

Hochschule für Angewandte Wissenschaften
Fachbereich Ökotrophologie

**Beeinflussung der Glukoseaufnahme von differenzierten
Adipozyten durch Insulin und Liganden des Proliferator-
Activated Receptor γ (PPAR γ)**

– Diplomarbeit –

vorgelegt am: 6. Dezember 2005

von: Nina Müller
Funhofweg 11
22307 Hamburg
Matrikel-Nr.: 1622250

Betreuung durch: Prof. Dr. Behr-Völtzer

Korreferat durch: Prof. Dr. Schrezenmeir

Vorwort

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. Schrezenmeir für die Bereitstellung dieses interessanten Themas bedanken.

Bei Frau Prof. Dr. Behr-Völtzer und Herrn Dr. Helwig bedanke ich mich für die Betreuung der vorliegenden Arbeit.

Vielen Dank an Dipl. oec. troph. Peter Möller, der mich sowohl bei der praktischen als auch bei der theoretischen Bearbeitung dieses Themas sehr gut unterstützt hat. Und vielen Dank auch an Dipl. oec. troph. Julia Kiosz für das Korrekturlesen der Arbeit.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Physiologie und Biochemie der Ernährung der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel Kiel bedanke ich mich für die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinem Freund Benjamin für ihre Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	4
Einleitung	6
1.1 Problemstellung	6
1.2 Fragestellung	7
1.3 Abgrenzung	8
2 Theoretischer Hintergrund	9
2.1 Das Metabolische Syndrom	9
2.1.1 Adipogenese und Adipositas	11
2.1.2 Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes Mellitus	12
2.2 Insulin	13
2.2.1 Aufbau.....	13
2.2.2 Insulinrezeptor und Insulinkaskade.....	13
2.2.3 Aufgabe und Funktion	16
2.3 Glukosetransport/ -er und Glukosestoffwechsel	17
2.3.1 Glukosetransporter (GLUT1 und GLUT4).....	17
2.3.2 Glukosestoffwechsel im Adipozyten	19
2.3.3 Gestörter Glukosestoffwechsel im Adipozyten.....	20
2.4 Peroxisome Proliferator Activated Receptors (PPARs)	21
2.4.1 Übersicht.....	21
2.4.2 Isoformen und Vorkommen	22
2.4.3 Rezeptorstruktur.....	22
2.4.4 Retinoid-Rezeptor (RXR).....	23
2.4.5 Peroxisome Proliferate Response Element (PPRE)	23
2.4.6 Coaktivatoren und Corepressoren.....	24
2.4.7 Wirkmechanismus des durch Liganden / Agonisten aktivierten PPARs ..	24
2.4.8 PPAR γ -Liganden /Agonisten.....	25
3 Material und Methode	30
3.1 Material.....	30
3.1.1 Zusammensetzung der Medien, Puffer und Lösungen.....	30
3T3-L1 Kultivierung.....	30
HepG2 Kultivierung.....	31
Färbung der 3T3-L1 Zellen	31
Proteinbestimmung der 3T3-L1 und HepG2 Zellen	32
Glukoseaufnahme in 3T3-L1 und HepG2 Zellen	32
3.2 Methode.....	34
3.2.1 Vorstellung der Zelllinien	34
3T3-L1 Zelllinie	34
HepG2 Zelllinie	34
3.2.2 Subkultivierung und Kultivierung der 3T3-L1 und der HepG2 Zelllinie....	36
3.2.3 Differenzierung der 3T3-L1 Zellen	37
3.2.4 HepG2 Zellen	37
3.2.5 Ölrot O Färbung der 3T3-L1 Zellen.....	37
3.2.6 Proteinbestimmung der 3T3-L1 und HepG2 Zellen.....	38
3.2.7 Glukoseaufnahme in differenzierte 3T3-L1 Adipozyten und HepG2 Zellen	39
3.2.8 Szintillationszählung im β -Counter.....	40
3.2.9 Einstellung der Parameter zur Messung der radioaktiven Glukose	41
3.2.10 Ergebnisauswertung und Statistik.....	42
4 Ergebnisse	43
4.1 Ergebnisse der 3T3-L1 Zellkultur	43
4.1.1 Vitalitätstest mit Trypanblau.....	43

4.1.2	Differenzierung.....	44
4.1.3	Ölrot O Färbung	46
4.2	Vorversuche zur Messung der Glukoseaufnahme in 3T3-L1 Zellen	47
4.2.1	Glukoseaufnahme mit und ohne Zugabe von Cytochalasin B in 3T3-L1 Adipozyten.....	47
4.2.2	Glukoseaufnahme mit und ohne Zugabe der Liganden-Lösungsvermittler Dimethylsulfoxid, Ethanol und Bovine Serum Albumin in 3T3-L1 Adipozyten.....	48
4.3	Glukoseaufnahme bei verschiedenen Insulinkonzentrationen in 3T3- Fibroblasten und 3T3-L1-Adipozyten	50
4.3.1	Glukoseaufnahme bei verschiedenen Insulinkonzentrationen in nicht differenzierte 3T3-L1 Fibroblasten und differenzierte 3T3-L1 Adipozyten.....	50
4.3.2	Aufnahmesteigerung der Glukose bei verschiedenen Insulin- konzentrationen im Vergleich zum Insulinnullwert in differenzierte 3T3-L1 Adipozyten und nicht differenzierte Fibroblasten.....	52
4.4	Glukoseaufnahme unter Einfluss von Troglitazon in differenzierte 3T3-L1- Adipozyten	54
4.4.1	Glukoseaufnahme bei verschiedenen Insulinkonzentrationen unter Einfluss verschiedener Troglitazonkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten.....	54
4.4.2	Aufnahmesteigerung der Glukose bei verschiedenen Troglitazon- und Insulinkonzentrationen im Vergleich zum Nullwert in 3T3-L1 Adipozyten.....	58
4.5	Glukoseaufnahme unter Einfluss von GW1929 in differenzierte 3T3-L1- Adipozyten	59
4.5.1	Glukoseaufnahme bei verschiedenen Insulinkonzentrationen unter Einfluss verschiedener GW1929- Konzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten.....	59
4.5.2	Aufnahmesteigerung der Glukose bei verschiedenen GW1929- und Insulinkonzentrationen im Vergleich zum Nullwert in 3T3-L1 Adipozyten.....	62
4.6	Glukoseaufnahme unter Einfluss des CLA-Isomers (trans-10, cis-12) in differenzierte 3T3-L1-Adipozyten	64
4.6.1	Glukoseaufnahme bei verschiedenen Insulinkonzentrationen unter Einfluss verschiedener Konzentrationen des CLA-Isomers in 3T3-L1 Adipozyten.....	64
4.6.2	Aufnahmesteigerung der Glukose bei verschiedenen CLA- und Insulin- konzentrationen im Vergleich zum Nullwert in 3T3-L1 Adipozyten	67
4.7	Glukoseaufnahme unter Einfluss des CLA-Gemisches (trans-10,cis-12 und cis-9,trans-11) in differenzierte 3T3-L1-Adipozyten	69
4.7.1	Glukoseaufnahme bei verschiedenen Insulinkonzentrationen unter Einfluss verschiedener Konzentrationen des CLA-Gemisches in 3T3-L1 Adipozyten.....	69
4.7.2	Aufnahmesteigerung der Glukose bei verschiedenen CLA-Gemisch- und Insulinkonzentrationen im Vergleich zum Nullwert in 3T3-L1 Adipozyten.....	72
4.8	Glukoseaufnahme in HepG2 Zellen	74
4.8.1	Glukoseaufnahme mit und ohne Zugabe von Cytochalasin B in HepG2 Zellen	74
4.8.2	Glukoseaufnahme bei verschiedenen Insulinkonzentrationen in HepG2 Zellen	75
4.8.3	Glukoseaufnahme bei verschiedenen Konzentrationen von GW1929,- CLA-Gemisch-(trans-10,cis-12 und cis-9,trans-11) und Troglitazon in HepG2 Zellen.....	76
4.9	Proteinbestimmung nach Lowry in 3T3-L1- und HepG2-Zellen	78

4.9.1	Standardkurve mit BSA	78
4.9.2	Proteingehalt in 3T3-L1 und HepG2 Zellen.....	79
5	Diskussion.....	80
5.1	3T3-L1 Zellen als Zellkulturmodell für Adipozyten	80
5.2	Glukoseaufnahme in 3T3-L1 Adipozyten unter Insulineinfluss	82
5.3	Glukoseaufnahme in differenzierte 3T3-L1 Adipozyten unter Einfluss verschiedener PPAR γ - Liganden.....	85
6	Zusammenfassung	98
7	Abbildungsverzeichnis.....	104
8	Tabellenverzeichnis	107
9	Literaturverzeichnis	109
9.1	Literaturquellen	109
9.2	Internetquellen	115

Abkürzungsverzeichnis

ADD	Adipocytes determination and differentiation factor
AF	Activation function
ap2	Adipocyte-fatty-acid-binding-protein
AS	Aminosäure
ATP III	Adult Treatment Panel III
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovine Serum Albumin
c	Konzentration
CAP	Cbl-associated Protein
C/EBP	CCAAT-enhancer-binding-protein
CLA	Konjugierte Linolsäure (Conjugated linoleic acid)
cpm	counts per minute
DBD	DNA-Bindungsdomäne (DNA-binding-domain)
DEXA	Dexamethason
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DMEM	Dulbecco's Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DR-1	Direct repeats-1
EtOH	Ethanol
FATP	Fettsäuretransportprotein (Fatty acid transport protein)
FCS	Fötale Kälberserum (Fetal Calf Serum)
FDA	Food and Drug Administration
(F)FA	(Freie) Fettsäuren ((Free) fatty acids)
g	Erdbeschleunigung
GLUT	Glukosetransporter
GSK-3	Glycogensynthase-Kinase 3
Gyk	Glycerolkinase
HDL	High density lipoprotein
IBMX	Isobutylmethylxanthin
IDF	International Diabetes-Federation
IRS	Insulinrezeptor-Substrat
kBq	Kilobecquerel
KRP	Krebs-Ringer-Puffer

LBD	Ligandenbindungsdomäne (Ligand-binding-domain)
LCFA	Langkettige Fettsäuren (Long chain fatty acids)
LDL	Low density lipoprotein
LPL	Lipoproteinlipase
mM	milliMol
µM	mikroMol
Met. Syn.	Metabolische Syndrom
MW	Mittelwert
n	Versuchsanzahl
NCEP	National Cholesterol Education Program
nM	nanoMol
nm	nanometer
p	Wahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (Phoshat-buffered saline)
PI 3-Kinase	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PK	Proteinkinase
PPAR	Peroxisome Proliferator Activeted Receptor
PPRE	Peroxisome Proliferator Response Element
PUFA	Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (Polyunsaturated fatty acid)
RXR	Retinoid rezeptor
rpm	rounds per minute
SH	Schwefelwasserstoff
SREBP	Sterol response element binding protein
STD	Standardabweichung
T2DM	Typ 2 Diabetes Mellitus
TG	Triglycerid
TNFα	Tumornekrosefaktor α
TZDs	Thiazolidindiones
UKPDS	United Kingdom Prospective Diabetes Study
VLDL	Very low density lipoprotein
w	Trockenmasse
WHO	World Health Organization
w/v	Trockenmasse pro Volumen
15d-PG J2	15-Deoxy-delta-12,14-Prostaglandin J2

Einleitung

1.1 Problemstellung

Das Metabolische Syndrom (Met. Syn.) gehört weltweit zu den häufigsten Ernährungskrankheiten, gegenwärtig sind ca. 22% der Gesamtbevölkerung betroffen (SPRANGER et al., 2003).

Das Zusammentreffen verschiedener endogener und exogener Risikofaktoren für koronare Herzkrankheiten wird in der Literatur als Met. Syn., Syndrom X oder Insulinresistenzsyndrom bezeichnet (STUMVOLL et al., 2002). Das Met. Syn. beschreibt das gemeinsame Auftreten von Glukoseintoleranz oder Typ 2 Diabetes Mellitus (T2DM) mit einer abdominalen Adipositas und/oder Dyslipoproteinämie und essentieller arterieller Hypertonie (KERNER et al., 2004). Die Klassifikation orientiert sich entweder wie die der World Health Organization (WHO) von 1999 an der Insulinresistenz oder wie das US National Cholesterol Education Program (NCEP) von 2001 an den Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen (ALBERTI et al., 2005). In einer neuen Definition des Met. Syn. der Internationalen Diabetes-Federation (IDF) von 2005 steht die abdominale Adipositas im Mittelpunkt. Über die Bestimmung der waist-to-hip-ratio ist mit Hilfe dieser Definition eine praxisnahe und schnellere Bestimmung sowie eine bessere Vergleichbarkeit unterschiedlicher ethnischer Gruppen gewährleistet (ALBERTI et al., 2005; www.idf.org, Zugriff am 21.08.05).

Die Grenzwerte, u.a. für den Blutzucker, wurden in den letzten Jahren mehrmals herabgesetzt, wodurch die Prävalenz des Met. Syn. in Deutschland mehrmals nach oben korrigiert werden musste (www.idf.org, Zugriff am 21.08.05).

Das Met. Syn. hat multifaktorielle Ursachen. Hierbei handelt es sich sowohl um genetische, als auch um verschiedene umweltbedingte Ursachen (SPRANGER et al., 2003). Typische Ernährungs- und Verhaltensmuster der Bevölkerung der westlichen Industriestaaten wie Hyperalimentation und Bewegungsmangel scheinen die Hauptfaktoren der zunehmenden Häufigkeit des Met. Syn. zu sein. Die primären Ursachen dieser multifaktoriellen metabolischen Störung sind bis heute noch nicht ausreichend erforscht (SHULMAN, 2000; www.idf.org, Zugriff am 21.08.05).

Adipositas ist als eine Komponente des Met. Syn. die häufigste Ernährungskrankheit in den Industrienationen (SPRANGER et al., 2003). In Deutschland sind laut des Bundes-Gesundheitssurveys von 1998 in den westlichen Bundesländern 48,7% der Männer übergewichtig (BMI 25-<30kg/m²) und 17,6% adipös (BMI 30-<40 kg/m²). Im Vergleich mit den Werten von 1991 bedeutet das einen Anstieg der adipösen Männer in den westlichen Bundesländern um 11,5% (BERGMANN und MENSINK, 1999). Laut des Bundes-Gesundheitssurveys von 1998 stellt Adipositas ein Schlüsselproblem der modernen Zivilisationskrankheiten dar. Bergmann und Mensink (1999) bezeichneten die Verbreitung und den ungünstigen Trend als alarmierend. Die Bekämpfung der Fettsucht stellt somit den entscheidenden Ansatz zur Reduzierung der globalen Risikofaktoren dar (MEIGS, 2004).

Epidemiologische Daten zeigen den starken Einfluss des Fettgewebes auf die Entstehung des T2DM (SHULMAN, 2000). Über 70% der Typ 2 Diabetes Patienten aus unterschiedlichen Populationen weltweit sind in verschiedenen Graden übergewichtig (HIRSCH et al., 2001). T2DM stellt die häufigste Form des Diabetes in Deutschland dar. Die

Prävalenz des T2DM ist in den letzten Jahren weltweit rapide angestiegen. Derzeit wird von ca. 150 Millionen Diabetespatienten weltweit ausgegangen (SPRANGER et al., 2003). Für das Jahr 2020 wird mit einem Anstieg der Diabetes Typ 2 Patienten auf 250 Millionen weltweit gerechnet (Vgl. O'RAHILLY, 1997 aus SHULMAN, 2000). Besonders problematisch ist, dass zunehmende Fälle von T2DM bei adipösen Kindern und Jugendlichen zu beobachten sind (KERNER et al., 2004). Insgesamt betrachtet, kann eine Zunahme des Fettgewebes zu einem erhöhten Insulinbedarf durch eine eintretende gestörte Glukosetoleranz und Insulinresistenz führen. Dieses beruht sowohl auf einem erhöhten Fettsäureausstrom aus den Adipozyten, als auch auf der Eigenschaft des Fettgewebes als endokrines Organ (STUMVOLL et al., 2002). Bei der Aufdeckung der verschiedenen Faktoren, die die direkte Verbindung zwischen Adipositas und Insulinresistenz darstellen, bleiben noch einige Fragen ungeklärt (SPRANGER et al., 2003).

Für die Insulinsensitivität scheinen u.a. die nuklearen Transkriptionsfaktoren Peroxisome Proliferator Activated Receptors (PPARs) von Bedeutung zu sein (GUAN et al., 2002). PPARs bilden eine Subfamilie, die zur Superfamilie der Nuklearrezeptoren gehören. Diese Mitglieder der Steroid-/Thyroid-Hormon-Rezeptor-Superfamilie wurden 1990 das erste Mal von Issemann und Green geklont. PPAR γ ist ein Isomer der PPAR Subfamilie, der aktiviert durch einen Liganden, mit dem Retinoid-X-Rezeptor in Form eines Heterodimers die Expression von verschiedenen Genen des Glukose- und Lipidstoffwechsels regulieren kann. Speziell PPAR γ 2 spielt wahrscheinlich bei der Insulinsensitivität eine wichtige Rolle, da es insbesondere im Fettgewebe expremiert wird (HOUSEKNECHT et al., 2002).

Eine wichtige Gruppe pharmakologischer PPAR γ -Liganden sind die Thiazolidindiones (TZDs). TZDs können die Insulinsensitivität bei Patienten mit T2DM oder verschlechterter Glukosetoleranz erhöhen (XU et al., 2001). TZDs scheinen über die Aktivierung von PPAR γ eine direkte Wirkung auf bestimmte Zellen, wie z.B. die Muskelzellen, auszuüben. Die Expression von PPAR γ ist in den Adipozyten am höchsten, was die Bedeutung dieser Zellen für die Pathogenese des T2DM unterstreicht (GUAN et al., 2002).

Ein natürlicher nutritiver PPAR γ -Ligand ist die konjugierte Linolsäure (Conjugated linoleic acid, CLA). CLA bildet eine heterogene Gruppe von geometrischen Stellungsisomeren der Linolsäure (C18:2 n-6). Sie kommt als natürlicher Nahrungsbestandteil der Lipidfraktion der Milch, des Rindfleisches und in weiteren Produkten von Wiederkäuern vor (CHOI et al., 1999; WANG und JONES, 2004). In den letzten Jahren haben diese zweifach ungesättigten Fettsäuren an Bedeutung gewonnen, weil sie in verschiedenen Studien den Körperfettanteil reduzieren und signifikante Effekte auf den Glukose- und Lipidstoffwechsel nachgewiesen werden konnten. Es wird vermutet, dass das CLA-Isomer trans-10,cis-12 der Fettsucht entgegenwirkt und die Insulinsensitivität verbessern kann (RISERUS et al., 2004). Der Zusammenhang zwischen PPAR γ und seiner antidiabetischen Wirkung wurde 1998 erstmals von Houseknecht et al. beschrieben.

1.2 Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von PPAR γ -Liganden und von Insulin auf die Glukoseaufnahme in Adipozyten untersucht. Ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit

war die Etablierung der Methode zur Differenzierung der Adipozyten sowie die Messung der Glukoseaufnahme.

Als Versuchsmodell wurde die 3T3-L1 Mauszelllinie gewählt, da dieses Modell bevorzugt in Versuchen zum Glukose- und Lipidmetabolismus eingesetzt wird (CHOI et al., 1999). Die 3T3-L1 Fibroblasten wurden zu reifen Adipozyten differenziert, um dem Fettgewebe des Menschen vergleichbare Bedingungen zu schaffen.

Es wurde folgende Kernfrage versucht zu beantworten:

Wie modulieren die PPAR γ Agonisten – CLA, Troglitazon und GW1929 – in Gegenwart verschiedener Insulinkonzentrationen die Glukoseaufnahme in Adipozyten?

Die experimentiellen Ergebnisse wurden in den großen Zusammenhang der Entstehung einer Insulinresistenz des Gesamtorganismus eingeordnet, für welche insbesondere das Muskel- und Fettgewebe von Bedeutung sind.

1.3 Abgrenzung

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich die PPAR-Isoform PPAR γ behandelt, weil PPAR γ erhöht im Fettgewebe exprimiert wird (SEWTER und VIDAL-PUIG, 2002; SPIEGELMAN und FLIER, 1996). Auf die Isoformen PPAR α und PPAR δ wurde nicht eingegangen. Weder PPAR α noch PPAR δ bewirken einen mit PPAR γ vergleichbaren Effekt auf die Adipogenese oder die Glukosehomöostase (BERGER et al., 1999). Das Wirkspektrum von PPAR γ wurde auf die Adipogenese und auf den Glukosestoffwechsel in Verbindung mit Insulin in den Adipozyten begrenzt.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Das Metabolische Syndrom

Das Met. Syn. stellt eine Gruppierung von entscheidenden Risikofaktoren für koronare Herzkrankheiten und für die Entstehung des T2DM dar (ALBERTI et al., 2005).

Das Met. Syn. beschreibt das gemeinsame Auftreten von Glukoseintoleranz oder T2DM mit einer abdominalen Adipositas und/oder Dyslipoproteinämie und essentieller arterieller Hypertonie (KERNER et al., 2004). Klinische Krankheitsbilder wie Adipositas und T2DM, die in Verbindung mit Insulinresistenz auftreten, zeigen meist neben einer gestörten Glukosehomöostase eine Reihe von weiteren Abnormalitäten, wie arterielle Hypertonie und Dyslipidämie. Hieraus resultiert ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko (STUMVOLL et al., 2002). Ein fundamentales Kennzeichen des Met. Syn. ist, dass die Komponenten des Met. Syn. hochgradig miteinander korreliert sind (MEIGS, 2004). 1988 stellte Reaven die Beziehung zwischen kardiovaskulären Erkrankungen und deren verschiedenen Risikofaktoren als das Konzept des Met. Syn. vor. Er beschrieb das Zusammentreffen der diagnostischen Kriterien der Insulinresistenz, der Hyperglykämie, der Hypertonie, der niedrigen HDL-Cholesterol- und erhöhten VLDL-Triglyceridspiegel als Syndrom X. Der Faktor Übergewicht war in dieser Definition noch nicht vertreten (REAVEN, 1988; ALBERTI et al., 2005). Die Definition des Met. Syn. wurde in den letzten Jahren des öfteren geändert. 1999 veröffentlichte die WHO die erste internationale Definition für die Diagnose des Met. Syn. Bei dieser Definition steht die Insulinresistenz im Fokus. Die Definition des NCEP von 2001, „Adult Treatment Panel III“ (ATP III), bezieht sich mehr auf den Zusammenhang zwischen Adipositas und kardiovaskulären Risikofaktoren und weniger auf die Insulinresistenz als Hauptfaktor (HOEFNER, 2003; ALBERTI et al., 2005). In einer neuen weltweiten Definition des Met. Syn. der IDF von 2005 steht die abdominale Adipositas im Mittelpunkt. In der Konsensus-Stellungnahme der IDF wird eine anormale abdominale Fettdistribution als potentielle Ursache für weitere Faktoren des Met. Syn. wie die Insulinresistenz identifiziert. Die Ergebnisse verschiedener Studien mit hohem Evidenzgrad stützen die Aussage, dass die abdominale Adipositas mit kardiovaskulären Risikofaktoren und weiteren Komponenten des Met. Syn. eng korreliert sind (ALBERTI et al., 2005). Ein zentrales Kriterium dieser Definition ist der Taillenumfang, der weltweit an ethnische Unterschiede angepasst werden kann (ALBERTI et al., 2005; www.idf.org, Zugriff am 21.08.05). Aufbauend auf frühere Definitionen der WHO und der NCEP ATP III ist diese neue Definition in der klinischen Praxis einfacher und schneller einzusetzen. Der Einsatz einer allgemein gültigen Definition würde auch die Problematik der Vergleichbarkeit von verschiedenen Studien und von verschiedenen ethnischen Gruppen beheben. Als Nachteil dieser Definition kann gesehen werden, dass Personen mit einer verschlechterten Glukosetoleranz aufgrund des nicht vorgesehenen oralen Glukosetoleranztests nicht unter diese Definition fallen würden (ALBERTI et al., 2005).

Tab.1. Elemente des Metabolischen Syndroms, Definition der IDF 2005 (ALBERTI et al., 2005).

<i>Metabolische Störung</i>	<i>Parameter</i>
Zentrale Adipositas	BMI $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ und/ oder WHR für Europa Frau: $\geq 0,80 \text{ cm}$ Mann: $\geq 0,94 \text{ cm}$
<i>Plus zwei weitere metabolische Störungen</i>	<i>Parameter</i>
Erhöhte Blutdruckwerte	Systolisch: $\geq 130 \text{ mm Hg}$ Diastolisch: $\geq 85 \text{ mm Hg}$
Erhöhte Triglyceridwerte	Triglyceride $> 150 \text{ mg/dL}$
Reduzierte HDL-Cholesterolvere	HDL-Cholesterol Frau: $< 40 \text{ mg/dL}$ Mann: $< 50 \text{ mg/dL}$
Insulinresistenz	Nüchtern Plasmaglukose $\geq 100 \text{ mg/dL}$

Das Met. Syn. hat multifaktorielle Ursachen. Hierbei handelt es sich sowohl um genetische, als auch um verschiedene umweltbedingte Ursachen (SPRANGER et al., 2003). Die Ernährungs- und Verhaltensmuster der Bevölkerung der westlichen Industriestaaten wie Hyperalimentation und Bewegungsmangel scheinen die Hauptfaktoren der zunehmenden Häufigkeit des Met. Syn. zu sein. Die Behandlung zielt meist auf die Verbesserung der Insulinresistenz und der Adipositas ab. Zur primären Intervention zählt nach der IDF eine moderate Kalorienreduktion und eine moderat erhöhte physische Aktivität (www.idf.org, Zugriff am 21.08.05).

Bei der Entwicklung von Stoffwechselstörungen spielt die Körperfettverteilung eine wichtige Rolle. Mit fortschreitendem Alter ist ein progressiver Trend zur Entwicklung einer abdominalen Adipositas zu sehen. Die abdominale Adipositas (subkutan, androide Form) steht im Zusammenhang mit einem gehäuften Auftreten von verschiedenen Stoffwechselstörungen wie Hypertonie und Diabetes Mellitus. Diese Komponenten des Met. Syn. treten bei der gynoiden (peripheren) Körperfettverteilung seltener auf. Eine ansteigende waist-to-hip-ratio ist ebenso mit ansteigenden Plasmainsulinspiegeln, Glukoseintoleranz und Hypertriglyceridämie eng korreliert (GRUENEWALD und MATSUMOTO, 2001; HIRSCH et al., 2001). Eine Studie aus Finnland aus dem Jahre 2001 hat gezeigt, dass das Auftreten von T2DM bei vorhandener Adipositas durch eine Gewichtsreduktion von 4,7% um 58% reduziert werden konnte. Insulinresistenz, Bluthochdruck und Dislipidämie konnten ebenfalls signifikant reduziert werden (Vgl. TUOMILEHTO et al., 2001 aus HOEFNER, 2003). Dies bestätigt nochmals, dass eine enge Korrelation zwischen dem Anstieg der Adipozytengröße, der abdominalen Körperfettverteilung, der Insulinresistenz und der Insulinplasmaspiegel besteht. Der Mechanismus, der über eine Erhöhung der Zellgröße zur Insulinresistenz führt, die Plasaminsulinspiegel ansteigen lässt und den Glukosestoffwechsel stört, ist noch nicht genau bekannt (HIRSCH et al., 2001).

2.1.1 Adipogenese und Adipositas

In der 15. Schwangerschaftswoche beginnt die Entwicklung des Fettgewebes bei dem Fötus. Bis zur 23. Woche nimmt die Anzahl der Fettzellen schnell zu. Danach erfolgt die Entwicklung des Fettgewebes nur noch langsam bis zum Ende der Schwangerschaft. Während der ersten beiden Lebensjahre wächst das Fettgewebe durch Erhöhung der Adipozytenanzahl und der Adipozytengröße. Zwischen dem 2. Lebensjahr und dem Beginn der Pubertät nimmt die Zellanzahl nur noch langsam zu. Während der Adoleszenz erhöht sich die Adipozytenanzahl noch einmal stark. Durch diesen zweiten Anstieg kommt es zu einem verstärkten Wachstum des Fettgewebes. Ab diesem Zeitpunkt bleibt das Fettgewebe und das damit zusammenhängende Gewicht des Menschen in den folgenden Jahren relativ stabil. Die Anzahl der Adipozyten bleibt konstant, jedoch kann sich die Adipozytengröße verändern. Der Lipidgehalt je Zelle kann zwischen 0,14 und 0,68µg variieren. Kleine Veränderungen der Adipozytengröße äußern sich in moderaten Gewichtsveränderungen (HIRSCH et al., 2001). Bei übergewichtigen Menschen werden größere Expansionen des Fettgewebes beobachtet. Es kann zu Veränderung der Adipozytengröße (Hypertrophie obesity) oder zu Veränderung der Adipozytengröße und der Adipozytenanzahl (Hyperplasie-Hypertrophie obesity) kommen (HIRSCH et al., 2001; KARLSON, 1994, S. 395). Hyperplasie tritt vorrangig bei Fettsucht (Obesity) vor dem 20. Lebensjahr auf. Die später auftretende Fettsucht geht meistens mit einer normalen Zellanzahl aber stark vergrößerten Adipozyten einher. Die maximale Zellgröße wird in der Literatur mit 1,0-1,2µg Lipidgehalt je Zelle angegeben. Es kann aber auch bei Erwachsenen mit extremer Adipositas nach dem 20. Lebensjahr zu einer Hyperplasie kommen. Eine normale Gewichtsreduktion geht nach derzeitigem Wissensstand nur mit einer Veränderung der Zellgröße, aber nicht mit einer Verringerung der Zellanzahl einher (HIRSCH et al., 2001).

Die Referenzwerte zum Körpergewicht Erwachsener werden über repräsentative Angaben für die Körpergröße mit der Formel des Body Mass Index (BMI) berechnet.

$$\text{BMI} = \text{Körpergewicht [kg]} / \text{Quadrat der Körperlänge [m}^2\text{]}$$

(Vgl. SCF 1993, zitiert nach REFERENZWERTE FÜR DIE NÄHRSTOFFZUFUHR 2001, S.24)

Eine Adipositas liegt vor, wenn der BMI $\geq 30\text{kg/m}^2$ (BERGMANN und MENSINK, 1999) ist oder, wenn der Anteil des Fettgewebes am Gesamtkörpergewicht bei Männern mehr als 20% und bei Frauen mehr als 25% beträgt (KARLSON, 1994, S. 395). Das Fettgewebe macht beim normalgewichtigen Menschen ca. 12% des Körpergewichtes aus (LÖFFLER, 1999, S.638).

Langkettige Fettsäuren (Long chain fatty acids, LCFA) adaptieren als ein Faktor die Körperfettmasse an nutritive Veränderungen. Diese Regulierung findet u.a. über die Expression bestimmter Zielgene des Lipidmetabolismus via Nuklearrezeptoren statt. Der Nuklearrezeptor PPAR γ spielt u.a. bei der Adipogenese eine zentrale Rolle. PPAR γ leitet nach Exposition von TZDs oder LCFA die Differenzierung der Fibroblasten zu Adipozyten ein (BASTIE et al., 2000). Die Adipozytendifferenzierung ist nicht identisch mit der Entstehung von Fettsucht. Fettsucht ist primär eine Störung der Energiebalance, wobei die Energieaufnahme den Energieverbrauch übersteigt. Ein Anstieg der Fettzellanzahl kann

zu Fettsucht führen. Hierbei muss es aber nicht zu einer Insulinresistenz kommen. Bei einer erhöhten Adipozytendifferenzierung und keiner gleichzeitig erhöhten Energieaufnahme kommt es zu einer erhöhten Anzahl kleiner Adipozyten, die insulinsensitiver sind (SPIEGELMAN, 1998).

Das Fettgewebe hat die Fähigkeit, überschüssige Kalorien nach einer Mahlzeit in Form von Triglyceriden zu speichern. Es besteht zu 95% aus Triglyceriden (LÖFFLER, 1999, S.638). Die Reveresterung zu Triglyceriden (TG) wird durch nutritive, neurale und hormonelle Faktoren reguliert (AHIMA und FLIER, 2001). Das Fettgewebe spielt durch den Wechsel zwischen Lipogenese und Lipolyse eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Stoffwechsels (LÖFFLER, 1999, S.638).

Neben der Aufgabe als Lipidspeicher übt das Fettgewebe endokrinologische Aktivitäten aus. Es synthetisiert und sezerniert eine Vielzahl metabolisch aktiver Signalmoleküle, die sogenannten Adipozytokine und inflammatorischen Zytokine. Es handelt sich um verschiedene Hormone und Zytokine, die den Stoffwechsel und die Energiehomöostase beeinflussen können. Wichtig sind z.B. Leptin, Resistin, Adiponectin und der Tumornekrose-Faktor α (TNF- α) (SALTIEL und KAHN, 2001; AHIMA und FLIER, 2001; SPRANGER et al., 2003). Die Expression von TNF- α steigt im Fettgewebe von fettleibigen Menschen an. Es konnte nachgewiesen werden, dass TNF- α die Serin-Phosphorylierung vom Insulinrezeptor-Substrat-1 (IRS-1) bewirkt. Dieses führte zu einer verringerten Insulinrezeptorkinaseaktivität und zur Insulinresistenz (Vgl. HOTAMISLIGIL, et al. 1996, aus SALTIEL und KAHN, 2001).

2.1.2 Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes Mellitus

Die Klassifikation des Typ 2 Diabetes Mellitus nach der American Diabetes-Gesellschaft (ADA) von 1997 wurde 2000 von der WHO und der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) im Konsensus bestätigt und in dieser Leitlinie übernommen. Ein T2DM wird demnach klassifiziert als eine vorwiegende Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel, der sich bis zu einem vorwiegend sekretorischen Defekt mit Insulinresistenz erstrecken kann (nach ADA, 1997, EK IV; Vgl. Alberti et al., 1998b, EK IV aus Kerner et al., 2004).

Tab.2. Diagnostische Kriterien des Diabetes Mellitus (nach ADA, 1997, EK IV; Vgl. Alberti et al., 1998b, EK IV, Härtegrad A aus KERNER et al., 2004).

<i>Plasmaglukose venös (mg/dl)</i>	<i>Nüchtern</i>	<i>2h-OGTT</i>
Diabetes mellitus	≥ 126	und/oder ≥ 200

T2DM ist eine multifaktorielle metabolische Störung, bei der Insulinresistenz und eine gestörte Insulinsynthese im Vordergrund der Pathogenese stehen (KIMMEL und INZUCCHI, 2005; SALTIEL und KAHN, 2001). Es müssen beide Komponenten mehr oder weniger stark ausgeprägt zusammentreffen, damit sich die Krankheit entwickeln kann (STUMVOLL et al., 2002). Die periphere Insulinresistenz ist ein Defekt der Signaltransduktion. Insulinresistenz liegt vor, wenn die normalen physiologischen Konzentrationen im Blut zur Erfüllung ihrer Funktion im Stoffwechsel nicht ausreichen (PESSIN und SALTIEL, 2000). Sie äußert sich vorwiegend in einer Verschlechterung der peripheren Glukoseaufnahme und der Glukoseverstoffwechslung (utilization) der Skelett-

muskulatur und des Fettgewebes sowie in einer erhöhten endogenen Glukoseproduktion und Glukoseausschüttung der Leber (KAHN und FLIER, 2000).

Shulman führte 2000 folgende Evidenzen für die zentrale Rolle der Insulinresistenz bei der Entstehung von T2DM auf:

- (a) die Insulinresistenz tritt schon 10-20 Jahre vor Erkennung der Krankheit auf
- (b) die Insulinresistenz ist ein konstantes Merkmal bei Patienten mit T2DM
- (c) prospektive Studien haben gezeigt, dass Insulinresistenz der beste Indikator für die Pathogenese einer späteren Diabetes ist.

Die β -Zellen der Langerhans'schen-Inseln des Pankreas können die Insulinresistenz über eine längere Zeit durch eine vermehrte Insulinsynthese ausgleichen. Es kommt zur Hyperinsulinämie. Sobald die gesteigerte Insulinsekretion den erhöhten Insulinbedarf nicht mehr ausgleichen kann, entsteht eine gestörte Glukosetoleranz (SPRANGER et al., 2003). Durch einen fortschreitenden Funktionsdefekt der Inselzellen und einem eventuellen Masseverlust der β -Zellen kommt es zur gestörten Insulinsynthese und zur Abnahme der Insulinsekretion (KIMMEL und INZUCCHI, 2005). Es entwickelt sich ein manifester Diabetes Typ 2 (SPRANGER et al., 2003). Daten aus der U.K. Prospective Diabetes Study (UKPDS) lassen vermuten, dass bei neu diagnostizierten Typ 2 Diabetikern ein ca. 50% iger β -Zellfunktionsverlust vorliegt. In verschiedenen Studien, wie der UKPDS, konnte eine signifikante Reduktion der mikrovaskulären Schäden bei einer engmaschigen Glukosekontrolle gezeigt werden (KIMMEL und INZUCCHI, 2005).

2.2 Insulin

2.2.1 Aufbau

Insulin zählt zu den hydrophilen Peptidhormonen. Es wird in den β -Zellen der Langerhans'schen-Inseln des Pankreas gebildet (PESSIN und SALTIEL, 2000).

Das Präpro-Insulin (bestehend aus 104 Aminosäuren, AS) trägt ein Signalpeptid, welches die Peptidkette ins Innere des Endoplasmatischen Retikulum führt und dort abgespalten wird. Nach Faltung des Moleküls werden drei Disulfid-Brücken gebildet. Diese noch inaktive Vorstufe, das Pro-Insulin (84 AS), wird in dem Golgi-Apparat in Vesikeln, den sogenannten β -Granula, verpackt und gelagert. Bei Bedarf werden die Reste (31-63 AS), das C-Peptid, proteolytisch abgespalten. Durch die Abspaltung des C-Peptids wird das reife Insulin (51 AS), bestehend aus einer A- und einer B-Kette, gebildet. Es wird in Form von zinkhaltigen Hexameren im Pankreas bis zur Ausschüttung gespeichert (KOOLMAN und RÖHM, 2003, S.76/77 und S.160/161).

2.2.2 Insulinrezeptor und Insulinkaskade

Die Insulinwirkung setzt sich aus einer Kaskade verschiedener Prozesse zusammen, die zu einem erhöhten Glukosetransport (Ras-unabhängiger Signalweg) und zu einer

Aktivierung der Ras/Map Kinase (Ras-abhängiger Signalweg) führt (HOLMAN und KASUGA, 1997).

Der Insulinrezeptor gehört zur Subfamilie der Tyrosinkinase-Rezeptoren. Zu dieser Familie gehört auch der „Insulin-like growth factor-1-Receptor“ und der „Insulin Receptor-related-Receptor“ (SALTIEL und KAHN, 2001). Der Insulinrezeptor sitzt auf der Zelloberfläche der Zielzelle und besteht aus zwei α -Untereinheiten und zwei β -Untereinheiten, die über Disulfidbindungen ein $\alpha_2\beta_2$ heterotetrameres Glycoprotein bilden (SALTIEL und KAHN, 2001; HOLMAN und KASUGA, 1997; HERS und TAVARÉ, 2005). Der Insulinrezeptor bildet eine Tyrosinkinase, die Phosphatgruppen vom Adenosintriphosphat (ATP) auf Tyrosinreste der intrazellulären Domäne überträgt. Die α -Untereinheit hemmt die Tyrosinkinase Aktivität der β -Untereinheit (SALTIEL und KAHN, 2001). Durch die Bindung des Insulins an der Insulinbindungsstelle auf der extrazellulären α -Untereinheit kommt es zur Aktivierung der Tyrosinkinase der intrazellulären β -Untereinheit. Es folgt die Phosphorylierung spezifischer Tyrosylreste der β -Untereinheiten (HOLMAN und KASUGA, 1997; SALTIEL und KAHN, 2001). Die Bindung von Insulin steigert die Tyrosinkinase-Aktivität der Rezeptor-Proteinkinase in der intrazellulären Domäne und führt zur Autophosphorylierung des Rezeptors und zur Phosphorylierung von Rezeptorsubstraten an spezifischen Tyrosinresten. Die Tyrosinkinaseaktivität ist essentiell für die weitere Insulinkaskade (HOLMAN und KASUGA, 1997). Über SH2-Domänen dockt das IRS-1 an die β -Untereinheiten an, was zur Phosphorylierung spezifischer Tyrosylresten von IRS-1 führt (SALTIEL und KAHN, 2001). Vom IRS-1 ausgehend folgen über die Bindung der SH2-Domänen der verschiedenen Signalproteine, unterschiedliche Signaltransduktionsvorgänge, die im Einzelnen noch nicht genau erforscht sind (LÖFFLER, 1999, S.491).

An das phosphorylierte IRS kann das Adapterprotein Grb-2 und SOS („son of sevenless“) binden und das G-Protein Ras aktivieren. Ras aktiviert die Protein-Kinase Raf. Es kommt über die Phosphorylierung der Kinasen MAPKK MEK und MAPK („mitogen activated protein kinase“) zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren im Zellkern, die zur Expression bestimmter Gene führen (KOOLMAN und RÖHM, 2003, S.388). Der IRS/Raf/MAPKK/MAPK-Signalweg wird nicht für die Translokation von GLUT4 benötigt.

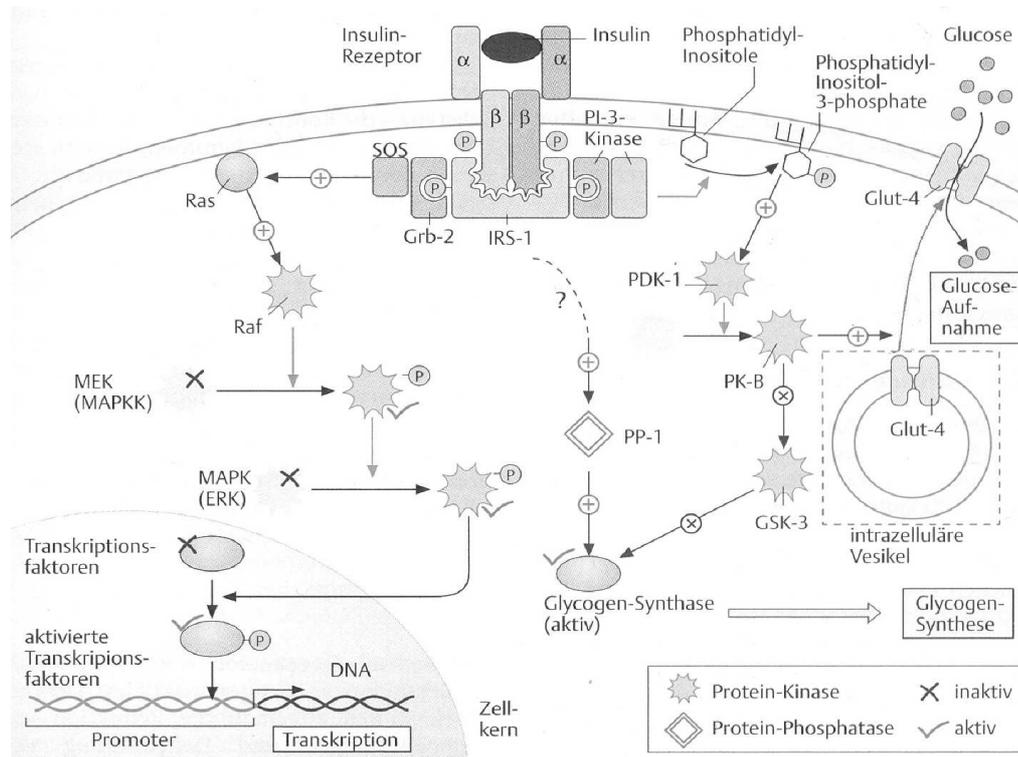


Abb.1. Übersicht über die Insulinkaskade (KOOLMAN und RÖHM, 2003, S.389).

An das phosphorylierte IRS kann nicht nur Grb-2 binden, sondern auch ein dimeres Adapterprotein, welches zu einer Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI 3-Kinase) aktiviert wird. Hierbei bindet die p85 regulatorische Untereinheit der PI 3-Kinase an IRS-1 und aktiviert die katalytische Untereinheit p110 der PI 3-Kinase (KOHN et al., 1996). Die $p21^{ras}$ und die p85/p110-type PI 3-Kinase sind wichtige Elemente in der Insulinkaskade, da sie wahrscheinlich einen direkten Einfluss auf die GLUT4 Translokation besitzen (CZECH und CORVERA, 1999). Die PI 3-Kinase Untereinheit p110 katalysiert die Phosphorylierung der Membranphospholipide Phosphoinositide an der 3' Position des Inositolringes (KOHN et al., 1996). An dessen Reaktionsprodukte bindet sich die Proteinkinase PDK-1. PDK-1 wird dadurch aktiviert und aktiviert die Proteinkinase C (PK-C) mit ihren Isoformen PK-Czeta und PK-Clambda. Diese scheinen auch einen direkten Einfluss auf die GLUT4 Regulation zu besitzen (CZECH und CORVERA, 1999). Es aktiviert weiterhin die Proteinkinase B (PK-B) (KOOLMAN und RÖHM, 2003, S.388). PK-B kommt in drei Isoformen vor, PK-B α , PK-B β und PK-B γ . PK-B α wird hauptsächlich durch Insulin in Muskelzellen, Hepatozyten und Adipozyten aktiviert. Die aktivierte membranständige PK-B wird von der Membran abgelöst und stimuliert die Glukoseaufnahme. Es führt zur Verschmelzung der intrazellulären GLUT4 Vesikel mit der Plasmamembran. Diese insulinstimulierte Translokation (trafficking, docking and fusion, (SALTIEL und KAHN, 2001)) führt zu einem Einbau der Glukosetransporter in die Plasmamembran und zu einer erhöhten Glukoseaufnahme in die Zelle (KOOLMAN und RÖHM, 2003, S.388). Insulin erhöht so die Exozytoserate und senkt die Endozytoserate von GLUT4. Es ist noch nicht genau bekannt, auf welche Weise die verschiedenen Proteinkinasen die GLUT4 Translokation genau beeinflussen.

Durch die Aktivierung des Insulinrezeptors kommt es wahrscheinlich parallel zur Phosphorylierung der Signalproteine Shc und Cbl an den spezifischen Tyrosinresten

(SALTIEL und KAHN, 2001). Das Cbl Proto-oncoprotein bindet an das Adapterprotein CAP (Cbl-associated protein). CAP scheint ebenfalls eine wichtige Rolle bei der GLUT4 Translokation zu spielen. Es wird während der Adipozytendifferenzierung induziert und u.a. durch PPAR γ Agonisten der TZD Familie reguliert (PESSIN und SALTIEL, 2000; SALTIEL und KAHN, 2001).

2.2.3 Aufgabe und Funktion

Die primäre Funktion des anabolen Hormons Insulin besteht in der Regulierung der Glukosehomöostase (PESSIN und SALTIEL, 2000). Der Plasmaglukosewert pendelt bei gesunden Individuen in dem Bereich zwischen 4-7mM (SALTIEL und KAHN, 2001). Nach einer kohlenhydrat- und/oder proteinreichen Mahlzeit steigt die Insulinausschüttung als Reaktion auf den ansteigenden Blutzucker- und Aminosäurespiegel an (PESSIN und SALTIEL, 2000).

Insulin reduziert die hepatische Glukoseproduktion und Glukoseausschüttung durch Hemmung der Gluconeogenese und der Glykogenolyse. Es steigert die Glukoseaufnahme in die Zelle durch Stimulierung der Translokation des Glukosetransporters GLUT4 von der intrazellulären Seite zur Zelloberfläche (SALTIEL und KAHN, 2001). Bis zu 75% der insulinabhängigen Glukoseverwertung findet in der Skelettmuskulatur statt und nur ein kleiner Anteil im Fettgewebe (SHULMAN, 2000; SALTIEL und KAHN, 2001). Darüber hinaus steigert es die Glykogensynthese in der Zelle durch Aktivierung der Glykogensynthase über Dephosphorylierung. Insulin beeinflusst den Glukosestoffwechsel auch indirekt über die Veränderung der Freisetzung der freien Fettsäuren ((Free) fatty acids, (F)FA) aus dem Fettgewebe (SALTIEL und KAHN, 2001).

