

Aus der Franz-Volhard-Klinik
Abteilung für Nephrologie und Hypertensiologie
der Medizinischen Fakultät Charité
Campus Berlin-Buch
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**Untersuchung zur quantitativen Genexpression
in Primärkulturen humaner Adipocyten
am Beispiel ausgewählter Gene
des Renin-Angiotensin-Systems**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum
(Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Frau Dipl.-Biol. Kerstin Gorzelnia
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A.M. Sharma

2. Prof. Dr. G. Löffler

3. Prof. Dr. rer. nat. S. Klaus

eingereicht: 5. September 2001

Datum der Promotion: 18. März 2002

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VI
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 ALLGEMEINER ÜBERBLICK	1
1.2 THEORETISCHER HINTERGRUND.....	2
1.2.1 Adipositas	2
1.2.2 Adipositas-assoziierte Hypertonie	3
1.2.3 Das Renin-Angiotensin-System.....	3
1.2.3.1 <i>Renin</i>	5
1.2.3.2 <i>Angiotensinogen</i>	6
1.2.3.3 <i>Angiotensin-Converting-Enzym</i>	7
1.2.3.4 <i>Angiotensinrezeptoren</i>	8
1.2.4 Das lokale adipocytäre Renin-Angiotensin-System.....	9
1.2.5 Hormonelle Regulation der Genexpression des Renin-Angiotensin-Systems	10
1.3 PROBLEMATIK DER ADIPOCYTENFORSCHUNG.....	11
1.4 VORARBEITEN	14
1.5 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	16
2 MATERIAL	18
2.1 GERÄTE.....	18
2.2 SPEZIELLE MATERIALIEN	19
2.3 CHEMIKALIEN	19
2.4 PRIMER UND SONDEN.....	20
2.5 KITS	22
2.6 ENZYME UND PCR-REAGENZIIEN	22
2.7 LÖSUNGEN, MEDIEN, PUFFER	23
2.8 ANTIKÖRPER.....	25

3	METHODEN.....	26
3.1	ISOLIERUNG UND KULTIVIERUNG HUMANER ADIPOCYTEN.....	26
3.1.1	Adipocytenisolierung.....	26
3.1.2	Adipocytenkultivierung.....	28
3.1.3	Zellzahlbestimmung bei Adipocyten.....	29
3.1.4	Vitalfärbung von Adipocyten.....	31
3.1.5	Überprüfung der Isolierungs- und Kultivierungsbedingungen.....	33
3.2	RNA-ISOLIERUNG.....	33
3.2.1	RNA-Isolierungsmethoden.....	34
3.2.1.1	<i>Differenzielle Präzipitation</i>	36
3.2.1.2	<i>Saure Phenol-Chloroform-Extraktion</i>	37
3.2.1.3	<i>CsCl-Gradienten-Zentrifugation</i>	39
3.2.1.4	<i>RNA-selektive Silikatmembran</i>	40
3.2.2	Optimiertes Protokoll zur Isolierung von Gesamt-RNA aus ausdifferenzierten Adipocyten.....	41
3.3	BESTIMMUNG DER RNA-KONZENTRATION UND INTEGRITÄTSPRÜFUNG.....	43
3.4	DNASE I - BEHANDLUNG.....	44
3.5	REVERSE TRANSKRIPTION.....	45
3.6	TAQMAN-REAL-TIME-PCR ZUR QUANTIFIZIERUNG DER GENEXPRESSION.....	47
3.6.1	Prinzip der TaqMan-PCR.....	47
3.6.2	Durchführung der TaqMan-PCR.....	48
3.6.3	Auswertung der TaqMan-PCR.....	50
3.6.4	Relative Quantifizierung.....	51
3.7	AUSWAHL EINER ENDOGENEN KONTROLLE.....	53
3.8	STIMULATIONSEXPERIMENTE.....	56
3.9	INDIREKTE IMMUNFLUORESCENZ UND KONFOKALE MIKROSKOPIE.....	58
3.10	DATENVERARBEITUNG UND STATISTIK.....	61
4	ERGEBNISSE.....	62
4.1	BESTIMMUNG DER ZELLZAHL IN ADIPOCYTENSUSPENSIONSKULTUREN MIT DEM R/S 1000.....	62
4.2	BESTIMMUNG DER VITALITÄT AUSDIFFERENZIERTER ADIPOCYTEN IN EINER SUSPENSIONSKULTUR.....	64
4.3	ÜBERPRÜFUNG DER ISOLIERUNGS- UND KULTIVIERUNGSBEDINGUNGEN.....	66
4.4	RNA-ISOLIERUNG.....	67
4.5	TAQMAN-PCR.....	69
4.5.1	Auswahl der endogenen Kontrolle.....	69
4.5.2	Relative Expressionsstärke der Gene des Renin-Angiotensin-Systems in ausdifferenzierten Adipocyten.....	72
4.6	STIMULATIONSEXPERIMENTE.....	74
4.7	ANSTIEG DER AT1-REZEPTORZAHL UNTER HYDROCORTISONSTIMULATION.....	76

5 DISKUSSION	78
5.1 ETABLIERUNG EINES <i>IN VITRO</i> SYSTEMS ZUR DURCHFÜHRUNG VON GENEXPRESSIONS- UNTERSUCHUNGEN AN PRIMÄREN HUMANEN ADIPOCYTEN	78
5.1.1 Zellzahlbestimmung in Suspensionskulturen ausdifferenzierter Adipocyten	78
5.1.2 Vitalitätsbestimmung in Suspensionskulturen ausdifferenzierter Adipocyten	80
5.1.3 In vitro Kultur	80
5.1.4 RNA-Isolierung	82
5.1.5 TaqMan-PCR	83
5.1.6 Endogene Kontrollen	86
5.2 DAS ADIPOCYTÄRE RENIN-ANGIOTENSIN-SYSTEM	87
5.2.1 Expression eines vollständigen adipocytären RAS	87
5.2.2 Bedeutung des adipocytären Renin-Angiotensin-Systems	89
5.3 HORMONELLE REGULATION DES RAS	90
5.3.1 Glucocorticoidstimulation der Genexpression des Angiotensin II-Rezeptors Typ 1 (<i>AGTR1</i>)	92
5.4 SCHLUßFOLGERUNG UND AUSBLICK	95
6 ZUSAMMENFASSUNG	97
7 LITERATURVERZEICHNIS	99
DANKSAGUNG	113

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Überblick über die sekretorische Aktivität des Adipocyten.....	1
Abbildung 2: Schema des Renin-Angiotensin-System.	4
Abbildung 3: Prinzip der TaqMan-PCR.....	47
Abbildung 4: Schema eines TaqMan-Amplifikationsplots.....	50
Abbildung 5: Prinzip der konfokalen Mikroskopie.	59
Abbildung 6: Zellsuspension humaner Adipocyten verteilt über zwei Gitter der Durchflußzählkammer des R/S 1000.....	62
Abbildung 7: Zellzahl in Abhängigkeit von der Verdünnung.	63
Abbildung 8: Vitalfärbung ausdifferenzierter Adipocyten mit Acridinorange.	65
Abbildung 9: Gelelektrophorese der isolierten RNA..	68
Abbildung 10: RT-PCR-Produkte der Pyruvat-Dehydrogenase Amplifikation.....	69
Abbildung 11: Relative Veränderungen der Genexpression ausdifferenzierter Adipocyten nach 12-stündiger hormoneller Stimulation.	70
Abbildung 12: Relative Veränderungen der Genexpression während der Adipocytendifferenzierung.....	71
Abbildung 13: Exemplarischer TaqMan Plot der RAS-Gene in unstimulierten humanen Adipocyten.....	72
Abbildung 14: Relative <i>AGT</i> -, <i>ACE</i> - bzw. <i>AGTR1</i> -Genexpression ausdifferenzierter Adipocyten während 24-stündiger Stimulation	75
Abbildung 15: Dosis-Wirkungskurve der <i>AGTR1</i> -Expression ausdifferenzierter humaner Adipocyten nach 24-stündiger Stimulation mit Hydrocortison.....	76
Abbildung 16: Relative <i>REN</i> - bzw. <i>AGTR2</i> -Expression nach 24 Stunden.....	76
Abbildung 17: Indirekte Immunfluoreszenzdetektion des AT1-Rezeptors in ausdifferenzierten humanen Adipocyten nach 1 bzw. 3-tägiger Stimulation mit Hydrocortison.....	77

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Klassifizierung der Adipositas und Risiko für Folgeerkrankungen entsprechend den WHO-Richtlinien von 1997	2
Tabelle 2: Endkonzentration der für die TaqMan-Real-Time-PCR verwendeten Primer und Sonden, sowie die jeweilige Länge der amplifizierten Sequenz.	49
Tabelle 3: Endogene Kontrollen der „Human Endogenous Control Plates“	54
Tabelle 4: Untersuchte Stimuli auf die Genexpression der verschiedenen endogenen Kontrollen.....	55
Tabelle 5: Vergleich der verschiedenen Methoden zur Isolierung von Gesamt-RNA aus ausdifferenzierten Adipocyten.	67
Tabelle 6: Relative Genexpression der RAS-Gene und des Leptingens in humanen Adipocyten.	73

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AC	Adipocyten
ACE	engl. Angiotensin-Converting-Enzyme
<i>ACE</i>	Gen des Angiotensin-Converting-Enzyms
AGT	Angiotensinogen
<i>AGT</i>	Gen des Angiotensinogens
<i>AGTR1</i>	Gen des Angiotensin II-Rezeptors Typ 1
<i>AGTR2</i>	Gen des Angiotensin II-Rezeptors Typ 2
Ang I / II	Angiotensin I bzw. II
AT ₁ -Rezeptor	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1
AT ₂ -Rezeptor	Angiotensin II-Rezeptor Typ 2
BMI	engl. Body Mass Index
bp	Basenpaar
BSA	engl. Bovine Serum Albumin
cDNA	engl. Complementary Desoxyribonucleic Acid
C/EBP	CCAAT / Enhancer bindendes Protein
CETP	Cholesterinester Transferprotein
C _T	engl. Threshold Cycle
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat
dGTP	2'-Desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	engl. Desoxyribonucleic Acid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol (1,4-Dithio-2,3-Dihydroxybutan)
dTTP	2'-Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat
dUTP	2'-Desoxy-Uracil-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FG	Fettgewebe
FKS	Fötale Kälberserum
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GIT	Guanidiniumthiocyanat

GLB	engl. Gel Loading Buffer
HBSS	engl. Hank´s Buffered Salt Solution
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethan Sulfonsäure
IL	Interleukin
kb	Kilobase
kD	kilo-Dalton
<i>LEP</i>	Gen des Leptin
LIF	Leukämie-inhibierender Faktor
LPL	Lipoproteinlipase
mRNA	engl. messenger RNA
OD	Optische Dichte
PAI	Plasminogenaktivator Inhibitor
PBS	engl. Phosphate Buffered Saline
PCR	engl. Polymerase Chain Reaction
PPAR γ	engl. Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ
RAS	Renin-Angiotensin System
<i>REN</i>	Gen des Renin
REN	Renin
RNA	engl. Ribonucleic Acid
RNase	Ribonuklease
rRNA	engl. ribosomal RNA
RT	Reverse Transcriptase
RT-PCR	engl. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TNF- α	Tumor Nekrose Faktors α
tRNA	engl. transfer RNA
UV	Ultraviolett
Vol.	Volumen
WAT	engl. White Adipose Tissue
WHO	engl. World Health Organization

1 Einleitung

1.1 Allgemeiner Überblick

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, daß Fettgewebe nicht nur ein inertes Fettspeicher ist sondern vielmehr ein Organ mit vielfältigen metabolischen, endokrinen, parakrinen und autokrinen Funktionen.^{1,2} Eine der bedeutendsten Entdeckungen in diesem Zusammenhang war die des Leptins, eines spezifisch nur vom Fettgewebe gebildeten Hormons,³ das an der Regulation der Nahrungsaufnahme und des Energiehaushalts beteiligt ist^{4,5} und als Maß des Körperfettgehalts gilt.⁶

Darüber hinaus exprimieren Adipocyten verschiedene Cytokine (z. B. Interleukine, $\text{TNF-}\alpha$) und Transkriptionsfaktoren (C/EBP- und PPAR-Familie), die an der Regulation des Lipidstoffwechsels ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{PPAR}\gamma_2$) beteiligt sind^{7,8,9} oder die Fettzelldifferenzierung ($\text{PPAR}\gamma$, $\text{C/EBP}\alpha$, $-\beta$, $-\delta$) beeinflussen.¹⁰⁻¹³ Die Synthese von Adipsin (Komplementfaktor D) scheint außerdem auf eine Rolle des Fettgewebes bei der Immunantwort hinzudeuten.¹⁴⁻¹⁶ Außerdem konnte in Untersuchungen an Nagetieren und später auch am Menschen die Existenz eines lokalen adipocytären Renin-Angiotensin-Systems (RAS)¹⁷ und die Produktion anderer an der Blutdruckregulation beteiligter Substanzen (Endothelin-1, NO-Synthasen, Prostaglandine) nachgewiesen werden.^{2,18-21} Derart vielfältige Funktionen lassen vermuten, daß das Fettgewebe eine größere Rolle bei der Entstehung von Erkrankungen spielt als bislang angenommen wurde.²

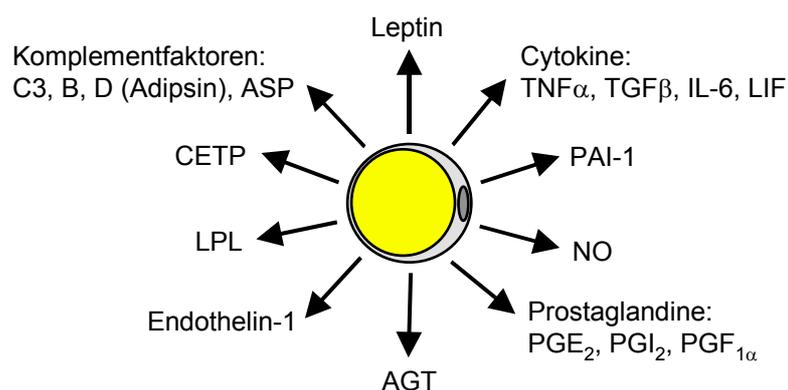


Abbildung 1: Überblick über die sekretorische Aktivität des Adipocyten.

1.2 Theoretischer Hintergrund

1.2.1 Adipositas

Adipositas stellt sowohl in den industrialisierten als auch in den nichtindustrialisierten Ländern ein großes Gesundheitsrisiko dar und ist ein wichtiger Risikofaktor für eine Reihe verschiedener Erkrankungen.²² Als Übergewicht wird eine über das Normalmaß hinausgehende Vermehrung der Körperfettmasse bezeichnet. Aus medizinischer Sicht erlangt Übergewicht dann einen Krankheitswert, wenn damit eine Beeinträchtigung wichtiger Organfunktionen bzw. eine erhöhte Morbidität und Mortalität verbunden ist.

Zur Beschreibung und Klassifikation der Adipositas ist z. Z. die Verwendung des Körpermasseindex (BMI) am gebräuchlichsten, da er gut mit der Körperfettmasse korreliert.²² Der BMI ergibt sich aus dem Quotienten des Körpergewichts [kg] und dem Quadrat der Körpergröße [m²] und ist bei Erwachsenen (≥ 18 Jahren) weder geschlechts- noch altersspezifisch.

Aufgrund der Zunahme von Folgeerkrankungen mit ansteigendem BMI werden laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) folgende Gruppen unterschieden.²²

Tabelle 1: Klassifizierung der Adipositas und Risiko für Folgeerkrankungen entsprechend den WHO-Richtlinien von 1997.²²

Adipositas-Grad	BMI [kg/m ²]	Risiko für Folgeerkrankungen laut WHO
Normalgewicht	18,5 – 24,9	durchschnittlich
Übergewicht	25,0 – 29,9	leicht erhöht
Adipositas Grad I	30,0 – 34,9	erhöht
Adipositas Grad II	35,0 – 39,9	stark erhöht
Adipositas Grad III	> 40,0	sehr stark erhöht

Zu den pathophysiologischen Veränderungen bei Adipositas gehören insbesondere Hypertonie,²³ Insulinresistenz mit Hyperinsulinämie²⁴ sowie Hyperlipidämie²⁵ und Hyperuricämie.²⁶ Diese Veränderungen werden allgemein unter dem Begriff des metabolischen Syndroms zusammengefaßt.²⁷ Neben dem metabolischen Syndrom und den daraus resultierenden kardiovaskulären Erkrankungen (Myokardinfarkt, Schlaganfall)²⁵ gehören auch Erkrankungen der Gallenblase²⁸ und des Bewegungsapparates²⁹ sowie eine Reihe bösartiger Tumorerkrankungen (z. B. Mammakarzinom)³⁰ zu den Adipositas-assoziierten Erkrankungen.

1.2.2 Adipositas-assoziierte Hypertonie

Adipositas gehört zu den wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung der Hypertonie. So zeigt z. B. die NHANES III Studie eine Zunahme der Hypertoniehäufigkeit mit dem Grad der Adipositas von 23 % bei Normalgewichtigen auf 48 % bei Adipositas Grad I und auf 60 % bei Adipositas Grad II.³¹

Als Pathomechanismen der Adipositas-induzierten Hypertonie werden vor allem eine gesteigerte Sympathikusaktivität, Insulinresistenz und eine erhöhte Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) diskutiert.²³ Die Steigerung der Sympathikusaktivität bei Adipositas, die u. a. mit erhöhten Katecholamin-Plasmaspiegeln bei adipösen Hypertonikern einhergeht,³² wird wahrscheinlich durch die Kombination von Hyperinsulinämie^{33,34} und Hyperleptinämie^{35,36} verursacht.²

Eine der zentralen Störungen, die bei Adipositas auftritt, ist die Rechtsverschiebung der renalen Drucknatriurese-Kurve. So benötigen Adipöse vergleichsweise höhere Blutdruckwerte als normalgewichtige Individuen, um gleich große Natriummengen auszuscheiden. Diese Adipositas-assoziierte Natriumretention wird durch eine verstärkte tubuläre Natriumresorption hervorgerufen, die höchstwahrscheinlich durch die gesteigerte Sympathikus-Aktivität, aber auch durch einen gesteigerten intrarenalen Druck bewirkt wird.³⁷

Einen Zusammenhang von Adipositas und gesteigerter Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) konnte in einer Vielzahl von Studien belegt werden. So sind sowohl die Angiotensinogen-Plasmaspiegel,³⁸⁻⁴² als auch die Plasma-Renin-Aktivität⁴³⁻⁴⁵ und die Plasma-Aktivität des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE)³⁸ positiv mit dem BMI assoziiert. Auch konnte die Expression verschiedener RAS-Gene in Adipocyten gezeigt werden.⁴⁶

1.2.3 Das Renin-Angiotensin-System

Das systemische Renin-Angiotensin-System (RAS) hat einen wichtigen Anteil sowohl an der Kurzzeit- als auch an der Langzeitregulation des arteriellen Blutdrucks. So aktivieren Faktoren, die den arteriellen Blutdruck senken, indem sie das effektive Blutvolumen verringern (z. B. Niedrig-Salz-Diät, Diuretika, Blutverlust) oder den

peripheren Gesamtwiderstand reduzieren (z. B. Vasodilatoren), die Renin-Freisetzung aus dem juxtaglomerulären Apparat der Niere.

Das proteolytische Enzym Renin spaltet aus dem von der Leber synthetisierten und ins Plasma freigesetzten Angiotensinogen (AGT) das Dekapeptid Angiotensin I (Ang I) ab. Dieses wird dann durch das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE), das größtenteils an der luminalen Oberfläche des Endothels lokalisiert ist, in das stark vasokonstriktorisch wirksame Oktapeptid Angiotensin II (Ang II) umgewandelt (Abb. 2).

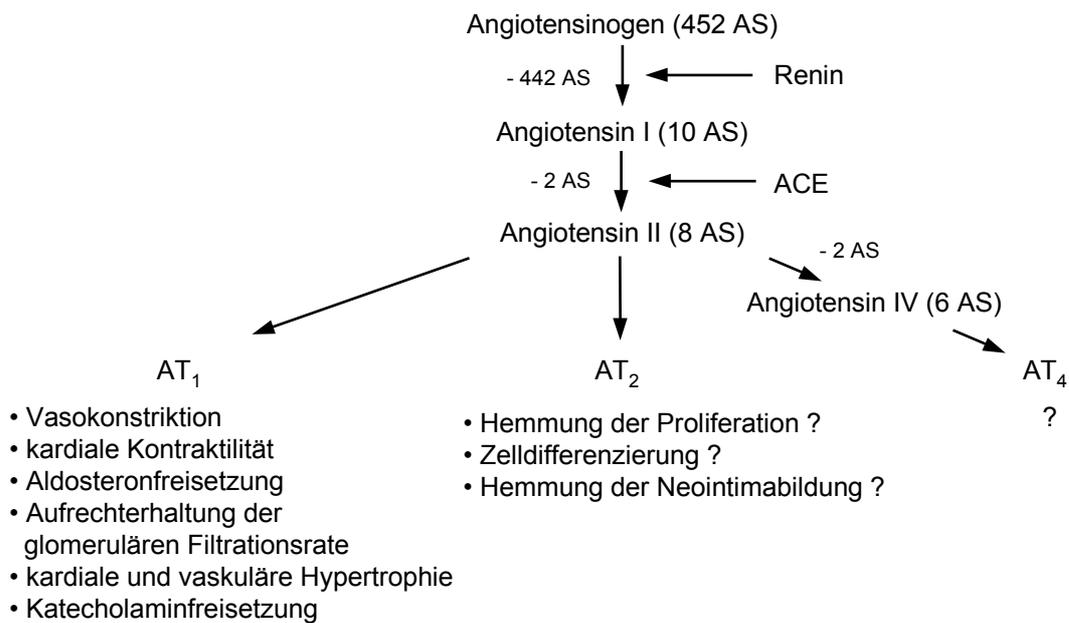


Abbildung 2: Schema des Renin-Angiotensin-System

Zirkulierendes Angiotensin II kann über eine Reihe von Mechanismen die Homöostase des Kreislaufs beeinflussen und zu einer Erhöhung des Blutdrucks führen. So trägt es durch Verstärkung des peripheren Gesamtwiderstandes zur Kurzzeitregulation des arteriellen Blutdrucks bei. Indem Angiotensin II direkt, aber auch indirekt durch Stimulation der Aldosteron-Freisetzung die Ausscheidung von Wasser und Na⁺-Ionen in der Niere verringert, leistet es auch einen Beitrag zur Langzeitstabilisierung des arteriellen Blutdrucks.

Neben dem klassischen endokrinen System, bei dem alle Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems und seiner Produkte in der Blutbahn zirkulieren und über den Blutstrom zu ihren Zielorganen transportiert werden, sind in den letzten Jahren lokale RAS in diversen Organen (z. B. Gehirn, Testis, Fettgewebe, Herz, Gefäße Niere,

Nebenniere und Plazenta) beschrieben worden.⁴⁷ Die Bedeutung dieser Systeme, die die meisten Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems lokal bilden, ist noch nicht vollständig geklärt. Untersuchungen an transgenen Tieren stützen jedoch die Hypothese, daß diese lokalen Systeme eine pathogenetische Rolle bei der Entwicklung bestimmter Hochdruckformen spielen, sowie an den Hochdruck-assoziierten Endorganschäden beteiligt sind.^{48,49}

Je nach Lokalisation der RAS-Komponenten und ihrer Herkunft wird zwischen extrinsischen und intrinsischen Systemen unterschieden. Es ist bekannt, daß ACE auf der Oberfläche vaskulärer Endothelzellen im gesamten Blutkreislauf präsent ist und das Renin in andere Gewebe aufgenommen werden kann.⁵⁰⁻⁵² Daher erfolgt die Konversion von AGT zu Angiotensin I und die Bildung von Angiotensin II aus zirkulierendem und lokal gebildetem Angiotensin I wahrscheinlich hauptsächlich innerhalb oder an der Oberfläche der Blutgefäßwände (extrinsisch).^{50,53,54} Die physiologische Bedeutung intrinsischer lokaler Renin-Angiotensin-Systeme, in dem alle Komponenten von der lokalen Expression des *REN*-, *AGT*- und *ACE*-Gens stammen, ist dagegen noch umstritten. Zwar exprimieren eine Reihe verschiedener Gewebe wie Blutgefäße, Herz, Niere oder Fettgewebe die mRNAs der Schlüsselenzyme, und Zellkulturen dieser Gewebe produzieren Renin, AGT, ACE und / oder Angiotensin I und II; ihre Expression ist jedoch relativ niedrig. Auch hat es den Anschein, daß kein einzelner Zelltyp des jeweiligen Gewebes alle Komponenten exprimiert.^{46,47,55,56}

Nachfolgend werden die einzelnen Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems näher charakterisiert.

1.2.3.1 Renin

Hauptbildungsort des zirkulierenden Renins sind die juxtaglomerulären Zellen in der Wand der afferenten Arteriole der Nierenglomeruli.⁵⁷ Renin ist ein 37 - 40 kD großes Glykoprotein aus der Familie der Aspartyl-Proteasen mit einer begrenzten Anzahl an Substraten. Sein natürliches Substrat ist das zirkulierende α_2 -Globulin Angiotensinogen, welches am aminoterminalen Ende gespalten wird.

Bei der Renin-Bildung wird zunächst ein aus 406 Aminosäuren (AS) bestehendes Präproenzym synthetisiert, aus dem durch Abspaltung von 23 AS Prorenin, die inaktive Vorstufe des Renins gebildet wird. Das 340 AS lange aktive Renin entsteht durch Abspaltung von weiteren 43 AS durch ein bisher noch unbekanntes Enzym. Es wird jedoch überwiegend Prorenin sezerniert,⁵⁶ das wahrscheinlich nicht nur eine inaktive Vorstufe darstellt, sondern möglicherweise selbst eine vasodilatatorische Funktion hat.⁵⁷ Die Prorenin-Konzentration in der Zirkulation ist ca. zehnmal höher als die des aktiven Renins, dessen Halbwertszeit etwa 15 Minuten beträgt.

Für das humane Renin-Gen ist ein einziger Locus auf Chromosom 1q32 bekannt, der 10 Exons und 9 Introns enthält und sich über 12,5 kb erstreckt. Die Promotor-Region enthält cis-wirkende Elemente für Progesteron, cAMP und Glucocorticoide. Die Renin-Expression wird in Niere, Herz und Nebenniere durch Natrium-Depletion und β -adrenerge Rezeptoren stimuliert, während Angiotensin II durch einen negativen Rückkoppelungsmechanismus die Expression in der Niere und anderen Geweben reduziert.^{55,58}

1.2.3.2 Angiotensinogen

Angiotensinogen, das Substrat des Renins, ist ein im Plasma zirkulierendes α_2 -Globulin, das zur Superfamilie der Serpine (Akronym für Serin-Protease-Inhibitoren) gehört. Das humane AGT hat ein Molekulargewicht von 55-65 kD⁵⁹ und besteht aus 452 AS. Es wird als Präangiotensinogen mit einem aus 24 oder 33 Aminosäuren bestehenden Signalpeptid synthetisiert. Der Hauptbildungsort des zirkulierenden AGTs ist die Leber.⁶⁰ AGT-Transkripte konnten jedoch auch in anderen Geweben, wie Fettgewebe, Niere, Gehirn, Rückenmark, Aorta, Mesenterium, Vorhof, Lunge, Nebenniere, Dickdarm, Magen, Milz, Ovarien und Plazenta nachgewiesen werden.^{47,61-63} Bei der Spaltung des Angiotensinogens durch Renin entstehen das Dekapeptid Angiotensin I und ein 442 AS großer Rest, dessen funktionelle Bedeutung bisher ungeklärt ist. Es wird jedoch über eine Beteiligung an Entzündungsreaktionen spekuliert.⁶⁰

Die AGT-Plasmakonzentration liegt nahe der Michaelis-Menten-Konstante der AGT-Spaltung durch Renin, daher führt bereits ein geringer Anstieg des AGT-Plasmaspiegels zu einer vermehrten Ang I-Bildung.⁵⁵ Die Angiotensinogensynthese in der Leber wird durch eine Reihe von Hormonen einschließlich Östrogen, Glucocorticoiden und Thyroidhormonen sowie durch Angiotensin II (positiver Rückkoppelungsmechanismus) stimuliert.^{58,64,65}

Für das humane *AGT*-Gen ist ein einzelner Locus auf Chromosom 1q 42-43 bekannt, der sich über 12 kb erstreckt und aus 5 Exons und 4 Introns besteht.⁵⁹ Für die Promotorregion des *AGT*-Gens sind cis-wirkende Elemente beschrieben worden, die in der Leber eine Steigerung der *AGT*-Expression durch Corticosteroide, Östrogene und Schilddrüsenhormone vermitteln.⁶⁶

1.2.3.3 Angiotensin-Converting-Enzym

Das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) ist eine Dipeptidyl-Carboxypeptidase aus der Familie der Zink-Metalloproteasen. Es spaltet das inaktive Dekapeptid Angiotensin I zu Angiotensin II, einem Oktapeptid und potenten Vasopressor. Da ACE relativ unspezifisch wirkt, spaltet es Dipeptide von Substraten mit unterschiedlichen Sequenzen ab. So inaktiviert es Bradykinin und andere vasodilatatorische Peptide, wobei es sogar eine größere Affinität zu Bradykinin besitzt als zu Angiotensin I.⁵⁵

ACE besteht aus einer Peptidkette mit 1278 Aminosäuren und ist ubiquitär im Körper verbreitet. Die genaue zelluläre Lokalisation ist nicht überall bekannt, jedoch findet man neben zirkulierendem ACE^{67,68} am häufigsten membranständiges ACE, das durch seinen C-terminalen Anteil an der luminalen Seite der Zellmembran von Endothel- und Epithelzellen sowie von Leukocyten verankert ist.⁵⁵

Es sind zwei Isoformen des ACE bekannt, die sich sowohl in der Größe der mRNA^{67,69} als auch in der Länge des Proteins unterscheiden. Das Molekulargewicht des testikulären ACE liegt zwischen 90-100 kD, das des ubiquitär verbreiteten endothelialen ACE dagegen zwischen 140-160 kD.⁵⁵

Beim Menschen ist bislang nur ein *ACE*-Locus auf Chromosom 17q 23 beschrieben worden. Dieser kodiert für beide Isoenzymformen. Das *ACE*-Gen des Menschen enthält 26 Exons und 25 Introns und erstreckt sich über 21 kb. Das Transkript des endothelialen *ACE* wird von Exon 1 bis Exon 26 unter Auslassung von Exon 13 abgelesen und ist 4,5-5 kb groß. Das 2,6 kb große testikuläre Transkript des *ACE* wird dagegen ausgehend von einem internen Promotor in Intron 12 von Exon 13 bis Exon 26 abgelesen.^{55,67,69} Am 5'-Ende liegen mehrere Konsensus-Sequenzen für den Transkriptionsfaktor Sp1 und cis-wirkende Elemente, die die Expressionsverstärkung durch Glucocorticoide und cAMP vermitteln.⁵⁵

1.2.3.4 Angiotensinrezeptoren

Die Effekte von Angiotensin II werden über spezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche vermittelt. Bisher sind zwei Subtypen des Angiotensin II-Rezeptors (AT₁, AT₂) beschrieben worden sowie ein Angiotensin IV-Rezeptor (AT₄), an den Angiotensin IV, das 3-8 Fragment des Angiotensin II,⁷⁰ bindet und dessen funktionelle Bedeutung bisher noch unklar ist (s. Abb. 2). Die beiden Angiotensin II-Rezeptortypen (AT₁, AT₂) weisen untereinander nur geringe Homologien (32 % Aminosäureidentität) auf. Die Affinität von Angiotensin II ist zu beiden gleich groß. Als spezifische Antagonisten werden u. a. Losartan für AT₁ und PD 123177 oder PD 123319 für AT₂ eingesetzt.⁵⁵

Der Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 (AT₁) gehört zur Superfamilie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren, besitzt sieben Transmembrandomänen, besteht aus 359 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 41 kD. Der singuläre Locus des humanen *AGTR1*-Gens des Menschen liegt auf Chromosom 3q 21-25 und ist etwa 60 kb lang.⁷¹ Es besteht aus 5 Exons, von denen nur das fünfte die kodierende Sequenz enthält.⁷² Das humane *AGTR1*-Transkript enthält sechs AUUUA-Motive, die kennzeichnend für labile mRNAs sind und eine posttranskriptionelle Regulation vermuten lassen.⁵⁵

Die Bindung von Angiotensin II an den AT₁-Rezeptor führt hauptsächlich zur Aktivierung der Phospholipasen C und D, sowie zur Inhibierung der Adenylatcyclase.⁵⁵ Der cytoplasmatische C-Terminus des AT₁-Rezeptors enthält mehrere Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C sowie mehrere Tyrosinreste, die ebenfalls zur Regulation der Rezeptoraktivität durch Phosphorylierung geeignet sind.

Der Angiotensin II-Rezeptor Typ 2 (AT₂) ist 363 Aminosäuren lang, besitzt wie der Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 sieben Transmembrandomänen, ist jedoch nicht fest an G-Proteine gekoppelt. Die Funktion des AT₂-Rezeptors ist weitgehend unklar, aber das weit verbreitete Vorkommen in fötalen und neonatalen Geweben läßt Funktionen im Bereich von Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen vermuten.^{73,74} So hemmt im Tiermodell z. B. die Aktivierung des AT₂-Rezeptors die vom AT₁-Rezeptor vermittelte proliferative Wirkung von Angiotensin II. Der antiproliferative Effekt des AT₂-Rezeptors erfolgt dabei nicht durch die Hemmung von Transkriptionsfaktoren, sondern über eine durch den AT₂-Rezeptor aktivierte Phosphotyrosinphosphatase, welche die wachstumsstimulierenden Phosphorylierungen am Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 wieder aufheben kann.⁷⁵

Beim Menschen liegt der singuläre Genlocus des AT₂-Rezeptors (*AGTR2*) auf Chromosom Xq 22-23. Wie beim Gen des AT₁-Rezeptors (*AGTR1*) enthält auch hier nur eines der drei Exons die kodierende Sequenz des *AGTR2*-Gens.

1.2.4 Das lokale adipocytäre Renin-Angiotensin-System

1987 berichteten Campbell und Habener⁶¹ erstmals, daß adventitielle und periaortale braune und weiße Fettzellen mehr *AGT*-mRNA enthalten als die Muskelzellen der Rattenaorta. Inzwischen wurde die *AGT*-Expression in mehreren braunen und weißen Fettgewebedepots der Ratte⁷⁶ sowie in verschiedenen Fettgewebedepots des Menschen^{17,77} nachgewiesen.

In einer Reihe von Untersuchungen konnte inzwischen die Genexpression fast aller Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems im Fettgewebe und in isolierten Adipocyten von Menschen und Nagetieren nachgewiesen werden.^{17,46,68,78,79} Auch die *AGT*-Sekretion und Ang II-Bildung *in vitro*^{17,80} sowie das Vorhandensein von AT₁-Rezeptoren in der Adipocytenmembran⁸¹ sind gezeigt worden. Kürzlich konnte

außerdem an transgenen Mäusen demonstriert werden, daß adipocytär gebildetes AGT in den Blutkreislauf gelangt und dort an der Blutdruckregulation beteiligt ist.⁸²

Über die funktionelle Bedeutung des adipocytären Renin-Angiotensin-Systems ist noch wenig bekannt, und die Ergebnisse sind z. T. widersprüchlich. In Tiermodellen der Adipositas (*db/db* und *ob/ob* Mäuse)⁸³ geht chronische Überernährung mit einer Überexpression von *AGT* im Fettgewebe einher, ohne daß dadurch die *AGT*-Expression der Leber beeinflusst wird. Bei Ratten führt eine gesteigerte Nahrungsaufnahme nach einer kurzzeitigen Phase des Fastens außerdem zu einer deutlichen Blutdruckerhöhung.⁸³ Die Beteiligung eines aktiven, lokalen RAS im Fettgewebe an der Pathophysiologie der Adipositas-assoziierten Hypertonie scheint daher naheliegend.

