

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin IV

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.-U. Häring

**Die Wirkung von Palmitat und Linoleat auf die
Genexpression in humanen Fibroblasten,
Hepatocyten, Endothel- und glatten
Gefäßmuskelzellen aus Koronararterien.**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
OLGA HIRSCHFELD-KROLL,
geb. HIRSCHFELD
aus
Wladiwostok / Russland**

2005

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. E. Schleicher

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. R. Riessen

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das metabolische Syndrom	2
1.2 Genetische Prädisposition	2
1.3 Freie Fettsäuren	2
1.4 Ziel der Arbeit	6
2. Material und Methoden	7
2.1 Untersuchungsmaterial	7
2.2 Geräte und Chemikalien	7
2.2.1 Geräte	7
2.2.2 Chemikalien	9
2.3 Methoden	10
2.3.1 Zusammenfassung der Methoden	10
2.3.2 Zellkulturplan	11
2.3.2.1 Fibroblasten (FB)	11
2.3.2.2 Koronararterien-Endothelzellen (CAEC)	11
2.3.2.3 Glatte Gefäßmuskelzellen aus Koronararterien (CASMC)	12
2.3.2.4 Hepatocyten (HepG2)	12
2.3.3 Passagieren von Zellen	13
2.3.4 Behandlung von Zellkultur mit Fettsäuren	13
2.3.5 Lysieren der Zellen	14
2.3.6 RNA-Isolierung	14
2.3.7 Umschreiben von RNA in cDNA	15
2.3.8 Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	16
2.3.8.1 Prinzip der Reaktion	16
2.3.8.2 Die LightCycler- PCR (LC-PCR)	17
2.3.8.3 Durchführung der LC-PCR	17
2.3.8 Agarosegelelektrophorese von DNA	21

3. Ergebnisse	22
3.1 Vorgehen bei der Ermittlung der Ergebnisse	22
3.2 Ermittelte Ergebnisse	27
3.2.1 Delta 9-Desaturase	27
3.2.2 PPAR alpha	32
3.2.3 PPAR gamma	37
3.2.4 FATP-1	42
3.2.5 CD 36	47
3.2.6 Interleukin-6	52
3.2.7 Humane glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (HumGlyc)	56
3.3 Gesamtergebnisse	61
3.4 Ergebnisse der Identifizierung von DNA mittels Agarosegelelektrophorese	65
4. Diskussion	68
4.1 Erforschung der Bedeutung von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren	68
4.2 Diskussion der Versuchsergebnisse	69
4.2.1 Delta 9-Desaturase	69
4.2.2 PPARs	70
4.2.3 Transportproteine FATP-1 und CD 36	71
4.2.4 Interleukin-6	73
4.3 Schlussfolgerung aus der Arbeit	75
5. Zusammenfassung	76
6. Literaturliste	78
7. Abkürzungsverzeichnis	86
8. Danksagung	87
9. Lebenslauf	88

1. Einleitung

1.1 Das metabolische Syndrom

Das metabolische Syndrom, auch „Insulinresistenzsyndrom“ oder „Syndrom X“ genannt, umfasst eine Reihe von Funktionsstörungen wie Adipositas, Insulinresistenz, Hypertonie, Dyslipidämie, endotheliale Dysfunktion und Artherosklerose. All diese Symptome haben eine heterogene genetische Basis und scheinen sehr eng miteinander verbunden zu sein. Zusammen stellen sie ein dramatisch erhöhtes kardiovaskuläres Risiko dar (24, 50).

Es gilt heute als unumstritten, dass das metabolische Syndrom eine starke genetische Prädisposition aufweist. Jedoch bestätigen sowohl der Hinweis auf „Gen-Umwelt-Interaktionen“ als auch rezente Präventionsstudien die entscheidende Bedeutung erworbener Faktoren für die Entstehung von Adipositas und Typ-2-Diabetes. Der Anstieg der Diabetes-Prävalenz der letzten Jahrzehnte ist mit verminderter körperlicher Aktivität, hyperkalorischer Ernährung sowie Gewichtszunahme assoziiert. Konsequenterweise nimmt daher die Prävalenz von Adipositas und Typ-2-Diabetes in den letzten Jahren schon im Jugendalter zu. Generell wird die Zahl der Typ-2-Diabetes Kranken im Jahre 2020 weltweit auf ungefähr 250 Millionen geschätzt (44).

Insgesamt führt eine Zunahme des Fettgewebes also zu einem vermehrten Insulinbedarf durch eine verschlechterte Insulinwirkung. Diese beruht auf einer Erhöhung der freien Fettsäuren und einer Zunahme von Entzündungsmediatoren im Blut, die ebenfalls u.a. aus den Fettzellen zu stammen scheinen. Gleichzeitig werden die Insulinproduktion und die Insulinfreisetzung sowohl durch die freien Fettsäuren direkt als auch durch weitere Fettzellhormone gestört. Dadurch entsteht eine verminderte Leistungsfähigkeit der beta-Zellen, die dem zunehmenden Bedarf an Insulin nicht mehr gerecht werden können. Es kommt zunächst zu einem relativen Insulinmangel, der sich vor allem zu Zeiten hohen Insulinbedarfs, also nach den Mahlzeiten, manifestiert. Dieses Phänomen wird als gestörte Glukosetoleranz im oralen Glukosetoleranztest erfasst.

1.2 Genetische Prädisposition

Bestimmte Populationen wie Pima-Indianer und Bewohner pazifischer und asiatischer Inseln weisen ein massiv erhöhtes Risiko für Adipositas und Typ-2-Diabetes auf. Aber auch in Europa und Nordamerika haben eineiige Zwillinge und Nachkommen von Typ-2-Diabetikern ein Risiko von ca. 50% bzw. 40–80%, einen Typ-2-Diabetes zu entwickeln. Mutationen bestimmter Gene der Insulin-Signalübertragung (IRS-1, IRS-2, PI3 kinase), der Gentranskription (Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma (PPAR- γ), der Adipokine (Interleukin-6 (-174) G/C-, TNF- promoter Polymorphismus), ATP-abhängiger Kanäle (Kir 6.2) sowie des Calpain-10 Gens (CAPN10)) werden nach Befunden neuer Studien mit Insulinresistenz bzw. Typ-2-Diabetes assoziiert (14, 16, 24, 42, 55, 64, 65).

Der Pro12Ala-Polymorphismus wird sowohl mit Adipositas, als auch mit der Funktion des Fettgewebes und Insulinwirkung in Verbindung gebracht. Interessant ist, dass die klinische Auswirkung des Pro12Ala-Polymorphismus auf eine Population erst durch andere Faktoren bestimmt wird, im Fall der Adipositas z.B. durch andere Gene oder durch das Verhältnis von gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren in der Ernährung. Dies gilt als Beispiel einer „Gen-Umwelt-Interaktion“. Dementsprechend, ist die klinische Manifestation des Typ-2-Diabetes das Produkt von Genen, die primär defekt sind, aber auch von Genen, die sekundär in ihrer Expression durch die initiierten, pathophysiologisch relevanten Mechanismen verändert werden.

1.3 Freie Fettsäuren

Die zentrale Rolle des Fettgewebes für die Insulinresistenz wird durch seine metabolische und endokrine Aktivität erklärt. Bei absolutem oder relativem Insulinmangel sekretieren die Adipocyten freie Fettsäuren (Lipolyse), deren Rolle als Mediator der Insulinresistenz seit langem bekannt und einigermassen unumstritten ist (50). Bei Adipositas und Typ-2-Diabetes sind die Plasmakonzentrationen freier Fettsäuren erhöht und korrelieren sogar mit dem Risiko der Manifestation des Typ-2-Diabetes.

Studien von Boden (7, 8, 9), Shulman (56) und Roden (51) haben in den letzten Jahren versucht, den Mechanismus der freien Fettsäuren am Menschen Insulinresistenz auszulösen, ausführlich zu untersuchen. Dabei wurde gezeigt, dass FFAs die Insulinwirkung an Muskel und Leber hemmen. Im Muskel werden Glukoseaufnahme und -speicherung reduziert, während in der Leber die Glukoseneubildung stimuliert wird.

Die Fettsäuren wirken ungünstig auch auf die insulin-produzierenden Zellen der Bauchspeicheldrüse - die beta-Zellen in den Langerhansschen Inseln. Sie verändern in den beta-Zellen das Programm der Insulinproduktion und der Insulinfreisetzung auf einen Glukosereiz. Erhöhte Fettsäuren steigern die basale Insulinfreisetzung aus den beta-Zellen, ohne die Produktionsrate des Insulins zu erhöhen. Gleichzeitig vermindern freie Fettsäuren das Ansprechen der beta-Zellen auf Glukose (3, 9). Sie fördern also eine Dysfunktion der beta-Zellen.

Darüber hinaus kann die langfristige Lipidexposition die Fibrinolyse und die Endothelfunktion beeinträchtigen und dadurch zur Entstehung der Atherosklerose beitragen. Diese Veränderungen („Lipotoxizität“) betreffen auch adipöse Patienten mit Risiko für Typ-1-Diabetes, der autoimmunologisch bedingt ist, sie beschleunigen somit die Manifestation der Erkrankung bei entsprechender Fehlernährung.

Die Effekte der Fettsäuren sind nicht nur von der Menge, sondern auch von ihrer Qualität abhängig, wobei besonders gesättigte Fettsäuren (z.B. Palmitat) nachteilig sein sollen. Untersuchungen an Ovarzellen von chinesischen Hamstern, mikrovaskulären Endothelzellen und Pericyten der Retina ergaben, dass Palmitat, jedoch nicht Linoleat, die Apoptose induzieren können, indem sie intrazelluläre Formation von ROS (reaktiv oxygen species) vergrößern (38,70). Auch in beta-Zellen der Pankreas wurde die apoptotische Wirkung von Palmitat nachgewiesen. Hier wird die Ursache in der Aktivierung von Protein Kinase C delta (PKC- δ) vermutet (20).

In letzter Zeit wurde nachgewiesen, dass Fettzellen auch Proteine mit Hormonwirkung freisetzen. Die Bedeutung dieser „Adipocytokine“ wird vorwiegend aus Tierexperimenten abgeleitet. Leptin wirkt beispielsweise an der Leber insulinähnlich und dämpft über Rezeptoren am Hirnstamm das Hungergefühl (6). Menschen mit sehr

seltenem genetischen Leptinmangel leiden daher unter unstillbarem Hunger und extremer Adipositas, die erst durch Leptin-Injektionen gebessert werden können. Adiponectin wirkt ebenfalls insulinähnlich, indem es die Glukoseproduktion der Leber senkt und die Fettverbrennung im Muskel fördert (26). Die Genexpression von Adiponectin im Fettgewebe scheint bei schlanken Personen und generell bei Frauen höher zu sein, sie ist auch mit höherer Insulinsensivität assoziiert (34). In Tierversuchen wirkt Adiponectin zusätzlich antiinflammatorisch und antiatherogen. Andere Cytokine der Fettzelle wie TNF- α , Resistin oder Interleukin-6 zirkulieren ebenfalls im Blut und sollen vorwiegend insulin-antagonistisch wirken. So wird TNF-alpha stark mitverantwortlich für die Entwicklung von Insulinresistenz und Fettleibigkeit gemacht (19,49,67). Von Interleukin-6 weiß man heute, dass seine Plasmakonzentration mit zunehmendem Schweregrad der Adipositas und der Insulinresistenz steigt, und eine Gewichtsreduktion bei insulinresistenten Übergewichtigen zu IL-6 Senkung führt (11,43). Auch eine insulinstimulierte Erhöhung der IL-6-Genexpression im humanen Fettgewebe und im insulinresistenten jedoch nicht im gesunden Rattenskelettmuskel wurde beobachtet (13,36). Eine genaue Rolle der Adipocytokine für die Entstehung von Adipositas und Typ-2-Diabetes beim Menschen ist jedoch noch unklar. Darüber hinaus ist mit der Identifizierung weiterer relevanter Peptidhormone aus dem Fettgewebe zu rechnen.

Die Aufnahme von Fettsäuren in die Zellen ist ein kontrollierter Prozess, sie wird überwiegend von Fettsäuren-Transportproteinen (z.B. FATP1, CD36) reguliert, welche den Transport von Fettsäuren durch die Plasmamembran ermöglichen (25). Neue Studien haben gezeigt, dass die negative Wirkung von freien Fettsäuren auf den Glucosetransport hauptsächlich auf der Ebene der Membrantransporte verursacht wird (56). Auch Mutationen von Transportproteingenen gehen mit metabolischer Dysfunktion einher.

FATPs (fatty acid transport proteins) werden als in die Membran integrierte Proteine beschrieben, die den Transport von langkettigen und sehr langkettigen Fettsäuren in die Zelle regulieren (59). Bei Menschen besteht die FATP-Familie aus sechs höchst homologen Proteinen: hsFATP-1-6. Rezente Untersuchungen an Adipocysten zeigten,

dass Insulin die FATP-1- und FATP-4-Translokation bewirkt und somit den Fettsäuretransport erhöht (60).

CD 36 ist eine Fettsäure-Translokase (FAT), ein in der Membran integriertes Glycoprotein. CD 36 Overexpression im Skelettmuskel wird mit Hyperglykämie und Hyperinsulinämie assoziiert (28). Es wird heute angenommen, dass CD 36 Defizienz beim Menschen gegen diabetogene Effekte wie fettreiche Ernährung schützt, da die Fettsäureutilisation somit vermindert ist.

Außer den Transportproteine kommen noch weitere am Fettsäuremetabolismus beteiligte Proteine für die Entstehung des metabolischen Syndroms in Frage, z.B. Desaturasen oder Gentranskriptionsfaktoren (PPARs). Desaturasen sind Enzyme, die Doppelbindungen in Fettsäuren einführen können. Ihre Aktivität wird durch die langkettigen polyungesättigten Fettsäuren sowie von Insulin reguliert. Insulinresistenz scheint die Desaturase-Aktivität zu verändern: Delta 9- und Delta 6-Desaturaseaktivität werden erhöht, Delta 5-Desaturaseaktivität dagegen erniedrigt (45). PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) alpha, betta und gamma sind liganden-abhängige Transkriptionsfaktoren, die Genexpression kontrollieren. Sie fungieren als Lipid-Sensoren und Lipidmetabolismus-Regulatoren (4). PPAR alpha reguliert die Expression von CD 36 mRNA, er kann von breitem Spektrum an ungesättigten und gesättigten FAs aktiviert werden. PPAR gamma bevorzugt dagegen mehrfach ungesättigte FAs. Das Resultat der PPARs-Aktivierung ist die Steigerung der Gentranskription (4).

Langfristige Lipidexposition soll die Insulinsekretion und die Insulinwirkung hemmen sowie Fibrinolyse und Endothelfunktion verschlechtern. Gemeinsam mit dem Auftreten inflammatorischer Prozesse trägt die Lipotoxizität somit zum erhöhten Risiko prämaturer makrovaskulärer Komplikationen (Herzinfarkt, Schlaganfall) bei Adipösen und Typ-2-Diabetikern bei.

1.4 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob die Effekte der gesättigten Säuren am Beispiel von Palmitat und der ungesättigten Säuren am Beispiel von Linoleat auf die Genexpression in verschiedenen Zelltypen vergleichbar sind oder nicht.

Zu diesem Zweck wurden für die Untersuchung vier verschiedene Zelltypen gewählt: koronare Endothelzellen (CAEC), glatte Gefäßmuskelzellen (CASMC), Hepatocyten (HepG2) und Fibroblasten (FB).

Die Genexpression wurde auf die folgenden, mit dem metabolischen Syndrom unmittelbar in Verbindung stehenden Gene begrenzt: Fettsäure-Transportproteine FATP-1 und CD 36, Transkriptionsfaktoren PPAR alpha und gamma, die die Fettsäuren als Liganden benutzen, Delta-9 Desaturase, für die Palmitat als Substrat dient und IL-6, das bei Adipositas und der Atheroseentwicklung eine Rolle spielen könnte.

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial

Die aus Koronararterien stammende Endothelzellen (human coronary artery endothelial cells = CAEC) und glatte Gefäßmuskelzellen (human coronary artery smooth muscle cells = CASMC) wurden von der Fa. Clonetics/BioWhittaker Europe (Verviers, Belgium), die Hepatocyten (human hepatoma cells = HepG2) von der Fa. Amaxa GmbH (Köln, Germany) erworben. Um die biologische Variabilität zu erzielen und die Reproduzierbarkeit der Effekte zu belegen, wurden diese Zelllinien jeweils 2 mal weiterpassagiert (n=3).

Die Fibroblastenkulturen (human fibroblasts culture = FB) wurden aus Haut von 4 verschiedenen Probanden (n=4) isoliert.

2.2 Geräte und Chemikalien

2.2.1 Geräte

Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Hanau, Germany
Zentrifuge Hettich Universal 30 RF	Hettich, Tutlingen, Germany
Pipetten 5,10, 100,200,1000 µl variabel Elektronische Pipetten „Research pro“ 10,100 µl variabel Eppendorfcups 0,2/ 0,5/ 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Germany
Sterile Filter-Spitzen „SafeSeal-Tips“ (DNase-, RNasefrei) 5,10, 100,200,1000 µl	Biozym Diagnostik, Oldendorf, Germany
Falconröhrchen 15, 50 ml	Falcon, Becton Dickenson, New Jersey, USA

Zellkulturschalen	Techno Plastic Products AG, Transadingen, Switzerland
Glaskolben Meßzylinder	Duran/ SCHOTT-Glas, Mainz , Germany
Photometer Gene Quant II	Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany
Mikrowelle	AEG, Frankfurt am Main, Germany
Feinwaage	Sartorius, Göttingen, Germany
UV-Licht-Kamera (Midi Doc Dokumentation System)	Herolab, Wiesloch, Germany
Rüttler Vortex-2 genie	Scientific Industries, Inc., New York, USA
Elektrophoresekammer	MWG- Biotech, München, Germany
Transluminator 40000	Stratagene, La Jolla, USA
Brutschrank „Hera Cell“	Heraeus, Hanau, Germany
LC-PCR- Gerät LC-Glaskapillaren Zentrifugenadaptoren	Roche Diagnostics, Mannheim, Germany
Magnetrüttler HS 501 digital	IKA Labortechnik, Staufen, Germany

2.2.2. Chemikalien

Wachstumsmedium für FB Wachstumsmedium für CAEC	Clonetics/ BioWhittaker Europe, Verviers, Belgium
Wachstumsmedium für HepG2	Life Technologies Ltd, Paisley, Scotland
Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Clonetics/ BioWhittaker Europe, Verviers, Belgium
Trypsin 2,5 %	Gibco BRL, Eggenstein, Germany
Albumin, fettsäurefreie (fatty acid-free bovine serum albumin, BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
Palmitat Linoleat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
Lysepuffer RLT RNeasy Mini-Kit (RDD-, RW1-, RPE-Puffers)	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
Primer Agarose	Invitrogen, Karlsruhe, Germany

T(A)E -Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)	Serva Feinbiochemica, Heidelberg (Tris) Sigma-Aldrich, Taufkirchen (EDTA)
Ethidiumbromid (C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃)	Boehringer, Mannheim, Germany
Farbpuffer (0,1% Br-Phenolblau, 0,1% Xylencyanol, 60% Glycerin, T(A)E-Puffer)	Uni-Apotheke, Tübingen, Germany
Molekulargewichtsmarker	PeqLab, Erlangen, Germany

2.3 Methoden

2.3.1 Zusammenfassung der Methoden

Die vier Zelltypen (CAEC, CASMC, HepG2, FB) wurden bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend mit Palmitat und Linoleat behandelt. Die Kontrollgruppe erhielt keinen Fettsäurezusatz. Parallel dazu wurden die Stammkulturen der Zelllinien CAEC, CASMC und HepG2 jeweils zwei mal weiterpassagiert, um die biologische Variabilität zu erzielen.

Im nächsten Schritt wurden die Zellen lysiert, aus der entstandenen Zellsuspension wurde RNA isoliert und ihre Konzentration vermessen. Danach wurde RNA in cDNA ungeschrieben und in gleiche Aliquots portioniert.

Mittels PCR wurden bestimmte DNA-Abschnitte vervielfältigt, und ihre Menge wurde mit der DNA-Menge der entsprechenden Kontrollgruppe verglichen. Zum Nachweis der PCR-Produkte wurden diese, zusammen mit DNA-Größen-Marker bekannter Basenlänge, auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrisch aufgetrennt, die Längen der DNA-Proben wurden verglichen.

2.3.2 Zellkulturplan

2.3.2.1 Fibroblasten (FB)

Die Inhalte der vier Kryoröhrchen (4 Probanden, n=4) wurden aufgetaut und in je 50 ml Falconröhrchen überführt. Zellsuspensionen wurden mit je 10 ml Wachstumsmedium (WM) für Fibroblasten (nach Anleitung des Herstellers, Fa. Clonetics/ BioWhittaker Europe, Verviers, Belgium) verdünnt und anschließend bei 1200 rpm, 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpelett mit 6 ml WM resuspendiert und mit weiteren 85 ml WM verdünnt. Die 91 ml der Zellsuspension wurden mit je 10 ml auf 9 Zellkulturschalen verteilt.

Zellen wurden bis zur Konfluenz von 80-90% kultiviert, Medienwechsel erfolgte alle 2-3 Tage.

2.3.2.2 Koronararterien-Endothelzellen (CAEC)

Die Probe (n=1) wurde aufgetaut und in ein 50 ml Falconröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde mit 10 ml Wachstumsmedium (WM) für CAEC gewaschen und abzentrifugiert. Das Zellpelett wurde mit 10ml WM resuspendiert.

In 2 sterile Gefäße wurden 85ml und 16 ml WM vorpipettiert. In das Gefäß mit 85 ml WM wurden dann 6 ml Zellsuspension zugefügt, die entstandenen 91 ml Gesamtvolumen wurden mit je 10ml auf 9 Zellkulturschalen mit jeweils 10 cm Durchmesser verteilt. In das Gefäß mit 16 ml WM wurden die restlichen 4 ml Zellsuspension pipettiert, die entstandenen 20 ml Lösung gab man auf Schale mit 15 cm Durchmesser (=Stammkultur zum Splitting).

Die Zellen wurden im Brutschrank (37°, 5%CO₂) unter regelmäßigem Medienwechsel (alle 2-3 Tage) kultiviert, die Stammkultur wurde bei 80-90% Konfluenz weiter passagiert (n=2, n=3).

2.3.2.3 Glatte Gefäßmuskelzellen aus Koronararterien (CASMC)

Die Probe (n=1) wurde aufgetaut und in ein 50 ml Falconröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde mit 10 ml Wachstumsmedium (WM) für CASMC gewaschen und abzentrifugiert. Das Zellpelett wurde mit 10ml WM resuspendiert.

In 2 sterile Gefäße wurden 85ml und 16 ml WM vorpipettiert. In das Gefäß mit 85 ml WM wurden dann 6 ml Zellsuspension zugefügt, die entstandenen 91 ml Gesamtvolumen wurden mit je 10ml auf 9 Zellkulturschalen mit jeweils 10 cm Durchmesser verteilt. In das Gefäß mit 16 ml WM wurden die restlichen 4 ml Zellsuspension pipettiert, die entstandenen 20 ml Lösung gab man auf Schale mit 15 cm Durchmesser (=Stammkultur zum Splitting).

Die Zellen wurden im Brutschrank (37°, 5%CO₂) unter regelmäßigem Medienwechsel (alle 2-3 Tage) kultiviert, die Stammkultur wurde bei 80-90% Konfluenz weiterpassagiert (n=2, n=3).

2.3.2.4 Hepatocyten (HepG2)

Die Probe (n=1) wurde aufgetaut und in ein 50 ml Falconröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde mit 10 ml Wachstumsmedium (WM) für HepG2 gewaschen und abzentrifugiert. Das Zellpelett wurde mit 10ml WM resuspendiert.

In 2 sterile Gefäße wurden 85ml und 16 ml WM vorpipettiert. In das Gefäß mit 85 ml WM wurden dann 6 ml Zellsuspension zugefügt, die entstandenen 91 ml Gesamtvolumen wurden mit je 10ml auf 9 Zellkulturschalen mit jeweils 10 cm Durchmesser verteilt. In das Gefäß mit 16 ml WM wurden die restlichen 4 ml Zellsuspension pipettiert, die entstandenen 20 ml Lösung gab man auf Schale mit 15 cm Durchmesser (=Stammkultur zum Splitting).

Die Zellen wurden im Brutschrank (37°, 5%CO₂) unter regelmäßigem Medienwechsel (alle 2-3 Tage) kultiviert, die Stammkultur wurde bei 80-90% Konfluenz weiterpassagiert (n=2, n=3).