Insulin beeinflusst den Lipidstoffwechsel. Es steigert die Lipidsynthese in der Leber und den Adipozyten. Insulin hemmt die Lipolyse und reduziert die Freisetzung von FFAs aus TG in Muskelzellen und Adipozyten (PESSIN und SALTIEL, 2000). Es hemmt die Lipolyse in den Adipozyten durch Hemmung der hormonsensitiven Lipase (SALTIEL und KAHN, 2001; KOOLMAN und RÖHM, 2002, S.380). Insulin induziert die Lipoproteinlipase, wodurch FAs aus triglyceridreichen Lipoproteinen (VLDL, Chylomikrone) im Blutkreislauf hydrolysiert und vom Muskel- und Fettgewebe aufgenommen werden können (LÖFFLER, 1999, S.639; HOEFNER, 2003).

Für die antilipolytische Wirkung wird weniger Insulin benötigt als für den Glukosetransport in die Zelle. Aus diesem Grund ist bei vorliegender Insulinresistenz der Glukosetransport verschlechtert, wobei der insulinabhängige antilipolytische Effekt erhalten bleibt. Die Fettspeicher bleiben erhalten und können weiter expandieren (KAHN und FLIER, 2000).

Insulin steigert darüber hinaus die Proteinsynthese und hemmt den Proteinabbau (SALTIEL und KAHN, 2001).

Somit agiert Insulin als einziges anaboles Hormon als Gegenspieler der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin sowie des Glukagons (LÖFFLER, 1999, S.494).

Es bewirkt nicht nur die Verstoffwechslung der verschiedenen Nährstoffe, sondern spielt auch eine wichtige Rolle bei der Differenzierung des Fettgewebes. Insulin ist für viele Zellen (z.B. Fibroblasten) ein Wachstumsfaktor. Wenn es kontinuierlich auf die Zellen einwirkt, werden in einem lang anhaltenden Effekt diejenigen Enzyme verstärkt

synthetisiert, die u.a. für die Triacylglyceridsynthese in Fettgewebszellen benötigt werden (KAHN und FLIER, 2000). Insulin bewirkt wahrscheinlich auch eine Veränderung des für die Differenzierung wichtigen Faktors PPAR γ (SPIEGELMAN und FLIER, 1996). Zusammen mit weiteren Transkriptionsfaktoren wird die Adipogenese gesteigert.

Die vielseitige Wirkungsweise des Insulins kann wie folgt zusammengefasst werden:

- Regulierung der Translokation des insulinabhängigen Glukosetransporters
- Enzymaktivierung und Inaktivierung durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung
- Induktion der Genexpression, was insgesamt zur Regulierung der anabolen Stoffwechselwege führt

Die schnelle Insulinwirkung entsteht über Interkonversion. Die langsame Wirkung erfolgt über die Transkriptionskontrolle durch Regulierung der Induktion bzw. Repression (KOOLMAN und RÖHM, 2003, S.120).

Insulinresistenz oder Insulinmangel führt zu einer Disregulierung dieser Prozesse (SALTIEL und KAHN, 2001).

2.3 Glukosetransport/ -er und Glukosestoffwechsel

2.3.1 Glukosetransporter (GLUT1 und GLUT4)

Die Konstanz der Glukosekonzentration im Blut erfordert eine Regulierung des Stoffwechsels auf verschiedenen Ebenen (LÖFFLER, 1999, S.123).

Im Organismus sind alle Zellen, mit Ausnahme der für die Glukoseresorption zuständigen Enterozyten und der von der Pfortader versorgten Hepatozyten, auf eine extrazelluläre Glukosekonzentration von etwas 5mM angepasst (LÖFFLER, 1999, S.123).

Glukose ist als polare, lipophobe Verbindung für die einfache Diffusion über die Doppellipidschicht der Plasmamembran impermeabel (KARLSON, 1994, S.327). Der Glukosetransport erfolgt durch integrale Membranprotein-Isomere mit unterschiedlicher Organverteilung (KOOLMAN und RÖHM, 2003, S. 220).

Tab.3. Glukosetransporter-Isoformen (LÖFFLER, 1999, S.125, modifiziert).

<i>Isomer</i>	<i>Lokalisation</i>	<i>Funktion</i>
GLUT1	Viele fetale und adulte Gewebe; Erythrozyten und Endothelzellen	Basale Glukoseversorgung vieler Gewebe
GLUT2	Hepatozyten, β -Zellen der Langerhans'schen -Inseln des Pankreas, Epithelzellen der Niere und des Intestinaltraktes	Transepithelialer Transport. Hepatische Glukoseaufnahme
GLUT3	Viele Gewebe, besonders Zentrales Nervensystem	Basale Glukoseversorgung; Glukoseaufnahme aus der cerebrospinalen Flüssigkeit
GLUT4	Skelettmuskulatur, Fettgewebe	Insulinabhängiger Glukoseumsatz des Organismus
GLUT5	Intestinaltrakt, Spermatozoen, in geringem Umfang in anderen Geweben	Fruktosetransport
GLUT7	Leber	Glukosetransport bei Gluconeogenese

Durch Transportsysteme werden die Membranen selektiv durchlässig (KARLSON, 1994, S.327). Die Carrier binden die Glukose auf der extrazellulären Membranseite, und nach einer Konformationsänderung trennen sie sich intrazellulär wieder ab. Wie bei der einfachen Diffusion ist für diesen Uniport der Glukose ein Konzentrationsgradient notwendig. Diese erleichterte Diffusion ist spezifisch für strukturell ähnliche Stoffe und sättigbar (SILBERNAGL und DESPOPOULOS, 2001, S.22-23; KARLSON, 1994, S.327). Der pyranoide Sechsring und die Hydroxygruppen am C-1 und am C-2 Atom des Zuckers sind wichtig für die Affinität zum Carrier (KASPER, 1994, S.329). Die Glukose-Transporter haben unterschiedliche Affinitäten für Glukose. Für die insulinstimulierte Glukoseaufnahme spielt der insulinabhängige Glukosetransporter GLUT4 eine wichtige Rolle. Er hat einen Kd-Wert von 5mM, was einer mittleren bis hohen Affinität für Glukose entspricht (KOOLMAN und RÖHM, 2003, S.220).

Im basalen Zustand zirkuliert GLUT4 in Vesikeln langsam zwischen der Zellmembranoberfläche und verschiedenen intrazellulären Kompartimenten (PESSIN et al., 1999; PESSIN und SALTIEL, 2000; SALTIEL und KAHN, 2001). Insulin induziert im Fettgewebe und in der Muskulatur den Glukosetransporter GLUT4 (LÖFFLER, 1999, S.492). Die Aktivierung der Insulinrezeptoren führt zu einem starken Anstieg der GLUT4-Vesikel-Exozytose und zu einem geringen Abfall der Internalisationsrate durch Endozytose. Es kommt zu einem Anstieg der GLUT4 steady-state Konzentration auf der Plasmamembranoberfläche, wodurch der Glukoseeinstrom katalysiert wird. Die Stimulierung der Exozytose durch Insulin ist vermutlich der wichtigste Schritt der GLUT4 Translokation, was allein durch die Hemmung der Endozytoserate nicht zu erreichen wäre (PESSIN et al., 1999). Die Aktivierung der PI 3-Kinase könnte in dem Prozess der Insulinkaskade das Ablösen

von GLUT4 aus dem intrazellulären tubulo-vesikulären System steigern oder das Andocken an die Plasmamembran erleichtern (HOLMAN, 1997). Die genaue Wirkungsweise der PI 3-Kinase ist jedoch noch nicht bekannt (PESSIN und SALTIEL, 2000).

GLUT1 ist ebenfalls an dem Transport der Glukose in Fett- und Muskelzellen beteiligt. Das ubiquitäre GLUT1 reguliert die basale, insulinunabhängige Glukoseaufnahme (XU et al., 2001). Durch Insulin wird die Lokalisation von GLUT1 in der Plasmamembran nur gering verändert (PESSIN et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass GLUT1 und GLUT4 in der Entwicklungsphase der gestreiften Muskulatur und des braunen Fettgewebes unterschiedlich stark expremiert werden. Bei der Maus ist im fetalen und früh postnatalen Stadium hauptsächlich GLUT1 der Transporter. Nach der Geburt wird GLUT4 stark expremiert und GLUT1 runterreguliert. GLUT4 ist in Preadipozyten nicht nachweisbar. Es wird während der Differenzierung zum Adipozyten verstärkt expremiert (WU et al., 1998). Die GLUT4 Spiegel sind im Fettgewebe und in der gestreiften Skelettmuskulatur signifikant höher als die GLUT1 Spiegel (PESSIN et al., 1999). Die Reifung der Adipozyten geht mit einer Steigerung der Insulinsensitivität einher (TAMORI et al., 2002; WU et al., 1999). Dieses konnte auch in den nachfolgenden Versuchen anhand der Messung der Glukoseaufnahme belegt werden (siehe Ergebnisse).

2.3.2 Glukosestoffwechsel im Adipozyten

In den Adipozyten wird Glukose über die Glykolyse abgebaut und hauptsächlich in Form von Lipiden gespeichert (SALTIEL 2001; DOMAGK, 1999, S.170). Glukose diffundiert über GLUT4 in den Adipozyten. Hier wird es über die Glykolyse zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert. Glukose-6-Phosphat wird zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) abgebaut und durch die α -Glycerophosphatdehydrogenase zu α -Glycerophosphat reduziert. Über diesen Weg liefert es den Kohlenstoff für den Glycerinanteil der Triacylglycerine. Die Fettsäuren zur Triacylglycerinsynthese stammen hauptsächlich aus der Hydrolyse triglyceridreicher Lipoproteine im Blut. Im Adipozyten reagiert das α -Glycerophosphat mit drei Fettsäuren, die vorher zu Acyl-CoA aktiviert wurden. Durch diese Veresterung entsteht das Speicherfett Triacylglycerin (LÖFFLER, 1999, S.639).

Die Glukose kann auch im Verlauf der Glykolyse über das aktivierte Glukose-6-Phosphat zu Pyruvat und weiter zu Acetyl-CoA abgebaut werden und als Substrat in die Fettsäurebiosynthese eingeschleust werden. Dieser Stoffwechselweg ist bei der heute üblichen fettreichen Ernährung von untergeordneter Bedeutung, da die Acetyl-CoA-Carboxylase und die Fettsäuresynthase runterreguliert sind (LÖFFLER, 1999, S.639). Das Glycerol-3-Phosphat kann nicht aus Glycerol gebildet werden, da in Adipozyten ein Mangel der Glycerolkinase (Gyk) vorliegt (GUAN et al., 2002).

Bei einer insulinstimulierten Glukoseaufnahme in Adipozyten, wie es in den vorliegenden Versuchen durchgeführt wurde, ist mit einer erhöhten Triacylglycerinsynthese aus Glukose zu rechnen (LÖFFLER, 1999, S.639).

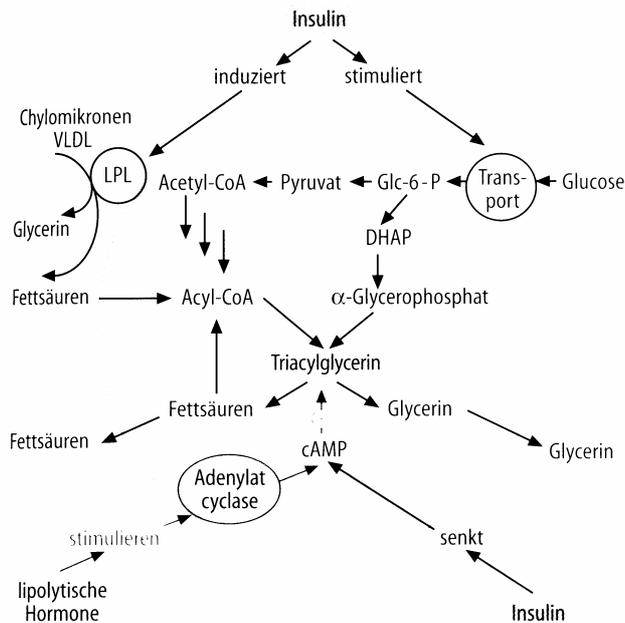


Abb.2. Mechanismus der Lipolyse und Lipogenese in der Fettzelle (LÖFFLER, 1999, S.639).

2.3.3 Gestörter Glukosestoffwechsel im Adipozyten

In der Studie von Shulman (2000) wurde mit Hilfe der „Nuclear magnetic resonance spectroscopy“ (NMR) die Konzentration von intrazellulären Metaboliten gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass unter hyperglykämischen und hyperinsulinämischen Bedingungen die Synthese von Glykogen der zentrale Stoffwechselweg der Glukose im Muskel ist. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein Glykogensynthesedefekt, z.B. durch einen Defekt der Glykogensynthase, der Hexokinase oder der Glukosetransporter, eine zentrale Rolle bei der Entstehung der Insulinresistenz in Patienten mit T2DM spielen könnte. Die intrazelluläre Glukose ist ein intermediärer Metabolit zwischen dem Glukosetransport und der Glukosephosphorylierung. Die Konzentration der Glukose ist somit ein Indikator für die relative Aktivität von GLUT4 und der Hexokinase-II. Bei der Pathogenese von T2DM scheint die Aktivität einer oder beider Stoffwechselwege der Glukose in der Zellen gestört zu sein. Anhand der Daten von Shulman ist anzunehmen, dass der Glukosetransport der limitierende Stoffwechselschritt für die Synthese von Glykogen bei Typ 2 Patienten ist. Das würde heißen, dass eine Verbesserung des Glukosetransports und nicht der Hexokinase- oder der Glykogensynthaseaktivität die Insulinsensitivität bei Patienten mit T2DM verbessern würde.

Ein weiterer wichtiger Faktor, der die Insulinsensitivität und somit auch den Glukosestoffwechsel negativ beeinflussen kann, sind erhöhte FFAs im Plasma. Wie die erhöhten FFA-Spiegel mit der Insulinresistenz direkt im Zusammenhang stehen, ist noch nicht genau aufgeklärt. Es konnte z.B. in dem Modell von Randle et al. (1963) über den „Glucose fatty acid cycle“ gezeigt werden, dass durch erhöhte FFA-Konzentrationen im Plasma über weitere Stoffwechselwege die Phosphofruktokinase, das Schlüsselenzym der Glykolyse, gehemmt und somit die Glykolyse gestoppt wird. Daraus folgt eine Akku-

mulierung des Glukose-6-Phosphats. Dieses würde die Hexokinase-II-Aktivität hemmen und zu einem Anstieg der intrazellulären Glukosekonzentration führen. Als Folge davon würde die Glukoseaufnahme abfallen (Vgl. RANDLE et al., 1963 aus SHULMAN, 2000). Ein anderes Modell z.B. von Shulman (2000) setzt direkt an der Insulinkaskade an. Es führt vor, wie die intrazellulären FFAs aus dem Plasma den Glukosetransport über Störung der „upstream“ Insulinsignalkaskade vermindern könnten und die Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran über diesen Prozess verringert werden würde.

2.4 Peroxisome Proliferator Activated Receptors (PPARs)

2.4.1 Übersicht

1990 wurde von Issemann und Green ein neues Mitglied der Steroid Hormon Rezeptor Superfamilie, der durch Peroxisome Proliferatoren aktiviert wird, geklont. Es handelt sich hierbei um die ligandenabhängigen Transkriptionsfaktoren Peroxisome Proliferator Activated Receptors (PPARs). Diese Entdeckung von PPAR sollte helfen, den Mechanismus des hypolipidämischen Effekts auf die Entstehung von Hepatokarzinogenen aufzuklären (ISSEMANN und GREEN, 1990).

PPARs bilden eine Subfamilie, die zur Superfamilie der Nuklearrezeptoren gehören. Zu dieser Superfamilie gehören die Thyroid-/ Steroid-Rezeptoren (DESVERGNE und WAHLI, 1999). Schon von Issemann und Green (1990) wurde bei dem Vergleich der Aminosäuresequenz von PPAR eine große Übereinstimmung mit anderen Mitgliedern der Steroid Hormon Superfamilie entdeckt, wie z.B. mit dem humanen Retenoic-acid Receptor alpha (hRAR α), dem humanen D3 Rezeptor (hVD3R) aber auch mit dem Drosophila Ecdysone-inducible Receptor. Die Aminosäuresequenzübereinstimmung liegt bei allen Spezien zwischen 96- 98% (HOUSEKNECHT et al., 2002).

PPARs müssen, um als Transkriptionsfaktor aktiv werden zu können, ein Heterodimer mit dem Retinoid-Rezeptor (RXR) bilden. Nur so können sie an dem spezifischen Peroxisome Proliferate Response Element (PPRE) der DNA binden (BERGER und MOLLER, 2002). Beide Rezeptoren können die Transkriptionsaktivität regulieren, indem sie mit einem Liganden interagieren und aktiviert werden.

PPARs spielen über die Expression bestimmter Zielgene eine wichtige Rolle bei verschiedenen zellulären Prozessen wie dem Lipidmetabolismus, der Glukosehomöostase, der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung, der Adipogenese, bei inflammatorischen Prozessen und der Immunantwort. Somit scheinen sie eine wichtige Rolle u.a. bei der Entstehung von Diabetes, Adipositas, Arteriosklerose und Krebs zu spielen (HOUSEKNECHT et al., 2002; BERGER und MOLLER, 2002; SEWTER und VIDAL-PUIG, 2002). Durch die Erforschung von pharmakologischen PPAR-Agonisten und -Antagonisten, sowie durch die fortlaufende Aufklärung der Wirkung von nutritiven PPAR-Agonisten, sind PPARs zu Schlüsselfaktoren bei der Suche nach neuen Antidiabetika zur Behandlung des T2DM geworden (KNOUFF and AUWERX, 2004; Xu et al., 2001).

2.4.2 Isoformen und Vorkommen

PPARs kommen in drei Isoformen vor, die von separaten Genen codiert werden: PPAR α , PPAR β und PPAR γ . Das humane PPAR α liegt auf dem Chromosom 22, PPAR β liegt auf dem Chromosom 6, und PPAR γ liegt auf dem Chromosom 3 (DESVERGNE und WAHLI, 1999). Durch den Vergleich der Kristallstruktur der Ligandenbindungsdomäne (LBD) der drei humanen PPARs konnten die Subtyp-Unterschiede bestimmt werden. Es handelt sich um eine Aminosäure, welche die Selektivität der Subtypen für TZD-Liganden ausmacht. Die Sequenz der LBD ist bei den PPAR Subtypen zu 60-70% identisch (XU et al., 2001).

PPAR γ liegt in drei Isoformen vor. Alle drei Isoformen werden von dem selben Gen codiert. Der Unterschied kommt durch drei verschiedene Promotoren zustande, die durch unterschiedliches Splicing und Unterschiede in ihren N-Termini drei verschiedene RNA Isoformen transkribieren: PPAR γ 1, PPAR γ 2 und PPAR γ 3. PPAR γ 2 hat im Vergleich zu γ 1 und γ 3 N-terminal 28 Aminosäuren mehr (SEWTER und VIDAL-PUIG, 2002).

Die Expression der PPAR-Isoformen ist gewebeabhängig. PPAR γ wird hauptsächlich im Fettgewebe und im Immunsystem exprimiert, wobei auch die Lokalisation der PPAR γ -Isoformen zu unterscheiden ist. PPAR γ 1 wird in vielen Geweben wie z.B. Herz, Lunge und Niere exprimiert, wobei PPAR γ 2 und PPAR γ 3 hauptsächlich im Fettgewebe (SPIEGELMAN und FLIER, 1996), Makrophagen und Darmepithelzellen vorkommen (SEWTER und VIDAL-PUIG, 2002). PPAR α wird hauptsächlich in Leber, Enterozyten und in der Niere exprimiert. PPAR β wird ubiquitär exprimiert (HOUSEKNECHT et al., 2002).

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt auf der Betrachtung von PPAR γ , da es in reifen Adipozyten in hohen Konzentrationen vorkommt (TAMORI et al., 2002). Die Expression von PPAR γ wird schon früh in der Adipogenese induziert. Die Transkriptionsfaktoren PPAR γ /RXR, C/EBP (CCAAT-enhancer-binding-protein) und ADD1/SREBP1 (Adipocyte determination and differentiation factor 1/sterol response element binding protein 1) agieren synergistisch und starten die Differenzierung zum adipozytentypischen Phänotyp sowie die Induktion adipozytenspezifischer Gene (HOUSEKNECHT et al., 2002). Wenn ein Mangel an PPAR γ oder ein fehlerhaftes PPAR γ in den Zellen vorhanden ist, kommt es zu keiner oder einer fehlerhaften Adipogenese (TAMORI et al., 2002).

2.4.3 Rezeptorstruktur

Wie alle Nuklearhormonrezeptoren besitzen PPARs eine bestimmte Struktur aus funktionellen Domänen. Das PPAR γ Protein ist aus drei funktionellen Domänen aufgebaut (SEWTER und VIDAL-PUIG, 2002).

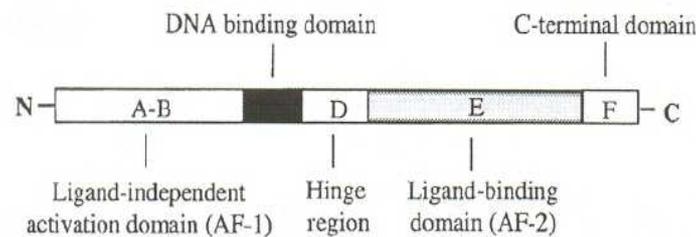


Abb.3. Aufbau der PPAR γ Protein Domäne (SEWTER und VIDAL-PUIG, 2002, Fig.1, S.240).

Die DNA-Bindungsdomäne (DBD) hat zwei zinkfingerähnliche Motive, die so gefaltet sind, dass sie ein DNA target von 6 Nukleotiden erkennen können (DESERGNE und WAHLI, 1999). Sie binden PPRE an der regulatorischen Region für das „PPAR-responsive gene“ (BERGER und MOLLER, 2002).

Die LBD liegt auf dem C-terminalen Ende des Rezeptors und besteht aus 13 α -Helices und vier β -Faltblättern (BERGER und MOLLER, 2002). Die Ligandenbindungstasche (Ligandbindingpocket, LBP) von PPAR ist im Vergleich zu anderen Nuklearrezeptoren 2-3 mal größer (OBERFIELD et al., 1990). Das erklärt, warum PPARs mit vielen hydrophoben Liganden unterschiedlicher Struktur und geringer Affinität reagieren können (DUPLUS und FOREST, 2002). Die LBD wird in die ligandenunabhängige Aktivierungsdomäne (ligand-independent activation domain) AF-1 (activation function-1), die in der A/B-Domäne nah am N-terminalen Ende liegt und in die ligandenabhängige Aktivierungsdomäne (ligand-dependent activation domain) AF-2 (activation function-2) unterteilt. AF-2 liegt neben der C-terminalen Domäne und ist beteiligt an der Bildung der Rezeptor-Coactivator-Bindungstasche. Die DBD und die LBD sind über die Isoformen hoch konservierte Regionen (BERGER und MOLLER, 2002).

2.4.4 Retinoid-Rezeptor (RXR)

RXR zählt wie PPAR zu den Transkriptionsfaktoren. Der RXR kommt in drei verschiedenen Isoformen vor: RXR α , RXR β und RXR γ (DUPLUS und FOREST, 2002). Alle drei Isoformen werden durch den endogenen Agonist 9-cis Retinoidsäure aktiviert. RXR bildet mit PPAR ein Heterodimer (BERGER und MOLLER, 2002).

2.4.5 Peroxisome Proliferate Response Element (PPRE)

Das Heterodimer aus PPAR γ /RXR α wird auf der DNA an der Basensequenz AGGTCAnAGGTCA gebunden. Diese zwei Hexanukleotide werden als PPAR-Response-Element (PPRE) bezeichnet. PPRE weist die Sequenz des DR-1-elements (direct repeats) mit einer beliebigen Base (n) Abstand auf (DUPLUS und FOREST, 2002). Diese PPRE Sequenz befindet sich in dem Promotor der PPAR-Zielgene, wie z.B. der Acyl-CoA Oxidase (BERGER und MOLLER, 2002).

2.4.6 Coaktivatoren und Corepressoren

Es gibt Cofaktor-Proteine, die als Coaktivatoren oder Corepressoren den Transkriptionsprozess über die Bindung an PPAR beeinflussen können. Die Coaktivatoren docken an der „Hinge-region“ an (siehe Abb.3.) (SEWTER und VIDAL-PUIG, 2002). Sie reagieren mit dem ligandengebundenen Transkriptionsfaktorkomplex über ein konserviertes LXXLL Motiv (X für eine beliebige Aminosäure) (BERGER und MOLLER, 2002). Durch diese Bindung an den Komplex kann es zu einer Hemmung oder Steigerung der Transkriptionsaktivität kommen (HOUSEKNECHT et al., 2002). Der Transkriptionsprozess kann z.B. durch CBP (p300/CREB binding protein) gesteigert werden. Dieser Coaktivator führt zur Acetylierung der Histone und somit zu einer für die Transkription zugänglicheren DNA-Form (FENSKE und HUSMANN, 2003).

2.4.7 Wirkmechanismus des durch Liganden / Agonisten aktivierten PPARs

Nach der Bindung eines Liganden an PPAR γ kommt es zu einer Konformationsänderung der LBD in der AF-2 Domäne (HOUSEKNECHT et al., 2002; XU et al., 2001). Durch diese Konformationsänderung kommt es zur „Rekrutierung“ von transkriptionalen Coaktivator-Proteinen. Trotz unterschiedlichen chemischen Strukturen der verschiedenen Agonisten erfolgt die Bindung an die LBP immer nach dem gleichen Muster. Die funktionellen Säuregruppen der Agonisten bilden Wasserstoffbrücken in der LBP. Die Wasserstoffbrückenbindungen stabilisieren die Bindung zwischen der C-terminalen AF-2 Helix und dem konservierten Lysinrest auf der Rezeptoroberfläche. PPAR-Antagonisten binden an das gleiche Epitop in der LBP wie die Agonisten. Vermutlich bewirken sie durch ihr größeres Volumen eine Repositionierung der AF-2 Helix und ein Ablösen der Coaktivatoren. An den Antagonist-Rezeptor-Komplex können Corepressor-Proteine binden (OBERFIELD et al., 1990). Aktiviert durch einen Liganden bindet PPAR an einen anderen spezifischen Transkriptionsfaktor, z.B. SREBP-1 (Sterol-regulatory-element-binding-protein-1), CEBP (CCAAT-enhancer-binding-protein), jedoch meistens an RXR. PPARs können als Monomer nicht an die DNA binden. PPAR γ bindet stärker als PPAR α und PPAR β an PPRE. Die Bindungsstärke ist u.a. von dem Isotypen des RXR-Heterodimerpartners abhängig. RXR γ ist ein stärkerer Partner als RXR α (DESVERGNE und WAHLI, 1999). Es entsteht ein funktionales Heterodimer, welches an PPRE auf der DNA bindet. Durch diesen Prozess kommt es zu einer Veränderung der Chromatinstruktur und darüber hinaus zur Veränderung der Transkriptionsrate bestimmter Zielgene. An diesen Heterodimerkomplex können Coaktivatoren oder Corepressoren binden und die Wirkung des Nuklearrezeptors beeinflussen (HOUSEKNECHT et al., 2002). Die liganden-aktivierten PPARs spielen über die Regulierung der Expression von bestimmten Zielgenen in verschiedenen metabolischen Prozessen eine wichtige Rolle (BERGER und MOLLER, 2002; HOUSEKNECHT et al., 2002).

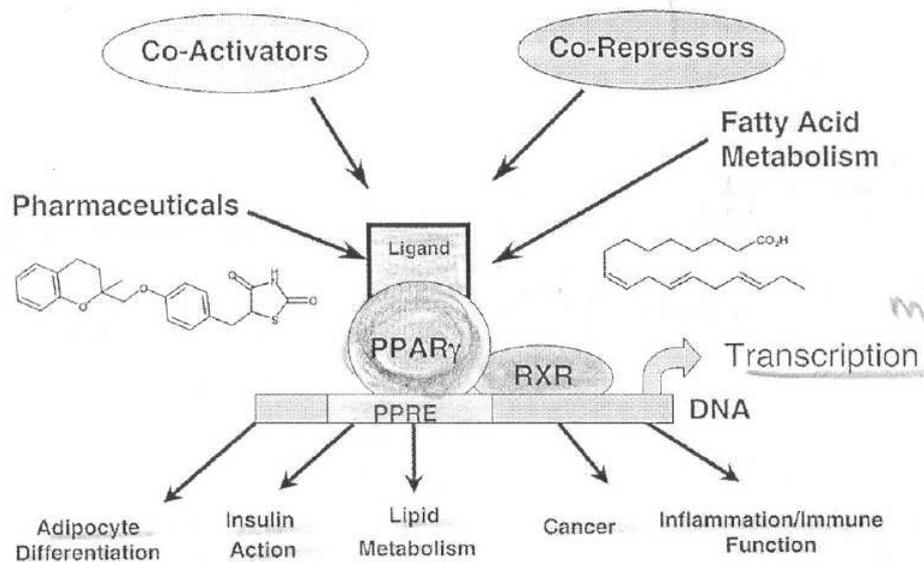


Abb.4. Übersicht über den PPAR γ Wirkmechanismus als Transkriptionsfaktor in der Zelle und seine Funktion im Stoffwechsel (HOUSEKNECHT et al., 2002, Fig. 2, S.3).

2.4.8 PPAR γ -Liganden /Agonisten

Nuklearrezeptorliganden können die Zellmembran passieren, da die Bindung im Zellinneren stattfindet (FENSKE und HUSMANN, 2003).

PPAR-Liganden können in natürliche (z.B. Fettsäuren oder Prostaglandine) und synthetische Liganden (z.B. TZDs) unterteilt werden (MITAL et al., 2002).

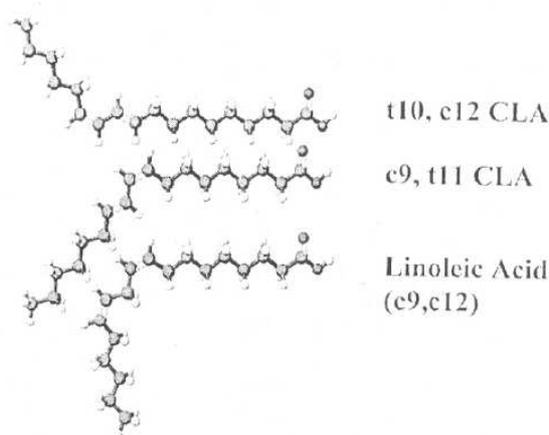


Abb.5. Strukturformel der konjugierten Linolsäure-Isomere und der Linolsäure (PARIZA, 2004, Fig.1, S.1133S).

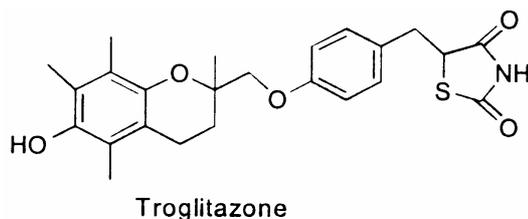


Abb.6. Strukturformel des Troglitazons (MITAL et al., 2002, Fig.1, S.5).

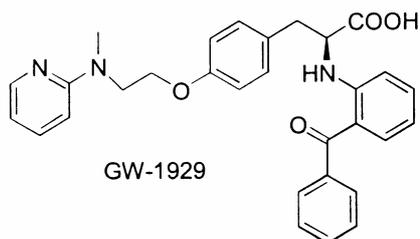


Abb.7. Strukturformel des GW1929 (MITAL et al., 2002, Fig.1, S.5).

Natürliche Liganden: Konjugierte Linolsäure

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (poly unsaturated fatty acids, PUFAs) haben zum Teil als essentielle Faktoren eine positive Wirkung auf den Metabolismus (CLARKE, 2001). Ein wichtiges Bindeglied zwischen einer PUFA-reichen Ernährung und dem Metabolismus bildet PPAR γ . Langkettige Fettsäuren und Eicosanoid-Derivate können schon im mikromolaren Bereich an alle drei PPAR γ -Isoformen binden und diese aktivieren (BERGER und MOLLER, 2002). PUFAs werden bevorzugt gebunden (DUPLUS und FOREST, 2002). Sie sind natürliche Liganden mit besonders hoher Affinität, wie die Linolsäure und die Linolensäure sowie deren Metaboliten, die Eicosapentaensäure und das Prostaglandin 15-Deoxy-delta-12,14-Prostaglandin J₂ (15d-PG J₂) (HOUSEKNECHT et al., 2002). Die Eicosanoide werden aus essentiellen PUFAs synthetisiert und müssen über die Nahrung aufgenommen werden (SPIEGELMAN und FLIER, 1996).

Die konjugierte Linolsäure (CLA) ist eine heterogene Gruppe von geometrischen Stellungsisomeren der Linolsäure (C₁₈:₂, n-6) (ROCHE, et al., 2002; CHOI et al., 1999; RISÉRIUS, et al., 2002). Sie kommt als natürlicher Nahrungsbestandteil der Lipidfraktion der Milch, des Rindfleisches und in weiteren Produkten von Wiederkäuern vor. Fermentative Bakterien isomerisieren die Linolsäure zur CLA. Wiederkäuer können die CLA auch über die Delta⁹-Desaturase aus trans-11-Octadecansäure synthetisieren (ROCHE, et al., 2002; WANG und JONES, 2004). Die Lipidzusammensetzung variiert bei den verschiedenen Spezies und kann durch die Auswahl der Nahrungskomponenten beeinflusst werden (PETERSON, 2004). Das CLA-Isomer cis-9,trans-11 ist hauptsächlich in Lebensmitteln vertreten. In geringeren Konzentrationen kommt das CLA-Isomer trans-10,cis-12 vor (ROCHE, et al., 2002; CHOI et al., 1999; WANG und JONES, 2004). Verschiedene Studien haben den Wirkmechanismus der CLA-Isomere untersucht. Primäre Ziele sind PPAR α , PPAR γ , der Liver X Rezeptor α und SREBP 1c. Die Wirkung

der CLA auf den Glukose- und Lipidstoffwechsel verläuft vermutlich u.a. über diese Nuklearrezeptoren (TAYLOR und ZAHRADKA, 2004).

In den letzten Jahren haben diese zweifach ungesättigten Fettsäureisomere an Bedeutung gewonnen, weil sie u.a. antikanzerogene, antiatherosclerotische, anti-diabetische und gewichtsreduzierende (antiobesity) Wirkungen zu haben scheinen (MCGUIRE und MCGUIRE, 1999; PARIZA, 2004). Mehrere Studien haben gezeigt, dass die Wirkungen der Isomere cis-9,trans-11 und trans-10,cis-12 im Organismus kontrovers sind. Das Isomer trans-10,cis-12 scheint, im Gegensatz zu cis-9,trans-11, das aktive Isomer mit Wirkung auf das Fettgewebe und auf die Insulinresistenz zu sein. Neuere Publikationen belegen, dass speziell das Isomer trans-10,cis-12 trotz seiner senkenden Wirkung auf den Körperfettanteil, aber nicht auf den BMI, nicht zu einer Verbesserung der Insulinwirkung, sondern zu einer Steigerung der Insulinresistenz im Menschen führte (RISÉRIUS et al., 2004 ; BROWN und MCINTOSH, 2003).

Synthetische Liganden: GW1929 und TZDs

Wichtige synthetische PPAR γ -Liganden sind die TZDs zu denen das hier verwendete Troglitazon gehört. TZDs sind eine neue Wirkstoffgruppe oraler Antidiabetiker.

Troglitazon wurde 1982 von dem japanischen Pharmakonzern Sankyo entwickelt. Dieser erste orale Insulinsensitizer zur Behandlung von nicht insulinabhängigen Diabetes wurde 1997 als Rezulin[®] auf den amerikanischen Markt gebracht. Es durchlief als „fast track“ einen verkürzten Zulassungsprozess der FDA. Kurz danach folgte die Zulassung von Rosiglitazon (Entwicklung von SmithKline Beecham) und Pioglitazon (Entwicklung von Takeda). Der Vorteil dieser Glitazone liegt nicht nur in der blutzuckersenkenden Wirkung, sondern auch in der positiven Wirkung auf die Reduktion von kardiovaskulären Risiken. Am 21. März 2000 wurde Troglitazon jedoch aufgrund seiner Hepatoxizität wieder vom Markt genommen (PARKER, 2002). Die TZDs Rosiglitazon und Pioglitazon sind als Antidiabetikum zugelassen (KIMMEL und INZUCCHI, 2005). In Deutschland sind sie ausschließlich in Kombination mit Metformin oder Sulfonylharnstoff zugelassen (STUMVOLL et al., 2002).

Die Wirkung als Insulinsensitizer ist hauptsächlich auf die Bindung an den TZD Rezeptor PPAR γ zurückzuführen (TAMORI et al., 2002; LEHMANN et al., 1995). Diese Bindung zwischen TZD und PPAR γ wurde erstmals in der Studie von Kletzien et al. (1991) beschrieben. Die Affinität der verschiedenen TZDs zu PPAR γ ist unterschiedlich stark (BERGER und MOLLER, 2002) und verhält sich parallel zu der in-vivo ermittelten anti-hyperglykämischen Wirkung. Die höchste Bindungsaffinität der verschiedenen TZDs an die PPARs wird an PPAR γ erzielt (BERGER et al., 1999). Die unterschiedliche Bindungsaffinität lässt sich nur über die verschiedenen Kettensubstituenten erklären, weil das heterozyklische Grundgerüst aus Thiazolidin-2,4-dione bei den verschiedenen TZDs gleich ist (MITAL et al., 2002).

Durch den Wirkstoff Troglitazon wird die insulinstimulierte Glukoseaufnahme in die Muskelzellen und die Adipozyten erhöht, die insulinstimulierte hepatische Glukoseausschüttung gehemmt und die Zellfunktion der β -Zellen im Pankreas verbessert (HOUSEKNECHT et al., 2002; MITAL et al., 2002). TZDs haben somit direkten Einfluss auf die Glukosehomöostase und die periphere Insulinresistenz (KIMMEL und INZUCCHI,

2005). An den stark insulinabhängigen Muskelzellen findet 70-80% der insulinstimulierten Glukoseaufnahme statt (MIYAZAKI et al., 2003). Die Wirkung der TZDs auf die Muskulatur kann über die Aktivierung von PPAR γ im Fettgewebe erfolgen (KIMMEL und INZUCCHI, 2005). Die hohe Expression von PPAR γ in Adipozyten lässt vermuten, dass die Hauptwirkung der TZDs über diesen Weg verläuft (TAMORI et al., 2002).

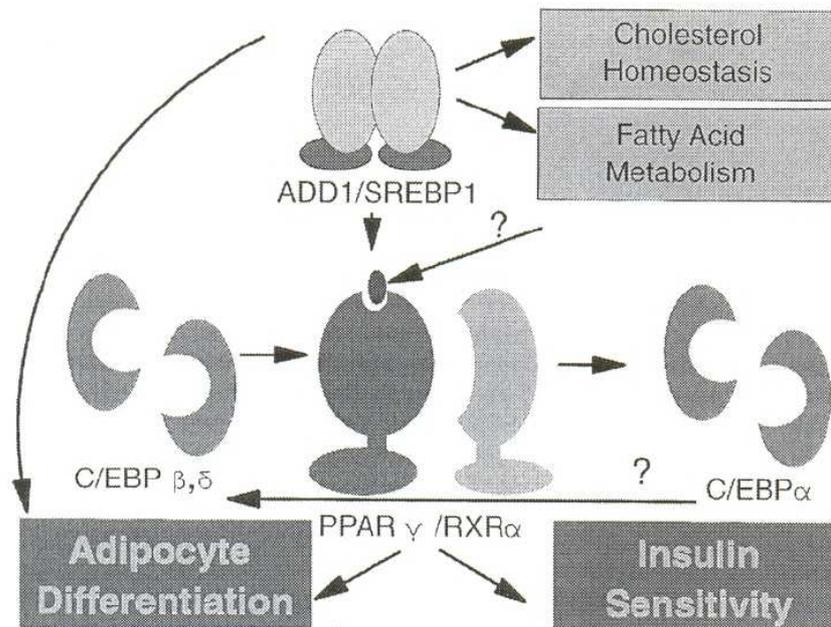


Abb.8. Kaskade der Transkriptionsfaktoren, die in die Adipozytendifferenzierung und die Insulinsensitivität involviert sind (SPIEGELMAN und FLIER, 1996, Fig.1, S.383).

Bei der Behandlung von Patienten mit TZDs kommt es zur Veränderung der Körperfettverteilung von peripheren zu subkutanen Depots. Diese veränderte Körperfettverteilung kann einen Einfluss auf die gesteigerte Insulinsensitivität besitzen (SEWTER und VIDAL-PUIG, 2002). In der klinischen Studie von Kim et al. (2002) konnte nach einer dreimonatigen Einnahme von Troglitazon ein signifikanter BMI-Anstieg gemessen werden. Dieser Effekt könnte über die adipogene Wirkung der TZDs über PPAR γ erklärt werden. Trotz eines angestiegenen BMIs zeigten die Probanden eine verbesserte Insulinwirkung. Es ist zu überlegen, wie eine Stimulierung der Adipogenese über PPAR γ mit einer verbesserten Insulinsensitivität durch die TZDs zu bewerten ist. Auf der anderen Seite stimuliert aktiviertes PPAR γ nicht nur die Differenzierung zum Adipozyten, sondern scheint auch die Apoptose von reifen, lipid-gefüllten Adipozyten auszulösen. Die neuen, kleineren Preadipozyten sind insulinsensitiver (HOUSEKNECHT et al., 2002). Eine weitere Erklärung wäre, dass die erhöhte Preadipozytenbildung zirkulierende FFA eliminiert und so der Wirkung der erhöhten FFA-Spiegel auf die Insulinsensitivität der Muskelzellen entgegenwirkt (SEWTER und VIDAL-PUIG, 2002). Weitere Studien lassen vermuten, dass die Inkubation mit TZDs die Lipolyserate hemmt und die Fettsäureaufnahme in die Adipozyten erhöht. Die Konzentration der FFAs im Plasma könnte somit gesenkt werden (HOUSEKNECHT et al., 2002; MITAL et al., 2002).

Wie bereits beschrieben, wird durch die Aktivierung von PPAR γ , durch z.B. TZDs nachweislich der insulinstimulierte Glukoseeinstrom in die Zelle durch die Steigerung der

Expression von Proteinen, die direkt in die Insulinsignalkaskade involviert sind, erhöht. Hierbei handelte es sich um CAP, IRS-1 und IRS-2, GLUT4 (SEWTER und VIDAL-PUIG, 2002) und die PI 3-Kinase (BROWN und MCINTOSH, 2003). In einer Studie von Miyazaki et al. (2003) konnte gezeigt werden, dass es nach einer 16 wöchigen Behandlung von T2DM Patienten mit Rosiglitazon u.a. zu einer Steigerung der insulinstimulierten IRS-1 Tyrosin-Phosphorylierung und zu einem Anstieg der Aktivität der p85-Untereinheit der PI 3-Kinase gekommen ist.

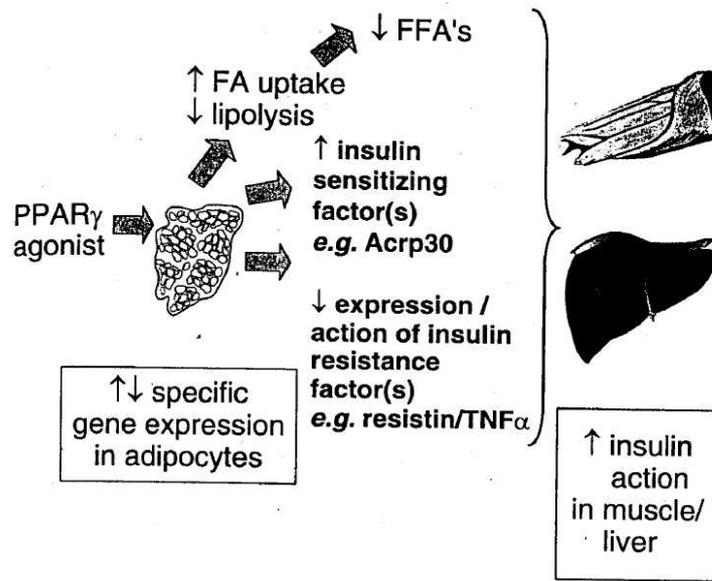


Abb.9. Mögliche Wirkung des aktivierten PPAR γ über die Fettzellen auf die Insulinsensitivität in Muskel- und Leberzellen (BERGER und MOLLER, 2002, Fig.3).

TZDs regulieren auch die Expression bestimmter Stoffe, die vom Fettgewebe in das Blut sezerniert werden, wie FFA, Adiponectin oder TNF- α . Diese Adipokine und Zytokine haben ebenfalls Einfluss auf die Insulinwirkung (KIMMEL und INZUCCHI, 2005; GUAN et al., 2002). TNF- α spielt u.a. eine Rolle bei der Entstehung von systemischer Insulinresistenz. TZDs können die Expression von TNF- α im Fettgewebe reduzieren und die Wirkung auf Adipozyten und Preadipozyten blockieren (SPIEGELMAN und FLIER, 1996). Gleiches gilt für die Wirkung von Leptin, ein Hormon des Fettgewebes, welches an der Entstehung der Insulinresistenz beteiligt ist. TZDs haben einen hemmenden Einfluss auf die Expression von Leptin (SEWTER und VIDAL-PUIG, 2002).

GW1929 gehört zur Serie der auf Tyrosin basierenden PPAR γ -Agonisten. Es zählt mit GI262570 und GW7845 zu den ersten antidiabetischen Medikamenten mit optimierter Aktivität auf das humane PPAR γ (MITAL et al., 2002). Es gehört wie Troglitazon zur Gruppe der „PPAR γ -Subtype-Selective-Agonisten“ (Produktinformationsblatt G5668).

3 Material und Methode

3.1 Material

3.1.1 Zusammensetzung der Medien, Puffer und Lösungen

3T3-L1 Kultivierung

- 1. Kultivierungsmedium: DMEM (Dulbecco's Minimal Essential Medium) (mit w: 3,7g/l NaHCO₃, w: 4,5g/l D-Glukose, w: 1,028g/l stable Glutamin, w/o Na-Pyruvate) mit den Supplementen:
 - 10% Fötale Kälberserum (FCS)
 - 50 Units Penicillin/Streptomycin
 - 2,5µg/ml Amphotericin B

- 2. Kultivierungsmedium: DMEM (mit w: 3,7g/l NaHCO₃, w: 4,5g/l D-Glukose, w: 1,028g/l stable Glutamin, w/o Na-Pyruvate) mit den Supplementen:
 - 10% FCS
 - 50 Units Penicillin/Streptomycin
 - 2,5µg/ml Amphotericin B
 - 2% Albumin Fraktion V (BSA)

- 1. Differenzierungsmedium: DMEM (mit w: 3,7g/l NaHCO₃, w: 4,5g/l D-Glukose, w: 1,028g/l stable Glutamin, w/o Na-Pyruvate) mit den Supplementen:
 - 10% FCS
 - 50 Units Penicillin/Streptomycin
 - 2,5µg/ml Amphotericin B
 - 400nM Insulin
 - 1,0mM 3-Isobutyl-1-Methylxanthine (IBMX)
 - 1,0µM Dexamethason (DEXA)

- 2. Differenzierungsmedium: DMEM (mit: w 3,7g/l NaHCO₃, w: 4,5g/l D-Glukose, w: 1,028g/l stable Glutamin, w/o Na-Pyruvate) mit den Supplementen:
 - 10% FCS
 - 50 Units Penicillin/Streptomycin
 - 2,5µg/ml Amphotericin B
 - 100nM Insulin

- Einfriermedium: DMEM (mit w: 3,7g/l NaHCO₃, w: 4,5g/l D-Glukose, w: 1,028g/l stable Glutamin, w/o Na-Pyruvate) mit den Supplementen:
 - 30% FCS
 - 10% DMSO

HepG2 Kultivierung

- Kultivierungsmedium: RPMI 1640 (mit Glutamax) mit den Supplementen:
 - 10% FCS
 - 50 Units Penicillin/Streptomycin
 - 2,5µg/ml Amphotericin B

FCS, BSA, Insulin, IBMX, DEXA und die Liganden wurden vor Einsatz in der Zellkultur durch einen Porenfilter (Porengröße 0,22µm) steril filtriert.

