



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Einfluss von Abbauprodukten ausgewählter
Glucosinolate auf die Glucoseaufnahme und
Fettakkumulierung in 3T3-L1-Adipozyten“

Verfasserin

Claudia Habersack

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 474

Studienrichtung lt. Studienblatt: Ernährungswissenschaften

Betreuerin / Betreuer: Univ.-Prof. Mag. Dr. Veronika Somoza

Danksagung

In erster Linie möchte ich Frau Univ.-Prof. Dr. Veronika Somoza für die Bereitstellung des Themas danken. Danke, dass ich an Ihrem Institut die Diplomarbeit durchführen durfte und für Ihre Hilfestellungen und Ihre Betreuung während dieser Zeit!

Ich danke außerdem Jessica Walker für Ihre Betreuung, Hilfe und kritischen Anmerkungen. Danke, dass du dir so viel Zeit für mich genommen hast und mir immer mit Rat zur Seite standst!

Marc Pignitter möchte ich danken für die Synthetisierung und Bereitstellung der Sulforaphan-Metabolite. Danke für deine Hilfe und deine Zeit bei „Glucosinolat-Fragen“!

Vor allem möchte ich mich bei den Dissertantinnen der Arbeitsgruppe, Annett Riedel, Barbara Rohm, Christina Hochkogler, Kathrin Liszt und Miriam Ehrnhöfer bedanken. Danke Annett für deine Zeit und Hilfe bei den „Clark-Elektroden-Versuchen“! Und danke an euch alle, dass eure Tür für mich immer offen stand, ich bei Fragen jederzeit zu euch kommen konnte und ihr mir eine große Stütze während dieser Zeit ward!

Ich danke auch den anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, Andreas Hosiner, Ann-Katrin Holik, Christiane Stoll, Denise Josino Soares, Julia Imböck, Katharina Schüller, Lisa-Marie Schäfer, Mathias Zaunschirm und Verena Stöger, und allen ehemaligen Mitgliedern für die schöne Zeit! Ich freue mich, weiterhin ein Teil dieser Arbeitsgruppe sein zu können!

Mein größter Dank geht aber an meine Familie, vor allem an meine Eltern, meine Schwester Karin, meine Oma und meinen „Neusiedler“ Großeltern. Danke für Eure finanzielle Unterstützung! Danke, dass ihr immer für mich da seid! Danke, dass ich mich immer auf euch verlassen kann! Danke, dass ich immer zu euch kommen kann und ihr mir so eine große Stütze seid!

Diese Diplomarbeit ist euch gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	X
1. Einleitung	1
2. Glucosinolate und deren Abbauprodukte	2
2.1. Allgemeines – Struktur, Vorkommen und Aufnahmemengen von Glucosinolaten	2
2.2. Die Abbauprodukte von Glucosinolaten: Isothiocyanate	4
2.2.1. <i>Metabolisierung des Isothiocyanats Sulforaphan und dessen Bioverfügbarkeit</i>	7
2.2.2. <i>Metabolisierung von Indol-3-Carbinol und Ascorbigen</i>	10
3. Physiologie von Adipozyten	12
3.1. Einleitung	12
3.2. Lipogenese in Adipozyten	14
3.3. Lipolyse in Adipozyten.....	17
3.4. Aufbau der Atmungskette und der Einfluss von Entkopplern auf den Stoffwechsel	18
3.4.1. <i>Entkoppler der Atmungskette</i>	19
4. Zellulärer Energiestoffwechsel von Diabetes Typ 2 bei Adipositas	22
5. Die 3T3-L-Zelllinie: Merkmale und Differenzierung	25
5.1. Entwicklung von pluripotenten Stammzellen zu Adipozyten	26
5.1.1. <i>Phasen der Differenzierung von 3T3-L1-Zellen</i>	27
5.1.2. <i>Der gereifte Adipozyt</i>	29

5.2.	Einfluss von IBMX, Dexamethason und Insulin auf die Differenzierung von 3T3-L1-Zellen zu Adipozyten.....	30
6.	Problemstellung	33
7.	Material und Methoden	35
7.1.	Materialien	35
7.2.	Zellkultur	40
7.2.1.	<i>Auftauen von 3T3-L1-Zellen</i>	<i>40</i>
7.2.2.	<i>Kultivierung von 3T3-L1-Zellen</i>	<i>40</i>
7.2.3.	<i>Zellernte</i>	<i>41</i>
7.2.4.	<i>Passagieren</i>	<i>42</i>
7.2.5.	<i>Auszählen der Zellen.....</i>	<i>42</i>
7.2.6.	<i>Anlegen von Platten und Zellkulturschalen</i>	<i>43</i>
7.2.7.	<i>Wachstumskurve</i>	<i>44</i>
7.3.	Methoden	46
7.3.1.	<i>Glucoseaufnahme in 3T3-L1-Zellen mit 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-desoxyglucose (2-NBDG)</i>	<i>46</i>
7.3.2.	<i>Messung des Proteingehaltes anhand der Bicinchoninsäure (BCA) Protein-Untersuchungsmethode.....</i>	<i>51</i>
7.3.3.	<i>DNA-Bestimmung.....</i>	<i>52</i>
7.3.4.	<i>Bestimmung der Lipidakkumulation in 3T3-L1-Zellen mit Oil Red O.....</i>	<i>53</i>
7.3.5.	<i>Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs</i>	<i>57</i>
7.4.	Statistik	62
7.4.1.	<i>Auswertung der 2-NBDG Glucoseaufnahme</i>	<i>62</i>
7.4.2.	<i>Auswertung des Proteingehaltes anhand der Bicinchoninsäure (BCA) Protein-Untersuchungsmethode</i>	<i>64</i>
7.4.3.	<i>Auswertung der Lipidakkumulation in 3T3-L1-Zellen mit Oil Red O.....</i>	<i>64</i>
7.4.4.	<i>Auswertung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs</i>	<i>65</i>
8.	Ergebnisse und Diskussion	66
8.1.	2-NBDG-Aufnahme in 3T3-L1-Zellen	66
8.2.	Sulforaphan	66
8.2.1.	<i>Einfluss verschiedener Sulforaphan-Konzentrationen auf die Glucoseaufnahme in 3T3-L1-Adipozyten</i>	<i>67</i>