2.3.3 Passagieren von Zellen

Das Wachstumsmedium (WM) wurde aus der Schale mit der Stammzellkultur abgesaugt. Die Zellen wurden mit 5 ml Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline (DPBS) ca. 1 Min. lang gewaschen und anschließend trockengesaugt. Sofort danach wurde die Zellkultur mit 4 ml Trypsin x 2 (Trypsin 2,5 % = Trypsin x10) behandelt und im Brutschrank bei 37°C für ca. 5 min inkubiert. Unter dem Mikroskop wurde der Grad der Zellablösung in regelmäßigen Zeitabständen kontrolliert. Die Wirkung von Trypsin wurde mit 5 ml WM gestoppt.

Die Zellsuspension wurde dann in ein steriles Falconröhrchen gegeben und bei 1000 rpm 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpelett mit 10 ml WM wieder resuspendiert.

In 2 sterile Gefäße wurden 85ml und 16 ml WM vorpipettiert. In das Gefäß mit 85 ml WM wurden dann 6 ml Zellsuspension zugefügt, die entstandenen 91 ml Gesamtvolumen wurden mit je 10ml auf 9 Zellkulturschalen mit jeweils 10 cm Durchmesser verteilt (n=2). In das Gefäß mit 16 ml WM wurden die restlichen 4 ml Zellsuspension pipettiert, die entstandenen 20 ml Lösung gab man auf Schale mit 15 cm Durchmesser (=Stammkultur zum Splitting).

Die Zellen wurden erneut im Brutschrank (37°, 5%CO₂) unter regelmäßigem Medienwechsel (alle 2-3 Tage) kultiviert, die Stammkultur wurde bei 80-90% Konfluenz wieder weiterpassagiert (n=3).

2.3.4 Behandlung von Zellkultur mit Fettsäuren

Herstellung von Grundlösung:

Man benötigt eine 12,5% Albuminlösung. Dafür wurden 12,5 g fettsäurefreien Albumin (fatty acid-free bovine serum albumin, BSA) in 100 ml Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline (DPBS) gelöst.

Fettsäurenlösungen:

a) Palmitatlösung

Palmitat wurde in 100-prozentigem Ethanol gelöst und mit der Grundlösung 1:40

verdünnt. Es entstand eine 5 mM Palmitatlösung.

b) Linoleatlösung

Linoleat wurde in 100-prozentigem Ethanol gelöst und mit der Grundlösung 1:40 verdünnt. Es entstand eine 5 mM Linoleatlösung.

Um eine mögliche Fettsäureoxidation zu verhindern, wurden die Fettsäurelösungen mit N₂ begast und im Brutschrank bei 37° ca. 15-20 Std. auf dem Rüttler geschüttelt.

Das alte Wachstumsmedium (WM) wurde aus den Kulturschalen abgesaugt, 9 ml frischen WM wurden wieder zugefügt. Danach erhielten die Zellkulturen entweder 1ml Palmitatlösung (5mM) oder 1 ml Linoleatlösung (5 mM) oder 1 ml Grundlösung (Kontrollgruppe).

Somit betrug die Endkonzentration der beiden Fettsäuren 0,5 mM. Die Konzentration der Albuminlösung in der Kontrollgruppe betrug 1,25 % (1:10 Verdünnung). Die Inkubationszeit der Zellen dauerte 20 Std.

2.3.5 Lysieren der Zellen

Die RNA wurde mit Hilfe von Lysepuffer RLT (enthält guanidin thiocyanat, Fa. Qiagen, Hilden, Germany) nach Angaben des Herstellers gewonnen.

Nach der Behandlung der Zellkultur mit Trypsin und anschließendem Abstoppen des Puffers wurde die Zellsuspension bei 10000 rpm 5 min. zentrifugiert, und der Überstand abgesaugt.

Das Zellpellet wurde mit 0,6 ml RLT-Puffer resuspendiert .

Die entstandene Zellsuspension wurde bei -80°C zu Weiterverwendung aufbewahrt.

2.3.6 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung wurde mittels eines RNeasy Mini-Kit von Fa. Qiagen (Hilden, Deutschland) durchgeführt.

Die Probe wurde nach dem Auftauen auf eine QIAshredder - Säule, die auf 2 ml großes Sammelgefäß gesetzt wurde, aufgetragen und bei 13.000 rpm für 2 min zentrifugiert.

Das gewonnene homogenisierte Lysat wurde mit 600 µl 70%-Ethanol gemischt und auf eine RNeasy- mini- spin- Säule (auch auf ein Sammelgefäß gesetzt) pipettiert. Die Probe wurde bei 10.000 rpm für 15 sec zentrifugiert, der Durchfluß wurde verworfen. Dieser Schritt wurde zwei mal durchgeführt, da das Volumen der Probe das Volumen einer Rneasy-mini-spin-Säule übersteigte.

Danach wurden 350 µl RW1-Puffer auf die Rneasy-Säule gegeben. Die Probe wurde wieder bei 10.000 rpm für 15 sec zentrifugiert, der Durchfluß wurde verworfen.

Separat wurde ein DNase Reaktions-Mix hergestellt, indem man 10 µl DNase 1 mit 70 µl RDD-Puffer mischte. Die entstandenen 80 µl Reaktions-Mix wurden direkt auf die Membran der Säule pipettiert, und die Probe wurde für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Erneut wurden 350 µl RW1 - Puffer auf die Säule gegeben, diese wurde bei 10.000 rpm für 15 sec zentrifugiert, der Durchfluß wurde verworfen. Die RNeasy-Säule kam auf ein frisches Sammelgefäß.

Dann erfolgten 2 weitere Waschschrte mit je 500 µl RPE-Puffer: einmal bei 10.000 rpm für 15 sec mit dem Verwerfen des Durchlaufs und einmal bei 13.000 rpm, um anschließend die Membran der Säule zu trocknen.

Für die Elution der RNA wurde die Säule auf ein frisches 1,5 ml Eppendorfcup gesetzt und, nach der Zugabe 50 µl RNase-freien Wasser direkt auf die Membran, bei 10.000 rpm 1 min. lang zentrifugiert.

Bestimmung der RNA-Konzentration: die Stammlösung wurde 1:20 verdünnt und im Photometer bei 260 nm vermessen.

2.3.7 Umschreiben von RNA in cDNA

Die Umschreibung wurde mit dem „1st Strand Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)“ von Fa. Roche Diagnostics (Mannheim, Germany) durchgeführt.

Es wurde jeweils 1 µg total RNA je Reaktionsansatz eingesetzt.

Die RNA-Probe wurde auf ein Volumen von 7,8 µl mit sterilem H₂O aufgefüllt, bei 65°C für 15 min. denaturiert und anschließend für ca. 5 min. auf Eis gestellt. Ein Master Mix wurde vorbereitet (Tab.1).

Tabelle 1: Master Mix für 1 Reaktionsansatz

Reagenz	Volumen/Probe	Endkonzentration
10x Reaction Buffer	2,0 µl	1x
25 mM MgCl ₂	4,0 µl	5 mM
Deoxynucleotide Mix	2,0 µl	1 mM
Random Primer p(dN) ₆	2,0 µl	2 µM
RNase Inhibitor	1,0 µl	50 Units
AMV Reverse Transcriptase	0,8 µl	> 20 Units
Gelatin	0,4 µl	0,01 mg/ml

12,2 µl von Master Mix wurden zu 7,8 µl RNA- Probe gegeben. Die 20 µl Reaktionsansatz wurden zuerst 10 min bei 25°C inkubiert, damit die Primeranlagerung stattfinden kann. Dann erfolgte die Transkription bei 42°C , 1 Std. lang. Anschließend wurde die Probe auf 99°C für 5 min erhitzt, um die reverse Transkriptase zu inaktivieren.

Zum Schluss wurde die Probe in 20 µl Portionen aufgeteilt und bei -20°C eingefroren.

2.3.8 Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

2.3.8.1 Prinzip der Reaktion

Die PCR ist eine in vitro-Methode, mit der man selektive Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Abschnittes erzielen kann. Sie ist ein zyklisches Verfahren und besteht aus drei Teilschritten, die ständig wiederholt werden:

1.Schritt: termische Auftrennung der DNA-Stränge (90°-95°C)

2.Schritt: Anlagerung der Primer an die einzelsträngigen DNA-Moleküle (50°-65°C)

3.Schritt:Verlängerung der DNA-Stranges mit Hilfe der DNA-Polymerase (70°-75°C)

Mit jeder neuen Runde wird die Anzahl der DNA-Kopien verdoppelt. Durch Wiederholung dieses Reaktionszyklus, in der Regel 40 bis 60 mal, kann man einen exponentiellen Anstieg des gewünschten DNA-Abschnittes erreichen.

2.3.8.2 Die LightCycler- PCR (LC-PCR)

Das LC-Gerät arbeitet, anders als andere PCR-Geräte, mit dünnen, widerstandsfähigen Glaskapillaren, die in der Temperierkammer von der Luft umgeben sind. Dadurch sind schnelle Wärmeübertragung und Temperaturwechsel möglich. Die Dauer einer PCR kann auf diese Weise bis auf 45 min. reduziert werden.

Darüber hinaus ist ein LC-Gerät mit einem Fluorimeter kombiniert, so dass anschließend eine Quantifizierung der Reaktionsprodukte erfolgen kann. Dazu wird dem Pipettiersatz ein fluoreszierender Farbstoff (SYBR Green) beigemischt, der durch die Bindung an die DNA-Doppelhelix seine Fluoreszenz über 100-fach verstärkt.

Eine Produktidentifizierung mittels Schmelzkurvenanalyse (eindeutiger charakteristischer Schmelzpunkt) ist im LC-Gerät ebenso möglich.

2.3.8.3 Durchführung der LC-PCR

Die PCR-Reaktionen wurden mittels "LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I"-Kit von Fa. Roche Diagnostics (Mannheim, Germany) durchgeführt. Die Primer wurden von der Fa. Invitrogen (Karlsruhe, Germany) erworben.

Es wurden 18 µl Reaktionsansatz pro cDNA-Probe (2 µl) nach Anleitung (s. Tabelle 2) vorbereitet. Der Reaktionsansatz wurde auf Eis zu den Proben pipettiert, es entstand somit eine PCR-Probe von 20 µl. Alles wurde gevortext, bei 13000 rpm zentrifugiert und anschließend in die vorgekühlten Glaskapillaren überführt. Die verschlossenen Kapillaren wurden dann noch mal für 30 sec. bei 1000 rpm zentrifugiert (Tisch-Zentrifuge, Zentrifugen-Adaptoren) und in den Rotor des LC-Geräts gesetzt. Anschlie-

ßend wurde das schon vorher gewählte und überprüfte Programm gestartet. Von jeder DNA-Probe wurden jeweils drei PCR-Ansätze hergestellt und gemessen, um mögliche Pipettierfehler erkennen und deselektieren zu können.

Tabelle 2: Reaktionsansätze für eine PCR-Probe (20 µl) und Konditionen der PCR-Programme.

	FATP 1- PCR		Delta 9- Desat-PCR		PPAR alpha-PCR		IL- 6-PCR	
Reagentien	Menge (µl)		Menge (µl)		Menge (µl)		Menge (µl)	
H2O	13,4		12,4		11,6		13,4	
MgCl (4mM)	1,6		1,6		2,4		1,6	
Primer up	0,5		0,5		0,5		0,5	
Primer down	0,5		0,5		0,5		0,5	
HotStart SYBR Green	2		2		2		2	
DMSO			1		1			
PCR-Programm	Temperatur	Zeit (sec)	Temperatur	Zeit (sec)	Temperatur	Zeit (sec)	Temperatur	Zeit (sec)
Denaturierung	95°C	600	95°C	600	95°C	600	95°C	600
Amplifikation	95°C	15	95°C	10	95°C	10	95°C	15
	68°C	10	58°C	10	67°C	10	63°C	10
	72°C	20	72°C	14	72°C	13	72°C	17
Schmelzkurve	95°C	5	95°C	5	95°C	5	95°C	5
	70°C	10	60°C	10	69°C	10	65°C	10
	98°C	0	98°C	0	98°C	0	98°C	0
Kühlen	40°C	30	40°C	30	40°C	30	40°C	30

Fortsetzung der Tabelle 2: Reaktionsansätze für eine PCR-Probe (20 µl) und Konditionen der PCR-Programme.

	CD 36-PCR		PPAR gamma-PCR		Human Glyc-PCR	
Reagentien	Menge (µl)		Menge (µl)		Menge (µl)	
H ₂ O	12,6		12,6		12,6	
MgCl (4mM)	2,4		2,4		2,4	
Primer up	0,5		0,5		0,5	
Primer down	0,5		0,5		0,5	
HotStart SYBR Green	2		2		2	
PCR-Programm	Temperatur	Zeit (sec)	Temperatur	Zeit (sec)	Temperatur	Zeit (sec)
Denaturierung	95°C	600	95°C	600	95°C	600
Amplifikation	95°C	15	95°C	15	95°C	15
	64°C	10	64°C	10	67°C	10
	72°C	14	72°C	17	72°C	11
Schmelzkurve	95°C	5	95°C	5	95°C	5
	69°C	10	68°C	10	69°C	10
	98°C	0	98°C	0	98°C	0
Kühlen	40°C	30	40°C	30	40°C	30

2.3.9 Agarosegelelektrophorese von DNA

Für die Agarosegelelektrophorese wurde 2% Agarosegel verwendet. Als Gel- und Laufpuffer diente 1x T(A)E -Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer).

2g Agarose wurden mit 100 ml T(A)E-Puffer gemischt und in der Mikrowelle aufgekocht.

Für den Fluoreszenznachweis unter UV-Licht wurden dem Gel 10 µl Ethidiumbromid-Lösung zugefügt. Das Gel wurde in eine Kammer gegossen, in die ein Kamm für die Ausformung der Taschen für die späteren DNA-Proben eingefügt war. Nach 15 min. Erstarrungszeit war das Gel einsatzfertig.

In jede Tasche wurden dann jeweils 9 µl DNA-Probe gemischt mit 2 µl Farbpuffer pipettiert. Der Farbpuffer bestand aus 0,1% Br-Phenolblau, 0,1% Xylencyanol, 60% Glycerin, auf 15 ml mit T(A)E-Puffer aufgefüllt. Zur Bestimmung der DNA-Länge wurden zwei verschiedene Molekulargewichtsmarker mit bekannter Basenlänge zwischen die Proben gesetzt (jeweils 5 µl mit 2 µl Farbpuffer gemischt). Anschließend wurde T(A)E-Puffer mit einem Überstand von ca 0,8 cm über das Gel gegossen, und das Gel bei 120 V eingespannt. Die Elektrophorese dauerte ca. 60 min.

Zur Dokumentation wurde das Gel im UV-Durchlicht fotografiert, die DNA-Längen wurden verglichen (s. Abb. 1 und 2).

3. Ergebnisse

3.1 Vorgehen bei der Ermittlung der Ergebnisse

Die Auswertung jedes PCR-Laufs erfolgte mittels internem Standard und der entsprechenden Eichkurve. Die Probe DNA-freies Wasser, die jedem Lauf beigelegt wurde, diente als Indikator für Sauberkeit des Pipettiervorgangs. War die Wasserprobe negativ, d.h. enthielt sie keine DNA Spuren, so konnten die Daten ausgewertet werden.

Als interne Kontrolle der eingesetzten mRNA-Menge in Proben wurde humane glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (HumGlyc), sogenanntes „house-keeping gene“, eingesetzt.

Jede DNA-Probe wurde in dreifacher Ausführung gemessen.

Nach einem korrekt durchgeführten PCR-Lauf wurden die drei vom Gerät kalkulierten Konzentrationswerte einer Probe untereinander verglichen, Pipettierfehler wurden deselektiert. Die Werte wurden in eine Tabelle (s. Beispiel Tabelle 3) eingetragen, in der gleichzeitig der Mittelwert der dreifachen Probenmessung in % im Vergleich zur Kontrollgruppe (100%) sowie die Standardabweichung errechnet wurden.

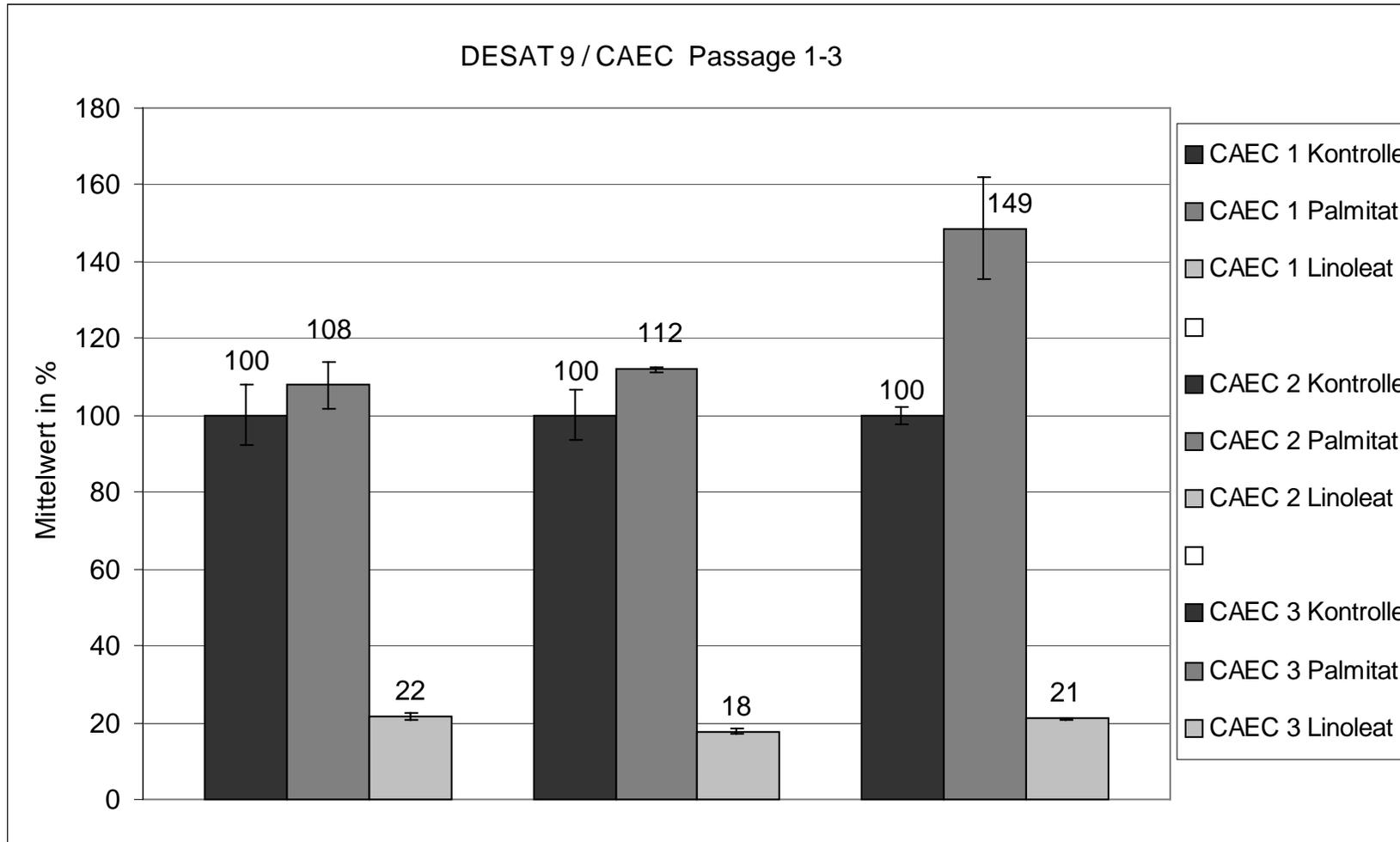
Die mRNA-Konzentration wurde in arbitrary units (AU) angegeben, 1 AU entspricht 1 ag mRNA /100 ng total RNA.

Nach den Tabellen wurden Diagramme erstellt, die graphisch die Konzentrationswerte von Palmitat- und Linoleatgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppen (100%) innerhalb jeder Zellkulturgeneration darstellten (s. Beispiel Diagramm 1). Wiesen die Werte starke Differenzen bzw. keine Gesetzmäßigkeit zwischen den jeweiligen Generationen auf, so wurde der Versuch zur Sicherheit wiederholt.

Tabelle 3: Quantifizierung der mRNA-Expression von Delta 9-Desaturase in drei Passagen von CAEC nach Behandlung mit Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM).

Name	Konzentration (AU)	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	Mittelwert (AU)	Standardabweichung (%)
CAEC 1 Kontrolle	213800				
CAEC 1 Kontrolle	236700	100	7,9	215200	17012,0
CAEC 1 Kontrolle	195100				
CAEC 1 Palmitat	247900				
CAEC 1 Palmitat	215300	108	6,2	232067	13325,2
CAEC 1 Palmitat	233000				
CAEC 1 Linoleat	47860				
CAEC 1 Linoleat	43720	22	0,9	46453	1933,0
CAEC 1 Linoleat	47780				
CAEC 2 Kontrolle	232000				
CAEC 2 Kontrolle	264000	100	6,5	241900	15655,2
CAEC 2 Kontrolle	229700				
CAEC 2 Palmitat	268100				
CAEC 2 Palmitat	271700	112	0,7	270533	1721,1
CAEC 2 Palmitat	271800				
CAEC 2 Linoleat	42660				
CAEC 2 Linoleat	45300	18	0,8	42890	1880,9
CAEC 2 Linoleat	40710				
CAEC 3 Kontrolle	198500				
CAEC 3 Kontrolle	207600	100	2,1	201500	4313,5
CAEC 3 Kontrolle	198400				
CAEC 3 Palmitat	285400				
CAEC 3 Palmitat	336800	149	13,2	299500	26635,4
CAEC 3 Palmitat	276300				
CAEC 3 Linoleat	42880				
CAEC 3 Linoleat	41810	21	0,3	42345	535,0
CAEC 3 Linoleat	-				

Diagramm 1: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von Delta 9-Desaturase in drei Passagen von CAEC.



Als nächster Schritt wurden die Palmitat- und Linoleat-Werte der jeweiligen Generationen (Passagen) in jeder PCR-Untersuchung entsprechend zusammen addiert (s. Beispiele Tabelle 4 und Diagramm 2).

Eine Ausnahme stellten die Fibroblasten dar, hier wurden die Werte getrennt betrachtet, da die Zellproben aus Haut von 4 verschiedenen Patienten gewonnen wurden.

Zur besseren Übersicht sind die Werte sowohl grafisch als auch tabellarisch dargestellt.

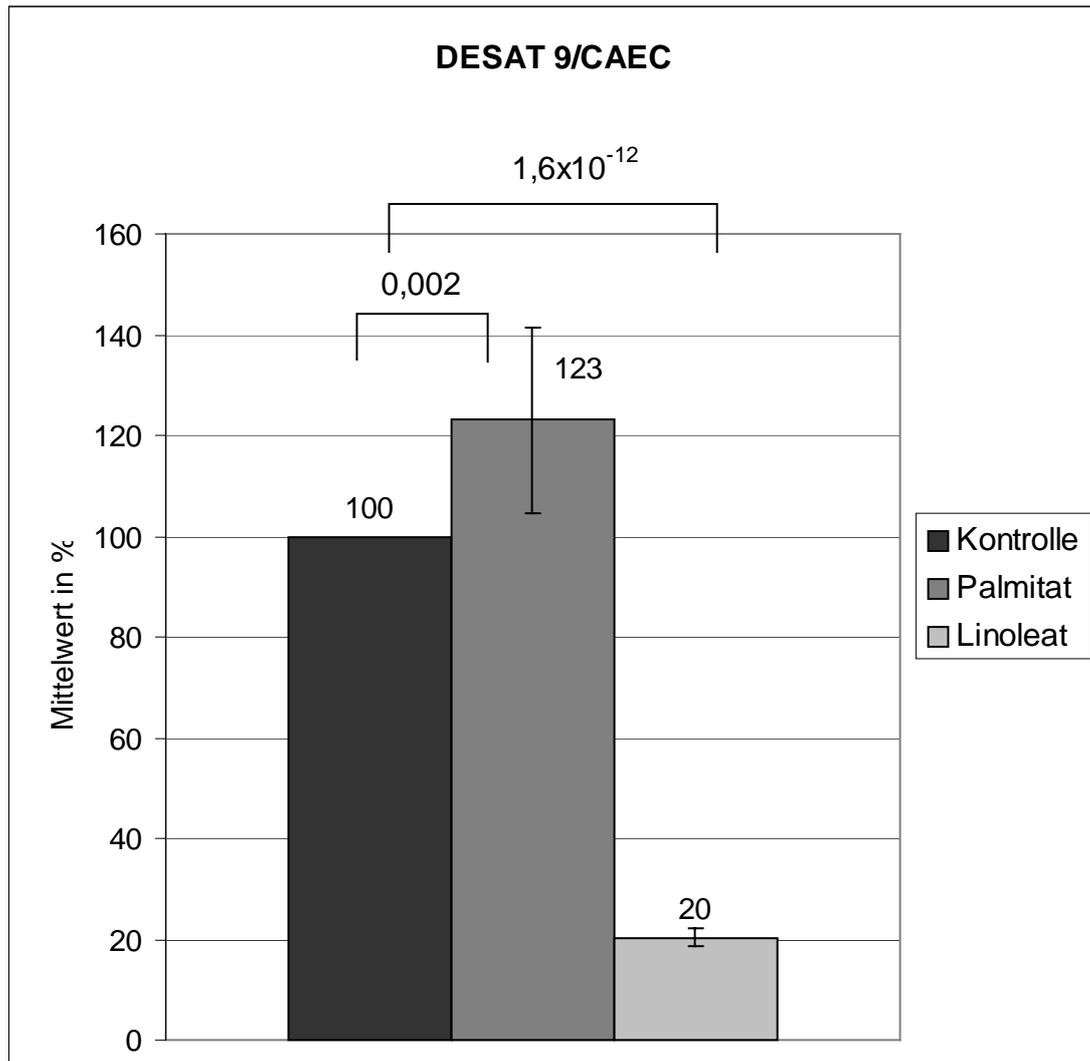
Die statistische Analyse wurde mit Hilfe von Student's t test durchgeführt.

