

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin IV
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.-U. Häring

Der Einfluss gesättigter und ungesättigter Fettsäuren auf
die mRNA-Expression von Suszeptibilitäts-Genen für
Diabetes mellitus Typ II in vaskulären Zellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Philipp Ludwig Lutz
aus
Stuttgart

2008

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. E. Schleicher

2. Berichterstatter:

Privatdozentin Dr. D. Siegel-Axel

Diese Arbeit sei Dr. med. Karl Schaal und Ludwig Lutz gewidmet

1	Einleitung	4
1.1	Das metabolische Syndrom	4
1.2	Pathophysiologie des Diabetes mellitus Typ II	5
1.3	Zielsetzung dieser Arbeit	5
1.3.1	PPAR γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma)	7
1.3.2	PGC-1 α (PPAR γ Coactivator 1 α)	8
1.3.3	Fetuin (α -Fetoprotein)	9
1.3.4	Interleukin-6 (IL-6)	9
1.3.5	eNOS (Endothelial Nitric Oxide Synthase)	10
1.3.6	Stearoyl-CoA-Desaturase (SCD)	11
1.3.7	Experimentelles Vorgehen	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Geräte und (Bio-)Chemikalien	13
2.1.1	Geräte	13
2.1.2	Chemikalien	15
2.2	Methoden	17
2.2.1	Überblick über die Abfolge der experimentellen Schritte	17
2.2.2	Aufnahme der Zellen in Kultur	17
2.2.3	Medienwechsel und Passagieren der Zellen	18
2.2.4	Herstellen der Inkubationsmedien	18
2.2.5	Inkubation der Zellen	20
2.2.6	Ernten der Zellen	20
2.2.7	RNA-Isolierung	21
2.2.8	Bestimmung der RNA-Konzentration am Photometer	22
2.2.9	Umschreiben von RNA in cDNA	22
2.2.10	Funktionsweise der LightCycler-PCR (LC-PCR)	24
2.2.11	Erstellen von Standardkurven für die Quantifizierung am LightCycler	25
2.2.12	Durchführen der quantitativen PCR's am Lightcycler	26
2.2.13	Pipettierschemata und Cyclebedingungen der einzelnen PCR's	27

2.2.14	Aufreinigung der PCR-Produkte	30
2.2.15	Überprüfen der Länge der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese	30
2.2.16	Funktionsweise des Sequenzierautomaten ABI PRISM™ 310	31
2.2.17	Sequenzierung der PCR-Produkte	31
2.2.18	Abgleich der Sequenzen	33
2.2.19	Auswertung der Daten	33
3	Ergebnisse	35
3.1	Einfluss von freien Fettsäuren und Glukose auf die mRNA-Expression von PPAR γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma) in CAEC, CASMC und HepG2-Zellen	35
3.1.1	CAEC	35
3.1.2	CASMC	37
3.1.3	HepG2	38
3.2	Einfluss von freien Fettsäuren und Glukose auf die mRNA-Expression von PGC-1 α (PPAR γ Coactivator 1 α) in CASMC und HepG2-Zellen	40
3.2.1	CASMC	40
3.2.2	HepG2	41
3.3	Einfluss von freien Fettsäuren und Glukose auf die mRNA-Expression von Fetuin (α -Fetoprotein) in HepG2-Zellen	43
3.3.1	HepG2	43
3.4	Einfluss von freien Fettsäuren und Glukose auf die mRNA-Expression von Interleukin-6 (IL-6) in CAEC und CASMC	45
3.4.1	CAEC	45
3.4.2	CASMC	47
3.5	Einfluss von freien Fettsäuren und Glukose auf die mRNA-Expression von eNOS (Endothelial Nitric Oxide Synthase) in CAEC	49
3.5.1	CAEC	49
3.6	Einfluss von freien Fettsäuren und Glukose auf die mRNA-	

	Expression von Stearoyl-CoA-Desaturase (SCD) in CAEC, CASMC und HepG2-Zellen	51
3.6.1	CAEC	51
3.6.2	CASMC	53
3.6.3	HepG2	56
3.7	Übersicht über den Einfluss freier Fettsäuren auf die mRNA-Expression von PGC-1 α , IL-6, eNOS und SCD in CAEC, CASMC und HepG2-Zellen	58
4	Diskussion	60
4.1	Einfluss von freien Fettsäuren und Glukose auf die mRNA-Expression von PPAR γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma) in den untersuchten Zellen	60
4.2	Einfluss von freien Fettsäuren und Glukose auf die mRNA-Expression von PGC-1 α (PPAR γ Coactivator 1 α) in den untersuchten Zellen	60
4.3	Einfluss von freien Fettsäuren und Glukose auf die mRNA-Expression von Fetuin (α -Fetoprotein) in HepG2-Zellen	61
4.4	Einfluss von freien Fettsäuren und Glukose auf die mRNA-Expression von Interleukin-6 (IL-6) in den untersuchten Zellen	62
4.5	Einfluss von freien Fettsäuren und Glukose auf die mRNA-Expression von eNOS (Endothelial Nitric Oxide Synthase) in den untersuchten Zellen	64
4.6	Einfluss von freien Fettsäuren und Glukose auf die mRNA-Expression von Stearoyl-CoA-Desaturase (SCD) in den untersuchten Zellen	65
5	Zusammenfassung	67
6	Literaturverzeichnis	68

1 Einleitung

1.1 Das metabolische Syndrom

Da Diabetes mellitus Typ II, Übergewicht, Dyslipidämie und arterieller Hypertonus gehäuft gemeinsam auftreten und unter anderem bedeutende Risikofaktoren für die Entstehung einer koronaren Herzerkrankung sind, wurde für das Zusammentreffen dieser Befunde der Begriff des metabolischen Syndroms geprägt (1). Allerdings existieren verschiedene Definitionen dieses Begriffes (1), auch ist er nicht unumstritten (2). Angesichts der hohen Prävalenzen von Diabetes mellitus und Übergewicht in den Industrieländern, aber vor allem angesichts der stetigen Steigerung dieser Prävalenzen (3,4) besteht ein großes Interesse daran, die entsprechende Pathophysiologie besser zu verstehen. Man hofft, dadurch sinnvolle Präventionsstrategien entwickeln zu können, um bedeutende Komplikationen wie koronare Herzerkrankung (1), Herzinsuffizienz (4), Niereninsuffizienz, diabetische Neuropathie (5) und Erblindung durch diabetische Retinopathie (6) verhindern zu können. Bisher konnte gezeigt werden, dass entsprechende Ernährung und sportliche Bewegung die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ II hinauszögern oder sogar verhindern können (7,8). Eine medikamentöse Prävention mit Metformin scheint nach diesen Studien auch möglich, ist aber weniger erfolgreich.

Bemerkenswert ist, dass Prävention durch Führung eines bestimmten Lebensstiles auf großes öffentliches Interesse trifft. Auch das Bundesministerium für Gesundheit hat Prävention in das Zentrum seiner Bemühungen gestellt. Körperliche Fitness und „gesunde“ Ernährung sind Themen, die in vielen Zeitschriften angesprochen werden. Das Schlagwort „lifestyle“ findet sich nicht nur in den Titeln großer Studien (7,8), sondern hat als Anglizismus in gängigen deutschsprachigen Medien auch im Zusammenhang mit medizinischen Themen Verbreitung gefunden. Damit besteht die Chance, dass neue medizinische Erkenntnisse auf diesem Gebiet tatsächlich zu einer Verhaltensänderung in der Bevölkerung und damit zu effektiver Prävention führen. Da andererseits bekannt ist, dass medizinisches Wissen oft genug nicht zu einem

entsprechenden Verhalten führt, ist es umso wichtiger, Prävention möglichst zielgerichtet zu gestalten.

1.2 Pathophysiologie des Diabetes mellitus Typ II

Die Entstehung des Diabetes mellitus Typ II ist noch nicht geklärt. Jedenfalls handelt es sich dabei um eine Insulin-Resistenz in Leber und Muskel und eine gestörte Insulin-Sekretion (9). Die Genese ist multifaktoriell, d. h. dass sowohl genetische Faktoren als auch das Verhalten bzw. die Umwelt Einfluss auf die Entwicklung des Diabetes mellitus Typ II haben. Auf genetischer Seite sind Polymorphismen gefunden worden, die mit einem erhöhten Risiko für die Krankheitsentwicklung einhergehen (10). Andererseits scheinen freie Fettsäuren im Blut eine Insulin-Resistenz zu begünstigen (1, 9). Gesättigte Fettsäuren hemmen die Funktion der β -Zellen des Pankreas (11). Außerdem sezerniert Fettgewebe eine Reihe von Zytokinen, wie Interleukin-6, die für eine Insulin-Resistenz mitverantwortlich zu sein scheinen (9). Großes Interesse gilt dabei auch der Insulin-Signalkaskade, um auf dieser Ebene Erklärungen für die Entstehung einer Insulin-Resistenz zu finden (vgl. u. a. 12). Da arterieller Hypertonus und Dyslipidämie nicht nur mit Diabetes mellitus Typ II assoziiert sind, sondern auch wichtige Risikofaktoren für Gefäßerkrankungen durch Arteriosklerose darstellen, wird vermutet, dass ein Zusammenhang zwischen endothelialer Dysfunktion und Insulinresistenz besteht (13). Insgesamt scheint es sich also um eine komplexe Fehlsteuerung von Zucker-, Fettstoffwechsel und Bluthochdruck zu handeln, die mehrere Organe bzw. Gewebe in den Krankheitsprozess einbezieht.

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren und verschiedener Glukose-Konzentrationen auf die Expression von Genen zu beobachten, die mit der Entstehung des metabolischen Syndroms in Zusammenhang gebracht werden. Ein besonderes Interesse galt

hierbei der Kombination von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren. Häufig finden sich Berichte über den Effekt einzelner gesättigter oder ungesättigter Fettsäuren, viel seltener wird über die Wirkung von Kombinationen berichtet. Aus der Wirkung der einzelnen Fettsäuren ist aber ein Rückschluss auf das Zusammenwirken mehrerer Fettsäuren nur begrenzt möglich. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass Palmitat in hoher Konzentration Apoptose verursacht, unter Zusatz von Oleat hingegen die Apoptose umgangen wird, indem Palmitat in Triglyceride überführt wird (14). In vivo treffen wir meistens auf ein komplexes Muster verschiedener Fettsäuren. Somit ist eine wichtige Fragestellung dieser Arbeit, ob Zusammenhänge zwischen den Wirkungen einzelner Fettsäuren und der Wirkung einer Fettsäurekombination bestehen.

Der Einfluss hoher Glukose-Konzentrationen ist deswegen interessant, weil zum einen schon vor Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ II zeitweilig eine Hyperglykämie besteht, die natürlich bei dem Vollbild der Insulin-Resistenz noch ausgeprägter ist (7, 8). Zum anderen wird eine stark erhöhte Glukose-Konzentration für die Entwicklung diabetischer Folgeschäden verantwortlich gemacht (5). Durch die Verwendung verschiedener Glukose-Konzentrationen besteht die Möglichkeit, eine Dosis-Abhängigkeit von Effekten festzustellen.

Als Fettsäuren wurden Palmitat, Linoleat und deren Kombination verwendet. Palmitat weist im Vergleich mit den anderen Fettsäuren die höchste Konzentration im Blut auf (15), viele Wirkungen sind schon beschrieben worden (11, 14, 15), meist im Sinne eines negativen Einflusses. Ernährung, die reich an gesättigten Fettsäuren ist, erhöht das Risiko, eine koronare Herzkrankung zu erleiden (16). Linoleat hingegen ist ein Hauptvertreter der mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Linoleat werden anti-arteriosklerotische Wirkungen zugeschrieben, vor allem soll es protektiv gegen eine koronare Herzerkrankung sein (16).

Bei den Komplikationen des Diabetes mellitus Typ II stehen mikro- und makrovaskuläre Komplikationen im Vordergrund (17). Daher schien es interessant, mit CAEC (coronary artery endothelial cells) und CAMSC (coronary artery smooth muscle cells) Gefäßzellen zu untersuchen. Diese Zellen werden von Probanden gewonnen, so dass unterschiedliche Chargen durchaus ein

unterschiedliches Verhalten zeigen können. Um einen Vergleich mit Zellen aus einem typischen Stoffwechselorgan zu ermöglichen, wurden HepG2 (human hepatoma cells) Zellen verwendet. Allerdings muss bei diesen Zellen berücksichtigt werden, dass es sich um neoplastisch veränderte Leberzellen handelt.

Als Methode bot sich die Quantifizierung der RNA-Expression an, da sie mit der LightCycler-PCR einfach durchführbar ist. Außerdem stellt die Umschreibung von DNA in RNA bei der Proteinproduktion den ersten Schritt dar. Wirkungen von Fettsäuren oder Glukose, die über die DNA-Transkription erfolgen, müssen also hier zuerst sichtbar werden.

Im Folgenden werden die einzelnen Gene, die in Art eines Screenings untersucht wurden, näher beschrieben.

1.3.1 PPAR γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma)

PPAR γ gehört zur Gruppe der PPARs, einer Untergruppe der nukleären Transkriptionsfaktoren. Bisher konnten drei verschiedene PPARs identifiziert werden: PPAR α , PPAR δ und PPAR γ . Alle Formen scheinen eine wichtige Rolle im Fettstoffwechsel, aber auch in anderen Bereichen zu spielen (18).

PPAR γ wird vor allem im Fettgewebe exprimiert und hat unter anderem dadurch besonderes Interesse erlangt, dass zu seinen Liganden die pharmakologische Gruppe der Glitazone gehört. Glitazone, zu denen zum Beispiel Rosiglitazon und Pioglitazon gehören, erhöhen die Insulin-Sensitivität und können somit zur Therapie des Diabetes mellitus Typ II eingesetzt werden (19). Für den Pro12Ala Polymorphismus im PPAR γ_2 -Gen wurde eine Assoziation mit einer erhöhten Insulin-Sensitivität nachgewiesen (20). Wie diese Wirkung zu Stande kommt, ist noch nicht geklärt. Eine Hypothese besagt, dass die vermehrte Aufnahme freier Fettsäuren in das Fettgewebe Leber und Muskel vor deren schädlicher Wirkung schützt. Da durch PPAR γ aber eine Vielzahl von Genen reguliert wird, sind auch indirekte Mechanismen über die Induktion von Zytokinen möglich (19).

Natürliche Liganden für PPAR γ sind Fettsäuren, darunter besonders die mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Außerdem spielt PPAR γ eine Rolle im

Immunsystem, ohne dass die einzelnen Ergebnisse bisher ein klares Gesamtbild ermöglichen (18). Zusätzlich wirkt eine Aktivierung von PPAR γ einer Arteriosklerose entgegen (21), steuert Zell-Differenzierung und -Proliferation (22) und kann schließlich zur Zell-Apoptose in vaskulären Zellen führen (23).

Bei den vorliegenden Experimenten interessierten also nicht nur Effekte auf die PPAR γ -Expression allein, sondern auch, ob im Vergleich mit der Expression anderer Gene Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten auffielen.

1.3.2 PGC-1 α (PPAR γ Coactivator 1 α)

PGC-1 α ist ein nukleärer Transkriptionskofaktor, der PPAR γ koaktivieren kann und in vielen Geweben exprimiert wird. Seine Funktionen sind äußerst vielfältig, wobei sich drei größere Bereiche abgrenzen lassen: Fettstoffwechsel bzw. Funktion der Mitochondrien, Glukoneogenese in der Leber und Zelldifferenzierung (24). PGC-1 α vermittelt in Mäusen die adaptive Thermogenese, er fördert den oxidativen Stoffwechsel, über NRF-1 (nuclear respiratory factor 1) kann er eine Proliferation der Mitochondrien bewirken (24). In Leberzellen stimuliert PGC-1 α über HNF4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α) die Glukoneogenese, HNF4 α wird aber nicht benötigt, um in diesen Zellen Ketogenese und β -Oxidation anzuregen (25). Es wird vermutet, dass PGC-1 α an der Differenzierung von Vorläufer-Fettzellen zu braunen Fettzellen beteiligt ist (24), jedenfalls steuert er die Entwicklung von Muskelfasern vom Typ I (26).

Bei Probanden mit Diabetes mellitus Typ II und solchen mit einer positiven Familienanamnese ist die Expression von PGC-1 α vermindert, interessanterweise wurden auch Hinweise gefunden, dass die Expression von PGC-1 α bei einer genetischen Variante mit dem Alter sinkt (27, 28).

Vor diesem Hintergrund schien es sinnvoll, PGC-1 α in die Experimente einzubeziehen. Dabei lag das Augenmerk wie bei PPAR γ nicht nur auf Änderungen der Expression von PGC-1 α selbst, sondern auch auf Gemeinsamkeiten und Unterschieden zur Expression der anderen untersuchten Gene.

1.3.3 Fetuin (α -Fetoprotein)

Für das Glykoprotein Fetuin finden sich in der Literatur mehrere Synonyme. Im klinischen Gebrauch wird meist von α -Fetoprotein gesprochen, daneben existiert die Bezeichnung α_2 -HS-Glykoprotein, eine Abkürzung für α_2 -Heremans-Schmid-Glykoprotein. Bekannt ist α -Fetoprotein aus der pränatalen Diagnostik, bei der es Hinweise auf Neuralrohrdefekte und weitere Fetopathien geben kann (29). Beim Erwachsenen ist die Fetuin-Expression bei einigen Lebererkrankungen erhöht (30), im klinischen Alltag wird α -Fetoprotein im Serum als Tumormarker für das hepatozelluläre Karzinom verwendet (31). Schon längere Zeit ist bekannt, dass Fetuin als Inhibitor in der Kaskade der Insulin-Signaltransduktion wirkt, in diesem Sinne zeigen Fetuin-Knockout-Mäuse bei fettreicher Ernährung keine Gewichtszunahme und eine höhere Insulin-Sensitivität als Mäuse ohne Knockout (32). Daten aus unserer eigenen Abteilung, die bei Probanden mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ II erhoben wurden, führten dazu, dass in dieser Arbeit auch Fetuin untersucht wurde.

1.3.4 Interleukin-6 (IL-6)

Interleukin-6 ist ein Glykoprotein aus der Familie der Zytokine, dem eine Reihe von Funktionen zugeschrieben werden. Zwar sind eine Vielzahl verschiedener Zellen in der Lage, Interleukin-6 zu produzieren, besonders scheint dies allerdings in Makrophagen, Fibroblasten und vaskulären Endothelzellen der Fall zu sein, wobei ein großer Teil des Interleukin-6 im Plasma aus dem Fettgewebe stammt (33). Interleukin-6 spielt im Immunsystem eine bedeutende Rolle, die bisher allerdings nicht eindeutig als pro- oder anti-inflammatorisch eingeordnet werden konnte (34).

Außerdem scheint Interleukin-6 ein wichtiger Regulator des Stoffwechsels zu sein. So wird Interleukin-6 bei körperlicher Arbeit aus dem Skelettmuskel freigesetzt, auch wenn kein Muskeltrauma vorliegt (34). Da IL-6 lipolytisch wirkt, aber auch den Glukosestoffwechsel in der Leber beeinflusst, könnte es ein

Botenstoff sein, der bei körperlicher Arbeit die Anpassung des Körpers an den erhöhten Energiebedarf regelt (33). Es konnte gezeigt werden, dass Interleukin-6 im Serum von Patienten mit Diabetes mellitus Typ II erhöht ist (35), wobei unklar ist, ob diese Erhöhung eine ursächliche Rolle bei der Entstehung des Diabetes spielt oder nur als Folgeerscheinung zu werten ist. Ein weiterer Grund dafür, Interleukin-6 in diese Arbeit aufzunehmen, liegt darin, dass seine Expression durch Palmitat sowohl in Myotuben (36) und CSMC, besonders stark aber in CAEC (15) gesteigert wird. Linoleat hingegen zeigte keinen Effekt. Damit konnte am Beispiel von Interleukin-6 gut untersucht werden, welche Wirkung die Kombination von Palmitat und Linoleat auf die Gen-Expression hat.

1.3.5 eNOS (Endothelial Nitric Oxide Synthase)

Stickstoffmonoxid (NO), ein Molekül mit einer sehr kurzen Halbwertszeit, hat eine wichtige Funktion als Vasodilatator (37, 38). Es wird vermutet, dass ein Mangel an NO bzw. fehlende Wirksamkeit von NO in engem Zusammenhang mit der Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion und damit auch eines diabetischen Gefäßschadens steht (38). Weitere Funktionen des NO, die u. a. einer Arteriosklerose vorbeugen, sind die Inhibierung der Leukozytenadhäsion an das Endothel, der Thrombozytenaggregation und der Proliferation glatter Muskelzellen (39).