8.2.2.	<i>Einfluss von verschiedenen Sulforaphan-Konzentrationen auf die Lipidakkumulation in 3T3-L1-Zellen</i>	69
8.2.3.	<i>Einfluss von Sulforaphan auf den Sauerstoffverbrauch von 3T3-L1-Adipozyten</i>	71
8.2.4.	<i>Diskussion zu Sulforaphan</i>	72
8.3.	Sulforaphan-Cystein-Glycin	75
8.3.1.	<i>Einfluss verschiedener SFN-CYS-GLY-Konzentrationen auf die Glucoseaufnahme in 3T3-L1-Adipozyten</i>	76
8.3.2.	<i>Einfluss verschiedener SFN-CYS-GLY-Konzentrationen auf die Lipidakkumulation</i>	77
8.3.3.	<i>Diskussion zu Sulforaphan-Cystein-Glycin</i>	78
8.4.	Sulforaphan-Glutathion	80
8.4.1.	<i>Einfluss verschiedener SFN-GSH-Konzentrationen auf die Glucoseaufnahme in 3T3-L1-Adipozyten</i>	80
8.4.2.	<i>Einfluss verschiedener SFN-GSH-Konzentrationen auf die Lipidakkumulation in 3T3-L1-Zellen</i>	82
8.5.	Sulforaphan-Cystein	83
8.5.1.	<i>Einfluss verschiedener SFN-CYS-Konzentrationen auf die Glucoseaufnahme in 3T3-L1-Adipozyten</i>	83
8.5.2.	<i>Einfluss verschiedener SFN-CYS-Konzentrationen auf die Lipidakkumulation in 3T3-L1-Zellen</i>	84
8.6.	Sulforaphan-N-Acetyl-Cystein	86
8.6.1.	<i>Einfluss verschiedener SFN-NAC-Konzentrationen auf die Glucoseaufnahme in 3T3-L1-Adipozyten</i>	86
8.6.2.	<i>Einfluss verschiedener SFN-NAC-Konzentrationen auf die Lipidakkumulation in 3T3-L1-Zellen</i>	88
8.6.3.	<i>Diskussion zu Sulforaphan-Glutathion, Sulforaphan-Cystein und Sulforaphan-N-Acetylcystein</i>	89
8.7.	Indol-3-Carbinol	91
8.7.1.	<i>Einfluss von verschiedenen Indol-3-Carbinol-Konzentrationen auf die Glucoseaufnahme in 3T3-L1-Adipozyten</i>	91
8.7.2.	<i>Einfluss von verschiedenen Indol-3-Carbinol-Konzentrationen auf die Lipidakkumulation in 3T3-L1-Zellen</i>	93
8.8.	Ascorbigen	94
8.8.1.	<i>Einfluss verschiedener Ascorbigen-Konzentrationen auf die Glucoseaufnahme in 3T3-L1-Adipozyten</i>	94
8.8.2.	<i>Einfluss verschiedener Ascorbigen-Konzentrationen auf die Lipidakkumulation 3T3-L1-Zellen</i>	96
8.8.3.	<i>Diskussion zu Indol-3-Carbinol und Ascorbigen</i>	97
9.	Schlußbetrachtung	100

10.	Zusammenfassung	104
11.	Abstract	106
12.	Literaturverzeichnis	108
13.	Anhang	115

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Grundstruktur der Glucosinolate	2
Abbildung 2: Glucoraphanin und Glucobrassicin	3
Abbildung 3: Entstehung der Abbauprodukte von Glucosinolaten.....	4
Abbildung 4: Verstoffwechslung des SFN im Körper über den Mercaptursäure Signalweg	6
Abbildung 5: Sulforaphan und dessen Metabolite.....	7
Abbildung 6: Glucobrassicin.....	
Abbildung 7: Bildung von Indol-3-Carbinol und Ascorbigen.....	10
Abbildung 8: Ablauf und Regulation der Lipogenese durch Insulin.....	14
Abbildung 9: Struktur von Rinderinsulin	15
Abbildung 10: Komplexe der Atmungskette	18
Abbildung 11: Pathogenese von Diabetes Typ 2 bei Adipositas.....	22
Abbildung 12: Kultivierte 3T3 L1 Zellen	25
Abbildung 13: Phasen bis zur endgültigen Differenzierung zu Adipozyten	26
Abbildung 14: In vitro Adipozytendifferenzierung unter Zusatz von Insulin, Isobutylmethylxanthin und Dexamethason.....	28
Abbildung 15: Ausdifferenzierte Fettzellen mit zahlreichen Fetteinlagerungen.....	29
Abbildung 16: IBMX	30
Abbildung 17: Dexamethason	30
Abbildung 18: Regulierung der Adipogenese über den extrazellulären Faktor Insulin.....	31
Abbildung 19: Neubauerzählkammer und Zählnetz	42
Abbildung 20: Wachstumskurve von 3T3-L1-Zellen	45
Abbildung 21: 2-NBDG.....	48
Abbildung 22: Behandlungsschema der Zellen bis zum Versuch	49
Abbildung 23: Oil Red O	54
Abbildung 24: Mit Oil Red O gefärbte Adipozyten.....	54
Abbildung 25: Die drei Szenarien des Lipidakkumulations-Versuches	55
Abbildung 26: Stromfluss in der Elektrode nach Anlegung einer Spannung von 700 mV	59
Abbildung 27: Aufbau der Clark Elektrode und Vorbereitung für die Versuchsdurchführung.....	59

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 28: Kurve der Messung des Sauerstoffverbrauches	62
Abbildung 29: Standardgerade für verschiedene 2-NBDG-Konzentrationen	63
Abbildung 30: Veränderung der 2-NBDG Aufnahme in differenzierten 3T3-L1-Adipozyten nach Inkubation von 0,01 nM bis 10 μ M SFN.....	67
Abbildung 31: Veränderung der 2-NBDG Aufnahme in differenzierten 3T3-L1-Adipozyten nach Inkubation von 0,1 nM bis 10 nM SFN.....	68
Abbildung 32: Veränderungen in der Lipidakkumulation bei differenzierten 3T3-L1-Adipozyten unter Inkubation mit SFN in verschiedenen Konzentrationen und Zeitspannen	70
Abbildung 33: Wirkung einer Direktzugabe von 10 nM Sulforaphan auf die mitochondriale Atmung von 3T3-L1-Adipozyten	72
Abbildung 34: Veränderung der 2-NBDG Aufnahme in differenzierten 3T3-L1-Adipozyten nach Inkubation verschiedener Konzentrationen von SFN-CYS-GLY.....	76
Abbildung 35: Veränderungen in der Lipidakkumulation bei differenzierten 3T3-L1-Adipozyten unter Inkubation mit SFN-CYS-GLY in verschiedenen Konzentrationen und Zeitspannen,	77
Abbildung 36: Veränderung der 2-NBDG Aufnahme in differenzierten 3T3-L1-Adipozyten nach Inkubation verschiedener Konzentrationen von SFN-GSH.....	81
Abbildung 37: Veränderungen in der Lipidakkumulation bei differenzierten 3T3-L1-Adipozyten unter Inkubation mit SFN-GSH in verschiedenen Konzentrationen und Zeitspannen	82
Abbildung 38: Veränderung der 2-NBDG Aufnahme in differenzierten 3T3-L1-Adipozyten nach Inkubation verschiedener Konzentrationen von SFN-CYS	84
Abbildung 39: Veränderungen in der Lipidakkumulation bei differenzierten 3T3-L1-Adipozyten unter Inkubation mit SFN-CYS in verschiedenen Konzentrationen und Zeitspannen,	85
Abbildung 40: Veränderung der 2-NBDG Aufnahme in differenzierten 3T3-L1-Adipozyten nach Inkubation verschiedener Konzentrationen von SFN-NAC,.....	87
Abbildung 41: Veränderungen in der Lipidakkumulation bei differenzierten 3T3-L1-Adipozyten unter Inkubation mit SFN-NAC in verschiedenen Konzentrationen und Zeitspannen	88
Abbildung 42: Veränderung der 2-NBDG Aufnahme in differenzierten 3T3-L1-Adipozyten nach Inkubation verschiedener Konzentrationen von I3C	92