Die statistische Signifikanz liegt bei $p < 0.05$.

Tabelle 4: Summierte Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von Delta 9-Desaturase in CAEC.

Desat 9/ CAEC				
Name	Wert (%)	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	p
CAEC K 1				
CAEC K 2	100	100	0	
CAEC K 3				
CAEC P 1	108			
CAEC P 2	112	123	18	0,002
CAEC P 3	149			
CAEC L 1	22			
CAEC L 2	18	20	2	$1,6 \times 10^{-12}$
CAEC L 3	21			

Diagramm.2: Summierte Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von Delta 9-Desaturase in CAEC.



3.2 Ermittelte Ergebnisse

3.2.1 Delta 9- Desaturase

Tabelle 5: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von Delta 9-Desaturase in CAEC.

Desat 9/ CAEC				
Name	Wert (%)	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	p
CAEC K 1	100	100	0	
CAEC K 2				
CAEC K 3				
CAEC P 1	108	123	18	0,002
CAEC P 2	112			
CAEC P 3	149			
CAEC L 1	22	20	2	$1,6 \times 10^{-12}$
CAEC L 2	18			
CAEC L 3	21			

Diagramm 3: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von Delta 9-Desaturase in CAEC.

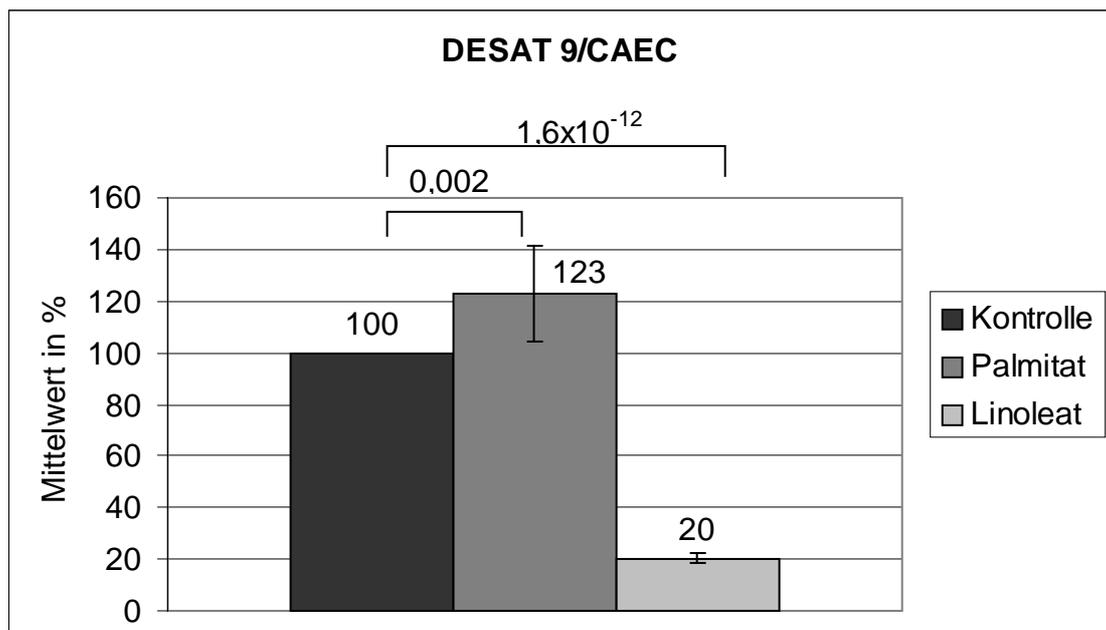


Tabelle 6: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von Delta 9-Desaturase in CASMC.

Desat 9				
Name	Wert (%)	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	p
CASMC K 1	100	100	0	
CASMC K 2				
CASMC K 3				
CASMC P 1	334	223	79	4×10^{-6}
CASMC P 2	171			
CASMC P 3	163			
CASMC L 1	59	38	15	$4,6 \times 10^{-7}$
CASMC L 2	34			
CASMC L 3	22			

Diagramm 4: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von Delta 9-Desaturase in CASMC.

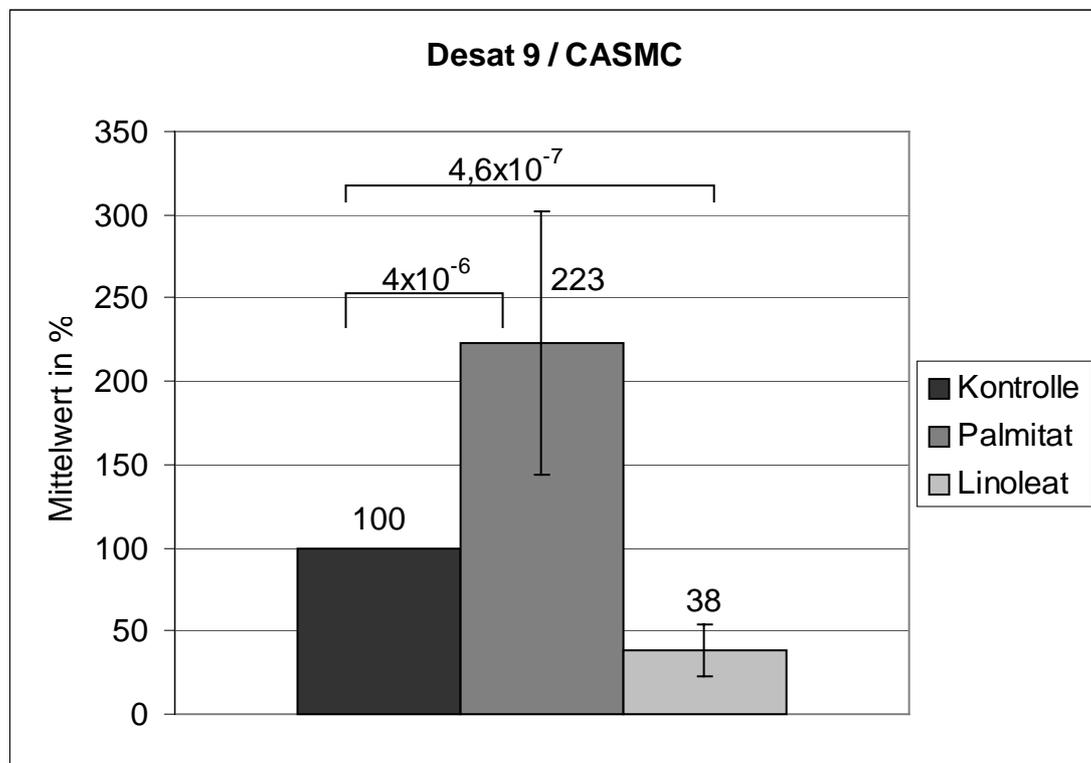


Tabelle 7: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von Delta 9-Desaturase in HepG2.

Desat 9				
Name	Wert (%)	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	p
HepG2 K 1				
HepG2 K 2	100	100	0	
HepG2 K 3				
HepG2 P 1	80			
HepG2 P 2	129	141	56	0,37
HepG2 P 3	215			
HepG2 L 1	65			
HepG2 L 2	65	66	1	0,03
HepG2 L 3	68			

Diagramm 5: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von Delta 9-Desaturase in HepG2.

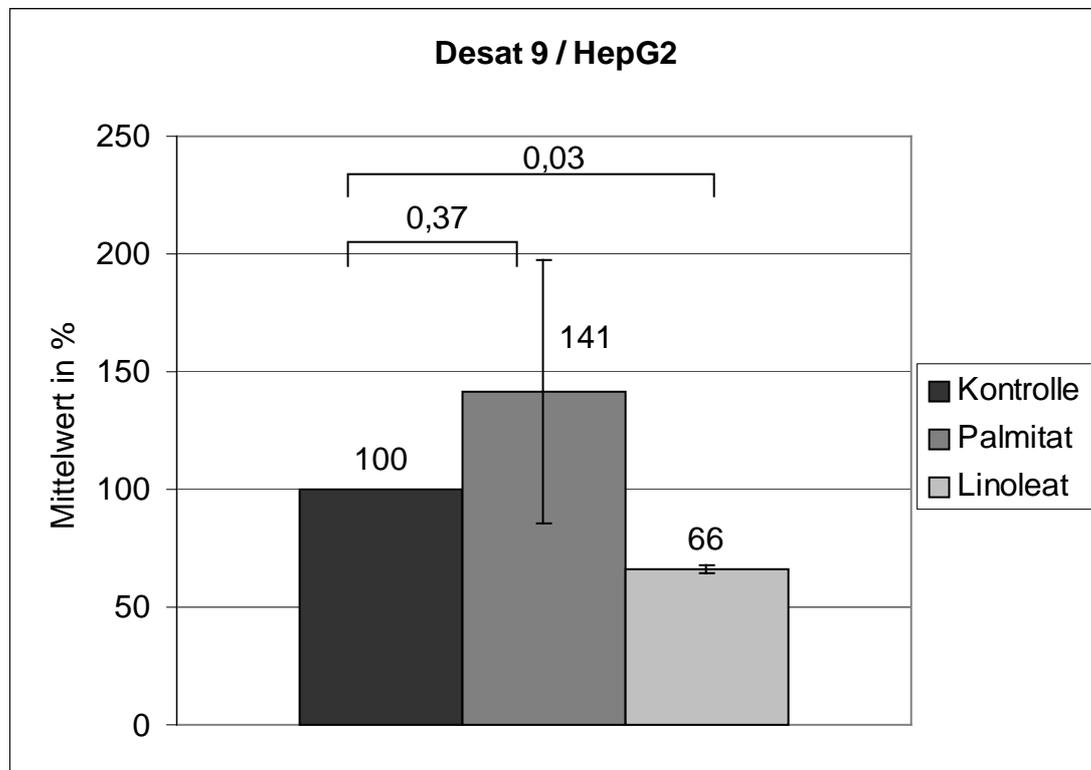
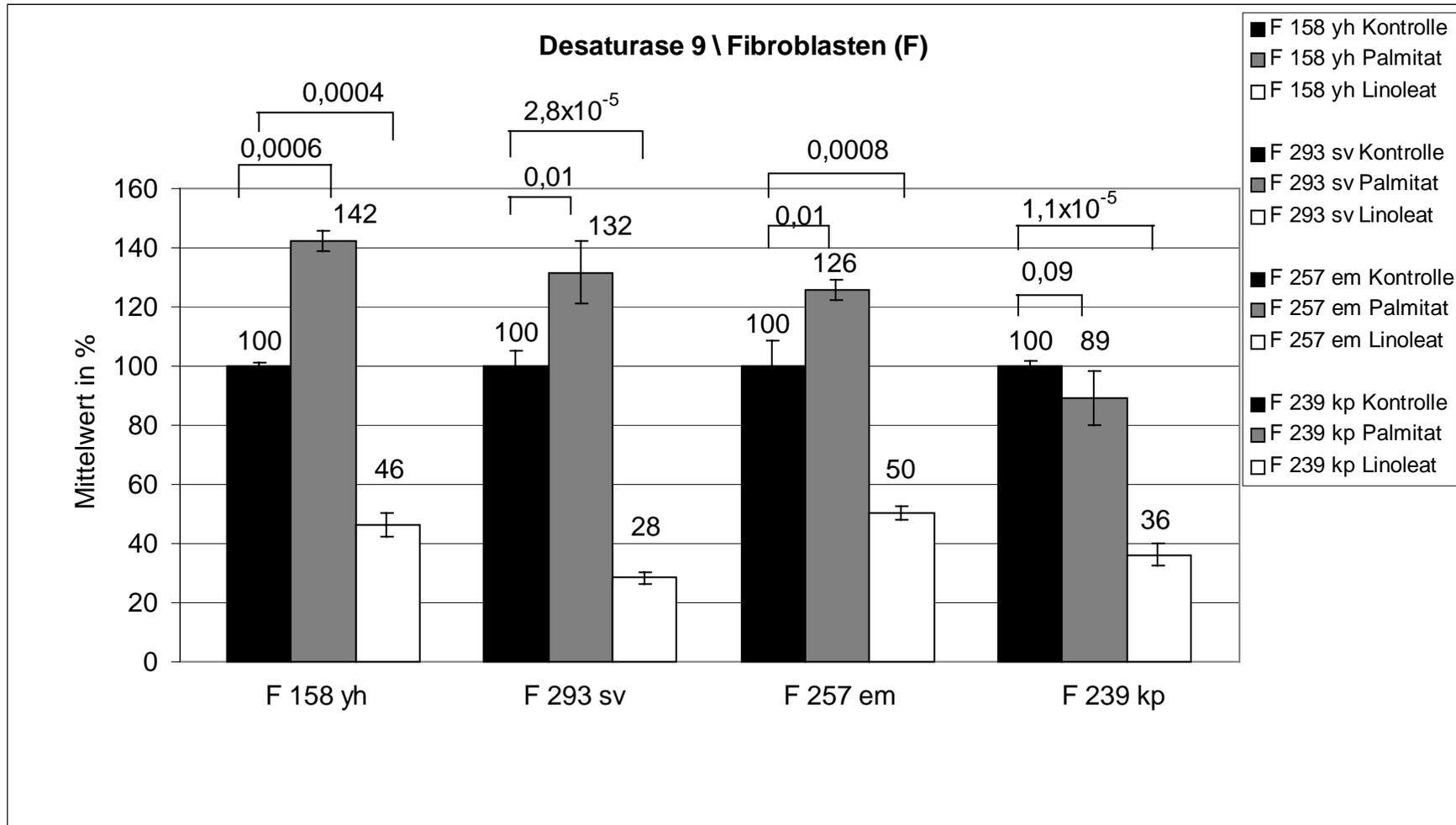


Tabelle 8: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von Delta 9-Desaturase in FB.

Desat 9			
Name	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	p
F 158 yh Kontrolle	100	1,4	
F 158 yh Palmitat	142	3,6	0,0006
F 158 yh Linoleat	46	3,9	0,0004
F 293 sv Kontrolle	100	5,3	
F 293 sv Palmitat	132	10,7	0,01
F 293 sv Linoleat	28	1,9	$2,8 \times 10^{-5}$
F 257 em Kontrolle	100	8,8	
F 257 em Palmitat	126	3,6	0,01
F 257 em Linoleat	50	2,2	0,0008
F 239 kp Kontrolle	100	1,5	
F 239 kp Palmitat	89	9,2	0,09
F 239 kp Linoleat	36	3,6	$1,1 \times 10^{-5}$

Diagramm 6: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von Delta 9-Desaturase in FB.



3.2.2 PPAR alpha

Tabelle 9: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von PPAR alpha in CAEC.

PPAR alpha				
Name	Wert (%)	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	p
CAEC K 1				
CAEC K 2	100	100	0	
CAEC K 3				
CAEC P 1	144			
CAEC P 2	178	164	14,5	$7,6 \times 10^{-6}$
CAEC P 3	170			
CAEC L 1	141			
CAEC L 2	127	138	8,4	0,0008
CAEC L 3	147			

Diagramm 7: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von PPAR alpha in CAEC.

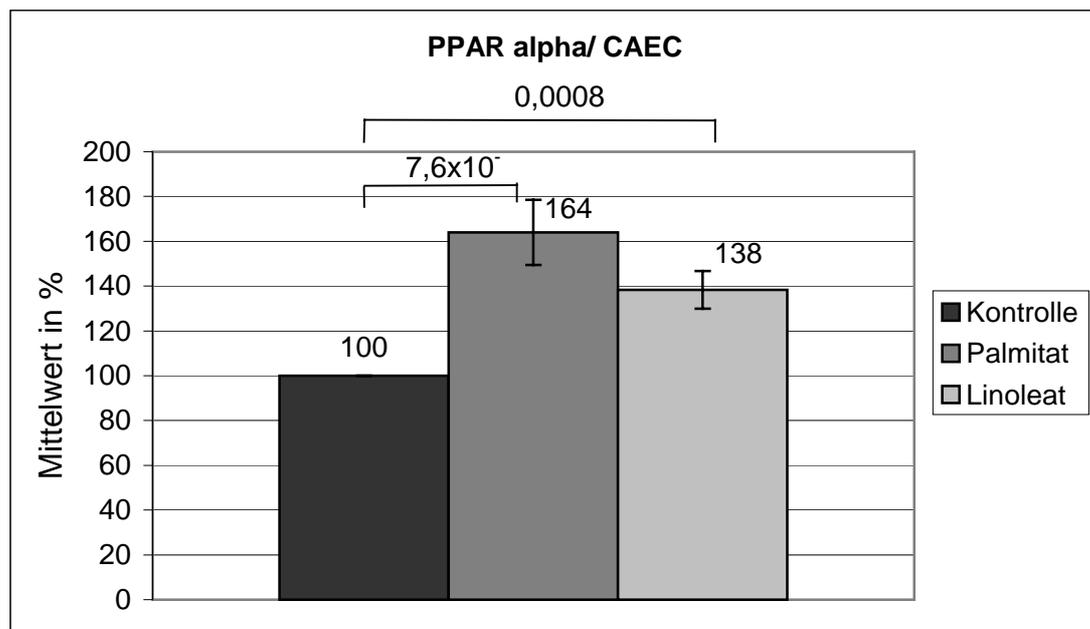


Tabelle 10: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von PPAR alpha in CASMC.

PPAR alpha				
Name	Wert (%)	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	p
CASMC K 1	100	100	0	
CASMC K 2				
CASMC K 3				
CASMC P 1	188	143	33	0,14
CASMC P 2	130			
CASMC P 3	111			
CASMC L 1	138	127	13	0,015
CASMC L 2	135			
CASMC L 3	109			

Diagramm 8: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von PPAR alpha in CASMC.

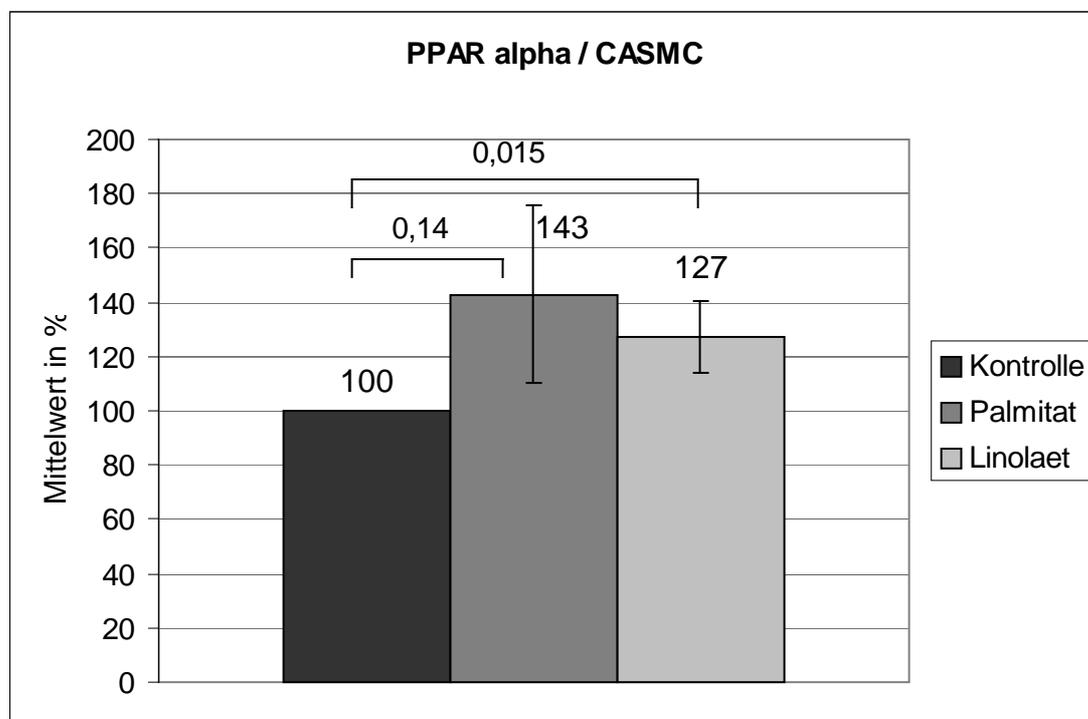


Tabelle 11: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von PPAR alpha in HepG2.

PPAR alpha				
Name	Wert (%)	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	p
HepG2 K 1	100	100	0	
HepG2 K 2				
HepG2 K 3				
HepG2 P 1	83	98	11	0,33
HepG2 P 2	110			
HepG2 P 3	100			
HepG2 L 1	107	105	14	0,08
HepG2 L 2	120			
HepG2 L 3	87			

Diagramm 9: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von PPAR alpha in HepG2.

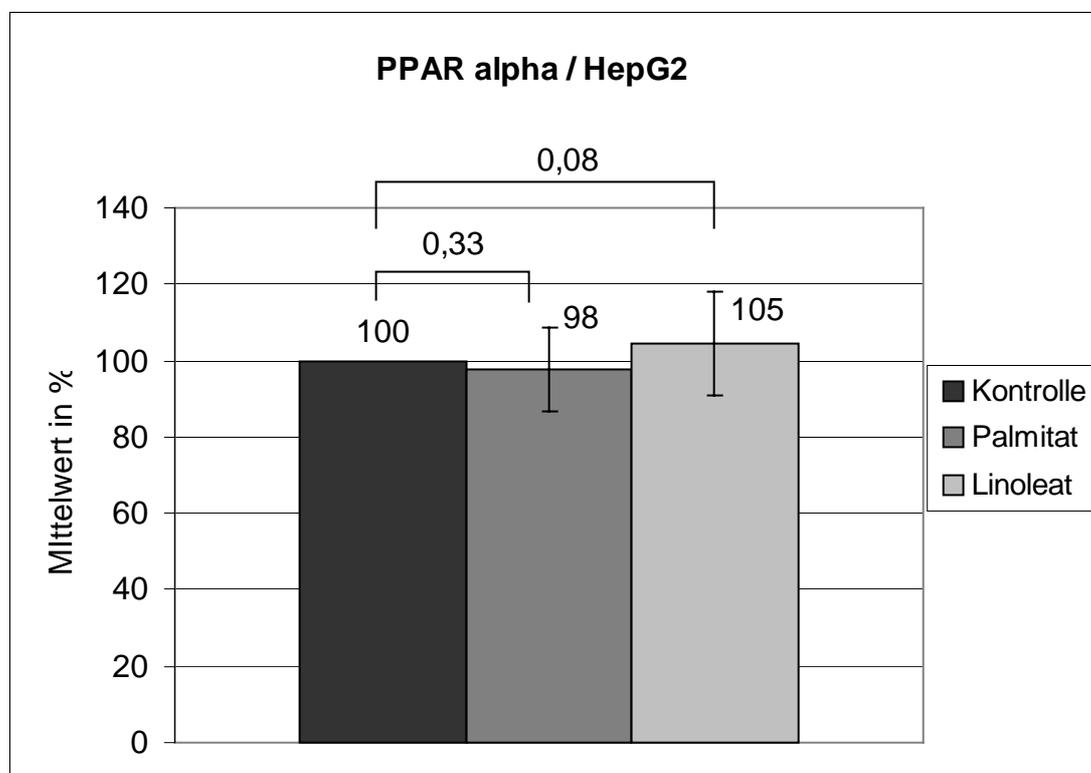
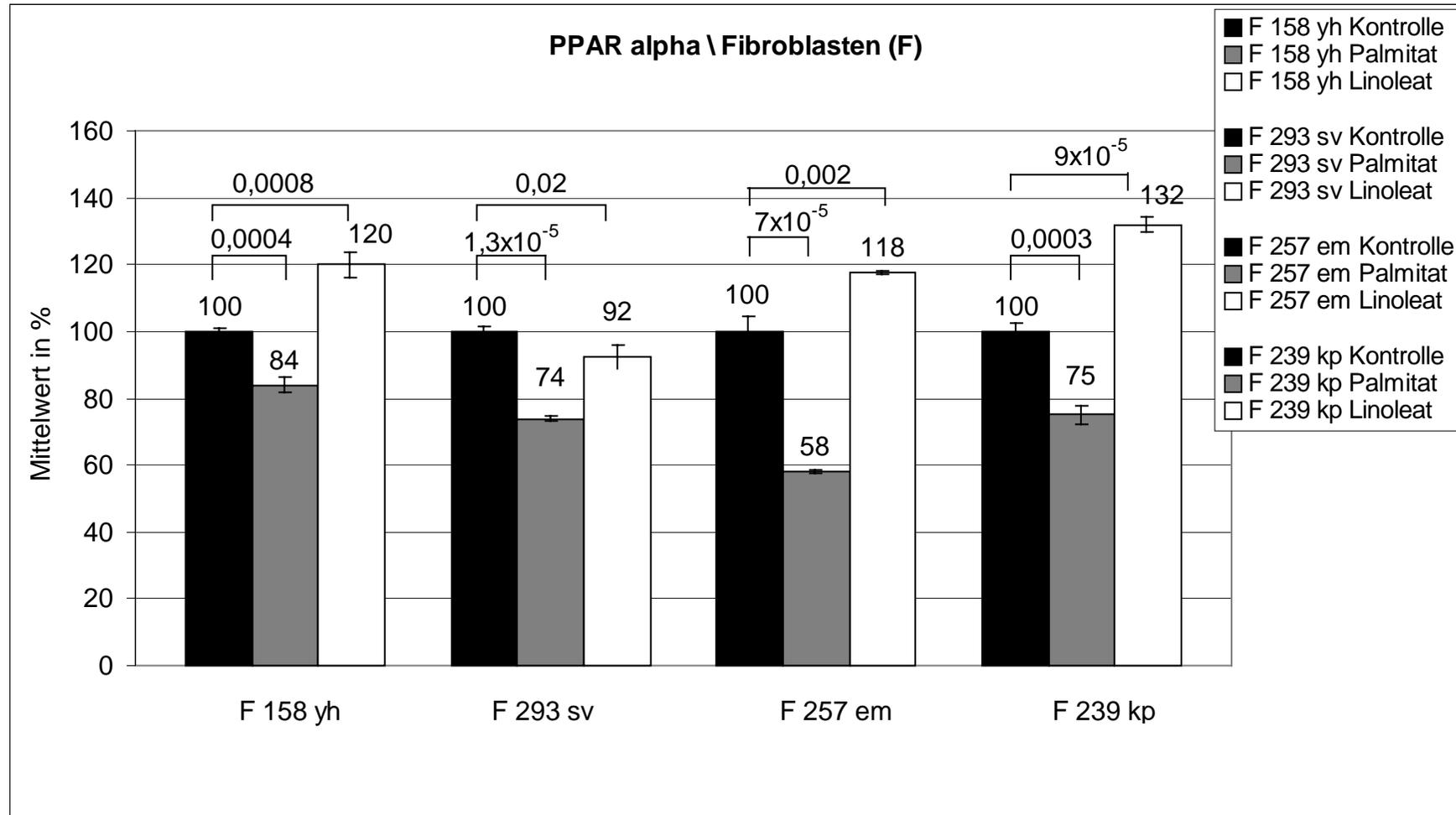


Tabelle 12: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von PPAR alpha in FB.