Bis jetzt sind drei Isoformen der NO-Synthase bekannt, dabei findet sich die neuronale NOS I (oder nNOS) vor allem in Nervenzellen, die induzierbare NOS II (oder iNOS) außer in Makrophagen in einer ganzen Reihe von Zellen, die endotheliale NOS III (oder eNOS) schließlich wird hauptsächlich in Endothelzellen exprimiert. Diese Enzyme bilden aus Arginin und molekularem Sauerstoff NO und Citrullin, wobei Kofaktoren, unter anderem Tetrahydrobiopterin, nötig sind (38). Die eNOS kann aber nicht nur NO, sondern auch O_2^- produzieren, das oxidativen Stress auf die Zelle ausübt und zur endothelialen Dysfunktion beiträgt. Dabei entscheidet wohl das Angebot an Tetrahydrobiopterin darüber, welches Produkt die eNOS bildet (40). Aus Untersuchungen an Probanden existieren widersprüchliche Ergebnisse

darüber, ob der G894T Polymorphismus des eNOS-Gens einen Risikofaktor für Gefäßerkrankungen darstellt (38, 41). Es ist interessant, dass Glitazone sowohl PPAR γ -abhängig als auch PPAR γ -unabhängig die NO-Produktion in bovinen Endothelzellen über eine Regulation der eNOS-Aktivität steigern können (42).

1.3.6 Stearoyl-CoA-Desaturase (SCD)

Ungesättigte Fettsäuren werden im Zellstoffwechsel schon allein dafür benötigt, Triglyceride zu speichern, da diese einen gewissen Gehalt an ungesättigten Fettsäuren aufweisen müssen, um unter physiologischen Bedingungen „flüssig“ zu sein (43). Zwar kann der menschliche Körper nicht alle ungesättigten Fettsäuren selbst herstellen, er besitzt aber in den Desaturasen eine Familie von Enzymen, die in gewissen Grenzen die Einführung von Doppelbindungen in gesättigte Fettsäuren erlaubt. Bisher sind Delta-5-, Delta-6- und Delta-9-Desaturasen bekannt (44). Die Produkte der Delta-5- und Delta-6-Desaturase sind mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie die Arachidonsäure, die als Bausteine der Zellmembranen, aber auch als Signalüberträger dienen (44).

Die Stearoyl-CoA-Desaturase (auch SCD oder Delta-9-Desaturase genannt) hingegen stellt einfach ungesättigte Fettsäuren wie Oleat oder Palmitoleat her. Es wird angenommen, dass sie Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Signaltransduktion beeinflusst (45, 46), indem sie das Verhältnis von Stearat zu Oleat und damit die Membran-Fluidität steuert. Während Mäuse vier Isoformen der Stearoyl-CoA-Desaturase aufweisen, die in verschiedenen Geweben exprimiert werden (47), weist der Mensch nur eine transkribierte Isoform auf (48), die am ehesten der SCD-1 der Maus entspricht (44). Die SCD weist eine komplexe Regulation auf, zum Beispiel senken mehrfach ungesättigte Fettsäuren und Leptin die mRNA-Expression, während Insulin und Cholesteroll sie erhöhen. Die sog. sterculic acid stellt einen Inhibitor des Enzymes selbst dar (45). Die Delta-9-Desaturase ist Bestandteil der Mikrosomen-Fraktion und hat eine kurze Halbwertszeit von 3-4 Stunden, wofür eine spezielle Protease verantwortlich zu sein scheint (49).

In Mausmodellen hat sich eine Beziehung zwischen der SCD und dem

metabolischen Syndrom gezeigt: SCD-1^{-/-}- Mäuse (Mäuse ohne funktionierende SCD-1-Gene) zeigen einen erhöhten Energie-Umsatz, vermindertes Körperfett, erhöhte Insulin-Sensitivität und entwickeln auch bei Kalorien-reicher Ernährung kein Übergewicht, woran PPAR α nicht beteiligt zu sein scheint (47). Ob/ob-Mäuse, denen Leptin fehlt, sind stark übergewichtig und Insulin-resistent, darüber hinaus findet sich in der Leber von ob/ob-Mäusen eine stark erhöhte SCD-Aktivität (50). Eine neuere Arbeit zeigt, dass Mäuse, die mit SCD-1-Antisense-Oligonukleotiden behandelt wurden, unter Kalorien-reicher Ernährung, ähnlich den SCD-1^{-/-}-Mäusen, kein Übergewicht entwickeln und postprandial niedrigere Insulin- und Glukose-Blutspiegel aufweisen als un-behandelte Mäuse (51). In einer klinischen Studie an Patienten mit Diabetes mellitus Typ II konnte Rosiglitazon die SCD-Gen-Expression im Fettgewebe steigern, der gleichzeitig erhöhte SCD-Aktivitäts-Index korrelierte mit einer gesteigerten Insulin-Sensitivität (52).

1.3.7 Experimentelles Vorgehen

In einem ersten Experiment wurde versucht, je 3 Passagen jeder Zell-Linie zu untersuchen. Leider ließen sich die CAEC und CASMC nur einmal erfolgreich passagieren.

So wurde ein zweites Experiment nötig, um durch eine höhere Anzahl von Versuchen die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beurteilen zu können. Die Erkenntnisse aus dem ersten Experiment wurden einbezogen, so dass schon zu Beginn nur zwei Passagen der CAEC und CASMC geplant wurden. Um trotz der schlechten Passagierbarkeit der CAEC eine ausreichende Anzahl von Versuchen zur Wirkung der Fettsäuren auf die eNOS in CAEC zu erhalten, wurden je Passage zwei Versuche parallel angesetzt.

Eine Ausnahme hiervon stellt die Bestimmung von Fetuin dar, die nachträglich erfolgte. Da hier in zwei Passagen kein Effekt der Fettsäuren nachgewiesen werden konnte, aber eine Wirkung von Glukose möglich schien, wurden in einer weiteren Messung nur noch die Glukose-Ansätze berücksichtigt.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und (Bio-)Chemikalien

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Tischezentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Hanau, Germany
Zentrifuge Hettich Universal 30 RF	Hettich, Tuttlingen, Germany
Zentrifuge Hettich Rotanta RPC	Hettich, Tuttlingen, Germany
Tischzentrifuge Millipore	Millipore GmbH, Schwalbach, Germany
Rüttler Vortex-2 Genie	Scientific Industries Inc., New York, USA
Magnetrüttler Heidolph 50382	Heidolph, Schwabach, Germany
Pipetten 2,5 µl; 10 µl; 20 µl; 100 µl; 200µl; 1000 µl Reference und Research variabel	Eppendorf, Hamburg, Germany
Elektronische Pipetten 10 µl; 100µl variabel Research pro	Eppendorf, Hamburg, Germany
Eppendorfcups 0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Germany
Pipettenspitzen 10 µl; 100 µl; 200 µl; 1000 µl	Greiner Bio-one, Kremsmünster, Austria
Sterile Filter-Spitzen „SafeSeal-Tips“ (DNase-, RNase-, Pyrogenfrei) 2,5 µl; 10 µl; 20 µl; 100 µl; 200µl; 1000 µl	Biozym Diagnostik, hess. Oldendorf, Germany
Safe Skin Satin Plus Powder-Free Latex Exam Gloves M	Kimberly-Clark, Zaventern, Belgium

Safe Skin Purple Nitrile Powder-Free Purple Nitrile Exam Gloves M	Kimberly-Clark, Zaventern, Belgium
Falconröhrchen 15 ml; 50 ml	Greiner Bio-one, Kremsmünster, Austria
Zellkulturschalen	Falcon, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany
Glaskolben, Messzylinder	Duran/Schott-Glas Mainz, Germany
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Germany
Mikrowelle	AEG, Frankfurt am Main, Germany
Feinwaage 1219 MP	Sartorius, Göttingen, Germany
UV-Licht-Kamera (Midi Doc Dokumentation System)	Herolab, Wiesloch, Germany
Transluminator 4000	Stratagene, La Jolla, USA
Elektrophoresekammer	MWG-Biotech, München, Germany
LKB Broma 2197 Power Supply	LKB Produkter AB, Bromma, Sweden
Brutschrank Hera Cell	Heraeus, Hanau, Germany
Amersham Life Science Hybridization Oven	Amersham, Little Chalfont, England
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Esslingen
Pasteur Capillary Pipettes short size 150 mm	WU, Mainz, Germany
Millex [®] GS Syringe Driven Filter Unit sterile 33 mm	Millex, Bedford, USA
Spritzen B. Braun Injekt 20 ml	B. Braun, Melsungen, Germany
Spritzen BE Plastipak [™] 100 x 1 ml Luer	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany
BD Microlance [™]	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany
LightCycler	Roche Diagnostics, Mannheim, Germany
20 µl Glaskapillaren	Roche Diagnostics, Mannheim, Germany

Mastercycler gradient GeneAmp®	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Germany
Cycler PCR Systems 9700	Applied Biosystems, PE Deutschland GmbH, Weiterstadt, Germany
Sequenzierer ABI PRISM™ 310	Applied Biosystems, PE Deutschland GmbH, Weiterstadt, Germany

2.1.2 Chemikalien

Reagenz	Hersteller
CAEC	Clonetics/BioWhittaker™, Verviers, Belgium
CASMC	Clonetics/BioWhittaker™, Verviers, Belgium
HepG2	Amaxa GmbH, Köln, Germany
EMEM Minimal Essential Medium Eagle with NEAA and Pyruvate Na without L-Glutamine	BioWhittaker™, Verviers, Belgium
SmBM® und SmGM®-2 SingleQuots®	Cambrex, Walkersville, USA
EBM® und EGM®-2MV SingleQuots®	Cambrex, Walkersville, USA
L-Glutamine 200 mM	BioWhittaker™, Verviers, Belgium
FBS (Fetal Bovine Serum, triple 0,1 µm sterile filtered)	Hyclone, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, Germany
PenStrep (10 000 U Penicillin/U 10 000 µg Streptomycin/ml)	BioWhittaker™, Verviers, Belgium
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Cambrex Bio Science / BioWhittaker™, Verviers, Belgium
Trypsin 2,5%	BioWhittaker™, Verviers, Belgium
BSA (fatty acid-free bovine serum albumin)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany

Palmitat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
Linoleat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
D-(+)-Glukose	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
RNeasy Mini-Kit (enthält auch RLT-Puffer)	Qiagen, Hilden, Germany
1st Strand Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Roche Diagnostics, Mannheim, Germany
LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I Kit	Roche Diagnostics, Mannheim, Germany
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, Germany
Primer	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
T(A)E-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)	Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Germany (Tris); Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany (EDTA)
Ethidiumbromidlösung 1% (10 mg/ml)	Carl-Roth-GmbH, Karlsruhe, Germany
Farbpuffer(0,1% Br-Phenolblau, 0,1% Xylencyanol, 60% Glycerin, T(A)E-Puffer)	Uni-Apotheke, Tübingen, Germany
DNA-Größenmarker XII; XV	PeqLab, Erlangen, Germany
BigDye [®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, PE Deutschland GmbH, Weiterstadt, Germany
5x Sequencing Buffer	Applied Biosystems, PE Deutschland GmbH, Weiterstadt, Germany
Water Molecular Biology Grade	Eppendorf, Hamburg, Germany
LiChrosolv-Wasser (HPLC grade)	Merck, Darmstadt, Germany
Ethanol 99,9%	Merck, Darmstadt, Germany
Diethyl Sulfoxide >99%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
Sephadex G-50 Superfine	Amersham Bioscience AB, Uppsala, Sweden

2.2 Methoden

2.2.1 Überblick über die Abfolge der experimentellen Schritte

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 70%-80% kultiviert. Dann wurden sie für 20 Stunden mit den entsprechenden Medien einschließlich der Kontrollen inkubiert und anschließend geerntet. Die RNA wurde extrahiert, deren Konzentration bestimmt und eine festgelegte Menge RNA in cDNA umgeschrieben. Zur eigentlichen Quantifizierung der Expression wurden die cDNA-Proben mit Hilfe der LightCycler-PCR vermessen. Dazu war das Erstellen von Standardkurven notwendig. Die Übereinstimmung der PCR-Produkte mit den zu bestimmenden mRNA's wurde durch Gelelektrophorese und Sequenzierung sichergestellt.

2.2.2 Aufnahme der Zellen in Kultur

Als Wachstumsmedien wurde für die CAEC das Medium EBM[®] + EGM[®]-2MV SingleQuots[®], für die CASMC das Medium SmBM[®] + SmGM[®]-2 SingleQuots[®] verwendet. Beide Medien wurden der Anleitung des Herstellers entsprechend bei Bedarf frisch angesetzt. Für die HepG2-Zellen wurde das Medium EMEM eingesetzt. Diesem Medium wurden 50 ml FBS, 5 ml Glutamin und 5 ml PenStrep hinzugefügt.

Die Wachstumsmedien wurden auf 37°C vorgewärmt. Die Cups mit den eingefrorenen Zellen wurden vorsichtig angetaut und in einem 15 ml Falconröhrchen in 5 ml Wachstumsmedium vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurden die Falconröhrchen 5 Minuten bei 4°C und 1000 rpm (rotations per minute) zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 5 ml des jeweiligen Wachstumsmediums resuspendiert. In einem sterilen Glasgefäß wurde die insgesamt benötigte Menge an Wachstumsmedium vorgelegt, abzüglich der 5 ml, in denen die Zellen schon resuspendiert worden waren. Für jede kleine Kulturschale mit 10 cm Durchmesser wurden 7 ml, für jede große Stammschale 15 ml Wachstumsmedium benötigt. Nachdem das

Wachstumsmedium vorgelegt worden war, wurden die 5 ml Zellsuspension unter sorgfältigem Mischen hinzugegeben. Abschließend konnte das Wachstumsmedium mit den darin enthaltenen Zellen auf die einzelnen Schalen verteilt und in den Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ gestellt werden.

2.2.3 Medienwechsel und Passagieren der Zellen

Nach 2-3 Tagen wurde ein Medienwechsel vorgenommen, falls die Zellen nicht hinreichend konfluent waren, um passagiert oder für Versuche verwendet zu werden. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt und auf jede 10 cm Schale 7 ml, auf jede 15 cm Schale 15 ml vorgewärmtes Wachstumsmedium gegeben. Falls auf den 15 cm Stammschalen eine Konfluenz von 70%-80% erreicht war, wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt, 5 ml DPBS hinzu gegeben und wieder abgesaugt. Danach wurden 4 ml 1x Trypsin auf die Zellen gegeben und diese zwischen 5 Minuten und 20 Minuten im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, bis die Zellen sich vom Boden der Schale abgelöst hatten. Nun wurde das Trypsin mit 2 ml Wachstumsmedium abgestoppt, das Zellsuspensat in ein 15 ml Falconröhrchen gegeben und 5 Minuten bei 4°C und 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 5 ml Wachstumsmedium resuspendiert. In einem sterilem Glasgefäß wurde die insgesamt benötigte Menge an Wachstumsmedium abzüglich der 5 ml Zellsuspension vorgelegt (vgl. 2.2.2 Aufnahme der Zellen in Kultur). Diese 5 ml Zellsuspension wurden unter sorgfältigem Mischen zu dem vorgelegten Wachstumsmedium hinzugegeben. Nun konnten die suspendierten Zellen auf die Schalen verteilt und zurück in den Brutschrank gestellt werden.

2.2.4 Herstellen der Inkubationsmedien

Die Fettsäuren standen in Aliquots mit einer Konzentration von 8 mM zur Verfügung, die Glukose-Stammlösung enthielt 1000 mM Glukose. Zur Herstellung der Fettsäure-Aliquots wurde die jeweilige Stocklösung mit 100-prozentigem Ethanol auf 200 mM verdünnt. Diese Lösung wurde 1/25 mit

Krebs-Ringer-Hepes Puffer, der 20-prozentiges BSA enthielt, weiter verdünnt, aliquotiert und unter Stickstoff bei -20°C eingefroren.

Da die Inkubationsmedien jeweils 0,5 mM Palmitat bzw. 0,5 mM Linoleat enthalten sollten, wurde folgendes Pipettierschema (siehe Tabelle 2.1) verwendet, das einer Verdünnung von 1/16 entsprach. In dem Kombinationsansatz aus Palmitat und Linoleat wurde die gleiche Konzentration von 0,5 mM je Fettsäure verwendet. Das BSA konnte in der gleichen Menge wie die Fettsäuren eingesetzt werden, um auf eine Konzentration von 1,25% bzw. bei doppelter Menge auf 2,5% zu kommen. Die Aliquots entstammten schließlich auch aus dem Krebs-Ringer-Hepes Puffer mit 20% BSA, statt der Fettsäure war aber ein Volumen 100-prozentiger Ethanol zugesetzt worden. Um das experimentelle Vorgehen zu vereinfachen, wurden für alle Zellen die gleichen Glukose-Ansätze in einer Verdünnung der Stammlösung von 1/200 bzw. 1/40 benutzt. Die Glukose-Konzentration in den Wachstumsmedien ohne Zusatz wurde gemessen und betrug in den Medien für die vaskulären Zellen 5,58 mmol/l und in dem Medium für die HepG2 Zellen 5,71 mmol/l. Damit ergaben sich für die Inkubationsmedien Glukose-Konzentrationen von etwa 11 mmol/l (im Folgenden Glukose I genannt) und 30 mmol/l, bzw. 31 mmol/l in den HepG2 Zellen (im Folgenden Glukose II genannt).

Tabelle 2.1 Pipettierschema für die Inkubationsmedien

Legende: Palm = Palmitat 0,5 mM; Lin = Linoleat 0,5 mM;

Zusatz	Wachstums- medium	BSA	Palmitat	Linoleat	Glukose
Ansatz	[ml]	[ml]	8 mM	8 mM	1000 mM
			[ml]	[ml]	[ml]
BSA 1,25%	6,56	0,437			
BSA 2,5%	6,12	0,874			
Palm	6,56		0,437		
Lin	6,56			0,437	
Palm + Lin	6,12		0,437	0,437	
Glukose I	9,95				0,05
Glukose II	9,75				0,25

Zur Herstellung der Inkubationsmedien wurden die Wachstumsmedien auf 37°C vorgewärmt. Danach wurde entsprechend dem Pipettierschema in Tabelle 2.1 das Wachstumsmedium in 50 ml Falcon-Röhrchen vorgelegt und die Fettsäure- bzw. Glukoselösung wie angegeben hinzu gegeben. Mit Hilfe von Sterilfiltern (Millex® GS Syringe Driven Filter Unit), Spritzen (Spritzen B. Braun Injekt 20 ml) und 15 ml Falcon-Röhrchen wurden die Medien sterilfiltriert. Für den Ansatz „basal“ als Kontrolle für die Glukosemedien wurde reines Wachstumsmedium verwendet.

2.2.5 Inkubation der Zellen

Zur Inkubation wurde das alte Zellmedium abgesaugt und durch 7 ml des jeweiligen Inkubationsmediums ersetzt. Nach 20 Stunden Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen geerntet.

2.2.6 Ernten der Zellen

Das Inkubationsmedium wurde nach 20 Stunden abgesaugt. Die Platten wurden zuerst mit 5 ml DPBS gewaschen, anschließend wurden sie mit 2 ml 1x Trypsin behandelt und zwischen 5 Minuten und 20 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, bis unter dem Mikroskop die Ablösung der Zellen zu beobachten war. Das Trypsin wurde mit 1 ml Wachstumsmedium abgestoppt und die Zellsuspension in 15 ml Falcon-Röhrchen pipettiert. Diese wurden 5 min bei 1000 rpm und 4° C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zell-Pellet in RLT-Puffer, dem den Angaben des Herstellers entsprechend β-Mercaptoethanol vor dem Gebrauch hinzugefügt worden war, resuspendiert. Bei den CAEC und CASMC wurden 350 µl Puffer verwendet, bei den HepG2-Zellen wurden auf Grund des großen Pellets 600 µl RLT-Puffer eingesetzt und die Resuspension mit Spritzen durchgeführt. Anschließend wurden die Falcon-Röhrchen bei -80°C eingefroren.