Abbildung 43: Veränderungen in der Lipidakkumulation bei differenzierten 3T3-L1-Adipozyten unter Inkubation mit I3C in verschiedenen Konzentrationen und Zeitspannen	93
Abbildung 44: Veränderung der 2-NBDG Aufnahme in differenzierten 3T3-L1-Adipozyten nach Inkubation verschiedener Konzentrationen von ASG	95
Abbildung 45: Veränderungen in der Lipidakkumulation bei differenzierten 3T3-L1-Adipozyten unter Inkubation mit ASG in verschiedenen Konzentrationen und Zeitspannen.....	96
Abbildung 46: Gegenüberstellung aller Substanzen in der 2-NBDG Aufnahme in differenzierten 3T3-L1-Adipozyten nach Inkubation mit 10 nM Substanz.....	100
Abbildung 47: Gegenüberstellung aller Substanzen in der Lipidakkumulation bei differenzierten 3T3-L1-Adipozyten unter Inkubation mit 10 nM über die Differenzierungs- und Reifungsperiode	102

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Glucosinolatgehalte ausgewählter Kreuzblütler	4
Tabelle 2: Insulinwirkungen auf den Stoffwechsel	16
Tabelle 3: Hemmstoffe der Atmungskette.....	19

Abkürzungsverzeichnis

2-NBDG	2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-Desoxyglucose
3T3-L1	Mausfibroblasten
ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	Zweifaktorielle Varianzanalyse
ASG	Ascorbigen
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinderalbumin
C/EBP	CCAT / Enhancer-bindendes Protein
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
Ci	Curie (Einheit)
CoA	Coenzym A
CREB	reagierendes Element-bindendes Protein
CYS	Cystein
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dubecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
EBR	ethanolische Extrakte der Pflanze <i>Brassica campestris</i> spp. <i>rapa</i>
EC	Enzyme Commission
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FADH ₂	Flavinadenindinukleotid in reduzierter Form
FCCP	Carbonyl-Cyanid-p-Trifluoromethoxyphenylhydrazon
G ₀ /G ₁	Phasen des Zellzykluses
GATA	Transkriptionsfaktor, der an die DNA Sequenz „GATA“ bindet
GLUT	Glucosetransporter

Abkürzungsverzeichnis

GLY	Glycin
GSH	Glutathion
HDAC	Histon Deacylase
HepG2	Humane Leberkarzinomzellen
HSL	Hormon-sensitive Lipase
I3C	Indol-3-Carbinol
I3-CA	Indol-3-Carbonsäure
IBMX	Isobutylmethylxanthin
IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
IL	Interleukin
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mRNA	Messenger Ribonucleinsäure
NAC	N-Acetyl-Cystein
NADH H ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid in reduzierter Form
PBS	Phospat-gepufferte Salzlösung
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PPAR γ	Peroxisom-Proliferator aktivierter Rezeptor γ
PREF	Präadipozytenfaktor
RCI	Respiratorischer Kontrollindex
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SFN	Sulforaphan
SREBP	Sterol-regulierendes Element-bindendes Protein
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
UCP	Entkoppelndes Protein
VLDL	Very low density lipoprotein

1. Einleitung

Adipositas, gekennzeichnet durch einen Bodymassindex von $> 30 \text{ kg} / \text{m}^2$, nimmt mittlerweile epidemische Ausmaße an. Es wird geschätzt, dass weltweit über eine Milliarde der Erwachsenen übergewichtig und davon mindestens 300 Millionen adipös sind (Kanasaki und Koya 2011). Adipositas ist mit der Entstehung von Herzerkrankungen, Bluthochdruck, Diabetes Typ 2, Krebs, Erkrankungen der Atmungsorgane und Osteoarthritis assoziiert (Brown et al. 2009; Guh et al. 2009). Weltweit leiden 285 Millionen Menschen an Diabetes Typ 2 (Bailey 2011).

Eine Ernährung reich an Obst und Gemüse kann der Entstehung von Übergewicht durch höhere Sättigungswirkung und folglich geringerer Energieaufnahme vorbeugen. Außerdem werden durch die Regulierung der Glykämischen Last die hormonellen Vorgänge nach der Nahrungsaufnahme beeinflusst (Ledoux et al. 2011).

Glucosinolate sind sekundäre Pflanzenstoffe, die von der Pflanze als Schutz vor Schädlingen gebildet werden. Ihnen werden gesundheitliche Vorteile wie eine antioxidative, antikanzerogene und cholesterinsenkende Wirksamkeit zugeschrieben (Hahn et al. 2005). Außerdem wurde eine mögliche Beeinflussung des Fettmetabolismus von An et al. 2010 festgestellt.

Aber können auch die Abbauprodukte und Metabolite der Glucosinolate die zelluläre Glucoseaufnahme, den Fettmetabolismus und den Energiestoffwechsel beeinflussen? Können sie so einer mit Adipositas assoziierten Entwicklung einer Insulinresistenz und folglich einer möglichen Entstehung von Diabetes Typ 2 entgegensteuern?

Anhand der 3T3-L1-Zelllinie, die zur Untersuchung von Stoffwechselfvorgängen in Adipozyten eingesetzt wird, können die Einflüsse von Stoffen in den einzelnen Zellentwicklungsphasen getestet werden.

Aufgrund der voranschreitenden Übergewichtsepidemie und der hohen Inzidenz an Diabetes Typ 2 wäre es wichtig, durch natürliche Nahrungsmittel bzw. durch dessen Inhaltsstoffe, eine Unterstützung zur Verbesserung und Vorbeugung von Adipositas und Diabetes erreichen zu können (An et al. 2010; Bailey 2011).