PPAR alpha			
Name	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	p
F 158 yh Kontrolle	100	0,7	
F 158 yh Palmitat	84	2,3	0,0004
F 158 yh Linoleat	120	3,6	0,0008
F 293 sv Kontrolle	100	1,4	
F 293 sv Palmitat	74	0,9	$1,3 \times 10^{-5}$
F 293 sv Linoleat	92	3,3	0,02
F 257 em Kontrolle	100	4,3	
F 257 em Palmitat	58	0,4	7×10^{-5}
F 257 em Linoleat	118	0,6	0,002
F 239 kp Kontrolle	100	2,5	
F 239 kp Palmitat	75	2,8	0,0003
F 239 kp Linoleat	132	2,3	9×10^{-5}

Diagramm 10: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von PPAR alpha in FB.



3.2.3 PPAR gamma

Tabelle 13: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von PPAR gamma in CAEC.

PPAR gamma				
Name	Wert (%)	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	p
CAEC K 1	100	100	0	
CAEC K 2				
CAEC K 3				
CAEC P 1	118	157	34	9×10^{-5}
CAEC P 2	154			
CAEC P 3	200			
CAEC L 1	91	107	13	0,13
CAEC L 2	109			
CAEC L 3	122			

Diagramm 11: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von PPAR gamma in CAEC.

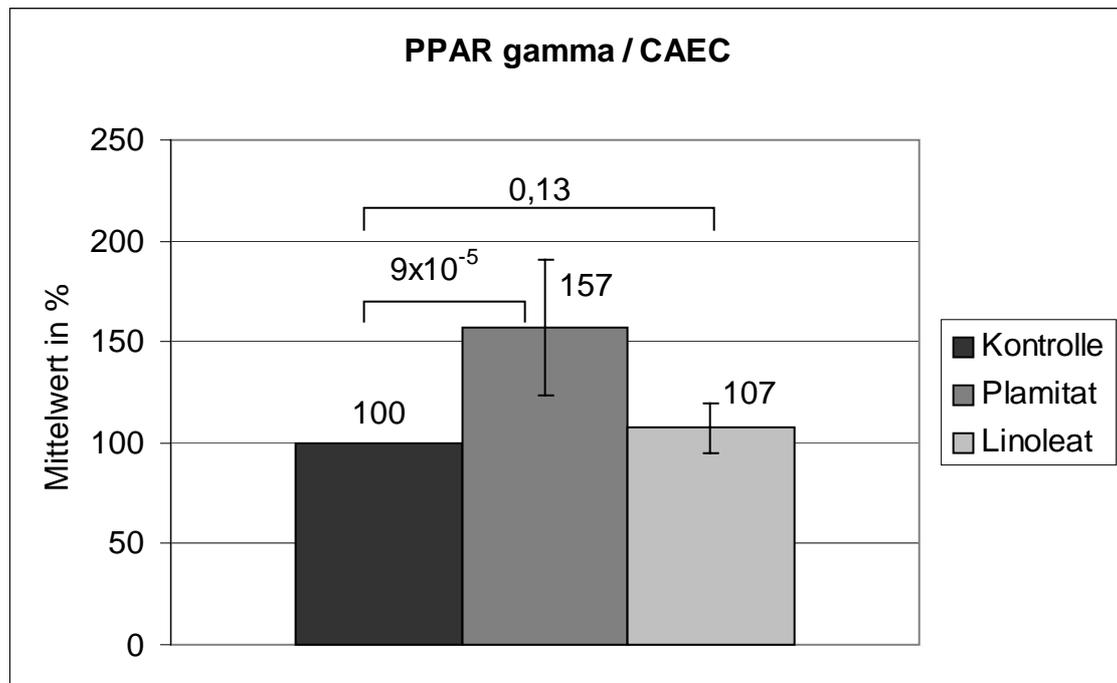


Tabelle 14: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von PPAR gamma in CASMC.

PPAR gamma				
Name	Wert (%)	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	p
CASMC K 1	100	100	0	
CASMC K 2				
CASMC K 3				
CASMC P 1	472	228	173	0,03
CASMC P 2	85			
CASMC P 3	127			
CASMC L 1	167	129	34	0,08
CASMC L 2	136			
CASMC L 3	84			

Diagramm 12: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von PPAR gamma in CASMC.

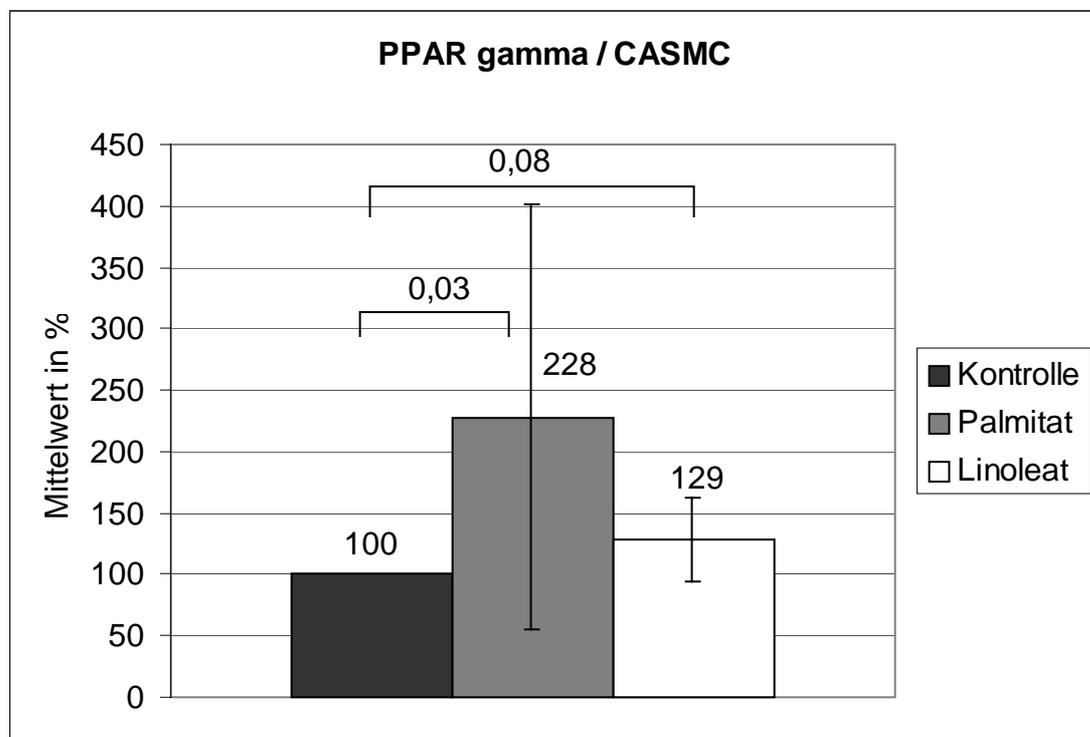


Tabelle 15: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von PPAR gamma in HepG2.

PPAR gamma				
Name	Wert (%)	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	p
HepG2 K 1	100	100	0	
HepG2 K 2				
HepG2 K 3				
HepG2 P 1	68	82	11	0,0002
HepG2 P 2	93			
HepG2 P 3	86			
HepG2 L 1	98	102	5	0,34
HepG2 L 2	110			
HepG2 L 3	99			

Diagramm 13: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von PPAR gamma in HepG2.

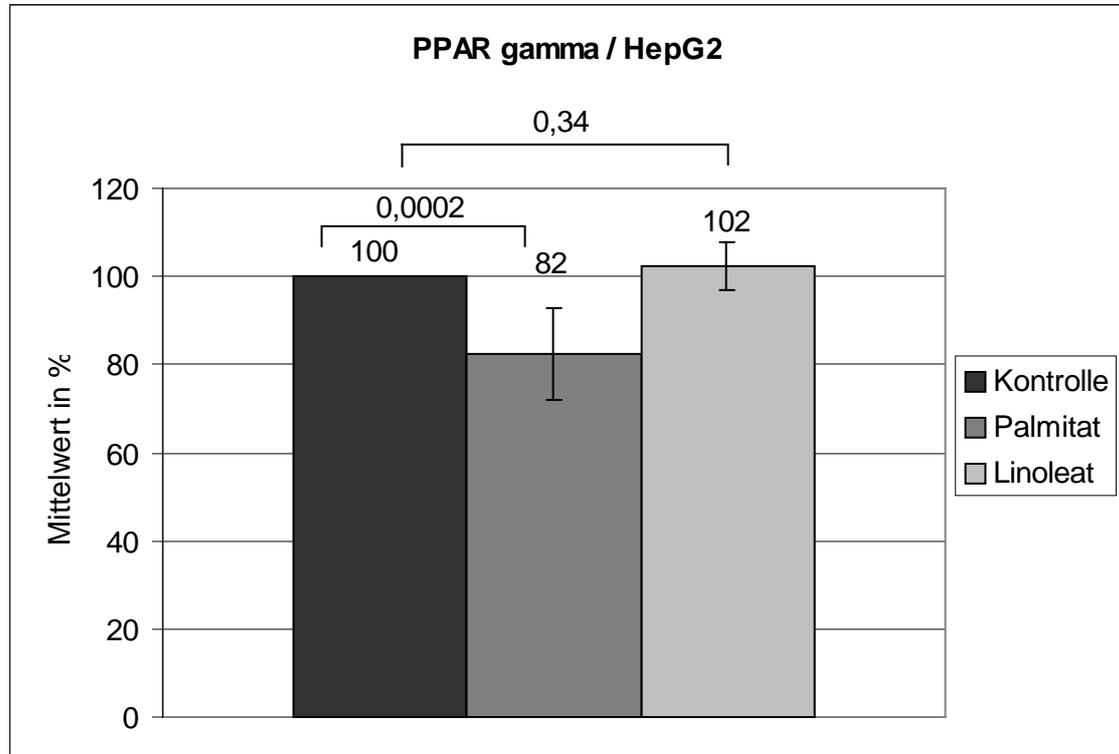
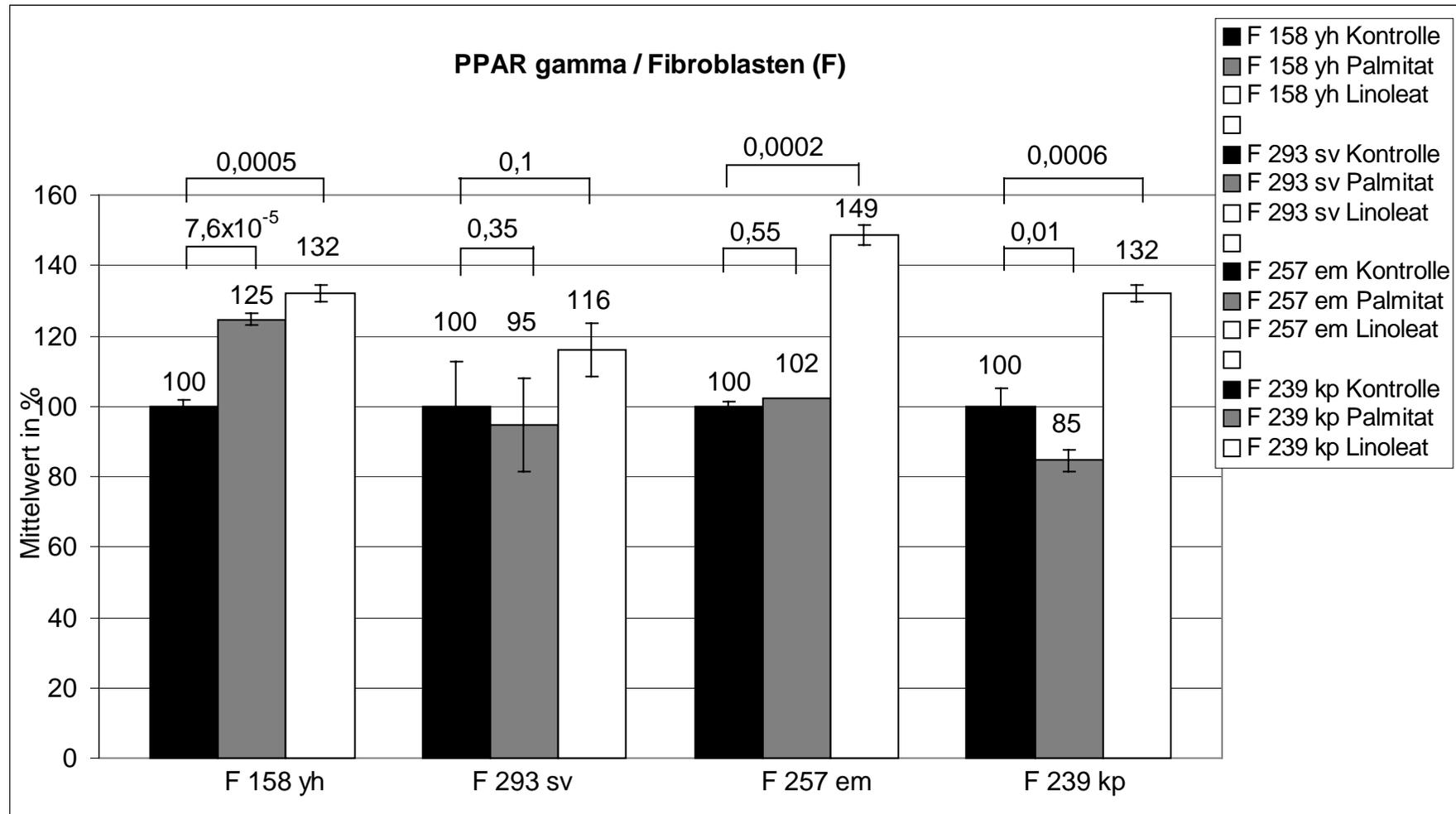


Tabelle 16: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von PPAR gamma in FB.

PPAR gamma			
Name	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	p
F 158 yh Kontrolle	100	1,9	
F 158 yh Palmitat	125	1,6	7,6x10 ⁻⁰⁵
F 158 yh Linoleat	132	2,4	0,0005
F 293 sv Kontrolle	100	12,9	
F 293 sv Palmitat	95	13,3	0,35
F 293 sv Linoleat	116	7,4	0,1
F 257 em Kontrolle	100	1,3	
F 257 em Palmitat	102	-	0,55
F 257 em Linoleat	149	2,9	0,0002
F 239 kp Kontrolle	100	5,1	
F 239 kp Palmitat	85	3,1	0,01
F 239 kp Linoleat	132	2,2	0,0006

Diagramm 14: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von PPAR gamma in FB.



3.2.4 FATP-1

Tabelle 17 : Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von FATP-1 in CAEC.

FATP-1				
Name	Wert (%)	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	p
CAEC K 1	100	100	0	
CAEC K 2				
CAEC K 3				
CAEC P 1	93	90	2	0,16
CAEC P 2	88			
CAEC P 3	88			
CAEC L 1	97	92	4	0,07
CAEC L 2	88			
CAEC L 3	91			

Diagramm 15: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von FATP-1 in CAEC.

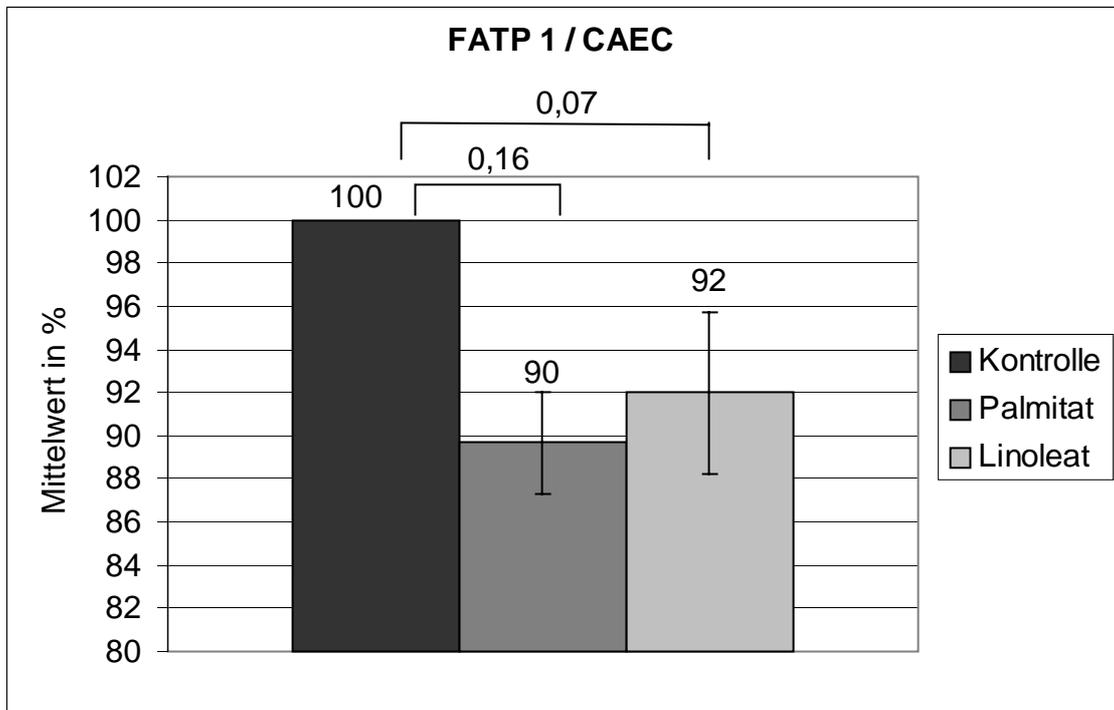


Tabelle 18: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von FATP-1 in CASMC.

FATP-1				
Name	Wert (%)	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	p
CASMC K 1	100	100	0	
CASMC K 2				
CASMC K 3				
CASMC P 1	88	87	14	0,28
CASMC P 2	104			
CASMC P 3	70			
CASMC L 1	112	98	12	0,49
CASMC L 2	83			
CASMC L 3	100			

Diagramm 16: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von FATP-1 in CASMC.

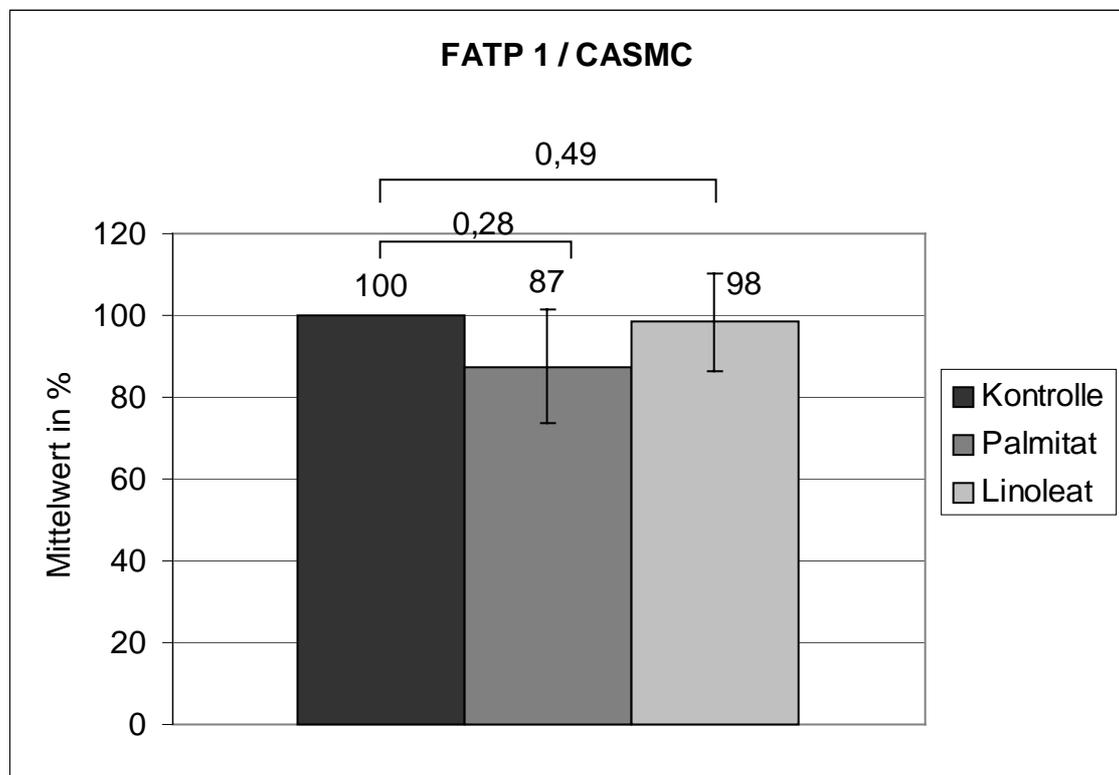


Tabelle 19: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von FATP-1 in HepG2.

FATP-1				
Name	Wert (%)	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	p
HepG2 K 1				
HepG2 K 2	100	100	0	
HepG2 K 3				
HepG2 P 1	107			
HepG2 P 2	87	99	9	0,41
HepG2 P 3	104			
HepG2 L 1	83			
HepG2 L 2	93	104	23	0,43
HepG2 L 3	136			

Diagramm 17: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von FATP-1 in HepG2.