2.2.7 RNA-Isolierung

Zur Isolierung der RNA wurde das RNeasy Mini-Kit der Firma Qiagen verwendet und nach der entsprechenden Arbeitsanweisung (RNeasy Mini Protocol for the Isolation of Total RNA from Animal Cells) vorgegangen. Die benötigten DNase Portionen wurden zu Beginn vorbereitet, indem für jede Probe in einem 0,5 ml Eppendorf-Cup zu 70 µl RDD Puffer 10 µl DNase Stock Solution pipettiert wurden. Bis zur weiteren Verwendung wurden sie im Kühlschrank aufbewahrt. Die Zell-Lysate wurden 10 min bei 37°C aufgetaut und in QIAshredder Säulen, aufgesetzt auf 2 ml Cups, überführt und bei 13.000 rpm 2 min lang zentrifugiert. Die Säulen wurden verworfen und 350 µl bzw. 600 µl 70% Ethanol, entsprechend dem bei der Zellernte eingesetzten Volumen an RLT-Puffer, dem Lysat hinzu gegeben und gemischt. Im Falle der HepG2-Zell-Lysate musste auf Grund der hohen Viskosität mit sterilen Spritzen gemischt werden. In Portionen à 700 µl wurde diese Mischung auf RNeasy Mini Spin Säulen übertragen, für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Unterstand verworfen. Nachdem die gesamte Menge so auf die Säulen übertragen worden war, wurden 350 µl RW1 Puffer hinzugefügt und bei 10.000 rpm 15 Sekunden zentrifugiert, der Unterstand wieder verworfen. Danach wurden die vorbereiteten DNase-Portionen direkt auf die Membran der Säulen pipettiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 350 µl RW1 Puffer hinzugefügt, bei 10.000 rpm 15 Sekunden zentrifugiert und der Unterstand verworfen. Nun wurden die Säulen in neue 2 ml Cups gesetzt und 500 µl RPE Puffer hinzu pipettiert, bei 10.000 rpm 15 Sekunden zentrifugiert und der Unterstand verworfen, wieder 500 µl RPE Puffer in die Säule gegeben, bei 13.000 rpm 2 min zum Trocknen zentrifugiert und die Säulen in frische 1,5 ml Cups gesetzt. Dann wurde 50 µl RNase freies Wasser direkt auf die Membran der Säule pipettiert, 1 Minute gewartet und bei 10.000 rpm 1 min zentrifugiert. Wenn bei HepG2 Zell-Lysaten besonders hohe Mengen an RNA erwartet wurden, wurden statt 50 µl 80 µl RNase freies Wasser eingesetzt, bei CAEC Zell-Lysaten und geringer erwarteter RNA-Menge auch nur 30 µl. Das Eluat enthielt die gewünschte RNA. Entweder wurde es direkt in Aliquots

bei -80°C eingefroren oder zuvor die Konzentration an RNA mit dem BioPhotometer der Firma Eppendorf vermessen.

2.2.8 Bestimmung der RNA-Konzentration am Photometer

Um eine bestimmte Menge RNA in cDNA umzuschreiben, musste die RNA-Konzentration in den Proben bestimmt werden. Dazu wurde das BioPhotometer verwendet, das aus der Absorption von UV-Licht der Wellenlänge 260 nm in einer Probe die Konzentration von Nukleinsäure, also von RNA, einzelsträngiger und doppelsträngiger DNA, misst und berechnet. Je mehr Licht absorbiert wird, desto mehr Nukleinsäure enthält die Probe.

Die RNA-Proben wurden mit H₂O (HPLC grade) je nach erwartetem RNA-Gehalt 1/20 oder 1/40 auf ein Gesamtvolumen von 80 µl verdünnt. Anschließend wurden die Proben am Photometer vermessen.

2.2.9 Umschreiben von RNA in cDNA

Für die Umschreibung wurde der „1st Strand Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)“ von Firma Roche Diagnostics und die aus der RNA-Isolierung erhaltene totale RNA eingesetzt. Je nach benötigter cDNA-Menge wurde ein einfacher Ansatz mit 20 µl cDNA oder ein doppelter Ansatz mit 40 µl verwendet.

Aus der RNA-Konzentration der Proben wurde errechnet, welches Volumen 1 µg RNA enthielt, dieses in einem 0,2 ml Eppendorf-Cup vorgelegt und mit sterilem H₂O auf 7,8 µl aufgefüllt. Ein doppelter Ansatz bestand dementsprechend aus 2 µg RNA in 15,6 µl sterilem H₂O.

Danach wurden die Proben für 15 min bei 65°C in dem Mastercycler gradient der Firma Eppendorf oder in dem GeneAmp[®] PCR Systems 9700 der Firma PE applied Biosystems denaturiert, danach wurden sie für etwa 5 Minuten auf Eis gestellt.

In der Zwischenzeit wurde ein Mastermix hergestellt (vgl. Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2: Ansatz für cDNA-Herstellung

Reagenz	Volumen / Probe einfacher Ansatz	Volumen / Probe doppelter Ansatz
25 mM MgCl ₂	4,0 µl	8,0 µl
10x Reaction Buffer	2,0 µl	4,0 µl
Deoxynucleotide Mix	2,0 µl	2,0 µl
Random Primer p(dN) ₆	2,0 µl	4,0 µl
Gelatin	0,4 µl	0,8 µl
RNase Inhibitor	1,0 µl	2,0 µl
AMV Reverse Transcriptase	0,8 µl	1,6 µl

Aus diesem Mastermix wurden zu jeder Probe 12,2 µl (bzw. 24,4 µl für den doppelten Ansatz) pipettiert, somit ergab sich ein Gesamtvolumen von 20 µl (bzw. 40 µl). Danach begann die eigentliche Umschreibung in demselben Cycler, der auch für die Denaturierung bei 65°C verwendet worden war. Tabelle 2.3 gibt Zeiten und Temperaturen an.

Tabelle 2.3: Zeiten und Temperaturen für die cDNA-Herstellung

Legende: ' = Minuten; mind. = mindestens

Schritt	Zeit	Temperatur
1	10'	25°C
2	60'	42°C
3	5'	99°C
4	mind. 5'	4°C

Abschließend wurde jede Probe in 2 µl Portionen aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Der Vorteil der Portionierung bestand darin, dass die Aliquots nun direkt für die quantitative Lightcycler-PCR eingesetzt werden konnten.

2.2.10 Funktionsweise der LightCycler-PCR (LC-PCR)

Die Lightcycler-PCR ist eine Variante der PCR (Polymerase Chain Reaction). Mit der PCR-Technik können gezielt DNA-Sequenzen in vitro exponentiell vermehrt werden. Das Verfahren nutzt dabei das unterschiedliche Verhalten von doppelsträngiger DNA bei verschiedenen Temperaturen und die Fähigkeit bestimmter Enzyme, DNA zu vervielfältigen. Dazu müssen ihnen Anfangs- und Endsequenz des gewünschten Abschnittes in Form von Primern und Nukleotide als Bausteine angeboten werden. Folgender Zyklus bildet den Kern des Verfahrens: bei 94°C - 95°C wird der DNA-Strang physikalisch in seine beiden Einzelstränge getrennt, anschließend können sich bei etwa 50°C - 60°C die Primer anlagern. Die eigentliche Vermehrung der DNA findet dann bei 72°C enzymatisch statt. Bei jeder Wiederholung dieses Zyklus wird die DNA verdoppelt, je geringer der DNA-Gehalt in der Probe, desto häufiger muss der Zyklus wiederholt werden.

Die LightCycler-PCR zeichnet sich zum einen dadurch aus, dass durch Einsatz dünner Glaskapillaren und schnelles Aufheizen bzw. Abkühlen der umgebenden Luft die Dauer eines Zyklus gegenüber herkömmlichen Geräten stark verkürzt wird.

Zum anderen kann der Lightcycler die Menge an doppelsträngiger DNA in einer Glaskapillare bestimmen. Dazu misst er die Fluoreszenz des Farbstoffes SYBR Green, die bei Einlagerung des Farbstoffes in doppelsträngige DNA stark zunimmt. Da je nach DNA-Menge, die in einer Probe enthalten ist, die Fluoreszenz in einem früheren oder späteren Zyklus ein Maximum an Zuwachs zeigt, kann das Gerät mit Hilfe eines Standards bekannter Größe den Gehalt an DNA in den einzelnen Proben quantifizieren. Die Eigenschaften des Farbstoffes SYBR Green werden beim LightCycler am Ende einer PCR zudem verwendet, um die gebildeten PCR-Produkte über ihre Schmelzkurve zu charakterisieren und sicherzustellen, dass einheitliche Produkte gebildet wurden. Die Schmelzkurve wird ermittelt, indem im LightCycler die Temperatur in kleinen Schritten erhöht wird und dabei die Fluoreszenz gemessen wird. Unterschiedliche DNA-Doppelstränge werden bei unterschiedlichen Temperaturen in

ihre Einzelstränge getrennt, dabei nimmt dann auch die Fluoreszenz stark ab.

2.2.11 Erstellen von Standardkurven für die Quantifizierung am LightCycler

Um DNA-Mengen quantifizieren zu können, müssen Standardkurven erstellt werden und bei jedem LightCycler-Lauf muss ein Standard mitgeführt werden. Die Standards bestehen aus einer bekannten Konzentration an PCR-Produkten, die für die jeweilige PCR spezifisch sind.

Zu Beginn muss eine hinreichende Menge an PCR-Produkten hergestellt werden. Dazu wurde jeweils ein LightCycler-Lauf mit drei cDNA-Proben ohne Standard und ohne Quantifizierung durchgeführt (zu Details vgl. Abschnitt 2.2.12 Durchführen der quantitativen PCR's am Lightcycler). Das PCR-Produkt wurde bei 1000 rpm aus den Glaskapillaren heraus zentrifugiert und drei identische Ansätze in ein Eppendorf-Cup überführt. Anschließend wurden die PCR-Produkte mit dem QIAquick PCR Purification Kit von Quiagen aufgereinigt (vgl. Abschnitt 2.2.14 Aufreinigung der PCR-Produkte) Dabei wurden, da 60 µl gereinigt wurden, statt 100µl 300 µl PB-Puffer verwendet.

Anschließend wurde die Konzentration der doppelsträngigen DNA am BioPhotometer der Firma Eppendorf, in einer Verdünnung von 1/10 vermessen (vgl. Abschnitt 2.2.8 Vermessen der RNA-Konzentration am Photometer), um durch Verdünnen mit H₂O (Water Molecular Biology Grade) eine Konzentration von 5 ng/µl herzustellen.

Von dieser Konzentration ausgehend wurde eine Verdünnungsreihe mit 10 Stufen erstellt. Mit H₂O (Water Molecular Biology) wurde die Konzentration absteigend 1/10 verdünnt, so dass also die erste Verdünnung eine Konzentration von 0,5 ng/µl enthielt, die zweite Verdünnung 0,05 ng/µl und so weiter. Eine Ausnahme bildete die 10. Verdünnung: sie wurde 1/1 aus der 9. Verdünnung hergestellt.

Die Verdünnungen 4 - 10 wurden in einem LightCycler-Lauf als 2 µl Portion eingesetzt (zu Details vgl. Abschnitt 2.2.12 Durchführen der quantitativen PCR's am Lightcycler). Aufbauend auf den Messergebnissen dieses PCR-Laufes wurde eine Standardkurve erstellt. Aus einer oder mehreren Verdünnungen

wurde eine ausreichende Anzahl von 2 µl Portionen aliquotiert und bei -20°C eingefroren, um sie später als Standard bei den LightCycler-Läufen zur Quantifizierung einsetzen zu können.

2.2.12 Durchführen der quantitativen PCR's am Lightcycler

Für die PCR's wurde der „LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I“-Kit der Firma Roche Diagnostics verwendet. Die Primer wurden über die Firma Invitrogen bezogen.

Zu Beginn wurden ein passender Standard und je drei cDNA-Aliquots von den Proben, die untersucht werden sollten, aufgetaut. Dabei handelte es sich immer um 2 µl Portionen. Außerdem wurden die entsprechenden weiteren Reagenzien bereitgestellt. Das gesamte Material wurde auf Eis oder in einer Kühlbox gekühlt.

Anschließend wurde bei Bedarf der Reaktionsmix (in Tabelle 2.4 als HotStart SYBR Green bezeichnet) aus 10 µl „1a LightCycler FastStart Enzyme“ und einem kompletten Hütchen „1b LightCycler FastStart Reaction Mix SYBR Green I 10x“ hergestellt. Nach diesen Vorbereitungen wurde der Mastermix nach Plan (siehe Tabelle 2.4) vorgelegt und je 18 µl zu jeder Probe und dem Standard gegeben. Als Negativkontrolle wurden in ein frisches Hütchen ohne DNA 20 µl Mastermix pipettiert. Schließlich wurden die 20 µl aus den Eppendorf-Cups in LightCycler Kapillaren überführt und mit einem Deckel verschlossen. Auch die Kapillaren wurden kurz zentrifugiert, bevor sie in das LightCycler-Karussell eingesetzt wurden. Abschließend wurde der Lauf mit den jeweiligen Temperaturen und Zeiten (siehe Tabelle 2.6) gestartet.

Der LightCycler-Lauf wurde beendet, wenn die Kurven aller Proben ihren zweiten Wendepunkt überschritten hatten. Diese Kurven stellen jeweils die Fluoreszenz, und damit die Menge der PCR-Produkte in den einzelnen Proben, in Abhängigkeit von der Zeit dar. Die Schmelzkurve der PCR-Produkte, die negative Kontrolle und der sog. Crossing Point des Standards (ein Maß für dessen Genauigkeit) wurden als Parameter herangezogen, ob ein Lauf gewertet werden konnte.

Abschließend mussten PCR-Produkte wieder gewonnen werden, um sie später zur Überprüfung ihrer Länge auf ein Agarosegel auftragen zu können. Dazu wurden entsprechende Proben aus den Glaskapillaren bei 1000 rpm heraus zentrifugiert.

2.2.13 Pipettierschemata und Cyclebedingungen der einzelnen PCR's

In den folgenden Tabellen (2.4; 2.5; 2.6; 2.7) sind die Mengen der einzelnen Reagenzien für jede PCR und die spezifischen Zeiten und Temperaturen aufgeführt. Außerdem sind die Sequenzen der Primer, die Länge des PCR-Produktes und der für die Gelelektrophorese verwendete Größenmarker angegeben. GAPDH steht für glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase und ist ein Haushaltsgen, das zur Kontrolle eingesetzt wurde.

Tabelle 2.4: LightCycler PCR-Ansätze

	GAPDH	PPARγ	PGC-1α	SCD	IL-6	eNOS	Fetuin
	Menge [μ l]	Menge [μ l]	Menge [μ l]	Menge [μ l]	Menge [μ l]	Menge [μ l]	Menge [μ l]
H₂O, PCR grade	12,6	12,6	12,6	12,4	13,4	13,4	12,6
MgCl₂ 25mM	2,4	2,4	2,4	1,6	1,6	1,6	2,4
Up-Primer (20μM)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Down-Primer (20μM)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
HotStart Syber Green	2	2	2	2	2	2	2
Diethyl Sulfoxide >99%	0	0	0	1	0	0	0

Tabelle 2.5 Sequenzen der Primer

	Sequenz Up-Primer	Sequenz Down-Primer
GAPDH	GGTCTCTCTTCCTCTTGTGC	ACGACACCAACTTCTCCACC
PPARγ	AGAACAGATCCAGTGGTTGC	GCCAACAGCTTCTCCTTCTC
PGC-1α	TGTGGA ACTCTCTGGA ACTG	TGAGGACTTGCTGAGTGGTG
SCD	TGCAGGACGATATCTCTAGC	ACGATGAGCTCCTGCTGTTA
IL-6	CCAGCTATGAACTCCTTCTC	GCTTGTTCCCTCACATCTCTC
eNOS	CATGAAGCACCTGGAGAATG	TCTGGCTGCAGAGAGATGAT
Fetuin	GGAATAGGTTGCTCACGGCT	GGCCACCTACAGTCATCCTA

Tabelle 2.6 Zeiten und Temperaturen der einzelnen PCR's

Legende: Temp. = Temperatur; ' = Minuten; " = Sekunden

	GAPDH		PPARγ		PGC-1α		SCD		IL-6		eNOS		Fetuin	
	Temp.	Zeit	Temp.	Zeit	Temp.	Zeit	Temp.	Zeit	Temp.	Zeit	Temp.	Zeit	Temp.	Zeit
Denaturierung	95°C	10'	95°C	10'	95°C	10'	95°C	10'	95°C	10'	95°C	10'	95°C	10'
Amplifizierung	95°C	15"	95°C	15"	95°C	15"	95°C	10"	95°C	15"	95°C	15"	95°C	10"
	67°C	10"	64°C	10"	65°C	10"	58°C	10"	63°C	10"	66°C	10"	69°C	10"
	72°C	11"	72°C	17"	72°C	10"	72°C	14"	72°C	17"	72°C	11"	72°C	8"
Schmelzkurve	95°C	5"	95°C	5"	95°C	5"	95°C	5"	95°C	5"	95°C	5"	95°C	5"
	69°C	10"	68°C	10"	67°C	10"	60°C	10"	65°C	10"	68°C	10"	71°C	10"
	98°C	0"	98°C	0"	98°C	0"	98°C	0"	98°C	0"	95°C	0"	98°C	0"
Kühlen	40°C	30"	40°C	30"	40°C	30"	40°C	30"	40°C	30"	40°C	30"	40°C	30"

Tabelle 2.7 Länge der PCR-Produkte und verwendete Größenmarker

	GAPDH	PPARγ	PGC-1α	SCD	IL-6	eNOS	Fetuin
Länge des PCR-Produktes	197 bp	415 bp	232 bp	347 bp	425 bp	271 bp	184 bp
verwendeter Größenmarker	XII	XV	XII	XII	XV	XII	XII

Legende: bp = Basenpaare

2.2.14 Aufreinigung der PCR-Produkte

Da die PCR-Produkte nicht nur mittels Gelelektrophorese auf ihre Länge, sondern zur größeren Sicherheit auch sequenziert werden sollten, mussten einige PCR-Produkte aufgereinigt werden. Dabei wurden je Gen und Zellart zwei Proben aufgereinigt, falls eine Expression mit der LightCycler-PCR messbar gewesen war.

Zur Aufreinigung wurde das QIAquick PCR Purification Kit von Quiagen verwendet. Dabei wurde entsprechend der Anweisung „QIAquick PCR Purification Kit Protocol using a microcentrifuge“ vorgegangen.

So wurde das 5 fache Volumen, also 100 µl, PB-Puffer zu den 20 µl PCR-Produkt hinzu gegeben und gemischt. Anschließend wurden die 120 µl auf eine QIAquick Säule, die in einem 2 ml Cup stand, aufgetragen und 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Unterstand wurde verworfen, 0,75 ml PE-Puffer, der zuvor mit Ethanol versetzt worden war, hinzu gegeben und wieder 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Erneut wurde der Unterstand verworfen und zur vollständigen Entfernung des Ethanols 1 Minute bei 15.000 rpm zentrifugiert. Zum Abschluss musste die QIAquick Säule in ein 1,5 ml Hütchen überführt werden und 30 µl EB-Puffer auf die Mitte der Säule pipettiert werden. Die Säule blieb 1 Minute stehen und wurde danach 1 Minute bei 15.000 rpm zentrifugiert. Das Eluat enthielt die aufgereinigte DNA.

2.2.15 Überprüfen der Länge der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese

Um sicherzustellen, dass die PCR-Produkte die erwartete Länge aufweisen, wurden sie auf einem zweiprozentigen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Dazu wurden 2% Agarose in 100 ml 1x T(A)E-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) gelöst und in einer Mikrowelle aufgeköcht. Das Gel wurde dann unter Zusatz von 10 µl Ethidiumdibromid-Lösung gegossen. Die eingesetzten Kämme erlaubten maximal 48 Proben je Gel.

Nachdem das Gel abgekühlt war, wurden die Kämme entfernt und das Gel

beladen. Für jede Probe wurden 2 µl Farbpuffer vorgelegt. Dieser enthielt 0,1% Br-Phenolblau, 0,1% Xylencyanol und 60% Glycerin, die mit T(A)E Puffer auf 15 ml aufgefüllt wurden. 8 µl jeder Probe wurden dann damit vermischt und wiederum 8 µl dieser Mischung auf das Gel aufgetragen. Je nach erwarteter Länge des Gen-Produktes wurden entweder 5 µl des DNA-Größenmarkers XII oder XV in einer Verdünnung 1/4 verwendet (siehe Tabelle 2.7). Die Größenmarker enthalten DNA-Fragmente bekannter Länge.

Das Gel selbst lief 60 Minuten bei 120 Volt unter 1x T(A)E-Puffer, das Ergebnis wurde unter UV-Licht auf Banden der gewünschten Länge überprüft und fotografiert.

2.2.16 Funktionsweise des Sequenzierautomaten ABI PRISM™ 310

Die PCR-Produkte werden in einer neuen PCR mit Hilfe einer „AmpliTaQ®-Polymerase, FS“ und Fluoreszenz-markierten ddNTP's (Didesoxynukleotide) zu DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge umgeschrieben.

