

**Der Einfluss verschiedener Ölemulsionen und der
IL-6-Typ-Zytokine CNTF und LIF auf die Differenzierung von
3T3-L1-Prädipozyten zu Fettzellen**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim**

Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft

vorgelegt von

Antje Ulrike Stäbler
aus Chemnitz

2009

Die vorliegende Arbeit wurde am 01.09.2009 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Dekan:	Prof. Dr. Heinz Breer
1. Berichtende Person:	Prof. Dr. Lutz Graeve (Betreuer)
2. Berichtende Person:	Prof. Dr. Tilman Grune
3. Prüfer:	Prof. Dr. Christiane Bode

Eingereicht am:	24.06.2009
Tag der mündlichen Prüfung:	20.10.2009

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Insulin – Synthese, Wirkung und Signaltransduktion.....	1
1.1.1	Insulinrezeptor.....	3
1.1.2	Signaltransduktion des Insulinrezeptors.....	4
1.1.3	GLUT4	7
1.2	Diabetes mellitus Typ 2.....	8
1.3	PPARγ.....	10
1.4	Caveolin1.....	11
1.5	Fette in der Ernährung.....	13
1.6	Zytokine.....	14
1.6.1	IL-6-Typ-Zytokine	14
1.6.1.1	IL-6.....	15
1.6.1.2	CNTF.....	16
1.6.1.3	LIF.....	17
1.6.2	Adipokine	18
1.6.2.1	TNF α	18
1.6.2.2	Resistin.....	20
1.6.2.3	aP2.....	20
1.7	3T3-L1-Zellen als Adipozytenmodell	21
1.8	Ziele der Untersuchungen	22
2	MATERIAL UND METHODEN.....	23
2.1	Kultivierung von 3T3-L1-Zellen.....	23
2.1.1	Auftauen der Zellen.....	24
2.1.2	Einfrieren der Zellen	24
2.1.3	Differenzierung der 3T3-L1-Präadipozyten zu Adipozyten	25

2.1.4	Inkubation der Zellen mit verschiedenen Ölemulsionen bzw. Zytokinen	25
2.1.5	Stimulation der Zellen.....	26
2.2	Wachstumskinetik.....	27
2.3	Ermittlung der Zytotoxizität mittels MTT-Test.....	28
2.4	Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung mittels Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC/MS).....	29
2.5	Färbung der Zellen mit Oil Red O und Quantifizierung der Triglyzeride.....	30
2.6	Molekularbiologie.....	31
2.6.1	RNA-Isolierung.....	31
2.6.2	Quantitative und qualitative Überprüfung der RNA	32
2.6.3	Synthese der cDNA.....	34
2.6.4	Real Time PCR.....	35
2.6.4.1	Herstellung eines Standards für die Real Time PCR	36
2.6.4.2	Durchführung der Real Time PCR.....	39
2.7	Proteinbiochemie.....	43
2.7.1	Herstellung von Zelllysaten	43
2.7.2	Proteindetermination	44
2.7.3	Immunpräzipitation	45
2.7.4	SDS-PAGE.....	49
2.7.5	Western Blot.....	50
2.7.5.1	Semi-Dry Western Blot.....	51
2.7.5.2	Wet Western Blot	51
2.7.6	Immundetektion	52
2.8	Densitometrie und statistische Auswertung.....	56
3	ERGEBNISSE.....	57
3.1	Differenzierung von 3T3-L1-Prädipozyten zu Adipozyten mittels Insulin, IBMX und Dexamethason	57
3.2	Stimulation von 3T3-L1-Adipozyten mit Insulin	59

3.3 Wachstum, Vitalität und Fettsäurezusammensetzung von 3T3-L1-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Ölemulsionen	61
3.4 Einfluss verschiedener Ölemulsionen auf das Differenzierungsverhalten von 3T3-L1-Zellen	65
3.4.1 Differenzierung von 3T3-L1-Zellen mittels Insulin, IBMX und Dexamethason unter Zugabe verschiedener Ölemulsionen	65
3.4.2 Differenzierungspotential verschiedener Ölemulsionen in 3T3-L1-Prädipozyten	69
3.5 3T3-L1-Zellen unter dem Einfluss der proinflammatorischen Zytokine TNFα und IL-6.....	73
3.5.1 Einfluss verschiedener Ölemulsionen auf die TNF α -induzierte Differenzierungsinhibition in 3T3-L1-Zellen	73
3.5.2 Einfluss einer 24-stündigen TNF α - und/oder Ölinkubation auf ausdifferenzierte 3T3-L1-Adipozyten.....	77
3.5.3 Stimulierbarkeit differenzierter 3T3-L1-Adipozyten durch Insulin nach 24-stündiger Inkubation mit IL-6 bzw. TNF α und/oder Öl.....	79
3.6 Regulierung der CNTF-Signaltransduktion während der Differenzierung von 3T3-L1-Zellen	81
3.7 Einfluss der IL-6-Typ-Zytokine CNTF und LIF auf das Differenzierungsverhalten von 3T3-L1-Zellen	84
3.7.1 Differenzierung von 3T3-L1-Zellen mittels Insulin, IBMX und Dexamethason unter Zugabe der Zytokine CNTF bzw. LIF	84
3.7.2 Differenzierungspotential der Zytokine CNTF bzw. LIF in 3T3-L1-Prädipozyten	88
4 DISKUSSION	92
4.1 Differenzierung der 3T3-L1-Prädipozyten zu Fettzellen	93
4.2 Einfluss verschiedener Ölemulsionen auf das Differenzierungsverhalten von 3T3-L1-Zellen	96

4.3	Einfluss der IL-6-Typ-Zytokine CNTF und LIF auf das Differenzierungsverhalten von 3T3-L1-Zellen	106
5	ZUSAMMENFASSUNG	112
6	SUMMARY	113
7	LITERATURVERZEICHNIS	114
8	ANHANG	138
8.1	Abbildungsverzeichnis	138
8.2	Tabellenverzeichnis	141
8.3	Abkürzungsverzeichnis	142
8.4	Lebenslauf	146
8.5	Danksagung	147
8.6	Eidesstattliche Erklärung	148

1 Einleitung

1.1 Insulin – Synthese, Wirkung und Signaltransduktion

Für eine normale Funktionsfähigkeit aller Organe – insbesondere des Gehirns, dessen Stoffwechsel allein von Glucose abhängig ist – ist die Aufrechterhaltung eines relativ konstanten Blutglucosespiegels zwischen 4 und 7 mM trotz sich verändernder Ernährungsbedingungen und Aktivität des Organismus essentiell. Ermöglicht wird diese Konstanz durch ein Gleichgewicht zwischen intestinaler Glucoseaufnahme, der als Gluconeogenese bezeichneten Glucoseproduktion und -freisetzung durch die Leber sowie der Aufnahme und Metabolisierung der Blutglucose durch die peripheren Gewebe. Für die Regulation dieses Gleichgewichtes sind hauptsächlich die antagonistisch wirkenden Hormone Insulin und Glucagon verantwortlich. Für die Entdeckung des Insulins erhielten Banting und McLeod 1923 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin (Banting & Best, 1990). Es ist eines der ersten Proteine, das in reiner Form kristallisiert werden konnte (Abel, 1926) und das erste Protein, dessen Aminosäuresequenz aufgeklärt wurde (Sanger & Thompson, 1952; Sanger & Thompson, 1953b; Sanger & Thompson, 1953a; Sanger & Tuppy, 1951a; Sanger & Tuppy, 1951b). Aufgebaut ist es aus zwei Peptidketten, die als A-Kette mit 21 Aminosäuren und als B-Kette mit 30 Aminosäuren bezeichnet werden. Durch zwei Disulfidbrücken sind A- und B-Kette miteinander verbunden. Eine dritte Disulfidbrücke innerhalb der A-Kette trägt zur Stabilisierung der Raumstruktur des Proteins bei. Für die Biosynthese des Insulins sowie seine Speicherung und Freisetzung sind die zum endokrinen Teil des Pankreas gehörenden Langerhans'schen Inseln verantwortlich. Hier befinden sich neben den Insulin produzierenden β -Zellen auch die α -Zellen, in denen das als Gegenspieler wirkende Glucagon gebildet wird. Die enge Anbindung der β -Zellen an die arterielle Blutversorgung ermöglicht eine schnelle Reaktion der Insulinproduktion auf Änderungen des Blutglucosespiegels. Das Translationsprodukt des Insulingens ist das Präpro-Insulin, aus dem durch Abspaltung des Signalpeptids nach Einfädung der synthetisierten Peptidkette in das endoplasmatische Reticulum Proinsulin entsteht. Anschließend wird das zwischen der späteren A- und B-Kette liegende sogenannte C-Peptid durch eine spezifische Protease entfernt. Dieser Prozess findet im Golgi-Apparat sowie in den Granula der β -Zellen statt. In diesen β -Granula liegt das Insulin in stark kondensierter Form als Zinkkomplex vor. Im Blut

jedoch kommt es wahrscheinlich nur in monomerer Form vor. Der physiologische Reiz zur Ausschüttung des Insulins aus den β -Zellen besteht in einer Erhöhung der Glucosekonzentration in der extrazellulären Flüssigkeit. Der dadurch ebenfalls erhöhte intrazelluläre Glucosespiegel führt zu einem Anstieg des ATP/ADP-Verhältnisses in den β -Zellen, der die Schließung eines ATP-abhängigen K^+ -Kanals und somit die Depolarisierung der Zelle zur Folge hat. Diese wiederum öffnet einen spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanal. Der Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration löst schließlich die Exocytose der β -Granula aus. Das hierbei freigesetzte Insulin wirkt nicht auf alle Zellen des Organismus. Von den insulinempfindlichen Geweben haben die Muskulatur, das Fettgewebe und die Leber die größte Bedeutung für den Stoffwechsel. Bereits im Jahre 1955 gelangten zwei Studien zu der Erkenntnis, dass die wichtigste Wirkung des Insulins in der Stimulation der Glucoseaufnahme in die Skelettmuskulatur sowie das Fettgewebe besteht (Goldstein & Levine, 1955; Park & Johnson, 1955). Allgemein wirkt Insulin als anaboles Hormon, d. h. es begünstigt den Aufbau von Speichermolekülen (Abbildung 1). In der Muskelzelle aktiviert es vor allem die Glycogenbiosynthese und führt zu einer gesteigerten Glycolyse. Auch in der Fettzelle wird die Glycolyse stimuliert, wobei das gebildete Pyruvat durch Aktivierung des in den Mitochondrien lokalisierten Pyruvatdehydrogenase-Komplexes zu Acetyl-CoA decarboxyliert und somit zur Fettsäurebiosynthese verwendet werden kann. Das ebenfalls für die Fettsäuresynthese benötigte NADPH/ H^+ wird durch Abbau der Glucose im Pentosephosphatweg gebildet. Die synthetisierten Fettsäuren können dann in Form von Triglyzeriden gespeichert werden. Gleichzeitig führt die durch Aktivierung der cAMP-spezifischen Phosphodiesterase vermittelte Senkung des cAMP-Spiegels zur Hemmung der Lipolyse in den Fettzellen. Der niedrige cAMP-Spiegel ist außerdem verantwortlich für die Hemmung der Glycogenolyse und die Stimulierung der Glycogensynthese in Leber und Skelettmuskel sowie die Hemmung der Gluconeogenese in der Leber. Auch Aminosäuren werden durch Insulin vermehrt in die Zellen aufgenommen und in Proteine eingebaut und tragen auf diese Weise zum Wachstum der Zelle bzw. des Organismus bei.

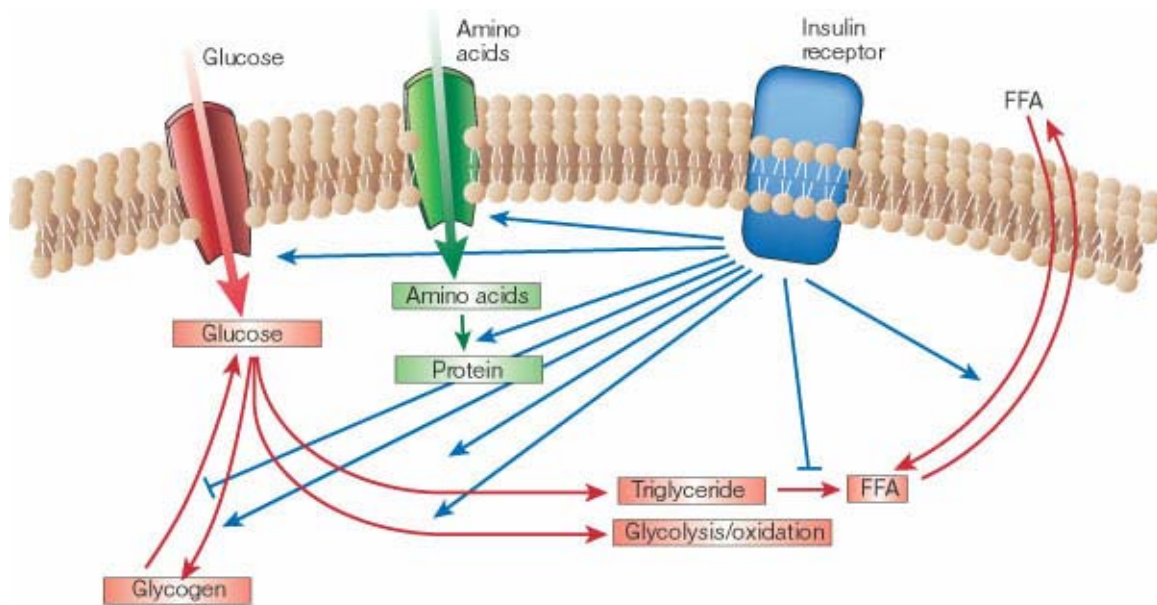


Abbildung 1: Stoffwechselregulation durch Insulin

Insulin wirkt als anaboles Hormon. Es fördert die Speicherung von Kohlenhydraten, Lipiden und Proteinen und hemmt ihren Abbau. (Saltiel & Kahn, 2001)

Insulin ist jedoch auch an einer Reihe weiterer biologischer Prozesse beteiligt. So ist die Insulinsignaltransduktion im Zentralnervensystem von Bedeutung für die Kontrolle der Nahrungsaufnahme und des Sättigungsgefühls, aber auch für die Fortpflanzung (Bruning *et al.*, 2000; Baskin *et al.*, 1999). Insulin konnte bereits mit neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden (Schubert *et al.*, 2004). Es beeinflusst Wachstum und Differenzierung von Nervenzellen (Heidenreich, 1993; Robinson *et al.*, 1994). Des Weiteren moduliert Insulin den vaskulären Tonus (Kuboki *et al.*, 2000) und spielt eine Rolle bei Alterungsprozessen (Blüher *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005).

1.1.1 Insulinrezeptor

Das Insulinsignal wird durch Vermittlung seines spezifischen Rezeptors ins Innere der Zelle transportiert. Der Insulinrezeptor gehört zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen. Es handelt sich um ein durch Disulfidbrücken stabilisiertes heterotetrameres Glycoprotein, das aus zwei α -Untereinheiten ($IR\alpha$) mit einem Molekulargewicht von je ca. 135 kDa sowie zwei β -Untereinheiten ($IR\beta$) mit einem Molekulargewicht von je ca. 95 kDa besteht (Van Obberghen, 1994). Die α -Untereinheiten befinden sich auf

der extrazellulären Seite und sind für die Ligandenbindung sowie für die allosterische Regulierung der β -Untereinheiten verantwortlich. Letztere besitzen sowohl einen extrazellulären sowie einen transmembranären und einen zytoplasmatischen Teil, der mit Hilfe seiner intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität das Signal weiterleitet. Durch Bindung des Insulins an die α -Untereinheiten wird die Inhibierung der Kinaseaktivität der β -Untereinheiten aufgehoben. In der Folge kommt es zur Transphosphorylierung im intrazellulären Teil der β -Ketten sowie zu einer Konformationsänderung, welche die Kinaseaktivität weiter erhöht (Patti & Kahn, 1998).

1.1.2 Signaltransduktion des Insulinrezeptors

Nach der Autophosphorylierung des Insulinrezeptors katalysiert dieser die Phosphorylierung verschiedener intrazellulärer Proteine. Dazu gehören die Insulinrezeptor-substrate (IRS) sowie Shc und Cbl. Nach erfolgter Tyrosinphosphorylierung interagieren diese Proteine wiederum mit weiteren Signalmolekülen über deren SH2 (*src-homology-2*)-Domäne. Im Wesentlichen können drei durch Insulin ausgelöste Signalwege unterschieden werden – der PI(3)K (Phosphatidylinositol-3-Kinase)-Weg, der MAPK (mitogenaktivierte Proteinkinase)-Weg und der CAP/Cbl-Weg (Abbildung 2).

Am Anfang des PI(3)K-Weges steht die Phosphorylierung der IRS-Proteine. Die Proteine der IRS-Familie (1-4) sind homolog, wirken aber eher komplementär als redundant. So sind IRS3 und IRS4 negative Regulatoren von IRS1 und IRS2 (Tsuruzoe *et al.*, 2001). PI(3)K besteht aus einer katalytischen p110-Untereinheit sowie einer regulatorischen p85-Untereinheit, die zwei SH2-Domänen besitzt, welche mit bestimmten Tyrosinmotiven der IRS-Proteine interagieren, wenn diese phosphoryliert sind (Myers *et al.*, 1992). PI(3)K katalysiert in der Folge die Phosphorylierung von PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) zu PIP₃ (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat), das an die PH (*pleckstrin homology*)-Domäne verschiedener Signalmoleküle bindet und deren Aktivierung bzw. subzelluläre Lokalisation beeinflusst (Lietzke *et al.*, 2000). Zu den durch PIP₃ regulierten Enzymen gehört beispielsweise PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase 1*), eine Serinkinase, die zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) führt (Alessi *et al.*, 1997). Akt selbst besitzt ebenfalls eine PH-Domäne und interagiert auch direkt mit PIP₃. Zu den durch Akt phosphorylierten Substraten gehört GSK-3 (Glycogensynthasekinase-3), ein negati-

ver Regulator der Glycogen- und Proteinsynthese, welcher durch Phosphorylierung inaktiviert wird (Cross *et al.*, 1995). Der PI(3)K-Weg spielt eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der metabolischen und mitogenen Effekte des Insulins (Shepherd *et al.*, 1995). Die Inhibierung dieses Signalweges führte in verschiedenen Studien zur Hemmung der Glycogen-, Lipid- und Proteinsynthese sowie zur Beeinträchtigung der Translokation des Glucosetransporters GLUT4 zur Membran (Lin & Lawrence, 1997; Okada *et al.*, 1994; Shepherd *et al.*, 1995).

Auch der MAPK-Weg wird durch die Phosphorylierung von IRS eingeleitet. Daneben spielt auch die Phosphorylierung von Shc eine Rolle. Im weiteren Verlauf wird mit Hilfe des Adapterproteins Grb2 das Protein SOS zur Membran rekrutiert, wo es das G-Protein Ras aktiviert. Letzteres löst eine Serinkinasekaskade durch die schrittweise Aktivierung von Raf, MEK und Erk (*extracellular signal-related kinase*) aus. Die MAP-Kinase Erk setzt schließlich durch Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren die Transkription der für Proliferation und Differenzierung wesentlichen Gene in Gang (Boulton *et al.*, 1991). Die Inhibierung dieses Signalweges führt zur Hemmung des insulinstimulierten Zellwachstums, hat aber keinen Einfluss auf die metabolische Wirkung des Hormons (Lazar *et al.*, 1995). Über den MAPK-Weg werden auch mitogene Effekte verschiedener Wachstumsfaktorrezeptoren vermittelt (Boney *et al.*, 2000).

Im CAP/Cbl-Signalweg wird das Protoonkogen Cbl durch den aktivierten Insulinrezeptor phosphoryliert (Ribon & Saltiel, 1997). Vermittelt wird diese Interaktion durch das Adapterprotein APS, das ebenfalls durch die Tyrosinkinaseaktivität des Insulinrezeptors phosphoryliert wird. Cbl ist mit dem Adapterprotein CAP über dessen SH3-Domäne assoziiert (Ribon *et al.*, 1998a). Nach Phosphorylierung interagiert der Cbl-CAP-Komplex mit dem Protein Flotillin und transloziert zu caveolinreichen Detergenz-resistenten Membrandomänen (Caveolae) (Baumann *et al.*, 2000). Über seine SH2-Domäne interagiert im Anschluss das Adapterprotein CrkII, das einen konstitutiven Komplex mit C3G bildet, mit dem phosphorylierten Cbl. C3G katalysiert den Austausch von GDP durch GTP und damit die Aktivierung des ebenfalls in Caveolae lokalisierten G-Proteins TC10 (Chiang *et al.*, 2001). Die Assoziation von TC10 mit Detergenz-resistenten Membrandomänen ist unerlässlich für seine Aktivierbarkeit durch Insulin (Watson *et al.*, 2001). Über die Aktivierung von TC10 erfolgt schließlich die Translokation von GLUT4 an die Plasmamembran.

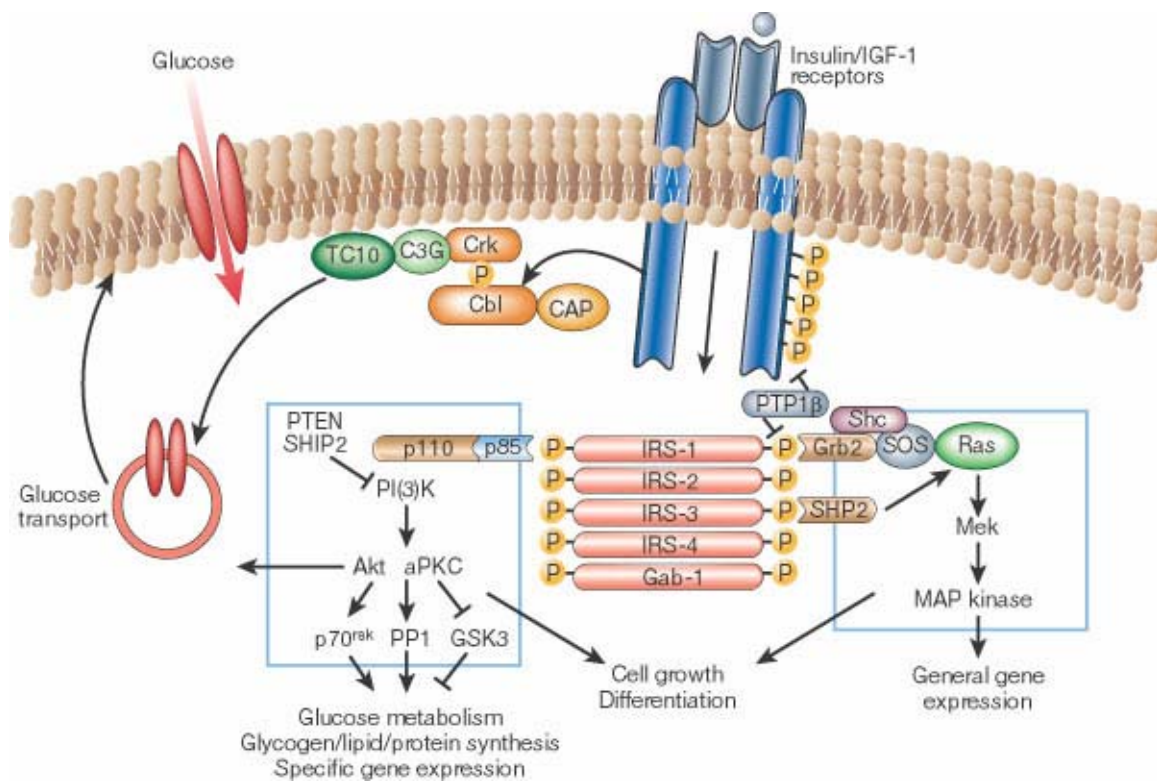


Abbildung 2: Signaltransduktion des Insulinrezeptors

Im Wesentlichen werden drei Signalwege unterschieden: MAPK-Weg, PI(3)K-Weg und CAP/Cbl-Weg. (Saltiel & Kahn, 2001)

Die hier beschriebenen Signalwege stellen nur einen Auszug der komplexen Insulin-signaltransduktion dar, sie werden des Weiteren durch insulinunabhängige Signale beeinflusst und sind auch untereinander verknüpft. Der Insulinrezeptor selbst ist die einzige Komponente dieser Signalprozesse, die allein der Aktivierung durch Insulin unterliegt (Youngren, 2007). Deshalb ist die negative Regulation dieses spezifischen Rezeptors von besonderer Bedeutung für die Wirksamkeit von Insulin. Inhibiert wird das Insulinsignal beispielsweise durch Dephosphorylierung des Insulinrezeptors sowie seiner Substrate mit Hilfe von Proteintyrosinphosphatasen (PTPasen). So konnte gezeigt werden, dass ein Knockout der zytosolischen Phosphatase PTP1B zu erhöhter Tyrosinphosphorylierung von IR und IRS führt sowie zu verbesserter Insulinsensitivität (Elchebly *et al.*, 1999). Des Weiteren kann die Autophosphorylierung der Tyrosinreste des Rezeptors durch eine Serinphosphorylierung verhindert werden. Eine entsprechende Serinkinaseaktivität besitzt z. B. Proteinkinase C (PKC), die unter anderem durch freie Fettsäuren aktiviert werden kann (Griffin *et al.*, 1999). Außerdem kann die Weiterleitung des Insulinsignals durch Bindung inhibitorischer

Proteine an den Insulinrezeptor beeinträchtigt werden. Zu diesen gehören die SOCS (*suppressor of cytokine signaling*)-Proteine. In Studien konnte gezeigt werden, dass SOCS-1, SOCS-3 und SOCS-6 in der Lage sind, an den Insulinrezeptor zu binden (Emanuelli *et al.*, 2000; Mooney *et al.*, 2001). Da die Expression der SOCS-Proteine durch verschiedene Zytokine induziert wird (Yasukawa *et al.*, 2000), ist es naheliegend, dass sie an der Entstehung der Insulinresistenz durch inflammatorische Prozesse beteiligt sind.

1.1.3 GLUT4

Da Glucose die Lipiddoppelschicht der Membran nicht passieren kann, bedarf es für den Transport in die Zellen spezifischer als Glucosetransporter (GLUT) bezeichneter Carrierproteine. Diese ermöglichen die sogenannte erleichterte Diffusion der Glucose, indem sie einen wassergefüllten Kanal in der Membran bilden (Lachaal *et al.*, 1996). Dabei wird die Glucose entlang ihres Konzentrationsgradienten transportiert. Alle GLUTs besitzen zwölf Transmembrandomänen, wobei die transmembranären Bereiche hochkonserviert sind, wohingegen die zytoplasmatischen und exoplasmatischen Domänen weniger stark konserviert sind (Jung, 1998). Der Transport verläuft nach folgendem Prinzip: Zunächst bindet das Substrat über Wasserstoffbrücken an hydrophile Reste der im inneren Bereich der Transporter gelegenen Aminosäuren (Barnett & Fergus, 1971). Daraufhin kommt es zu einer Konformationsänderung und zur Freisetzung des Substrates auf der intrazellulären Seite. Die GLUT-Familie umfasst 14 verschiedene Moleküle, von denen elf Glucose transportieren (Scheepers *et al.*, 2004). Die Verteilung der GLUTs ist gewebespezifisch. Außerdem verfügen sie über eine Substratspezifität und unterscheiden sich in ihren kinetischen Eigenschaften sowie in ihrer Regulierbarkeit durch Hormone und metabolische Einflüsse (Wood & Trayhurn, 2003). Der in Leber und Pankreas exprimierte GLUT2 gehört zu den insulinunabhängigen Glucosetransportern. Er besitzt eine geringe Affinität zu seinem Substrat, wodurch die intrazelluläre Glucosekonzentration und damit die Glycolyserate und der ATP/ADP-Quotient der GLUT2-tragenden Zellen direkt abhängig sind von der Blutglucosekonzentration. Auf diese Weise ist GLUT2 ein Teil des Messapparates für den Glucosespiegel und aktiviert so die Insulinsynthese und -freisetzung in den β -Zellen des Pankreas sowie inhibiert den Glycogenabbau in der Leber. Im Fettgewebe werden acht verschiedene GLUTs exprimiert (GLUT1, GLUT3, GLUT4,

GLUT5, GLUT8, GLUT10, GLUT12, GLUT13 (HMIT)) (Wood *et al.*, 2003). Der insulinabhängige GLUT4 kommt nur im Fettgewebe und in den Zellen der gestreiften Muskulatur vor. Insulin erhöht den Glucosetransport in Fett- und Muskelzellen durch Stimulation der Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran. GLUT4 liegt in der Zelle in speziellen Vesikeln gespeichert vor, die fortwährend zwischen Zytosol und Plasmamembran zirkulieren. Durch Insulin wird die Exocytose dieser Vesikel verstärkt und die Internalisierungsrate verringert und so das Gleichgewicht zugunsten einer erhöhten Anzahl von GLUT4 in der Membran verschoben (Pessin *et al.*, 1999). Vermittelt wird die GLUT4-Translokation sowohl durch den PI(3)K-Signalweg als auch durch den CAP/Cbl-Signalweg. Außerdem ist das mikrotubuläre Netzwerk am Transport der GLUT4-Vesikel beteiligt (Guilherme *et al.*, 2000).

1.2 Diabetes mellitus Typ 2

Nach Angaben der Internationalen Diabetes-Föderation (IDF) betrug die Anzahl der Diabetiker im Jahre 2006 weltweit 246 Millionen. Gelingt es nicht, einschneidende Maßnahmen im Kampf gegen Diabetes zu ergreifen, könnten es in etwa 20 Jahren bereits 380 Millionen Diabetiker sein. Die Krankheit ist für 3,8 Millionen Todesfälle pro Jahr verantwortlich. Beim Diabetes mellitus handelt es sich um eine Stoffwechselerkrankung, die auf einem relativen oder absoluten Insulinmangel beruht. Der sogenannte Typ-1-Diabetes entsteht meist durch eine autoimmun bedingte Schädigung der β -Zellen der Langerhans'schen Inseln und hat einen absoluten Insulinmangel zur Folge, der durch eine Substitutionstherapie mit Insulin ausgeglichen werden kann. Als mögliche Ursachen für diese Autoimmunreaktion werden neben genetischen und ernährungsabhängigen Faktoren auch Stress und bestimmte Virusinfektionen diskutiert. Die weitaus größere Zahl von Diabetikern leidet jedoch am sogenannten Typ-2-Diabetes. Im Gegensatz zum Typ-1-Diabetes ist hier der klinische Verlauf nicht abrupt, sondern eher schleichend. Zunächst kommt es durch eine beginnende periphere Insulinresistenz zu einer schwach ausgeprägten Hyperglykämie bei gleichzeitig erhöhtem Insulinspiegel (Warram *et al.*, 1990). In diesem Stadium ist die β -Zelle meist noch in der Lage, große Mengen an Insulin auszuschütten. Auf Grund zunehmender Resistenz der Zielgewebe Skelettmuskulatur, Fettgewebe und Leber gegenüber dem Hormon Insulin kommt es zum weiteren Anstieg des Blutglucosespiegels und schließlich auch zu einer Sekretionsstörung der β -Zellen (Chang-Chen *et al.*,

2008). Neben einer genetischen Prädisposition gelten auch Umweltfaktoren – vor allem eine fettreiche Ernährung, Übergewicht und Bewegungsmangel – als Ursachen für die Entstehung dieser Krankheit. Dabei scheint jedoch auch die Fettverteilung von Bedeutung zu sein. So wird eine Insulinresistenz hauptsächlich durch die Akkumulation von viszeralem Fettgewebe ausgelöst (Despres *et al.*, 2001). Verschiedene Faktoren, die von Fettzellen freigesetzt werden, rücken zunehmend als Mediatoren der Insulinresistenz ins Zentrum des Interesses (Hajer *et al.*, 2008). Daneben spielt der auf Grund der im insulinresistenten Zustand nicht gehemmten Lipolyse erhöhte freie Fettsäurespiegel eine wichtige Rolle. Die hohe Konzentration freier Fettsäuren im Blut scheint vor allem an der Entstehung entzündlicher Prozesse beteiligt zu sein, die letztendlich zur Inhibierung des Insulinsignals führen (Lee *et al.*, 2001; Suganami *et al.*, 2005; Suganami *et al.*, 2007). Eine Störung des Insulinsignals kann auf vielen Ebenen erfolgen (Kashyap & Defronzo, 2007; Pessin & Saltiel, 2000). Es hat sich jedoch gezeigt, dass die Störung meist auf Postrezeptorebene zu suchen ist. Wird die diabetische Stoffwechselproblematik nicht ausreichend behandelt, so kommt es durch die anhaltende Hyperglykämie sowie die als Metabolisches Syndrom bezeichneten Störungen wie Hyperlipidämie und arterielle Hypertonie zum diabetischen Spätsyndrom (Goriya *et al.*, 2000). Durch gesteigerte nichtenzymatische Glycosylierung von Proteinen und die Bildung von sogenannten *advanced glycation endproducts* (AGE-Produkte) entstehen Mikroangiopathien. Durch diese werden in erster Linie die Nieren (Nephropathie) und die Netzhaut (Retinopathie) geschädigt. Außerdem führt die gestörte Osmoregulation zur Trübung und Schwellung der Augenlinse und damit schließlich zur Erblindung. Auf Grund der Hypertonie sowie des durch die Dyslipidämie erhöhten Arteriosklerosisrisikos entstehen unspezifische Makroangiopathien, die zu zerebralen, koronaren und peripheren Durchblutungsstörungen führen. Eine Stoffwechsellnormalisierung ist wesentlich für die Vermeidung dieser gesundheitlichen Komplikationen. Neben einer Gewichtsreduktion und vermehrter körperlicher Bewegung (Jung *et al.*, 2008) sind dabei antidiabetisch wirksame Medikamente von Bedeutung. Als Antidiabetika kommen mehrere Substanzgruppen mit verschiedenartigen Wirkprinzipien zum Einsatz. Beispiele hierfür sind α -Glucosidase-Hemmer, die die Glucoseaufnahme aus dem Darm in das Blut hemmen (Chiasson *et al.*, 2002), Biguanide, welche die endogene Glucoseproduktion über Aktivierung der Kinase AMPK verringern (Knowler *et al.*, 2002) oder die Insulinsekretion anregende Sulfonylharnstoffe. Eine weitere Gruppe von Antidiabetika bilden die Thiazolidindio-

ne, zu denen beispielsweise die Medikamente Pioglitazon und Rosiglitazon gehören. Dabei handelt es sich um Agonisten des nukleären Rezeptors PPAR γ (siehe Abschnitt 1.3). Die Behandlung mit Thiazolidindionen führt zur Normalisierung des Blutglucosespiegels sowie zu einer verringerten Konzentration an Triglyzeriden und freien Fettsäuren (Freed *et al.*, 2002). Der Nachteil dieser Behandlung besteht allerdings in einer Zunahme des Körperfettes. Obwohl dabei offenbar bevorzugt subkutane und weniger viszerale Fettdepots entstehen, ist die langfristige Auswirkung dieser Gewichtszunahme auf den Gesundheitszustand des Diabetikers unklar (Larsen *et al.*, 2003).

1.3 PPAR γ

PPAR α , PPAR β/δ und PPAR γ sind ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren und gehören zur Superfamilie der nukleären Hormonrezeptoren. Neben den sogenannten SREBPs (*sterol regulatory element-binding proteins*) spielen die PPARs (*peroxisome proliferator-activated receptors*) als Transkriptionsfaktoren eine Schlüsselrolle in Entwicklung und Metabolismus der Fettzellen (Shimomura *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu den Steroidhormonrezeptoren, die als Homodimer agieren, bilden die PPARs Heterodimere mit dem Rezeptor für 9-cis-Retinsäure (RXR) (Kliewer *et al.*, 1992). Diese Heterodimere werden jedoch erst durch Bindung eines entsprechenden Liganden aktiviert (Feige *et al.*, 2005) und beeinflussen daraufhin die Transkription durch Interaktion mit als PPREs (*peroxisome proliferator response element*) bezeichneten DNA-Sequenzen (Tugwood *et al.*, 1992). PPAR α wird vor allem in denjenigen Organen stark exprimiert, in denen der Katabolismus von Fettsäuren eine wichtige Rolle spielt – dazu gehören z. B. Leber, Herz, Nieren und braunes Fettgewebe (Mandard *et al.*, 2004). Seine Hauptaufgabe besteht in der Regulation der Energiehomöostase (Lefebvre *et al.*, 2006). PPAR β/δ besitzt ein sehr breites Expressionsmuster. Es ist ebenfalls an der Regulierung der Energiehomöostase beteiligt (Wang *et al.*, 2003), spielt aber des Weiteren eine Rolle in der Kontrolle der Zellproliferation und -differenzierung sowie in der Wundheilung (Tan *et al.*, 2004). Vom PPAR γ existieren zwei Isoformen – PPAR γ 1 und PPAR γ 2 (Zhu *et al.*, 1995). Das am N-Terminus um 30 Aminosäuren kürzere PPAR γ 1 hat ein relativ breites Expressionsspektrum, wohingegen PPAR γ 2 hauptsächlich in Adipozyten zu finden ist (Chawla *et al.*, 1994).

Hier aktiviert es die Transkription verschiedener, in die Differenzierung der Adipozyten sowie den Fettsäurestoffwechsel involvierter Gene wie z. B. der Lipoproteinlipase (LPL) (Schoonjans *et al.*, 1996), der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) (Tontonoz *et al.*, 1995), des Fettsäure-bindenden Proteins 4 (aP2, siehe 1.6.2.3) (Ross *et al.*, 1990) sowie des UCP1 (*uncoupling protein 1*) (Sears *et al.*, 1996). Neben der Differenzierung von Präadipozyten und der Speicherung von Fettsäuren (Rosen & Spiegelman, 2001) stimuliert es außerdem die GLUT4-Expression (Wu *et al.*, 1998) und beeinflusst die Freisetzung der Adipokine (Walczak & Tontonoz, 2002). Die Aktivierung von PPAR γ führt zur Hyperplasie der Fettzellen durch Einlagerung von Triglyzeriden aus zirkulierenden Lipoproteinen und resultiert indirekt in niedrigeren Insulinspiegeln sowie einer geringeren Blutkonzentration an freien Fettsäuren (de Souza *et al.*, 2001). Des Weiteren wirkt die Aktivierung von PPAR γ antiinflammatorisch, was ebenfalls zu seiner Bedeutung im Zusammenhang mit Arteriosklerose und Diabetes beiträgt (Ricote *et al.*, 1998). Zu den endogenen PPAR γ -Liganden gehören Prostaglandin J2 (Kliwer *et al.*, 1995) sowie verschiedene Fettsäuren und deren Metabolite (Kliwer *et al.*, 1997; Krey *et al.*, 1997). Außerdem kann PPAR γ durch synthetische Liganden wie die bereits in Abschnitt 1.2 beschriebenen Thiazolidindione aktiviert werden.

1.4 Caveolin1

Bislang sind drei Caveoline bekannt, wobei Caveolin1 am besten untersucht ist. Von diesem Protein existieren zwei Isoformen: Caveolin1 α mit 24 kDa und Caveolin1 β mit 21 kDa, welche sich durch Nutzung eines alternativen Translationsstartpunktes um 31 Aminosäuren am N-Terminus unterscheiden (Scherer *et al.*, 1995a). Caveolin1 findet sich in großer Menge in Endothel- und Epithelzellen sowie in Adipozyten. In letzteren wird es während der Differenzierung stark induziert (Scherer *et al.*, 1994). Caveolin2 wird in den gleichen Geweben exprimiert wie Caveolin1, wo es mit diesem funktionelle Heterooligomere aus 14-16 Untereinheiten bildet (Scherer *et al.*, 1997). Caveolin3 dagegen wird hauptsächlich in Muskelzellen gebildet (Tang *et al.*, 1996). Seit Caveolin im Jahre 1992 als Hauptproteinkomponente der sogenannten Caveolae entdeckt wurde (Rothberg *et al.*, 1992), ist die Forschung auf diesem Gebiet stark intensiviert worden. Caveolae sind reich an Cholesterin und Sphingolipiden und stel-

len eine Untergruppe der Detergenz-resistenten Membrandomänen dar. Sie bilden mit Hilfe eines aus Caveolinmolekülen zusammengesetzten Gerüsts flaschenförmige Einstülpungen in der Plasmamembran. Caveolae spielen nicht nur eine wichtige Rolle bei der Endozytose und Transzytose, sondern sind auch für die Rekrutierung und die Signaltransduktion verschiedenster Signalmoleküle von Bedeutung. Caveolin1 kann verschiedene Proteine durch direkte Interaktion inhibieren oder aktivieren, indem seine sogenannte *scaffolding domain* mit hydrophoben, aromatische Aminosäuren enthaltenden Sequenzen der Interaktionspartner in Wechselwirkung tritt (Couet *et al.*, 1997a). Zu den auf diese Weise inhibierten Proteinen gehört die Proteinkinase A (PKA) (Razani *et al.*, 1999), eine entsprechende Aktivierung wurde für den Insulinrezeptor gezeigt (Yamamoto *et al.*, 1998). Auch für GLUT4 konnte eine Beteiligung der Caveolae an für die Signalweiterleitung und ordnungsgemäße Funktion der Proteine wesentlichen Prozessen gezeigt werden (Karlsson *et al.*, 2002; Yuan *et al.*, 2007), wobei die genauen Zusammenhänge allerdings noch unklar sind. Dass Caveolin bei der Reaktion auf Insulin eine wichtige Rolle spielt, ist jedoch unumstritten. Beispielsweise bilden Caveolin1-defiziente Mäuse eine Insulinresistenz aus und exprimieren etwa 90% weniger Insulinrezeptorprotein (Cohen *et al.*, 2003). Caveoline konnten von mehreren Arbeitsgruppen in der Randschicht zytoplasmatischer Fetttröpfchen nachgewiesen werden (Fujimoto *et al.*, 2001; Ostermeyer *et al.*, 2001; Pol *et al.*, 2001). Sie sind nicht nur in der Lage Cholesterin zu binden (Murata *et al.*, 1995), sondern sind offenbar an dessen Transport von der Zelloberfläche zu den Speichervesikeln beteiligt (Le Lay *et al.*, 2006). Fettsäuren werden möglicherweise ebenfalls caveolinabhängig in die Zelle aufgenommen. So ist Caveolin1 beispielsweise unerlässlich für die Lokalisation und Funktionalität der Fettsäuretranslokase FAT/CD36 in der Plasmamembran embryonaler Mäusefibroblasten (Ring *et al.*, 2006). Des Weiteren findet die Synthese von Triglyzeriden aus exogen zugeführten Fettsäuren möglicherweise innerhalb der membranständigen Caveolae statt (Ost *et al.*, 2005). Auf diese Weise könnte Caveolin durch Abschnürung dieser fettreichen Caveolae von der Plasmamembran direkt an der Bildung der intrazellulären Fetttröpfchen beteiligt sein (Le Lay *et al.*, 2008).

1.5 Fette in der Ernährung

Fett hat mit 9 kcal/g von allen Nährstoffen den höchsten Energiegehalt. Nahrungsfette, zu denen neben Triglyzeriden auch Phospholipide, Sphingomyeline und Cholesterin gehören, dienen jedoch nicht nur als Energielieferant. Sie sind auch Träger der fettlöslichen Vitamine und Lieferant essentieller Fettsäuren, aus denen im Körper wichtige Gewebshormone synthetisiert werden. Nach der Nahrungsaufnahme werden durch Hydrolyse der Triglyzeride in triglyzeridreichen Lipoproteinen (VLDL, Chylomikronen und deren Remnants) mittels Lipoproteinlipase (LPL) freie Fettsäuren aus dem Blut in die Zellen aufgenommen. Hier werden sie wiederum in Form von Triglyzeriden gespeichert, sind aber auch am Aufbau der Plasmamembran sowie an verschiedenen Signalprozessen beteiligt. Umgekehrt werden Fettsäuren durch Hydrolyse der Triglyzeride im Adipozyten mit Hilfe der hormonsensitiven Lipase (HSL) aus dem Fettgewebe mobilisiert. Der Fettgehalt der Adipozyten wird hauptsächlich durch Insulin reguliert, da es als Aktivator der LPL sowie als Inhibitor der HSL wirkt (Hajer *et al.*, 2008). Eine hohe Fettzufuhr über die Nahrung wird mit der Entstehung von Adipositas, Diabetes, Arteriosklerose und Krebs in Verbindung gebracht. Jedoch hat sich gezeigt, dass nicht nur die Quantität, sondern ebenso die Qualität der aufgenommenen Fette von Bedeutung ist. So hat in den letzten Jahren vor allem die mediterrane Ernährung mit ihrem besonders hohen Anteil an Olivenöl auf Grund ihrer positiven Wirkung auf die Gesundheit Berühmtheit erlangt. Einfach ungesättigte Fettsäuren, wie sie im Olivenöl reichlich vorhanden sind, wirken sich günstig auf verschiedene kardiovaskuläre Risikofaktoren wie z. B. die Lipoproteinzusammensetzung des Blutes (Kris-Etherton, 1999) oder den Blutdruck aus (Ros, 2003). Auch im Zusammenhang mit Diabetes wird nicht mehr nur der Kohlenhydratzufuhr Beachtung geschenkt, sondern zunehmend auch der Einfluss verschiedener Fette auf den gesamten Metabolismus erkannt. Im direkten Vergleich führte eine an Sonnenblumenöl und damit an Linolsäure reiche Diät bei Diabetikern zu höheren Blutglucose und -insulinspiegeln als eine an Ölsäure reiche Olivenöldiät (Madigan *et al.*, 2000). Mehrfach ungesättigte Fettsäuren hingegen reduzieren die Mortalität und Morbidität bei Herzinfarktpatienten (von Schacky, 2007). Besonders mehrfach ungesättigte Omega-3-Fettsäuren zeigen vorteilhafte Effekte auf Entzündungsprozesse, die unter anderem an der Etablierung des metabolischen Syndroms beteiligt sind (Calder, 2006). Zudem wird eine Diät, die sich auf die qualitative Zusammensetzung

der Nahrungsfette konzentriert, im Allgemeinen besser von den Patienten angenommen als eine fettarme Diät (Ros, 2003). Fettemulsionen sind mittlerweile auch für die parenterale Ernährung entdeckt worden. Sie haben den Vorteil, dass in einem relativ kleinen Volumen große Energiemengen angeboten werden können. Die in dieser Arbeit verwendeten kommerziell erhältlichen Emulsionen Salvilipid[®] und ClinOleic[®] bestehen aus Sojaöl bzw. aus Olivenöl mit 20% Sojaölaufsatz. Die Kombination aus Olivenöl und Sojaöl in diesem Verhältnis gewährleistet einerseits eine ausreichende Zufuhr an essentiellen Fettsäuren und bietet andererseits die positiven Eigenschaften des Olivenöls und einen Schutz vor der immunsuppressiven Wirkung einer zu hohen Linolsäuredosis (Battistella *et al.*, 1997; Granato *et al.*, 2000). Die infundierten Fettpartikel entsprechen in ihrer Größe den physiologischen Chylomikronen (Produktinformation der Firma Baxter). Nach hydrolytischer Spaltung der Triglyzeride durch die LPL werden die freigesetzten Fettsäuren an Albumin gebunden transportiert.

1.6 Zytokine

Zytokine sind meist kleine Polypeptide, die eine wichtige Rolle beim Wachstum und bei der Differenzierung von Zellen sowie bei der Regulation der Immunantwort spielen. Sie werden von verschiedensten Zelltypen gebildet und in der Regel innerhalb kurzer Zeit nach Stimulation synthetisiert und sezerniert. Sie wirken auto-, para- oder endokrin im pico- bis nanomolaren Bereich. Sie können sich gegenseitig additiv, synergistisch oder antagonistisch beeinflussen. Ein Zytokin kann auf unterschiedliche Zelltypen wirken (Pleiotropismus) und verschiedene Zytokine können auf ihren Zielzellen Gleiches bewirken (Redundanz). Sie werden auf Grund ihrer Wirkung, ihrer Rezeptoren oder ihrer dreidimensionalen Struktur in Gruppen eingeteilt.

1.6.1 IL-6-Typ-Zytokine

Zur Gruppe der Interleukin-6-Typ-Zytokine gehören neben Interleukin-6 (IL-6) auch Interleukin-11 (IL-11), Interleukin-27 (IL-27), *leukemia inhibitory factor* (LIF), *oncostatin M* (OSM), *ciliary neurotrophic factor* (CNTF), Neuropoietin (NPN), Cardiotrophin-1 (CT-1) und *cardiotrophin-like cytokine/novel neurotrophin-1/B-cell-stimulating factor-3* (CLC/NNT-1/BSF-3) (Fasnacht & Muller, 2008). Allen gemeinsam ist das Glycopro-

tein gp130 als für die Signalweiterleitung verantwortlicher Teil des Rezeptorkomplexes und der in der Folge ausgelöste Jak/STAT-Signalweg. Die Signaltransduktion wird nach Ligandenbindung durch die Komplexbildung aus gp130 und gegebenenfalls dem LIF-Rezeptor (LIFR) bzw. dem OSM-Rezeptor (OSMR) als weitere signalleitende Komponente sowie teilweise einem zytokinspezifischen α -Rezeptor ausgelöst (Heinrich *et al.*, 1998). Die somit aktivierten, rezeptorassoziierten Januskinasen Jak1, Jak2 und/oder Tyk2 (Stahl *et al.*, 1994) phosphorylieren Tyrosinreste im zytoplasmatischen Bereich der Rezeptoren, die dann als Rekrutierungsstellen für Proteine mit SH2-Domänen fungieren. Zu diesen gehören die STAT (*signal transducer and activator of transcription*)-Faktoren, die Tyrosinphosphatase SHP-2 (Stahl *et al.*, 1995) und Proteine der SOCS-Familie, die für eine negative Rückkopplung des Signals sorgen. Die STAT-Faktoren – in den meisten Fällen STAT1 und STAT3 – werden ihrerseits phosphoryliert und translozieren als Homo- bzw. Heterodimere in den Zellkern, wo sie die Transkription verschiedener Zielgene beeinflussen (Gerhartz *et al.*, 1996). Neben dem Jak/STAT-Signalweg wird über SHP-2 auch der MAPK-Weg durch IL-6-Typ-Zytokine aktiviert (Schiemann *et al.*, 1997). Zu den negativen Regulatoren dieser Signalprozesse gehören außer den bereits erwähnten SOCS-Proteinen, die eine unkontrollierte Reaktion auf den Stimulus unter anderem durch Hemmung der Januskinasen verhindern (Larsen & Ropke, 2002), auch die sogenannten PIAS (*protein inhibitors of activated STATs*), welche mit STAT-Faktoren assoziieren und so deren Bindung an die entsprechenden DNA-Sequenzen zuvorkommen (Chung *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998).