2. Glucosinolate und deren Abbau- produkte

2.1. Allgemeines – Struktur, Vorkommen und Aufnahmemengen von Glucosinolaten

Die Grundstruktur der Glucosinolate zeigt Abbildung 1. Glucosinolate werden in aliphatische, indolische und aromatische Glucosinolate eingeteilt. Es sind über 120 Verbindungen bekannt, die in 16 Familien der Ordnung *Capparales* vorkommen. Viele Vertreter der Familie der Kreuzblütengewächse (*Brassicaceae*) sind Teil der menschliche Ernährung, wie beispielsweise Kohl, Kohlsprossen,

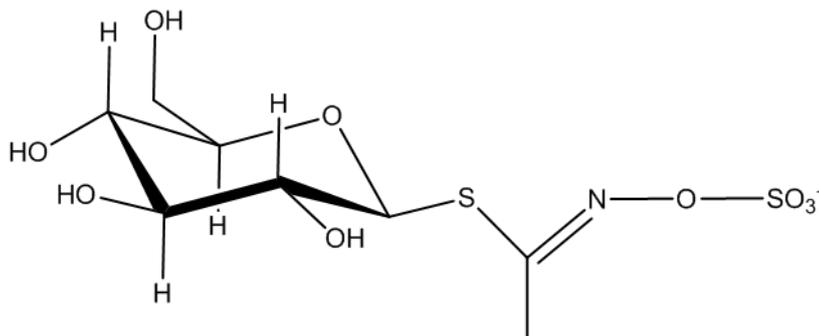


Abbildung 1: Grundstruktur der Glucosinolate

Broccoli, Karfiol, Radieschen, Rüben, Rucolasalat, Senf, Wasabi und Raps (Fahey et al. 2001; Verkerk et al. 2009). Eine Studie von Holst und Williams im Jahr 2004 kam zu dem Ergebnis, dass die durchschnittliche Aufnahme von Glucosinolaten in Deutschland bei 46 mg pro Tag im Winter bzw. 36 mg pro Tag im Sommer lag, was einer durchschnittlichen täglichen Aufnahme von *Brassicaceae* von 54 g entsprach. Die hauptsächlich aufgenommenen Glucosinolate waren aliphatische, gefolgt von aromatischen und indolischen. In Großbritannien wurden die Aufnahmemengen von Glucosinolaten mit 50 mg pro Tag im Jahr 1986 und in den Niederlanden mit 22 mg pro Tag im Jahr 1996 ermittelt.

Weltweit betrachtet lag China mit dem Konsum von 100 g pro Tag *Brassicaceae* an erster Stelle, gefolgt von anderen asiatischen Ländern und Australien mit 40 g bis 80 g pro Tag. In Nordamerika wurde ein täglicher Konsum von 25 bis 30 g pro Tag errechnet. Südamerika und Südafrika bildeten in der Statis-

2. Glucosinolate und deren Abbauprodukte

Die Schlusslichter mit einer täglichen Aufnahme von weniger als 15 g (Agudo et al. 2008).

Glucosinolate kommen in unterschiedlichen Zusammensetzungen und Konzentrationen, je nach Phase des Wachstums, in allen Teilen der *Brassicaceen* vor. Während des Pflanzenwachstums beeinflussen genetische Faktoren, Umweltfaktoren, Klima, Lage, physiologische Faktoren, die Ernährung der Pflanze, der Selengehalt des Bodens und das Wasserangebot die Zusammensetzung und Konzentrationen der Glucosinolate. Die anschließenden Prozesse des Transports und der Weiterverarbeitung beeinflussen die Gehalte nochmals (Padilla et al. 2007; Verkerk et al. 2009).

In der Züchtung zeigt sich der Trend zur Senkung der scharf schmeckenden Glucosinolate wie Sinigrin (2-Propenyl-Glucosinolat) und Gluconapin (3-Butenyl-Glucosinolat) und zur Erhöhung der möglicherweise gesundheitsfördernden aliphatischen Glucosinolate wie Glucoiberin (3-Methylsulphinylpropyl-Glucosinolat) und Glucoraphanin (Abbildung 2). Letzteres kommt vor allem im

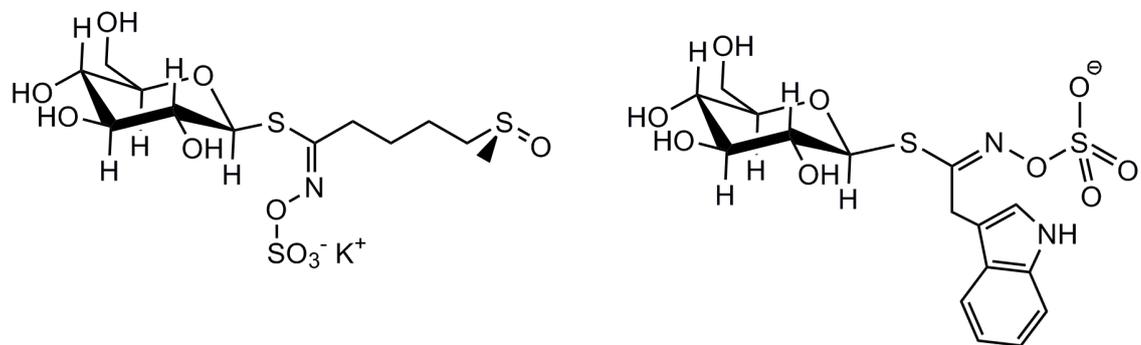


Abbildung 2: Glucoraphanin und Glucobrassicin

Broccoli in höherer Menge vor (Verkerk et al. 2009). Ein indolisches Glucosinolat, das in Broccoli vorkommt und dessen Metabolite im Blut und Urin, neben Sulforaphan und dessen Metaboliten, häufig nachgewiesen werden, ist Glucobrassicin (3-Indolylmethyl-Glucosinolat) (siehe Abbildung 2) (Clark et al. 1996). Tabelle 1 bietet eine Übersicht der verschiedenen Glucosinolatkonzentrationen im Broccoli und ausgewählter Kreuzblütler.

Tabelle 1: Glucosinolatgehalte ausgewählter Kreuzblütler (McNaughton und Marks 2003).

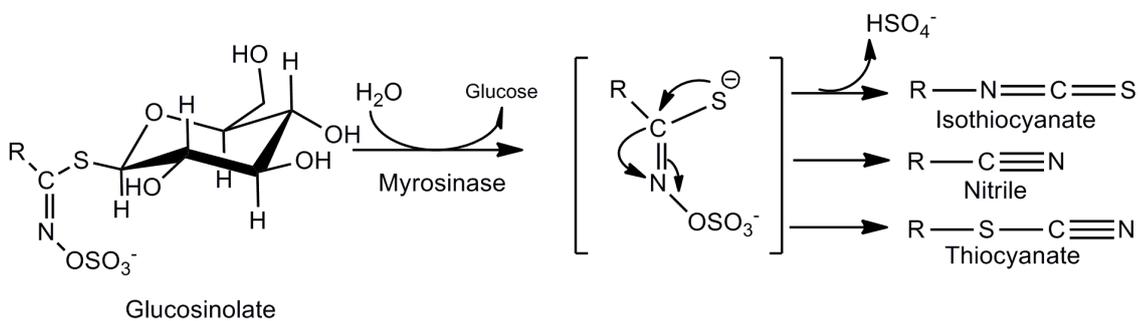
Pflanze / Lebensmittel	Glucosinolatgehalt [mg / 100 g] (McNaughton und Marks 2003)	Glucoraphanin- Gehalt [mg / 100 g] (Cieslik et al. 2007)	Glucobrassicin- Gehalt [mg / 100 g] (Cieslik et al. 2007)
Broccoli, roh	61,70 (19,30 – 127,50)	48,70	4,69
Broccoli, gekocht	37,20	19,20	2,59
Broccoli, gefroren, roh	50,70	37,80	5,66
Karfiol, roh	43,20 (11,70 – 78,60)	0,27	14,90
Kohlsprossen, roh	236,60 (80,10 – 445,50)	2,66	36,00
Grünkohl, roh	89,40	5,05	9,50