Der ABI PRISM™ 310 trennt die DNA-Fragmente im elektrischen Feld mit Hilfe eines Polymers in einer Kapillare auf. Ein Argonlaser regt die markierten Didesoxynukleotide zur Fluoreszenz an, die dann über eine Kamera detektiert wird, dadurch kann die Sequenz ermittelt werden.

2.2.17 Sequenzierung der PCR-Produkte

Um die aufgereinigten PCR-Produkte mit dem ABI PRISM™ 310 zu sequenzieren, muss eine PCR mit markierten Nukleotiden erfolgen. Danach erfolgt eine Aufreinigung und abschließend die eigentliche Sequenzierung im ABI PRISM™ 310. Es wurde das „BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit“ der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt, Germany) verwendet.

Es wurde für jede untersuchte mRNA jeweils ein PCR-Produkt je Zellart sequenziert, falls eine Expression messbar war. Tabelle 2.8 gibt den Ansatz für die PCR wieder. Für jedes PCR-Produkt wurde derselbe Up-Primer wie für die LightCycler-PCR verwendet. Tabelle 2.9 stellt die verwendeten Zeiten und

Temperaturen dar.

Tabelle 2.8: PCR-Ansatz für die Sequenzierung

Reagenz	Volumen je Probe
PCR-Produkt	1 µl
Cycle Sequencing RR-100	2 µl
Up-Primer (20µM)	0,5 µl
H ₂ O (HPLC grade)	5,5 µl
5x Sequencing Buffer	1,0 µl

Tabelle 2.9: Zeiten und Temperaturen für die PCR aus Tabelle 2.8

Legende: ' = Minuten; " = Sekunden

Schritt	Zeit	Temperatur
1	1'	96°C
2	10"	96°C
3	10"	50°C
4	4'	60°C
5	beliebig	4°C

} 25 x

Nach der PCR wurden die neuen Produkte über Sephadexsäulen aufgereinigt. Hierzu wurden 4 g Sephadex G 50 superfine in 75 ml H₂O bidest suspendiert. Anschließend ließ man die Lösung unter leichtem Rühren mindestens 30 Minuten quellen. Die neuen PCR-Produkte wurden mit 10 µl H₂O (HPLC grade) auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt.

Zur Aufreinigung wurden auf jede Säule 0,75 ml der Sephadexsuspension pipettiert, wobei die Säulen in 2 ml Cups standen. Es wurde 3 Minuten bei 5.000 rpm zentrifugiert. Nachdem die Säulen in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Cup gestellt worden waren, wurden die 20 µl jeder Probe oben auf den Sephadex-Gradienten jeder Säule pipettiert und wieder 3 Minuten bei 5.000 rpm zentrifugiert.

In speziellen Sequenzierungs-Cups wurden dann 16 µl H₂O (HPLC grade) vorgelegt und 4 µl des Eluates hinzugeben. Nach kurzem Zentrifugieren wurden

die Cups mit einem Deckel verschlossen und die Sequenzierung im ABI PRISM 310 durchgeführt.

2.2.18 Abgleich der Sequenzen

Die Sequenzen wurden mit Hilfe der Funktion „Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn)“, die das „National Center for Biotechnology Information“ unter der Internet-Adresse „<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>“ anbietet, auf ihre Homologie zu den gewünschten Sequenzen überprüft. Damit wurde sichergestellt, dass jede PCR nicht nur ein Produkt der erwarteten Länge ergab, sondern auch die richtige Basenfolge.

2.2.19 Auswertung der Daten

Aus den Dreifachwerten der LightCycler-PCR wurde Mittelwerte als Ergebnis in willkürlichen Einheiten (arbitrary units, AU) gebildet. Dabei entspricht 1 AU 1 μ g mRNA/100 ng total RNA. Falls sich innerhalb der Dreifachwerte ein Pipettierfehler zeigte, wurde dieser Wert nicht einbezogen.

Da man annimmt, dass die GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) als sogenanntes housekeeping gene in allen Zellen unter allen Bedingungen gleich stark exprimiert wird, wurden alle Messergebnisse auf die Werte, die sich für die GAPDH-Epression ergaben, bezogen. Dafür wurde das Statistikprogramm JMP[®] Version 4.0.4 (SAS Institute Inc.) verwendet.

Auf die so errechneten Werte wurde mit dem gleichen Programm ein gepaarter t-Test ausgeführt, da die Zellen der Kontrollen und der eigentlichen Ansätze identisch waren und identisch behandelt wurden. Dabei wurde die gemessenen Werte der Glukose-Ansätze mit denen des Basalmediums verglichen, Palmitat bzw. Linoleat mit BSA 1,25% und Palmitat + Linoleat mit BSA 2,5%. Selbstverständlich wurde nur ein statistischer Test ausgeführt, wenn mindestens 3 unabhängige Versuche vorlagen. Ein $p < 0,1$ wurde als Trend, ein $p < 0,05$ als statistisch signifikant eingeschätzt. Falls Hypothesen aus der Dissertation von Olga Hirschfeld-Kroll (Universität Tübingen (2004): „Die Wirkung von Palmitat

und Linoleat auf die Genexpression in humanen Fibroblasten, Hepatocyten, Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen aus Koronararterien“) bestätigt wurden, wurde ein einseitiger t-Test verwendet und dies im Text erwähnt. In allen sonstigen Fällen wurde ein zweiseitiger t-Test angewandt. Falls sich für ein Gen mehrere Ansätze mit einem signifikanten Unterschied von der jeweiligen Kontrolle fanden, wurde zwischen diesen Ansätzen ein gepaarter t-Test ausgeführt, falls diese Ansätze sich auf unterschiedlichen Kontrollen bezogen, wurden die Werte davor durch den Wert der Kontrollen geteilt. Fand sich kein signifikanter Unterschied von der jeweiligen Kontrolle, wurde auf einen statistischen Vergleich der Ansätze untereinander verzichtet, da ein mögliches signifikantes Ergebnis biologisch nicht aussagekräftig schien. Bedingt durch die unterschiedlichen Kontrollen schien der Einsatz von ANOVA nicht sinnvoll.

Mit Microsoft® Excel 2002 wurden Mittelwerte und Standardfehler berechnet und die Daten graphisch dargestellt. Da die Standardfehler somit die Schwankung der Werte zwischen den einzelnen Zellpassagen angeben, der gepaarte t-Test aber Werte innerhalb einer Passage vergleicht, kann trotz Überlappung der Fehlerbalken eine statistische Signifikanz vorliegen.

3 Ergebnisse

Dargestellt ist die Menge an mRNA des jeweiligen Genes bezogen auf die mRNA-Menge von GAPDH, einem Haushaltsgen.

Da es nach ersten Ergebnissen nicht lohnend schien, die Versuche zum Einfluss von Glukose auf die Gen-Expression fortzusetzen, wurden diese nicht unbedingt bis zu einem $n > 2$ weitergeführt.

3.1 Einfluss von freien Fettsäuren und Glukose auf die mRNA-Expression von PPAR γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma) in CAEC, CASMC und HepG2-Zellen

Da nach dem ersten Experiment die Bestimmung der PPAR γ -mRNA-Menge nicht weiterverfolgt wurde, finden sich für die vaskulären Zellen jeweils zwei ($n = 2$), für die HepG2-Zellen drei unabhängige Bestimmungen ($n = 3$), für den Kombinationsansatz aus Palmitat + Linoleat und für HepG2 Glukose I je eine Bestimmung weniger.

3.1.1 CAEC

Es wurde kein Hinweis auf einen Effekt der Metabolite gefunden (Abb. 3.1 - 3.3).

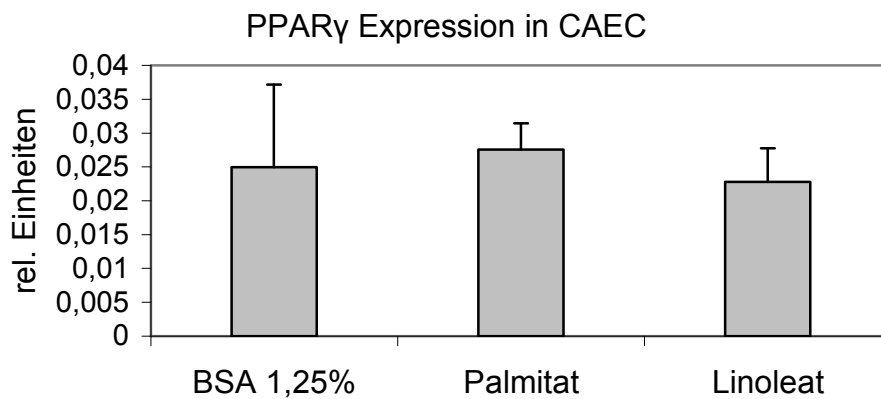


Abbildung 3.1: Darstellung der Expression von PPAR γ in CAEC bezogen auf die GAPDH-Expression (n=2)

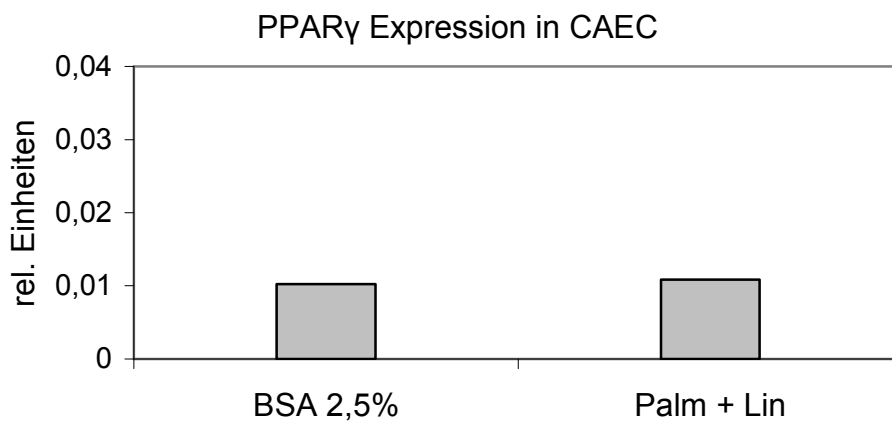


Abbildung 3.2: Darstellung der Expression von PPAR γ in CAEC bezogen auf die GAPDH-Expression (n=1); Palm = Palmitat, Lin = Linoleat

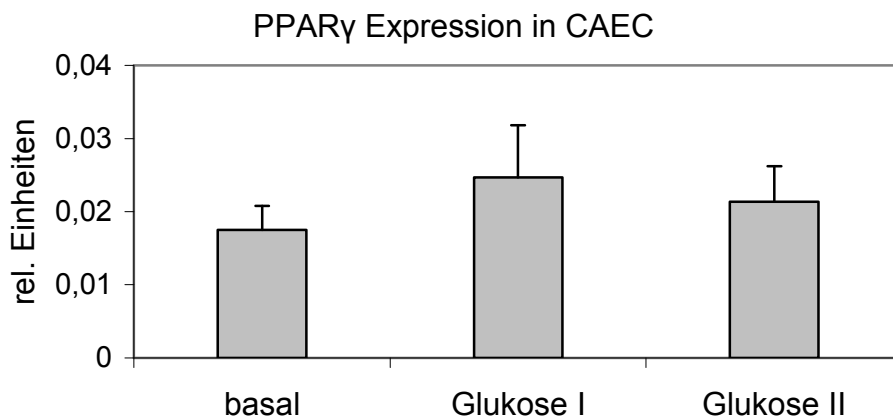


Abbildung 3.3: Darstellung der Expression von PPAR γ in CAEC bezogen auf die GAPDH-Expression (n=2) (Glukose I: 11 mmol/l, Glukose II: 30 mmol/l)

3.1.2 CASMC

Auch hier wurde kein Hinweis auf einen signifikanten Unterschied zwischen den Metaboliten gefunden (Abb. 3.4 - 3.6).

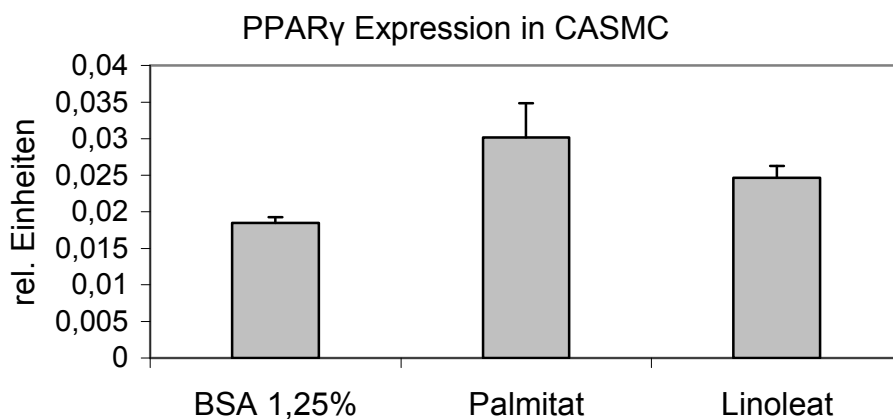


Abbildung 3.4: Darstellung der Expression von PPAR γ in CASMC bezogen auf die GAPDH-Expression (n=2)

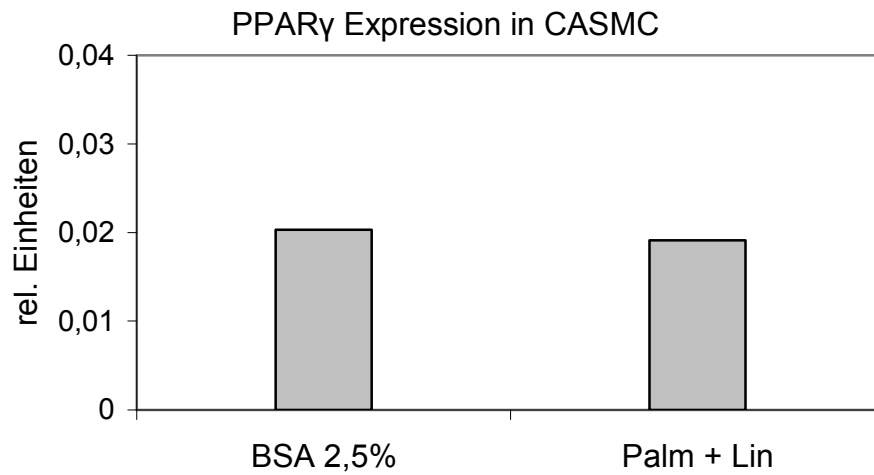


Abbildung 3.5: Darstellung der Expression von PPAR γ in CASMC bezogen auf die GAPDH-Expression (n=1); Palm = Palmitat, Lin = Linoleat

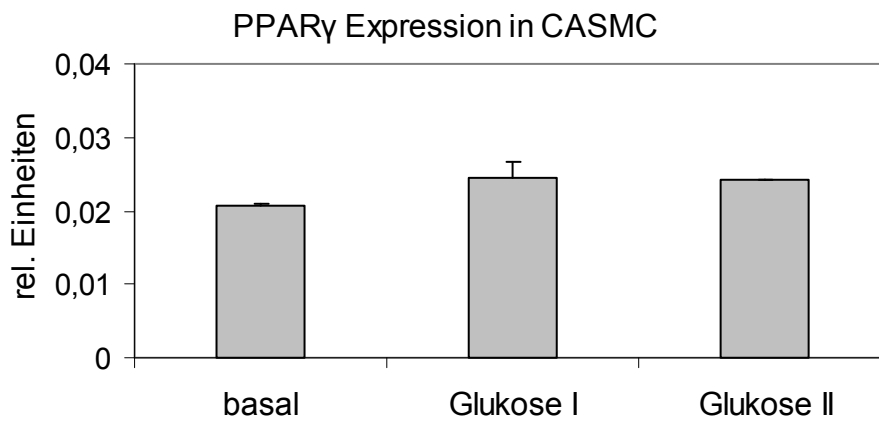


Abbildung 3.6: Darstellung der Expression von PPAR γ in CASMC bezogen auf die GAPDH-Expression (n = 2) (Glukose I: 11 mmol/l, Glukose II: 30 mmol/l)

3.1.3 HepG2

In den HepG2-Zellen wurde die Messung der PPAR γ Expression nach der Ermittlung der folgenden Ergebnisse nicht weiterverfolgt (Abb. 3.7 - 3.9), da die

Steigerung um etwa 20%, die durch Palmitat hervorgerufen wurde ($p < 0,1$ im Vergleich mit BSA 1,25%) so geringfügig ist, dass eine biologische Relevanz fragwürdig scheint.

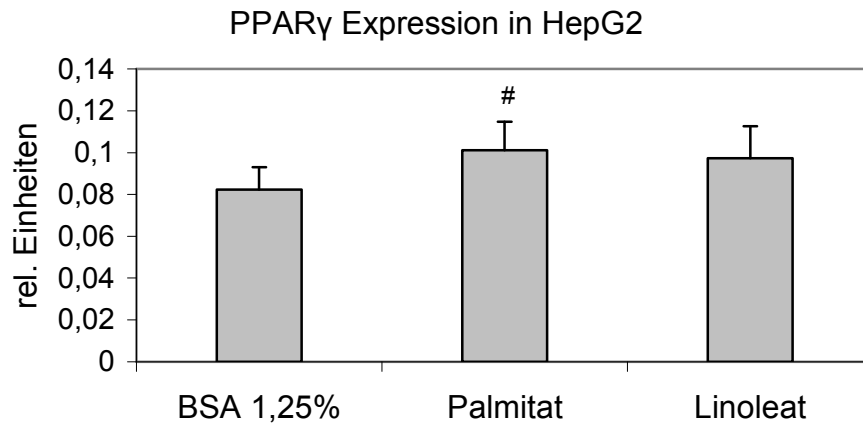


Abbildung 3.7: Darstellung der Expression von PPAR γ in HepG2 bezogen auf die GAPDH-Expression (n=3); # = $p < 0,1$ gegenüber BSA 1,25%

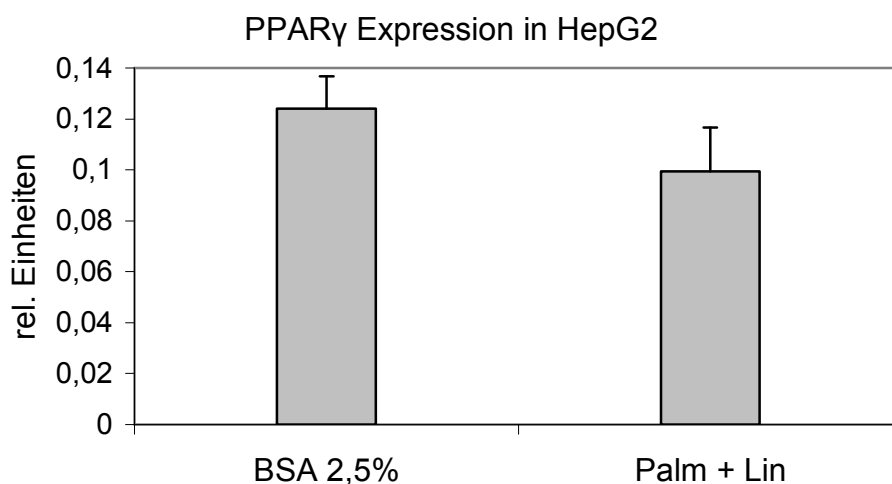


Abbildung 3.8: Darstellung der Expression von PPAR γ in HepG2 bezogen auf die GAPDH-Expression (n=2); Palm = Palmitat, Lin = Linoleat

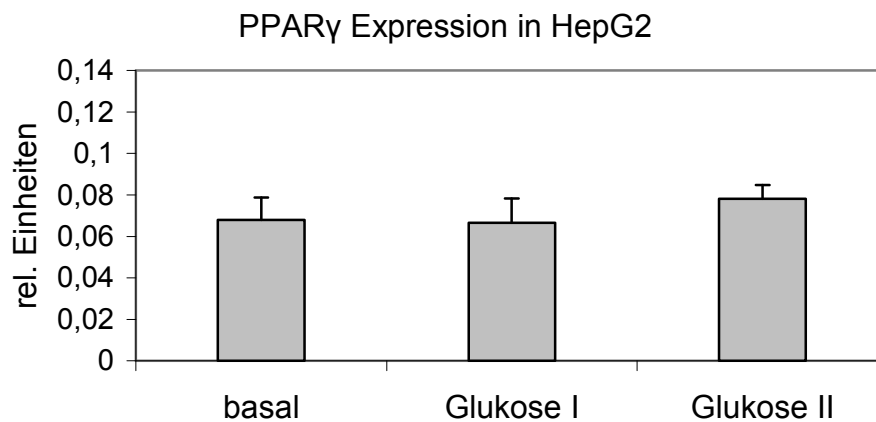


Abbildung 3.9: Darstellung der Expression von PPAR γ in HepG2 bezogen auf die GAPDH-Expression (Glukose I: 11 mmol/l, n = 2; Glukose II: 31 mmol/l, n = 3)

3.2 Einfluss von freien Fettsäuren und Glukose auf die mRNA-Expression von PGC-1 α (PPAR γ Coactivator 1 α) in CASMC und HepG2-Zellen

Für diesen Transkriptionsfaktor konnte mit den verwendeten Methoden in den CAEC keine eindeutige Expression festgestellt werden, d. h. die Messwerte am Lightcycler waren so niedrig, dass sich unspezifische PCR-Produkte ergaben. Auch in den CASMC war die Expression so gering, dass eine Quantifizierung nicht sinnvoll schien (Abb. 3.10). Allerdings konnte in den HepG2-Zellen eine deutliche Expression festgestellt werden.