1.6.1.1 IL-6

IL-6 bindet zunächst an seinen spezifischen α -Rezeptor IL-6R (Yamasaki *et al.*, 1988), der nicht an der intrazellulären Signalkaskade beteiligt ist, und rekrutiert dann gp130 als weiteren Bestandteil des Rezeptorkomplexes (Murakami *et al.*, 1993). Im Allgemeinen wird IL-6 als proinflammatorisches Zytokin angesehen, es konnten aber auch antiinflammatorische Eigenschaften wie die Hemmung der Produktion anderer proinflammatorischer Zytokine – z. B. TNF α und IL-1 β – nachgewiesen werden (Schindler *et al.*, 1990; Tilg *et al.*, 1994). Auch im Zusammenhang mit Diabetes ist die Rolle von IL-6 keineswegs vollständig geklärt und eindeutig. Erhöhte IL-6-Spiegel werden mit der Entstehung von Insulinresistenz und Diabetes in Verbindung ge-

bracht (Kern *et al.*, 2001; Vozarova *et al.*, 2001). In 3T3-L1-Zellen konnten inhibitorische Effekte des IL-6 auf die Differenzierung sowie die Expression von IRS1, GLUT4 und PPAR γ nachgewiesen werden (Rotter *et al.*, 2003). Außerdem spielt es eine Rolle im Wachstum des Fettgewebes durch Stimulation der Angiogenese (Rega *et al.*, 2007). Andererseits sind IL-6-defiziente Mäuse wider Erwarten adipös und insulinresistent (Wallenius *et al.*, 2002). Des Weiteren wird durch die IL-6-Ausschüttung des arbeitenden Skelettmuskels die Blutkonzentration bis auf das 100-fache erhöht (Febbraio & Pedersen, 2005) und dadurch unter anderem die Mobilisierung von Fettsäuren und ihre Verwertung im Skelettmuskel angeregt (Al-Khalili *et al.*, 2006; Carey *et al.*, 2006). Körperliche Betätigung verbessert die Insulinsensitivität des gesamten Organismus (Ryder *et al.*, 2001) und gilt daher als wesentlicher Faktor sowohl in der Prävention als auch in der Therapie des Diabetes. In einer Studie mit 3T3-L1-Zellen konnte eine Steigerung der Glucoseaufnahme durch den Einfluss von IL-6 gezeigt werden (Stouthard *et al.*, 1996). Offenbar muss einerseits die IL-6-Wirkung auf verschiedene Gewebe differenziert betrachtet und andererseits akute von chronischen Effekten unterschieden werden (Glund & Krook, 2008).

1.6.1.2 CNTF

Nach Bindung an seinen spezifischen α -Rezeptor CNTFR (Davis *et al.*, 1991) rekrutiert CNTF sowohl gp130 als auch LIFR als signalweiterleitende Komponenten des Rezeptorkomplexes (Davis *et al.*, 1993). Interessanterweise besitzt CNTF daneben auch eine gewisse Affinität zum IL-6R (Schuster *et al.*, 2003). CNTF wurde zunächst als wichtiger Faktor für das Überleben bestimmter Nervenzellen entdeckt (Adler *et al.*, 1979) und verdankt diesem Umstand seinen Namen. Dass CNTF eine Gewichtsabnahme bewirken kann, wurde zunächst zufällig entdeckt, als Patienten mit amyotrophischer Lateralsklerose mit diesem Zytokin behandelt wurden (1996). In den letzten Jahren rückte es daraufhin zunehmend wegen seiner leptinähnlichen Effekte, die auch im leptinresistenten Zustand bei Adipositas erhalten bleiben (Flier, 2004), ins Zentrum des Interesses. Der für die Leptinsignaltransduktion verantwortliche Leptinrezeptor b (LRb) weist strukturelle Ähnlichkeiten zum gp130 auf, jedoch besteht zwischen beiden Molekülen ein bedeutsamer Unterschied: In der zytoplasmatischen Domäne besitzt LRb lediglich eine STAT3-Bindungsdomäne, gp130 hingegen besitzt vier solche Domänen. Die zusätzlichen STAT3-Bindungsstellen des gp130 werden

für die Fähigkeit des CNTFs verantwortlich gemacht, eine Inhibierung der Signaltransduktion durch SOCS3, die bei der Entstehung der Leptinresistenz eine Rolle spielt (Howard *et al.*, 2004; Mori *et al.*, 2004), zu umgehen (Matthews & Febbraio, 2008; Watt *et al.*, 2006). In 3T3-L1-Adipozyten wurde die Stimulation der mitochondrialen Biogenese und damit der oxidativen Kapazität durch Aktivierung der p38 MAPK und gesteigerte Expression des PGC1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1 α*) nachgewiesen (Crowe *et al.*, 2008). Als Folge davon werden die Veresterung von Fettsäuren und die Lipogenese vermindert, die Fettsäureoxidation dagegen bevorzugt. CNTF führt auf diese Weise vor allem zu einem Verlust an weißem Fettgewebe bzw. gibt diesem Eigenschaften, die denen des braunen Fettgewebes ähnlich sind. Eine weitere Studie konnte nachweisen, dass CNTF im braunen Fettgewebe von Mäusen über die Induktion von NRF-1 (*nuclear respiratory factor-1*) und TFam (*mitochondrial transcription factor A*) die Expression von UCP-1 (*uncoupling protein-1*) gesteigert wird (Liu *et al.*, 2007). Auf der anderen Seite ist zu beachten, dass CNTF zur Proliferation hypothalamischer Zellen führt (Kokoeva *et al.*, 2005), deren Auswirkung noch unklar ist, und außerdem möglicherweise entzündliche Prozesse im Zentralnervensystem auslöst (Kelly *et al.*, 2004; Prima *et al.*, 2004).

1.6.1.3 LIF

Die Signaltransduktion von LIF wird durch einen Rezeptorkomplex aus LIFR und gp130 vermittelt (Gearing *et al.*, 1992). Benannt wurde es nach seiner zuerst entdeckten Eigenschaft, die Differenzierung bestimmter muriner Leukämiezellen zu induzieren und ihre Proliferation zu inhibieren (Metcalf, 1991). Mittlerweile gilt LIF als pleiotrop wirkendes Zytokin mit außerordentlich unterschiedlichen Wirkungen in den verschiedensten Systemen, die bisher in keinen Zusammenhang gebracht werden konnten (Metcalf, 2003). In der experimentellen Biologie findet es Anwendung auf Grund seiner Fähigkeit, die Totipotenz embryonaler Stammzellen zu bewahren (Williams *et al.*, 1988). Eine exogen herbeigeführte Überproduktion von LIF in Mäusen führte unter anderem zum völligen Verlust von Fettgewebe, zu Knochenveränderungen und zu Pankreatitis (Metcalf & Gearing, 1989). LIF spielt eine entscheidende Rolle bei der Fortpflanzung. Zwar ist es nicht für die Embryogenese selbst notwendig, es ist jedoch unerlässlich für die Einnistung der Blastozyste in die Gebärmutter

(Stewart *et al.*, 1992). Des Weiteren ist LIF in der Lage, eine Akut-Phase-Reaktion in der Leber hervorzurufen (Baumann & Wong, 1989). Es blockiert den Lipidtransport in Adipozyten durch Hemmung der LPL und wird daher mit der Entstehung der Kachexie im Zusammenhang mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht (Marshall *et al.*, 1994; Mori *et al.*, 1989).

1.6.2 Adipokine

In den letzten Jahren wurde immer deutlicher, dass das Fettgewebe nicht nur als Speicher überschüssiger Energie dient, sondern auch als endokrines Organ eine bedeutende Rolle spielt. Dort gebildete Zytokine werden als Adipokine bezeichnet. Zu den Adipokinen gehört auch das bereits in Abschnitt 1.6.1.1 beschriebene IL-6, das hauptsächlich vom viszeralen Fettgewebe freigesetzt wird (Fontana *et al.*, 2007). Im Ruhezustand ist das Fettgewebe für etwa 30% des IL-6-Spiegels verantwortlich (Path *et al.*, 2001). Die Plasmakonzentrationen der Adipokine steigen mit zunehmender Fettmasse und Größe der Adipozyten – mit Ausnahme des Adiponectins, dessen Blutspiegel bei Adipositas sinkt (Skurk *et al.*, 2007). Adiponectin wird ausschließlich von Adipozyten gebildet (Scherer *et al.*, 1995b). Es verbessert die Insulinsensitivität, indem es die hepatische Gluconeogenese inhibiert sowie die Glucoseaufnahme und Fettsäureoxidation in Leber und Muskel steigert (Tomas *et al.*, 2002; Yamauchi *et al.*, 2002). Außerdem erhöht es den Energieverbrauch *in vitro* – vermutlich durch Entkopplung der ATP-Synthese in den Mitochondrien (Kadowaki & Yamauchi, 2005). Es wirkt antiinflammatorisch und antiarteriosklerotisch (Tataranni & Ortega, 2005). Leptin ist ein weiteres wichtiges Adipokin. Seine Aufgabe besteht darin, den langfristigen Ernährungsstatus mit dem Gehirn zu verknüpfen (Cheung *et al.*, 1997; Schwartz *et al.*, 2000). Die Leptinproduktion ist in großen Adipozyten erhöht (Considine *et al.*, 1996). Sie wird durch Insulin stimuliert, durch TNF α und freie Fettsäuren hingegen beeinträchtigt (Zhang *et al.*, 2000). Die in dieser Arbeit untersuchten Adipokine TNF α , Resistin und aP2 werden in den folgenden Abschnitten gesondert aufgeführt.

1.6.2.1 TNF α

TNF α (*tumor necrosis factor α*) ist ein pleiotropes, proinflammatorisch wirkendes Zytokin, das von unterschiedlichen Zelltypen innerhalb des Fettgewebes, aber auch

von den Fettzellen selbst gebildet wird. Der Name Tumor-Nekrose-Faktor geht auf Untersuchungen an Mäusen zurück, in denen Tumorzellen durch Behandlung mit $\text{TNF}\alpha$ nekrotisierten (Carswell *et al.*, 1975). $\text{TNF}\alpha$ wird bei Adipositas vermehrt vom Fettgewebe gebildet und mit der Entstehung einer Insulinresistenz in Verbindung gebracht (Uysal *et al.*, 1997). Unter anderem inhibiert es die Expression verschiedener für die Insulinsignaltransduktion und die Adipozytendifferenzierung wesentlicher Proteine, wie z. B. $\text{PPAR}\gamma$, GLUT4 und IRS1 (Ruan *et al.*, 2002). Sowohl in primären humanen Präadipozyten als auch in differenzierten 3T3-L1-Zellen wird die Expression von Adiponectin durch $\text{TNF}\alpha$ gehemmt (Kappes & Loffler, 2000). $\text{TNF}\alpha$ aktiviert mehrere MAPK-Kaskaden – darunter Erk, JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) und p38-MAPK (Wallach *et al.*, 1999). Souza *et al.* konnten zeigen, dass die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Lipolyse in 3T3-L1-Adipozyten hauptsächlich durch die Aktivierung von Erk vermittelt wird. Erk phosphoryliert das an der Oberfläche der intrazellulären Lipidtröpfchen befindliche Perilipin, welches dadurch inaktiviert wird (Souza *et al.*, 2003). Perilipin hat die Aufgabe, die Lipidtröpfchen vor dem Abbau zu schützen (Brasaemle *et al.*, 2000). Durch die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Lipolyse kommt es zur vermehrten Freisetzung nicht veresterter Fettsäuren, welche die Entstehung der Insulinresistenz vorantreiben (Boden, 1997). Die Aktivierung von MAPK-Kaskaden ist außerdem auch für die Inhibierung der Differenzierung von Präadipozyten verantwortlich. Durch Erk und JNK wird $\text{PPAR}\gamma$ phosphoryliert und so dessen transkriptionelle Aktivität inhibiert, die für den Differenzierungsprozess und für die Akkumulation von Lipiden wesentlich ist (Adams *et al.*, 1997). Wie für LIF bereits beschrieben, inhibiert auch $\text{TNF}\alpha$ das Enzym LPL, jedoch in stärkerem Ausmaß (Marshall *et al.*, 1994). Des Weiteren stimuliert $\text{TNF}\alpha$ die Produktion von MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) innerhalb des Fettgewebes, wodurch die Ansiedlung weiterer Makrophagen gefördert und der Entzündungsstatus des Fettgewebes erhöht wird (Bruun *et al.*, 2005). In 3T3-L1-Adipozyten stimuliert $\text{TNF}\alpha$ die Expression der GM3-Synthase. Der hierdurch erhöhte Anteil des Gangliosids GM3 in der Membran führt zu Veränderungen der Caveolae, welche unter anderem eine gestörte Insulinrezeptor- und GLUT4-Funktionalität zur Folge haben (Inokuchi, 2007).

1.6.2.2 Resistin

Resistin wurde zuerst im Jahre 2001 als Adipokin beschrieben (Kim *et al.*, 2001; Stepan *et al.*, 2001). Seine Expression nahm während der Differenzierung von 3T3-L1-Zellen zu. Wurden die Zellen während der Differenzierung mit resistinhaltigem Medium inkubiert, so sank die PPAR γ -Induktion um 80% (Kim *et al.*, 2001). Durch entsprechende Fütterung adipöse und insulinresistente Mäuse zeigten stark erhöhte Resistinspiegel. Wurden jedoch neutralisierende Antikörper appliziert, so normalisierten sich Blutglucosespiegel und Insulinsensitivität. Resistin-defiziente Mäuse zeigten trotz fettreicher Diät eine bessere Glucosetoleranz als Kontrolltiere (Stepan *et al.*, 2001). Dementsprechend wurde Resistin zunächst als differenzierungsinhibierender Faktor angesehen, der in Bezug auf den Glucosemetabolismus antagonistisch zum Insulin wirkt und ein wichtiges Bindeglied zwischen Adipositas und Diabetes darstellt (Stepan *et al.*, 2001). Außerdem wurde nachgewiesen, dass Resistin in 3T3-L1-Adipozyten autokrin die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF α , IL-6 und MCP-1 induziert, die Expression beispielsweise von PPAR γ , aP2 und GLUT4 hingegen inhibiert (Fu *et al.*, 2006). Die Rolle von Resistin wird jedoch mittlerweile kontrovers diskutiert, denn eine weitere Studie mit 3T3-L1-Zellen zeigte eine stimulierende Wirkung von Resistin auf die Differenzierung zu Adipozyten (Gong *et al.*, 2004). Die Behandlung des gleichen Zelltyps mit TNF α führte zu einer verminderten Expression des Resistings (Li *et al.*, 2003). Überraschenderweise wurde Resistin in humanen Präadipozyten stark exprimiert, war jedoch in reifen Adipozyten kaum detektierbar und korrelierte keineswegs mit dem Körpergewicht und der Insulinsensitivität (Janke *et al.*, 2002). Streng genommen ist Resistin im Menschen also kein Adipokin und spielt möglicherweise auch nicht die tragende Rolle im Zusammenhang mit der Insulinresistenz, die ihm anfänglich zugeordnet wurde.

1.6.2.3 aP2

aP2 ist das Produkt des FABP4 (*fatty acid-binding protein 4*)-Gens, welches zu den PPAR γ -Zielgenen gehört (Ross *et al.*, 1990). Es wird sowohl in weißen als auch in braunen Adipozyten sowie in Makrophagen stark exprimiert und bindet langkettige Fettsäuren im stöchiometrischen Verhältnis 1:1 (Bernlohr *et al.*, 1997). Außerdem tritt es in direkten Kontakt mit dem Enzym HSL (Shen *et al.*, 1999). aP2 hat wie die anderen Proteine dieser Klasse die Aufgabe, den Transport der im Zytoplasma unlösli-

chen Fettsäuren zwischen verschiedenen Zellkompartimenten zu erleichtern (Coe & Bernlohr, 1998). aP2-defiziente Mäuse zeigen eine deutliche Reduktion der Lipolyse und eine höhere Insulinsensitivität als die Kontrolltiere (Uysal *et al.*, 2000). Aus aP2-defizienten Mäusen isolierte Adipozyten akkumulieren nicht veresterte Fettsäuren im Zytosol und schütten weniger freie Fettsäuren aus (Coe *et al.*, 1999). Die Überexpression Fettsäure-bindender Proteine in Adipozyten resultiert entsprechend in einer gesteigerten Lipolyse und Insulinresistenz (Hertzel *et al.*, 2002). Neuere Untersuchungen zeigen eine ligandenabhängige Interaktion des aP2 mit der unphosphorylierten Form der Januskinase Jak2 unter anderem in 3T3-L1-Adipozyten und in der Folge eine Inhibierung der Jak2-vermittelten Signaltransduktion (Thompson *et al.*, 2009).

1.7 3T3-L1-Zellen als Adipozytenmodell

Die 3T3-L1-Zelllinie wurde aus Swiss 3T3-Zellen kloniert, welche aus Mäuseembryonen isoliert wurden (Green & Kehinde, 1975). Morphologisch ähneln 3T3-L1-Zellen zunächst Fibroblasten, es handelt sich jedoch um sogenannte Präadipozyten, die in serumhaltigem Medium spontan innerhalb einiger Wochen zu Fettzellen differenzieren. Dieser Prozess kann durch Zugabe von Insulin, Glucocorticoiden und Substanzen, die den cAMP-Spiegel erhöhen, beschleunigt werden (Green & Meuth, 1974). Bei 3T3-L1-Zellen wird üblicherweise das Glucocorticoid Dexamethason eingesetzt sowie Isobutylmethylxanthin (IBMX) (Rubin *et al.*, 1978), das als Inhibitor der Phosphodiesterase wirkt und somit zu einem erhöhten cAMP-Spiegel führt. Außerdem inhibiert IBMX die endogene Produktion von $\text{TNF}\alpha$ (Hube *et al.*, 1999). Von Gregoire *et al.* wurde der Differenzierungsprozess ausführlich beschrieben: Voraussetzung für die Initialisierung der Differenzierung ist die Einstellung der Zellproliferation. Die Zellen beenden ihre mitotische Aktivität, runden sich ab, akkumulieren Fetttröpfchen und erwerben so schrittweise morphologische und biochemische Eigenschaften reifer weißer Adipozyten. Damit verbunden sind sukzessive Veränderungen in der Genexpression. Einer der ersten Schritte ist die Induktion der Transkriptionsfaktoren $\text{PPAR}\gamma$ und C/EBP (*enhancer binding protein*). Diese wiederum induzieren verschiedene adipozytenspezifische Proteine, wie z. B. am Lipidmetabolismus beteiligte Enzyme. Auch die Zusammensetzung der Komponenten des Zytoskeletts und der extrazellulären Matrix ändert sich drastisch. (Gregoire *et al.*,

1998) Da der Differenzierungsprozess der 3T3-L1-Zellen prinzipiell den physiologischen Verhältnissen entspricht, werden sie routinemäßig als Modell für die Differenzierung zu reifen Fettzellen verwendet. Präadipozyten entstehen im Organismus aus multipotenten Stammzellen mesodermalen Ursprungs. Die Fähigkeit neue Fettzellen zu bilden, bleibt während des gesamten Lebens eines Menschen erhalten (Otto & Lane, 2005).

1.8 Ziele der Untersuchungen

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des durch Insulin, IBMX und Dexamethason in 3T3-L1-Präadipozyten ausgelösten Differenzierungsprozesses. Dabei sollte der Einfluss einer Olivenöl- bzw. Sojaölinkubation auf diesen Differenzierungsvorgang analysiert sowie beide Öle auf ein von Insulin, IBMX und Dexamethason unabhängiges Potential zur Differenzierung der Präadipozyten hin untersucht werden. Der inhibitorische Effekt des proinflammatorischen Zytokins $TNF\alpha$ auf die Differenzierung und die Insulinsignaltransduktion sollte bestätigt und die Auswirkung einer gleichzeitigen Ölinkubation registriert werden.

Dem IL-6-Typ-Zytokin CNTF wurden in den letzten Jahren positive Effekte auf Fettzellentstehung und -metabolismus bescheinigt. Daher war die Entwicklung des CNTF-Signals während der Differenzierung der 3T3-L1-Zellen ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit. Außerdem sollte der Einfluss einer CNTF-Inkubation auf den durch Insulin, IBMX und Dexamethason initialisierten Differenzierungsprozess untersucht sowie ein mögliches Differenzierungspotential des Zytokins nachgewiesen werden. Das wie CNTF zur Gruppe der IL-6-Typ-Zytokine gehörende LIF wurde in diese Untersuchungen mit einbezogen.

2 Material und Methoden

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien und Verbrauchsmaterialien von folgenden Firmen bezogen: Carl Roth GmbH + Co. KG [Karlsruhe], Merck KGaA [Darmstadt], Sigma-Aldrich® [Taufkirchen], SERVA Electrophoresis GmbH [Heidelberg], Sarstedt AG & Co. [Nümbrecht], Greiner Bio-One GmbH [Frickenhausen], PEQLAB Biotechnologie GmbH und neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH [Heidelberg]. Die verwendeten Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser (dd H₂O) hergestellt.

2.1 Kultivierung von 3T3-L1-Zellen

Reagenzien/Lösungen

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Low Glucose (Glucosegehalt 1 g/L) mit L-Glutamin (584 mg/L) [PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich]
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) High Glucose (Glucosegehalt 4,5 g/L), mit L-Glutamin (584 mg/L) [PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich]
- Fetales Kälberserum (FCS) [PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich]
- Penicillin-/Streptomycinlösung (P/S) (100x) [PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich]
- Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS⁻), pH 7,2-7,4
0,2 g/L KCl, 0,2 g/L KH₂PO₄, 8 g/L NaCl, 1,44 g/L Na₂HPO₄ x 2 H₂O
- Trypsin/EDTA (1x) (0,05 % / 0,02 %) [PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich]

3T3-L1-Zellen sind adhärent wachsende Präadipozyten murinen Ursprungs. Sie wurden in DMEM Low Glucose mit 10% FCS und 1% P/S bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten, mit 5% CO₂ angereicherten Atmosphäre gehalten. Für Gewebekulturschalen mit einem Durchmesser von 100 mm wurden etwa 8 mL Medium verwendet, in Gewebekulturschalen mit 60 mm Durchmesser 3 mL. Das Medium mit sämtlichen Zusätzen wurde alle 48 h erneuert. Sollte keine Differenzierung zu Adipozyten durchgeführt werden, wurden die Zellen nach Erreichen der Konfluenz pas-

sagiert. Dazu wurden die Zellen nach Entfernen des Mediums zweimal mit etwa 3 mL PBS⁻ gewaschen. Anschließend wurden wenige Tropfen Trypsinlösung zugesetzt und etwa 10 min bei 37°C inkubiert. Durch Spaltung extrazellulärer Proteine erfolgt hierbei die Trennung der Zellen voneinander sowie von der Kulturschale. Die folgende Zugabe einiger mL Medium bewirkt durch das enthaltene FCS die Inaktivierung des Enzyms. Nach Zentrifugation für 5 min bei 4°C und ca. 150 x g wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und nach Bedarf auf mehrere Gewebekulturschalen verteilt.

2.1.1 Auftauen der Zellen

Zum Auftauen der Zellen aus flüssigem Stickstoff wurden zunächst einige mL vorgewärmtes Medium in einem sterilen 15 mL-Falcon vorgelegt. Die möglichst zügig aufgetaute Zellsuspension wurde dann hinzupipettiert und anschließend wie beim Passagieren abzentrifugiert und auf Gewebekulturschalen verteilt.

2.1.2 Einfrieren der Zellen

Reagenzien/Lösungen

- Einfriermedium
10% Dimethylsulfoxid (DMSO) in FCS
- Flüssiger Stickstoff

Zur langfristigen Aufbewahrung der Zellen wurden diese wie beim Passagieren trypsiniert. Das durch Zentrifugation entstandene Zellpellet wurde dann in Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen pipettiert. Um die Entstehung zellschädigender Eiskristalle zu vermeiden, erfolgte das Einfrieren schrittweise zunächst für einige Stunden bei -20°C, dann für einige Tage bzw. bei Bedarf bis zu mehreren Monaten bei -80°C und für die dauerhafte Lagerung schließlich in flüssigem Stickstoff.

2.1.3 Differenzierung der 3T3-L1-Prädipozyten zu Adipozyten

Reagenzien/Lösungen

- 3-Isobutyl-1-methyl-Xanthin (IBMX) [AppliChem, Darmstadt]
Stammlösung: 0,1 M in 70% Ethanol
- Dexamethason [AppliChem, Darmstadt]
Stammlösung: 2,5 mM in 70% Ethanol
- Insulin
Stammlösung: 10 mg/mL

Um die Differenzierung der 3T3-L1-Prädipozyten zu Adipozyten zu induzieren, wurde nach Erreichen der Konfluenz von DMEM Low Glucose auf DMEM High Glucose (ebenfalls mit 10% FCS und 1% P/S) umgestellt. Gleichzeitig wurden dem Medium 0,5 mM IBMX, 2,5 μ M Dexamethason und 850 nM Insulin zugesetzt. Aus den entsprechenden Stammlösungen waren dies pro mL Medium 5 μ L IBMX-, 1 μ L Dexamethason- sowie 0,5 μ L Insulinlösung. Nach 48 h wurde dieses Medium erneuert – jedoch ohne IBMX und Dexamethason. Nach weiteren 48 h wurde auch Insulin nicht mehr zugegeben. Danach erfolgte alle zwei Tage ein Mediumwechsel mit High Glucose-Medium. Lediglich wenn der Einfluss einer chronischen Insulineinwirkung untersucht werden sollte (Abschnitt 3.2), wurde die zur Differenzierung verwendete Insulinkonzentration von 850 nM bis zur Ernte der Zellen aufrecht erhalten. Sollte das Differenzierungspotential einer Ölemulsion oder eines Zytokins ermittelt werden (Abschnitte 3.4.2 und 3.7.2), so wurde zwar auf High Glucose-Medium umgestellt, jedoch weder IBMX noch Dexamethason oder Insulin zugegeben.

2.1.4 Inkubation der Zellen mit verschiedenen Ölemulsionen bzw. Zytokinen

Reagenzien/Lösungen

- ClinOleic[®] 20% [Baxter, Unterschleißheim]
160 g/L rektifiziertes Olivenöl, 40 g/L rektifiziertes Sojaöl, 12 g/L Eilecithin, 22,5 g/L Glycerol, 0,3 g/L Natriumoleat, Natriumhydroxid zur pH-Einstellung, pH 6-8

- Salvilipid[®] 20 [Baxter, Unterschleißheim]
200 g/L rektifiziertes Sojaöl, 12 g/L Eilecithin, 25 g/L Glycerol, Natriumoleat, Natriumhydroxid zur pH-Einstellung, pH 6-8

Diese für die parenterale Ernährung hergestellten Ölemulsionen wurden freundlicherweise von Baxter für die Untersuchungen dieser Arbeit zur Verfügung gestellt.

- humanes CNTF [PeproTech GmbH, Hamburg]
Stammlösung: 100 µg/mL in 5 mM Natriumphosphat, pH 7,5
- humanes LIF
Stammlösung: 10 µg/mL in 1% BSA in PBS⁻
- humanes IL-6 wurde freundlicherweise von G. Müller-Newen (RWTH Aachen) bereitgestellt
Stammlösung: 80 µg/mL
- murines TNF α [ImmunoTools GmbH, Friesoythe]
Stammlösung: 100 µg/mL

Um die Auswirkung verschiedener Ölemulsionen bzw. der Zytokine CNTF, LIF und TNF α auf das Differenzierungsverhalten der 3T3-L1-Zellen zu untersuchen (Abschnitte 3.4, 3.5.1 und 3.7), wurden sie während der gesamten Differenzierungszeit dem Zellkulturmedium zugesetzt sowie mit diesem alle 48 h erneuert. Die hierbei verwendeten Konzentrationen waren für die Ölemulsionen 0,1% bzw. 1% (Original-emulsionen 1:200 bzw. 1:20 verdünnt), für CNTF 25 ng/mL (Stammlösung 1:4000 verdünnt), für LIF 10 ng/mL (Stammlösung 1:1000 verdünnt) sowie für TNF α 0,1 nM (Stammlösung ca. 1:50000 verdünnt). Des Weiteren wurden Experimente mit 24-stündiger Inkubation von ausdifferenzierten Adipozyten durchgeführt (Abschnitte 3.5.2 und 3.5.3). Hier betragen die Ölkonzentrationen wie oben 0,1% bzw. 1%, die Konzentration von IL-6 20 ng/mL (Stammlösung 1:4000 verdünnt) und diejenige von TNF α 1 nM (Stammlösung ca. 1:5000 verdünnt).

2.1.5 Stimulation der Zellen

Reagenzien/Lösungen

- Insulin
Stammlösung: 10 mg/mL

- humanes CNTF [PeproTech GmbH, Hamburg]
Stammlösung: 100 µg/mL in 5 mM Natriumphosphat, pH 7,5
- humanes LIF
Stammlösung: 10 µg/mL in 1% BSA in PBS⁻
- humanes IL-6 wurde freundlicherweise von G. Müller-Newen (RWTH Aachen) bereitgestellt
Stammlösung: 80 µg/mL
- Bovines Serumalbumin (BSA) [PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich]
- Hungermedium
DMEM Low bzw. High Glucose mit 0,2% BSA

In den Abschnitten 3.2, 3.5.3 und 3.6 wurde die Aktivierung verschiedener Signalwege nach Stimulation von 3T3-L1-Zellen mit Insulin, CNTF, LIF oder IL-6 untersucht. Um eine eventuell durch das im Zellkulturmedium vorhandene FCS hervorgerufene Grundstimulation zu verhindern, wurden die Zellen 24 h vor der Stimulation nach zweimaligem Waschen mit PBS⁻ mit sogenanntem Hungermedium ohne FCS und P/S versetzt. Um eine Minimalversorgung der Zellen mit Protein zu gewährleisten, wurde diesem Medium BSA in einer Endkonzentration von 0,2% zugegeben. Anschließend wurden die Zellen für die jeweils angegebenen Zeiträume mit den entsprechenden Stimulationsmedien bei 37°C inkubiert. Im Einzelnen waren dies 100 nM Insulin (Stammlösung 1:17000 verdünnt), 25 ng/mL CNTF (Stammlösung 1:4000 verdünnt), 10 ng/mL LIF (Stammlösung 1:1000 verdünnt) bzw. 20 ng/mL IL-6 (Stammlösung 1:4000 verdünnt) in Hungermedium. Zur Beendigung der Stimulation sowie zur Aufrechterhaltung des aktivierten Zustands wurden die Zellen direkt im Anschluss auf Eis gehalten.

2.2 Wachstumskinetik

Um den Einfluss der in dieser Arbeit verwendeten Ölemulsionen auf das Wachstum der Zellen zu untersuchen, wurde deren Proliferation über einen Zeitraum von 48 h verfolgt (Abschnitt 3.3). Da differenzierte 3T3-L1-Adipozyten ihre mitotische Aktivität einstellen, wurden hierfür undifferenzierte Zellen verwendet.

Zunächst wurden ausreichend 3T3-L1-Zellen durch Trypsinieren gesammelt (vgl. Abschnitt 2.1), ihre Anzahl in einer definierten Menge Medium durch Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer [Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe] bestimmt und dann für jeden Zeitpunkt (0 h, 24 h, 48 h) und jede Versuchsbedingung (0,1% bzw. 1% Ölemulsion sowie eine entsprechende Kontrolle ohne Öl) $0,5 \times 10^6$ Zellen pro Zellkulturschale (\varnothing 100 mm) ausgesät. Am nächsten Tag waren die Zellen am Schalenboden angewachsen und konnten nun mit den Ölemulsionen bzw. im Fall der Kontrollen lediglich mit frischem Medium versetzt werden. Gleichzeitig wurde die durchschnittliche Zellzahl pro Schale zu diesem Zeitpunkt (0 h) erfasst. Ein weiterer Mediumwechsel erfolgte nicht. Es wurde lediglich die Anzahl der Zellen auf jeder Zellkulturschale nach 24 h bzw. 48 h Inkubation bestimmt.

2.3 Ermittlung der Zytotoxizität mittels MTT-Test

Reagenzien/Lösungen

- MTT-Lösung
1% 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid in PBS⁻
- Solubilisierungsreagenz
10 g SDS, 0,6 mL Essigsäure, ad 100 mL DMSO
- Positivkontrolle
0,1% Triton X-100 in Medium

Der sogenannte MTT-Test wird zur Bestimmung der zytotoxischen Wirkung einer Substanz herangezogen. Er beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) zu einem violetten, wasserunlöslichen Formazan. Letzteres fällt in den Zellen aus und wird dann durch ein Solubilisierungsreagenz gelöst. Die Intensität der violetten Farbe wird im Anschluss photometrisch gemessen und gilt als Maß für die allgemeine Vitalität der Zellen. Als Positivkontrolle kann das Detergens Triton X-100 in einer Endkonzentration von 0,1% in der entsprechenden Lösung verwendet werden.

Im Einzelnen umfasste der Test folgende Schritte: Die Zellen wurden unter den zu prüfenden Bedingungen auf 60 mm-Gewebekulturschalen herangezogen. Als Positivkontrolle wurden gegebenenfalls Zellen mit 0,1% Triton X-100 in Medium

inkubiert. Nach Ende der entsprechenden Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit PBS⁻ gewaschen und 3 mL Medium ohne Zusätze pro Schale zugegeben. Anschließend wurden je 100 µL MTT-Lösung zu den 3 mL Medium hinzugefügt und die Zellen für 2 h 15 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Medium entfernt und die Zellkulturschalen nach Zugabe von je 1 mL Solubilisierungsreagenz für einige Minuten geschwenkt bis keine Schlieren mehr zu sehen waren. Die photometrische Messung der violetten Färbung erfolgte in Dreifachbestimmung mit je 50 µL Überstand in einer 96-well-Flachbodenplatte bei einer Wellenlänge von 590 nm (Referenz 660 nm) im ELISA-Reader EL340 [Bio-Tek Instruments, Winooski, USA] und mit Hilfe der MikroWin Software Version 3.0 [Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath].

2.4 Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung mittels Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC/MS)

Reagenzien/Lösungen

- Ethylacetat : Hexan (1:1, v/v)
- 0,5 M methanolische Kaliumhydroxid (KOH)-Lösung
- methanolische Bortrifluorid (BF₃)-Lösung
- Hexan
- gesättigte Natriumchlorid (NaCl)-Lösung
- Heptadecansäure-Methylester (17:0-ME)

Zur Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung der Zellen nach einer Inkubation mit den in dieser Arbeit untersuchten Ölemulsionen wurden die auf 100 mm-Gewebekulturschalen herangezogenen Zellen zunächst viermal mit je 3 mL PBS⁻ gewaschen, um möglichst alle anhaftenden Ölrreste zu entfernen. Danach wurden pro Schale 0,5 mL PBS⁻ zugegeben und die Zellen durch Abschaben in einem Reagenzglas gesammelt. Nach Zentrifugation für 5 min bei ca. 2000 x g und 4°C wurde der Überstand entfernt und durch 0,5 mL frisches PBS⁻ ersetzt. Die Zellsuspension wurde mit Hilfe einer 20G Injektionskanüle [ROSE GmbH, Trier] homogenisiert und erneut zentrifugiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Überstand erfolgte

mittels Bio-Rad[®] DC Protein Assay (vgl. Abschnitt 2.7.2). Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Von jeder Probe wurde ein Volumen von 480 µL mit dd H₂O auf 4 mL aufgefüllt und anschließend dreimal mit je 2 mL einer Mischung aus Ethylacetat und Hexan (1:1, v/v) extrahiert. Die Lösungsmittel wurden anschließend durch sanftes Einblasen von Stickstoff bei 35-40°C entfernt. Entsprechend der offiziellen Standardmethode (DGF-Einheitmethode, 1998) (Thurnhofer & Vetter, 2005) wurden nun Fettsäuremethylester synthetisiert. 0,5 mL 0,5 M methanolische KOH-Lösung wurden zu jeder Probe zugegeben, die Reagenzgläser verschlossen und dann für 5 min auf 80°C erhitzt. Nach etwa 10-minütigem Abkühlen im Eisbad wurde je 1 mL methanolische BF₃-Lösung zupipettiert, die Reagenzgläser erneut verschlossen und für 5 min bei 80°C gehalten. Nach Abkühlen wurden zu jeder Probe je 2 mL Hexan sowie gesättigte NaCl-Lösung zugesetzt und geschüttelt. Die organische Phase wurde abgenommen und im Volumen angepasst. Vor der Messung wurde Heptadecansäure-Methylester (17:0-ME) als interner Standard zugegeben. Die Analyse erfolgte mittels Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC/MS) mit Hilfe eines 3400/Saturn 4D Systems [Varian Deutschland GmbH, Darmstadt] und einer mit quervernetztem 5% PhMe Polysiloxan beschichteten Kapillarsäule [Hewlett-Packard GmbH, Böblingen]. Diese Untersuchungen wurden von Rasa Adomkiene mit Unterstützung der Arbeitsgruppe von Prof. Vetter (Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hohenheim) durchgeführt.

2.5 Färbung der Zellen mit Oil Red O und Quantifizierung der Triglyzeride

Reagenzien/Lösungen

- ca. 10% Formaldehyd in PBS⁻
- 70% Ethanol
- Oil Red O-Lösung

1 g Oil Red O wurde in 286 mL Isopropanol gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen, am nächsten Tag wurde die Lösung filtriert und 214 mL dd H₂O zugegeben, nach erneutem Stehenlassen über Nacht bei 4°C wurde zwei weitere Male filtriert

- Isopropanol

Mit Hilfe des roten Farbstoffes Oil Red O können Fette in Zellen mikroskopisch sichtbar gemacht sowie photometrisch quantifiziert werden. Die hierfür auf 60 mm-Schalen kultivierten Zellen wurden zunächst gründlich mit PBS⁻ gewaschen, um Reste einer eventuell vorangegangenen Ölinkubation zu entfernen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen durch Zugabe von 1 mL 10% Formaldehyd in PBS⁻ und 25-minütige Inkubation. Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Es wurde mit 2 mL 70% Ethanol gewaschen und die Zellen mit 1 mL Oil Red O-Lösung für 13 min gefärbt. Nach erneutem Waschen mit 70% Ethanol wurden Bilder der Zellen mit Hilfe des Inversen Mikroskops Axiovert 25 [Carl Zeiss Mikroskopie, Jena] und der Software AxioVision 3.1 [Carl Zeiss Vision GmbH, Aalen] bei einer Vergrößerung von 1:100 aufgenommen. Ethanolreste wurden durch Trocknen der geöffneten Zellkulturschalen bei ca. 40°C entfernt und durch Zugabe von je 1,5 mL Isopropanol der rote Farbstoff aus den Zellen herausgelöst. Die Überstände wurden in Reaktionsgefäße überführt und für 3 min bei 16000 x g zentrifugiert. Die Quantifizierung der Fette erfolgte durch Absorptionsmessung bei 510 nm in PMMA-Makro-Einmalküvetten mittels Photometer [Genesys 20, Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG, Bonn]. Lag die Absorption über 1,0, so wurde die Probe 1:5 mit Isopropanol verdünnt und erneut gemessen.

2.6 Molekularbiologie

Um Reaktionen der Zellen auf bestimmte Bedingungen auf RNA-Ebene zu untersuchen, wurde diese aus den Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und anschließend mittels Real Time PCR spezifisch quantifiziert.

2.6.1 RNA-Isolierung

Reagenzien/Lösungen

- RNeasy[®] Mini Kit [QIAGEN GmbH, Hilden]
 - RLT-Puffer
 - RW1-Puffer
 - RPE-Puffer
- β -Mercaptoethanol
- 70% Ethanol

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus 3T3-L1-Zellen erfolgte mittels RNeasy[®] Mini Kit mit einigen Modifikationen nach dem Handbuch des Herstellers. Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Zentrifugiert wurde jeweils mit 16000 x g. Die für die RNA-Isolierung auf 60 mm-Gewebekulturschalen herangezogenen Zellen wurden zunächst, vor allem nach einer Ölinkubation, gründlich mit PBS⁻ gewaschen. Pro Schale wurden 400 µL RLT-Puffer mit 1% β-Mercaptoethanol (v/v), das direkt vor Gebrauch frisch zugesetzt wurde, verwendet. Die Schalen wurden einige Minuten geschwenkt und dann schräg gestellt, so dass das Lysat ablaufen konnte. Dieses wurde dann in einem 2 mL-Reaktionsgefäß zehn Mal durch eine 20G Injektionskanüle [ROSE GmbH, Trier] gezogen und auf diese Weise homogenisiert. Nach Zugabe von 400 µL 70% Ethanol wurde mit Hilfe einer Pipette gemischt. 500 µL dieses Gemisches wurden auf ein Säulchen aufgetragen, der Rest zur eventuellen späteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Das Säulchen wurde nun für 4 min zentrifugiert. Nach Zugabe von 500 µL des Puffers RW1 wurde erneut 1 min zentrifugiert. Das Auffanggefäß wurde verworfen und durch ein neues ersetzt. Nach zweimaligem Waschen mit je 300 µL RPE-Puffer wurde 1 min bzw. 2 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Säulchen in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit 50 µL RNA-freiem dd H₂O durch 1-minütige Zentrifugation eluiert und sofort auf Eis gestellt. Im Anschluss wurde direkt mit der Überprüfung der RNA-Qualität fortgefahren oder die RNA-Lösung bei -20°C gelagert. Die Säulchen wurden durch zweimaliges Waschen mit je 500 µL dd H₂O regeneriert und ein weiteres Mal verwendet.

2.6.2 Quantitative und qualitative Überprüfung der RNA

Reagenzien/Lösungen

- Agarose
- 5 x TBE-Puffer, pH 8,3
54 g Tris Base, 27,5 g Borsäure, 20 mL 0,5 M Na₂EDTA pH 8,0 ad 1 L dd H₂O
- 1 x TBE-Puffer
5 x TBE-Puffer 1:5 verdünnt
- Ethidiumbromid
Stammlösung: 0,5 mg/mL
- 2 x RNA-Probenpuffer
13% Ficoll, 0,01% Bromphenolblau, 7 M Harnstoff in 1 x TBE

Für eine quantitative Analyse mittels PCR ist eine gute Qualität der RNA unerlässlich. Zunächst erfolgte die Bestimmung der RNA-Konzentration in den jeweiligen, durch Isolierung mittels Qiagen-Säulchen (Abschnitt 2.6.1) erhaltenen Proben. Hierfür wurden die wässrigen RNA-Lösungen 1:20 verdünnt und ihre Konzentration im UV-Spektrometer Smart SpecTM 3000 [Bio-Rad Laboratories GmbH, München] gemessen. Hierbei wird die Absorption bei 260 nm (A₂₆₀) sowie bei 280 nm (A₂₈₀) und 320 nm bestimmt. Die Absorption bei 260 nm ist ein direktes Maß für die RNA-Konzentration und kann mit Hilfe eines Konversionsfaktors in diese umgerechnet werden. Der Quotient der beiden Werte A₂₆₀/A₂₈₀ gibt Aufschluss über die Reinheit der RNA, da Proteine eine erhöhte Absorption bei 280 nm verursachen. Liegt der Wert des Quotienten über 1,8, so kann von einer nur unwesentlichen Kontamination der Probe mit Protein ausgegangen werden. Die Absorptionsmessung bei 320 nm dient der Hintergrundkorrektur, da weder Nukleinsäuren noch Proteine bei dieser Wellenlänge absorbieren.

Um die Qualität der RNA weiterhin zu prüfen, wurde eine RNA-Gelelektrophorese durchgeführt. Zunächst wurde ca. 1 µg RNA aus jeder Probe mit dd H₂O auf 8 µL aufgefüllt und mit 8 µL 2 x RNA-Probenpuffer versetzt. Zur Denaturierung der RNA wurde anschließend für 10 min bei 70°C inkubiert, abgekühlt und kurz zentrifugiert. Zur Herstellung des Agarosegels wurde 1 g Agarose in 100 mL 1 x TBE mit Hilfe einer Mikrowelle geschmolzen, die Lösung bis auf Handwärme abgekühlt, 20 µL Ethidiumbromidstammlösung (Endkonzentration: 0,1 µg/mL) hinzugegeben und das Gel in der entsprechenden Gießvorrichtung gegossen. Zur Formung der Probenaschen diente ein Kamm, der in die noch flüssige Agaroselösung gesenkt wurde. Nach Erstarren des Gels nach etwa 20 min wurde dieses in eine horizontale Elektrophoresekammer [PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen], die mit 1 x TBE gefüllt war, eingesetzt und die Proben aufgetragen. Anschließend wurde für 60-90 min eine Spannung von 60 V angelegt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die RNA durch UV-Belichtung im Geldokumentationssystem E.A.S.Y 440 K [Herolab GmbH, Wiesloch] visualisiert und photographisch dokumentiert. Abbildung 3 zeigt ein Beispiel für ein solches RNA-Gel. Liegt die RNA in guter Qualität vor, sind hier zwei deutliche Banden sichtbar, die der 28S bzw. der 18S rRNA entsprechen. Außerdem ist oft schwach die 5S rRNA-Bande zu erkennen. Verschmierte Banden deuten auf eine Degradation der RNA hin, Banden mit hohem Molekulargewicht oberhalb der 28S-Bande sprechen für eine Verunreinigung mit genomischer DNA. Für die cDNA-

Synthese wurden die photometrisch bestimmten RNA-Mengen gegebenenfalls entsprechend der Bandenstärke des RNA-Gels korrigiert.

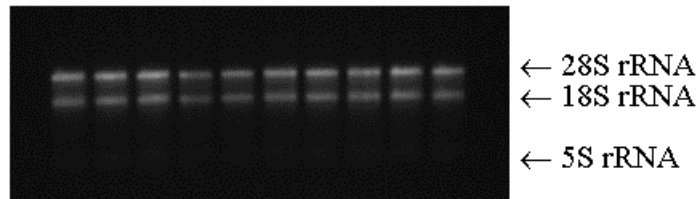


Abbildung 3: Beispiel für eine RNA-Gelelektrophorese

Mittels UV-Belichtung wurden die elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennten RNA-Banden sichtbar gemacht und die Überprüfung der RNA-Qualität ermöglicht.

2.6.3 Synthese der cDNA

Reagenzien/Lösungen

- iScript™ cDNA Synthesis Kit [Bio-Rad Laboratories GmbH, München]
 - 5 x iScript Reaktionsmix
 - iScript Reverse Transkriptase
 - Nuklease-freies H₂O

Durch eine Reverse Transkriptase wird die RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben und so die spätere Amplifikation in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht. In dieser Arbeit wurde für die cDNA-Synthese das iScript™ cDNA Synthesis Kit verwendet. Es wurden Ansätze mit ca. 0,5 µg RNA und einem Gesamtvolumen von 10 µL in 0,2 mL-Reaktionsgefäßen auf Eis pipettiert (Tabelle 1).

5 x iScript Reaktionsmix	2,0 µL
iScript Reverse Transkriptase	0,5 µL
Nuklease-freies H ₂ O	7,5 µL – x µL
RNA (0,5 µg)	x µL

Tabelle 1: Pipettierschema für einen cDNA-Syntheseansatz

Um Fehler durch Ungenauigkeit beim Pipettieren zu vermeiden, wurde bei mehreren Ansätzen ein Mastermix aus iScript Reaktionsmix und Reverser Transkriptase mit ca. 5% Überschuss hergestellt, von diesem pro Ansatz 2,5 μL verwendet und lediglich das Nuklease-freie H_2O sowie die RNA-Lösung für jeden Ansatz einzeln zugegeben. Die Synthese der cDNA erfolgte in einem Thermocycler [Primus, MWG-Biotech AG, Ebersberg] mit dem in Tabelle 2 angegebenen Temperaturprogramm.

Equilibrierung der Reaktionsteilnehmer	5 min	25°C
cDNA-Synthese	30 min	42°C
Inaktivierung der Reversen Transkriptase	5 min	85°C

Tabelle 2: Temperaturprogramm des Thermocyclers für die cDNA-Synthese
Die Deckeltemperatur war auf 110°C eingestellt.

Im Anschluss wurden die cDNA-Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.6.4 Real Time PCR

Die Real Time PCR oder Quantitative PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerasekettenreaktion (PCR), ermöglicht aber zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA. Die Polymerasekettenreaktion wird verwendet, um ein genau definiertes Stück eines DNA-Stranges mit Hilfe spezifischer Primer in mehreren Zyklen zu vervielfältigen. Dabei sind die Produkte eines jeden Zyklus die Ausgangsstoffe für den nächsten Zyklus, wodurch es zu einer exponentiellen Vermehrung selbst kleinster DNA-Mengen kommt. Ein solcher Zyklus besteht prinzipiell aus drei Schritten. Durch die Erhitzung des Reaktionsgemisches auf ca. 95°C erfolgt die Denaturierung der DNA. Dies bedeutet, dass die doppelsträngige DNA durch Aufbruch der verbindenden Wasserstoffbrücken in Einzelstränge aufgegliedert wird. Es folgt die Hybridisierung der Primer mit der einzelsträngigen DNA an spezifischen Sequenzen. Die für diesen als Annealing bezeichneten Schritt zu wählende Temperatur ist abhängig von der Länge und der Zusammensetzung der jeweiligen

Primer. Schließlich werden die neuen DNA-Stränge mit Hilfe einer DNA-Polymerase synthetisiert. Dieser Prozess wird als Elongation bezeichnet und findet bei der für die jeweils eingesetzte DNA-Polymerase optimalen Temperatur statt. Die Real Time PCR arbeitet zusätzlich mit einem fluoreszierenden Farbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet und somit nach jedem Elongationsschritt die Messung der in der Probe vorhandenen DNA über die Fluoreszenz ermöglicht. Die in der exponentiellen Phase der PCR gemessene Fluoreszenz ist ein Maß für die ursprünglich eingesetzte DNA-Menge. Zur Optimierung der erhaltenen Daten kann bei der Real Time PCR ein weiterer Temperaturschritt zwischengeschaltet werden. Dieser findet ca. 5°C unterhalb der Schmelztemperatur des PCR-Produktes statt und dient der Schmelzung von eventuell gebildeten Primerdimeren oder unspezifischen Produkten, die dann bei der nachfolgenden Fluoreszenzmessung nicht berücksichtigt werden. Die Erfassung der Schmelzkurve im Anschluss an die PCR dient der Beurteilung der Produktreinheit.

2.6.4.1 Herstellung eines Standards für die Real Time PCR

Reagenzien/Lösungen

- spezifische Primer [biomers.net GmbH, Ulm]
- iQ™ SYBR® Green Supermix [Bio-Rad Laboratories GmbH, München]
- Agarose
- 50 x TAE-Puffer
2 M Tris-Base, 50 mM EDTA pH 8,0, 1 M Essigsäure
- 1 x TAE-Puffer
50 x TAE-Puffer 1:50 verdünnt
- Ethidiumbromid
Stammlösung: 0,5 mg/mL
- verschiedene DNA-Molekulargewichtsmarker [Fermentas GmbH, St. Leon-Rot]
- 6 x Loading Dye (#R0611) [Fermentas GmbH, St. Leon-Rot]
- QIAquick® Gel Extraction Kit [QIAGEN GmbH, Hilden]
 - QG-Puffer
 - PE-Puffer
- Isopropanol

Zur Quantifizierung von DNA-Proben mittels Real Time PCR ist außerdem ein spezifischer Standard bekannter Konzentration nötig. Zur Herstellung dieses Standards wurde eine beliebige cDNA-Probe der 3T3-L1-Zellen im Corbett Rotor-Gene™ 6000 [QIAGEN GmbH, Hilden] amplifiziert. Das Pipettierschema für diesen Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µL ist Tabelle 4 zu entnehmen. Wieder wurde ein 0,2 mL-Reaktionsgefäß verwendet und auf Eis gearbeitet. Die Endkonzentration der Primer betrug jeweils 500 nM. Die spezifische Amplifizierung des gewünschten DNA-Stückes erfolgte mit dem in Tabelle 5 dargestellten Temperaturprogramm. Tabelle 3 enthält sämtliche Primersequenzen.