(McNaughton und Marks 2003): Review. Studienanzahl n = 2-109. Angabe des Mittelwertes der verschiedenen Studien, () = Streuung. Bei Cieslik et al. 2007: Studienanzahl n = 1

2.2. Die Abbauprodukte von Glucosinolaten: Isothiocyanate

Bildung von Isothiocyanaten durch das Enzym Myrosinase

Für die biologischen Effekte der Glucosinolate sind vor allem deren Abbauprodukte, die Isothiocyanate, verantwortlich. Isothiocyanate werden durch das pflanzliche Enzym Myrosinase (EC 3.2.1.147) aus Glucosinolaten freigesetzt, indem Glucose abgespalten wird (siehe Abbildung 3).

**Abbildung 3:** Entstehung der Abbauprodukte von Glucosinolaten (Fahey et al. 2001).

2. Glucosinolate und deren Abbauprodukte

Die Lagerung der Glucosinolate findet in Pflanzen in den Vakuolen statt, die der Myrosinase (EC 3.2.1.147) im Cytoplasma. Bei einer Zerstörung der Zellen kommt das Enzym mit dem Substrat in Kontakt und kann seine hydrolytische Wirkung entfalten. Die Zellzerstörung kann durch verschiedene Verarbeitungsarten, wie Schneiden, Hacken und Pürieren, ausgelöst werden. Auch der Kauvorgang und Verdauungsvorgänge bewirken eine Zerstörung der Zellen (Verkerk et al. 2009).

Bei der hydrolytischen Spaltung entstehen bei pH-Werten von 6 bis 7 vor allem Isothiocyanate. Bei sauren oder alkalischen pH-Werten, oder wenn die Myrosinase (EC 3.2.1.147) inaktiviert wurde, entstehen Nitrile (Abbildung 3). Verschiedene Verarbeitungsbedingungen, wie Einfrieren und Erhitzen beeinflussen die Menge und die Zusammensetzung der gebildeten Abbauprodukte. Die Produkte und deren Konzentrationen in zubereiteten Lebensmitteln sind beispielsweise bei der Zubereitung mit heißem und kaltem Wasser unterschiedlich (Verkerk et al. 2009). Die Bildung von Thiocyanaten kann nur bei drei natürlich vorkommenden Glucosinolaten, nämlich bei Allyl-, Benzyl- und 4-(Methylthio)Butylglucosinolaten, erfolgen (Bones and Rossiter 1996).

Isothiocyanatmetabolismus im Körper

Durch Aufnahme von Lebensmitteln, die Glucosinolate enthalten, gelangen diese in den Körper und werden weiter metabolisiert. Die Metabolisierung der Isothiocyanate erfolgt hauptsächlich über den Mercaptursäure¹-Weg im Gastrointestinaltrakt (siehe Abbildung 4, Darstellung anhand von Sulforaphan), bei dem die Isothiocyanate zuerst mit Glutathion (GSH) konjugiert und dann weiter enzymatisch metabolisiert werden.

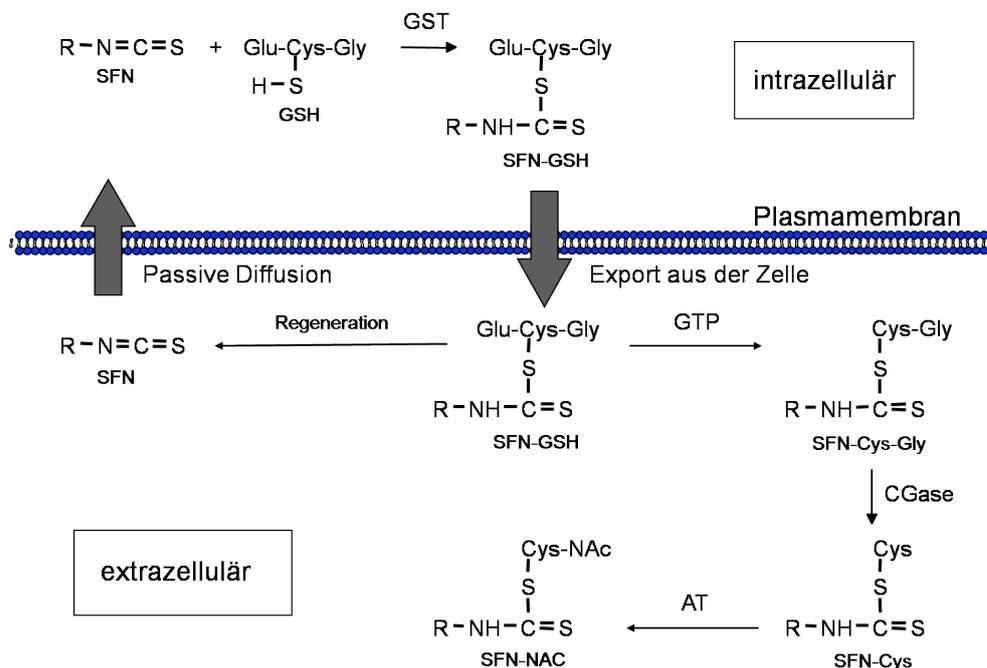


Abbildung 4: Verstoffwechslung des SFN im Körper über den Mercaptursäure Signalweg. GST - Glutathion S-Transferase, GTP - γ -Glutamyltranspeptidase, Cgase - Cysteinylglycinnase, AT - Acetyltransferase, SFN - Sulforaphan, GSH - Glutathion, Cys - Cystein, Gly - Glycin, NAC - N-Acetyl-Cystein, R - $CH_3-SOH-C_4H_8$ (Hauder 2011).