3.2.1 CASMC

Als Beispiel für die geringe Expression folgt die Darstellung der Wirkung von Palmitat und Linoleat (Abb. 3.10).

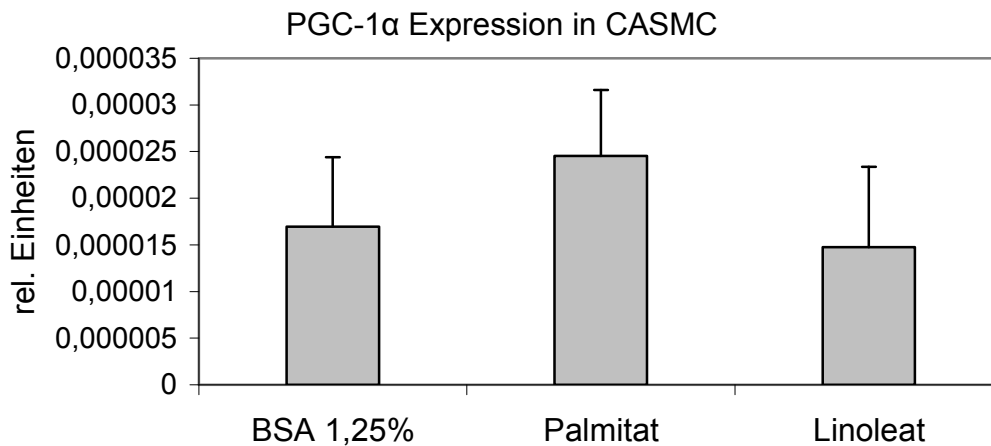


Abbildung 3.10: Darstellung der Expression von PGC-1 α in CASMC bezogen auf die GAPDH-Expression (n=2)

3.2.2 HepG2

Sowohl Palmitat also auch Linoleat konnten die Expression von PGC-1 α statistisch signifikant auf etwa das 1,5 fache (Palmitat) bzw. knapp das 1,4 fache (Linoleat) steigern (Abb. 3.11, n = 4, p < 0,05). Zwischen Palmitat und Linoleat bestand kein statistisch signifikanter Unterschied. Ebenso bestand kein signifikanter Unterschied des Kombinationsansatzes Palmitat + Linoleat gegenüber BSA 2,5% (Abb 3.12). Bei Glukose II (31 mmol/l) fand sich ein Trend (p < 0,1 im Vergleich zu basal, n = 3) zur Steigerung der Expression auf etwa das 1,6 fache (Abb. 3.13).

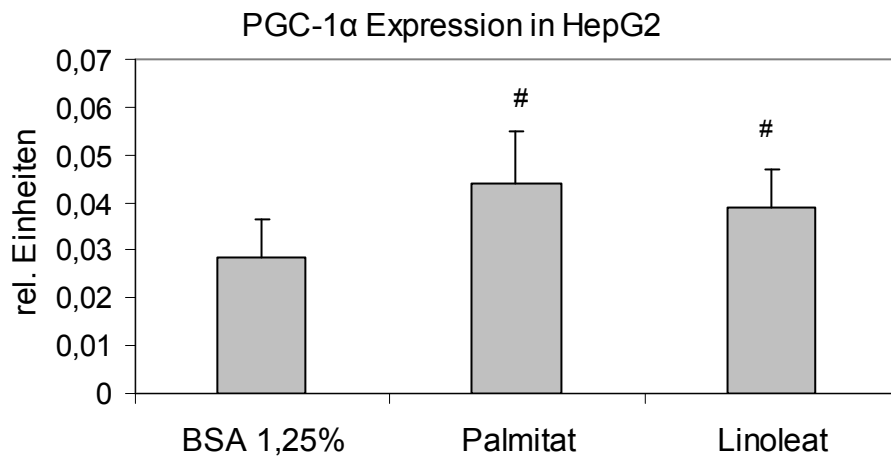


Abbildung 3.11: Darstellung der Expression von PGC-1 α in HepG2 bezogen auf die GAPDH-Expression (n=4); # = p < 0,05 gegenüber BSA 1,25%

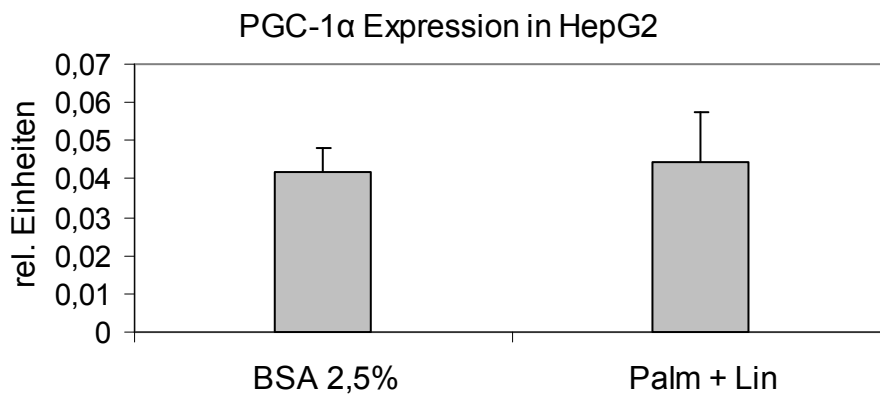


Abbildung 3.12: Darstellung der Expression von PGC-1 α in HepG2 bezogen auf die GAPDH-Expression (n=3); Palm = Palmitat; Lin = Linoleat

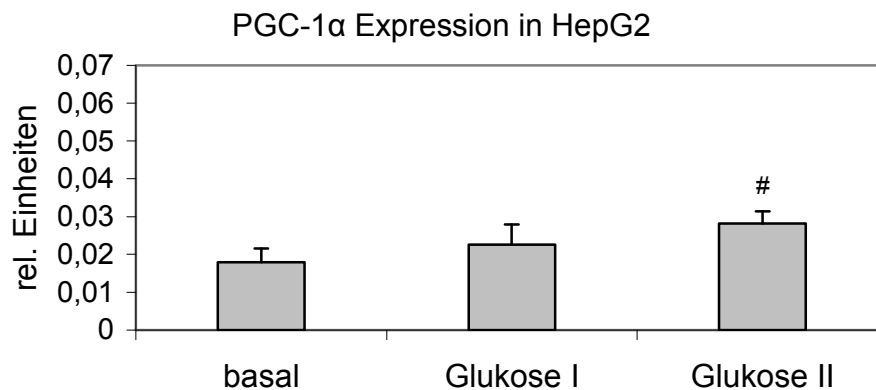


Abbildung 3.13: Darstellung der Expression von PGC-1 α in HepG2 bezogen auf die GAPDH-Expression (Glukose I: 11 mmol/l, n = 2; Glukose II: 31 mmol/l, n = 3); # = p < 0,1 gegenüber basal

3.3 Einfluss von freien Fettsäuren und Glukose auf die mRNA-Expression von Fetuin (α -Fetoprotein) in HepG2-Zellen

3.3.1 HepG2

Die Expression von Fetuin wurde nur in HepG2-Zellen bestimmt. Da sich bei den Fettsäuren für ein n = 2 keine Unterschiede zeigten, wurden keine weiteren Messungen durchgeführt (Abb. 3.14 - 3.15). Der hohe Standardfehler beruht darauf, dass die Werte, die für die zwei gemessenen Passagen ermittelt wurden, stark schwanken. Innerhalb einer Passage finden sich aber keine Unterschiede.

Glukose zeigte in zwei Passagen eine Senkung der Expression, nicht jedoch in der ersten Passage (Abb. 3.16).

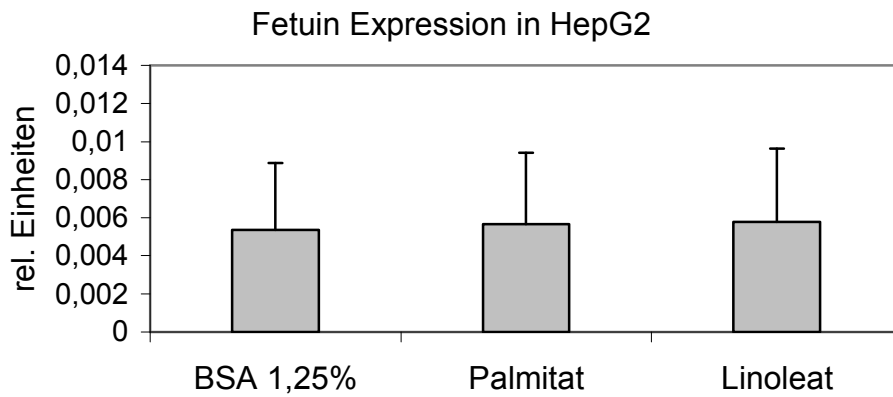


Abbildung 3.14: Darstellung der Expression von Fetuin in HepG2 bezogen auf die GAPDH-Expression (n = 2)

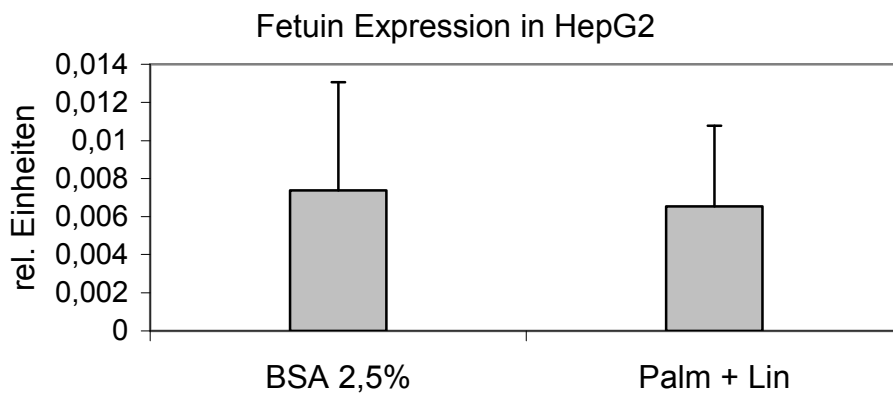


Abbildung 3.15: Darstellung der Expression von Fetuin in HepG2 bezogen auf die GAPDH-Expression (n = 2); Palm = Palmitat; Lin = Linoleat

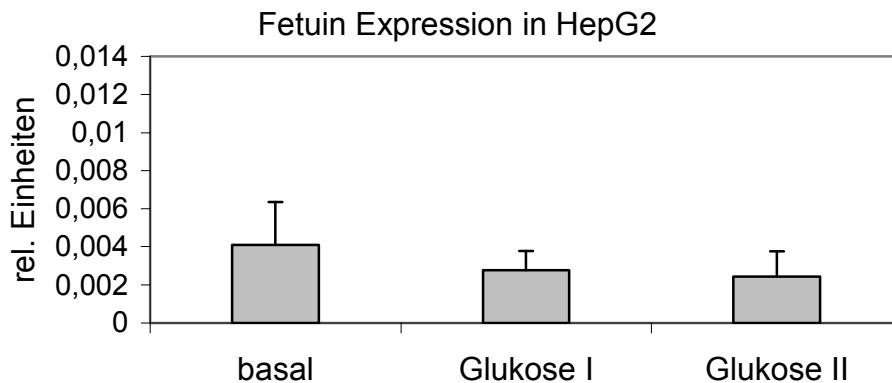


Abbildung 3.16: Darstellung der Expression von Fetuin in HepG2 bezogen auf die GAPDH-Expression (Glukose I: 11 mmol/l, n = 2; Glukose II: 31 mmol/l, n = 3)

3.4 Einfluss von freien Fettsäuren und Glukose auf die mRNA-Expression von Interleukin-6 (IL-6) in CAEC und CASMC

In HepG2-Zellen konnte keine eindeutige Expression von Interleukin-6 gemessen werden, falls es dort exprimiert wird, dann nur in sehr geringem Maße. In den vaskulären Zellen wurden die Glukose-Ansätze nach einem n = 2 verlassen (Abb. 3.19, Abb. 3.22). Aus der Arbeit von Olga Hirschfeld-Kroll (siehe Kapitel 2.2.19) bestanden Hypothesen zur Wirkung von Palmitat und Linoleat, so dass gegebenenfalls statistisch ein einseitiger Test verwendet wurde.

3.4.1 CAEC

Palmitat steigerte die Expression von IL-6 stark um etwa das 9-fache (Abb. 3.17, n = 4, $p < 0,01$ im Vergleich zu BSA 1,25% im einseitigen gepaarten t-Test), Linoleat zeigte keinen statistisch signifikanten Effekt.

Interessant ist, dass die Kombination aus Palmitat + Linoleat gegenüber BSA 2,5% keinen statistisch signifikanten Unterschied zeigte (Abb. 3.18). Da die IL-6

Expression in den Glukose-Ansätzen viel geringer ist, wurde für diese Abbildung (Abb. 3.19) ein anderer Maßstab verwendet.

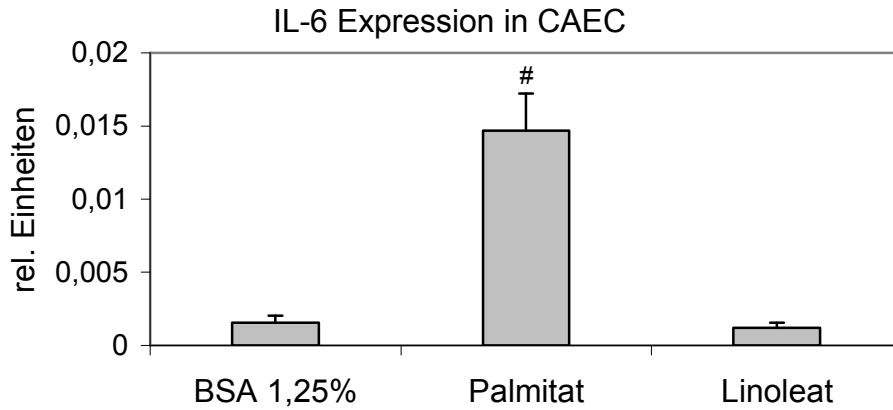


Abbildung 3.17: Darstellung der Expression von IL-6 in CAEC bezogen auf die GAPDH-Expression (n = 4); # = p < 0,01 gegenüber BSA 1,25% im einseitigen gepaarten t-Test

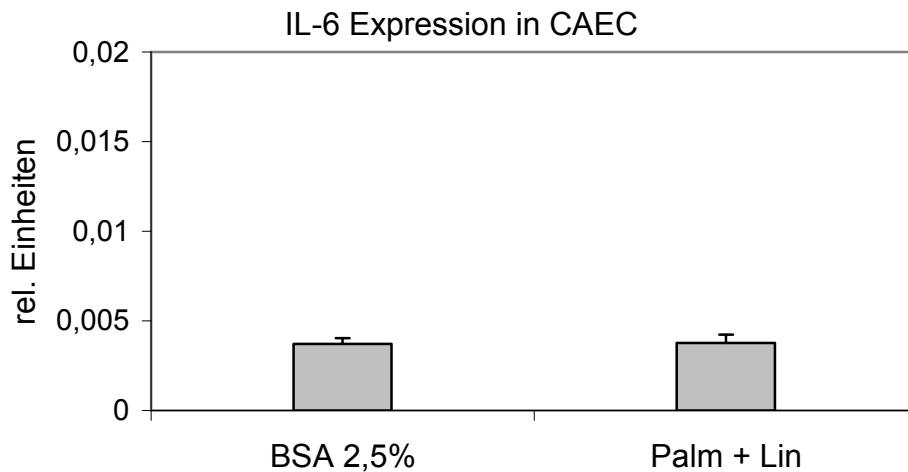


Abbildung 3.18: Darstellung der Expression von IL-6 in CAEC bezogen auf die GAPDH-Expression (n = 3); Palm = Palmitat, Lin = Linoleat

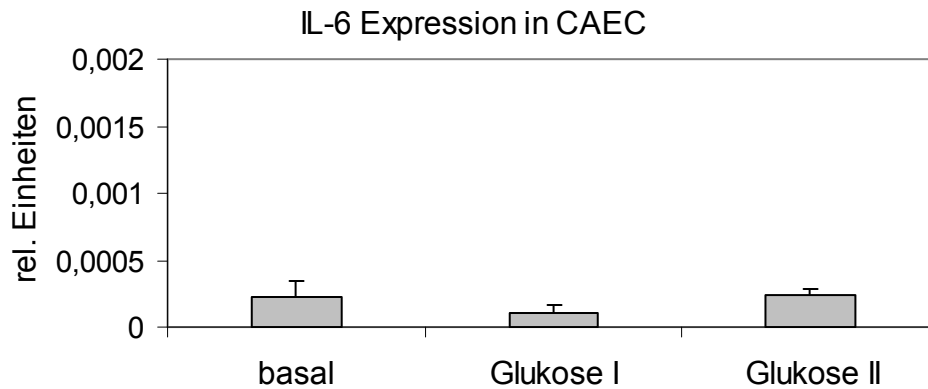


Abbildung 3.19: Darstellung der Expression von IL-6 in CAEC bezogen auf die GAPDH-Expression (n = 2) (Glukose I: 11 mmol/l, Glukose II: 30 mmol/l)

3.4.2 CASMC

Auch in den CASMC wurde die Expression von IL-6 durch Palmitat um etwa das 1,5 fache gesteigert, damit also deutlich geringer als in CAEC (Abb. 3.20, n = 4; p = 0,05 gegenüber BSA 1,25% im einseitigen gepaarten t-Test). Linoleat zeigte keine Wirkung. Der Kombinationsansatz aus Palmitat + Linoleat zeigte keine statistische Signifikanz gegenüber BSA 2,5% (Abb. 3.21).