PCR	Primersequenzen	Produkt
PPAR γ 2	forward: 5`-aac tct ggg aga ttc tcc tgt tga-3` reverse: 5`-gaa gtg ctc ata ggc agt gca t-3`	69 bp
GLUT4	forward: 5`-cta tgc tgg cca aca atg tc-3` reverse: 5`-ccc tga tgt tag ccc tga gt-3`	131 bp
Resistin	forward: 5`-agc gga tga aga acc ttt ca-3` reverse: 5`-gga gga gac tgt cca gca at-3`	185 bp
aP2	forward: 5`-aag tgg gag tgg gct ttg c-3` reverse: 5`-ccg gat ggt gac caa atc c-3`	92 bp
18S	forward: 5`-aca cgg aca gga ttg aca ga-3` reverse: 5`-gga cat cta agg gca tca ca-3`	238 bp

Tabelle 3: Primersequenzen

Die Sequenzen für die 18S-Primer wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Frank (Universität Hohenheim, Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft) zur Verfügung gestellt, diejenigen für die GLUT4-Primer von der Arbeitsgruppe Klaus (Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Potsdam). Die restlichen Primersequenzen wurden verschiedenen Literaturquellen entnommen (PPAR γ 2 (Edvardsson *et al.*, 2006); Resistin (Haugen *et al.*, 2005); aP2 (Guan *et al.*, 2005)).

iQ SYBR Green Supermix	10 μ L
forward-Primer (10 pmol/ μ L)	1 μ L
reverse-Primer (10 pmol/ μ L)	1 μ L
steriles dd H ₂ O	7 μ L
cDNA-Probe	1 μ L

Tabelle 4: Pipettierschema für die Amplifizierung eines spezifischen cDNA-Stückes zur Herstellung eines Standards für die Real Time PCR

Aktivierung der iTaq™ DNA-Polymerase	3 min	95°C	1x
Denaturierung	10 sec	95°C	40x
Annealing	15 sec	55°C	
Elongation	20 sec	72°C	

Tabelle 5: Temperaturprogramm für die Amplifizierung eines spezifischen cDNA-Stückes zur Herstellung eines Standards für die Real Time PCR

Anschließend wurde das PCR-Produkt einer Agarosegelelektrophorese unterworfen. Hierzu wurden zum Probenvolumen von 20 μ L 4 μ L 6 x Loading Dye hinzugefügt und gemischt. Das Agarosegel wurde wie in Abschnitt 2.6.2 beschrieben hergestellt. Verwendet wurden dafür je nach erwarteter Produktlänge 1-2 g Agarose, 100 mL 1 x TAE-Puffer sowie 20 μ L Ethidiumbromidstammlösung. Neben der Probe wurde ein DNA-Molekulargewichtsmarker aufgetragen, der die Kontrolle der Produktlänge ermöglichte. Die Elektrophorese erfolgte bei ca. 100 V und je nach Größe des Produkts für 1-2 h. Unter UV-Belichtung wurde dann die entsprechende Bande mit Hilfe eines Skalpell und mit möglichst wenig Agaroseüberschuss ausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Mittels QIAquick® Gel Extraction Kit wurde nun die DNA aus dem Agarosestück isoliert. Es wurde jeweils mit 16000 x g zentrifugiert und bei Raumtemperatur gearbeitet. Zunächst wurden 3 Volumina QG-Puffer (100 mg \approx 100 μ L) zur Agarose gegeben und diese durch Erhitzen für 10 min bei 50°C ge-

schmolzen. Anschließend wurde 1 Volumen Isopropanol zugesetzt, gemischt und der Ansatz auf eines der im Kit enthaltenen Säulchen gegeben. Nach 1-minütiger Zentrifugation wurde das Sammelgefäß geleert und anschließend durch erneute Zentrifugation mit 500 µL QG-Puffer die Agarosereste entfernt. Anschließend wurde das Säulchen mit 750 µL PE-Puffer gewaschen, das Sammelgefäß geleert und ein weiteres Mal zentrifugiert, um sämtliche Ethanolreste zu beseitigen. Nach Überführen des Säulchens in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß wurde die DNA mit 50 µL dd H₂O eluiert und sofort auf Eis gestellt. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte ähnlich wie in Abschnitt 2.6.2 für die RNA beschrieben im UV-Spektrometer Smart Spec™ 3000 [Bio-Rad Laboratories GmbH, München] – jedoch unverdünnt und in einer sterilen Mikroküvette [UVette®, Eppendorf AG, Hamburg] bei einer Weglänge von 2 mm. Die Berechnung der Kopienzahl der spezifischen DNA-Stücke pro Mikroliter wurde nach folgender Gleichung durchgeführt:

$$\text{Kopien}/\mu\text{L} = \frac{x \text{ g}/\mu\text{L DNA}}{[\text{Produktlänge in bp}] \cdot 660} \cdot 6,022 \cdot 10^{23}$$

Anschließend wurde diese DNA-Lösung bis zu einer Konzentration von 10⁷ Kopien/µL (cop/µL) verdünnt, aliquotiert und bei –20°C aufbewahrt.

2.6.4.2 Durchführung der Real Time PCR

Reagenzien/Lösungen

- iQ™ SYBR® Green Supermix [Bio-Rad Laboratories GmbH, München]

Die Real Time PCRs wurden im Corbett Rotor-Gene™ 6000 mit einem 36-Well Rotor durchgeführt. Um ähnliche Temperaturverhältnisse für jeden Lauf zu gewährleisten, wurden eventuelle freie Plätze mit leeren 0,2 mL-Reaktionsgefäßen aufgefüllt. Zur späteren Quantifizierung der ursprünglich in jeder Probe vorhandenen Kopienzahl der jeweiligen spezifischen cDNA wurden sechs verschiedene Standardwerte (S1 – S6) in jeden Lauf integriert. Die Konzentrationen der Standards sind Tabelle 6 zu entnehmen.

Bezeichnung	S1	S2	S3	S4	S5	S6
Konzentration [cop/ μ L]	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2

Tabelle 6: Bezeichnung und Konzentration der in der Real Time PCR verwendeten Standardwerte

Transkript	PPAR γ 2	GLUT4	Resistin	aP2	18S
Verdünnung der cDNA-Proben	-	-	1:100	1:100	1:10000

Tabelle 7: Verdünnung der cDNA-Proben für die Bestimmung der jeweiligen Transkripte mittels Real Time PCR

Die optimale Verdünnung der cDNA-Proben wurde für jedes Transkript in Vorversuchen ermittelt und ist in Tabelle 7 dargestellt. Alle vorbereitenden Arbeiten bis zur Messung der Proben wurden auf Eis unter halbsterilen Bedingungen durchgeführt. Es wurden Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 20 μ L in 0,2 mL-Reaktionsgefäße pipettiert. Das Pipettierschema für einen einzelnen Ansatz zeigt Tabelle 8. Um Fehler durch Ungenauigkeit beim Pipettieren zu vermeiden, wurde jedoch ein Mastermix für alle Proben aus iQTM SYBR[®] Green Supermix, den Primern und sterilem dd H₂O mit ca. 5% Überschuss hergestellt, von diesem pro Ansatz 19 μ L verwendet und dann 1 μ L der eventuell verdünnten cDNA-Probe, des jeweiligen Standards bzw. für die Negativkontrolle lediglich 1 μ L steriles dd H₂O hinzugefügt. Die Endkonzentration der Primer betrug auch hier je 500 nM, ihre Sequenzen sind in Tabelle 3 aufgelistet. Anschließend wurde kurz gemischt und die Proben in den 36-Well Rotor eingesetzt. Die verwendeten Temperaturprogramme des Corbett Rotor-GeneTM 6000 sind in Tabelle 9 aufgeführt.

iQ SYBR Green Supermix	10 µL
forward-Primer (100 pmol/µL)	0,1 µL
reverse-Primer (100 pmol/µL)	0,1 µL
steriles dd H ₂ O	8,8 µL
Probe	1µL

Tabelle 8: Pipettierschema für einen Real Time PCR-Ansatz

Aktivierung der iTaq™ DNA-Polymerase		3 min	95°C	1 x	
Denaturierung		10 sec	95°C	40 x	
Annealing	PPAR γ 2	15 sec	60°C		
	GLUT4		60°C		
	Resistin		56°C		
	aP2		56°C		
	18S		60°C		
Elongation		20 sec	72°C		
1. FLUORESZENZMESSUNG					
Schmelzung unspezifischer Produkte	PPAR γ 2	3 sec	79°C		
	GLUT4		83°C		
	Resistin		79°C		
	aP2		79°C		
	18S		84°C		
2. FLUORESZENZMESSUNG					
Schmelzkurve	PPAR γ 2	62°C bis 95°C mit 0,5°C/5 sec			
	GLUT4	62°C bis 95°C mit 0,5°C/5 sec			
	Resistin	57°C bis 95°C mit 0,5°C/5 sec			
	aP2	57°C bis 95°C mit 0,5°C/5 sec			
	18S	62°C bis 95°C mit 0,5°C/5 sec			

Tabelle 9: Temperaturprogramme für die Real Time PCR

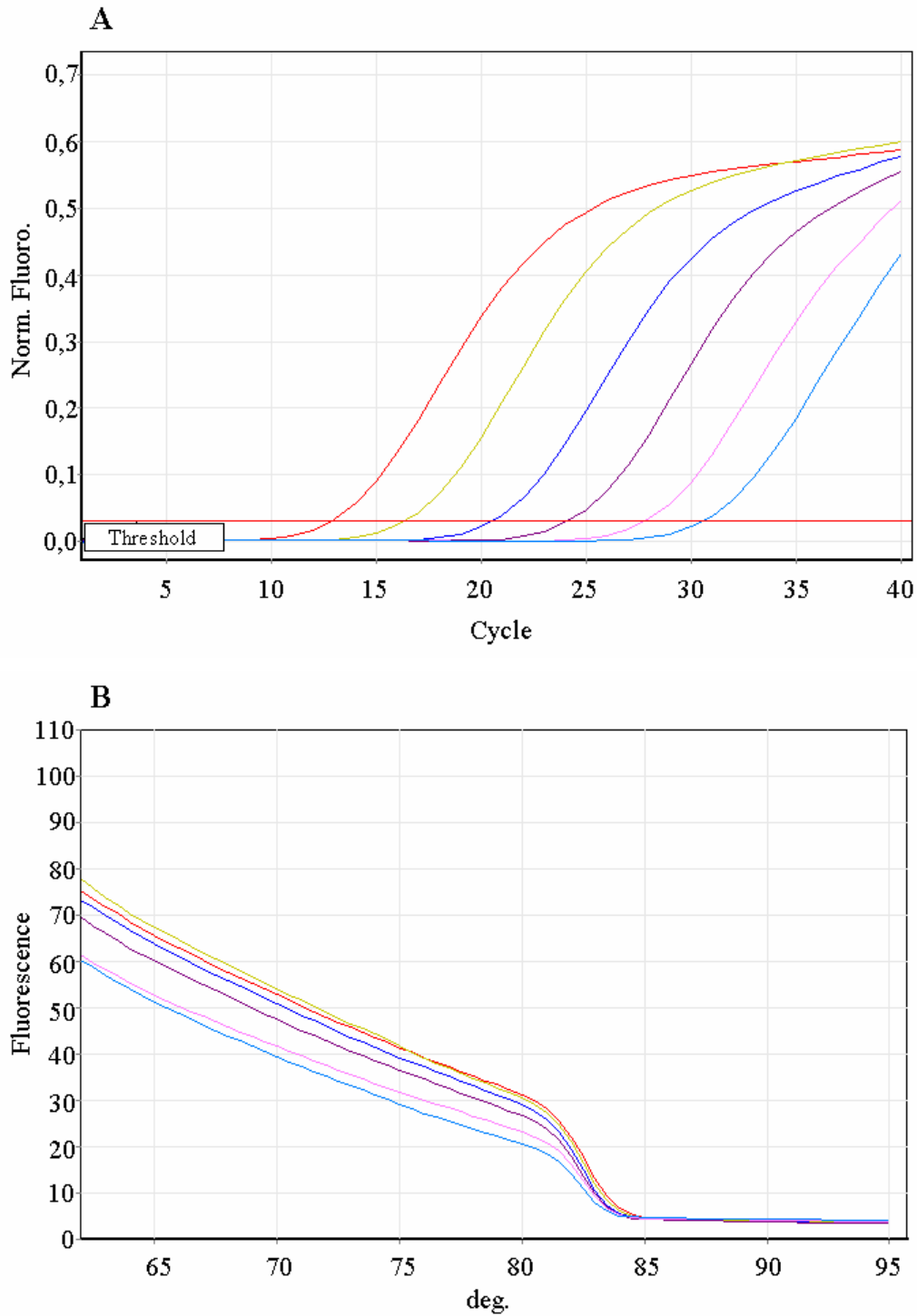


Abbildung 4: Typischer Verlauf der Fluoreszenz bei der Real Time PCR; Amplifizierung (A), Schmelzkurve (B)

Die Auswertung der erhaltenen Daten wurde mit der Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7 [QIAGEN GmbH, Hilden] durchgeführt. Alle Werte wurden auf die 18S rRNA (18S) bezogen, deren Expressionsrate von den in dieser Arbeit untersuchten Bedingungen unbeeinflusst bleibt. Abbildung 4A zeigt anhand eines Standards

den typischen Verlauf der Fluoreszenz während der Amplifizierung des spezifischen cDNA-Stückes inklusive dem als *Threshold* bezeichneten Schwellwert, der mit Hilfe der Software ermittelt wird. Der Zeitpunkt (Zyklenzahl), zu dem die Fluoreszenz einer Probe diesen Wert erreicht, wird für die Quantifizierung herangezogen. Die dazugehörigen Schmelzkurven sind in Abbildung 4B dargestellt. Der starke Abfall der Fluoreszenz bei ca. 83°C entspricht dem Schmelzpunkt des PCR-Produktes. Da die Schmelzkurven ansonsten gleichmäßig verlaufen, kann davon ausgegangen werden, dass keine unspezifischen Produkte oder Primerdimere gebildet wurden.

2.7 Proteinbiochemie

Auch auf Proteinebene wurden Effekte der in dieser Arbeit verwendeten Ölemulsionen bzw. der Zytokine auf 3T3-L1-Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen nach der jeweiligen Inkubationszeit lysiert, die Proteine in definierter Menge mittels SDS-PAGE aufgetrennt und schließlich mit spezifischen Antikörpern detektiert.

2.7.1 Herstellung von Zelllysaten

Reagenzien/Lösungen

- PBS⁻ mit 100 µM Natriumorthovanadat
Zugabe von 1 µL Natriumorthovanadat-Stammlösung (100 mM) pro mL PBS⁻ direkt vor Verwendung
- Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren
20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 mM NaF, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100
Zugabe folgender Inhibitoren direkt vor Verwendung:
 - 1 µL/mL Natriumorthovanadat (Stammlösung: 100 mM)
 - 1,5 µL/mL PMSF (Stammlösung: 0,5 M in Methanol)
 - 10 µL/mL Aprotinin (Stammlösung: 1 mg/mL)
 - 10 µL/mL Leupeptin (Stammlösung: 1 mg/mL)
 - 40 µL/mL Pepstatin A (Stammlösung: 0,25 mg/mL in Methanol)
- 4 x Lämmli
1 mL 1,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 3 mL Glycerin, 0,6 mL 20% SDS, 0,5 mL β-Mercaptoethanol, etwas Bromphenolblau, ad 10 mL dd H₂O

Die Lyse der Zellen wurde auf Eis durchgeführt. Je nach Bedarf – vor allem nach einer vorangegangenen Ölinkubation – wurden die Zellen zunächst mit kaltem PBS⁻ mit Natriumorthovanadat gewaschen. Anschließend wurden pro 60 mm-Gewebe-
kulturschale 200 µL bzw. pro 100 mm-Schale 500 µL vorgekühlter Lysispuffer mit Inhibitoren zugegeben und die Zellen durch Abschaben in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach kurzem Mischen folgte eine ca. 30-minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurde erneut gründlich gemischt und die Lysate 10 min bei ca. 16000 x g und 4°C abzentrifugiert. Danach wurden die Überstände in neue Gefäße pipettiert und ihre Proteinkonzentration bestimmt (siehe Abschnitt 2.7.2). Für die Analyse der Proben mittels SDS-PAGE wurden jeweils 20-50 µg Protein mit dd H₂O auf ein definiertes Volumen gebracht, mit einer entsprechenden Menge 4 x Lämmli versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Gelagert wurden die Lämmli-Proben bei -20°C.

2.7.2 Proteindetermination

Reagenzien/Lösungen

- Lysispuffer ohne Inhibitoren (siehe Abschnitt 2.7.1)
- BSA-Stammlösung: 1,4 mg/mL BSA in Lysispuffer ohne Inhibitoren
- Bio-Rad[®] DC Protein Assay [Bio-Rad Laboratories GmbH, München]
 - Reagenz A
 - Reagenz S
 - Reagenz B

Um gleiche Gesamtproteinmengen in verschiedenen Zelllysaten hinsichtlich ihrer Zusammensetzung untersuchen zu können, wurde die Proteinkonzentration in den Lysaten mit Hilfe des Bio-Rad[®] DC Protein Assay nach der Methode von Lowry bestimmt (Lowry *et al.*, 1951). Hierzu wurde mit dem in Abschnitt 2.7.1 verwendeten Lysispuffer – allerdings ohne Inhibitoren – eine 1:5-Verdünnung der Lysate hergestellt und davon in Dreifachbestimmung je 5 µL in eine 96-well-Flachbodenplatte pipettiert. In gleicher Weise wurde ein Standard mit acht verschiedenen BSA-Konzentrationen auf die Platte gegeben. Die Konzentrationen dieses Standards und das entsprechende Pipettierschema sind Tabelle 10 zu entnehmen. Anschließend wurden jeweils 25 µL einer 1:50-Verdünnung von Reagenz S in Reagenz A zugegeben sowie 200 µL Reagenz B. Nach 10- bis 20-minütiger Inkubation im Dunkeln wur-

de mittels ELISA-Reader EL340 [Bio-Tek Instruments, Winooski, USA] die Absorption bei 750 nm gemessen. Die Durchführung der Proteinbestimmung erfolgte bei Raumtemperatur. Ausgewertet wurden die Daten mit der MikroWin Software Version 3.0 [Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath] sowie GraphPad Prism 4.0 [GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA USA].

Standard Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
BSA-Stammlösung [μL]	0	2	5	10	30	50	70	100
Lysispuffer [μL]	100	98	95	90	70	50	30	0
Proteinkonzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	0	0,03	0,07	0,14	0,42	0,70	0,98	1,40

Tabelle 10: Pipettierschema für die BSA-Eichgerade

2.7.3 Immunpräzipitation

Bei manchen Proteinen empfiehlt sich beispielsweise auf Grund niedriger Expressionsraten die Durchführung einer Immunpräzipitation zur späteren Detektion des Proteins im Western Blot. Es handelt sich hierbei um die Aufkonzentrierung eines Proteins durch Präzipitation mittels spezifischem Antikörper aus einem Gemisch. Dabei bedient man sich in der Regel sogenannter Beads, z. B. aus quervernetzter Agarose (Sephargose), die mit Protein A oder Protein G beschichtet sind. Protein A und Protein G sind Zellwandproteine bestimmter Bakterienstämme und binden spezifisch an die F_C -Region der meisten Säugetierantikörper. Durch Zentrifugation kann der Komplex aus Protein, Antikörper und Sepharosebead vom restlichen Zelllysat abgetrennt werden. Eine Erweiterung dieser Methode ist die Koimmunpräzipitation, mit deren Hilfe Protein-Protein-Wechselwirkungen untersucht werden können, indem ein potentieller Interaktionspartner zusammen mit dem gebundenen Protein präzipitiert wird.

Reagenzien/Lösungen

- IP-Lysispuffer 1 mit Proteaseinhibitoren
50 mM Hepes pH 7,0, 150 mM NaCl, 10% Glycerin, 1% Triton X-100, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 10 mM Natriumpyrophosphat, 100 mM NaF
Zugabe folgender Inhibitoren direkt vor Verwendung:
 - 1 µL/mL Natriumorthovanadat (Stammlösung: 100 mM)
 - 1,5 µL/mL PMSF (Stammlösung: 0,5 M in Methanol)
 - 10 µL/mL Aprotinin (Stammlösung: 1 mg/mL)
 - 10 µL/mL Leupeptin (Stammlösung: 1 mg/mL)
 - 40 µL/mL Pepstatin A (Stammlösung: 0,25 mg/mL in Methanol)
- IP-Lysispuffer 2 mit Proteaseinhibitoren
1% Nonidet P40, 0,4% Natriumdeoxycholat, 60 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7,4
Zugabe folgender Inhibitoren direkt vor Verwendung:
 - 1 µL/mL Natriumorthovanadat (Stammlösung: 100 mM)
 - 1,5 µL/mL PMSF (Stammlösung: 0,5 M in Methanol)
 - 10 µL/mL Aprotinin (Stammlösung: 1 mg/mL)
 - 10 µL/mL Leupeptin (Stammlösung: 1 mg/mL)
 - 40 µL/mL Pepstatin A (Stammlösung: 0,25 mg/mL in Methanol)
- Pansorbin[®] Cells
10% Suspension in PBS, 0,1% NaN₃, pH 7,2
- 10% SDS
- α-gp130 (BP-4) [Diaclone, Besançon, Frankreich]
- α-IRS1 (C-20) [Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg]
- α-IRβ (C-19) [Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg]
- Protein G-Sepharose[®], Fast Flow
Stammsuspension: ca. 0,1 bis 0,2 mg/mL in RIPA-Puffer (bezogen auf Protein G)
- Protein A-Sepharose[®] CL-4B [Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Nümbrecht]
Stammsuspension: 50 mg/mL in RIPA-Puffer (bezogen auf Sepharose)

- RIPA-Puffer
1% Nonidet P40, 0,5% Natriumdeoxycholat, 0,1% SDS, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl
- 2 x Lämmli
1 mL 1,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 3 mL Glycerin, 0,6 mL 20% SDS, 0,5 mL β -Mercaptoethanol, etwas Bromphenolblau, ad 20 mL dd H₂O

Alle Immunpräzipitationen der vorliegenden Arbeit wurden bei 4°C durchgeführt. Die Zentrifugationen erfolgten bei 16000 x g.

Immunpräzipitation von gp130

Die Immunpräzipitation von gp130 wurde aus den wie unter 2.7.1 beschrieben hergestellten Zelllysaten vorgenommen. Hierzu wurde eine etwa 600-800 μ g Protein entsprechende Menge aus jedem Zelllysate entnommen und mit dem dort verwendeten Lysispuffer auf 250 μ L aufgefüllt. Außerdem wurde in jeden Versuch eine Kontrollprobe integriert, die lediglich aus 250 μ L Lysispuffer bestand. Zu jeder Probe wurden 12,5 μ L zweimal mit RIPA-Puffer gewaschenes Pansorbin zugegeben und 1 h im Überkopfschüttler [Roto-Shake, A. Kühner AG, Basel] inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde für 10 min zentrifugiert und die Überstände in frische Reaktionsgefäße überführt, in denen bereits je 7,5 μ L 10% SDS vorgelegt waren. Zu jeder Probe wurde 1 μ g des Antikörpers α -gp130 (BP-4) zugesetzt und über Nacht über Kopf geschüttelt. Am nächsten Tag wurde zunächst 5 min zentrifugiert und die Überstände in frische Reaktionsgefäße überführt. Zu jeder Probe wurden dann 50 μ L Protein G-Sepharose gegeben und erneut für 1-2 h über Kopf geschüttelt. Die Sepharosebeads wurden dann 1 min abzentrifugiert und zweimal mit je 750 μ L RIPA-Puffer gewaschen. Die Pellets wurden in 30 μ L 2 x Lämmli aufgenommen und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Aufbewahrung bis zur Analyse mittels SDS-PAGE erfolgte bei -20°C.

Immunpräzipitation von IRS1

Teilweise war auch zur Detektion von IRS1 eine Aufkonzentrierung durch Immunpräzipitation auf Grund nur schwacher Signale im Western Blot nötig. Die Stimulation der Zellen wurde wie unter 2.1.5 beschrieben durchgeführt und anschließend die Zel-

len pro 60 mm-Schale nach Zugabe von 300 μ L IP-Lysispuffer 1 mit Proteaseinhibitoren abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach kurzem Mischen wurde ca. 30 min auf Eis inkubiert, anschließend erneut gründlich gemischt und 5 min abzentrifugiert. Die Überstände wurden in frische Reaktionsgefäße überführt und einer Proteindetermination (siehe Abschnitt 2.7.2) unterzogen. Für die Immunpräzipitation wurden ca. 500 μ g Protein mit IP-Lysispuffer 1 auf ein definiertes Volumen aufgefüllt. Das gleiche Volumen IP-Lysispuffer 1 ohne Protein diente als Kontrolle und wurde im weiteren Verlauf wie alle anderen Proben behandelt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden nun zu jeder Probe 50 μ L Protein A-Sepharose gegeben und für 2 h über Kopf geschüttelt. Parallel dazu wurde eine entsprechende Anzahl sogenannter Präinkubationen angesetzt und ebenfalls 2 h über Kopf geschüttelt. Ein Präinkubationsansatz bestand aus 500 μ L IP-Lysispuffer 1 sowie 70 μ L Protein A-Sepharose und 1 μ g α -IRS1 (C-20). Danach wurden alle Ansätze 1 min abzentrifugiert, die Überstände der Proben zu den Pellets der Präinkubationen gegeben und erneut 2 h über Kopf geschüttelt. Nach Abzentrifugation der Sepharosebeads wurden die Überstände zur eventuellen weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren und die Pellets einmal mit 300 μ L IP-Lysispuffer 1 gewaschen und dann in 10 μ L 2 x Lämmli aufgenommen, für 5 min bei 95°C denaturiert und dann bis zur weiteren Analyse in der SDS-PAGE ebenfalls bei -20°C gelagert.

Koimmunpräzipitation von IR β mit Caveolin-1

Um die Wechselwirkung von IR β mit Caveolin-1 zu untersuchen, wurde IR β immunpräzipitiert und anschließend beide Proteine im Western Blot nachgewiesen. Die auf 100 mm-Schalen gewachsenen Zellen wurden hier nach Zugabe von je 1 mL IP-Lysispuffer 2 mit Proteaseinhibitoren abgeschabt, in ein Reaktionsgefäß überführt, nach kurzem Mischen 30 min auf Eis inkubiert und nach 5-minütiger Zentrifugation die Überstände in frische Gefäße übertragen. Nach Ermittlung der jeweiligen Proteinkonzentration (siehe Abschnitt 2.7.2) wurde von jeder Probe ein 800 μ g Protein entsprechendes Volumen mit IP-Lysispuffer 2 auf 250 μ L aufgefüllt. Außerdem wurde eine Kontrolle in Form von 250 μ L Lysispuffer angesetzt. Zu jeder Probe sowie zur Kontrolle wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 12,5 μ L zweimal mit RIPA-Puffer gewaschenes Pansorbin zugegeben und ca. 1 h über Kopf geschüttelt. Anschließend wurden die Überstände in Reaktionsgefäße überführt, in denen bereits

jeweils 7,5 µL 10% SDS vorgelegt waren. Nach Zugabe von je 1 µg α -IR β (C-19) wurde über Nacht im Überkopfschüttler inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Proben 5 min abzentrifugiert und die Überstände mit je 50 µL Protein A-Sepharose versetzt. Nach 1 h Überkopfschütteln wurde 1 min abzentrifugiert und die so erhaltenen Sepharosepellets zweimal mit je 750 µL RIPA-Puffer gewaschen. Die Überstände wurden zur Aufbewahrung bei -20°C eingefroren. Die Sepharosepellets wurden in je 30 µL 2 x Lämmli aufgenommen, 5 min bei 95°C denaturiert und bis zur Analyse in der SDS-PAGE bei -20°C gelagert.

2.7.4 SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine analytische Methode zur Trennung von Proteingemischen im elektrischen Feld. Zur Auftrennung wird hier ein Gel auf Polyacrylamidbasis mit variabler Porengröße verwendet. Eine wichtige Rolle spielt außerdem das anionische Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS), welches stark denaturierend wirkt, indem es an die hydrophoben Bereiche der Proteine bindet. Des Weiteren gibt es ihnen eine negative Ladung, die die Eigenladung der Proteine überdeckt und proportional zu ihrem Molekulargewicht ist.

Reagenzien/Lösungen

- 30% Acrylamid/1% Bisacrylamid-Lösung (w/v)
- 1,5 M Tris-HCl pH 8,8
- 1,5 M Tris-HCl pH 6,8
- 10% SDS
- 10% Ammoniumpersulfat (APS)
- N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)
- 5 x Laufpuffer
250 mM Tris-Base, 1,9 M Glycin, 0,5% SDS, pH 8,5-8,7
- 1 x Laufpuffer
5 x Laufpuffer 1:5 verdünnt
- Proteinmolekulargewichtsmarker #SM0441 und #SM0671 [Fermentas GmbH, St. Leon-Rot]

In einer entsprechenden Gießvorrichtung wurde zunächst das Trenngel und danach das Sammelgel zwischen zwei Glasplatten gegossen (Pipettierschema siehe Tabelle 11). Vor der Polymerisierung wurde in das Sammelgel ein 10er bzw. 15er Kamm für die Formung der Probestaschen eingesetzt. Nach Fixierung der Gele in einem Mini-PROTEAN® Tetra Cell Elektrophoresesystem [Bio-Rad Laboratories GmbH, München] und Auffüllen der Kammer mit 1 x Laufpuffer wurde der Kamm entfernt und die Proben aufgetragen. Außerdem wurde neben den Proben ein Proteinmolekulargewichtsmarker aufgetragen, der die spätere Identifizierung der Proteine anhand ihres Molekulargewichtes ermöglicht. Die Gele wurden in Abhängigkeit von der Größe des zu detektierenden Proteins für 90-120 min einer Spannung von 100-120 V ausgesetzt.

für ein Gel mit einer Dicke von 1,0 mm	Trenngel			Sammelgel
	8%	10%	12%	
dd H ₂ O	2,3 mL	2 mL	1,65 mL	1,4 mL
Acrylamidlösung (30%/1%)	1,35 mL	1,65 mL	2 mL	330 µL
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1,25 mL	1,25 mL	1,25 mL	-
1,5 M Tris-HCl pH 6,8	-	-	-	250 µL
10% SDS	50 µL	50 µL	50 µL	20 µL
10% APS	50 µL	50 µL	50 µL	20 µL
TEMED	3 µL	2 µL	2 µL	2 µL

Tabelle 11: Pipettierschema für die Herstellung von Polyacrylamidgelen unterschiedlicher Porengröße

2.7.5 Western Blot

Nach beendeter SDS-PAGE wurden die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wiederum mittels Elektrophorese auf eine Trägermembran überführt. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Verfahren angewendet.

2.7.5.1 Semi-Dry Western Blot

Reagenzien/Lösungen

- Methanol
- Anodenpuffer A1 (pH 10-11)
30 mM Tris-Base, 20% Methanol (v/v)
- Anodenpuffer A2 (pH 10-11)
300 mM Tris-Base, 20% Methanol (v/v)
- Kathodenpuffer B (pH 9-10)
25 mM Tris-Base, 20% Methanol (v/v), 40 mM 6-Aminocapronsäure

Das Gel aus der SDS-PAGE, die Polyvinyliden (PVDF)-Membran und das auf 6,5 cm x 8,5 cm zugeschnittene Blotting Papier [Schleicher & Schuell GmbH, Dassel] wurden entsprechend den Angaben in Abbildung 5 angefeuchtet und luftblasenfrei in eine Trans-Blot® SD-Kammer [Bio-Rad Laboratories GmbH, München] geschichtet. Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte mit 44 mA pro Membran für 90 min.

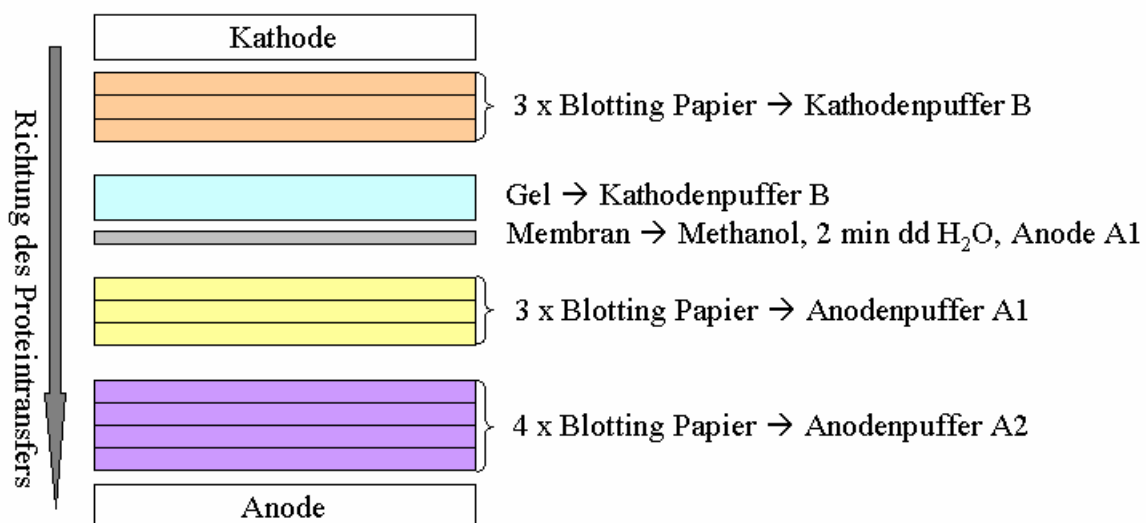


Abbildung 5: Aufbau eines Semi-Dry Western Blots

2.7.5.2 Wet Western Blot

Reagenzien/Lösungen

- Transferpuffer
3,03 g/L Tris-Base, 14,4 g/L Glycin, 20% Methanol (v/v)
- Methanol

Für besonders große Proteine – wie in dieser Arbeit für die Proteine LIFR und IRS1 – hat sich der Transfer mittels Wet Western Blots bewährt. Hier wurden zunächst die Stofffilter und das Blotting Papier (8,5 cm x 10 cm) sowie das Gel in Transferpuffer getränkt. Die Membran wurde in Methanol befeuchtet, anschließend für 2 min in dd H₂O gelegt und dann ebenfalls mit Transferpuffer benetzt. Die Schichtung erfolgte wie in Abbildung 6 gezeigt. Die Halterung wurde mit einer Kühleinheit in den mit Transferpuffer gefüllten Puffertank [Bio-Rad Laboratories GmbH, München] eingesetzt und der Western Blot bei 100 V für 2 h 15 min durchgeführt.

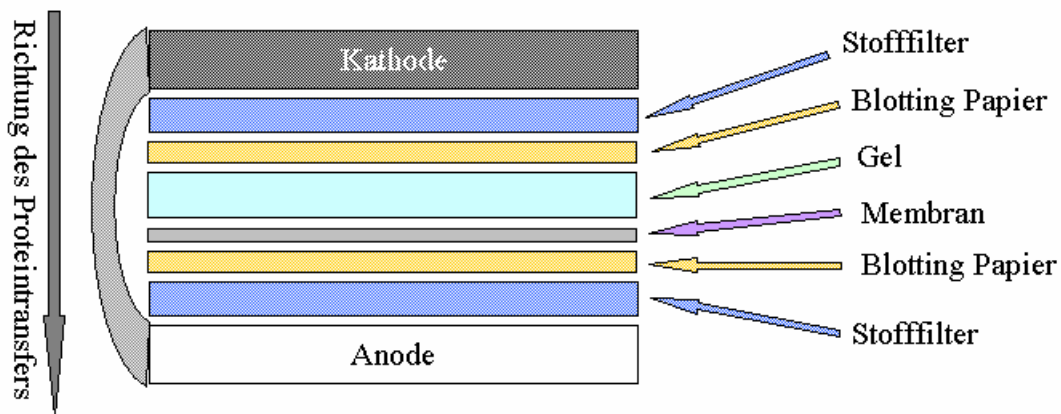


Abbildung 6: Aufbau eines Wet Western Blots

2.7.6 Immundetektion

Nach dem Western Blot können die auf der PVDF-Membran haftenden Proteine über eine Immundetektion visualisiert werden. Dazu wird die Membran zunächst mit einem antigenspezifischen Primärantikörper inkubiert, der durch die Antigen-Antikörper-Bindung ebenfalls an der Membran haften bleibt. An die F_C-Region des primären Antikörpers bindet im nächsten Schritt ein sekundärer Markierungsantikörper, über den schließlich die Detektion erfolgt.

Reagenzien/Lösungen

- 10 x TBS
8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 25 mM Tris-Base, pH 7,4
- 1 x TBS
10 x TBS 1:10 verdünnt
- TBST
0,1% Tween[®] 20 (v/v) in 1 x TBS

- Blockierlösung
5% Milchpulver in TBST bzw. 5% BSA in TBST
- α -pY20 aus Maus [Zymed Laboratories, Invitrogen, Carlsbad, USA]
- α -Caveolin1 (N-20) aus Kaninchen [Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg]
- α -pErk (Tyr 204) aus Kaninchen [Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg]
- α -Erk1 (C-16) aus Kaninchen [Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg]
- α -GLUT4 (IF8) aus Maus [Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg]
- α -PPAR γ (H-100) aus Kaninchen [Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg]
- α -CNTFR α (AN-E4) aus Maus [BD Biosciences, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg]
- α -pSTAT3 (Tyr 705) aus Kaninchen [Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA]
- α -STAT3 aus Kaninchen [Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA]
- α -IR β (C-19) aus Kaninchen [Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg]
- α -gp130 (BP-4) aus Maus [Diaclone, Besançon, Frankreich]
- α -IRS1 (C-20) aus Kaninchen [Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg]
- α -LIFR (C-19) aus Kaninchen [Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg]
- α -Kaninchen-Antikörper mit Meerrettichperoxidase konjugiert (α -rabbit-HRP) [Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Nümbrecht]
- α -Maus-Antikörper mit Meerrettichperoxidase konjugiert (α -mouse-HRP) [Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Nümbrecht]
- ECL-Reagenz (Pierce Enhanced Chemiluminescence Western Blotting Substrate) [Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG, Bonn]
- Entwickler
X-Ray Developer LX 24 (1:5 in dd H₂O) [Kodak GmbH, Paris, Frankreich]
- Stoppbad
Indicator Stop Bath (1:25 in dd H₂O) [Kodak GmbH, Paris, Frankreich]
- Fixierer
X-Ray Fixer AI 4 (1:5 in dd H₂O) [Kodak GmbH, Paris, Frankreich]
- Methanol

- Waschpuffer zur Entfernung der Antikörper
1,667 mL Tris-HCl pH 6,8, 395 μ L β -Mercaptoethanol, 10 mL 10% SDS, ad 50 mL dd H₂O

Für die Immundetektion wurde die PVDF-Membran nach erfolgtem Western Blot sofort in Blockierlösung gelegt und unter Schwenken 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Welche Blockierlösung verwendet wurde, war vom zu detektierenden Protein abhängig. Anschließend wurde die Membran einige Minuten in TBST gewaschen, um Reste der Blockierlösung zu entfernen. Die Inkubation mit der entsprechenden Primärantikörperlösung erfolgte unter Schütteln über Nacht bei 4°C. Danach wurde die Membran einige Male in TBST gewaschen und im Anschluss für ca. 1 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler mit der Sekundärantikörperlösung inkubiert. Um Reste der Antikörperlösung zu entfernen, wurde abschließend wieder einige Male in TBST gewaschen. Die jeweilige Blockierlösung sowie die spezifischen Primär- und Sekundärantikörperlösungen sind für jedes in dieser Arbeit detektierte Protein in Tabelle 12 aufgeführt. Beide Sekundärantikörper, die hier zur Verwendung kamen, waren mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert, welche durch Katalyse der Chemilumineszenzreaktion des hier verwendeten ECL-Reagenzes die Detektion ermöglicht. Jede Membran wurde für 1 min im Dunkeln mit 1 mL dieses ECL-Reagenzes inkubiert und anschließend für die Belichtung eines Röntgenfilms [Agfa-Gevaert AG, Mortsel, Belgien] in einer Fotokassette [Rego X-Ray GmbH, Augsburg] fixiert. Auf dem Röntgenfilm waren nach Einlegen in Entwickler, Stoppbad und Fixierer die Proteine in Form von schwarzen Banden sichtbar.

Um auf einer Membran nacheinander verschiedene Proteine gleicher oder ähnlicher Größe zu detektieren, wurden die bereits bestehenden Antigen-Antikörper-Bindungen gelöst. Hierzu wurde die Membran zunächst kurz in Methanol gelegt und dann für 30 min bei 50°C unter Schwenken mit dem Waschpuffer zur Entfernung der Antikörper inkubiert. Anschließend wurde die Membran einige Minuten in TBST gewaschen und danach erneut mit der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mittels Blockierlösung begonnen.

Protein [kDa]	Blockierlösung (in TBST)	Primärantikörperlösung (in 0,05% NaN₃ in TBST)	Sekundärantikörperlösung (in 0,05% NaN₃ in TBST)
Caveolin1 [22]	5% Milchpulver	α -Caveolin1 1:2000 in 5% BSA	α -rabbit-HRP 1:5000 in 5% Milchpulver
pErk1/2 [42 bzw. 44]	5% Milchpulver	α -pErk 1:1000 in 5% BSA	α -rabbit-HRP 1:5000 in 5% Milchpulver
Erk1 [44]	5% Milchpulver	α -Erk1 1:1000 in 5% BSA	α -rabbit-HRP 1:5000 in 5% Milchpulver
GLUT4 [50-63]	5% Milchpulver	α -GLUT4 1:500 in 5% BSA	α -mouse-HRP 1:3000 in 5% Milchpulver
PPARγ1/2 [55-67]	5% Milchpulver	α -PPAR γ 1:500 in 5% BSA	α -rabbit-HRP 1:5000 in 5% Milchpulver
CNTRF [60-70]	5% Milchpulver	α -CNTRF 1:500 in 5% BSA	α -mouse-HRP 1:3000 in 5% Milchpulver
pSTAT3 [80-92]	5% Milchpulver	α -pSTAT3 1:1000 in 5% BSA	α -rabbit-HRP 1:5000 in 5% Milchpulver
STAT3 [80-92]	5% Milchpulver	α -STAT3 1:1000 in 5% BSA	α -rabbit-HRP 1:5000 in 5% Milchpulver
IRβ [95]	5% Milchpulver	α -IR β 1:1000 in 5% BSA	α -rabbit-HRP 1:5000 in 5% Milchpulver
gp130 [130]	5% Milchpulver	α -gp130 1:1000 in 4% BSA	α -mouse-HRP 1:3000 in 5% Milchpulver
pIRS1 [170-185]	5% BSA	α -pY20 1:1000 in 1% BSA	α -mouse-HRP 1:3000 in 1% BSA
IRS1 [170-185]	5% BSA	α -IRS1 1:1000 in 1% BSA	α -rabbit-HRP 1:5000 in 1% BSA
LIFR [190]	5% BSA	α -LIFR 1:500 in 5% BSA	α -rabbit-HRP 1:5000 in 1% BSA

Tabelle 12: Übersicht über die zur Detektion der verschiedenen Proteine verwendeten Blockier- sowie Primär- und Sekundärantikörperlösungen

Alle Lösungen wurden in TBST angesetzt. Da die Primärantikörperlösungen mehrfach verwendet wurden, enthielten sie zur Vermeidung mikrobieller Kontaminationen außerdem Natriumazid (NaN₃).

2.8 Densitometrie und statistische Auswertung

Densitometrie ist die quantitative Messung der Farbdichte. Die nach der Immundetektion auf Röntgenfilmen erhaltenen Proteinbanden können mit dieser Methode in ihrer Schwärzung verglichen und damit Rückschlüsse auf die in jeder Probe enthaltene Menge des Proteins gezogen werden. Für die densitometrische Bestimmung wurden die entsprechenden Röntgenfilme eingescannt und mittels E.A.S.Y Win 32 Software [Herolab GmbH, Wiesloch] ausgewertet. Zur Beurteilung der Signifikanz der densitometrisch gemessenen Unterschiede zwischen verschiedenen Versuchsbedingungen wurde der t-Test für gepaarte Stichproben verwendet. Dabei handelt es sich um einen Hypothesentest, d. h. es wird berechnet, mit welcher Wahrscheinlichkeit die Nullhypothese – zwei Proben unterscheiden sich nicht – abgelehnt werden kann. Für die vorliegende Arbeit wurde ein Signifikanzniveau von 0,05 gewählt. Damit beträgt die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Proben zu unrecht als signifikant unterschiedlich bezeichnet werden (Nullhypothese wird auf Grund falsch-positiver Ergebnisse abgelehnt; Fehler 1. Art), maximal 5%. Es wurden jeweils drei voneinander unabhängige Experimente ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Differenzierung von 3T3-L1-Prädipozyten zu Adipozyten mittels Insulin, IBMX und Dexamethason

Durch Zugabe der Reagenzien Insulin, IBMX und Dexamethason zum Kulturmedium kann in 3T3-L1-Prädipozyten die Differenzierung zu Adipozyten initialisiert werden. Die Anfärbung der eingelagerten Triglyzeride mittels Oil Red O veranschaulicht die morphologische Entwicklung hin zu Fettzellen (Abbildung 7A). Die Zellen runden sich ab und lagern mit fortschreitender Differenzierung zunehmend Fetttropfchen ein.

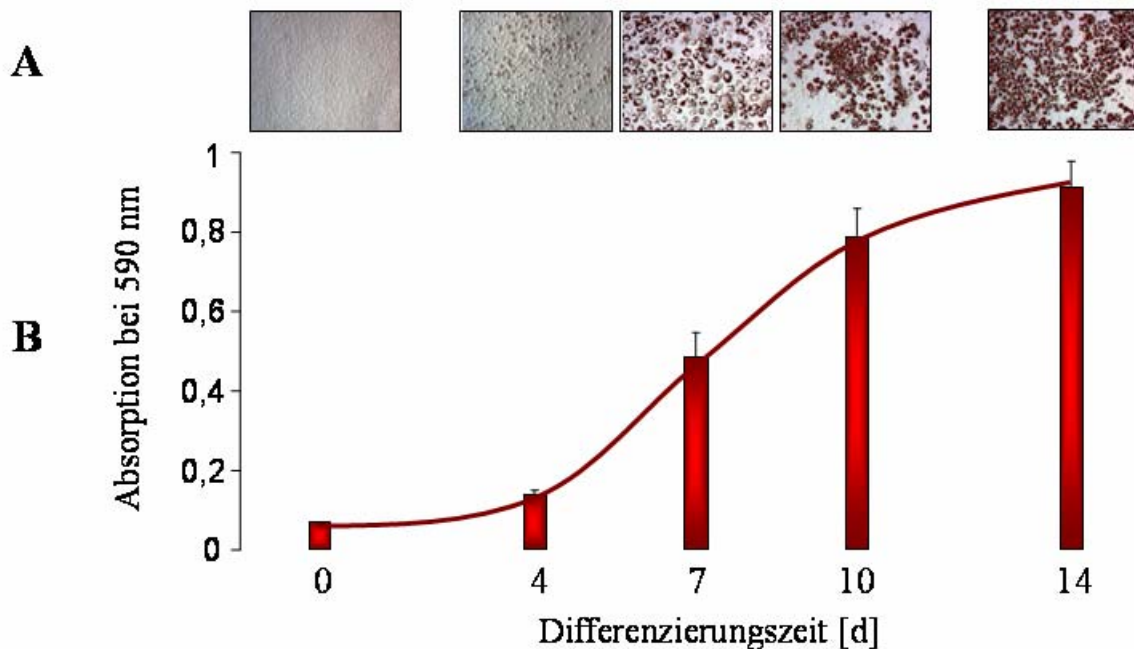


Abbildung 7: Einlagerung von Fetttropfchen in 3T3-L1-Zellen während der Differenzierung mittels Insulin/IBMX/Dexamethason

Die intrazellulären Triglyzeride wurden mit Oil Red O angefärbt (A). Anschließend wurde der Farbstoff mit Isopropanol aus den Zellen herausgelöst und photometrisch quantifiziert (n=2; Mittelwerte mit Standardabweichungen) (B).

Die photometrische Quantifizierung des in den Zellen gelösten Farbstoffes – und damit die Akkumulation von Fett in diesen Zellen – zeigt einen sigmoidalen Kurvenverlauf während einer 14-tägigen Differenzierung (Abbildung 7B). Der stärkste Anstieg der Fetteinlagerung findet sich nach etwa sieben Tagen. Nach 14 Tagen werden die Triglyzeridspeicher kaum noch vergrößert. Nach vier bzw. sieben Tagen Differenzierung wurde mit Hilfe der quantitativen Real Time PCR die Expression ver-

schiedener für Differenzierung und Insulinsignaltransduktion wesentlicher Gene untersucht (Abbildung 8). Die mRNA des Transkriptionsfaktors PPAR γ 2, des insulinabhängigen Glucosetransporters GLUT4 sowie des Fettsäure-bindenden Proteins aP2 nimmt während der 7-tägigen Differenzierung offenbar relativ gleichmäßig zu. Am vierten Tag der Differenzierung finden sich etwa 50% der mRNA-Mengen, die nach sieben Tagen gemessen wurden. Lediglich das bezüglich seiner Wirkung im Zusammenhang mit der Insulinsignaltransduktion kontrovers diskutierte Resistin erfährt auf mRNA-Ebene offenbar bereits zu einem früheren Zeitpunkt einen starken Anstieg.

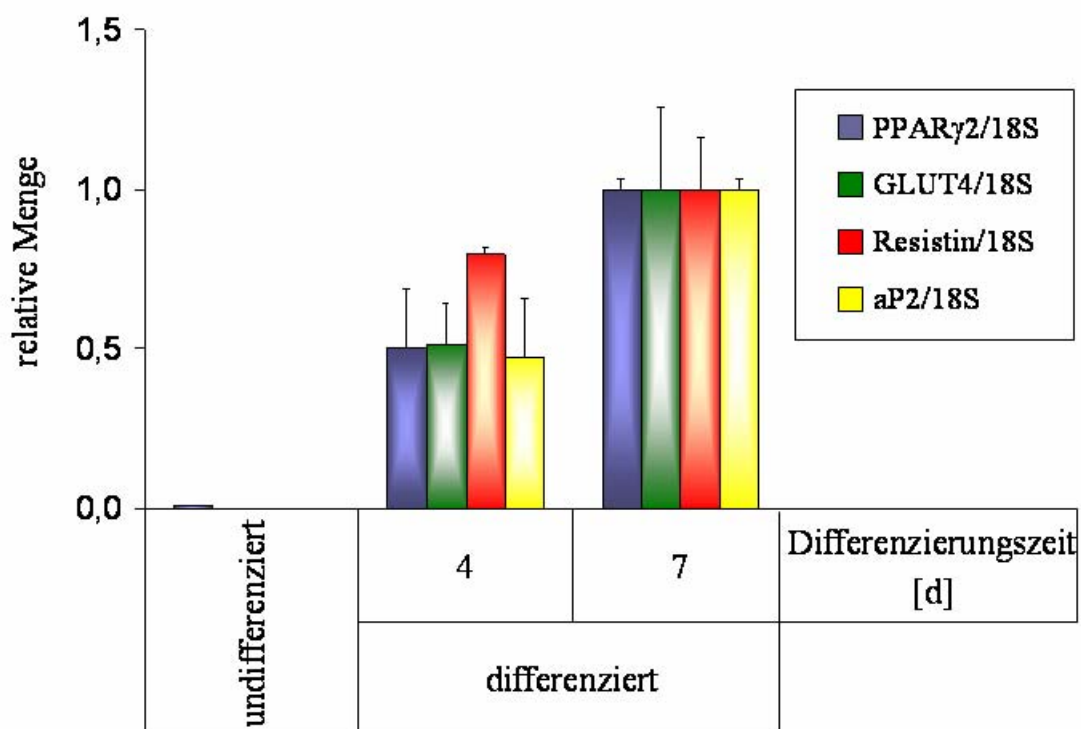


Abbildung 8: mRNA-Spiegel verschiedener Gene während der Differenzierung von 3T3-L1-Zellen mittels Insulin/IBMX/Dexamethason

Die RNA wurde aus den Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und unter Verwendung spezifischer Primer mittels Real Time PCR quantifiziert (n=2; Mittelwerte mit Standardabweichungen).