Inzwischen gibt es auch Hinweise darauf, daß im Fettgewebe gebildetes Angiotensin II nicht nur direkt zu einer gesteigerten Vasokonstriktion führen könnte, sondern auch indirekt durch die Beeinflussung des Noradrenalinumsatzes⁸⁴ zu einer Veränderung des Blutflusses und der Stoffwechselaktivität beitragen könnte, da beide Funktionen eng an die adrenerge Regulation gekoppelt sind.^{85,86} So konnte zum einen gezeigt werden, daß Angiotensin II die β -adrenerg vermittelte Blutflußsteigerung verringert⁸⁷ und zum anderen das perivaskuläre Fettgewebe über die Freisetzung und Aufnahme von Noradrenalin die Kontraktionsfähigkeit von Gefäßen beeinflusst.⁸⁸ Andererseits steigert Angiotensin II jedoch die adipocytäre Bildung vasodilatatorischer Substanzen wie NO, Prostacyclin und Leptin *in vitro* und *in vivo*.^{2,19-21,89}

In Ob 1771-Zellen, einer klonalen Zelllinie der Maus, steigert adipocytär gebildetes Angiotensin II außerdem die adipogene Differenzierung von Präadipocyten, indem es die Prostacyclin-Bildung in reifen Adipocyten stimuliert.⁹⁰ Dagegen scheint Angiotensin II beim Menschen die adipogene Differenzierung zu hemmen.⁹¹

1.2.5 Hormonelle Regulation der Genexpression des Renin-Angiotensin-Systems

Aus den Promotorregionen einiger RAS-Gene sind cis-wirkende Elemente für Glucocorticoide (*REN*, *AGT*, *ACE*), Östrogen (*AGT*) und Thyroidhormone (*AGT*) bekannt (s.1.2.3.1 - 3), was darauf schließen läßt, daß die Regulation auf transkriptioneller Ebene erfolgt. Am besten untersucht ist bisher die Regulation des hepatischen

Angiotensinogens. Es konnte gezeigt werden, daß bei Ratten neben Glucocorticoiden⁹⁰⁻⁹³ auch Östrogene,^{92,95-97} Triiodo-L-Thyronin (T₃),^{92,98} Testosteron⁹⁹ und Angiotensin II,^{58,92,93} letzteres über eine positive Rückkopplungsschleife, die *AGT*-mRNA-Konzentration und die *AGT*-Sekretion *in vivo* und *in vitro* steigern. Dagegen wird die Genexpression des Renins in der Niere durch Angiotensin II-Infusion reduziert.

Zur hormonellen Regulation der Expression der Renin-Angiotensin-System-Gene im Fettgewebe liegen bisher nur wenige Daten aus Untersuchungen an verschiedenen Rattenstämmen und klonalen Mäusezelllinien vor. So wird bei Sprague-Dawley Ratten die *AGT*-Expression durch Glucocorticoide,^{61,100} Triiodo-L-Thyronin (T₃),⁶¹ 17-β-Estradiol⁶¹ und Testosteron^{61,101} stimuliert. Auch Lipopolysaccharide¹⁰² und Insulin¹⁰¹ haben bei bestimmten Rattenstämmen eine positive Wirkung. Dagegen konnte bei klonalen Ob 1771-Zellen der Maus eine Stimulation der *AGT*-Expression durch Glucocorticoide, Fettsäuren und TNF α ^{100,104} beobachtet werden. Triiodo-L-Thyronin (T₃), 17-β-Estradiol und Angiotensin II zeigten aber keinen Einfluß auf die *AGT*-Expression. Widersprüchlich sind auch die Ergebnisse zur Wirkung von Insulin, das die *AGT*-Expression in 3T3 F442A- und Ob 1771-Zellen hemmt, in 3T3-L1-Zellen jedoch steigert.^{77,105} Daten zur Regulation der Expression der anderen RAS-Gene im Fettgewebe liegen nicht vor.

1.3 Problematik der Adipocytenforschung

Trotz des gestiegenen Interesses an der Fettzellbiologie ist die Zahl der *in vitro* Untersuchungen bislang verhältnismäßig gering. Dies liegt z. T. vermutlich auch an den besonderen physikalischen und biologischen Eigenschaften der Adipocyten, die stark von denen anderer Zellarten abweichen und die Übertragung herkömmlicher Methoden der Zell- und Molekularbiologie erschweren. Nachfolgend sind zunächst die Vor- und Nachteile der verschiedenen *in vitro* Untersuchungsmethoden des Fettgewebes und die sich dabei aus den Eigenschaften der Zellen ergebenden Probleme zusammengefaßt. Anschließend wird kurz auf die Unterschiede von Tiermodellen bzw. tierischen Zelllinien gegenüber humanem Fettgewebe eingegangen.

Neben der Kultivierung ganzer Fettgewebestücke werden *in vitro* Untersuchungen entweder an isolierten Adipocyten oder meistens an *in vitro* differenzierten Präadipocyten (Primärkulturen oder Zelllinien) durchgeführt. Die Verwendung ganzer Fettgewebestücke kommt den körpereigenen Bedingungen zwar am nächsten, da alle Komponenten, die zur Bildung des Fettgewebes beitragen (Adipocyten, Stromavaskularzellen, Bindegewebe) in diesem Ansatz enthalten sind.; Die Funktionen der einzelnen Zellarten zu untersuchen, ist hier jedoch kaum möglich. Technisch bestehen bei diesem Untersuchungsansatz aufgrund des hohen Fettgehaltes des Gewebes die gleichen Probleme wie bei isolierten Adipocyten (s. u.). Hinzu kommt hier jedoch noch die Schwierigkeit, während der Kultivierung bzw. des Experimentes eine ausreichende Perfusion der Gewebestücke zu erhalten, um damit eine gleichmäßige Versorgung der Gewebebestandteile sicherzustellen.

Eine gute Alternative zu diesem Untersuchungsansatz ist die Verwendung isolierter Adipocyten, da sie den größten Teil des Fettgewebes ausmachen¹⁰⁶ und ihre Zahl und Größe während der Entstehung von Adipositas stark zunimmt. Im Verhältnis zur Größe anderer Zellarten, wie z. B. Hepatocyten, Fibroblasten oder Präadipocyten (20 - 30 μm ¹⁰⁷) sind Adipocyten jedoch mit einem Durchmesser von 40 – 150 μm ¹⁰⁸⁻¹¹⁰ ausgesprochen groß und mechanisch sehr empfindlich. Sie besitzen meistens eine einzige, große lipidgefüllte Vakuole, die ca. 95 % des Zellvolumens einnimmt und zusammen mit dem randständigen, diskusförmigen Zellkern von einem nur sehr dünnen Cytoplasmasaum umgeben ist. Auch können sie sich im Gegensatz zu ihren Vorläuferzellen, den Präadipocyten, nicht mehr teilen, wodurch die Anzahl der Experimente, die mit einer Primärkultur durchgeführt werden können, sehr begrenzt ist. Jedoch sind es insbesondere die Größe und der hohe Fettgehalt der Adipocyten, die bei der Untersuchung isolierter Zellen eine Reihe von Problemen hervorrufen. So sind Adipocyten für bestimmte Geräte (z. B. Neubauer-Zählkammern, Kapillaren, Zuleitungsschläuche etc.) zu groß. Die eingelagerten Lipide verleihen den Fettzellen darüber hinaus einen starken Auftrieb. Dies führt dazu, daß Adipocyten sich stets an der Oberfläche des Kulturmediums sammeln. Das erschwert die Handhabung der Kulturen, wie auch das Suspendieren der Zellen und behindert Versuche, bei denen die Zellen vollständig vom Medium umspült sein müssen (z. B. Rezeptorbindungsstudien). Auch macht der dünne Cytoplasmasaum der Adipocyten die mikroskopische Beobachtung angefärbter Zellbestandteile (z. B. cytoplasmatische Rezeptoren)

schwierig. Bei molekularbiologischen Untersuchungen beeinträchtigen Fettgehalt und Größe besonders die Menge und die Qualität des verwendeten Materials. Da Zellkern und Cytoplasma bei Adipocyten zusammen nur ca. 5 % des Zellvolumens ausmachen, ist der Gehalt an Nukleinsäuren bzw. Proteinen im Verhältnis zum Volumen wesentlich geringer als bei anderen Zellarten. Hinzu kommt, daß Lipide bei den meisten Isolierungsmethoden für Proteine, RNA oder DNA die Qualität und Ausbeute zusätzlich verringern.

Aufgrund dieser Probleme ist es für *in vitro* Untersuchungen isolierter Adipocyten erforderlich, einen Großteil der für andere Zelltypen etablierten Methoden speziell anzupassen oder sogar neue Verfahren zu entwickeln. Da dies u. U. sehr aufwendig ist, wurden bisher die meisten Untersuchungen an Primärkulturen von Präadipocyten durchgeführt, die mit Hilfe verschiedener Hormone zur Differenzierung angeregt werden. Solche Kulturen sind einfacher zu handhaben, weisen aber verschiedene Nachteile auf. So enthalten sie neben den teildifferenzierten Adipocyten auch immer undifferenzierte Präadipocyten, während ausdifferenzierte Adipocyten kaum vorhanden sind, da diese sich aufgrund des hohen Fettgehaltes vom Boden des Kulturgefäßes lösen und beim Medienwechsel größtenteils verloren gehen. Auch haben die teildifferenzierten Adipocyten noch relativ wenige Lipide akkumuliert, die in diesem Entwicklungsstadium noch multilokulär organisiert sind, wodurch sie sich deutlich von ausdifferenzierten Adipocyten mit ihren unilokulären Lipidvakuolen unterscheiden. Insofern entsprechen die Verhältnisse in differenzierenden Präadipocyten nicht zwangsläufig denen in ausdifferenzierten Zellen, welche doch den größten Teil des Fettgewebes ausmachen.¹⁰⁶ Auch zur Untersuchung der hormonellen Regulation ist dieses System durch die bereits erwähnte Notwendigkeit der hormonellen Stimulation der Differenzierung wenig geeignet. Eine weitere Einschränkung liegt darin, daß Primärkulturen isolierter Präadipocyten zunehmend ihre Differenzierungsfähigkeit verlieren und das mit Beginn der Differenzierung wiederum die Teilungsfähigkeit verloren geht. So ist es auch bei der Verwendung von Präadipocytenkulturen notwendig, immer wieder neue Primärkulturen anzulegen, wofür relativ große Mengen Fettgewebe benötigt werden, da der Präadipocytenanteil des Fettgewebes verhältnismäßig gering ist.¹⁰⁶

Da menschliches Fettgewebe jedoch meist schlecht verfügbar ist, wurden bisher ein Großteil der Untersuchungen an Ratten, Mäusen oder an verschiedenen klonalen Zelllinien der Maus (z. B. 3T3, Ob 1771) durchgeführt. Einer der wichtigsten Unterschiede zwischen Menschen und Nagetieren ist jedoch das Fehlen brauner Fettgewebedepots beim erwachsenen Menschen. Adipocyten aus braunem Fettgewebe sind wesentlich kleiner (ca. 60 μm ^{107,109}), enthalten viele kleine multilokulär organisierte Lipidvakuolen und eine große Anzahl von Mitochondrien. Braunes Fettgewebe ist speziell der Wärmeerzeugung angepaßt und bei vielen Nagetieren sowie den meisten Winterschläfern vorhanden. Beim Menschen ist es nur bei Neugeborenen zu finden.¹⁰⁶ Es wird jedoch diskutiert, daß das weiße Fettgewebe des Menschen vereinzelt braune Adipocyten enthält.^{109,111} Davon abgesehen haben Untersuchungen an weißem Fettgewebe gezeigt, daß Befunde bei Ratten, Mäusen oder klonalen Zelllinien z. T. deutlich voneinander abweichen oder sogar gegensätzlich sind.^{77,105} Insofern ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse von Nagetieren auf den Menschen nur bedingt möglich.

1.4 Vorarbeiten

Aufgrund der Einschränkungen, die Tiermodelle und halbdifferenzierte Adipocytenkulturen aufweisen, entschieden wir uns, ein System zu etablieren, daß es erlaubte, Experimente zur Genregulation an ausdifferenzierten humanen Adipocyten durchzuführen. Anfangs standen dazu nur geringe Mengen (10 - 50 g) Fettgewebe aus unterschiedlichen operativen Eingriffen zur Verfügung. Damit war es möglich, basierend auf den Methoden von Rodbell¹¹² und Marshall,¹¹³ ein Verfahren zu entwickeln, mit dem sowohl Adipocyten als auch Präadipocyten aus verschiedenen humanen Fettgewebedepots (subkutan, intraperitoneal) isoliert werden konnten. Für Kultivierungs- und Stimulationsexperimente war die Gewebemenge jedoch zu gering. Ausreichend große Fettgewebemengen (bis 400 g) erhielten wir schließlich aus verschiedenen Kliniken, in denen sich gesunde, vorwiegend weibliche Patienten aus kosmetischen Gründen einer Bauchplastik oder einer Mammareduktion unterzogen. Dabei zeigte es sich, daß das Material während des Transportes nur leicht gekühlt werden darf und zwischen Entnahme und Beginn des Gewebeaufschlusses nicht mehr

als zwei Stunden vergehen sollten, wodurch die Zahl der in Frage kommenden Kliniken stark limitiert wurde.

Für den Gewebeaufschluß wurden Kollagenasen verschiedener Hersteller und unterschiedliche Puffersysteme getestet, um ein System zu etablieren, mit dem in relativ kurzer Zeit sowohl große Mengen Fettgewebe als auch Biopsiematerial vollständig aufgeschlossen und eine hohe Ausbeute an intakten Zellen erzielt werden kann. Zur Kultivierung der Adipocyten wurden ebenfalls verschiedene in der Literatur beschriebene Medienkombinationen getestet. Um zukünftig auch Co-Kultivierungsexperimente mit Präadipocyten durchführen zu können, wurde eine dem Präadipocytenmedium sehr ähnliche Medienkombination gewählt. Durch den Verlust der Teilungsfähigkeit ist es jedoch bei ausdifferenzierten Adipocyten nicht möglich, die Wachstumsrate zur Qualitätskontrolle der Primärkulturen einzusetzen. Statt dessen können die Kulturbedingungen über die Veränderung der Zellzahl und die Vitalitätsrate kontrolliert werden. In den entsprechenden Experimenten zeigte sich jedoch, daß herkömmliche Methoden, wie die Zellzahlbestimmung in einer Neubauer-Zählkammer oder die Vitalitätsbestimmung mittels Trypanblau nicht auf Adipocyten anwendbar sind.

Die RNA-Isolierung aus Adipocyten war ebenfalls problematisch, da konventionelle Protokolle zur RNA-Isolierung aus Zellen und Geweben nur schlecht oder gar nicht funktionierten. Mit einigen Modifikationen in der Versuchsdurchführung gelang es zwar, mit der Phenol-Chloroform-Methode RNA aus Adipocyten zu isolieren, die Qualität der isolierten RNA war jedoch nicht besonders gut und die Ausbeute vor allem bei Biopsiematerial zu gering, um damit Northern-Blot-Analysen durchführen zu können. Mittels konventioneller RT-PCR in Verbindung mit Ethidiumbromid gefärbten Gelen gelang es aber, die Genexpression von Angiotensinogen (*AGT*), Angiotensin-Converting-Enzym (*ACE*) und Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 (*AGTR1*) in ausdifferenzierten humanen Adipocyten nachzuweisen.⁴⁶ Die Expression des Renin (*REN*)- und Angiotensin II-Rezeptor Typ 2 Gens (*AGTR2*) konnte jedoch mit dieser Methode weder an isolierten Adipocyten noch an Fettgewebe nachgewiesen werden.⁴⁶

1.5 Problemstellung und Zielsetzung

Bei dem Versuch, ein System zu etablieren, das es erlaubt, an humanen Adipocyten Experimente zur Genregulation durchzuführen, hatte sich gezeigt, daß insbesondere die Größe und der hohe Lipidgehalt der Adipocyten zu vielfältigen Problemen führen. So hatten sich z. B. herkömmliche Methoden zur Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung als ungeeignet erwiesen. Die Neubauer-Zählkammer war für Adipocyten zu niedrig. Aber auch mit der größeren Fuchs-Rosenthal-Zählkammer war eine verlässliche Zellzahlbestimmung sehr schwierig, da es kaum möglich war, die Adipocyten gleichmäßig suspendiert in die Kammer zu pipettieren. Durch den starken Auftrieb der Zellen (s. 1.2.5) entmischte sich die Zellsuspension bereits vor dem Auftragen in die Zählkammer in der Pipette. Vitalitätsbestimmungen mittels Trypanblau waren ebenfalls nicht erfolgreich, da der Cytoplasmasaum der Adipocyten zu dünn ist. Unter dem Mikroskop ist die Blaufärbung des Cytoplasmas toter Zellen nicht deutlich zu erkennen.

Auch die gängigen Verfahren zur RNA-Isolierung ergaben bei Adipocyten keine befriedigenden Ergebnisse, da der RNA-Gehalt einer Fettzelle aufgrund ihres geringen Cytoplasmagehaltes (ca. 5 %) im Verhältnis zu ihrem Volumen sehr gering ist und konventionelle Protokolle zur RNA-Isolierung weder für Material mit hohem Lipidgehalt noch für derart große Zellen (bis 150 µm im Durchmesser) ausgelegt sind. Für die geplanten Expressionsanalysen reichte die Menge an isolierter RNA kaum aus und war bei kleineren Gewebemengen (Biopsien) gänzlich unzureichend. Neben einem verbesserten Verfahren zur RNA-Isolierung wurde daher auch für die Expressionsanalysen eine sensitive Methode benötigt. Unter Berücksichtigung der zu erwartenden RNA-Mengen schieden neben Northern-Blot-Analysen sowohl die „limited-dilution-PCR“ als auch die „competitive PCR“ aus.

Als problematisch erwies sich bei den Expressionsanalysen hormonell stimulierter Adipocyten und Präadipocyten auch die Auswahl einer geeigneten endogenen Kontrolle („house-keeping“ Gen), da es Hinweise auf die Regulation häufig verwendeter „house-keeping“ Gene wie z. B. GAPDH, β -Actin oder 18S rRNA gibt. ¹¹⁴⁻¹¹⁶

Die Ziele dieser Arbeit waren daher :

1. Entwicklung einer für Adipocyten geeigneten Methode der Zellzahlbestimmung.
2. Etablierung eines Verfahrens zur Bestimmung der Vitalitätsrate von Primärkulturen humaner Adipocyten.
3. Vergleich verschiedener Methoden zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Primärkulturen ausdifferenzierter Adipocyten.
4. Auswahl und Optimierung der für Adipocyten geeignetsten Methode der RNA-Isolierung.
5. Etablierung der TaqMan[®]-Real-Time-PCR Technik, einer sehr sensitiven RT-PCR Methode zur Quantifizierung der Genexpression.
6. Auswahl einer endogenen Kontrolle, die es ermöglicht, die Genexpression sowohl bei Adipocyten unter hormoneller Stimulation als auch bei Präadipocyten während der Differenzierung zu quantifizieren.
7. Demonstration der Funktionsweise der TaqMan[®]-Real-Time-PCR Technik zur relativen Quantifizierung der Genexpression am Beispiel von *AGT*, *ACE*, *AGTR1* und eventuell auch *REN* und *AGTR2* in hormonell stimulierten Adipocyten. Untersucht wird dabei der Einfluß von Hydrocortison, Insulin, 17- β -Estradiol, 3,3'-5-Triiodo-L-Thyronin (T_3) bzw. Angiotensin II auf die Expression oben genannter Gene über einen Zeitraum von 24 h.

2 Material

2.1 Geräte

Analysenwaage BP 615	Fa. Sartorius
Biofuge 13	Fa. Heraeus
Brutschrank, Kupfer; Function Line	Fa. Heraeus
DNA Thermal Cycler	Fa. Perkin Elmer
Elektrorührer Compact HPI	Fa. Variomag
Fluoreszenz Kondensator CK 40 – RFA	Fa. Olympus
Fluoreszenzmodul Blau CX – DMB	Fa. Olympus
Fluoreszenzmodul Grün CX – DMG	Fa. Olympus
GeneAmp PCR System 9600	Fa. Perkin Elmer
Inversmikroskop CK 40 mit Fluoreszenzmodulen	Fa. Olympus
Inversmikroskop Diaphot 300	Fa. Nikon
Konfokalmikroskopapparatur	Fa. Biorad
Magnetrührer	Fa. IKA
MUPID-2 Mini-Gel Elektrophoresis Unit	Fa. Cosmo Bio Co., LTD.
Roto-Vette	Fa. Helma
Schüttelwasserbad SW 20	Fa. Julabo
Sequence Detection System 5700	Fa. PE Biosystems
Sterile Werkbank HERA Safe	Fa. Heraeus
Thermomixer 5436	Fa. Eppendorf
Tischzentrifuge 5415 C	Fa. Eppendorf
Ultraschallbad Ultrasonics	Fa. Astrason
Ultrazentrifuge L-70	Fa. Beckman
UV Imager TI 2	Fa. Biometra
UV Spectrometer UV 1202	Fa. Shimatzu
UV Spectrometer Ultra-Spec 2000	Fa. Pharmacia Biotec
UV Transluminator	Fa. UVP, Inc.
Vortex-Genie-2	Fa. Scientific Industries
Wasserbad	Fa. Kötterman
Zentrifuge 5810 R	Fa. Eppendorf
Zentrifuge RC2-B	Fa. Sorvall

2.2 Spezielle Materialien

Steritop-GP Filter (0,22 µm Porengröße, GP Express Membran) (# SCGPT 05 RE)	Fa. Millipore
MicroAmp Optical Caps (# N 80 10 935)	Fa. PE Biosystems
MicroAmp Optical 96 Well Reaction Plates (# N 80 10 560)	Fa. PE Biosystems
Siebgewebe, Polypropylen, 250 µm Maschenweite	Fa. W. Kaldenbach
Sterikan Sonderkanülen 20-G, gelb (0,9 x 70 mm) (# 466 57 91)	Fa. Braun
Zellkulturflaschen, 225 cm ² (900 ml) (# 3160-225)	Fa. Dunn Labortechnik
Zellkulturflaschen EasyFlask mit Filterkappen 25 cm ² (50 ml) (# 156367) bzw. 75 cm ² (260 ml) (# 156499)	Fa. Nunc
Zellkulturflaschen SoLo Flask 185 cm ² (600 ml) mit Filterkappen (# 144903)	Fa. Nunc
UZ-Röhrchen Ultra-Clear (# 344057)	Fa. Beckman

2.3 Chemikalien

Acridinorange (# 15931-0025)	Fa. Merck
Adenosin (# A 4036)	Fa. Sigma
Agarose (# A 9539)	Fa. Sigma
Angiotensin II, human (# A 9525)	Fa. Sigma
Aqua ad iniectabilia	Fa. Braun
Aqua Spüllösung	Fa. Delta Pharma
Aqua-Poly / Mount (# 18606)	Fa. Polysciences, Inc.
Bovine Serum Albumin (BSA) Fract. V (# 01400)	Fa. Biomol
Bovine Serum Albumin (BSA) Fract. V (# A 9418)	Fa. Sigma
Cäsiumchlorid (# C 4036)	Fa. Sigma
Chloroform (# 10 2445)	Fa. Merck
D-Biotin (# B 4639)	Fa. Sigma
DEPC (Diethylpyrocarbonat) (# 5758)	Fa. Sigma
DMEM / F12 (1:1), Dubecco's Modified Eagles' Medium /	Fa. Life Technologies

Nutrient F12, (# 32 500-019)	
Eisessig (# 1.000.561.000)	Fa. Merck
17- β -Estradiol (# E 8875)	Fa. Sigma
Ethanol, unvergällt (# 1.009.831.000)	Fa. Merck
Ethanol, vergällt (# 1.009.741.011)	Fa. Merck
Fötale Kälberserum (FKS) (# S 0113)	Fa. Biochrom
N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin (# K 0202)	Fa. Biochrom
Guanidiniumthiocyanat (# G 9277)	Fa. Sigma
HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) (# L 2015)	Fa. Biochrom
HEPES (# L 1615)	Fa. Biochrom
Hydrocortison (# H 4001)	Fa. Sigma
Isopropanol (2-Propanol) (# 1.096.341.000)	Fa. Merck
Insulin (# I 2767)	Fa. Sigma
Kanamycin (# 15160-047)	Fa. Life Technologies
2-Mercaptoethanol (# M 6250)	Fa. Sigma
Methylen Blue Solution (# 66F-6109)	Fa. Sigma-Diagnostics
Natriumacetat (# 1.06268.1000)	Fa. Merck
Natriumbicarbonat, NaHCO ₃ (# S 5771)	Fa. Sigma
Natriumhydroxid, NaOH (#1.064.95.1000)	Fa. Merck
PBS (Phosphat Buffered Saline) ohne Mg ²⁺ , Ca ²⁺ (# 1825)	Fa. Biochrom
Penicillin /Streptomycin (# A 2212)	Fa. Biochrom
TNF α , human (# T 6674)	Fa. Sigma
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Trizima-Base), (# T 1503)	Fa. Sigma
3,3',5-Triiodo-L-Thyronin (# T 2752)	Fa. Sigma
Trypan Blau in PBS (# L 6323)	Fa. Biochrom

2.4 Primer und Sonden

Die nachfolgenden Primer wurden von der Fa. Life Technologies bezogen.

Alle verwendeten Sonden stammen von der Fa. BioTez, MDC Berlin-Buch und sind am 5'-Ende mit FAM (6-Carboxy-Fluoricein, Emission bei 518 nm) und am 3'-Ende mit TAMRA (6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin, Emission bei 582 nm) markiert.

Pyruvat-Dehydrogenase (PDH)-Gen

Vorwärtsprimer : 5' GGT ATG GAT GAG GAG CTG GA 3' 20-mer
 Rückwärtsprimer : 5' CTT CCA CAG CCC TCG ACT AA 3' 20-mer

Renin (REN)-Gen

Vorwärtsprimer : 5' TTG GAG AGG TCA CGG AGA TGC 3' 21-mer
 Rückwärtsprimer : 5' TGC CCA CAA CCC CAT CAA AC 3' 20-mer
 Sonde : 5' CGC CTT ACC CTT CAT GCT GGC CG 3' 23-mer

Angiotensinogen (AGT)-Gen

Vorwärtsprimer : 5' CTT CAC TGA GAG CGC CTG C 3' 19-mer
 Rückwärtsprimer : 5' GAG ACC CTC CAC CTT GTC CA 3' 20-mer
 Sonde : 5' CTG ATC CAG CCT CAC TAT GCC TCT GAC C 3' 28-mer

Angiotensin-Converting-Enzym (ACE)-Gen

Vorwärtsprimer : 5' CAC CCA GGC CAG GAA GTT T 3' 19-mer
 Rückwärtsprimer : 5' TGC CCG TTC TAG GTC CTG AA 3' 20-mer
 Sonde : 5' CCA GTT GCA GAA CAC CAC TAT CAA GCG G 3' 28-mer

Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 (AGTR1)-Gen

Vorwärtsprimer : 5' ACC CAA TGA AGT CCC GCC T 3' 19-mer
 Rückwärtsprimer : 5' AGC AGC CAA ATG ATG ATG CAG 3' 21-mer
 Sonde : 5' CGA CGC ACA ATG CTT GTA GCC AAA GTC A 3' 28-mer

Angiotensin II-Rezeptor Typ 2 (AGTR2)-Gen

Vorwärtsprimer : 5' CCA AGT CCT GAA GAT GGC AGC 3' 21-mer
 Rückwärtsprimer : 5' GGA AGG TCA GAA CAT GGA AGG G 3' 22-mer
 Sonde : 5' TTG TTC TGG CCT TCA TCA TTT GCT GGC T 3' 28-mer

Leptin (LEP)-Gen

Vorwärtsprimer : 5' ACC AGG ATC AAT GAC ATT TCA CAC 3' 24-mer
 Rückwärtsprimer : 5' CCA GGA ATG AAG TCC AAA CCG 3' 21-mer
 Sonde : 5' CGC AGT CAG TCT CCT CCA AAC AGA AAG TCA T 3' 31-mer

Für das **GAPDH-Gen** wurde der „Human GAPDH“ Kit (huGAPDH, VIC-markiert, # 4310884 E) der Firma PE Biosystems verwendet. Die Sequenzen werden vom Hersteller nicht bekannt gegeben.

2.5 Kits

Human GAPDH Kit (huGAPDH,vic-markiert) (# 4310884 E)	Fa. PE Biosystems
Human Endogenous Control Plates (# 4309921)	Fa. PE Biosystems
PUREscript (# 210002)	Fa. Biozym
Rnase Free DNase Set (# 79254)	Fa. Qiagen
Rneasy Mini Kit (# 74 106)	Fa. Qiagen
RLT-Puffer für den Rneasy Mini Kit (# 79 216)	Fa. Qiagen
TaqMan Universal PCR Mastermix (4305719)	Fa. PE Biosystems
TRizol Reagenz (# 15596-018)	Fa. Life Technologies

2.6 Enzyme und PCR-Reagenzien

Kollagenase Typ I CLS (# C1-22)	Fa. Biochrom
Desoxyribonuclease I (DNase I), Amplification Grade (# 18068-015)	Fa. Life Technologies
dNTP-Mix, 10 mM each (#18427-013)	Fa. Life Technologies
Random Primer Mix (# 48190-011)	Fa. Life Technologies
Superscript RNase H ⁻ Reverse Transkriptase (# 18053-017)	Fa. Life Technologies
Taq-DNA-Polymerase (# 18038-026)	Fa. Life Technologies
Taq-DNA-Polymerase PCR-Buffer (# 18067-017)	Fa. Life Technologies

2.7 Lösungen, Medien, Puffer

HBSS - Puffer :

	HBSS, flüssig
1x10 ⁵ U / l	Penicillin
100 mg / l	Streptomycin
200 mg / l	Kanamycin
25 mmol / l	HEPES
3 %	Rinder Serum Albumin (BSA) Fraktion V

Alle Zusätze in HBSS lösen, den pH-Wert mit NaOH auf 7,5 einstellen und die Lösung steril filtrieren (0,22 µm Porengröße, GP Express Membran, Fa. Millipore).

Kollagenaselösung :

Die Konzentration der verwendeten Kollagenase (Typ 1 CLS) variierte von Charge zu Charge zwischen 175 U / mg und 277 U / mg. Für 200 bis 300 g Fettgewebe wurde eine Konzentration von ca. 0,2 U / ml HBSS-Puffer eingesetzt. Für größere Gewebemengen (400 g) wurden bis zu 0,5 U / ml HBSS-Puffer verwendet.

Zum Ansetzen der Kollagenaselösung wurde zunächst 1 g der lyophilisierten Kollagenase (dies entspricht der Verpackungseinheit) in 10 ml HBSS-Puffer gelöst. Diese Stammlösung ist bei -20°C ca. 2 Wochen haltbar. Ein entsprechendes Aliquot der Stammlösung wurde in der Regel vor Gebrauch zum vorbereiteten HBSS-Puffer (ca. 500 ml) gegeben und mit diesem zusammen steril filtriert (0,22 µm Porengröße, GP Express Membran, Fa. Millipore). Die gebrauchsfertige Kollagenaselösung ist bei 4°C maximal 3 Tage haltbar, danach läßt die Aktivität der Kollagenase stark nach.

Adipocytenmedium :

	DMEM / F12 (1:1), Trockenmedium
1 x 10 ⁵ U / l	Penicillin
100 mg / l	Streptomycin
200 mg / l	Kanamycin
10 mg / l	HEPES
2,5 mmol / l	N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin
50 nmol / l	Adenosin
33 µmol / l	d-Biotin
0,85 g / l	Na-Bicarbonat, NaHCO ₃
1%	Rinder Serum Albumin (BSA) Fraktion V
1%	Fötales Kälberserum (FKS)

Trockenmedium und alle Zusätze, außer FKS, in pyrogenfreiem Wasser lösen, mit NaOH auf pH 7,4 einstellen, auf 990 ml auffüllen und steril filtrieren (0,22 µm Porengröße, GP Express Membran, Fa. Millipore). Lagerung bei 4°C. FKS oder entsprechende Menge H₂O (bei serumfreier Kultivierung) vor Gebrauch zugeben.

CsCl – Lösung :

5,7 M CsCl
12,5 mM Na-Acetat, pH 6
in DEPC-H₂O lösen, steril filtrieren, bei 4°C lagern.

GIT - Puffer :

4 M Guanidiniumthiocyanat
25 mM Na-Acetat, pH 6
0,1 M 2-Mercaptoethanol
in DEPC-H₂O lösen, steril filtrieren, bei 4°C lagern.

50 x TAE-Elektrophoresepuffer:

242 g / l Tris-Acetat
57,1 ml / l Essigsäure
100 ml / l EDTA (0,5 M, pH 8)

GLB-Puffer :

0,1 % Bromphenolblau
50 % Glycerol

in RNase-freiem Wasser lösen.

2.8 Antikörper

AT1 (N-10) : Kaninchen IgG, polyclonal, Bindung an die Aminosäuren 15 – 24 des aminoterminalen Endes des humanen Angiotensin II-Rezeptors Typ 1, keine Kreuzreaktivität mit dem Angiotensin II-Rezeptor Typ 2; Fa. Santa Cruz (# sc-1173)

Cy-2-konjugierter Sekundärantikörper : Esel anti Kaninchen IgG (H+L), polyclonal, Cy-2 (Carbocyanin) Fluoreszenzfarbstoff mit maximaler Anregung bei 490 nm und maximaler Emmission bei 508 nm; Fa. Dianova (# 711-225-152)

3 Methoden

3.1 Isolierung und Kultivierung humaner Adipocyten

3.1.1 Adipocytenisolierung

Die hier angewandte Methode basiert auf der von Rodbell 1963 beschriebenen Isolierung von Adipocyten aus Fettgewebe der Ratte.¹¹² Die Grundlagen dieser Methode sind die enzymatische Auflösung der Gewebestruktur mittels Kollagenase und die Trennung von Adipocyten und Stromavaskularzellen (Prädipocyten, Fibroblasten, Blutzellen) durch Zentrifugation. Diese Methode wurde soweit modifiziert, daß sie sich gut zur Isolierung humaner Adipocyten (aber auch Prädipocyten) aus größeren Gewebemengen (bis 400 g) eignete. Auf die gleichzeitig mögliche Isolierung von Prädipocyten wird im folgenden Protokoll jedoch nicht genauer eingegangen, da dieser Teil der Methode für die hier vorgestellten Untersuchungen nicht benötigt wurde.

Vor allem für die Stimulationsversuche wurden große Gewebemengen benötigt, da der Anteil ausdifferenzierter Adipocyten pro Gramm Fettgewebe aufgrund ihrer ungewöhnlichen Größe (40 - 180 µm) relativ gering ist (verglichen mit anderen Geweben). Außerdem können sich ausdifferenzierte Adipocyten nicht mehr vermehren und sind daher nur eine begrenzte Zeit (ca. zwei Wochen) in Kultur zu halten. Dies machte es notwendig, für die einzelnen Teilversuche jeweils neue Primärkulturen anzulegen.

Die ausdifferenzierten Adipocyten wurden aus subkutanem Fettgewebe der Brust oder des Bauches weiblicher Patientinnen isoliert, die sich aus kosmetischen Gründen entweder einer Mammareduktion oder einer Bauchplastik unterzogen haben.

Protokoll

1. Fettgewebe entweder direkt nach der Entnahme im OP auf einer sterilen Unterlage in kleinere Stücke schneiden und in Flaschen mit gekühltem HBSS-Puffer (s. 2.7) oder Adipocytenmedium ins Labor überführen, oder das gesamte Explantat unzerkleinert und leicht gekühlt (nicht direkt auf Eis) in einem sauberen Autoklavierbeutel transportieren.
2. Entnommenes Fettgewebe in möglichst kleine Stücke schneiden und dabei von großen Bindegewebsstücken und Blutgefäßen befreien.

3. 200 bis 400 g des kleingeschnittenen Gewebes auf mehrere 50 ml-Zentrifugengefäße mit vorgelegtem HBSS-Puffer verteilen und darin leicht schütteln, da Fettgewebestücke aufgrund des hohen Fettgehaltes an der Oberfläche schwimmen.
4. Dann die Röhrchen 5 min bei 200 x g zentrifugieren (Eppendorf Zentrifuge 5810 R mit Ausschwingrotor).
5. Unterstand (HBSS-Puffer) mit den zu Boden gesunkenen festen Bestandteilen (z. B. geronnenes Blut) absaugen.
6. Jeweils ca. 100 bis 200 g der kleinen Stücke in eine 900 ml-Gewebekulturflasche mit 250 ml Kollagenaselösung (ca. 0,2 U / ml, s. 2.7) überführen.
Die Fettgewebemenge sollte nicht mehr als die Hälfte des Gesamtvolumens ausmachen, da sonst der Kollagenaseverdau ineffizient ist.
7. Gewebekulturflaschen waagrecht ins Wasserbad legen und 60 - 90 Minuten bei 37°C unter leichtem Schwenken (60 - 80 rpm) inkubieren, bis fast keine Fettgewebestücke mehr erkennbar sind.
8. Die durch den Kollagenaseverdau entstandene Zellsuspension durch einen sterilen Siebgewebetrichter aus Polypropylen (Maschenweite 250 µm) filtrieren, um noch vorhandene Bindegewebsreste und unverdaute Stücke abzutrennen.
9. Filtrat dann auf 50 ml-Zentrifugenröhrchen verteilen und 5 min mit 200 x g zentrifugieren (s. o.).
10. Die nach der Zentrifugation an der Oberfläche schwimmenden Adipocyten vorsichtig durch Dekantieren in frische Zentrifugenröhrchen überführen und in Aliquots von 20 - 25 ml Adipocyten aufteilen.
Die Präadipocyten verbleiben im Unterstand und können ab hier separat weiterbearbeitet werden.
11. Aliquotierte Adipocyten mit etwa dem gleichen Volumen HBSS-Puffer auffüllen.
12. Adipocyten durch mehrfaches Schwenken des Röhrchens resuspendieren und erneut zentrifugieren (s.o.).
13. Zuerst die über der Zellschicht liegende Ölschicht und dann den Unterstand, einschließlich des eventuell noch vorhandenen Pellets, absaugen.
14. Adipocyten auf diese Weise noch zweimal mit HBSS-Puffer waschen und zentrifugieren (s. o.).