DEXA wurde in Ethanol absolut (EtOH abs.) gelöst. Es wurde eine 10nM Stammlösung angesetzt, damit nur 500µl/500ml Medium eingesetzt werden müssen. Dieses entspricht einer Ethanolkonzentration von 0,1% im Medium, wodurch kein zytotoxischer Effekt zu erwarten war. DEXA ist lichtempfindlich, weshalb die angesetzten Medien lichtdicht gelagert wurden.

IBMX wurde in DMSO gelöst. Vor dem Einsatz in das Medium wurde die 1mM Stammlösung für 2 min bei 95°C erhitzt, um ein besseres Lösungsverhalten der lipophilen Substanz im Medium zu erzielen.

FCS wurde vor Einsatz in der Zellkultur bei 56°C für 30 min hitzeinaktiviert.

Die supplementierten Medien wurden bei 4°C gelagert.

Die verschiedenen Supplemente wurden je nach gewünschter Einsatzkonzentration aliquotiert und laut Herstellerangaben gelagert.

Es wurden nur Substanzen verwendet, die als „cell culture tested“ deklariert sind.

Färbung der 3T3-L1 Zellen

- Trypanblau Stammlösung
 - 0,5% (w/v) Trypanblau
- Ölrot O Stammlösung: (nach SHAO und LAZAR, 1997)
 - 0,5g Ölrot O in 100ml 99% Isopropylalkohol (2-Propanol)
- Färbelösung: (nach LILLIE und FULLMER, 1976)
 - 6 Teile (24ml) Stammlösung. + 4 Teile Aqua dest. (16ml)
 - 24 h stehen lassen
 - filtrieren (Faltenfilter), nach längerem Stehen erneut filtern
- 10% Formaldehydlösung:
 - aus 37% Formaldehydlösung mit 1x PBS (Phosphat-buffered saline) verdünnt, pH 7,4
- Waschpuffer: 1x PBS, pH 7,4

Proteinbestimmung der 3T3-L1 und HepG2 Zellen

- RIPA-Lysispuffer, pH 7,2 in Aqua dest. supplementiert mit Protease-Inhibitor (Verhältnis: 10 Teile zu 1 Teil)
 - 50 mM Tris-HCl, pH 7,5
 - 150 mM NaCl
 - 1% NP-40
 - 0,5% Na-Deoxycholat
 - 0,1% Dodecylsulfat Na-Salz (SDS)

- Reagenz A, Ansatz für 1000ml in Aqua dest.
 - 20g Na₂CO₃
 - 0,2g K/Na-Tartat (CaKC₄H₄O₆*H₂O)
 - 4g CaOH
 - 10,2g Dodecylsulfat Na-Salz (SDS)

- Reagenz B, Ansatz für 1000ml in Aqua dest.
 - 5g CuSO₄*5 H₂O

- Reagenz C
 - Reagenz A + B (50+1 Teil), frisch anzusetzen

- Phenol Reagenz
 - Folin Phenolreagenz + Aqua bidest. (1+1 Teil), frisch anzusetzen

- Proteinstandardlösung: BSA in RIPA-Lysispuffer in verschiedenen Konzentrationen

Glukoseaufnahme in 3T3-L1 und HepG2 Zellen

- Ligandenansatz
 - CLA-Isomer und CLA-Isomergemisch Stammlösung: 20mM in EtOH abs.
 - GW1929 Stammlösung: 1mM in DMSO
 - Troglitazon Stammlösung: 1mM in DMSO

- Fettsäuremedium für 3T3-L1: DMEM (mit w: 3,7g/l NaHCO₃, w: 4,5g/l D-Glukose, w: 1,028g/l stable Glutamin, w/o Na-Pyruvate) mit den Supplementen:
 - 10% FCS
 - 50 Units Penicillin/Streptomycin
 - 2,5µg/ml Amphotericin B
 - 3% fettsäurefreies BSA

- Fettsäuremedium für HepG2 Zellen: RPMI 1640 (mit Glutamax) mit den Supplementen
 - 10% FCS
 - 50 Units Penicillin/Streptomycin
 - 2,5µg/ml Amphotericin B

- 3% fettsäurefreies BSA
- Transportassaymedium: DMEM (mit w: 3,7g/l NaHCO_3 , w: 4,5g/l D-Glukose, w: 1,028g/l stable Glutamin, w/o Na-Pyruvate), serum- und antibiotikafrei mit dem Supplement:
 - 1% BSA, Fraktion V
- Insulinlösung: 50mg/10ml 10mM HCl, 861 μL auf 1ml 1x Krebs-Ringer-Puffer (KRP): 1mM in KRP
- Cytochalasin B Lösung: 10mM in EtOH abs., vor Einsatz in die Versuche 1:10 mit KRP verdünnt ergibt 1mM Lösung, davon 10 μl auf 1000 μl Versuchsansatz \rightarrow 10 μM Cytochalasin B je Well
- Waschpuffer 1: KRP, pH 7,4; Ansatz für 1000ml in Aqua dest.:
 - 6,954g NaCl
 - 2,600g Hepes
 - 2,100g NaHCO_3
 - 0,350g KCl
 - 0,296g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
 - 0,235g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
 - 0,163g KH_2PO_4
- Waschpuffer 2: 1x PBS, pH 7,4
- Lysispuffer: 0,1% SDS
- 2-Deoxy-D-[1- ^3H] Glukoselösung: 200 $\mu\text{Ci/ml}$, 0,1mM, 1225ml
 - 245 μL 2-Deoxy-D-[1- ^3H] Glukose: 250 μCi , Spezifische Aktivität: 9.00Ci/mmol,
 - 755 μl 1.Glukosestammlösung: 0,097mM
 - 225 μl 2.Glukosestammlösung: 0,1mM \rightarrow vor der Glukoseaufnahme 1:25 Verdünnung mit der 2. Glukosestammlösung: Einsatz von 100 μl 8 $\mu\text{Ci/ml}$ /Well in die Versuche
- Szintillationslösung

3.2 Methode

Die Etablierung der Methode zur Differenzierung der Adipozyten sowie zur Messung der Glukoseaufnahme erfolgte wie in diesem Methodenteil dargestellt.

3.2.1 Vorstellung der Zelllinien

3T3-L1 Zelllinie

Die 3T3-L1 Zelllinie (American Type Culture Collection, Katalognummer CL-173) ist eine Fibroblastenzelllinie aus der Maus, die aus Embryonen gewonnen wird. Die Verdopplungszeit beträgt 18 Stunden. L1 ist eine fortlaufende Unterrasse der 3T3 (Swiss albino), die durch klonale Isolierung entwickelt wurde. Bei dieser murinen Fibroblastenzelllinie kommt es zu einer schnellen Zellteilung bis zur Konfluenz, bei welcher der Zellkontakt eine weitere Zellteilung verhindert. Die Zellen durchlaufen nach der Konfluenz eine Umwandlung vom Preadipozyten zu einem adipozytenvergleichbaren Stadium. Durch eine hohe Serumkonzentration im Medium kann die Fettakkumulation in der Fettvakuole gesteigert werden. Diese Zelllinie wird unter der Biosicherheitsstufe 1 eingeordnet (Produktinformationsblatt CL-173).

HepG2 Zelllinie

Bei der HepG2 Zelllinie (American Type Culture Collection, Katalognummer HB-8065) handelt es sich um eine humane Krebszelllinie der Leber (Produktinformationsblatt HB-8065).

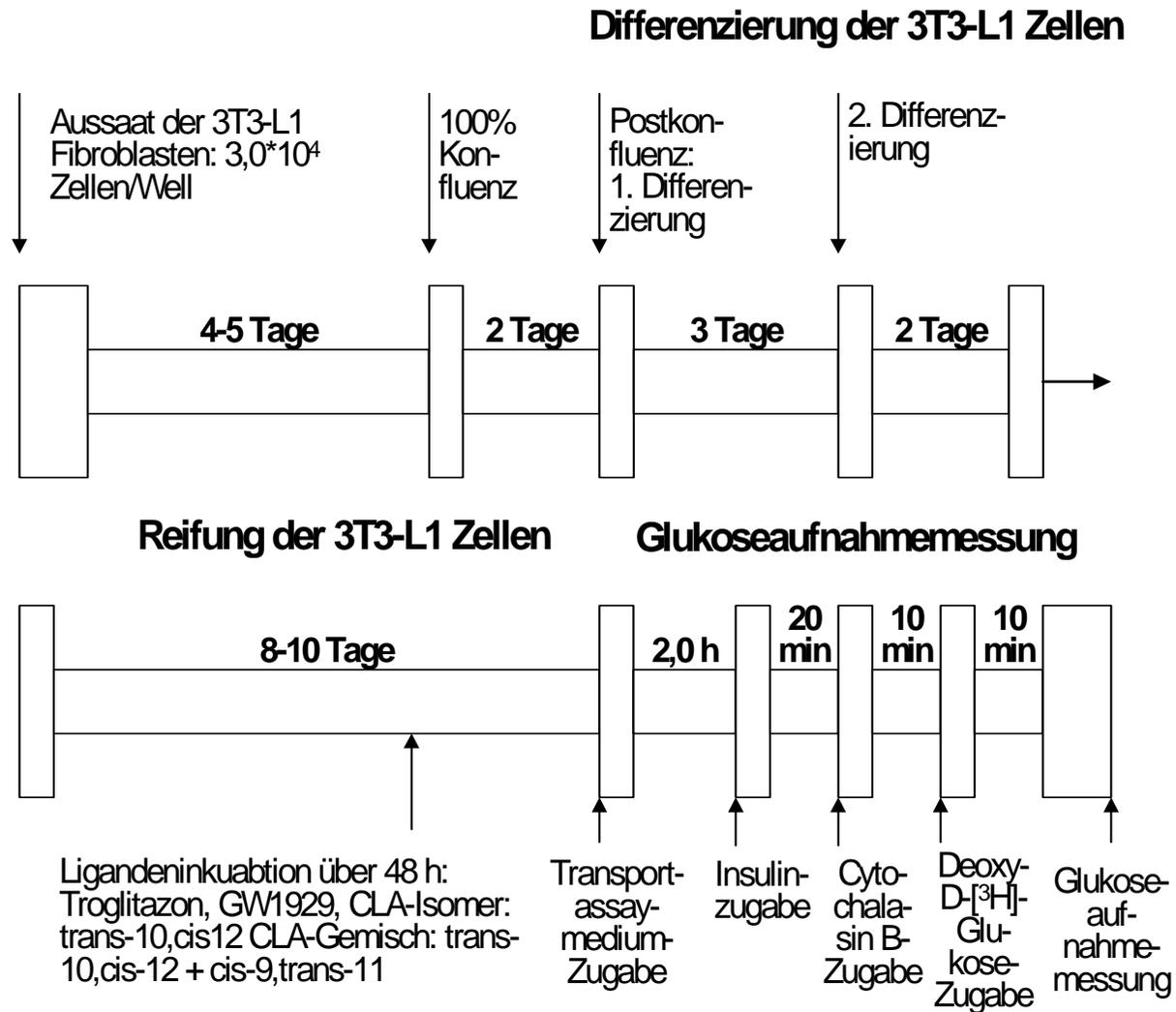


Abb.10. Fließschema von der Differenzierung der 3T3-L1 Fibroblasten zu reifen 3T3-L1 Adipozyten bis zur Messung der Glukoseaufnahme (Quelle: Eigene Darstellung).

3.2.2 Subkultivierung und Kultivierung der 3T3-L1 und der HepG2 Zelllinie

Die Kultivierung der 3T3-L1 und der HepG2 Zellen erfolgte nach den Empfehlungen der American Type Culture Collection (Produktinformationsblatt für CL-173 und HB-8065) sowie nach Lindl (2002) und fand bis zu den Versuchen zur Messungen der Glukoseaufnahme ausschließlich unter sterilen Bedingungen statt.

Die optimalen Kultivierungsbedingungen der Zellen herrschen in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre.

Für die HepG2 Zellen wurde RPMI mit GlutaMAX verwendet, welches laut Herstellerangaben u.a. mit 10% FCS supplementiert worden ist (siehe 3.1.1 HepG2 Kultivierung).

Bei dem optimalen Medium für die 3T3-L1 handelt es sich laut Hersteller um DMEM mit 4mM L-Glutamin. Dieses Medium wurde während der Kultivierung und der Differenzierung sowie vor dem Glukosetransportassay eingesetzt und mit verschiedenen Supplementen angereichert (siehe 3.1.1 3T3-L1-Kultivierung). Den Medien wurden Antibiotika zugesetzt. Die gewählten Konzentrationen stützten sich auf Empfehlungen von Lindl (2002, S.55) und auf die Publikation von Clancy und Czech (1990). Der Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Um ein optimales Wachstum zu erzielen, wurde bei der Kultivierung der Zellen Plastikmaterial anstelle von Glasware eingesetzt.

Die Zellen wurden unter Isopropanolathmosphäre eingefroren, um ein schonendes Einfrieren von -1°C/ 1min zu gewährleisten. Für eine längere Lagerung müssten die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196°C überführt werden, um einen Vitalitätsverlust bei -70°C vorzubeugen.

Während der Proliferationsphase wurden die 3T3-L1 Zellen in T-75cm² Flaschen kultiviert. Die Zellen wurden zunächst dreimal passagiert, bevor sie das erste Mal eingefroren wurden, um eine bessere Anpassung der Zellen an die Kultivierungsbedingungen zu erzielen. Vor dem Einfrieren wurden die Zellen bis zu ca. 60-80% Konfluenz im 1.Kultivierungsmedium (siehe 3.1.1 3T3-L1 Kultivierung) in T-75cm²-Flaschen kultiviert.

Zur Erstellung einer neuen Subkultur wurden die Zellen durch Trypsin/EDTA-Behandlung aus den Kulturflaschen abgelöst und entweder eingefroren oder in eine neue T-75cm²-Kulturflasche gesplittet. Zur Trypsinierung wurden die Zellen zunächst einmalig mit PBS gewaschen. Danach wurden 2,5ml 0,25% (w/v) Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben und es folgte eine 5 minütige Inkubation im Brutschrank. Durch zusätzliches mechanisches Ablösen der Zellen konnten diese aus den Flaschen abgelöst werden. Zum Stoppen der Trypsininkubation wurden die gelösten Zellen in ca. 10ml serumhaltiges Medium überführt. Diese Zellsuspension wurde für 5 min bei 1000xg zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in frischem Medium resuspendiert. Zur Weiterkultivierung wurde die Zellsuspension in neue T-75cm²-Flaschen gegeben, in denen zur besseren Verteilung der Zellen Medium vorgelegt war.

Für den Einfrierprozess wurden die Zellen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt und anschließend für 5 min bei 1000xg zentrifugiert. Das Pellet wurde in speziellem Einfriermedium mit 10% DMSO (siehe 3.1.1 3T3-L1 Kultivierung) gelöst. Ohne den Zusatz von DMSO kann es beim Einfrieren der Zellen durch die intra- und extrazellulären Kristalle zu einer irreversiblen Zellschädigung kommen (Lindl, 2000). Aufgrund der Toxizität des DMSO erfolgte der Einfrierschritt sehr zügig. Es wurden jeweils ca. $1,1-1,5 \cdot 10^6$ Zellen je 1,5ml Kryoröhrchen eingefroren.

Durch das Einfrieren der Zellen kann die Vitalität beeinflusst werden. Aus diesem Grund wurde nach dem Auftauen ein Vitalitätstest mit Trypanblau durchgeführt.

Das Pellet der aufgetauten Zellen wurde in neuem Medium resuspendiert. Anschließend wurde ein 20µl Aliquot 1:1 mit 0,5% Trypanblau gevortext. Nach 1 min wurde die Dichte der Zellsuspension mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierfür wurden 10µl der Zellsuspension auf die Zählkammer gegeben, vier große Quadrate á 0,1µl Zellsuspension ausgezählt, der Mittelwert gebildet und mit 10^4 multipliziert. Die gezählte Zellzahl bezog sich auf 1ml der Zellsuspension. Es konnten jeweils 92-94% vitale Zellen bestimmt werden. Wenn die Vitalität unter 90% lag, wurde die Zellsuspension verworfen (Abb.12.)

Die Einsaat der Zellen erfolgte mit ca. $3,0 \cdot 10^4$ Zellen/Well einer 12-Well-Platte im 2.Kultivierungsmedium (siehe 3.1.1 3T3-L1 Kultivierung). In den 12-Well-Platten fand die weitere Kultivierung, Differenzierung, Reifung sowie der Glukosetransportassay statt.

3.2.3 Differenzierung der 3T3-L1 Zellen

Die Differenzierung erfolgte nach der Methode von Vogel (2002, S.696-670).

Bei einer Anfangszellzahl von $3,0 \cdot 10^4$ Zellen/Well einer 12-Well-Platte erreichten die Zellen nach 5-6 Tagen 100%ige Konfluenz. Nach zwei Tagen Postkonfluenz wurde mit der Differenzierung begonnen (TAFURI, 1996; WEILAND et al., 1990; FROST und LANE, 1985). Von dem 1.Differenzierungsmedium, supplementiert mit 400nm Insulin, 1µM DEXA und 1mM IBMX (siehe 3.1.1 3T3-L1 Kultivierung), wurden jeweils 2,0ml/Well eingesetzt. Nach drei Tagen wurde das Medium durch das 2.Differenzierungsmedium, supplementiert mit 100nM Insulin (siehe 3.1.1 3T3-L1 Kultivierung), ersetzt. Nach weiteren zwei Tagen wurde dieses Medium durch das 1.Kultivierungsmedium (siehe 3.1.1 3T3-L1 Kultivierung) ersetzt. Die Reifung der Zellen erfolgte unter regelmäßigem Mediumwechsel mindestens bis zum 13. und maximal bis zum 15. Tag nach der Differenzierung. Mindestens 85% der Zellen zeigten in den Versuchen, wie bei Vogel (2002), nach 12 Tagen den adipozyten-spezifischen Phänotyp.

Die reifen Adipozyten wurden für den Glukosetransportassay eingesetzt.

3.2.4 HepG2 Zellen

Die HepG2 Zellen wurden in T-75cm²-Flaschen kultiviert und vor den Versuchen in 12-Well-Platten ausgesät. Es wurden $3,0 \cdot 10^5$ Zellen/Well einer 12-Well-Platte eingesät. Ein Einfriervorgang wurde nicht durchgeführt, die Differenzierung entfiel ebenfalls.

3.2.5 Ölrot O Färbung der 3T3-L1 Zellen

Die Färbung der intrazellulären Lipidvakuole zählt zu der Standardmethode des Adipozytennachweises (BASTIE et al., 2000). Der Färbemechanismus basiert auf der besseren Löslichkeit des Farbstoffes in den Lipiden der Zelle im Vergleich zu dem

verwendeten Lösungsmittel (2-Propanol). Der Farbstoff Ölrot O wird von hydrophoben Triglyceriden, Cholesterolester und Fettsäuren absorbiert und gelöst (LILLIE und FULLMER, 1976).

In diesen Versuchen wurde die Ölrot O Färbung nach Shao und Lazar (1997) mit Modifikationen von Ramirez-Zacarias et al. (1992) sowie Lillie und Fullmer (1976) durchgeführt.

Die adhärennten Monolayerkulturen der 3T3-L1 Adipozyten wurden vor dem Färben dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurde 1,0ml 60%iger 2-Propanol für 2 min auf die Wells gegeben (LILLIE und FULLMER, 1976). Die Zellen wurden für 1 h mit 10%iger Formaldehydlösung bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden sie einmal mit PBS gewaschen und für 15 min mit 2,0ml/Well frisch filtrierter Färbelösung (siehe 3.1.1 Färbung der 3T3-L1 Zellen) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal für jeweils 15 min mit Aqua dest. gewaschen. Danach wurde 1,0ml 60%ige 2-Propanol für 1 min auf die Wells gegeben, um den Zellrasen von möglichen Farbresten zu reinigen (RAMIREZ-ZACARIAS et al., 1992). Die Adipozyten waren unter dem Mikroskop durch kräftig rot gefärbte intrazelluläre Lipidvakuolen zu erkennen (Abb.21.).

3.2.6 Proteinbestimmung der 3T3-L1 und HepG2 Zellen

Die Proteinbestimmung der 3T3-L1 Adipozyten und der HepG2 Zellen wurde nach der Methode von Lowry et al. (1951) durchgeführt. Bei dieser Methode werden anhand der Färbung die freien Aminosäuren bestimmt.

Die Proteine bilden in alkalischer Lösung mit Cu^{2+} einen Komplex, der bei der Zugabe des Folin-Phenolreagenz die enthaltene Heteropolysäure reduziert. Es kommt zu einem Farbumschlag von gelb nach blau. Der Proteingehalt der Proben verhält sich in geringen Konzentrationen proportional zu der Komplexbildung und kann fotometrisch bei 660nm gemessen werden. Zur Erstellung der Standardkurve diente BSA als Proteinstandard.

Zuerst wurden die Zellen in der 12-Well-Platte auf Eis dreimal mit 1,0ml PBS gewaschen. Dann wurde 110 μ l des frisch angesetzten RIPA-Lysepuffers mit dem Proteinaseinhibitor (siehe 3.1.1 Proteinbestimmung der 3T3-L1 und HepG2 Zellen) auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden unter leichtem Schütteln 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers aus den Wells geschabt und in ein Reaktionsgefäß auf Eis überführt. Die Zellen wurden für 20 sek mit 100 Watt Ultraschall behandelt. Danach wurden sie 20 min auf Eis gelagert und anschließend bei 4°C für 20 min bei 14.000rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen. Der Überstand wurde abgenommen und aliquotiert. Von jeder Probe wurde der Proteingehalt im unverdünnten Zustand sowie in der Verdünnung 1:5 und 1:10 mit RIPA-Lysepuffer bestimmt.

Zu den vorbereiteten Proben wurde jeweils 1000 μ l Reagenz C hinzugegeben und vorsichtig geschüttelt. Nach 10 min wurde 100 μ l Phenolreagenz hinzugegeben und kurz gevortext. Nach einer 45-minütigen Inkubation im Dunkeln und bei Raumtemperatur konnte der Farbumschlag optisch festgestellt werden. Die Proben wurden bei einer Wellenlänge von 660nm im Fotometer gemessen. Zusätzlich wurde noch der Blindwert, reiner RIPA-Lysepuffer und die Standardkurve, BSA in ansteigender Konzentration in

RIPA-Lysepuffer, gemessen. Alle Versuche wurden im Doppelansatz durchgeführt. Der Proteingehalt der unverdünnten und verdünnten Proben wurden über die Extinktionen der Standardkurve berechnet und in mg Protein /ml angegeben (Abb.39. und Abb.40.).

3.2.7 Glukoseaufnahme in differenzierte 3T3-L1 Adipozyten und HepG2 Zellen

Die Messung der Glukoseaufnahme wurde nach der Methode von Zuber et al. (1985) und von Weiland et al. (1990) durchgeführt. Hinzu kamen Modifikationen nach Frost und Lane, die 1985 die Messung der Glukoseaufnahme in 3T3-L1 Adipozyten als eine der ersten Arbeitsgruppen durchgeführt haben, sowie nach Clancy und Czech (1990).

Nach 13-15 Tagen Reifung wurde die Glukoseaufnahme in die 3T3-L1 Adipozyten gemessen. Die HepG2 Zellen wurden eingesetzt, nachdem sie eine 80-90% Konfluenz aufwiesen. Zur Bestimmung der Glukoseaufnahme unter Einfluss verschiedener PPAR γ -Liganden wurden die Zellen 48 h vor der Glukoseaufnahme mit den zu untersuchenden PPAR γ -Liganden in ansteigenden Konzentrationen inkubiert. Die Inkubationszeit wurde in Anlehnung an Nugent et al. (2001) gewählt, die beschrieben haben, dass eine Inkubation mit Rosiglitazon erst nach 48 h die Glukoseaufnahme in die 3T3-L1 Adipozyten signifikant erhöht hat. Anhand der folgenden Publikationen wurde die Ligandenkonzentrationen ausgewählt. Bei Nugent et al. (2001) wurden 100nM Rosiglitazon und GW1929 bei der Messung der Glukoseaufnahme eingesetzt. Bei Mukherjee et al. (2000) wurden ebenfalls 100nM Rosiglitazone eingesetzt und bei Tafuri (1996) wurde mit 500nM und 5000nM Troglitazon inkubiert. In den Versuchen von Brown und McIntosh (2003) wurden 10-30 μ M CLA eingesetzt.

In Anlehnung an die Vorversuche, in denen verschiedene Insulinkonzentrationen eingesetzt wurden, wurden folgende Konzentrationen ausgewählt.

Tab.4. Eingesetzte Insulin- und Ligandenkonzentrationen in den Versuchen zur Glukoseaufnahme.

Konzentrationen in nM	Insulin	Troglitazon	GW1929	CLA-Isomer (trans-10,cis-12)	CLA-Gemisch (trans-10,cis-12 ; cis-9,tans-11)
0	X	X	X	X	X
1	X	X	X		
10	X	X	X		
100 (0,1 μ M)	X	X	X	X	X
1000 (1 μ M)	X	X	X	X	X
10000 (10 μ M)	X	X		X	X
100000 (100 μ M)				X	X

Die Lösungsmittel der Liganden wurde so eingesetzt, dass die Konzentrationen von 0,1% DMSO (KLETZIEN et al., 1991) und 0,5% EtOH abs. in den Ligandenansätzen nicht überschritten wurden, um einen möglichen zytotoxischen Effekt zu vermeiden.

Die Fettsäuren wurden in einem Fettsäuremedium mit BSA und GW1929 sowie Troglitazon in dem gleichen Medium ohne BSA (siehe 3.1.1 Glukoseaufnahme in 3T3-L1 und HepG2 Zellen) auf die Zellen gegeben.

Die 3T3-L1 und die HepG2 Zellen wurden vor der Messung der Glukoseaufnahme für 2 h in 2,0ml serum- und antibiotikafreien Transportassaymedium (siehe 3.1.1 Glukoseaufnahme in 3T3-L1 und HepG2 Zellen) im Brutschrank inkubiert (FROST und LANE, 1985). Danach wurden die Zellen dreimal mit 1,0ml vorgewärmten KRP gewaschen und in 890µl KRP mit den verschiedenen Insulinkonzentrationen (Tab.4.) bei 37°C inkubiert. Nach 20 min wurden 10µl der 1mM Cytochalasin B Lösung für weitere 10 min bei 37°C auf die Zellen gegeben (CLANCY und CZECH, 1990). Die radioaktiv markierte 2-Deoxy-D-Glukoselösung wurde vor dem Versuch frisch angesetzt und auf Eis gelagert. Dafür wurde die radioaktive Deoxy-D-[³H]-Glukoselösung (9,25MBq/250µl, 0,1mM) 1:25 mit nichtradioaktiver 0,1mM Glukoselösung verdünnt, um eine Deoxy-D-[³H]-Glukoselösung mit 8µCi/ml (24,13kBq/100µl) zu erhalten (siehe 3.1.1 Glukoseaufnahme in 3T3-L1 und HepG2 Zellen). Der Glukosetransportvorgang wurde durch die Zugabe von 100µl der 8µCi/ml-Glukoselösung zu den vorliegenden 900µl Inkubationslösung/Well gestartet. Das Gesamtvolumen des Transportassays betrug 1000µl. Die Inkubation erfolgte für 10 min bei 37°C. Zum Stoppen des Transportvorgangs wurde die Glukose zügig aus den Wells abgezogen und jedes Well dreimal mit 1,0ml eiskaltem PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen aus den Wells wurde 500µl 0,1%ige SDS-Lösung auf jedes Well gegeben und die Zellen darin homogen lysiert. Aus der abgelösten Zellsuspension wurde jeweils ein 300µl-Aliquot (PATERNITI, 2000) in die Szintillationsgefäße (Vials) überführt. In die Vials wurden 4,0ml Szintillationslösung pipettiert und anschließend geschüttelt (CLANCY und CZECH, 1990). Nach 30 min Ruhen wurden die Proben im β-Counter gemessen.

Die Versuche mit den verschiedenen Liganden- und Insulinkonzentrationen wurden mindestens sechsmal durchgeführt. Parallel zu allen Versuchen wurden Nullwerte ohne Liganden- und Insulinzugabe, reine Lösungsmittelwerte und Proben mit Cytochalasin B gemessen.

Cytochalasin B bindet an die Plasmamembran der Zellen und hemmt sowohl den insulinstimulierten als auch den basalen Glukosetransport (CUSHMAN und WARDZALA, 1980). Unter Cytochalasin B Zugabe wurde nur die unspezifisch an die Zellwand gebundene Glukose erfasst (CLANCY und CZECH, 1990). Dies ist notwendig, um den aktiven Glukosetransport in die Zellen zu ermitteln.

3.2.8 Szintillationszählung im β-Counter

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Tritium ist ein Isotop des Wasserstoffs, welches in Form einer mit Tritium markierten 2-Deoxy-[³H]-Glukose verwendet wurde. Tritium hat eine Halbwertszeit von 12,3 Jahren und zählt zu den weichen β-Strahlern (PINGOUD 1997, S.31-33). 2-Deoxy-D-Glukose wird von Glukosetransportern gleich behandelt wie D-Glukose, jedoch von der Zelle nicht verstoffwechselt. Somit eignet sich tritiummarkierte 2-Deoxy-D-Glukose sehr gut für wissenschaftliche Transportversuche an Zellen. Zur quantitativen Messung von Proben, die β-Strahler enthalten, werden

Flüssigkeitsszintillationszähler eingesetzt, die als Detektor zum Nachweis der radioaktiven β -Strahlung verwendet werden (PINGOUD 1997, S.34-36).

Die zu messende Probe, die eine mit Tritium markierte 2-Deoxy-D-[^3H]-Glukose enthielt, sendet β -Strahlung (Elektronen) aus. Die Elektronen treffen auf die Szintillatoren (organische und anorganische Fluorophoren), die in Form einer Szintillationslösung mit der Probe vermischt wurden, und erzeugen Fluoreszenz (Lichtblitze). Diese Fluoreszenz wird an der Photokathode des Photosekundärelektronen-Vervielfachers (Photomultiplier) in Elektronenimpulse umgewandelt und gemessen. Je nach Energie und Menge, der in die Zelle aufgenommenen mit Tritium markierten Glukose, werden mehr oder weniger Lösungsmittelmoleküle und damit Fluorophore angeregt und im β -Counter gemessen. Der hierdurch im Photomultiplier ausgelöste Photostrompuls verhält sich über weite Bereiche proportional zu der Energie, welche die Fluoreszenz auslösenden β -Strahler abgeben. Szintillationszähler sind sehr gut als quantitative Messverfahren geeignet (PINGOUD 1997, S.34-36).

3.2.9 Einstellung der Parameter zur Messung der radioaktiven Glukose

Tab.5. Einstellung der Parameter am β -Counter (Beckman LS 1800 Liquid Scintillations System).

<i>Parameter</i>	<i>Einstellungen</i>
Messzeit (PRESET TIME)	10min
Wiederholung der Probenmessung (SAMPLE REPEAT)	1
Wiederholung des Messzyklus (CYCLE REPEAT)	1
Quenchemessung (H#)	0
Automatische Quench Kompensierung (AQC)	0
Quench Kompensationsfaktor (QCF)	0
Verwerfung niedriger Probewerte (LSR)	0
Computerschnittstelle (RS232)	0
Druckformat (PRINT FORMAT: Standard)	1
Messkanal (COUNT CHANNEL)	1
Öffnung des Messkanals (CHANNEL LOW and UP LIMIT)	0-600
Statistischer Fehler des Kanals (CHANNEL 2 SIGMA%)	2,0
Datenerfassung (DATA CALC PROGRAM)	Counts per minute (cpm)

3.2.10 Ergebnisauswertung und Statistik

Die Ergebnisse der Glukoseaufnahmemessung wurden mit Hilfe des Datenverarbeitungsprogramms Microsoft Excel 2000 zu einem arithmetischen Mittelwert (MW)¹ zusammengefasst und +/- der Standardabweichung (STD)² angegeben. Weiterhin konnten die Ergebnisse der Glukoseaufnahmemessung in counts per minute (cpm) auf eine für jeden Versuch gemessene Vollprobe bezogen werden, um Schwankungen der Szintillation des Versuchsmediums auszuschließen. Der in den Versuchen zur Proteingehaltbestimmung der Zellen gemessene und berechnete Proteingehalt in mg/ml diente der Darstellung der Ergebnisse der Glukoseaufnahme in nM Glukose/mg Protein³. Die Grafen wurden mit Sigma Plot 8.0 2002 der SPSS Inc. erstellt.

Um zu überprüfen, ob signifikante Unterschiede im direkten Vergleich zwischen unstimulierten Zellen und stimulierten Zellen vorlagen, wurde der ungepaarte Student-t-Test mit Hilfe des Programms Sigma Plot verwendet. Als Signifikanzniveau wurde 5% gewählt [$p < 0.05$].

Die Regressionsanalyse zur Berechnung des Korrelationskoeffizienten und der Steigung der Regressionsgeraden wurde mit Hilfe des Regressions Wizard⁴ des Programms Sigma Plot und Excel aus den Originaldaten (in cpm) erstellt. Es wurde zusätzlich zu dem Verlauf der Messwerte eine über die exponentielle oder quadratische Funktion berechnete sigmoide (Insulin), exponentielle (Troglitazon) oder polynomale Kurve (GW1929 und CLA) in bestimmte Abbildungen des Ergebnisteils gelegt.

¹ Mittelwert (MW) = $1/n \cdot \sum x_i$

² STD = $(1/n \cdot \sum (x_i - MW(x))^2)^{1/2}$

³ Glukoseaufnahme in nM/mg Protein = $((\text{Versuchswert [cpm]} \cdot \text{Radioaktivität der 2-Deoxy-D-[}^3\text{H]-Glukosestammlösung [24,16kBq/100}\mu\text{L]}) / \text{MW Vollproben [cpm]}) \cdot (10\mu\text{l 2-Deoxy-D-[}^3\text{H]-Glukosestammlösung [0,1mM, 9,25MBq/250}\mu\text{l]}) / \text{2-Deoxy-D-[}^3\text{H]-Glukosestammlösung [24,16kBq/100}\mu\text{L]}) / \text{MW Proteingehalt Probe [mg/ml]}$

⁴ Auswahl aus Gleichungskategorie (Equation Category)

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der 3T3-L1 Zellkultur

4.1.1 Vitalitätstest mit Trypanblau

Die Trypanblaufärbung der 3T3-L1 Zellen diente als Vitalitätstest vor Einsatz der Zellen in die Versuche. Zum Nachweis der Funktionalität des Tests wurden die Zellen unbehandelt oder mit Ethanol behandelt fotografiert (Abb.11.-13.).

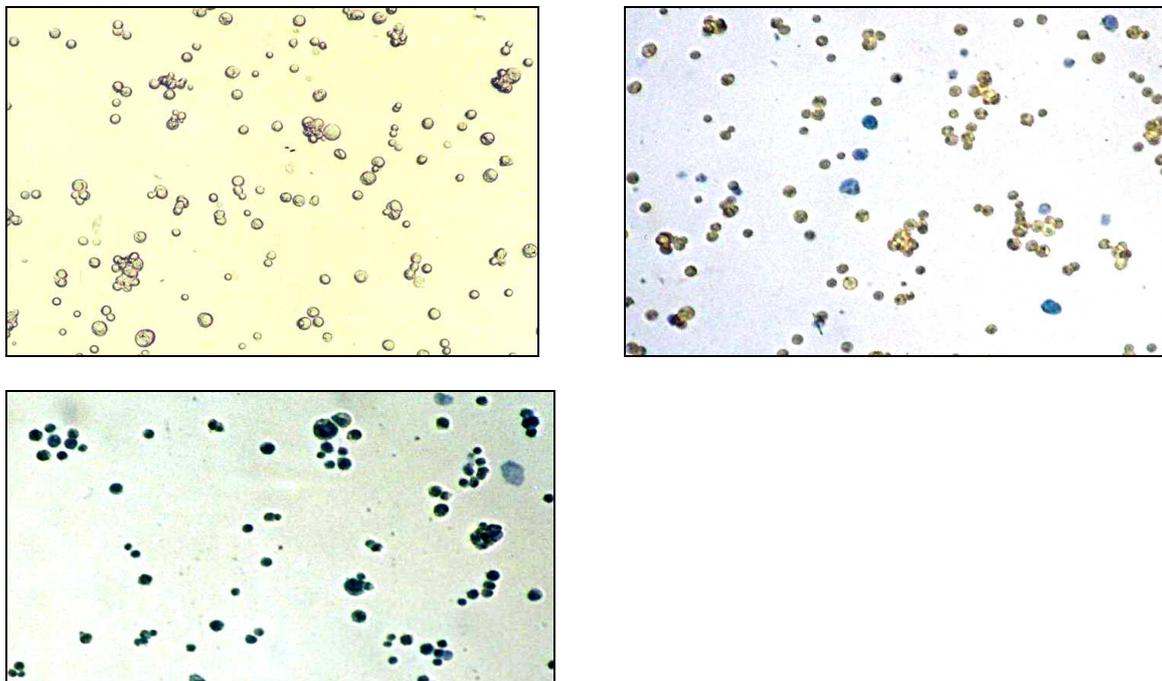


Abb. 11.-13. Die erste Abbildung (Abb.11.) zeigt eine mit PBS verdünnte ungefärbte Zellsuspension der 3T3-L1 Zellen nach dem Auftauen. Die zweite Abbildung (Abb.12.) zeigt eine mit PBS verdünnte Zellsuspension der 3T3-L1 Zellen nach dem Auftauen gefärbt mit Trypanblau (1:1 mit 0,5% Trypanblau). Beim wiederholten Auszählen der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer hat sich eine Letalität von 6-8% ergeben. Die dritte Abbildung (Abb.13.) zeigt eine mit PBS verdünnte Zellsuspension der 3T3-L1 Zellen nach dem Auftauen, gefärbt mit Trypanblau (1:1 mit 0,5% Trypanblau). Die Zellen wurden vor der Färbung für 3 min in Ethanol absolut inkubiert (1:1:1 mit 100% EtOH). Es konnten nahezu 100% letale Zellen gezählt werden.

Das Ergebnis des Vitalitätstests war ein Nachweis der Vitalität von 92-94% im arithmetischen Mittel. Wenn die Vitalität unter 90% lag, wurde die Zellsuspension verworfen. Der Nachweis der Funktionalität des Tests wurde durch die Inkubation der Zellen mit 100% Etanol erbracht. Es kam aufgrund der Zytotoxizität des Ethanol zu nahezu 100% letalen Zellen (Blaufärbung). Dieser Vitalitätstest wurde vor fast jedem Versuch durchgeführt.

4.1.2 Differenzierung

Tab.6. Morphologische Veränderungen der 3T3-L1 Zellen während der Differenzierung zum Adipozyten (unter dem Mikroskop sichtbar).

<i>Zeit in Tagen</i>	<i>Zugabe von Medien zur Differenzierung</i>	<i>Morphologische Veränderungen</i>
1. Tag der Differenzierung (1. Tag der Reifung)	1. Differenzierungsmedium	- 100% konfluente adhärente Monolayer- kultur aus Fibroblasten
3. Tag der Differenzierung (3. Tag der Reifung)	2. Differenzierungsmedium	- Bildung von insel- ähnlichen zellfreien Flächen, keine Konfluenz mehr - Bildung von langen Zellausläufern - Erste kleine Lipid- vakuolen vereinzelt in den Zellen zu erkennen
5. Tag der Differenzierung (5. Tag der Reifung)	1. Kultivierungsmedium	- Viele kleine und größere Lipidvakuolen in den Zellen zu erkennen, >60% der Zellen haben sichtbar Lipidvakuolen entwickelt
8. Tag der Reifung	1. Kultivierungsmedium	- Uni – und multivakuole Verteilung der Lipid- vakuolen in der Zelle: Vakuolen sind dicker und treten gehäufte auf (1-10 Lipidvakuolen/ Zelle) - Kreisförmige Anordnung der Lipidvakuolen in den Zellen - Wenige undifferenzierte Fibroblasten zu erkennen
10.Tag der Reifung	1. Kultivierungsmedium	- Lipidvakuolen füllen sich weiter - >90% der Zellen zeigen den Phänotyp der Adipozyten
13.-15. Tag der Reifung	Transportassaymedium	- Lipidvakuolen haben maximale Größe erreicht, weiterhin unregelmäßige Größenstadien zu erkennen - >90% der Zellen zeigen den Phänotyp der Adipozyten
		-

Zum Nachweis der geglückten Differenzierung und der adipozytentypischen Reifungsschritte wurden die Zellen in den verschiedenen Differenzierungsstadien bis zum reifen Adipozyten fotografiert (Abb.14.-20.).

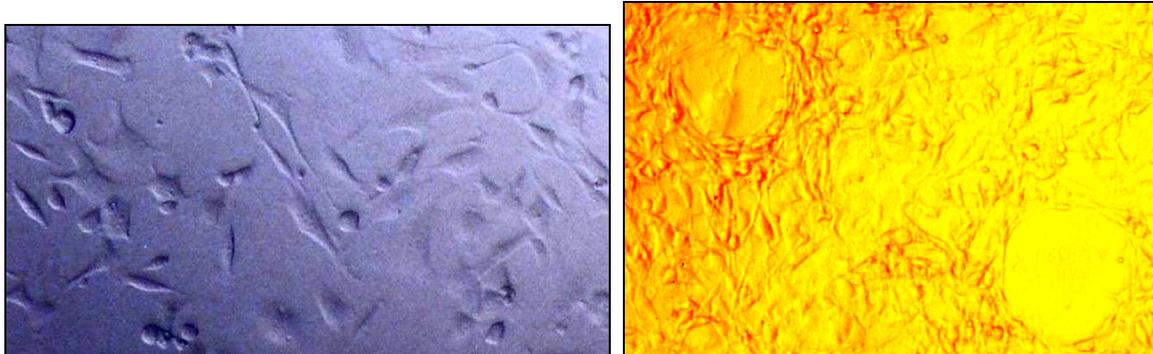


Abb.14-15. 2. Tag der Aussaat und 3. Tag der Differenzierung (3.Tag der Reifung) der 3T3-L1 Fibroblasten, die spezifischen Vorläuferzellen, die Präadipozyten.

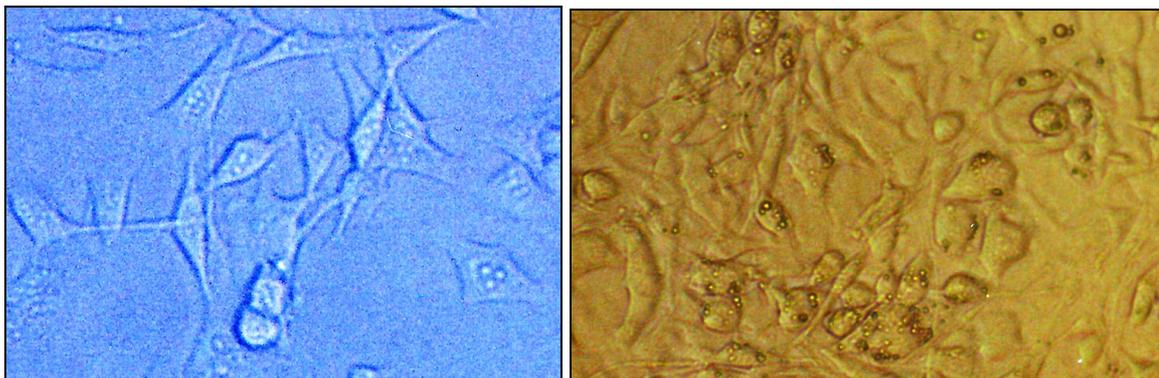


Abb.16-17. 4. und 5. Tag der Differenzierung (4. und 5. Tag der Reifung) der 3T3-L1 Fibroblasten

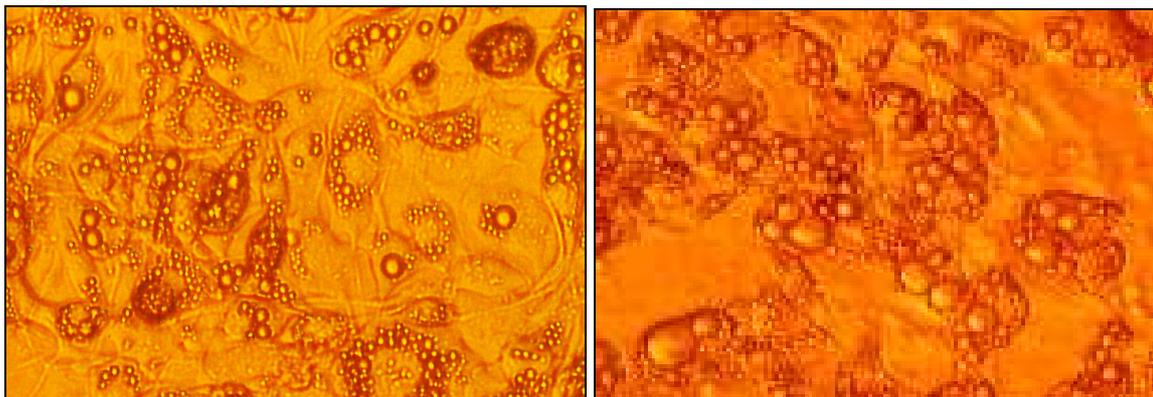


Abb.18-19. 9. Tag und 14.Tag der Reifung der 3T3-L1 Adipozyten

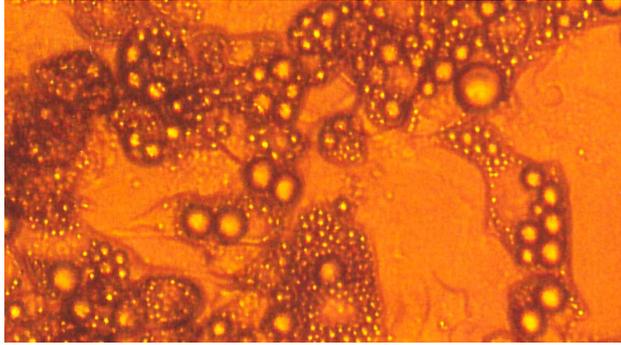


Abb.20. 15. Tag der Reifung der 3T3-L1 Adipozyten. Die reifen Adipozyten sind anhand ihrer Speicherfunktion der Lipide morphologisch deutlich zu erkennen. Ihr Volumen wird fast vollständig durch eine triglyceridhaltige Fettvakuole ausgefüllt. Sie bilden vereinzelt univakuoläre Zellen, jedoch hauptsächlich multivakuoläre Zellen. Das Zytoplasma mit dem Zellkern liegt in der schmalen Randzone.

4.1.3 Ölrot O Färbung

Ölrot O Färbung der differenzierten 3T3-L1 Zellen nach Shao und Lazar (1997).

Zum Nachweis der adipozytenspezifischen Lipidvakuole wurden die Zellen gefärbt und fotografiert (Abb.21.-22.).