Außerdem wurde auf Proteinebene die Regulierung von IR β , PPAR γ 1/2, GLUT4, Erk1/2 und Caveolin1 durch Immundetektion nach Western Blot bestimmt (Abbildung 9). Die Expression des IR β zeigt bei etwa fünf bis sieben Tagen ein Maximum. Ganz ähnlich ist der Verlauf bei PPAR γ 2. Das um 30 Aminosäuren kürzere PPAR γ 1 (untere Bande) wird bereits etwas früher am stärksten exprimiert. Die Detektion von GLUT4

zeigt ein klares Maximum nach sieben Tagen. Die Phosphorylierung von Erk1/2 sowie die Expression von Erk1 nehmen mit fortschreitender Differenzierung ab. Die Caveolin1-Expression nimmt bis etwa zum fünften Tag zu und bleibt dann auf diesem hohen Niveau.

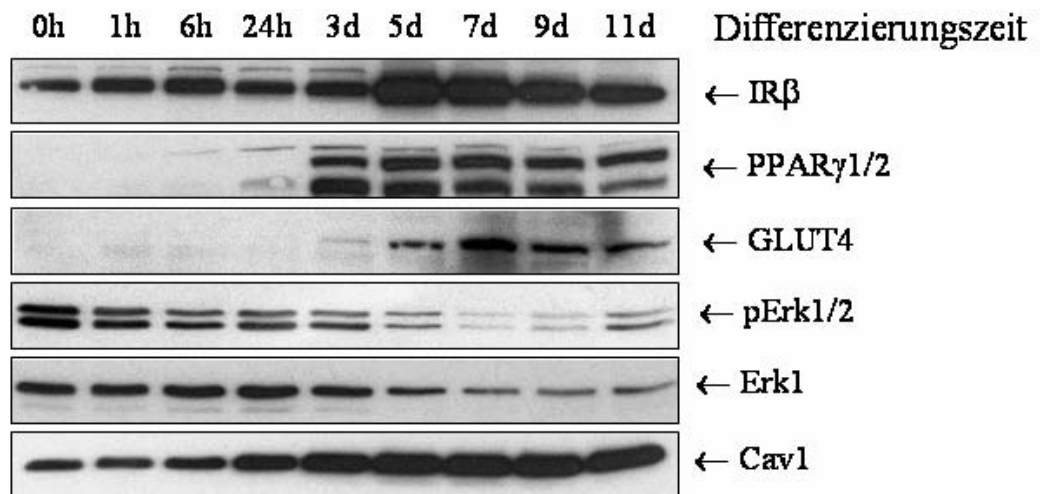


Abbildung 9: Regulierung verschiedener Proteine während der Differenzierung von 3T3-L1-Zellen mittels Insulin/IBMX/Dexamethason

Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten der Differenzierung lysiert, die Proteine anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und unter Einsatz spezifischer Antikörper immunodetektiert.

Insgesamt sind die Zellen nach Behandlung mit Insulin, IBMX und Dexamethason etwa am siebten Tag voll ausdifferenziert und zeigen alle wesentlichen morphologischen und biochemischen Eigenschaften reifer Adipozyten.

3.2 Stimulation von 3T3-L1-Adipozyten mit Insulin

Anhand der Phosphorylierung der Proteine IRS1 und Erk1/2 sowie der Interaktion des Insulinrezeptors mit Caveolin wurden die Intensität und der zeitliche Verlauf der Reaktion von 3T3-L1-Adipozyten auf eine unterschiedlich lang andauernde Stimulation mit Insulin untersucht (Abbildung 10). Am neunten Tag der Differenzierung mit Insulin, IBMX und Dexamethason wurden die Zellen nach 24-stündigem Hungern unterschiedlich lang mit 100 nM Insulin inkubiert. Ein Teil der Zellen erhielt während der gesamten Differenzierungszeit die ansonsten lediglich für vier Tage zugegebene Insulinmenge von 850 nM. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die jeweiligen Proteine direkt aus dem Lysat nach Auftrennung mittels SDS-PAGE detektiert bzw.

zunächst der IR β präzipitiert und dessen Protein-Protein-Interaktion mit Caveolin1 durch Detektion beider Proteine im Western Blot nachgewiesen.

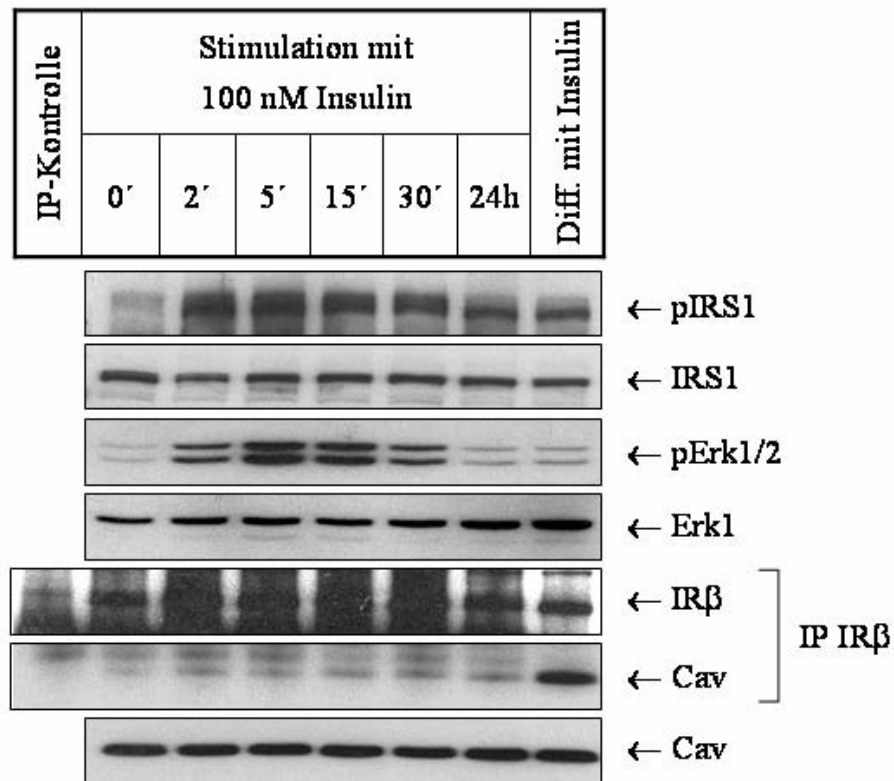


Abbildung 10: Phosphorylierung der Proteine IRS1 und Erk1/2 sowie Interaktion des Insulinrezeptors mit Caveolin nach Stimulation von 3T3-L1-Adipozyten mit Insulin

Die Zellen wurden am neunten Differenzierungstag nach 24-stündigem Hungern mit 100 nM Insulin stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und unter Einsatz spezifischer Antikörper immunodetektiert. Ein Teil der Zellen (letzte Spalte) erhielt bis zur Lyse die sonst nur anfänglich zur Differenzierung eingesetzte Menge von 850 nM Insulin. Diese Zellen wurden ebenfalls lysiert, jedoch wurde hier zunächst eine Immunpräzipitation (IP) von IR β durchgeführt und dessen Interaktion mit Caveolin1 durch Detektion beider Proteine im Western Blot untersucht. Als IP-Kontrolle diente der Lysispuffer ohne Zellbestandteile.

Die Tyrosinphosphorylierung von IRS1 erreicht bereits nach wenigen Minuten Stimulation ihr Maximum und ist auch nach 24-stündiger Stimulation noch deutlich. Auch wenn Insulin während der gesamten Differenzierungszeit zugegeben wird, ist eine IRS1-Phosphorylierung erkennbar. In gleichem Maße reagieren außerdem undifferenzierte Präadipozyten in Form einer IRS1-Phosphorylierung auf eine Stimulation mit Insulin (nicht gezeigt). Auf die Expression von IRS1 hat keine der hier untersuchten Bedingungen einen Einfluss. Die Phosphorylierung von Erk1/2 erreicht nach ca.

5-15 Minuten Insulineinwirkung ihr Maximum und klingt dann rasch ab. Die Insulingabe während der gesamten Differenzierung hat keine Erk-Aktivierung zur Folge. Die Expression von Erk1 bleibt im Wesentlichen unverändert. Eine Wechselwirkung zwischen IR β und Caveolin1, die die Koimmunpräzipitation beider Proteine ermöglicht, ist erst bei permanenter Insulingabe deutlich zu sehen. Der Einfluss einer veränderten Caveolinexpression auf diesen Effekt kann ausgeschlossen werden, da diese unverändert bleibt.

3.3 Wachstum, Vitalität und Fettsäurezusammensetzung von 3T3-L1-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Ölemulsionen

Für die Inkubation der Zellen wurden in dieser Arbeit die für die parenterale Ernährung hergestellten Ölemulsionen Salvilipid[®] und ClinOleic[®] der Firma Baxter verwendet. Bei Salvilipid[®] handelt es sich um eine reine Sojaölemulsion, während ClinOleic[®] aus Olivenöl mit 20% Sojaölzusatz besteht. Der Einfachheit halber werden sie im Folgenden lediglich als Sojaöl (S) bzw. Olivenöl (O) bezeichnet. Um eine toxische Wirkung der Öle auszuschließen, wurde ihr Einfluss auf die Proliferation sowie die metabolische Aktivität der Zellen untersucht. Da differenzierte 3T3-L1-Zellen keine Mitose mehr durchlaufen, wurde das Wachstum undifferenzierter Präadipozyten beobachtet. Hierzu wurden die Zellen mit 0,1% bzw. 1% Soja- oder Olivenöl inkubiert und nach 24 sowie nach 48 Stunden die jeweiligen Zellzahlen mit denen ohne Öl gehaltener Kontrollzellen verglichen (Abbildung 11). Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der beiden Ölemulsionen sind keine wesentlichen Unterschiede im Wachstum zu erkennen. Unter allen untersuchten Bedingungen hat sich die Zahl der Zellen in dieser Zeit etwa verdoppelt. Nach 48 Stunden jedoch zeigt sich ein wachstumshemmender Effekt beider Öle, der bei einer Inkubation mit Sojaöl weniger stark ausgeprägt ist. Außerdem ist eine schwache Konzentrationsabhängigkeit dieser Wirkung erkennbar.

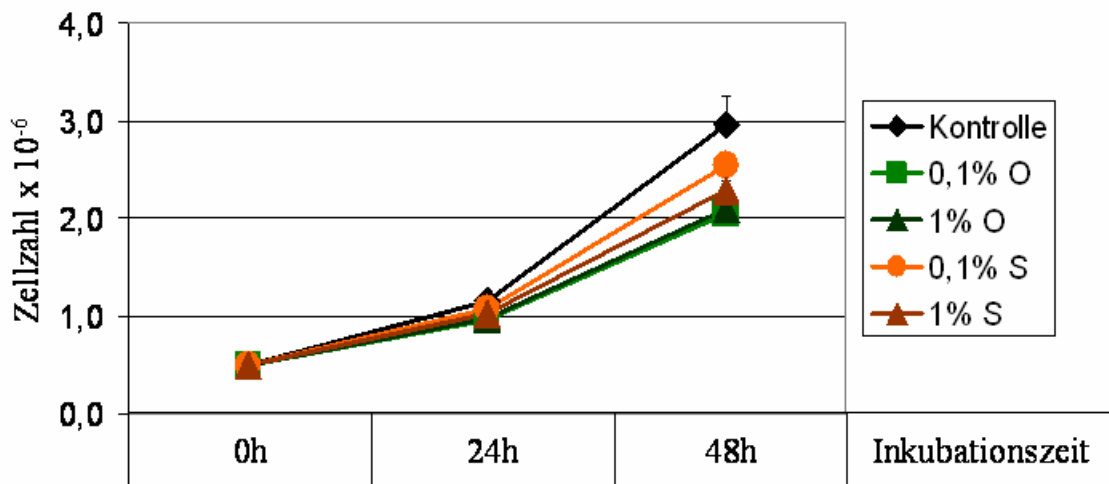


Abbildung 11: Beeinflussung des Wachstums von 3T3-L1-Prädipozyten durch Inkubation mit Olivenöl (O) bzw. Sojaöl (S)

Die Zellen wurden mit Öl in den angegebenen Konzentrationen inkubiert und nach 24 sowie nach 48 Stunden die Zellzahl bestimmt. Als Kontrolle dienten Zellen, die in öl-freiem Medium gehalten wurden. (n=2; Mittelwerte mit Standardabweichungen)

Zur Ermittlung der Zytotoxizität eines Stoffes wird häufig die hauptsächlich vom NADH-Gehalt und damit von der Glycolyserate der Zelle abhängige Umsetzung von MTT zu einem violetten Farbstoff verwendet. Letzterer kann durch photometrische Messung quantifiziert werden und gibt somit Aufschluss über die allgemeine Vitalität der Zellen. Ist der Zellmetabolismus beispielsweise durch apoptotische Prozesse geschwächt, wird weniger MTT umgesetzt. Werden die Öle während der gesamten Differenzierungszeit dem Zellkulturmedium zugesetzt, so zeigt sich überraschenderweise ein deutlicher Anstieg des MTT-Umsatzes um ca. 50% (Abbildung 12). Dieser Effekt ist jedoch unabhängig von der Ölart sowie der Ölkonzentration. Eine zytotoxische Wirkung kann hier nicht belegt werden. Da in weiteren Versuchen ausdifferenzierte 3T3-L1-Zellen für 24 Stunden mit Öl inkubiert wurden (Abschnitte 3.5.2 und 3.5.3), wurde auch unter diesen Bedingungen die Umsetzung von MTT überprüft (Abbildung 13). In diesem Fall ist eine Abnahme der metabolischen Aktivität zu beobachten, die jedoch nicht ausreichend ist, um von einer relevanten Zytotoxizität der Öle auszugehen. Die Positivkontrolle mit 0,1% Triton X-100 führt in beiden Fällen zur fast vollständigen Abtötung der Zellen.

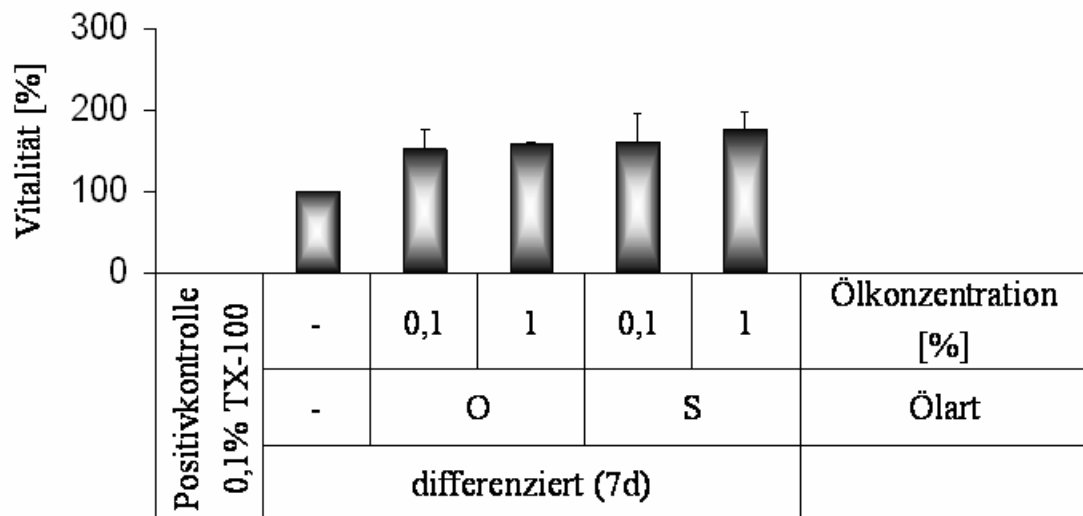


Abbildung 12: Vitalität von 3T3-L1-Adipozyten nach Inkubation mit Olivenöl (O) bzw. Sojaöl (S) während der Differenzierung mit Insulin, IBMX und Dexamethason

Die Zellen wurden sieben Tage lang unter Ölzusatz differenziert und anschließend ihre allgemeine Vitalität mit Hilfe eines MTT-Tests bestimmt. Der hierbei entstandene violette Farbstoff wurde photometrisch quantifiziert. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die unter Zusatz von 0,1% TX-100 differenziert wurden. (n=3; Mittelwerte mit Standardabweichungen)

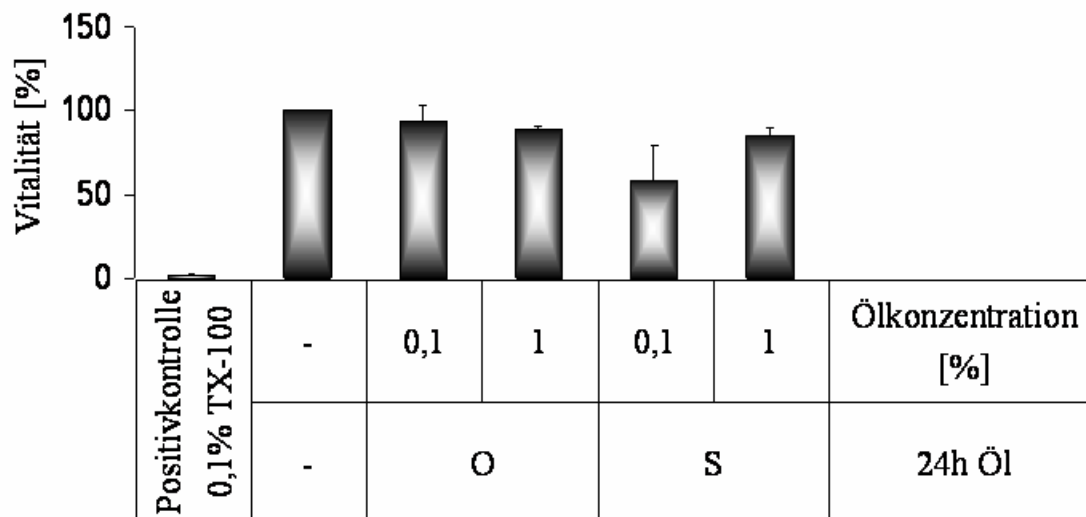


Abbildung 13: Vitalität ausdifferenzierter 3T3-L1-Adipozyten nach 24-stündiger Inkubation mit Olivenöl (O) bzw. Sojaöl (S)

Die ausdifferenzierten Zellen wurden für 24 Stunden mit Öl inkubiert und anschließend ihre allgemeine Vitalität mit Hilfe eines MTT-Tests bestimmt. Der hierbei entstandene violette Farbstoff wurde photometrisch quantifiziert. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die 24 Stunden mit 0,1% TX-100 inkubiert wurden. (n=3; Mittelwerte mit Standardabweichungen)

Die tatsächliche Aufnahme der zum Kulturmedium zugesetzten Fette in die Zellen ist eine Grundvoraussetzung für die Fragestellungen dieser Arbeit. Aufgrund dessen wurden 3T3-L1-Prädipozyten für sechs Stunden mit Oliven- bzw. Sojaöl in den für die folgenden Versuche relevanten Konzentrationen (0,1% bzw. 1%) inkubiert und anschließend die Fettsäurezusammensetzung der Zellen gaschromatographisch analysiert (Abbildung 14). Anhand der für das jeweilige Öl typischen Fettsäuren Linolsäure (Sojaöl) bzw. Ölsäure (Olivenöl) ist deutlich ersichtlich, dass es zu einer konzentrationsabhängigen Veränderung des Fettsäuremusters kommt.

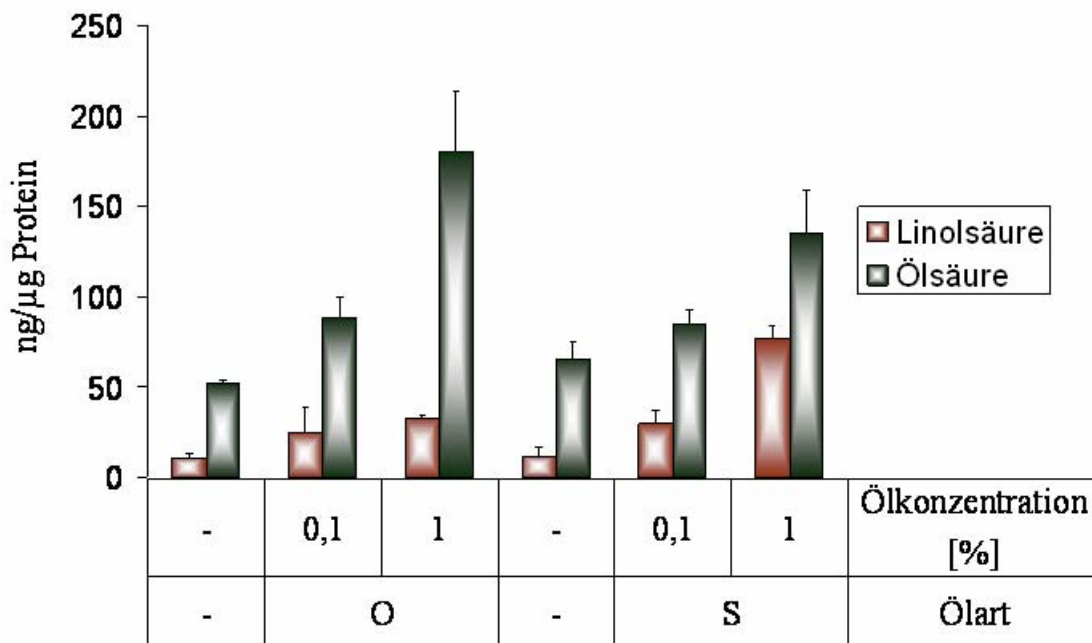


Abbildung 14: Fettsäurezusammensetzung von 3T3-L1-Prädipozyten nach 6-stündiger Inkubation mit Olivenöl (O) bzw. Sojaöl (S)

Nach der Inkubation wurden die Zellen geerntet, homogenisiert und die Fette mit einer Mischung aus Ethylacetat und Hexan (1:1) extrahiert. Im Anschluss wurden die Fette verseift und zu Fettsäuremethylestern umgesetzt, die mittels Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC/MS) analysiert wurden. (n=8; Mittelwerte mit Standardabweichungen) Die Analyse der Fettsäurezusammensetzung wurde von Rasa Adomkiene durchgeführt.

3.4 Einfluss verschiedener Ölemulsionen auf das Differenzierungsverhalten von 3T3-L1-Zellen

Die Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten spielt im Körper eine wichtige Rolle bei der Beseitigung überschüssiger Nährstoffe aus dem Blut. Eine gestörte Differenzierung hat unter anderem die Überschwemmung anderer Organe wie der Leber oder der Muskulatur mit freien Fettsäuren zur Folge und wird mit der Entstehung der Insulinresistenz in Verbindung gebracht. Die als Antidiabetika eingesetzten Thiazolidindione fördern die Differenzierung zu Fettzellen durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors PPAR γ . Dem Einfluss verschiedener nutritiver Fette auf den gesamten Metabolismus wird zunehmend Beachtung geschenkt. Besonders Olivenöl ist in verschiedenen Studien eine positive Wirkung auf Insulin- und Glucosespiegel nachgewiesen worden. In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Einfluss verschiedener Öle auf das Differenzierungsverhalten von 3T3-L1-Zellen untersucht.

3.4.1 Differenzierung von 3T3-L1-Zellen mittels Insulin, IBMX und Dexamethason unter Zugabe verschiedener Ölemulsionen

Zunächst wurden 3T3-L1-Zellen mittels Insulin, IBMX und Dexamethason differenziert und die Auswirkung einer gleichzeitigen Gabe verschiedener Ölemulsionen auf den Differenzierungsprozess untersucht. Die Anfärbung der intrazellulären Triglyceride mittels Oil Red O lässt eine deutliche, konzentrationsabhängige Zunahme der Fetteinlagerung durch die Ölinkubation erkennen (Abbildung 15A). Die photometrische Quantifizierung des in den Zellen gelösten Farbstoffes zeigt, dass die Sojaölinkubation die Bildung größerer Fettspeicher zur Folge hatte als die Inkubation mit Olivenöl (Abbildung 15B). Bei genauerer Betrachtung ergibt sich ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Ölen: Unter dem Einfluss von Sojaöl bilden sich sehr viele kleine Fetttropfchen, wohingegen die mit Olivenöl inkubierten Zellen weniger, aber dafür größere Fetttropfchen enthalten (Abbildung 16).

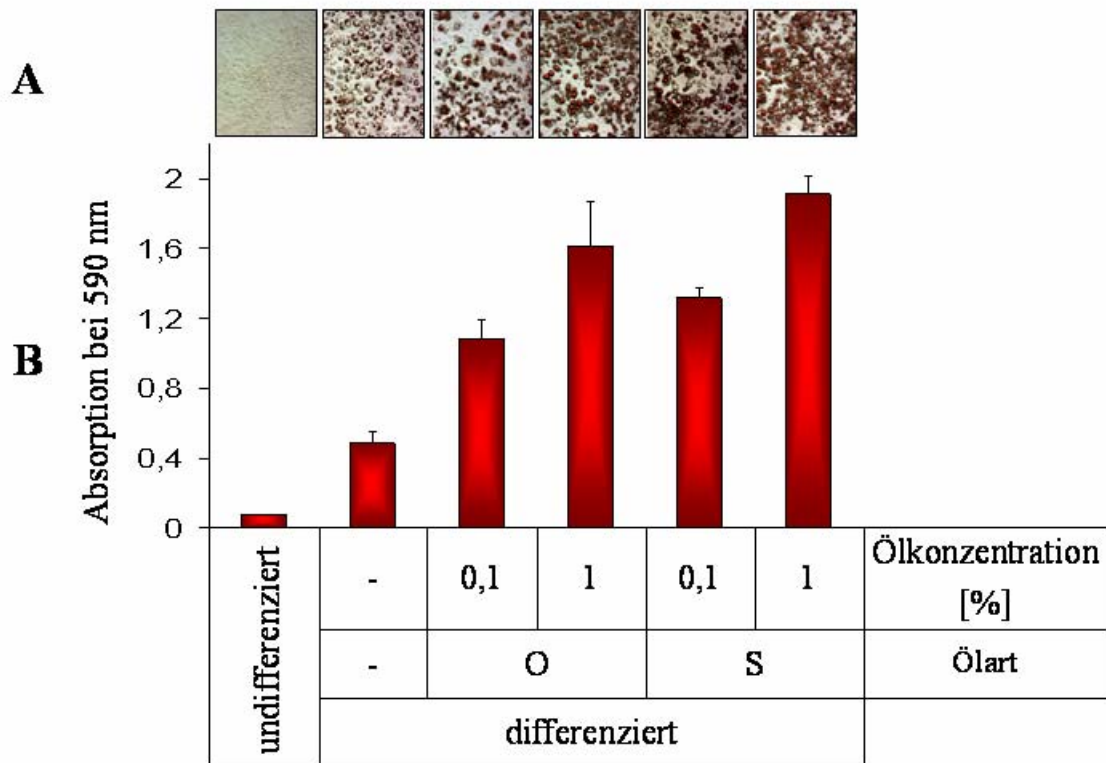


Abbildung 15: Einlagerung von Fetttropfchen in 3T3-L1-Zellen während 7-tägiger Differenzierung mittels Insulin/IBMX/Dexamethason unter Zugabe von Olivenöl (O) bzw. Sojaöl (S)

Die intrazellulären Triglyzeride wurden mit Oil Red O angefärbt (A). Anschließend wurde der Farbstoff mit Isopropanol aus den Zellen herausgelöst und photometrisch quantifiziert (n=2; Mittelwerte mit Standardabweichungen) (B).

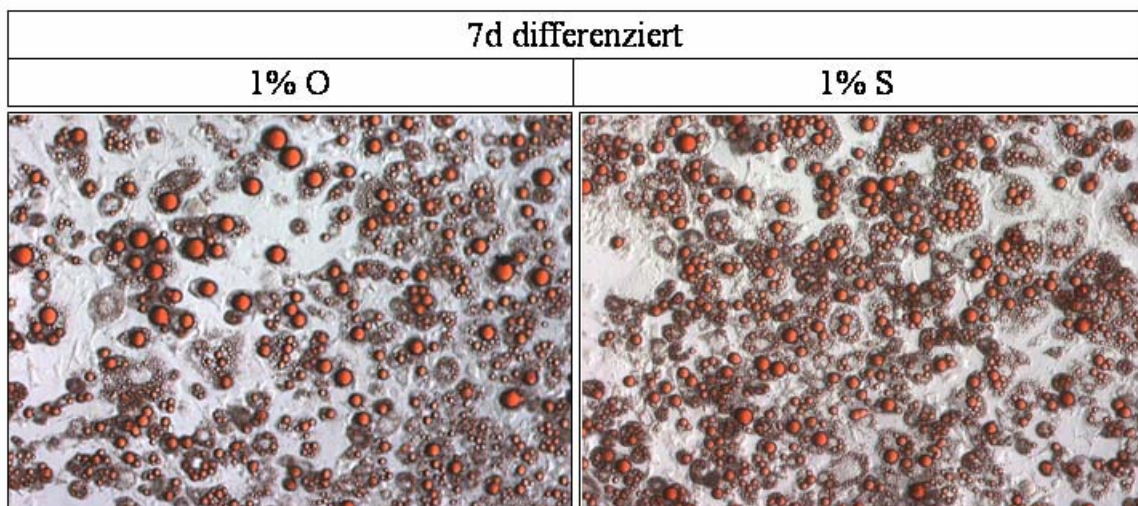


Abbildung 16: Gegenüberstellung der unter Olivenöl (O)- bzw. Sojaölsatz (S) differenzierten Zellen – unterschiedliche Größe der mit Oil Red O gefärbten Fetttropfchen

Die Expressionsrate von PPAR γ 2, Resistin und aP2 nach 7-tägiger Differenzierung wird durch gleichzeitige Inkubation mit 1% Öl um ca. 40% verringert (Abbildung 17). Die inhibitorische Wirkung auf die GLUT4-Expression fällt etwas weniger stark aus. Ein Unterschied zwischen den beiden Ölen ist nicht erkennbar.

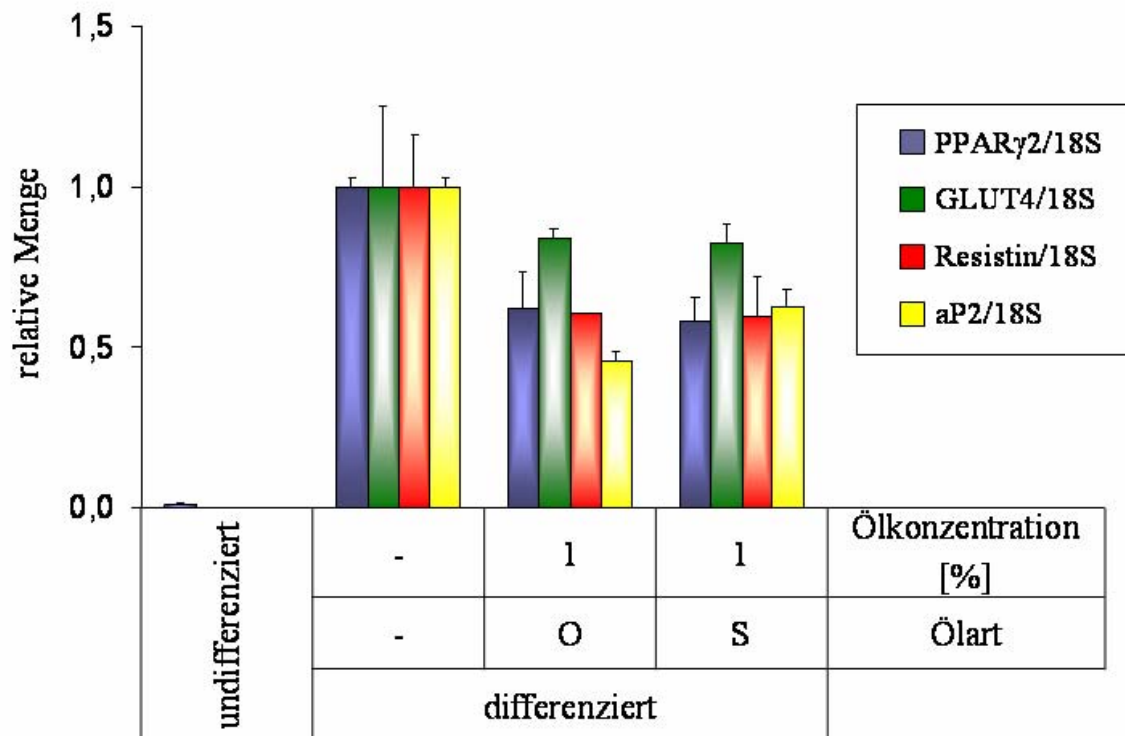


Abbildung 17: mRNA-Spiegel verschiedener Gene während 7-tägiger Differenzierung von 3T3-L1-Zellen mittels Insulin/IBMX/Dexamethason unter Zugabe von Olivenöl (O) bzw. Sojaöl (S)

Die RNA wurde aus den Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und unter Verwendung spezifischer Primer mittels Real Time PCR quantifiziert (n=2; Mittelwerte mit Standardabweichungen).

Abbildung 18 zeigt den Einfluss der Ölinkubation während der Differenzierung auf Proteinebene. IR β wird durch den Differenzierungsprozess erwartungsgemäß stark induziert. Die gleichzeitige Inkubation mit Öl ändert daran nichts. Auch PPAR γ 1/2 wird in 3T3-L1-Adipozyten stark exprimiert. Ölinkubierte Adipozyten zeigen jedoch eine verringerte Expression von PPAR γ 1/2, wobei Sojaöl sich etwas stärker auswirkt als Olivenöl. Die Detektion von GLUT4 fällt relativ schwach aus, zeigt jedoch prinzipiell das gleiche Bild wie PPAR γ 1/2. Die Phosphorylierung von Erk1/2 ist auch hier in undifferenzierten Zellen sehr viel stärker ausgeprägt als in differenzierten Adipozy-

ten. Die Inkubation mit Öl während der Differenzierung hat keinen Einfluss auf die Erk-Aktivierung. Die Induktion von Caveolin1 durch den Differenzierungsprozess wird insgesamt durch die Öle verstärkt. Dabei scheinen die Ölkonzentration sowie die Ölart keine Rolle zu spielen.

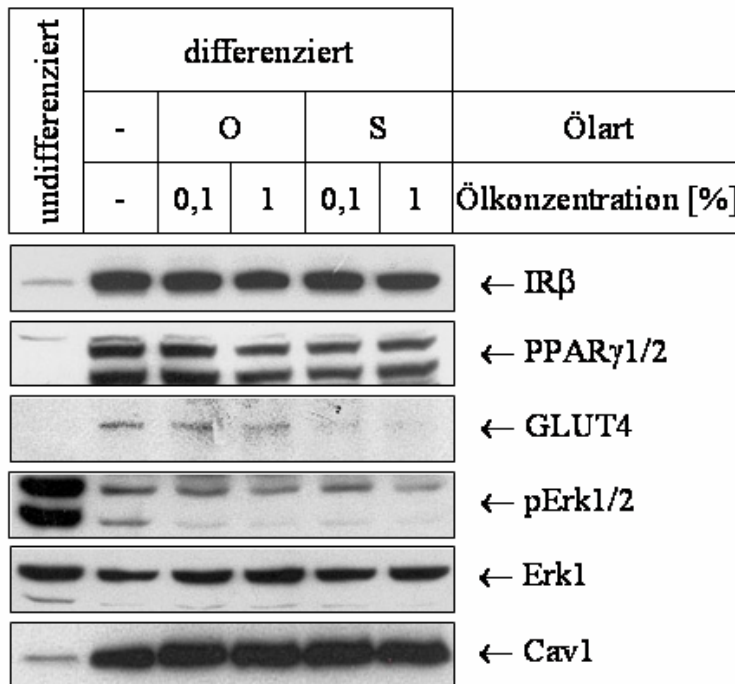


Abbildung 18: Regulierung verschiedener Proteine während 7-tägiger Differenzierung von 3T3-L1-Zellen mittels Insulin/IBMX/Dexamethason unter Zugabe von Olivenöl (O) bzw. Sojaöl (S)
Die Zellen wurden am siebten Differenzierungstag lysiert, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und unter Einsatz spezifischer Antikörper immunodetektiert.

Die statistische Auswertung dreier unabhängiger Experimente ergab bezüglich der Expression von PPAR γ 2 und Caveolin1 erwartungsgemäß einen signifikanten Anstieg durch den Differenzierungsvorgang (Abbildung 19). Eine Inkubation mit Öl während der Differenzierung führte zu einer verringerten PPAR γ 2-Expression, die bei einem Signifikanzniveau von 0,05 aber lediglich für 1% Sojaöl signifikant war. Die Caveolin1-Expression war unabhängig von der Ölart und der Konzentration in allen drei Experimenten erhöht. Jedoch war die Ausprägung dieses Effektes zwischen den einzelnen Experimenten derart unterschiedlich, dass insgesamt kein signifikanter Effekt zu errechnen war.

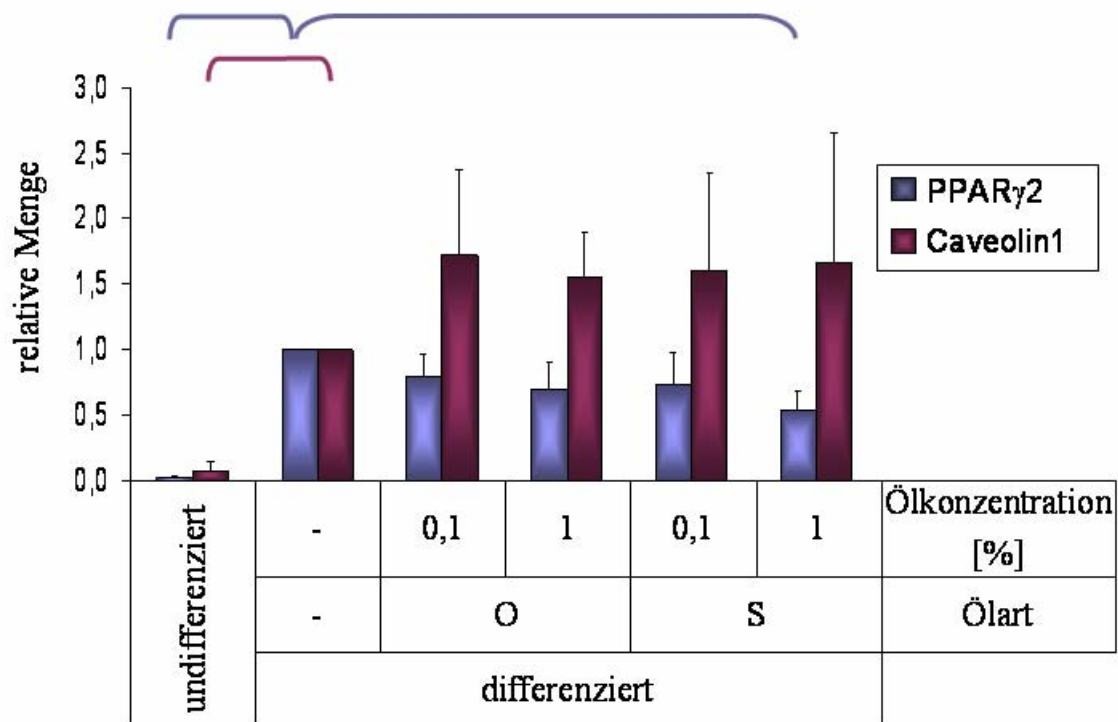


Abbildung 19: Densitometrische Auswertung der Expression der Proteine PPAR γ 2 und Caveolin1 nach Zugabe von Olivenöl (O) bzw. Sojaöl (S) während 7-tägiger Differenzierung von 3T3-L1-Zellen mit Insulin, IBMX und Dexamethason

Die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente wurden densitometrisch erfasst und mittels t-Test für gepaarte Stichproben ausgewertet. Die mit Klammern verbundenen Werte unterscheiden sich zum Signifikanzniveau 0,05. (n=3; Mittelwerte mit Standardabweichungen)

3.4.2 Differenzierungspotential verschiedener Ölemulsionen in 3T3-L1-Prädipozyten

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob die zur Inkubation verwendeten Öle in der Lage sind, in 3T3-L1-Zellen einen ähnlichen Differenzierungsprozess auszulösen wie es durch die Zugabe von Insulin, IBMX und Dexamethason gelingt. Physiologisch wären die Öle in diesem Fall möglicherweise in der Lage, die Aufnahme von Fetten und Zucker aus dem Blut ins Fettgewebe zu fördern. Zur Unterstützung der Differenzierung wurde zwar zu Beginn der Ölinkubation auf High Glucose-Medium umgestellt (vgl. Abschnitt 2.1.3), es wurde jedoch auf den Zusatz von Insulin, IBMX oder Dexamethason zum Zellkulturmedium verzichtet. Die Quantifizierung des in den Zellen gelösten Oil Red O zeigt einen deutlichen Anstieg der Fettakkumulation durch

die 7-tägige Inkubation undifferenzierter Präadipozyten mit den verschiedenen Öl-emulsionen (Abbildung 20B), jedoch ohne dass bei mikroskopischer Betrachtung Zellen zu finden sind, deren Phänotyp dem von Adipozyten entspricht (Abbildung 20A). Auch hier wirkt sich eine Inkubation mit Sojaöl stärker aus als diejenige mit Olivenöl.

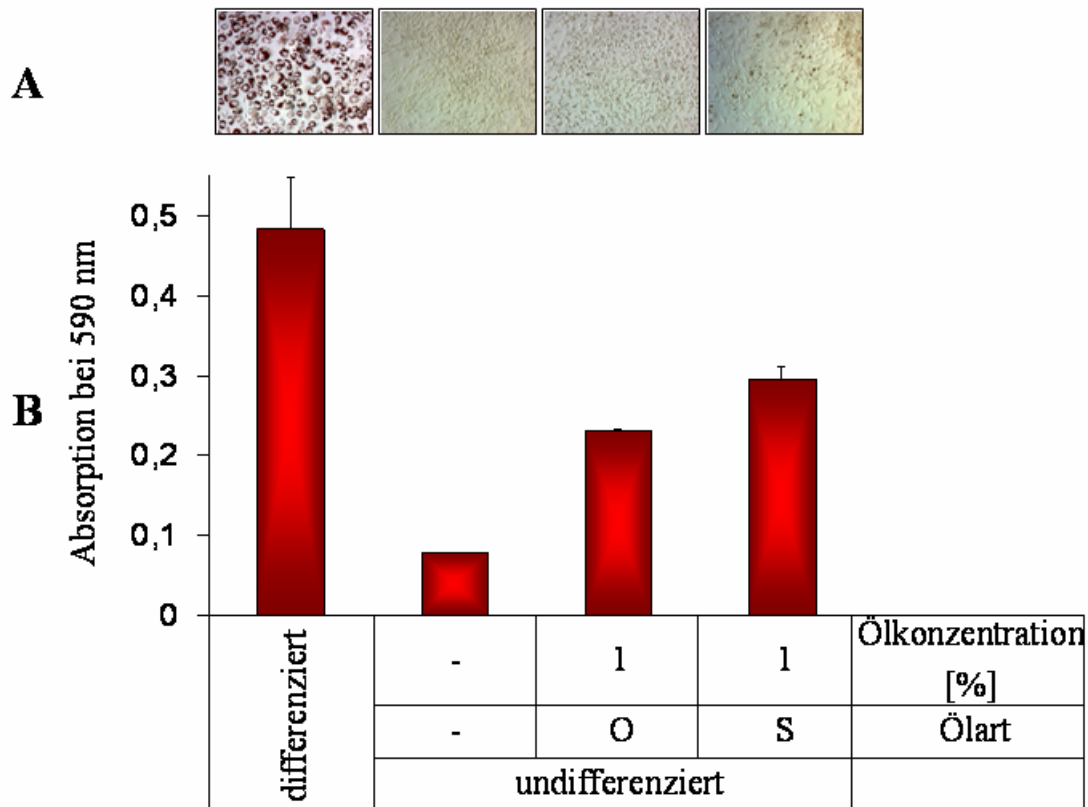


Abbildung 20: Einlagerung von Fetttröpfchen in 3T3-L1-Präadipozyten nach 7-tägiger Inkubation mit Olivenöl (O) bzw. Sojaöl (S)

Die intrazellulären Triglyzeride wurden mit Oil Red O angefärbt (A). Anschließend wurde der Farbstoff mit Isopropanol aus den Zellen herausgelöst und photometrisch quantifiziert (n=2; Mittelwerte mit Standardabweichungen) (B).

Die Untersuchung auf mRNA-Ebene ergab einen leichten Anstieg von GLUT4, PPAR γ 2 und am deutlichsten vom Fettsäure-bindenden Protein aP2 durch den Zusatz der Öle zum Kulturmedium der Präadipozyten (Abbildung 21). Die Expression von Resistin hingegen wurde unter den gleichen Bedingungen eher gehemmt. Auf Proteinebene ist kein Einfluss der Ölinkubation auf die IR β -Expression von 3T3-L1-Präadipozyten erkennbar (Abbildung 22). Der PPAR γ 1/2- sowie der GLUT4-Spiegel der undifferenzierten Zellen sind derart niedrig, dass keine Aussage über einen even-

tuellen Effekt der Öle getroffen werden kann. Die Aktivierung von Erk1/2 wird bei Betrachtung mehrerer Experimente nicht maßgeblich durch die untersuchten Bedingungen beeinflusst. Caveolin1 hingegen wird in den Präadipozyten deutlich durch beide Öle induziert. Abbildung 23 zeigt die statistische Auswertung dieses Effektes. Wiederum wurden drei unabhängige Experimente mit Hilfe der Densitometrie auf signifikante Unterschiede untersucht. Die 7-tägige Inkubation der Präadipozyten zeigt einen von der Ölsorte unabhängigen Anstieg der Caveolin1-Expression, der im Mittel bei einer Ölkonzentration von 1% größer, jedoch auf Grund der besseren Konsistenz zwischen den verschiedenen Experimenten nur bei 0,1% Öl signifikant war.

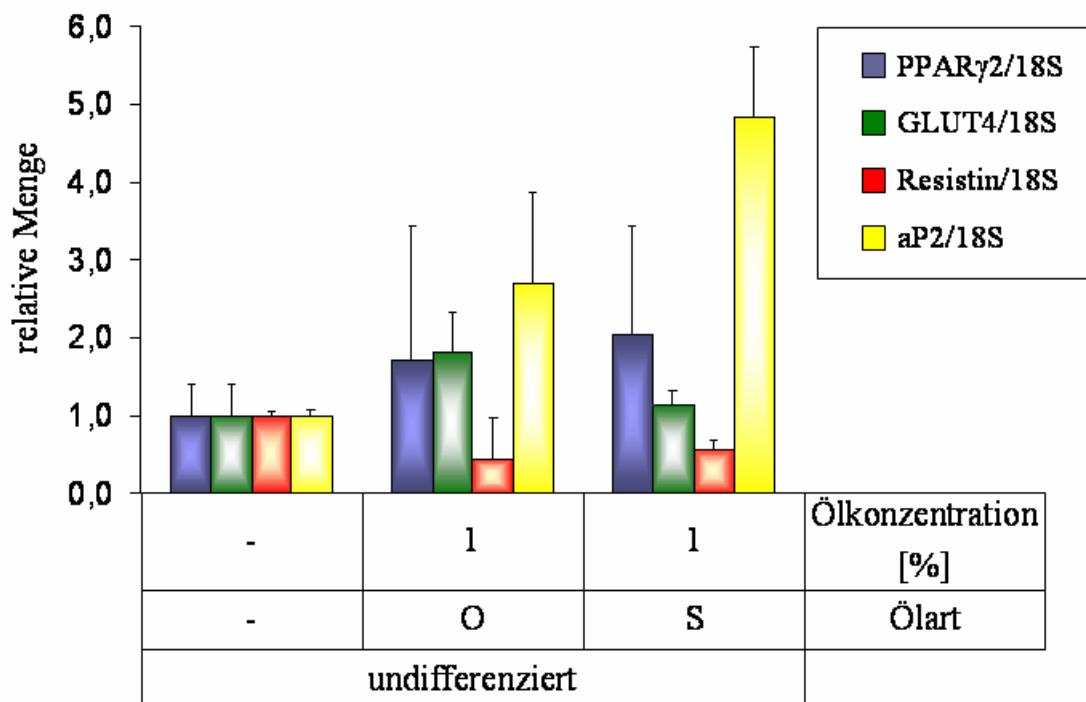


Abbildung 21: mRNA-Spiegel verschiedener Gene nach 7-tägiger Inkubation von 3T3-L1-Präadipozyten mit Olivenöl (O) bzw. Sojaöl (S)

Die RNA wurde aus den Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und unter Verwendung spezifischer Primer mittels Real Time PCR quantifiziert (n=2; Mittelwerte mit Standardabweichungen).

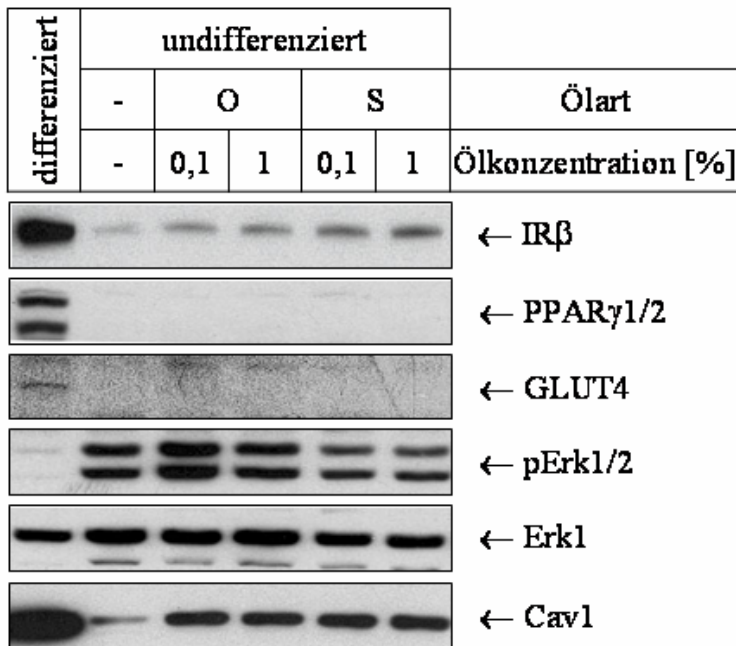


Abbildung 22: Regulierung verschiedener Proteine nach 7-tägiger Inkubation von 3T3-L1-Prädipozyten mit Olivenöl (O) bzw. Sojaöl (S)

Die Zellen wurden am siebten Versuchstag lysiert, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und unter Einsatz spezifischer Antikörper immunodetektiert.