In weiterer Folge entstehen Cysteinylglycin- (CYS-GLY-), Cystein- (CYS-) und N-Acetylcystein-Konjugate (NAC-), die zur Gruppe der Dithiocarbamate gehören (Ye et al. 2002). Im Blut sind Isothiocyanate im nM-Bereich detektierbar. Sie haben eine starke Bindungsneigung an Amino- und Thiolgruppen (Verkerk et al. 2009). Sie werden an Albumin, Glycoproteinen oder anderen Amino- oder Thiolgruppen gebunden transportiert und mit dem Urin ausgeschieden (Ye et al. 2002; Verkerk et al. 2009). Die Aufnahme in Zellen erfolgt durch passive Diffusion als ungebundenes Molekül, Glutathion-Konjugat oder als L-Cysteinderivat,

¹ Alte Bezeichnung für Acetylcystein

2. Glucosinolate und deren Abbauprodukte

wobei freie Isothiocyanate von den Zellen wahrscheinlich schneller aufgenommen werden als konjugierte (Ye et al. 2002; Verkerk et al. 2009). Die zelluläre Aufnahme, Akkumulierung und der Transport von Isothiocyanaten und deren Metaboliten werden von zellulären GSH-Konzentrationen beeinflusst (Zhang und Talalay 1998). Intrazelluläre Konzentrationen der Isothiocyanate können im mM-Bereich liegen und im Vergleich zum extrazellulären Bereich 200 Mal so hoch sein (Hanlon et al. 2009).

2.2.1. Metabolisierung des Isothiocyanats Sulforaphan und dessen Bioverfügbarkeit

Sulforaphan (SFN), ein Isothiocyanat, wird aus dem Glucosinolat Glucoraphanin (4-Methylsulphonylbutyl-Glucosinolat) gebildet (Padilla et al. 2007). Die Strukturen von Sulforaphan und dessen Metaboliten sind in Abbildung 5 dargestellt.

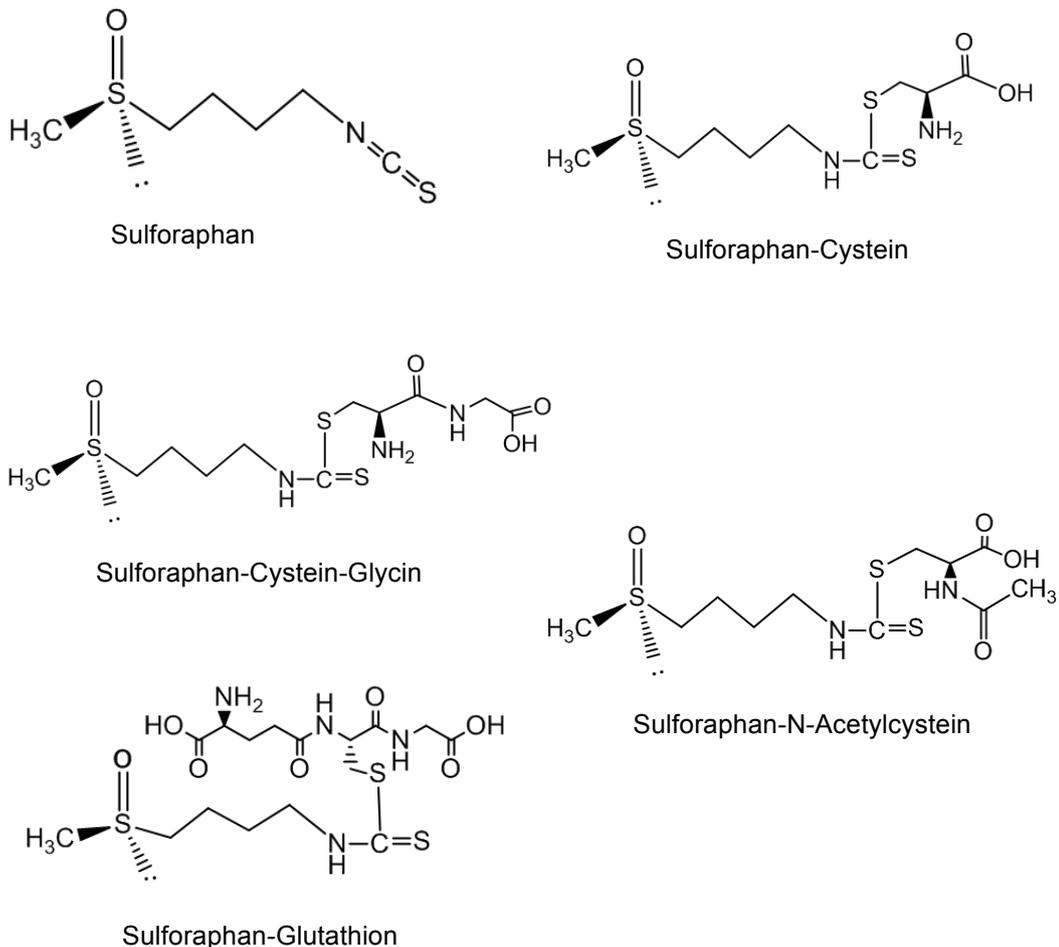


Abbildung 5: Sulforaphan und dessen Metabolite

Ye et al. konnten 2002 zeigen, dass sich in Zellen, die Sulforaphan ausgesetzt waren, Dithiocarbamate schnell in hohen Konzentrationen (mM-Bereich) einlagern. Es wurde angenommen, dass der Hauptteil davon aus GSH-Konjugaten bestand.

Außer im Blut wurden Metabolite der Isothiocyanate noch im Gastrointestinaltrakt, in der Leber und in der Niere in höheren Konzentrationen im Vergleich zu anderen Geweben gefunden. Studien zeigten, dass durch Polymorphismen der Gluthation-S-Transferase (EC 2.5.1.18) und in der N-Acetyltransferase (EC 2.3.1.5) die Ausscheidung und Metabolisierung beeinflusst werden kann (Vermeulen et al. 2008; Verkerk et al. 2009). In einer Studie mit sechs Probanden von Petri et al. 2003 konnte gezeigt werden, dass Sulforaphan im Dünndarm durch passive Diffusion zu $74 \pm 29 \%$ in die Darmzellen aufgenommen wird, wo ein Teil des Sulforaphans mit Glutathion konjugiert und anschließend wieder in das Lumen rücktransportiert wird. Abbildung 4 zeigt die Metabolisierung von Sulforaphan über den Mercaptursäure-Weg (nach Hauder 2011). Die Konzentration von Sulforaphan im Körper, die Aussagen über die Bioverfügbarkeit geben kann, kann anhand von Kurzzeitparametern, wie Urin- und Plasmetaboliten, und Langzeitmarkern, wie Albuminaddukten, festgestellt werden (Kumar und Sabbioni 2010). In einer Studie von Hauder 2011 wurden zwölf männlichen Probanden jeweils 2,5 g Broccoli / kg Körpergewicht in fünf Interventionen roh, blanchiert, püriert, als Saft und als Extrakt jeweils einmalig verabreicht. Die Blut- und Urinkonzentrationen von Sulforaphan und dessen Metaboliten wurden in bestimmten Zeitabständen, ab einer halben bis 24 Stunden nach der Intervention, bestimmt. Nach Konsum von rohem und für vier Minuten bei 110 °C blanchiertem Broccoli war die Bioverfügbarkeit am höchsten, während sie nach Verabreichung von Broccolisaft am geringsten war. Nach Gabe von rohem Broccoli konnte im Blut freies Sulforaphan mit 115 nM, gefolgt von SFN-CYS-GLY mit 54 nM und SFN-NAC mit 32 nM detektiert werden. Die Konzentration der Metaboliten SFN-CYS und SFN-GSH bewegten sich bei allen Darreichformen unter 10 nM im Plasma. Der Hauptmetabolit im Urin war SFN-NAC mit 5183 nmol/mmol Kreatinin nach Konsum von rohem Broccoli, gefolgt von SFN mit 877 nmol/mmol Kreatinin; SFN-CYS-GLY wurde nur in sehr geringem Maße ausgeschieden (Hauder 2011). Vermeulen et al. (2008) verglichen