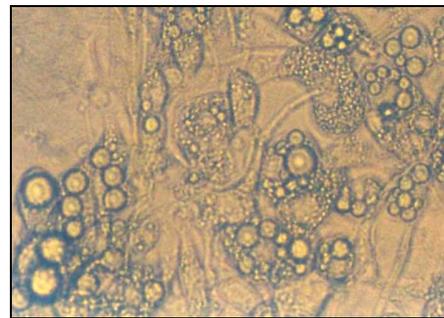
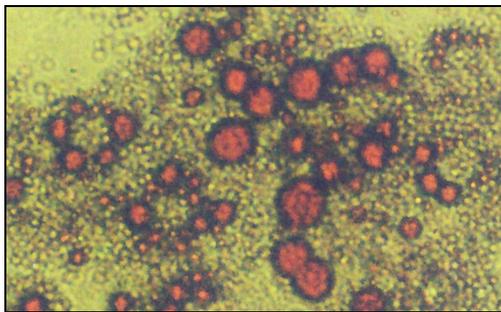


Abb.21.-22. Mit Ölrot O gefärbte Adipozyten und ungefärbte 3T3-L1 Adipozyten am 15.Tag der Reifung.

4.2 Vorversuche zur Messung der Glukoseaufnahme in 3T3-L1 Zellen

4.2.1 Glukoseaufnahme mit und ohne Zugabe von Cytochalasin B in 3T3-L1 Adipozyten

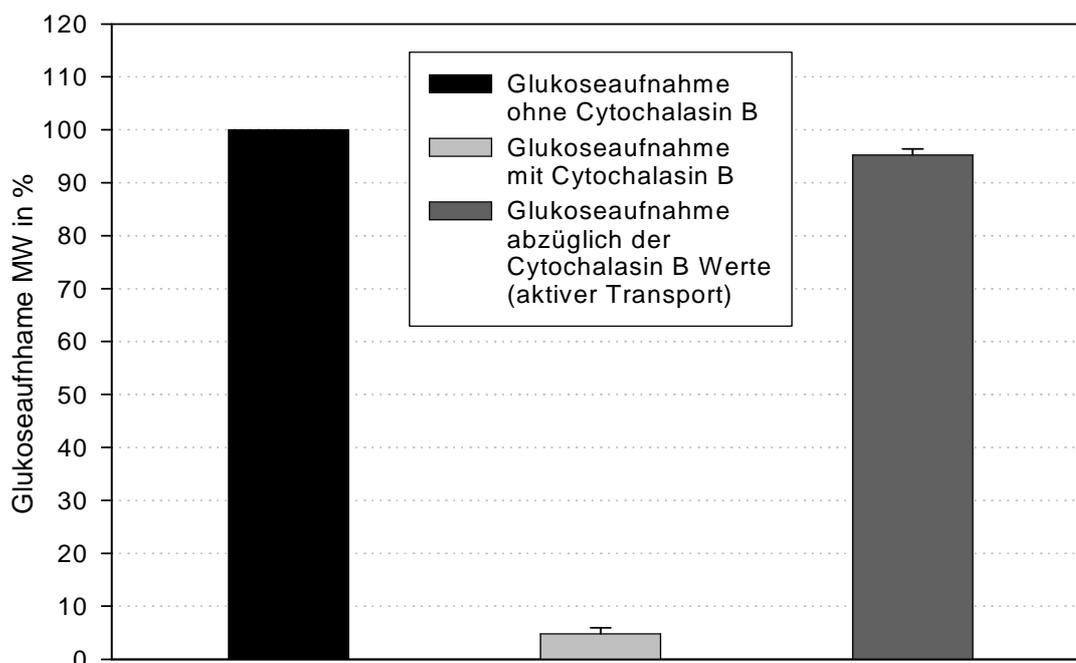


Abb.23. Glukoseaufnahme in 3T3-L1 Adipozyten mit und ohne Zugabe von 10 μ M Cytochalasin B (n: 39). Die 13-15 Tage lang gereiften Zellen wurden vor den Versuchen für 2 h im serumfreien Medium im Brutschrank kultiviert. Nach drei Waschschrritten mit KRP wurden die Zellen für 30 min sowohl mit als auch ohne Insulin in KRP inkubiert. Das Cytochalasin B wurde für 10 min bei 37°C vor der Inkubation mit der 2-Deoxy-D-[3 H]-Glukose über 10 min bei 37°C eingesetzt. Zur Bestimmung der unspezifisch an die Zellwand gebundenen Glukose wurde zu jeder Bestimmung des Glukoseeinstroms ein Wert unter Einfluss von 10 μ M Cytochalasin B ermittelt. Dieses diente zur Bestimmung des aktiven Transports⁵. Die absoluten Werte (in cpm) der eingesetzten Radioaktivität wurden im β -Counter gemessen und zu einem arithmetischen MW zusammengefasst. Die MW wurde in Prozent umgerechnet und für die Werte mit Cytochalasin B und abzüglich Cytochalasin B wurde die STD berechnet. Die Glukoseaufnahme ohne Cytochalasin B fungierte als 100%-Wert.

Abbildung 23 zeigt, dass unter Einfluss von 10 μ M Cytochalasin B die basale und insulinstimulierte Glukoseaufnahme in die 3T3-L1-Adipozyten zu 95,2% gehemmt wurde. Der Einsatz von Cytochalasin B diente dazu, den unspezifischen Glukosetransport und die unspezifisch an die Zellwand gebundene Glukose zu bestimmen. Dieser Wert betrug im Mittel 4,8% und wurde von allen Einzelmesswerten ohne Cytochalasineinfluss abgezogen. Die verbleibende Glukoseaufnahme ist dem aktiven Transport zuzuordnen. Die Hemmung der Glukoseaufnahme wurde durch die Stimulierung der Zellen mit Insulin oder einem PPAR γ -Liganden nicht beeinflusst.

⁵ Aktiver Transport = (Glukoseaufnahme ohne Cytochalasin B (in cpm) – Glukoseaufnahme mit Cytochalasin B (in cpm))/Glukoseaufnahme gesamt (ohne Cytochalasin B Zugabe)

4.2.2 Glukoseaufnahme mit und ohne Zugabe der Liganden-Lösungsvermittler Dimethylsulfoxid, Ethanol und Bovine Serum Albumin in 3T3-L1 Adipozyten

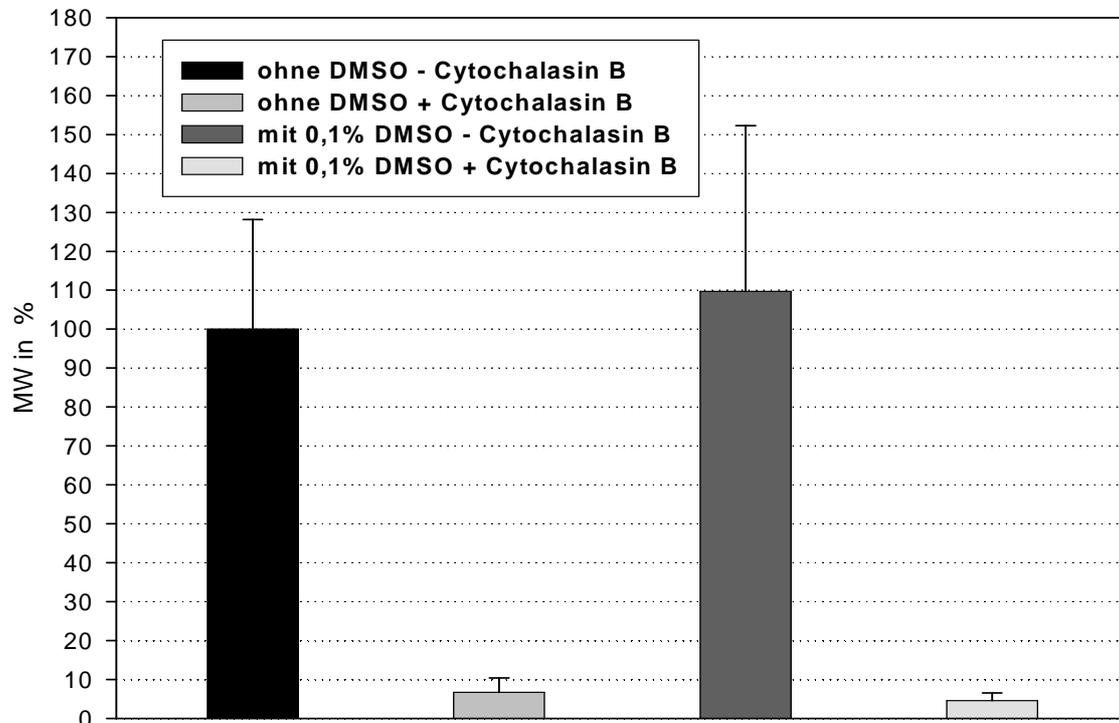


Abb.24. Wirkung von 0,1% DMSO auf die Glukoseaufnahme in 3T3-L1 Adipozyten (n: 10-14). Das Lösungsmittel DMSO diente zur Lösung der PPAR γ -Liganden Troglitazon und GW1929. Es wurde in der Konzentration von 0,1% /Well mit dem darin gelösten Liganden über 48 h eingesetzt. Zur Kontrolle der möglichen Modifikation der Ergebnisse durch DMSO wurden Proben, die nur 0,1% des Lösungsmittel ohne Liganden enthielten, mitgemessen. Als Kontrolle der zytotoxischen Wirkung des DMSO wurden auch Zellen ohne DMSO und ohne Ligandenzugabe gemessen, die als 100%-Wert fungierten. Um eine mögliche zusätzliche Beeinträchtigung durch die Zugabe von Cytochalasin B auf das DMSO zu erfassen, wurden diese Kontrollen sowohl mit als auch ohne 10 μ M Cytochalasin B ermittelt. Die absoluten Werte (in cpm) der eingesetzten Radioaktivität wurden im β -Counter gemessen und zu einem arithmetischen MW zusammengefasst. Der MW wurde in Prozent umgerechnet und +/- STD angegeben.

Abbildung 24 zeigt, dass der Einsatz des Lösungsmittels DMSO in Höhe von 0,1% keinen zytotoxischen Einfluss auf die Zellen hatte. Es besteht kein signifikanter Unterschied [$p=0.522$] zwischen dem Glukoseeinstrom mit 0,1% DMSO und ohne DMSO. Eine mögliche Beeinträchtigung der Cytochalasinwirkung durch DMSO wurde nicht nachgewiesen. Die Ergebnisse der Glukoseaufnahme unter Troglitazon- und GW1929-Einfluss, die in DMSO gelöst wurden, wurde durch die Zugabe von DMSO nicht signifikant modifiziert.

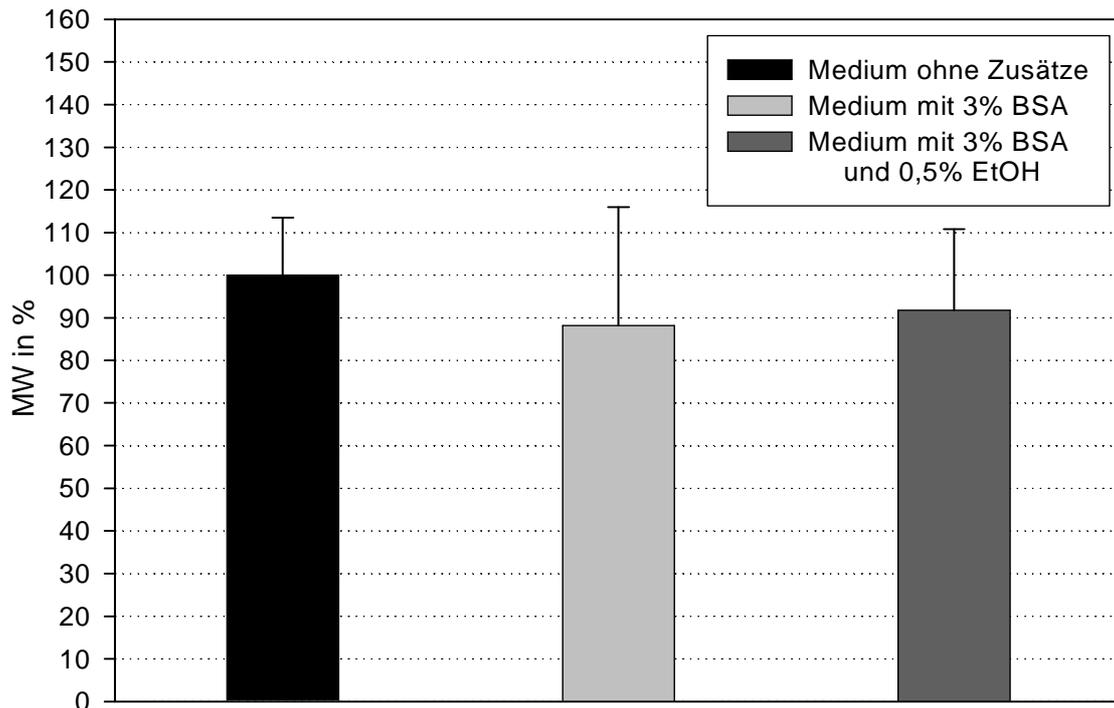


Abb.25. Wirkung von 0,5% EtOH und 3% BSA auf die Glukoseaufnahme in 3T3-L1 Adipozyten (n: 6-9). Der Liganden-Lösungsvermittler EtOH und BSA diente der Lösung und Bindung der CLA trans-10,cis-12 sowie des CLA-Gemisches trans-10,cis-12 und cis-9,trans-11. EtOH abs. wurde in der Konzentration von 0,5% mit dem darin gelösten Liganden über 48 h eingesetzt. Zur Kontrolle der möglichen Modifikation der Ergebnisse durch EtOH wurden Proben mit 0,5% des Lösungsmittels ohne Ligandenzugabe gemessen. Als Kontrolle der zytotoxischen Wirkung des EtOH wurden Zellen ohne EtOH und ohne Ligandenzugabe gemessen. Sie fungierten als 100%-Wert. Um eine mögliche Beeinträchtigung durch die Zugabe von 3% BSA auf die Glukoseaufnahme zu erfassen, wurden Proben nur mit 3% BSA und im Vergleich ohne BSA eingesetzt. Die absoluten Werte (in cpm) der eingesetzten Radioaktivität wurden im β -Counter gemessen und zu einem arithmetischen MW zusammengefasst. Der MW wurde in Prozent umgerechnet und +/- STD angegeben.

Abbildung 25 zeigt, dass weder der Einsatz von 0,5% EtOH, noch von 3% BSA einen signifikanten Einfluss auf die Höhe des Glukoseeinstroms hatte. Es besteht kein signifikanter Unterschied [$p=0.453$] zwischen dem Glukoseeinstrom mit 3% BSA und dem Medium ohne Zusätze. Es ist ebenfalls kein signifikanter Unterschied [$p=0.444$] zwischen dem Glukoseeinstrom mit 3% BSA sowie 0,5% EtOH und dem Medium ohne Zusätze festzustellen. Ethanol wirkte in dieser Konzentration nicht zytotoxisch. Die Ergebnisse der Glukoseaufnahme unter Einfluss von CLA, welches in EtOH gelöst wurden, wurden durch die Zugabe von EtOH nicht signifikant modifiziert.

4.3 Glukoseaufnahme bei verschiedenen Insulinkonzentrationen in 3T3-Fibroblasten und 3T3-L1-Adipozyten

4.3.1 Glukoseaufnahme bei verschiedenen Insulinkonzentrationen in nicht differenzierte 3T3-L1 Fibroblasten und differenzierte 3T3-L1 Adipozyten

Tab.7. Glukoseaufnahme bei verschiedenen Insulinkonzentrationen in nicht differenzierte 3T3-L1 Fibroblasten. Die absoluten Werte (in cpm) der eingesetzten Radioaktivität wurden im β -Counter gemessen und zu einem arithmetischen MW zusammengefasst. Dieser wurde zur Bestimmung der Glukoseaufnahme anhand der gemessenen cpm und der Proteinbestimmung der Zellen nach Lowry in nM Glukose/mg Protein umgerechnet (n: 1).

<i>c(Insulin) in nM</i>	<i>Glukoseaufnahme in nM Glukose/mg Protein</i>
0	0,005
1	0,006
10	0,007
50	0,007
1000	0,008

Tab.8. Glukoseaufnahme bei verschiedenen Insulinkonzentrationen in differenzierte 3T3-L1 Adipozyten. Die absoluten Werte (in cpm) der eingesetzten Radioaktivität wurden im β -Counter gemessen, zu einem arithmetischen MW zusammengefasst und in die Einheit Kilobecquerel (kBq) umgerechnet. Dieser MW, der von den Zellen aufgenommenen Glukose/Well, wurde auf den Proteingehalt der Zellen bezogen. Die Werte wurden in nM Glukose/mg Protein umgerechnet und +/- STD angegeben (n: 4-8).

<i>c(Insulin) in nM</i>	<i>Glukoseaufnahme in nM Glukose/mg Protein +/- STD</i>	<i>Signifikanz 0nM Insulin vs. c(Insulin) [p<0.05]</i>
0	0,039 +/- 0,010	
1	0,094 +/- 0,022	0.007
5	0,144 +/- 0,009	0.001
10	0,169 +/- 0,043	0.002
50	0,174 +/- 0,043	0.004
100	0,195 +/- 0,056	0.003
1000	0,174 +/- 0,029	0.001

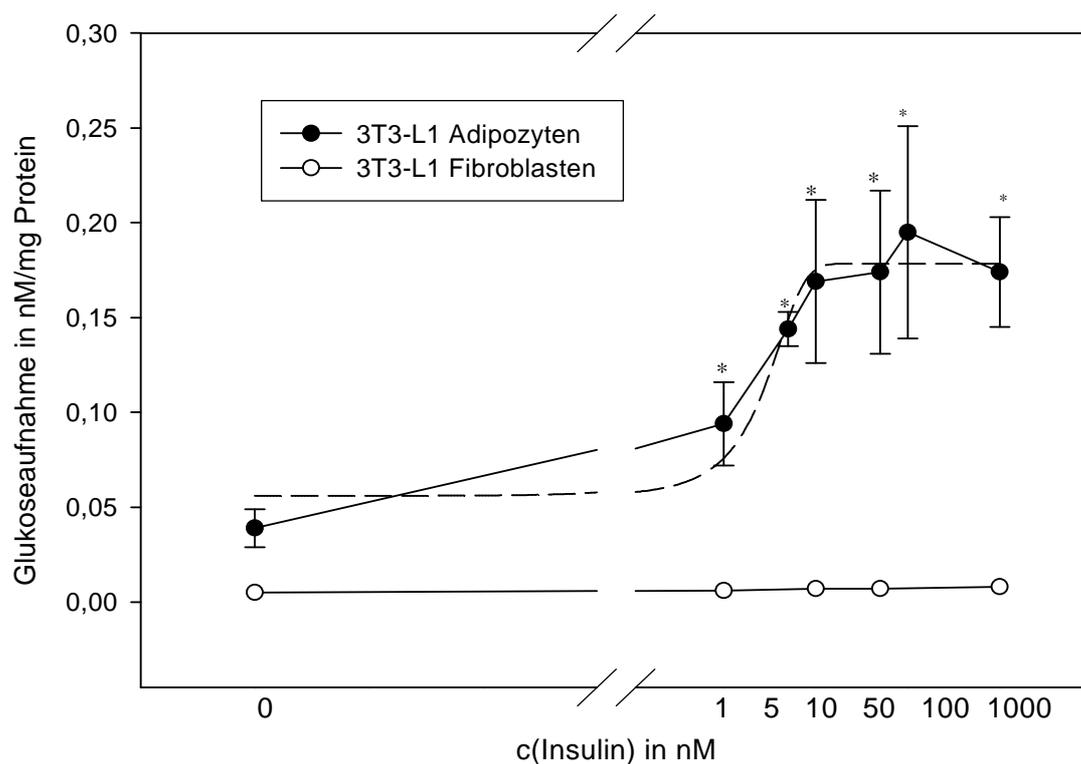


Abb.26. Glukoseaufnahme in differenzierte 3T3-L1 Adipozyten (n: 4-8) und nicht differenzierte 3T3-L1 Fibroblasten (n: 1). Die 13-15 Tage lang gereiften Adipozyten und die 6 Tage kultivierten Fibroblasten wurden vor den Versuchen für 2 h im serumfreien Medium im Brutschrank kultiviert. Nach drei Waschsritten mit KRP wurden die Zellen für 30 min mit 1, 5, 10, 50, 100 und 1000nM human Insulin inkubiert. Die Inkubation der 2-Deoxy-D- ^3H -Glukose betrug 10 min bei 37°C. Als Kontrolle zu der stimulierenden Wirkung des Insulins wurde 0nM Insulin verwendet. In den Verlauf der Messwerte wurde über ein Regression Wizard eine sigmoide Kurve zusätzlich eingelegt.

* $p < 0.05$ im direkten Vergleich zum Insulinnullwert

Die Abbildung 26 und die Tabellen 7 und 8 zeigen, dass mit zunehmender Insulinkonzentration die Glukoseaufnahme in die Adipozyten gesteigert wurde. Hierbei verhalten sich reife Adipozyten und undifferenzierte Fibroblasten, als Vorstadium der Adipozyten, unterschiedlich. Bei den Adipozyten konnte im direkten Vergleich zwischen dem Einsatz von 0nM Insulin und den verschiedenen eingesetzten Insulinkonzentrationen ein signifikanter Anstieg der Glukoseaufnahme bei allen verwendeten Konzentrationen gezeigt werden (Tab.8.). Bei den nicht differenzierten 3T3-L1 Fibroblasten kam es zu keinem deutlichen Anstieg der Glukoseaufnahme durch Insulinzugabe.

4.3.2 Aufnahmesteigerung der Glukose bei verschiedenen Insulinkonzentrationen im Vergleich zum Insulinnullwert in differenzierte 3T3-L1 Adipozyten und nicht differenzierte Fibroblasten

Tab.9. Aufnahmesteigerung der Glukose⁶ bei verschiedenen Insulinkonzentrationen im Vergleich zum Insulinnullwert in differenzierte 3T3-L1 Adipozyten (n: 4-8) und nicht differenzierte 3T3-L1 Fibroblasten (n: 1). Angabe der MW +/- STD.

<i>0nM Insulin:</i>	<i>Aufnahmesteigerung der Glukose bei verschiedenen c(Insulin) +/- STD in Adipozyten</i>	<i>Aufnahmesteigerung der Glukose bei verschiedenen c(Insulin) in Fibroblasten</i>
Zu 0nM Insulin	1,00 +/- 0,00	1,0
Zu 1nM Insulin	2,53 +/- 0,79	1,1
Zu 5nM Insulin	3,00 +/- 0,37	
Zu 10nM Insulin	4,39 +/- 0,77	1,5
Zu 50nM Insulin	4,87 +/- 1,18	1,5
Zu 100nM Insulin	5,09 +/- 1,31	
Zu 1000nM Insulin	4,88 +/- 0,97	1,7

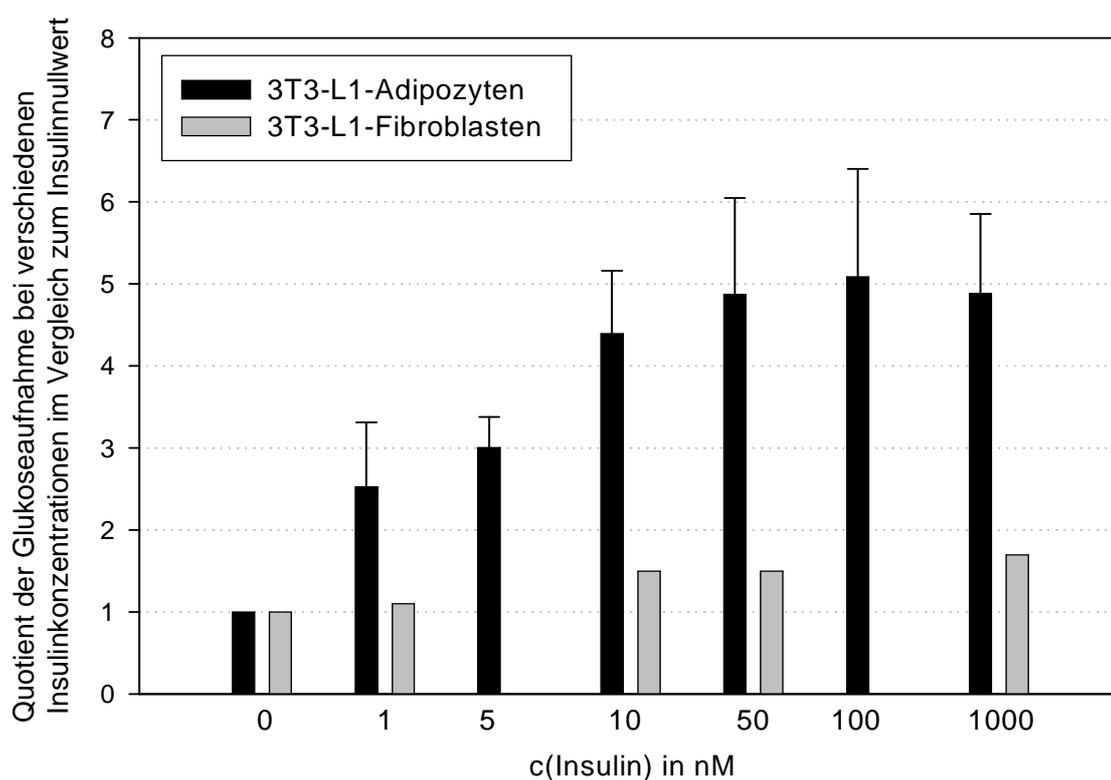


Abb.27. Aufnahmesteigerung der Glukose bei verschiedenen Insulinkonzentrationen im Vergleich zum Insulinnullwert in differenzierte 3T3-L1 Adipozyten (n: 4-8) und nicht differenzierte 3T3-L1 Fibroblasten (n: 1). Die 13-15 Tage lang gereiften Adipozyten und die 6 Tage kultivierten Fibroblasten wurden vor den Versuchen für 2 h im serumfreien Medium im Brutschrank kultiviert. Nach drei Waschschrritten mit KRP wurden die Zellen für 30 min mit 1, 5, 10, 50, 100 und 1000nM human Insulin inkubiert. Die Inkubation der 2-Deoxy-D-[³H]-Glukose betrug 10 min bei 37°C. Als Kontrolle wurde 0nM Insulin verwendet.

⁶ Aufnahmesteigerung der Glukose bei verschiedenen Insulinkonzentrationen im Vergleich zum Insulinnullwert: Quotient aus c(Insulin) (in cpm)/ 0nM Insulin (in cpm)

Aus der Abbildung 27 und der Tabelle 9 ist zu sehen, dass es mit steigender Insulinzugabe zu einer Aufnahmesteigerung der Glukoseaufnahme im Vergleich zum Insulinnullwert gekommen ist. Die höchste Aufnahmesteigerung (5,09 fach) erfolgte in reifen Adipozyten bei 100nM Insulin (Tab.9.). In den Fibroblasten kam es bei der höchsten Insulinkonzentration von 1000nM zu einem Anstieg um das 1,7 fache im Vergleich zum Insulinnullwert (1,0 fach). Bei den reifen Adipozyten kam es dagegen bei 1000nM Insulin zu einem 4,88 fachen Anstieg (Tab.9.). Das zeigt, dass die Fibroblasten bezüglich der Glukoseaufnahme anders reagierten als die Adipozyten.

In den folgenden Hauptversuchen wurden verschiedene chemische und natürliche potentielle PPAR γ -Liganden unter Einfluss von 0nM, 1nM und 50nM Insulinzugabe in reifen 3T3-L1 Adipozyten untersucht. Die Auswahl der Konzentrationen ergab sich anhand dieser Vorversuche.

4.4 Glukoseaufnahme unter Einfluss von Troglitazon in differenzierte 3T3-L1-Adipozyten

4.4.1 Glukoseaufnahme bei verschiedenen Insulinkonzentrationen unter Einfluss verschiedener Troglitazonkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten

Tab.10. Glukoseaufnahme bei verschiedenen Troglitazon- und Insulinkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten. Die absoluten Werte (in cpm) der eingesetzten Radioaktivität wurden im β -Counter gemessen, zu einem MW zusammengefasst und in die Einheit kBq umgerechnet. Dieser MW, der von den Zellen aufgenommenen Glukose/Well, wurde auf den Proteingehalt der Zellen bezogen. Die Werte wurden in nM Glukose/mg Protein umgerechnet und +/- STD angegeben. Die Signifikanz wurde im direkten Vergleich zwischen den verschiedenen Insulinkonzentrationen und dem Insulinnullwert bestimmt (n: 6-10).

<i>c(Troglitazon) in nM</i>	<i>Bei 0nM Insulin: Glukoseauf- nahme in nM/ mg Protein +/- STD</i>	<i>Bei 1nM Insulin: Glukoseauf- nahme in nM/ mg Protein +/- STD</i>	<i>Bei 50nM Insulin: Glukoseauf- nahme in nM/ mg Protein +/- STD</i>	<i>Signifikanz 0nM vs. 1nM Insulin [$p < 0.05$]</i>	<i>Signifikanz 0nM vs. 50nM Insulin [$p < 0.05$]</i>
0	0,024 +/-0,005	0,072 +/-0,012	0,148 +/-0,018	0.000	0.000
1	0,029 +/-0,006	0,086 +/-0,024	0,169 +/-0,026	0.000	0.000
10	0,031 +/-0,010	0,086 +/-0,024	0,180 +/-0,051	0.000	0.000
100	0,026 +/-0,009	0,08 +/- 0,025	0,174 +/-0,053	0.000	0.000
1000	0,036 +/-0,014	0,104 +/-0,033	0,195 +/-0,045	0.000	0.000
10000	0,125 +/-0,400	0,244 +/-0,070	0,351 +/-0,074	0.016	0.000

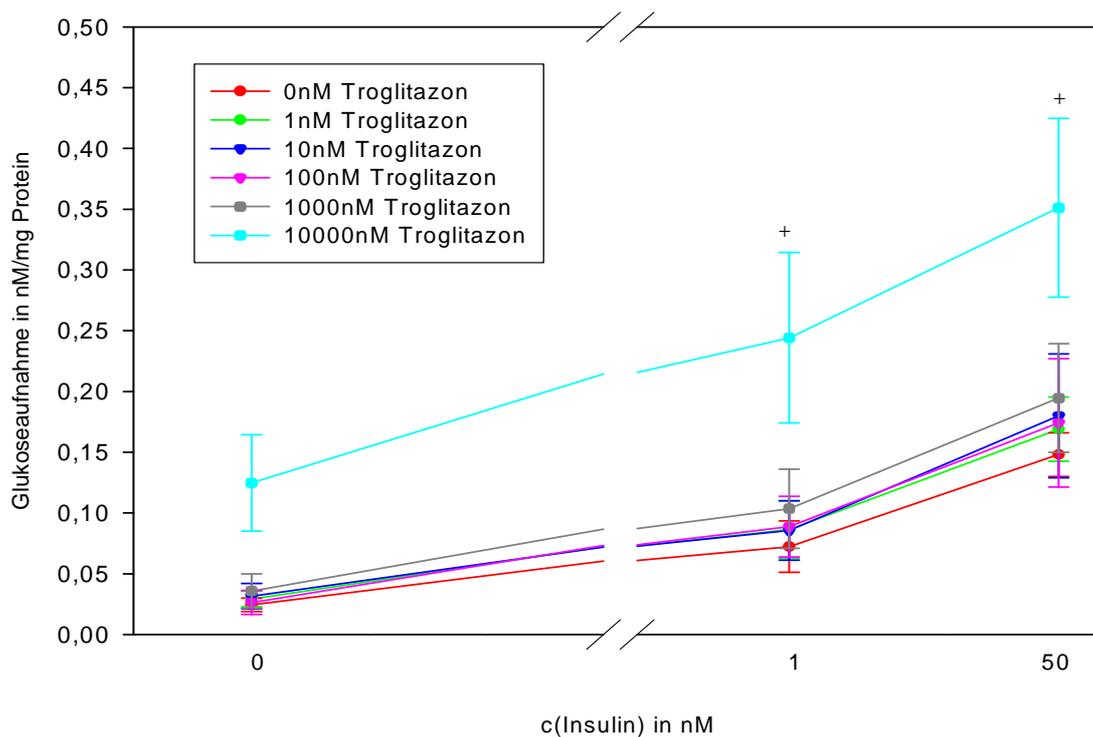


Abb.28. Glukoseaufnahme bei verschiedenen Insulinkonzentrationen in Abhängigkeit vom Niveau der verschiedenen Troglitazonkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten (n: 6-10).

Die Stimulierung mit Troglitazon erfolgt über 48 h in den Konzentrationen 1, 10, 100, 1000 und 10000nM. Die 13-15 Tage lang gereiften Zellen wurden vor den Versuchen für 2 h im serumfreien Medium im Brutschrank kultiviert. Nach drei Waschschritten mit KRP wurden die Zellen für 30 min mit 0, 1 und 50nM human Insulin inkubiert. Die Inkubation der 2-Deoxy-D-[³H]-Glukose betrug 10 min bei 37°C. Als Kontrolle der stimulierenden Wirkung Troglitazon und Insulin wurde 0nM Troglitazon und 0nM Insulin eingesetzt.

+ $p < 0.05$, bei allen Konzentrationen im direkten Vergleich zum Insulinnullwert

Die Abbildung 28 und die Tabelle 10 zeigen, dass die mit dem pharmakologischen PPAR γ -Liganden Troglitazon stimulierte Glukoseaufnahme in 3T3-L1-Adipozyten mit ansteigender Insulinkonzentration unabhängig von der eingesetzten Troglitazonkonzentration erhöht wurde. Das Niveau der Glukoseaufnahme erhöhte sich auch mit steigender Troglitazonkonzentration, besonders bei dem Einsatz von 10000nM Troglitazon.

Die Tabelle 10 zeigt weiterhin, dass Insulin in den Konzentrationen 1nM und 50nM die Glukoseaufnahme unabhängig von den eingesetzten Troglitazonkonzentrationen signifikant zum Insulinnullwert erhöht hat.

Tab.11. Signifikanz der Glukoseaufnahme bei verschiedenen Troglitazon- und Insulinkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten. Die Signifikanz wurde im direkten Vergleich zwischen den verschiedenen Troglitazonkonzentrationen und dem Troglitazonnullwert bestimmt (n: 6-10).

<i>c(Troglitazon) in nM</i>	<i>Bei 0nM Insulin: Signifikanz 0nM Troglitazon vs. c(Troglitazon) [p<0.05]</i>	<i>Bei 1nM Insulin: Signifikanz 0nM Troglitazon vs. c(Troglitazon) [p<0.05]</i>	<i>Bei 50nM Insulin: Signifikanz 0nM Troglitazon vs. c(Troglitazon) [p<0.05]</i>
0			
1	0.072	0.200	0.108
10	0.056	0.237	0.145
100	0.558	0.152	0.242
1000	0.021	0.028	0.025
10000	0.000	0.000	0.000

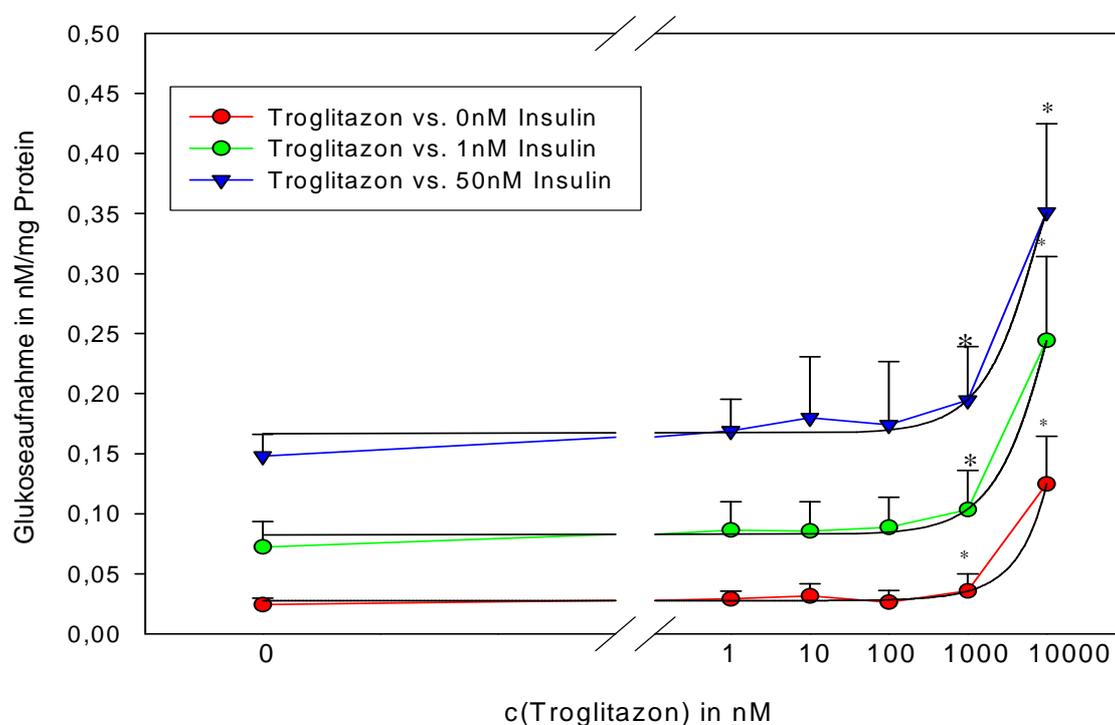


Abb.29. Glukoseaufnahme bei verschiedenen Troglitazonkonzentrationen in Abhängigkeit vom Niveau der verschiedenen Insulinkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten (n: 6-10).

Die Stimulierung mit Troglitazon erfolgte über 48 h in den Konzentrationen 1, 10, 100, 1000 und 10000nM. Die 13-15 Tage lang gereiften Zellen wurden vor den Versuchen für 2 h im serumfreien Medium im Brutschrank kultiviert. Nach drei Waschschrritten mit KRP wurden die Zellen für 30 min mit 0, 1 und 50nM human Insulin inkubiert. Die Inkubation der 2-Deoxy-D-[³H]-Glukose betrug danach 10 min bei 37°C. Als Kontrolle zu der stimulierenden Wirkung von Troglitazon und Insulin wurde 0nM Troglitazon eingesetzt. In den Verlauf der Messwerte wurde eine exponentiale Regressionsgerade zusätzlich eingefügt. Anhand der Regressionsanalyse wurde die Steigung der drei Grafen berechnet und verglichen.

* $p < 0.05$ im direkten Vergleich zum Troglitazonnullwert

Anhand der Abbildung 29 und der Tabelle 11 ist zu sehen, dass die mit Troglitazon stimulierte Glukoseaufnahme in 3T3-L1-Adipozyten mit ansteigender Troglitazon-

konzentration in den Konzentrationen von 1000nM und 10000nM unabhängig von der eingesetzten Insulinkonzentration erhöht wurde. Der Anstieg zwischen 1000nM und 10000nM Troglitazon war bei fehlender Insulinzugabe am geringsten.

Im direkten Vergleich zwischen fehlender Troglitazonstimulierung und 1000nM Troglitazon konnte unabhängig von der eingesetzten Insulinkonzentration ein signifikanter Unterschied der Glukoseaufnahme [$p=0.021$, $p=0.028$ und $p=0.025$] berechnet werden. Ebenfalls konnte ein signifikanter Unterschied der Glukoseaufnahme im direkten Vergleich zwischen fehlender Troglitazonstimulierung und 10000nM Troglitazon unabhängig von der eingesetzten Insulinkonzentration [$p=0.000$] festgestellt werden (Tab.11).

Tab.12. Steigung der Glukoseaufnahme bei verschiedenen Troglitazon- und Insulinkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten (n: 6-10).

<i>Steigung bei vers. c(Troglitazon)</i>	<i>Bei 0nM Insulin</i>	<i>Bei 1nM Insulin</i>	<i>Bei 50nM Insulin</i>
Von 0 zu 10 μ M (10000nM)	0,010	0,016	0,018
Von 0 zu 1 μ M (1000nM)	0,008	0,021	0,028
Von 1 μ M (1000nM) zu 10 μ M (10000nM)	0,010	0,016	0,017

Die Tabelle 12 zeigt, dass bei dem Einsatz von 50nM Insulin im Vergleich zu 0 und 1nM Insulin von 0 bis 10000nM Troglitazon die Steigung mit 0,018 am stärksten war, gefolgt von 0,016 bei 1nM Insulin. Die Steigung von 0 bis 10000nM Troglitazon war verglichen mit der Steigung von 1000 bis 10000nM Troglitazon innerhalb der verwendeten Insulinkonzentrationen annähernd identisch. Es ist festzustellen, dass die Steigung bei der maximal verwendeten Konzentration von 10000nM Troglitazon nicht abgenommen hat. Die Steigung unterschied sich ebenfalls insulinabhängig zwischen 0 und 1000nM Troglitazon und 1000 und 10000nM Troglitazon. Hierbei wurde die geringste Steigung mit 0,008 bzw. 0,010 bei 0nM Insulin erzielt und somit eine um das 3,5 fache bzw. 1,7 fache geringere Steigung im Vergleich zu 50nM Insulin mit 0,028 bzw. 0,017 erreicht.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Steigung mit zunehmender Insulinkonzentration erhöht hat. Darüber hinaus war der Anstieg zwischen 0 und 1000nM Troglitazon bei 1 und 50nM Insulin am größten.

4.4.2 Aufnahmesteigerung der Glukose bei verschiedenen Troglitazon- und Insulinkonzentrationen im Vergleich zum Nullwert in 3T3-L1 Adipozyten

Tab.13. Aufnahmesteigerung der Glukose⁶ bei verschiedenen Insulinkonzentrationen im Vergleich zum Insulinnullwert nach der Inkubation mit verschiedenen Troglitazonkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten. Angabe der Quotienten, gebildet aus den MW (n: 6-10).

<i>c(Troglitazon) in nM</i>	<i>Quotient aus 0nM zu 0nM Insulin</i>	<i>Quotient aus 1nM zu 0nM Insulin</i>	<i>Quotient aus 50nM zu 0nM Insulin</i>
0	1,00	3,01	6,36
1	1,00	2,98	6,10
10	1,00	2,82	6,19
100	1,00	3,31	6,36
1000	1,00	3,33	6,36
10000	1,00	2,02	3,00

Die Tabelle 13 zeigt, dass der Anstieg der Glukoseaufnahme bei den verschiedenen Insulinkonzentrationen im Vergleich zu dem Insulinnullwert bei allen eingesetzten Troglitazonkonzentrationen im Mittel konstant war. Bei 1nM Insulin lag der Quotient zwischen 2,82 und 3,33, mit Ausnahme bei 10000nM Troglitazon. Hier erfolgte ein 2,02 facher Anstieg der Glukoseaufnahme. Bei 50nM Insulin lag der Quotient zwischen 6,10 und 6,36, mit Ausnahme bei 10000nM Troglitazon, wo ein 3,00 facher Anstieg der Glukoseaufnahme erfolgte. Das zeigt, dass Insulin unabhängig von der eingesetzten Troglitazonkonzentration die gleiche Wirkung auf den Glukoseeinstrom ausgeübt hat. Dieses gilt nicht für die maximal eingesetzte Troglitazonkonzentration von 10000nM.

Tab.14. Aufnahmesteigerung der Glukose⁶ bei verschiedenen Troglitazonkonzentrationen im Vergleich zum Troglitazonnullwert nach der Inkubation mit verschiedenen Insulinkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten Angabe der Quotienten, gebildet aus den MW (n: 6-10).

<i>c(Troglitazon) in nM</i>	<i>Bei 0nM Insulin: Quotient aus c(Troglitazon) zu 0nM Troglitazon</i>	<i>Bei 1nM Insulin: Quotient aus c(Troglitazon) zu 0nM Troglitazon</i>	<i>Bei 50nM Insulin: Quotient aus c(Troglitazon) zu 0nM Troglitazon</i>
0	1,00	1,00	1,00
1	1,12	1,20	1,14
10	1,29	1,18	1,22
100	1,08	1,23	1,18
1000	1,47	1,43	1,31
10000	5,13	3,38	2,37

Die Tabelle 14 zeigt, dass sich bei der Inkubation mit 10000nM Troglitazon die Werte im Vergleich zu 0nM Troglitazon (1,00) je nach verwendeter oder fehlender Insulinzugabe erhöhten. Die höchste Glukoseaufnahme wurde bei 0nM Insulin mit 5,13 und die niedrigste bei 50nM Insulin mit 2,37 erreicht. Gleiches gilt für 1000nM Troglitazon, wo ebenfalls die höchste Aufnahmesteigerung bei 0nM Insulin mit 1,47 und die geringste Steigerung bei 50nM Insulin mit 1,31 erzielt wurde (Tab.14.).

⁶ Aufnahmesteigerung der Glukose bei verschiedenen Insulinkonzentrationen im Vergleich zum Insulinnullwert: Quotient aus $c(\text{Insulin})$ (in cpm)/ $0nM$ Insulin (in cpm)

⁶ Aufnahmesteigerung der Glukose bei verschiedenen Troglitazonkonzentrationen im Vergleich zum Troglitazonnullwert: Quotient aus $c(\text{Troglitazon})$ (in cpm)/ $0nM$ Troglitazon (in cpm)

4.5 Glukoseaufnahme unter Einfluss von GW1929 in differenzierte 3T3-L1-Adipozyten

4.5.1 Glukoseaufnahme bei verschiedenen Insulinkonzentrationen unter Einfluss verschiedener GW1929- Konzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten

Tab.15. Glukoseaufnahme bei verschiedenen GW1929- und Insulinkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten. Die absoluten Werte (in cpm) der eingesetzten Radioaktivität wurden im β -Counter gemessen, zu einem arithmetischen MW zusammengefasst und in die Einheit kBq umgerechnet. Dieser MW der von den Zellen aufgenommenen Glukose/Well wurde auf den Proteingehalt der Zellen bezogen. Die Werte wurden in nM Glukose/mg Protein umgerechnet und +/- STD angegeben. Die Signifikanz wurde im direkten Vergleich zwischen den verschiedenen Insulinkonzentrationen und dem Insulinnullwert bestimmt (n: 6).

<i>c(GW1929) in nM</i>	<i>Bei 0nM Insulin: Glukoseaufnahme in nM/mg Protein +/- STD</i>	<i>Bei 1nM Insulin: Glukoseaufnahme in nM/mg Protein +/- STD</i>	<i>Bei 50nM Insulin: Glukoseaufnahme in nM/mg Protein +/- STD</i>	<i>Signifikanz 0nM vs. 1nM Insulin [p<0.05]</i>	<i>Signifikanz 0nM vs. 50nM Insulin [p<0.05]</i>
0	0,039 +/-0,006	0,094 +/-0,033	0,214 +/-0,051	0.011	0.000
1	0,046 +/-0,013	0,146 +/-0,046	0,285 +/-0,055	0.003	0.000
10	0,046 +/-0,013	0,158 +/-0,038	0,320 +/-0,106	0.000	0.001
100	0,054 +/-0,008	0,159 +/-0,008	0,304 +/-0,058	0.000	0.000
1000	0,051 +/-0,013	0,142 +/-0,029	0,252 +/-0,079	0.000	0.001

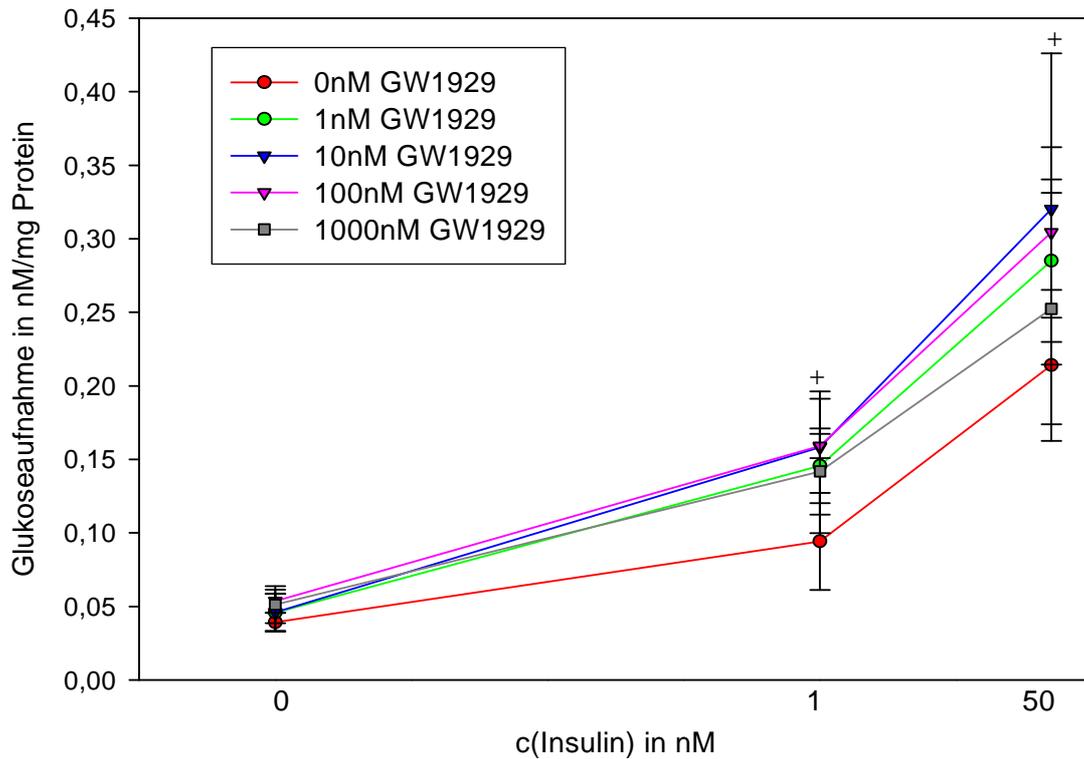


Abb.30. Glukoseaufnahme bei verschiedenen Insulinkonzentrationen in Abhängigkeit vom Niveau der verschiedenen GW1929-Konzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten (n: 6).