15. Nach dem dritten Mal jeweils ca. 30 – 40 ml der durch Zentrifugation separierten Adipocyten in 60 ml Adipocytenmedium mit 1 % FKS (s. 2.7) resuspendieren und in eine 600 ml-Gewebekulturflasche überführen.
16. Zellen über Nacht in einem befeuchteten Brutschrank mit 5 % CO₂ bei 37°C als 2 - 4 mm dünne, an der Oberfläche schwimmende Schicht inkubieren.
17. Adipocyten am folgenden Tag erneut zentrifugieren (s. o.) und das alte Medium durch frisches Adipocytenmedium ersetzen.
(Andere eventuell noch vorhandene Zellen sinken über Nacht zu Boden und werden dort adherent. Durch den Wechsel der Flaschen und des Mediums lassen sich diese Zellen daher sehr einfach von den an der Oberfläche schwimmenden Adipocyten trennen.)

3.1.2 Adipocytenkultivierung

Die Kultivierung der isolierten Adipocyten basiert im wesentlichen auf den von Marshall et al.¹¹³ für Rattenadipocyten und den von Moustaid et al.¹¹⁴ für humane Adipocyten beschriebenen Methoden. Ausdifferenzierte Adipocyten werden im Gegensatz zu Zellen anderer Gewebe aufgrund ihres hohen Fettgehaltes in der Kultur nicht adherent. Da sie außerdem mechanisch relativ empfindlich sind, eignen sie sich auch nicht für Suspensionskulturen. Aus diesem Grund werden die Zellen als dünne, an der Oberfläche des Nährmediums schwimmende Zellschicht kultiviert.

Die wichtigste Modifikation betrifft das verwendete Medium. Hier wird als Basis DMEM / HAMS´F12 verwendet, das auch bei der Kultivierung von Präadipocyten eingesetzt wird. Außerdem wird eine Kombination aus HEPES und Bicarbonat zum Abpuffern des Mediums verwendet, und N-Acetyl-L-Alanyl-Glutamin („stabiles“ Glutamin) als L-Glutamin-Quelle eingesetzt. Mit diesen Veränderungen ist es möglich sowohl „Kurzzeitversuche“ (bis 48 Stunden) in serumfreiem Medium als auch Versuche über einen längeren Zeitraum (bis zwei Wochen) in serumhaltigem Medium durchzuführen. Auf die Adipocytenkultivierung in serumfreiem Medium wird im folgenden Protokoll jedoch nicht näher eingegangen, da dieser Teil der Methode im Rahmen dieser Arbeit nicht verwendet wurde.

Protokoll

1. Adipocyten nach der Isolierung mindestens 12 Stunden in serumhaltigem Adipocytenmedium mit 1 % FKS (s. 2.7) als dünne an der Oberfläche schwimmende Schicht inkubieren (s. 3.1.1).
2. Durch leichtes Schwenken der Zellkulturflasche Adipocyten resuspendieren, dann in Zentrifugenröhrchen überführen und 5 min bei 200 x g zentrifugieren (Eppendorf Zentrifuge 5810 R mit Ausschwingrotor).
3. Ölschicht und Unterstand absaugen.
4. Zellen in frischem Adipocytenmedium (1 % FKS) resuspendieren und in eine frische Zellkulturflasche überführen.
5. ggf. Versuchsbeginn.
6. Kultivierung in einem befeuchteten Brutschrank mit 5 % CO₂ bei 37°C.
7. Medium täglich wechseln, ggf. Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung durchführen (s. 3.1.3 bzw. 3.1.4).

3.1.3 Zellzahlbestimmung bei Adipocyten

Für Adipocyten hatte sich die Zellzahlbestimmung mittels herkömmlicher Zählkammern als ungeeignet erwiesen. Im folgenden wird eine Methode vorgestellt, bei der die modifizierte Form eines Gerätes verwendet wird, das ursprünglich zur halbautomatischen Bestimmung von Urinsediment konzipiert wurde.

Das R/S 1000 der Firma Diasys besteht aus einer optisch klaren Durchflußkammer mit aufgeprägten Zählgittern, die in einer Metallhalterung befestigt ist. Sie dient als Objektträger und bleibt während des gesamten Arbeitsvorganges auf dem Mikroskoptisch liegen. Die Kammer ist über Schläuche auf der einen Seite mit einer kleinen Pumpanlage verbunden und auf der anderen Seite mit einem Ansaugstift, der in die Urinprobe bzw. in diesem Fall in die Zellsuspension eingetaucht wird. Ein Aliquot (ca. 250 µl) der Probe wird mit Hilfe der Pumpe innerhalb von drei Sekunden in die Zählkammer eingesaugt und nach der Zählung wieder über den Ansaugstift ausgespült.

Da die serienmäßige Zählkammer für Adipocyten zu niedrig war, wurde uns vom Hersteller eine 250 µm hohe Zählkammer zur Verfügung gestellt. Sie enthält vier, an der Außenseite aufgeprägte Zählgitter, bestehend aus je 5 x 5 Kästchen. Das Volumen eines Kästchens beträgt 0,02 µl, das eines Gitters 0,5 µl und das Gesamtvolumen aller vier Gitter somit 2 µl.

Protokoll

1. Adipocytenkultur in einem sterilen Gefäß mit Hilfe eines Magnetrührers suspendieren.
2. Ein Aliquot der Zellsuspension (500 bis 1000 µl) in ein 3 ml-Plastikröhrchen mit geradem Boden überführen, mit Adipocytenmedium auf ein Endvolumen von 2 ml auffüllen und auf dem Magnetrührer resuspendieren.
3. Durchflußzählkammer mit dem Zählgitter nach oben unter das Mikroskop legen und 40-fache Vergrößerung einstellen.
4. Ansaugstift in den mittleren Bereich der Adipocytensuspension halten und den „Sample“-Knopf drücken, um einen Teil der Probe (ca. 250 µl) in die unter dem Mikroskop liegende modifizierte Zählkammer einzusaugen.
5. Adipocyten treiben in der Zählkammer nach oben, sammeln sich dort unter dem außen aufgeprägten Zählgitter und können nun gezählt werden. Die Zellzahl eines Gitters entspricht der Anzahl an Adipocyten in 0,5 µl der verdünnten Zellsuspension.
6. Nach Beendigung des Zählens Ansaugstift in den Abfallsammelbehälter halten und dann den „Purge“-Knopf drücken, um die Zellen mit isotonischer Kochsalzlösung aus der Durchflußkammer auszuspülen.
7. Ausspülvorgang wiederholen, bis keine Adipocyten mehr in der Durchflußkammer sind.
8. Zählvorgang noch mindestens zweimal wiederholen.

Die Zellzahl wird wie folgt berechnet :

Zellzahl pro Gitter x 2000 x Verdünnungsfaktor = Zellen / ml (der Kultur)

Anmerkung

Sollte das Spülen mit Kochsalzlösung nicht ausreichen, um die Zählkammer zu säubern, kann die vom Hersteller mitgelieferte „Urizym“-Lösung in die Zählkammer eingesaugt werden. Eine kurze Einwirkzeit (ca. 1 min) ist meist ausreichend, um letzte Zellen und Lipidreste gründlich aus der Kammer und dem Ansaugschlauch zu entfernen.

Zur besseren Unterscheidung von Adipocyten und Fetttropfen können die Zellkerne der Fettzellen vor dem Einsaugen in die Zählkammer mit Methyleneblau angefärbt werden. Dazu wird das aus der Zellsuspension abgenommene Aliquot mit 100 µl einer 1,4 %-igen Methyleneblaulösung durch vorsichtiges Schütteln mit der Hand gemischt. Nach fünf Minuten erfolgt die Zählung (s. o.). Unter dem Mikroskop sind die diskusförmigen Zellkerne dunkelblau gefärbt, das umgebende Medium ist blaßblau und die Lipidtropfen ungefärbt, wodurch Adipocyten deutlich von Lipidtropfen ähnlicher Größe zu unterscheiden sind.

3.1.4 Vitalfärbung von Adipocyten

Eine häufig in der Zellkultur angewandte Methode zur Vitalitätsbestimmung ist das Anfärben des Cytoplasmas mit Trypanblau. Diese hatte sich jedoch für ausdifferenzierte Adipocyten als ungeeignet erwiesen (s. 1.3).

Im folgenden ist eine Methode zur Bestimmung der Vitalität beschrieben, bei der die DNA der Zellkerne mit Acridinorange angefärbt wird. Unter Blaulichtanregung färbt Acridinorange die Zellkerne lebender Zellen grün, die Kerne absterbender oder toter Zellen dagegen gelborange bis rot. Im Gegensatz zur Zellzahlbestimmung ist in diesem Fall eine Gleichverteilung der Zellen in der Zählkammer nicht erforderlich, da hier nur das Verhältnis von vitalen Zellen zu toten Zellen bestimmt wird. Der prozentuale Anteil vitaler Zellen (grüner Kerne) in einer definierten Population entspricht dann der Vitalitätsrate. Diese Methode wurde erstmals von Lorich et al. 1969¹¹⁵ zur Färbung von Adipocyten der Maus beschrieben und wurde als Alternative zur Bestimmung des DNA-Gehaltes eingesetzt. Nachfolgend ist eine modifizierte Form dieses Verfahren dargestellt.

Protokoll

1. Eine 0,5 %-ige (5 mg / ml) Acridinorangestammlösung in einer gepufferten Salzlösung ohne Phenolrot, mit 1 % BSA (HBSS oder PBS) ansetzen und vor Gebrauch ungelöste Kristalle abfiltrieren (Papierfilter oder Spritzenfilter mit 0,45 µm Porengröße).
2. Ein Aliquot der Zellsuspension (250 µl – 1 ml) im Verhältnis 1 : 2 mit der Acridinorangelösung mischen und 5 - 10 min einwirken lassen.
3. Zellen mehrfach mit der gepufferten Salzlösung waschen, d. h. kurz anzentrifugieren (Eppendorf Zentrifuge 5415 C) Unterstand absaugen und Zellen in frischem Puffer resuspendieren.
4. Bleibt der Puffer nach dem Resuspendieren farblos, ein Aliquot entnehmen und entweder in der Zählkammer des modifizierten R/S 1000 oder in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer mikroskopieren.
5. Unter Blaulichtanregung bei 100-facher Vergrößerung mindestens 200 Adipocyten pro Durchgang auszählen und das Verhältnis von Zellen mit hellgrün leuchtendem Zellkern (vital) gegenüber Zellen mit orangerotem Zellkern (nicht mehr vital) bestimmen. Den oval bis diskusförmig Zellkern dabei genau fokussieren, da ein leicht rötliches Leuchten auch von außen anhaftenden Farbstoffpartikeln stammen kann, die nicht vollständig abgewaschen wurden.
6. Zählung 2 - 3 mal wiederholen.

Es wurde entweder das Zeiss Fluoreszenz-Auflichtmikroskop III RS mit dem Interferenz-Breitbandfilter 09 (BP 450 – 490, FT 510, LP 520) oder das Olympus Inverse Mikroskop CK 40 mit Fluoreszenzaufsatz verwendet.

3.1.5 Überprüfung der Isolierungs- und Kultivierungsbedingungen

Um zu kontrollieren, ob die verwendete Methode zur Isolierung von ausdifferenzierten Adipocyten reproduzierbare Ergebnisse erbringt, wurden die Zellen nach der Isolierung gezählt und die Zellzahl pro Gramm Fettgewebe ermittelt. Auf diese Weise ist es auch möglich, den Bedarf an Fettgewebe für einen geplanten Versuch abzuschätzen bzw. die Anzahl möglicher Teilversuche, die mit dem zur Verfügung stehenden Gewebe durchführbar sind, zu bestimmen.

Die Kulturbedingungen wurden kontrolliert, indem die Adipocyten täglich gezählt und ihre Vitalität bestimmt wurde. Da ausdifferenzierte Adipocyten sich nicht mehr vermehren können, nimmt die Zellzahl im Laufe der Kultivierung z. B. durch Zelltod, mechanischen Streß und Verluste beim Medienwechsel ab. Daher werden Kulturbedingungen dann als günstig erachtet, wenn für die Dauer der Kultivierung der Zellverlust gleichbleibend gering ist und die Vitalitätsrate über 90 % liegt.

Darüber hinaus wurde untersucht, ob die Zugabe der Substanzen, die für die Stimulationsexperimente eingesetzt werden sollten, einen Einfluß auf die Vitalität der Adipocyten haben.

3.2 RNA-Isolierung

Da sich die RNA-Isolierung aus Adipocyten mit herkömmlichen Verfahren als problematisch erwiesen hatte, werden im ersten Teil zunächst vier verschiedene Methoden mit modifizierten Protokollen beschrieben, die auf ihre Eignung für Fettzellen untersucht werden sollten. Im zweiten Teil ist darauf aufbauend ein optimiertes Protokoll für ausdifferenzierte Adipocyten aufgeführt. Dieses bildet die Grundlage für alle folgenden Versuche, denen die Isolierung von Gesamt-RNA zugrunde lag.

3.2.1 RNA-Isolierungsmethoden

Auf der Suche nach einer effizienten Methode der RNA-Isolierung aus ausdifferenzierten Adipocyten wurden vier verschiedene Systeme in bezug auf Ausbeute, Reinheit (Kontaminationen mit DNA, Proteinen, Salzen, ggf. Phenol) und Zeitaufwand getestet. Wie unter Punkt 3.2.1.1 – 3.2.1.4 beschrieben, unterscheiden sich die ausgewählten Verfahren sowohl in der Art des Zellaufschlusses als auch in der Methode der Trennung von RNA, DNA und Proteinen.

Um die Methoden miteinander vergleichen zu können, wurden für alle Versuche jeweils in flüssigem Stickstoff schockgefrorene Aliquots mit 2×10^6 Zellen (2 ml) der gleichen Adipocytenpräparation verwendet und für alle Verfahren folgende Modifikationen vorgenommen:

- Aufgrund der Größe der Zellen wurde das gefrorene Adipocytenpellet in der zehnfachen Menge des vom jeweiligen Kit vorgegebenen Volumens an Lysepuffer lysiert.
- Um das Lysat zu homogenisieren und die genomische DNA zu scheren, wird es kurz erwärmt, kräftig geschüttelt und dann mehrfach durch eine 20-G Kanüle gesaugt.
- Das bei der Lyse freigesetzte Lipid wird durch Zentrifugation abgetrennt.

Nach der RNA-Isolierung wurden die Konzentration und die Reinheit der Proben photometrisch bestimmt (s. 3.3). Die Integrität der RNA und das Auftreten von DNA-Kontaminationen wurden mittels Gelelektrophorese (s. 3.3) vor und nach der DNase I-Behandlung (s. 3.4), sowie durch RT-PCR der Pyruvat-Dehydrogenase-mRNA überprüft (s. u.).

Im folgenden ist der Versuchsablauf einschließlich der bereits erwähnten Modifikationen dargestellt.

Protokoll

1. Isolierung humaner Adipocyten (s. 3.1.1) und Kultivierung der Zellen über Nacht (s. 3.1.2).
2. Am folgenden Tag die Zellzahl der Adipocytensuspension bestimmen (s. 3.1.3) und diese dementsprechend in Aliquots zu je 2×10^6 Zellen aufteilen.
3. Adipocyten einmal mit PBS waschen, um das Medium zu entfernen und anschließend sofort in flüssigem Stickstoff schockfrieren.
4. Gefrorenes Adipocytenpellet (2×10^6 ausdifferenzierte Adipocyten entsprechen einem Volumen von ca. 2 ml) in der zehnfachen Menge des vom jeweiligen Kit vorgegebenen Volumens an Lysepuffer aufnehmen.
5. Zellpellet kurz (ca. 2 min) in einem 37°C-Wasserbad erwärmen, bis es sich aufgelöst hat und sich die bei der Lyse freigesetzten Lipide verflüssigt haben.
6. Probenröhrchen anschließend kräftig schütteln und dann 30 s vortexen.
7. Homogenat fünfmal durch eine 20-G Kanüle saugen, um die genomische DNA zu scheren.
8. Probe 5 min bei 2500 x g zentrifugieren (Eppendorf 5810 R mit Ausschwingrotor).
9. Nach der Zentrifugation die obere ölige Phase und die dünne weiße Interphase mit einer langen 20-G Kanüle (\varnothing 0,9 mm x 70 mm) durchstechen, den wäßrigen Unterstand mit den Nukleinsäuren in die Spritze saugen und in ein frisches Röhrchen überführen.
10. Ab hier entsprechend dem Protokoll des jeweiligen RNA-Kits weiterverfahren, dabei die Volumina zusätzlicher Lösungen ggf. dem größeren Volumen des Lysates anpassen.
11. RNA in 50 μ l RNase-freiem Wasser lösen.
12. Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit (s. 3.3) mit 3 μ l RNA-Lösung 1 : 30 verdünnt.
13. 3 μ g RNA mit DNase I verdauen (s. 3.4) und zusammen mit 3 μ g unverdauter RNA elektrophoretisch auftrennen (s. 3.3).
14. Reverse Transkription (s. 3.5) von je 2 μ g RNA (einmal unverdaut, einmal Dnase I verdaut).

15. PCR des Pyruvat-Dehydrogenase-Gens (*PDH*) unter Verwendung dieser cDNAs wie folgt ansetzen und mit H₂O auf 20 ml auffüllen:
- 2,0 µl RT-Ansatz (ca. 200 ng RNA konvertiert in cDNA)
 - 2,0 µl 5 µM PDH-Vorwärtsprimer (500 nM Endkonzentration)
 - 2,0 µl 5 µM PDH-Rückwärtsprimer (500 nM Endkonzentration)
 - 2,0 µl 10 x PCR Puffer
 - 0,2 µl 5 mM dNTP-Mix (500 µM Endkonzentration)
 - 1,2 µl 25 mM MgCl₂ (1,5 mM Endkonzentration)
 - 0,2 µl 5 U / µl Taq-Polymerase (0,5 U / µl Endkonzentration)
16. 3-Schritt-PCR nach folgendem Temperaturprofil durchführen:
- 1 x 3 min 94°C
 - 30 Zyklen 40 s 94°C Denaturierung
 - 50 s 62°C Primer-„Annealing“
 - 45 s 72°C Primer-Extension
17. Den gesamten PCR-Ansatz auf einem 2 %-igem TAE-Gel auftrennen.

3.2.1.1 Differenzielle Präzipitation

Bei dieser Methode zur Isolierung von Gesamt-RNA erfolgt der Aufschluß der Zellen in einem SDS-haltigen Puffer. Daran anschließend werden die festen Bestandteile, die genomische DNA und die Proteine präzipitiert, während die RNA in Lösung bleibt. Um auch Salze aus der Lösung zu entfernen, wird die RNA danach ebenfalls gefällt, das RNA-Pellet gewaschen und wieder in Wasser aufgenommen.

Auf dieser Methode basiert der hier eingesetzte PUREscript-Kit der Fa. Biozym. Abgesehen von den unter 3.2.1 zusammengefaßten Modifikationen wurde entsprechend dem Protokoll des Herstellers verfahren, wobei die Menge der verwendeten Lösungen dem größeren Volumen des Lysates angepaßt wurden. Nachfolgend ist das Verfahren kurz zusammengefaßt:

Protokoll

1. – 9. Adipocytenlysat wie unter 3.2.1 beschrieben vorbereiten. Die Lyse der Zellen erfolgt in 3 ml (10 x 300 µl) „Cell Lysis Solution“.
- 10 a. Den wäßrigen Unterstand mit 1 ml „Protein – DNA-Precipitation Solution“ (bzw. 100 µl pro 300 µl „Cell Lysis Solution“) durch mehrfaches Umdrehen des Röhrchens vorsichtig mischen.
- 10 b. Probe 5 min im Eisbad inkubieren und dann 3 min bei 12 000 x g und 6°C zentrifugieren (10 000 rpm, Sorvall SM 24 Rotor).
- 10 c. Überstand mit 3 ml vorgelegtem Isopropanol (bzw. 100 µl pro 100 µl „Cell Lysis Solution“) durch mehrfaches (50 x) vorsichtiges Umdrehen des Röhrchens vorsichtig mischen, erneut 3 min zentrifugieren (s. o.) und Überstand dekantieren.
- 10 d. Das RNA-Pellet in 300 µl 70 %-igem Ethanol waschen, 1 min zentrifugieren (Heraeus Biofuge 13, max. Geschwindigkeit).
- 10 e. Überstand sorgfältig entfernen und Pellet 10 – 15 min lufttrocknen.
11. – 17. Nach dem Lösen des Pellets in 50 µl „RNA Hydration Solution“ RNA weiterbearbeiten wie unter 3.2.1 beschrieben.

3.2.1.2 Saure Phenol-Chloroform-Extraktion

Diese Methode zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe oder Zellen basiert darauf, daß DNA und Proteine in saurem Phenol (pH-Wert 5 - 6) löslich sind, RNA jedoch nicht.¹¹⁶ Durch Zugabe von saurem Phenol zum Zell- bzw. Gewebelysat läßt sich die RNA leicht abtrennen, da DNA und Proteine in die Phenolphase übergehen, während die RNA in der wäßrigen Phase gelöst bleibt. Unterstützt wird diese Trennung noch durch die Zugabe hydrophober Lösungsmittel wie z. B. Chloroform. Darüber hinaus werden RNasen durch den niedrigen pH-Wert inaktiviert.¹¹⁷

Das hier verwendete TRIzol[®]-Reagenz (Fa. Life Technologies) besteht aus einem Gemisch von Guanidiniumisothiocyanat und saurem Phenol. Guanidiniumisothiocyanat lysiert die Zellen und inhibiert darüber hinaus RNasen wirksam. Die Zugabe von Chloroform führt zur Trennung der hydrophoben Phenol-Chloroform-Phase (mit DNA und Proteinen) und der wäßrigen Phase mit der darin gelösten RNA.

Auch hier wurde von den unter 3.2.1 aufgeführten Modifikationen abgesehen entsprechend dem Protokoll des Herstellers verfahren, wobei die Menge der verwendeten Lösungen dem größeren Volumen des Lysates angepaßt wurden. Allerdings entfällt die unter 3.2.1 Punkt 8, angegebene Zentrifugation, da sich die freigesetzten Lipide ebenfalls im TRIzol-Reagenz lösen. Die Abtrennung der Lipide erfolgt dementsprechend gleichzeitig mit der Phasentrennung nach der Chloroform-Zugabe. Nachfolgend ist das Verfahren kurz zusammengefaßt:

Protokoll

1. – 9. Adipocytenlysat wie unter 3.2.1 beschrieben vorbereiten. Die Lyse der Zellen erfolgt in 4,0 ml TRIzol[®]-Reagenz.
- 10 a. Dem Unterstand 0,8 ml Chloroform (bzw. 0,2 ml pro 1 ml eingesetztem TRIzol) zugeben, vortexen und weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubieren.
- 10 b. Probe danach 15 min bei 12 000 x g und 6°C zentrifugieren (10 000 rpm, Sorvall SM 24 Rotor).
- 10 c. Die klare, wäßrige Phase mit einer Spritze abnehmen (s. auch 3.2.1 Punkt 9), mit 2 ml eiskaltem Isopropanol (bzw. 0,5 ml pro 1 ml eingesetztem TRIzol) vortexen.
- 10 d. RNA 45 min bei - 20°C fällen, dann erneut zentrifugieren (s.o.).
- 10 e. Überstand abgießen, das am Boden klebende Pellet mit 1 ml 75 %-igem Ethanol kurz vortexen und dann 5 min bei 7 500 x g und 6°C (8 000 rpm, Sorvall SM 24 Rotor) zentrifugieren.
- 10 f. Überstand vorsichtig dekantieren und die restlichen Tropfen ggf. mit sterilem Watteträger entfernen, um so wenig wie möglich Ethanol zurückzubehalten, da dieser die Löslichkeit der RNA in Wasser reduziert.
11. – 17. Nach dem Lösen des Pellets in 50 µl RNase-freiem Wasser, RNA, wie unter 3.2.1 beschrieben, weiterbearbeiten.

3.2.1.3 CsCl-Gradienten-Zentrifugation

Dieser Methode zur Präparation von Gesamt-RNA beruht auf dem unterschiedlichen Sedimentationsverhalten von RNA und DNA bei Ultrazentrifugation über einem Cäsiumchlorid-Gradienten (5,7 M) und wurde von Chirgwin et al. 1979 beschrieben.¹¹⁸

Der Aufschluß der Zellen erfolgt auch bei dieser Methode in Guanidiniumisothiocyanat, das sowohl die Zellen lysiert als auch freigesetzte RNasen inhibiert. Das Lysat wird durch die Zentrifugation wie folgt aufgetrennt:

Die Proteine bleiben im wäßrigen Überstand, die festen Bestandteile liegen in der Zwischenschicht von wäßriger Phase und CsCl-Lösung. Die doppelsträngige DNA sammelt sich etwa in der Mitte des CsCl-Gradienten, die einzelsträngige RNA dagegen am Boden des Zentrifugenröhrchens. Allerdings sedimentieren sehr kurze RNA-Moleküle wie tRNAs (70 – 90 Nukleotide), 5,8S- oder 5S-rRNA (ca. 120 bzw. 160 Nukleotide) nicht vollständig, sodaß es zu einer Anreicherung längerer RNA-Moleküle kommt. Die Größenverteilung der isolierten RNA entspricht in etwa der, die man bei der RNA-Isolierung mittels RNA-selektiver Membran des Rneasy Mini Kits erhält (s. 3.2.1.4).

Protokoll

1. – 9. Adipocytenlysat, wie unter 3.2.1 beschrieben, vorbereiten. Die Lyse der Zellen erfolgt in 4,0 ml GIT-Puffer (s. 2.7).
- 10 a. Für den CsCl-Gradienten 2 ml CsCl-Lösung (s. 2.7) in einem 5 ml-UZ-Röhrchen (Ultra Clear™) vorlegen und vorsichtig mit dem nach der Zentrifugation abgenommenen wäßrigen Unterstand (s. 3.2.1 Punkt 9) überschichten.
- 10 b. Ultrazentrifugation 20 Stunden bei 100 000 x g (Beckmann Ultrazentrifuge L-70, SW 65 Rotor, 38 000 rpm).
- 10 c. Ölphase, wäßrigen Überstand (Lipide und GIT-Puffer) und den größten Teil der CsCl-Lösung (mit der DNA) abpipettieren und den letzten Rest dekantieren.
- 10 d. RNA-Pellet in 2 x 100 µl RNase-freiem Wasser (aus Rneasy Mini Kit, s. 3.2.1.4) aufnehmen und mit 40 µl 3 M Natriumacetat-Lösung und 700 µl 98 %-igem Ethanol mischen.

- 10 e. RNA 30 - 45 min bei - 80°C fällen, dann 10 min bei 15 000 x g (Heraeus Biofuge 13) pelletieren und Überstand dekantieren.
- 10 f. Überstand vorsichtig dekantieren und die restlichen Tropfen ggf. mit sterilem Watteträger entfernen, um so wenig wie möglich Ethanol zurückzubehalten, da dieser die Löslichkeit der RNA in Wasser reduziert.
- 10 g. Überstand vorsichtig dekantieren und das RNA-Pellet kurz an der Luft trocknen lassen.
11. – 17. Nach dem Lösen des Pellets in 50 µl RNase-freiem Wasser, RNA weiterbearbeiten wie unter 3.2.1 beschrieben.

3.2.1.4 RNA-selektive Silikatmembran

Diese Methode nutzt die Fähigkeit von Membranen auf Silikat-Gel-Basis, Nukleinsäuren unter hohen Konzentrationen chaotroper Salze reversibel zu binden. Je nach Art der Silikatmembran und den Ionenbedingungen des verwendeten Puffers erfolgt eine selektive Bindung von RNA bzw. DNA.

Bei dem hier verwendeten Rneasy Mini Kit erfolgt die Isolierung und Reinigung der RNA mittels Zentrifugation über eine RNA-selektive Silikatmembran. Die Zellen werden in einem Guanidiniumisothiocyanat-Puffer aufgeschlossen, dem anschließend Ethanol zugegeben wird, um die entsprechenden Bedingungen für die RNA-Bindung an die Silikatmatrix zu schaffen. Das Lysat wird dann mittels Zentrifugation über die in einer Säule befindlichen Silikatmembran filtriert. Während die RNA dabei an die Silikatmatrix bindet, gelangen alle übrigen Zellbestandteile ins Filtrat und werden in den folgenden Waschschritten vollständig ausgewaschen. Die RNA wird anschließend mit Wasser oder einem „Niedrig-Salz-Puffer“ eluiert.

Bei dieser Methode werden allerdings nur RNA-Moleküle, die länger als 200 Basen lang sind, isoliert. Kleine RNAs wie tRNAs (70 – 90 Nukleotide), 5,8S- oder 5S-rRNA (ca. 120 bzw. 160 Nukleotide) binden unter den verwendeten Bedingungen nicht quantitativ. Da RNAs mit niedrigem Molekulargewicht etwa 15 - 20 % der Gesamt-RNA ausmachen, kommt es zu einer Anreicherung längerer RNA-Moleküle. Die Größenverteilung der isolierten RNA ist dabei mit der, die man durch Ultrazentrifugation über einen CsCl-Gradienten erhält, vergleichbar (s. 3.2.1.3).

Im folgenden ist das für den Vergleich der verschiedenen RNA-Isolierungstechniken (s. 3.2.1) verwendete und dementsprechend modifizierte Protokoll für den RNeasy® Mini Kit dargestellt.

Weitere Modifikationen dieses Verfahrens, die im Rahmen der Optimierung erarbeitet wurden, sind unter 3.2.2 dargestellt.

Protokoll

1. – 9. Adipocytenlysat wie unter 3.2.1 beschrieben vorbereiten. Die Lyse der Zellen erfolgt in 3,5 ml (10 x 350 µl) RLT-Lyse-Puffer.
- 10 a. Den wäßrigen Unterstand mit einem Volumen 70 %-igen Ethanols gründlich mischen und auf die Säule auftragen.
- 10 b. Säule 15 s mit 10 000 x g (Eppendorf Tischzentrifuge 5415 C) zentrifugieren, Unterstand verwerfen.
- 10 c. Beladen der Säule und Zentrifugation wiederholen, bis das gesamte Lysat über die Membran gelaufen ist (ca. 10 x).
- 10 d. Anschließend 1 x mit 700 µl RW 1-Puffer und 2 x mit 500 µl RPE-Puffer waschen. Anschließend 1 x mit 700 µl RW 1-Puffer und 2 x mit 500 µl RPE-Puffer waschen.
11. RNA mit 50 µl RNase-freiem Wasser eluieren (Zentrifugation 20 – 30 sec bei 10 000 x g, Eppendorf Tischzentrifuge 5415 C).
12. – 17. Mit der RNA, wie unter 3.2.1 beschrieben, fortfahren.

3.2.2 Optimiertes Protokoll zur Isolierung von Gesamt-RNA aus ausdifferenzierten Adipocyten

Aufbauend auf dem Vergleich der verschiedenen RNA-Isolierungsmethoden (s. 3.2.1) wurde das Protokoll des RNeasy-Mini-Kits, wie es unter 3.2.1.4 aufgeführt ist, weiter verbessert. Bei allen anschließenden Versuchen erfolgte die RNA-Isolierung entsprechend diesem unten aufgeführten, optimierten Verfahren.

Die wichtigsten Änderungen betreffen die Menge des verwendeten Lysepuffers, das Abtrennen der freigesetzten Lipide und das Volumen, in dem die isolierte RNA eluiert wird. So hat es sich als günstig erwiesen, den RLT-Lyse-Puffer im Verhältnis 2 : 1

gegenüber dem Zellvolumen der Adipocyten einzusetzen (1×10^6 Adipocyten entsprechen etwa 1 ml) und die dabei freigesetzten Lipide schon vor dem Scheren der DNA abzutrennen. Außerdem ist es vorteilhaft, die RNA nur in 30 µl RNase-freiem Wasser zu lösen, da die isolierte RNA dann in höherer Konzentration vorliegt. Dadurch kann auf das Eintrocknen der Proben vor der reversen Transkription (s. 3.5) bzw. auf die DNase-Behandlung (s. 3.4) verzichtet werden.

Eine weitere sehr günstige Modifikation ist die Verwendung des „RNase-free DNase-Kits“ (Fa. Qiagen). Er ermöglicht es, die DNase I-Behandlung zwischen den Waschschritten des Isolierungsprotokolls, während die RNA noch an die Membran der Säule gebunden ist, durchzuführen. Erfolgt die DNase I-Behandlung dagegen erst im Anschluß an die RNA-Isolierung, wird die DNase nur deaktiviert, verbleibt aber in der RNA-Lösung (s. dazu auch 3.4). Da dieser Kit jedoch anfangs nicht zur Verfügung stand, wurde nur bei einem Teil der Versuche (endogene Kontrollen (s. 4.5.1), Vergleich der Expressionsstärke (s. 4.5.2), Dosis-Wirkungskurve (s. 4.6)) der „RNase-free DNase-Kit“ verwendet.

Nachfolgend ist das optimierte Verfahren der RNA-Isolierung kurz zusammengefaßt:

Protokoll

1. Adipocytenpellet (frisch oder gefroren) in RLT-Lyse-Puffer aufnehmen (doppelte Menge des Zellvolumens) und kurz vortexen.
2. Beides im 37°C-Wasserbad erwärmen und dabei immer wieder kräftig vortexen, bis sich das Zellpellet vollständig aufgelöst hat und eine Dispersion entstanden ist.
3. Lysat 5 min bei 2500 x g und 20°C zentrifugieren (Eppendorf Zentrifuge 5810 R mit Ausschwingrotor).
4. Den wäßrigen Unterstand mit Spritze und langer 20-G Kanüle (\varnothing 0,9 mm x 70 mm) abnehmen und in ein frisches Röhrchen überführen.
5. Lysat wiederholt (10 x) durch die Kanüle in die Spritze saugen, um die genomische DNA zu scheren.
6. Homogenat im Verhältnis 1 : 1 mit 70 %-igem Ethanol mischen und dann nach und nach auf die Säule auftragen (s. auch 3.2.1.4 Punkt 3 – 5).

7. Die an die Membran der Säule gebundene RNA entweder mit 700 µl RW 1-Puffer waschen oder in diesen Waschschrift die DNase I-Behandlung gemäß dem „RNase-free DNase-Kit“ (Fa. Qiagen) einschieben.
8. Anschließend 2 x mit 500 µl RPE Puffer waschen. Beim zweiten Mal jedoch die Probe nur kurz anzentrifugieren, den Unterstand abgießen und die Säule dann 4 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren (Eppendorf Tischzentrifuge 5415 C), bis die Membran der Säule trocken ist.
9. 30 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran geben und nach 1 - 2 min die gelöste RNA abzentrifugieren (20 - 30 sec bei 10 000 x g, Eppendorf Tischzentrifuge 5415 C).

3.3 Bestimmung der RNA-Konzentration und Integritätsprüfung

Da die RNA die Grundlage für alle Untersuchungen zur Genexpression darstellt, sind Konzentration und Reinheit der RNA-Lösung sowie die Integrität der isolierten RNA von grundlegender Bedeutung.