2. Glucosinolate und deren Abbauprodukte

die Bioverfügbarkeit von 200 g zerkleinertem, rohen mit in der Mikrowelle gekochtem Broccoli, der zusätzlich zu einer Mahlzeit verabreicht wurde. Anschließend wurden Urinproben in den folgenden 24 Stunden und Blutproben in den folgenden zwölf Stunden genommen. Die Plasmakonzentrationen von Sulforaphan, die mittels Umkehrphasen-HPLC-MS/MS ermittelt wurden, lagen nach zusätzlichem Konsum von rohem Broccoli durchschnittlich bei 103 nM. Damit lagen die Ergebnisse in einem ähnlichen Konzentrationsbereich wie die von Hauder. Nach Bolusgabe von 200 g gekochtem Broccoli wurde eine Plasmakonzentration von 31 nM ermittelt. Sulforaphan war nach Bolusgabe von rohem Broccoli mit durchschnittlich 37 % und bei gekochtem Broccoli mit 3 % im Urin, auf den Kreatiningehalt bezogen, detektierbar.

Ebenfalls ähnliche Plasmawerte von Sulforaphan konnten von Hanlon et al. (2009) detektiert werden. In dieser Studie wurden sechs Probanden einmalig jeweils 300 mL Broccolisaft verabreicht. Die Maximalkonzentration von Sulforaphan im Plasma wurde nach einer Stunde mit 12 ng / mL erreicht, was circa 69 nM Sulforaphan entsprach.

Gaspar et al. (2005) führten eine Studie mit 16 Probanden durch, bei der einmalig eine Broccolisuppe aus 100 g Broccoli verabreicht wurde. Zwanzig Minuten bis acht Stunden nach Verabreichung der Suppe wurden Blut- und Urinproben entnommen. Die Konzentrationen der Metabolite wurden mittels Massenspektrometrie bestimmt. Als quantitativ dominierender Metabolit im Vergleich zu allen im Plasma detektierten Metaboliten wurde auch in dieser Studie freies Sulforaphan mit 42 % detektiert, gefolgt von SFN-CYS mit 30 % und SFN-CYS-GLY mit 16 %. Im Urin wurde als quantitativ dominierender Metabolit SFN-NAC mit 68 %, gefolgt von SFN-CYS mit 23 % und freiem Sulforaphan mit 12 % detektiert. Die Gesamtkonzentration im Plasma von freiem Sulforaphan und den Metaboliten belief sich auf 11 µM. Im Vergleich zur Studie von Hauder waren die Konzentrationsverhältnisse der einzelnen Metabolite ähnlich, die absoluten Plasmakonzentrationen jedoch höher. Gründe dafür könnten im anderen Studiendesign und in anderen Zubereitungsverfahren liegen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Sulforaphan bioverfügbar ist. Im Plasma und Urin liegt Sulforaphan als freies Sulforaphan sowie in Form von verschiedenen Metaboliten vor.

2.2.2. Metabolisierung von Indol-3-Carbinol und Ascorbigen

Aus Glucobrassicin (siehe Abbildung 6) entsteht unter Einwirkung der Myrosinase (EC 3.2.1.147) im neutralen pH-Bereich das instabile Zwischenprodukt

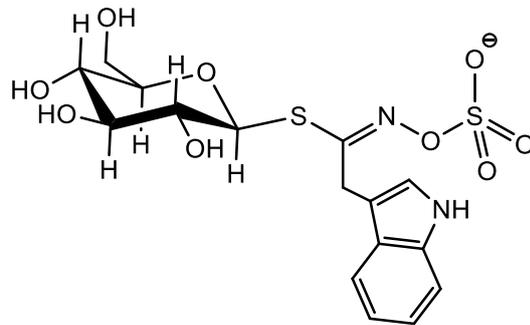


Abbildung 6: Glucobrassicin

Indol-3-Methylisothio-cyanat. Nach Abspaltung von SCN^- entsteht Indol-3-Carbinol (I3C), das mit Hilfe von Ascorbinsäure Ascorbigen (ASG) bildet (Strukturformeln siehe Abbildung 7). Durch oxidative Metabolisierung ohne Ascorbinsäure entsteht der Metabolit Indol-3-Carbonsäure (I3-CA) (Bradfield et al. 1987).

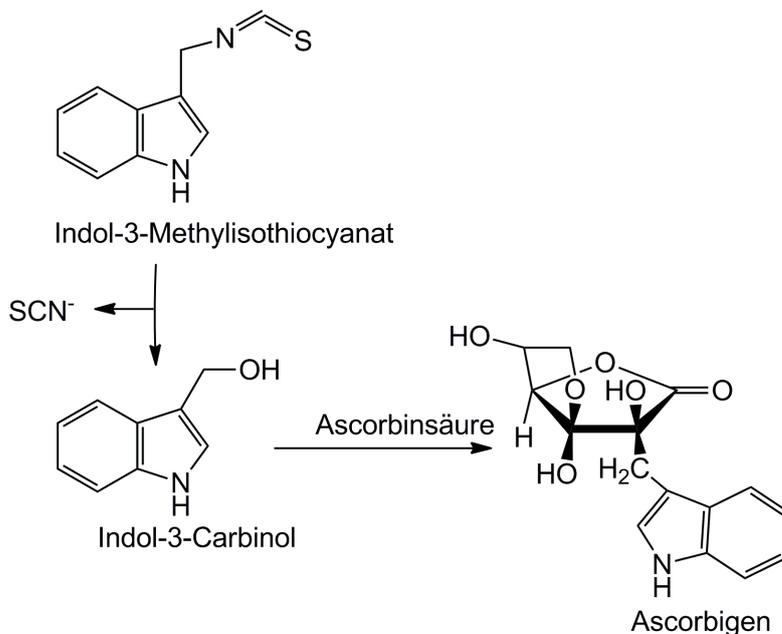


Abbildung 7: Bildung von Indol-3-Carbinol und Ascorbigen.