Die Stimulierung mit GW1929 erfolgt über 48 h in den Konzentrationen 1, 10, 100 und 1000nM. Die 13-15 Tage lang gereiften Zellen wurden vor den Versuchen für 2 h im serumfreien Medium im Brutschrank kultiviert. Nach drei Waschschrritten mit KRP wurden die Zellen für 30 min mit 0, 1 und 50nM human Insulin inkubiert. Die Inkubation der 2-Deoxy-D-[³H]-Glukose betrug 10 min bei 37°C. Als Kontrolle der stimulierenden Wirkung von GW1929 und Insulin wurde 0nM GW1929 und 0nM Insulin eingesetzt.

+ p<0.05, bei allen Konzentrationen im direkten Vergleich zum Insulinnullwert

Die Abbildung 30 und die Tabelle 15 zeigen, dass die mit dem chemischen PPAR γ -Liganden GW1929 stimulierte Glukoseaufnahme in 3T3-L1-Adipozyten mit ansteigender Insulinkonzentration unabhängig von der eingesetzten GW1929-Konzentration erhöht wurde. Das Niveau der Glukoseaufnahme erhöhte sich auch bei ansteigenden GW1929-Konzentrationen signifikant (Tab.16.). Die Tabelle 15 zeigt weiterhin, dass Insulin in den Konzentrationen 1nM und 50nM die Glukoseaufnahme unabhängig von den eingesetzten GW1929-Konzentrationen signifikant zum Insulinnullwert erhöht hat.

Tab.16. Signifikanz der Glukoseaufnahme bei verschiedenen GW1929- und Insulinkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten. Die Signifikanz wurde im direkten Vergleich zwischen den verschiedenen GW1929-Konzentrationen und dem GW1929-Nullwert bestimmt (n: 6).

<i>c</i> (GW1929) in nM	Bei 0nM Insulin: Signifikanz 0nM GW1929 vs. <i>c</i> (GW1929) [<i>p</i> <0.05]	Bei 1nM Insulin: Signifikanz 0nM GW1929 vs. <i>c</i> (GW1929) [<i>p</i> <0.05]	Bei 50nM Insulin: Signifikanz 0nM GW1929 vs. <i>c</i> (GW1929) [<i>p</i> <0.05]
0			
1	0.285	0.050	0.044
10	0.270	0.011	0.051
100	0.006	0.001	0.017
1000	0.064	0.025	0.340

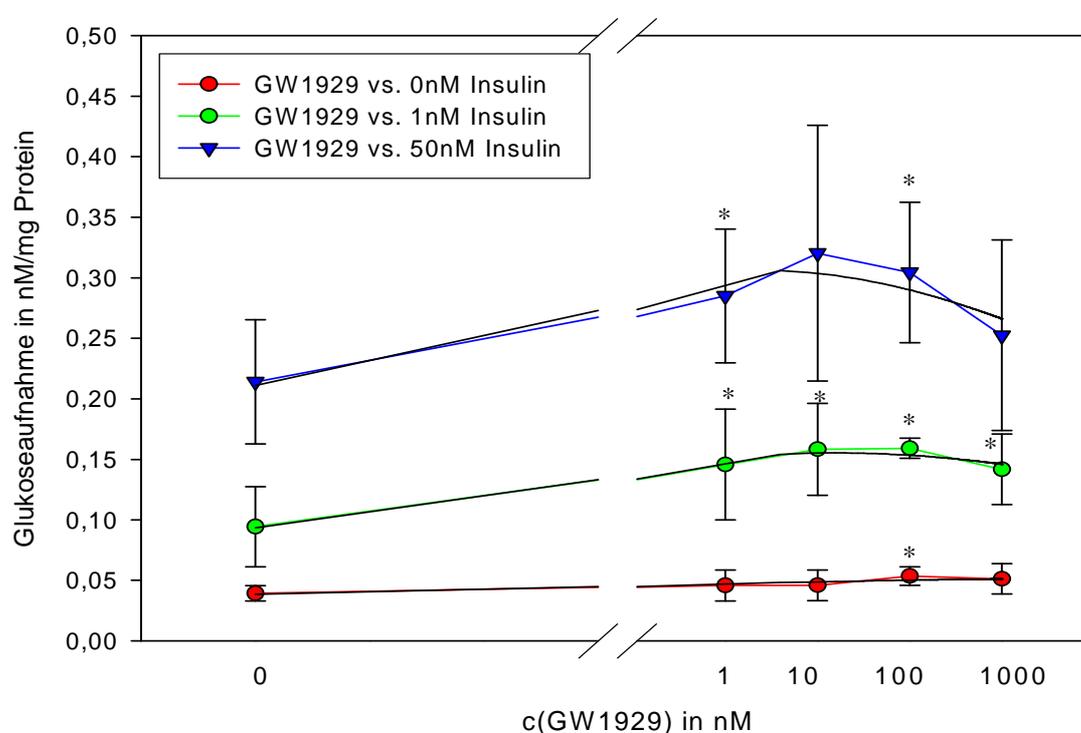


Abb.31. Glukoseaufnahme bei verschiedenen GW1929-Konzentrationen in Abhängigkeit vom Niveau der verschiedenen Insulinkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten (n: 6).

Die Stimulierung mit GW1929 erfolgte über 48 h in den Konzentrationen 1, 10, 100 und 1000nM. Die 13-15 Tage lang gereiften Zellen wurden vor den Versuchen für 2 h im serumfreien Medium im Brutschrank kultiviert. Nach drei Waschschrritten mit KRP wurden die Zellen für 30 min mit 0, 1 und 50nM human Insulin inkubiert. Die Inkubation der 2-Deoxy-D-[³H]-Glukose betrug 10 min bei 37°C. Als Kontrolle der stimulierenden Wirkung von GW1929 und Insulin wurde 0nM GW1929 eingesetzt. In den Verlauf der Messwerte wurde über eine quadratische Funktion ein polynomaler Kurvenverlauf zusätzlich eingelegt. Anhand der Regressionsanalyse wurde die Steigung der drei Grafen berechnet und verglichen.

* *p*<0.05 im direkten Vergleich zum GW1929-Nullwert

Die Abbildung 31 und die Tabelle 16 zeigen, dass die mit dem chemischen PPAR γ -Liganden GW1929 stimulierte Glukoseaufnahme in 3T3-L1-Adipozyten mit ansteigender GW1929-Konzentration, in Abhängigkeit von der eingesetzten Insulinkonzentration, zum

Teil signifikant erhöht wurde. Das Niveau der Glukoseaufnahme wurde bei dem Einsatz von 100nM GW1929 bei allen Insulineinsätzen signifikant [$p=0.006$, $p=0.001$ und $p=0.017$] zum GW1929-Nullwert erhöht. Bei 50nM Insulin kam es zusätzlich zu einer signifikanten Erhöhung der Glukoseaufnahme bei 1nM GW1929 [$p=0.044$]. Bei 10nM GW1929 wurde das Signifikanzniveau von [$p<0.05$] mit [$p=0.051$] knapp verfehlt. Bei dem Einsatz von 1nM Insulin konnte die Glukoseaufnahme im direkten Vergleich zwischen dem GW1929-Nullwert und den verschiedenen GW1929-Konzentrationen bei allen verwendeten Konzentrationen signifikant erhöht werden.

Tab.17. Steigung der Glukoseaufnahme bei verschiedenen GW1929- und Insulinkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten (n: 6).

<i>Steigung bei vers. c(GW1929)</i>	<i>Bei 0nM Insulin</i>	<i>Bei 1nM Insulin</i>	<i>Bei 50nM Insulin</i>
Von 0 zu 1 μ M (1000nM)	0,006	0,005	-0,025
Von 0 zu 0,01 μ M (10nM)	0,000	4,413	7,971
Von 0 zu 0,1 μ M (100nM)	0,105	0,310	0,391

Die Tabelle 17 zeigt, dass die Steigung von 0 bis 1000nM GW1929 bei dem Einsatz von 0 und 1nM Insulin sehr gering (0,006 und 0,005) und bei 50nM Insulin negativ (-0,025) gewesen ist.

Bei dem Einsatz von 0 bis 10nM GW1929 wurde die höchste Steigung bei 1nM (4,413) und 50nM (7,971) Insulin erzielt. Im Gegensatz zu diesen Werten ist die Steigung bei fehlender Insulinzugabe Null. Es ist festzustellen, dass die Glukoseaufnahme durch den Einsatz von 10nM GW1929 nur unter Zugabe von Insulin gesteigert werden konnte.

Ohne Insulinzugabe wurde die höchste Steigung (0,105) von 0 zu 100nM GW1929 erzielt, was unter der Steigung (0,310 und 0,391) bei Insulinzugabe lag.

4.5.2 Aufnahmesteigerung der Glukose bei verschiedenen GW1929- und Insulinkonzentrationen im Vergleich zum Nullwert in 3T3-L1 Adipozyten

Tab.18. Aufnahmesteigerung der Glukose⁶ bei verschiedenen Insulinkonzentrationen im Vergleich zum Insulinnullwert nach der Inkubation mit verschiedenen GW1929-Konzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten. Angabe der Quotienten, gebildet aus den MW (n: 6).

<i>c(GW1929) in nM</i>	<i>Quotient aus 0nM zu 0nM Insulin</i>	<i>Quotient aus 1nM zu 0nM Insulin</i>	<i>Quotient aus 50nM zu 0nM Insulin</i>
0	1,00	2,42	5,54
1	1,00	3,45	6,84
10	1,00	3,81	8,00
100	1,00	3,02	5,77
1000	1,00	3,08	5,75

Die Tabelle 18 zeigt, dass der Anstieg der Glukoseaufnahme bei verschiedenen Insulinkonzentrationen im Vergleich zu dem Insulinnullwert abhängig von der GW1929-

⁶ Aufnahmesteigerung der Glukose bei verschiedenen Insulinkonzentrationen im Vergleich zum Insulinnullwert: Quotient aus c(Insulin) (in cpm)/ 0nM Insulin (in cpm)

Stimulierung ist. Bei 1nM Insulin liegt der Quotient zwischen 2,42 bei fehlender GW1929-Zugabe und 3,81 bei 10nM GW1929-Zugabe. Bei 50nM Insulin liegt der Quotient zwischen 5,54 bei fehlender GW1929-Zugabe und 8,00 bei 10nM GW1929. Durch die Zugabe von GW1929 konnte die Glukoseaufnahme, im Vergleich zu fehlender GW1929 Zugabe, gesteigert werden. In der Kombination aus 50nM Insulin und 10nM GW1929 konnte eine im eingesetzten Konzentrationspektrum maximale Wirkung auf den Glukosetransport erzielt werden.

Tab.19. Aufnahmesteigerung der Glukose⁶ bei verschiedenen GW1929-Konzentrationen im Vergleich zum GW1929-Nullwert nach der Inkubation mit verschiedenen Insulin-konzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten. Angabe der Quotienten, gebildet aus den MW (n: 6).

<i>C(GW1929) in nM</i>	<i>Bei 0nM Insulin: Quotient aus c(GW1929) zu 0nM GW1929</i>	<i>Bei 1nM Insulin: Quotient aus c(GW1929) zu 0nM GW1929</i>	<i>Bei 50nM Insulin: Quotient aus c(GW1929) zu 0nM GW1929</i>
0	1,00	1,00	1,00
1	1,17	1,54	1,33
10	1,17	1,68	1,50
100	1,36	1,69	1,42
1000	1,31	1,50	1,18

Die Tabelle 19 zeigt, dass die höchste Glukoseaufnahmesteigerung im Vergleich zur Kontrolle ohne GW1929 (1,00) bei allen verwendeten GW1929-Konzentrationen durch den zusätzlichen Einsatz von 1nM Insulin erzielt wurde. Die Glukoseaufnahme bei 1nM Insulin unter der Zugabe von 1nM (1,54), 10nM (1,68), 100nM (1,69) und 1000nM (1,50) GW1929 überstieg alle Werte, die ohne Insulin und bei 50nM Insulin gemessen worden sind.

⁶ Aufnahmesteigerung der Glukose bei verschiedenen GW1929-Konzentrationen im Vergleich zum GW1929-Nullwert: Quotient aus c(GW1929) (in cpm)/ 0nM GW1929 (in cpm)

4.6 Glukoseaufnahme unter Einfluss des CLA-Isomers (trans-10, cis-12) in differenzierte 3T3-L1-Adipozyten

4.6.1 Glukoseaufnahme bei verschiedenen Insulinkonzentrationen unter Einfluss verschiedener Konzentrationen des CLA-Isomers in 3T3-L1 Adipozyten

Tab.20. Glukoseaufnahme bei verschiedenen CLA-Isomer- und Insulinkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten. Die absoluten Werte (in cpm) der eingesetzten Radioaktivität wurden im β -Counter gemessen, zu einem arithmetischen MW zusammengefasst und in die Einheit kBq umgerechnet. Dieser MW der von den Zellen aufgenommenen Glukose/Well wurde auf den Proteingehalt der Zellen bezogen. Die Werte wurden in nM Glukose/mg Protein umgerechnet und +/- STD angegeben. Die Signifikanz wurde im direkten Vergleich zwischen den verschiedenen Insulinkonzentrationen und dem Insulinnullwert bestimmt (n: 6).

<i>c(CLA-Isomer) in μM</i>	<i>Bei 0nM Insulin: Glukoseauf- nahme in nM/mg Protein +/- STD</i>	<i>Bei 1nM Insulin: Glukoseauf- nahme in nM/mg Protein +/- STD</i>	<i>Bei 50nM Insulin: Glukoseauf- nahme in nM/mg Protein +/- STD</i>	<i>Signifikanz 0nM vs. 1nM Insulin [p<0.05]</i>	<i>Signifikanz 0nM vs. 50nM Insulin [p<0.05]</i>
0	0,053 +/- 0,034	0,118 +/- 0,082	0,211 +/- 0,163	0.007	0.000
0,1	0,087 +/- 0,065	0,157 +/- 0,098	0,243 +/- 0,123	0.010	0.000
1	0,082 +/- 0,034	0,156 +/- 0,099	0,281 +/- 0,136	0.004	0.000
10	0,095 +/- 0,071	0,169 +/- 0,117	0,266 +/- 0,093	0.017	0.000
100	0,076 +/- 0,061	0,159 +/- 0,073	0,251 +/- 0,151	0.001	0.000

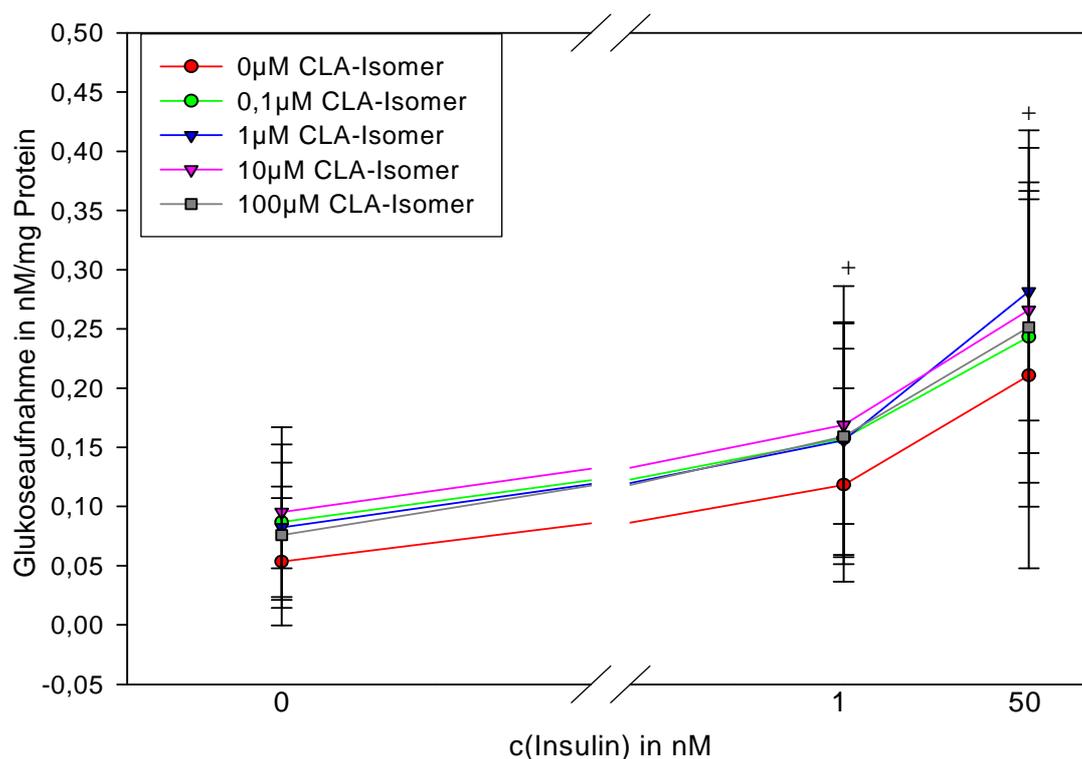


Abb.32. Glukoseaufnahme bei verschiedenen Insulinkonzentrationen in Abhängigkeit vom Niveau der verschiedenen CLA-Isomer-Konzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten (n: 6).

Die Stimulierung mit CLA erfolgte über 48 h in den Konzentrationen 0,1; 1; 10 und 100nM. Die 13-15 Tage lang gereiften Zellen wurden vor den Versuchen für 2 h im serumfreien Medium im Brutschrank kultiviert. Nach drei Waschsritten mit KRP wurden die Zellen für 30 min mit 0, 1 und 50nM human Insulin inkubiert. Die Inkubation der 2-Deoxy-D-[³H]-Glukose betrug 10 min bei 37°C. Als Kontrolle zu der stimulierenden Wirkung des CLA-Isomers und des Insulins wurden 0nM CLA-Isomer und 0nM Insulin eingesetzt.

+ $p < 0.05$, bei allen Konzentrationen im direkten Vergleich zum Insulinnullwert

Die Abbildung 32 und die Tabelle 20 zeigen, dass die mit dem nutritiven PPAR γ -Liganden CLA-Isomer (trans-10,cis-12) stimulierte Glukoseaufnahme in 3T3-L1 Adipozyten mit ansteigender Insulinkonzentration unabhängig von der eingesetzten CLA-Konzentration erhöht wurde. Das Niveau der Glukoseaufnahme erhöhte sich auch in Abhängigkeit der CLA-Konzentrationen signifikant.

Die Tabelle 20 zeigt weiterhin, dass Insulin in den Konzentrationen 1nM und 50nM die Glukoseaufnahme unabhängig von den eingesetzten CLA-Konzentrationen signifikant zum Insulinnullwert erhöht hat.

Tab.21. Signifikanz der Glukoseaufnahme bei verschiedenen CLA-Isomer- und Insulinkonzentrationen in differenzierte 3T3-L1 Adipozyten. Die Signifikanz wurde im direkten Vergleich zwischen den verschiedenen CLA-Konzentrationen und dem CLA-Nullwert bestimmt (n: 6).

<i>c(CLA-Isomer) in μM</i>	<i>Bei 0nM Insulin: Signifikanz 0nM CLA vs. c(CLA) [$p < 0.05$]</i>	<i>Bei 1nM Insulin: Signifikanz 0nM CLA vs. c(CLA) [$p < 0.05$]</i>	<i>Bei 50nM Insulin: signifikanz 0nM CLA vs. c(CLA) [$p < 0.05$]</i>
0			
0,1	0.058	0.075	0.332
1	0.039	0.083	0.056
10	0.027	0.042	0.088
100	0.278	0.035	0.272

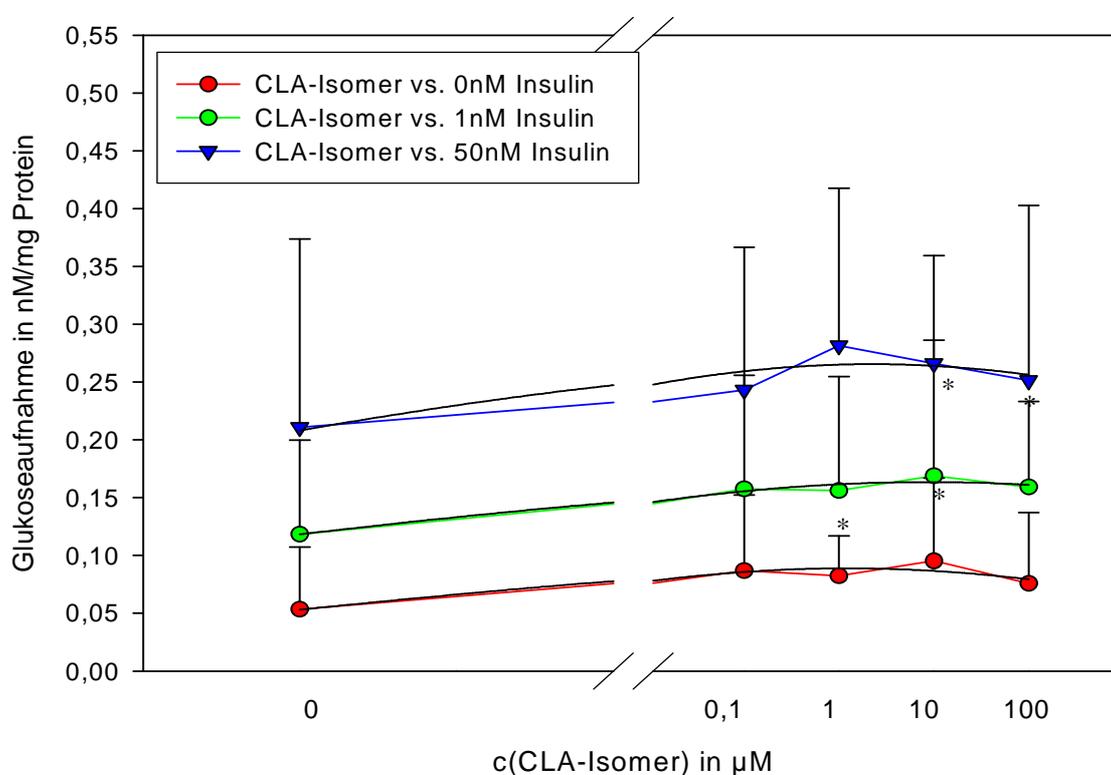


Abb.33. Glukoseaufnahme bei verschiedenen CLA-Isomer-Konzentrationen in Abhängigkeit vom Niveau der verschiedenen Insulinkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten (n: 6). Die Stimulierung mit CLA (trans-10,cis-12) erfolgte über 48 h in den Konzentrationen 0,1; 1; 10 und 100 μM . Die 13-15 Tage lang gereiften Zellen wurden vor den Versuchen für 2 h im serumfreien Medium im Brutschrank kultiviert. Nach drei Waschschritten mit KRP wurden die Zellen für 30 min mit 0, 1 und 50nM human Insulin inkubiert. Die Inkubation der 2-Deoxy-D-[^3H]-Glukose betrug 10 min bei 37°C. Als Kontrolle zu der stimulierenden Wirkung des CLA-Isomers und des Insulins wurden 0nM CLA-Isomer und 0nM Insulin eingesetzt. In den Verlauf der Messwerte wurde über eine quadratische Funktion ein polynomaler Kurvenverlauf zusätzlich eingelegt. Anhand der Regressionsanalyse wurde die Steigung der drei Grafen berechnet und verglichen.

* $p < 0.05$ im direkten Vergleich zum CLA-Nullwert

Die Abbildung 33 und die Tabelle 21 zeigen, dass die mit dem CLA-Isomer stimulierte Glukoseaufnahme in 3T3-L1-Adipozyten mit ansteigender CLA-Konzentration signifikant erhöht wurde. Das Niveau der Glukoseaufnahme erhöhte sich bei dem Einsatz von 10 μM

CLA bei fehlender Insulinzugabe [$p=0.027$] und bei 1nM Insulin [$p=0.042$] signifikant zum CLA-Nullwert. Bei 1nM Insulin kam es zusätzlich bei 100 μ M CLA [$p=0.035$] und bei der fehlenden Insulinzugabe zusätzlich bei 1 μ M CLA [$p=0.039$] zu einer signifikanten Erhöhung der Glukoseaufnahme. Die Glukoseaufnahme konnte bei dem Einsatz von 50nM Insulin im direkten Vergleich zwischen dem CLA-Nullwert und verschiedenen CLA-Konzentrationen nicht signifikant erhöht werden. Es ist festzustellen, dass der Glukoseeinstrom durch die Kombination aus Insulin und CLA unterschiedlich beeinflusst wurde.

Tab.22. Steigung der Glukoseaufnahme bei verschiedenen CLA-Isomer- und Insulinkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten (n: 6).

Steigung bei vers. c(CLA-Isomer)	Bei 0nM Insulin	Bei 1nM Insulin	Bei 50nM Insulin
Von 0 zu 100 μ M	-1,647	0,000	0,000
Von 0 zu 1 μ M	0,015	0,022	0,060
Von 0 zu 10 μ M	0,002	0,003	0,003

Die Tabelle 22 zeigt, dass es bei dem Einsatz von 1 und 50nM Insulin zwischen 0 und 100 μ M CLA zu keiner Steigung (0,000) der Glukoseaufnahme kam. Ohne Insulinzugabe (1,647) ist es zu keiner weiteren Steigerung der Glukoseaufnahme bei dem Einsatz von 100 μ M CLA gekommen. Die höchste Steigung der Glukoseaufnahme wurde bei den verwendeten Insulinkonzentrationen (0,022 und 0,060) und insulinunabhängig (0,015) zwischen 0 und 1 μ M CLA erzielt. Bei 50nM Insulin lag die Steigung bei 0,060, was die Steigung ohne Insulinzugabe um das 4 fache und bei 1nM Insulin um das fast 3 fache überstieg (Tab.22.).

4.6.2 Aufnahmesteigerung der Glukose bei verschiedenen CLA- und Insulinkonzentrationen im Vergleich zum Nullwert in 3T3-L1 Adipozyten

Tab.23. Aufnahmesteigerung der Glukose⁶ bei verschiedenen Insulinkonzentrationen im Vergleich zum Insulinnullwert nach der Inkubation mit verschiedenen CLA-Isomer-Konzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten. Angabe der Quotienten, gebildet aus den MW (n: 6).

c(CLA- Isomer) in μ M	Quotient aus 0nM zu 0nM Insulin	Quotient aus 1nM zu 0nM Insulin	Quotient aus 50nM zu 0nM Insulin
0	1,00	2,10	3,77
0,1	1,00	2,04	3,14
1	1,00	1,90	3,49
10	1,00	2,09	3,32
100	1,00	2,36	3,66

Die Tabelle 23 zeigt, dass der Anstieg der Glukoseaufnahme bei verschiedenen Insulinkonzentrationen im Vergleich zum Insulinnullwert bei den eingesetzten CLA-Isomer-Konzentrationen nahezu unverändert geblieben ist. Bei 1nM Insulin lag der Quotient zwischen 1,90 und 2,36 und bei 50nM Insulin zwischen 3,14 und 3,77. Das zeigt, dass

⁶ Aufnahmesteigerung der Glukose bei verschiedenen Insulinkonzentrationen im Vergleich zum Insulinnullwert: Quotient aus c(Insulin) (in cpm)/ 0nM Insulin (in cpm)

Insulin unabhängig von der CLA-Isomer-Stimulierung die gleiche Wirkung auf den Glukoseeinstrom ausgeübt hat.

Tab.24. Aufnahmesteigerung der Glukose⁶ bei verschiedenen CLA-Isomer-Konzentrationen im Vergleich zum CLA-Nullwert nach der Inkubation mit verschiedenen Insulin-konzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten. Angabe der Quotienten, gebildet aus den MW (n: 6).

<i>c(CLA- Isomer) in μM</i>	<i>Bei 0nM Insulin: Quotient aus c(CLA- Isomer) zu 0μM CLA</i>	<i>Bei 1nM Insulin: Quotient aus c(CLA- Isomer) zu 0μM CLA</i>	<i>Bei 50nM Insulin: Quotient aus c(CLA-Isomer) zu 0μM CLA</i>
0	1,00	1,00	1,00
0,1	1,41	1,33	1,15
1	1,34	1,32	1,34
10	1,55	1,43	1,26
100	1,23	1,35	1,19

Die Tabelle 24 zeigt, dass die höchste Glukoseaufnahmesteigerung im Vergleich zur Kontrolle ohne CLA (1,00) in Abhängigkeit von der eingesetzten Insulinkonzentration bei unterschiedlichen CLA-Isomer-Konzentrationen erzielt wurde. Bei fehlender Insulinzugabe (1,55 fach) und bei 1nM (1,43 fach) Insulinzugabe wurde der maximale Anstieg der Glukoseaufnahme bei 10 μ M CLA erzielt. Unter 50nM Insulinzugabe wurde der maximale Anstieg bei 1 μ M CLA um das 1,34 fache erzielt.

⁶ Aufnahmesteigerung der Glukose bei verschiedenen CLA-Konzentrationen im Vergleich zum CLA-Nullwert: Quotient aus c(CLA) (in cpm)/ 0nM CLA (in cpm)

4.7 Glukoseaufnahme unter Einfluss des CLA-Gemisches (trans-10,cis-12 und cis-9,trans-11) in differenzierte 3T3-L1-Adipozyten

4.7.1 Glukoseaufnahme bei verschiedenen Insulinkonzentrationen unter Einfluss verschiedener Konzentrationen des CLA-Gemisches in 3T3-L1 Adipozyten

Tab.25. Glukoseaufnahme bei verschiedenen CLA-Gemisch- und Insulinkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten. Die absoluten Werte (in cpm) der eingesetzten Radioaktivität wurden im β -Counter gemessen, zu einem arithmetischen MW zusammengefasst und in die Einheit kBq umgerechnet. Dieser MW der von den Zellen aufgenommenen Glukose/Well wurde auf den Proteingehalt der Zellen bezogen. Die Werte wurden in nM Glukose/mg Protein umgerechnet und +/- STD angegeben. Die Signifikanz wurde im direkten Vergleich zwischen den verschiedenen Insulinkonzentrationen und dem Insulinnullwert bestimmt (n: 7).

<i>c(CLA-Gemisch) in μM</i>	<i>Bei 0nM Insulin: Glukoseaufnahme in nM/mg Protein +/- STD</i>	<i>Bei 1nM Insulin: Glukoseaufnahme in nM/mg Protein +/- STD</i>	<i>Bei 50nM Insulin: Glukoseaufnahme in nM/mg Protein +/- STD</i>	<i>Signifikanz 0nM vs. 1nM Insulin [$p < 0.05$]</i>	<i>Signifikanz 0nM vs. 50nM Insulin [$p < 0.05$]</i>
0	0,079 +/- 0,049	0,185 +/- 0,092	0,269 +/- 0,115	0.029	0.003
0,1	0,115 +/- 0,083	0,203 +/- 0,105	0,298 +/- 0,114	0.133	0.008
1	0,107 +/- 0,072	0,195 +/- 0,086	0,298 +/- 0,096	0.081	0.002
10	0,112 +/- 0,081	0,186 +/- 0,068	0,315 +/- 0,095	0.113	0.002
100	0,108 +/- 0,053	0,183 +/- 0,072	0,274 +/- 0,070	0.064	0.000

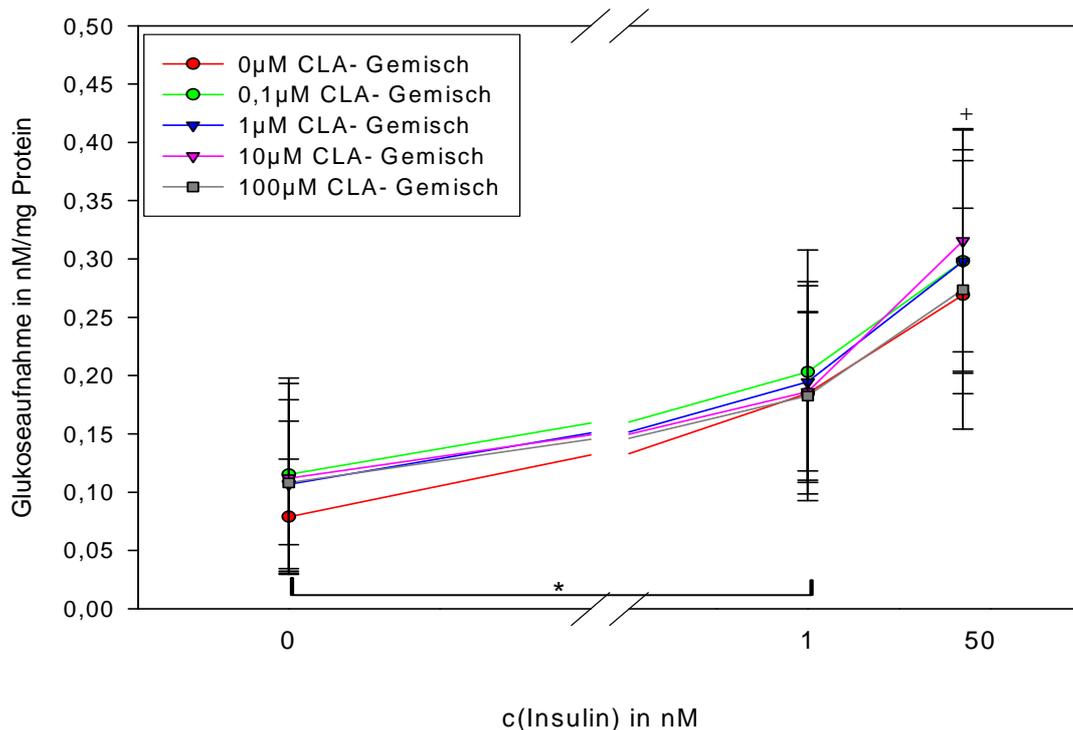


Abb.34. Glukoseaufnahme bei verschiedenen Insulinkonzentrationen in Abhängigkeit vom Niveau der verschiedenen CLA-Gemisch-Konzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten (n: 7).

Die Stimulierung mit CLA-Gemisch erfolgt über 48 h in den Konzentrationen 0,1; 1; 10 und 100nM. Die 13-15 Tage lang gereiften Zellen wurden vor den Versuchen für 2 h im serumfreien Medium im Brutschrank kultiviert. Nach drei Waschsritten mit KRP wurden die Zellen für 30 min mit 0, 1 und 50nM human Insulin inkubiert. Die Inkubation der 2-Deoxy-D- ^3H -Glukose betrug 10 min bei 37°C. Als Kontrolle zu der stimulierenden Wirkung des CLA-Gemisches und des Insulins wurden 0nM CLA-Gemisch und 0nM Insulin eingesetzt.

+ $p < 0.05$, bei allen Konzentrationen im direkten Vergleich zum Insulinnullwert

* $p < 0.05$ im direkten Vergleich 1nM Insulin zum Insulinnullwert bei 0μM CLA-Gemisch-Zugabe

Die Abbildung 34 und die Tabelle 25 zeigen, dass sich die mit dem CLA-Gemisch (trans-10,cis-12 und cis-9,trans-11) stimulierte Glukoseaufnahme in 3T3-L1 Adipozyten mit ansteigender Insulinkonzentration unabhängig von der eingesetzten CLA-Gemisch-Konzentration steigerte. Das Niveau der Glukoseaufnahme erhöhte sich durch die Stimulierung mit dem CLA-Gemisch nicht signifikant (Tab.26.).

Die Tabelle 25 zeigt weiterhin, dass Insulin in der Konzentration von 50nM die Glukoseaufnahme unabhängig von den eingesetzten CLA-Gemisch-Konzentrationen im direkten Vergleich zum Insulinnullwert signifikant erhöhte. Es konnte im direkten Vergleich zwischen 1nM Insulin und fehlender Insulinstimulierung ausschließlich eine signifikante Erhöhung der Glukoseaufnahme [$p=0.029$] ohne CLA-Einfluss gemessen werden.

Tab.26. Signifikanz der Glukoseaufnahme bei verschiedenen CLA-Gemisch- und Insulinkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten. Die Signifikanz wurde im direkten Vergleich zwischen den CLA-Konzentrationen und dem CLA-Nullwert bestimmt (n: 7).

<i>c</i> (CLA-Gemisch) in μM	Bei 0nM Insulin: Signifikanz 0nM CLA vs. <i>c</i> (CLA) [$p < 0.05$]	Bei 1nM Insulin: Signifikanz 0nM CLA vs. <i>c</i> (CLA) [$p < 0.05$]	Bei 50nM Insulin: Signifikanz 0nM CLA vs. <i>c</i> (CLA) [$p < 0.05$]
0			
0,1	0.305	0.716	0.620
1	0.382	0.830	0.597
10	0.342	0.974	0.396
100	0.275	0.957	0.926

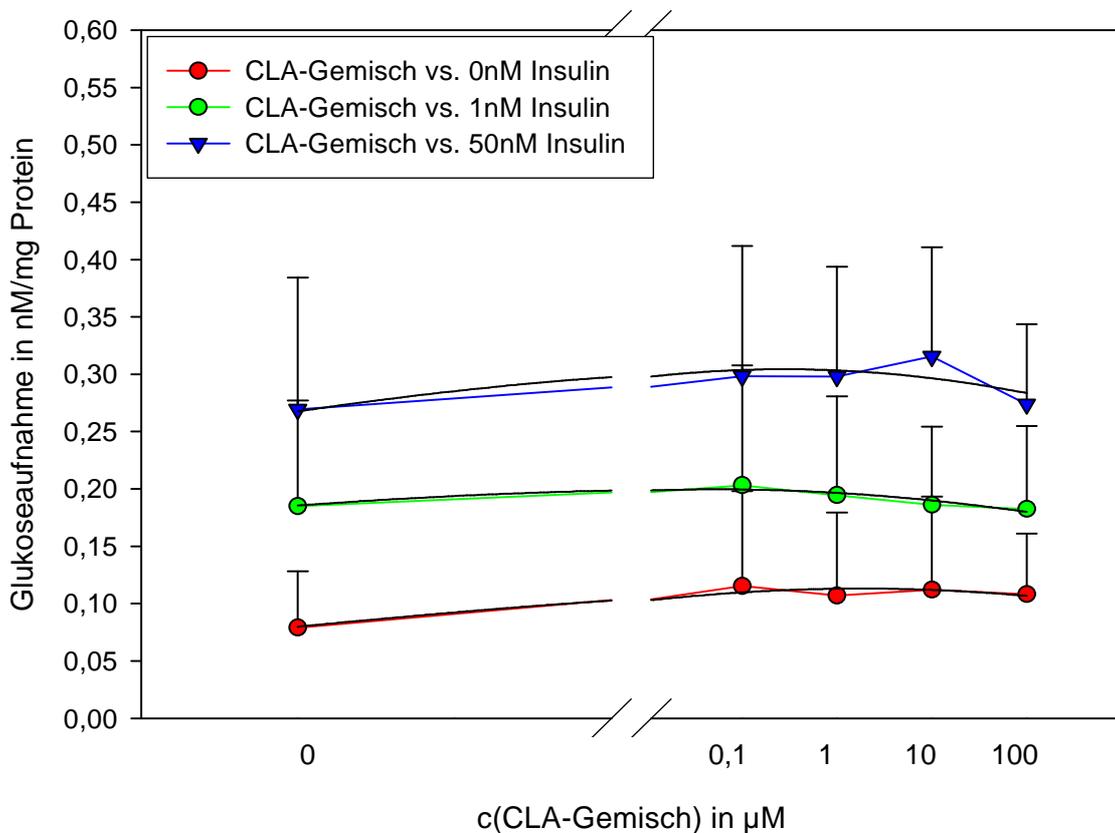


Abb.35. Glukoseaufnahme bei verschiedenen CLA-Gemisch-Konzentrationen in Abhängigkeit vom Niveau der verschiedenen Insulinkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten (n: 7). Die Stimulierung mit dem CLA-Gemisch erfolgte über 48 h in den Konzentrationen 0,1; 1; 10 und 100 μM . Die 13-15 Tage lang gereiften Zellen wurden vor den Versuchen für 2 h im serumfreien Medium im Brutschrank kultiviert. Nach drei Waschschrritten mit KRP wurden die Zellen für 30 min mit 0, 1 und 50nM human Insulin inkubiert. Die Inkubation der 2-Deoxy-D- ^3H -Glukose betrug 10 min bei 37°C. Als Kontrolle zu der stimulierenden Wirkung des CLA-Gemisches und des Insulins wurden 0nM CLA-Gemisch und 0nM Insulin eingesetzt. In den Verlauf der Messwerte wurde über eine quadratischen Funktion ein polynomaler Kurvenverlauf zusätzlich eingelegt. Anhand der Regressionsanalyse wurde die Steigung der drei Grafen berechnet und verglichen.

Die Abbildung 35 und die Tabelle 26 zeigen, dass bei keiner eingesetzten Konzentration des CLA-Gemisches eine signifikante Erhöhung der Glukoseaufnahme festzustellen war.

Die Glukoseaufnahme erfolgte zwar auf verschiedenen hohen Niveaus, dieses war aber auf die Insulinzugabe zurückzuführen (Abb.34.).

Tab.27. Steigung der Glukoseaufnahme unter verschiedenen CLA-Gemisch- und Insulinkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten (n: 7).

<i>Steigung bei vers. c(CLA-Gemisch)</i>	<i>Bei 0nM Insulin</i>	<i>Bei 1nM Insulin</i>	<i>Bei 50nM Insulin</i>
Von 0 zu 100µM	0,000	0,000	0,000
Von 0 zu 0,1µM	0,363	0,183	0,290
Von 0 zu 10µM	0,001	-0,001	0,003

Die Tabelle 27 zeigt, dass zwischen dem gesamten Konzentrationsspektrum von 0 bis 100µM CLA-Gemisch und dem zusätzlichen Einsatz von 0nM, 1nM und 50nM Insulin keine Steigung der Glukoseaufnahme festzustellen ist. Gleiches zeigt sich zwischen den CLA-Konzentrationen 0 und 10µM innerhalb der verschiedenen Insulinkonzentrationen. Die höchste Steigung der Glukoseaufnahme wurde zwischen 0 und 0,1µM CLA-Gemisch bei den eingesetzten Insulinkonzentrationen (0,183 bzw. 0,290) und ohne Insulin (0,363) erzielt.

4.7.2 Aufnahmesteigerung der Glukose bei verschiedenen CLA-Gemisch- und Insulinkonzentrationen im Vergleich zum Nullwert in 3T3-L1 Adipozyten

Tab.28. Aufnahmesteigerung der Glukose⁶ bei verschiedenen Insulinkonzentrationen im Vergleich zum Insulinnullwert nach der Inkubation mit verschiedenen CLA-Gemisch-Konzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten. Angabe der Quotienten, gebildet aus den MW (n:7).

<i>c(CLA-Gemisch) in µM</i>	<i>Quotient aus 0nM zu 0nM Insulin</i>	<i>Quotient aus 1nM zu 0nM Insulin</i>	<i>Quotient aus 50nM zu 0nM Insulin</i>
0	1,00	2,77	3,99
0,1	1,00	2,30	3,55
1	1,00	2,52	4,11
10	1,00	2,21	3,99
100	1,00	1,89	3,00

Die Tabelle 28 zeigt, dass der Anstieg der Glukoseaufnahme bei den verschiedenen Insulinkonzentrationen im Vergleich zum Insulinnullwert bei den verwendeten CLA-Gemisch-Konzentrationen, mit Ausnahme von 100µM, nahezu konstant ist. Bei 1nM Insulin liegt der Quotient, ohne 100µM CLA, zwischen 2,21 und 2,77. Bei 50nM Insulin liegt der Quotient, ohne 100µM CLA, zwischen 3,55 und 4,11. Bei der maximal verwendeten Konzentration von 100µM CLA liegen die Werte mit 1,89 bei 1nM Insulin und 3,00 bei 50nM Insulin niedriger. Insulin hat unabhängig von der Stimulierung mit dem CLA-Gemisch, mit Ausnahme bei 100µM CLA-Gemisch, die gleiche Wirkung auf den Glukoseeinstrom ausgeübt. In der CLA-Gemisch-Konzentration von 100µM kam es zu einer geringeren Aufnahmesteigerung des Glukoseeinstroms.

⁶ Aufnahmesteigerung der Glukose bei verschiedenen Insulinkonzentrationen im Vergleich zum Insulinnullwert: Quotient aus c(Insulin) (in cpm)/ 0nM Insulin (in cpm)

Tab.29. Aufnahmesteigerung der Glukose⁶ bei verschiedenen CLA-Gemisch-Konzentrationen im Vergleich zum CLA-Nullwert nach der Inkubation mit verschiedenen Insulin-konzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten. Angabe der Quotienten, gebildet aus den MW. (n:7)

<i>c(CLA-Gemisch) in μM</i>	<i>Bei 0nM Insulin: Quotient aus c(CLA-Gemisch) zu 0μM CLA</i>	<i>Bei 1nM Insulin: Quotient aus c(CLA-Gemisch) 0μM CLA</i>	<i>Bei 50nM Insulin: Quotient aus c(CLA-Gemisch) 0μM zu CLA</i>
0	1,00	1,00	1,00
0,1	1,46	1,10	1,11
1	1,35	1,05	1,11
10	1,42	1,01	1,37
100	1,37	0,99	1,02

Die Tabelle 29 zeigt, dass die höchste Glukoseaufnahme, stimuliert durch das CLA-Gemisch, bei fehlender Insulinzugabe (1,46) und bei 1nM Insulin (1,10) bei dem Einsatz von 0,1 μM CLA-Gemisch erreicht wurde. Bei 50nM Insulin (1,37) lag das Maximum bei 10 μM CLA. Die Tabelle zeigt weiterhin, dass die Aufnahmesteigerung der Glukose im Vergleich zu fehlender CLA-Zugabe bei den eingesetzten CLA-Konzentration bei dem zusätzlichen Einsatz von 1 und 50nM Insulin nahe 1,0 liegt. Das CLA-Gemisch hatte einen geringen Einfluss auf die Glukoseaufnahme.