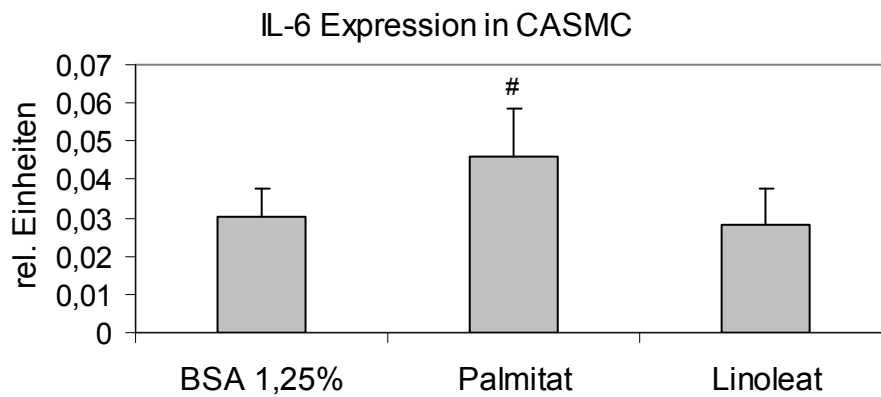


Abbildung 3.20: Darstellung der Expression von IL-6 in CASMC bezogen auf die GAPDH-Expression (n = 4); # bedeutet p = 0,05 gegenüber BSA 1,25% im einseitigen gepaarten t-Test

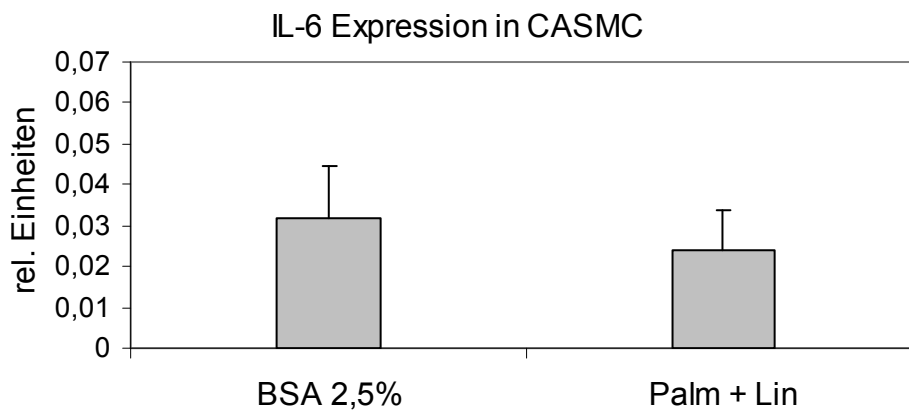


Abbildung 3.21: Darstellung der Expression von IL-6 in CASMC bezogen auf die GAPDH-Expression (n = 3); Palm = Palmitat, Lin = Linoleat

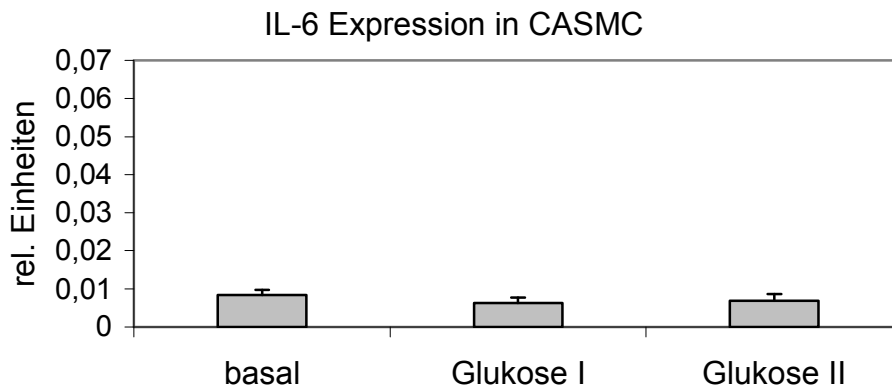


Abbildung 3.22: Darstellung der Expression von IL-6 in CASMC bezogen auf die GAPDH-Expression (n = 2) (Glukose I: 11 mmol/l, Glukose II: 30 mmol/l)

3.5 Einfluss von freien Fettsäuren und Glukose auf die mRNA-Expression von eNOS (Endothelial Nitric Oxide Synthase) in CAEC

In CASMC ergaben sich auf Grund einer sehr geringen Expression nur unspezifische PCR-Produkte. In den HepG2-Zellen war die Expression so niedrig, dass eine Quantifizierung nicht sinnvoll schien.

3.5.1 CAEC

Auch hier wurden die Glukose-Ansätze nach zwei Messungen verlassen (Abb. 3.25). Es schien sich eine Steigerung der eNOS-Expression durch Linoleat auf das 1,5 - 2 fache zu ergeben, die aber statistisch nicht einmal die Kriterien eines Trends erreichte (Abb. 3.23). Die Kombination aus Palmitat + Linoleat zeigte keine statistisch signifikante Wirkung (Abb. 3.24)

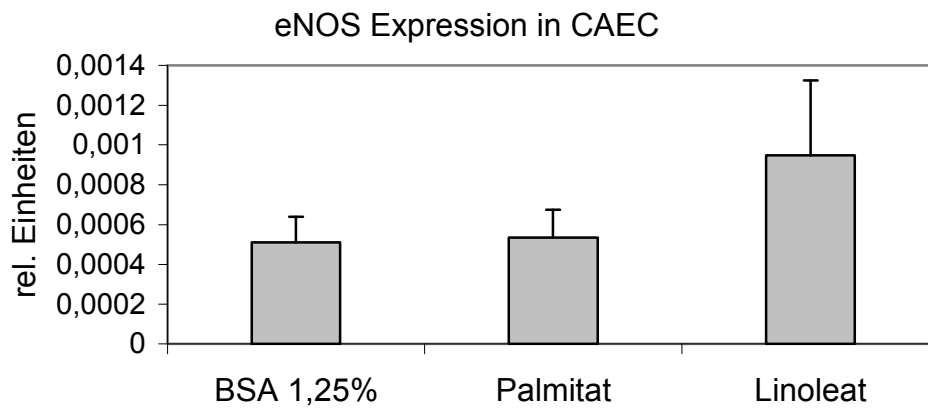


Abbildung 3.23: Darstellung der Expression von eNOS in CAEC bezogen auf die GAPDH-Expression (n = 6)

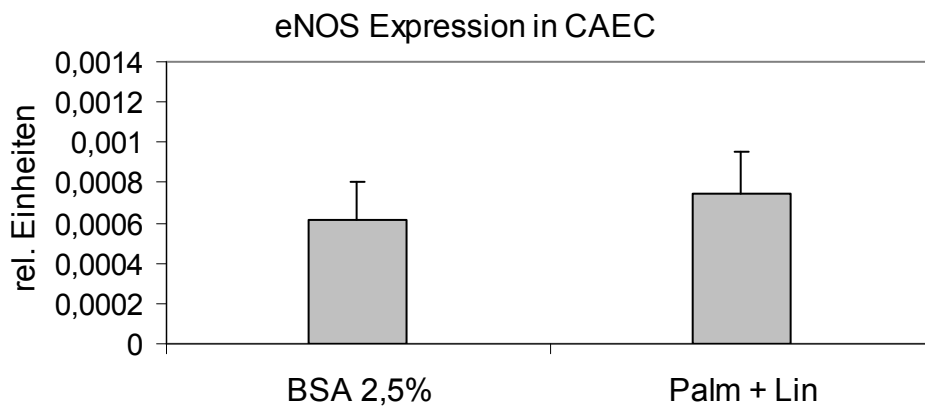


Abbildung 3.24: Darstellung der Expression von eNOS in CAEC bezogen auf die GAPDH-Expression (n = 5); Palm = Palmitat, Lin = Linoleat

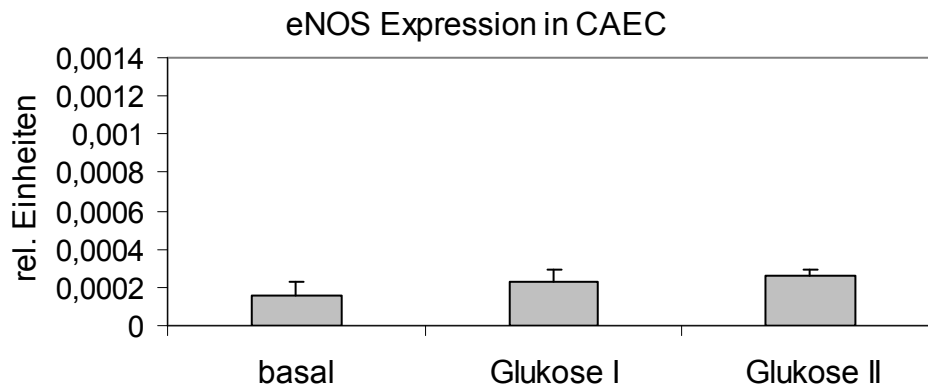


Abbildung 3.25: Darstellung der Expression von eNOS in CAEC bezogen auf die GAPDH-Expression (n = 2) (Glukose I: 11 mmol/l, Glukose II: 30 mmol/l)

3.6 Einfluss von freien Fettsäuren und Glukose auf die mRNA-Expression von Stearoyl-CoA-Desaturase (SCD) in CAEC, CASMC und HepG2-Zellen

Eine Expression der SCD konnte in allen Zellen gemessen werden. Es ist nicht unbedingt selbstverständlich, dass ein solches Enzym nicht nur in der Leber, sondern auch in vaskulären Zellen exprimiert wird.

3.6.1 CAEC

Palmitat zeigte keine statistisch signifikante Wirkung auf die Expression der SCD. Linoleat senkte die Expression auf ein Fünftel im Vergleich zu BSA 1,25%. Dieses Ergebnis erreichte aber selbst im einseitigen t-Test (basierend auf einem Ergebnis aus der Dissertation von Olga Hirschfeld-Kroll) nur die Qualität eines Trends (Abb. 3.26, n = 4, p < 0,1). Die Kombination aus Palmitat + Linoleat senkte die SCD-Expression zwar deutlich, verpasste aber im zweiseitigen gepaarten t-Test knapp die Kriterien eines Trends (Abb. 3.27, n = 3, p = 1,066). Die Glukose-Ansätze wurden nach einem n = 2 verlassen (Abb. 3.28).

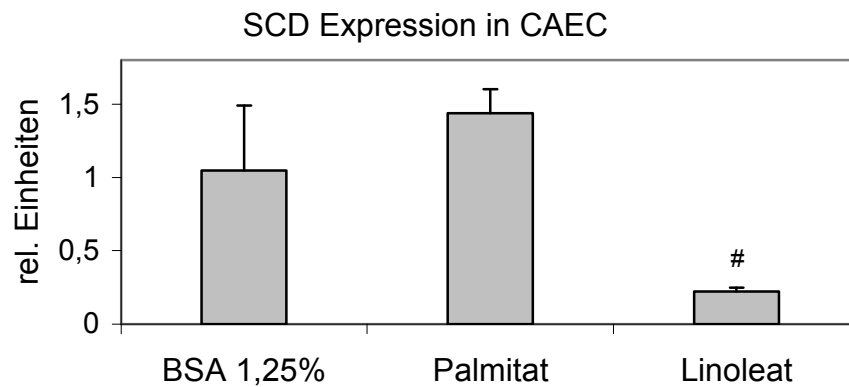


Abbildung 3.26: Darstellung der Expression von SCD in CAEC bezogen auf die GAPDH-Expression (n = 4); # = p < 0,1 gegenüber BSA 1,25% im einseitigen gepaarten t-Test

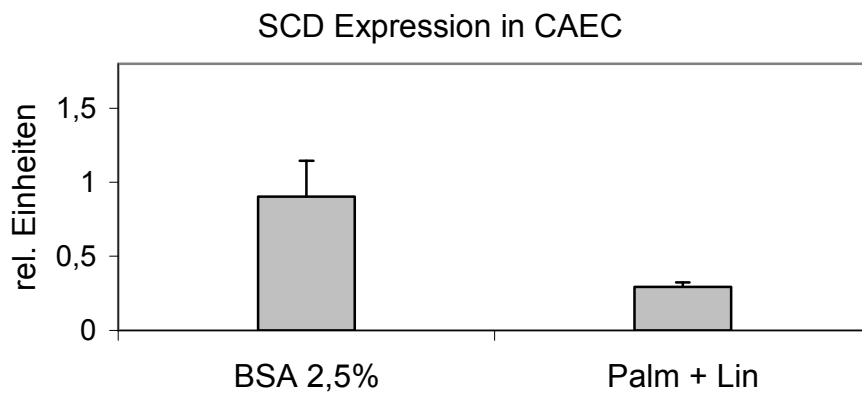


Abbildung 3.27: Darstellung der Expression von SCD in CAEC bezogen auf die GAPDH-Expression (n = 3); Palm = Palmitat, Lin = Linoleat

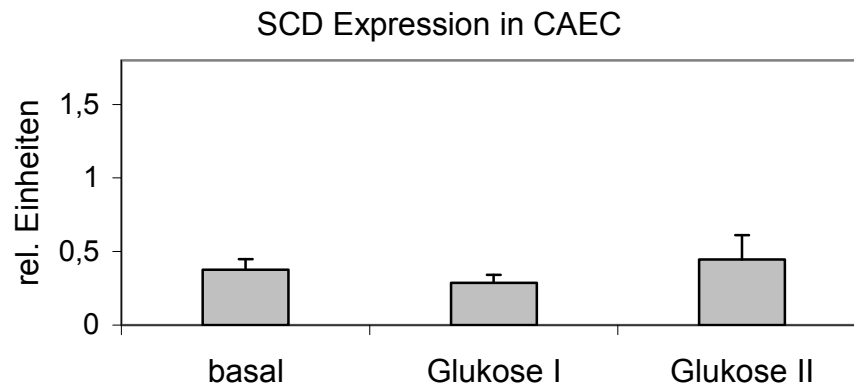


Abbildung 3.28: Darstellung der Expression von SCD in CAEC bezogen auf die GAPDH-Expression (n = 2) (Glukose I: 11 mmol/l, Glukose II: 30 mmol/l)

3.6.2 CASMC

Palmitat steigerte die Expression der SCD um den Faktor 2,2 gegenüber BSA 1,25%, Linoleat hingegen führte zu einer Senkung auf 40% im Vergleich zu BSA 1,25%. Beide Effekte waren schon in der Dissertation von Olga Hirschfeld Kroll (siehe Kapitel 2.2.19) festgestellt worden, so dass ein einseitiger gepaarter t-Test verwendet wurde (Abb. 3.29, n = 4, p < 0,01). Außerdem ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Palmitat und Linoleat (Abb. 3.29, p < 0,0001 im zweiseitigen gepaarten t-Test. Bei dem Kombinationsansatz aus Palmitat + Linoleat fand sich eine Reduktion der SCD-Expression auf etwa 2/3 im Vergleich zu BSA 2,5% (Abb. 3.30, p < 0,05 im zweiseitigen gepaarten t-Test. Der Unterschied zu Palmitat bzw. Linoleat allein war statistisch signifikant (Abb. 3.31). Nach zwei Messungen wurden die Glukose-Ansätze nicht weiterverfolgt (Abb. 3.32).

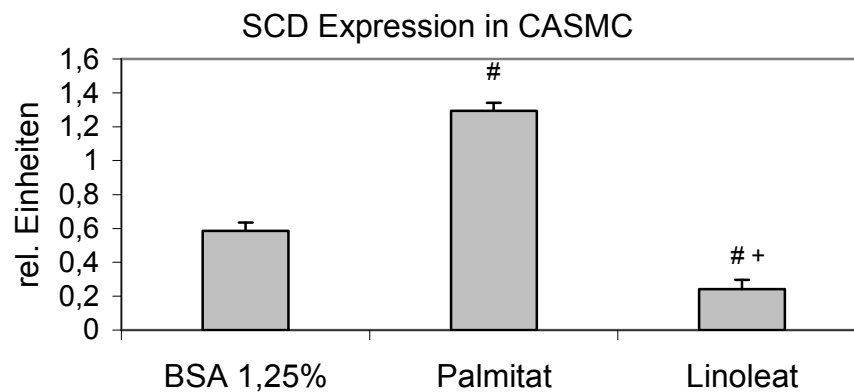


Abbildung 3.29: Darstellung der Expression von SCD in CASMC bezogen auf die GAPDH-Expression (n = 4); # = p < 0,01 gegenüber BSA 1,25% im einseitigen gepaarten t-Test; + = p < 0,0001 im Vergleich mit Palmitat im zweiseitigen gepaarten t-Test

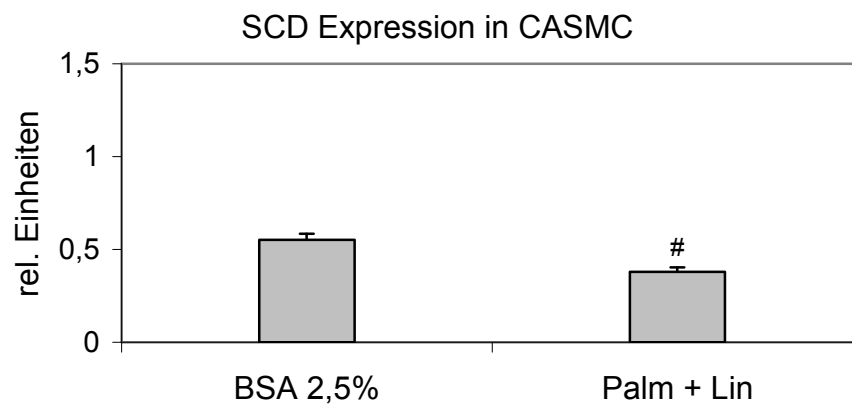


Abbildung 3.30: Darstellung der Expression von SCD in CASMC bezogen auf die GAPDH-Expression (n = 3); Palm = Palmitat, Lin = Linoleat; # = p < 0,05 gegenüber BSA 2,5% im zweiseitigen gepaarten t-Test

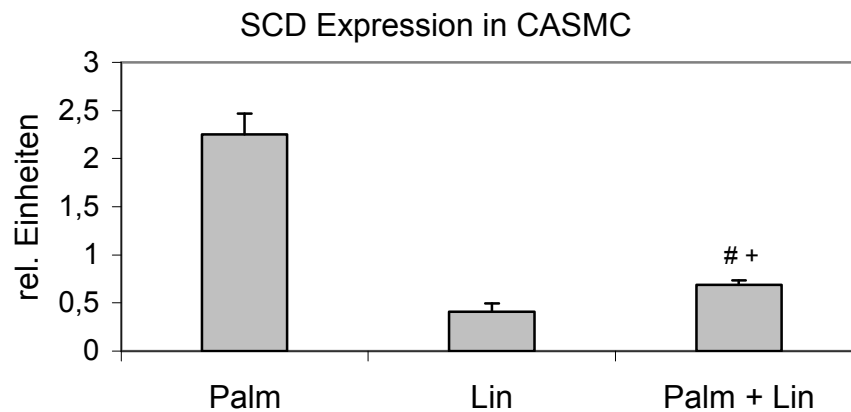


Abbildung 3.31: Darstellung der Expression von SCD in CASMC. Die auf die GAPDH-Expression bezogenen Werte für Palmitat, Linoleat bzw. Palmitat + Linoleat wurden durch die auf die GAPDH-Expression bezogenen Werte der Kontrollen BSA 1,25% bzw. BSA 2,5% geteilt (n = 3); Palm = Palmitat, Lin = Linoleat; # = p < 0,05 gegenüber Palmitat im zweiseitigen gepaarten t-Test; + = p < 0,001 gegenüber Linoleat im zweiseitigen gepaarten t-Test

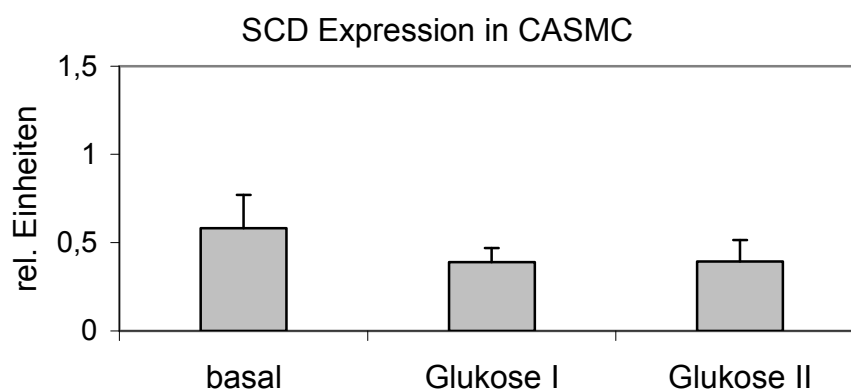


Abbildung 3.32: Darstellung der Expression von SCD in CASMC bezogen auf die GAPDH-Expression (n = 2) (Glukose I: 11 mmol/l, Glukose II: 30 mmol/l)

3.6.3 HepG2

Palmitat führte zu einer Steigerung der Expression der SCD auf etwa das 1,7 fache (Abb. 3.33, $n = 4$, $p < 0,01$ gegenüber BSA 1,25% im einseitigen gepaarten t-Test). Linoleat ergab selbst im einseitigen t-Test nur einen Trend (Abb. 3.33, $n = 4$, $p < 0,1$ gegenüber BSA 1,25%), die Expression wurde dabei im Schnitt nur um etwa ein Fünftel gesenkt. Palmitat + Linoleat kombiniert konnten die Expression der SCD auf etwa die Hälfte senken (Abb. 3.35, $n = 3$, $p < 0,01$ gegenüber BSA 2,5% im zweiseitigen gepaarten t-Test), dabei fand sich ein statistisch signifikant Unterschied zu Palmitat (Abb. 3.35, $n = 3$, $p < 0,05$ im zweiseitigen gepaarten t-Test). Die Versuche mit Glukose wurden nach zwei Messungen nicht weitergeführt. Es zeigte sich als Trend, dass die SCD-Expression etwa um ein Viertel durch Glukose II (11 mmol/l) gesenkt wurde (Abb. 3.36, $p < 0,1$ im Vergleich zu basal im zweiseitigen gepaarten t-Test).