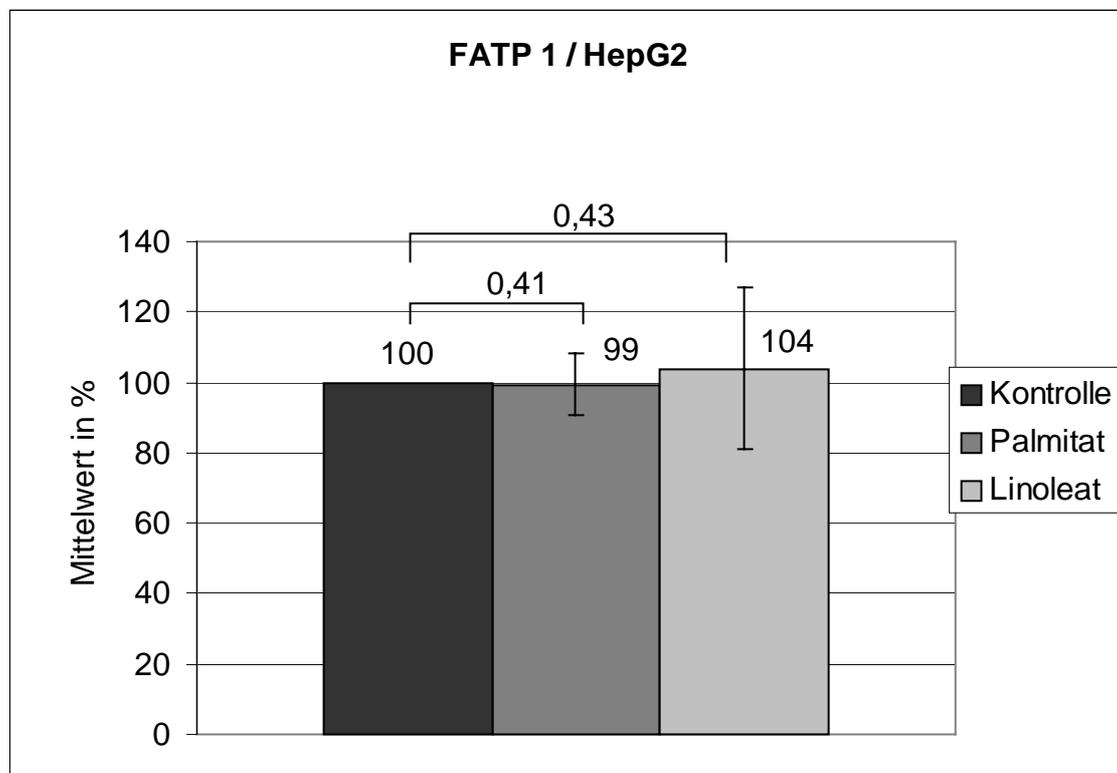
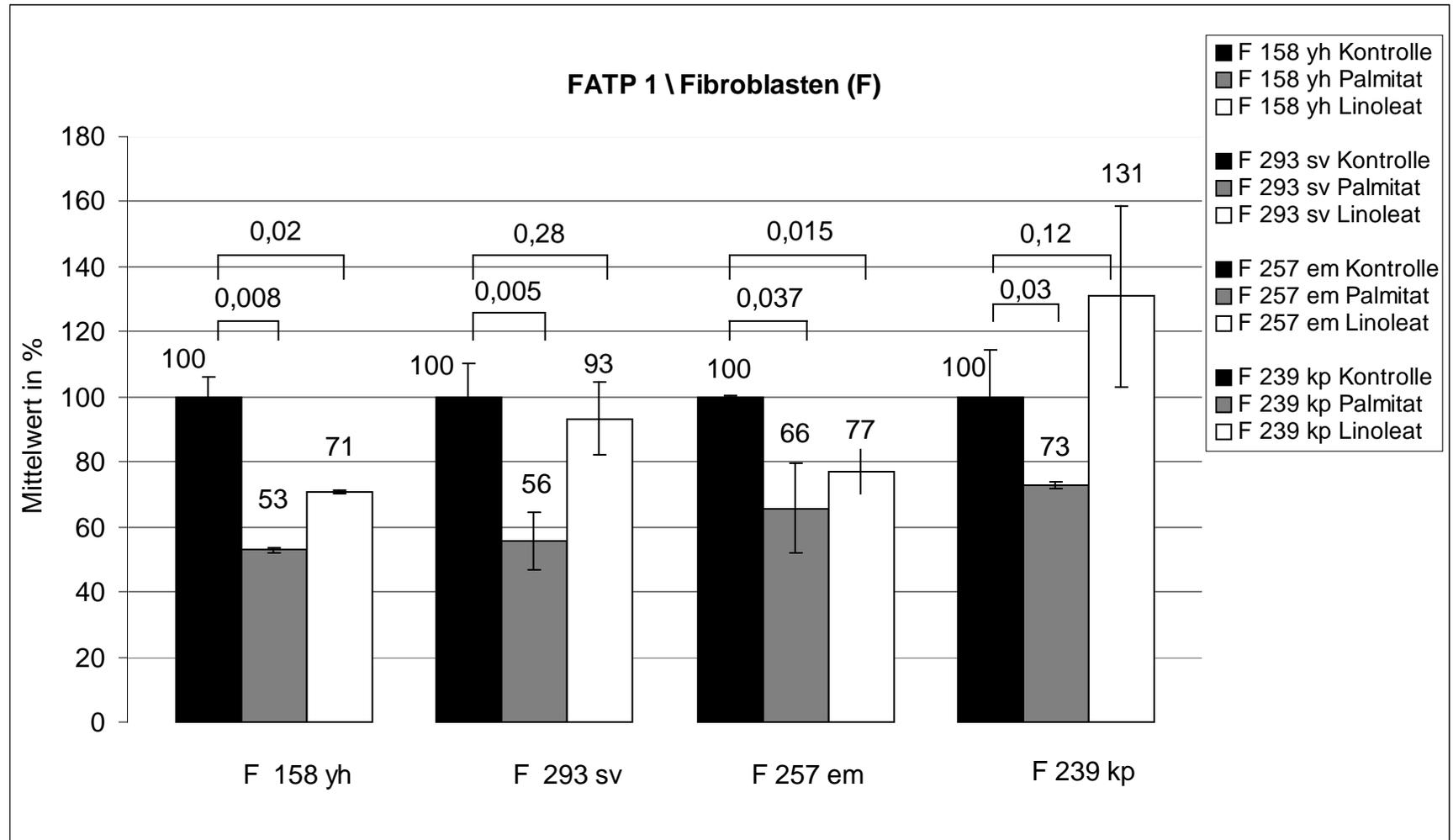


Tabelle 20: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von FATP-1 in FB.

FATP-1			
Name	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	p
F 158 yh Kontrolle	100	5,9	
F 158 yh Palmitat	53	0,9	0,008
F 158 yh Linoleat	71	0,5	0,02
F 293 sv Kontrolle	100	10,1	
F 293 sv Palmitat	56	8,8	0,005
F 293 sv Linoleat	93	11,2	0,28
F 257 em Kontrolle	100	0,3	
F 257 em Palmitat	66	13,9	0,037
F 257 em Linoleat	77	6,5	0,015
F 239 kp Kontrolle	100	14,6	
F 239 kp Palmitat	73	1,3	0,03
F 239 kp Linoleat	131	27,7	0,12

Diagramm 18: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von FATP-1 in FB.



3.2.5 CD 36

Tabelle 21: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von CD 36 in CAEC.

CD 36				
Name	Wert (%)	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	p
CAEC K 1	100	100	0	
CAEC K 2				
CAEC K 3				
CAEC P 1	23	44	21	0,004
CAEC P 2	72			
CAEC P 3	37			
CAEC L 1	103	101	10	0,47
CAEC L 2	112			
CAEC L 3	87			

Diagramm 19: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von CD 36 in CAEC.

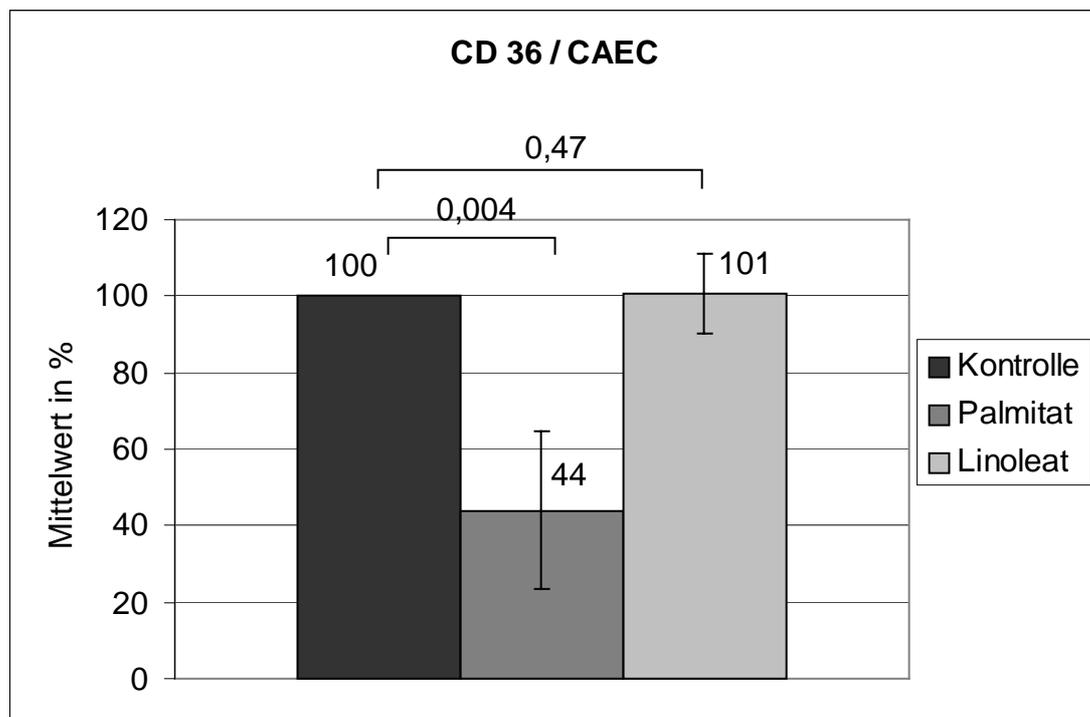


Tabelle 22: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von CD 36 in CASMC.

CD 36				
Name	Wert (%)	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	p
CASMC K 1	100	100	0	
CASMC K 2				
CASMC K 3				
CASMC P 1	287	160	91	0,15
CASMC P 2	110			
CASMC P 3	82			
CASMC L 1	124	116	14	0,3
CASMC L 2	128			
CASMC L 3	97			

Diagramm 20: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von CD 36 in CASMC.

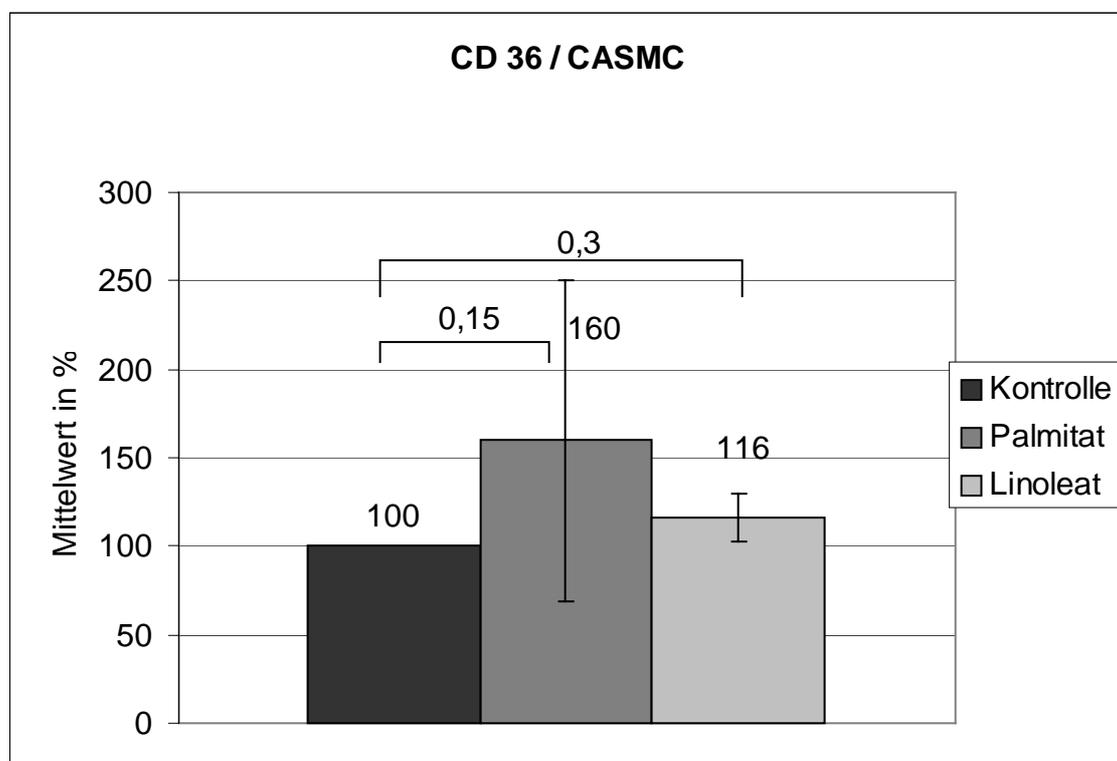


Tabelle 23: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von CD 36 in HepG2.

CD 36				
Name	Wert (%)	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	p
HepG2 K 1	100	100	0	
HepG2 K 2				
HepG2 K 3				
HepG2 P 1	72	88	13	0,15
HepG2 P 2	104			
HepG2 P 3	87			
HepG2 L 1	103	101	23	0,41
HepG2 L 2	129			
HepG2 L 3	72			

Diagramm 21: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von CD 36 in HepG2.

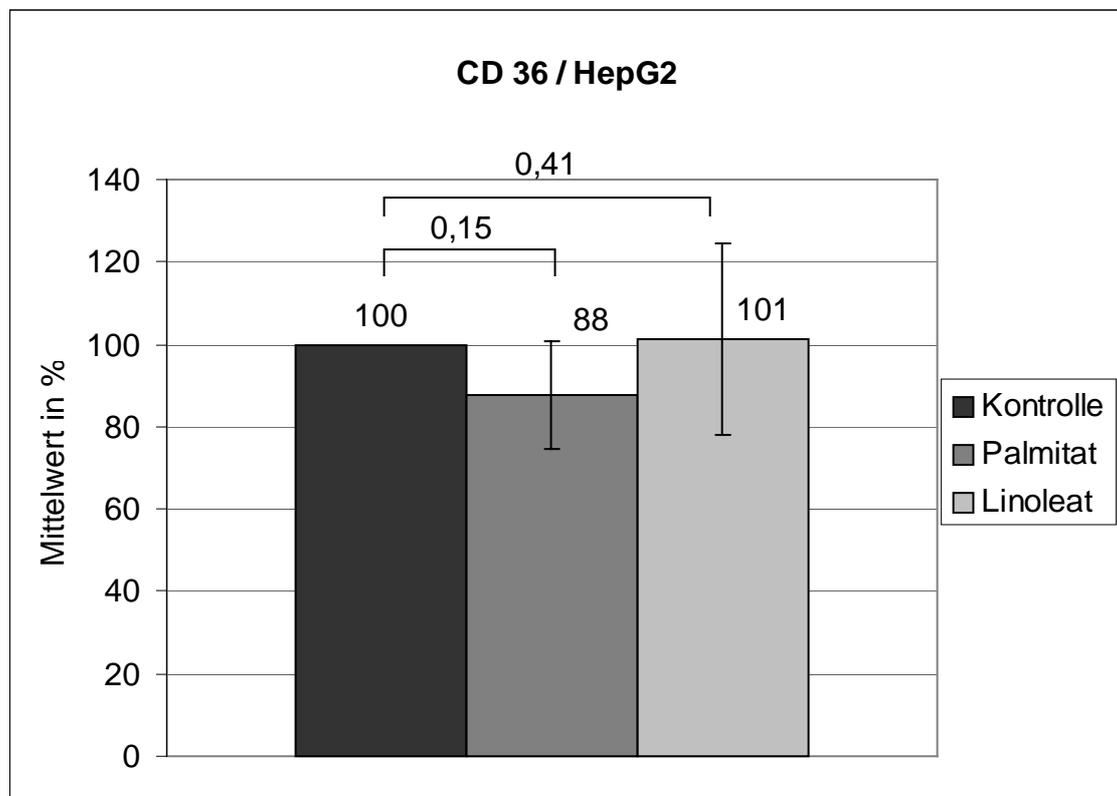
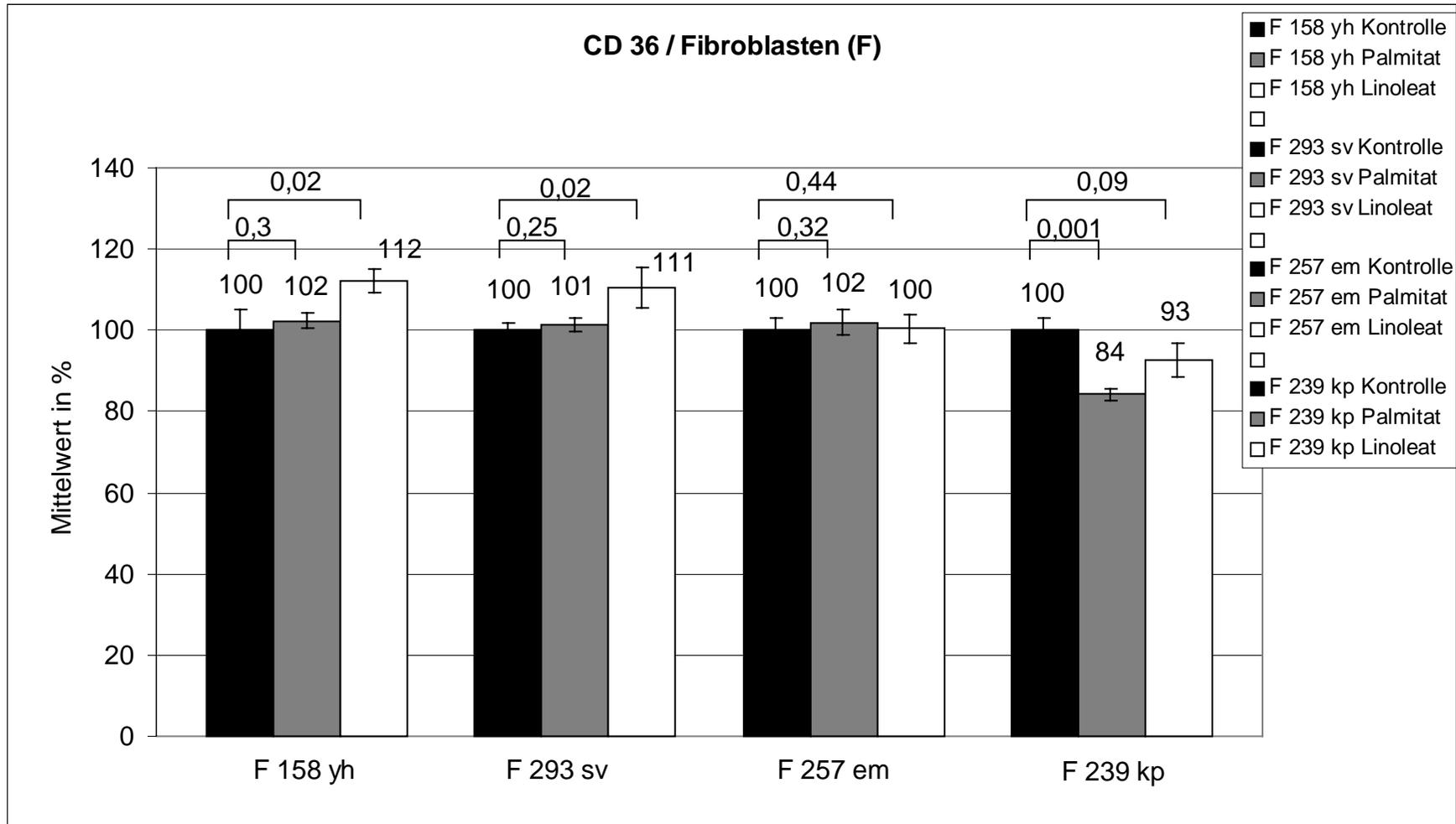


Tabelle 24: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von CD 36 in FB.

CD 36			
Name	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	p
F 158 yh Kontrolle	100	5,0	
F 158 yh Palmitat	102	1,9	0,3
F 158 yh Linoleat	112	2,9	0,02
F 293 sv Kontrolle	100	1,8	
F 293 sv Palmitat	101	1,8	0,25
F 293 sv Linoleat	111	5,0	0,02
F 257 em Kontrolle	100	3,0	
F 257 em Palmitat	102	3,1	0,32
F 257 em Linoleat	100	3,5	0,44
F 239 kp Kontrolle	100	3,0	
F 239 kp Palmitat	84	1,5	0,001
F 239 kp Linoleat	93	4,2	0,09

Diagramm 22: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von CD 36 in FB.



3.2.6 Interleukin-6 (IL-6)

Tabelle 25: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von IL-6 in CAEC.

IL-6				
Name	Wert (%)	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	p
CAEC K 1	100	100	0	
CAEC K 2				
CAEC K 3				
CAEC P 1	1179	2101	828	7×10^{-14}
CAEC P 2	3188			
CAEC P 3	1935			
CAEC L 1	103	107	17	0,42
CAEC L 2	89			
CAEC L 3	129			

Diagramm 23: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von IL-6 in CAEC.

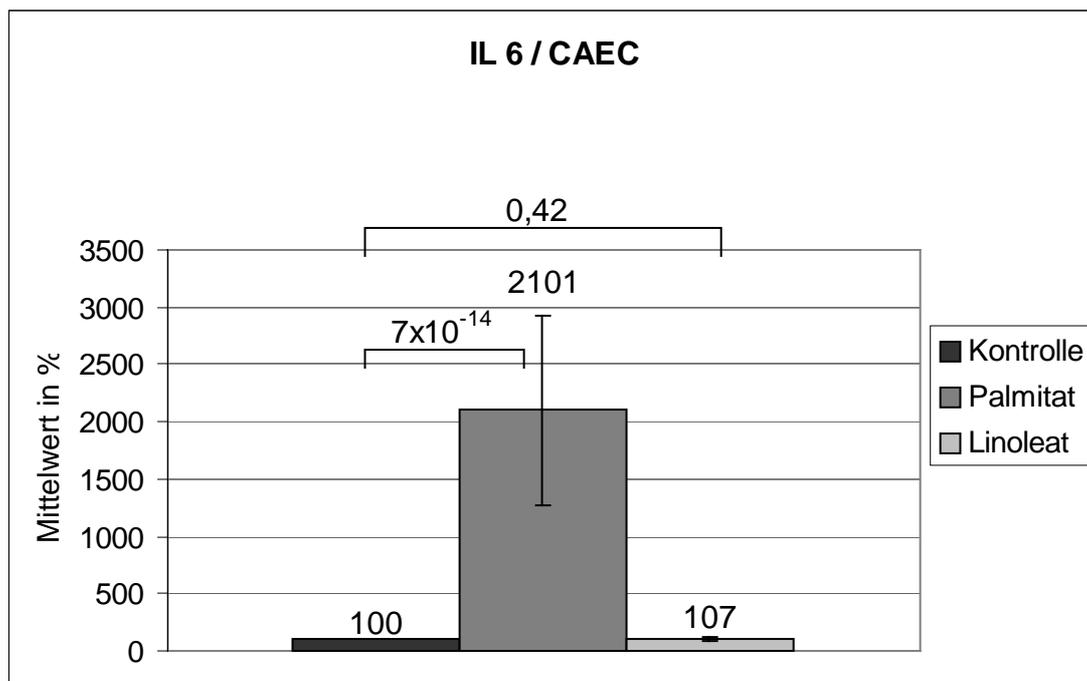
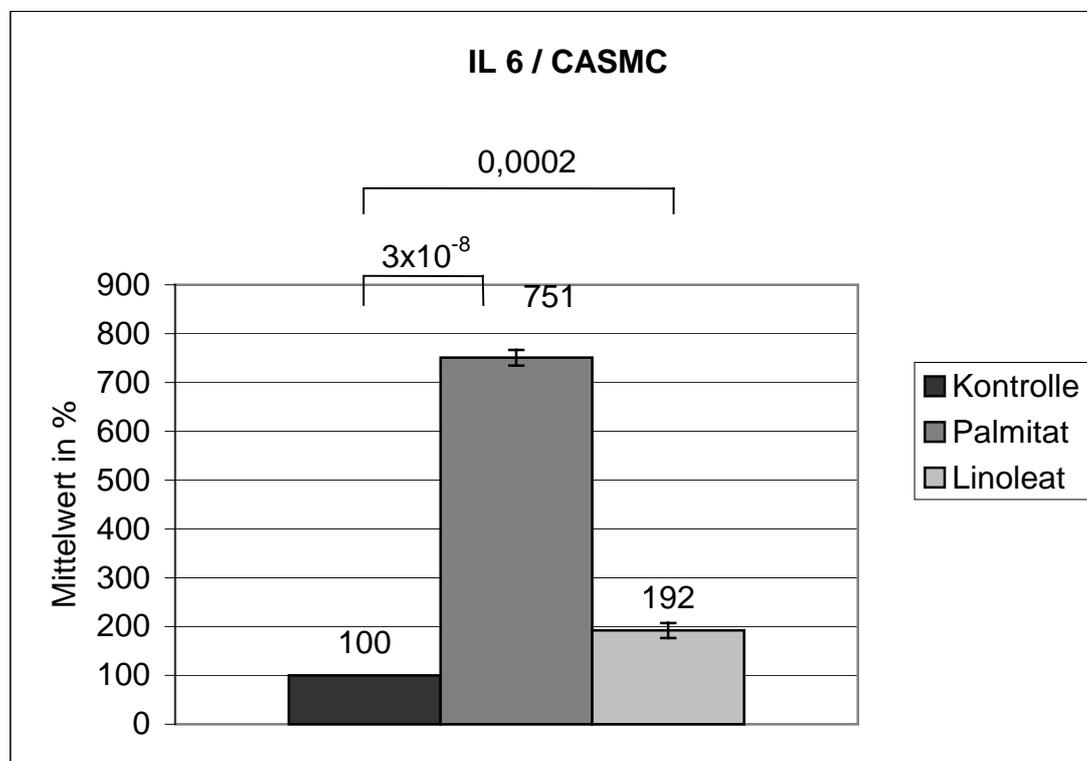


Tabelle 26: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von IL-6 in CASMC.