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA erfolgt im UV-Spektrometer bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Die optischen Dichte (OD) von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg / ml doppelsträngiger DNA bzw. einer Konzentration von 40 µg / ml einzelsträngiger DNA oder RNA. Unter Berücksichtigung einer eventuellen Verdünnung wurde die Konzentration der isolierten RNA wie folgt berechnet:

$$OD_{260\text{nm}} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor} / 1000 = \mu\text{g RNA} / \mu\text{l}.$$

Zur Bestimmung der Reinheit wurde außerdem die optische Dichte (OD) bei 280 nm gemessen. Dort liegt das Absorptionsmaximum aromatischer Verbindungen (z. B. aromatische Aminosäuren, Phenol). Über den Quotienten der optischen Dichte von 260 nm und 280 nm ($OD_{260\text{nm}} / OD_{280\text{nm}}$) läßt sich eine Aussage über die Reinheit der RNA-Lösung machen. Optimal ist ein Quotient zwischen 1,9 und 2,0. Während kleinere Werte auf die Anwesenheit von Proteinen oder Kontaminationen mit Phenol hinweisen, zeigen Werte über 2,0 Salz- oder Nukleotidverunreinigungen aufgrund fortschreitender RNA-Degradierung durch RNasen an.

Aus diesem Grund erfolgt auch immer eine Überprüfung der Integrität der isolierten RNA mittels Gel-Elektrophorese. Dazu wurden 1 – 2 µl der RNA-Lösung mit 1 µl GLB-Puffer (10-fach, s. 2.7) gemischt, mit Wasser auf 10 µl aufgefüllt und auf einem nativen 1,5 %-igen TAE-Agarose-Gel (s. 2.7), (mit 0,07 µg / ml Ethidiumbromid) aufgetrennt. Die Qualität der RNA läßt sich unter UV-Licht-Bestrahlung (UV-Transluminator: 250 – 310 nm) an den zwei charakteristischen Banden der 28S und 18S rRNA abschätzen. Im Idealfall sollten Dicke und Intensität der 28S rRNA-Bande doppelt so groß sein wie die der 18S rRNA-Bande, andernfalls ist die RNA bereits teilweise degradiert. Eine Färbung im Bereich der Gelladetaschen weist darüber hinaus auf Kontaminationen mit genomischer DNA hin.

3.4 DNase I - Behandlung

Es ist wichtig, sowohl für qualitative als auch für quantitative Untersuchungen der Genexpression mittels RT-PCR sicherzustellen, daß die verwendete RNA keine DNA-Kontaminationen enthält oder diese zumindest nicht amplifiziert werden können, da dies zu falsch-positiven Ergebnissen führt. Sofern es nicht möglich ist, Primer so zu wählen, daß sie auf einem Exon-Exon Übergang liegen und damit die Amplifikation genomischer DNA verhindern, wird in der Regel vor der reversen Transkription eine DNase I-Behandlung durchgeführt, wobei einzel- und doppelsträngige DNA in Oligo-Desoxyribonukleotide gespalten wird.

Dies hat jedoch zwei Nachteile: Zum einen bleiben der Puffer, die deaktivierte DNase und das EDTA in der Lösung und werden dadurch Teil der nachfolgenden Reaktionen (Reverse Transkription, PCR), was unter Umständen nachteilig sein kann. Zwar wäre es möglich, die RNA-Lösung durch eine anschließende Fällung zu reinigen, der Verlust bei geringen RNA-Mengen ist jedoch sehr hoch.

Zum anderen erfolgt die Konzentrationsbestimmung in diesem Fall vor der DNase-Behandlung, da dies hinterher aufgrund der geringen RNA-Menge mit den zur Verfügung stehenden Geräten nicht möglich ist. Dadurch fließt der DNA-Gehalt, der von Probe zu Probe unterschiedlich ist, in das Ergebnis mit ein, wodurch der RNA-Gehalt nach der DNase-Behandlung von Probe zu Probe etwas variiert.

Die hier verwendete DNase I (Desoxiribonuclease I, Ampl. Grade) ist geeignet, um im Anschluß an die RNA-Isolierung Kontaminationen genomischer DNA aus der RNA-Lösung zu entfernen. Sie ist auf die Abwesenheit von RNase-Aktivität getestet und weist eine spezifische Aktivität von 10 000 U / mg auf.

Für die DNase I-Behandlung einer Probe wurden im allgemeinen 2 µg Gesamt-RNA verwendet. Das Volumen des Gesamtansatzes betrug 20 µl. War das benötigte Volumen der RNA-Lösung für 2 µg RNA größer als 16 µl, wurde das Volumen des Gesamtansatzes auf 25 µl erhöht und der Anteil an Puffer und DNase I entsprechend angepaßt. Wenn die RNA-Lösung jedoch sehr stark verdünnt war, wurde sie vorher im Vakuum getrocknet und die RNA in einem geringeren Volumen RNase-freiem Wassers gelöst, bevor die Reagenzien der DNase-Behandlung zugegeben wurden.

Protokoll

1. Der Ansatz erfolgte auf Eis und sah wie folgt aus:
 - 2 µg RNA, gelöst in RNase-freiem Wasser
 - 2 µl DNase I „Reaction Buffer“ (10 x)
 - 2 µl DNase I (Ampl. Grade; 1 U / µl); Endkonzentration 0,1 U / µl
 - auf 20 µl mit RNase-freiem H₂O auffüllen.
2. Probe mischen und 15 min bei Raumtemperatur inkubieren.
3. Anschließend 2 µl EDTA-Lösung zugeben, um die Reaktion zu stoppen.
4. Probe dann 10 min auf 65°C erhitzen, um die Dnase zu deaktivieren.
5. Proben danach wieder auf Eis stellen oder einfrieren.

3.5 Reverse Transkription

Die reverse Transkription (RT) ist der erste Schritt bei der Untersuchung der Genexpression mittels RT-PCR Technik. Dabei wird die isolierte RNA mit einer „Reversen Transkriptase“ in ihre komplementäre DNA-Sequenz (cDNA) konvertiert.

„Reverse Transkriptasen“ wie die MMLV-RT (für: Moloney Murine Leukaemia Virus) oder die AMV-RT (für: Avian Myeloblastosis Virus) sind DNA-Polymerasen, die RNA als Matrize verwenden. Das 3'-Ende eines Primers (Random Hexamer, Poly-(T)-Primer)

liefert dabei den Startpunkt für die Synthese des cDNA-Stranges, wobei ein RNA-DNA-Hybrid entsteht. Dieser Schritt wird auch als Einzelstrang-Synthese bezeichnet, und in der anschließenden PCR-Amplifikation dient nur der cDNA-Strang als Matrize.

Verwendet wurde die Superskript RNase H⁻, die ihre RNase H-Aktivität durch eine Punktmutation verloren hat und sich durch besondere Syntheseleistung auszeichnet. Für die reverse Transkription einer Probe wurden im allgemeinen 2 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Das Volumen des Gesamtansatzes betrug 20 µl. War das Volumen der RNA-Lösung größer als 10 µl, z. B. durch eine vorangegangenen DNase I-Behandlung, wurde die RNA vor der reversen Transkription im Vakuum getrocknet und dann in einem geringeren Volumen RNase-freiem Wasser gelöst.

Protokoll

1. 2 µg RNA, gelöst in RNase-freiem Wasser, mit 1,8 µl Random Primer (3 µM) mischen und mit Wasser auf 12 µl auffüllen. 2 µg RNA, gelöst in RNase-freiem Wasser, mit 1,8 µl Random Primer (3 µM) mischen und mit Wasser auf 12 µl auffüllen.
2. Probe 10 min auf 65°C erhitzen, dann sofort auf Eis stellen.
3. Dann folgendes zugeben:
 - 4,0 µl First Strand Buffer (5x)
 - 1 µl dNTP (je weils 10 mM); Endkonzentration 500 µM
 - 2 µl DTT (100 mM) ; Endkonzentration 10 mM
 - 0,5 µl Superscript RNase H⁻ (200 U / µl); Endkonzentration 5 U / µl
 - 0,5 µl H₂O.
4. Probe mischen und 1 h bei 37°C inkubieren.
5. Anschließend Probe 10 min auf 95°C erhitzen, um die RT zu deaktivieren.

3.6 TaqMan-Real-Time-PCR zur Quantifizierung der Genexpression

3.6.1 Prinzip der TaqMan-PCR

Diese von Lee et al.¹¹⁹ 1993 bei Applied Biosystems entwickelte Technik basiert auf der Anwendung der Polymerase Kettenreaktion (PCR) und auf dem Einsatz der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase in Verbindung mit einer fluoreszenzmarkierten Sonde. Bei der Sonde handelt es sich um ein sequenzspezifisches Oligonukleotid, das zwischen den beiden Primern an die Zielsequenz bindet und am 5'-Ende einen fluoreszierenden „Reporter“-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat) trägt. Am 3'-Ende ist die Sonde mit einem „Quencher“-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) markiert und darüber hinaus mit einem Phosphatrest blockiert, der eine Verlängerung des Sondenstrangs während der Extensionsphase verhindert.

Wird die intakte Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge (488 nm) zur Fluoreszenz angeregt, so wird die Fluoreszenz des „Reporter“-Farbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe zum „Quencher“ durch einen Fluoreszenz-Energietransfer unterdrückt, sodaß nur die Emission des „Quenchers“ meßbar ist. Während der PCR hybridisieren Primer und Sonde zunächst an den Matrizenstrang. In der Extensionsphase (Abb. 2 A) trifft die Taq-Polymerase dann auf die Sonde und beginnt sie vom Strang zu verdrängen. Dabei entsteht eine Y-förmige Sekundärstruktur (Abb. 2 B), wodurch die 5' 3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase aktiviert und die Sonde geschnitten wird (Abb. 3 C). Freie, nicht-hybridisierte Sondenmoleküle bleiben dagegen intakt.

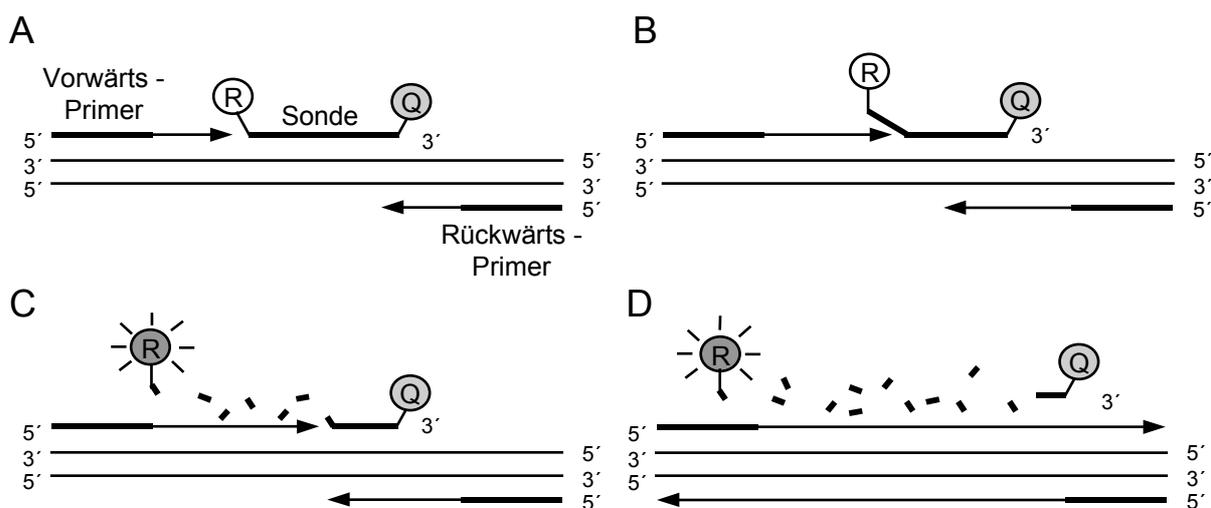


Abbildung 3: Prinzip der TaqMan-PCR. A: Primer-Extension (R = Reporter, Q = Quencher), B: Ausbildung der Y-förmigen Sekundärstruktur, C: Sondenhydrolyse, D: Abschluß der Polymerisation.

Durch die Sondenhydrolyse wird die räumliche Nähe und damit auch der Fluoreszenz-Energietransfer zwischen „Reporter“ und „Quencher“ unterbrochen. „Reporter“ und „Quencher“ fluoreszieren nun in zwei getrennten Wellenlängenbereichen. Entsprechend der Akkumulation des PCR-Produktes steigt auch die Fluoreszenz des freigesetzten „Reporters“ mit jedem Amplifikationszyklus an. Dabei führt weder die unspezifische Bindung der Primer noch die der Sonde zu einem Anstieg der „Reporter“-Fluoreszenz, da die Sondenhydrolyse nur dann erfolgt, wenn zwischen den Primern auch die Sonde bindet bzw. die Sequenz an den die Sonde bindet, während der PCR amplifiziert wird.

Mit Hilfe des GenAmp® 5700 Sequence Detection Systems von PE Biosystems wird der Anstieg des „Reporter“-Fluoreszenzsignals gemessen. Dadurch ist es möglich, den gesamten Verlauf der PCR-Reaktion darzustellen. Auf diese Weise kann die Quantifizierung des Fluoreszenzsignals verschiedener Proben unabhängig von ihrer Ausgangskonzentration zu einem Zeitpunkt erfolgen, an dem sie sich alle in der exponentiellen Phase der Amplifikation befinden.

3.6.2 Durchführung der TaqMan-PCR

Für die TaqMan-PCR wurde der „TaqMan® Universal PCR Master Mix“ von PE Biosystems verwendet. Dieser bereits optimierter Puffer enthält alle notwendigen Substanzen außer den Primern, der Sonde und der zu untersuchenden cDNA. An Stelle von dTTP wird dUTP eingesetzt. Außerdem sind noch das Enzym AmpErase UNG und der Referenzfarbstoff ROX (6-Carboxy-X-rhodamin) enthalten. Das Enzym verhindert die Reamplifikation von Kontaminationen aus vorangegangenen PCRs, indem es die Uracil-Reste aus doppelsträngiger DNA entfernt. ROX dient als interne, passive Referenz zur Normalisierung des „Reporter“-Signals während der Datenaufnahme. Dadurch können Fluoreszenzschwankungen aufgrund von Konzentrations- oder Volumenunterschieden korrigiert werden.

Unter Punkt 2.4 sind die Sequenzen der für die TaqMan Real Time PCR verwendeten Primer und Sonden angegeben. Sie wurden mit der ABIPRISM® Primer Express™ Software für die TaqMan-PCR unter Verwendung der voreingestellten Parameter ausgewählt.

Tabelle 2: Endkonzentration der für die TaqMan-Real-Time-PCR verwendeten Primer und Sonden, sowie die jeweilige Länge der amplifizierten Sequenz.

	REN	AGT	ACE	AGTR1	AGTR2	LEP
Vorwärts Primer	50 nM	900 nM	900 nM	300 nM	300 nM	50 nM
Rückwärts Primer	900 nM	300 nM				
Sonde	100 nM	130 nM	120 nM	180 nM	100 nM	250 nM
Amplifikatlänge	66 bp	73 bp	88 bp	70 bp	77 bp	77 bp
RNA-Menge (konvertiert in cDNA) pro Probe	30 ng	10 ng	20 ng	10 ng	30 ng	10 ng

Primer und Sonde (Sequenzen s. 2.4) sind dabei dicht hintereinander, mit nur wenigen Basen Zwischenraum, angeordnet, wodurch sehr kurze Amplifikate (60 – 100 bp) entstehen. Dadurch wird eine hohe Amplifikationseffizienz erzielt. Zur Optimierung der PCR wurden verschiedene Primer- (50 – 900 nM) und Sondenkonzentrationen (50 – 300 nM) getestet. Die optimalen Endkonzentrationen, bei denen ein möglichst niedriger C_T -Wert und gleichzeitig ein möglichst hoher Rn-Wert erreicht wird, sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Als endogene Kontrolle wurde die GAPDH des „Human-GAPDH-Kits“ (huGAPDH) der Firma PE Biosystems verwendet. Sie wurde den Herstellerangaben entsprechend eingesetzt. Für die GAPDH-Amplifikation wurden pro Probe 10 ng RNA (konvertiert in cDNA) eingesetzt.

Die PCR erfolgte in 25 µl-Ansätzen, wobei für die unbekanntenen Proben Vierfach- und für die Eichreihe jeweils Dreifachansätze amplifiziert wurden. Da die relative Quantifizierung über Eichkurven erfolgte, wird für beide Gene (Zielgen und endogene Kontrolle) je eine Eichreihe angelegt.

Es wurde eine 2-Schritt-PCR nach folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

	2 min	50°C	AmpErase UNG Verdau
	10 min	95°C	AmpliTaQ Gold [®] DNA-Polymerase Aktivierung
40 Zyklen:	15 sec	95°C	Denaturierung
	1 min	60°C	Primer "Annealing" und Extension

Eine Extensionstemperatur unter 72°C begünstigt die Bindung der Sonde, sodaß ihre Hydrolyse durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase effizienter verläuft.

3.6.3 Auswertung der TaqMan-PCR

In der frühen Phase der PCR ändert sich das Fluoreszenzsignal kaum. In diesem Bereich wird das Hintergrundsignal ermittelt. Als Maß für die Fluoreszenz dient der ΔR_n -Wert, der aus dem normalisierten „Reporter“-Signal (R_n) abzüglich des Hintergrundsignals berechnet wird. Der R_n -Wert entspricht dabei dem Quotienten der Emissionsintensität des „Reporter“-Farbstoffs dividiert durch die Emissionsintensität des Referenzfarbstoffes ROX. Die Normalisierung durch den Referenzfarbstoff dient dem Ausgleich unspezifischer Schwankungen, wie z.B. Konzentrationsschwankungen aufgrund von Volumenänderungen (z. B. Pipettierfehler).

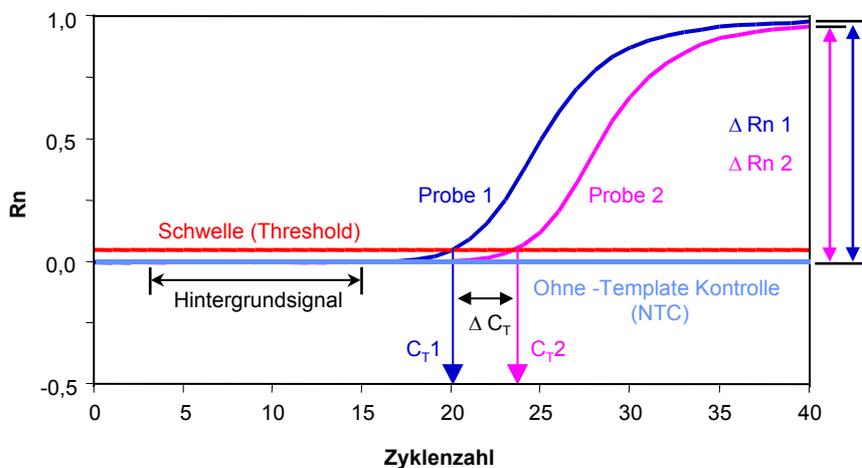


Abbildung 4: Schema eines TaqMan-Amplifikationsplot.

Die Quantifizierung der Genexpression erfolgt über den C_T -Wert (*threshold cycle*), der die Zyklenzahl ausdrückt, an dem die „Reporter“-Fluoreszenz erstmals einen bestimmten Schwellenwert (engl. threshold) oberhalb der Basislinie erreicht. Der Schwellenwert wird so gewählt, daß er die Amplifikationskurven der zu vergleichenden Proben in der exponentiellen Phase schneidet. Je höher die Ausgangskonzentration der

Zielsequenz zu Beginn der PCR ist, desto eher wird der Schwellenwert erreicht und desto niedriger ist der C_T -Wert. In der exponentiellen Phase der PCR und unter Annahme einer 100 %-igen Effizienz sollte bei einer Verdoppelung der Startkopienzahl der C_T -Wert ein Zyklus niedriger sein.

3.6.4 Relative Quantifizierung

Im Gegensatz zur „absoluten Quantifizierung“, bei der die Startkopienzahl des Standards bekannt ist, wird bei dieser Form der Quantifizierung die Expression der Zielsequenz relativ zu einem Kalibrator (Standardprobenmaterial / -gewebe) bestimmt. Dazu wird für die zu vergleichenden Proben die Ausgangsmenge der Zielsequenz aus einer Eichkurve bestimmt und dann durch die Ausgangsmenge des Kalibrators dividiert. Der Kalibrator wird dadurch zur „1 x Probe“, und die Expression der unbekanntenen Proben kann als n-facher Unterschied relativ zum Kalibrator angegeben werden.

Bei einer Quantifizierung, die über eine endogene Kontrolle normalisiert werden soll, um z. B. Konzentrationsunterschiede aufgrund von Pipettier- und Verdünnungsfehlern (z. B. bei der vorangegangenen „Reversen Transkription“) zwischen den Proben auszugleichen, kann der Zielsequenzwert einer Probe direkt durch den entsprechenden Wert der endogenen Referenz geteilt werden, sofern die Effizienz beider Amplifikationsreaktionen gleich ist. Weichen die Amplifikationseffizienzen jedoch voneinander ab, führt dies dazu, daß der bei Normalisierung gebildete Quotient mit abnehmender bzw. zunehmender Gesamt-cDNA-Menge variiert, obwohl das Verhältnis beider Gene in einer Probe unabhängig von der jeweiligen Gesamtmenge immer gleich ist. Um diesen PCR-bedingten Fehler auszugleichen, werden sowohl für die Zielsequenz (z. B. GAPDH) als auch für die endogene Referenz Eichkurven erstellt. Über die Formel der Eichgeraden (1) wird dann für jede einzelne Probe die Ausgangskonzentration der Zielsequenz und der endogenen Kontrolle berechnet (2). Die Normalisierung erfolgt durch Division der Zielsequenzwerte durch die Werte der endogenen Referenz, wobei eine einheitslose Zahl entsteht (3).

Da die Einheit wegfällt, benötigt man für die Eichkurven nur die genauen Verdünnungsstufen, nicht jedoch die genau Startkopienzahl. Daher kann für eine relative Quantifizierung eine beliebige cDNA-Lösung, in der die Zielsequenz enthalten

ist, als Standard verwendet werden. Wenn Proben verschiedener PCR-Läufe miteinander verglichen werden sollen, muß jedoch die gleiche cDNA-Stammlösung für alle Eichkurven eingesetzt werden, um vergleichbare Daten zu erhalten.

Nach der Normalisierung der Werte wird die Expression des Kalibrators mit 1 gleichgesetzt. Indem nun die normalisierten Werte der einzelnen Proben durch den normalisierten Wert des Kalibrators geteilt werden, erhält man das Expressionsmuster der Zielsequenz. Im folgenden sind die zur relativen Quantifizierung verwendeten Formeln dargestellt:

Zur Erstellung der Eichkurve wurde der C_T -Wert (y) über den Logarithmus der Ausgangskonzentration ($x = \log ng$ Gesamt-RNA) aufgetragen. Für die Eichkurve ergibt sich daher die folgende Formel:

$$(1) \quad y = m x + b \quad \text{bzw.} \\ C_T = m (\log ng) + b$$

wobei m die Steigung der Geraden und b der Schnittpunkt der Geraden mit der y -Achse ist.

Die Ausgangsmenge der Zielsequenz bzw. der endogenen Referenz wird für jede Probe wie folgt berechnet:

$$(2) \quad \log ng_{(Probe)} = \frac{(C_{T(Probe)} - b)}{m} \\ ng_{(Probe)} = 10^{\log ng_{(Probe)}}$$

Der normalisierte Wert der Zielsequenz einer Probe ($X_{N(Probe)}$) ergibt sich aus dem Mittelwert der Zielsequenz ($\overline{X_Z}$) dividiert durch den entsprechenden Mittelwert der endogenen Kontrolle ($\overline{X_K}$):

$$(3) \quad X_{N(Probe)} = \frac{\overline{X_Z}}{\overline{X_K}}$$

Die Standardabweichung des normalisierten Wertes wird über folgende Formeln berechnet:

$$(4) \quad cv_N = \sqrt{(cv_Z)^2 + (cv_K)^2}, \quad \text{wobei allgemein gilt:}$$

$$cv = \frac{s}{\bar{X}} = \frac{\text{Standardabweichung}}{\text{Mittelwert}} \quad \text{bzw.}$$

$$s = (cv) (\bar{X}) \quad \text{ist.}$$

Die Quantifizierung relativ zum Kalibrator erfolgt durch Division der normalisierten Probenwerte durch den normalisierten Kalibratorwert:

$$(5) \quad X_{N(\text{Probe})} = \frac{X_{N(\text{Probe})}}{X_{N(\text{Kalibrator})}} \quad \text{wobei}$$

$$X_{N(\text{Kalibrator})} = 1 \quad \text{ist.}$$

Die Standardabweichung der relativen Werte wird berechnet nach:

$$(6) \quad S_{\text{rel}(\text{Probe})} = \frac{S_{N(\text{Probe})}}{X_{N(\text{Kalibrator})}}$$

3.7 Auswahl einer endogenen Kontrolle

Für jede Art der Quantifizierung wird eine Bezugsgröße benötigt, durch die sich Unterschiede zwischen den einzelnen Proben (z. B. unterschiedliche Materialmengen, schwankende RT-Effizienz usw.) ausgleichen lassen. Zur Untersuchung der Genexpression werden dazu häufig endogene Kontrollen eingesetzt. Das sind Gene, die mit dem Zielgen co-exprimiert werden, aber unter den gegebenen Versuchsbedingungen selbst nicht transkriptionell reguliert werden. In der Regel werden dazu sogenannte „house-keeping“-Gene verwendet.

Jedoch gibt es in der Literatur Hinweise darauf, daß auch die relativ häufig verwendeten Gene GAPDH, β -Actin bzw. 18S rRNA unter bestimmten Umständen als endogene Kontrollen ungeeignet sind.¹²⁰⁻¹²²

Um eine endogene Kontrolle zu finden, die bei Versuchen mit humanen Adipocytten für ein möglichst weites Spektrum an unterschiedlichen Versuchsbedingungen

(z. B. hormonelle Stimulation, Adipocytendifferenzierung) geeignet ist, wurden mit Hilfe der „Human Endogenous Control Plates“ (Fa. PE Biosystems) die folgenden 11 gebräuchlichen „house-keeping“-Gene (s. u.) getestet.

Tabelle 3: Endogene Kontrollen der „Human Endogenous Control Plates“ (Fa. PE Biosystems)

Acronym	Endogene Kontrollgene
IPC	Interne Positivkontrolle (zum Test auf PCR Inhibitoren)
<i>18S</i>	18S rRNA
<i>PO</i>	„Acidic Ribosomal Protein“
<i>βAct</i>	β-Actin
<i>CYC</i>	Cyclophilin
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-Phosphat-Dehydrogenase
<i>PGK</i>	Phosphoglycerokinase
<i>β2m</i>	β ₂ -Microglobulin
<i>GUS</i>	β-Glucuronidase
<i>HPRT</i>	Hypoxantin-Ribosyl-Transferase
<i>TBP</i>	Transcriptionsfaktor IID, TATA-Bindungsprotein
<i>TfR</i>	Transferrin Rezeptor

Es wurde dazu die Wirkung von sechs verschiedenen Hormonen (100 µM Hydrocortison, 1 µM Insulin, 1 µM 17-β-Estradiol, 1 µM 3,3'-5-Triiodo-L-Thyronin (T₃), 10 µM Angiotensin II und 100 µM TNF α sowie der Einfluß der Adipocytendifferenzierung auf die Expression der 11 verschiedenen endogenen Kontrollgene untersucht. Zusätzlich dazu wird eine interne Positivkontrolle (IPC), die der Detektion von eventuell vorhandenen PCR-Inhibitoren dient, amplifiziert. Es handelt sich dabei um ein bereits vorgelegtes künstliches „Template“ definierter Konzentration. In Anwesenheit von PCR-Inhibitoren weicht der C_T-Wert einer Probe deutlich von den übrigen Proben ab.

Da pro Platte nur vier verschiedene Proben aufgetragen werden können, wurden die zu untersuchenden Proben wie folgt aufgeteilt und die Expression untereinander verglichen:

Tabelle 4: Untersuchte Stimuli auf die Genexpression der verschiedenen endogenen Kontrollen.

	Platte 1	Platte 2	Platte 3
Kalibrator	Unbehandelte Adipocyten nach 12 h	Unbehandelte Adipocyten nach 12 h	undifferenzierte Präadipocyten
Probe 1	Hydrocortison behandelte Adipocyten nach 12 h	Insulin behandelte Adipocyten nach 12 h	teildifferenzierte Präadipocyten nach 6 Tagen
Probe 2	17- β -Estradiol behandelte Adipocyten nach 12 h	T ₃ behandelte Adipocyten nach 12 h	teildifferenzierte Präadipocyten nach 11 Tagen
Probe 3	Angiotensin II behandelte Adipocyten nach 12 h	TNF α behandelte Adipocyten nach 12 h	ausdifferenzierte Adipocyten

Protokoll

1. Ausdifferenzierte humane Adipocyten isolieren (s. 3.1.1), kultivieren (s. 3.1.2) und mit den oben genannten Hormonen über 12 h behandeln (s. 3.9).
2. RNA isolieren (s. 3.2.2) und je 2 μ g in cDNA umschreiben (s. 3.5).
3. Reaktionsansatz und PCR entsprechend dem Protokoll des Herstellers.

Die Amplifikation erfolgt in einer „96-well“-Platte, auf der Primer und Sonden für alle Amplifikationen (8 „wells“ pro Gen) bereits vorgelegt worden sind. Die „wells“ der Positivkontrolle (IPC) enthalten zusätzlich das entsprechende „Template“. Der Reaktionsmix mit der cDNA des Kalibrators bzw. einer der drei Proben wird auf je zwei Reihen (24 „wells“) aufgeteilt, so daß pro Gen und Probe Doppelansätze amplifiziert werden. Jeder Reaktionsansatz enthielt 2 μ g Gesamt-RNA (konvertiert in cDNA), das sind ca. 75 ng pro „well“.

Der Vergleich der Genexpression zwischen Kalibrator und Probe erfolgt über die Berechnung des ΔC_T -Wertes (s. Abbildung 4) der Probe. Dieser wird durch Subtraktion wie folgt bestimmt:

$$\Delta C_T (\text{Probe}) = \text{Mittelwert-}C_T (\text{Kalibrator}) - \text{Mittelwert-}C_T (\text{Probe})$$

Das Ergebnis ist ein ΔC_T -Wert, der größer oder kleiner ist als der des Kalibrators. Proben mit einem positiven ΔC_T -Wert haben eine höhere Ausgangskonzentration als der Kalibrator, während Proben mit einem negativen ΔC_T -Wert eine niedrigere Ausgangskonzentration besitzen. Dabei entspricht eine C_T -Wert Differenz von einem Zyklus ($\Delta C_T = \pm 1$) einem zweifachen Unterschied in der Anfangskonzentration (siehe

dazu auch 3.5.5). Die relative Veränderung der Genexpression (X_{rel}) gegenüber dem Kalibrator läßt sich aus folgender Formel bestimmen:

$$X_{\text{rel}} = 2^{-\Delta C_T}$$

So entsprechen dann z. B. Werte von 2 oder 4 einer Verdopplung bzw. Vervierfachung der Expression gegenüber dem Kalibrator, während Werte um 0,5 eine Halbierung und um 0,25 eine Verringerung auf 25 % Genexpression bedeuten.

3.8 Stimulationsexperimente

Zur Untersuchung des hormonellen Einflusses auf die Regulation der Genexpression ausdifferenzierter Adipocyten wurden die Zellen mit jeder der folgenden Substanzen behandelt: Hydrocortison (100 μM), Insulin (1 μM), 17- β -Estradiol (1 μM), 3,3'-5-Triiodo-L-Thyronin (T_3 ; 1 μM) und Angiotensin II (1 μM). Als Lösungsmittel diente Wasser oder 98 %-iger unvergällter Ethanol (Hydrocortison, 17- β -Estradiol)

Um den zeitlichen Verlauf im Falle einer Veränderung der Genexpression verfolgen zu können, wurden Zellen aus zwei parallelen Ansätzen nach 0, 4, 6, 8, 10, 12, 14 und 24 Stunden eingefroren. Die Adipocyten des einen Ansatzes blieben unbehandelt, die anderen erhielten eine der oben aufgeführten Substanzen bzw. Ethanol (Lösungsmittelkontrolle). Anschließend wurde die Gesamt-RNA (s. 3.2.2) isoliert und ihre Qualität überprüft (s. 3.3). Zur Quantifizierung der Genexpression wurden ein Teil der RNA in cDNA umgeschrieben (s. 3.5) und im GeneAmp 5700 mit der TaqMan-Real-Time-PCR Technik untersucht (s. 3.6).

Insgesamt wurde für jedes der drei ausgewählten Gene (*AGT*, *ACE* und *AGTR1*) die Genexpression unbehandelter Adipocyten nach 0, 4, 8, 10, 12 und 24 h quantifiziert und mit der Expression behandelter Zellen (jeweils eine der fünf oben aufgeführten Substanzen oder Ethanol) verglichen. Da nur sechs Proben parallel quantifiziert werden können, wurden die 6- und 14-Stunden-Proben nicht verwendet. Darüber hinaus wurde für die Gene *REN* und *AGTR2* die Veränderung der Genexpression nach 24-stündiger Stimulation mit oben genannten Substanzen bestimmt.

Um die Veränderung der Genexpression in Abhängigkeit von der Dosis (Dosis-Wirkungskurve) verfolgen zu können, wurden Adipocyten mit verschiedenen Konzentrationen (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM, 100 µM) der jeweiligen Substanz stimuliert und mit unstimulierten Zellen verglichen. Die Inkubationsdauer entsprach dabei dem Zeitraum, bei dem sich im Zeitverlauf die größte Änderung gezeigt hatte.

Protokoll

1. Beginn des Experimentes 12 bis 16 Stunden nach der Isolierung (s. 3.1.2).
2. Adipocytenkultur 5 min bei 200 x g abzentrifugieren (Eppendorf 5810 R mit Ausschwingrotor).
3. Ölschicht auf den Zellen und Medienunterstand absaugen.
4. Adipocyten in frischem Adipocytenmedium (s. 2.7) durch gleichmäßiges, nicht zu starkes Rühren auf einem Magnetrührer resuspendieren (ca. 1,5 Vol. Zellen auf 1 Vol. Medium).
5. Aliquots abnehmen und Zellzahl bestimmen (s. 3.1.3)
6. Die Inkubation erfolgte in 50 ml-Gewebekulturflaschen mit mindestens 2×10^6 Zellen (dies entspricht ca. 1 ml Adipocyten ohne Medium) und in einem Gesamtvolumen von 9 ml pro Ansatz.
7. Zellsuspension dementsprechend auf die Gewebekulturflaschen verteilen und mit Adipocytenmedium auf 8,5 ml auffüllen.
8. 2 Stunden Vorinkubation im Brutschrank (s. 3.1.2), damit sich die Adipocyten vom Streß des Rührens und Aliquotierens erholen können.
9. Anschließend pro Ansatz 0,5 ml Adipocytenmedium mit bzw. ohne stimulierende Substanz zugeben.
10. Nach Ablauf der Inkubationszeit Adipocyten abzentrifugieren (s. o.).
11. Medium unter der Zellschicht ggf. mit einer Spritze vorsichtig absaugen und in flüssigem Stickstoff schockfrieren, oder Medium verwerfen.
12. Adipocyten in 5 ml PBS-Puffer resuspendieren, um das Medium auszuwaschen (kann die RNA-Isolation stören) und nochmals zentrifugieren (s. o.).
13. Ölschicht auf den Zellen ggf. entfernen und Unterstand absaugen.
14. Adipocyten in flüssigem Stickstoff schockfrieren und bis zur RNA-Isolierung bei -80°C lagern.
15. Qualitätskontrolle s. 3.3.

16. 2 µg der RNA-Lösung für den DNase-Verdau (s. 3.4) einsetzen und anschließend eine reverse Transkription (s. 3.5) durchführen.
17. TaqMan-Real-Time-PCR für die Gene *AGT*, *ACE* und *AGTR1* (unbehandelte und behandelte Proben nach 0, 4, 8, 10, 12 und 24 h) bzw. *REN* und *AGTR2* (nur 24 h-Proben) sowie für die Proben der Dosis-Wirkungsversuche.

3.9 Indirekte Immunfluoreszenz und konfokale Mikroskopie

Mittels indirekter Immunfluoreszenz in Verbindung mit der konfokalen Mikroskopie ist es u. a. möglich, an fixierten Zellen zu untersuchen, ob die hormonelle Stimulation der Genexpression auch zu einer Veränderung der Proteinexpression führt. Der immunologische Nachweis des Proteins erfolgt über zwei Antikörper. Der erste Antikörper bindet spezifisch an das antigene Epitop des nachzuweisenden Proteins. Der sekundäre Antikörper erkennt dagegen konstante Bereiche des ersten Antikörpers und ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt.