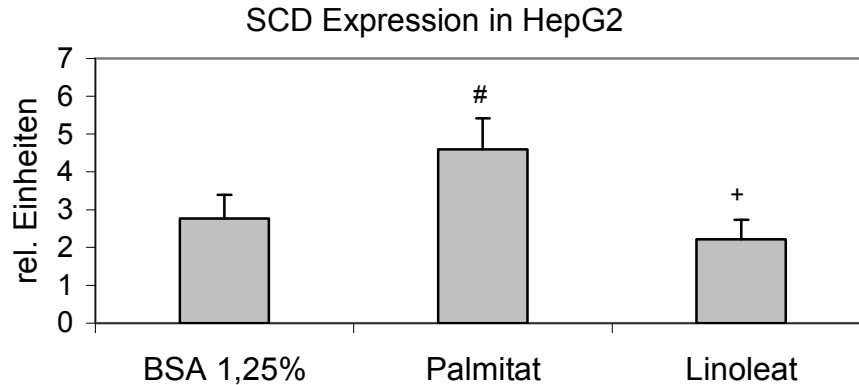


Abbildung 3.33: Darstellung der Expression von SCD in HepG2 bezogen auf die GAPDH-Expression ($n = 4$); # = $p < 0,01$ gegenüber BSA 1,25% im einseitigen gepaarten t-Test; + = $p < 0,1$ gegenüber BSA 1,25% im gleichen Test

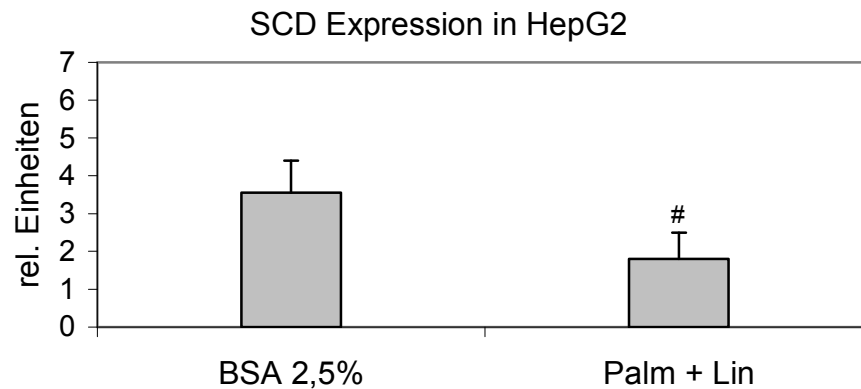


Abbildung 3.34: Darstellung der Expression von SCD in HepG2 bezogen auf die GAPDH-Expression (n = 3); Palm = Palmitat; Lin = Linoleat; # = p < 0,01 gegenüber BSA 2,5% im zweiseitigen gepaarten t-Test

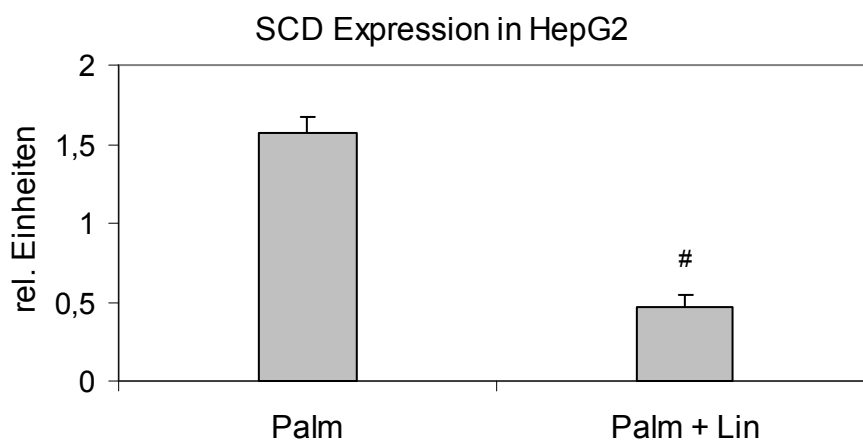


Abbildung 3.35: Darstellung der Expression von SCD in HepG2. Die auf die GAPDH-Expression bezogenen Werte für Palmitat bzw. Palmitat + Linoleat wurden durch die auf die GAPDH-Expression bezogenen Werte der Kontrollen BSA 1,25% bzw. BSA 2,5% geteilt (n = 3); Palm = Palmitat; Lin = Linoleat; # = p < 0,05 gegenüber Palmitat im zweiseitigen gepaarten t-Test

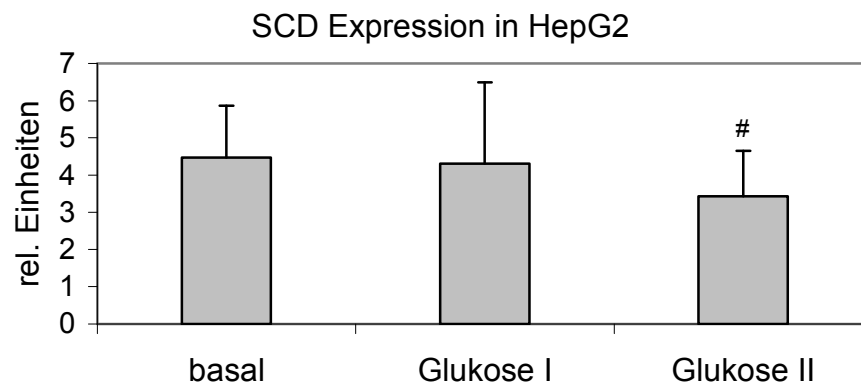


Abbildung 3.36: Darstellung der Expression von SCD in HepG2 bezogen auf die GAPDH-Expression (Glukose I: 11 mmol/l, n = 2; Glukose II: 31 mmol/l, n = 3); # = $p < 0,1$ gegenüber basal im zweiseitigen gepaarten t-Test

3.7 Übersicht über den Einfluss freier Fettsäuren auf die mRNA-Expression von PGC-1 α , IL-6, eNOS und SCD in CAEC, CASMC und HepG2-Zellen

Die folgende Tabelle (Tabelle 3.1) soll einen Überblick über die dargestellten Ergebnisse vermitteln. Da die Glukose-Ansätze zu keinen statistisch signifikanten Ergebnissen geführt haben, wurden sie in der Tabelle nicht berücksichtigt. Außerdem wurden die Ergebnisse zu Fetuin und PPAR γ nicht aufgenommen, weil bei Fetuin nur zwei Messungen erfolgten und die Versuche zu PPAR γ nicht weiterverfolgt wurden.

Tabelle 3.1: Übersicht über den Einfluss freier Fettsäuren auf die mRNA-Expression von PGC-1 α , IL-6, eNOS und SCD in CAEC, CASMC und HepG2-Zellen

Legende: Palm = Palmitat; Lin = Linoleat; P + L = Palmitat + Linoleat; – = keine Veränderung; \uparrow = Steigerung um mindestens das 1,3-fache gegenüber der Kontrolle; \downarrow = Senkung um mindestens 1/4 gegenüber der Kontrolle; $\uparrow\uparrow$ = Steigerung um mindestens das 5-fache gegenüber der Kontrolle; n. N. = unter Nachweisgrenze; Ergebnisse aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen; für alle Änderungen gilt $p < 0,05$;

Zellart	CAEC			CASMC			HepG2		
	Fettsäure	Palm	Lin	P + L	Palm	Lin	P + L	Palm	Lin
PGC-1 α	n. N.	n. N.	n. N.	n. N.	n. N.	n. N.	\uparrow	\uparrow	–
IL-6	$\uparrow\uparrow$	–	–	–	–	–	n. N.	n. N.	n. N.
eNOS	–	–	–	n. N.	n. N.	n. N.	n. N.	n. N.	n. N.
SCD	–	–	–	\uparrow	\downarrow	\downarrow	\uparrow	–	\downarrow

4 Diskussion

4.1 Einfluss von freien Fettsäuren und Glukose auf die mRNA-Expression von PPAR γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma) in den untersuchten Zellen

Nach ersten Messungen wurden die Versuche mit PPAR γ nicht weiterverfolgt. Der statistische Trend zu einer leichten Steigerung der PPAR γ -Expression durch Palmitat in HepG2-Zellen scheint biologisch kaum relevant zu sein. Selbst wenn Palmitat wirklich die Expression steigert, ist zu bezweifeln, ob daraus eine Zunahme des Proteins resultiert.

Um zu untersuchen, ob Effekte von Palmitat bzw. Linoleat auf die Expression anderer untersuchter Gene durch PPAR γ vermittelt sind, würde es sich anbieten, Antagonisten (z. B. GW0072) und Agonisten (z. B. Glitazone) einzusetzen (18).

4.2 Einfluss von freien Fettsäuren und Glukose auf die mRNA-Expression von PGC-1 α (PPAR γ Coactivator 1 α) in den untersuchten Zellen

Eine deutliche Expression von PGC-1 α konnte in HepG2-Zellen gemessen werden. Während in CAEC keine eindeutige Expression festgestellt werden konnte, war sie in CASMC so niedrig, dass eine Quantifizierung nicht sinnvoll schien. Das legt nahe, dass PGC-1 α in diesen vaskulären Zellen keine bedeutende Rolle spielt. Allerdings konnte in einer neueren Arbeit eine Expression von PGC-1 α in einigen Endothelzellen nachgewiesen werden (53), so dass sich entweder verschiedene Endothelzellen unter anderem durch die Expression von PGC-1 α unterscheiden oder die unterschiedlichen Ergebnisse methodisch bedingt sind.

Dass in CASMC, verglichen mit CAEC, überhaupt eine Expression gemessen werden konnte, könnte in dem höheren Energiebedarf glatter Muskelzellen liegen. Vielleicht spielt PGC-1 α ähnlich wie im Skelettmuskel (26) auch in den glatten Muskelzellen eine Rolle bei der Zelldifferenzierung.

In HepG2-Zellen steigerten Palmitat oder Linoleat die Expression um etwa das 1,5-fache, Glukose II (31 mmol/l) führte zu ebenfalls zu einer Steigerung, allerdings statistisch nur in Form eines Trends. Da PGC-1 α den oxidativen Stoffwechsel zumindest indirekt stimuliert (24), scheint es verständlich, dass seine Expression durch ein erhöhtes Angebot an Fettsäuren stimuliert wird. Es fällt aber auf, dass zwischen Palmitat und Linoleat kein Unterschied besteht.

Interessant ist, dass die Kombination aus Palmitat + Linoleat die Expression nicht beeinflusst hat. Eine gesicherte Erklärung hierfür existiert meines Wissens nicht. Es wäre aber denkbar, dass die Kombination aus gesättigter und ungesättigter Fettsäure direkt zu einer erhöhten Triglycerid-Synthese führt (vgl. 14), da die Leberzellen dafür über alle notwendigen Substrate verfügt. Einzelne Fettsäuren hingegen würden dem oxidativen Stoffwechsel, für den PGC-1 α nötig ist, zugeführt, da eine Triglycerid aus Palmitat bzw. Linoleat allein physikalisch ungünstige Eigenschaften haben könnte.

Da keine andere Gen-Expression im Rahmen dieser Arbeit sowohl durch Palmitat als auch durch Linoleat gesteigert wurde, ergibt sich kein Hinweis auf einen möglichen Einfluss von PGC-1 α auf die Expression anderer Gene.

4.3 Einfluss von freien Fettsäuren und Glukose auf die mRNA-Expression von Fetuin (α -Fetoprotein) in HepG2-Zellen

Die Fetuin-Expression wurde nur in HepG2-Zellen bestimmt. In diesen Zellen haben Palmitat, Linoleat sowie die Kombination aus beiden Fettsäuren die Expression von Fetuin in zwei Passagen nicht verändert. Mir ist aus der Literatur auch nur ein Zusammenhang zwischen diesen Fettsäuren und Fetuin bekannt: Fetuin ist Serum-Albumin sehr ähnlich, weist aber eine wesentlich höhere Affinität zu ungesättigten Fettsäuren auf (30).

Interessant ist, dass Glukose in zwei von drei gemessenen Passagen die Fetuin-Expression um etwa die Hälfte senken konnte. In Passage 1 hingegen konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden, so dass sich die Frage stellt, welche Ergebnisse für die Wirklichkeit repräsentativ sind (siehe Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Relative Expression von Fetuin in HepG2 bezogen auf basal, dabei wurden zur Berechnung jeweils die auf die GAPDH-Expression bezogenen Werte verwendet.

Legende: n. b = nicht bestimmt

	Passage 1	Passage 2	Passage 3
Glukose I (11 mmol/l)	129%	n. b.	44%
Glukose II (31 mmol/l)	88%	44%	59%

Immerhin könnte ein Senkung der Fetuin-Expression durch Glukose gut erklärt werden. Fetuin ist nämlich ein Inhibitor in der Insulin-Signalkaskade, Mäuse mit Fetuin-Knockout sind Insulin-sensitiver als solche ohne Knock-Out (32). Daher könnte es sinnvoll sein, wenn in Leberzellen bei erhöhter Glukose-Konzentration die Fetuin-Expression gesenkt würde und über eine erhöhte Insulin-Sensitivität der extrazellulären Glukosespiegel abgebaut würde. Aus diesem Blickwinkel heraus wäre es interessant, festzustellen, ob und welche Wirkung Glukose auf die Fetuin-Expression in Leberzellen hat. Bei der praktischen Durchführung wären osmotischen Kontrollen, etwa mit L-Glukose, nötig, um auszuschließen, dass mögliche Effekte nicht durch die Glukose selbst, sondern durch die höhere Osmolarität der Glukose-Ansätze bedingt sind. Außerdem wäre es wünschenswert, Leberzellen zu verwenden, die im Gegensatz zu HepG2-Zellen nicht neoplastisch verändert sind.

4.4 Einfluss von freien Fettsäuren und Glukose auf die mRNA-Expression von Interleukin-6 (IL-6) in den untersuchten Zellen

Sowohl in CAEC als auch in CASMC konnte eine Expression von Interleukin-6 gemessen werden, in HepG2-Zellen hingegen wurde keine eindeutige Expression festgestellt. Allerdings besteht in HepG2-Zellen grundsätzlich die Möglichkeit, Interleukin-6 zu exprimieren, etwa nach Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* (54).

In CAEC wurde die Expression von Interleukin-6 durch Palmitat stark gesteigert, in CASMC fand sich derselbe Effekt in deutlich geringerem Ausmaß

und verfehlte knapp die Kriterien der statistischen Signifikanz ($p = 0,05$). Linoleat hingegen zeigte keine Wirkung. In der Dissertation von Olga Hirschfeld-Kroll (siehe Kapitel 2.2.19) finden sich ähnliche Ergebnisse, allerdings hatte sie eine Steigerung der IL-6 Expression in CASMC auch durch Linoleat gemessen. Eine Zunahme der Expression durch Palmitat, nicht aber durch Linoleat, ist an anderer Stelle in der Literatur beschrieben (15). Interessant ist, dass der Kombinationsansatz aus Palmitat + Linoleat die Expression von Interleukin-6 gegenüber der Kontrolle nicht veränderte. Damit hebt Linoleat die Wirkung von Palmitat vollständig auf.

Es ist unklar, welcher molekulare Mechanismus dieser Wirkung zugrunde liegt. Bekannt ist, dass Oleat über die Bildung von Triglyceriden die schädliche Wirkung von Palmitat in Zellen aus Ovarien chinesischer Hamster verhindert (14). Allerdings fehlen bisher Anhaltspunkte dafür, dass auch in Endothelzellen relevante Mengen an Triglyceriden gebildet werden.

Hilfreich wäre, die Kaskade zu kennen, die zur Expression von Interleukin-6 nach Stimulation mit Palmitat führt. Aktivierung von PPAR und Ceramid-Bildung scheiden aus (15). In CAEC steigert eine Hemmung der Protein-Synthese die Expression von Interleukin-6 sowohl in Zellen, die mit Palmitat behandelt wurden, als auch in unbehandelten Zellen, so dass der Abbau eines aktiv gebildeten Repressor-Proteins nach Inkubation mit Palmitat vermutet wurde (15). Linoleat müsste demzufolge die Repression aufrechterhalten.

Eine Möglichkeit besteht darin, dass Linoleat PPAR α aktivieren und damit über eine Repression von NF- κ B die durch Palmitat induzierte Steigerung der IL-6 Expression hemmen könnte. Diese Hypothese basiert zum einen darauf, dass Linoleat ein bekannter Agonist von PPAR α ist (55). Zum anderen konnte gezeigt werden, dass zwar Interleukin-1 in glatten Gefäßmuskelzellen aus menschlicher Aorta die Interleukin-6 Produktion und die Cyclooxygenase-2 Expression steigert, dieser Effekt aber durch Aktivierung von PPAR α mit Fibraten verhindert wird. Zusätzlich findet sich eine Repression der NF- κ B Signalkaskade (56). PPAR α wird sowohl in CAEC als auch in CASMC exprimiert, wie Olga Hirschfeld-Kroll in ihrer Dissertation (siehe Kapitel 2.2.19) zeigen konnte. In Myotuben scheint eine Proteasomen-abhängige Aktivierung

von Nuclear Factor- κ B (NF- κ B), in Skelettmuskeln die Aktivierung von NF- κ B und von Proteinkinase C eine Rolle bei der Induktion von Interleukin-6 durch Palmitat zu spielen (36, 57).

Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten einen Mechanismus widerspiegeln, wie ungesättigte Fettsäuren auf molekularer Ebene vasoprotektiv wirken. Linoleat senkt das Risiko, eine koronare Herzerkrankung zu erleiden (16). Gleichzeitig weiß man, dass eine erhöhte IL-6 Konzentration im Blut zumindest ein Epiphänomen der Arteriosklerose ist (58). Zwar besteht generell ein Unterschied zwischen dem Fettsäuremuster der zugeführten Nahrung und dem Muster im Blut, das unter anderem durch die Stoffwechselfvorgänge in der Leber geprägt wird. Da Linoleat aber eine essenzielle Fettsäure ist, muss zumindest ein gewisser Teil aus der Nahrung unverändert in den Systemkreislauf gelangen. Dabei wird zu bestimmen sein, inwieweit Linoleat auch in physiologischeren Konzentrationen die IL-6 Induktion durch Palmitat hemmen kann. Zugleich stellt sich die Frage, in welchem Maße Versuche mit einer einzigen Fettsäure die physiologische Situation widerspiegeln, findet sich im Blut doch immer auch eine hohe Konzentration an ungesättigten Fettsäuren.

4.5 Einfluss von freien Fettsäuren und Glukose auf die mRNA-Expression von eNOS (Endothelial Nitric Oxide Synthase) in den untersuchten Zellen

Erwartungsgemäß konnte nur in CAEC eine zwar geringe, aber klare Expression gemessen werden. In HepG2-Zellen waren die Messwerte am Lightcycler so niedrig, dass eine Quantifizierung nicht sinnvoll war, in CASMC konnte keine eindeutige Expression festgestellt werden. In CAEC konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Ansätzen nachgewiesen werden.

Die ersten zwei Passagen schienen eine Steigerung der eNOS-Expression durch Glukose anzudeuten. In der Literatur zeigt sich bei der Wirkung von Glukose auf die eNOS-Expression die Komplexität ihrer Regulation. Hohe Glukose-Konzentrationen steigern in BAEC (bovine aortic endothelial cells)

zwar sowohl die mRNA-Expression als auch die Protein-Synthese von eNOS, führen aber zur einer verminderten NO- und einer erhöhten O_2^- -Konzentration (59). In CAEC hingegen führte eine Inkubation mit einer hohen Glukose-Konzentration über 7 Tage zu einer Senkung der eNOS-Proteinmenge (60). Vor diesem Hintergrund wurde die Wirkung von Glukose auf die eNOS-Expression nicht weiterverfolgt.

Bei Linoleat ergab sich keine signifikante Veränderung der mRNA-Expression. Da sich aber nur in der ersten Passage eine minimale Reduktion, in den übrigen 5 Passagen dagegen eine zum Teil sehr deutliche Zunahme der Expression fand, kann man wohl davon ausgehen, dass sich eine statistische Signifikanz bei einer Erhöhung der Versuchszahl einstellen würde. Dabei wäre natürlich noch vollkommen offen, ob aus einer vermehrten Expression eine vermehrte Protein-Synthese und daraus wiederum eine Steigerung der NO-Produktion resultieren würde. In Endothelzellen aus Lungenarterienzellen steigert Linoleat die eNOS-Aktivität (61), eine andere Arbeit hat aber gezeigt, dass Oleat oder Linoleat die NOS-Aktivität in Endothelzellen aus Rinder-Lungenarterien senken (62).

4.6 Einfluss von freien Fettsäuren und Glukose auf die mRNA-Expression von Stearoyl-CoA-Desaturase (SCD) in den untersuchten Zellen

In allen drei Zelltypen konnte eine deutliche Expression von SCD gefunden werden.