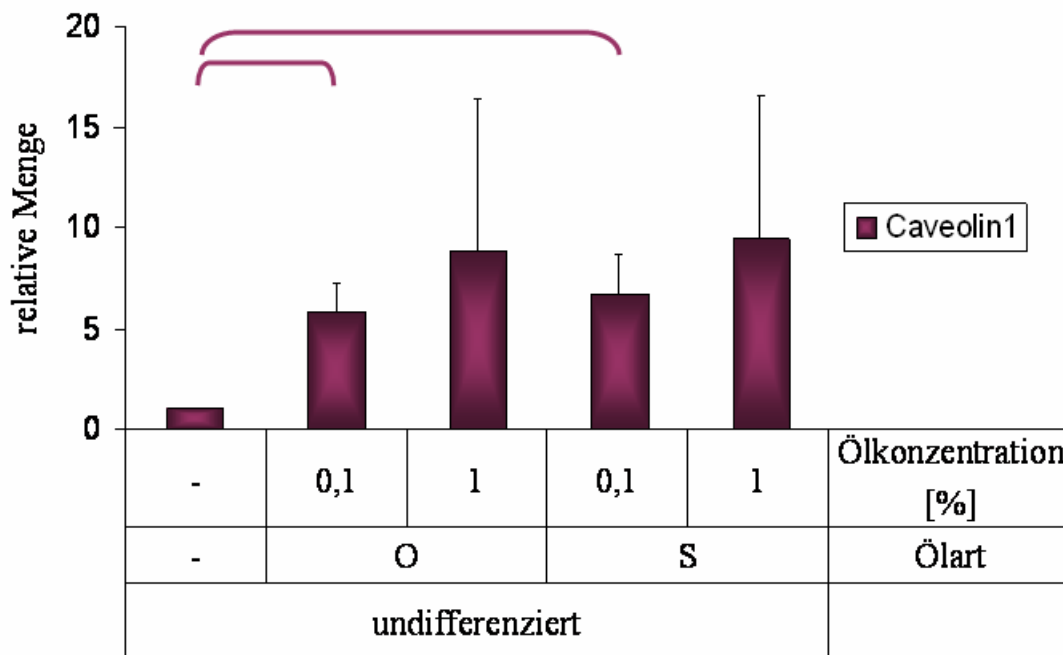


Abbildung 23: Densitometrische Auswertung der Expression von Caveolin1 nach 7-tägiger Inkubation von 3T3-L1-Prädipozyten mit Olivenöl (O) bzw. Sojaöl (S)

Die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente wurden densitometrisch erfasst und mittels t-Test für gepaarte Stichproben ausgewertet. Die mit Klammern verbundenen Werte unterscheiden sich zum Signifikanzniveau 0,05. (n=3; Mittelwerte mit Standardabweichungen)

In Anbetracht der gezeigten Ergebnisse ist ein gewisses Differenzierungspotential der Öle zwar nicht eindeutig nachzuweisen, erscheint aber durchaus möglich.

3.5 3T3-L1-Zellen unter dem Einfluss der proinflammatorischen Zytokine $\text{TNF}\alpha$ und IL-6

Proinflammatorische Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$ und IL-6 spielen nach derzeitiger Auffassung eine bedeutende Rolle bei der Entstehung einer Insulinresistenz. Auch im Zellkulturmodell finden diese Zytokine Anwendung, um einen insulinresistenten Zustand der Zellen zu simulieren und damit verbundene Prozesse zu analysieren.

3.5.1 Einfluss verschiedener Ölemulsionen auf die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Differenzierungsinhibition in 3T3-L1-Zellen

Zunächst wurde $\text{TNF}\alpha$ in einer Konzentration von 0,1 nM während der Differenzierung von 3T3-L1-Zellen mittels Insulin, IBMX und Dexamethason dem Zellkulturmedium zugesetzt und mit diesem alle 48 Stunden erneuert. Auf diese Weise wurde eine chronische Einwirkung des Zytokins auf die entstehenden Fettzellen nachgestellt, wie sie auch bei Diabetes mellitus vermutet wird. Die Färbung der Zellen mit dem fettlöslichen Farbstoff Oil Red O verdeutlicht den dramatischen Einfluss des Zytokins (Abbildung 24). Die Differenzierung zu Fettzellen wird fast vollständig inhibiert und es sind bei mikroskopischer Betrachtung nur noch einzelne abgerundete, mit Fetttropfchen gefüllte Zellen zu sehen. Die gleichzeitige Inkubation der Zellen mit Öl schwächt diesen Effekt offenbar ab. Die Anzahl der Adipozyten erhöht sich und auch die photometrische Messung des in die Zellen aufgenommenen roten Farbstoffes ergibt einen Anstieg gegenüber den ohne Öl, aber mit $\text{TNF}\alpha$ differenzierten Zellen. Wie in den vorherigen Kapiteln erscheint auch hier die Wirkung von Sojaöl verglichen mit der von Olivenöl etwas stärker. Im Einklang mit diesem Befund stellt sich die Situation auf der Ebene der mRNA dar (Abbildung 25). Auch auf die mittels Real Time PCR analysierten Transkripte von $\text{PPAR}\gamma 2$, GLUT4, Resistin und aP2 hat der Zusatz von $\text{TNF}\alpha$ zum Differenzierungsmedium der 3T3-L1-Zellen eine stark inhibitorische Wirkung, die durch den Zusatz von 1% Öl etwas ausgeglichen wird. Dabei besteht kein Unterschied zwischen Soja- und Olivenölinkubation.

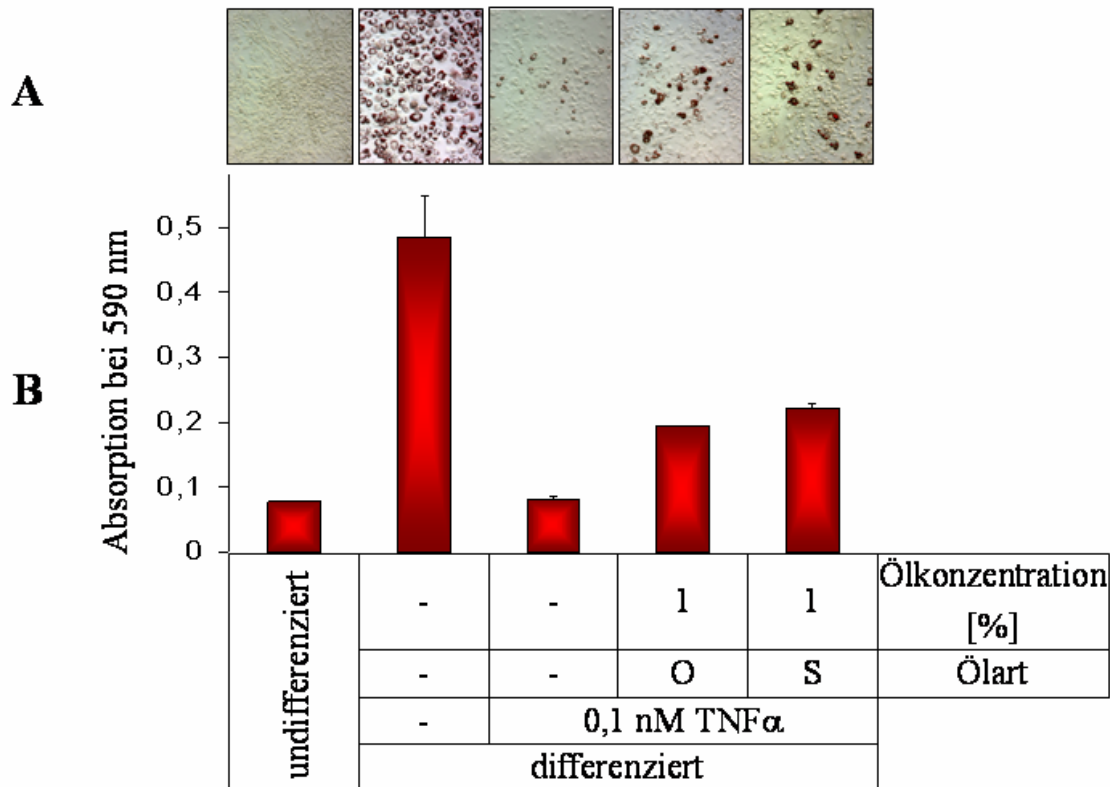


Abbildung 24: Einlagerung von Fetttröpfchen in 3T3-L1-Zellen nach 7-tägiger Differenzierung unter dem Einfluss von TNF α und Olivenöl (O) bzw. Sojaöl (S)
Die intrazellulären Triglyzeride wurden mit Oil Red O angefärbt (A). Anschließend wurde der Farbstoff mit Isopropanol aus den Zellen herausgelöst und photometrisch quantifiziert (n=2; Mittelwerte mit Standardabweichungen) (B).

Abbildung 26 zeigt den Einfluss der Ölinkubation auf die TNF α -induzierte Differenzierungsinhibition auf Proteinebene. IR β wird, unabhängig von einer Inkubation mit Soja- oder Olivenöl, unter dem Einfluss von TNF α nach 7-tägiger Differenzierung deutlich schwächer exprimiert. PPAR γ 2 war mit den für diese Arbeit zur Verfügung stehenden Methoden nach TNF α -Einwirkung nicht mehr nachweisbar. Die Detektion von PPAR γ 1 (untere Bande) zeigt jedoch ein schwaches Signal nach Inkubation mit 1% Öl. Dies lässt darauf schließen, dass möglicherweise auch PPAR γ 2, dessen Expressionsmuster in 3T3-L1-Zellen offenbar im Wesentlichen dem von PPAR γ 1 entspricht, unter diesen Bedingungen etwas stärker exprimiert wird, jedoch immer noch unterhalb der Nachweisgrenze bleibt. Die Detektion von GLUT4 ist schwach, lässt aber einen ähnlichen Effekt vermuten, wie er für PPAR γ 1 gezeigt wurde. Erk1/2 wird in 3T3-L1-Adipozyten durch TNF α aktiviert. Eine Ölinkubation schwächt diese Aktivierung etwas ab. Das nach TNF α -Inkubation ebenfalls stark in seiner Expression inhibierte Caveolin1 erholt sich konzentrationsabhängig bei gleichzeitiger Ölgabe.

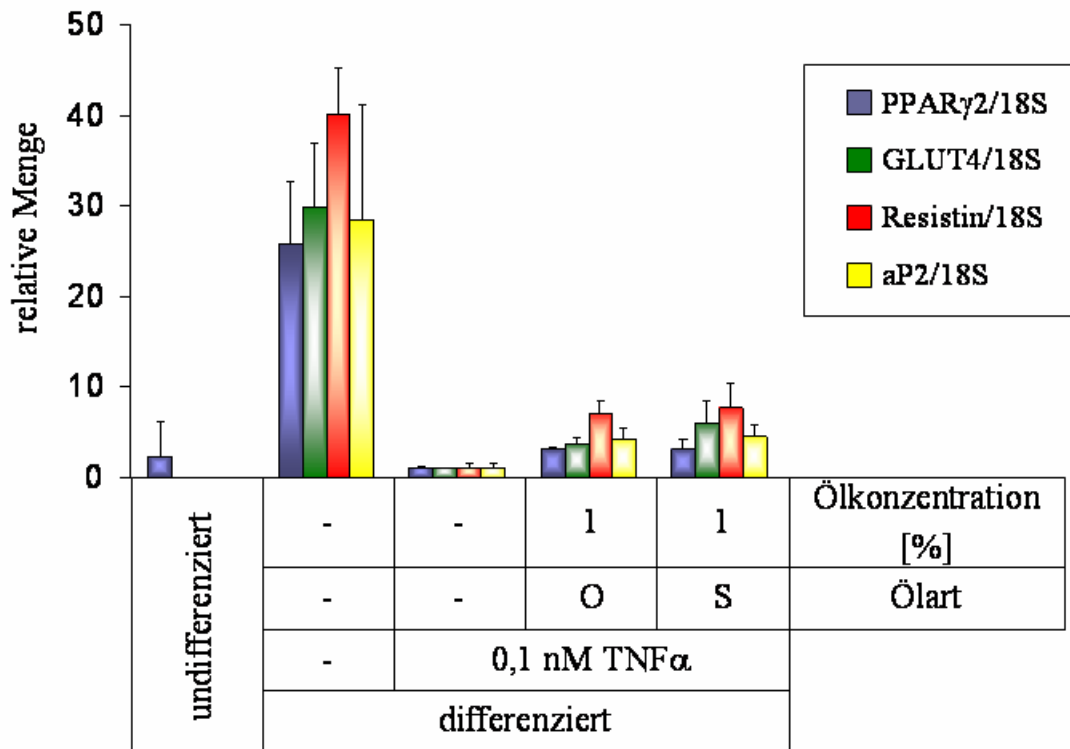
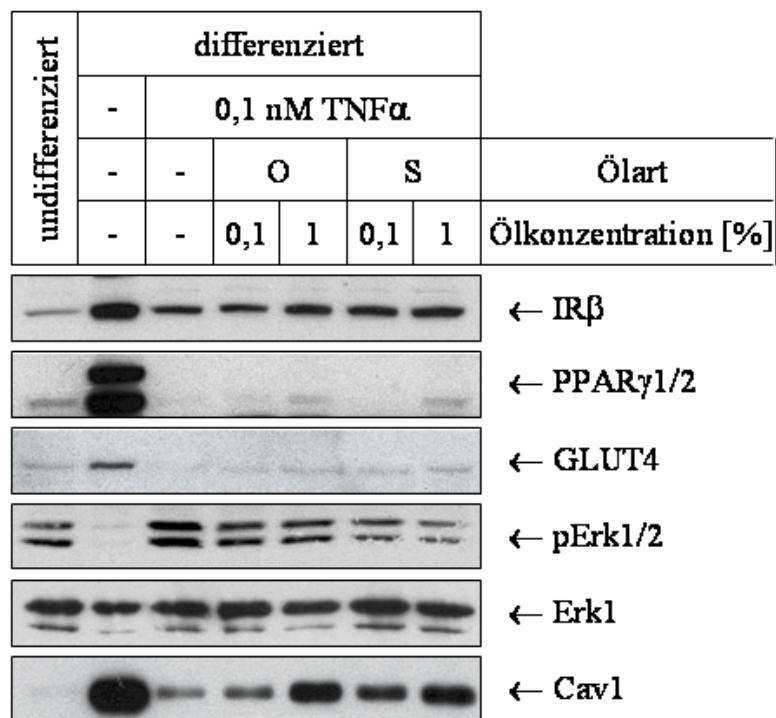


Abbildung 25: mRNA-Spiegel verschiedener Gene nach 7-tägiger Differenzierung von 3T3-L1-Zellen unter dem Einfluss von TNF α und Olivenöl (O) bzw. Sojaöl (S)

Die RNA wurde aus den Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und unter Verwendung spezifischer Primer mittels Real Time PCR quantifiziert (n=3; Mittelwerte mit Standardabweichungen).

Abbildung 26: Regulierung verschiedener Proteine nach 7-tägiger Differenzierung von 3T3-L1-Zellen unter dem Einfluss von TNF α und Olivenöl (O) bzw. Sojaöl (S)

Die Zellen wurden am siebten Versuchstag lysiert, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und unter Einsatz spezifischer Antikörper immunodetektiert.



Der statistischen Auswertung zu Folge wird die Expression von Caveolin1 durch den Einfluss von $TNF\alpha$ während der Differenzierung stark verringert, bleibt aber signifikant über dem Level undifferenzierter Präadipozyten (Abbildung 27). Sowohl 1% Olivenöl als auch 0,1% sowie 1% Sojaöl bewirkt einen signifikanten Anstieg der Caveolin1-Expression. In diesem Fall führt die Erhöhung der Olivenölkonzentration von 0,1% auf 1% zu einem signifikanten Unterschied.

Insgesamt scheinen beide Öle durchaus in der Lage zu sein, dem Einfluss von $TNF\alpha$ in gewissem Maße entgegenzuwirken.

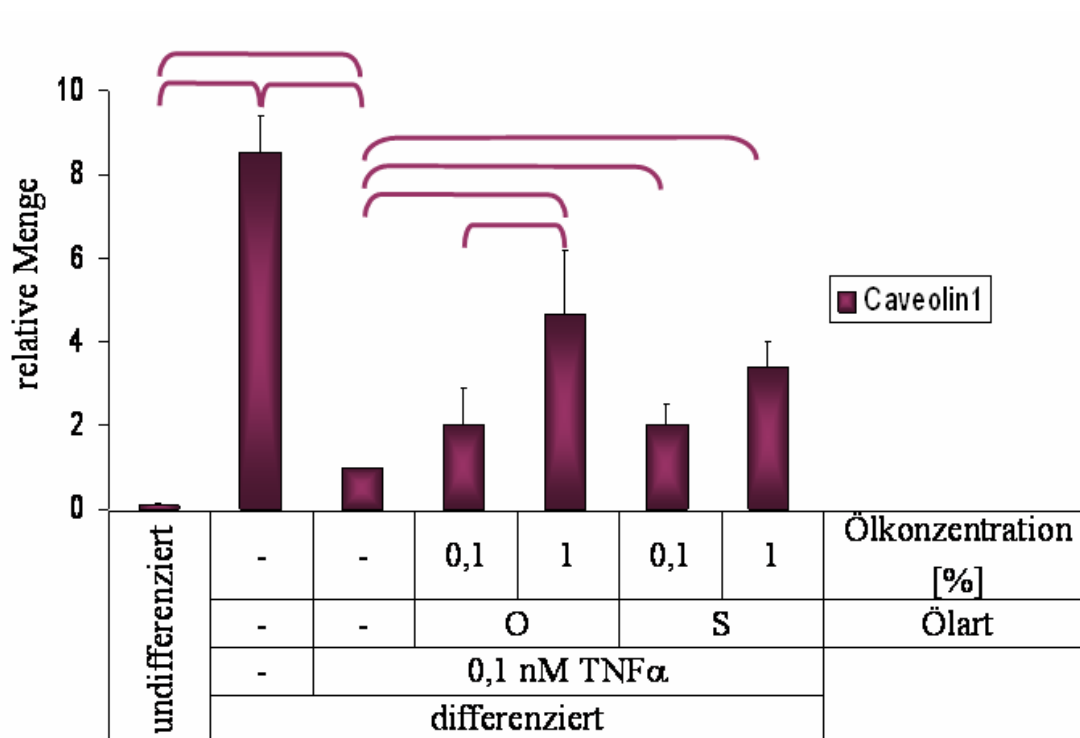


Abbildung 27: Densitometrische Auswertung der Expression von Caveolin1 nach 7-tägiger Differenzierung von 3T3-L1-Zellen unter dem Einfluss von $TNF\alpha$ und Olivenöl (O) bzw. Sojaöl (S)

Die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente wurden densitometrisch erfasst und mittels t-Test für gepaarte Stichproben ausgewertet. Die mit Klammern verbundenen Werte unterscheiden sich zum Signifikanzniveau 0,05. (n=3; Mittelwerte mit Standardabweichungen)

3.5.2 Einfluss einer 24-stündigen TNF α - und/oder Ölinkubation auf ausdifferenzierte 3T3-L1-Adipozyten

In weiteren Experimenten wurde die vergleichsweise kurzfristige Wirkung von TNF α auf bereits differenzierte 3T3-L1-Zellen untersucht. Zu diesem Zweck wurde dem Kulturmedium der Adipozyten am 8. Tag der Differenzierung für 24 Stunden TNF α in einer Konzentration von 1 nM sowie gegebenenfalls 1% Öl zugesetzt und anschließend die Effekte auf mRNA- sowie auf Proteinebene erfasst.

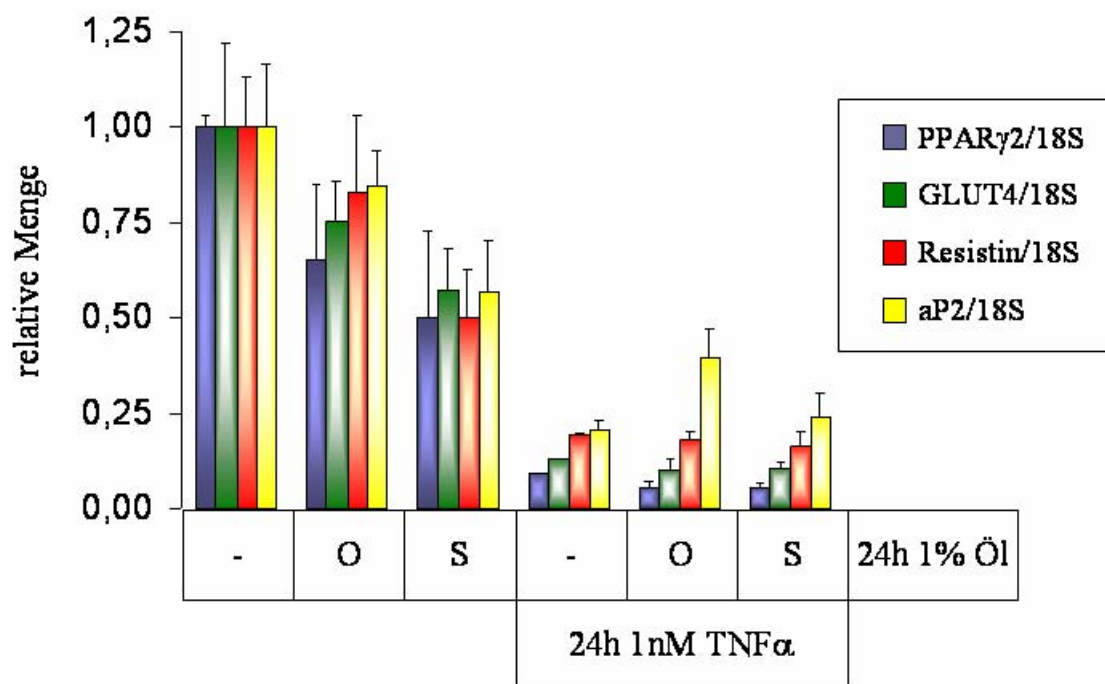


Abbildung 28: Einfluss einer 24-stündigen TNF α - und/oder Olivenöl (O)- bzw. Sojaölinkubation (S) auf die Expression verschiedener Gene in 3T3-L1-Adipozyten

Die RNA wurde aus den Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und unter Verwendung spezifischer Primer mittels Real Time PCR quantifiziert (n=2; Mittelwerte mit Standardabweichungen).

Die 24-stündige Ölinkubation ausdifferenzierter 3T3-L1-Adipozyten zeigt einen vergleichbaren Effekt auf die Expressionsrate der untersuchten Gene wie eine Einwirkung der Öle während der gesamten Differenzierungszeit (Abbildung 28). Auch die Wirkung des 24-stündigen TNF α -Zusatzes ist mit der in Abschnitt 3.5.1 gezeigten chronischen Wirkung des Zytokins vergleichbar. Hier führt jedoch die gleichzeitige Inkubation mit Öl nicht zu der oben beschriebenen Erhöhung der jeweiligen mRNA-Spiegel. Auf Proteinebene wird IR β durch die akute TNF α - und/oder Öleinwirkung

nicht beeinflusst (Abbildung 29). Die Expression von PPAR γ 1/2 wird durch 24-stündige Ölinkubation leicht, durch 24-stündige TNF α -Einwirkung jedoch stark verringert. Die gleichzeitige Gabe von TNF α und Öl führt nicht zu einem Wiederanstieg der PPAR γ 1/2-Produktion. Damit entspricht die Situation auf Proteinebene dem Ergebnis der mRNA-Messung. Bezüglich der GLUT4-Expression ist auf Grund der schwachen Detektion kaum eine Aussage zu treffen. TNF α bewirkt auch nach 24-stündiger Inkubation eine leichte Erk-Aktivierung, die von den Ölen jedoch im Wesentlichen unbeeinflusst bleibt. Die Expression von Caveolin1 ist sowohl durch Oliven- als auch durch Sojaöl nach 24 Stunden erhöht. TNF α hat darauf kaum einen Einfluss.

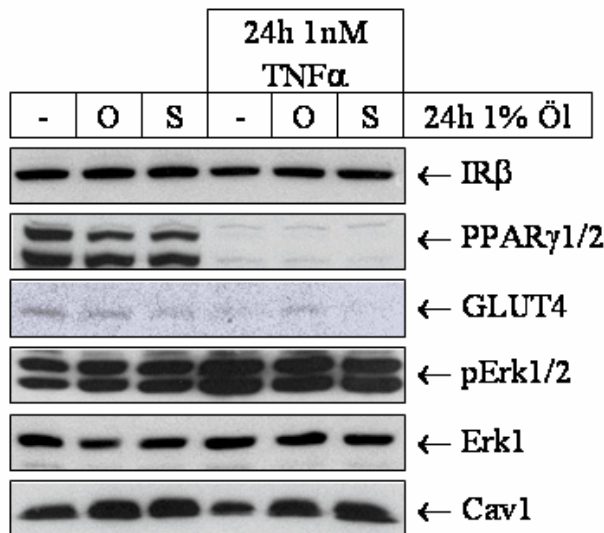


Abbildung 29: Einfluss einer 24-stündigen TNF α - und/oder Olivenöl (O)- bzw. Sojaölinkubation (S) auf die Regulierung verschiedener Proteine in 3T3-L1-Adipozyten

Die Zellen wurden nach der 24-stündigen Inkubation lysiert, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und unter Einsatz spezifischer Antikörper immunodetektiert.

Auch die densitometrische Auswertung dreier unabhängiger Versuche zeigt eine signifikante Abnahme von PPAR γ 2 durch 24-stündige Ölinkubation ausdifferenzierter Adipozyten (Abbildung 30). Der inhibitorische Einfluss von TNF α ist signifikant. Die schwache Inhibierung der Caveolin1-Expression durch TNF α sowie die durch 24-stündige Ölinkubation leicht erhöhte Expression ist im hier verwendeten Berechnungsansatz nicht signifikant.

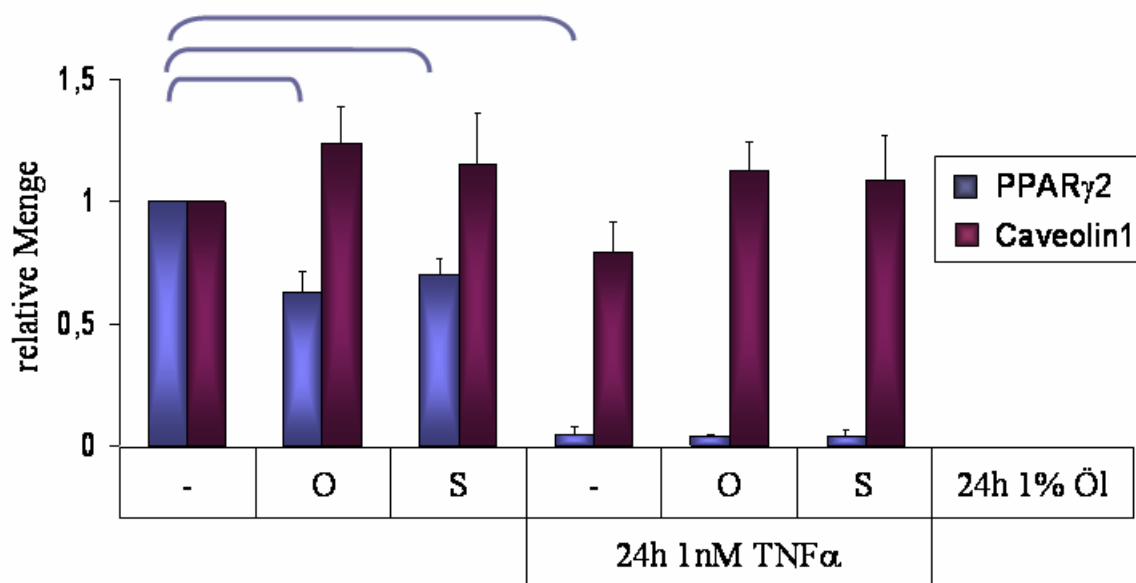


Abbildung 30: Densitometrische Auswertung des Einflusses einer 24-stündigen TNF α - und/oder Olivenöl (O)- bzw. Sojaölinkubation (S) auf die Expression von PPAR γ 2 und Caveolin1 in 3T3-L1-Adipozyten

Die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente wurden densitometrisch erfasst und mittels t-Test für gepaarte Stichproben ausgewertet. Die mit Klammern verbundenen Werte unterscheiden sich zum Signifikanzniveau 0,05. (n=3; Mittelwerte mit Standardabweichungen)

3.5.3 Stimulierbarkeit differenzierter 3T3-L1-Adipozyten durch Insulin nach 24-stündiger Inkubation mit IL-6 bzw. TNF α und/oder Öl

Um zu überprüfen, ob eine 24-stündige TNF α - bzw. IL-6-Inkubation ausdifferenzierter Adipozyten sich auf deren Stimulierbarkeit durch Insulin auswirkt, wurden 3T3-L1-Zellen am 8. Tag ihrer Differenzierung für einen Tag mit 1 nM TNF α bzw. 20 ng/mL IL-6 mit oder ohne 1% Öl inkubiert, parallel dazu durch den Entzug von FCS gehungert und anschließend für 15 Minuten mit 100 nM Insulin stimuliert. Zum Nachweis der Stimulation wurde die Phosphorylierung von IRS1 bzw. Erk1/2 mittels Western Blot analysiert (Abbildung 31).

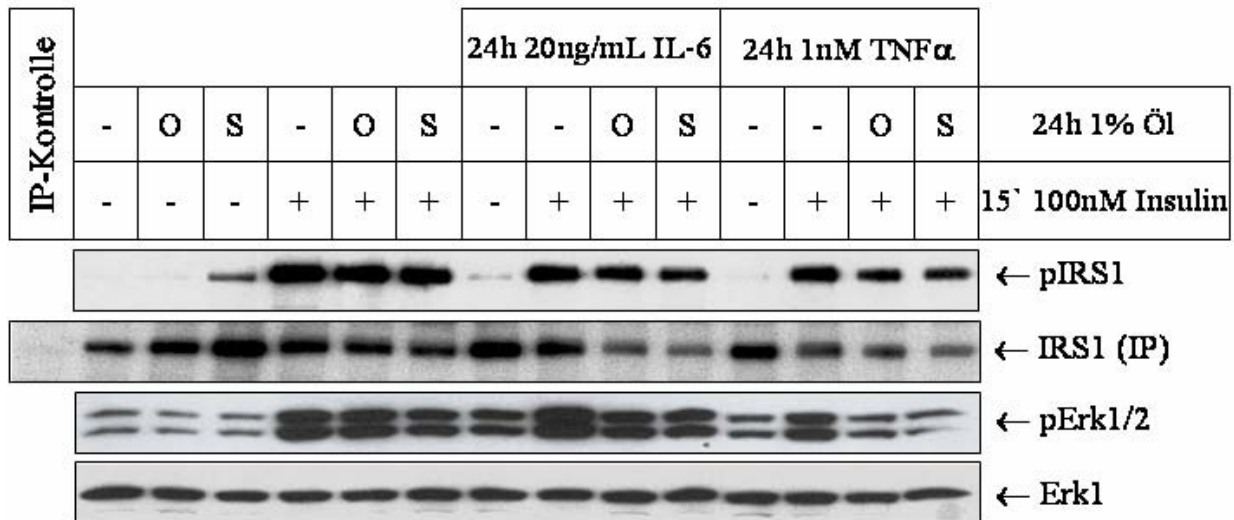


Abbildung 31: Phosphorylierung der Proteine IRS1 und Erk1/2 nach 24-stündiger Inkubation ausdifferenzierter 3T3-L1-Adipozyten mit TNF α bzw. IL-6 und/oder Olivenöl (O) bzw. Sojaöl (S) und anschließender Stimulation mit Insulin

Die Zellen wurden am neunten Differenzierungstag nach 24-stündigem Hungern und 24-stündiger Inkubation mit TNF α bzw. IL-6 und/oder Öl für 15 Minuten mit 100 nM Insulin stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert. Die Lysate wurden entweder direkt mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die zu untersuchenden Proteine unter Einsatz spezifischer Antikörper immunodetektiert oder es erfolgte zunächst eine Aufkonzentrierung des gewünschten Proteins (IRS1) mittels Immunpräzipitation (IP). Als IP-Kontrolle diente der Lysispuffer ohne Zellbestandteile.

Ein wesentlicher Einfluss einer 24-stündigen Inkubation der Adipozyten mit IL-6 oder TNF α auf die insulinstimulierte IRS1-Phosphorylierung sowie die IRS1-Expression kann nicht festgestellt werden. Auch die Ölinkubation zeigt hier keinen nennenswerten Einfluss. Die Unregelmäßigkeiten in der Gesamtausbeute an IRS1 sind methodisch bedingt. Die Betrachtung der Erk-Phosphorylierung ergibt ebenfalls keinen Effekt der vorangegangenen Zytokineinwirkung auf die Aktivierung durch Insulin. Die 24-stündige Inkubation mit Öl führt allgemein zu einem eher abgeschwächten pErk1/2-Signal nach Insulinstimulation.

3.6 Regulierung der CNTF-Signaltransduktion während der Differenzierung von 3T3-L1-Zellen

Auf Grund seiner leptinähnlichen Eigenschaften und der positiven Beeinflussung des Fettzellmetabolismus wurde das IL-6-Typ-Zytokin CNTF in den letzten Jahren intensiv in die Diabetesforschung einbezogen. In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem das zur gleichen Zytokingruppe gehörende LIF in die Untersuchungen integriert. Zunächst wurde die Stimulierbarkeit undifferenzierter und differenzierter 3T3-L1-Zellen durch CNTF, LIF und IL-6 anhand der Aktivierung von STAT3 und Erk1/2 überprüft (Abbildung 32).

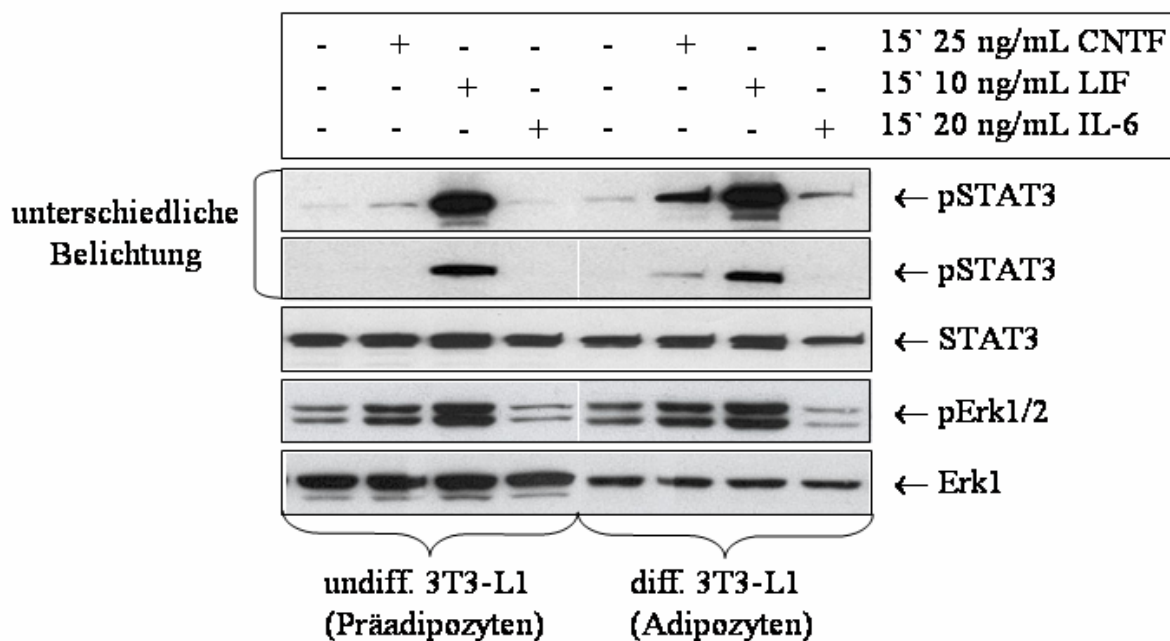


Abbildung 32: Stimulierbarkeit undifferenzierter bzw. differenzierter 3T3-L1-Zellen durch die Zytokine CNTF, LIF bzw. IL-6

Undifferenzierte Präadipozyten bzw. voll ausdifferenzierte Adipozyten wurden nach 24-stündigem Hungern für 15 Minuten mit CNTF, LIF oder IL-6 stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und unter Einsatz spezifischer Antikörper immunodetektiert.

3T3-L1-Adipozyten reagieren stärker in Form einer STAT3-Aktivierung auf CNTF als Präadipozyten. Gegenüber LIF besteht kein Unterschied in der Sensitivität, es bewirkt jedoch bei Weitem die höchste STAT3-Phosphorylierung in beiden Differenzierungsstadien. Die STAT3-Aktivierung durch IL-6 ist dagegen sehr schwach. Allerdings scheinen die Adipozyten verglichen mit den Präadipozyten wiederum et-

was empfindlicher auf eine IL-6-Stimulation zu reagieren. Die STAT3-Expression bleibt vom Differenzierungsprozess unbeeinflusst. Auch in Bezug auf die Aktivierung von Erk1/2 zeigt LIF die größte Wirkung, gefolgt von einer etwas schwächeren Aktivierung durch CNTF. Eine durch IL-6 hervorgerufene Erk1/2-Phosphorylierung ist nicht nachzuweisen. Bei keinem der eingesetzten Zytokine ist ein Unterschied in der Erk1/2-Aktivierung zwischen undifferenzierten und differenzierten Zellen zu erkennen. Lediglich die Abnahme der Erk1-Expression während der Differenzierung bestätigt sich hier erneut (vgl. Abschnitt 3.1).

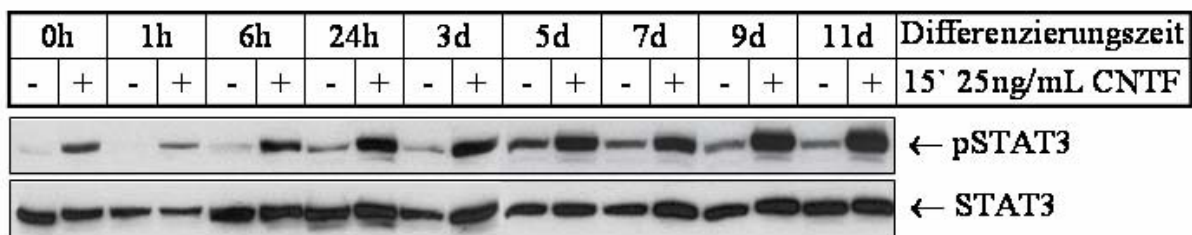


Abbildung 33: Aktivierung des Jak/STAT-Signalweges in 3T3-L1-Zellen durch CNTF im Verlauf der Differenzierung zu Adipozyten

Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten während der Differenzierung nach 24-stündigem Hungern mit CNTF stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und unter Verwendung spezifischer Antikörper immunodetektiert.

Die in reifen 3T3-L1-Adipozyten erhöhte Aktivierung des Jak/STAT-Weges durch CNTF steht im Widerspruch zu bereits veröffentlichten Daten (Zvonic *et al.*, 2003). Auf Grund dessen wurde die Regulierung der CNTF-Signaltransduktion während der Differenzierung von 3T3-L1-Zellen im Folgenden eingehender untersucht. Abbildung 33 zeigt die gleichmäßige Zunahme der STAT3-Phosphorylierung durch 15-minütige CNTF-Stimulation mit fortschreitender Differenzierung.

Des Weiteren wurden die Expression der CNTFR-Komplexkomponenten CNTFR, LIFR und gp130 sowie die Grundstimulation des Jak/STAT-Weges im Verlauf der Differenzierung verfolgt (Abbildung 34). Gp130 und LIFR werden als Doppelbande detektiert. Der Grund hierfür ist vermutlich das Auftreten zweier unterschiedlicher Glycosylierungsformen der Proteine, die beide durch den jeweiligen Antikörper erkannt werden. Die Expression des LIFR nimmt wenige Stunden nach Differenzierungsinitialisierung vorübergehend etwas ab, erholt sich jedoch nach etwa 24 Stunden wieder und nimmt danach schließlich deutlich ab, so dass ausdifferen-

zierte 3T3-L1-Adipozyten eindeutig über weniger LIFR-Moleküle verfügen als undifferenzierte Präadipozyten. Gp130 und CNTFR bleiben durch den Differenzierungsvorgang in ihrer Expression hingegen im Wesentlichen unbeeinflusst. Die Grundstimulation des Jak/STAT-Signalweges, d. h. die ohne den Einfluss zugesetzter Zytokine bestimmte STAT3-Aktivierung, nimmt zu Beginn der Differenzierung zu, wird jedoch ab etwa dem fünften Differenzierungstag wieder schwächer und fällt auf ihr ursprüngliches Niveau zurück. Induziert wird diese Grundstimulation vermutlich durch einen autokrinen Einfluss. Die Expression der CNTFR-Komplexkomponenten im Verlauf der Differenzierung von 3T3-L1-Zellen liefert keine Erklärung für die höhere Sensitivität der Adipozyten gegenüber CNTF. In Anbetracht der Abnahme der LIFR-Expression während der Differenzierung wären umgekehrte Verhältnisse zu erwarten gewesen.

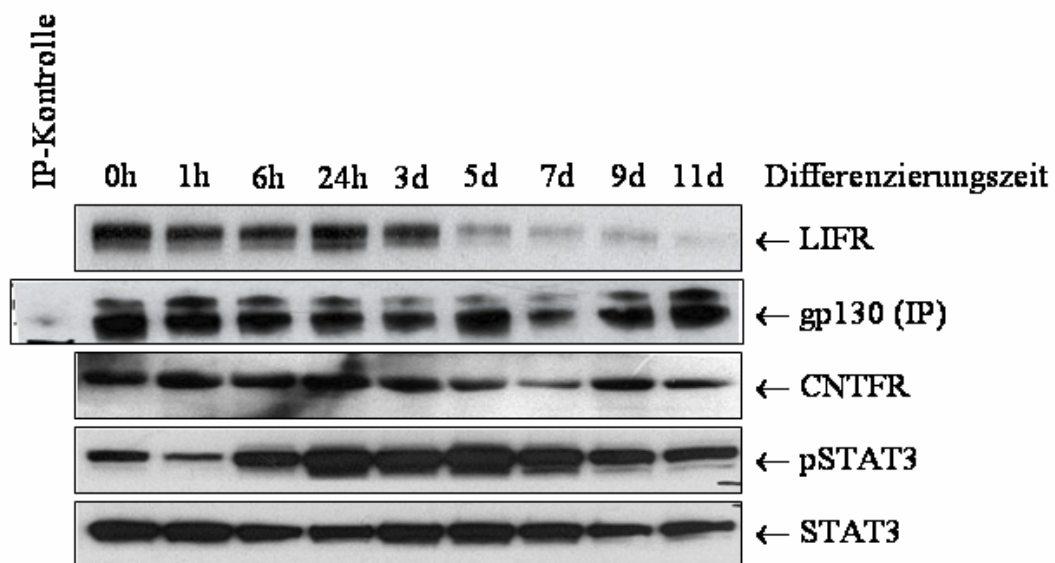


Abbildung 34: Regulierung der an der CNTF-Signaltransduktion beteiligten Proteine während der Differenzierung von 3T3-L1-Zellen zu Adipozyten

Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten während der Differenzierung lysiert. Die Lysate wurden entweder direkt mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die zu untersuchenden Proteine unter Einsatz spezifischer Antikörper immunodetektiert oder es erfolgte zunächst eine Aufkonzentrierung des gewünschten Proteins (gp130) mittels Immunpräzipitation (IP). Als IP-Kontrolle diente der Lysispuffer ohne Zellbestandteile.

3.7 Einfluss der IL-6-Typ-Zytokine CNTF und LIF auf das Differenzierungsverhalten von 3T3-L1-Zellen

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss eines CNTF- bzw. LIF-Zusatzes zum Zellkulturmedium auf die Differenzierung von 3T3-L1-Präadipozyten zu Adipozyten untersucht.

3.7.1 Differenzierung von 3T3-L1-Zellen mittels Insulin, IBMX und Dexamethason unter Zugabe der Zytokine CNTF bzw. LIF

Um zu bestätigen, dass keine toxische Wirkung von einer langfristigen Zytokineinwirkung ausgeht, wurde auch hier ein sogenannter MTT-Test durchgeführt, d. h. die Umsetzung des Farbstoffes MTT, die als Maß für die allgemeine Vitalität der Zellen herangezogen wird, wurde nach der Differenzierung der 3T3-L1-Zellen mit bzw. ohne die Zytokine CNTF und LIF bestimmt (Abbildung 35). Erwartungsgemäß wird der zelluläre Metabolismus durch die Zugabe der Zytokine nicht geschwächt, sondern sogar etwas intensiviert. LIF hat dabei tendenziell eine stärkere Wirkung als CNTF.

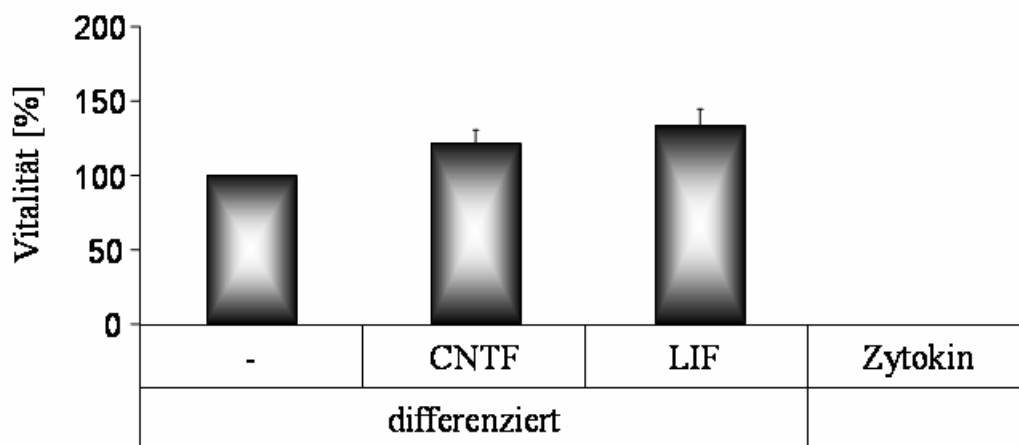


Abbildung 35: Vitalität von 3T3-L1-Adipozyten nach Inkubation mit den Zytokinen CNTF bzw. LIF während der Differenzierung mit Insulin, IBMX und Dexamethason

Die Zellen wurden sieben Tage lang unter Zusatz des jeweiligen Zytokins differenziert und anschließend ihre allgemeine Vitalität mit Hilfe eines MTT-Tests bestimmt. Der hierbei entstandene violette Farbstoff wurde photometrisch quantifiziert. (n=3; Mittelwerte mit Standardabweichungen)

Überraschend ist hingegen die deutliche Zunahme der Fetteinlagerung während der Differenzierung der 3T3-L1-Zellen in Anwesenheit eines der beiden Zytokine (Abbildung 36). Unter der Einwirkung von CNTF wurde nach Herauslösen des Farbstoffes Oil Red O aus den gefärbten Zellen etwa die doppelte, mit LIF sogar fast die dreifache Absorption gemessen im Vergleich zu gänzlich ohne Zytokine behandelten Zellen. Ob dabei mehr Adipozyten gebildet wurden oder die gleiche Anzahl Adipozyten lediglich mehr Fett einlagerte, konnte auf Grund der ungleichmäßigen, inselförmigen Verteilung der differenzierten Zellen nicht zuverlässig bestimmt werden. Auffällig war außerdem, dass unter LIF-Einfluss einzelne Zellen besonders groß wurden. Dies allein kann jedoch nicht die starke Zunahme der Oil Red O-Aufnahme erklären, da es sich nur um eine sehr geringe Anzahl von Zellen handelte und diese sehr großen Zellen keineswegs besonders viel Fett eingelagert hatten.

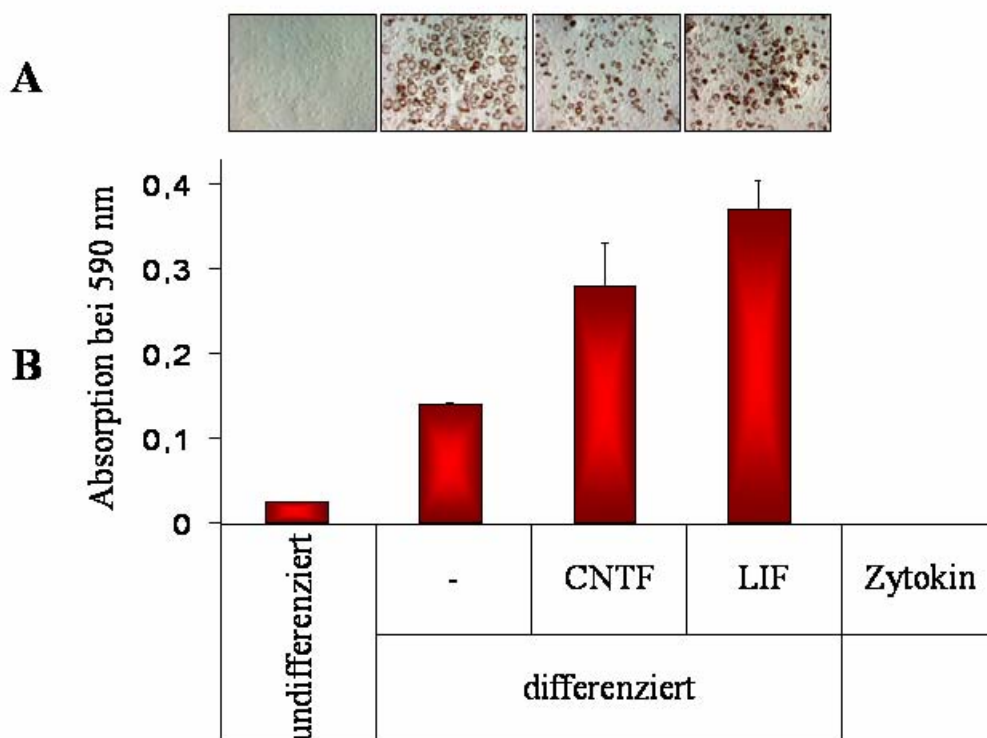


Abbildung 36: Einlagerung von Fetttröpfchen in 3T3-L1-Zellen während 7-tägiger Differenzierung mittels Insulin/IBMX/Dexamethason unter Zugabe der Zytokine CNTF bzw. LIF

Die intrazellulären Triglyzeride wurden mit Oil Red O angefärbt (A). Anschließend wurde der Farbstoff mit Isopropanol aus den Zellen herausgelöst und photometrisch quantifiziert (n=2; Mittelwerte mit Standardabweichungen) (B).

Die Ergebnisse der Real Time PCR zeigen keinen wesentlichen Einfluss der Zytokine auf die Expression der untersuchten Gene während der 7-tägigen Differenzierung (Abbildung 37). Zudem konnte wegen Unregelmäßigkeiten bei der Messung teilweise nur ein einziger Messwert pro Transkript ermittelt werden (Bestimmung des mRNA-Spiegels von PPAR γ 2, Resistin und aP2 nach 7-tägiger Differenzierung der Zellen unter Zugabe von CNTF), wodurch eine zuverlässige Aussage unmöglich wird.

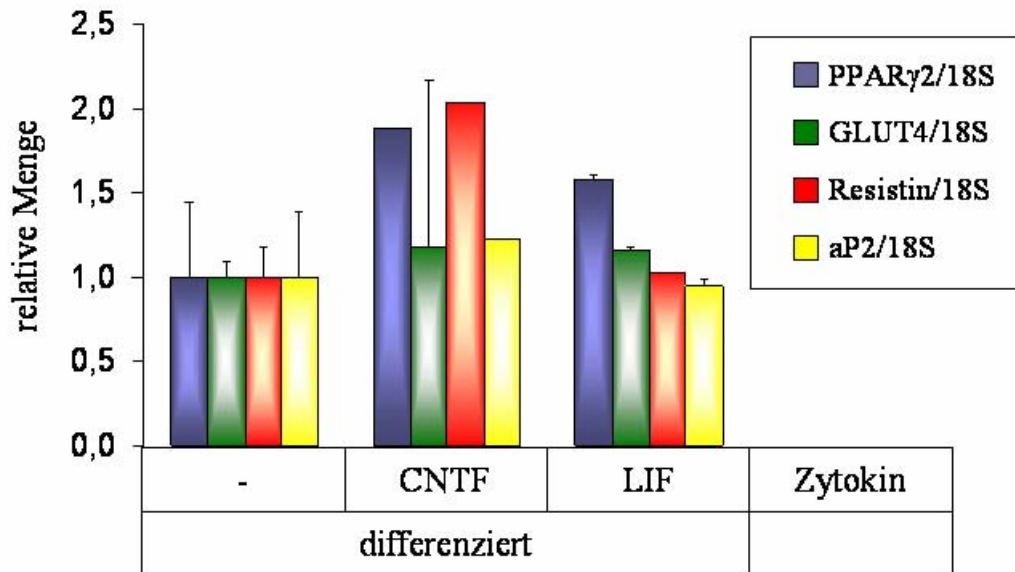


Abbildung 37: mRNA-Spiegel verschiedener Gene während 7-tägiger Differenzierung von 3T3-L1-Zellen mittels Insulin/IBMX/Dexamethason unter Zugabe der Zytokine CNTF bzw. LIF

Die RNA wurde aus den Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und unter Verwendung spezifischer Primer mittels Real Time PCR quantifiziert. Auf Grund von Unregelmäßigkeiten bei der Messung konnte für den mRNA-Spiegel von PPAR γ 2, Resistin und aP2 nach Differenzierung mit CNTF nur ein Wert ermittelt werden. (n=1 bzw. n=2; Mittelwerte mit Standardabweichungen)

Auch auf Proteinebene ist der Einfluss der beiden verwendeten Zytokine nur geringfügig (Abbildung 38). Die Expression von IR β und die Aktivierung von Erk1/2 sind nach 7-tägiger Differenzierung der 3T3-L1-Zellen mit CNTF oder LIF nicht maßgeblich verändert. CNTF bewirkt bei keinem der im Western Blot detektierten Proteine eine erhöhte oder erniedrigte Expression.