Die konfokale Mikroskopie¹²³ beruht auf dem von Marvin Minsky entwickelten und 1961 patentierten „zweifach fokussierendem Objekt-Raster-Mikroskop“. Im Gegensatz zur normalen Auflichtmikroskopie, bei der das gesamte Präparat gleichmäßig ausgeleuchtet wird, wird bei einem konfokalen Mikroskop nur ein winziger Fleck hell erleuchtet, um das Entstehen von Streulicht weitgehend zu vermindern. Da aber die Bereiche ober- und unterhalb der Zielebene ebenfalls Licht direkt zurückwerfen oder diffus streuen, wird das reflektierte Licht durch eine auf die Zielebene abgestimmte Lochblende auf den Detektor geleitet, wodurch die meisten der nicht aus der Schärfenebene kommenden Strahlen abgeschirmt werden und eine hohe Tiefenschärfe erzielt wird (s. Abb. 5). Das Abtasten des Objektes im Rasterverfahren ermöglicht schließlich die Wiedergabe einer kompletten Schnittebene.

Das hier verwendete Gerät MCR 1024 der Fa. Bio-Rad verfügt über einen Argon-Crypton-Laser, der Licht der Wellenlängen 488 nm, 568 nm und 643 nm emittiert. Zum Nachweis des Angiotensin II-Rezeptors Typ 1 wurde der Antikörper AT₁ (N-10) der Fa. Santa Cruz verwendet, der an die Aminosäuren 15 – 24 des aminoterminalen Endes des humanen Angiotensin II-Rezeptors Typ 1 bindet und keine Kreuzreaktivität mit dem Angiotensin II-Rezeptor Typ 2 aufweist. Die Anregung des hier eingesetzten Cy-2-

konjugierte Sekundärantikörper (Fa. Dianova) erfolgte bei einer Wellenlänge von 488 nm. Die Intensität des emittierten Lichts (522 nm) wird dann vom Bildverarbeitungssystem des Konfokalmikroskopes in eine Farbskala übertragen, die von schwarz (Intensität = 0), über blau (niedrige Intensität), grün, gelb bis rot (hohe Intensität) reicht. Zur Quantifizierung der Rezeptorexpression wurden mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware „MCR 1024 Laser Scanning Confocal Imaging Software“ (Fa. Bio-Rad) die Immunfluoreszenzintensitäten von jeweils 20 Adipocyten pro Gruppe bestimmt und miteinander verglichen.

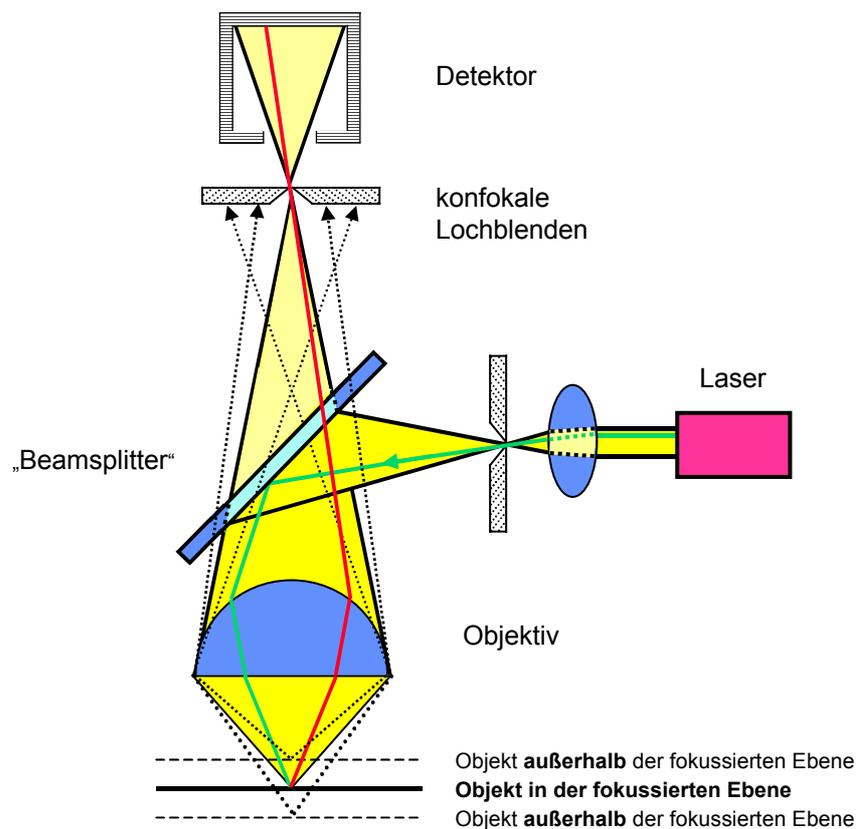


Abbildung 5: Prinzip der konfokalen Mikroskopie.

Protokoll

a) Fixierung:

1. Stimulation der Adipocyten wie unter 3.8 beschrieben über einen Zeitraum von 1 bzw. 3 Tagen.
2. Vor Entnahme der Zellen eine 4 %-ige Paraformaldehyd-Lösung frisch ansetzen. Dazu Paraformaldehyd mit PBS mischen, im Wasserbad auf ca. 90°C erhitzen, bis es sich löst und auf Raumtemperatur abkühlen lassen.

3. Adipocytenkultur einmal in 5 ml PBS waschen (s. 3.8) und 300 µl-Aliquots der Suspension in die Deckglaskammern überführen (je Zeitwert zwei Aliquots der stimulierten bzw. unstimulierten Adipocyten sowie zusätzlich zwei Aliquots der unstimulierten Adipocyten (24 h) als Negativkontrolle)
4. In der Deckglaskammer den PBS-Unterstand vorsichtig entfernen und die Zellen in der frisch angesetzten 4 %-igen Paraformaldehyd-Lösung 10 min fixieren.
5. Anschließend den Paraformaldehyd-Unterstand wieder abpipettieren und die Adipocyten erneut in PBS waschen.
6. Nach dem Entfernen des PBS die Zellen in eiskaltem 80 %-igen Methanol resuspendieren und darin 20 min bei -20°C inkubieren.
7. Nachdem der Methanol-Unterstand wieder vorsichtig entfernt wurde, die Präparate kurze Zeit lufttrocknen und dann bei -20°C lagern.

b) Immunfluoreszenz

1. Fixierte Adipocyten 1 h mit einer 1,5 %-igen, frisch angesetzten BSA-Lösung bei Raumtemperatur inkubieren, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren und anschließend die Zellen mit PBS waschen.
2. Adipocyten über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper (AT₁ (N-10), 1 µg / µl) inkubieren und erneut mit PBS waschen.
3. Zellen dann 1 ½ h bei Raumtemperatur mit dem Cy-2-konjugierten Sekundärantikörper (1 : 180 verdünnt) inkubieren und danach wieder mit PBS waschen.
4. Adipocyten mit „Aqua-Poly / Mount“ eindecken und die Präparate über Nacht aushärten lassen.
5. Auswertung der Präparate mittels konfokaler Mikroskopie und Speicherung der Bilder von 20 Zellen zur Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten.
6. Zur Quantifizierung der Rezeptorexpression wird mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware die Fluoreszenzintensität pro Fläche von 20 Adipocyten pro Gruppe bestimmt.

3.10 Datenverarbeitung und Statistik

Die Berechnungen der Ergebnisse von Zellzahlbestimmung und TaqMan-RT-PCR erfolgten in EXCEL 7.0 (Microsoft). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Softwarepaket SPSS für Windows, Version 9.0. Alle in die Auswertung einbezogenen Variablen waren normalverteilt (Kolmogorov-Smirnov-Test), sodaß die Angaben stets als Mittelwerte \pm Standardabweichung erfolgen. Im Experiment zur Zellzahlbestimmung wurden die Ergebnisse der einzelnen Verdünnungen zur Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson und zur Berechnung der Regressionsgeraden verwendet. Die Intergruppenvergleiche erfolgten mittels einfaktorieller ANOVA und anschließend multiplern t-Test für mehr als zwei unabhängige Stichproben nach Bonferroni. Als signifikant wurde bei allen Tests ein $p < 0,05$ angesehen. Wenn keine p-Werte angegeben werden, bestehen keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

4 Ergebnisse

4.1 Bestimmung der Zellzahl in Adipocytensuspensionskulturen mit dem R/S 1000

Mit der modifizierten Form des R/S 1000, welches ursprünglich zur halbautomatischen Bestimmung von Urinsediment konzipiert wurde, gelang es, eine einfach reproduzierbare Methode zur Bestimmung der Zellzahl ausdifferenzierter Adipocyten in Suspensionskulturen zu entwickeln.

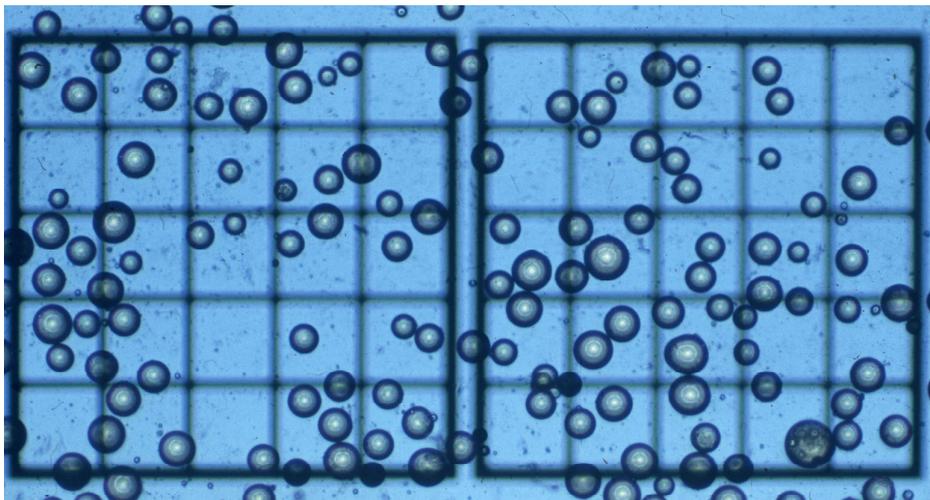


Abbildung 6: Zellsuspension humaner Adipocyten ($1,1 \times 10^5$ Zellen / ml) verteilt über zwei Gitter der Durchflußzählkammer des R/S 1000. Methyleneblau-Färbung, 40-fache Vergrößerung.

Abbildung 6 zeigt einen Ausschnitt der Durchflußzählkammer mit zwei der vier Zählgitter während eines Zählvorganges, bei dem Adipocyten unterschiedlicher Größe gleichmäßig in der Kammer und über die Gitter verteilt sind. Anhand der Seitenlänge eines Kästchens ($283 \mu\text{m}$) läßt sich dabei auch die besondere Größe mancher Adipocyten abschätzen. Obwohl die mit Methyleneblau gefärbten Zellkerne bei dieser Vergrößerung nicht genau zu erkennen sind, lassen sich Adipocyten eindeutig von Fetttropfen zu unterscheiden (z. B. rechtes Gitter, fünfte Reihe, viertes Kästchen). Die Zellzahl variiert zwischen den insgesamt vier Gittern nur gering. Der Fehler liegt bei etwa 7 %. Dies zeigt, daß die Zellen während des Einsaugens in die Durchflußkammer suspendiert bleiben, was bei Verwendung einer Pipette nicht der Fall war. Eine Zelldichte von 40 bis 80 Zellen pro Gitter ließ sich leicht und schnell auszählen. Insgesamt wurden pro Durchgang dazu nicht mehr als 3 Minuten benötigt. Eine geringere Zellzahl zeigte häufig größere Unterschiede in der Verteilung, sowohl über die

Gitter (> 10 %), als auch bei wiederholten Zählungen (> 20 %). Dagegen ließen sich mehr als 200 Zellen pro Gitter schlecht zählen, da die Zellen dann sehr dicht und z. T. übereinander lagen.

Die Reinigung des Apparates mit isotonischer Kochsalzlösung zwischen den einzelnen Durchgängen ist einfach und schnell durchzuführen. Außerdem blockiert eine Sicherheitsschaltung das Ansaugen eines weiteren Aliquots aus der Zellsuspension solange, bis die Zählkammer mindestens einmal mit der Reinigungslösung durchgespült worden ist. Dies verhindert, daß Zellen des vorangegangenen Durchgangs mitgezählt werden. Das vom Hersteller mitgelieferte Reinigungsenzym (Urizym[®]) ist besonders wirksam bei der Entfernung von Lipidresten aus der Kammer und den Zuleitungsschläuchen, was mit der isotonischen Kochsalzlösung allein nicht immer gelang. An Stelle der Zellsuspension in die Zählkammer eingesaugt, ließen sich mit der „Urizym“-Lösung auch gelegentlich anhaftende Adipocyten ohne lange Einwirkzeit (max. 30 sec) entfernen, sodaß bei jedem Zählvorgang stets eine saubere und zellfreie Durchflußkammer vorlag.

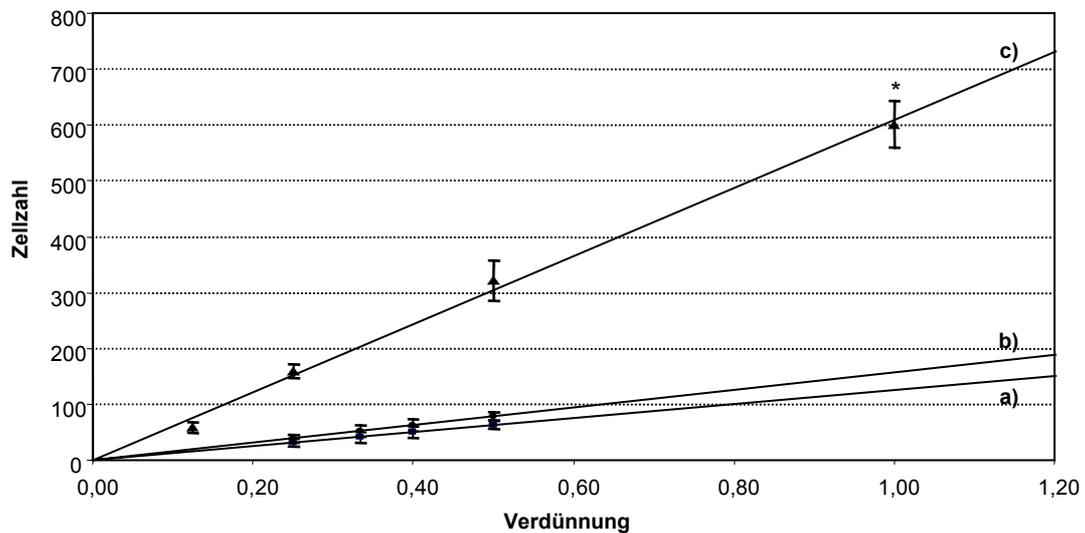


Abbildung 7: Zellzahl in Abhängigkeit von der Verdünnung. Angegeben sind für drei unabhängige Experimente Mittelwerte \pm Standardabweichung; $n = 6$ bzw. $n = 3$ (*); die Korrelationskoeffizienten (nach Pearson) sind $R = 1,000$ (a, b) bzw. $R = 0,998$ (c), das Bestimmtheitsmaß der Regressionsgeraden $R^2 = 0,999$ (a), $R^2 = 0,997$ (b) bzw. $R^2 = 0,996$ (c) und die Signifikanzniveaus $p < 0,001$ (a, b) bzw. $p = 0,002$ (c)

Abbildung 7 zeigt die Zellzahlbestimmung einer Adipocytensuspension in Abhängigkeit von ihrer Verdünnung für drei unabhängige Versuche mit unterschiedlicher Ausgangszellzahl, wobei jede Zählung sechsmal wiederholt wurde. Bei allen drei Versuchen sind die Abweichungen der Mittelwerte von den Regressionsgeraden sehr gering. So liegen die Korrelationskoeffizienten (berechnet nach Pearson) bei 0,998 bzw. 1,000 mit einem Signifikanzniveau von mindestens 0,002. Die Intraassay-Variabilität, ermittelt aus sechs aufeinanderfolgenden Zählungen einer Probe, liegt bei den hier dargestellten Versuchen durchschnittlich bei 15 %. Sie ist jedoch stark von der Verdünnungsstufe und der Homogenität der Adipocytensuspension abhängig und steigt mit zunehmender Verdünnung an. Die Interassay-Variabilität liegt mit 16 % in der gleichen Größenordnung und hängt ebenfalls entscheidend von der Homogenität der Adipocytensuspension ab. So wird durch kontinuierliches Rühren (Magnetrührer) in einem schmalen Gefäß mit ebenem Boden eine gleichmäßigere Suspension erreicht als durch Verwendung eines Vortexgerätes. Die Intraassay-Variabilität lag hier bei 11 % (Magnetrührer) gegenüber 18 % (Vortexer).

4.2 Bestimmung der Vitalität ausdifferenzierter Adipocyten in einer Suspensionskultur

Die Kernfärbung mittels Acridinorange ist eine gut geeignete Methode zur Bestimmung der Vitalität bei ausdifferenzierten Adipocyten, da sie einfach und mit geringem Zeitaufwand (ca. 30 min) durchzuführen ist. Wie die nachfolgende Abbildung zeigt, leuchten die diskusförmigen Zellkerne der mit Acridinorange gefärbten Adipocyten unter Blauanregung grün bis orangerot. Die Färbung der Kerne ist selbst dann gut zu erkennen, wenn die Kerne vom Betrachter aus gesehen, auf oder unter der großen Lipidvakuole liegen (z. B. Abb. 8: grüner Kern unten links [A]; oder orangefarbene Kerne obere Mitte [B] bzw. der beiden großen Zellen unten [C]).

Um den kontinuierlichen Farbübergang vom Grün vitaler Kerne über das Gelb und Orange absterbender Zellen bis zum Rot der Zellkerne toter Adipocyten zu demonstrieren, wurden die Zellen erst ca. 2 Stunden nach Entnahme aus dem Brutschrank und der Färbung fotografiert. Daher ist hier der Anteil der gelb bis orangefarbenen Zellkerne wesentlich höher als bei frisch entnommenen Zellen und nicht repräsentativ für die Vitalität der in den Experimenten eingesetzten Adipocytenkulturen.

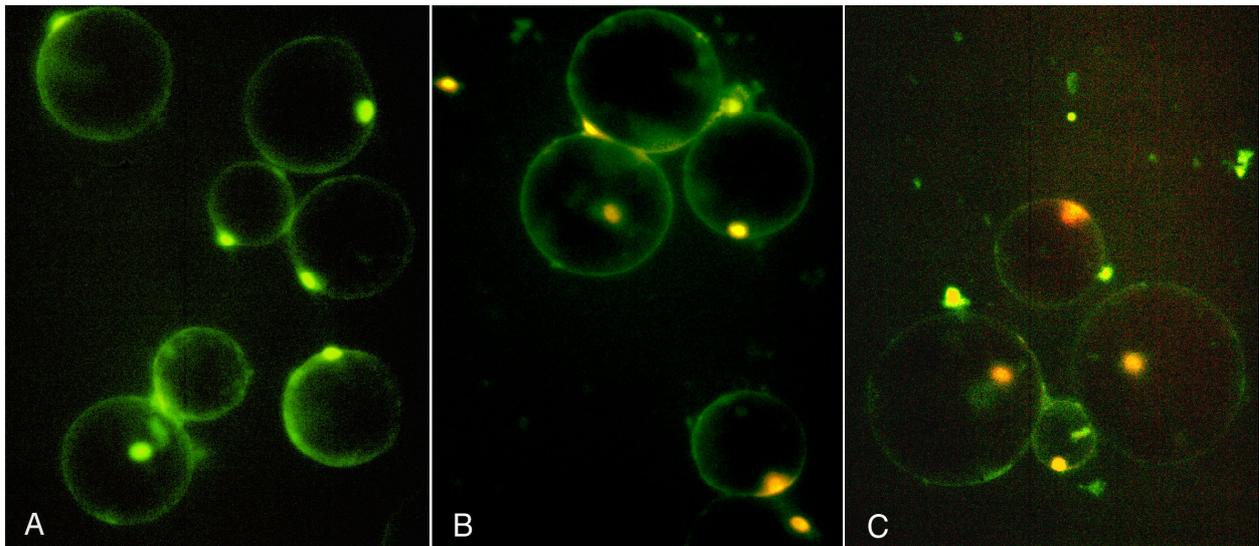


Abbildung 8: Vitalfärbung ausdifferenzierter Adipocyten mit Acridinorange. A: vitale Adipocyten mit grünen Zellkernen; B: Adipocyten mit nachlassender Vitalität (Zellkerne gelb-orange); C: Absterbende Adipocyten mit orange bis roten Zellkernen. 20-fache Vergrößerung.

Die Adipocyten in Abbildung 8 A sind vital, ihre Zellkerne leuchten hellgrün. Die Vitalität der Zellen im oberen Teil der Abbildung 8 B (oben) lässt dagegen bereits nach (gelb Kerne oben), während im unteren Teil bereits zwei absterbende Zellen mit orangefarbenen Zellkernen zu erkennen sind. In Abbildung 8 C ist die Vitalität dagegen nur noch sehr gering. Neben einer Zelle mit nachlassender Vitalität (gelber Kern, ganz unten) und zwei absterbenden Adipocyten (rechts und links darüber), ist hier auch der leuchtend rote Zellkern einer toten Zelle zu erkennen (oberste Zelle). Bemerkenswert ist auch die Beobachtung vereinzelter „zelloser“ Zellkerne (orangefarbener „Kern“ links oben [B] bzw. gelber „Kern“ Mitte links [C]). Die Ursache dafür ist wahrscheinlich eine starke mechanische Beanspruchung während des Mikroskopierens oder beim Auflegen des Deckglases, die zur Auflösung von Zellwand und Vakuole führt. Dafür spricht auch,

daß die beobachteten „zelloseren“ Kerne nicht nur orange und rot, sondern gelegentlich auch grün waren.

Zur Bestimmung der Vitalitätsrate der in den Experimenten verwendeten Kulturen wurden jeweils dreimal 200 der gefärbten Zellen mit dem R/S 1000 gezählt und der Anteil vitaler Zellen berechnet. Der Mittelwert aus drei Zählungen reichte in der Regel aus, um die Vitalitätsrate einer Adipocytensuspension verlässlich zu ermitteln. Der Fehler lag dabei unter 5 %. Die Ergebnisse unterscheiden sich von den hier gezeigten Bildern insofern, als daß die Zellkerne fast ausschließlich grün und die Kerne der wenigen nicht vitalen Zellen orange oder rot waren. Gelbe oder gelborange Kerne wurden kaum beobachtet. Auch „zelloseren“ Kerne traten sehr selten auf, was auf eine insgesamt hohe Vitalität der Primärkulturen hinweist.

4.3 Überprüfung der Isolierungs- und Kultivierungsbedingungen

Die Zellzahlbestimmung im Anschluß an die Adipocytisolierung (s. 3.1) ergab, daß pro Gramm Fettgewebe durchschnittlich $3,8 \pm 0,7 \times 10^5$ Zellen isoliert wurden. Die Ausbeute schwankte um etwa 20 %, wobei zu bedenken ist, daß das untersuchte Fettgewebe von Patientinnen unterschiedlichsten Alters und Körpergewichtes stammt. Insbesondere der Anteil und die Festigkeit des Bindegewebes beeinflussten das Ergebnis der Isolation deutlich. Eine direkte Beziehung der Zellzahl zu Alter und Gewicht konnte nicht beobachtet werden, aber in der Regel waren Anteil und Festigkeit des Bindegewebes bei älteren und adipösen Patientinnen verringert.

Im Verlauf der Kultivierung nahm die Zellzahl erwartungsgemäß ab (s. 3.1.5). In den ersten 12 – 16 Stunden nach der Isolierung war der Verlust an Adipocytan mit über 30 % am größten. In den folgenden fünf Tagen war der Zellverlust wesentlich geringer und lag bei ca. 15 % pro Tag. Daher wurden alle Versuche erst am Tag nach der Isolierung begonnen und bei den Stimulationsversuchen erfolgte die Zugabe der jeweiligen Substanz erst 2 Stunden nach dem Aliquotieren der Adipocytan (s. 3.8 Protokoll). Die Vitalitätsrate während der Kultivierung war gleichbleibend hoch und lag sowohl bei unstimulierten als auch bei stimulierten Adipocytankulturen zwischen 92 % und 97 %. Auch wurde die Zellzahl durch keine der für die Stimulationsversuche (s. 3.8) verwendeten Substanzen beeinflusst.

4.4 RNA-Isolierung

Wie aus Tabelle 5 und Abbildung 9 hervorgeht, konnte unter Verwendung der hier beschriebenen Modifikationen (s. 3.2.1) mit allen vier Methoden Gesamt-RNA aus ausdifferenzierten Adipocyten isoliert werden. Alle RNAs waren intakt, aber nur die der CsCl-Methode war frei von DNA-Kontaminationen (s. a. Abb. 9). Für 2×10^6 Zellen lag die Ausbeute an RNA zwischen 12 μg und 20 μg . Gemessen am Quotienten aus $\text{OD}_{260 \text{ nm}} / \text{OD}_{280 \text{ nm}}$ wurde die größte Reinheit in bezug auf Proteine, Salze und ggf. Phenol mit der RNA-selektiven Membran erreicht. In der reinen Arbeitszeit (45 - 65 min) unterschieden sich die vier Methoden kaum, jedoch war der Zeitaufwand insgesamt bei der CsCl-Methode durch die 20-stündige Ultrazentrifugation deutlich größer.

Tabelle 5: Vergleich der verschiedenen Methoden zur Isolierung von Gesamt-RNA aus ausdifferenzierten Adipocyten.

Methode	Differentielle Präzipitation	Saure Phenol-Chloroform Extraktion	CsCl Gradienten-Zentrifugation	RNA-selektive Membran
RNA Gesamtmenge in μg ¹	12,6 \pm 7,9	19,6 \pm 3,9	12,4 \pm 0,9	13,7 \pm 4,8
DNA Kontamination	++	++	-	+
Quotient aus $\text{OD}_{260 \text{ nm}} / \text{OD}_{280 \text{ nm}}$ ¹	1,50 \pm 0,08	1,58 \pm 0,04	1,62 \pm 0,04	1,98 \pm 0,09
Zeitaufwand insgesamt ²	2 h	2 h	21 h	55 min
Arbeitszeit ²	65 min	45 min	60 min	45 min
Anzahl der Proben ³	3	6	6	9

1) Daten entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung. Die Messung der UV-Absorption erfolgte vor der DNase I Behandlung.

2) Zeitaufwand insgesamt und Arbeitszeit beziehen sich auf jeweils drei parallel bearbeitete Proben.

3) Die Anzahl der Proben war durch die von den Herstellern zur Verfügung gestellten Lösungen limitiert.

Die etwas geringeren RNA-Mengen (s. Tab. 5) beruhen bei der Verwendung der RNA-selektiven Membran und der CsCl-Methode wahrscheinlich darauf, daß bei beiden Methoden sehr kleine RNA-Moleküle (unter 200 bp wie tRNAs, 5.8S oder 5S rRNA) verloren gehen (s. 3.2.1.3 bzw. 3.2.1.4), was bei der Phenol-Chloroform-Methode nicht der Fall ist. Dagegen ist bei der differentiellen Präzipitation die geringere Ausbeute

möglicherweise darauf zurückzuführen, daß sich das RNA-Pellet am Ende nur sehr schlecht lösen ließ.

In der RT-PCR (s. Abb. 10), die an den DNase-Verdau anschloß, wurde bei allen vier RNA-Präparationsmethoden das 102 bp lange RT-PCR Produkt der *PDH*-mRNA amplifiziert. Amplifikationsprodukte genomischer DNA (185 bp) entstanden jedoch weder bei den DNase behandelten RNAs noch bei den unbehandelten RNAs, die mit der CsCl-Methode isoliert wurden.

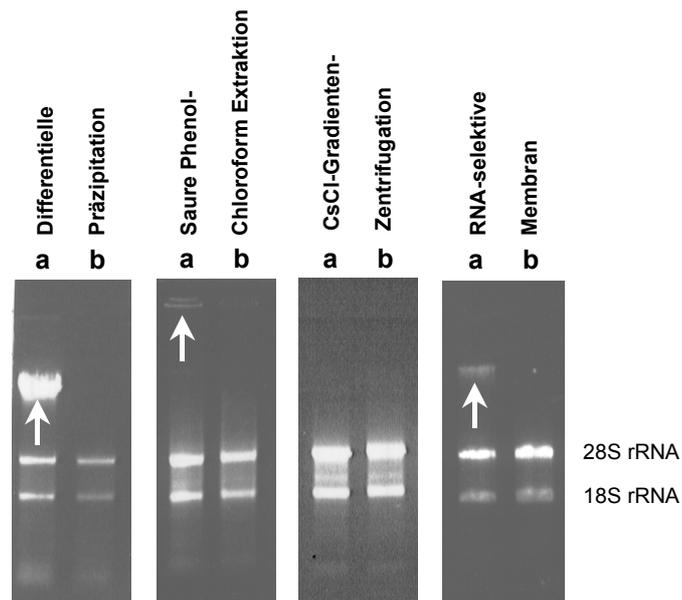


Abbildung 9: Gelelektrophorese der isolierten RNA. Es wurden jeweils 3 µg Gesamt-RNA (a) vor bzw. (b) nach der DNase I-Behandlung aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Zu sehen sind die 18S- und 28S-rRNA-Banden und die DNA-Kontaminationen (Pfeile).

Zur Quantifizierung der Genexpression in isolierten Adipocyten sind somit alle hier getesteten Methoden prinzipiell geeignet. Mit Ausnahme der in bezug auf Zeit und Geräte leider sehr aufwendigen CsCl-Methode ist allerdings zusätzlich eine DNase I-Behandlung der isolierten RNA erforderlich. In der unter 3.2.2 beschriebenen, optimierten RNA-Isolierungsmethode erfolgt diese bereits während der Isolierung, sodaß man bei einem geringfügig höheren Zeitaufwand (75 min statt 55 min) sehr reine, DNA-freie RNA erhält.

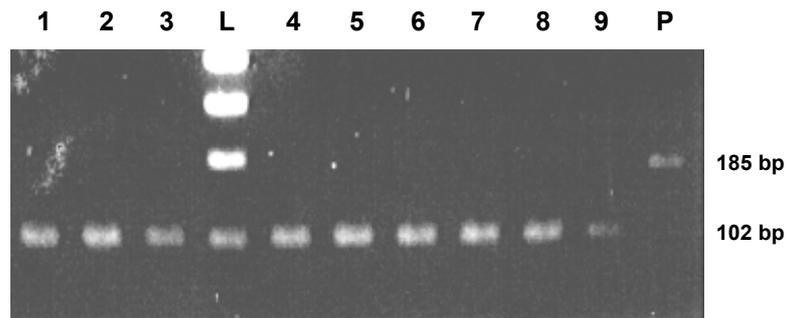


Abbildung 10: RT-PCR-Produkte der Pyruvat-Dehydrogenase Amplifikation. PDH-mRNA (102 bp), genomische PDH-DNA (185 bp). 1-3: Amplifikation nach DNase I-Verdau; 1) Saure Phenol-Chloroform-Extraktion, 2) RNA-selektive Membran, 3) Differentielle Präzipitation, L: 100-bp-Leiter; 4-9: Amplifikation verschiedener Proben der CsCl-Gradienten-Zentrifugation ohne vorherigen DNase I-Verdau, P: Positivkontrolle für DNA-Kontaminationen (genomische DNA humaner Leukozyten).

4.5 TaqMan-PCR

4.5.1 Auswahl der endogenen Kontrolle

Nachfolgend sind die Einflüsse hormoneller Stimulation (Abb. 11 A+B) bzw. der *in vitro* Differenzierung (Abb. 11) auf die Genexpression potentieller endogener Kontrollen dargestellt. Zur Verdeutlichung der Veränderungen wurden hierzu die ΔC_T -Werte (s. 3.7 und Abbildung 4) entsprechend der Formel $X_{rel} = 2^{\Delta C_T}$ in den relativen Unterschied der Probe (s. Tabelle 4) zu ihrem jeweiligen Kalibrator umgerechnet. Ein ΔC_T -Wert von + 1 entspricht dabei einer Verdopplung der mRNA-Konzentration gegenüber dem Kalibrator, während bei einem ΔC_T -Wert von - 1 nur die Hälfte der Ausgangskonzentration vorlag.

Die geringen Abweichungen bei den internen Positivkontrollen (ΔC_T -Werte zwischen - 0,01 und - 0,3) zeigen, daß keine der Proben PCR-Inhibitoren enthielt (s. 3.7). Die detektierten Unterschiede zwischen Probe und Kalibrator sind daher nicht auf variierende Amplifikationseffizienzen sondern auf unterschiedliche Ausgangskonzentrationen des jeweiligen Zielgens zurückzuführen. Da Pipettierfehler durch den Referenzfarbstoff schon während der Messung ausgeglichen werden, beruhen somit die Unterschiede in den Ausgangsmengen auf Veränderungen der Expression des jeweiligen Gens.

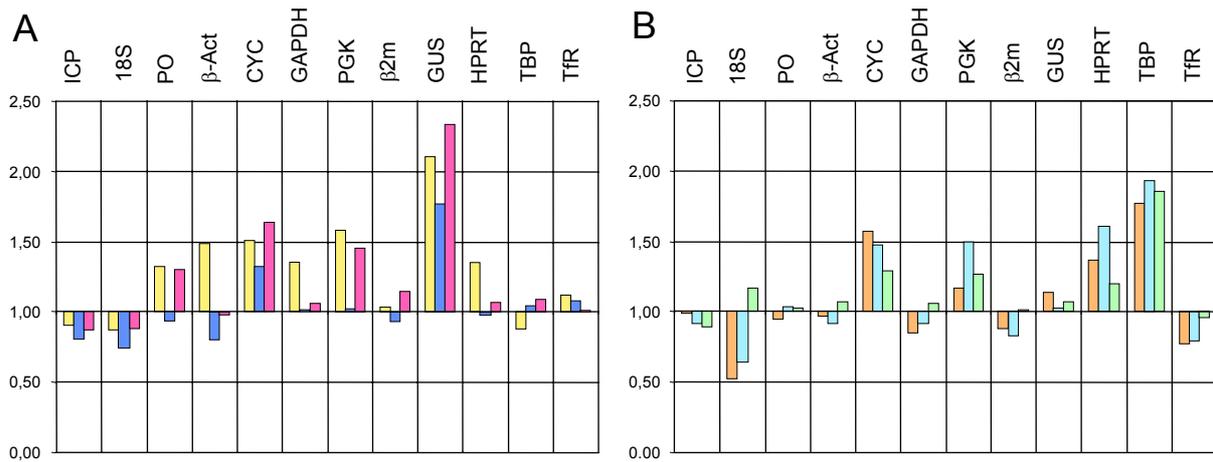


Abbildung 11: Relative Veränderungen der Genexpression ausdifferenzierter Adipocyten nach 12-stündiger hormoneller Stimulation bezogen auf unstimulierte Adipocyten (Kalibrator). A: Insulin (1 μ M) \square , 17- β -Estradiol (1 μ M) \square oder Angiotensin II \square bzw. B: Hydrocortison (100 μ M) \square , Triiodo-L-Thyronin (1 μ M) \square oder TNF α (100 nM) \square .

Wie in Abbildungen 11 A+B dargestellt, führt bei ausdifferenzierten Adipocyten die Stimulation mit Insulin bzw. Angiotensin II bei *GUS* zu einer Transkriptionsverdopplung ($\Delta C_T > 1$). Unter Hydrocortison-, Triiodo-L-Thyronin-, TNF α - bzw. 17- β -Estradiol-Stimulation wird dagegen zwar bei *TBP* (ΔC_T 0,82 - 0,95), *18S* ($\Delta C_T = -0,92$) bzw. *GUS* ($\Delta C_T = 0,82$) eine deutliche Veränderung der Genexpression gemessen, eine Verdoppelung (*TBP*, *GUS*) bzw. Halbierung (*18S*) wird jedoch nicht ganz erreicht. Ob dies auf eine Veränderung der Transkription zurückzuführen ist, kann jedoch mit der TaqMan-Methode nicht sicher bestimmt werden. Bei allen anderen potentiellen endogenen Kontrollen sind die gemessenen Veränderungen gering. Die ΔC_T -Werte liegen unter $\pm 0,5$ (*PO*, *β Ac*, *GAPDH*, *β 2m*, *TfR*) bzw. $\pm 0,75$ (*CYC*, *PGK*, *HPRT*).