⁶ Aufnahmesteigerung der Glukose bei verschiedenen CLA-Gemisch-Konzentrationen im Vergleich zum CLA-Gemisch-Nullwert: Quotient aus c(CLA-Gemisch) (in cpm)/ 0nM CLA-Gemisch (in cpm)

4.8 Glukoseaufnahme in HepG2 Zellen

4.8.1 Glukoseaufnahme mit und ohne Zugabe von Cytochalasin B in HepG2 Zellen

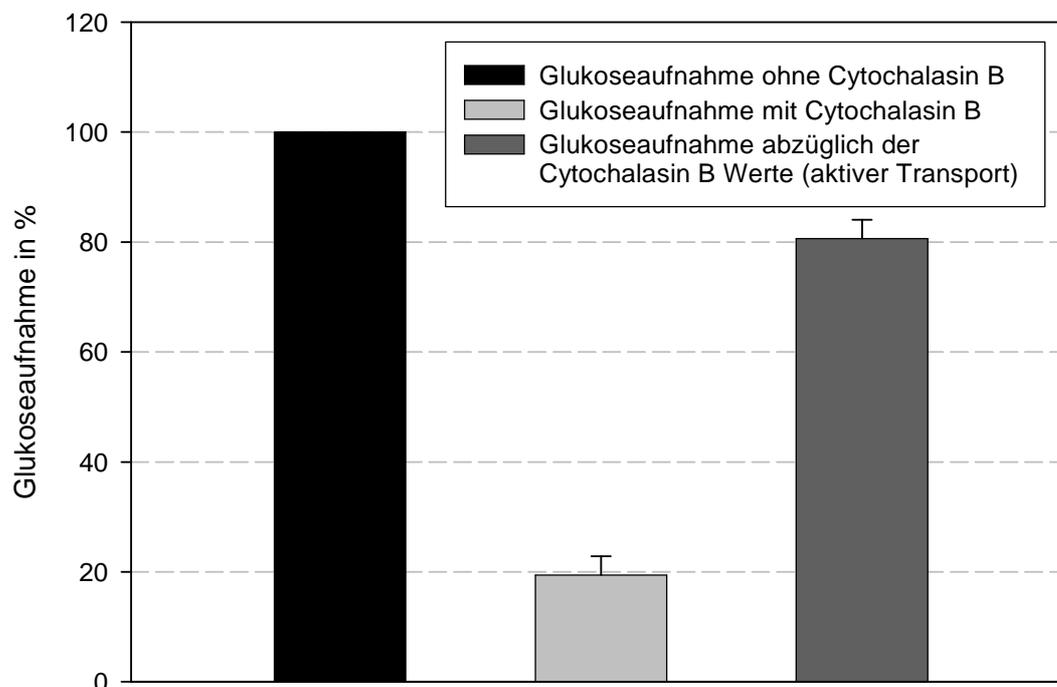


Abb.36. Glukoseaufnahme in HepG2 Zellen mit und ohne Zugabe von 10µM Cytochalasin B (n: 16). Die 2 Tage bei 80-90% Konfluenz kultivierten Zellen, wurden vor den Versuchen für 2 h im serumfreien Medium im Brutschrank kultiviert. Nach drei Waschschrritten mit KRP wurden die Zellen für 30 min ohne Insulin in KRP inkubiert. Das Cytochalasin B wurde vor der Inkubation mit der 2-Deoxy-D-[³H]-Glukose für 10 min bei 37°C eingesetzt. Zur Bestimmung der unspezifisch an die Zellwand gebundenen Glukose wurde zu jeder Bestimmung des Glukoseeinstroms ein Wert unter Einfluss von 10µM Cytochalasin B ermittelt. Dieses diente zur Bestimmung des aktiven Transports¹. Die absoluten Werte (in cpm) der eingesetzten Radioaktivität wurden im β-Counter gemessen und zu einem arithmetischen MW zusammengefasst. Der MW wurde in Prozent umgerechnet. Für die Werte mit Cytochalasin B und abzüglich Cytochalasin B wurde die STD berechnet. Die Glukoseaufnahme ohne Cytochalasin B fungierte als 100%-Wert.

Die Abbildung 36 zeigt, dass der Zusatz von 10µM Cytochalasin B die Glukoseaufnahme in die HepG2 Zellen zu 80,6% gehemmt hat. Der Einsatz von Cytochalasin B diente dazu, den unspezifischen Glukosetransport und die unspezifisch an der Zellwand gebundene Glukose zu bestimmen. Dieser betrug 19,4% und wurde von allen Messwerten ohne Cytochalasineinfluss abgezogen. Die verbleibende Glukoseaufnahme ist dem aktiven Transport zuzuordnen.

⁵Aktiver Transport = (Glukoseaufnahme ohne Cytochalasin B (in cpm) – Glukoseaufnahme mit Cytochalasin B (in cpm))/Glukoseaufnahme gesamt (ohne Cytochalasin B Zugabe)

4.8.2 Glukoseaufnahme bei verschiedenen Insulinkonzentrationen in HepG2 Zellen

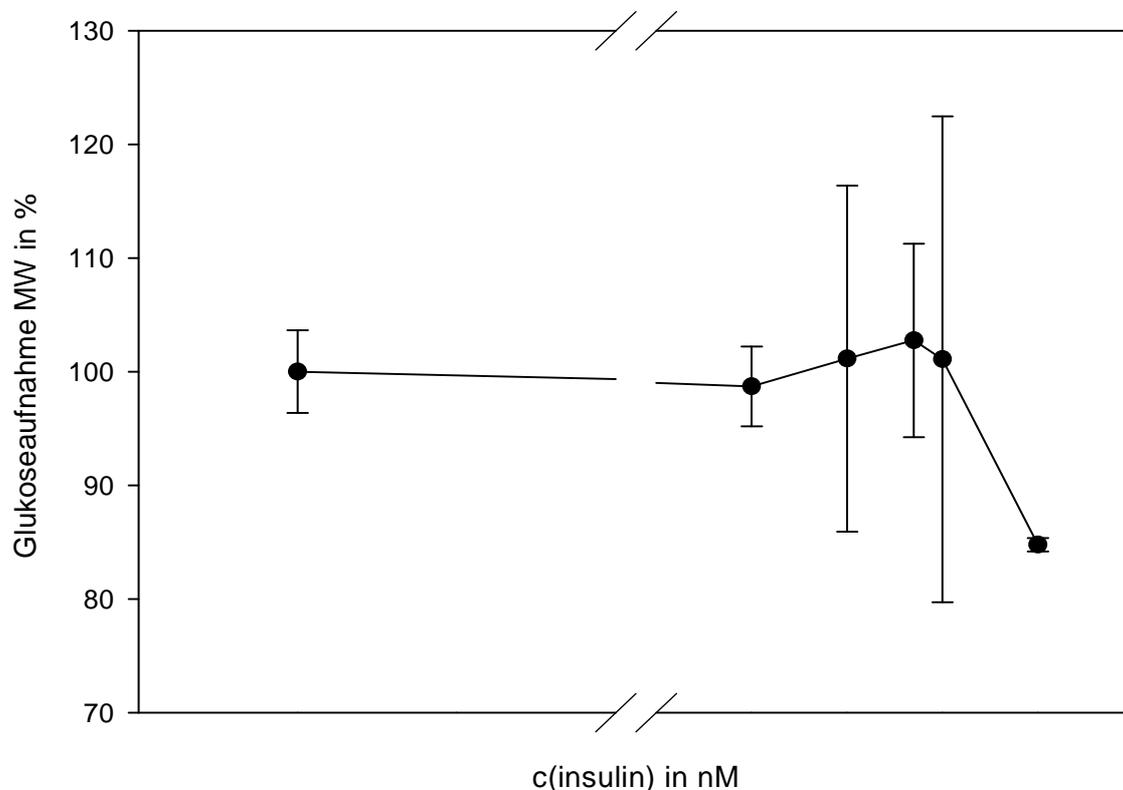


Abb.37. Glukoseaufnahme in HepG2 Zellen unter der Zugabe von verschiedenen Insulinkonzentrationen (n: 2). Die HepG2 Zellen waren vor den Versuchen 2 Tage zu 80-90% konfluent. Die Zellen wurden vor den Versuchen für 2 h im serumfreien Medium im Brutschrank kultiviert. Nach drei Waschschrinen mit KRP wurden die Zellen für 30 min in den Konzentrationen 1, 10, 50, 100 und 1000nM Insulin in KRP inkubiert. Die Inkubation der 2-Deoxy-D-[³H]-Glukose betrug 10 min bei 37°C. Als Kontrolle wurde 0nM Insulin eingesetzt. Die absoluten Werte (in cpm) wurden zu einem arithmetischen MW +/- STD zusammengefasst und in Prozent umgerechnet. Die unstimulierte Glukoseaufnahme fungierte als 100%-Wert.

Die Abbildung 37 zeigt, dass die Stimulierung mit zunehmender Insulinkonzentration zu keiner signifikanten Erhöhung der Glukoseaufnahme in HepG2 Zellen führte. Bei 1000nM Insulin kam es zu einem Abfall der Glukoseaufnahme (84,8%) im Vergleich zur unstimulierten Messung (100%). Die Versuche zeigten, dass der Glukoseeinstrom in HepG2 Zellen durch Insulinzugabe nicht signifikant gesteigert werden konnte. Die PPAR γ -Liganden-Versuche wurden ohne Insulinstimulierung durchgeführt.

4.8.3 Glukoseaufnahme bei verschiedenen Konzentrationen von GW1929,- CLA-Gemisch-(trans-10,cis-12 und cis-9,trans-11) und Troglitazon in HepG2 Zellen

Tab.30. Glukoseaufnahme unter Einsatz der verschiedenen PPAR γ -Liganden: Troglitazon, GW1929 und des CLA-Gemisches in HepG2 Zellen. Berechnung des arithmetischen MW +/- STD aus den absoluten Werten (in cpm). Angabe der Werte in Prozent, wobei die Werte ohne Liganden-Stimulierung als 100%-Werte fungierten (n: 4-5).

	Troglitazon (n: 4)	GW1929 (n: 4)	CLA- Gemisch (n: 5)
Ligandenkonzentration in nM	MW in Prozent +/- STD	MW in Prozent +/- STD	MW in Prozent +/- STD
0	100 +/- 18,4	100 +/-11,7	100 +/- 42,25
0,1	80,9 +/- 34,3	119,8 +/- 23,2	-
1	117,5 +/- 9,9	101,6 +/- 20,9	-
10	109,7 +/- 33,8	112,6 +/- 20,6	-
100 (0,1 μ M)	108,4 +/- 17,0	129 +/- 26,3	94,4 +/- 43,0
1000 (1 μ M)	84,6 +/- 26,2	108,7 +/- 25,3	89,6 +/- 31,2
10000 (10 μ M)	87,3 +/- 19,1	-	103,7 +/- 47,5
100000 (100 μ M)	-	-	109,9 +/- 46,6

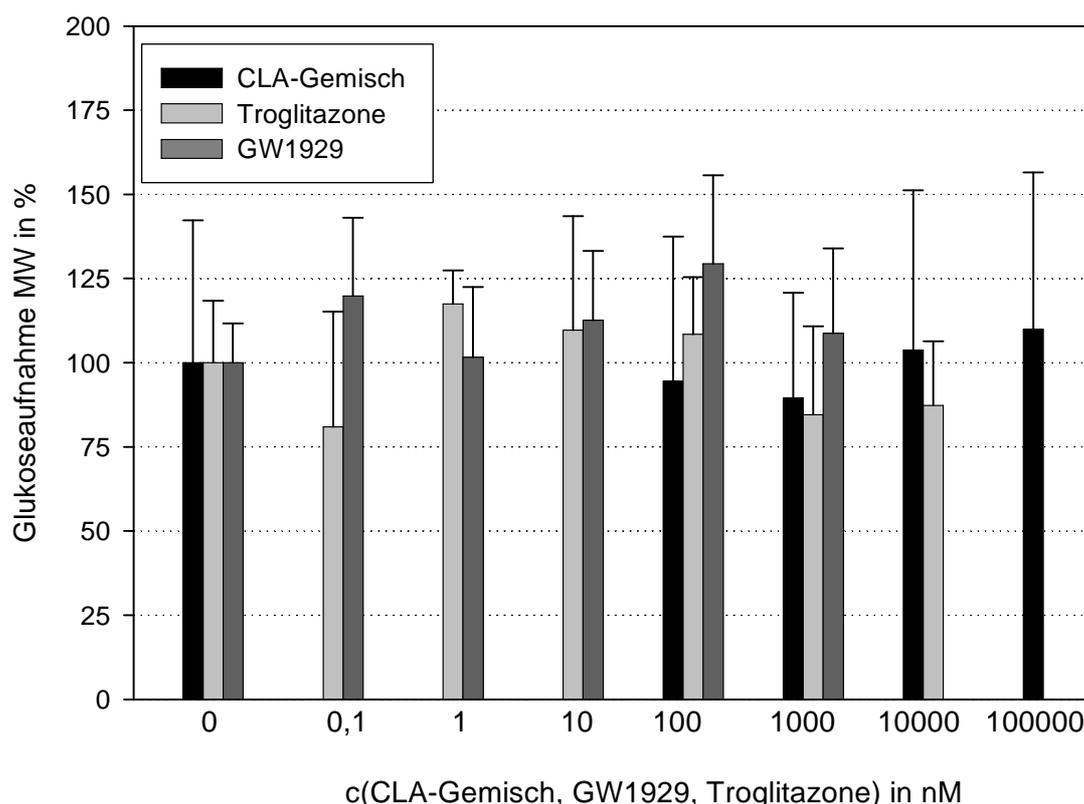


Abb.38. Glukoseaufnahme unter Einsatz der verschiedenen PPAR γ -Liganden: Troglitazon, GW1929 und des CLA-Gemisches in HepG2 Zellen (n: 4-5). Die Stimulierung mit den Liganden erfolgte über 48 h in den Konzentrationen, die auch in den 3T3-L1 Adipozyten verwendet wurden (zwischen 0,1nM und 100 μ M). Die HepG2 Zellen waren vor Einsatz in die Versuche 2 Tage zu 80-90% konfluent. Die Zellen wurden vor den Versuchen für 2 h im serumfreien Medium im Brutschrank kultiviert. Nach drei Waschschrritten mit KRP wurden die Zellen für 30 min ohne Insulin in KRP inkubiert. Die Inkubation der 2-Deoxy-D-[3 H]-Glukose betrug 10 min bei 37 $^{\circ}$ C. Als Kontrollen wurde jeweils 0 μ M des verwendeten Liganden eingesetzt. Die absoluten Werte (in cpm)

wurden zu einem arithmetischen MW +/- STD zusammengefasst und in Prozent umgerechnet. Die Werte ohne Liganden-Stimulierung fungierten als 100%-Werte.

Die Abbildung 38 und die Tabelle 30 zeigen, dass der Einsatz der verschiedenen PPAR γ -Liganden – Troglitzone, GW1929 und CLA-Gemisch – keinen signifikanten Einfluss auf die Erhöhung der Glukoseaufnahme in HepG2 Zellen hatten.

4.9 Proteinbestimmung nach Lowry in 3T3-L1- und HepG2-Zellen

4.9.1 Standardkurve mit BSA

Tab.31. Standardgerade nach Lowry mit BSA als Proteinstandard. Angabe der arithmetischen MW der Extinktion +/- STD bei 660 Nanometer [nm] (n: 3).

Proteingehalt in mg/ml BSA	MW der Extinktion bei 660nm +/- STD
0,05	0,032 +/- 0,009
0,1	0,051 +/- 0,011
0,2	0,102 +/- 0,003
0,3	0,134 +/- 0,002
0,4	0,169 +/- 0,019
0,5	0,221 +/- 0,035
0,6	0,264 +/- 0,032

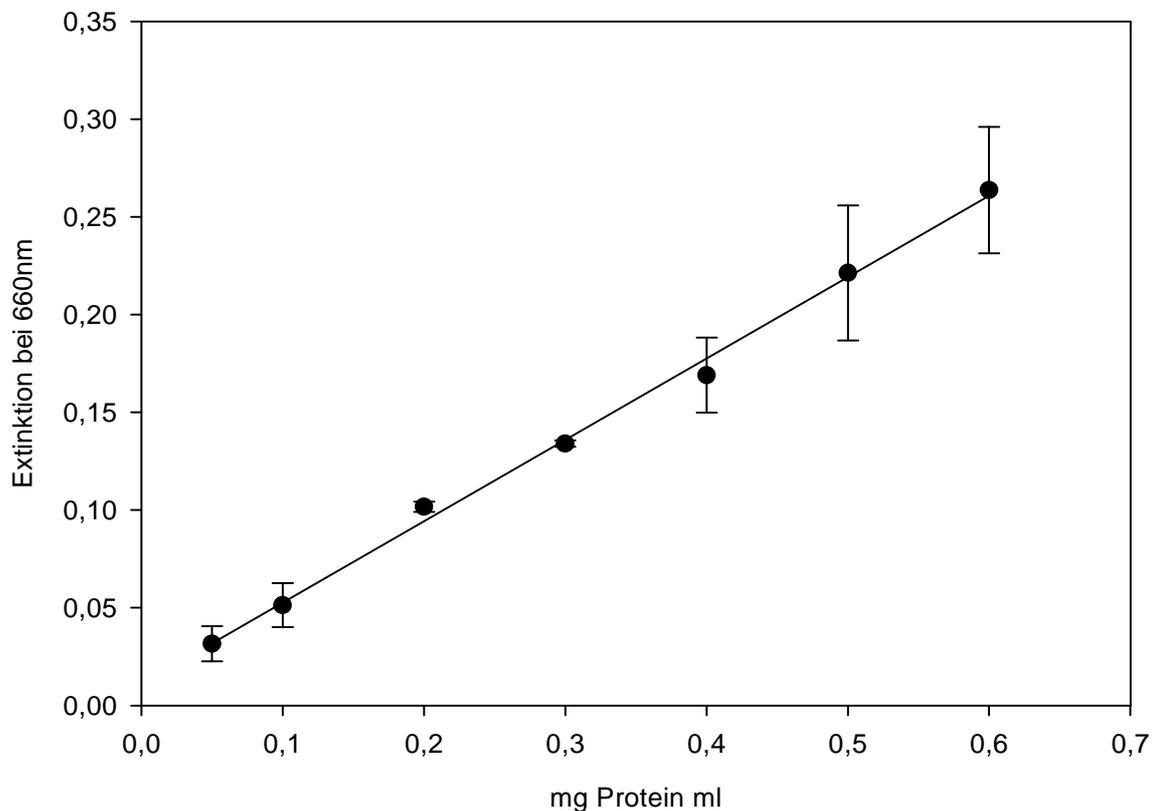


Abb.39. Standardkurve nach Lowry mit BSA als Proteinstandard gemessen gegen die Wellenlänge von 660nm (n: 3). Zur Erstellung der Standardgeraden wurden verschiedene Stammlösungen aus BSA hergestellt und nach der Methode von Lowry weiterbehandelt. Die Bestimmung der Extinktionen bei 660nm der verschiedenen BSA-Konzentrationen wurde mit Hilfe eines Fotometers durchgeführt. Es fand jeweils eine Doppelbestimmung statt. Es wurde eine einfache Regressionsanalyse durchgeführt und die Steigung ermittelt. Angabe der arithmetischen MW der Extinktion +/- STD.

Der berechnete Korrelationskoeffizient beträgt 0,998. Dies zeigt, dass eine hohe Korrelation zwischen dem Proteingehalt und der Extinktion besteht.

4.9.2 Proteingehalt in 3T3-L1 und HepG2 Zellen

Tab.32. Proteingehaltbestimmung der 3T3-L1 und HepG2 Zellen nach Lowry. Es wurde eine einfache Regressionsanalyse zur Bestimmung der Steigung der BSA-Standardgeraden durchgeführt. Anhand der berechneten Steigung und der Extinktionswerte der Proteinproben bei 660nm wurde der Proteingehalt der Proben berechnet. Angabe der arithmetischen MW +/- STD (n: 5, im Doppelansatz).

	MW +/- STD
Proteingehalt der 3T3-L1-Zellen in mg/ml	1,473 +/- 0,232
Proteingehalt der HepG2-Zellen in mg/ml	2,442 +/- 0,405

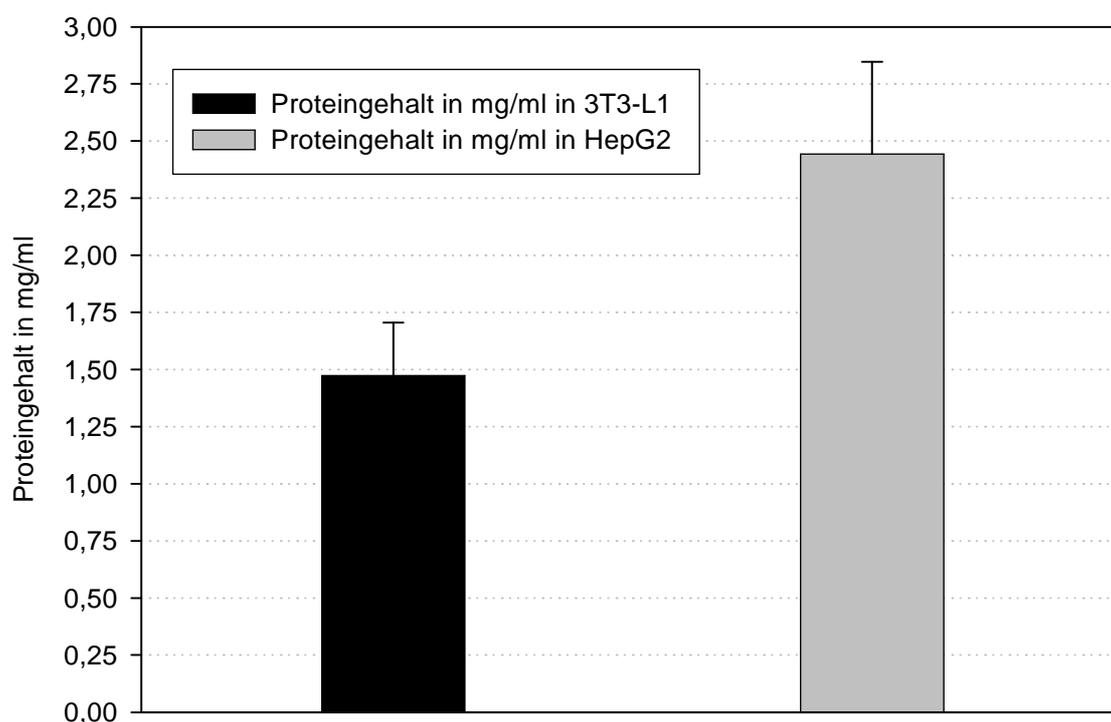


Abb.40. Proteingehaltbestimmung der 3T3-L1 und HepG2 Zellen nach Lowry (n: 5, im Doppelansatz). Anhand der gemessenen Extinktionen wurde der Proteingehalt über die BSA-Standardkurve berechnet. Die Zellen wurden am 8. Tag nach der Aussaat, bei 100%iger Konfluenz (3T3-L1) und bei 80-90%iger Konfluenz (HepG2) mit Hilfe des RIPA-Puffers und unter Einsatz von 10µl Proteaseinhibitor aus den Wells der 12-Well-platte gelöst. Nach einer 10 minütigen Lagerung auf Eis wurden die Zellen mit Zellschabern aus den Wells gelöst. Es folgte eine Ultraschallbehandlung für 20 sec mit 100 Watt. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (20 min bei 14000rpm bei 4°C) von dem Proteinbestand abgetrennt. Mit dem Überstand wurde die Proteinbestimmung nach Lowry anhand unterschiedlich stark verdünnter (Originalprobe; 1 zu 5 und 1 zu 10 verdünnt) Proben durchgeführt. Die Proben wurden bei 660nm im Fotometer gemessen. Der Blindwert, reiner RIPA-Puffer, wurde von allen Proben abgezogen. Es wurde anhand der berechneten Steigung der BSA-Standardgeraden und der Extinktionswerte der Proben der Proteingehalt bestimmt. Angabe der arithmetischen MW der Proteingehalte +/- STD.

Die Abbildung 40 und die Tabelle 32 zeigen, dass der Proteingehalt in den verschiedenen Zelltypen variiert. In einem Well einer 12-Well-Platte befanden sich im arithmetischen Mittel 1,47mg Protein bei 3T3-L1 Zellen bzw. 2,44mg Protein bei HepG2 Zellen. Die HepG2 Zellen hatten somit einen ca. 65% höheren Proteingehalt als die 3T3-L1 Adipozyten.

5 Diskussion

5.1 3T3-L1 Zellen als Zellkulturmodell für Adipozyten

„In contrast to isolated adipocyte suspensions which lose cell viability rapidly, 3T3-L1 adipocytes can be studied in stable cell monolayers which maintain cell viability and hormonal responsiveness for extended periods of time.” (FROST und LANE, 1984, S. 2646)

Die 3T3-L1 Zelllinie stellt ein häufig eingesetztes Zellkulturmodell zur Veranschaulichung der Insulinwirkung und des Glukosemetabolismus dar. Diese Zellen können unter definierten Zellkulturbedingungen vom Fibroblasten zum Adipozyten differenziert werden (KOHN et al., 1996). Die Methode der Differenzierung von 3T3-L1 Fibroblasten zu Adipozyten wurde im Rahmen dieser Arbeit genutzt, um die Wirkung von chemischen und natürlichen PPAR γ -Liganden auf die Glukoseaufnahme zu untersuchen. Es wurde sowohl der insulinstimulierte als auch der insulinunabhängige Glukosetransport erfasst.

Bei der Untersuchung der insulinstimulierten Glukoseaufnahme ist von Bedeutung, dass sich die Wirkung des Insulins auf den Glukosetransport erst im reifen Adipozyten und nicht schon im Fibroblasten zeigt. Ein wichtiger Aspekt der Differenzierung ist die Induktion der Insulinsensitivität (WU et al., 1999). Ross et al. (1995) haben gezeigt, dass GLUT4 nicht in Fibroblasten nachzuweisen ist. Erst 6-8 Tage nach Initiierung der Differenzierung stieg der GLUT4 Spiegel an. Die Erkenntnis, dass GLUT4 in Preadipozyten nicht nachweisbar ist, sondern erst während der Differenzierung zum Adipozyten ansteigend exprimiert wird, ist in mehreren Studien belegt worden (WU et al., 1998). Die geglückte Differenzierung und Reifung der 3T3-L1 Fibroblasten zum Adipozyten war somit Voraussetzung für die weiteren Versuche dieser Arbeit zum insulinstimulierten Glukoseeinstrom. Dieses ist auch anhand der Vorversuche mit undifferenzierten Fibroblasten zu sehen (Tab.7., Abb.26.). Es ist zu beachten, dass der Fibroblastenversuch nur einmal durchgeführt wurde und, um diese Aussage sicher zu belegen, eine größere Versuchsanzahl nötig gewesen wäre. Rubin et. al. (1978) haben berichtet, dass Preadipozyten Insulin binden können, die Glukoseaufnahme aber durch Insulin nicht stimuliert werden konnte. Erst nach der Initiierung der Differenzierung mit IBMX und DEXA konnte die Glukoseaufnahme durch Insulin erhöht werden. Durch die Supplementierung mit Insulin, DEXA und IBMX kann der Prozess der Differenzierung, wie auch in den vorliegenden Versuchen gezeigt, gestartet und beschleunigt werden. C/EBP β und δ werden wahrscheinlich in den Fibroblasten durch DEXA, IBMX und Insulin aktiviert und bewirken die Induktion von PPAR γ und C/EBP α . Diese Transkriptionsfaktoren induzieren die Differenzierung zum reifen Adipozyten (Vgl. YEH et al., 1995 aus WU et al., 1998).

Rubin et al. (1978) haben gezeigt, dass die optimale Steigerung der Fettzellentwicklung bei 0,85 μ M DEXA liegt. In den vorliegenden Versuchen wurde 1 μ M DEXA eingesetzt, um die optimale Wirkung sicher zu erzielen (siehe 3.2.4 Differenzierung der 3T3-L1 Zellen).

Für die Differenzierung der 3T3-L1-Fibroblasten nach Vogel (2002) spielte, neben DEXA und IBMX, Insulin eine wichtige Rolle. Zur Erzielung der Differenzierung wurden in den vorliegenden Versuchen zuerst 400nM und anschließend 100nM Insulin eingesetzt (siehe

3.2.4 Differenzierung der 3T3-L1 Zellen). Insulin ist für viele Zellen, wie den eingesetzten Fibroblasten, ein Wachstumsfaktor. Wenn Insulin kontinuierlich auf die Zellen einwirkt, werden in einem lang anhaltenden Prozess diejenigen Enzyme verstärkt synthetisiert, die u.a. für die Triacylglyceridbildung in Fettgewebszellen benötigt werden. Dieses ist für die Fettzellentwicklung Voraussetzung. Die Wirkung manifestierte sich in den vorliegenden Versuchen erst nach Stunden und erforderte die kontinuierliche Einwirkung des Insulins. Die eintretende Adipogenese als Indikator der Adipozytenbildung wurde in dieser Arbeit anhand der Ölrot O Färbung der Lipidvakuolen nachgewiesen (Abb.21.-22.). Dieser optische Nachweis gilt als Standardmethode des Adipozytennachweises und wurde in verschiedenen Publikationen zur Veranschaulichung der Adipogenese durchgeführt (BASTIE et al., 2000; OBERFIELD et al., 1990; TAMORI et al., 2002; KOHN et al., 1996). Die Zellen mussten vor dem Einsatz in die Versuche 13-15 Tage lang reifen, um morphologisch und metabolisch humanen Adipozyten ähnliche Zellen zu erhalten. Tamori et al. (2002) haben zur Untersuchung der Funktion von PPAR γ in Adipozyten differenzierte, 15 Tage lang gereifte, 3T3-L1 Adipozyten eingesetzt. Über diese Zeit kultivierte 3T3-L1 Zellen werden als repräsentativ für reife Adipozyten angesehen, da sich die Expression der Proteine, welche die Differenzierung beeinflussen, ab dem 8. Tag der Reifung nicht mehr signifikant verändert hat. Aufgrund dieser Angaben und weiteren Angaben in der Literatur wurde die Glukoseaufnahme in die Adipozyten am 13-15. Tag der Reifung gemessen.

Die Unterschiede in den verschiedenen Vorgehensweisen bei der Methode der Differenzierung bestehen in der Konzentration und der Inkubationszeit der eingesetzten Supplemente. In den vorliegenden Versuchen wurde im Gegensatz zu anderen Versuchen (VOGEL, 2002; FROST und LANE, 1985) während der Kultivierung und der Differenzierung Antibiotika und ein Antimykotikum eingesetzt (siehe 3.1.1 3T3-L1 Kultivierung). Dieses hatte den Vorteil, dass die Zellen über den Kultivierungszeitraum von insgesamt 19-21 Tagen weitestgehend vor möglichen Kontaminanten geschützt waren. Als Nachteil ist zu sehen, dass Antibiotika und Antimykotika in den Stoffwechsel der Zelle eingreifen und ihn modifizieren können.

Es ist zu beachten, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf dem Adipozytenmodell der Mauszelllinie beruhen und somit nur bedingt mit humanen Adipozyten vergleichbar sind. Darüber hinaus handelt es sich um eine Zelllinie und keine Primärkultur. In der Gegenüberstellung der Zelllinie zur Primärkultur kann es zu signifikanten intrazellulären Veränderungen der biologischen und physiologischen Funktionen kommen. Brown und McIntosh (2003) beschrieben hierzu, dass es u.a. zu Veränderungen der Morphologie und der Gene (genetic drift) kommen kann.

Bei den folgenden Versuchen zur Messung der Glukoseaufnahme unter Einfluss von PPAR γ -Liganden und Insulin im 3T3-L1 Adipozyten ergibt sich der gleiche mögliche Nachteil für die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen. Aus diesem Grund wäre das Modell einer humanen Adipozyten Primärkultur „naturgetreuer“ als die 3T3-L1 Zelllinie der Maus gewesen.

5.2 Glukoseaufnahme in 3T3-L1 Adipozyten unter Insulineinfluss

Von besonderer Bedeutung für die Glukoseaufnahme unter Einsatz der verschiedenen PPAR γ Liganden – Troglitazon, GW1929 und CLA – und Insulin ist die Wirkung von PPAR γ auf die Insulinkaskade sowie der damit verbundenen Wirkung auf den Glukosetransporter GLUT4 in den Adipozyten.

Die Glukoseaufnahme in die reifen 3T3-L1 Adipozyten konnte durch die Stimulierung mit Insulin je nach eingesetzter Insulinkonzentration im Vergleich zum Insulinnullwert um das 2,53-5,09 erhöht werden (Tab.9.). Eine Steigerung der Glukoseaufnahme erfolgte bis zu der Konzentration von 100nM Insulin. Bei dem Einsatz von 1000nM Insulin kam es im Vergleich zu 100nM Insulin zu keiner weiteren Steigerung (Tab.8., Abb.26.).

In den Versuchen mit humanen differenzierten Adipozyten von Brown und McIntosh (2003) wurde bei Einsatz von 100nM Insulin über 10 min eine dreifache Steigerung der Glukoseaufnahme im Vergleich zur Kontrolle gemessen. In der Publikation von Frost und Lane (1985) wurde von einer Erhöhung der Glukoseaufnahme in differenzierte 3T3-L1 Adipozyten um das 15-20 fache durch Insulinzugabe berichtet. Clancy und Czech (1990) beschrieben ebenfalls, dass in Versuchen mit 3T3-L1 Adipozyten bei der Zugabe von 100nM Insulin ein 15-20 facher Anstieg des Glukoseeinstroms im Vergleich zum Insulinnullwert innerhalb von 30 min zu messen war. In den vorliegenden Versuchen wurde bei dem stufenweisen Insulineinsatz von 0 bis 1000nM, einer Inkubation über 30 min bei 37°C und dem Einsatz von reifen Adipozyten eine maximale Erhöhung der Glukoseaufnahme im Vergleich zum Insulinnullwert im arithmetischen Mittel um das 5,09 fache gemessen (Tab.9.).

Viele Arbeitsgruppen haben sich mit der Thematik der Translokation von GLUT4 im Adipozyten beschäftigt. Cushman and Wardzala (1980) und Suzuki und Kono (1980) beschrieben, dass die Glukosetransporter hauptsächlich in intrazellulären Membranvesikeln lokalisiert sind. Die Stimulierung mit Insulin führte zu einem Anstieg der Rekrutierung dieser Transporter zur Plasmamembran. Diese Translokation bewirkt eine erhöhte Glukosetransportrate in die insulinstimulierten Zellen (HOLMAN et al., 1997). Auch Ross et al. (1995) beschrieben, dass die Steigerung der Glukoseaufnahme durch Insulin über eine erhöhte Fusion der GLUT4 enthaltenden intrazellulären Vesikel mit der Plasmamembran zu Stande gekommen ist. Diese Translokation hat sowohl in den Fettzellen, als auch in den Muskelzellen stattgefunden (SALTIEL und KAHN, 2001).

In den vorliegenden Versuchen erfolgte bei den Insulinnullwerten eine Basisglukoseaufnahme in die Zelle (Tab.8.). HARRISON et al. (1990) beschrieben, dass die Expression von humanem GLUT1 zwar im Zusammenhang mit einer Erhöhung der basalen Glukoseaufnahme steht, jedoch nicht zu einer Erhöhung des insulinstimulierten Glukoseeinstroms in 3T3-L1 Fibroblasten und Adipozyten geführt hat. Kohn et al. (1996) zeigten, dass GLUT1 bei der insulinstimulierten Glukoseaufnahme ebenfalls zur Zellmembran rekrutiert wurde, aber nur einen geringen Anteil an der Steigerung der Glukoseaufnahme hatte. Nach neueren Untersuchungen scheint Insulin ebenfalls die Translokation von GLUT1 und den Transferrin-Rezeptoren in 3T3-L1 Zellen durch die Steigerung der Exozytoserate zu stimulieren, aber nicht in dem Umfang wie GLUT4 (HOLMAN und KASUGA, 1997).

Es sind viele Komponenten, die in dem Prozess des Vesikel "trafficking", "docking" und "fusion" involviert sind, bekannt (HOLMAN and KASUGA, 1997). Die Details über die Teilnahmerate und den Mechanismus, der diese Prozesse der Translokation reguliert, sind jedoch noch weitestgehend ungeklärt.

Wu et al. (1998) beschrieben, dass die Wirkung von PPAR γ auf GLUT4 noch nicht genau erforscht ist. Es wäre möglich, dass eine direkte Interaktion zwischen PPAR γ und dem „corresponding nuclear hormon response element“ in dem Promotor Enhancer des GLUT4 Genes existiert. Aus Versuchen von Tamori und Mitarbeitern (2002), die die Rolle von PPAR γ in reifen 3T3-L1 Adipozyten über die Überexpression eines dominant negativen Mutanten, PPAR γ -deltaC, ermittelt haben, ging hervor, dass der insulinabhängige Glukosetransport unter Einfluss von PPAR γ -deltaC reduziert war. PPAR γ scheint somit u.a. über die Regulierung der Expression von Genen des Insulinsignalweges eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Insulinsensitivität in reifen 3T3-L1 Adipozyten zu spielen.

Anhand der Ergebnisse der verschiedenen Arbeiten zu diesem Kontext und den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit wird deutlich, wieviele Faktoren auf den Prozess des Glukosetransports in die Zelle einwirken können. Die Insulinkaskade kann an verschiedenen Schlüsselstellen wie der Reduktion der Insulinrezeptorkinase, der IRS-Protein-Tyrosinphosphorylierung oder der Aktivierung der PI 3-Kinase gestört sein. Diese Veränderungen sind bei Typ 2 Diabetikern zu finden. Es ist bis heute noch nicht genau bekannt, inwieweit diese primären Veränderungen der Insulinrezeptorfunktion zur Insulinresistenz und sekundär zur Hyperinsulinämie oder Hyperglykämie führen können (PESSIN und SALTIEL, 2000).

Es ist zu beachten, dass es durch eine Stimulierung der Glukoseaufnahme in Adipozyten zu einer erhöhten Lipogenese aus Glukose kommen könnte (siehe Theoretischer Hintergrund: 2.3.2 Glukosestoffwechsel im Adipozyten) (DUPLUS und FOREST, 2002; LÖFFLER, 1999, S. 639). Bei dieser Annahme musste die Glukose sowohl das Substrat für die Fettsäurebiosynthese als auch für das Glycerin stellen (LÖFFLER, 1999, S. 639). In Versuchen von Guan et al. (2002) mit radioaktiv markierter Glukose konnte gezeigt werden, dass in 3T3-L1 Adipozyten die Glukose nach einer 48 stündigen Stimulierung mit dem TZD Rosiglitazon verstärkt über die Lipogenese in Lipide eingebaut wurde. Im Vergleich zur Kontrolle kam es zu einem 1,8 fachen Anstieg. D.h., die Adipozyten legten durch die erhöhte Lipogenese erhöhte Lipidspeicher an. Dieses wäre auch schon während der kurzen Versuchszeit von 48 h in den vorliegenden Versuchen zu erwarten. Adipozyten mit größeren Fettspeichern werden als nicht so insulin sensitiv wie kleine Adipozyten angesehen (SPIEGELMAN, 1998). Bei der Fettsucht z.B. können die Fettzellen mit TG „überladen“ sein, so dass das Fettgewebe nicht mehr in der Lage ist, die alimentär aufgenommenen Fettsäuren ausreichend zu „puffern“. Als Folge würde die Konzentration der FFAs im Blut ansteigen und es zu einer Akkumulierung von TG in vorwiegend glukoseverwertenden Geweben wie den Muskelzellen kommen. Dieses würde zu einer erhöhten TG-Hydrolyse in den Muskelzellen führen und die Insulinsensitivität der Zellen verschlechtern (FRAYN, 2001). Dieser Mechanismus soll zeigen, inwieweit erhöhte Lipidspeicher im Fettgewebe den Metabolismus beeinflussen können. In diesem Zusammenhang sollte im Vergleich zur Muskelzelle abgewogen werden, inwieweit eine Steigerung der Glukoseaufnahme unter dem Aspekt der erhöhten Lipogenese im Adipozyten einen positiven Einfluss auf die Insulinsensitivität hat. Als Vorteil sollte die wahrscheinlich

erhöhte Translokation von GLUT4 durch PPAR γ -Liganden und Insulin im Adipozyten betrachtet werden, die in dieser Arbeit vermutlich durch den erhöhten Glukoseeinstrom gemessen werden konnte (Tab.8.; Tab.10.; Tab.15.; Tab.20.; Tab.25.). Dieser Mechanismus liegt wahrscheinlich auch in der Muskelzelle vor, wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Weiterhin gibt es interessante Studien zu dem Zusammenhang zwischen Insulinsensitivität und der GLUT4 Expression im Fettgewebe. Eine Überexpression von GLUT4 hat in Versuchen mit transgenen Mäusen zu einer Steigerung der Insulinsensitivität und der Glukosetoleranz des gesamten Organismus geführt (Vgl. SHEPHERD et al., 1993 aus KAHN und FLIER, 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das „GLUT4 knocking out“, speziell im Fettgewebe, zu einer Insulinresistenz geführt hat, wie sie sonst durch ein „GLUT4 knocking out“ im Muskelgewebe festzustellen war. Ob die Insulinresistenz direkt durch das Fehlen der GLUT4 Transporter im Fettgewebe oder indirekt durch die Störung der Glukoseaufnahme durch Stoffe, die vom Fettgewebe sezerniert werden, ausgelöst wurde, bleibt als Schlüsselfrage zu klären (KAHN und FLIER, 2000).

Cytochalasin B ist ein klassischer Inhibitor des erleichterten Glukosetransports in Säugetierzellen (FROST und LANE, 1985). Lin und Spudich (1974) sowie Jung und Rampal (1977) haben die Wirkung von Cytochalasin B auf die Glukoseaufnahme untersucht. Die Bindung des Cytochalasin B erfolgt schnell, reversibel und mit hoher Affinität an membranständige Proteine. Es handelt sich um eine kompetitive Hemmung der Glukosetransporteraktivität. Cytochalasin B bindet an die Plasmamembran der Adipozyten und hemmt sowohl die insulinstimulierte als auch die basale Glukoseaufnahme. Es interagiert wahrscheinlich mit verschiedenen Bindungsstellen auf der Membran. Diese Hemmung tritt nicht bei L-Glukose auf (CUSHMAN und WARDZALA, 1980). Cytochalasin B hemmt ebenfalls den carriervermittelten Glukosetransport in humanen Erythrozyten (JUNG und RAMPAL, 1977). Dieses ist besonders im Hinblick auf die vorliegenden Versuche zu den HepG2 Zellen zu beachten.

In den vorliegenden Versuchen wurden Kontrollzellen vor Messung des Glukoseeinstroms mit 10 μ M Cytochalasin B über 10 min inkubiert. Die basale und insulinstimulierte Glukoseaufnahme wurde unter Cytochalasineinfluss in den 3T3-L1-Adipozyten zu 95,2% (n: 39) gehemmt (Abb.23.). In den Versuchen von Frost und Lane (1985) wurde durch die Zugabe von 20 μ M Cytochalasin B über 10 min der basale und der insulinstimulierte Glukoseeinstrom in differenzierten 3T3-L1 Adipozyten um 90-95% gehemmt. In den Versuchen von Brown und McIntosh (2003) mit humanen differenzierten Adipozyten konnte die Glukoseaufnahme unter 5 μ M Cytochalasin B zu 90% gehemmt werden.

Durch den Einsatz von 10 μ M Cytochalasin B konnte in den HepG2 Zellen eine Hemmung der Glukoseaufnahme um 80,6% erreicht werden (Abb.36.). Dieses lässt sich aus den unterschiedlichen GLUT-Isoformen in den beiden Zelltypen erklären (Oka et al., 1988).

Für die Hauptversuche mit den PPAR γ -Liganden wurden 0nM, 1nM und 50nM Insulin anhand der Insulinvorversuche (Abb.26., Tab.8.) ausgewählt.

Bei 0nM Insulin wurde die Glukoseaufnahme bei fehlender externer Insulinstimulierung gemessen, d.h. die insulinunabhängige basale Glukoseaufnahme in die Adipozyten bestimmt. Hierbei muss beachtet werden, dass die Zellen nicht als 100% insulinfrei betrachtet werden dürfen, weil ein „Restinsulinbestand“ in der Zelle vorhanden ist, der unabhängig von der extrazellulären Zugabe wirken kann.

Als optimale Dosis-Wirkungsbeziehung des Insulins auf den Glukosetransport wurde 1nM Insulin angenommen. Aus der Abbildung 26 lässt sich erkennen, dass von den untersuchten Insulinkonzentrationen 1nM am nächsten am Wendepunkt der Regressionskurve liegt. Insulin bewirkte in dieser Konzentration im Vergleich zu 0nM Insulin einen Anstieg um das 2,53 fache (Tab.9.), was die höchste relative Steigung im Vergleich zu den weiteren Steigungsstufen darstellt. Bei 1nM Insulin wurde die insulinabhängige Glukoseaufnahme unter annähernd physiologischen Konzentrationen bestimmt.

Anhand der Regressionskurve in Abbildung 26 ist zu erkennen, dass die maximale Stimulierung der Zellen durch Insulin ab einer Konzentration von 10nM Insulin erzielt wurde, da bei dieser Konzentration das Plateau der Regressionskurve erstmals erreicht wurde. Als Konzentration der maximalen Stimulierung der Glukoseaufnahme diente in den Versuchen 50nM Insulin. Insulin bewirkte in dieser Konzentration im Vergleich zu fehlender Insulinstimulierung einen Anstieg um das 4,87 fache (Tab.9.), was annähernd die höchste absolute gemessene Aufnahme war. Der Glukosetransport erfolgte wahrscheinlich hauptsächlich über den insulinabhängigen Glukosetransporter GLUT4.

Bei 1000nM Insulin (4,88 fach) konnte die Glukoseaufnahme in die Zelle im Vergleich zu 100nM Insulin (5,09 fach) nicht weiter erhöht werden (Tab.9.). Dies hat gezeigt, dass die maximale Wirkung des Insulins auf die Glukoseaufnahme überschritten wurde.

5.3 Glukoseaufnahme in differenzierte 3T3-L1 Adipozyten unter Einfluss verschiedener PPAR γ Liganden

Anhand der Ergebnisse der Glukoseaufnahme ist zu sehen, dass sowohl die verschiedenen Insulinkonzentrationen, als auch die chemischen und natürlichen PPAR γ -Liganden einen unterschiedlichen Einfluss auf die Glukoseaufnahme in die 3T3-L1 Adipozyten haben. Eine signifikante Erhöhung der Glukoseaufnahme ist sowohl von der eingesetzten Konzentration des Insulins, als auch von der Art und der Konzentration des PPAR γ -Agonisten abhängig.

Troglitazon

Die Versuche mit dem pharmakologischen PPAR γ -Ligand Troglitazon haben gezeigt, dass mit zunehmender Insulinkonzentration die Glukoseaufnahme, unabhängig von der Ligandenzugabe, im Vergleich zum Insulinnullwert signifikant erhöht wurde (Tab.10., Abb.28.). Innerhalb der Insulinkonzentrationen stieg die Glukoseaufnahme auch abhängig von der zunehmenden Ligandenkonzentration an, insbesondere bei dem Einsatz von 10000nM Troglitazon (Abb.29.). Im direkten Vergleich zwischen dem Troglitazonnullwert und 10000nM Troglitazon konnte bei allen eingesetzten Insulinkonzentration ein signifikanter Unterschied der Glukoseaufnahme [jeweils $p=0.000$] bestimmt werden (Tab.11.). Ebenfalls konnte ein signifikanter Unterschied der Glukoseaufnahme im direkten Vergleich zwischen dem Troglitazonnullwert und 1000nM Troglitazon auch unabhängig von den eingesetzten Insulinkonzentration [$p=0.021$, $p=0.028$ und $p=0.025$]

berechnet werden (Tab.11.). Das Niveau der Glukoseaufnahme erhöhte sich somit in den beiden höchsten Troglitazonkonzentrationen bei allen eingesetzten Insulinkonzentrationen am stärksten (Abb.29.).