IL-6				
Name	Wert (%)	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	p
CASMC K 1	100	100	0	
CASMC K 2				
CASMC K 3				
CASMC P 1	730	751	16	3×10^{-8}
CASMC P 2	769			
CASMC P 3	753			
CASMC L 1	175	192	15	0,0002
CASMC L 2	212			
CASMC L 3	189			

Diagramm 24: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von IL-6 in CASMC.

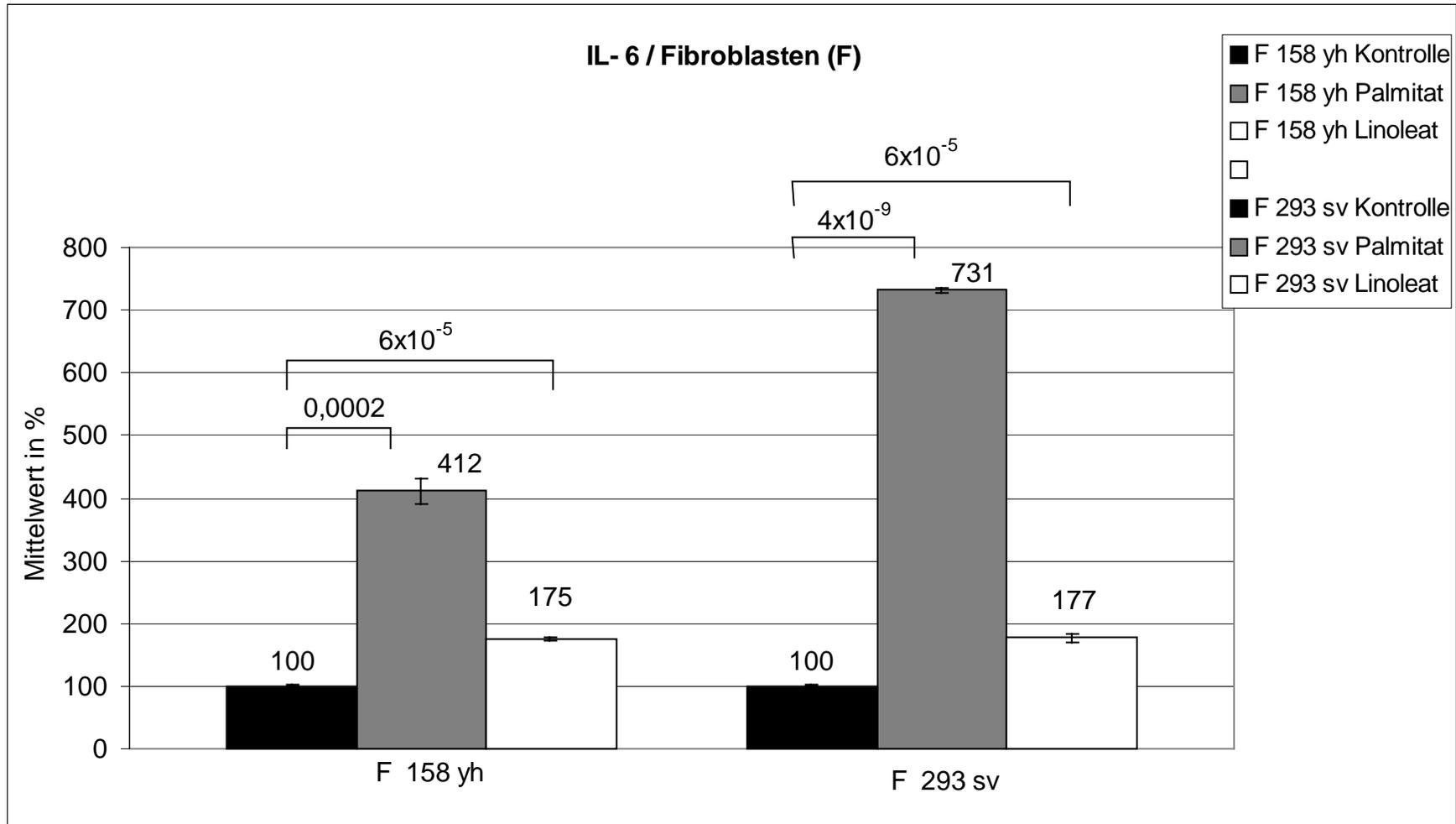


Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von PPAR gamma in HepG2 können hier nicht demonstriert werden, da es in dieser Versuchsreihe nicht gelungen ist, die mRNA-Expression von IL-6 in Hepatocyten nachzuweisen.

Tabelle 27: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von IL-6 in FB.

IL-6			
Name	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	p
F 158 yh Kontrolle	100	1,1	
F 158 yh Palmitat	412	20,3	0,0002
F 158 yh Linoleat	175	3,0	6×10^{-5}
F 293 sv Kontrolle	100	1,4	
F 293 sv Palmitat	731	5,3	4×10^{-9}
F 293 sv Linoleat	177	7,3	6×10^{-5}

Diagramm 25: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von IL-6 in FB.



3.2.7 Humane glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (HumGlyc)

Tabelle 28: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von HumGlyc in CAEC.

HumGlyc				
Name	Wert (%)	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	p
CAEC K 1				
CAEC K 2	100	100	0	
CAEC K 3				
CAEC P 1	109			
CAEC P 2	91	103	9	0,16
CAEC P 3	110			
CAEC L 1	96			
CAEC L 2	99	101	6	0,35
CAEC L 3	109			

Diagramm 26: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von HumGlyc in CAEC.

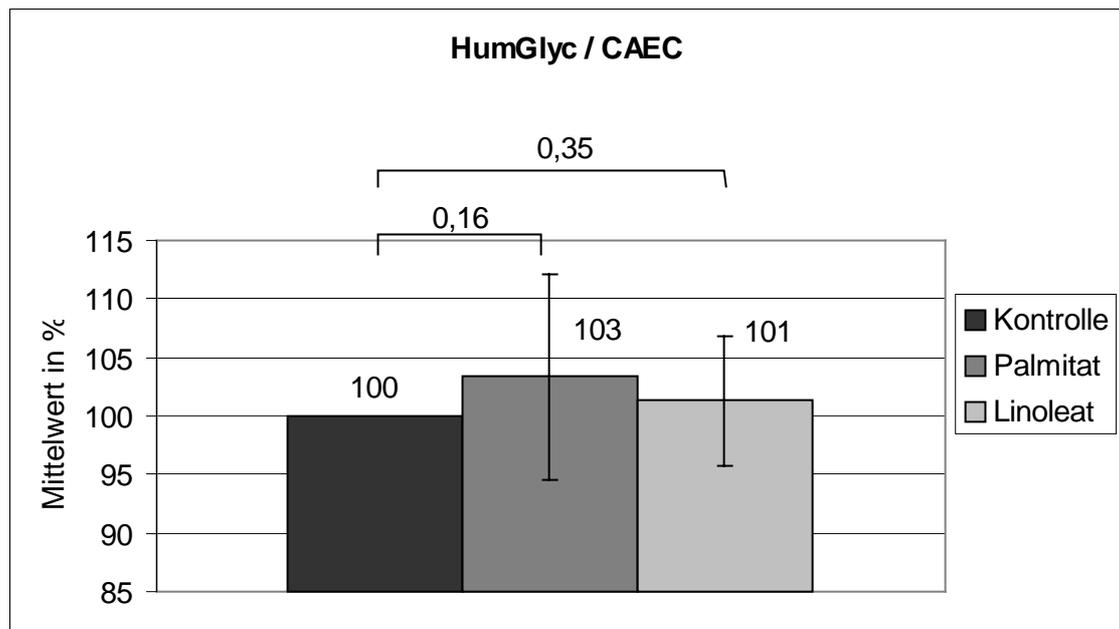


Tabelle 29: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von HumGlyc in CASMC.

HumGlyc				
Name	Wert (%)	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	p
CASMC K 1	100	100	0	
CASMC K 2				
CASMC K 3				
CASMC P 1	84	78	11	0,002
CASMC P 2	63			
CASMC P 3	88			
CASMC L 1	94	95	5	0,1
CASMC L 2	102			
CASMC L 3	90			

Diagramm 27: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von HumGlyc in CASMC.

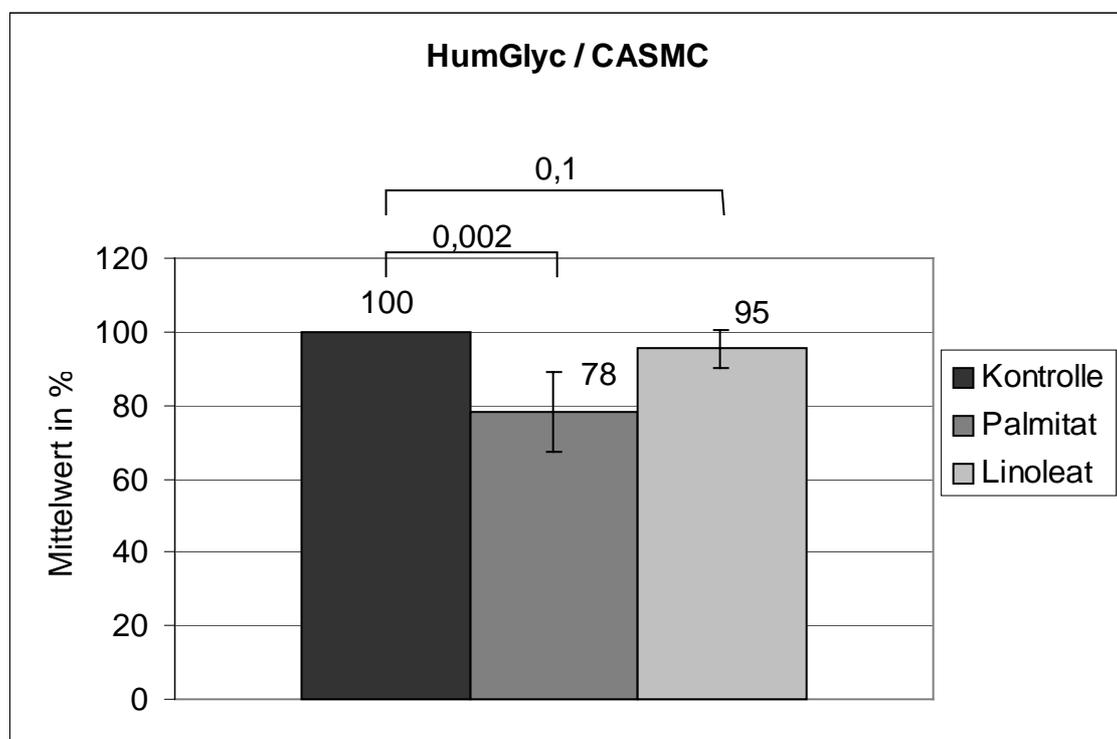


Tabelle 30: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von HumGlyc in HepG2.

HumGlyc				
Name	Wert (%)	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	p
HepG2 K 1	100	100	0	
HepG2 K 2				
HepG2 K 3				
HepG2 P 1	93	90	5	0,05
HepG2 P 2	83			
HepG2 P 3	93			
HepG2 L 1	101	90	12	0,24
HepG2 L 2	95			
HepG2 L 3	73			

Diagramm 28: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von HumGlyc in HepG2.

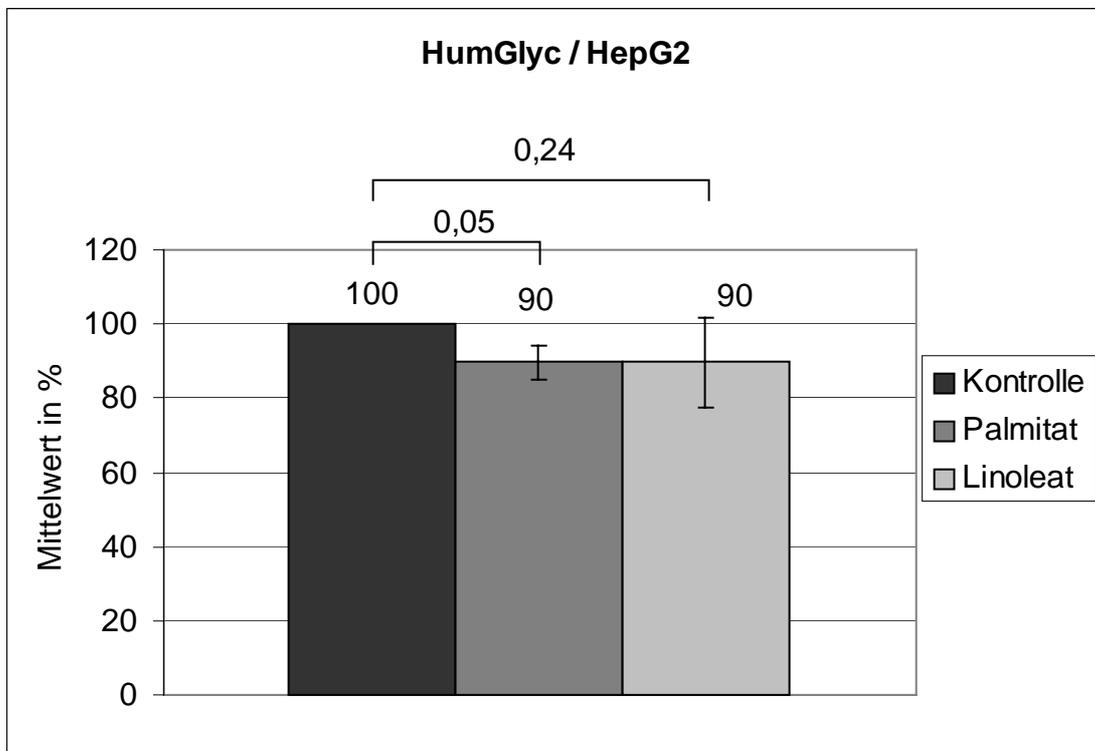
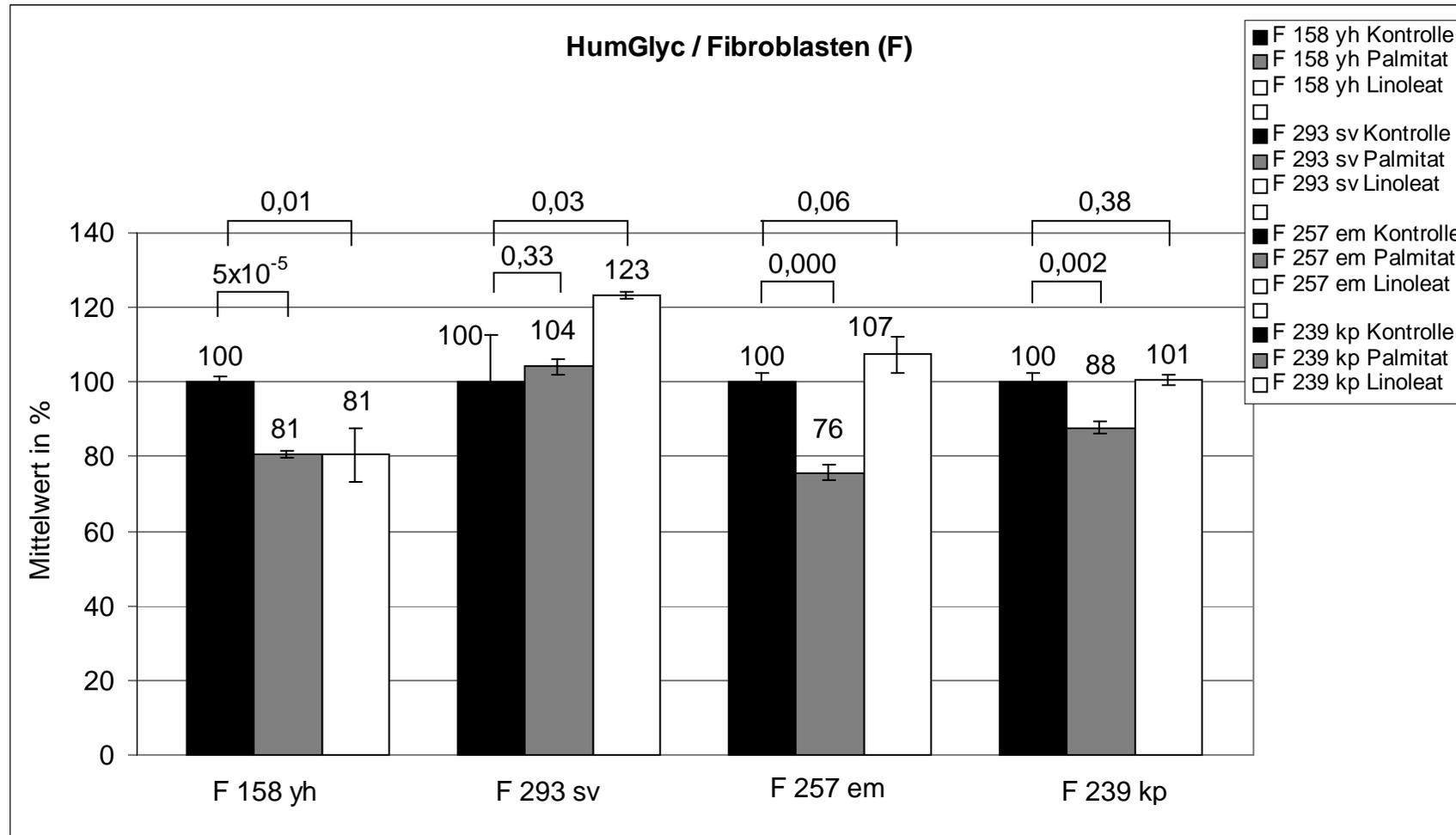


Tabelle 31: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von HumGlyc in FB.

HumGlyc			
Name	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	p
F 158 yh Kontrolle	100	1,6	
F 158 yh Palmitat	81	0,8	5x10 ⁻⁵
F 158 yh Linoleat	81	7,2	0,01
F 293 sv Kontrolle	100	12,5	
F 293 sv Palmitat	104	2,1	0,33
F 293 sv Linoleat	123	0,9	0,03
F 257 em Kontrolle	100	2,3	
F 257 em Palmitat	76	2,1	0,0002
F 257 em Linoleat	107	4,9	0,06
F 239 kp Kontrolle	100	2,4	
F 239 kp Palmitat	88	1,7	0,002
F 239 kp Linoleat	101	1,4	0,38

Diagramm 29: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression von HumGlyc in FB.



3.3. Gesamtergebnisse

Um einen Gesamtüberblick über die Effekte der Fettsäuren zu bekommen, wurden alle Ergebnisse in Form von Feilen in einer Tabelle festgehalten (s. Tabelle 32). Die Feile stellen die Tendenzwirkung von Palmitat und Linoleat im Vergleich zu Kontrollgruppe (100%) graphisch dar:

ein senkrechter Feil = Konzentrationsänderung der mRNA Expression >50 %,

zwei senkrechte Feile = Konzentrationsänderung der mRNA Expression >100 %.

Unterschiede unter 50% haben keine biologische Bedeutung, sie wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt (horizontaler Pfeil).

Statistische Signifikanz liegt bei $p < 0,05$.

3.3.1 Delta 9-Desaturase

Die ermittelten Ergebnisse zeigen, dass Linoleat eine starke Hemmung der mRNA-Expression von Delta-9-Desaturase in allen untersuchten Zelltypen bewirkt: in CAEC verglichen mit der Kontrollgruppe um Faktor 5 ($p = 1,6 \times 10^{-12}$), in CASMC um Faktor 2,6 ($p = 4,6 \times 10^{-7}$), in HepG2 um Faktor 1,5 ($p = 0,03$) und in Fibroblasten um Faktor 2 bis 4 je nach Patienten ($p < 0,0008$).

Palmitat dagegen induziert eine Stimulation der mRNA-Expression von Delta-9-Desaturase: in CASMC um Faktor 2,2 und statistisch hoch signifikant ($p = 4 \times 10^{-6}$), in allen anderen Zelltypen freilich in einem geringeren Ausmaß (Faktor < 1,4), der zwar fast immer (außer bei HepG2) statistisch signifikant, jedoch wahrscheinlich ohne biologische Bedeutung ist.

3.3.2 PPAR alpha

Lediglich in CAEC ist eine Wirkung der Fettsäuren zu beobachten: palmitat-induzierte Stimulation der mRNA-Expression von PPAR alpha ($p = 7,5 \times 10^{-6}$). In allen anderen Zelltypen ist kein statistisch und biologisch signifikanter Effekt zu erkennen.

3.3.3 PPAR gamma

Palmitat induziert eine Hochregulation der mRNA-Expression von PPAR gamma in CAEC (Faktor 1,6; $p=9 \times 10^{-5}$) und besonders stark in CASMC (Faktor 2,3; $p=0,03$), jedoch nicht in HepG2 und Fibroblasten. Linoleat hat keine Wirkung auf die mRNA-Expression von PPAR gamma.

3.3.4 FATP-1

Palmitat hemmt die mRNA-Expression von FATP-1 lediglich in Fibroblasten (Faktor 1,9 bis 1,5; $p<0,03$). In alle anderen Zelltypen haben Palmitat und Linoleat keinen statistisch und biologisch signifikanten Effekt.

3.3.5 CD 36

Palmitat bewirkt eine starke Hemmung der mRNA-Expression von CD 36 in CAEC (Faktor 2,3; $p=0,004$). In alle anderen Zelltypen ist kein statistisch und biologisch signifikanter Effekt zu beobachten.

3.3.6 IL-6

Es ist eine enorm starke stimulierende Wirkung von Palmitat auf die mRNA-Expression von IL-6 in CAEC (Faktor 21, $p=7 \times 10^{-14}$), CASMC (Faktor 7,5; $p=3 \times 10^{-8}$) und FB (Faktor 4 und 7, $p<0,0002$) festzustellen. Linoleat reguliert die mRNA-Expression in CASMC (Faktor 1,9; $p=0,0002$) und FB (Faktor 4 und 7, $p<0,0002$) ebenfalls hoch, seine Wirkung ist jedoch, verglichen mit Palmitat, deutlich schwächer. In CAEC hat Linoleat keinen Effekt.

3.3.7 HumGlyc

Es ist keine Änderung der mRNA-Konzentration bei der mRNA-Expression von humaner glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase als interner Kontrolle nach der Behandlung mit Palmitat und Linoleat zu erkennen. Dies beweist, dass in allen untersuchten Proben exakt gleiche DNA-Mengen eingesetzt wurden.

Tabelle 32: Gesamtergebnisse: Effekte von Palmitat (0,5 mM) und Linoleat (0,5 mM) auf die mRNA-Expression in allen untersuchten Zelltypen.

PCR	Zellkultur													
	CAEC		CASM C		HepG2		FB 158 yh		FB 293 sv		FB 257 em		FB 239 kp	
	Palmitat	Linoleat	Palmitat	Linoleat	Palmitat	Linoleat	Palmitat	Linoleat	Palmitat	Linoleat	Palmitat	Linoleat	Palmitat	Linoleat
Desat 9	→	↓	↑↑	↓	→	↓	→	↓	→	↓	→	↓	→	↓
PPAR alpha	↑	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
PPAR gamma	↑	→	↑↑	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
FATP-1	→	→	→	→	→	→	↓	→	↓	→	↓	→	→	→
CD 36	↓	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
IL 6	↑↑	→	↑↑	↑	n.b.*	n.b.*	↑↑	↑	↑↑	↑	n.b.*	n.b.*	n.b.*	n.b.*
HumGlyc	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→

* = nicht bestimmt

3.4 Ergebnisse der Identifizierung von DNA mittels Agarosegelelektrophorese

Die DNA-Längen der untersuchten Gene sind wie folgt definiert:

Desat 9 = 347 bp (Basenpaare)

PPAR alpha = 307 bp

PPAR gamma = 415 bp

CD 36 = 335 bp

FATP-1 = 493 bp

IL-6 = 425 bp

HumGlyc = 197 bp

Die eingesetzten Marker weisen folgende DNA-Längen auf:

Marker XII: 67/ 110/ 147/ 190/ 242/ 331/ 404/ 489/501

Marker XIII: 118/ 194/ 234/ 271/ 281/ 310/ 603/ 872/ 1078/ 1353

Die untersuchten Basenpaare-Längen aller eingesetzten Gene stimmten mit den definierten Längen überein. Somit wurden sie als die Richtigen identifiziert.