Abbildung 38: Regulierung verschiedener Proteine während 7-tägiger Differenzierung von 3T3-L1-Zellen mittels Insulin/IBMX/Dexamethason unter Zugabe der Zytokine CNTF bzw. LIF

Die Zellen wurden am siebten Differenzierungstag lysiert, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und unter Einsatz spezifischer Antikörper immunodetektiert.

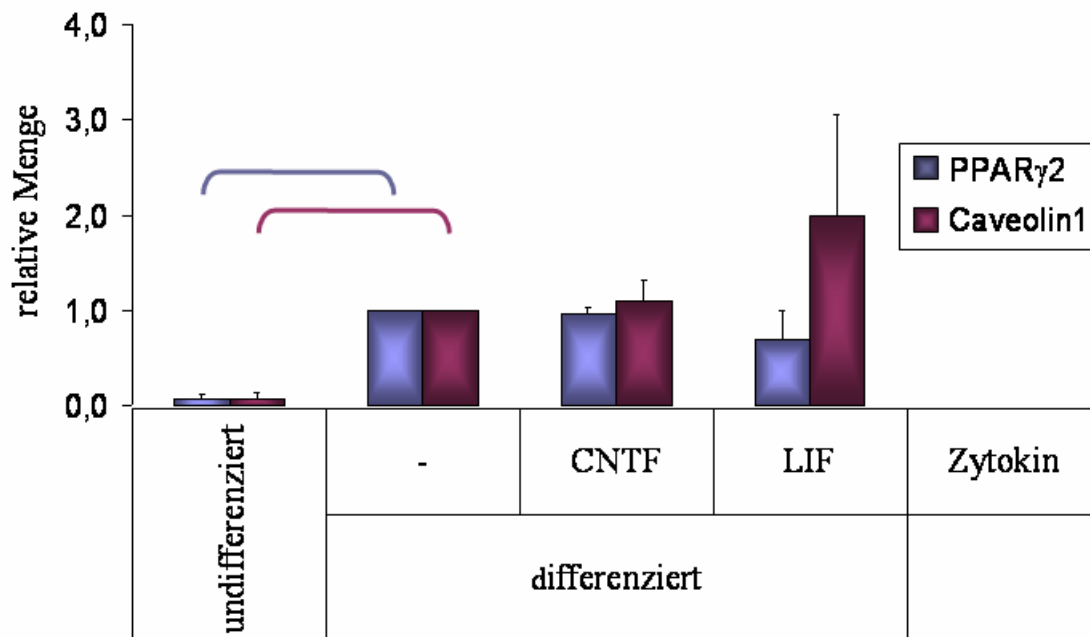
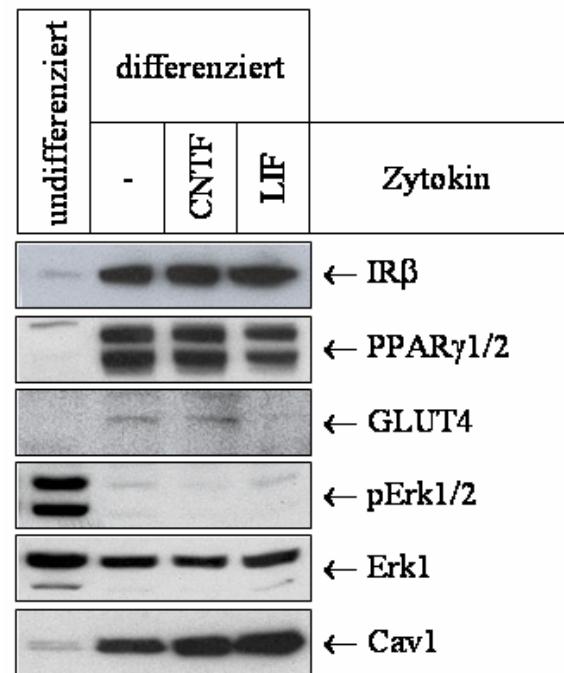


Abbildung 39: Densitometrische Auswertung der Expression der Proteine PPAR γ 2 und Caveolin1 nach Zugabe der Zytokine CNTF bzw. LIF während 7-tägiger Differenzierung von 3T3-L1-Zellen mit Insulin, IBMX und Dexamethason

Die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente wurden densitometrisch erfasst und mittels t-Test für gepaarte Stichproben ausgewertet. Die mit Klammern verbundenen Werte unterscheiden sich zum Signifikanzniveau 0,05. (n=3; Mittelwerte mit Standardabweichungen)

Lediglich durch die Zugabe von LIF zum Zellkulturmedium während der Differenzierung zeichnet sich eine entgegengesetzte Regulierung des Proteins PPAR γ 2 gegenüber Caveolin1 ab, wie sie bereits in Abschnitt 3.4.1 für die Zugabe von Oliven- bzw. Sojaöl während der Differenzierung der Zellen mit Insulin, IBMX und Dexamethason gezeigt wurde. Die Expression von PPAR γ 2 nimmt leicht ab, die von Caveolin1 dagegen nimmt etwas zu. Diese Unterschiede waren nach statistischer Auswertung dreier unabhängiger Experimente nicht signifikant (Abbildung 39), obwohl in jedem der drei Experimente der Zusatz des Zytokins LIF während der Differenzierung eine Erhöhung der Caveolin1-Expression zur Folge hatte – allerdings in sehr unterschiedlichem Ausmaß. GLUT4 ist im Western Blot nur schwach zu sehen, folgt aber auch hier wieder dem Expressionsmuster von PPAR γ .

3.7.2 Differenzierungspotential der Zytokine CNTF bzw. LIF in 3T3-L1-Prädipozyten

Wie bereits in Abschnitt 3.4.2 für die Öle geschehen, wurde auch für die Zytokine CNTF und LIF das Differenzierungspotential in 3T3-L1-Prädipozyten bestimmt anhand der Färbung der Zellen mit Oil Red O, der Messung der Transkripte von PPAR γ 2, GLUT4, Resistin und aP2 mittels Real Time PCR sowie der Detektion verschiedener Proteine mit Aussagekraft über den Differenzierungszustand der Zellen, wie z.B. PPAR γ und Caveolin1. Die Zellen wurden zur Unterstützung eines eventuell durch die Zytokine ausgelösten Differenzierungsprozesses auf High Glucose-Medium umgestellt, es wurden jedoch weder Insulin noch IBMX oder Dexamethason zugesetzt. Wie in Abbildung 40B anhand der Quantifizierung des intrazellulär gelösten Oil Red O ersichtlich, hatte die 7-tägige Inkubation der Prädipozyten mit einem der beiden Zytokine keinerlei Auswirkung auf die Triglyzerideinlagerung der Zellen. Auch bei mikroskopischer Betrachtung war keine Änderung des fibroblastenartigen Phänotyps der Zellen zu erkennen (Abbildung 40A).

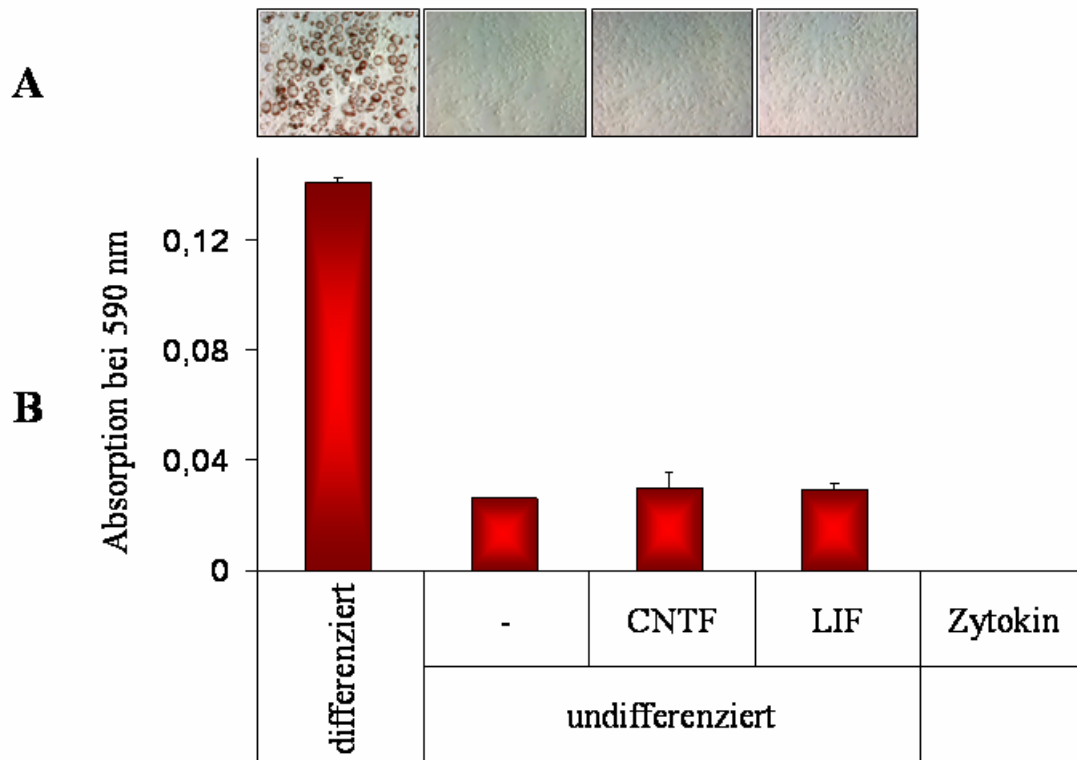


Abbildung 40: Einlagerung von Fetttropfchen in 3T3-L1-Prädipozyten nach 7-tägiger Inkubation mit den Zytokinen CNTF bzw. LIF

Die intrazellulären Triglyzeride wurden mit Oil Red O angefärbt (A). Anschließend wurde der Farbstoff mit Isopropanol aus den Zellen herausgelöst und photometrisch quantifiziert (n=2; Mittelwerte mit Standardabweichungen) (B).

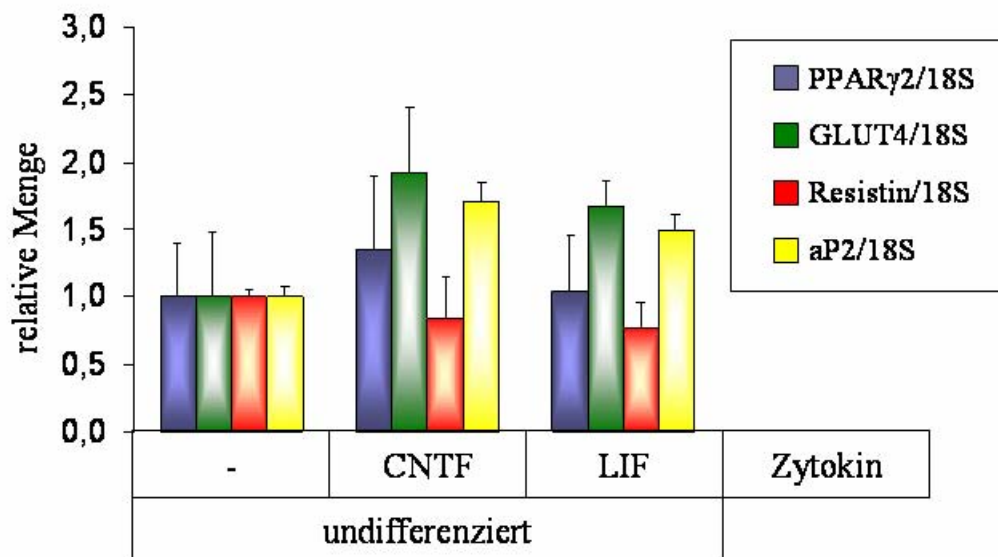


Abbildung 41: mRNA-Spiegel verschiedener Gene nach 7-tägiger Inkubation von 3T3-L1-Prädipozyten mit den Zytokinen CNTF bzw. LIF

Die RNA wurde aus den Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und unter Verwendung spezifischer Primer mittels Real Time PCR quantifiziert (n=2; Mittelwerte mit Standardabweichungen).

Des Weiteren spricht auch die Messung der mRNA-Spiegel von PPAR γ 2, GLUT4, Resistin und aP2 nicht für ein wesentliches Differenzierungspotential der Zytokine (Abbildung 41). Lediglich die Expression von GLUT4 und aP2 ist nach 7-tägiger Inkubation der 3T3-L1-Prädipozyten mit einem der beiden Zytokine leicht erhöht. Hierbei besteht kein Unterschied in der Wirkung von CNTF und LIF. Die Analyse mittels Western Blot deutet ebenfalls nicht auf eine maßgebliche Einflussnahme der Zytokine auf für die Differenzierung der 3T3-L1-Zellen aussagekräftige Proteine hin (Abbildung 42). Eine Ausnahme bildet hier wiederum Caveolin1, dessen Expression in allen drei densitometrisch ausgewerteten Experimenten durch die Einwirkung von LIF deutlich erhöht war. Allerdings hatte auch hier die unterschiedlich starke Ausprägung dieses Effekts eine relativ hohe Standardabweichung zur Folge (Abbildung 43). Die Expression von PPAR γ war in allen ohne Insulin, IBMX und Dexamethason behandelten Zellen zu schwach, um densitometrisch erfasst zu werden.

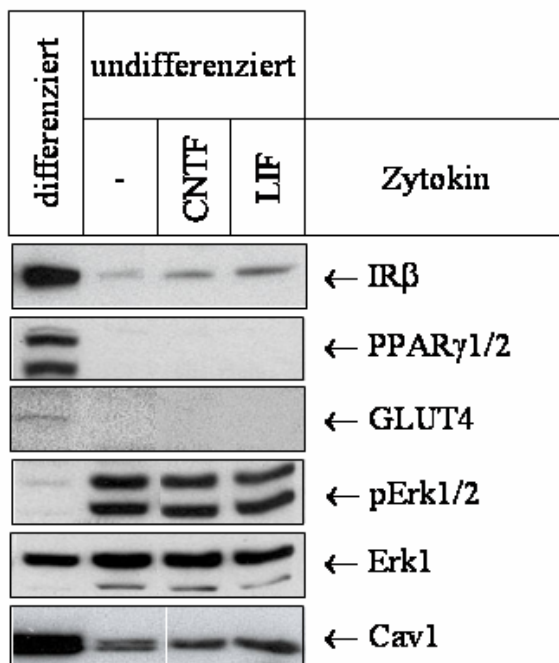


Abbildung 42: Regulierung verschiedener Proteine nach 7-tägiger Inkubation von 3T3-L1-Prädipozyten mit den Zytokinen CNTF bzw. LIF

Die Zellen wurden am siebten Versuchstag lysiert, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und unter Einsatz spezifischer Antikörper immunodetektiert.

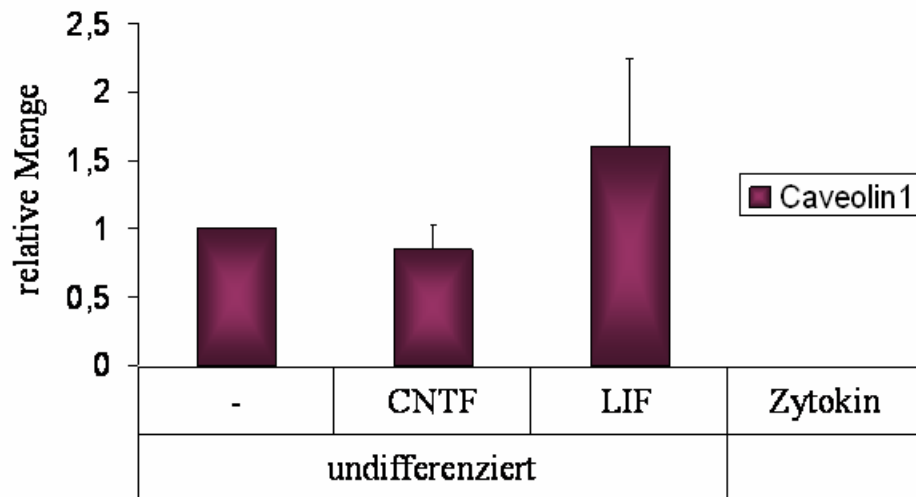


Abbildung 43: Densitometrische Auswertung der Expression von Caveolin1 nach 7-tägiger Inkubation von 3T3-L1-Prädipozyten mit den Zytokinen CNTF bzw. LIF

Die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente wurden densitometrisch erfasst und mittels t-Test für gepaarte Stichproben ausgewertet. Die mit Klammern verbundenen Werte unterscheiden sich zum Signifikanzniveau 0,05. (n=3; Mittelwerte mit Standardabweichungen)

4 Diskussion

Fast jeder Zelltyp des menschlichen Organismus ist in der Lage, in gewissem Maße Energie in Form von Glycogen oder kleinen Fetttröpfchen zu speichern. Allerdings stört die Ansammlung größerer Fettmengen in den meisten Zellen die normalen metabolischen und signalleitenden Prozesse. Dieser Effekt wird als Lipotoxizität bezeichnet (Unger, 2003). Beispielsweise führt eine erhöhte Triglyzeridmenge in Leber- und Muskelzellen zur vermehrten Bildung von Diazylglyzerin (DAG) und in der Folge zur Aktivierung bestimmter Proteinkinase C (PKC)-Isoformen, die zur Serinphosphorylierung von IRS1 führt und damit dessen Aktivierung durch Tyrosinphosphorylierung verhindert. Infolgedessen ist die Insulinsignaltransduktion gestört und die verringerte PI(3)K-Aktivität verursacht in Muskelzellen eine Abnahme der Glucoseaufnahme und -verwertung sowie in Leberzellen einen Anstieg der Gluconeogenese – beides Prozesse, die einen erhöhten Blutglucosespiegel zur Folge haben (Wolf, 2008). Lediglich Adipozyten sind auf die Speicherung größerer Fettmengen spezialisiert und können auch dann noch normal funktionieren, wenn das Zytoplasma fast vollständig von Fettspeichern eingenommen wird und die übrigen Zellorganellen dicht an die Membran gedrängt werden. Die Bildung neuer Fettzellen spielt daher eine wesentliche Rolle bei der Entfernung überschüssiger Nährstoffe aus dem Blut und wird zum Beispiel durch die als Antidiabetika eingesetzten Thiazolidindione gefördert. Langfristig bewirken diese Medikamente jedoch eine Gewichtszunahme, die wiederum als Risikofaktor für die Entstehung eines Diabetes mellitus Typ 2 angesehen wird. In den letzten Jahren wurde außerdem deutlich, dass das Fettgewebe nicht nur eine Funktion als Speicher großer Energiereserven hat, sondern auch als endokrin aktives Organ eine wichtige Rolle spielt. Eine Vielzahl als Adipokine bezeichnete Signalstoffe wird von Fettzellen ausgeschüttet und beeinflusst den gesamten Organismus.

Die Entstehung von Fettzellen kann im Zellkulturmodell durch die Differenzierung muriner 3T3-L1-Präadipozyten zu Adipozyten nachgestellt werden. Die Heterogenität der 3T3-L1-Zellen zwischen verschiedenen Passagen bzw. zwischen 3T3-L1-Zellen von unterschiedlichen Bezugsquellen stellte bei der in der vorliegenden Arbeit erreichten Stichprobenzahl von meist drei Experimenten pro Fragestellung ein gewisses Problem dar. Zwar wurden in allen drei Experimenten prinzipiell die gleichen Effekte beobachtet, deren stark unterschiedliche Ausprägung führte jedoch zu hohen

Standardabweichungen bei der statistischen Berechnung und schwächte auf diese Weise die Signifikanz der einzelnen Resultate.

Die Untersuchung biochemischer Prozesse mittels Zellkulturmodellen hat neben den Vorteilen der relativ einfachen und kostengünstigen Handhabung auch einige Nachteile. Dazu gehört der fehlende Einfluss weiterer Zelltypen oder Organe auf die analysierten Vorgänge, der im Organismus möglicherweise eine wichtige Rolle spielt. Im hier verwendeten Modell für Fettzellen kommt hinzu, dass nicht zwischen viszeralem und subkutanem Fett unterschieden werden kann. Auf Grund der einzigartigen anatomischen Nähe des viszeralen Fettes zur Pfortader der Leber ist dieser Unterschied physiologisch jedoch durchaus bedeutsam. Werden 3T3-L1-Zellen subkutan in Mäuse injiziert, sind die daraus entstehenden Fettpolster histologisch allerdings nicht vom dort ansässigen weißen Fettgewebe zu unterscheiden (Gregoire *et al.*, 1998).

4.1 Differenzierung der 3T3-L1-Prädipozyten zu Fettzellen

3T3-L1-Prädipozyten entwickeln sich nach Einstellung des Wachstums - z. B. durch Kontaktinhibition – spontan zu Fettzellen. Dieser Prozess wird üblicherweise durch den Zusatz von Insulin, IBMX und Dexamethason zum Zellkulturmedium beschleunigt und wurde auch in der vorliegenden Arbeit auf diese Weise ausgelöst. Die Differenzierung hat die zügige Einlagerung von Triglyzeriden zur Folge, wie in Abbildung 7 durch die Anfärbung der intrazellulären Fetttropfchen mit Oil Red O veranschaulicht wird. Außerdem führt die Differenzierung zu Veränderungen auf transkriptioneller Ebene, wie durch Messung der mRNA-Spiegel von PPAR γ 2, GLUT4, Resistin und aP2 mittels Real Time PCR registriert werden konnte (Abbildung 8). Erwartungsgemäß erfährt PPAR γ 2 während der Differenzierung einen starken Anstieg auf mRNA-Ebene. Fu *et al.* wiesen etwa 36 bis 48 Stunden nach Differenzierungsinitialisierung mit Insulin, IBMX und Dexamethason eine Zunahme der PPAR γ -mRNA in 3T3-L1-Zellen nach, die bis zum siebten Differenzierungstag anhielt (Fu *et al.*, 2005). PPAR γ ist von essentieller Bedeutung für den Organismus. Homozygote PPAR γ -Knockout-Mäuse sind nicht lebensfähig (Barak *et al.*, 1999). Die längere Isoform PPAR γ 2 kommt hauptsächlich in Adipozyten vor (Chawla *et al.*, 1994) und ist unerlässlich für deren Entwicklung. Die retrovirale Expression von PPAR γ 2 in Fibroblasten stimuliert

die Differenzierung zu Adipozyten (Tontonoz *et al.*, 1994). PPAR γ ist über die Verbesserung der Insulinsensitivität am Glucosemetabolismus beteiligt und stellt daher ein wichtiges Bindeglied zwischen Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel dar (Michalik *et al.*, 2006). Die Expression von GLUT4 (Wu *et al.*, 1998) und aP2 (Ross *et al.*, 1990) wird durch PPAR γ induziert und folgt dementsprechend der Expression von PPAR γ 2 (Abbildung 8). Obwohl Resistin in humanen Adipozyten nicht nachgewiesen werden konnte (Janke *et al.*, 2002) und somit in Bezug auf den Menschen kein Adipokin ist, wurde in den 3T3-L1-Zellen ebenfalls die Resistin-mRNA bestimmt. Die Rolle von Resistin im Zusammenhang mit der Differenzierung der Präadipozyten wird widersprüchlich diskutiert. Zum einen wurde gezeigt, dass Resistin die PPAR γ -Induktion in 3T3-L1-Zellen weitestgehend unterdrückt (Kim *et al.*, 2001). Zum anderen wurde jedoch auch eine stimulierende Wirkung von Resistin auf die Differenzierung zu Adipozyten gefunden, nachdem 3T3-L1-Präadipozyten mit Resistin transfiziert wurden und dieses anschließend überexprimiert wurde (Gong *et al.*, 2004). Einig sind sich die Wissenschaftler darin, dass die Resistin-Expression während der Differenzierung der 3T3-L1-Präadipozyten zunimmt (Gong *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2001), wie auch in Abbildung 8 ersichtlich. Um eine an die momentanen Bedingungen angepasste, differentielle Genexpression zu ermöglichen, wird die mRNA nach einer gewissen Zeit in den sogenannten *P-Bodies* (*processing bodies*) wieder abgebaut (Marx, 2005). Die Lebensdauer der Ribonukleinsäuren hängt von der Länge ihrer Poly-A-Schwänze ab und wird außerdem durch verschiedene stabilisierende oder destabilisierende Elemente beeinflusst, so dass vom mRNA-Spiegel nicht direkt auf die entsprechende Translationsrate geschlossen werden kann. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit auch auf Proteinebene verschiedene an der Insulin-signaltransduktion beteiligte Faktoren untersucht. Die Expression von IR β , PPAR γ , GLUT4 und Caveolin1 nimmt erwartungsgemäß durch den Differenzierungsprozess zu (Abbildung 9). Sowohl IR β als auch PPAR γ und GLUT4 zeigen dabei ein Maximum zwischen dem fünften und siebten Differenzierungstag. Die Aktivierung der MAPK Erk1/2 sowie die Expression von Erk1 nehmen während der Differenzierung nach und nach ab. Der Einfluss einer Erk-Aktivierung auf den Differenzierungsprozess ist unklar. Einerseits wurde eine erhöhte Expression (Prusty *et al.*, 2002) und Aktivierung durch Phosphorylierung von PPAR γ durch den Einfluss der MAPK Erk festgestellt (Zhang *et al.*, 1996). Watanabe *et al.* zeigten andererseits eine inhibitorische

sche Wirkung der MAPK-Aktivierung auf die transkriptionelle Aktivität von PPAR γ in 3T3-L1-Adipozyten (Watanabe *et al.*, 2003). Des Weiteren wird Erk als Transporthilfe bei der Wanderung von PPAR γ aus dem Zellkern in das Zytoplasma beschrieben (Burgermeister & Seger, 2007) und beispielsweise die Inhibierung der Adipozytendifferenzierung auf Grund mechanischer Beanspruchung durch eine Erk-vermittelte Verringerung der PPAR γ 2-Expression verursacht (Tanabe *et al.*, 2004). Die in Abbildung 9 dargestellte Entwicklung der Erk-Aktivierung und der PPAR γ -Expression während der Differenzierung der 3T3-L1-Zellen gibt keinen Aufschluss darüber, ob die anfänglich vorhandene Erk-Aktivierung die PPAR γ -Expression induziert oder ob Erk zunächst inaktiviert werden muss, um die PPAR γ -Induktion zu ermöglichen. In Bezug auf die Caveolin1-Expression hat die Aktivierung des MAPK-Weges in NIH-3T3-Zellen eine inhibitorische Wirkung (Engelman *et al.*, 1999), welche auch in 3T3-L1-Zellen eine Erklärung für die gegenläufige Regulation der Erk-Aktivierung und der Caveolin1-Expression während der Differenzierung sein könnte. Da die Ausstattung der 3T3-L1-Zellen mit für die Insulinsignaltransduktion wesentlichen Faktoren etwa am siebten Differenzierungstag offenbar am besten ist und die Zellen zu diesem Zeitpunkt allgemein als ausdifferenzierte Adipozyten angesehen werden, wurde für die meisten weiteren Versuche der vorliegenden Arbeit dieser Zeitpunkt gewählt, um eventuelle Effekte der untersuchten Bedingungen auf den Differenzierungsprozess deutlich sehen zu können. Um das Stimulationsverhalten ausdifferenzierter 3T3-L1-Adipozyten zu analysieren, wurden die Zellen für 24 Stunden gehungert und anschließend unterschiedlich lang mit 100 nM Insulin stimuliert bzw. es wurden während der gesamten Differenzierungszeit 850 nM Insulin dem Zellkulturmedium zugesetzt. Anschließend wurden im Western Blot die Aktivierung von IRS1 und Erk sowie die Interaktion von IR β mit Caveolin1 untersucht. IRS1 wird direkt vom Insulinrezeptor aktiviert und steht am Anfang des PI(3)K- und des MAPK-Weges (Abbildung 2). Die Aktivierung von Erk resultiert nach mehreren Zwischenschritten aus der angestoßenen MAPK-Kaskade. Abbildung 10 zeigt die schnelle Anschaltung von IRS1, die allerdings auch bei lang andauernder Insulineinwirkung erhalten bleibt. Erk wird zwar nach zügiger Aktivierung auch rasch wieder inaktiviert, ist jedoch innerhalb der MAPK-Kaskade relativ weit vom Insulinrezeptor entfernt und wird auch durch zahlreiche andere Faktoren beeinflusst. Der Interaktion zwischen Insulinrezeptor und Caveolin wurde in den letzten Jahren viel Bedeutung beigemessen. In 3T3-L1-Zellen

wurde der Insulinrezeptor in hoher Konzentration in Caveolae gefunden (Gustavsson *et al.*, 1999). Caveolin beeinflusst die Insulinrezeptorsignaltransduktion auf positive Weise (Yamamoto *et al.*, 1998) und Caveolin1-defiziente Mäuse entwickeln nicht nur eine Insulinresistenz, sondern zeigen auch eine um 90% verringerte Insulinrezeptorexpression (Cohen *et al.*, 2003). Dabei bleiben die mRNA-Spiegel allerdings uneinträchtigt, was für eine stabilisierende Wirkung des Caveolins auf das Insulinrezeptorprotein spricht. Des Weiteren wurden in beiden Molekülen spezifische Bindungsdomänen gefunden, die eine direkte Interaktion ermöglichen (Couet *et al.*, 1997b; Yamamoto *et al.*, 1998). Keiner der in Abbildung 10 gezeigten Effekte einer Insulinstimulation zeigt jedoch für sich genommen ein zu den physiologischen Erfordernissen der Insulinwirkung passendes Stimulationsprofil – eine schnelle, zeitlich begrenzte Wirkung. Das IRS1-Signal wird bei andauernder Insulinwirkung nicht abgeschaltet. Die Erk-Aktivierung zeigt zwar ein angemessenes Profil, ist jedoch zu unspezifisch, um als alleiniges Maß für die Insulinwirkung herangezogen zu werden. Eine Koimmunpräzipitation von IR β mit Caveolin1 war in der vorliegenden Arbeit erst nach permanenter Insulingabe möglich. Diese ist jedoch physiologisch nicht relevant. Kabayama *et al.* zeigten einen inhibitorischen Effekt von TNF α auf die Interaktion zwischen Insulinrezeptor und Caveolin1, arbeiteten jedoch ebenfalls mit einer permanenten Insulingabe während der Differenzierung der 3T3-L1-Zellen (Kabayama *et al.*, 2007).

4.2 Einfluss verschiedener Ölemulsionen auf das Differenzierungsverhalten von 3T3-L1-Zellen

Mittlerweile ist unbestritten, dass nicht nur die Quantität, sondern vor allem auch die Qualität der mit der Nahrung zugeführten Fette von Bedeutung für die Gesundheit ist. Dabei ist insbesondere die Zusammensetzung aus gesättigten (*saturated fatty acids*, SFA) bzw. einfach (*monounsaturated fatty acids*, MUFA) oder mehrfach ungesättigten (*polyunsaturated fatty acids*, PUFA) Fettsäuren zu beachten. Gesättigte Fettsäuren vermitteln inflammatorische Prozesse und begünstigen die Entstehung einer Insulinresistenz im Fettgewebe, indem sie z. B. die Akkumulation von DAG, die Aktivierung von NF κ B (*nuclear factor- κ B*) und MAPKs sowie die Rekrutierung von Zellen des Immunsystems bewirken (Kennedy *et al.*, 2009). Mehrfach ungesättigte Omega-

3-Fettsäuren hingegen wirken durch die Beeinflussung der Expression entsprechender Gene antiinflammatorisch (Calder, 2006). Durch Fütterungsversuche mit an ungesättigten Fettsäuren reichem Fischöl konnte der mRNA-Spiegel und die Aktivität an der Fettsäureoxidation beteiligter Enzyme in Mäusen erhöht sowie ein vermutlich durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors PPAR γ hervorgerufener Anstieg des Adiponectinspiegels gezeigt werden (Flachs *et al.*, 2006). Außerdem induzieren gesättigte Fettsäuren das an der Bildung inflammatorisch wirkender Prostaglandine beteiligte Enzym Cyclooxygenase-2 (COX-2) über die Aktivierung des TLR4 (*toll-like receptor 4*) in Makrophagen, welche durch ungesättigte Fettsäuren wiederum verhindert werden kann (Lee *et al.*, 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb das Differenzierungsverhalten der 3T3-L1-Zellen unter dem Einfluss der für die parenterale Ernährung hergestellten Ölemulsionen ClinOleic[®] und Salvilipid[®] untersucht. ClinOleic[®] setzt sich aus 80% Olivenöl und 20% Sojaöl zusammen und enthält 15% gesättigte, 65% einfach ungesättigte sowie 20% essentielle, mehrfach ungesättigte Fettsäuren. Das aus reinem Sojaöl bestehende Salvilipid[®] enthält ebenfalls 15% gesättigte, aber nur 25% einfach ungesättigte Fettsäuren und mit 60% einen sehr hohen Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Um die Wirkung der Öle auf die Zellen zu untersuchen, wurde zunächst das Wachstum von 3T3-L1-Präadipozyten während einer Ölinkubation analysiert, da die Zellen im Laufe der Differenzierung ihre mitotische Aktivität einstellen. Abbildung 11 zeigt die konzentrationsabhängige, inhibitorische Wirkung der Öle auf die Proliferation der Präadipozyten innerhalb von 48 Stunden, wobei das Wachstum durch die Olivenölinkubation noch etwas stärker gehemmt wird als durch die Sojaölinkubation. Für Linolsäure wurde bereits eine wachstumshemmende Wirkung auf 3T3-L1-Präadipozyten gezeigt (Satory & Smith, 1999). Die Proliferation humaner Präadipozyten wurde durch Ölsäure stärker gehemmt als durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren (McNeel *et al.*, 2003). Das in den Ölemulsionen mit einer Konzentration von etwa 2% enthaltene Glycerin könnte ebenfalls eine gewisse Rolle bei der Hemmung der Proliferation durch die Ölinkubation spielen. Für Rattenhepatozyten und humane HepG2-Zellen wurde eine wachstumshemmende Wirkung von Glycerin nachgewiesen (Sugiyama *et al.*, 2002). Allerdings lagen die in der vorliegenden Arbeit erreichten Glycerinkonzentrationen im Zellkulturmedium von 0,1% bzw. 0,01% unter den von Sugiyama *et al.* untersuchten Konzentrationen. Außerdem ist nicht auszuschlie-

ßen, dass durch den hohen Fettgehalt des Mediums der Gasaustausch beeinträchtigt wird und es dadurch zu einem etwas verringerten Zellwachstum kommt. Mittels MTT-Test wurden die Öle des Weiteren auf eine zytotoxische Wirkung überprüft. Die Umsetzung des MTT zum violetten Formazan ist in erster Linie von NADH und NADPH und damit von der Glycolyserate der Zelle abhängig und wird von Enzymen des Endoplasmatischen Reticulums katalysiert (Berridge, 1996). Ein gewisser Teil des MTT kann außerdem durch die mitochondriale Succinatdehydrogenase reduziert werden. Dieser Prozess ist somit abhängig von der mitochondrialen Aktivität, spielt jedoch im Gegensatz zur anfänglichen Vermutung eine eher geringe Rolle. Überraschenderweise wurde nach 7-tägiger Differenzierung der 3T3-L1-Zellen unter Ölzugabe um etwa 50% mehr MTT umgesetzt als in den ohne Öl differenzierten Kontrollzellen (Abbildung 12). Die 24-stündige Ölinkubation ausdifferenzierter 3T3-L1-Adipozyten hingegen führte zu einem verminderten MTT-Umsatz (Abbildung 13). Falls die Ursache für den erhöhten MTT-Umsatz nach Differenzierung der Zellen unter Ölzugabe auf mitochondrialer Ebene zu suchen ist, so ist eine durch die Öle vermehrte Bildung von Mitochondrien während der Differenzierung wahrscheinlicher als eine eher kurzfristige Beeinflussung des mitochondrialen Stoffwechsels. Thiazolidindione führen in 3T3-L1-Adipozyten zu einer erhöhten mitochondrialen Biogenese sowie zu qualitativen Veränderungen der Mitochondrien (Wilson-Fritch *et al.*, 2003). Möglicherweise werden verschiedene, im Zellkern codierte mitochondriale Gene durch PPAR γ kontrolliert. Vermutlich ist jedoch eine Erhöhung des NADH/NADPH-Spiegels durch den Einfluss der Öle für den beobachteten Effekt verantwortlich zu machen. Es ist denkbar, dass durch das sehr hohe Fettangebot durch den Zusatz der Öle zum Differenzierungsmedium NADH/NADPH-verbrauchende Prozesse, wie z. B. die Fettsäuresynthese, gehemmt werden. Insbesondere einfach ungesättigte Fettsäuren sind starke Repressoren der Fettsäuresynthase (Oku *et al.*, 2003). Möglich scheint auch eine Inhibierung aerober Vorgänge, wie z. B. der Atmungskette, durch einen gestörten Gasaustausch während der Ölinkubation der 3T3-L1-Zellen und ein dadurch verursachter Anstieg des NADH/NADPH-Spiegels. Als Ursache für die Verringerung des MTT-Umsatzes nach 24-stündiger Ölinkubation ausdifferenzierter Adipozyten ist ein erniedrigter NADH/NADPH-Spiegel anzunehmen. Letzterer könnte auf Grund der Fähigkeit vor allem ungesättigter Fettsäuren, die mitochondriale β -Oxidation zu entkoppeln, zustande kommen (Borst *et al.*, 1962). Maassen *et al.* diskutieren dieses Phänomen als Schutzfunktion vor einer unkontrollierten Freiset-

zung von Fettsäuren durch die Adipozyten, wenn z. B. durch lipolytische Effekte die Fettsäurekonzentration im Zytosol die Kapazität der Fettsäure-bindenden Proteine übersteigt (Maassen *et al.*, 2007). Da die ADP-Konzentration bei der gekoppelten β -Oxidation den limitierenden Faktor darstellt, kann durch eine Entkopplung dieses Prozesses die Verwertung von Fettsäuren deutlich gesteigert werden. Von einer relevanten Zytotoxizität der Ölemulsionen ist auf Grund der MTT-Tests nicht auszugehen. Die Aufnahme der im Zellkulturmedium enthaltenen Fette in die Zellen wurde durch 6-stündige Ölinkubation von 3T3-L1-Prädipozyten und anschließende gaschromatographische Analyse der zellulären Fette nachgewiesen (Abbildung 14). Kampf *et al.* postulieren eine prinzipiell für Prädipozyten und Adipozyten identische Weise des Fettsäuretransports über die Zellmembran mittels einer noch nicht bekannten membranständigen Proteinpumpe, die die bisherige Annahme widerlegt, dass Fettsäuren mit Hilfe der während der Differenzierung der Zellen induzierten Proteine FAT/CD36, FABPpm, FATP1 und Caveolin-1 über die Membran transportiert werden (Kampf *et al.*, 2007).

Zur Untersuchung des Einflusses der Ölemulsionen auf das Differenzierungsverhalten der 3T3-L1-Zellen wurden diese zunächst mittels Insulin, IBMX und Dexamethason differenziert und die Öle während der gesamten Differenzierungszeit von sieben Tagen dem Zellkulturmedium zugesetzt. Der für den Differenzierungsprozess wesentliche Transkriptionsfaktor PPAR γ wird durch Fettsäuremetabolite aktiviert und fungiert somit als eine Art Lipidsensor. Durch spezifische lipolytische Aktivitäten wie beispielsweise der Lipoproteinlipase (LPL) können bestimmte zirkulierende Lipoproteine hydrolysiert und PPAR-Liganden gebildet werden (Ziouzenkova *et al.*, 2003). Im Fettgewebe von Menschen, Mäusen und Ratten konnte bereits ein Einfluss nutritiver Faktoren auf die PPAR γ -Expression gezeigt werden. Im menschlichen Fettgewebe fiel der mRNA-Spiegel von PPAR γ 2 nach niedrigkalorischer Diät vorübergehend um 25% (Vidal-Puig *et al.*, 1997), im Fettgewebe von Ratten nach nächtlichem Nahrungsentzug sogar um 50% (Escher *et al.*, 2001). In Mäusen wurde nach einer 12- bis 48-stündigen Fastenperiode eine Abnahme der mRNA von PPAR γ 2 im Fettgewebe um 80% gemessen, nach einer fettreichen Diät war jedoch ein Anstieg des mRNA-Spiegels um 50% zu beobachten (Vidal-Puig *et al.*, 1996). In 3T3-L1-Zellen wird durch den Zusatz von Linolsäure zum Zellkulturmedium während der Differenzierung PPAR γ auf Proteinebene induziert (Kang *et al.*, 2003). In der vor-

liegenden Arbeit hingegen wird PPAR γ durch den Zusatz der Öle während der Differenzierung sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene geschwächt im Vergleich zu ölfrei differenzierten Zellen (Abbildung 17, Abbildung 18, Abbildung 19). Dabei wirkt sich Sojaöl im Vergleich zu Olivenöl auf Proteinebene etwas stärker aus. Die Expression von GLUT4 folgt derjenigen von PPAR γ , soweit dies auf Grund des schwachen Signals im Western Blot zu beurteilen ist. PPAR γ stimuliert jedoch nicht nur die Expression von GLUT4 (Wu *et al.*, 1998), sondern induziert auch das an der Translokation von GLUT4 zur Membran beteiligte CAP (Ribon *et al.*, 1998b). Die durch Insulin, IBMX und Dexamethason initialisierte Differenzierung der 3T3-L1-Zellen wird offenbar durch die Öle etwas gehemmt. Im Gegensatz zu PPAR γ wird Caveolin1 durch die Ölinkubation während der Differenzierung stärker exprimiert. Caveolin1 ist für die Bildung neuer Fettzellen nicht notwendig, da embryonale Fibroblasten von Caveolin1-defizienten Mäusen in der Lage sind, zu Adipozyten zu differenzieren (Le Lay *et al.*, 2006). Caveolin1-defiziente Mäuse sind einerseits resistent gegenüber einer diätinduzierten Adipositas, andererseits zeigen sie eine Hypertriglyzeridämie (Razani *et al.*, 2002) und sind sowohl insulinresistent (Cohen *et al.*, 2003) als auch resistent gegenüber lipolytischer Stimulation (Cohen *et al.*, 2004). Dies legt eine regulatorische Rolle des Caveolins bezüglich Auf- und Abbau der intrazellulären Fettspeicher nahe. Tatsächlich wurde Caveolin auf der Oberfläche zyttoplasmatischer Lipidtröpfchen gefunden (Fujimoto *et al.*, 2001; Otto & Lane, 2005; Pol *et al.*, 2001). Der Transport von Caveolin1 zu den Fettröpfchen erfolgt aktiv und kann in 3T3-L1-Zellen beispielsweise durch exogen zugeführtes Cholesterin ausgelöst werden (Le Lay *et al.*, 2006). Für eine regulierende Wirkung des Caveolins spricht auch, dass es einerseits die Aktivität der Proteinkinase A (PKA) durch direkte Interaktion mit der katalytischen Untereinheit hemmt, andererseits jedoch für die Phosphorylierung und damit Inaktivierung von Perilipin durch PKA nötig ist, da es die Reaktionspartner in räumliche Nähe zueinander bringt (Cohen *et al.*, 2004). Die Tatsache dass in bestimmten Caveolae primärer Adipozyten die Synthese von Triglyceriden nachgewiesen werden konnte (Ost *et al.*, 2005), legt die Vermutung nahe, dass diese Caveolae nach ihrer Endozytose möglicherweise der Ursprung der zytoplasmatischen Lipidtröpfchen sind (Le Lay *et al.*, 2008). Es erscheint plausibel, dass die Induktion von Caveolin1 durch die Inkubation von 3T3-L1-Zellen mit Öl während der Differenzierung (Abbildung 18) dazu dient, eine große Menge Fett effizient ins Zellin-

neren zu transportieren und dort zu speichern. Da nach Sojaölinkubation insgesamt mehr Fett eingelagert wurde (Abbildung 15) und außerdem die so entstandenen Fetttröpfchen zahlreicher, aber dafür kleiner waren als die nach Olivenölinkubation gebildeten Lipidspeicher und somit eine deutlich größere Oberfläche aufwiesen (Abbildung 16), wäre eine stärkere Induktion von Caveolin1 durch Sojaöl im Vergleich zu Olivenöl zu erwarten gewesen. Möglicherweise konnte diese auf Grund der geringen Stichprobenzahl und der relativ hohen Standardabweichungen nicht nachgewiesen werden (Abbildung 19). Ein weiterer Grund für die unterschiedliche Fetteinlagerung könnte jedoch auch die stärkere Hemmung der Fettsäuresynthese und damit der Fettsäuresynthese aus im Medium enthaltener Glucose durch die für Olivenöl typische Ölsäure im Vergleich zur im Sojaöl reichlich vorhandenen Linolsäure sein (Oku *et al.*, 2003). Insgesamt scheint die Inkubation der Zellen mit Öl unter den beschriebenen Bedingungen die Auffüllung bereits vorhandener Adipozyten mit zusätzlichem Fett gegenüber der Neubildung von Fettzellen zu bevorzugen. In großen Adipozyten ist jedoch wiederum die GLUT4-Translokation nach Insulinstimulation gestört und die Glucoseaufnahme in die Zellen entsprechend verringert, wodurch die Einlagerung von weiterem Fett verhindert wird (Franck *et al.*, 2007). Außerdem setzen große Adipozyten mehr gesättigte Fettsäuren frei, die an TLR-4 von Makrophagen binden und in einer Aktivierung von NF κ B resultieren, die schließlich zur erhöhten Freisetzung von TNF α führt (Suganami *et al.*, 2005; Suganami *et al.*, 2007). Die Größe der Fettzellen spielt folglich durchaus eine Rolle bei der Entstehung einer Insulinresistenz.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob die Öle in der Lage sind, einen gewissen Differenzierungsprozess in 3T3-L1-Präadipozyten auszulösen. Die sieben Tage lang mit Oliven- oder Sojaöl inkubierten Präadipozyten zeigen im Vergleich zu ohne Öl gehaltenen Präadipozyten und zu mit Insulin, IBMX und Dexamethason differenzierten Zellen einen überraschend hohen Fettanteil, obwohl die fibroblastenartige Morphologie der Zellen unverändert ist (Abbildung 20). Es ist nicht auszuschließen, dass dieses Ergebnis durch eventuelle Ölrückstände auf der Zelloberfläche verfälscht ist. Allerdings wurde nachgewiesen, dass bereits nach dem zweiten Waschschrift vor Durchführung der Oil Red O-Färbung keine nennenswerten Mengen Öl mehr in der Waschlösung enthalten sind (nicht gezeigt). Des Weiteren würde die Einbeziehung eventueller Ölrückstände auf der Zelloberfläche in das

Messergebnis nicht den deutlichen Unterschied zwischen Soja- und Olivenöl erklären. Dass Präadipozyten in der Lage sind, die im Zellkulturmedium enthaltenen Fette aufzunehmen, wurde bereits in Abbildung 14 demonstriert. Auch hier dient die Induktion von Caveolin1 durch die Ölinkubation vermutlich der effizienten Einlagerung von Fett im Zellinneren (Abbildung 22, Abbildung 23). aP2, das neben PPAR γ als Marker für die Differenzierung der Zellen zu Adipozyten herangezogen werden kann, ist auf mRNA-Ebene, vor allem nach Sojaölinkubation, leicht erhöht (Abbildung 21). Über die Induktion von PPAR γ und GLUT4 lässt sich auf Grund hoher Standardabweichungen bzw. niedriger Expressionsraten keine Aussage treffen. Insgesamt scheint ein schwaches Differenzierungspotential der Öle möglich. Zu beachten ist allerdings, dass 3T3-L1-Zellen in serumhaltigem Medium nach einer gewissen Zeit auch spontan zu Adipozyten differenzieren. Dieser Prozess könnte durch den Zusatz der Öle etwas beschleunigt werden. Die Hemmung des Wachstums der Präadipozyten durch die Ölinkubation (Abbildung 11) könnte ein weiterer Hinweis auf die Beeinflussung des Differenzierungsprozesses sein, da die Einstellung der Proliferation Voraussetzung für die Bildung von 3T3-L1-Adipozyten ist (Gregoire *et al.*, 1998). Zur Untersuchung des Differenzierungspotentials der Öle wurde weder Insulin noch IBMX oder Dexamethason zum Zellkulturmedium gegeben, allerdings wurden die Präadipozyten dennoch auf High Glucose-Medium umgestellt. Es ist daher denkbar, dass auch die Glucosekonzentration des Mediums einen Einfluss auf die Differenzierungsinitialisierung hat. Dabei kann es sich jedoch höchstens um einen synergistischen Effekt der Glucose mit den Ölen handeln, da auch die ohne Öl gehaltenen Zellen auf High Glucose-Medium umgestellt wurden.

Die Ergebnisse der Abschnitte 3.4.1 und 3.4.2 deuten auf eine ausgleichende Wirkung der Öle in Bezug auf die Differenzierung von 3T3-L1-Zellen hin, d. h. eine durch die Zugabe von Insulin, IBMX und Dexamethason erzwungene Differenzierung wird gehemmt, ansonsten aber die Entwicklung der Präadipozyten zu Adipozyten eher unterstützt. Dies ist positiv zu bewerten, da die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Fettzellen physiologisch prinzipiell wichtig ist für die Bewältigung großer Nährstoffmengen im Blut und für die Bildung von Energiereserven. Auf der anderen Seite vermittelt PPAR γ jedoch die durch fettreiche Ernährung induzierte Fettzellhypertrophie und Insulinresistenz (Kubota *et al.*, 1999). Im menschlichen Fettgewebe wurde eine positive Korrelation der PPAR γ 2-mRNA mit Adipositas und BMI festgestellt

(Vidal-Puig *et al.*, 1997). Des Weiteren ist eine Feinregulation des durch PPAR γ induzierten aP2 nötig, um lipolytische Effekte und die Entstehung einer Insulinresistenz zu verhindern (Coe *et al.*, 1999; Uysal *et al.*, 2000). Für eine genauere Analyse der Wirkung verschiedener Fette auf das Differenzierungsverhalten von 3T3-L1 ist die Einbeziehung von hauptsächlich aus gesättigten Fettsäuren zusammengesetzten Fetten in weitere Untersuchungen nötig.