Im Verlauf der Differenzierung und im Vergleich von Präadipocyten und ausdifferenzierten Adipocyten sind vier Gene transkriptionell deutlich verändert (Abb. 12). Neben dem sehr starken Anstieg der Genexpression von *GUS* ($\Delta C_T > 1,33$) sinkt bei *PO*, *β Ac* und *β 2m* im Vergleich zu undifferenzierten Präadipocyten die Genexpression während der Differenzierung auf weniger als die Hälfte ($\Delta C_T > -1,17$) bzw. bei *HPRT* auf knapp die Hälfte ($\Delta C_T = -0,83$) der Expression. Bei allen anderen Genen bleibt die Transkription während der Differenzierung unbeeinflusst ($\Delta C_T < \pm 0,6$).

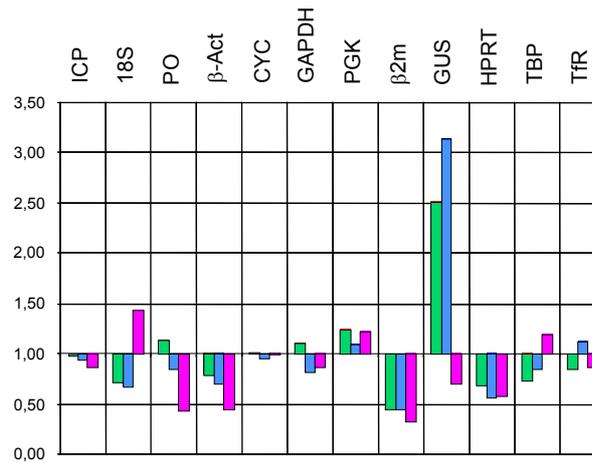


Abbildung 12: Relative Veränderungen der Genexpression während der Adipocytendifferenzierung bezogen auf undifferenzierte Präadipozyten (Kalibrator). Präadipozyten nach 6 ■ bzw. 11 ■ Tagen und ausdifferenzierte Adipozyten ■.

Die geringsten Schwankungen über das gesamte Spektrum der untersuchten Einflüsse (hormonelle Stimulation und Differenzierungsgrad) treten bei *GAPDH* und *TfR* (s. a. Tabelle 3) auf. Die ΔC_T -Werte liegen durchgehend unter $\pm 0,5$ und damit noch im Bereich methodisch bedingter Schwankungen. Bei allen anderen untersuchten potentiellen endogenen Kontrollen traten dagegen z. T. deutliche Unterschiede im Vergleich zum jeweiligen Kalibrator auf, wenn auch wie z. B. bei *CYC* und *PGK* keine Verdopplung bzw. Halbierung erreicht wird ($\Delta C_T < 0,71$).

In weiteren Versuchen konnte bestätigt werden, daß die *GAPDH* zur Untersuchung der Genexpression hormonell stimulierter Adipozyten als endogene Kontrolle geeignet ist. So liegen die ΔC_T -Werte der *GAPDH* auch nach 24-stündiger Stimulation mit Hydrocortison (100 μM), Insulin (1 μM), (1 μM), 3,3'-5-Triiodo-L-Thyronin, (T_3 ; 1 μM) oder Angiotensin II (10 μM) zwischen - 0,24 und 0,12 und schwanken auch im Verlauf der Stimulation nur wenig (Ergebnisse nicht gezeigt).

4.5.2 Relative Expressionsstärke der Gene des Renin-Angiotensin-Systems in ausdifferenzierten Adipocyten

Mit der TaqMan-PCR gelang es, von den Genen des Renin-Angiotensin-Systems nicht nur die Genexpression des Angiotensinogens (*AGT*), des Angiotensin-Converting-Enzyms (*ACE*) und des Angiotensin II-Rezeptors Typ 1 (*AGTR1*) (s. 1.3) in ausdifferenzierten Adipocyten nachzuweisen, sondern jetzt auch die des Renins (*REN*) und des Angiotensin II-Rezeptors Typ 2 (*AGTR2*). Dabei zeigte sich, daß zwischen den einzelnen Genen z. T. große Unterschiede in der Stärke der Genexpression bestehen. Dies ist im folgenden exemplarisch dargestellt.

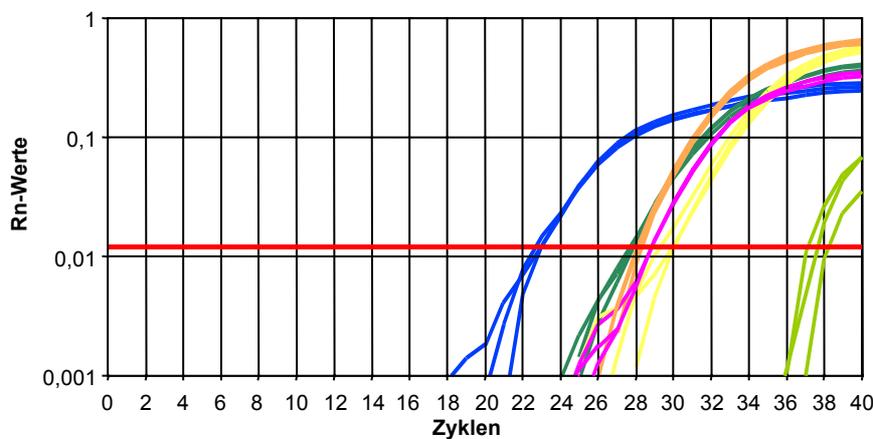


Abbildung 13: Exemplarischer TaqMan Plot der RAS-Gene in unstimulierten humanen Adipocyten. Genexpression von ■ Leptin, ■ Renin, ■ Angiotensinogen, ■ Angiotensin-Converting-Enzym, ■ Angiotensin II Typ 1-Rezeptor und ■ Angiotensin II Typ 2-Rezeptor.

So zeigt Abbildung 13 die Amplifikationskurven der verschiedenen RAS-Gene und des ausschließlich in Fettzellen exprimierten Leptingens in ausdifferenzierten humanen Adipocyten. Die Amplifikation erfolgte gleichzeitig für alle Gene, mit gleichen Mengen einer cDNA-Probe, die aus Adipocyten dreier schlanker Patientinnen unterschiedlichen Alters gepoolt wurde.

Die Darstellung des Amplifikationsverlaufes gibt bereits einen Überblick über das Expressionsverhältnis der einzelnen untersuchten Gene zueinander. So beginnt die Amplifikation der fettzellspezifischen Leptin-cDNA deutlich früher als die aller RAS-Gene und die des Angiotensin II-Rezeptor Typ 2-Gens erheblich später als bei allen anderen. Dagegen liegen die Amplifikationskurven von *AGT* und *AGTR1* sehr dicht beieinander. Über die C_T -Wert-Differenzen lassen sich diese Unterschiede in relative Expressionsunterschiede der einzelnen Gene zueinander ausdrücken. Da die

Steigungen der Amplifikationskurven (s. Abb. 13) bei den verschiedenen Genen jedoch aufgrund unterschiedlicher Amplifikationseffizienzen verschieden ist, variieren auch die ΔC_T -Werte je nach Lage des „Threshold“ (siehe z. B. die sich überkreuzenden Kurven von *AGTR1* und *AGT* in Abb. 13). Um diese Unterschiede auszugleichen, wurde hier die Expression der Gene bei verschiedenen cDNA-Konzentrationen gemessen und die mittlere C_T -Wert-Differenz berechnet. Die sich daraus ergebenden relativen Expressionsunterschiede sind in Tabelle 6 exemplarisch für Adipocyten einer Gruppe schlanker Patientinnen dargestellt.

Tabelle 6: Relative Genexpression der RAS-Gene und des Leptingens in humanen Adipocyten.

Kalibrator- gen	Expressionsverhältnis zum Kalibratorgen					
	<i>AGT</i>	<i>REN</i>	<i>ACE</i>	<i>AGTR1</i>	<i>AGTR2</i>	<i>LEP</i>
<i>AGT</i>	1	3 x weniger	1/3 x weniger	1/3 x mehr	720 x weniger	39 x mehr
<i>REN</i>	3 x mehr	1	2 x mehr	4 x mehr	235 x weniger	120 x mehr
<i>ACE</i>	1/3 x mehr	2 x weniger	1	2 x mehr	470 x weniger	60 x mehr
<i>AGTR1</i>	1/3 x weniger	4x weniger	2 x weniger	1	960 x weniger	29 x mehr
<i>AGTR2</i>	720 x mehr	235 x mehr	470 x mehr	960 x mehr	1	27 x mehr
<i>LEP</i>	39 x weniger	120 x weniger	60 x weniger	29 x weniger	27 000 x weniger	1

Insgesamt sind in ausdifferenzierten Adipocyten schlanker Patientinnen alle RAS-Gene wesentlich schwächer exprimiert als das fettzellspezifische Leptingen. So ist die Genexpression des Leptins ca. 40 mal höher als die des *AGTs* und sogar mehr als 27 000 mal stärker als die des Angiotensin II-Rezeptors Typ 2. Im Vergleich dazu sind die Unterschiede zwischen den RAS-Genen *AGT*, *AGTR1* und *ACE* relativ gering. Rund 1000-fach geringer als die des Angiotensin II-Rezeptors Typ 1 ist jedoch die Genexpression des anderen Angiotensin II-Rezeptorsubtyps *AGTR2*.

4.6 Stimulationsexperimente

Die Inkubation ausdifferenzierter Adipocyten mit 100 μM Hydrocortison resultiert in einem zeitabhängigen Anstieg der Genexpression des AT_1 -Rezeptors (Abb. 14 C). Während die mRNA-Menge der stimulierten Zellen nach 8 Stunden bereits doppelt so hoch ist, wird nach 24 Stunden beinahe eine Vervierfachung der Genexpression im Vergleich zu den unstimulierten Adipocyten erreicht. Das zum Lösen des Hydrocortisons verwendete Ethanol hatte dagegen keinen Einfluß auf die Genexpression.

Wie Abbildung 15 zeigt, ist die Wirkung des Hydrocortisons dabei von der eingesetzten Dosis abhängig. So wird bereits bei einer Konzentration von 1 μM Hydrocortison eine Genexpressionsverdopplung erzielt. Bei 10 μM Hydrocortison ist das Maximum nahezu erreicht, da die 10-fache Dosis nur noch eine geringe Genexpressionssteigerung bewirkt.

Auf die Expression der anderen RAS-Gene *AGT*, *ACE* und *REN* hat Hydrocortison keinen Effekt (s. Abbildung 14 und Abbildung 16). Auch keines der anderen Hormone (Insulin, 17- β -Estradiol, 3,3',5-Triiodo-L-Thyronin oder Angiotensin II) beeinflusst bei ausdifferenzierten Adipocyten die Genexpression des Angiotensinogens (*AGT*), des Angiotensin-Converting-Enzyms (*ACE*), des Angiotensin II-Rezeptors Typ 1 (*AGTR1*) (Abb. 14) oder des Renins (Abbildung 16).

Die Quantifizierung der Genexpression des Angiotensin II-Rezeptors Typ 2 erwies sich aufgrund des sehr geringen Expressionsniveaus (s. Tabelle 6 bzw. Abbildung 13) selbst mit der TaqMan-Methode als ausgesprochen schwierig. Die C_T -Werte schwankten z. T. sehr stark, sodaß die Expressionsverdopplung durch Hydrocortison bzw. 3,3',5-Triiodo-L-Thyronin nicht in allen Experimenten nachweisbar war.

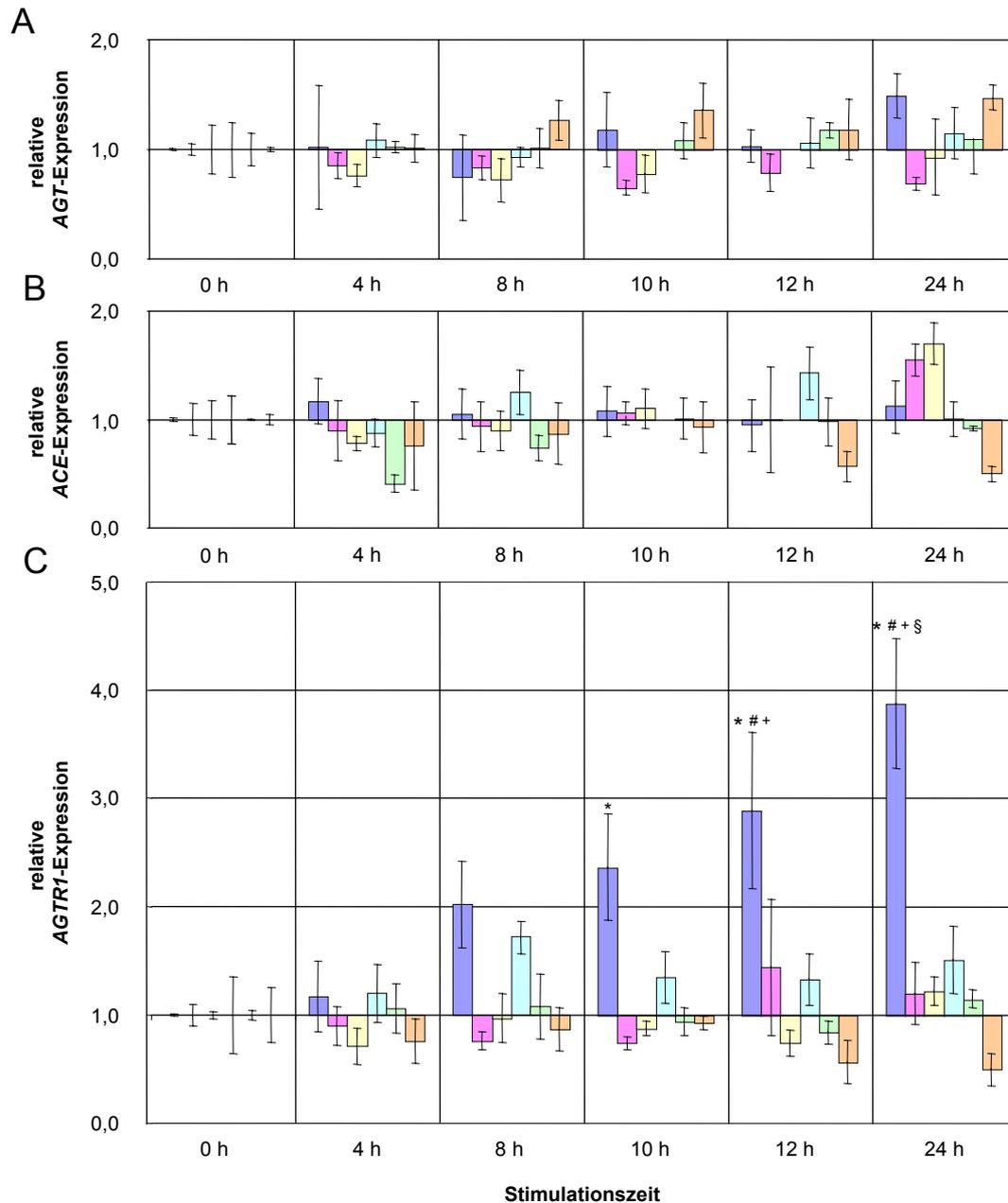


Abbildung 14: Relative AGT-, ACE- bzw. AGTR1-Genexpression ausdifferenzierter Adipocyten während 24-stündiger Stimulation bezogen auf die Genexpression unstimulierter Adipocyten des entsprechenden Zeitpunktes. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung; $n = 4$; ■ Hydrocortison (100 μM), ■ Insulin (1 μM), ■ 17- β -Estradiol (1 μM), ■ Triiodo-L-Thyronin (1 μM), ■ Angiotensin II (1 μM) oder ■ Ethanol (Lösemittelkontrolle). Der Vergleich zwischen den einzelnen Zeitpunkten erfolgte mittels ANOVA und nachfolgendem multiplen t-Test nach Bonferroni. * $p < 0,05$ vs. 0 h, # $p < 0,05$ vs. 4 h, + $p < 0,05$ vs. 8 h, § $p < 0,05$ vs. 10 h.

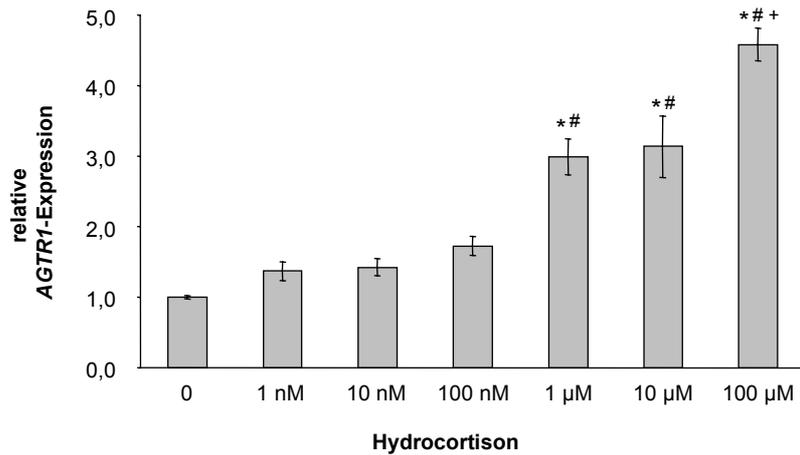


Abbildung 15: Dosis-Wirkungskurve der AGTR1-Expression ausdifferenzierter humaner Adipocyten nach 24-stündiger Stimulation mit Hydrocortison. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung der normalisierten Genexpression relativ zur unstimulierten Kontrolle. $n = 3$. Der Vergleich zwischen den Dosisgruppen erfolgte mittels ANOVA und nachfolgendem multiplen t-Test nach Bonferroni. * $p < 0,05$ vs. unstimulierte Adipocyten; # $p < 0,05$ vs. 1 nM, 10 nM, 100 nM, 100 μ M Hydrocortison; + $p < 0,05$ vs. alle anderen Hydrocortisonkonzentrationen.

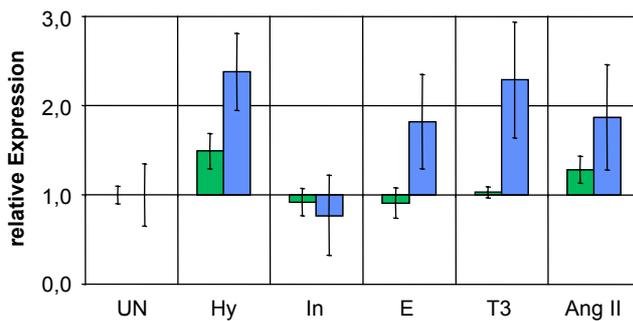


Abbildung 16: Relative REN- bzw. AGTR2-Expression nach 24 Stunden bezogen auf unstimulierte Adipocyten (Kalibrator). Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung; $n = 4$; UN (unstimuliert), Hy (100 μ M Hydrocortison), In (1 μ M Insulin), E (1 μ M 17- β -Estradiol), T3 (1 μ M Triiodo-L-Thyronin), Ang II (1 μ M Angiotensin II).

4.7 Anstieg der AT₁-Rezeptorzahl unter Hydrocortisonstimulation

Die indirekte Immunfluoreszenzmarkierung des Angiotensin II-Rezeptors Typ 1 an ausdifferenzierten humanen Adipocyten zeigt, daß die Zellen auch im unstimulierten Zustand eine deutlich erkennbare AT₁-Rezeptorexpression in der Zellmembran und auch im Bereich des Zellkerns aufweisen (Abb. 17 A, Bild 1). Nach 24-stündiger Hydrocortisonstimulation ist die AT₁-Rezeptorzahl noch unverändert (Abb. 17 A, Bild 1 + 2). Nach drei Tagen ist die Rezeptordichte in der Zellmembran und im Kern deutlich

erhöht (Abb. 17 A, Bild 4). Die Immunfluoreszenzintensität, berechnet aus je 20 fixierten Adipocyten pro Gruppe, ist bei den unstimulierten Adipocyten (Tag 1 und 3) sowie bei den Hydrocortison (100 μ M) stimulierten Adipocyten (Tag 1) nahezu gleich. Nach 3-tägiger Inkubation ist die Immunfluoreszenzintensität der stimulierten Adipocyten jedoch mehr als doppelt so hoch (Abb. 17 B).

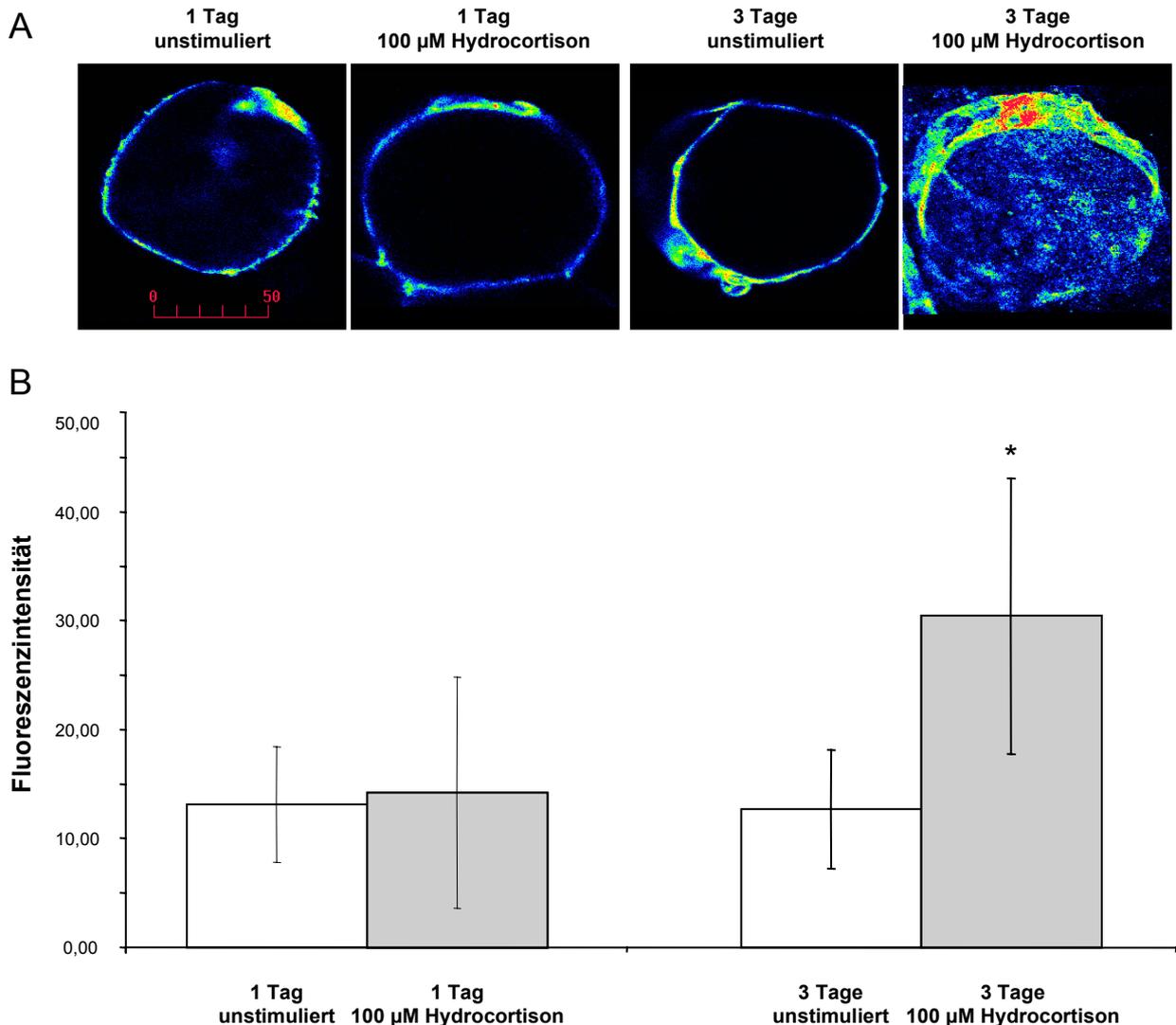


Abbildung 17: Indirekte Immunfluoreszenzdetektion des AT1-Rezeptors in ausdifferenzierten humanen Adipocyten nach 1 bzw. 3-tägiger Stimulation mit Hydrocortison. A : Konfokalmikroskopische Bilder repräsentativer Zellen. B : Immunfluoreszenzintensitäten unstimulierter und stimulierter (100 μ M Hydro-cortison) Adipocyten nach 1 bzw. 3 Tagen Inkubation. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung der Immunfluoreszenzintensität von je 20 fixierten Zellen pro Gruppe. Der Vergleich zwischen den Dosisgruppen erfolgte mittels ANOVA und nachfolgendem multiplen t-Test nach Bonferroni. * $p < 0,001$ vs. unstimulierte Adipocyten (Tag 1 und 3) und stimulierte Adipocyten (Tag 1).

5 Diskussion

5.1 Etablierung eines *in vitro* Systems zur Durchführung von Genexpressionsuntersuchungen an primären humanen Adipocyten

5.1.1 Zellzahlbestimmung in Suspensionskulturen ausdifferenzierter Adipocyten

Obwohl Methoden zur Isolierung und *in vitro* Kultivierung von ausdifferenzierten Adipocyten seit längerem bekannt sind,¹¹²⁻¹¹⁴ werden zur Untersuchung der Vorgänge im Fettgewebe meistens *in vitro* differenzierte Präadipocyten bevorzugt. Der Hauptgrund dafür ist sicherlich, daß sich die Kultivierung ausdifferenzierter Adipocyten vor allem aufgrund ihrer Größe und des hohen Lipidgehaltes als technisch sehr schwierig erwiesen hat (s. 1.3). Insbesondere mit dem Problem der Zellzahlbestimmung haben sich bereits verschiedene Autoren beschäftigt, da zur Durchführung quantitativer Experimente oder zur Standardisierung der Kultivierungs- und Versuchsbedingungen die genaue Kenntnis der Zellzahl unerlässlich ist. Bei der Verwendung konventioneller Zählgeräte (z. B. Coulter Counter) besteht jedoch die Schwierigkeit, daß diese nicht zwischen Fettzellen und Fetttropfen gleicher Größe unterscheiden können, was zeitaufwendige Fixierungsverfahren (z. B. mit TCA-Glutaraldehyd oder Osmiumtetroxid) notwendig macht.¹²⁴ Aber auch die von Fine und DiGirolamo¹²⁵ beschriebene Methode, bei der die Zelldichte einer Adipocytensuspension indirekt über den Lipocritgehalt und die mikroskopische Bestimmung des mittleren Zelldurchmessers und Zellvolumens erfolgt, ist nicht weniger aufwendig.

Mit dem R/S 1000, das ursprünglich zur Bestimmung von Urinsedimenten konzipiert wurde, steht nun ein einfaches Verfahren zur routinemäßigen Bestimmung der Zellzahl in Adipocytensuspensionskulturen zur Verfügung.¹²⁶ Der Apparat ist einfach zu bedienen und bedarf nur geringfügiger Modifikationen an der Durchflußzählkammer (Höhe, Gittergröße). Die Ergebnisse sind besonders im Hinblick auf die Problematik von Adipocytensuspensionskulturen (Größe, lipidbedingter Auftrieb etc.) gut reproduzierbar. So liegt die Intraassay-Variabilität in den hier gezeigten Versuchen bei 15 %. Mit zunehmender Routine in der Handhabung des Gerätes und insbesondere bei der Suspendierung der Adipocyten sank der Fehler auf etwa 10 % (Daten nicht gezeigt). Die Verteilung der Adipocyten innerhalb der Zählkammer variiert nur wenig. Auch hier wurde die Abweichung mit zunehmender Routine geringer (< 5 %). Im Gegensatz zur Entmischung der Suspension in der Pipette und der daraus resultierenden

Ungleichverteilung in einer herkömmlichen Zählkammer (s. 1.3) zeigen diese Ergebnisse, daß beim R/S 1000 die Suspension auch während des Einsaugens in die Durchflußzählkammer erhalten bleibt. Ebenso wie bei der Intraassay-Variabilität hängt die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse paralleler Ansätze hauptsächlich von der Güte der Suspendierung beim Abnehmen des Zellaliquots und während des Ansaugens der Adipocyten in die Zählkammer ab. Die Verwendung von Magnetrührer und Gefäßen mit flachem Boden erwies sich hierzu als am Besten geeignet, so daß sich auch die Interassay-Variabilität von zunächst 16 % auf 10 % senken ließ.

Unter Verwendung des hier angegebenen Protokolls (s. 3.1.3) und einer Zelldichte von etwa 40 – 80 Zellen pro Gitter sind im Allgemeinen drei Wiederholung der Zellzahlbestimmung ausreichend, um die Zellzahl einer Adipocytensuspension verlässlich zu bestimmen. Dafür werden nicht mehr als ca. 10 Minuten benötigt, da das Ansaugen und Ausspülen der Zellsuspension in Sekunden erfolgt. Die für wiederholte Messungen benötigte Zeit ist somit, verglichen mit konventionellen Methoden, sehr gering. Inklusive der Vorbereitungen (suspendieren und aliquotieren der Proben) liegt der Zeitaufwand bei etwa 15 Minuten, so daß sich diese Technik sehr gut zur routinemäßigen Zellzahlbestimmung von Adipocytensuspensionskulturen eignet. Die automatische Bedienung der Durchflußzählkammer reduziert jedoch nicht nur die Dauer der Zellzahlbestimmung deutlich, auch die Reinigung des Apparates ist einfach und schnell, und wird durch das mitgelieferte Enzymgemisch zusätzlich unterstützt. Vorteilhaft ist auch die Sicherheitsschaltung, die verhindert, daß Zellen der vorangegangenen Messung mitgezählt werden, indem sie das Ansaugen einer zweiten Probe so lange blockiert, bis die Kammer mindestens einmal mit Reinigungslösung durchgespült worden ist.

Prinzipiell kann das R/S 1000 auch bei anderen Zellarten zur Zellzahlbestimmung verwendet werden. Da die meisten Zellen (Hepatocyten, Fibroblasten usw.) jedoch wesentlich kleiner sind als Adipocyten, empfiehlt sich hierzu der Einsatz der kleineren Standarddurchflußkammer mit einer Höhe von 100 µm statt 250 µm (modifizierte Kammer). Beide Varianten der Durchflußkammer sind sowohl für die Phasen-Kontrast-Mikroskopie als auch für die Verwendung von polarisiertem Licht geeignet. In Kombination mit entsprechenden Färbetechniken ist es außerdem möglich, die Anzahl vitaler Zellen in einer Primärkultur oder die Häufigkeit eines Zelltyps in einer Mischkultur

routinemäßig zu bestimmen. Somit steht mit dem R/S 1000 insgesamt ein einfaches, schnell zu bedienendes und vielseitig verwendbares System zur Verfügung.¹²⁶

5.1.2 Vitalitätsbestimmung in Suspensionskulturen ausdifferenzierter Adipocyten

Zur Standardisierung der Kultivierungs- und Versuchsbedingungen ist jedoch nicht nur die Kenntnis der genauen Zellzahl notwendig. Es muß auch sichergestellt werden können, daß die Vitalität der Kultur unter den gegebenen Bedingungen gleichbleibend hoch ist. In bezug auf Adipocytenkulturen finden sich dazu in der Literatur jedoch praktisch keine Angaben, und auch Arbeiten, die sich direkt mit der Vitalitätsbestimmung bei Adipocyten beschäftigen, sind nicht vorhanden. So wurde die von Lorch und Rensch beschriebene Acridinorange-Färbung,¹¹⁵ auf der die in dieser Arbeit vorgestellte Methode beruht, ursprünglich nur als Alternative zur Bestimmung des DNA-Gehaltes eingesetzt.

Das hier aufgeführte Protokoll (s. 3.1.4) der Vitalfärbung mittels Acridinorange ist einfach und mit geringem Zeitaufwand (ca. 30 min) durchzuführen. Es liefert gut reproduzierbare Ergebnisse (ca. 5 % Intraassay-Variabilität) und eignet sich gut zur kontinuierlichen Überwachung der Vitalität einer Adipocytenkultur. Trotz der großen Lipidvakuole ist die Färbung der Zellkerne auch dann zu erkennen, wenn diese in einer anderen Betrachtungsebene liegen. Allerdings setzt diese Technik das Vorhandensein eines Mikroskops mit Fluoreszenzeinrichtung voraus, was nicht unbedingt zur Grundausstattung eines Zellkulturlabors gehört. Zusammen mit der hier vorgestellten Methode zur Zellzahlbestimmung ermöglichte dieses Verfahren die kontinuierliche Überwachung der Versuchsbedingungen bei der Adipocytenisolierung und Kultivierung.

5.1.3 In vitro Kultur

Unter den hier gegebenen Bedingungen konnten durchschnittlich etwa $3,8 \times 10^5$ Adipocyten pro Gramm Fettgewebe isoliert werden. Berücksichtigt man außerdem den Zellverlust der ersten 16 Stunden, so reichen für einen Versuch mit 12 parallelen

Ansätzen und je 1×10^6 Adipocyten pro Ansatz ca. 100 g humanes Fettgewebe aus. In Verbindung mit dem verbesserten Protokoll zur RNA-Isolierung (s. 3.2.2) liefert die entsprechende Zellzahl ca. 6 μ g Gesamt-RNA pro Ansatz. Mit der TaqMan-RT-PCR Technik erlaubt das die Quantifizierung von mindestens 25 verschiedenen Genen.

Der größte Zellverlust (ca. 30 %) ist in den ersten 16 Stunden nach der Isolierung zu beobachten, was höchstwahrscheinlich auf die starke Beanspruchung der Zellen durch die Einwirkung der Kollagenase und die zahlreichen Zentrifugationsschritte zurückzuführen ist. Im restlichen Beobachtungszeitraum ist die Verlustrate deutlich geringer. Es ist daher empfehlenswert, Versuche erst am Tag nach der Isolierung zu beginnen und bei Kurzzeitversuchen die Adipocyten nach dem Aliquotieren erst einige Zeit (ca. 2 h) zur Ruhe kommen zu lassen, bevor der Versuch z. B. durch Zugabe einer Substanz gestartet wird (s. 3.8 Protokoll). Die Vitalität unter den gegebenen Kulturbedingungen ist durchgehend hoch (> 90 %). Dennoch ist der Zellverlust mit durchschnittlich 15 % pro Tag höher als nach der Vitalitätsbestimmung zu erwarten wäre. Diese Diskrepanz ist wahrscheinlich dadurch zu erklären, daß sich tote Zellen während der Färbung z. T. bereits aufzulösen beginnen, wodurch sie nicht mehr in die Vitalitätsbestimmung eingehen. Dies wird durch die Beobachtung vereinzelter Kerne ohne Zellkörper, die überwiegend rot oder orange und nur ganz selten grün sind, bestätigt. Hier scheinen sich die Zellmembranen gerade erst aufgelöst zu haben, während die Kernhülle noch intakt ist.

Untersuchungen unter serumfreien Bedingungen sind innerhalb von 48 Stunden ebenfalls möglich. Zellzahl und Vitalität unterscheiden sich in diesem Zeitraum nicht wesentlich von denen FKS-haltiger Kulturen (Daten nicht gezeigt). Bei einer länger andauernden serumfreien Kultivierung scheint der Zellverlust jedoch höher zu sein. Ein Einfluß der für die Stimulationsversuche verwendeten Substanzen auf Zellzahl und Vitalität konnte weder in serumhaltigem noch in serumfreiem Medium beobachtet werden. Somit kann ausgeschlossen werden, daß die Wirkung der untersuchten Substanzen auf eine Veränderung der Vitalität zurückzuführen ist.

Insgesamt liegt mit den hier aufgeführten Techniken ein gut geeignetes System zur *in vitro* Kultivierung humaner Adipocyten vor, das die Untersuchung der hormonellen Regulation der Genexpression unter standardisierten Bedingungen erlaubt.

5.1.4 RNA-Isolierung

Trotz des großen Interesses an Studien zur Genexpression in Fettgewebe gibt es in der Literatur bisher nur einen einzigen Report, der sich speziell mit einer Methode zur Isolierung von RNA aus diesem Gewebe¹²⁷ befaßt. Diese Methode ist jedoch aufgrund einer Reihe von Präzipitations- und Zentrifugationsschritten sehr zeit- und arbeitsaufwendig. Obwohl eine große Anzahl von einfachen und schnellen RNA-Isolierungskits kommerziell erhältlich sind, gibt es in den beigefügten Protokollen jedoch keinerlei Hinweise auf ihre Verwendbarkeit für Fettgewebe (s. 1.5). Wie die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, benötigen die meisten Protokolle vor allem Veränderungen bezüglich der Zellyse, der Homogenisation und der Abtrennung der Lipide. Ohne diese Veränderungen wurden kaum befriedigende Ergebnisse erzielt (s. 1.4). Mit den hier beschriebenen Modifikationen (s. 3.2.1) war es jedoch möglich, mit den hier getesteten kommerziell erhältlichen Kits eine akzeptable Menge an RNA guter Qualität aus Adipocyten zu isolieren. Besonders ein der Größe der Adipocyten angepaßtes Volumen des Lysepuffers (mindestens zweifaches Volumen des Zellpellets) und die Abtrennung der Lipidphase waren dabei von entscheidender Bedeutung. Bei gefrorenen Proben hat sich außerdem das Erwärmen des Lysepuffers während der Homogenisation als vorteilhaft erwiesen.