Abbildung 1: Agarosegelelektrophorese mit DNA-Marker XII und Genen Desat 9, PPAR gamma und HumGlyc.

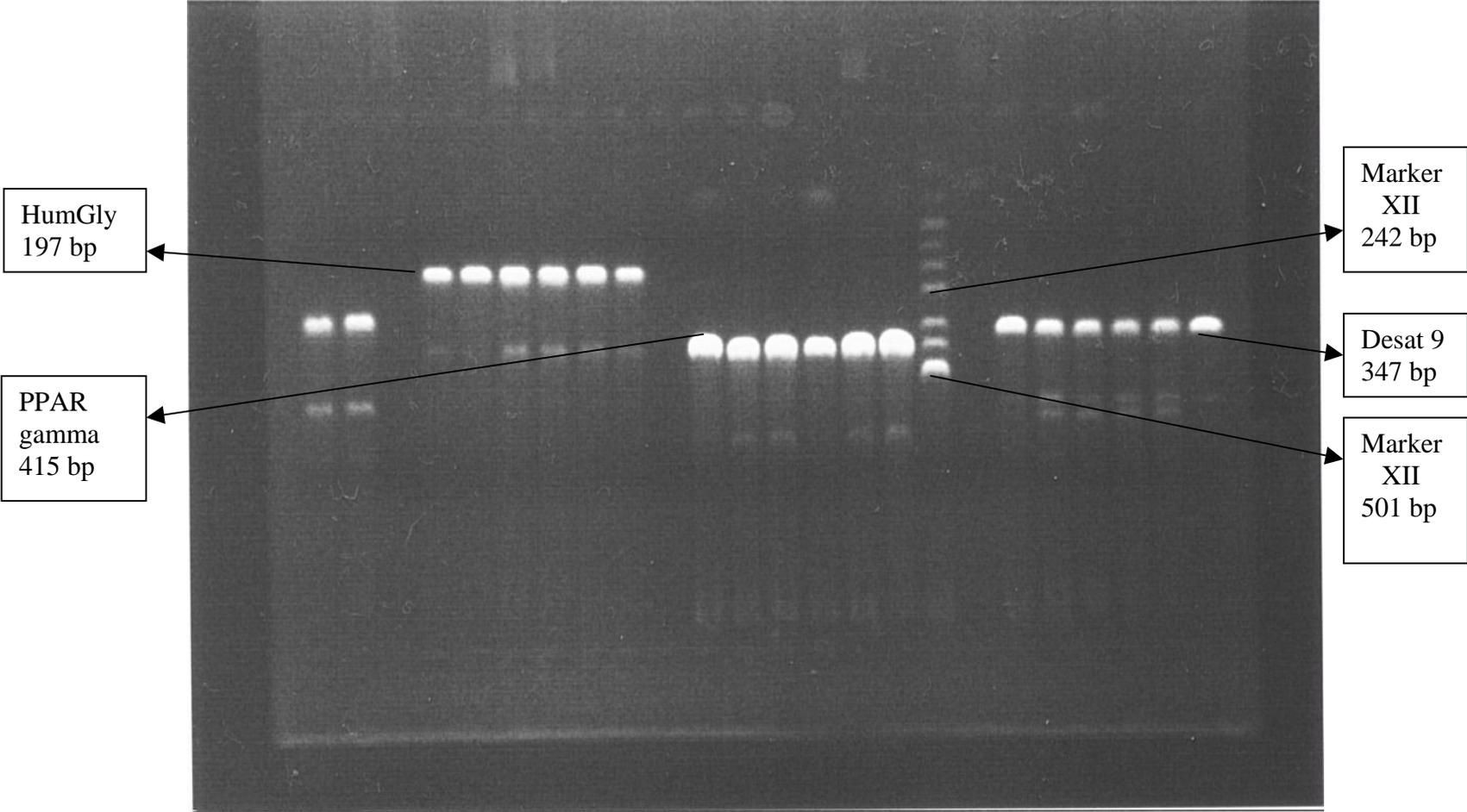
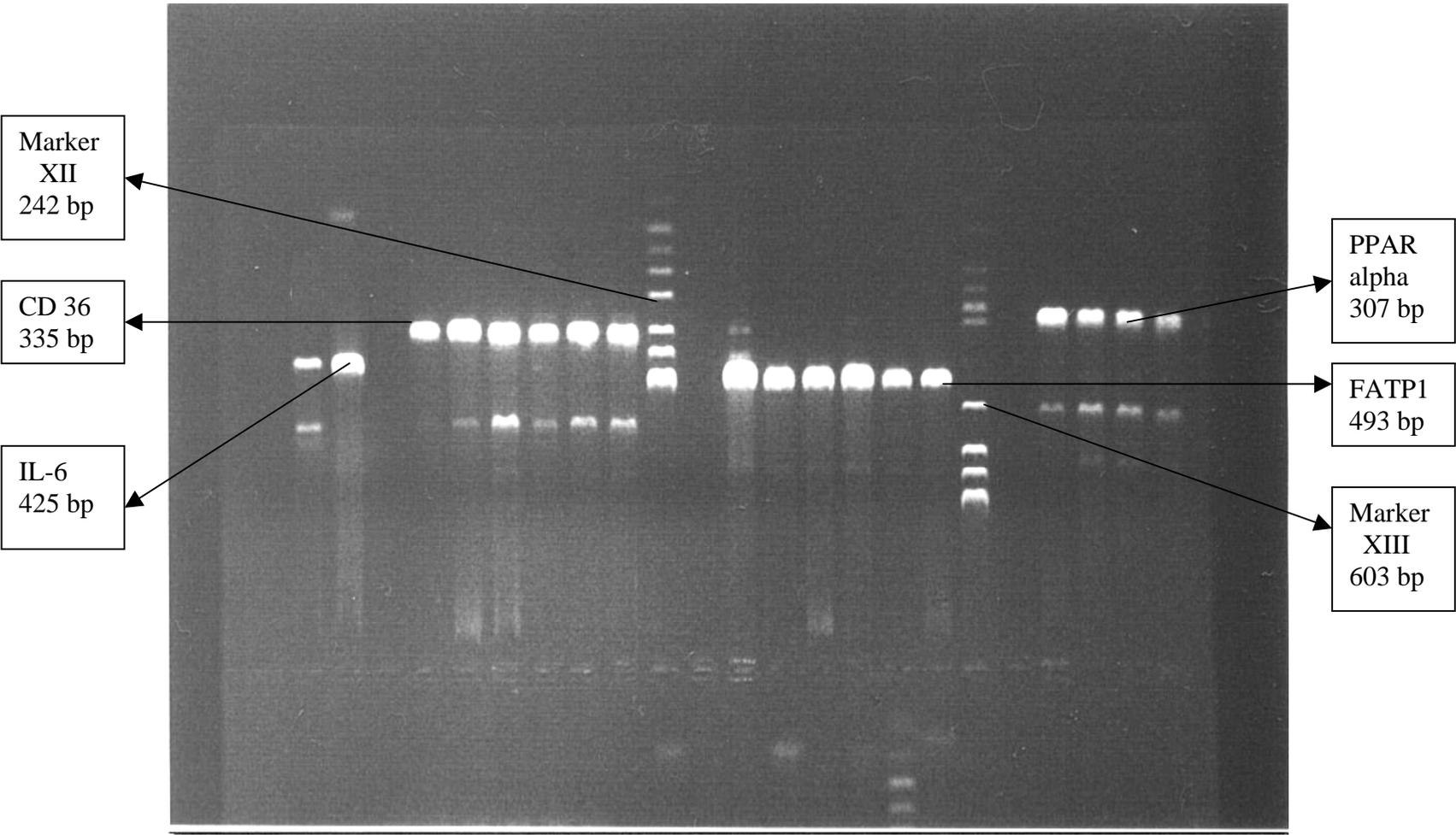


Abbildung 2: Agarosegelelektrophorese mit DNA-Marker XII und XIII und Genen PPAR alpha, CD 36, FATP-1 und IL-6.



4. Diskussion

4.1 Erforschung der Bedeutung von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren

Fette, die mit Nahrung aufgenommen werden, sind wesentliche Bestandteile für das Wachstum und die Entwicklung aller Organismen. Zusätzlich zu ihrer wichtigsten Rolle als Energielieferant und ihrer Wirkung auf die Zusammensetzung der Membranlipide, haben Fette tiefgründige Effekte auf die Genexpression, die zu Veränderungen in Metabolismus, Wachstum und Zelldifferenzierung führen. Allerdings ist ihre Wirkung auf die Genexpression von der Quantität und vom Typ der eingenommenen Fette sehr abhängig (15, 32).

Bis 1992 wurden die genetischen Effekte von Fettsäuren im Bezug auf die Änderung in Membranphospholipiden oder auf die Produktion von Eikosanoiden als sekundär betrachtet, bis dann 1992 gleich zwei Labors über die Entdeckung von Zellkern-Rezeptoren, die von Fettsäuren reguliert wurden, nämlich PPARs, berichteten (23, 29). Folglich können einige Fettsäuren oder ihre Metabolite als Hormone agieren und die Aktivität oder die Menge von spezifischen Transkriptionsfaktoren kontrollieren. In Säugetieren konnten unter anderen PPAR alpha, beta, gamma, HNF4 alpha, NFkB und SREBP1c als target identifiziert werden (31).

Auf der zellulären Ebene ist die physiologische Wirkung der Fettsäuren von ihrer Quantität, Zusammensetzung und von der Dauer ihrer Applikation, aber auch vom zell-spezifischen Fettsäuren-Metabolismus sowie von der zellulären Menge an spezifischen Zellkern- und Membran-rezeptoren abhängig. Diese Mechanismen sind alle in den Kohlenhydrat- und Lipid-metabolismus involviert, genauso wie in die Zelldifferenzierung und Zellwachstum, in die Freisetzung von Cytokinen und Adhäsionsmolekülen, und in die Produktion von Eikosanoiden (31).

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Wirkung von gesättigten (Palmitat) und ungesättigten (Linoleat) Fettsäuren auf die Genexpression einiger, am Kohlenhydrat- und Lipidmetabolismus beteiligter Gene. Dabei wurde mit etablierten Zelltypen wie HepG2, CASMC, CAEC und Fibroblasten gearbeitet.

4.2 Diskussion der Versuchsergebnisse

4.2.1 Delta 9-Desaturase

Stearyl CoA-desaturase (SCD) ist ein mikrosomales Enzym, das die Synthese von monounsättigten Fettsäuren aus gesättigten Fettsäuren katalysiert. Die wichtigsten Substrate des SCD-Enzyms sind v.a. Palmitoyl- bzw. Stearyl-CoA, die in Palmitoleoyl- bzw. Oleoyl-CoA umgewandelt werden. Das Verhältnis der gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren beeinflusst die Zusammensetzung der Phosphorlipiden in der Membran, und diese Veränderung steht im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen wie Adipositas, Diabetes, kardiovaskuläre oder neurologische Erkrankungen (2,30,45,46,61). Obesity wird beim Menschen mit erhöhter Desaturase 9-Aktivität und reduzierter Desaturase 5- und Desaturase 6- Aktivität assoziiert (45). In SCD-Null-Mäusen wurde beobachtet, dass hier die mRNA-Expression von Protein-Tyrosin Phosphatase 1 B reduziert wird (48), GluT4 erhöht ist, und die Tiere insulinempfindlicher als Wildtyp sind. Es hat sich deutlich gezeigt, dass eine SCD-Defizienz zu einer Erhöhung des Insulinsignals und der Glykogenmetaboliten führt (48). In isolierten humanen Myotuben haben Wahl et al. (66) gezeigt, dass bei der Behandlung mit Troglitazonen, die auch zu einer Verbesserung der Insulinsensitivität beitragen, eine Aktivierung von PPAR gamma zu einer Reduktion der mRNA-Expression von Delta 6-Desaturase führt. Deshalb ist zu erwarten, dass eine Erhöhung der Desaturase-mRNA-Expression mit einer Verminderung des Glukosetransports oder mit einer Reduktion des Insulinsignals verbunden ist.

Im vorliegenden Versuch konnte zum ersten mal gezeigt werden, dass die Zugabe von der ungesättigten Fettsäure Linoleat zu einer Reduktion der Desaturase 9-mRNA-Expression in allen untersuchten Zellen führt. Die Zugabe von der gesättigten Fettsäure Palmitat bewirkt dagegen eine signifikante Erhöhung der Desaturase 9-mRNA-Expression in CASMC. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass Palmitat, das erst in Palmitoyl-CoA umgewandelt und dann als Substrat der Delta 9-Desaturase verwendet wird, die mRNA-Expression von Desaturase in CASMC reguliert. Dagegen

beim Überschuss der ungesättigten Fettsäuren (Linoleat), wird das Enzym Delta 9-Desaturase nicht benötigt, folglich wird die mRNA-Expression herunterreguliert.

Ebenso wird in dieser Arbeit demonstriert, dass die mRNA-Expression von Desaturase 9 möglicherweise nicht immer über die Regulation von PPAR gamma erfolgt. Bei Behandlung mit Troglitazonen (66) konnten in Myotuben die PPAR gamma-Expression sowie die PPAR gamma-Aktivierung reguliert werden, gleichzeitig aber wurde die mRNA-Expression von Desaturase gehemmt. In dieser Untersuchung wurde jedoch beobachtet, dass Palmitat bei gleichzeitiger Regulation der PPAR gamma-Expression die Desaturase-mRNA-Expression entweder stark stimuliert (CASMIC) oder gar nicht verändert (CAEC). Diese Ergebnisse belegen, dass eine Stimulation der mRNA-Expression und eine Aktivierung von PPAR gamma nicht unbedingt zu einer negativen Regulation von Delta 9-Desaturase führen müssen.

4.2.2 PPARs

PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors) sind liganden-abhängige Transkriptionsfaktoren, die in einigen Organen und Zelltypen vorhanden sind. PPAR alpha und gamma stellen die zwei wichtigsten Vertreter von ihnen dar. Sie beide können sowohl Lipidmetabolismus, Glucosehomöostase, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose als auch „inflammatory response“ beeinflussen, indem sie die Transkription ihrer Zielgene aktivieren (29, 47, 53).

PPAR alpha wird hauptsächlich in Gewebe mit hohem Fettsäure-Katabolismus wie Leber, braunes Fettgewebe, Niere, Herz und Skelettmuskel exprimiert; PPAR gamma - in weißem wie braunem Fettgewebe und (in limitierten Mengen) in Skelettmuskel und Herz. Beide Isotypen werden außerdem in vaskulären Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert (12).

PPAR gamma wird von Metaboliten der Arachidonsäure, oxidierten „low density“ Lipoproteinen, Thiazolidinedionen (TZD) und 15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 aktiviert (21, 22, 37, 47). PPAR alpha Liganden sind Fettsäuren, Fibrate und Eukosanoide (21, 47).

Fibrate wirken gleichzeitig auch proinflammatorisch, somit kann PPAR alpha eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Dauer der Inflammation, die durch Leukotriene

B4 oder Arachidonsäure induziert wird, spielen. Der erste Beweis dafür, dass PPAR alpha den Inflammationsprozess beeinflusst, lieferte die PPAR alpha-Null-Maus, die eine verlängerte „inflammatory response“ zeigte (12, 18).

Untersuchungen von Spencer et al. (57) ergaben, dass in vitro Zugabe von PPAR alpha Liganden in alten Mäusen zur Senkung des NFkappaB- Spiegels und zur Reduktion aller von NFkappaB regulierten, pleiotropischen Cytokine führt. In humanen arteriellen glatten Muskelzellen (HASMC, human aortic smooth-muscle cell) wurde gezeigt, dass PPAR alpha - Aktivatoren (Fibrate) die IL-1 induzierte Produktion von IL-6 und Prostaglandinen sowie Expression von Zyklooxygenase-2 inhibieren. Die Inhibition von Zyklooxygenase-2-Induktion stellt sich transkriptionell als Resultat von PPAR alpha Repression auf NFkappaB (58). Dies bedeutet, dass Fibrate eine negative Wirkung auf die IL-1 β -induzierten IL-6-Produktion haben und zwar über die Hemmung von NFkappaB-Aktivität (17). Dabei ist anzumerken, dass die antiinflammatorische Eigenschaft von Fibraten PPAR alpha-abhängig ist, denn in PPAR alpha-Null-Mäusen konnten Fibrate keine IL-6- Repression bewirken (17).

Die präsentierte Studie zeigt interessante Gemeinsamkeiten der PPARs in der Reaktion auf die Fettsäuren. So wirkt Palmitat als Ligand von PPAR alpha in CAEC und als Ligand von PPAR gamma in CAEC und in CASMC. Hier wird die mRNA-Expression von PPARs durch 0,5 mMol Palmitat stimuliert. Im Falle von PPAR gamma weiß man, dass die Stimulation seiner mRNA-Expression gleichzeitig seine Aktivierung und somit die Regulation einer Reihe von Genen bedeutet. In HepG2 und FB zeigen die Fettsäuren dagegen keine Wirkung auf die mRNA-Expression von PPARs (α und γ).

4.2.3 Transportproteine FATP-1 und CD 36

Die zirkulierenden Fettsäuren können die Plasmamembrane auf zwei verschiedene Arten passieren: entweder durch die passive Diffusion aufgrund ihrer Lipidlöslichkeit (25, 27) oder durch die aktive Aufnahme in die Zellen mittels Fettsäuren-Transport-Systeme (1, 62, 63). Drei Gruppen von Transportern werden hier unterschieden (5,40).

Die best untersuchte von ihnen ist die FATP- Familie (fatty acid transport protein = FATP) mit dem Hauptverteiler FATP -1, einem Plasmamembran-Protein, das langkettige Fettsäuren befördert (52). Zwei andere spezialisierte Transportsysteme sind Glykoprotein CD 36 oder FAT (fatty acid translocase) und FABP pm.

Der physiologische Zustand, in dem der Fettsäurenverbrauch gesteigert wird, ist mit Veränderungen in der Expression dieser Transportproteine verbunden, z.B. FABPc wird während kalorimetrischer Einschränkung erhöht (33), mFABP nimmt im Muskel während des Trainings zu (35). In Nagetieren wurde gezeigt, dass die kontraktive Aktivität zu einer Zunahme des Fettsäuren-Transports führt und gleichzeitig eine Induktion der Expression von FAT sowohl im roten als auch im weißen Muskel bewirkt (10). Auch das Hungern erhöht die FATP-1 mRNA-Expression im adipösen Gewebe der Maus (39). Ein Quantitätsvergleich der Expression dieser Transportproteine wurde allerdings bis jetzt nicht durchgeführt.

Binnert et al. (5) haben in humanem Gewebe (Muskel und Adipocyten) gezeigt, dass die Expression von mFATP-1 im Skelettmuskel bei Frauen höher ist als bei Männern, unabhängig davon, ob sie gesund oder Diabetiker sind. Darüber hinaus stellten sie fest, dass eine Insulin-Infusion zur Reduktion von FATP-1 mRNA-Expression im Muskel schlanker Frauen, jedoch nicht im Muskel schlanker Männer, führt. Bei allen anderen Probanden ihrer Studie (adipöse Patienten und Typ-2-Diabetiker beider Geschlechter) bewirkte Insulin-Infusion sowohl im Skelettmuskel als auch in Adipocyten keinen Effekt auf die FATP-1 mRNA-Expression. Auf der Basis dieser Daten nahmen die Autoren an, dass die Änderung in FATP-1-Expression höchstwahrscheinlich wenig mit der Änderung im Fettsäureumsatz bei Fettleibigkeit oder bei Typ-2-Diabetes gemeinsam hat (5).

Diese Arbeit zeigt zum ersten mal, dass die Fettsäuren-Transportproteine FATP-1 und CD 36 in isolierten humanen Zellen wie HepG2, CASMC, CAEC und FB exprimiert werden, und, was noch wichtiger ist, sie demonstriert die Wirkung von Palmitat und Linoleat auf die Genexpression von FATP-1 und CD 36.

Dabei wurde die Vermutung von Binnert et al. bezüglich der Wirkung von Linoleat auf die mRNA-Expression von FATP- 1 und CD 36 bestätigt: die ungesättigte Fettsäure Linoleat beeinflusst bei einer Konzentration von 0,5 mMol die mRNA-Expres-

sion dieser beiden Transportproteine nicht. Die Zugabe von Palmitat führte allerdings zu einer Hemmung der mRNA-Expression von FATP-1 in FB (drei von vier Probanden) und der mRNA-Expression von CD 36 in CAEC. Man kann infolge dessen nur vermuten, dass Palmitat unterschiedliche Wirkung in unterschiedlichen Zelltypen hat. Dies genau zu klären bedarf weiterer Untersuchungen. Möglich ist es auch, dass Palmitat und Linoleat andere, für diese Fettsäuren spezifische Transportproteine regulieren, die in dieser Arbeit nicht untersucht wurden.

Die Studien von Martin G. und Schoonjans K. (41, 54) fanden heraus, dass die mRNA-Expression von FATP-1 und ACS (acyl-CoA synthetase) in einigen Zelltypen (Adipocyten, Hepatocyten von Raten) stark von Insulin und von PPARs -Aktivatoren (Fibrate, Fettsäuren und Thiazolidinedione) kontrolliert wird. Darüber hinaus stimulieren die Retinoid X Rezeptor (RXR)- Liganden, die sogenannten „Rexinoide“ (LG1069, LG100268) ebenfalls die mRNA-Expression von FATP-1 und ASC, indem sie die Bildung von RXR-PPAR-Heterodimeren induzieren (40). Die Untersuchung von Wilmsen et al. (69) ergab, dass eine langzeitige Behandlung der humanen Skelettmuskelzellen von Diabetes Typ2 Patienten mit Thiazolidinedionen zu einem erhöhten Fettsäureumsatz mit gleichzeitiger Hochregulation von CD 36-Expression führt. In diesem Versuch konnte keine Regulation von PPAR alpha oder PPAR gamma auf die Transportproteine FATP-1 und CD 36 festgestellt werden. Dies deutet ebenfalls auf eine andere Regulationsart von Palmitat auf die Genexpression in den hier untersuchten Zellen als die Regulation von Fibraten und Thiazolidinedionen in Adipocyten und humanen Skelettmuskelzellen.

4.2.4 Interleukin-6 (IL-6)

Die Studie von C. Weigert et al. (68) fand heraus, dass Palmitat die IL-6- mRNA-Expression (und die Proteinsekretion) in Myotuben des Skelettmuskels stimuliert, Linoleat dagegen hemmt.

In der präsentierten Arbeit wird zum ersten mal die Wirkung von Palmitat auf die IL-6 in CASMC, CAEC und FB gezeigt. Dabei konnte ebenfalls eine deutliche Stimulation

der IL-6- mRNA-Expression durch Palmitat festgestellt werden. Allerdings zeigte auch Linoleat, wider Erwarten, eine hochregulierende Wirkung in CASMC und FB. Dies lässt die Vermutung nahe, dass Linoleat in verschiedenen Organen unterschiedliche Effekte erzeugen kann.

Im Rahmen dieses Versuches gelang es nicht, die IL-6- mRNA-Expression in HepG2 nachzuweisen, was vermutlich an einer viel zu geringen mRNA-Menge lag.

Diese Untersuchung hat gezeigt, dass Palmitat ein Ligand des PPAR alpha ist und somit seine mRNA-Expression in CAEC stimuliert. Man weiß allerdings nicht, ob Palmitat außer der mRNA-Expression gleichzeitig auch die PPAR alpha-Aktivität stimuliert und auf diese Weise dann auch andere Gene reguliert. Man kann jedoch davon ausgehen, dass Palmitat die mRNA-Expression von PPAR alpha und möglicherweise sogar die Aktivierung des Rezeptors anders als Fibrate reguliert. Dies zeigen die hier zum ersten mal präsentierten Ergebnisse, dass Palmitat zwar genauso wie Fibrate die mRNA-Expression von PPAR alpha stimuliert, gleichzeitig aber, im Gegensatz zu ihnen, auch die mRNA-Expression von IL-6 fördert und nicht über IL-1 β hemmt, wie es in Versuchen von Staels, Delerive et al. der Fall war (17, 58). Allerdings, ob diese Stimulation der mRNA-Expression von IL-6 in diesem Versuch über die Aktivierung von IL-1 β oder über andere Mechanismen erfolgt, kann man mit den hier erzielten Ergebnissen nicht beantworten. Aus dieser Arbeit lässt es sich lediglich ableiten, dass die Stimulation von IL-6 mRNA-Expression nicht über die Aktivierung von PPAR gamma erfolgen kann, da nicht bei allen Zelltypen eine Stimulation der mRNA-Expression von PPAR gamma, dafür aber in allen Zellen eine Hochregulation der mRNA-Expression von IL-6 durch Palmitat induziert wird.