Das proinflammatorische Zytokin TNF α spielt eine wesentliche Rolle bei der Entstehung einer Insulinresistenz. Es wird bei Adipositas vermehrt vom Fettgewebe gebildet (Kern *et al.*, 2001), inhibiert die Expression von PPAR γ , GLUT4, IRS1 (Ruan *et al.*, 2002) und Adiponectin (Kappes & Loffler, 2000) und verhindert somit die Differenzierung von Präadipozyten. Es fördert die Lipolyse intrazellulärer Fettspeicher, indem es die Phosphorylierung von Perilipin bewirkt (Souza *et al.*, 2003) sowie dessen mRNA- und Proteinexpression inhibiert (Rosenbaum & Greenberg, 1998), und führt zur vermehrten Ansiedlung von Makrophagen im Fettgewebe (Bruun *et al.*, 2005). Für die Inhibition der Adipozytendifferenzierung sowie für die Induktion der Lipolyse wird unter anderem die Aktivierung der MAPK Erk durch TNF α verantwortlich gemacht (Adams *et al.*, 1997; Souza *et al.*, 2003). Für eine tragende Rolle der Erk-Aktivierung im Zusammenhang mit Insulinresistenz spricht außerdem die Tatsache, dass die insulininduzierte Stimulation dieses Signalweges beim Typ 2-Diabetiker im Gegensatz zum PI(3)K-Weg nicht verringert ist (Cusi *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Soja- bzw. Olivenöl auf die TNF α -induzierte Differenzierungsinhibition in 3T3-L1-Zellen untersucht. Zu diesem Zweck wurde den Zellen ab dem Zeitpunkt der Differenzierungsinitialisierung durch Insulin, IBMX und Dexamethason TNF α in einer Konzentration von 0,1 nM zugesetzt. Sowohl die Anfärbung der Fetttropfchen mit Oil red O (Abbildung 24) als auch die Ergebnisse der Real Time PCR (Abbildung 25) und auf Proteinebene (Abbildung 26) zeigen die stark inhibitorische Wirkung des Zytokins auf den Differenzierungsprozess. Bereits in Abbildung 24A ist deutlich zu erkennen, dass unter dem gleichzeitigen Einfluss der Öle mehr Adipozyten gebildet werden. Entsprechend den in Abbildung 15 und Abbildung 20 gezeigten Ergebnissen führt Sojaöl im Vergleich zu Olivenöl auch hier wieder zu einer etwas stärkeren Fettakkumulation. Die positive Wirkung der Öle bestätigt sich des Weiteren in der Messung der mRNA von PPAR γ 2, GLUT4 und aP2 (Abbildung 25) sowie im Western Blot für PPAR γ 1, GLUT4 und Caveolin1 (Abbildung

26). Abbildung 26 zeigt außerdem die Aktivierung von Erk1/2 durch die Einwirkung von $\text{TNF}\alpha$ während der Differenzierung der Zellen sowie den abschwächenden Effekt der Öle auf die Erk-Aktivierung. Die verringerte Phosphorylierung von Erk ist möglicherweise für die zum $\text{TNF}\alpha$ antagonistische Wirkung der Öle verantwortlich. Dafür spricht auch, dass mit Hilfe von $\text{PPAR}\gamma$ -Agonisten wie z. B. Rosiglitazon die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Erk-Aktivierung und Lipolyse weitgehend blockiert werden können (Souza *et al.*, 2003).

In weiteren Versuchen wurde die Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ auf bereits ausdifferenzierte Adipozyten analysiert. Hierzu wurden die 3T3-L1-Fettzellen in Anlehnung an die Arbeiten von Rotter *et al.* für 24 Stunden mit 1 nM $\text{TNF}\alpha$ inkubiert. Rotter *et al.* beobachteten die Hemmung der Expression von IRS1, GLUT4 und $\text{PPAR}\gamma$ in differenzierten 3T3-L1-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit $\text{TNF}\alpha$ (Rotter *et al.*, 2003). Zu dem gleichen Ergebnis kamen auch Ruan *et al.* (Ruan *et al.*, 2002). Konform dazu zeigt Abbildung 28 die durch $\text{TNF}\alpha$ gehemmte Expression aller hier untersuchten Gene. Die Ergebnisse auf Proteinebene stimmen bezüglich $\text{PPAR}\gamma$ und GLUT4 damit überein. Die Ölinkubation der ausdifferenzierten Adipozyten für 24 Stunden ergibt ein ähnliches Bild wie die Zugabe der Öle während der gesamten Differenzierungszeit. $\text{PPAR}\gamma$ wird sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene geschwächt, wohingegen Caveolin1 eher etwas induziert wird (Abbildung 30). Es bestätigt sich die Hypothese, dass durch die Öleinwirkung zusätzliches Fett eher in bereits vorhandenen Adipozyten gelagert und nicht durch die Bildung weiterer Fettzellen abgefangen wird. Im Gegensatz zur $\text{TNF}\alpha$ - und/oder Ölinkubation während der gesamten Differenzierungszeit zeigt sich bei 24-stündiger Inkubation ausdifferenzierter 3T3-L1-Zellen kein Anstieg der durch die $\text{TNF}\alpha$ -Wirkung verminderten mRNA- und Proteinnengen durch die gleichzeitige Einwirkung der Öle. Der Differenzierungsprozess selbst wird durch die Eliminierung von $\text{PPAR}\gamma$ in 3T3-L1-Adipozyten nicht rückgängig gemacht (Liao *et al.*, 2007). Dafür spricht beispielsweise auch die Tatsache, dass die $\text{IR}\beta$ -Expression nicht parallel zur $\text{PPAR}\gamma$ -Expression gemindert wird, wie in Abbildung 29 ersichtlich ist. Allerdings wiesen Imai *et al.* die Notwendigkeit von $\text{PPAR}\gamma$ für das Überleben reifer Adipozyten in Mäusen nach (Imai *et al.*, 2004). Des Weiteren bewirkt auch die vergleichsweise kurzfristige $\text{TNF}\alpha$ -Gabe für 24 Stunden die Aktivierung von Erk (Abbildung 29) und spielt somit vermutlich auch in ausdifferenzierten Adipozyten eine Rolle bei der Induktion der Lipolyse über die Phosphorylierung und

Inhibition von Perilipin. Eine Auswirkung der gleichzeitigen Ölinkubation während der 24 Stunden auf die Erk-Aktivierung ist nicht erkennbar. Die Rolle von Resistin bei der Differenzierung von Präadipozyten und der Entstehung einer Insulinresistenz ist unklar (vgl. Abschnitt 1.6.2.2). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Li et al. (Li et al., 2003) wurde Resistin in der vorliegenden Arbeit auf mRNA-Ebene durch $\text{TNF}\alpha$ gehemmt (Abbildung 25, Abbildung 28) und kann hier in keinen negativen Zusammenhang mit der Differenzierung der 3T3-L1-Zellen gebracht werden. Eine Inhibierung der insulinstimulierten IRS1-Phosphorylierung sowie der IRS1-Expression durch 24-stündige IL-6- bzw. $\text{TNF}\alpha$ -Inkubation (Rotter et al., 2003) kann nicht bestätigt werden (Abbildung 31). Allerdings ist die Aussagekraft der IRS1- bzw. Erk-Phosphorylierung als Marker für die Insulinsignaltransduktion fraglich, wie bereits in der Diskussion der Abbildung 10 dargestellt wurde. Deshalb bleibt an dieser Stelle offen, ob IL-6 und $\text{TNF}\alpha$ das Insulinsignal in diesem Versuchsansatz nicht inhibieren oder ob die Inhibition mit den angewandten Mitteln nicht detektiert wurde. Die leichte Abschwächung des insulinstimulierten pErk1/2-Signals durch die Öle (Abbildung 31) könnte wiederum ein Hinweis auf deren wachstumshemmende Wirkung sein (vgl. Abbildung 11), da die Aktivierung von Erk eine wichtige Rolle spielt bei der Induktion verschiedener für die Proliferation wesentlicher Gene nach Stimulation durch Insulin oder Wachstumsfaktoren (Boney et al., 2000; Boulton et al., 1991; Lazar et al., 1995). Im Einklang damit steht auch die Abnahme des Erk-Signals während des Differenzierungsprozesses (vgl. Abbildung 9).

Zusammengefasst zeigen die in dieser Arbeit zur Inkubation verwendeten Öle vor allem bei langfristiger Zugabe zum Zellkulturmedium eine positive Wirkung auf die Entwicklung der 3T3-L1-Zellen zu Adipozyten. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen somit die Vermutung, dass ungesättigte Fette in der Nahrung von Bedeutung sein können sowohl für die Prävention als auch für die Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2. Für eine vollständige Klärung des Sachverhalts ist es jedoch notwendig, gesättigte Fette in weitere Untersuchungen zu integrieren. Eine Insulinresistenz wird in Fettzellen durch die Inkubation mit Fettsäuren *in vitro* nicht ausgelöst, wie die Untersuchungen von Lundgren und Eriksson zeigen. Oleat und Palmitat hatten in Rattenadipozyten keinen negativen Effekt auf Glucoseaufnahme, Lipolyse und Insulinsignaltransduktion (Lundgren & Eriksson, 2004). Olivenöl und Sojaöl zeigen in der vorliegenden Arbeit keine wesentlichen Unterschiede in ihrer Wirkung. Dass *in vivo*

dennoch unterschiedliche Effekte gefunden wurden von an einfach ungesättigten Fettsäuren reichem Olivenöl gegenüber Ölen, die hauptsächlich mehrfach ungesättigte Fettsäuren enthalten (Madigan *et al.*, 2000), könnte beispielsweise durch Veränderungen auf Zellmembranebene begründet sein, die hier nicht untersucht wurden. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren verringern auf Grund ihrer flexiblen Raumstruktur die Löslichkeit von Cholesterin in der Membran (Niu & Litman, 2002; Stillwell & Wassall, 2003) und beeinflussen daher möglicherweise die für Insulinrezeptor- und GLUT4-Funktionalität wichtigen Caveolae (Keck, 2009).

4.3 Einfluss der IL-6-Typ-Zytokine CNTF und LIF auf das Differenzierungsverhalten von 3T3-L1-Zellen

Neben den Nahrungsfetten ist das IL-6-Typ-Zytokin CNTF im Zusammenhang mit Adipositas und Diabetes interessant. Es hat leptinähnliche Effekte auf Stoffwechsel und Körpergewicht, die vermutlich auf Grund der zusätzlichen STAT3-Bindungsstellen in der zytoplasmatischen Domäne des Signaltransduktors gp130 im Vergleich zum strukturell ähnlichen LRB auch im leptinresistenten Zustand erhalten bleiben (Matthews & Febbraio, 2008; Watt *et al.*, 2006). Seinem Einsatz in der Therapie von Adipositas und Diabetes steht derzeit die proliferative Wirkung auf hypothalamische Zellen (Kokoeva *et al.*, 2005) sowie die Induktion inflammatorischer Prozesse im Zentralnervensystem (Kelly *et al.*, 2004; Prima *et al.*, 2004) entgegen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulierung der CNTF-Signaltransduktion während der Differenzierung von 3T3-L1-Zellen sowie der Einfluss des Zytokins auf das Differenzierungsverhalten untersucht. Die STAT3-Aktivierung durch CNTF ist in 3T3-L1-Adipozyten deutlich stärker als in den Präadipozyten (Abbildung 32). Abbildung 33 zeigt die gleichmäßige Zunahme dieser Sensitivität während der Differenzierung. Die Expression der CNTF-Rezeptorkomplexkomponenten gp130 und CNTFR bleibt vom Differenzierungsprozess weitgehend unbeeinflusst, während die LIFR-Expression in 3T3-L1-Adipozyten deutlich niedriger ist als in den Vorläuferzellen (Abbildung 34). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den von Zvonic *et al.* veröffentlichten Daten. Zwar bleibt die gp130-Expression auch hier bei gleichzeitiger Abnahme der LIFR-Expression während der Differenzierung gleich, jedoch sinkt die Expression des CNTFR 48 Stunden nach Differenzierungsbeginn schlagartig auf ein kaum noch detektierbares Niveau und die STAT3-Aktivierung durch CNTF ist in den

3T3-L1-Adipozyten schwächer als in den Präadipozyten (Zvonic *et al.*, 2003). Da der CNTFR jedoch sowohl in nativen Mäuseadipozyten exprimiert wird als auch im Medium von kultivierten 3T3-L1-Adipozyten gefunden wurde, vermuten Zvonic *et al.* ein durch die Zellkultur bedingtes Artefakt als Ursache für den Verlust des CNTFR während der Differenzierung der 3T3-L1-Zellen. Die Induktion von CNTFR im Fettgewebe adipöser Mäuse wird als kompensatorischer Mechanismus interpretiert, der zur Verbesserung der Insulinsensitivität führen soll (Zvonic *et al.*, 2003). Die in Abbildung 34 gezeigte Regulation der CNTFR-Komplexkomponenten erklärt nicht die höhere Sensitivität der 3T3-L1-Adipozyten gegenüber CNTF. Dass die Wirkung eines Zytokins nicht nur durch die Komponenten seines Rezeptorkomplexes bestimmt wird, zeigt beispielsweise die Tatsache, dass das ebenfalls zur Gruppe der IL-6-Typ-Zytokine gehörende Neuropoietin die gleichen Rezeptormoleküle – gp130, LIFR und CNTFR – zum Komplex verbindet wie CNTF, aber dennoch eine andere Wirkung hat (Derouet *et al.*, 2004; White *et al.*, 2008). Des Weiteren ist die Fähigkeit des CNTF zur Signaltransduktion nicht zwingend abhängig vom CNTFR. Es wurde gezeigt, dass CNTF auch über einen lediglich aus gp130 und LIFR bestehenden Komplex wirken kann (Gearing *et al.*, 1994; Monville *et al.*, 2001). Außerdem besitzt es eine gewisse Affinität zum IL-6R (Schuster *et al.*, 2003), der zum CNTFR homolog ist (Helgren *et al.*, 1994). Im Skelettmuskel ist die Expression des CNTFR deutlich niedriger als diejenige des IL-6R (Watt *et al.*, 2006). Eine akute intraperitoneale CNTF-Injektion führt jedoch zur STAT3-Aktivierung in den Muskelzellen (Zvonic *et al.*, 2003). Es wäre daher denkbar, dass die höhere Stimulierbarkeit der 3T3-L1-Adipozyten durch CNTF die Folge eines Anstiegs der IL-6R-Expression während der Differenzierung der Zellen ist. In diesem Fall müssten die Adipozyten auch auf IL-6 sensibler reagieren als die Präadipozyten. Die Stimulation der 3T3-L1-Zellen durch IL-6 ist zwar allgemein sehr schwach, lässt jedoch eine etwas höhere Sensitivität der Adipozyten vermuten (Abbildung 32). Eine weitere Ursache für die zunehmende Empfindlichkeit der 3T3-L1-Zellen gegenüber CNTF während der Differenzierung könnte eine Abnahme der SOCS-3-Expression sein. SOCS-Proteine sind negative Regulatoren der IL-6-Typ-Zytokine. SOCS-3 wird im Fettgewebe insulinresistenter Mäuse verstärkt exprimiert (Emanuelli *et al.*, 2001; Ueki *et al.*, 2004) und inhibiert auf verschiedenen Wegen auch die Insulinsignaltransduktion (Lebrun & Van Obberghen, 2008).

Der Zusatz von CNTF während der Differenzierung der 3T3-L1-Zellen hat einen etwas gesteigerten MTT-Umsatz zur Folge (Abbildung 35). Die Ursache hierfür könnte einerseits die durch CNTF erhöhte mitochondriale Biogenese (Crowe *et al.*, 2008) oder andererseits die Hemmung der Fettsäuresynthese in 3T3-L1-Zellen (Zvonic *et al.*, 2003) und ein dadurch höherer NADH/NADPH-Spiegel sein. Anhand der in Abbildung 36 dargestellten Oil Red O-Färbung ist die durch CNTF vermehrte Einlagerung von Triglyzeriden in durch Insulin, IBMX und Dexamethason differenzierten 3T3-L1-Zellen ersichtlich. Dieses Ergebnis ist angesichts der von Crowe *et al.* beschriebenen Abnahme an weißem Fettgewebe in mit CNTF behandelten Mäusen und der verminderten Ansammlung von Fetttröpfchen in 3T3-L1-Zellen durch CNTF überraschend (Crowe *et al.*, 2008). Die unterschiedlichen Resultate in Bezug auf die Triglyzeridmenge in 3T3-L1-Adipozyten begründen sich möglicherweise dadurch, dass in den Untersuchungen von Crowe *et al.* Insulin während der gesamten Differenzierungszeit der Zellen zugegeben wurde und somit in den nicht mit CNTF behandelten Zellen mehr Fett eingelagert wurde als es in der vorliegenden Arbeit der Fall war. Auf Proteinebene werden weder PPAR γ 1/2 noch Caveolin1 maßgeblich durch die CNTF-Einwirkung während der Differenzierung der 3T3-L1-Zellen beeinflusst (Abbildung 38, Abbildung 39). Die erhöhte Triglyzerideinlagerung, kombiniert mit der pro Zellkulturschale, auf der sich Zellen unterschiedlicher Differenzierungsstadien befinden, gleichbleibenden PPAR γ -Expression, spricht dafür, dass die durch Insulin, IBMX und Dexamethason ausgelöste Fettzellendifferenzierung durch CNTF dahingehend gelenkt wird, dass viele kleine, mit einer großen Anzahl Mitochondrien ausgestattete Fettzellen anstelle von weniger, dafür aber größeren Fettzellen entstehen. Die unter dem Einfluss von CNTF geringere Größe der Adipozyten wird auch durch die Arbeiten von Crowe *et al.* bestätigt (Crowe *et al.*, 2008). Damit erhöht CNTF die Kapazität zur Fettspeicherung und zur Fettsäureoxidation und verringert die Gefahr der Freisetzung ungebundener Fettsäuren.

Durch 7-tägige Inkubation von 3T3-L1-Prädipozyten mit CNTF wurde des Weiteren untersucht, ob das Zytokin selbst einen Differenzierungsprozess in den Zellen initiieren kann. Zwar sind die mRNA-Spiegel von PPAR γ 2, GLUT4 und aP2 nach 7-tägiger Inkubation undifferenzierter 3T3-L1-Zellen mit CNTF leicht erhöht (Abbildung 41), ein wesentliches Differenzierungspotential des Zytokins in Prädipozyten kann jedoch nicht nachgewiesen werden. Die Absorption durch den fettlösli-

chen Farbstoff Oil Red O ist im Vergleich zu ohne CNTF inkubierten Präadipozyten unverändert (Abbildung 40) und auch auf Proteinebene ist keinerlei Effekt des Zytokins zu erkennen (Abbildung 42, Abbildung 43).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die positive Wirkung von CNTF auf den Fettzellmetabolismus und geben zusätzlich Hinweise auf eine günstige Beeinflussung des Differenzierungsverhaltens von 3T3-L1-Zellen durch das Zytokin. Die Konstruktion eines Moleküls mit CNTF-ähnlichen Eigenschaften, jedoch einer erhöhten Affinität zum IL-6R und einer spezifischen Wirkung auf periphere Gewebe wie Skelettmuskel und Fettgewebe stellt eine mögliche therapeutische Strategie im Kampf gegen Übergewicht und Diabetes dar und gehört zu den aktuellen Herausforderungen der Forschung auf diesem Gebiet (Matthews & Febbraio, 2008).

Die Wirkung des wie CNTF zur Gruppe der IL-6-Typ-Zytokine gehörenden LIF auf das Differenzierungsverhalten der 3T3-L1-Zellen wurde ebenfalls untersucht. Die Signaltransduktion von LIF wird durch einen Rezeptorkomplex aus LIFR und gp130 vermittelt (Gearing *et al.*, 1992). Obwohl die Expression von LIFR während der Differenzierung der 3T3-L1-Zellen abnimmt und diejenige von gp130 nahezu konstant bleibt (Abbildung 34), zeigen die Adipozyten im Vergleich zu den Präadipozyten in Bezug auf die Aktivierung von STAT3 und Erk keinen Unterschied in ihrer Sensitivität gegenüber LIF (Abbildung 32). Wie CNTF übt auch LIF keine zytotoxische Wirkung auf die 3T3-L1-Zellen aus, wenn es während der gesamten Differenzierungszeit dem Zellkulturmedium zugesetzt wird, sondern erhöht den MTT-Umsatz deutlich (Abbildung 35). Die Ursache hierfür ist unklar. Ebenso überrascht die unter LIF-Einwirkung stark erhöhte Triglyzerideinlagerung während der Differenzierung der Zellen mit Insulin, IBMX und Dexamethason (Abbildung 36). Die Überexpression von LIF führt bei Mäusen zum völligen Verlust von Fettgewebe (Metcalf & Gearing, 1989), was teilweise durch die hemmende Wirkung des Zytokins auf die LPL (Marshall *et al.*, 1994; Mori *et al.*, 1989) erklärt werden kann. Diese extreme Reduktion des Fettgewebes ist jedoch nicht positiv zu bewerten. Ein ähnlicher Effekt kann auch durch adenoviral induzierte Hyperleptinämie in Ratten herbeigeführt werden (Orci *et al.*, 2004). Der als Lipodystrophie bezeichnete völlige Verlust von Fettgewebe kann jedoch in Hepatomegalie, Hypertriglyzeridämie und einem gestörten Glucosemetabolismus resultieren und somit zu Diabetes mellitus führen (Misra & Garg, 2003). Es gehört zu den Vorzügen von CNTF, dass es einen regulierten Verlust an Fett zur Folge hat und die Adipozyten eher qualitativ verändert (Crowe *et al.*, 2008).

Da bei der Differenzierung der 3T3-L1-Zellen unter Zusatz von LIF kein Fett im Medium enthalten war, spielt eine eventuelle Wirkung des Zytokins auf die LPL hier vermutlich keine Rolle. Angesichts des durch LIF erhöhten MTT-Umsatzes (Abbildung 35) und der mittels Oil Red O-Färbung detektierten gesteigerten Fetttröpfchenbildung (Abbildung 36) scheint es naheliegend, dass die im Medium enthaltene Glucose schnell mittels Glycolyse abgebaut wird, dadurch einen erhöhten NADH-Spiegel verursacht und anschließend durch *de novo* Fettsynthese umgewandelt wird. Ob die nach LIF-Einwirkung vereinzelt beobachteten sehr großen Zellen einkernig sind oder ob es sich möglicherweise um mehrkernige Synzytien handelt, ist unbekannt. Im Zusammenhang mit der Einnistung der Blastozyste in die Gebärmutterwand wurde eine inhibitorische Wirkung von LIF auf die Synzytienbildung des Zytotrophoblasten *in vitro* beschrieben (Bischof *et al.*, 1995). Um besonders große Adipozyten handelt es sich wahrscheinlich ebenfalls nicht, da diese Zellen vergleichsweise wenig Fett akkumulierten. Die Tendenz zur gegenläufigen Regulierung von PPAR γ und Caveolin1 bei der Zugabe von LIF während der Differenzierung der 3T3-L1-Zellen mittels Insulin, IBMX und Dexamethason (Abbildung 38, Abbildung 39) erinnert an die oben beschriebene Wirkung der Öle (Abbildung 18, Abbildung 19). In beiden Fällen wird die Expression von PPAR γ etwas inhibiert, während diejenige von Caveolin1 induziert wird. Offenbar wird auch durch die Wirkung von LIF die Auffüllung bereits vorhandener Adipozyten mit weiterem Fett gegenüber der Bildung neuer Fettzellen bevorzugt. Ein gewisses Differenzierungspotential des Zytokins ist angesichts der Ergebnisse der 7-tägigen Inkubation von 3T3-L1-Präadipozyten mit LIF denkbar. Auf mRNA-Ebene ist die Wirkung von LIF mit derjenigen von CNTF vergleichbar – die Expression von PPAR γ 2, GLUT4 und aP2 ist leicht erhöht (Abbildung 41). Eine Beurteilung des Differenzierungspotentials auf Proteinebene ist kaum möglich, da die Expression sowohl von PPAR γ als auch von GLUT4 unterhalb der Nachweisgrenze liegt (Abbildung 42). Allerdings wird Caveolin1 in 3T3-L1-Präadipozyten durch die Inkubation mit LIF leicht induziert (Abbildung 43). Dieser Effekt wurde auch nach 7-tägiger Inkubation der Vorläuferzellen mit den Ölen beobachtet, jedoch in deutlicherem Ausmaß (Abbildung 23). Allerdings konnte keine erhöhte Einlagerung von Fetttröpfchen in die 3T3-L1-Zellen nach LIF-Einwirkung nachgewiesen werden (Abbildung 40). Die Beeinflussung der Differenzierung anderer Zellen durch LIF ist widersprüchlich. Beispielsweise wird die Differenzierung bestimmter Leukämiezellen

induziert, während der gleiche Prozess in normalen embryonalen Stammzellen inhibiert wird (Metcalf, 2003). Obwohl LIF zur gleichen Zytokinfamilie gehört wie CNTF, übt es keine vergleichbar positive Wirkung aus. Im Gegensatz zu CNTF erleichtert es die Bildung großer Adipozyten, die sich wiederum negativ auf den Stoffwechsel und auf inflammatorische Prozesse auswirken. Außerdem ist LIF in der Lage, eine Akut-Phase-Reaktion in der Leber zu provozieren und teilt sich verschiedene Eigenschaften mit $TNF\alpha$. Beide Zytokine stimulieren 3T3-L1-Zellen zur vermehrten Ausschüttung von IL-6 (Berg *et al.*, 1994) und hemmen unter anderem das Enzym LPL (Marshall *et al.*, 1994) und somit die Aufnahme zirkulierender Fette in die Adipozyten. Das im Blut verbleibende Fett kann sich in der Folge lipotoxisch auf andere Organe auswirken.

5 Zusammenfassung

Die sich weltweit epidemieartig ausbreitende Zivilisationskrankheit Diabetes mellitus Typ 2 ist unter anderem gekennzeichnet durch zu hohe Glucose- und Triglyzeridspiegel des Blutes. Für die Entfernung überschüssiger Nährstoffe aus dem Blut ist die Differenzierung von Präadipozyten zu auf die Speicherung großer Fettmengen spezialisierten Adipozyten essentiell. Dieser Vorgang kann im Zellkulturmodell durch die Differenzierung von 3T3-L1-Zellen mit Hilfe von Insulin, IBMX und Dexamethason nachgestellt werden. In dieser Arbeit wurde ein ausgleichender Effekt einer Oliven- bzw. Sojaölinkubation auf den Differenzierungsprozess in 3T3-L1-Zellen nachgewiesen. Die durch den Zusatz von Insulin, IBMX und Dexamethason initialisierte Differenzierung wurde durch beide Öle etwas gehemmt, während sowohl Oliven- als auch Sojaöl in undifferenzierten Präadipozyten ein gewisses Differenzierungspotential besitzen. Dies weist auf Vorteile bestimmter, mit der Nahrung zugeführter Öle gegenüber den als Antidiabetika eingesetzten Thiazolidindionen hin, welche langfristig zu einer Gewichtszunahme führen. Des Weiteren konnte die durch das proinflammatorische Zytokin $TNF\alpha$ induzierte Differenzierungsinhibition durch beide Öle in gewissem Maße ausgeglichen werden. Als Marker für den Differenzierungsstatus wurde der Transkriptionsfaktor $PPAR\gamma$ herangezogen. Das am Auf- und Abbau intrazellulärer Fettspeicher beteiligte Caveolin1 wurde sowohl in differenzierten als auch in undifferenzierten 3T3-L1-Zellen durch die Öle induziert.

Außerdem wurde die Signaltransduktion des IL-6-Typ-Zytokins CNTF in 3T3-L1-Zellen untersucht sowie dessen Einfluss auf die Differenzierung dieser Zellen überprüft. CNTF ist in den letzten Jahren zunehmend wegen seiner leptinähnlichen Wirkung, die auch im leptinresistenten Zustand erhalten bleibt, ins Zentrum des Interesses gerückt. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Zunahme der Sensitivität von 3T3-L1-Zellen gegenüber CNTF während der Differenzierung gezeigt werden. Des Weiteren wurde die positive Wirkung des Zytokins auf den Fettsäuremetabolismus und die Fettzellendifferenzierung bestätigt. Die Bildung vieler kleiner Fettzellen wurde unter dem Einfluss von CNTF gegenüber der Bildung einer geringeren Zahl größerer Fettzellen bevorzugt, wodurch die Funktionalität der Zellen günstig beeinflusst und der Schutz vor der Entstehung einer Insulinresistenz erhöht wird. Das ebenfalls zur Gruppe der IL-6-Typ-Zytokine gehörende LIF glich in seiner Wirkung nicht CNTF, sondern war tendenziell mit den Ölen vergleichbar.

6 Summary

Type 2 diabetes is a disease of civilization spreading all over the world like an epidemic. Among other things it is characterized by increased glucose and triglyceride levels of the blood. Thus the differentiation of preadipocytes into adipocytes that are specialized in storing large fat depots is essential for the removal of excess nutrients from the circulation. This process can be simulated through the differentiation of 3T3-L1 cells by treatment with insulin, IBMX, and dexamethasone. In this study a compensative effect of olive oil as well as soy bean oil on the differentiation of 3T3-L1 cells was found. The differentiation triggered by insulin, IBMX, and dexamethasone was somewhat inhibited by incubating the cells with one of the two oils, whereas both olive and soy bean oil had a certain potential to act as differentiating agents themselves when insulin, IBMX, and dexamethasone were not added. This points to benefits of certain oils contained in food compared to thiazolidinediones that are used as antidiabetics and lead to weight gain in the long term. Furthermore the inhibitory effect of the proinflammatory cytokine $TNF\alpha$ on the differentiation process could be compensated to some degree by either oil. The transcription factor $PPAR\gamma$ was used to measure the state of differentiation. Caveolin1 is involved in both buildup and degradation of intracellular fat stores and was induced by oil incubation in differentiated as well as in undifferentiated 3T3-L1 cells.

Moreover the signal transduction of the IL-6-related cytokine CNTF in 3T3-L1 cells and its influence on the differentiation process of these cells was investigated. In recent years CNTF was spotlighted because of its leptin-like properties that persist even in leptin resistant states. In this study an increasing sensitivity to CNTF during the differentiation of 3T3-L1 cells was shown. Furthermore the positive effects of the cytokine on fatty acid metabolism and adipocyte development were verified. CNTF favored the emergence of many small adipocytes compared to fewer, but larger adipocytes under different conditions. Thereby the functionality of the cells is influenced in a positive way and the protection from the development of insulin resistance is increased. The effect of LIF - another IL-6-related cytokine - was not similar to that of CNTF but was more comparable to the effect of the oils.

7 Literaturverzeichnis

1. (1996) A double-blind placebo-controlled clinical trial of subcutaneous recombinant human ciliary neurotrophic factor (rHCNTF) in amyotrophic lateral sclerosis. ALS CNTF Treatment Study Group. *Neurology* 46(5), 1244-9.
2. Abel, J.J. (1926) Crystalline Insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 12(2), 132-6.
3. Adams, M., Reginato, M.J., Shao, D., Lazar, M.A. & Chatterjee, V.K. (1997) Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. *J Biol Chem* 272(8), 5128-32.
4. Adler, R., Landa, K.B., Manthorpe, M. & Varon, S. (1979) Cholinergic neurotrophic factors: intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons. *Science* 204(4400), 1434-6.
5. Al-Khalili, L., Bouzakri, K., Glund, S., Lonqvist, F., Koistinen, H.A. & Krook, A. (2006) Signaling specificity of interleukin-6 action on glucose and lipid metabolism in skeletal muscle. *Mol Endocrinol* 20(12), 3364-75.
6. Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B. & Cohen, P. (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol* 7(4), 261-9.
7. Banting, F.G. & Best, C.H. (1990) Pancreatic extracts. 1922. *J Lab Clin Med* 115(2), 254-72.
8. Barak, Y., Nelson, M.C., Ong, E.S., Jones, Y.Z., Ruiz-Lozano, P., Chien, K.R., Koder, A. & Evans, R.M. (1999) PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 4(4), 585-95.
9. Barnett, E.A. & Fergus, C.L. (1971) The relation of extracellular amylase, mycelium, and time, in some thermophilic and mesophilic *Humicola* species. *Mycopathol Mycol Appl* 44(2), 131-41.
10. Baskin, D.G., Figlewicz Lattemann, D., Seeley, R.J., Woods, S.C., Porte, D., Jr. & Schwartz, M.W. (1999) Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. *Brain Res* 848(1-2), 114-23.
11. Battistella, F.D., Widergren, J.T., Anderson, J.T., Siepler, J.K., Weber, J.C. & MacColl, K. (1997) A prospective, randomized trial of intravenous fat emulsion administration in trauma victims requiring total parenteral nutrition. *J Trauma* 43(1), 52-8; discussion 58-60.

12. Baumann, C.A., Ribon, V., Kanzaki, M., Thurmond, D.C., Mora, S., Shigematsu, S., Bickel, P.E., Pessin, J.E. & Saltiel, A.R. (2000) CAP defines a second signaling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature* 407(6801), 202-7.
13. Baumann, H. & Wong, G.G. (1989) Hepatocyte-stimulating factor III shares structural and functional identity with leukemia-inhibitory factor. *J Immunol* 143(4), 1163-7.
14. Berg, M., Fraker, D.L. & Alexander, H.R. (1994) Characterization of differentiation factor/leukaemia inhibitory factor effect on lipoprotein lipase activity and mRNA in 3T3-L1 adipocytes. *Cytokine* 6(4), 425-32.
15. Bernlohr, D.A., Simpson, M.A., Hertzell, A.V. & Banaszak, L.J. (1997) Intracellular lipid-binding proteins and their genes. *Annu Rev Nutr* 17, 277-303.
16. Berridge, M.V., Tan A.S., McCoy K.D. & Wang, R. (1996) The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica* 4.
17. Bischof, P., Haenggeli, L. & Campana, A. (1995) Effect of leukemia inhibitory factor on human cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway. *Am J Reprod Immunol* 34(4), 225-30.
18. Bluher, M., Kahn, B.B. & Kahn, C.R. (2003) Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science* 299(5606), 572-4.
19. Boden, G. (1997) Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 46(1), 3-10.
20. Boney, C.M., Gruppuso, P.A., Faris, R.A. & Frackelton, A.R., Jr. (2000) The critical role of Shc in insulin-like growth factor-I-mediated mitogenesis and differentiation in 3T3-L1 preadipocytes. *Mol Endocrinol* 14(6), 805-13.
21. Borst, P., Loos, J.A., Christ, E.J. & Slater, E.C. (1962) Uncoupling activity of long-chain fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 62, 509-18.
22. Boulton, T.G., Nye, S.H., Robbins, D.J., Ip, N.Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S.D., DePinho, R.A., Panayotatos, N., Cobb, M.H. & Yancopoulos, G.D. (1991) ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65(4), 663-75.
23. Brasaemle, D.L., Rubin, B., Harten, I.A., Gruia-Gray, J., Kimmel, A.R. & Londos, C. (2000) Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J Biol Chem* 275(49), 38486-93.
24. Bruning, J.C., Gautam, D., Burks, D.J., Gillette, J., Schubert, M., Orban, P.C., Klein, R., Krone, W., Muller-Wieland, D. & Kahn, C.R. (2000) Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289(5487), 2122-5.

25. Bruun, J.M., Lihn, A.S., Pedersen, S.B. & Richelsen, B. (2005) Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT. *J Clin Endocrinol Metab* 90(4), 2282-9.
26. Burgermeister, E. & Seger, R. (2007) MAPK kinases as nucleo-cytoplasmic shuttles for PPARgamma. *Cell Cycle* 6(13), 1539-48.
27. Calder, P.C. (2006) n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* 83(6 Suppl), 1505S-1519S.
28. Carey, A.L., Steinberg, G.R., Macaulay, S.L., Thomas, W.G., Holmes, A.G., Ramm, G., Prelovsek, O., Hohnen-Behrens, C., Watt, M.J., James, D.E., Kemp, B.E., Pedersen, B.K. & Febbraio, M.A. (2006) Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. *Diabetes* 55(10), 2688-97.
29. Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N. & Williamson, B. (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(9), 3666-70.
30. Chang-Chen, K.J., Mullur, R. & Bernal-Mizrachi, E. (2008) Beta-cell failure as a complication of diabetes. *Rev Endocr Metab Disord* 9(4), 329-43.
31. Chawla, A., Schwarz, E.J., Dimaculangan, D.D. & Lazar, M.A. (1994) Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology* 135(2), 798-800.
32. Cheung, C.C., Clifton, D.K. & Steiner, R.A. (1997) Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* 138(10), 4489-92.
33. Chiang, S.H., Baumann, C.A., Kanzaki, M., Thurmond, D.C., Watson, R.T., Neudauer, C.L., Macara, I.G., Pessin, J.E. & Saltiel, A.R. (2001) Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature* 410(6831), 944-8.
34. Chiasson, J.L., Josse, R.G., Gomis, R., Hanefeld, M., Karasik, A. & Laakso, M. (2002) Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. *Lancet* 359(9323), 2072-7.
35. Chung, C.D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P. & Shuai, K. (1997) Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 278(5344), 1803-5.
36. Coe, N.R. & Bernlohr, D.A. (1998) Physiological properties and functions of intracellular fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1391(3), 287-306.

37. Coe, N.R., Simpson, M.A. & Bernlohr, D.A. (1999) Targeted disruption of the adipocyte lipid-binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty acid levels. *J Lipid Res* 40(5), 967-72.
38. Cohen, A.W., Razani, B., Schubert, W., Williams, T.M., Wang, X.B., Iyengar, P., Brasaemle, D.L., Scherer, P.E. & Lisanti, M.P. (2004) Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation. *Diabetes* 53(5), 1261-70.
39. Cohen, A.W., Razani, B., Wang, X.B., Combs, T.P., Williams, T.M., Scherer, P.E. & Lisanti, M.P. (2003) Caveolin-1-deficient mice show insulin resistance and defective insulin receptor protein expression in adipose tissue. *Am J Physiol Cell Physiol* 285(1), C222-35.
40. Considine, R.V., Sinha, M.K., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Marco, C.C., McKee, L.J., Bauer, T.L. & et al. (1996) Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334(5), 292-5.
41. Couet, J., Li, S., Okamoto, T., Ikezu, T. & Lisanti, M.P. (1997a) Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J Biol Chem* 272(10), 6525-33.
42. Couet, J., Sargiacomo, M. & Lisanti, M.P. (1997b) Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. *J Biol Chem* 272(48), 30429-38.
43. Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M. & Hemmings, B.A. (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378(6559), 785-9.
44. Crowe, S., Turpin, S.M., Ke, F., Kemp, B.E. & Watt, M.J. (2008) Metabolic remodeling in adipocytes promotes ciliary neurotrophic factor-mediated fat loss in obesity. *Endocrinology* 149(5), 2546-56.
45. Cusi, K., Maezono, K., Osman, A., Pendergrass, M., Patti, M.E., Pratipanawatr, T., DeFronzo, R.A., Kahn, C.R. & Mandarino, L.J. (2000) Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest* 105(3), 311-20.
46. Davis, S., Aldrich, T.H., Stahl, N., Pan, L., Taga, T., Kishimoto, T., Ip, N.Y. & Yancopoulos, G.D. (1993) LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. *Science* 260(5115), 1805-8.
47. Davis, S., Aldrich, T.H., Valenzuela, D.M., Wong, V.V., Furth, M.E., Squinto, S.P. & Yancopoulos, G.D. (1991) The receptor for ciliary neurotrophic factor. *Science* 253(5015), 59-63.

48. de Souza, C.J., Eckhardt, M., Gagen, K., Dong, M., Chen, W., Laurent, D. & Burkey, B.F. (2001) Effects of pioglitazone on adipose tissue remodeling within the setting of obesity and insulin resistance. *Diabetes* 50(8), 1863-71.
49. Derouet, D., Rousseau, F., Alfonsi, F., Froger, J., Hermann, J., Barbier, F., Perret, D., Diveu, C., Guillet, C., Preisser, L., Dumont, A., Barbado, M., Morel, A., deLapeyriere, O., Gascan, H. & Chevalier, S. (2004) Neuropeptin, a new IL-6-related cytokine signaling through the ciliary neurotrophic factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(14), 4827-32.
50. Despres, J.P., Lemieux, I. & Prud'homme, D. (2001) Treatment of obesity: need to focus on high risk abdominally obese patients. *Bmj* 322(7288), 716-20.
51. Edvardsson, U., Ljungberg, A. & Oscarsson, J. (2006) Insulin and oleic acid increase PPARgamma2 expression in cultured mouse hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 340(1), 111-7.
52. Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A.L., Normandin, D., Cheng, A., Himms-Hagen, J., Chan, C.C., Ramachandran, C., Gresser, M.J., Tremblay, M.L. & Kennedy, B.P. (1999) Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 283(5407), 1544-8.
53. Emanuelli, B., Peraldi, P., Filloux, C., Chavey, C., Freidinger, K., Hilton, D.J., Hotamisligil, G.S. & Van Obberghen, E. (2001) SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor-alpha in the adipose tissue of obese mice. *J Biol Chem* 276(51), 47944-9.
54. Emanuelli, B., Peraldi, P., Filloux, C., Sawka-Verhelle, D., Hilton, D. & Van Obberghen, E. (2000) SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. *J Biol Chem* 275(21), 15985-91.
55. Engelman, J.A., Zhang, X.L., Razani, B., Pestell, R.G. & Lisanti, M.P. (1999) p42/44 MAP kinase-dependent and -independent signaling pathways regulate caveolin-1 gene expression. Activation of Ras-MAP kinase and protein kinase A signaling cascades transcriptionally down-regulates caveolin-1 promoter activity. *J Biol Chem* 274(45), 32333-41.
56. Escher, P., Braissant, O., Basu-Modak, S., Michalik, L., Wahli, W. & Desvergne, B. (2001) Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. *Endocrinology* 142(10), 4195-202.
57. Fasnacht, N. & Muller, W. (2008) Conditional gp130 deficient mouse mutants. *Semin Cell Dev Biol* 19(4), 379-84.
58. Febbraio, M.A. & Pedersen, B.K. (2005) Contraction-induced myokine production and release: is skeletal muscle an endocrine organ? *Exerc Sport Sci Rev* 33(3), 114-9.

59. Feige, J.N., Gelman, L., Tudor, C., Engelborghs, Y., Wahli, W. & Desvergne, B. (2005) Fluorescence imaging reveals the nuclear behavior of peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor heterodimers in the absence and presence of ligand. *J Biol Chem* 280(18), 17880-90.
60. Flachs, P., Mohamed-Ali, V., Horakova, O., Rossmeisl, M., Hosseinzadeh-Attar, M.J., Hensler, M., Ruzickova, J. & Kopecky, J. (2006) Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia* 49(2), 394-7.
61. Flier, J.S. (2004) Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 116(2), 337-50.
62. Fontana, L., Eagon, J.C., Trujillo, M.E., Scherer, P.E. & Klein, S. (2007) Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes* 56(4), 1010-3.
63. Franck, N., Stenkula, K.G., Ost, A., Lindstrom, T., Stralfors, P. & Nystrom, F.H. (2007) Insulin-induced GLUT4 translocation to the plasma membrane is blunted in large compared with small primary fat cells isolated from the same individual. *Diabetologia* 50(8), 1716-22.
64. Freed, M.I., Ratner, R., Marcovina, S.M., Kreider, M.M., Biswas, N., Cohen, B.R. & Brunzell, J.D. (2002) Effects of rosiglitazone alone and in combination with atorvastatin on the metabolic abnormalities in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 90(9), 947-52.
65. Fu, M., Sun, T., Bookout, A.L., Downes, M., Yu, R.T., Evans, R.M. & Mangelsdorf, D.J. (2005) A Nuclear Receptor Atlas: 3T3-L1 adipogenesis. *Mol Endocrinol* 19(10), 2437-50.
66. Fu, Y., Luo, L., Luo, N. & Garvey, W.T. (2006) Proinflammatory cytokine production and insulin sensitivity regulated by overexpression of resistin in 3T3-L1 adipocytes. *Nutr Metab (Lond)* 3, 28.
67. Fujimoto, T., Kogo, H., Ishiguro, K., Tauchi, K. & Nomura, R. (2001) Caveolin-2 is targeted to lipid droplets, a new "membrane domain" in the cell. *J Cell Biol* 152(5), 1079-85.
68. Gearing, D.P., Comeau, M.R., Friend, D.J., Gimpel, S.D., Thut, C.J., McGourty, J., Brasher, K.K., King, J.A., Gillis, S., Mosley, B. & et al. (1992) The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science* 255(5050), 1434-7.
69. Gearing, D.P., Ziegler, S.F., Comeau, M.R., Friend, D., Thoma, B., Cosman, D., Park, L. & Mosley, B. (1994) Proliferative responses and binding properties of hematopoietic cells transfected with low-affinity receptors for leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(3), 1119-23.

70. Gerhartz, C., Heesel, B., Sasse, J., Hemmann, U., Landgraf, C., Schneider-Mergener, J., Horn, F., Heinrich, P.C. & Graeve, L. (1996) Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. *J Biol Chem* 271(22), 12991-8.
71. Glund, S. & Krook, A. (2008) Role of interleukin-6 signalling in glucose and lipid metabolism. *Acta Physiol (Oxf)* 192(1), 37-48.
72. Goldstein, M.S. & Levine, R. (1955) Neuroendocrine relationships. *Prog Neurol Psychiatry* 10, 273-8.
73. Gong, H., Ni, Y., Guo, X., Fei, L., Pan, X., Guo, M. & Chen, R. (2004) Resistin promotes 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Eur J Endocrinol* 150(6), 885-92.
74. Goriya, Y., Suzuki, T., Takizawa, S. & Natto, M. (2000) Follow-up of elderly diabetics with or without hypertension and hyperlipidemia. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 19(1-2), 159-65.
75. Granato, D., Blum, S., Rossle, C., Le Boucher, J., Malnoe, A. & Dutot, G. (2000) Effects of parenteral lipid emulsions with different fatty acid composition on immune cell functions in vitro. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 24(2), 113-8.
76. Green, H. & Kehinde, O. (1975) An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 5(1), 19-27.
77. Green, H. & Meuth, M. (1974) An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* 3(2), 127-33.
78. Gregoire, F.M., Smas, C.M. & Sul, H.S. (1998) Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78(3), 783-809.
79. Griffin, M.E., Marcucci, M.J., Cline, G.W., Bell, K., Barucci, N., Lee, D., Goodyear, L.J., Kraegen, E.W., White, M.F. & Shulman, G.I. (1999) Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 48(6), 1270-4.
80. Guan, H.P., Ishizuka, T., Chui, P.C., Lehrke, M. & Lazar, M.A. (2005) Corepressors selectively control the transcriptional activity of PPARgamma in adipocytes. *Genes Dev* 19(4), 453-61.
81. Guilherme, A., Emoto, M., Buxton, J.M., Bose, S., Sabini, R., Theurkauf, W.E., Leszyk, J. & Czech, M.P. (2000) Perinuclear localization and insulin responsiveness of GLUT4 requires cytoskeletal integrity in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 275(49), 38151-9.

82. Gustavsson, J., Parpal, S., Karlsson, M., Ramsing, C., Thorn, H., Borg, M., Lindroth, M., Peterson, K.H., Magnusson, K.E. & Stralfors, P. (1999) Localization of the insulin receptor in caveolae of adipocyte plasma membrane. *Faseb J* 13(14), 1961-71.
83. Hajer, G.R., van Haefen, T.W. & Visseren, F.L. (2008) Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J* 29(24), 2959-71.
84. Haugen, F., Zahid, N., Dalen, K.T., Hollung, K., Nebb, H.I. & Drevon, C.A. (2005) Resistin expression in 3T3-L1 adipocytes is reduced by arachidonic acid. *J Lipid Res* 46(1), 143-53.
85. Heidenreich, K.A. (1993) Insulin and IGF-I receptor signaling in cultured neurons. *Ann N Y Acad Sci* 692, 72-88.
86. Heinrich, P.C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F. & Graeve, L. (1998) Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334 (Pt 2), 297-314.
87. Helgren, M.E., Squinto, S.P., Davis, H.L., Parry, D.J., Boulton, T.G., Heck, C.S., Zhu, Y., Yancopoulos, G.D., Lindsay, R.M. & DiStefano, P.S. (1994) Trophic effect of ciliary neurotrophic factor on denervated skeletal muscle. *Cell* 76(3), 493-504.
88. Hertzfel, A.V., Bennaars-Eiden, A. & Bernlohr, D.A. (2002) Increased lipolysis in transgenic animals overexpressing the epithelial fatty acid binding protein in adipose cells. *J Lipid Res* 43(12), 2105-11.
89. Howard, J.K., Cave, B.J., Oksanen, L.J., Tzamelis, I., Bjorbaek, C. & Flier, J.S. (2004) Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of *Socs3*. *Nat Med* 10(7), 734-8.
90. Hube, F., Lee, Y.M., Rohrig, K. & Hauner, H. (1999) The phosphodiesterase inhibitor IBMX suppresses TNF- α expression in human adipocyte precursor cells: a possible explanation for its adipogenic effect. *Horm Metab Res* 31(6), 359-62.
91. Imai, T., Takakuwa, R., Marchand, S., Dentz, E., Bornert, J.M., Messaddeq, N., Wendling, O., Mark, M., Desvergne, B., Wahli, W., Chambon, P. & Metzger, D. (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor γ is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(13), 4543-7.
92. Inokuchi, J. (2007) Insulin resistance as a membrane microdomain disorder. *Yakugaku Zasshi* 127(4), 579-86.
93. Janke, J., Engeli, S., Gorzelniak, K., Luft, F.C. & Sharma, A.M. (2002) Resistin gene expression in human adipocytes is not related to insulin resistance. *Obes Res* 10(1), 1-5.

94. Jung, C.Y. (1998) Proteins that interact with facilitative glucose transporters: implication for function. *Exp Physiol* 83(2), 267-73.
95. Jung, S.H., Park, H.S., Kim, K.S., Choi, W.H., Ahn, C.W., Kim, B.T., Kim, S.M., Lee, S.Y., Ahn, S.M., Kim, Y.K., Kim, H.J., Kim, D.J. & Lee, K.W. (2008) Effect of weight loss on some serum cytokines in human obesity: increase in IL-10 after weight loss. *J Nutr Biochem* 19(6), 371-5.
96. Kabayama, K., Sato, T., Saito, K., Loberto, N., Prinetti, A., Sonnino, S., Kinjo, M., Igarashi, Y. & Inokuchi, J. (2007) Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(34), 13678-83.
97. Kadowaki, T. & Yamauchi, T. (2005) Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 26(3), 439-51.
98. Kampf, J.P., Parmley, D. & Kleinfeld, A.M. (2007) Free fatty acid transport across adipocytes is mediated by an unknown membrane protein pump. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293(5), E1207-14.
99. Kang, K., Liu, W., Albright, K.J., Park, Y. & Pariza, M.W. (2003) trans-10,cis-12 CLA inhibits differentiation of 3T3-L1 adipocytes and decreases PPAR gamma expression. *Biochem Biophys Res Commun* 303(3), 795-9.
100. Kappes, A. & Loffler, G. (2000) 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(11-12), 548-54.
101. Karlsson, M., Thorn, H., Parpal, S., Stralfors, P. & Gustavsson, J. (2002) Insulin induces translocation of glucose transporter GLUT4 to plasma membrane caveolae in adipocytes. *Faseb J* 16(2), 249-51.
102. Kashyap, S.R. & Defronzo, R.A. (2007) The insulin resistance syndrome: physiological considerations. *Diab Vasc Dis Res* 4(1), 13-9.
103. Keck, M.K. (2009) Einfluss verschiedener Ölemulsionen auf die Assoziation von Signalproteinen mit Detergenz-resistenten Membrandomänen. In *Institute of Biological Chemistry and Nutrition, University of Hohenheim, Stuttgart, Germany*.
104. Kelly, J.F., Elias, C.F., Lee, C.E., Ahima, R.S., Seeley, R.J., Bjorbaek, C., Oka, T., Saper, C.B., Flier, J.S. & Elmquist, J.K. (2004) Ciliary neurotrophic factor and leptin induce distinct patterns of immediate early gene expression in the brain. *Diabetes* 53(4), 911-20.
105. Kennedy, A., Martinez, K., Chuang, C.C., LaPoint, K. & McIntosh, M. (2009) Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. *J Nutr* 139(1), 1-4.