Dennoch besitzen einige der getesteten Methoden besondere Vorteile. So resultieren die selektiven Bindungseigenschaften der Zentrifugationssäulen mit Silikatgelmembran nicht nur in akzeptablen RNA-Mengen hoher Qualität. Zeit- und Arbeitsaufwand sind darüber hinaus gering und können in Verbindung mit einer Vakuumapparatur zum Laden der Säulen weiter reduziert werden. Eine weitere besonders vorteilhafte Ergänzung dieser Methode ist die DNase-Behandlung der RNA direkt auf der Säule, die es ermöglicht, innerhalb kürzester Zeit (ca. 75 min) sehr reine, Protein- und DNA-freie RNA zu isolieren. Dagegen erleichtern die lipophilen Eigenschaften des Phenols die Lyse der Adipocyten und die Homogenisation der Probe erheblich, insbesondere bei der Verwendung von Fettgewebe. Die größte Reinheit der isolierten RNA in bezug auf DNA-Kontaminationen wird bei der leider sehr zeitintensiven und geräteaufwendigen (Ultrazentrifuge) CsCl-Gradientenzentrifugation^{118,128} erzielt. Im Gegensatz zu den anderen Verfahren ist hier der Einsatz einer DNase nicht erforderlich. Dagegen erwies sich das Entfernen von DNA und Proteinen durch differentielle Präzipitation als

schwierig, was sowohl in einer geringeren Ausbeute an RNA als auch in einer schlechteren Qualität resultierte.

Eine nachteilige Wirkung der DNase-Behandlung im Anschluß an die RNA-Isolierung im Vergleich zum DNase I-Verdau auf der Silikatgelsäule während der RNA-Präparation konnte nicht beobachtet werden. Offensichtlich stören die Komponenten der DNase-Behandlung (Puffer, inaktiviertes Enzym, EDTA; s. 3.4) weder die nachfolgende reverse Transkription noch die PCR, da die Amplifikationseffizienzen in beiden Fällen hoch waren (> 90 %) und sich nicht deutlich voneinander unterschieden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß der Großteil der kommerziell erhältlichen RNA-Präparationskits mit entsprechenden Modifikationen zur Isolierung von RNA aus Adipocyten verwendet werden kann. Ausbeute, Reinheit, einfache Handhabung und der geringe Zeitaufwand machen die RNA-Isolierung mittels RNA-selektiver Membran insbesondere in Verbindung mit der DNase-Behandlung auf der Säule zur am besten geeigneten Methode für Adipocyten.¹²⁹ Die CsCl-Methode ist dann zu empfehlen, wenn ein DNase I-Verdau nicht möglich ist. Die Phenol-Chloroform-Extraktion ist dagegen am besten geeignet, um große Mengen an RNA aus Adipocyten und Fettgewebe zu isolieren.

5.1.5 TaqMan-PCR

Mit der verbesserten RNA-Isolierungsmethode war es nun möglich, akzeptable Mengen RNA aus kleinen Zell- und Gewebeproben (Zellfraktionen der Stimulationsexperimente, Biopsiematerial) zu gewinnen. Dennoch reichte, wie bereits angesprochen (s. 1.4), die Sensitivität konventioneller RT-PCRs in Verbindung mit Ethidiumbromid gefärbten Gelen nicht aus, um sehr schwach exprimierte Gene zu detektieren oder mit dem vorhandenen Material die Expression mehrerer Gene zu quantifizieren. Mit der TaqMan-PCR gelang es jedoch nicht nur, die Genexpression des Renins und des Angiotensin II-Rezeptors Typ 2 nachzuweisen, was zuvor nicht möglich gewesen war,⁴⁶ sondern auch diese zu quantifizieren.

Wie unter 4.5.2 gezeigt, ist die mRNA-Menge des Leptins mehr als 27 000-fach größer als die des Angiotensin II-Rezeptors Typ 2. Bei der Amplifikation wesentlich stärker exprimierter Gene, wie z. B. der endogenen Kontrollen GAPDH oder 18S rRNA (s. 4.5.1), ist die Amplifikation sogar schon ab dem 10. - 12. Zyklus detektierbar (Daten nicht gezeigt). Im Verlauf der Untersuchungen zeigte sich, daß die Genexpression gut reproduzierbar zu quantifizieren ist, wenn die Detektion der Amplifikation zwischen dem 10. und 30. Zyklus beginnt. Die C_T -Werte liegen dann etwa in einem Bereich zwischen 15 und 35. Das traf bei ausdifferenzierten Adipocyten auf fast alle RAS-Gene, das Leptin und alle untersuchten endogenen Kontrollen zu. Damit umfaßt der Quantifizierungsbereich mehr als sechs Zehnerpotenzen. Bei sehr schwach exprimierten Genen, wie z. B. dem Angiotensin II-Rezeptor Typ 2, ist die Quantifizierung schwieriger, da die Einzelwerte mit abnehmender cDNA-Menge stärker streuen, was sich besonders auf die zur Quantifizierung benötigte Eichkurve auswirkt. Eine Erhöhung der Menge an Ausgangsmaterial vermindert zwar die Schwankungen, ist aber nur bis zu einer Konzentration von 2 ng / μ l Gesamt-RNA (konvertiert in cDNA) möglich, da größere Mengen inhibitorisch auf die PCR wirken. Daher ist es in diesem Fall empfehlenswert, die höchstmögliche cDNA-Menge zu verwenden und die Anzahl der Wiederholungen zu erhöhen.

Obwohl die Amplifikationseffizienz für alle untersuchten Gene stets über 90 % lag (ermittelt anhand von Verdünnungsreihen während der Etablierungsphase), variiert sie zwischen den verschiedenen Genen (Abbildung 13), was abhängig von der cDNA-Konzentration zu unterschiedlichen ΔC_T -Werten führt. Aus diesem Grund war es zur Quantifizierung der Genexpression bei den Stimulationsuntersuchungen notwendig, die C_T -Werte von „Zielgen“ und endogener Kontrolle (GAPDH) zunächst auf eine co-amplifizierte Eichreihe abzugleichen, bevor die relative Genexpression des „Zielgens“ auf den GAPDH-Gehalt der Probe normalisiert werden konnte. Dies hat den Nachteil, daß die Anzahl der Proben, die parallel amplifiziert und miteinander verglichen werden können, trotz des „96-well“-Formates auf 7 - 10 Proben begrenzt ist. Durch den Einsatz einer Kalibratorprobe (z. B. cDNA einer unstimulierten Adipocytenfraktion), die bei jedem PCR-Durchgang mitamplifiziert wird und auf die alle Werte bezogen werden, ist es jedoch möglich, auch Proben aus verschiedenen Amplifikationsläufen miteinander zu vergleichen.

Die Menge der zur Quantifizierung benötigten RNA ist wesentlich geringer als bei konventionellen Methoden. Während z. B. bei der TaqMan-Methode 30 ng Gesamt-RNA pro 25 µl-Ansatz zur Quantifizierung von *REN* und *AGTR2* ausreichen, war es bei der konventionellen RT-PCR selbst mit der 3-fachen Menge an Ausgangsmaterial nicht möglich, ihre Genexpression nachzuweisen. Da für jede Probe Vierfachbestimmungen erfolgten, lag der RNA-Bedarf für *REN* und *AGTR2* bei 120 ng pro Probe, während bei den anderen Genen sogar 40 – 80 ng ausreichten. Zusammen mit der endogenen Kontrolle lag bei einer Quantifizierung der Bedarf pro Probe bei maximal 160 ng Gesamt-RNA. Aber selbst wenn die höchstmögliche RNA-Menge von 50 ng / 25 µl - Ansatz zur Quantifizierung eines Gens benötigt wird, reichen die aus 1×10^6 Adipocyten (Stimulationsexperimente) isolierten 6 µg Gesamt-RNA aus, um mindestens 25 verschiedene Gene zu quantifizieren. Dies ist besonders bei Biopsieproben schlanker Patienten, bei denen die RNA-Ausbeute z. T. unter 2 µg liegt, von großem Vorteil.

Die einzige Einschränkung der "TaqMan-Real-Time-PCR" Technik ist, daß nur Unterschiede, die mindestens einer Verdopplung bzw. einer Halbierung der Expression entsprechen, sicher quantifizierbar sind. Diese Problematik wurde unter anderem bei der Bestimmung einer geeigneten endogenen Kontrolle deutlich. Erfahrungsgemäß beruhen bei der TaqMan-RT-PCR Methode C_T -Wert Differenzen unter $\pm 0,5$, wie sie z. B. bei *GAPDH* und *TfR* auftraten (Abbildung 11 und Abbildung 12) auftraten, auf methodisch bedingten Schwankungen. So liegen z. B. bei Mehrfachbestimmungen einer Probe nur selten größere C_T -Wert Unterschiede vor (Daten nicht gezeigt). Dagegen zeigen andere Gene (z. B. *$\beta 2m$* oder *GUS*) mit ΔC_T -Werten über $\pm 1,0$ deutliche Veränderungen der Genexpressionslevel gegenüber der jeweiligen Vergleichsprobe (Kalibrator). Für Gene, deren ΔC_T -Werte jedoch zwischen $\pm 0,5$ und $\pm 1,0$ liegen, kann man mit dieser Methode keine eindeutige Aussage machen. Je näher der ΔC_T Wert einer Probe jedoch bei ± 1 liegt, desto wahrscheinlicher ist es, daß ein Unterschied in der Genexpression zwischen Probe und Kalibrator besteht. Aus diesen Gründen wurde hier zur Bewertung der TaqMan Ergebnisse folgende Einteilung festgelegt:

ΔC_T -Werte $\leq \pm 0,5$: keine Veränderung der Genexpression;

ΔC_T -Werte zwischen $\pm 0,5$ und $\pm 0,8$: Genexpression wahrscheinlich nicht verändert;

ΔC_T -Werte zwischen $\pm 0,8$ und $\pm 0,99$: Genexpression wahrscheinlich verändert;

ΔC_T -Werte ≥ 1 : Genexpression verändert.

Insgesamt konnte gezeigt werden, daß die große Sensitivität der Detektion bei der „TaqMan-Real-Time PCR“ Technik die Quantifizierung in einem dynamischen Bereich von sechs Zehnerpotenzen ermöglicht und damit den Vergleich von Proben mit sehr unterschiedlichen Mengen an Ausgangsmaterial z. B. aufgrund unterschiedlicher Expressionslevel erlaubt. Die Methode ermöglicht auch die Expression von Genen, die mit konventioneller RT-PCR Technik nicht nachweisbar war, mit relativ geringen Mengen an Ausgangsmaterial zu quantifizieren. Expressionsunterschiede unter einer Verdopplung bzw. Halbierung sind jedoch nicht eindeutig quantifizierbar. Aufgrund unterschiedlicher Amplifikationseffizienzen war es notwendig, zur Quantifizierung der Expressionsunterschiede die „Standardkurvenmethode“ einzusetzen und für den Vergleich von Proben aus verschiedenen PCR-Läufen einen Kalibrator zu verwenden. Unter diesen Voraussetzungen ließ sich die Genexpression aller untersuchten Gene gut quantifizieren.

5.1.6 Endogene Kontrollen

Auf der Basis der unter 5.1.5 aufgeführten Kriterien zeigte sich z. B., daß bei der Genexpression des Cytoskelettproteins β -Actin große Unterschiede zwischen Adipocyten und Präadipocyten bestehen, was aufgrund der starken morphologischen Veränderungen während der Adipocytendifferenzierung nicht überraschend ist. In anderen Fällen waren die Veränderungen dagegen unerwartet (z. B. *GUS*, $\beta 2m$). Insgesamt ist die Verwendung von Genen wie *PO*, βAC , $\beta 2m$ oder *GUS* unter den gegebenen Bedingungen nicht zu empfehlen, da transkriptionell regulierte endogene Kontrollen Expressionsunterschiede des „Zielgens“ überdecken können. Aber auch Gene wie *18S*, *HPRT* und *TBP* sollten nach Möglichkeit nicht verwendet werden, ohne zuvor noch mit einer anderen Methode genau zu überprüfen, ob die hier beobachteten Veränderungen reproduzierbar sind.

Von den insgesamt 11 getesteten potentiellen „house-keeping“ Genen erwiesen sich somit für stimulierte Adipocyten und differenzierende Präadipocyten nur zwei (*GAPDH* und *TfR*) als geeignete endogene Kontrollen.¹³⁰ Unter anderen Versuchsbedingungen ist es jedoch empfehlenswert, ihre Eignung erneut zu überprüfen. Für Versuche, die nur die hormonelle Stimulation ausdifferenzierter Adipocyten mit einer der hier untersuchten

Substanzen umfassen, sind auch *PO*, *βAc*, *PGK* und *β2m* als endogene Kontrollen geeignet. Dagegen können für den Vergleich von Präadipocyten mit ausdifferenzierten Adipocyten und bei Untersuchungen an differenzierenden Präadipocyten neben *GAPDH* und *TfR* auch *18S*, *CYC*, *PGK*, und *TBP* als „house-keeping“ Gene verwendet werden.

5.2 Das adipocytäre Renin-Angiotensin-System

5.2.1 Expression eines vollständigen adipocytären RAS

Obwohl die bisher gängige Ansicht war, daß in Geweben mit lokalem Renin-Angiotensin-System (RAS) kein einzelner Zelltyp alle Gene exprimiert,^{46,47,55,56} konnte hier gezeigt werden, daß in ausdifferenzierten humanen Adipocyten alle RAS-Gene aktiv sind. Damit ist die Grundvoraussetzung zur lokalen, von Plasmakomponenten unabhängigen Angiotensin II-Bildung im Fettgewebe gegeben.

Während die Genexpressionslevel von *AGT*, *REN*, *ACE* und *AGTR1* in der gleichen Größenordnung liegen, ist die Expression dieser Gene deutlich niedriger als die des Leptingens (30 – 60-fach geringer), aber dennoch ausreichend, daß bei kultivierten humanen Adipocyten *AT₁*-Rezeptoren in der Zellmembran (Abb. 17 A) und *AGT*-Sekretion nachgewiesen werden kann.⁸¹ Die insgesamt niedrigste Expression zeigte das *AT₂*-Rezeptorgen (*AGTR2*; 27 000-fach geringer als Leptin). Möglicherweise wird eine höhere Leptinexpression benötigt, da das Fettgewebe der einzige Bildungsort für das gesamte im Plasma zirkulierende Leptin ist, was für die Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems nicht zutrifft. Denkbar ist aber auch, daß für den überwiegend lokalen Bedarf die weitaus geringere Genexpression der RAS-Gene im Fettgewebe ausreicht. Zusammen mit dem Nachweis verschiedener RAS-Komponenten im Fettgewebe,^{46,68,77,79,80} der Bildung von Angiotensin II durch humane Fettzellen⁷⁹ und der Wirkung von Angiotensin II auf Adipocyten^{2,21,89,144,145} stimmen die Ergebnisse dieser Arbeit klar mit der Präsenz eines voll funktionsfähigen RAS in isolierten humanen Adipocyten überein.

Die Expression des Reningens ist deutlich niedriger als die der anderen drei RAS-Gene (*AGT*, *ACE* und *AGTR1*), deren Expressionsstärke nahezu gleich ist, sodaß der Genexpressionslevel des Renins dreimal geringer als die seines Substrates Angiotensinogen ist. Dies ist wahrscheinlich der Grund, weshalb es mit weniger sensitiven Methoden⁴⁶ als der hier eingesetzten Technik, bisher nicht gelungen war, die Reninexpression in Adipocyten nachzuweisen, obwohl die lokale Bildung von Angiotensin II im Fettgewebe gezeigt werden konnte.¹⁷ Daher wurde bisher vermutet, daß entweder ein alternatives Angiotensin I-bildendes Enzym in Adipocyten gebildet wird oder daß es sich hier um ein extrinsisches System (s. 1.2.3) handelt, bei dem das von den Adipocyten freigesetzte Angiotensinogen durch Renin, welches von anderen Zellen (z. B. Präadipocyten) gebildet wird oder aus dem Blut stammt, umgesetzt wird. Auch wenn beide Möglichkeiten nicht ausgeschlossen werden können, zeigen die hier gewonnenen Ergebnisse, daß Adipocyten grundsätzlich über ein autonomes Renin-Angiotensin-System verfügen.

Besonders niedrig ist die Expression des Angiotensin II-Rezeptors Typ 2. Sie ist zwar mit der sehr sensitiven TaqMan-RT-PCR Methode gerade noch nachweisbar, die Bedeutung für das humane adipocytäre RAS ist jedoch fraglich, insbesondere da die Genexpression des anderen Rezeptorsubtyps (AT₁-Rezeptor) fast 1000-fach höher ist. Dieses Ergebnis stimmt mit anderen Untersuchungen überein, die zeigen, daß z. B. Adipocyten adulter Ratten ebenfalls ausschließlich den AT₁-Rezeptor exprimieren,¹³¹ während der AT₂-Rezeptor vorwiegend in embryonalen, neonatalen und jungen Geweben vertreten ist.^{132,133} Daher wird auch vermutet, daß AT₂-Rezeptoren an der Regulation der Differenzierung und des Wachstums beteiligt sein könnten.¹³⁴ Diese Annahme wird bestärkt durch Experimente an Koronarendothelzellen, bei denen die Inhibition der Proliferation über den AT₂-Rezeptor vermittelt wird,⁷⁵ oder durch Untersuchungen an Ob1771-Zellen der Maus, bei denen der Typ 2-Rezeptor die Präadipocytendifferenzierung fördert. Darüber hinaus konnte in neueren Untersuchungen an 3T3-L1 Zellen mittels "Western Blots" gezeigt werden, daß der Angiotensin II-Rezeptor Typ 2 im Verlauf der adipocytären Differenzierung verschwindet, während der Typ 1-Rezeptor unverändert exprimiert wird.¹³⁵ Dies läßt ebenfalls eine, wenn auch inverse Korrelation des AT₂-Rezeptors mit der Adipocytendifferenzierung vermuten. Insofern würde die minimale Genexpression des

Angiotensin II-Rezeptors Typ 2 in den ausdifferenzierten, teilungsunfähigen, humanen Adipocyten gut in dieses Bild passen.

Inwieweit die hier beobachteten Unterschiede in der Expressionsstärke der einzelnen RAS-Gene zur Regulation des adipocytären RAS beitragen und ob es Unterschiede im Expressionsmuster z. B. zwischen Adipösen und Schlanken bestehen, ist bisher nicht bekannt.

5.2.2 Bedeutung des adipocytären Renin-Angiotensin-Systems

Aufgrund der großen Ausdehnung und starken Vaskularisierung des Fettgewebes und dem Vorkommen von Fettzellen in der Umgebung von Gefäßwänden (adventitielles Fettgewebe) stellt ein vollständiges adipocytäres RAS die größte potentielle Quelle für Angiotensin II im Körper dar. Daher ist das adipocytäre Renin-Angiotensin-System wahrscheinlich nicht nur lokal von Bedeutung, sondern womöglich auch an der Blutdruckregulation des Gesamtorganismus beteiligt.

Dafür sprechen Untersuchungen an Tiermodellen, in denen nicht nur nachgewiesen werden konnte, daß das Fettgewebe nach der Leber den bedeutendsten Bildungsort für Angiotensinogen darstellt,¹³⁶ sondern daß adipocytär gebildetes AGT in den Blutkreislauf gelangt und dort zum Anstieg des Blutdrucks beitragen kann.⁸² Ermöglicht werden könnte dies durch die niedrige adipocytäre Reninexpression. Angenommen, die in Adipocyten gemessenen transkriptionellen Expressionsunterschiede führen auch auf Proteinebene zu ähnlichen Verhältnissen, dann würde nur ein Teil des adipocytär gebildeten Angiotensinogens in Angiotensin I umgesetzt werden, während der AGT-Überschuß in die Zirkulation gelangen könnte. Dies könnte, trotz der Fähigkeit von Adipocyten selbst Angiotensinogen umzusetzen, die Korrelation von AGT-Plasmaspiegel und BMI³⁸⁻⁴² erklären.

Darüber hinaus kann die lokale Bildung von Angiotensin II im adventitiellen Fettgewebe sowohl direkt als auch indirekt, in Verbindung mit der Förderung der Noradrenalinfreisetzung,⁸⁴ an der Erhöhung des Gefäßtonus und damit der Zunahme des Blutdrucks beteiligt sein. Langfristig könnte somit die Zunahme an Körperfettmasse durch beide hier dargestellten Mechanismen zur Entstehung von Hypertonie führen. Auch wäre es denkbar, daß die gleichen Mechanismen an der Reduktion des Blutdrucks bei Gewichtsabnahme beteiligt sind.¹³⁷

Eine weitere Hypothese ist, daß eine verminderte Perfusion des Fettgewebes aufgrund einer durch Angiotensin II vermittelten Vasokonstriktion den Abtransport freier Fettsäuren reduzieren könnte, was zu einer lokalen Akkumulation und verstärkten Reveresterung der freien Fettsäuren im Fettgewebe führen könnte.

Die vasokonstriktorische Wirkung auf benachbarte Gefäße ist sicherlich nicht die einzige Funktion des adipocytär gebildeten Angiotensin II. So scheint es bei 3T3-L1 Zellen und subkutanen, humanen Adipocyten die Lipogenese zu steigern, da *in vitro* sowohl die Genexpression als auch die Aktivität der Fettsäuresynthase (FAS) und der Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase (GPDH) zunehmen.⁸⁹ Auch führt Angiotensin II bei kultivierten Adipocyten von Ratte oder Mensch zu einem Anstieg von Prostaglandinen im Medium,¹³⁸ von denen eines, das PGE₂, ein potentes antilipolytisches Agens ist.¹³⁹ Auf diese Weise könnte nicht nur das systemische Renin-Angiotensin-System, sondern auch das adipocytäre RAS zur Entstehung oder Konsolidierung der Adipositas beitragen.⁸³

5.3 Hormonelle Regulation des RAS

Aufgrund der potentiellen Rolle von Angiotensin II sowohl für die Entstehung der Adipositas-assoziierten Hypertonie⁸² als auch die Entstehung bzw. Manifestation der Adipositas ist es wichtig, die Regulation des adipocytären RAS zu verstehen. Aus verschiedenen Untersuchungen war bekannt, daß die Regulation auf transkriptioneller Ebene erfolgt (s. 1.2.5) und das sich z. B. die Genexpression des AGTs trotz eines starken zwischenzeitlichen Anstiegs bereits nach 24 Stunden wieder normalisiert haben kann.⁹⁴ Aus diesem Grund wurde hier, anders als in vielen anderen Untersuchungen zur hormonellen Regulation der Genexpression, für alle RAS-Gene der zeitliche Verlauf der Expression über 24 Stunden quantifiziert.

Überraschenderweise führt bei isolierten humanen Adipocyten keiner der aus der Leber bekannten Regulatoren (Hydrocortison,⁹²⁻⁹⁵ 17- β -Estradiol,^{92,95-97} Triiodo-L-Thyronin^{92,98} oder Angiotensin II^{58,92,93}) zu einer Veränderung der AGT-Genexpression (s. 4.6), obwohl das Vorhandensein von „Response“-Elementen für Corticosteroide, Östrogen und Thyroidhormon in der 5'-Promotorregion des Angiotensinogens gut untersucht ist.⁶⁶ Auch Insulin zeigt, im Gegensatz zu Untersuchungen an klonalen

Präadipocytzelllinien^{77,105}, keine Wirkung auf die Genexpression des adipocytären Angiotensinogens. Da die Expression der anderen RAS-Gene mit einer Ausnahme unter hormoneller Stimulation ebenfalls unverändert bleibt, scheinen diese Gene in Adipocytan anderen Regulationsfaktoren zu unterliegen als in der Leber oder in anderen Geweben.^{66,95,140}

Einzig das Gen des Angiotensin II-Rezeptors Typ 1 reagiert deutlich auf die Stimulation mit Hydrocortison. So steigt die Genexpression in Abhängigkeit von der Stimulationszeit und der Dosis auf etwa das Vierfache an (s. Abbildung 14 C und Abbildung 15), und die Rezeptordichte verdoppelt sich innerhalb von drei Tagen (s. Abbildung 17).

Die Ergebnisse der Genexpressionsquantifizierung scheinen auch auf eine Stimulation des AT₂-Rezeptor-Gens durch Hydrocortison und Triiodo-L-Thyronin hinzuweisen. Die Bedeutung einer Expressionsverdopplung ist dennoch aufgrund des insgesamt sehr niedrigen Expressionsniveaus (unter Stimulation ist die Expression immer noch ca. 500-fach geringer als die des unstimulierten *AGTR1*) eher fraglich. Hinzu kommt, daß die Messungen in diesem Expressionsbereich auch mit der sensitiven TaqMan-Technik stark schwanken, so daß es weiterer Wiederholungen dieser Versuche bedarf, um die Frage der Regulation des AT₂-Rezeptors vollständig zu klären.

Das weitgehende Fehlen einer transkriptionellen Antwort auf die untersuchten hormonellen Stimuli ist insofern unerwartet, da für verschiedene Rattenstämme und Präadipocytzelllinien der Maus zumindest die Stimulation der adipocytären AGT-Genexpression durch einige, wenn auch nicht alle, der hier untersuchten Substanzen beschrieben worden ist.^{58,77,92-98,105} Eine mögliche Ursache hierfür könnte der Rückgang oder Verlust der Hormonrezeptoren direkt nach der Isolierung sein.^{141,142} Mittels indirekter Immunfluoreszenz konnte hier jedoch gezeigt werden, daß ausdifferenzierte humane Adipocytan unter den gegebenen Kultivierungsbedingungen den AT₁-Rezeptor sowohl in der Zellmembran als auch im Kern aufweisen und die Rezeptordichte auch nach dreitägiger Kultivierung unverändert bleibt. Für die anderen Rezeptoren (Glucocorticoid-, Östrogen-, Insulin-, Thyroidhormonrezeptoren) weisen die Ergebnisse, die im Rahmen der Auswahl des endogenen Kontrollgens gewonnen wurden, indirekt auf ihr Vorhandensein in den Primärkulturen hin. Hier führte eine 12-stündige Stimulation ausdifferenzierter Adipocytan mit Insulin oder Angiotensin II zu einer Verdopplung der Genexpression der β -Glucuronidase (*GUS*), und unter 17- β -Estradiol- bzw. Triiodo-L-Thyronin- und Hydrocortisonstimulation wurde ebenfalls

fast eine Verzwweifachung der Genexpression von *GUS* bzw. *TBP* (Transkriptionsfaktor IID-TATA-Bindungsprotein) erreicht. Dies zeigt, daß in dem verwendeten experimentellen System die Voraussetzungen für eine Antwort auf die hier untersuchten hormonellen Stimuli gegeben sind.

5.3.1 Glucocorticoidstimulation der Genexpression des Angiotensin II-Rezeptors Typ 1 (*AGTR1*)

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Inkubation ausdifferenzierter humaner Adipocyten mit Hydrocortison in einer zeit- und dosisabhängigen Hochregulation des AT₁-Rezeptorgens und nach drei Tagen auch in einer Verdopplung der Rezeptordichte resultiert. Dieses Ergebnis entspricht den Beobachtungen einer Dexamethason-induzierten Stimulation der Genexpression des Angiotensin II-Rezeptors Typ 1 bei glatten Gefäßmuskelzellen.¹⁴⁰ Sato et al. konnten außerdem zeigen, daß dies zur Hypersensitivität der Gefäße gegenüber Angiotensin II führt¹⁴⁰ und damit womöglich zur Entstehung der Glucocorticoid-induzierten Hypertonie beiträgt.

Die Funktion des Angiotensin II-Rezeptors Typ 1 in ausdifferenzierten Adipocyten ist dagegen weitgehend unklar. Durch die Expression des AT₁-Rezeptors in der Adipocytenmembran werden Fettzellen selbst zu „Zielzellen“ des lokal gebildeten Angiotensin II, was zunächst einen regulativen Rückkopplungsmechanismus vermuten läßt. Dies ließ sich zumindest für die Regulation der adipocytären RAS-Gene jedoch nicht bestätigen.

Es konnte bisher gezeigt werden, daß Angiotensin II die adipocytäre Bildung von NO, Prostacyclin, Leptin und Plasminogen Aktivierungsinhibitor-1 (PAI-1) *in vitro* und *in vivo* stimuliert.^{2,21,89,143,144} Wie diese Wirkung durch den AT₁-Rezeptor vermittelt wird und welche Bedeutung diese Substanzen im Zusammenhang mit der Adipositas-assoziierten Hypertonie einnehmen, ist jedoch weitgehend unklar.

Auf eine enge Verbindung zwischen Glucocorticoidhaushalt und Fettgewebemasse deuten eine Reihe verschiedener Beobachtungen hin: Bei transgenen Mäusen wird z. B. der Anstieg von „Corticotrophin-releasing“ Faktor und Corticosteronlevel von einer Zunahme der Fettgewebemasse begleitet und führt bei Mäusen, die den „Corticotrophin-releasing“ Faktor überexprimieren, zur Entstehung des Cushing-

Syndroms.^{145,146} Björntorp und Rosmond¹⁴⁷ berichteten kürzlich auch über eine enge Korrelation zwischen dem BMI und Störungen der sog. „HPA-Achse“ (engl. „hypothalamic-pituitary-adrenal axis“), die auf eine direkte Verbindung zwischen erhöhter Cortisolsekretion und Übergewicht hindeutet. Hierfür sprechen auch die Untersuchungen von Bujalska et al.,¹⁴⁸ die zeigen, daß das Enzym 11- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1 (11 β -HSD1) im humanen Fettgewebe, und vor allem im visceralen Fettgewebe, inaktives Cortison in aktives Cortisol umsetzt. Die Autoren konnten außerdem nachweisen, daß *in vitro* die Cortison-induzierte Präadipocytendifferenzierung von der 11 β -HSD1 abhängt,¹⁴⁹ was auch auf eine Beteiligung des lokalen Glucocorticoidmetabolismus an der Kontrolle der Fettgewebedifferenzierung hinweist.¹⁵⁰

Aus Untersuchungen an Primärkulturen humaner Präadipocyten ist bekannt, daß Angiotensin II *in vitro* die Adipocytendifferenzierung auch in Anwesenheit von Hydrocortison⁹¹ hemmt, wohingegen die Blockade des AT₁-Rezeptors mit Irbesartan die Differenzierung noch über die Wirkung des Cortisols hinaus fördert.⁹¹ Sofern Glucocorticoide auch bei Präadipocyten die AT₁-Rezeptorexpression stimulieren, könnte es sich hierbei um einen Gegenregulationsmechanismus handeln, der über die Erhöhung der AT₁-Rezeptorzahl bei erhöhten Glucocorticoidspiegeln (gestörte HPA-Achse, gesteigerte 11 β -HSD1-Aktivität, Cushing-Syndrom) die Differenzierung zusätzlicher Adipocyten begrenzt. Allerdings gibt es Hinweise darauf, daß bei Präadipocyten der Anstieg der AT₁-Rezeptorexpression im Verlauf der Differenzierung kein direkter Effekt der Hydrocortisonstimulation ist, da erst nach mehreren Tagen eine Expressionsverdopplung meßbar ist (J. Janke, persönliche Kommunikation).

Bei differenzierenden Adipocyten fördert Angiotensin II dagegen *in vitro* z. B. die Bildung des antilipolytisch wirksamen Prostaglandins PGE₂^{138,139} Crandall et al.⁷⁷ folgerte daraus, daß die Hemmung der lokalen Produktion von PGE₂ durch die Blockade des adipocytären AT₁-Rezeptors die basale Lipolyse erhöht und damit Größe und Metabolismus der Adipocyten beeinflussen kann. Im umgekehrten Fall könnte es durch die Zunahme der adipocytären AT₁-Rezeptoren zu einer vermehrten Lipidakkumulation kommen, indem einerseits durch die Produktion von PGE₂ die Lipolyse gehemmt und andererseits die Lipogeneseaktivität über die Stimulation von FAS und GPDH⁸⁹ (s. a. 5.2.2) gesteigert wird. Bei pathologisch erhöhten

Glucocorticoidspiegeln, wie sie z. B. beim Cushing-Syndrom vorliegen, könnte dies zur Entstehung von Adipositas führen oder sie zumindest fördern.

Die Untersuchung der Gesamtkörperlipolyse gesunder männlicher Probanden von Townsend ¹⁵¹ ergab allerdings keine signifikante Veränderung der lipolytischen Aktivität durch Angiotensin II-Infusion bzw. die Blockade des Renin-Angiotensin-Systems mit Enalapril. Daher folgerte er, daß das adipocytäre RAS des Menschen eher an der Regulation des regionalen Blutflusses im Fettgewebe und der Fettzellzahl beteiligt ist, als an der direkten Regulation des Lipidstoffwechsels.

Dagegen stehen jedoch neuere Ergebnisse aus Mikrodialyseuntersuchungen in subkutanem Fettgewebe des Menschen von Jordan et al., ¹⁵² bei denen Angiotensin II im Perfusat die Glycerolkonzentration, als Maß der lipolytischen Aktivität, im Dialysat ansteigen ließ, während der Blutfluß überraschenderweise unverändert blieb. Bestätigt wird dies durch Ergebnisse von Skurk et al., ¹⁵³ die zeigen konnten, daß Angiotensin II die Lipolyse bei *in vitro* differenzierten humanen Adipocyten subkutanen Ursprungs ebenfalls stimuliert. Sofern dieser Effekt auf subkutanes Fettgewebe beschränkt ist, könnte es bei pathologisch erhöhten Glucocorticoidspiegeln (gestörte HPA-Achsen Aktivität, Cushing-Syndrom) durch den Anstieg der AT₁-Rezeptorexpression und der damit verbundenen Erhöhung der lipolytischen Aktivität des subkutanen Fettgewebes zu einer Umverteilung der Triglyceride im Körper hin zu anderen Depots (z. B. viscerales Fettgewebe) oder Geweben (z. B. Muskeln) kommen. Daher könnte dies einer der Mechanismen sein, die zur Entstehung bzw. Förderung der besonderen Fettgewebeverteilung des Cushing-Syndroms oder (bei gleichzeitiger Überernährung) der zentralen Adipositas beitragen.

Auch wenn diese Zusammenhänge z. Z. noch spekulativ sind, stellt die adipocytäre Expression des AT₁-Rezeptors neben der lokalen Expression der RAS-Gene einen nicht zu vernachlässigenden Faktor bei der Aufklärung von Adipositas-assoziierten Störungen dar. Dabei sollte auch nicht außer Acht gelassen werden, daß selbst bei unveränderter Genexpression die Zunahme der Fettzellzahl zur Erhöhung des insgesamt verfügbaren Angiotensinogens und damit auch des Angiotensin II führt.

5.4 Schlußfolgerung und Ausblick

Über die Bedeutung des adipocytären Renin-Angiotensin-Systems für die Adipositas-assoziierte Hypertonie wurde bereits viel spekuliert.¹⁵⁴ Dennoch ist wenig in bezug auf seine Wirkung („Zielzellen“) und Regulation bekannt.¹⁷ Auch sind die Ergebnisse oft verschieden und z. T. widersprüchlich. Dies mag teilweise auf Speziesunterschiede (Nagetier / Mensch) oder verschiedene Untersuchungsmodelle (*in vivo* Experimente, Primärkulturen, klonale Zelllinien) zurückzuführen sein (s. 1.3), wird aber auch durch die ausgesprochen große Komplexität des Systems bedingt, die sich erst nach und nach offenbart. Es gibt im Prinzip vier Bereiche, auf die das adipocytäre Renin-Angiotensin-System potentiell Einfluß hat, und in denen seine Wirkung eventuell sehr unterschiedlich, wenn nicht sogar gegensätzlich, sein kann. Da wäre zunächst die endokrine Wirkung des adipocytär gebildeten Angiotensinogens im Blutkreislauf und sein Beitrag zur Regulation des Blutdrucks. Der zweite Bereich umfaßt das adipocytär gebildete Angiotensin II im adventitiellen Fettgewebe (parakrines System) und seinen Einfluß auf den Gefäßtonus. Im Bereich des Speicherfettgewebes stellt sich schließlich die Frage nach der Bedeutung des lokal gebildeten Angiotensin II und des AT₁-Rezeptors für die ausdifferenzierten Adipocyten (autokrin-parakrin) einerseits und die Differenzierung der Präadipocyten (parakrine Wirkung) andererseits, sowie ihr gemeinsamer Beitrag an der Entstehung der Adipositas. Auch kommen noch mögliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Fettgewebedepots (subkutan / visceral) hinzu.