Weitere Informationen über den molekularen Mechanismus der Palmitat-Wirkung auf die mRNA-Expression und die Protein-Synthese sind hier notwendig und bedürfen weiterer Nachforschung.

4.3 Schlußfolgerung aus der Arbeit

Zusammengefasst liefert diese Arbeit eine Reihe von Hinweisen, dass Palmitat auf den Fettmetabolismus Effekte wie Regulation von Delta-9 Desaturase und IL-6, möglicherweise Aktivierung von Protein-Tyrosine Phosphatase 1 B (PTB-1) und Beeinträchtigung des Insulinsignals bewirken kann.

Weiterhin wurde in diesem Versuch zum ersten mal gezeigt, dass die Fettsäuren-Transportproteine FATP-1 und CD 36 in isolierten humanen Zellen wie HepG2, CASMC, CAEC und FB exprimiert werden und dass die Genexpression dieser Transportproteine weder von Palmitat noch von Linoleat reguliert wird. Auch das Ergebnis, dass Palmitat und Linoleat fast in allen untersuchten Zelllinien die mRNA-Expression von IL-6 hochregulieren, ist neu.

Darüber hinaus sind hier zum ersten mal Daten vorgelegt worden, die belegen, dass Palmitat, nicht aber Linoleat, die mRNA- Expression von PPAR alpha in CAEC sowie auch von PPAR gamma in CAEC und CASMC stimuliert. Dabei konnte man beobachten, dass Palmitat anders als Fibrate die mRNA-Expression von PPAR alpha reguliert. Die Art der Regulation war allerdings aus der Versuchsanordnung nicht bestimmbar.

Im Rahmen dieser Untersuchung war es auch nicht möglich festzustellen, ob eine Stimulation der mRNA-Expression von PPAR alpha gleichzeitig eine Aktivierung des Rezeptors bewirkt, wie es bei der Stimulation der mRNA-Expression von PPAR gamma der Fall ist, und ob auf diese Weise dann die Genregulation gesteuert werden kann. Die hier erzielten Daten zeigen ebenfalls nicht, ob eine mRNA-Expression gleichzeitig zu einer Erhöhung der Proteine führt. Um eine klare Antwort darauf zu erhalten, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

5. Zusammenfassung

In den letzten Jahren lieferten zahlreiche Studien Hinweise dafür, dass die Erkrankungen, die als „metabolisches Syndrom“ zusammengefasst werden, nicht nur eine erbliche, sondern auch eine umweltbedingte Komponente besitzen. Konsequenter Anstieg von Diabeteskranken und Übergewichtigen, bedingt durch steigende körperliche Passivität und hyperkalorische Ernährung, ist ein eindeutiger Beleg dieser Hypothese.

Eine Zunahme des Fettgewebes führt zwangsläufig zu einer Erhöhung der freien Fettsäuren im Blut. Daraus resultiert eine Reihe von metabolischen Funktionsstörungen wie verschlechterte Insulinwirkung, reduzierte Insulinproduktion, Anstieg der Entzündungsmediatoren im Blut, Beeinträchtigung von Fibrinolyse und Endothelfunktion.

Seitdem bekannt ist, dass die Fettsäuren auch tiefgreifende Effekte auf die Genexpression ausüben können, ist es von großer Bedeutung herauszufinden, welche Fettsäuren welche Gene und in welchen Zellen regulieren können. Diesem Zweck dient auch die vorliegende Studie.

In der präsentierten Untersuchung wurden vier verschiedene Zelltypen (CASM, CAEC, FB, HepG2) mit der gesättigten Fettsäure Palmitat und der ungesättigten Fettsäure Linoleat für 20 Stunden inkubiert. Die Expression der am Fettmetabolismus beteiligten Gene (Delta 9-Desat, PPAR alpha, PPAR gamma, FATP-1, CD 36, IL-6) wurde mittels Polymerase-Ketten-Reaktion bestimmt. Als interne Kontrolle der eingesetzten DNA-Menge diente humane glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Die Identifizierung der Gene erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese.

Die Effekte von Palmitat und Linoleat in den untersuchten Geweben wurden verglichen und sowohl tabellarisch als auch grafisch dargestellt. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe von Student`s t test durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zum ersten mal, dass Linoleat die mRNA-Expression von Delta 9-Desaturase in allen untersuchten Zellkulturen herunterreguliert, Palmitat dagegen in einem Zelltyp (CASMC) stimuliert. Die mRNA-Expression der Fettsäuren-Transportproteine FATP-1 und CD 36 wird von Linoleat nicht beeinflusst, von Palmitat jedoch in FB (FATP-1) und in CAEC (CD 36) gehemmt. Neu ist ebenfalls, dass Palmitat, nicht aber Linoleat, die mRNA-Expression von PPAR gamma in CASMC und in CAEC stimulieren kann. In CAEC reguliert Palmitat darüber hinaus auch die mRNA-Expression von PPAR alpha hoch. Ob PPAR alpha gleichzeitig aktiviert wird oder nicht, lässt es sich durch diese Untersuchung nicht feststellen. Die Versuche haben ebenso gezeigt, dass die mRNA-Expression von IL-6 von Palmitat in CAEC, CASMC, FB und von Linoleat, wenn auch deutlich schwächer, in CASMC und FB stimuliert wird. Aus den erzielten Daten geht allerdings nicht hervor, ob die mRNA-Expression von IL-6 gleichzeitig zu einer Erhöhung der Proteine führt. Um dies zu klären, bedarf es weiterer Untersuchungen.

Diese Studie hat somit gezeigt, dass sowohl gesättigte als auch ungesättigte Fettsäuren die Genexpression in verschiedenen Zielgeweben beeinflussen können. Da hier in physiologischen Bereichen gearbeitet wurde (Fettsäurenkonzentration 0,5 mM), kann man vermuten, dass in vivo entsprechende Effekte zu erwarten sind.

Aus diesem Grund ist es vorstellbar, dass Palmitat bzw. Linoleat die erbliche Komponente des metabolischen Syndroms aktivieren bzw. hemmen („Gen-Umwelt-Interaktion“) und somit für die Entstehung von Insulinresistenz, Diabetes Typ 2, Hypertonie, Atherosklerose und anderen Krankheiten des Syndroms verantwortlich sein könnte. Um diese komplexe Hypothese jedoch zu bestätigen, sind zahlreiche umfassende Studien erforderlich.

Mit dieser Arbeit ist ein Beitrag zum Verständnis der potentiellen Rolle von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren, die über die Nahrung aufgenommen oder im Körper gebildet werden, für die Entstehung des metabolischen Syndroms geleistet worden.

6. Literaturverzeichnis

1. Abumrad, N.A., Perkins, R.C., Park, J.H., Park, C.R. (1981)
Mechanism of long chain fatty acid permeation in the isolated adipocyte.
J Biol Chem 256, 9183-9191
2. Agatha, G., Hafer, R., Zintl, F. (2001)
Fatty acid composition of lymphocyte membrane phospholipids in children with acute Leukaemia.
Cancer Lett 173, 139 –144
3. Arner, P. (2002)
Insulin resistance in type 2 diabetes: role of fatty acids.
Diabetes Metab Res Rev 18, 5-9
4. Berger, J., Moller, D.E. (2002)
The mechanism of action of PPARs.
Annu Rev Med 53, 409-435
5. Binnert, Ch., Koistinen, H.A., Martin, G., Andreelli, F., Bebeling, P., Koivisto, V.A., Lavill, M., Auwerx, J., Vidal, H. (2000)
Fatty acid transport protein-1 mRNA expression in skeletal muscle and adipose tissue in humans.
Am J Physiol Endocrinol Metab 279, E1072-E1079
6. Blundell, J.E., Goodson, S., Halford, J.C. (2001)
Regulation of appetite: role of leptin in signalling systems for drive and satiety.
Int J Obes Relat Metab Disord 1, 29-34
7. Boden, G. (2003)
Effects of free fatty acids (FFA) on glucose metabolism: significance for insulin resistance and type 2 diabetes.
Exp Clin Endocrinol Diabetes 111, 121-124
8. Boden, G., Lebed, B., Schatz, M., Homko, C., Lemieux, S. (2001)
Effects of acute changes of plasma free fatty acids on intramyocellular fat content and insulin resistance in healthy subjects.
Diabetes 51, 1612-1617
9. Boden, G., Shulman, G.I. (2002)
Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the Development of insulin resistance and beta-cell dysfunction.
Eur J Clin Invest 32, 14-23

10. Bonen, A., Luiken, J.J., Liu, S., Dyck, D.J., Kiens, B., Kristiansen, S., Turcotte, L.P., Van der Vusse, G.J., Glatz, J.F. (1998)
Palmitate transport and fatty acid transporters in red and white muscles.
Am J Physiol Endocrinol Metab 275, E471-E478
11. Bruun, J.M., Verdich, C., Toubro, S., Astrup, A., Richelsen, B. (2003)
Association between measures of insulin sensitivity and circulating levels of IL-8, IL-6 and tumor necrosis factor-alpha. Effect of weight loss in obese men.
Eur J Endocrinol 148, 535-542
12. Cabrero, A., Laguna, J.C., Vazquez, M. (2002)
Peroxisome proliferator- activated receptors and the control of inflammation.
Curr Drug Targets Inflamm Allergy 1, 243-248
13. Carey, A.L., Lamont, B., Andrikopoulos, S., Koukoulas, I., Proietto, J., Febbraio, M.A. (2003)
Interleukin-6 gene expression is increased in insulin-resistant rat skeletal muscle following insulin stimulation.
Biochem Biophys Res Commun 302, 837-840
14. Carlsson, E., Fredriksson, J., Groop, L., Ridderstrale, M. (2004)
Variation in the calpain- 10 gene is associated with elevated triglyceride levels and reduced adipose tissue messenger ribonucleic acid expression in obese Swedish subjects.
J Clin Endocrinol Metab 89, 3601-3605
15. Clarke, S.D., Jump, D.B. (1994)
Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription.
Annu Rev Nutr 14, 83-98
16. del Bosque-Plata, L., Aguilar-Salinas, C.A., Tusie-Luna, M.T., Ramirez-Jimenez, S., Rodriguez-Torres, M., Auron-Gomez, M., Ramirez, E., Velasco-Perez, M., Ramirez-Silva, A., Gomez-Perez, F., Hanis, C.L., Tsuchiya, T., Yoshiuchi, I., Cox, N., Bell, G.I. (2004)
Association of the calpain-10 gene with type 2 diabetes mellitus in a Mexican population.
Mol Genet Metab 81, 122-126
17. Delerive, P., De Bosscher, K., Besnard, S., Vanden Berghe, W., Peters, J.M., Conzaes, F.J., Fruchart, J.C., Tedgui, A., Haegeman, G., Staels, B. (1999)
Peroxisome proliferator- activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1.
J Biol Chem 274, 32048-32054

18. Devchand, P.R., Keller, H., Peters, J.M., Vazquez, M., Gonzales, F., Wahli, W. (1996)
The PPAR alpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control.
Nature 384, 39
19. Dzienis-Straczkowska, S., Straczkowski, M., Szelachowska, M., Stepien, A., Kowalska, I., Kinalska, I. (2003)
Soluble tumor necrosis factor-alpha receptors in young obese subjects with normal and impaired glucose tolerance.
Diabetes Care 26, 875-880
20. Eitel, K. Staiger, H., Rieger, J., Mischak, H., Brandhorst, H., Brendel, M., Bretzel, R., Häring, H., Kellerer, M. (2003)
Protein kinase C δ activation and translocation to the nucleus are required for fatty acid-induced apoptosis of insulin-secreting cells.
Diabetes 52, 991-997
21. Forman, B.M., Chen, J., Evans, R.M. (1997)
Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta.
Proc Natl Acad Sci USA 94, 4312-4317
22. Forman, B.M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R.P., Spiegelman, B.M., Evans, R.M. (1995)
5-Deoxy-delta-12,14,-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma.
Cell 83, 803-812
23. Gottlicher, M., Widmark, E., Li, Q., Gustafsson, J.A. (1992)
Fatty acids activate a chimera of the clofibrilic acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor.
Proc Natl Acad Sci USA 89, 4653-4657
24. Groop, L. (2000)
Pathogenesis of type 2 diabetes: the relative contribution of insulin resistance and impaired insulin secretion.
Int J Clin Pract Suppl 113, 3-13
25. Hamilton, J.A., Kamp, F. (1999)
How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids?
Diabetes 48, 2255-2269
26. Heilbronn, L.K., Smith, S.R., Ravussin, E. (2003)
The insulin-sensitizing role of the fat derived hormone adiponectin.
Curr Pharm Des 9, 1411-1418

27. Higgins, C.F. (1994)
Flip-flop: the transmembrane translocation of lipids.
Cell 79, 393-395
28. Ibrahimi, A., Bonen, A. Blinn, W.D., Hajri, T., Li, X., Zhong, K., Cameron, R., Abumrad, N.A. (1999)
Muscle-specific overexpression of FAT/CD36 enhance fatty acid oxidation by contracting muscle, reduces plasma triglycerides and fatty acids, and increases plasma glucose and insulin.
J Biol Chem 274, 26761-26766
29. Issemann, I., Grenn, S. (1990)
Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators.
Nature 347, 645-650
30. Jones, B.H., Maher, M.A., Banz, W.J., Zemel, M.B., Whelan, J., Smith, P.J., Moustaid, N. (1996)
Adipose tissue stearoyl-CoA desaturase mRNA is increased by obesity and decreased by polyunsaturated fatty acids.
Am J Physiol 271, E44-49
31. Jump, D.B., Clarke, S.D. (1999)
Regulation of gene expression by dietary fat.
Annu Rev Nutr 19, 63-90
32. Jump, D.B., Clarke, S.D., Thelen, A., Liimatta, M., Ren, B., Badin, M. (1996)
Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription .
Prog Lipid Res 35, 227-241
33. Kempen, K.P., Saris, W.H., Kuipers, H., Glatz, J.F., Van der Vusse, G.J. (1998)
Skeletal muscle metabolic characteristics before and after energy restriction in human obesity: fibre type, enzymatic beta-oxidative capacity and fatty acid-binding protein content.
Eur J Clin Invest 28, 1030-1037
34. Kern, P.A., Gregorio, G.B., Lu, T., Rassouli, N., Ranganathan, G. (2003)
Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin Resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression.
Diabetes 52, 1779-1785
35. Kiens, B., Kristiansen, S., Jensen, P., Richter, E.A., Turcotte, L.P. (1997)
Membrane associated fatty acid binding protein (FABPm) in human skeletal muscle is increased by endurance training.
Biochem Biophys Res Commun 231, 463-465

36. Krogh-Madsen, R., Plomgaard, P., Keller, P., Keller, C., Pedersen, B.K. (2003)
Insulin stimulates interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha gene expression in human subcutaneous adipose tissue.
Am J Physiol Endocrinol Metab [Epub ahead of print]
37. Lehmann, J.M., Moore, L., Smith-Oliver, T.A., Willson, T.M., Kliewer, S.A. (1995)
An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator- activated receptor gamma (PPAR gamma).
J Biol Chem 270, 12953-12956
38. Listenberger, L., Ory, D., Schaffer, J.E. (2001)
Palmitate-induced apoptosis can occur through a ceramide- independent Pathway.
J Biol Chem 276, 14890-14895
39. Man, M.Z., Hui, T.Y., Schaffner, J.E., Lodish, H.F., Bernlohr, D.A. (1999)
Regulation of the murine adipocyte fatty acid transporter gene by insulin.
Mol Endocrinol 10, 1021-1028
40. Martin, G., (2000)
Induction of the Fatty Acid Transport Protein-1 and Acyl-CoA Synthetase genes by dimer-selective Retinoids suggests that the peroxisome proliferator- activated receptor- Retinoid X Receptor heterodimer is their molecular target.
J Biol Chem 275, 12612-12618
41. Martin, G., Schoonjans, K., Lefebvre, A.M., Staels, B., Auwerx, J. (1997).
Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA Synthetase genes by PPAR alpha and PPAR gamma activators.
J Biol Chem 272, 28210-28217
42. McIntyre, E.A., Walker, M. (2002)
Genetics of type 2 diabetes and insulin resistance: knowledge from human studies.
Clin Endocrinol (Oxf) 57, 303-311
43. Monzillo, L.U., Hamdy, O., Horton, E.S., Ledbury, S., Mullooly, C., Jarema, C. Porter, S., Ovalle, K., Moussa, A., Mantzoros, C.S. (2003)
Effects of lifestyle modification on adipokine levels in obese subjects with Insulin resistance.
Obes Res 11, 1048-1054
44. O`Rahilly, S. (1997)
Science, medicine, and future. Non-insulin dependent diabetes mellitus : the gathering storm.
BMJ 314, 955-959

45. Pan, D.A., Hulbert, A.J., Storlien, L.H. (1994)
Dietary fats, membrane phospholipids and obesity.
J Nutr 124, 1555-1565
46. Pettegrew, J.W., Panchalingam, K., Hamilton, R.L., McClure, R.J. (2001)
Brain membrane phospholipid alteration in Alzheimer's disease.
Neurochem Res 26, 771-782
47. Puddu, P., Puddu, G.M., Muscari, A. (2003)
Peroxisome proliferator- activated receptors: are they involved in atherosclerosis progression?
Int J Cardiol 90, 133-140
48. Rahman, S.M., Dobrzyn, A., Dobrzyn, P., Lee, S.H., Miyazaki, M., Ntambi, J.M. (2003)
Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency elevates insulin-signaling components and down-regulates protein-tyrosine phosphatase 1B in muscle.
Proc Natl Acad Sci USA 100, 11110-11115
49. Rask-Madsen, C., Dominguez, H., Ihlemann, N., Hermann, T., Kober, L. (2003)
Tumor necrosis factor-alpha inhibits insulin's stimulating effect on glucose uptake and endothelium-dependent vasodilatation in humans.
Circulation 108, 1815-1821
50. Reaven, G. (1988)
Role of insulin resistance in human disease.
Diabetes 37, 1595-1607
51. Roden, M., Price, T.B., Perseghin, G., Petersen, K.F., Rothman, D.L., Cline, G.W., Shulman, G.I. (1996)
Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans.
J Clin Invest 97, 2859-2865
52. Schaffer, J.E., Lodish H.F. (1994)
Expression cloning and characterisation of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein.
Cell 79, 427-436
53. Schoonjans, K., Staels, B., Auwerx, J. (1996)
The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation.
Biochim Biophys Acta 1302, 93-106
54. Schoonjans, K., Watanabe, M., Suzuki, H., Mahfoudi, A., Krey, G., Wahli, W., Grimaldi, P., Staels, B., Yamamoto, T., Auwerx, J. (1995)
Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter.
J Biol Chem 270, 19269-76

55. Shiau, M.Y., Wu, C.Y., Huang, C.N., Hu, S.W., Lin, S.J., Chang, Y.H. (2003)
TNF-alpha polymorphisms and type 2 diabetes mellitus in Taiwanese patients.
Tissue Antigens 61, 393-397
56. Shulman, G.I. (2000)
Cellular mechanisms of insulin resistance.
J Clin Invest 106, 171-176
57. Spencer, N.F., Poynter, M.E., Im, S.Y., Daynes, R.A. (1997)
Constitutive activation of NF-kappaB in an animal model of aging.
Int Immunol 9, 1581-1588
58. 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 alpha but not by PPAR gamma activators.
Nature 393, 790-793
59. Stahl, A. (2003)
A current review of fatty acid transport proteins (SLC27).
Pflugers Arch (Epub ahead of print)
60. Stahl, A., Evans, J.G., Pattel, S., Hirsch, D., Lodisch, H.F. (2002)
Insulin causes fatty acid transport protein translocation and enhanced fatty acid uptake in adipocytes.
Dev Cell 2, 477-488
61. Storlien, L.H., Jenkins, A.B., Chisholm, D., Pascoe, W.S., Khouri, S., Kraegen, E. (1991)
Influence of dietary fat composition on the development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipid.
Diabetes 40, 280-289
62. Stremmel, W., (1989)
Transmembrane transport of fatty acids in the heart.
Mol Cell Biol 88, 23-29
63. Stremmel, W., Strohmeyer, G., Berk, P.D. (1986)
Hepatocellular uptake of oleate is energy dependant, sodium linked, and inhibited by an antibody to a hepatocyte plasma membrane fatty acid binding protein.
Proc Natl Acad Sci USA 83, 3584-3588
64. Vendrell, J., Fernandez-Real, J.M., Gutierrez, C., Zamora, A., Simon, I., Bardaji, A., Ricart, W., Richart, C. (2003)
A polymorphism in the promoter of the tumor necrosis factor-alpha gene (-308) is associated with coronary heart disease in type 2 diabetic patients.
Atherosclerosis 167, 257-264

65. Vozarova, B., Fernandez-Real, J.M., Knowler, W.C., Gallart, L., Hanson, R.L., Gruber, J.D., Ricart, W., Richart, C., Vendrell, J., Tatarani, P.A., Wolford, J. (2003)
The interleukin-6-(174) G/C promoter polymorphism is associated with type 2 diabetes mellitus in Native Americans and Caucasians.
Hum Genet 112, 409-413
66. Wahl, H.G., Kausch, C., Machicao, F., Rett, K., Stumvoll, M., Harig, H.U. (2002)
Troglitazone downregulates delta-6 desaturase gene expression in human skeletal muscle cell cultures.
Diabetes 51, 1060-1065
67. Warne, J.P. (2003)
Tumor necrosis factor-alpha: a key regulator of adipose tissue mass.
J Endocrinol 177, 351-355
68. Weigert, C. (Publikation in Vorbereitung)
69. Wilmsen, H.M., Ciaraldi, T.P., Carter, L., Reehman, N., Mudaliar, S.R., Henry, R. (2003)
Thiazolidinediones upregulate impaired fatty acid uptake in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects.
Am J Physiol Endocrinol Metab 285, E354-362
70. Yamagishi, S.I., Okamoto, T., Amano, S., Inagaki, Y., Koga, K., Choei, H., Sasaki, N., Kikuchi, S., Takeuchi, M., Makita, Z. (2002)
Palmitate-induced apoptosis of microvascular endothelial cells and pericytes.
Mol Med 8, 179-184

7. Abkürzungsverzeichnis

ACS = acyl-CoA synthetase

AU = arbitrary units

bp = Basenpaare

CAEC = coronary artery endothelial cells

CASMC = coronary artery smooth muscle cells

DPBS = Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

FABP pm = plasma membrane fatty acid-binding protein

FAT = fatty acid translocase

FATP = fatty acid transport protein

FB = fibroblasts culture

FFA = free fatty acid

HepG2 = Hepatocyten

HNF4 alpha = hepatocyte nuclear factor 4 alpha

HumGlyc = humane glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

IL-6 = Interleukin-6

NFkB = nuclear factor kappa B

PCR = Polymerase-Ketten-Reaktion

PKC = protein kinase C

PPAR = peroxisome proliferator-activated receptor

PTB-1 = protein-tyrosine phosphatase 1

ROS = reaktiv oxygen species

SCD = Stearyl CoA-desaturase

SREBP = sterol regulatory element binding protein

TNF = tumor necrosis factor

TZD = Thiazolidinedionen

WM = Wachstumsmedium

8. Danksagung

Ich danke Herrn Professor R. Wahl für das entgegengebrachte Vertrauen und die Überlassung des Themas sowie Herrn Professor E. Schleicher für die Übernahme der „Doktorvaterschaft“ und das Korrekturlesen des Manuskriptes.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Fausto Machicao, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Für seine fachliche Unterstützung, seine wissenschaftlichen Anregungen und Diskussionen, die mir die Bewältigung dieser Arbeit erleichtert haben, für seine Geduld bei den mühsamen Textkorrekturen sowie für seine stets freundliche und humorvolle Art danke ich ganz herzlichst!

Ein großes Dankeschön auch an Melanie Weisser, Claudia Peterfi und insbesondere an Alke Guirguis für die tatkräftige Unterstützung im Labor.

Außerdem danke ich meinen Eltern und meinem Mann, die mich während der Promotionsarbeit und der gesamten Studienzeit liebevoll unterstützt haben.

9. Lebenslauf

Zur Person:

Name: Olga Hirschfeld-Kroll, geb. Hirschfeld
Geburtsdatum: 21.01.74
Geburtsort: Wladiwostok
Familienstand: verheiratet

Schulbildung:

1981-1991 Allgemeine Mittelschule in Wladiwostok
1992-1993 Studium an der Fernöstlichen Staatlichen Universität in Wladiwostok,
Juristische Fakultät
1993-1994 Jugendorf-Christophorusschule, Priv. Gymnasium in Altensteig,
Abschluss Mittlere Reife
1994-1997 Friedrich-Schiller-Gymnasium in Ludwigsburg, Abschluss Abitur

Studium:

1997-2003 Studium der Zahnheilkunde an der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen
29.03.2000 Zahnärztliche Vorprüfung
24.06.2003 Zahnärztliche Prüfung