Bei der Inkubation mit 10000nM Troglitazon konnte die Aufnahmesteigerung der Glukose in die Zellen im Vergleich zu 0nM Troglitazon (1,0) je nach verwendeter oder fehlender Insulinzugabe am stärksten erhöht werden (Tab.14.). Die höchste Glukoseaufnahme wurde bei 0nM Insulin mit 5,13 und die niedrigste bei 50nM Insulin mit 2,37 erreicht. Bei 1000nM Troglitazon wurde ebenfalls die höchste Aufnahmesteigerung der Glukose bei 0nM Insulin mit 1,47 und die geringste Steigerung bei 50nM Insulin mit 1,31 erzielt (Tab.14.). Bei der Insulinzugabe von 50nM scheint die Wirkung durch den zusätzlichen Einfluss von 10000nM Troglitazon deutlich im Vergleich zum Troglitazonnullwert erhöht zu werden (2,37 zu 1,0 fach), jedoch nicht so stark wie bei 1 und 0nM Insulin (3,38 bzw. 5,13 fach) (Tab.14.). Dies kann heißen, dass Troglitazon seine beste Wirkung auf die Steigerung der Glukoseaufnahme in die Zellen ohne externe Insulinzugabe (0nM Insulin) oder bei geringen externen Insulinkonzentrationen (1nM Insulin) erlangt hat.

Der Anstieg der Glukoseaufnahme bei den verschiedenen Insulinkonzentrationen zu dem Insulinnullwert war bei allen eingesetzten Troglitazonkonzentrationen relativ konstant (Tab.13.). Bei 1nM Insulin lag der Quotient zwischen 2,82 und 3,33, mit Ausnahme von 10000nM Troglitazon, da erfolgte nur ein 2,02 facher Anstieg der Glukoseaufnahme. Bei 50nM Insulin lag der Quotient zwischen 6,10 und 6,36, mit Ausnahme bei 10000nM Troglitazon, wo lediglich ein 3,00 facher Anstieg der Glukoseaufnahme erfolgte (Tab.13.). Das verdeutlicht, dass Insulin, unabhängig von der eingesetzten Troglitazonkonzentration, immer die gleiche Wirkung auf den Glukoseeinstrom ausgeübt hat, was jedoch nicht für die maximal eingesetzten Troglitazonkonzentration galt. Dies lässt vermuten, dass bei dieser Troglitazonkonzentration das Maximum des Glukoseeinstroms in die Zelle erreicht wurde und es durch den Zusatz von Insulin zu keiner weiteren Stimulierung der insulinabhängigen Glukoseaufnahme gekommen ist. Die gegenläufige Wirkung des Troglitazons bei 10000nM zu Insulin auf die Steigerung der Glukoseaufnahme (bei 0nM Insulin 5,13; bei 1nM Insulin 3,58; bei 50nM Insulin 2,37) zum einen und die Verringerung der Insulinwirkung (bei 10000nM Troglitazon 2,02 bzw. 3,00 fach) zum anderen kann heißen, dass Troglitazon über einen weiteren Mechanismus als Insulin gewirkt hat (Vgl.Tab.13. und Tab.14.). Die signifikante Erhöhung der Glukoseaufnahme (Tab.11.) könnte auf einer troglitazonabhängigen Aktivierung von PPAR γ beruhen, die zu einer Erhöhung der Translokation von GLUT4 geführt hat. Hierbei könnte die maximale Wirkung auf den Glukoseeinstrom über das eingesetzte Konzentrationsspektrum bis 10000nM Troglitazon hinausgehen (Tab.10., Abb.28.).

In Zellkulturversuchen mit Muskelzellen von übergewichtigen T2DM Patienten konnte unter Troglitazonzugabe eine Steigerung der PPAR γ mRNA Expression und eine verbesserte insulinstimulierte Glukoseaufnahme gemessen werden (Vgl. PARK et al., 1998 aus KIM et al., 2002). Lehmann et al. (1995) konnten nachweisen, dass die Inkubation mit verschiedenen TZDs in der Konzentration von 1×10^{-5} mol in Zellkulturversuchen keine signifikante Aktivierung von PPAR α bewirken konnte. Die Isoformen PPAR γ 1 und 2 konnten dagegen signifikant aktiviert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde bei dem eingesetzten Konzentrationsspektrum von 1×10^{-5} - 10^{-9} mol der Nachweis einer möglichen angestiegenen PPAR γ -Expression nicht erbracht, jedoch decken sich die Ergebnisse eines angestiegenen Glukoseeinstroms mit den Ergebnissen von Park et al (1998).

In Zellkulturversuchen mit humanen Adipozyten konnte gezeigt werden, dass die PPAR γ -Aktivierung durch die Inkubation mit TZDs direkt die Expression der Gene induziert, welche in die Insulinkaskade involviert sind (Vgl. SMITH et al., 2001 aus KIM et al., 2002). Weiterhin wurde in Versuchen mit 3T3-L1 Adipozyten nach einer 48 stündigen Inkubation mit TZDs eine Steigerung der Expression von IRS2, aber nicht von IRS1 gemessen (TAMORI et al., 2002). Die in der vorliegenden Arbeit gemessene Steigerung des Glukoseeinstroms könnte auf solch eine Modifikation der Insulinkaskade über die Aktivierung von PPAR γ über Troglitazon zurückzuführen sein.

Aus den in-vitro Ergebnissen der verschiedenen Studien und den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit könnte auf die Glukoseaufnahme in-vivo geschlossen werden. In Bezug auf den Menschen könnte somit spekuliert werden, dass ein Patient mit T2DM nach einer Behandlung mit TZDs unabhängig von seinem Insulinstatus eine erhöhte Glukoseaufnahme vorrangig in die Muskelzellen aber auch in die Adipozyten erfährt. Diese Erhöhung der Glukoseaufnahme könnte über die Troglitazon-bedingte Aktivierung von PPAR γ im Fettgewebe erfolgen. Die Wirkung des Insulinsensitizers Troglitazon könnte in bestimmten Dosierungen bei einer vorliegenden Hyperinsulinämie oder einem Insulinmangel in-vivo die gleiche Wirkung haben, wie es bei den vorliegenden Versuchen in-vitro gezeigt wurde. Dieser Effekt der TZDs wurde bereits in verschiedenen Studien belegt (siehe Theoretischer Hintergrund 2.4.8. PPAR γ -Liganden/Agonisten: Synthetische Liganden:GW1929 und TZDs).

GW1929

Ein weiterer bei der Messung der Glukoseaufnahme eingesetzter chemischer PPAR γ -Agonist war GW1929, der schon in geringen Konzentrationen von 1nM die Glukoseaufnahme signifikant erhöht hat (Tab.16.). Die Versuche haben gezeigt, dass die mit GW1929 stimulierte Glukoseaufnahme in 3T3-L1 Adipozyten mit ansteigender GW1929-Konzentration und in Abhängigkeit von der eingesetzten Insulinkonzentration zum Teil signifikant erhöht wurde (Tab.16.; Abb.31.). Das Niveau der Glukoseaufnahme wurde bei dem Einsatz von 100nM GW1929 bei allen Insulineinsätzen signifikant [$p=0.006$; $p=0.001$ und $p=0.017$] zum GW1929-Nullwert erhöht. Bei 50nM Insulin kam es zusätzlich zu einer signifikanten Erhöhung der Glukoseaufnahme bei 1nM GW1929 [$p=0.044$]. Das Signifikanzniveau von [$p<0.05$] wurde bei 50nM Insulinzugabe und 10nM GW1929 mit [$p=0.051$] knapp verfehlt (Tab.16.). Dies könnte auf die hohe Standardabweichung bei diesem MW zurückzuführen sein (Tab.15.). Bei dem Einsatz von 1nM Insulin konnte die Glukoseaufnahme im direkten Vergleich zwischen dem GW1929-Nullwert und den verschiedenen GW1929-Konzentrationen bei allen eingesetzten GW1929-Konzentrationen signifikant erhöht werden (Tab.16.; Abb.31.).

Weiterhin ist festzuhalten, dass die mit GW1929 stimulierte Glukoseaufnahme in 3T3-L1 Adipozyten mit ansteigender Insulinkonzentration auch unabhängig von der eingesetzten GW1929-Konzentration erhöht wurde. Tabelle 15 zeigt, dass Insulin in den Konzentrationen 1nM und 50nM die Glukoseaufnahme bei allen eingesetzten GW1929-Konzentrationen signifikant zum Insulinnullwert erhöht hat.

Der Anstieg der Glukoseaufnahme bei den verschiedenen Insulinkonzentrationen im Vergleich zu dem Insulinnullwert unter GW1929-Stimulierung zeigte eine GW1929

abhängige Veränderung der Werte (Tab.18.). Bei 1nM Insulin lag der Quotient zwischen 2,42 bei fehlender GW1929-Zugabe und 3,81 bei 10nM GW1929-Zugabe. Bei 50nM Insulin lag der Quotient zwischen 5,54 bei fehlender GW1929-Zugabe und 8,00 bei 10nM GW1929. Das zeigt, dass durch die Zugabe von GW1929 die Glukoseaufnahme deutlich im Vergleich zu fehlender GW1929 Zugabe gesteigert werden konnte (Tab.18.). Das in den Insulinvorversuchen erreichte Maximum der Glukoseaufnahmesteigerung um das 5,09 fache bei der Zugabe von 100nM Insulin wurde durch GW1929 ebenfalls überschritten (Vgl. Tab.9. und Tab.18.).

Die höchste Glukoseaufnahmesteigerung wurde im Vergleich zur Kontrolle ohne GW1929 (1,0) bei allen verwendeten GW1929-Konzentrationen durch den zusätzlichen Einsatz von 1nM Insulin erzielt (Tab.19). Die Glukoseaufnahme bei 1nM Insulin überstieg unter Zugabe von 1nM (1,54), 10nM (1,68), 100nM (1,69) und 1000nM (1,50) GW1929 alle Werte, die ohne Insulin und bei 50nM Insulin gemessen worden sind (Tab.19.).

Die maximale Wirkung von GW1929 auf den Glukoseeinstrom wurde mit dem eingesetzten Konzentrationsspektrum vermutlich erzielt, da es bei dem Einsatz von 1000nM GW1929 zu keiner weiteren Steigerung der Glukoseaufnahme im Vergleich zu 100nM GW1929 kam (Tab.15.).

Es konnte gezeigt werden, dass die signifikante Erhöhung der Glukoseaufnahme sowohl von der Insulinzugabe als auch von der GW1929-Konzentration abhängig war. Ohne die Zugabe von GW1929 hatte Insulin eine geringere Wirkung auf den Glukoseeinstrom in die Zellen ausgeübt. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass GW1929 die Glukoseaufnahme durch eine Steigerung Translokation der Glukosetransporter steigern konnte. Dieser Effekt muss auf die Wirkung von GW1929 alleine und in Kombination mit Insulin beruhen haben. Durch eine Aktivierung von PPAR γ könnte es über verschiedene Mechanismen, wie z.B. der Steigerung der PI 3-Kinase-Aktivität, zu einer Steigerung der Translokation von GLUT4 aus den intrazellulären Vesikeln zur Plasmamembran gekommen sein. Hieraus kann ein signifikanter Anstieg der Glukoseaufnahme folgen.

Es konnte weiter gezeigt werden, dass GW1929 einen stärkeren Einfluss auf die insulinstimulierte Glukoseaufnahme hatte als Troglitazon, bei dem die Glukoseaufnahme weniger von der eingesetzten Insulinkonzentration, sondern von der eingesetzten Troglitazonkonzentration abhängig war (Vgl. Tab.10. und Tab.15.) Anhand der Ergebnisse ist zu sehen, dass GW1929 schon in geringen Konzentrationen (1nM), die Glukoseaufnahme signifikant erhöhen konnte was bei Troglitazon erst unter Einsatz hoher Konzentrationen (1000nM und 10000nM) erreicht wurde (Vgl. Tab. 11 und Tab.16.). Dies kann auf eine höhere Affinität von GW1929 zu PPAR γ zurückzuführen sein, die auch in der Literatur beschrieben wird (NUGENT et al. 2001).

Es wurde der PPAR γ aktivierende Agonist GW1929 gewählt, da er eine hohe und spezifische Affinität für PPAR γ besitzt (NUGENT et al. 2001; MITAL et al., 2002). Der Einsatz von GW1929 in diesen Versuchen sollte zur weiteren Aufklärung der spezifischen Wirkung des Transkriptionsfaktors PPAR γ auf den Glukoseeinstrom in die Adipozyten dienen und zeigen, dass der Glukoseeinstrom in die Adipozyten über eine mögliche PPAR γ Aktivierung erhöht werden konnte. Aus den in-vitro Versuchen mit GW1929 könnte somit für die in dieser Arbeit verwendeten PPAR γ -Liganden gefolgert werden, dass die Steigerung der insulinstimulierten und der insulinunabhängigen Glukoseaufnahme sehr wahrscheinlich über die Aktivierung von PPAR γ erfolgt ist.

CLA-Isomer (trans-10,cis-12)

Durch die Inkubation mit dem nutritiven PPAR γ -Agonist CLA-Isomer (trans-10,cis-12) konnte die Glukoseaufnahme bis zu einer bestimmten insulinabhängigen Konzentration signifikant erhöht werden. Abbildung 33 und Tabelle 21 zeigen, dass die mit dem CLA-Isomer stimulierte Glukoseaufnahme in 3T3-L1 Adipozyten bei bestimmten CLA-Konzentration signifikant erhöht wurde. Die Glukoseaufnahme wurde bei dem Einsatz von 10 μ M CLA bei fehlender Insulinzugabe [$p=0.027$] und bei 1nM Insulin [$p=0.042$] signifikant zum CLA-Nullwert erhöht. Bei 1nM Insulin kam es zusätzlich bei 100 μ M CLA [$p=0.035$] und bei der fehlenden Insulinzugabe zusätzlich bei 1 μ M CLA [$p=0.039$] zu einer signifikanten Erhöhung der Glukoseaufnahme. Bei dem Einsatz von 50nM Insulin konnte die Glukoseaufnahme im direkten Vergleich zwischen dem CLA-Nullwert und den eingesetzten CLA-Konzentrationen nicht signifikant erhöht werden. Das Signifikanzniveau von [$p<0.05$] wurde bei 0nM Insulinzugabe und 0,1 μ M CLA mit [$p=0.058$] und bei 50nM Insulin und 1 μ M CLA mit [$p=0.056$] knapp verfehlt (Tab.21.).

Bei 1 μ M und 10 μ M trans-10,cis-12 wurde je nach eingesetzter Insulinkonzentration die höchste Glukoseaufnahme in die Zellen erreicht. Bei 100 μ M trans-10,cis-12 konnte der Glukoseeinstrom nicht weiter im Vergleich zu 10 μ M CLA erhöht werden. Das hat gezeigt, dass die eingesetzte Konzentration von 100 μ M CLA wahrscheinlich ausgereicht hat, um die maximale Glukoseaufnahme durch trans-10,cis-12 zu ermitteln (Tab.20., Abb.33.).

Es konnte gezeigt werden, dass Insulin in den Konzentrationen 1nM und 50nM die Glukoseaufnahme unabhängig von den eingesetzten CLA-Isomer-Konzentrationen signifikant zum Insulinnullwert erhöht hat (Tab.20., Abb.32.).

Der Anstieg der Glukoseaufnahme bei verschiedenen Insulinkonzentrationen im Vergleich zum Insulinnullwert bleibt bei den CLA-Konzentrationen relativ konstant (Tab.23.). Bei 1nM Insulin lag der Quotient zwischen 1,90 und 2,36. Bei 50nM Insulin lag der Quotient zwischen 3,14 und 3,77. Das zeigt, dass Insulin unabhängig von der CLA-Stimulierung die gleiche Aufnahmesteigerung auf den Glukoseeinstrom ausgeübt hat. Diese war im arithmetischen Mittel geringer als in den Vorversuchen (Vgl. Tab.9. und Tab.23.).

Tabelle 24 zeigt die insulinunabhängige Steigerung der Glukoseaufnahme durch den Einfluss des CLA-Isomers. Es erfolgte eine maximale Aufnahmesteigerung um das 1,55 fache bei 0nM Insulin und 10 μ M CLA-Zugabe.

CLA könnte über die Aktivierung von PPAR γ die Glukosetransporter und somit den Glukosetransport signifikant beeinflusst haben. Die Translokation von GLUT4 könnte über die Steigerung der PI 3-Kinase Aktivität oder einem weiteren Mechanismus, wie der Steigerung der GLUT4-Exozytose und der Verringerung der GLUT4-Endozytose signifikant erhöht worden sein. Es ist in verschiedenen Studien belegt worden, dass PPAR γ als adipogener Transkriptionsfaktor anabole Stoffwechselprozesse induziert, wie die TG-Synthese und die Steigerung der Fettsäure- und Glukosesaufnahme (BROWN und McIntosh, 2003). Diese Wirkung erfolgte über indirekte oder direkte Steigerung der Transkription von bestimmten Zielgenen, die Proteine wie GLUT4 codieren (WU et al., 1998).

Die Versuche mit der trans-10,cis-12 lieferten in der Wissenschaft keine einheitlichen Ergebnisse. In einigen Publikationen wurde von einer positiven Wirkung dieses Isomers auf den Lipid- und Glukosestoffwechsel und die Insulinwirkung berichtet. Andere Studien widerlegten diese Ergebnisse. In Versuchen mit Adipozyten konnten Granlund et al. (2005) und Kang et al. (2003) nicht nur zeigen, dass die Stimulierung mit trans-10,cis-12 die Akkumulierung von Lipiden während der Differenzierung zum reifen Adipozyten

verhindert hat, sondern auch dass diese Wirkung auf PPAR γ zurückzuführen ist. In den Zellkulturversuchen von Choi et al. (2000) wurden die 3T3-L1 Preadipozyten während der Differenzierung mit der CLA trans-10,cis-12 (10-100 μ M) inkubiert. Am 9. Tag wurde die mRNA isoliert. Es kam zu keiner signifikanten Beeinflussung der adipozytenspezifischen Gene, wie das Adipocyte-fatty-acid-binding-protein (aP2), C/EBP α und des Transkriptionsfaktors PPAR γ . Der Einsatz eines CLA-Gemisches reduzierte in diesen Versuchen sogar die mRNA-Expression von PPAR γ und aP2. Der cis-9,trans-11 Isomer hatte dagegen keinen Einfluss auf die Expression von adipozytenspezifischen Genen.

In Versuchen von Brown und McIntosh (2003) hat eine chronische Supplementierung mit 3-30 μ M trans-10,cis-12 die insulinstimulierte Glukoseaufnahme reduziert und verminderte die Expression von GLUT4 in humanen Preadipozyten. Im Vergleich zeigte cis-9,trans-11 keinen wesentlichen Effekt auf die Glukoseaufnahme. Sie konnten weiterhin zeigen, dass die chronische und nicht die akute Supplementierung mit der CLA trans-10,cis-12 die Expression von PPAR γ 2 gesenkt hat. Aus einer weiteren Publikation von Brown et al. (2003) zur Wirkung des CLA-Isomer (trans-10,cis-12) in differenzierten humanen Adipozyten konnte anhand einer RNA-Isolierung ein leichter Anstieg von PPAR γ 1 und PPAR γ 2 während der Inkubationszeit von 72 h gemessen werden. Bei der chronischen Supplementierung von bis zu 216 h konnte dagegen ein signifikanter Abfall der Expression von PPAR γ 1 und PPAR γ sowie bestimmten Zielgenen, wie aP2, gemessen werden. Diese Ergebnisse entsprechen den Ergebnissen der Publikation von Evans et al. (2001). Weiterhin konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die mit trans-10,cis-12 inkubierten Zellen während der Differenzierung kleinere Lipidvakuolen entwickelten. Die einfach ungesättigten Fettsäuren Palmitinsäure (C16:1) und Ölsäure (C 18:1), die bis zu 58% der Lipidvakuole ausmachen, waren reduziert vorhanden (CHOI et al., 2000). Im Vergleich steigerte die Supplementierung mit cis-9,trans-11 die Triglyceridakkumulierung. Die beschriebenen TG-senkenden und insulinresistenz-induzierenden Effekte sind zwar vermutlich auf eine Senkung der Expression oder Aktivierung von PPAR γ -Zielgenen durch trans-10,cis-12 zurückzuführen, aber erst nach einer chronischen Supplementierung.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden nach einer akuten Supplementierung über 48 h mit CLA erzielt. Die PPAR γ 2 Isoform müsste somit leicht hochreguliert worden sein. Es wäre ebenfalls mit einer leichten Hochregulierung der PPAR γ Zielgene wie GLUT4 zu rechnen. Dieses könnte sich in einem erhöhten Glukoseeinstrom äußern, was in den Versuchen der vorliegenden Arbeit geschehen ist. Weiterhin scheint auch der Zeitpunkt der CLA-Inkubation wichtig zu sein. In vielen Publikationen wurde die CLA während des Preadipozytenstadiums eingesetzt (KANG et al., 2003; GRANLUND et al., 2005; CHOI et al., 1999). In den vorliegenden Versuchen wurde die CLA erst nach vollendeter Differenzierung im reifen Adipozyten eingesetzt. Nach der Differenzierung liegen die PPAR γ -Isomere 2 und 3 in hohen Konzentrationen vor, (SEWTER und VIDAL-PUIG, 2002; SPIEGELMAN und FLIER, 1996) wobei C/EBP α eine stetige Expression von PPAR γ bewirkt (SPIEGELMAN und FLIER, 1996; WU et al., 1998). Es stellt sich die Frage, inwieweit die Expression von PPAR γ unter dem stetigen Einfluss von C/EBP α auch im reifen Adipozyten durch die CLA-Supplementierung runterreguliert werden könnte.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit kann im Hinblick auf den Menschen vermutet werden, dass nur eine akute, d.h. kurzzeitige Supplementierung mit trans-10,cis-12 einen positiven Effekt auf die Erhöhung der Glukoseaufnahme haben würde. Der Glukosetransport konnte in den vorliegenden Versuchen schon durch die Zugabe niedriger Konzentrationen (1 μ M)

dieses CLA-Isomers signifikant erhöht werden (Tab.21). Eine annähernd physiologische Insulinkonzentration im Blut des Menschen sollte in den Versuchen durch die Zugabe von 1nM Insulin simuliert werden. Hierbei kam es in den Versuchen durch die Zugabe von CLA (10 μ M und 100 μ M) zu einer signifikanten Erhöhung der Glukoseaufnahme in die Zellen (Tab.21.). Das Problem einer praktischen Empfehlung für den Verbraucher ergibt sich jedoch daraus, dass eine längere Supplementierung, laut verschiedener Studien, einen negativen Effekt auf die Insulinsensitivität ausüben kann (ROCHE et al., 2002; RISÈRIUS et al., 2004; WANG und JONES 2004). Weiterhin beziehen sich die Ergebnisse zur signifikanten Steigerung der Glukoseaufnahme nur auf das reine CLA-Isomer trans-10,cis-12 und nicht auf das CLA-Gemisch. Hierbei ist zu beachten, dass dieses Isomer nur in geringen Konzentrationen in Lebensmitteln wie Milch oder Rindfleisch vorkommt, und dass das in höheren Konzentrationen vorkommende CLA-Gemisch (cis-9,trans-11 und trans-10,cis-12) nach den vorliegenden Ergebnissen (siehe nächster Abschnitt) keinen signifikanten Einfluss auf die Glukoseaufnahme hatte. Der pharmakologische Nutzen oder der Nutzen als diätetisches Supplement wäre unter dem Aspekt einer kontrollierten Anwendung für den Menschen, z.B. bei Adipositas, zu betrachten (PARIZA, 2004). Der diesem CLA-Isomer zugeschriebene hemmende Effekt auf die TG-Akkumulierung der Adipozyten ist für die Bekämpfung der Adipositas von Bedeutung (KANG et al., 2003; BROWN und MCINTOSH, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Effekt nach 48 h CLA-Inkubation unter dem Mikroskop nicht beobachtet. Der Grund hierfür könnte sein, dass nur reife, bereits differenzierte Adipozyten mit CLA stimuliert worden sind und dadurch die in der Differenzierung hauptsächlich stattfindende TG-Akkumulierung zur Ausbildung der Lipidvakuolen schon weitestgehend abgeschlossen war.

Inwieweit eine fettsäuremodifizierte Diät, speziell auf die CLA-Isomere bezogen, die Insulinsensitivität im Organismus über die Aktivierung von PPAR γ positiv beeinflussen kann, ist nach den vorliegenden Ergebnissen und den verschiedenen aufgeführten Publikationen nicht eindeutig zu beantworten. Der Effekt des CLA-Isomers sowie des CLA-Gemisches auf den Glukosestoffwechsel müsste durch Humanstudien weiter belegt und abgesichert werden.

CLA-Gemisch (trans-10,cis-12 und cis-9, trans-11)

Im Vergleich zu dem CLA-Isomer trans-10,cis-12 erzielte das CLA-Gemisch (trans-10,cis-12 und cis-9,trans-11) unabhängig von der Insulinzugabe keine signifikanten Ergebnisse. Es kam bei keiner der eingesetzten Konzentrationen des CLA-Gemisches zu einer signifikanten Erhöhung der Glukoseaufnahme (Tab.26.). Die Glukoseaufnahme erfolgte zwar auf verschiedenen hohen Niveaus, was jedoch auf die Insulinzugabe zurückzuführen war (Tab.25., Abb.35.).

Abbildung 34 und Tabelle 25 zeigen, dass Insulin in der Konzentration von 50nM die Glukoseaufnahme unabhängig von der eingesetzten CLA-Konzentrationen im direkten Vergleich zum Insulinnullwert signifikant erhöht hat. Dagegen konnte im direkten Vergleich zwischen 1nM Insulin und dem Insulinnullwert lediglich ohne die Stimulierung mit dem CLA-Gemisch eine signifikante Erhöhung der Glukoseaufnahme [p=0.029] gemessen werden (Tab.25.) Im Gegensatz hierzu war die Glukoseaufnahme in den anderen Versuchen mit Troglitazon, GW1929 und dem CLA-Isomer im direkten Vergleich zwischen

1nM Insulin und dem Insulinnullwert bei jedem Liganden signifikant gesteigert worden (Vgl. Tab.10., 15., 20. und 25.). Das kann bedeuten, dass die Inkubation mit dem CLA-Gemisch bei geringer Insulinzugabe die insulinstimulierte Glukoseaufnahme in die Zelle gestört hat.

Der Anstieg der Glukoseaufnahme bei den verschiedenen Insulinkonzentrationen ist im Vergleich zum Insulinnullwert bei den verwendeten CLA-Konzentrationen recht konstant, mit Ausnahme von 100µM CLA-Gemisch (Tab.28.). Bei 1nM Insulin lag der Quotient, mit Ausnahme von 100µM CLA-Gemisch, zwischen 2,21 und 2,77. Bei 50nM Insulin lag der Quotient, mit Ausnahme von 100µM CLA-Gemisch, zwischen 3,55 und 4,11. Bei der maximal verwendeten Konzentration von 100µM CLA lagen die Werte mit 1,89 bei 1nM und 3,00 bei 50nM Insulin niedriger (Tab.28.). Das zeigt, dass Insulin, außer bei der hohen CLA-Konzentration von 100µM, unabhängig von der Stimulierung mit dem CLA-Gemisch immer die gleiche Wirkung auf den Glukoseeinstrom ausgeübt hat.

Bei 100µM CLA-Gemisch ist es im Vergleich zu 10µM CLA zu keiner weiteren Steigerung der Glukoseaufnahme gekommen. Dieses lässt vermuten, dass die maximal eingesetzte Konzentration von 100µM CLA ausgereicht hat, um die maximale Glukoseaufnahme durch das CLA-Gemisch zu ermitteln (Tab.25.).

Tabelle 29 zeigt, dass die höchste Aufnahmesteigerung der Glukose unter Einfluss des CLA-Gemisches im Vergleich zum CLA-Nullwert bei fehlender Insulinzugabe und bei 1nM Insulin bei 0,1µM CLA-Gemisch (1,46 bzw. 1,10) erreicht wurde. Bei 50nM Insulin lag das Maximum bei 10µM CLA (1,37). Tabelle 29 zeigt weiterhin, dass die Aufnahmesteigerung der Glukose bei allen eingesetzten CLA-Konzentration im Vergleich zum CLA-Nullwert bei dem zusätzlichen Einsatz von Insulin nahe 1,0 lag. Dieses bestätigt, dass das CLA-Gemisch nur einen geringen Einfluss auf die Steigerung der Glukoseaufnahme hatte. Durch die Aktivierung der Insulinkaskade durch Insulin kam es wahrscheinlich zu einer Erhöhung der Translokation der insulinabhängigen Glukosetransporter GLUT4 und somit zu einer signifikanten Steigerung der Glukoseaufnahme im Vergleich zum Insulinnullwert (Tab.25.). Das CLA-Gemisch bewirkt dagegen wahrscheinlich keine erhöhte Translokation der Glukosetransporter und somit keine signifikante Erhöhung des Glukoseeinstroms. Anhand der Ergebnisse lässt sich erkennen, dass nur das reine CLA-Isomer trans-10,cis-12 einen signifikanten Einfluss auf die Glukoseaufnahme hatte. Die Konzentration von trans-10,cis-12 scheint in dem Gemisch in zu geringer Konzentration (Cognis Certificate of analysis: Analysis: 80,1% CLA: 39,2% cis9,trans11 + 38,1% trans10,cis12) vorzukommen, als dass es die Glukoseaufnahme signifikant hätte steigern können. Es könnte auch sein, dass sich die Wirkung durch die unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Isomere in dem Gemisch, wieder aufgehoben hat (BROWN et al., 2003). Es wäre in diesem Zusammenhang interessant gewesen, die reinen Isomere trans-10,cis-12 und cis-9,trans-11 selber im Verhältnis 1:1 zu mischen und die Glukoseaufnahme nach einer 48 h Inkubation zu messen oder die Glukoseaufnahme unter lediglich dem Einfluss von dem reinen Isomer cis-9,trans-11 zu bestimmen. Hierbei dürfte es nach den vorliegenden Ergebnissen und den verschiedenen Publikationen zu keiner signifikanten Erhöhung der Glukoseaufnahme kommen. Zusätzlich ist zu beachten, dass das verwendete CLA-Gemisch neben den beschriebenen CLA-Isomeren (trans-10,cis-12 und cis-9,trans-11) noch andere CLA-Isomere oder andere Stoffe enthalten könnte, die auf die Glukoseaufnahme eingewirkt haben. Z.B. können nicht isomerisierte Linolsäuren in dem Gemisch vorhanden sein, die ebenfalls einen Einfluss auf die adipozytenspezifische Genexpression besitzen können (CHOI et al., 2000).

Die aufgeführten Versuche haben gezeigt, dass zur Überprüfung der Wirkung des Troglitazons, GW1929 und der CLA auf die Glukoseaufnahme nach der 48 stündigen Stimulierung der Zellen eine Extraktion der mRNA der PPAR γ Zielgene, wie GLUT4, hätte stattfinden können. Die Werte hätten mit einem Kontrollwert ohne Ligandenzugabe verglichen werden müssen, um eine erwartete erhöhte Expression von PPAR γ Zielgenen nachweisen zu können. Dieses hätte zur Vervollständigung der Ergebnisse und der abgesicherten Wirkung über die Aktivierung von PPAR γ beitragen können. Um die Wirkung z.B. der TZDs auf das Fettgewebe besser verstehen zu können, wäre es ebenfalls wichtig gewesen, die Verstoffwechselung der Glukose in den Adipozyten zu untersuchen, wie es von Guan et al. (2002) durchgeführt wurde.

Diese weiteren Versuche hätten jedoch die Aufgabenstellung der Etablierung der Methode zur Glukoseaufnahmemessung überschritten.

HepG2- Zellen

Die Messung der Glukoseaufnahme in die HepG2 Zellen wurde zusätzlich durchgeführt, um die Ergebnisse der 3T3-L1 Adipozyten mit denen eines anderen Zelltyps vergleichen zu können. Diese Versuche sollten zeigen, dass die Wirkungsweise der PPAR γ -Liganden gewebeabhängig ist.

Die Versuche fanden in einem kleineren Umfang (n: 4), jedoch unter den gleichen Bedingungen und mit dem Einsatz der gleichen Liganden wie bei den 3T3-L1 Zellen statt. Als Ergebnis ist festzuhalten, dass es bei keinem der eingesetzten Liganden zu einer signifikanten Steigerung der Glukoseaufnahme gekommen ist (Werte nicht aufgeführt) (Abb.38.). Alle Versuche wurden ohne Insulinzugabe durchgeführt, da in Vorversuchen (Abb.37.) und aus der Literatur eine weitestgehende Insulinunabhängigkeit der Zellen festgestellt bzw. beschrieben wurde. Die Glukosetransporter des HepG2-Typs sind nicht insulinabhängig. Bei diesem Zelltyp kommt es durch Insulinzugabe zu keiner Stimulation der Translokation von Glukosetransportern (GOULD et al., 1989). Die Glukoseaufnahme war somit in den vorliegenden Versuchen durch Insulinzugabe nicht signifikant beeinflussbar. Jedoch sind die Ergebnisse mit Vorbehalt zu betrachten, da die Versuchsanzahl mit zwei Einzelmessungen nur sehr gering war.

Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Oka et al. (1988) haben gezeigt, dass die HepG2 Glukosetransporter sehr ähnlich wie die Glukosetransporter der humanen Erythrocyten funktionieren. Der Glukosetransporter GLUT1 wurde hauptsächlich in Erythrozyten, dem Gehirn und verschiedenen Zellkulturlinien, wie den HepG2 Zellen, nachgewiesen. Das Fehlen des Glukosetransporters GLUT4 ist der entscheidende Unterschied im Bezug auf die Glukoseaufnahme im Vergleich zu den 3T3-L1 Zellen.

Vergleich der Liganden

Im Vergleich zwischen den Liganden ist zu sehen, dass die natürlichen Liganden der Familie der CLA eine geringere Steigerung der Glukoseaufnahme als die chemischen Liganden Troglitazon und GW1929 erzielt haben (Vgl. Tab.10., 15., 20. und 25.).

Von den vier PPAR γ Agonisten, die in diesen Versuchen untersucht wurden, hatte GW1929 die höchste Affinität zu PPAR γ . Es bewirkte im Vergleich zu Troglitazon und CLA schon im nanomolaren Bereich (1nM) eine signifikante Erhöhung der Glukoseaufnahme in die 3T3-L1 Adipozyten (Tab.16.). Diese Erhöhung ist wahrscheinlich auf eine Aktivierung von PPAR γ zurückzuführen. CLA wurde im μ M Bereich eingesetzt und hatte die geringste PPAR γ -Affinität. In der Literatur ist eine Affinitätsreihenfolge der natürlichen PPAR γ Liganden in Bezug zu den TZDs zu finden, die sich mit den ermittelten Ergebnissen dieser Arbeit deckt (MITAL et al., 2002). Die höchste Affinität zu PPAR γ hat hiernach Rosiglitazon > Pioglitazon > **Troglitazon** > 15-Deoxy-delta12,14-PGJ2 > 15-Deoxy-PGJ2 > Linolensäure = **Linolsäure** = Ölsäure. **GW1929** wäre nach den vorliegenden Ergebnissen und den Ergebnissen von Nugent et al. (2001) vor der Gruppe der TZDs einzuordnen. Wichtig ist hierbei, dass die Liganden mit einer hohen Affinität für PPAR γ schon in geringen Konzentrationen PPAR γ aktivieren können und die Wirkung von PPAR γ auf den Glukose- und den Lipidstoffwechsel auslösen können. Aus diesem Grund wurde GW1929 ausgewählt, um zu zeigen, dass die Erhöhung des Glukoseeinstroms über eine Aktivierung von PPAR γ erfolgen kann. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die anderen Agonisten den Glukoseeinstrom wie GW1929 via PPAR γ Aktivierung erhöht haben.

Die Bedeutung dieser Ergebnisse für den Menschen sind im Zusammenhang mit der Insulinresistenz, der Adipositas, dem damit möglicherweise verbundenen T2DM und mit PPAR γ als ein Schlüsselmediator im Glukosestoffwechsel zu betrachten.

Für den Typ 2 Diabetiker ist die hohe Affinität und Selektivität der TZDs für PPAR γ von besonderer Bedeutung für die Wirkung als Insulinsensitizer (SPIEGELMAN, 1998). Troglitazon wurde zwar als Medikament in Deutschland verboten, gehört jedoch zur Wirkstoffgruppe der in Deutschland zugelassenen TZDs. Daten aus verschiedenen klinischen Studien (KIM et al., 2002; MIYAZAKI et al., 2003) zeigen, dass ein Insulinsensitivität steigernder Effekt von Troglitazon u.a. auf eine Steigerung der PI 3-Kinase Aktivität über PPAR γ zurückzuführen ist und somit die Translokation von GLUT4 erhöht (siehe Theoretischer Hintergrund: Synthetische Liganden: GW1929 und TZDs). In vielen Publikationen, die sich mit diesem Thema beschäftigt haben, besteht der Konsens, dass die Wirkung der TZDs auf die Insulinresistenz der Skelettmuskulatur via Aktivierung von PPAR γ im Fettgewebe verläuft. In den vorliegenden Versuchen konnte die Wirkung des Troglitazons auf den Glukoseeinstrom in die Adipozyten nachgewiesen werden (Tab.10., Abb.28.). Hierbei konnte gezeigt werden, dass sowohl Insulin als auch Troglitazon vermutlich über eine verstärkte GLUT4 Translokation, die Glukoseaufnahme in die Zellen erhöhen konnten und somit bezogen auf in-vivo die Blutzuckerspiegel senken würden. Im Gegensatz zu diesen positiven Effekten auf die Insulinsensitivität ist auch ein Nachteil der TZD-Therapie zu beachten. Dabei handelt es sich um den adipogenese-steigernden Effekt der TZDs bei den meist schon übergewichtigen T2DM Patienten. In klinischen Studien (KIM et al., 2002) und in Tierversuchen (Zucker diabetic fatty FA/FA rats, ZDF-Ratten) wurde gezeigt, dass es zu einem Gewichtsanstieg und einer Fettdepositionierung gekommen ist (SPIEGELMAN, 1998). Ganda (2000) berichtete, dass bei der Therapie mit TZD bei Typ 2 Diabetikern eine Abnahme des intra-abdominalen (viszeral) Fettes beobachtet werden konnte. Das Verhältnis von viszeralem zu subkutanem Fett sank. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass TZDs die Differenzierung der subkutanen Preadipozyten stärker stimuliert haben als die

Differenzierung von viszeralen Preadipozyten. Dieses könnte das „TZD-Paradox“ der verbesserten Insulinsensitivität bei ansteigender Fettmasse erklären. Spiegelman (1998) erklärte dieses Paradoxon des ansteigenden BMIs bei einer Verbesserung der Insulinsensitivität mit einer Steigerung der Adipozytenanzahl und einer Verringerung der Anzahl großer reifer und evtl. insulinresistenter Adipozyten.

Im Gegensatz zu der Wirkung der TZDs konnte in Versuchen von Risérus et al. (2002) gezeigt werden, dass das CLA-Isomer trans-10,cis-12 die Bildung von neuen kleineren und insulinsensitiven Fettzellen gehemmt hat. Evtl. erfolgte diese Hemmung über eine Runterregulierung von PPAR γ . Dieses könnte die mögliche zugeschriebene Verschlechterung der Insulinsensitivität erklären.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass PUFAs eine positive Wirkung auf den Metabolismus haben (CLARKE et al., 2001). Bezüglich der Wirkung der PUFA CLA gibt es viele Widersprüche. Dieses könnte auf den Einsatz des CLA-Gemisches mit unterschiedlicher Isomer-Ratio, auf die Verwendung einer unterschiedlichen Dosis und Interventionszeit sowie auf ein unterschiedliches Versuchsmodell zurückzuführen sein (CHOI et al., 1999; BROWN und MCINTOSH, 2003). Einige Studien belegen den Vorteil des CLA Einsatzes zur Therapie des Met. Syn. Hierbei ist besonders die Bekämpfung der Adipositas von Bedeutung. In einem 14-tägigen Tierversuch mit prediabetischen ZDF-Ratten wurde nach der Fütterung mit einem Gemisch aus CLA-Isomeren festgestellt, dass die Glukosetoleranz sich normalisierte und die Triglycerid- und Insulinserumspiegel abnahmen. Ähnliche Effekte konnten nach der Behandlung mit Troglitazon beobachtet werden (Vgl. HOUSEKNECHT et al., 1998 aus HOUSEKNECHT et al., 2002). In anderen Studien mit ZDF-Ratten konnte gezeigt werden, dass lediglich das CLA Isomer trans-10,cis-12, jedoch nicht das Isomer cis-9,trans-11, die Entwicklung einer Hyperglykämie verhindern konnte (Vgl. RYDER et al., 2001 aus HOUSEKNECHT et al., 2002).

Eine positive Wirkung der CLA auf die Insulinresistenz und die Dyslipidämie wurde jedoch in verschiedenen Studien widerlegt (CHOI et al., 1999 ; RISÈRIUS et al., 2002 ; WANG und JONES, 2004). In dem schwedischen Experiment von Risérius und Mitarbeitern (2004) wurde die Wirkung der CLA auf anthropometrische Daten, den Lipid- und Glukosestoffwechsel und Marker der Lipidperoxidation untersucht. Es handelte sich um eine kontrollierte, randomisierte Doppelblindstudie über 4-12 Wochen. Die Wirkung der CLA wurde an zwei Probandengruppen gemessen. Zum einen an gesunden Männern und Frauen und zum anderen an übergewichtigen Männern mit diagnostiziertem Met. Syn. Die Ergebnisse der Studie haben gezeigt, dass CLA (CLA-Gemisch und reines trans-10,cis-12) das Körperfett leicht gesenkt hat, speziell das abdominale Fett. Insgesamt betrachtet, hatte es jedoch keinen Einfluss auf den BMI. Es kam zu keiner Verbesserung des Lipid- und Glukosestoffwechsels. Das trans-10,cis-12 Isomer bewirkte sogar eine signifikante Verschlechterung der peripheren Insulinsensitivität. Weitere Studien dieses Designs bestätigten diese Aussagen, wie z.B. die Studie von Moloney et al. (2004). Es kann geschlussfolgert werden, dass eine Reduktion des Glukose- und des Fettsäureeinstroms in die Adipozyten aufgrund einer Supplementierung mit trans-10,cis-12 in vivo zu einer Hyperglykämie und somit zur Insulinresistenz führen könnte (BROWN und MCINTOSH, 2003). Sowohl in-vivo als auch in-vitro Versuche bestätigten, dass eine chronische Hyperglykämie zur Insulinresistenz führen kann (KIM et al., 2002).

CLA als diätetisches Produkt wurde in verschiedenen Tierversuchen auf seine Toxizität geprüft und evaluiert. Angeschlossen haben sich eine Reihe klinischer Studien. Pariza

berichtete in seiner Veröffentlichung von 2004 über die Effektivität und Sicherheit von CLA als diätetisches Supplement und Lebensmittelinhaltsstoff. Weiterhin beschrieb er, dass CLA in den letzten Jahren und zur Zeit einer der in klinischen Studien, Tierversuchen und Zellkulturversuchen am häufigsten eingesetzten Stoffe ist. Die Bekämpfung der Adipositas steht im Mittelpunkt bei der Entwicklung von verschiedenen diätetischen Supplementen auf der Basis der CLA. Pariza geht weiter auf die Bedeutung der Entschlüsselung der biochemischen Wirkungsweise der CLA und die gemeinsamen Faktoren für die mögliche intrazelluläre Wirkung ein. Es scheinen viele verschiedene, noch unbekannte Faktoren für die vielseitige Wirkung der CLA verantwortlich zu sein „So how does CLA do it?“ (PARIZA, 2004, S.1132S).

Die in den vorliegenden Ergebnissen aufgezeigte Wirkung der CLA auf den Glukosestoffwechsel im Adipozyten könnte ein weiterer Schritt zur Aufklärung der CLA-Wirkung über bestimmte Faktoren in der Zelle, wie PPAR γ , sein. Durch die Etablierung dieser Methode ergibt sich die Möglichkeit, neben CLA, weitere nutritive Faktoren wie bestimmte Fettsäuren auf ihre Wirkung auf den Glukosestoffwechsel über PPAR γ zu überprüfen und zu möglichen neuen Erkenntnissen zu gelangen.

Houseknecht et al. (2002) zeigten, dass durch eine gezielte, fettsäuremodifizierte Diät die Möglichkeit besteht, PPAR γ über im Plasma zirkulierende PUFAs zu aktivieren und über die Expression von bestimmten Genen die positive Wirkung u.a. auf die Insulinsensitivität zu nutzen. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Fragestellung von McGuire und McGuire (1999, S.4): „Does the Presence of CLA Make Dairy Products and Beef Functional Foods?“ Es liegen Studien vor, die nachweisen, dass die CLA zur Krebsprävention oder Krebshemmung eingesetzt werden könnte (Vgl. SCIMECA et al., 1994 aus MCGUIRE und MCGUIRE, 1999). Die Wirkung der CLA sollte auch unter dem Aspekt der Anwendung als Lebensmittel mit gesundheitlichen Zusatznutzen in verschiedenen weiteren Studien evaluiert werden. Es werden in Zukunft mehrere Studien, auch Humanstudien, nötig sein, um mehr über die spezifische Wirksamkeit der verschiedenen CLA-Isomere (WANG und JONES, 2004) sowie der TZD-Wirkstoffe auf die Adipositas und die T2DM zu erfahren. Speziell zur genaueren Klärung der PPAR γ -Wirkung auf die Zielgene sind noch weitere Versuche an humanem Fettgewebe empfehlenswert.

Nicht nur der Einsatz eines Agonisten, sondern auch der Einsatz eines PPAR γ -Antagonisten lässt vermuten, dass Insulinresistenz und Übergewicht auch über den Mechanismus der PPAR γ Regulierung reduziert werden könnten. Die Ergebnisse von Mukherjee et al. (2000) zeigen, dass der PPAR γ -Antagonist LF100641, die von PPAR γ induzierte Adipozytendifferenzierung hemmen und die Glukoseaufnahme in die 3T3-L1 Adipozyten erhöhen könnte. Die Wirkung eines PPAR γ -Antagonisten, der die Fettzellbildung verhindern könnte, wäre in diesem Zusammenhang zur Behandlung von Übergewicht ein weiterer interessanter Forschungsansatz (SPIEGELMAN und FLIER, 1996).

Es ist zu beachten, dass sich die Ergebnisse der vorliegenden Versuche nicht einfach auf den Menschen übertragen lassen. Wang und Jones (2004) beschrieben in ihrer Publikation, dass die der CLA zugeschriebenen Wirkungen meist aus Tierversuchen stammen und sich aus diesem Grund nicht problemlos auf den Menschen übertragen lassen. Die gewichtsreduzierende Wirkung der CLA-Isomere im Menschen ist im Vergleich zu den Tierversuchen zum Teil widersprüchlich und lieferten nur selten signifikante

Ergebnisse (WANG und JONES, 2004; BROWN und MCINTOSH, 2003). Hinzu kommt, dass in Tierversuchen bis zu fünf mal höhere Konzentrationen an CLA eingesetzt wurden als in Humanstudien, was auch zu einer Diskrepanz der Ergebnisse beitragen kann (BROWN und MCINTOSH, 2003).

6 Zusammenfassung

Hintergrund: Das Metabolische Syndrom (viszerale Adipositas, Dislipidämie, Hyperglykämie und Hypertonie) ist zu einer der größten Herausforderungen ernährungsbedingter Erkrankungen geworden (ALBERTI et al., 2005). Gegenwärtig sind ca. 22% der Gesamtbevölkerung betroffen. Typische Ernährungs- und Verhaltensmuster der Bevölkerung der westlichen Industriestaaten, wie Hyperalimentation und Bewegungsmangel, scheinen die Hauptfaktoren der zunehmenden Häufigkeit des Metabolischen Syndroms zu sein (SPRANGER et al., 2003).