In CAEC fand sich kein statistisch signifikanter Effekt. Für die Senkung der Gen-Expression durch Linoleat, die Olga Hirschfeld-Kroll in ihrer Dissertation (siehe Kapitel 2.2.19) gefunden hatte, fand sich selbst im einseitigen t-Test nur ein Trend. Dagegen steigerte in CASMC Palmitat die Expression, Linoleat senkte sie stärker als Palmitat + Linoleat. Hier konnten die Ergebnisse von Olga Hirschfeld-Kroll bestätigt werden. In HepG2-Zellen konnte Palmitat die Expression ebenfalls steigern, während die Kombination aus Palmitat + Linoleat sie senkte. Diese Effekte waren untereinander und gegenüber der Kontrolle statistisch signifikant. Außerdem ergab sich in HepG2 ein Trend zu einer

Senkung der Expression durch Glukose II (31 mmol/l). In der Dissertation von Olga Hirschfeld-Kroll hat Palmitat in HepG2-Zellen eine ähnliche Wirkung wie in dieser Arbeit gezeigt, Linoleat aber eine Senkung der SCD-Gen-Expression bewirkt. Letzteres konnte in der vorliegenden Arbeit ähnlich wie bei den CAEC nicht bestätigt werden.

Dabei fällt auf, dass die Effekte in HepG2 und in CASMC, wenn vorhanden, in dieselbe Richtung weisen. Interessant ist, dass in HepG2 Linoleat keinen Effekt, die Kombination aus Palmitat + Linoleat aber zu einer starken Senkung führte. Aus den Ergebnissen lässt sich allerdings vermuten, dass auch Linoleat zu einer statistisch signifikanten Senkung geführt hätte, wie sie auch Olga Hirschfeld-Kroll in ihrer Arbeit (siehe Kapitel 2.29) festgestellt hat, wenn die Zahl der Versuch gesteigert worden wäre.

Es ist unklar, auf welchem Weg die Kombination aus Palmitat + Linoleat zu einer Senkung der mRNA-Expression führt. Es ist möglich, dass durch die Kombination kein neuer Mechanismus in Gang gesetzt wird, sondern Linoleat einen stärkeren Effekt ausübt als Palmitat. Linoleat senkt die SCD-Promoter-Aktivität, wahrscheinlich über Aktivierung eines SREBPs (Sterol Regulatory Element-Binding Proteins) (48). Es ist unklar, wie Palmitat die SCD-Expression steigert. Da von Stearat eine Steigerung der SCD-Promoter-Aktivität berichtet wurde (48), kann für Palmitat ein ähnlicher Mechanismus vermutet werden. Eine weitere Erklärung für die Senkung der Expression durch Palmitat + Linoleat könnte darin liegen, dass Linoleat zu einem erhöhten Abbau der SCD-mRNA führt. Aus 3T3-L1-Adipozyten ist nämlich bekannt, dass mehrfach ungesättigte Fettsäuren die scd1-mRNA-Stabilität verringern (63).

Aus diesen Ergebnissen könnten sich neue Einsichten ergeben, mit welchen Mechanismen ungesättigte Fettsäuren die Effekte gesättigter Fettsäuren und damit ihre potentiell schädliche Wirkung aufheben. Schließlich kann durch eine Verringerung der SCD-Aktivität im Mausmodell erreicht werden, dass negative Folgen von Ernährungs-bedingtem Übergewicht wie Leberzellverfettung und erhöhte postprandiale Insulin-Blutspiegel abgemildert werden (51).

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl Palmitat als auch Linoleat, nicht aber die Kombination aus diesen beiden Fettsäuren, die mRNA-Expression von PGC-1 α (Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma Coactivator 1 α) in HepG2-Zellen steigern. In CASMC (coronary artery smooth muscle cells) und CAEC (coronary artery endothelial cells) bewirkt die Inkubation von Linoleat zusätzlich zu Palmitat, dass die Palmitat-Induzierte Steigerung der mRNA-Expression von Interleukin-6 verhindert wird. Ein Einfluss von Palmitat, Linoleat oder Glukose konnte weder auf die Gen-Expression von Fetuin noch auf die Gen-Expression der eNOS (Endothelial Nitric Oxide Synthase) nachgewiesen werden. Während Palmitat in CASMC und HepG2-Zellen die mRNA-Expression der SCD (Stearoyl-CoA-Desaturase) steigert, Linoleat sie hingegen in CASMC senkt, bewirkt die Kombination von Palmitat + Linoleat sowohl in HepG2-Zellen als auch in CASMC eine Senkung der mRNA-Expression.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Blutkonzentration freier Fettsäuren über eine Änderung der Gen-Expression von PGC-1 α , Interleukin-6 und der SCD Einfluss auf Entstehung, Ausprägungsgrad oder Prävention des metabolischen Syndroms hat. Wenig Beachtung hat dabei bisher die erstaunlich hohe mRNA-Expression der SCD, also eines Enzyms des Fettsäure-Metabolismus, in Endothelzellen gefunden. Sie könnte ein Hinweis auf eine bisher unbekannte Rolle des Endothels im Lipid-Stoffwechsel sein. Darüber hinaus legt die Zusammenschau der Ergebnisse nahe, dass die mRNA-Expression wichtiger Gene weniger von einzelnen freien Fettsäuren, sondern auf komplexe Weise durch die Kombination verschiedener freier Fettsäuren gesteuert wird. Dadurch werden neue experimentelle Ansätze nötig, die die Fettsäure-Muster, die sich bei verschiedenen physiologischen und pathologischen Zuständen finden, nachahmen und deren Wirkung auf die Gen-Expression und Protein-Synthese bestimmen.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Eckel, R.H., Grundy, S.M., Zimmet, P.Z. (2005) The metabolic syndrome, *Lancet* 365, 1415-1428
- 2 Reaven G.M. (2005) The Metabolic Syndrome: Requiescat in Pace, *Clin Chem* 51, 931-938
- 3 Zimmet P., Alberti K.G.M.M., Shaw J. (2001) Global and societal implications of the diabetes epidemic, *Nature* 414, 782-787
- 4 Kopelman P.G. (2000) Obesity as a medical problem, *Nature* 404, 635-643
- 5 Tesfaye S., Chaturvedi N., Eaton S.E., Ward J.D., Manes C., Ionescu-Tirgoviste C., Witte D.R., Fuller J.H., EURODIAB Prospective Complications Study Group (2005) Vascular risk factors and diabetic neuropathy. *N Engl J Med* 352, 341-350
- 6 Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993) The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus, *N Engl J Med* 329, 977-986
- 7 Tuomilehto J., Lindstrom J., Eriksson J.G., Valle T.T., Hamalainen H., Ilanne-Parikka P., Keinanen-Kiukaanniemi S., Laakso M., Louheranta A., Rastas M., Salminen V., Uusitupa M. (2001) Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance, *N Engl J Med* 344, 1343-1350
- 8 Knowler W.C., Barrett-Connor E., Fowler S.E., Hamman R.F., Lachin J.M., Walker E.A., Nathan D.M. (2002) Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin, *N Engl J Med* 346, 393-403
- 9 Bays H., Mandarino L., DeFronzo R.A. (2004) Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach, *J Clin Endocrinol Metab* 89, 463-78
- 10 Hansen T. (2002) Genetics of Type 2 diabetes, *Curr Sci* 83,1477-1482
- 11 Maedler K., Oberholzer J., Bucher P., Spinass G.A., Donath M.Y. (2003) Monounsaturated Fatty Acids Prevent the Deleterious Effects of Palmitate and High Glucose on Human Pancreatic β -Cell Turnover and Function, *Diabetes* 52, 726-733
- 12 Moeschel K., Beck A., Weigert C., Lammers R., Kalbacher H., Voelter W., Schleicher E.D., Häring H.U., Lehmann R. (2004) Protein kinase C- ζ -induced phosphorylation of Ser318 in insulin receptor substrate-1 (IRS-1) attenuates the interaction with the insulin receptor and the tyrosine phosphorylation of IRS-1 *J Biol Chem* 279, 25157-25163
- 13 Shinozaki K, Kashiwagi A, Masada M, Okamura T (2003) Stress and vascular responses: oxidative stress and endothelial dysfunction in the insulin-resistant state, *J Pharmacol Sci* 91, 187-191
- 14 Listenberger L.L., Han X., Lewis S.E., Cases S., Farese R.V., Ory D.S., Schaffer J.E. (2003) Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3077-3082
- 15 Staiger H., Staiger K., Stefan N., Wahl H.G., Machicao F., Kellner M., Häring H.U. (2004) Palmitate-induced interleukin-6 expression in human

- coronary artery endothelial cells, *Diabetes* 53, 3209-3216
- 16 National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult treatment Panel III) (2002) Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report, *Circulation* 106, 3143-3421
 - 17 Zimmet P.Z. (1999) Diabetes epidemiology as a tool to trigger diabetes research and care, *Diabetologia* 42, 499-518
 - 18 Berger J., Moller D.E. (2002) The mechanisms of action of PPARs, *Annu Rev Med* 53, 409-35
 - 19 Yki-Järvinen H. (2004) Thiazolidinediones, *N Engl J Med* 351, 1106-1118
 - 20 Stumvoll M., Wahl H.G., Loblein K., Becker R., Machicao F., Jacob S., Haring H. (2001) Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene is associated with increased antilipolytic insulin sensitivity, *Diabetes* 50, 876-881
 - 21 Marx N., Duez H., Fruchart J.C., Staels B. (2004) Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells, *Circ Res* 94, 1168-78
 - 22 Theocharis S., Margeli A., Vielh P., Kouraklis G. (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands as cell-cycle modulators, *Cancer Treat Rev* 30, 545-54
 - 23 Bruemmer D., Yin F., Liu J., Berger J.P., Sakai T., Blaschke F., Fleck E., Van Herle A.J., Forman B.M., Law R.E. (2003) Regulation of the growth arrest and DNA damage-inducible gene 45 (GADD45) by peroxisome proliferator-activated receptor gamma in vascular smooth muscle cells, *Circ Res* 93, e38-e47
 - 24 Puigserver P., Spiegelman B.M. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 alpha (PGC-1 α): transcriptional coactivator and metabolic regulator, *Endocr Rev* 24, 78-90
 - 25 Rhee J., Inoue Y., Yoon J.C., Puigserver P., Fan M., Gonzalez F.J., Spiegelman B.M. (2003) Regulation of hepatic fasting response by PPAR γ coactivator-1alpha (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4alpha in gluconeogenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4012-4017
 - 26 Lin J., Wu H., Tarr P.T., Zhang C.Y., Wu Z., Boss O., Michael L.F., Puigserver P., Isotani E., Olson E.N., Lowell B.B., Bassel-Duby R., Spiegelman B.M. (2002) Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres, *Nature* 418, 797-801
 - 27 Patti M.E., Butte A.J., Crunkhorn S., Cusi K., Berria R., Kashyap S., Miyazaki Y., Kohane I., Costello M., Saccone R., Landaker E.J., Goldfine A.B., Mun E., DeFronzo R., Finlayson J., Kahn C.R., Mandarino L.J. (2003) Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8466-8471
 - 28 Shuldiner A.R., McLenithan J.C. (2004) Genes and pathophysiology of type 2 diabetes: more than just the Randle cycle all over again; *J Clin Invest* 114;

- 1414-1417
- 29 Cunniff C., American Academy of Pediatrics Committee on Genetics (2005) Prenatal screening and diagnosis for pediatricians, *Pediatrics* 114, 889-94
 - 30 Lazarevich NL (1999) Molecular mechanisms of alpha-fetoprotein gene expression, *Biochemistry (Mosc)* 65, 117-33
 - 31 Di Bisceglie A.M. (2004) Issues in screening and surveillance for hepatocellular carcinoma, *Gastroenterology* 127, 104-7
 - 32 Mathews S.T., Singh G.P., Ranalletta M., Cintron V.J., Qiang X., Goustin A.S., Jen K.L., Charron M.J., Jahnen-Dechent W., Grunberger G. (2002) Improved insulin sensitivity and resistance to weight gain in mice null for the Ahsg gene, *Diabetes* 51, 2450-2458
 - 33 Febbraio M.A., Pedersen B.K. (2002) Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles, *FASEB J* 16, 1335-1347
 - 34 Steensberg A. (2003) The role of IL-6 in exercise-induced immune changes and metabolism, *Exerc Immunol Rev* 9, 40-47
 - 35 Pickup J.C., Mattock M.B., Chusney G.D., Burt D. (1997) NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X, *Diabetologia* 40, 1286-1292
 - 36 Weigert C., Brodbeck K., Staiger H., Kausch C., Machicao F., Haring H.U., Schleicher E.D. (2004) Palmitate, but not unsaturated fatty acids, induces the expression of interleukin-6 in human myotubes through proteasome-dependent activation of nuclear factor-kappaB, *J Biol Chem* 279, 23942-23952
 - 37 Michel T. (1999) Targeting and translocation of endothelial nitric oxide synthase, *Braz J Med Biol Res* 32, 1361-1366
 - 38 Li H., Förstermann U. (2000) Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease, *J Pathol* 190, 244-254
 - 39 Kawashima S. (2004) Malfunction of vascular control in lifestyle-related diseases: endothelial nitric oxide (NO) synthase/NO system in atherosclerosis, *J Pharmacol Sci* 96, 411-419
 - 40 Shinozaki K., Ayajiki K., Kashiwagi A., Masada M., Okamura T. (2004) Malfunction of vascular control in lifestyle-related diseases: mechanisms underlying endothelial dysfunction in the insulin-resistant state, *J Pharmacol Sci* 96, 401-405
 - 41 Spence M.S., McGlinchey P.G., Patterson C.C., Allen A.R., Murphy G., Bayraktutan U., Fogarty D.G., Evans A.E., McKeown P.P. (2004) Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and ischemic heart disease, *Am Heart J* 148, 847-851
 - 42 Cho D.H., Choi Y.J., Jo S.A., Jo I. (2004) Nitric oxide production and regulation of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by prolonged treatment with troglitazone: evidence for involvement of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma-dependent and PPARgamma-independent signaling pathways, *J Biol Chem* 279, 2499-2506
 - 43 Ntambi J.M. (1999) Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol, *J Lipid Res* 40, 1549-1558
 - 44 Nakamura M.T., Nara T.Y. (2004) Structure, function, and dietary regulation

- of $\Delta 6$, $\Delta 5$, and $\Delta 9$ desaturases, *Annu Rev Nutr* 24, 345-376
- 45 Ntambi J.M., Miyazaki M. (2004) Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism, *Prog Lipid Res* 43, 91-104
 - 46 Scaglia N., Igal R.A. (2005) Stearoyl-CoA desaturase is involved in the control of proliferation, anchorage-independent growth and survival in human transformed cells, *J Biol Chem* 280, 25339-49
 - 47 Miyazaki M., Dobrzyn A., Sampath H., Lee S.H., Man W.C., Chu K., Peters J.M., Gonzalez F.J., Ntambi J.M. (2004) Reduced adiposity and liver steatosis by stearoyl-CoA desaturase deficiency are independent of peroxisome proliferator-activated receptor- α , *J Biol Chem* 279, 35017-35024
 - 48 Zhang L., Ge L., Tran T., Stenn K., Prouty S.M. (2001) Isolation and characterization of the human stearoyl-CoA desaturase gene promoter: requirement of a conserved CCAAT cis-element, *Biochem J* 357, 183-193
 - 49 Heinemann F.S., Ozols J. (1998) Degradation of stearoyl-coenzyme A desaturase: endoproteolytic cleavage by an integral membrane protease, *Mol Biol Cell* 9, 3445-3453
 - 50 Cohen P., Friedman J.M. (2004) Leptin and the control of metabolism: role for stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1), *J Nutr* 134, 2455S-2463S
 - 51 Jiang G., Li Z., Liu F., Ellsworth K., Dallas-Yang Q., Wu M., Ronan J., Esau C., Murphy C., Szalkowski D., Bergeron R., Doebber T., Zhang B.B. (2005) Prevention of obesity in mice by antisense oligonucleotide inhibitors of stearoyl-CoA desaturase-1, *J Clin Invest* 115, 1030-1038
 - 52 Riserus U., Tan G.D., Fielding B.A., Neville M.J., Currie J., Savage D.B., Chatterjee V.K., Frayn K.N., O'Rahilly S., Karpe F. (2005) Rosiglitazone Increases Indexes of Stearoyl-CoA Desaturase Activity in Humans: Link to Insulin Sensitization and the Role of Dominant-Negative Mutation in Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ , *Diabetes* 54, 1379-1384
 - 53 Valle I., Alvarez-Barrientos A., Arza E., Lamas S., Monsalve M. (2005) PGC-1 α regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells, *Cardiovasc Res* 66, 562-573
 - 54 Bouwman J.J., Visseren F.L., Bouter P.K., Diepersloot R.J. (2004) Azithromycin inhibits interleukin-6 but not fibrinogen production in hepatocytes infected with cytomegalovirus and chlamydia pneumoniae, *J Lab Clin Med* 144, 18-26
 - 55 Kersten S., Desvergne B., Wahli W. (2000) Roles of PPARs in health and disease, *Nature* 405, 421-424
 - 56 Staels B., Koenig W., Habib A., Merval R., Lebret M., Torra I.P., Delerive P., Fadel A., Chinetti G., Fruchart J.C., Najib J., Maclouf J., Tedgui A. (1998) Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPAR α but not by PPAR γ activators, *Nature* 393, 790-793
 - 57 Jove M., Planavila A., Laguna J.C., Vazquez-Carrera M. (2005) Palmitate-induced Interleukin 6 Production is mediated by Protein Kinase C and Nuclear-Factor κ B Activation and Leads to GLUT4 Downregulation in Skeletal Muscle Cells, *Endocrinology* 146, 3087-95
 - 58 Hansson G.K. (2005) Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease, *N Engl J Med* 352, 1685-1695

- 59 Ding Q.F., Hayashi T., Packiasamy A.R., Miyazaki A., Fukatsu A., Shiraishi H., Nomura T., Iguchi A. (2004) The effect of high glucose on NO and O₂⁻ through endothelial GTPCH1 and NADPH oxidase, *Life Sci* 75, 3185-3194
- 60 Ding Y., Vaziri N.D., Coulson R., Kamanna V.S., Roh D.D. (2000) Effects of simulated hyperglycemia, insulin, and glucagon on endothelial nitric oxide synthase expression, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279, E11-E17
- 61 Meerarani P., Smart E.J., Toborek M., Boissonneault G.A., Hennig B. (2003) Cholesterol attenuates linoleic acid-induced endothelial cell activation, *Metabolism* 52, 493-500
- 62 Davda R.K., Stepniakowski K.T., Lu G., Ullian M.E., Goodfriend T.L., Egan B.M. (1995) Oleic acid inhibits endothelial nitric oxide synthase by a protein kinase C-independent mechanism, *Hypertension* 26, 764-770
- 63 Sessler A.M., Kaur N., Palta J.P., Ntambi J.M. (1996) Regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 mRNA stability by polyunsaturated fatty acids in 3T3-L1 adipocytes, *J Biol Chem* 271, 29854-29858

Danksagung

Herzlich danke ich allen, die mich bei dieser Doktorarbeit so hilfsbereit und tatkräftig unterstützt haben.

Besonders danke ich meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Schleicher, für die Überlassung der Fragestellung, die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und die Begleitung dieser Arbeit.

Der Dank hierfür gilt auch meinem Betreuer, Herrn Dr. Machicao, der mir für meine Fragen immer zur Verfügung stand.

Herrn Dr. Staiger danke ich für die Hilfe bei der praktischen Umsetzung der Experimente.

Bei Herrn Dr. Tschritter bedanke ich mich für die ausführliche Beratung zur statistischen Auswertung der Daten.

Mein Dank gilt außerdem Frau Guirguis, Frau Haas, Frau Peterfi und Frau Weisser für die Einführung in die Laborarbeit und die tägliche Unterstützung darin.

Lebenslauf

Person:

Name	Philipp Ludwig Lutz
Geburtsdatum	17.7.1980
Geburtsort	Stuttgart
Eltern	Dr. med. Hans-Georg Lutz, Facharzt für Innere Medizin Dr. med. Ulrike Lutz, geb. Schaal, Fachärztin für Allgemeinmedizin
Geschwister	Friederike Lutz, geb. 1984

Schulausbildung:

1987 – 1991	Grundschule Sonnenhalde Konstanz
1991 – 2000	Heinrich-Suso-Gymnasium Konstanz
26.6.2000	Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

3.7.2000 - 31.5.2001	Zivildienst in den Kliniken Schmieder Konstanz
----------------------	--

Studium:

Oktober 2001	Beginn des Studiums der Humanmedizin in Homburg an der Universität des Saarlandes
17.9.2003	Ärztliche Vorprüfung
Oktober 2003	Wechsel an die Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen
6.6.2008	Ärztliche Prüfung (2. Staatsexamen)