106. Kern, P.A., Ranganathan, S., Li, C., Wood, L. & Ranganathan, G. (2001) Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280(5), E745-51.
107. Kim, K.H., Lee, K., Moon, Y.S. & Sul, H.S. (2001) A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 276(14), 11252-6.
108. Kliewer, S.A., Lenhard, J.M., Willson, T.M., Patel, I., Morris, D.C. & Lehmann, J.M. (1995) A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 83(5), 813-9.
109. Kliewer, S.A., Sundseth, S.S., Jones, S.A., Brown, P.J., Wisely, G.B., Koble, C.S., Devchand, P., Wahli, W., Willson, T.M., Lenhard, J.M. & Lehmann, J.M. (1997) Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(9), 4318-23.
110. Kliewer, S.A., Umesono, K., Noonan, D.J., Heyman, R.A. & Evans, R.M. (1992) Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 358(6389), 771-4.
111. Knowler, W.C., Barrett-Connor, E., Fowler, S.E., Hamman, R.F., Lachin, J.M., Walker, E.A. & Nathan, D.M. (2002) Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 346(6), 393-403.
112. Kokoeva, M.V., Yin, H. & Flier, J.S. (2005) Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* 310(5748), 679-83.
113. Krey, G., Braissant, O., L'Horsset, F., Kalkhoven, E., Perroud, M., Parker, M.G. & Wahli, W. (1997) Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol* 11(6), 779-91.
114. Kris-Etherton, P.M. (1999) AHA Science Advisory. Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease. American Heart Association. Nutrition Committee. *Circulation* 100(11), 1253-8.
115. Kuboki, K., Jiang, Z.Y., Takahara, N., Ha, S.W., Igarashi, M., Yamauchi, T., Feener, E.P., Herbert, T.P., Rhodes, C.J. & King, G.L. (2000) Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin. *Circulation* 101(6), 676-81.

116. Kubota, N., Terauchi, Y., Miki, H., Tamemoto, H., Yamauchi, T., Komeda, K., Satoh, S., Nakano, R., Ishii, C., Sugiyama, T., Eto, K., Tsubamoto, Y., Okuno, A., Murakami, K., Sekihara, H., Hasegawa, G., Naito, M., Toyoshima, Y., Tanaka, S., Shiota, K., Kitamura, T., Fujita, T., Ezaki, O., Aizawa, S., Kadowaki, T. & et al. (1999) PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 4(4), 597-609.
117. Lachaal, M., Rampal, A.L., Lee, W., Shi, Y. & Jung, C.Y. (1996) GLUT1 transmembrane glucose pathway. Affinity labeling with a transportable D-glucose diazirine. *J Biol Chem* 271(9), 5225-30.
118. Larsen, L. & Ropke, C. (2002) Suppressors of cytokine signalling: SOCS. *Apmis* 110(12), 833-44.
119. Larsen, T.M., Toubro, S. & Astrup, A. (2003) PPARgamma agonists in the treatment of type II diabetes: is increased fatness commensurate with long-term efficacy? *Int J Obes Relat Metab Disord* 27(2), 147-61.
120. Lazar, D.F., Wiese, R.J., Brady, M.J., Mastick, C.C., Waters, S.B., Yamauchi, K., Pessin, J.E., Cuatrecasas, P. & Saltiel, A.R. (1995) Mitogen-activated protein kinase kinase inhibition does not block the stimulation of glucose utilization by insulin. *J Biol Chem* 270(35), 20801-7.
121. Le Lay, S., C, M.B., Hajduch, E. & Dugail, I. (2008) Filling up adipocytes with lipids. Lessons from caveolin-1 deficiency. *Biochim Biophys Acta*.
122. Le Lay, S., Hajduch, E., Lindsay, M.R., Le Liepvre, X., Thiele, C., Ferre, P., Parton, R.G., Kurzchalia, T., Simons, K. & Dugail, I. (2006) Cholesterol-induced caveolin targeting to lipid droplets in adipocytes: a role for caveolar endocytosis. *Traffic* 7(5), 549-61.
123. Lebrun, P. & Van Obberghen, E. (2008) SOCS proteins causing trouble in insulin action. *Acta Physiol (Oxf)* 192(1), 29-36.
124. Lee, J.Y., Sohn, K.H., Rhee, S.H. & Hwang, D. (2001) Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 276(20), 16683-9.
125. Lefebvre, P., Chinetti, G., Fruchart, J.C. & Staels, B. (2006) Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest* 116(3), 571-80.
126. Li, Y., Totsune, K., Takeda, K., Furuyama, K., Shibahara, S. & Takahashi, K. (2003) Differential expression of adrenomedullin and resistin in 3T3-L1 adipocytes treated with tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Endocrinol* 149(3), 231-8.
127. Liao, W., Nguyen, M.T., Yoshizaki, T., Favelyukis, S., Patsouris, D., Imamura, T., Verma, I.M. & Olefsky, J.M. (2007) Suppression of PPAR-gamma attenuates insulin-stimulated glucose uptake by affecting both GLUT1 and GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293(1), E219-27.

128. Lietzke, S.E., Bose, S., Cronin, T., Klarlund, J., Chawla, A., Czech, M.P. & Lambright, D.G. (2000) Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. *Mol Cell* 6(2), 385-94.
129. Lin, T.A. & Lawrence, J.C., Jr. (1997) Control of PHAS-I phosphorylation in 3T3-L1 adipocytes: effects of inhibiting protein phosphatases and the p70S6K signaling pathway. *Diabetologia* 40 Suppl 2, S18-24.
130. Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S.A., Chung, C.D., Chang, D.D. & Shuai, K. (1998) Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(18), 10626-31.
131. Liu, Q.S., Wang, Q.J., Du, G.H., Zhu, S.Y., Gao, M., Zhang, L., Zhu, J.M. & Cao, J.F. (2007) Recombinant human ciliary neurotrophic factor reduces weight partly by regulating nuclear respiratory factor 1 and mitochondrial transcription factor A. *Eur J Pharmacol* 563(1-3), 77-82.
132. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1), 265-75.
133. Lundgren, M. & Eriksson, J.W. (2004) No in vitro effects of fatty acids on glucose uptake, lipolysis or insulin signaling in rat adipocytes. *Horm Metab Res* 36(4), 203-9.
134. Maassen, J.A., Romijn, J.A. & Heine, R.J. (2007) Fatty acid-induced mitochondrial uncoupling in adipocytes as a key protective factor against insulin resistance and beta cell dysfunction: a new concept in the pathogenesis of obesity-associated type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 50(10), 2036-41.
135. Madigan, C., Ryan, M., Owens, D., Collins, P. & Tomkin, G.H. (2000) Dietary unsaturated fatty acids in type 2 diabetes: higher levels of postprandial lipoprotein on a linoleic acid-rich sunflower oil diet compared with an oleic acid-rich olive oil diet. *Diabetes Care* 23(10), 1472-7.
136. Mandard, S., Muller, M. & Kersten, S. (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *Cell Mol Life Sci* 61(4), 393-416.
137. Marshall, M.K., Doerrler, W., Feingold, K.R. & Grunfeld, C. (1994) Leukemia inhibitory factor induces changes in lipid metabolism in cultured adipocytes. *Endocrinology* 135(1), 141-7.
138. Marx, J. (2005) Molecular biology. P-bodies mark the spot for controlling protein production. *Science* 310(5749), 764-5.
139. Matthews, V.B. & Febbraio, M.A. (2008) CNTF: a target therapeutic for obesity-related metabolic disease? *J Mol Med* 86(4), 353-61.

140. McNeel, R.L., Smith, E.O. & Mersmann, H.J. (2003) Isomers of conjugated linoleic acid modulate human preadipocyte differentiation. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 39(8-9), 375-82.
141. Metcalf, D. (1991) The leukemia inhibitory factor (LIF). *Int J Cell Cloning* 9(2), 95-108.
142. Metcalf, D. (2003) The unsolved enigmas of leukemia inhibitory factor. *Stem Cells* 21(1), 5-14.
143. Metcalf, D. & Gearing, D.P. (1989) Fatal syndrome in mice engrafted with cells producing high levels of the leukemia inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(15), 5948-52.
144. Michalik, L., Auwerx, J., Berger, J.P., Chatterjee, V.K., Glass, C.K., Gonzalez, F.J., Grimaldi, P.A., Kadowaki, T., Lazar, M.A., O'Rahilly, S., Palmer, C.N., Plutzky, J., Reddy, J.K., Spiegelman, B.M., Staels, B. & Wahli, W. (2006) International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev* 58(4), 726-41.
145. Misra, A. & Garg, A. (2003) Clinical features and metabolic derangements in acquired generalized lipodystrophy: case reports and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 82(2), 129-46.
146. Monville, C., Couplier, M., Conti, L., De-Fraja, C., Dreyfus, P., Fages, C., Riche, D., Tardy, M., Cattaneo, E. & Peschanski, M. (2001) Ciliary neurotrophic factor may activate mature astrocytes via binding with the leukemia inhibitory factor receptor. *Mol Cell Neurosci* 17(2), 373-84.
147. Mooney, R.A., Senn, J., Cameron, S., Inamdar, N., Boivin, L.M., Shang, Y. & Furlanetto, R.W. (2001) Suppressors of cytokine signaling-1 and -6 associate with and inhibit the insulin receptor. A potential mechanism for cytokine-mediated insulin resistance. *J Biol Chem* 276(28), 25889-93.
148. Mori, H., Hanada, R., Hanada, T., Aki, D., Mashima, R., Nishinakamura, H., Torisu, T., Chien, K.R., Yasukawa, H. & Yoshimura, A. (2004) Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity. *Nat Med* 10(7), 739-43.
149. Mori, M., Yamaguchi, K. & Abe, K. (1989) Purification of a lipoprotein lipase-inhibiting protein produced by a melanoma cell line associated with cancer cachexia. *Biochem Biophys Res Commun* 160(3), 1085-92.
150. Murakami, M., Hibi, M., Nakagawa, N., Nakagawa, T., Yasukawa, K., Yamaniishi, K., Taga, T. & Kishimoto, T. (1993) IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science* 260(5115), 1808-10.

151. Murata, M., Peranen, J., Schreiner, R., Wieland, F., Kurzchalia, T.V. & Simons, K. (1995) VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(22), 10339-43.
152. Myers, M.G., Jr., Backer, J.M., Sun, X.J., Shoelson, S., Hu, P., Schlessinger, J., Yoakim, M., Schaffhausen, B. & White, M.F. (1992) IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(21), 10350-4.
153. Niu, S.L. & Litman, B.J. (2002) Determination of membrane cholesterol partition coefficient using a lipid vesicle-cyclodextrin binary system: effect of phospholipid acyl chain unsaturation and headgroup composition. *Biophys J* 83(6), 3408-15.
154. Okada, T., Kawano, Y., Sakakibara, T., Hazeki, O. & Ui, M. (1994) Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor wortmannin. *J Biol Chem* 269(5), 3568-73.
155. Oku, H., Wongtangtharn, S., Iwasaki, H. & Toda, T. (2003) Conjugated linoleic acid (CLA) inhibits fatty acid synthetase activity in vitro. *Biosci Biotechnol Biochem* 67(7), 1584-6.
156. Orci, L., Cook, W.S., Ravazzola, M., Wang, M.Y., Park, B.H., Montesano, R. & Unger, R.H. (2004) Rapid transformation of white adipocytes into fat-oxidizing machines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(7), 2058-63.
157. Ost, A., Ortegren, U., Gustavsson, J., Nystrom, F.H. & Stralfors, P. (2005) Triacylglycerol is synthesized in a specific subclass of caveolae in primary adipocytes. *J Biol Chem* 280(1), 5-8.
158. Ostermeyer, A.G., Paci, J.M., Zeng, Y., Lublin, D.M., Munro, S. & Brown, D.A. (2001) Accumulation of caveolin in the endoplasmic reticulum redirects the protein to lipid storage droplets. *J Cell Biol* 152(5), 1071-8.
159. Otto, T.C. & Lane, M.D. (2005) Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 40(4), 229-42.
160. Park, C.R. & Johnson, L.H. (1955) Effect of insulin on transport of glucose and galactose into cells of rat muscle and brain. *Am J Physiol* 182(1), 17-23.
161. Path, G., Bornstein, S.R., Gurniak, M., Chrousos, G.P., Scherbaum, W.A. & Hauner, H. (2001) Human breast adipocytes express interleukin-6 (IL-6) and its receptor system: increased IL-6 production by beta-adrenergic activation and effects of IL-6 on adipocyte function. *J Clin Endocrinol Metab* 86(5), 2281-8.
162. Patti, M.E. & Kahn, C.R. (1998) The insulin receptor--a critical link in glucose homeostasis and insulin action. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 9(2-4), 89-109.
163. Pessin, J.E. & Saltiel, A.R. (2000) Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest* 106(2), 165-9.

164. Pessin, J.E., Thurmond, D.C., Elmendorf, J.S., Coker, K.J. & Okada, S. (1999) Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking. Location! Location! Location! *J Biol Chem* 274(5), 2593-6.
165. Pol, A., Luetterforst, R., Lindsay, M., Heino, S., Ikonen, E. & Parton, R.G. (2001) A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance. *J Cell Biol* 152(5), 1057-70.
166. Prima, V., Tennant, M., Gorbatyuk, O.S., Muzyczka, N., Scarpace, P.J. & Zolotukhin, S. (2004) Differential modulation of energy balance by leptin, ciliary neurotrophic factor, and leukemia inhibitory factor gene delivery: microarray deoxyribonucleic acid-chip analysis of gene expression. *Endocrinology* 145(4), 2035-45.
167. Prusty, D., Park, B.H., Davis, K.E. & Farmer, S.R. (2002) Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and C/EBPalpha gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem* 277(48), 46226-32.
168. Razani, B., Combs, T.P., Wang, X.B., Frank, P.G., Park, D.S., Russell, R.G., Li, M., Tang, B., Jelicks, L.A., Scherer, P.E. & Lisanti, M.P. (2002) Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. *J Biol Chem* 277(10), 8635-47.
169. Razani, B., Rubin, C.S. & Lisanti, M.P. (1999) Regulation of cAMP-mediated signal transduction via interaction of caveolins with the catalytic subunit of protein kinase A. *J Biol Chem* 274(37), 26353-60.
170. Rega, G., Kaun, C., Demyanets, S., Pfaffenberger, S., Rychli, K., Hohensinner, P.J., Kastl, S.P., Speidl, W.S., Weiss, T.W., Breuss, J.M., Furnkranz, A., Uhrin, P., Zaujec, J., Zilberfarb, V., Frey, M., Roehle, R., Maurer, G., Huber, K. & Wojta, J. (2007) Vascular endothelial growth factor is induced by the inflammatory cytokines interleukin-6 and oncostatin m in human adipose tissue in vitro and in murine adipose tissue in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(7), 1587-95.
171. Ribon, V., Herrera, R., Kay, B.K. & Saltiel, A.R. (1998a) A role for CAP, a novel, multifunctional Src homology 3 domain-containing protein in formation of actin stress fibers and focal adhesions. *J Biol Chem* 273(7), 4073-80.
172. Ribon, V., Johnson, J.H., Camp, H.S. & Saltiel, A.R. (1998b) Thiazolidinediones and insulin resistance: peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation stimulates expression of the CAP gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(25), 14751-6.
173. Ribon, V. & Saltiel, A.R. (1997) Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-Cbl in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J* 324 (Pt 3), 839-45.

174. Ricote, M., Li, A.C., Willson, T.M., Kelly, C.J. & Glass, C.K. (1998) The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391(6662), 79-82.
175. Ring, A., Le Lay, S., Pohl, J., Verkade, P. & Stremmel, W. (2006) Caveolin-1 is required for fatty acid translocase (FAT/CD36) localization and function at the plasma membrane of mouse embryonic fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1761(4), 416-23.
176. Robinson, L.J., Leitner, W., Draznin, B. & Heidenreich, K.A. (1994) Evidence that p21ras mediates the neurotrophic effects of insulin and insulin-like growth factor I in chick forebrain neurons. *Endocrinology* 135(6), 2568-73.
177. Ros, E. (2003) Dietary cis-monounsaturated fatty acids and metabolic control in type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 78(3 Suppl), 617S-625S.
178. Rosen, E.D. & Spiegelman, B.M. (2001) PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem* 276(41), 37731-4.
179. Rosenbaum, S.E. & Greenberg, A.S. (1998) The short- and long-term effects of tumor necrosis factor-alpha and BRL 49653 on peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)gamma2 gene expression and other adipocyte genes. *Mol Endocrinol* 12(8), 1150-60.
180. Ross, S.R., Graves, R.A., Greenstein, A., Platt, K.A., Shyu, H.L., Mellovitz, B. & Spiegelman, B.M. (1990) A fat-specific enhancer is the primary determinant of gene expression for adipocyte P2 in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(24), 9590-4.
181. Rothberg, K.G., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.S., Glenney, J.R. & Anderson, R.G. (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68(4), 673-82.
182. Rotter, V., Nagaev, I. & Smith, U. (2003) 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(46), 45777-84.
183. Ruan, H., Hacoen, N., Golub, T.R., Van Parijs, L. & Lodish, H.F. (2002) Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory. *Diabetes* 51(5), 1319-36.
184. Rubin, C.S., Hirsch, A., Fung, C. & Rosen, O.M. (1978) Development of hormone receptors and hormonal responsiveness in vitro. Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* 253(20), 7570-8.
185. Ryder, J.W., Gilbert, M. & Zierath, J.R. (2001) Skeletal muscle and insulin sensitivity: pathophysiological alterations. *Front Biosci* 6, D154-63.

186. Saltiel, A.R. & Kahn, C.R. (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414(6865), 799-806.
187. Sanger, F. & Thompson, E.O. (1952) The amino-acid sequence in the glyceryl chain of insulin. *Biochem J* 52(1), iii.
188. Sanger, F. & Thompson, E.O. (1953a) The amino-acid sequence in the glyceryl chain of insulin. I. The identification of lower peptides from partial hydrolysates. *Biochem J* 53(3), 353-66.
189. Sanger, F. & Thompson, E.O. (1953b) The amino-acid sequence in the glyceryl chain of insulin. II. The investigation of peptides from enzymic hydrolysates. *Biochem J* 53(3), 366-74.
190. Sanger, F. & Tuppy, H. (1951a) The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin. 2. The investigation of peptides from enzymic hydrolysates. *Biochem J* 49(4), 481-90.
191. Sanger, F. & Tuppy, H. (1951b) The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin. I. The identification of lower peptides from partial hydrolysates. *Biochem J* 49(4), 463-81.
192. Satory, D.L. & Smith, S.B. (1999) Conjugated linoleic acid inhibits proliferation but stimulates lipid filling of murine 3T3-L1 preadipocytes. *J Nutr* 129(1), 92-7.
193. Scheepers, A., Joost, H.G. & Schurmann, A. (2004) The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 28(5), 364-71.
194. Scherer, P.E., Lewis, R.Y., Volonte, D., Engelman, J.A., Galbiati, F., Couet, J., Kohtz, D.S., van Donselaar, E., Peters, P. & Lisanti, M.P. (1997) Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J Biol Chem* 272(46), 29337-46.
195. Scherer, P.E., Lisanti, M.P., Baldini, G., Sargiacomo, M., Mastick, C.C. & Lodish, H.F. (1994) Induction of caveolin during adipogenesis and association of GLUT4 with caveolin-rich vesicles. *J Cell Biol* 127(5), 1233-43.
196. Scherer, P.E., Tang, Z., Chun, M., Sargiacomo, M., Lodish, H.F. & Lisanti, M.P. (1995a) Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and sub-cellular distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. *J Biol Chem* 270(27), 16395-401.
197. Scherer, P.E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G. & Lodish, H.F. (1995b) A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 270(45), 26746-9.

198. Schiemann, W.P., Bartoe, J.L. & Nathanson, N.M. (1997) Box 3-independent signaling mechanisms are involved in leukemia inhibitory factor receptor alpha- and gp130-mediated stimulation of mitogen-activated protein kinase. Evidence for participation of multiple signaling pathways which converge at Ras. *J Biol Chem* 272(26), 16631-6.
199. Schindler, R., Mancilla, J., Endres, S., Ghorbani, R., Clark, S.C. & Dinarello, C.A. (1990) Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* 75(1), 40-7.
200. Schoonjans, K., Peinado-Onsurbe, J., Lefebvre, A.M., Heyman, R.A., Briggs, M., Deeb, S., Staels, B. & Auwerx, J. (1996) PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *Embo J* 15(19), 5336-48.
201. Schubert, M., Gautam, D., Surjo, D., Ueki, K., Baudler, S., Schubert, D., Kondo, T., Alber, J., Galldiks, N., Kustermann, E., Arndt, S., Jacobs, A.H., Krone, W., Kahn, C.R. & Bruning, J.C. (2004) Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(9), 3100-5.
202. Schuster, B., Kovaleva, M., Sun, Y., Regenhard, P., Matthews, V., Grotzinger, J., Rose-John, S. & Kallen, K.J. (2003) Signaling of human ciliary neurotrophic factor (CNTF) revisited. The interleukin-6 receptor can serve as an alpha-receptor for CTNF. *J Biol Chem* 278(11), 9528-35.
203. Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Jr., Seeley, R.J. & Baskin, D.G. (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* 404(6778), 661-71.
204. Sears, I.B., MacGinnitie, M.A., Kovacs, L.G. & Graves, R.A. (1996) Differentiation-dependent expression of the brown adipocyte uncoupling protein gene: regulation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol Cell Biol* 16(7), 3410-9.
205. Shen, W.J., Sridhar, K., Bernlohr, D.A. & Kraemer, F.B. (1999) Interaction of rat hormone-sensitive lipase with adipocyte lipid-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(10), 5528-32.
206. Shepherd, P.R., Nave, B.T. & Siddle, K. (1995) Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase. *Biochem J* 305 (Pt 1), 25-8.
207. Shimomura, I., Shimano, H., Korn, B.S., Bashmakov, Y. & Horton, J.D. (1998) Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver. *J Biol Chem* 273(52), 35299-306.

208. Skurk, T., Alberti-Huber, C., Herder, C. & Hauner, H. (2007) Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 92(3), 1023-33.
209. Souza, S.C., Palmer, H.J., Kang, Y.H., Yamamoto, M.T., Muliro, K.V., Paulson, K.E. & Greenberg, A.S. (2003) TNF-alpha induction of lipolysis is mediated through activation of the extracellular signal related kinase pathway in 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Biochem* 89(6), 1077-86.
210. Stahl, N., Boulton, T.G., Farruggella, T., Ip, N.Y., Davis, S., Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Silvennoinen, O., Barbieri, G., Pellegrini, S. & et al. (1994) Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science* 263(5143), 92-5.
211. Stahl, N., Farruggella, T.J., Boulton, T.G., Zhong, Z., Darnell, J.E., Jr. & Yancopoulos, G.D. (1995) Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* 267(5202), 1349-53.
212. Steppan, C.M., Bailey, S.T., Bhat, S., Brown, E.J., Banerjee, R.R., Wright, C.M., Patel, H.R., Ahima, R.S. & Lazar, M.A. (2001) The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409(6818), 307-12.
213. Stewart, C.L., Kaspar, P., Brunet, L.J., Bhatt, H., Gadi, I., Kontgen, F. & Abbondanzo, S.J. (1992) Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 359(6390), 76-9.
214. Stillwell, W. & Wassall, S.R. (2003) Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chem Phys Lipids* 126(1), 1-27.
215. Stouthard, J.M., Oude Elferink, R.P. & Sauerwein, H.P. (1996) Interleukin-6 enhances glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 220(2), 241-5.
216. Suganami, T., Nishida, J. & Ogawa, Y. (2005) A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(10), 2062-8.
217. Suganami, T., Tanimoto-Koyama, K., Nishida, J., Itoh, M., Yuan, X., Mizuarai, S., Kotani, H., Yamaoka, S., Miyake, K., Aoe, S., Kamei, Y. & Ogawa, Y. (2007) Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(1), 84-91.
218. Sugiyama, N., Mizuguchi, T., Aoki, T., Hui, T., Inderbitzin, D., Demetriou, A.A. & Rozga, J. (2002) Glycerol suppresses proliferation of rat hepatocytes and human HepG2 cells. *J Surg Res* 103(2), 236-42.

219. Tan, N.S., Michalik, L., Desvergne, B. & Wahli, W. (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor-beta as a target for wound healing drugs. *Expert Opin Ther Targets* 8(1), 39-48.
220. Tanabe, Y., Koga, M., Saito, M., Matsunaga, Y. & Nakayama, K. (2004) Inhibition of adipocyte differentiation by mechanical stretching through ERK-mediated downregulation of PPARgamma2. *J Cell Sci* 117(Pt 16), 3605-14.
221. Tang, Z., Scherer, P.E., Okamoto, T., Song, K., Chu, C., Kohtz, D.S., Nishimoto, I., Lodish, H.F. & Lisanti, M.P. (1996) Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem* 271(4), 2255-61.
222. Tataranni, P.A. & Ortega, E. (2005) A burning question: does an adipokine-induced activation of the immune system mediate the effect of overnutrition on type 2 diabetes? *Diabetes* 54(4), 917-27.
223. Thompson, B.R., Muzurkiewicz-Munoz, A.M., Suttles, J., Carter-Su, C. & Bernlohr, D.A. (2009) Interaction of Adipocyte Fatty Acid Binding Protein and JAK2: AFABP/aP2 as a Regulator of JAK2 Signaling. *J Biol Chem*.
224. Thurnhofer, S. & Vetter, W. (2005) A gas chromatography/electron ionization-mass spectrometry-selected ion monitoring method for determining the fatty acid pattern in food after formation of fatty acid methyl esters. *J Agric Food Chem* 53(23), 8896-903.
225. Tilg, H., Trehu, E., Atkins, M.B., Dinarello, C.A. & Mier, J.W. (1994) Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* 83(1), 113-8.
226. Tomas, E., Tsao, T.S., Saha, A.K., Murrey, H.E., Zhang Cc, C., Itani, S.I., Lodish, H.F. & Ruderman, N.B. (2002) 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(25), 16309-13.
227. Tontonoz, P., Hu, E., Devine, J., Beale, E.G. & Spiegelman, B.M. (1995) PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol* 15(1), 351-7.
228. Tontonoz, P., Hu, E. & Spiegelman, B.M. (1994) Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79(7), 1147-56.
229. Tsuruzoe, K., Emkey, R., Kriauciunas, K.M., Ueki, K. & Kahn, C.R. (2001) Insulin receptor substrate 3 (IRS-3) and IRS-4 impair IRS-1- and IRS-2-mediated signaling. *Mol Cell Biol* 21(1), 26-38.

230. Tugwood, J.D., Issemann, I., Anderson, R.G., Bundell, K.R., McPheat, W.L. & Green, S. (1992) The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *Embo J* 11(2), 433-9.
231. Ueki, K., Kondo, T., Tseng, Y.H. & Kahn, C.R. (2004) Central role of suppressors of cytokine signaling proteins in hepatic steatosis, insulin resistance, and the metabolic syndrome in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(28), 10422-7.
232. Unger, R.H. (2003) The physiology of cellular liporegulation. *Annu Rev Physiol* 65, 333-47.
233. Uysal, K.T., Scheja, L., Wiesbrock, S.M., Bonner-Weir, S. & Hotamisligil, G.S. (2000) Improved glucose and lipid metabolism in genetically obese mice lacking aP2. *Endocrinology* 141(9), 3388-96.
234. Uysal, K.T., Wiesbrock, S.M., Marino, M.W. & Hotamisligil, G.S. (1997) Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 389(6651), 610-4.
235. Van Obberghen, E. (1994) Signalling through the insulin receptor and the insulin-like growth factor-I receptor. *Diabetologia* 37 Suppl 2, S125-34.
236. Vidal-Puig, A., Jimenez-Linan, M., Lowell, B.B., Hamann, A., Hu, E., Spiegelman, B., Flier, J.S. & Moller, D.E. (1996) Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J Clin Invest* 97(11), 2553-61.
237. Vidal-Puig, A.J., Considine, R.V., Jimenez-Linan, M., Werman, A., Pories, W.J., Caro, J.F. & Flier, J.S. (1997) Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest* 99(10), 2416-22.
238. von Schacky, C. (2007) Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10(2), 129-35.
239. Vozarova, B., Weyer, C., Hanson, K., Tataranni, P.A., Bogardus, C. & Pratley, R.E. (2001) Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes Res* 9(7), 414-7.
240. Walczak, R. & Tontonoz, P. (2002) PPARadigms and PPARadoxes: expanding roles for PPARgamma in the control of lipid metabolism. *J Lipid Res* 43(2), 177-86.
241. Wallach, D., Varfolomeev, E.E., Malinin, N.L., Goltsev, Y.V., Kovalenko, A.V. & Boldin, M.P. (1999) Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 17, 331-67.

242. Wallenius, V., Wallenius, K., Ahren, B., Rudling, M., Carlsten, H., Dickson, S.L., Ohlsson, C. & Jansson, J.O. (2002) Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med* 8(1), 75-9.
243. Wang, M.C., Bohmann, D. & Jasper, H. (2005) JNK extends life span and limits growth by antagonizing cellular and organism-wide responses to insulin signaling. *Cell* 121(1), 115-25.
244. Wang, Y.X., Lee, C.H., Tjep, S., Yu, R.T., Ham, J., Kang, H. & Evans, R.M. (2003) Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 113(2), 159-70.
245. Warram, J.H., Martin, B.C., Krolewski, A.S., Soeldner, J.S. & Kahn, C.R. (1990) Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents. *Ann Intern Med* 113(12), 909-15.
246. Watanabe, M., Inukai, K., Katagiri, H., Awata, T., Oka, Y. & Katayama, S. (2003) Regulation of PPAR gamma transcriptional activity in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 300(2), 429-36.
247. Watson, R.T., Shigematsu, S., Chiang, S.H., Mora, S., Kanzaki, M., Macara, I.G., Saltiel, A.R. & Pessin, J.E. (2001) Lipid raft microdomain compartmentalization of TC10 is required for insulin signaling and GLUT4 translocation. *J Cell Biol* 154(4), 829-40.
248. Watt, M.J., Dzamko, N., Thomas, W.G., Rose-John, S., Ernst, M., Carling, D., Kemp, B.E., Febbraio, M.A. & Steinberg, G.R. (2006) CNTF reverses obesity-induced insulin resistance by activating skeletal muscle AMPK. *Nat Med* 12(5), 541-8.
249. White, U.A., Stewart, W.C., Mynatt, R.L. & Stephens, J.M. (2008) Neuropoietin attenuates adipogenesis and induces insulin resistance in adipocytes. *J Biol Chem* 283(33), 22505-12.
250. Williams, R.L., Hilton, D.J., Pease, S., Willson, T.A., Stewart, C.L., Gearing, D.P., Wagner, E.F., Metcalf, D., Nicola, N.A. & Gough, N.M. (1988) Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336(6200), 684-7.
251. Wilson-Fritch, L., Burkart, A., Bell, G., Mendelson, K., Leszyk, J., Nicoloso, S., Czech, M. & Corvera, S. (2003) Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone. *Mol Cell Biol* 23(3), 1085-94.
252. Wolf, G. (2008) Role of fatty acids in the development of insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nutr Rev* 66(10), 597-600.

253. Wood, I.S., Hunter, L. & Trayhurn, P. (2003) Expression of Class III facilitative glucose transporter genes (GLUT-10 and GLUT-12) in mouse and human adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 308(1), 43-9.
254. Wood, I.S. & Trayhurn, P. (2003) Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr* 89(1), 3-9.
255. Wu, Z., Xie, Y., Morrison, R.F., Bucher, N.L. & Farmer, S.R. (1998) PPARgamma induces the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the absence of C/EBPalpha during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes. *J Clin Invest* 101(1), 22-32.
256. Yamamoto, M., Toya, Y., Schwencke, C., Lisanti, M.P., Myers, M.G., Jr. & Ishikawa, Y. (1998) Caveolin is an activator of insulin receptor signaling. *J Biol Chem* 273(41), 26962-8.
257. Yamasaki, K., Taga, T., Hirata, Y., Yawata, H., Kawanishi, Y., Seed, B., Taniguchi, T., Hirano, T. & Kishimoto, T. (1988) Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. *Science* 241(4867), 825-8.
258. Yamauchi, T., Oike, Y., Kamon, J., Waki, H., Komeda, K., Tsuchida, A., Date, Y., Li, M.X., Miki, H., Akanuma, Y., Nagai, R., Kimura, S., Saheki, T., Nakazato, M., Naitoh, T., Yamamura, K. & Kadowaki, T. (2002) Increased insulin sensitivity despite lipodystrophy in Crebbp heterozygous mice. *Nat Genet* 30(2), 221-6.
259. Yasukawa, H., Sasaki, A. & Yoshimura, A. (2000) Negative regulation of cytokine signaling pathways. *Annu Rev Immunol* 18, 143-64.
260. Youngren, J.F. (2007) Regulation of insulin receptor function. *Cell Mol Life Sci* 64(7-8), 873-91.
261. Yuan, T., Hong, S., Yao, Y. & Liao, K. (2007) Glut-4 is translocated to both caveolae and non-caveolar lipid rafts, but is partially internalized through caveolae in insulin-stimulated adipocytes. *Cell Res* 17(9), 772-82.
262. Zhang, B., Berger, J., Zhou, G., Elbrecht, A., Biswas, S., White-Carrington, S., Szalkowski, D. & Moller, D.E. (1996) Insulin- and mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 271(50), 31771-4.
263. Zhang, H.H., Kumar, S., Barnett, A.H. & Eggo, M.C. (2000) Tumour necrosis factor-alpha exerts dual effects on human adipose leptin synthesis and release. *Mol Cell Endocrinol* 159(1-2), 79-88.
264. Zhu, Y., Qi, C., Korenberg, J.R., Chen, X.N., Noya, D., Rao, M.S. & Reddy, J.K. (1995) Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(17), 7921-5.

265. Ziouzenkova, O., Perrey, S., Asatryan, L., Hwang, J., MacNaul, K.L., Moller, D.E., Rader, D.J., Sevanian, A., Zechner, R., Hoefler, G. & Plutzky, J. (2003) Lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins generates PPAR ligands: evidence for an antiinflammatory role for lipoprotein lipase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(5), 2730-5.
266. Zvonic, S., Cornelius, P., Stewart, W.C., Mynatt, R.L. & Stephens, J.M. (2003) The regulation and activation of ciliary neurotrophic factor signaling proteins in adipocytes. *J Biol Chem* 278(4), 2228-35.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stoffwechselregulation durch Insulin	3
Abbildung 2: Signaltransduktion des Insulinrezeptors	6
Abbildung 3: Beispiel für eine RNA-Gelelektrophorese	34
Abbildung 4: Typischer Verlauf der Fluoreszenz bei der Real Time PCR; Amplifizierung (A), Schmelzkurve (B)	42
Abbildung 5: Aufbau eines Semi-Dry Western Blots.....	51
Abbildung 6: Aufbau eines Wet Western Blots	52
Abbildung 7: Einlagerung von Fetttröpfchen in 3T3-L1-Zellen während der Differenzierung mittels Insulin/IBMX/Dexamethason.....	57
Abbildung 8: mRNA-Spiegel verschiedener Gene während der Differenzierung von 3T3-L1-Zellen mittels Insulin/IBMX/Dexamethason.....	58
Abbildung 9: Regulierung verschiedener Proteine während der Differenzierung von 3T3-L1-Zellen mittels Insulin/IBMX/Dexamethason.....	59
Abbildung 10: Phosphorylierung der Proteine IRS1 und Erk1/2 sowie Interaktion des Insulinrezeptors mit Caveolin nach Stimulation von 3T3-L1-Adipozyten mit Insulin.....	60
Abbildung 11: Beeinflussung des Wachstums von 3T3-L1-Präadipozyten durch Inkubation mit Olivenöl (O) bzw. Sojaöl (S)	62
Abbildung 12: Vitalität von 3T3-L1-Adipozyten nach Inkubation mit Olivenöl (O) bzw. Sojaöl (S) während der Differenzierung mit Insulin, IBMX und Dexamethason. 63	
Abbildung 13: Vitalität ausdifferenzierter 3T3-L1-Adipozyten nach 24-stündiger Inkubation mit Olivenöl (O) bzw. Sojaöl (S)	63
Abbildung 14: Fettsäurezusammensetzung von 3T3-L1-Präadipozyten nach 6- stündiger Inkubation mit Olivenöl (O) bzw. Sojaöl (S)	64
Abbildung 15: Einlagerung von Fetttröpfchen in 3T3-L1-Zellen während 7-tägiger Differenzierung mittels Insulin/IBMX/Dexamethason unter Zugabe von Olivenöl (O) bzw. Sojaöl (S)	66
Abbildung 16: Gegenüberstellung der unter Olivenöl (O)- bzw. Sojaölsatz (S) differenzierten Zellen – unterschiedliche Größe der mit Oil Red O gefärbten Fetttröpfchen	66

Abbildung 17: mRNA-Spiegel verschiedener Gene während 7-tägiger Differenzierung von 3T3-L1-Zellen mittels Insulin/IBMX/Dexamethason unter Zugabe von Olivenöl (O) bzw. Sojaöl (S)	67
Abbildung 18: Regulierung verschiedener Proteine während 7-tägiger Differenzierung von 3T3-L1-Zellen mittels Insulin/IBMX/Dexamethason unter Zugabe von Olivenöl (O) bzw. Sojaöl (S)	68
Abbildung 19: Densitometrische Auswertung der Expression der Proteine PPAR γ 2 und Caveolin1 nach Zugabe von Olivenöl (O) bzw. Sojaöl (S) während 7-tägiger Differenzierung von 3T3-L1-Zellen mit Insulin, IBMX und Dexamethason	69
Abbildung 20: Einlagerung von Fetttröpfchen in 3T3-L1-Präadipozyten nach 7-tägiger Inkubation mit Olivenöl (O) bzw. Sojaöl (S)	70
Abbildung 21: mRNA-Spiegel verschiedener Gene nach 7-tägiger Inkubation von 3T3-L1-Präadipozyten mit Olivenöl (O) bzw. Sojaöl (S)	71
Abbildung 22: Regulierung verschiedener Proteine nach 7-tägiger Inkubation von 3T3-L1-Präadipozyten mit Olivenöl (O) bzw. Sojaöl (S)	72
Abbildung 23: Densitometrische Auswertung der Expression von Caveolin1 nach 7-tägiger Inkubation von 3T3-L1-Präadipozyten mit Olivenöl (O) bzw. Sojaöl (S)	72
Abbildung 24: Einlagerung von Fetttröpfchen in 3T3-L1-Zellen nach 7-tägiger Differenzierung unter dem Einfluss von TNF α und Olivenöl (O) bzw. Sojaöl (S)	74
Abbildung 25: mRNA-Spiegel verschiedener Gene nach 7-tägiger Differenzierung von 3T3-L1-Zellen unter dem Einfluss von TNF α und Olivenöl (O) bzw. Sojaöl (S)	75
Abbildung 26: Regulierung verschiedener Proteine nach 7-tägiger Differenzierung von 3T3-L1-Zellen unter dem Einfluss von TNF α und Olivenöl (O) bzw. Sojaöl (S)	75
Abbildung 27: Densitometrische Auswertung der Expression von Caveolin1 nach 7-tägiger Differenzierung von 3T3-L1-Zellen unter dem Einfluss von TNF α und Olivenöl (O) bzw. Sojaöl (S)	76
Abbildung 28: Einfluss einer 24-stündigen TNF α - und/oder Olivenöl (O)- bzw. Sojaölinkubation (S) auf die Expression verschiedener Gene in 3T3-L1-Adipozyten.....	77
Abbildung 29: Einfluss einer 24-stündigen TNF α - und/oder Olivenöl (O)- bzw. Sojaölinkubation (S) auf die Regulierung verschiedener Proteine in 3T3-L1-Adipozyten.....	78
Abbildung 30: Densitometrische Auswertung des Einflusses einer 24-stündigen TNF α - und/oder Olivenöl (O)- bzw. Sojaölinkubation (S) auf die Expression von PPAR γ 2 und Caveolin1 in 3T3-L1-Adipozyten	79

Abbildung 31: Phosphorylierung der Proteine IRS1 und Erk1/2 nach 24-stündiger Inkubation ausdifferenzierter 3T3-L1-Adipozyten mit TNF α bzw. IL-6 und/oder Olivenöl (O) bzw. Sojaöl (S) und anschließender Stimulation mit Insulin	80
Abbildung 32: Stimulierbarkeit undifferenzierter bzw. differenzierter 3T3-L1-Zellen durch die Zytokine CNTF, LIF bzw. IL-6	81
Abbildung 33: Aktivierung des Jak/STAT-Signalweges in 3T3-L1-Zellen durch CNTF im Verlauf der Differenzierung zu Adipozyten	82
Abbildung 34: Regulierung der an der CNTF-Signaltransduktion beteiligten Proteine während der Differenzierung von 3T3-L1-Zellen zu Adipozyten.....	83
Abbildung 35: Vitalität von 3T3-L1-Adipozyten nach Inkubation mit den Zytokinen CNTF bzw. LIF während der Differenzierung mit Insulin, IBMX und Dexamethason	84
Abbildung 36: Einlagerung von Fetttropfchen in 3T3-L1-Zellen während 7-tägiger Differenzierung mittels Insulin/IBMX/Dexamethason unter Zugabe der Zytokine CNTF bzw. LIF	85
Abbildung 37: mRNA-Spiegel verschiedener Gene während 7-tägiger Differenzierung von 3T3-L1-Zellen mittels Insulin/IBMX/Dexamethason unter Zugabe der Zytokine CNTF bzw. LIF	86
Abbildung 38: Regulierung verschiedener Proteine während 7-tägiger Differenzierung von 3T3-L1-Zellen mittels Insulin/IBMX/Dexamethason unter Zugabe der Zytokine CNTF bzw. LIF.....	87
Abbildung 39: Densitometrische Auswertung der Expression der Proteine PPAR γ 2 und Caveolin1 nach Zugabe der Zytokine CNTF bzw. LIF während 7-tägiger Differenzierung von 3T3-L1-Zellen mit Insulin, IBMX und Dexamethason	87
Abbildung 40: : Einlagerung von Fetttropfchen in 3T3-L1-Prädipozyten nach 7-tägiger Inkubation mit den Zytokinen CNTF bzw. LIF.....	89
Abbildung 41: mRNA-Spiegel verschiedener Gene nach 7-tägiger Inkubation von 3T3-L1-Prädipozyten mit den Zytokinen CNTF bzw. LIF.....	89
Abbildung 42: Regulierung verschiedener Proteine nach 7-tägiger Inkubation von 3T3-L1-Prädipozyten mit den Zytokinen CNTF bzw. LIF.....	90
Abbildung 43: Densitometrische Auswertung der Expression von Caveolin1 nach 7-tägiger Inkubation von 3T3-L1-Prädipozyten mit den Zytokinen CNTF bzw. LIF	91

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pipettierschema für einen cDNA-Syntheseansatz	34
Tabelle 2: Temperaturprogramm des Thermocyclers für die cDNA-Synthese.....	35
Tabelle 3: Primersequenzen.....	37
Tabelle 4: Pipettierschema für die Amplifizierung eines spezifischen cDNA-Stückes zur Herstellung eines Standards für die Real Time PCR.....	38
Tabelle 5: Temperaturprogramm für die Amplifizierung eines spezifischen cDNA-Stückes zur Herstellung eines Standards für die Real Time PCR	38
Tabelle 6: Bezeichnung und Konzentration der in der Real Time PCR verwendeten Standardwerte	40
Tabelle 7: Verdünnung der cDNA-Proben für die Bestimmung der jeweiligen Transkripte mittels Real Time PCR	40
Tabelle 8: Pipettierschema für einen Real Time PCR-Ansatz	41
Tabelle 9: Temperaturprogramme für die Real Time PCR	41
Tabelle 10: Pipettierschema für die BSA-Eichgerade.....	45
Tabelle 11: Pipettierschema für die Herstellung von Polyacrylamidgelen unterschiedlicher Porengröße	50
Tabelle 12: Übersicht über die zur Detektion der verschiedenen Proteine verwendeten Blockier- sowie Primär- und Sekundärantikörperlösungen.....	55

8.3 Abkürzungsverzeichnis

a	Adenin
ADP	Adenosindiphosphat
AGE	<i>advanced glycation endproducts</i>
Akt/PKB	Proteinkinase B
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
aP2/AFABP	<i>adipocyte fatty acid-binding protein</i>
APS	Adaptorprotein mit PH- und SH-Domäne
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Bovines Serumalbumin
BSF	<i>B-cell stimulating factor</i>
bzw.	beziehungsweise
c	Cytosin
°C	Grad Celsius
C3G	<i>guanine nucleotide-releasing factor 2</i>
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAP	<i>Cbl associated protein</i>
Cav	Caveolin
Cbl	<i>casitas B cell-lineage lymphoma</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
C/EBP	<i>CCAAT-enhancer-binding proteins</i>
CLC	<i>cardiotrophin-like cytokine</i>
cm	Zentimeter
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
CNTFR	<i>ciliary neurotrophic factor receptor</i>
CoA	Coenzym A
cop	Kopie
COX	Cyclooxygenase
CrklI	<i>CT 10 regulator of kinase II</i>
CT	Cardiotrophin
d	Tag
DAG	Diazylglyzerin
dd H ₂ O	bidestilliertes Wasser
d. h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Erk	<i>extracellular signal-related kinase</i>
et al.	und andere (<i>et alii</i>)
FABP	<i>fatty acid-binding protein</i>
FAT	<i>fatty acid translocase</i>
FATP	<i>fatty acid transport protein</i>

FCS	<i>fetal calf serum</i>
FFA	<i>free fatty acids</i>
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
g	Guanin
Gab	<i>Grb2-associated binder</i>
GC/MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
GDP	Guanosindiphosphat
GLUT	Glucosetransporter
GM3	Gangliosid GM3
gp	Glycoprotein
Grb	<i>growth factor receptor bound protein</i>
GSK	Glycogensynthasekinase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HMIT	<i>proton-coupled myoinositol transporter</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSL	hormonsensitive Lipase
IBMX	Isobutylmethylxanthin
IDF	Internationale Diabetes-Föderation
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IL	Interleukin
IL-6R	Interleukin-6-Rezeptor
IP	Immunpräzipitation
IR	Insulinrezeptor
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
Jak	Januskinase
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kcal	Kilokalorien
kDa	Kilodalton
L	Liter
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
LIFR	<i>leukemia inhibitory factor receptor</i>
LPL	Lipoproteinlipase
LR	Leptinrezeptor
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	mikromolar
M	molar
mA	Milliampere
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MCP	<i>monocyte chemoattractant protein</i>
ME	Methylester
MEK	mitogenaktivierte Erk-Kinase
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>

MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
MUFA	<i>monounsaturated fatty acids</i>
n	Stichprobenumfang
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF	<i>nuclear factor</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	nanomolar
NNT	<i>novel neurotrophin</i>
NPN	Neuropoietin
NRF	<i>nuclear respiratory factor</i>
O	Olivenöl
OSM	<i>oncostatin M</i>
OSMR	<i>oncostatin M receptor</i>
p	phosphoryliert
p	Protein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDK	<i>phosphoinositide-dependent kinase</i>
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PGC	<i>peroxisome proliferator-activated receptor coactivator</i>
pH	potentia Hydrogenii
PH	<i>pleckstrin homology</i>
PI(3)K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIAS	<i>protein inhibitors of activated STATs</i>
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
pmol	Pikomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Phosphoproteinphosphatase
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PPRE	<i>peroxisome proliferator response element</i>
P/S	Penicillin-/Streptomycinlösung
PTEN	<i>phosphatase and tensin homologue</i>
PTP	Proteintyrosinphosphatase
PUFA	<i>polyunsaturated fatty acids</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Raf	<i>Ras activation protein</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rRNA	ribosomale RNA
RXR	Rezeptor für 9-cis-Retinsäure
S	Sojaöl
S	Svedberg
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
sec	Sekunde

SFA	<i>saturated fatty acids</i>
SH	<i>src-homology</i>
Shc	<i>SH2-containing collagen-related protein</i>
SHIP	<i>SH2-containing inositol phosphatase</i>
SHP	<i>SH2-containing phosphatase</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
SOS	<i>son of sevenless</i>
Src	<i>Rous sarcoma oncogene</i>
SREBP	<i>sterol regulatory element-binding protein</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
t	<i>Thymin</i>
TAE	<i>Tris-Acetat-EDTA</i>
TBE	<i>Tris-Borat-EDTA</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline-Tween</i>
TC10	<i>GTP-binding protein TC10</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin</i>
TFam	<i>mitochondrial transcription factor A</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
Tyk	<i>Tyrosinkinase</i>
UCP	<i>uncoupling protein</i>
UV	<i>ultraviolett</i>
V	<i>Volt</i>
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
z. B.	<i>zum Beispiel</i>

8.4 Lebenslauf

Name:	Antje Ulrike Stäbler (geb. Roscher)
Geburtsdatum:	22.11.1977
Geburtsort:	Chemnitz (Sachsen)
Familienstand:	verheiratet, 1 Kind (geb. am 27.09.2005)
1984 – 1992	Karl-Liebknecht-Oberschule Chemnitz
1992 – 1997	Gymnasium Seligenthal Landshut Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
1997 – 1999	Studium der Biochemie Universität Regensburg
1999 – 2004	Studium der Ernährungswissenschaften Universität Hohenheim, Stuttgart Abschluss: Diplom
2003 – 2004	Diplomarbeit: Prof. Dr. Christiane Bode Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft, Universität Hohenheim, Stuttgart <i>Auswirkung der Interaktion von Alkohol und Retinsäure auf die Aktivierung humaner mononukleärer Leukocyten</i>
2004 – 2009	Promotion: Prof. Dr. Lutz Graeve Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft, Universität Hohenheim, Stuttgart

8.5 Danksagung

Herrn Prof. Lutz Graeve danke ich für die Vergabe des interessanten Themas, seine Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Weiterhin möchte ich Frau Prof. Christiane Bode dafür danken, dass sie mich ermutigt hat, Wissenschaft und Familienplanung unter einen Hut zu bringen.

Für die Zusendung der 3T3-L1-Zellen danke ich Herrn PD Dr. rer. nat. Harald Staiger von der Uniklinik Tübingen.

Ich danke meinen Kollegen Dr. Deborah Buk, Dr. Inna Ziegler, Monika Schumacher, Gabriele (Gobi) Pfanner, Dr. Jordan Doumanov, Rasa Adomkiene, Irene Kieß, Kathrin Wurster, Sabine Neukamm, Simone Lissner, Merle Daubrawa, Sibylle Gündisch, Andrea Ziegler, Ralph Bessey, Eva Schopf, Maria Sprenger, Irene Hadjicosta-Karmi, Bharathy Thayaparasingham und Lili Nimri für das freundschaftliche Arbeitsklima und die lustige Zeit, die wir trotz nicht ausbleibender wissenschaftlicher Rückschläge miteinander hatten. „Meinen“ Diplomandinnen Michaela Keck und Miriam Britsch danke ich außerdem für ihren Einsatz und ihr Interesse an unserer Arbeit.

Bei Andrea Flaccus und Dagmar Mvondo möchte ich mich für die kompetente Einweisung in die Real Time PCR bedanken.

Es ist mir besonders wichtig, mich herzlich bei meinen Schwiegereltern Renate und Werner zu bedanken, bei denen ich meinen Sohn stets in den besten Händen wusste.

Auch meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung, ihr Interesse am Fortgang meiner Arbeit und alles, was sie je für mich getan haben (und noch tun werden).

Meinen zwei Männern danke ich von Herzen für ihre Liebe.

8.6 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Dipl. Ernährungswissenschaftlerin Antje Ulrike Stäbler, Doktorandin am Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft der Universität Hohenheim, dass ich diese Dissertation mit dem Titel „Der Einfluss verschiedener Ölemulsionen und der IL-6-Typ-Zytokine CNTF und LIF auf die Differenzierung von 3T3-L1-Prädipozyten zu Fettzellen“ selbstständig angefertigt, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet und inhaltlich oder wörtlich übernommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ort, Datum

Unterschrift