Die Peroxisome Proliferator Activated Receptors (PPARs) bilden eine Subfamilie, die zur Superfamilie der Nuklearrezeptoren gehören. PPARs sind durch Liganden aktivierte Transkriptionsfaktoren, die über die Regulierung der Genexpression in bestimmte metabolische Prozesse eingreifen (BERGER und MOLLER, 2000). PPAR γ ist ein Isomer der PPAR Subfamilie, das insbesondere im Fettgewebe exprimiert wird (HOUSEKNECHT et al., 2002). Eine wichtige Gruppe synthetischer PPAR γ -Liganden sind die Thiazolidindione (TZDs). TZDs, wie Troglitazon, können die Insulinsensitivität von Patienten mit Typ 2 Diabetes Mellitus oder verschlechterter Glukosetoleranz verbessern (BERGER und MOLLER, 2000). Ein wichtiger natürlicher PPAR γ -Ligand ist die konjugierte Linolsäure (CLA). CLA bildet eine heterogene Gruppe von geometrischen Stellungsisomeren der Linolsäure (C18:2 n-6). Es kommt als natürlicher Nahrungsbestandteil der Lipidfraktion der Milch und in weiteren Produkten von Wiederkäuern vor (ROCHE et al., 2002).

Ziel: Im Rahmen dieser Arbeit soll der Einfluss von PPAR γ -Agonisten (CLA, Troglitazon und GW1929) bei verschiedenen Insulinkonzentrationen auf die Glukoseaufnahme im Adipozyten untersucht werden. Voraussetzung hierfür ist die Etablierung der Methode zur Messung der Glukoseaufnahme in Adipozyten unter Einfluss der PPAR γ -Liganden.

Methodik: Als Versuchsmodell wurde die 3T3-L1 Mauszelllinie ausgewählt. Die 3T3-L1 Fibroblasten wurden nach zwei tägiger Postkonfluenz unter definierten Bedingungen mit Insulin, Dexamethason und Isobutylmethylxanthin zu reifen Adipozyten differenziert. Die Zellen wurden nach 13-15 Tagen Reifung in die Versuche eingesetzt, als mehr als 90% der Zellen den adipozytenspezifischen Phenotyp aufgewiesen haben. Sie wurden vor den Versuchen für 48 h mit den verschiedenen Liganden in verschiedenen Konzentrationen (Troglitazon; GW1929; CLA-Gemisch (trans10,cis12 und cis9,trans11) und CLA-Isomer (trans10,cis12)) und direkt vor dem Versuch über 30 min mit verschiedenen Insulinkonzentrationen inkubiert. Der Transportassay wurde durch die Zugabe der 2-Deoxy-D-[3 H]-Glukose (0,1mM, 8 μ Ci) über 10 min gestartet und durch eiskaltes PBS gestoppt. Die Messung erfolgte im β -Counter. Neben den 3T3-L1 Adipozyten wurde der Transportassay mit HepG2 Zellen zum Vergleich der PPAR γ -Wirkung in unterschiedlichen Geweben eingesetzt. Zur Etablierung der Methode mussten vor dem Einsatz der zu untersuchenden PPAR γ -Liganden verschiedene Vorversuche durchgeführt werden, um so die in den Hauptversuchen einzusetzenden Insulinkonzentrationen zu bestimmen. Durch den Einsatz von Cytochalasin B konnte die unspezifische Glukoseaufnahme bestimmt werden und somit der aktive Transport der Glukose in die Zellen berechnet werden. Durch die zusätzliche Messung der Glukoseaufnahme unter Zugabe der verwendeten Liganden-Lösungsvermittler sollte ein möglicher Einfluss auf die Ergebnisse bestimmt werden.

Die Messung der Signifikanz erfolgte mittels des ungepaarten Student-t-Test [p<0.05].

Ergebnisse: Die Ergebnisse zeigen, dass die Liganden-Lösungsvermittler keinen signifikanten Einfluss auf die Messung der Glukoseaufnahme hatten. Der aktive Transport der Glukose in die Zellen betrug bei den 3T3-L1 Adipozyten 95,2% und bei den HepG2 Zellen 80,5%. Die PPAR γ -Liganden wurde jeweils unter der Zugabe von 0nM, 1nM und 50nM Insulin gemessen. Der Einfluss des Insulins hat die Glukoseaufnahme unabhängig von den zusätzlich eingesetzten Liganden in allen Messungen signifikant zum Insulin-nullwert erhöht. Die einzige Ausnahme bildete das CLA-Gemisch. Die Hauptversuche haben gezeigt, dass der Einfluss von 1000nM und 10000nM Troglitazon die basale und insulinstimulierte Glukoseaufnahme signifikant zum Troglitazonnullwert erhöht haben. Bei dem Einsatz von GW1929 konnte eine signifikante Erhöhung der Glukoseaufnahme unter Einfluss von 1nM Insulin bei allen GW1929-Konzentrationen im Vergleich zum GW1929-Nullwert bestimmt werden. Bei 100nM GW1929 konnte unter Zugabe von 50nM Insulin und bei 0nM Insulin ebenfalls eine signifikante Steigerung berechnet werden. Bei 1nM GW1929 kam es zusätzlich noch bei 50nM Insulin zu einer Signifikanz. Bei dem CLA-Isomer kam es bei 0nM Insulin bei 1 μ M und 10 μ M CLA-Isomer zu einer signifikanten Erhöhung der Glukoseaufnahme im Vergleich zum CLA-Nullwert. Bei der Zugabe von 1nM Insulin kam es ebenfalls zu einer signifikanten Steigerung unter Einfluss von 10 μ M und 100 μ M CLA-Isomer. Bei 50nM Insulin konnte bei keiner eingesetzten CLA-Konzentration eine signifikante Steigerung der Glukoseaufnahme gemessen werden. Durch den Einfluss des CLA-Gemisches konnte keine signifikante Erhöhung der Glukoseaufnahme festgestellt werden. Die HepG2 Zellen zeigten keine signifikante Erhöhung der Glukoseaufnahme durch die Zugabe von Insulin oder den verschiedenen PPAR γ -Liganden.

Diskussion: Dieser Transportassay hat sowohl den insulinstimulierten Glukosetransport via erleichterte Diffusion (Glukosetransporter GLUT4) durch die Zellmembran als auch den basalen Glukosetransport unter Einfluss der PPAR γ -Liganden bestimmt. Die Versuche haben gezeigt, dass die verschiedenen PPAR γ -Liganden unterschiedlich agieren. Der PPAR γ -Ligand GW1929 zeigte eine bessere Wirkung als Troglitazon und CLA. Es konnte bestätigt werden, dass GW1929 eine hohe spezifische Affinität für PPAR γ besitzt. GW1929 wurde eingesetzt, um zu zeigen, dass die stimulierende Wirkung auf die Glukoseaufnahme sehr wahrscheinlich über den Mechanismus der PPAR γ -Aktivierung in der Zelle erfolgt ist. Verschiedene Studien, die sich mit der Funktion von PPAR γ auf die Genexpression beschäftigt haben, konnten zeigen, dass über die Aktivierung von PPAR γ der insulinstimulierte Glukoseeinstrom u.a. durch eine erhöhte Expression von GLUT4, der Phosphatidylinositol-3 Kinase und der Insulinrezeptor-Substrate 1 und 2 erfolgt ist (BROWN and McIntosh, 2003). Die Translokation von GLUT4 könnte somit über die Aktivierung von PPAR γ durch Einsatz von GW1929 erhöht worden sein. Aus den Ergebnissen ist zu sehen, dass bestimmte Konzentrationen von Troglitazon und dem CLA-Isomer die Glukoseaufnahme sowohl unabhängig als auch abhängig vom Insulin signifikant erhöhen konnten. Daraus kann vermutet werden, dass über die Aktivierung von PPAR γ eine erhöhte Translokation von GLUT4 in der Zelle ausgelöst wurde. Im Gegensatz hierzu konnte bei Einsatz des CLA-Gemisches keine signifikante Erhöhung der Glukoseaufnahme festgestellt werden. Die Ergebnisse zeigen den unterschiedlichen Effekt des CLA-Isomers zu dem CLA-Gemisch auf den Glukosetransport und somit vermutlich eine unterschiedliche Regulation der PPAR γ Zielgene, wie z.B. GLUT4. Durch die Etablierung dieser Methode ergibt sich die Möglichkeit, neben CLA weitere nutritive Faktoren auf ihre Wirkung auf den Glukoseeinstrom zu überprüfen. Die aufgezeigte

Wirkung der CLA auf den Glukoseeinstrom im Adipozyten könnte ein weiterer Schritt zur Aufklärung der CLA-Wirkung über bestimmte Faktoren in der Zelle, wie PPAR γ , sein, wobei noch weitere Versuche zu diesem Kontext erforderlich sind. PPARs können wichtige molekulare Schlüsselfaktoren zur Entwicklung weiterer Medikamente gegen Diabetes, Adipositas und Herzerkrankungen darstellen.

Summary

Background: The Metabolic Syndrome (visceral obesity, dislipidaemia, hyperglycaemia and hypertension) has become one of the major public health-challenges worldwide (ALBERTI et al., 2005). Currently approximately 22% of the total population are affected. Typical nourishing and behavior patterns of the population of the industrialised countries, like hyperalimentation and lack of physical activity, seem to be the main factors of the increasing frequency of the Metabolic Syndrome (SPRANGER et al., 2003).

Peroxisome Proliferator Activated Receptors (PPARs) form a subfamily of the nuclear receptor superfamily. They are ligand-regulated transcription factors with an important role in the regulation of the metabolic processes by controlling gene expression (BERGER und MOLLER, 2000). PPAR γ is an isoform of the PPAR subfamily, which is predominantly expressed in adipocytes (HOUSEKNECHT et al., 2002). An important group of synthetic PPAR γ -ligands are the Thiazolidinediones (TZDs). TZDs, including Troglitazone, have insulinsensitizing and antidiabetic activity in humans with Typ 2 Diabetes Mellitus or impaired glucose tolerance (BERGER und MOLLER, 2000). An important natural PPAR γ -Ligand is the conjugated linoleic acid (CLA). CLA is a heterogeneous group of positional and geometric isomers of linoleic acid (C 18:2 n6). It is a natural food component found in the lipid fraction of milk and other dairy products (ROCHE et al., 2002).

AIM: The main question, which should be examined in the context of this work is: How do the PPAR γ -Agonists (Troglitazone, GW1929 and CLA) with and without various insulin concentrations modulate the glucose-uptake in adipocytes? Therefore the method for the measurement of glucose-uptake in adipocytes under influence of PPAR γ -ligands had to be established.

METHODS: In this study we used the well-characterized mouse 3T3-L1 preadipocyte cell line. After two days postconfluence differentiation of the 3T3-L1 fibroblasts were initiated by addition of insulin, dexamethason and isobutylmethylxanthin. The mature adipocytes were used 13 to 15 days after completion of the differentiation, when more than 90% of the cells expressed the adipocyte phenotype. Prior the experiments the cells were incubated 48 h with different ligands in different concentrations (troglitazone; GW1929; CLA-mixture (trans-10,cis-12 and cis-9,trans11) and CLA-isomer (trans-10,cis-12)) and directly 30 min prior the experiments the cells were incubated with different insulin concentrations. The transportassay was started by addition of 2-Deoxy-D-[³H]-Glucose (0,1mM, 8 μ Ci), the incubation continued for another 10 min and was stopped by ice-cold PBS. The cells were counted in the β -counter. Beside the 3T3-L1 adipocytes, the transportassay was measured in HepG2 cells in order to compare the PPAR γ -effect in different tissues. For the evaluation of the method different preliminary tests were conducted. An insulin dose/response curve were created in order to test the insulin sensitivity of the cells and to find out the best insulin concentration for the experiments with the PPAR γ -ligands. To correct for 2-deoxyglucose unspecifically associated with the cell surface or entrapped in extracellular spaces Cytochalasin B was added. So the active glucose transport was determined. The measurement of the glucose-uptake under addition of the used ligand solution mediators should exclude a possible influence on the results. Statistical significance was determined using the unpaired Student-t-test [$p < 0.05$].

RESULTS: The results demonstrated that the ligand solution mediators had no significant effect on the glucose-uptake. The active glucose transport into the 3T3-L1 adipocytes was measured by 95,2% and into the HepG2 cells by 80,5%. The cells were supplemented with the different PPAR γ -ligands and 0nM, 1nM and 50nM insulin in order to measure the total insulin-stimulated and basal glucose uptake. Increasing insulin concentrations stimulated the glucose-uptake significantly compared with cells treated without insulin. Troglitazone significantly enhanced basal and insulin-stimulated glucose-uptake at 1000nM and 10000nM Troglitazone compared with cells treated without Troglitazone. GW1929 dose dependently increased the insulin-stimulated and the basal glucose-uptake. The glucose-uptake was enhanced significantly with increasing concentration of GW1929 and 1nM insulin. 100nM GW1929 supplemented with 50nM insulin and without insulin showed a significant increased glucose-uptake compared with cells treated without GW1929. In addition 1nM GW1929 supplemented with 50nM insulin significantly increased insulin-stimulated glucose-uptake compared with the control. The insulin-stimulated (1nM insulin) glucose-uptake was enhanced significantly with 10 μ M and 100 μ M CLA-isomer compared with cells treated without CLA. In addition 1 μ M and 10 μ M CLA-isomer significantly enhanced basal glucose uptake compared with the control. No statistically significant effect with 50nM insulin was observed at CLA-isomer-treated cells. The CLA-mixture had no statistically significant effect on the glucose-uptake. In contrast, the PPAR γ -ligands and the insulin had no significant effect on glucose-uptake in HepG2 cells.

DISCUSSION: This assay measured the insulin-stimulated specific transport of glucose across the plasma membrane via facilitated diffusion (glucose carrier, GLUT4) and the basal transport under supplementation with different PPAR γ -ligands. The study demonstrated that the various PPAR γ -ligands acted in a different way. GW1929 significantly enhanced the glucose-uptake at low nanomolar concentration. Troglitazone and CLA-isomer were found to be less potent than GW1929 in glucose-uptake activity. GW1929 binds to the receptor with high affinity. GW1929 was used, in order to show that the increasing effect on the glucose-uptake was probably mediated by the mechanism of PPAR γ activation in the cell. Many of the functions assigned to PPAR γ arise from studies looking at genes that are modulated by it, such as the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 (SEWTER und VIDAL-PUIG, 2002). So activation of PPAR γ promoted insulin-stimulated glucose-uptake by increasing the expression of downstream targets including the insulin-stimulated GLUT4, the phosphatidylinositol 3-kinase or e.g. insulin receptor substrate 1 and 2 (BROWN and McIntosh, 2003). GW1929 could have altered the GLUT4-Translocation. In this study, it could be demonstrated that Troglitazone and CLA-isomer dose-dependently significantly increased basal and insulin-stimulated glucose-uptake. This potential effect on glucose-uptake in 3T3-L1 adipocytes was probably mediated via PPAR γ . So they could have altered the GLUT4-Translocation. In contrast, the CLA-mixture had no effect on the glucose-uptake. This divergent effect of the CLA-mixture on the glucose-uptake in adipocytes suggested a isomer-specific regulation of PPAR γ target genes, e.g. GLUT4. This highlighted the contrasting molecular and metabolic effect of two isomers of the same fatty acids. The evaluation of this method arose the opportunity to prove other nutritive factors beside CLA on their effect on the glucose-uptake in adipocytes. It is entirely possible that proper isomer-specific dose titrations may prove beneficial, but more research is needed to fully understand the molecular mechanism by which CLA is exerting its increasing effect on the glucose-uptake before we can be sure.

PPARs are important molecular targets for the development of antidiabetes, antiobesity, and cardiovascular drugs.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb.1.	Übersicht über die Insulinkaskade	15
Abb.2.	Mechanismus der Lipolyse und Lipogenese in der Fettzelle	20
Abb.3.	Aufbau der PPAR γ Protein Domäne	23
Abb.4.	Übersicht über den PPAR γ Wirkmechanismus als Transkriptionsfaktor in der Zelle und seine Funktion im Stoffwechsel	25
Abb.5.	Strukturformel der konjugierten Linolsäure-Isomere und der Linolsäure	25
Abb.6.	Strukturformel des Troglitazons	26
Abb.7.	Strukturformel des GW1929	26
Abb.8.	Kaskade der Transkriptionsfaktoren, die in die Adipozyten-differenzierung und die Insulinsensitivität involviert sind	28
Abb.9.	Mögliche Wirkung des aktivierten PPAR γ über die Fettzellen auf die Insulinsensitivität in Muskel- und Leberzellen	29
Abb.10.	Fließschema von der Differenzierung der 3T3-L1 Fibroblasten zu reifen 3T3-L1 Adipozyten bis zur Messung der Glukoseaufnahme	35
Abb.11.	Ungefärbte Zellsuspension der 3T3-L1 Zellen	43
Abb.12.	Mit Trypanblau gefärbte Zellsuspension der 3T3-L1 Zellen	43
Abb.13.	Mit Trypanblau gefärbte Zellsuspension der 3T3-L1 Zellen und in Ethanol absolut inkubiert	43
Abb.14.	2. Tag der Aussaat der 3T3-L1 Fibroblasten	45
Abb.15.	3. Tag der Differenzierung (3. Tag der Reifung) der 3T3-L1 Fibroblasten	45
Abb.16.	4. Tag der Differenzierung (4. Tag der Reifung) der 3T3-L1 Fibroblasten	45
Abb.17.	5. Tag der Differenzierung (5. Tag der Reifung) der 3T3-L1 Fibroblasten	45
Abb.18.	9. Tag der Reifung der 3T3-L1 Adipozyten	45
Abb.19.	14. Tag der Reifung der 3T3-L1 Adipozyten	45
Abb.20.	15. Tag der Reifung der 3T3-L1 Adipozyten	46
Abb.21.	Mit Ölrot O gefärbte Adipozyten am 15.Tag der Reifung	46
Abb.22.	Ungefärbte 3T3-L1 Adipozyten am 15.Tag der Reifung	46

Abb.23.	Glukoseaufnahme in 3T3-L1 Adipozyten mit und ohne Zugabe von 10µM Cytochalasin B	47
Abb.24.	Wirkung von 0,1% DMSO auf die Glukoseaufnahme in 3T3-L1 Adipozyten	48
Abb.25.	Wirkung von 0,5% EtOH und 3% BSA auf die Glukoseaufnahme in 3T3-L1 Adipozyten	49
Abb.26.	Glukoseaufnahme in differenzierte 3T3-L1 Adipozyten (n: 4-8) und nicht differenzierte 3T3-L1 Fibroblasten (n: 1)	51
Abb. 27.	Aufnahmesteigerung der Glukose bei verschiedenen Insulinkonzentrationen im Vergleich zum Insulinnullwert in differenzierte 3T3-L1 Adipozyten (n: 4-8) und nicht differenzierte Fibroblasten (n: 1)	52
Abb. 28.	Glukoseaufnahme bei verschiedenen Insulinkonzentrationen in Abhängigkeit vom Niveau der verschiedenen Troglitazonkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten	55
Abb.29.	Glukoseaufnahme bei verschiedenen Troglitazonkonzentrationen in Abhängigkeit vom Niveau der verschiedenen Insulinkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten	56
Abb.30.	Glukoseaufnahme bei verschiedenen Insulinkonzentrationen in Abhängigkeit vom Niveau der verschiedenen GW1929-Konzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten	60
Abb.31.	Glukoseaufnahme bei verschiedenen GW1929-Konzentrationen in Abhängigkeit vom Niveau der verschiedenen Insulinkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten	61
Abb.32.	Glukoseaufnahme bei verschiedenen Insulinkonzentrationen in Abhängigkeit vom Niveau der verschiedenen CLA-Isomer-Konzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten	65
Abb.33.	Glukoseaufnahme bei verschiedenen CLA-Isomer-Konzentrationen in Abhängigkeit vom Niveau der verschiedenen Insulinkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten	66
Abb.34.	Glukoseaufnahme bei verschiedenen Insulinkonzentrationen in Abhängigkeit vom Niveau der verschiedenen CLA-Gemisch-Konzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten	70
Abb.35.	Glukoseaufnahme bei verschiedenen CLA-Gemisch-Konzentrationen in Abhängigkeit vom Niveau der verschiedenen Insulinkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten	71
Abb.36.	Glukoseaufnahme in HepG2 Zellen mit und ohne Zugabe von 10µM Cytochalasin B	74
Abb.37.	Glukoseaufnahme in HepG2 Zellen unter der Zugabe von verschiedenen Insulinkonzentrationen	75

-
- Abb.38.** Glukoseaufnahme unter Einsatz der verschiedenen potenziellen PPAR γ - Liganden: Troglitazon, GW1929 und des CLA-Gemisches in HepG2 Zellen 76
- Abb.39.** Standardgerade nach Lowry mit BSA als Proteinstandard gemessen gegen die Wellenlänge von 660nm 78
- Abb.40.** Proteingehaltbestimmung der 3T3-L1 und HepG2 Zellen nach Lowry 79

8 Tabellenverzeichnis

Tab.1.	Elemente des Metabolischen Syndroms, Definition der IDF 2005	10
Tab.2.	Diagnostische Kriterien des Diabetes Mellitus	12
Tab.3.	Glukosetransporter-Isoformen	18
Tab.4.	Eingesetzte Insulin- und Ligandenkonzentrationen in den Versuchen zur Glukoseaufnahme	39
Tab.5.	Einstellung der Parameter am β -Counter	41
Tab.6.	Morphologische Veränderungen der 3T3-L1 Zellen während der Differenzierung zum Adipozyten (unter dem Mikroskop sichtbar)	44
Tab.7.	Glukoseaufnahme bei verschiedenen Insulinkonzentrationen in nicht differenzierte 3T3-L1 Fibroblasten	50
Tab.8.	Glukoseaufnahme bei verschiedenen Insulinkonzentrationen in differenzierte 3T3-L1 Adipozyten	50
Tab.9.	Aufnahmesteigerung der Glukose bei verschiedenen Insulinkonzentrationen im Vergleich zum Insulinnullwert in differenzierte 3T3-L1 Adipozyten (n: 4-8) und nicht differenzierten 3T3-L1 Fibroblasten (n: 1)	52
Tab.10.	Glukoseaufnahme bei verschiedenen Troglitazon- und Insulinkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten	54
Tab.11.	Signifikanz der Glukoseaufnahme bei verschiedenen Troglitazon- und Insulinkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten	56
Tab.12.	Steigung der Glukoseaufnahme unter verschiedenen Troglitazon- und Insulinkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten	57
Tab.13.	Aufnahmesteigerung der Glukose bei verschiedenen Insulinkonzentrationen im Vergleich zum Insulinnullwert nach der Inkubation mit verschiedenen Troglitazonkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten	58
Tab.14.	Aufnahmesteigerung der Glukose bei verschiedenen Troglitazonkonzentrationen im Vergleich zum Troglitazonnullwert nach der Inkubation mit verschiedenen Insulinkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten	58
Tab.15.	Glukoseaufnahme bei verschiedenen GW1929- und Insulinkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten	59
Tab.16.	Signifikanz der Glukoseaufnahme bei verschiedenen GW1929- und Insulinkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten	61
Tab.17.	Steigung der Glukoseaufnahme bei verschiedenen GW1929- und Insulinkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten	62

Tab.18.	Aufnahmesteigerung der Glukose bei verschiedenen Insulinkonzentrationen im Vergleich zum Insulinnullwert nach der Inkubation mit verschiedenen GW1929- Konzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten	62
Tab.19.	Aufnahmesteigerung der Glukose bei verschiedenen GW1929- Konzentrationen im Vergleich zum GW1929-Nullwert nach der Inkubation mit verschiedenen Insulin-konzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten	63
Tab.20.	Glukoseaufnahme bei verschiedenen CLA-Isomer- und Insulinkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten	64
Tab.21.	Signifikanz der Glukoseaufnahme bei verschiedenen CLA-Isomer- und Insulin-konzentrationen in differenzierte 3T3-L1 Adipozyten	66
Tab.22.	Steigung der Glukoseaufnahme bei verschiedenen CLA-Isomer- und Insulinkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten	67
Tab.23.	Aufnahmesteigerung der Glukose bei verschiedenen Insulinkonzentrationen im Vergleich zum Insulinnullwert nach der Inkubation mit verschiedenen CLA-Isomer-Konzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten	67
Tab.24.	Aufnahmesteigerung der Glukose bei verschiedenen CLA-Isomer-Konzentrationen im Vergleich zum CLA-Nullwert nach der Inkubation mit verschiedenen Insulinkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten	68
Tab.25.	Glukoseaufnahme bei verschiedenen CLA-Gemisch- und Insulinkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten	69
Tab.26.	Signifikanz der Glukoseaufnahme bei verschiedenen CLA-Gemisch- und Insulinkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten	71
Tab.27.	Steigung der Glukoseaufnahme unter verschiedenen CLA-Gemisch- und Insulinkonzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten	72
Tab.28.	Aufnahmesteigerung der Glukose bei verschiedenen Insulinkonzentrationen im Vergleich zum Insulinnullwert nach der Inkubation mit verschiedenen CLA-Gemisch-Konzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten	72
Tab.29.	Aufnahmesteigerung der Glukose bei verschiedenen CLA-Gemisch-Konzentrationen im Vergleich zum CLA-Nullwert nach der Inkubation mit verschiedenen Insulin-konzentrationen in 3T3-L1 Adipozyten	73
Tab.30.	Glukoseaufnahme unter Einsatz der verschiedenen PPAR γ -Liganden: Troglitazon, GW1929 und des CLA-Gemisches in HepG2 Zellen	76
Tab.31.	Standardgerade nach Lowry mit BSA als Proteinstandard	78
Tab.32.	Proteingehaltbestimmung der 3T3-L1 und HepG2 Zellen nach Lowry	79

9 Literaturverzeichnis

9.1 Literaturquellen

Ahima R.S. und Flier J.S.: The endocrine Adipozyte, in: Principles and practice of Endocrinology and Metabolismus. (Hrsg.: Becker KL) 2001, 3. Auflage, Williams & Wilkins, Philadelphia; Kapitel 186: 1686-1690

Alberti K.G. und Zimmet P.Z.: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation, in: Diabet. Med. (1998) 15 (7):539-553

Alberti K.G., Zimmet P.Z. und Shaw J.: The metabolic syndrome-a new worldwide definition, in Lancet (2005) 366: 1059-1061

Bastie C. et al.: Alterations of Peroxisome Proliferator-activated Receptor δ Activity Affect Fatty Acid-controlled Adipose Differentiation, in: The Journal of biological Chemistry (2000) 275 (49): 38768-38773

Berger J. et al.: Novel Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) γ and PPAR δ Ligands Produce Distinct Biological Effects, in: The Journal of Biological Chemistry (1999) 274 (10): 6718-6725

Berger J. und Moller D.E.: The Mechanisms of Action of PPARs, in: Annu. Rev. Med. (2002) 53: 409-435

Bergmann K.E. und Mensink G.B.M.: Körpermaße und Übergewicht, in: Gesundheitswesen (1999) 61, Sonderheft 2: S115-S120

Brown J.M. und McIntosh M.K.: Conjugated Linoleic Acid in Humans: Regulation of Adiposity and Insulin Sensitivity, in: American Society for Nutritional Sciences (2003): 3041-3046

Brown J.M. et al. : Isomer-specific regulation of metabolism and PPAR γ signaling by CLA in human preadipocytes, in : Journal of lipid research (2003) 44 : 1287-1300

Choi Y. et al.: The trans-10,cis-12 Isomer of Conjugated Linoleic Acid Downregulates Stearoyl-CoA Desaturase 1 Gene Expression in 3T3-L1 Adipocytes, in: American Society for Nutritional Sciences (2000): 1920-1924

Chung S. et al.: Conjugated Linoleic Acid Promotes Human Adipocyte Insulin Resistance Through NF κ B-Dependent Cytokine Production, in: JBC Paper in Press. Published on September 9, 2005 as Manuscript M508159200

Clancy B.M. and Czech M.P.: Hexose Transport Stimulation and Membrane Redistribution of Glucose Transporter Isoforms in Response to Cholera Toxin, Dibutyryl Cyclic AMP, and Insulin in 3T3-L1 Adipocytes, in: The Journal of Biological Chemistry (1990) 265 (21): 12434-12443

Clarke S.D.: Polyunsaturated Fatty Acid Regulation of Gene Transcription: A Molecular Mechanism to Improve the Metabolic Syndrom, in: American Society for Nutritional Sciences (2001): 1129-1132

Cushman S.W. und Wardzala L.J.: Potential Mechanism of Insulin Action on Glukose Transport in the Isolated Rat Adipose Cells, in: The Journal of Biological (1980) 255 (10): 4758-4762

Czech M.P. und Corvera S.: Signaling Mechanisms That Regulate Glucose Transport, in: The Journal of Biological Chemistry (1999) 274 (4): 1865-1868

- DACH, DGE, ÖGE:** Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr 2001, 1. Auflage, Umschau-Braus-Verlag, Frankfurt am Main
- Desvergne B. und Wahli W.:** Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism, in: *Endocrine Reviews* (1999) 20 (5): 649-688
- Domagk G.F.:** Biochemie für die mündliche Prüfung 1999, 3. Auflage, Springer Verlag
- Duplus E. and Forest C.:** Is there a single mechanism for fatty acid regulation of gene transcription?, in: *Biochemical Pharmacology* (2002) 64:893-901
- Evans M. et al.:** Trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid reduces triglyceride content while differentially affecting peroxisome proliferator activated receptor gamma2 and aP2 expression in 3T3-L1 preadipocytes, in: *Lipids*. (2001): 1223-1232
- Frayn K.N.:** Adipose Tissue and the insulin resistance syndrome, in: *Proceedings of the Nutrition Society* (2001) 60: 375-380
- Frost S.C. und Lane M.D.:** Evidence for the Involvement of VicinalSulphydryl Groups in Insulin-activated Hexose Transport by 3T3-L1 Adipocytes, in: *The Journal of Biological Chemistry* (1985) 260 (5): 2646-2652
- Fukumoto H. et al.:** Cloning and Characterization of the Major Insulin-responsive Glukose Transporter Expressed in Human Skeletal Muscle and Other Insulin-responsiveTissues, in: *The Journal of Biological* (1989) 264 (14): 7776-7779
- Ganda Om P.:** Lipoatrophy, Lipodystrophy, and Insulin Resistance, in: *Annals of Internal Medicin* (2000) 133 (4): 304-306.
- Gould G.W. et al.:** Insulin-stimulated Translokation of the HepG2/Erythrocyte-type Glukose Transporter Expressed in 3T3-L1 Adipocytes, in: *The Journal of Biological Chemistry* (1989) 264 (4): 2180-2184
- Granlund L., Pedersen J.I. und Nebb H.I.:** Impaired lipid accumulation by trans10, cis 12 CLA during adipocyte differentiation is dependend on timing and length of treatment, in: *Biochem. Biophys. Acta*. (2005) 1687 (1-3): 11-22
- Gruenewald D.A. und Matsumoto A.M.:** Endocrinology and Aging, in: *Principles and practice of Endocrinology and Metabolismus*. (Hrsg.: Becker KL) 2001, 3. Auflage, Williams & Wilkins, Philadelphia; Kapitel 199: 1823-1824
- Guan H.-P. et al.:** A futile metabolic cycle activated in adiocytes by antidiabetic agents, in: *Nature Medicin* (2002) 8 (10): 1122-1128
- Harrison S.A. et al.:** Insulin Regulation of Hexose Transport in Mouse 3T3-L1 Cells Expressing the Human HepG2 Glukose Transporter, in: *The Journal of Biological Chemistry* (1990) 265 (33): 20106-20116
- Heller-Harrison R.A. et al. :** Insulin mediated targeting of phosphatidylinositol 3-kinase to GLUT4-containing vesicles, in *J. Biol. Chem.* (1996) 271: 10200-10204
- Hers I. und Tavaré J.M.:** Mechanism of feedback regulation of insulin receptor substrate-1 phosphorylation in primary adipocytes, in: *Biochem. Journal* (2005) 388: 713-720
- Hirsch J., Salans L.B. und Aronne L.J.:** Obesity, in: *Principles and practice of Endocrinology and Metabolismus*. (Hrsg.: Becker KL.) 2001, 3. Auflage, Williams & Wilkins, Philadelphia; Kapitel 126: 1239-1247.
- Holman G.D. and Kasuga M.:** From receptor to transporter: insulin signaling to glucose transport, in: *Diabetologia* (1997) 40: 991- 1003
- Holman G.D., Leggio L.L. und Cushman S.W.:** Insulin-stimulated GLUT4 Glukose Transporter Recycling, in: *The Journal of Biological Chemistry* (1994) 269 (26): 17516-17524

- Hotamisligil G.S. et al.:** IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance, in: *Science* (1996) 271: 665-668
- Houseknecht K.L. et al.:** Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty FA/FA rat, in: *Biochem Biophys Res Commun* (1998) 244: 678-682
- Houseknecht K.L., Cole B.M. und Steele P.M.:** Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) and its ligands: A review, in: *Domestic Animal Endocrinology* (2002) 22: 1-23
- Hwang J.H. et al.:** Regional differences in intramyocellular lipids in humans observed by in vivo ¹H-MR spectroscopic imaging, in: *J. Appl. Physiol.* (2001) 90: 1267-1274
- Issemann I. und Green S.:** Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferations, in: *Nature* (1990) 347: 645-650
- Jung C.Y. und Rampal A.L.:** Cytochalasin B Binding Sites and Glucose Transport Carrier in Human Erythrocyte Ghosts, in: *The Journal of Biological Chemistry* (1977) 252 (15): 5456-5463
- Kahn B.B. und Flier J.S.:** Obesity and insulin resistance, in: *The Journal of Clinical Investigation* (2000) 106 (4): 473-481
- Kang K. et al.:** Trans-10,cis-12 CLA inhibits differentiation of 3T3-L1 adipocytes and decreases PPAR gamma expression, in: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2003) 303 (3): 795-799
- Karlson P., Doenecke D. und Koolman J.:** Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, 1994, 14. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart
- Kasper H.,** Ernährungsmedizin und Diätetik 2000, 9. Auflage, Urban-Fischer-Verlag
- Kerner W. Brückel J. und Böhm B.O.:** Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus, in: *Evidenzbasierte Diabetes-Leitlinien DDG* (Hrsg.: Scherbaum WA, Kiess W); Aktualisierung der 1. Auflage vom Juli 2001 der Deutsche Diabetes-Gesellschaft 2001. Aktualisierte Leitlinie ist bis 2006 gültig.
- Kim Y.B. et al.:** Troglitazon but not Metformin Restores Insulin-Stimulated Muscle of Type 2 Diabetes Subjects, in: *Diabetes* (2002) 51: 443-448
- Kimmel B. und Inzucchi S.E.:** Oral Agents for Type 2 Diabetes: An Update, in: *Clinical Diabetes* (2005) 23 (2): 64-75
- Kletzien R.F., Clarke S.D. und Ulrich R.G.:** Enhancement of Adipocyte Differentiation by an Insulin-Sensitizing Agent, in: *Molecular Pharmacology* (1991) 41: 393-398
- Knouff C. und Auwerx J.:** Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Calls for Activation in Moderation: Lessons from Genetics and Pharmacology, in: *The Endocrine Society* (2004) 25 (6):899-918
- Kohn A.D. et al.:** Expression of a Constitutively Active Akt Ser/Thr Kinase in 3T3-L1 Adipocytes Stimulates Glucose Uptake and Glucose Transporter 4 Translokation, in: *The Journal of Biological Chemistry* (1996) 271 (49): 31372-31378
- Koolman J. und Röhm K.-H.,** Taschenatlas der Biochemie 2003, Thieme Verlag Stuttgart
- Lee K.N., Storkson J.M. and Pariza M.W.:** Dietary conjugated linoleic acid changes fatty acid composition in different tissues by decreasing monounsaturated fatty acids, in: *IFT Annual Meeting: Book of Abstracts* (1995): S. 183
- Lehmann J.M. et al.:** An Antidiabetic Thiazolidindione Is a High Affinity Ligand for Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ), in: *The Journal of Biological Chemistry* (1995) 270 (22): 12953-12956

- Lillie R.D. und Fullmer H.M.:** Histopathologic Technic and Practical Histochemistry, New York: McGraw-Hill (1976): 559-610
- Lin S. und Spudich J.A.:** Biochemical Studies on the Mode of Action of Cytochalasin B, in: The Journal of Biological Chemistry (1974) 249 (18): 5778-5783
- Lindl T.:** Zell-und Gewebekultur, 2002, 4. Auflage, Spektrum Gustav Fischer Verlag
- Löffler G.,** Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie, 1999, 3. Auflage, Springer Verlag Berlin, Heidelberg
- Lowry O.H. et al.:** Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent, in: J.Biol.Chem (1955) 193: 265-275
- Meigs J.B.:** Metabolic Syndrom. In search of a clinical role, in: Diabetes Care (2004) 27 (11): 2761-2763
- Mital A., Vats R.K. and Ramachandran U.:** PPARs: Nuclear Receptors for Antidiabetics, in: CRIPS (2002) 3 (1): 5-8
- Miyazaki Y. et al.:** Rosiglitazone Improves Downstream insulin Receptor Signaling in Type 2 Diabetic Patients in: Diabetes (2003) 52: 1943-1950
- Moloney F. et al.:** Conjugated linoleic acid supplementation, insulin sensitivity, and lipoprotein metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus, in: Am. J. Clin. Nutr. (2004) 80 (4): 887-895
- Mukherjee R. et al.:** A Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ (PPAR γ) Modulator Blocks Adipocyte Differentiation but Stimulates Glucose Uptake in 3T3-L1 Adipocytes, in: Molecular Endocrinology (2000) 14 (9): 1425-1433
- Nugent C. et al.:** Potentiation of Glucose Uptake in 3T3-L 1 Adipocytes by PPAR γ Agonists Is Maintained in Cells Expressing a PPAR γ Dominant-Negative Mutant: Evidence for Selectivity in the Downstream Responses to PPAR γ Activation, in: Molecular Endocrinology (2001) 15 (10): 1729-1738
- Oberfield J.L. et al.:** A peroxisome proliferator activated receptor γ ligand inhibits adipocyte differentiation, in: Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999) 96: 6102- 6106
- Oka Y. et al.:** Studies with Antipeptide Antibody Suggest the Presence of at Least Two Types of Glucose Transporter in Rat Brain and Adipocyte, in: The Journal of Biological Chemistry (1988) 263 (26): 13432-13439
- O'Rahilly S.:** Science, medicine and the future. Non-insulin dependent diabetes mellitus: the gathering storm, in B.M.J. (1997) 314: 955-959
- Pariza M.W.:** Perspective on the safety and effectiveness of conjugated linoleic acid, in: Am. J. Clin. Nutr. (2004) 79: 1132S- 1136S
- Park K.S. et al.:** Troglitazon effects on gene expression in human skeletal muscle of type II diabetes involve up-regulation of peroxisome proliferator- activated receptor- γ , in: J. Clin. Endocrinol. Metab. (1998) 83: 2830-2835
- Parker J.C.:** Troglitazon: the discovery and development of a novel therapy for the treatment of type 2 diabetes mellitus, in: Adv. Drug Deliv. Rev. (2002) 54 (9):1173-1197
- Pessin J.E. and Saltiel A.R.:** Signaling pathways in insulin actions: molecular targets of insulin resistance, in: The Journal of Clinical Investigation (2000) 106 (2): 165-169
- Pessin J.E. et al.:** Molecular Basis of Insulin-stimulated GLUT4 Vesicle Trafficking, in: The Journal of Biological Chemistry (1999) 274 (5): 2593-2596
- Peterson G.P., Matitashvili E.A. und Bauman D.E.:** The Inhibitory Effect of trans-10, cis-12 CLA on Lipid Synthesis in Bovine Mammary Epithelial Cells Involves Reduced

Proteolytic Activation of the Transcription Factor SREBP-1, in: American Society of Nutrition (2004): 2523-2527

Pingoud A. und Urbanke C.: Arbeitsmethode der Biochemie. 1997; Walter de Gruyter & Co Verlag, Berlin

Ramirez-Zacarias J.L., Castro-Muñozledo F., Kuri-Harcuch W.: Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O, in: Histochemistry (1992); 97: 493-497

Randle P.J. et al.: The glucose-fatty acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus, in: Lancet (1963)i: 785-789

Reaven G.M.: Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease, in: Diabetes (1988) 37 (12): 1595-1607.

Risérus U. et al.: Treatment With Dietary trans20cis12 Conjugated Linoleic Acid Causes Isomer-Specific Insulin Resistance in Obese Men With the Metabolic Syndrom, in: Diabetes Care (2002) 25 (9): 1516-1521

Risérus U. et al.: Metabolic effects of conjugated linoleic acid in humans: the Swedish experience, in: Am J. Clin. Nutr. (2004) 79: 1146S- 1148S

Roche H.M. et al.: Isomere-Dependent Metabolic Effects of Conjugated Linoleic Acid, in: Diabetes (2002) 51: 2037-2044

Ross S.A. et al.: Characterization of the Insulin-regulated Membrane Aminopeptidase in 3T3-L1 Adipocytes, in: The Journal of Biological Chemistry (1996) 271 (6): 3328-2232

Rubin C.S. et al.: Development of Hormone Receptors and Hormonal Responsiveness in Vitro, in: The Journal of Biological Chemistry (1978) 253 (20): 7570-7578

Russell T.R. und Ho R.J.: Conversion of 3T3 fibroblasts into adipose cells: Triggering of differentiation by prostaglandin F₂α and 1-methyl-3-isobutylxanthine, in: Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1976) 73 (12): 4516-4520

Ryder J.W. et al.: Isomer-specific anti-diabetic properties of conjugated linoleic acid: improved glucose tolerance, skeletal muscle insulin action, and UCP2 gene expression, in: Diabetes (2001) 50: 1149-1157

Saltiel A.R. und Kahn C.R.: Insulin signaling and the regulation of the glucose and lipid metabolism, in: Nature (2001) 414: 799-806

Scientific Committee for Foods (SCF), Commission of the European Communities: Nutrient and Energy Intakes for the European Community, Office for the Official Publications of the European Communities. 1993 Luxemburg

Scimeca J.A., Thompson H.J. und Ip C.: Effect of conjugated linoleic acid on carcinogenesis, in: Diet and Breast Cancer (1994): 59-65. Plenum Press, New York

Sewter C. und Vidal-Puig A.: PPARγ and the Thiazolidindiones: molecular basis for a treatment of 'Syndrom X', in: Diabetes, Obesity and Metabolism (2002) 4: 239-284

Shao D. und Lazar M.A.: Peroxisome Proliferator Activated Receptorγ, CCAAT/Enhancer-binding Protein α, and Cell Cycle Status Regulate the Commitment to Adipocyte Differentiation, in: The Journal of Biological Chemistry (1997) 272 (34): 21473-21478

Shepherd P.R. et al.: Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue, in: Journal of Biological Chemistry (1993); 268: 22243-22246

Shulman G.I.: Cellular mechanisms of insulin resistance, in: The Journal of Clinical Investigation (2000) 106 (2): 171-176

- Silbernagl S. und Despopoulos A.**, Taschenatlas der Physiologie 2001, 5. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart
- Smith U. et al.**: Thiazolindinediones (PPAR γ agonists) but not PPAR α agonists increase IRS-2 gene expression in 3T3-L1 and human adipocytes, in: *FASEB J* (2001) 15: 215-220
- Spiegelman B.M.**: PPAR- γ : Adipogenic Regulator and Thiazolidindione Receptor, in: *Diabetes* (1998) 47: 507-514
- Spiegelman B.M. und Flier J.S.**: Adipogenesis and Obesity: Rounding Out the Big Picture, in: *Cell* (1996) 87: 377-389
- Spranger J., Möhlig M. und Pfeiffer A.F.H.**: Das metabolische Syndrom: Bedeutung von Zytokinen als endokrine und metabolische Signalelemente, in: *Aktuelle Ernährungsmedizin* (2003) 28: 143-150; Georg Thieme Verlag, New York, ISSN 1434-0275
- Stumvoll M. et al.**: Adipositas und Insulinresistenz. Neues über die Mechanismen, in: *Diabetes* (2002) 135 (5): 135-139
- Suzuki K. und Kono T.**: Evidence that insulin causes Translokation of glucose transport activity to the plasma membran from an intracellular storage site, in: *Proc Natl Acad Sci USA* (1980) 77:2542-2545
- Tafari S.R.**: Troglitazon Enhances Differentiation, Basal Glucose uptake, and Glut1 Protein Levels in 3T3-L1 Adipocytes, in: *Endocrinology* (1996) 137 (11): 4706-4712
- Tamori Y. et al.**: Role of Peroxisome Proliferation-Activated Receptor- γ in Maintenance of the Characteristics of Mature 3T3-L1 Adipocytes, in: *Diabetes* (2002) 51: 2045-2055
- Tuomlietho J. et al.**: Prevention of Type 2 diabetes by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance, in: *N. Engl. J. Med.* (2001) 344: 1343-1350
- Vogel H.G.**, Drug Discovery and Evaluation Pharmacological Assays, Second Edition, Springer 2002; Kapitel 3: S. 969-972
- Wang Y. und Jones J.H.**: Dietary conjugated linoleic acid and body composition, in: *Am.J. Clin.Nutr.* (2004) 79: 1153S- 1158S
- Weiland M. et al.**: Development of the hormone-sensitive Glucose transport activity in differentiating 3T3-L1 murine fibroblast, in: *Biochem. J.* (1990) 270: 331-336
- Wu Z. et al.**: PPAR γ Induces the Insulin-dependent Glucosetransporter GLUT4 in the Absence of C/EBP α During the Conversion of 3T3-L1 Fibroblast into Adipocytes, in: *J.Clin.Invest.* (1998) 101 (1): 22-32
- Wu Z. et al.**: Cross-Regulation of C/EBP α and PPAR γ Controls the Transcriptional Pathway of Adipogenesis and Insulin Sensitivity, in: *Molecular Cell* (1999) 3: 151-158
- Yeh W.C. et al.**: Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins, in: *Genes Dev.* (1995) 9: 168- 181
- Young P.W. et al.**: Identification of High-Affinity Binding Sites for the Insulin Sensitizer Rosiglitazone (BR-49653) in Rodent and Human Adipocytes Using a Radioiodinated Ligand for Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor γ , in: *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (1998) 284 (2): 751-759
- Xu H.E. et al.**: Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator- activated receptors, in: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2001) 98 (24): 13919-13924

Zuber M.X. et al.: Elevation of the Number of Cell-surface Insulin Receptors and the Rate of 2-Deoxy-Glucose Uptake by Exposure of 3T3-L1 Adipocytes to Tolbutamide, in: The Journal of Biological Chemistry (1985) 260 (26): 14045-14052

9.2 Internetquellen

CL-173 Produktinformationsbroschüre von der American Type Culture Collection, www.atcc.org, Zugriff am 25.02.05

Fenske D. und Husmann M.: PPAR-Rezeptoren vermitteln vielfältige Effekte, in: Pharmazeutische-Zeitung (2003) über <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/pza/2003-23/titel.htm>, Zugriff am 22.11.2004

G5668 Produktinformationsbroschüre von Sigma-Aldrich, www.sigma-aldrich.com, Zugriff am 20.08.2005

HB-8065 Produktinformationsbroschüre von der American Type Culture Collection, www.atcc.org, Zugriff am 01.06.05

Hoefner D.M.: The ruthless malady: metabolic syndrom, aus: www.mlo-online.com, Oktober 2003

International Diabetes Federation (IDF): Press Release: A new worldwide definition of the metabolic syndrom. Consensus from the International Diabetes Federation could help stop the cardiovascular diseases time bomb, 15.4.2005, Berlin. www.idf.org/home/index.cfm?node=1401, Zugriff am 21.08.2005

International Diabetes Federation (IDF): The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. www.idf.org/home → New IDF worldwide definition of the metabolic syndrome → Download: IDF worldwide definition of the metabolic syndrome (pdf, 131KB)

McGuire M.A. und McGuire M.K.: Conjugated linoleic acid (CLA): a ruminant fatty acid with beneficial effects on human health, in: Proceedings of the American Society of Animal Science (1999), www.asas.org/jas/symposia/proceedings/0938.pdf, Zugriff am 20.10.05

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Hamburg, den 01.02.20076

Nina Müller