Bei derart vielfältigen Wirkungsmechanismen des adipocytären Renin-Angiotensin-Systems ist es nicht überraschend, wenn hier andere Regulationsmechanismen als im systemischen RAS wirken. Die enge örtliche Verbindung zum Lipidstoffwechsel legt eine Regulation durch ernährungsphysiologische Parameter nahe, auf die es durch die Experimente mit Ratten von Frederich et al. bereits Hinweise gibt.⁸³ Inwieweit dies auch auf den Menschen übertragbar ist, bleibt abzuwarten, da die wenigen Untersuchungen zur Beeinflussung der Lipolyse durch Angiotensin II beim Menschen nicht eindeutig sind.^{151,152,153}

Aufbauend auf den hier gewonnenen Ergebnissen wären die nächsten Schritte, auch die anderen RAS-Proteine sowie ihre Aktivität in den Adipocyten und / oder im Medium nachzuweisen und die Stimulationsexperimente an Adipocytenkulturen mit anderen potentiellen Regulatoren der RAS-Gene (z. B. freie Fettsäuren) fortzusetzen. Von

großem Interesse ist sicherlich die Rolle des Angiotensin II-Rezeptors Typ 1 für den Stoffwechsel ausdifferenzierter Adipocyten (z. B. Beeinflussung der Leptinexpression) sowie seine Bedeutung für die Präadipocytendifferenzierung. Hier könnte die Untersuchung der Signaltransduktionswege wichtige Hinweise liefern. Ferner sollte auch die Frage, auf welche Weise sich Adipocyten und Präadipocyten gegenseitig beeinflussen, z. B. durch Co-Kultivierungsexperimente näher untersucht werden.

Zusammenfassend weist die vorliegende Arbeit auf das Vorhandensein eines vollständigen adipocytären Renin-Angiotensin-Systems hin. Seine Bedeutung bei der Entstehung Adipositas-assoziiierter Erkrankungen, wie z. B. Hypertonie oder Diabetes bedarf weiterer Untersuchungen.

6 Zusammenfassung

In den letzten Jahren hat sich gezeigt, daß Fettgewebe nicht nur ein inertes Fettspeicher ist, sondern auch eine Vielzahl endokrin wirksamer Substanzen produziert. Hierzu gehören u. a. auch Komponenten, die an der Blutdruckregulation beteiligt sind, wie Angiotensinogen, NO-Synthase oder Endothelin-1. Da Adipositas bekanntermaßen ein wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung der Hypertonie ist, ist der Beitrag adipocytär exprimierter Blutdruckregulationssysteme von großem Interesse.

Da Ergebnisse aus Tiermodellen nicht in allen Fällen auf den Menschen übertragbar sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein System zur quantitativen Untersuchung der Genexpression in Primärkulturen humaner Adipocyten entwickelt und die Regulation der Renin-Angiotensin-System-Gene unter hormoneller Stimulation untersucht. Dies beinhaltete zum einen die Etablierung der Adipocytenisolierung, Kultivierung, und eines Stimulationsassays sowie die Entwicklung einer der besonderen Größe und dem hohen Fettgehalt der Zellen angepaßten Zellzahl- und Vitalitätsbestimmungsmethode. Darüber hinaus wurden vier verschiedene RNA-Extraktionsmethoden auf ihre Eignung für Adipocyten untersucht und schließlich ein besonders sensibles RT-PCR System zur Untersuchung der Genexpression mittels einer fluoreszenzmarkierten Sonde etabliert.

Es konnte gezeigt werden, daß sich das R/S 1000 und die Färbung mit Acridinorange gut zur schnellen und reproduzierbaren Bestimmung von Zellzahl bzw. Vitalität in Adipocytensuspensionskulturen eignen und daß die Kulturbedingungen für die Stimulationsexperimenten geeignet waren. Unter bestimmten Modifikationen (Zellyse, Lipidabtrennung) eignete sich jede der hier untersuchten RNA-Extraktionen, wobei sich die Methode mit der RNA-selektiven Membran durch Reinheit, Schnelligkeit und die Kombinierbarkeit mit einem DNase-Verdau auszeichnete. Die besondere Sensitivität der hier verwendeten „TaqMan-Real-Time-PCR“ zeigte sich u. a. darin, daß zwei RAS-Gene, deren Nachweis mit herkömmlichen Methoden bisher nicht gelungen war, quantifiziert werden konnten, und daß Expressionsunterschiede in einem Bereich von mehr als sechs Zehnerpotenzen meßbar sind. Der Test von 11 verschiedenen potentiellen endogenen Kontrollen ergab, daß nur die Genexpression von zweien, darunter die GAPDH, weder während der Präadipocytendifferenzierung noch durch eines der verwendeten Hormone verändert wurde.

Die Untersuchung des adipocytären Renin-Angiotensin-Systems ergab, daß ausdifferenzierte humane Adipocyten alle RAS-Gene exprimieren, wenngleich die Genexpression des Angiotensin II-Rezeptor Typ 2 sehr gering ist. Ein Einfluß von Hydrocortison, 17- β -Estradiol, Insulin, Triiodo-L-Thyronin oder Angiotensin II auf die Genexpression von AGT, ACE und REN konnte in humanen Adipocyten nicht nachgewiesen werden, was vermuten läßt, daß diese Gene hier anderen Regulationsfaktoren zu unterliegen als in der Leber oder in anderen Geweben. Beim Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 kommt es dagegen unter Hydrocortisonstimulation zu einer zeit- und dosisabhängigen Steigerung der Genexpression auf ca. das 4-fache nach 24 Stunden. Darüber hinaus konnte mittels indirekter Immunfluoreszenz gezeigt werden, daß der Hydrocortison-induzierte Anstieg der Genexpression nach drei Tagen auch zu einer Verdopplung der AT₁-Rezeptorzahl an humanen Adipocyten führt. Dieser Aspekt ist möglicherweise nicht nur bei der besonderen Adipositasform des Cushing-Syndroms von Bedeutung, sondern auch für die Entstehung der zentralen Adipositas.

7 Literaturverzeichnis

1. Mohamed-Ali V, Pinkney JH, Coppack SW: Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ.. *Int J Obes* 1998; 22: 1145-1158.
2. Hauner H, Després JP (Eds.): Adipose Tissue: A multifunctional Organ. *Horm Metab Res* 32 2000; (11/12) 441-560.
3. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425-432.
4. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F: Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 1995; 269: 540-543.
5. Frederich RC, Lollmann B, Hamann A, Napolitano Rosen A, Kahn BB, Lowell BB, Flier JS: Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents. Impact of nutrition and obesity. *J Clin Invest* 1995; 96: 1658-1663.
6. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, Caro JF: Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996; 334: 292-295.
7. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM: Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995; 95: 2409-2415.
8. Hauner H, Petruschke T, Russ M, Rohrig K, Eckel J: Effects of tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) on glucose transport and lipid metabolism of newly-differentiated human fat cells in cell culture. *Diabetologia* 1995; 38: 764-771.
9. Auwerx J, Martin G, Guerre-Millo M, Staels B: Transcription, adipocyte differentiation, and obesity. *J Mol Med* 1996; 74: 347-352.
10. Brun RP, Kim JB, Hu E, Altiock S, Spiegelman BM: Adipocyte differentiation: A transcriptional regulatory cascade. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8: 826-832.

11. Freytag SO, Paielli DL, Gilbert JD: Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells. *Genes Dev* 1994; 8: 1654-1663.
12. Wu Z, Xie Y, Bucher NL, Farmer SR: Conditional ectopic expression of C/EBP beta in NIH-3T3 cells induces PPAR gamma and stimulates adipogenesis. *Genes Dev* 1995; 9: 2350-2363.
13. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM: Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 1994; 79: 1147-1156.
14. Napolitano A, Lowell BB, Damm D, Leibel RL, Ravussin E, Jimerson DC, Lesem MD, Van Dyke DC, Daly PA, Chatis P: Concentrations of adipsin in blood and rates of adipsin secretion by adipose tissue in humans with normal, elevated and diminished adipose tissue mass. *Int J Obes* 1994; 18: 213-218.
15. Choy LN, Rosen BS, Spiegelman BM: Adipsin and an endogenous pathway of complement from adipose cells. *J Biol Chem* 1992; 267: 12736-12741.
16. White RT, Damm D, Hancock N, Rosen BS, Lowell BB, Usher P, Flier JS, Spiegelman BM: Human adipsin is identical to complement factor D and is expressed at high levels in adipose tissue. *J Biol Chem* 1992; 267: 9210-9213.
17. Engeli S, Negrel R, Sharma AM: Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension* 2000; 35: 1270-1277.
18. Engeli S, Janke J, Gorzelniak K, Luft FC, Sharma AM: Expression of endothelin-system genes and secretion of endothelin-1 by human adipocytes. *Int J Obes* 2001; 25 (Suppl. 2): S75
19. Kapur S, Marcotte B, Marette A: Mechanism of adipose tissue iNOS induction in endotoxemia. *Am J Physiol* 1999; 276: E635-E641.
20. Nisoli E, Tonello C, Briscini L, Carruba MO: Inducible nitric oxide synthase in rat brown adipocytes: implications for blood flow to brown adipose tissue. *Endocrinology* 1997; 138: 676-682.

21. Axelrod L, Minnich AK, Ryan CA: Stimulation of prostacyclin production in isolated rat adipocytes by angiotensin II, vasopressin, and bradykinin: evidence for two separate mechanisms of prostaglandin synthesis. *Endocrinology* 1985; 116: 2548-2553.
22. Obesity - Preventing and managing the global epidemic. WHO Consultation on Obesity Geneva, 3-5 June 1997: 1997; 1-276.
23. Mikhail N, Golub MS, Tuck ML: Obesity and hypertension. *Prog Cardiovasc Dis* 1999; 42: 39-58.
24. Maheux P, Jeppesen J, Sheu WH, Hollenbeck CB, Clinkingbeard C, Greenfield MS, Chen YD, Reaven GM: Additive effects of obesity, hypertension, and type 2 diabetes on insulin resistance. *Hypertension* 1994; 24: 695-698.
25. Pi-Sunyer FX.: Medical hazards of obesity. *Ann Intern Med* 1993; 119: 655-660.
26. Schmidt MI, Watson RL, Duncan BB, Metcalf P, Brancati FL, Sharrett AR, Davis CE, Heiss G: Clustering of dyslipidemia, hyperuricemia, diabetes, and hypertension and its association with fasting insulin and central and overall obesity in a general population. *Metabolism* 1996; 45: 699-706.
27. Reaven GM: Syndrome X: 6 years later. *J Intern Med* 1994; 736 (Suppl.): 13-22.
28. Sjoström LV: Morbidity of severely obese subjects. *Am J Clin Nutr* 1992; 55: 508S-515S.
29. Hauner H, Koster I, von Ferber L: Frequency of 'obesity' in medical records and utilization of out-patient health care by 'obese' subjects in Germany. An analysis of health insurance data. *Int J Obes* 1996; 20: 820-824.
30. Chamras H, Bagga D, Elstner E, Setoodeh K, Koeffler HP, Heber D: Preadipocytes stimulate breast cancer cell growth. *Nutr Cancer* 1998; 32: 59-63.
31. Must A, Spadano J, Coakley EH, Field AE, Colditz G, Dietz WH: The disease burden associated with overweight and obesity. *JAMA* 1999; 282: 1523-1529.
32. Kunz I, Schorr U, Klaus S, Sharma AM: Resting metabolic rate and substrate use in obesity hypertension. *Hypertension* 2000; 36: 26-32.

33. Vollenweider L, Tappy L, Owlya R, Jequier E, Nicod P, Scherrer U: Insulin-induced sympathetic activation and vasodilation in skeletal muscle. Effects of insulin resistance in lean subjects. *Diabetes* 1995; 44: 641-645.
34. Berne C, Fagius J, Pollare T, Hjemdahl P: The sympathetic response to euglycaemic hyperinsulinaemia. Evidence from microelectrode nerve recordings in healthy subjects. *Diabetologia* 1992; 35: 873-879.
35. Shek EW, Brands MW, Hall JE: Chronic leptin infusion increases arterial pressure. *Hypertension* 1998; 31 (Suppl.): 409-414.
36. Haynes WG, Morgan DA, Walsh SA, Mark AL, Sivitz WI: Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. *J Clin Invest* 1997; 100: 270-278.
37. Hall JE, Brands MW, Henegar JR: Mechanisms of hypertension and kidney disease in obesity. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 892: 91-107.
38. Cooper R, McFarlane Anderson N, Bennett FI, Wilks R, Puras A, Tewksbury D, Ward R, Forrester T: ACE, angiotensinogen and obesity: a potential pathway leading to hypertension. *J Hum Hypertens* 1997; 11: 107-111.
39. Cooper R, Forrester T, Ogunbiyi O, Muffinda J: Angiotensinogen levels and obesity in four black populations. ICSHIB Investigators. *J Hypertens* 1998; 16: 571-575
40. Bloem LJ, Manatunga AK, Tewksbury DA, Pratt JH: The serum angiotensinogen concentration and variants of the angiotensinogen gene in white and black children. *J Clin Invest* 1995; 95: 948-953.
41. Umemura S, Nyui N, Tamura K, Hibi K, Yamaguchi S, Nakamaru M, Ishigami T, Yabana M, Kihara M, Inoue S, Ishii M: Plasma angiotensinogen concentrations in obese patients. *Am J Hypertens* 1997; 10: 629-633.
42. Schorr U, Blaschke K, Turan S, Distler A, Sharma AM: Relationship between angiotensinogen, leptin and blood pressure levels in young normotensive men. *J Hypertens* 1998; 16: 1475-1480.
43. Hall JE, Brands MW, Dixon WN, Smith MJ Jr: Obesity-induced hypertension: Renal function and systemic hemodynamics. *Hypertension* 1993; 22: 292-299.

44. Licata G, Scaglione R, Ganguzza A, Corrao S, Donatelli M, Parrinello G, Dichiaro MA, Merlino G, Cecala MG: Central obesity and hypertension: Relationship between fasting serum insulin, plasma renin activity, and diastolic blood pressure in young obese subjects. *Am J Hypertens* 1994; 7: 314-320.
45. Uckaya G, Ozata M, Sonmez A, Kinalp C, Eyileten T, Bingol N, Koc B, Kocabalkan F, Ozdemir IC: Plasma leptin levels strongly correlate with plasma renin activity in patients with essential hypertension. *Horm Metab Res* 1999; 31: 435-438.
46. Engeli S, Gorzelniak K, Kreutz R, Runkel N, Distler A, Sharma AM: Co-expression of renin-angiotensin system genes in human adipose tissue. *J Hypertens* 1999; 17: 555-560.
47. Phillips MI, Speakman EA, Kimura B: Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. *Regul Pept* 1993; 43: 1-20.
48. Pinto YM, Buikema H, Van Gilst WH, Scholtens E, van Geel PP, de Graeff PA, Wagner J, Paul M: Cardiovascular end-organ damage in Ren-2 transgenic rats compared to spontaneously hypertensive rats. *J Mol Med* 1997; 75: 371-377.
49. Luft FC, Mervaala E, Müller DN, Gross V, Schmidt F, Park JK, Schmitz C, Lippoldt A, Breu V, Dechend R, Dragun D, Schneider W, Ganten D, Haller H: Hypertension-induced end-organ damage : A new transgenic approach to an old problem. *Hypertension* 1999; 33: 212-218.
50. Danser AH, van Kats JP, Admiraal PJ, Derkx FH, Lamers JM, Verdouw PD, Saxena PR, Schalekamp MA: Cardiac renin and angiotensins. Uptake from plasma versus in situ synthesis. *Hypertension* 1994; 24: 37-48.
51. Loudon M, Bing RF, Thurston H, Swales JD: Arterial wall uptake of renal renin and blood pressure control. *Hypertension* 1983; 5: 629-634.
52. Müller DN, Luft FC: The renin-angiotensin system in the vessel wall. *Basic Res Cardiol* 1998; 93 (Suppl. 2): 7-14.
53. Kato H, Iwai N, Inui H, Kimoto K, Uchiyama Y, Inagami T: Regulation of vascular angiotensin release. *Hypertension* 1993; 21: 446-454.

54. Taddei S, Virdis A, Abdel-Haq B, Giovannetti R, Duranti P, Arena AM, Favilla S, Salvetti A: Indirect evidence for vascular uptake of circulating renin in hypertensive patients. *Hypertension* 1993; 21: 852-860.
55. Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW: Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation* 1993; 87: 1816-1828.
56. Lee MA, Bohm M, Paul M, Ganten D: Tissue renin-angiotensin systems. Their role in cardiovascular disease. *Circulation* 1993; 87 (Suppl. 5): IV7-IV13.
57. Sealey JE, Catanzaro DF, Lavin TN, Gahnem F, Pitarresi T, Hu LF, Laragh JH: Specific prorenin/renin binding (ProBP). Identification and characterization of a novel membrane site. *Am J Hypertens* 1996; 9: 491-502.
58. Nakamura , Iwao H, Fukui K, Kimura S, Tamaki T, Nakanishi S, Abe Y: Regulation of liver angiotensinogen and kidney renin mRNA levels by angiotensin II. *Am J Physiol* 1990; 258: E1-E6.
59. Fukamizu A, Takahashi S, Seo MS, Tada M, Tanimoto K, Uehara S, Murakami K: Structure and expression of the human angiotensinogen gene. Identification of a unique and highly active promoter. *J Biol Chem* 1990; 265: 7576-7582.
60. Lynch KR, Peach MJ: Molecular biology of angiotensinogen. *Hypertension* 1991; 17: 263-269.
61. Campbell DJ, Habener JF: Cellular localization of angiotensinogen gene expression in brown adipose tissue and mesentery: quantification of messenger ribonucleic acid abundance using hybridization in situ. *Endocrinology* 1987; 121: 1616-1626.
62. Cassis L LA, Lynch KR, Peach MJ: Localization of angiotensinogen messenger RNA in rat aorta. *Circ Res* 1988; 62: 1259-1262.
63. Campbell DJ, Habener JF: Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *J Clin Invest* 1986; 78: 31-39.
64. Hilgenfeldt U, Schwind S: Angiotensin II is the mediator of the increase in hepatic angiotensinogen synthesis after bilateral nephrectomy. *Am J Physiol* 1993; 265: E414-E418.

65. Li J, Brasier AR: Angiotensinogen gene activation by angiotensin II is mediated by the rel A (nuclear factor-kappaB p65) transcription factor: one mechanism for the renin angiotensin system positive feedback loop in hepatocytes. *Mol Endocrinol* 1996; 10: 252-264.
66. Gaillard I, Clauser E, Corvol P: Structure of human angiotensinogen gene. *DNA* 1989; 8: 87-99.
67. Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F: Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J Biol Chem* 1991; 266: 15377-15383.
68. Jonsson JR, Game PA, Head RJ, Frewin DB: The expression and localisation of the angiotensin-converting enzyme mRNA in human adipose tissue. *Blood Press* 1994; 3: 72-75.
69. Costerousse O, Jaspard E, Wei L, Corvol P, Alhenc-Gelas F: The angiotensin I-converting enzyme (kininase II): Molecular organization and regulation of its expression in humans. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 20 (Suppl. 9): S10-S15.
70. Mustafa T, Chai SY, Mendelsohn FA, Moeller I, Albiston AL: Characterization of the AT(4) receptor in a human neuroblastoma cell line (SK-N-MC). *J Neurochem* 2001; 76: 1679-1687.
71. Curnow KM, Pascoe L, White PC: Genetic analysis of the human type-1 angiotensin II receptor. *Mol Endocrinol* 1992; 6: 1113-1118.
72. Regitz Zagrosek V, Neuss M, Holzmeister J, Warnecke C, Fleck E: Molecular biology of angiotensin receptors and their role in human cardiovascular disease. *J Mol Med* 1996; 74: 233-251.
73. Timmermans PB, Benfield P, Chiu AT, Herblin WF, Wong PC, Smith RD: Angiotensin II receptors and functional correlates. *Am J Hypertens* 1992; 5 (Suppl.): 221S-235S.
74. Schütz S, Le Moullec JM, Corvol P, Gasc JM: Early expression of all the components of the renin-angiotensin-system in human development. *Am J Pathol* 1996; 149: 2067-2079.

75. Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T: The angiotensin AT₂-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest* 1995; 95: 651-657.
76. Cassis LA, Saye J, Peach MJ: Location and regulation of rat angiotensinogen messenger RNA. *Hypertension* 1988; 11: 591-596.
77. Jones BH, Standridge MK, Taylor JW, Moustaid N: Angiotensinogen gene expression in adipose tissue: Analysis of obese models and hormonal and nutritional control. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1997; 273: R236-R242.
78. Pinterova L, Krizanova O, Zorad S: Rat epididymal fat tissue express all components of the renin-angiotensin system. *Gen Physiol Biophys* 2000; 19: 329-334.
79. Schling P, Mallow H, Trindl A, Löffler G: Evidence for a local renin angiotensin system in primary cultured human preadipocytes. *Int J Obes* 1999; 23: 336-341.
80. Karlsson C, Lindell K, Ottoson M, Sjöstrom L, Carlsson LM: Human adipose tissue expresses angiotensinogen and enzymes required for its conversion to angiotensin II. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 1998; 83: 3925-3929.
81. Crandall DL, Herzlinger HE, Saunders BD, Armellino DC, Kral JG: Distribution of angiotensin II receptors in rat and human adipocytes. *J Lipid Res* 1994; 35: 1378-1385.
82. Massiéra F, Murakami K, Fukamizu A, Gasc JM, Ailhaud G, Meneton P, Teboul M: Angiotensinogen produced by adipose tissue is secreted in blood circulation. *Int J Obes* 2000; 24 (Suppl. 1): S18
83. Frederich RCJ, Kahn BB, Peach MJ, Flier JS: Tissue-specific nutritional regulation of angiotensinogen in adipose tissue. *Hypertension* 1992; 19: 339-344.
84. English V, Cassis L: Facilitation of sympathetic neurotransmission contributes to angiotensin regulation of body weight. *J Neural Transm* 1999; 106: 631-644.

85. Barbe P, Millet L, Galitzky J, Lafontan M, Berlan M: In situ assessment of the role of the beta 1-, beta 2- and beta 3-adrenoceptors in the control of lipolysis and nutritive blood flow in human subcutaneous adipose tissue. *Br J Pharmacol* 1996; 117: 907-913
86. Galitzky J, Lafontan M, Nordenstrom J, Arner P: Role of vascular alpha-2 adrenoceptors in regulating lipid mobilization from human adipose tissue. *J Clin Invest* 1993; 91: 1997-2003.
87. Adams F; Klaus S, Boschmann M: Metabolic and hemodynamic responses to angiotensin II in rat adipose tissue. *Int J Obes* 2000; 24 (Suppl. 1): S74
88. Soltis E.E, Cassis LA: Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. *Clin Exp Hypertens* 1991; 13: 277-296.
89. Jones BH, Standridge MK, Moustaid N: Angiotensin II increases Lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells. *Endocrinology* 1997; 138: 1512-1519.
90. Darimont C, Vassaux G, Ailhaud G, Negrel R: Differentiation of preadipose cells: paracrine role of prostacyclin upon stimulation of adipose cells by angiotensin-II. *Endocrinology* 1994; 135: 2030-2036.
91. Janke J, Gorzelniak K, Engeli S, Sharma AM: Angiotensin inhibits in vitro differentiation of human preadipocytes. *Int J Obes* 2000; 24 (Suppl. 1): S47
92. Clauser E, Gaillard I, Wei L, Corvol P: Regulation of angiotensinogen gene. *Am J Hypertens* 1989; 2: 403-410.
93. Klett C, Hellmann W, Suzuki F, Nakanishi S, Ohkubo H, Ganten D, Hackenthal E: Induction of angiotensinogen mRNA in hepatocytes by angiotensin II and glucocorticoids. *Clin Exp Hypertens A* 1988; 10: 1009-1022.
94. Kalinyak JE, Perlman AJ: Tissue-specific regulation of angiotensinogen mRNA accumulation by dexamethasone. *J Biol Chem* 1987; 262: 460-464.
95. Klett C Ganten D, Hellmann W, Kaling M, Ryffel GU, Weimar-Ehl T, Hackenthal E: Regulation of hepatic angiotensinogen synthesis and secretion by steroid hormones. *Endocrinology* 1992; 130: 3660-3668.
96. Gordon MS, Chin WW, Shupnik MA: Regulation of angiotensinogen gene expression by estrogen. *J Hypertens* 1992; 10: 361-366.

97. Chang E, Perlman AJ: Multiple hormones regulate angiotensinogen messenger ribonucleic acid levels in a rat hepatoma cell line. *Endocrinology* 1987; 121: 513-519.
98. Kimura S, Iwao H, Fukui K, Abe Y, Tanaka S: Effects of thyroid hormone on angiotensinogen and renin messenger RNA levels in rats. *Jpn J Pharmacol* 1990; 52: 281-285.
99. Ming M, Sikstrom R, Lachance S, Delalandre A, Carrière S, Chan JSD: Hormonal regulation of expression of the angiotensinogen gene in cultured mouse hepatoma cells. *Am J Hypertens* 1993; 6: 141-148.
100. Aubert J, Darimont C, Safonova I, Ailhaud G, Negrel R: Regulation by glucocorticoids of angiotensinogen gene expression and secretion in adipose cells. *Biochem J* 1997; 328: 701-706.
101. Serazin-Leroy V, Morot M, de Mazancourt P, Giudicelli Y: Androgen regulation and site specificity of angiotensinogen gene expression and secretion in rat adipocytes. *Am J Physiol* 2000; 279: E1398-E1405.
102. Nyui N, Tamura K, Yamaguchi S, Nakamaru M, Ishigami T, Yabana M, Kihara M, Ochiai H, Miyazaki N, Umemura S, Ishii M: Tissue angiotensinogen gene expression induced by lipopolysaccharide in hypertensive rats. *Hypertension* 1997; 30: 859-867.
103. Cassis LA: Downregulation of the renin-angiotensin system in streptozotocin-diabetic rats. *Am J Physiol* 1992; 262: E105-E109.
104. Safonova I, Aubert J, Negrel R, Ailhaud G: Regulation by fatty acids of angiotensinogen gene expression in preadipose cells. *Biochem J* 1997; 322: 235-239.
105. Aubert J, Safonova I, Negrel R, Ailhaud G: Insulin down-regulates angiotensinogen gene expression and angiotensinogen secretion in cultured adipose cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 250: 77-82.
106. Pond CM: *The Fats of Life*. Cambridge University Press 1998.
107. Leonhardt H: *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*. Band 3, 8. Aufl., Thieme Verlag 1990

-
108. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO: Basic Histology. 7. Aufl., Springer Verlag. 1990
109. Heese H: Grundriß und Atlas der Mikroskopischen Anatomie des Menschen. Band I, 12. Aufl., Gustav Fischer Verlag 1996.
110. Krstić RV: Die Gewebe des Menschen und der Säugetiere. 2. Aufl., Springer Verlag 1988.
111. Cinti S: The Adipose Organ. Milano, Italy Ediktrice Kurtis 1999.
112. Rodbell M: Metabolism of Isolated Fat Cells. 1. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis. *J Biol Chem* 1964; 239: 375-380.
113. Marshall S, Garvey WT, Geller M: Primary culture of isolated adipocytes. A new model to study insulin receptor regulation and insulin action. *J Biol Chem* 1984; 259: 6376-6384.
114. Moustaid N, Jones BH, Taylor JW: Insulin increases lipogenic enzyme activity in human adipocytes in primary culture. *J Nutr* 1996; 126: 865-870.
115. Lorch E, Rentsch G: A simple method for staining and counting isolated adipose tissue fat cells. *Diabetologia* 1969; 5: 356-357.
116. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159.
117. Kimmel AR, Berger SL: Preparation of cDNA and the generation of cDNA libraries: overview. *Methods Enzymol* 1987; 152: 307-316.
118. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979; 18: 5294-5299.
119. Lee LG, Connell CR, Bloch W: Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucl Acids. Res.* 1993; 21: 3761-3766.
120. Alexander-Bridges M, Buggs C, Giere L, Denaro M, Kahn B, White M, Sukhatme V, Nasrin N: Models of insulin action on metabolic and growth response genes. *Mol Cell Biochem* 1992; 109: 99-105.

121. Serazin-Leroy V, Denis-Henriot D, Morot M, de Mazancourt P, Giudicelli Y: Semi-quantitative RT-PCR for comparison of mRNAs in cells with different amounts of house-keeping gene transcripts. *Mol Cell Probes* 1998; 12: 283-291.
122. Fain JN, Bahouth SW: Hormonal regulation of 18S RNA, leptin mRNA, and leptin release in adipocytes from hypothyroid rats. *Metabolism* 1998; 47: 1455-1461.
123. Lichtman JW: Konfokale Mikroskopie. *Spektrum der Wissenschaft* 1994: S78.
124. Hirsch J, Gallian E: Methods for the determination of adipose cell size in man and animals. *J Lipid Res* 1968; 9: 110-119.
125. Fine JB., DiGirolamo M: A simple method to predict cellular density in adipocyte metabolic incubations. *Int J Obes* 1997; 21: 764-768.
126. Gorzelniak K, Engeli S, Sharma AM: Standardizing the counting of adipocytes in cell culture. *Biotechniques* 1998; 24: 536-538.
127. Tavangar K, Hoffman AR, Kraemer FB: A micromethod for the isolation of total RNA from adipose tissue. *Anal Biochem* 1990; 186: 60-63.
128. Glisin V, Crkvenjakov R, Byus C: Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry* 1974; 13: 2633-2637.
129. Janke J, Engeli S, Gorzelniak K, Sharma AM: Extraction of total RNA from adipocytes. *Horm Metab Res.* 2001; 33: 213-215.
130. Gorzelniak K, Janke J, Engeli S, Sharma AM: Validation of endogenous controls for gene expression studies in human adipocytes and preadipocytes. *Horm Metab Res.* 2001; 33: 625-627.
131. Crandall DL, Herzlinger HE, Saunders BD, Zolotor RC, Feliciano L, Cervoni P: Identification and characterization of angiotensin II receptors in rat epididymal adipocyte membranes. *Metabolism* 1993; 42: 511-515.
132. Bottari SP, De Gasparo M, Steckelings UM, Levens NR: Angiotensin II receptor subtypes: characterization, signalling mechanisms, and possible physiological implications. *Front Neuroendocrinol* 1993; 14: 123-171.
133. Saavedra JM: Brain and pituitary angiotensin. *Endocr Rev* 1992; 13: 329-380.
134. Unger T: The angiotensin type 2 receptor: variations on an enigmatic theme. *J Hypertens* 1999; 17: 1775-1786.

135. Mallow H, Trindl A, Löffler G: Produktion of angiotensin II receptors type one (AT1) and type two (AT2) during the differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes. *Horm Metab Res* 2000; 32: 500-503.
136. Campbell DJ: The site of angiotensin production. *J Hypertens* 1985; 3: 199-207.
137. Sharma AM, Pischon T, Engeli S, Scholze J: Choice of drug treatment for obesity-related hypertension: where is the evidence ? *J Hypertens* 2001; 19: 667-674.
138. Richelsen B: Factors regulating the production of prostaglandin E2 and prostacyclin (prostaglandin I2) in rat and human adipocytes. *Biochem J* 1987; 247: 389-394.
139. Crandall DL, Vu V, Lizzo FH, Davis BA, Cervoni P: Antilipolytic activity of viprostol, a transdermally active antihypertensive PGE2 analog. *Prostaglandins* 1987; 33: 767-773.
140. Sato A, Suzuki H, Nakazato Y, Shibata H, Inagami T, Saruta T: Increased expression of vascular angiotensin II type 1A receptor gene in glucocorticoid-induced hypertension. *J Hypertens* 1994; 12: 511-516.
141. Ichihara A, Nakamura T, Tanaka K, Tomita Y, Aoyama K, Kato S, Shinno H: Biochemical functions of adult rat hepatocytes in primary culture. *Ann N Y Acad Sci* 1980; 349: 77-84.
142. Nakamura T, Tomomura A, Noda C, Shimoji M, Ichihara A: Acquisition of a beta-adrenergic response by adult rat hepatocytes during primary culture. *J Biol Chem* 1983; 258: 9283-9289.
143. Engeli S, Janke J, Kettler M, Gorzelniak K, Sharma AM: Nitric oxide system genes and formation of nitric oxide in human adipose tissue. *Int J Obes* 2000; 24: S28.
144. Skurk T, Lee YM, Hauner H: Angiotensin II and its metabolites stimulate PAI-1 protein release from human adipocytes in primary culture. *Hypertension* 2001; 37: 1336-1340.
145. Pepin MC, Pothier F, Barden N: Impaired type II glucocorticoid-receptor function in mice bearing antisense RNA transgene. *Nature* 1992; 355: 725-728.

-
146. Stenzel-Poore MP, Cameron VA, Vaughan J, Sawchenko PE, Vale W: Development of Cushing's syndrome in corticotropin-releasing factor transgenic mice. *Endocrinology* 1992; **130**: 3378-3386.
147. Björntorp P, Rosmond R: Neuroendocrine abnormalities in visceral obesity. *Int J Obes* 2000; **24**: S80-S85.
148. Bujalska IJ, Kumar S, Steward PM: Does central obesity reflect „Cushing's disease of the omentum“? *Lancet* 1997; **349**: 1210-1213.
149. Bujalska IJ, Kumar S, Hewison M, Steward PM: Differentiation of adipose stromal cells: the roles of glucocorticoids and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* 1999; **140**: 3188-3196.
150. Hauner H, Entenmann G, Wabitsch M, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R, Pfeiffer EF: Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest* 1989; **84**: 1663-1670.
151. Townsend, RR: The effects of angiotensin II on lipolysis in humans. *Metabolism* 2001; **50**: 468-472.
152. Jordan J, Boschmann M, Tank J, Klaus S, Sharma AM, Luft FC: Tissue specific interaction of angiotensin II and Nitric oxide on perfusion and metabolism. *J Hypertens* 2001; **19** (Suppl. 2): P2.99.
153. Skurk T, Röhrig H, Hauner H: Angiotensin II stimuliert die Lipolyse in primärkultivierten humanen Adipozyten. *Aktuel Ernähr Med* 2000; **25**: 248
154. Engeli S, Sharma AM: The renin-angiotensin system and natriuretic peptides in obesity-associated hypertension. *J Mol Med* 2001; **79**: 21-29.

DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. A.M. Sharma für die Überlassung des Themas, sein stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit und die vielen die Arbeit begleitenden, wertvollen Hinweise und Anregungen.

Mein besonderer Dank gilt:

- Stefan Engeli für die sehr gute Zusammenarbeit, das Lesen des Manuskriptes sowie für die umfassenden, niemals langweiligen und äußerst „erhellenden“ Erläuterungen.
- Diese haben Licht ins Dunkel meiner anfänglichen Unwissenheit bezüglich medizinischer Zusammenhänge gebracht, mich an seiner Begeisterung teilhaben lassen, und mir viel zusätzliche Motivation gegeben.
- - Dr. Jürgen Janke für die stete Gesprächsbereitschaft während der praktischen Arbeit und der Niederschrift der Ergebnisse, für die zahlreichen konstruktiven Anregungen und ganz besonders für das Teilen seines Erfahrungsschatzes bezüglich „Promo-Viren“.

Beiden möchte ich vor allem ganz besonders für ihre Kameradschaft und Anteilnahme danken sowie für die vielen Kleinigkeiten, die aufzuzählen kaum möglich sind und die mir doch sehr viel bedeuten.

Mein herzlicher Dank geht auch an alle Mitarbeiter der AG Sharma am Universitätsklinikum Benjamin Franklin und an der Franz Volhard Klinik für das hervorragende Arbeitsklima. Insbesondere möchte ich mich hier bei Bärbel Girresch und Klaus Schlotter für ihre große Hilfsbereitschaft und Anteilnahme am Fortgang meiner Dissertation bedanken.

Herzlichen Dank auch an Dr. Maren Wellner und Dr. Ute Heintze für ihr Interesse an meiner Arbeit und das abschließende Lesen des Manuskriptes.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie, die stets regen Anteil genommen und mir so manches mal den Rücken frei gehalten hat, sowie meinen Freundinnen Andrea Barac und Ines Jäger, die alle Höhen und Tiefen miterlebt und „erlitten“ haben. Ich danke ihnen für ihre unermüdliche Motivation, daß sie mir während der schwierigen Phasen dieser Dissertationsarbeit stets den Rücken gestärkt und mir geholfen haben, den Blick auch für andere Dinge im Leben offenzuhalten.

Berlin, 5. September 2001

Kerstin Gorzelniak

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit an Eides statt, daß die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 5. September 2001