Bradfield et al. (1987) gaben als Hauptmetaboliten von Glucobrassicin *in vitro*

2. Glucosinolate und deren Abbauprodukte

Indol-3-Carbinol an, Preobrazhenskaya et al. (1993) Ascorbigen. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Bildung von Ascorbigen die Bildung von Indol-3-Carbinol gehemmt wurde (Preobrazhenskaya et al. 1993). Hauder et al. (2011) untersuchten als erste den *in vivo* Metabolismus von Glucobrassicin aus Broccoli. Es konnte nach einmaliger Gabe von 200 g Broccoli kein Indol-3-Carbinol im Plasma nachgewiesen werden, jedoch konnte Indol-3-Carbonsäure im Vergleich dazu in sehr hohen Konzentrationen, und zwar mit 480 nM bei rohem Broccoli, detektiert werden. Die Konzentration von Ascorbigen im Plasma lag nach einmaliger Gabe von rohem Broccoli bei 20 nM. Die Urinausscheidung von ASG nach Verabreichung von rohem Broccoli lag bei 76 nmol/mmol Kreatinin und für I3-CA bei 362 nmol/mmol Kreatinin. Das niedrige Vorkommen von Indol-3-Carbinol könnte darin begründet liegen, dass die Verbindung im sauren pH-Bereich instabil ist. Auch im menschlichen Magen herrscht ein saurer pH-Wert vor.

Die hohen Konzentrationen von Indol-3-Carbonsäure können darauf zurückzuführen sein, dass diese Verbindung ein Zwischenprodukt im Tryptophanmetabolismus ist und daher *in vivo* auch unabhängig von der Glucosinolatzufuhr gebildet wird. Eine hohe Konzentration dieses Metaboliten könnte sich nach Hauder (2011) verringernd auf Indol-3-Carbinolkonzentrationen auswirken.

Inwieweit die Indol-3-Carbonsäurekonzentrationen daher aus dem Broccolikonsum stammten, konnte nicht ermittelt werden.

3. Physiologie von Adipozyten

3.1. Einleitung

Braunes Fettgewebe

Das braune Fettgewebe dient hauptsächlich zur Wärmebildung, weniger zur Fettspeicherung. Es hat eine größere Anzahl an Mitochondrien als weißes Fettgewebe und ein höheres Vorkommen an entkoppelnden Proteinen (uncoupling proteins, UCPs), vor allem dem UCP-1 (Dulloo und Samec 2001), mit dessen Hilfe die ATP-Bildung deutlich verhindert werden kann (Rangwala und Lazar 2000; Rosen und MacDougald 2006). Braune Fettzellen, die UCP-1 exprimieren, und weiße Fettzellen, die kein UCP-1 exprimieren (Dulloo und Samec 2001), stammen von anderen Vorläuferzellen ab. Die Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen zu braunem Fettgewebe erfolgt vor der Geburt (Rosen und Spiegelman 2000). Speicher von braunem Fettgewebe sind beim Menschen nur in der Kindheit vorhanden. Im Erwachsenenalter deutet eine Expression von UCP-1 im weißen Fettgewebe auf das Vorhandensein von einzelnen braunen Fettgewebszellen hin (Rangwala und Lazar 2000; Rosen und MacDougald 2006).

Weißes Fettgewebe

Die Entwicklung (Differenzierung) des weißen Fettgewebes findet vor und nach der Geburt statt (Rangwala und Lazar 2000). Während des Wachstums besteht hoher Bedarf an Energiespeicherung. Im Erwachsenenalter wird bei übermäßiger Energieaufnahme sowie im Rahmen normaler Stoffwechselfvorgänge Fett gebildet. Die Größe der Fettzellen kann schwanken, sie ist jedoch limitiert. Die Anzahl der Fettzellen ist zum Zeitpunkt der Geburt nicht vorgegeben. Auch im Erwachsenenalter können neue weiße Fettzellen gebildet werden; so konnten bei Gregoire et al. (2001) in alten Mäusen frühe Marker der Fettdifferenzierung nachgewiesen werden und die Anzahl der Fettzellen im Zuge einer kohlenhy-

3. Physiologie von Adipozyten

dratreichen Ernährung gesteigert werden. Außerdem konnten isolierte weiße Vorläuferzellen aus menschlichem Gewebe weiter zu ausgewachsenen Fettzellen differenziert werden (Gregoire et al. 1998; Rosen und Spiegelman 2000). Gereifte Adipozyten, die zellulären Hauptbestandteile des weißen Fettgewebes, sind hoch spezialisierte Zellen. Sie dienen der Energiereserve durch die Einlagerung von Triglyceriden, die beim Fasten wieder als freie Fettsäuren freigesetzt werden (Kim und Moustaid-Moussa 2000; Gregoire 2001). Außerdem sezernieren Adipozyten verschiedene Proteine, Zytokine und Wachstumsfaktoren, die bei immunologischen Prozessen, vaskulären Erkrankungen, bei der Appetitregulation, der hormonellen Fettregulierung und der Regulierung des Energiehaushaltes eine Rolle spielen. Das Fettgewebe hat dadurch Einfluss auf den Stoffwechsel anderer Gewebe, auch Gehirn, Leber und Muskeln (Kim und Moustaid-Moussa 2000; Gregoire 2001).

Weißes Fettgewebe weist je nach Lokalisation andere Eigenschaften und physiologische Besonderheiten auf, zum Beispiel ist eine Erhöhung des viszeralen Fettes mit einem erhöhten Risiko für Insulinresistenz und Herzkrankheiten assoziiert (Rangwala und Lazar 2000; Rosen und MacDougald 2006).

Weißes Fettgewebe kann Eigenschaften von braunem Fettgewebe unter Kälteeinwirkung oder exzessiver Katecholaminzufuhr (z. B. Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin) zeigen (Rangwala und Lazar 2000; Rosen und MacDougald 2006).

Außerdem werden auch im weißen Fettgewebe UCPs exprimiert, nämlich das UCP-2, UCP-3 und UCP-5 (Dulloo und Samec 2001; Kopecky et al. 2001).

3.2. Lipogenese in Adipozyten

Die Lipogenese findet beim Menschen zu 40 % im Fettgewebe statt (Kopecky et al. 2001). Nach einer Mahlzeit erfolgt die Aufnahme von ca. 2 – 4 % der mit der Nahrung konsumierten

Glucose in die Adipozyten. Wie in Abbildung 8 ersichtlich, wird über die Glucosetransporter (GLUT) Glucose aufgenommen, wobei die insulinstimulierte Aufnahme durch GLUT4 erfolgt. Aus der Glucose wird im Rahmen der Glykolyse

Dihydroxyaceton-Phosphat und in weiterer Folge Glycerol-3-Phosphat gebildet, das mit Fettsäuren verestert

Triglyzeride bildet. Die Fettsäuren werden zuvor durch die Lipoproteinlipase (EC 3.1.1.3) aus Chylomikronen und VLDLs abgespalten und über Fettsäuretransporter in die Fettzellen transportiert. Auch aus Pyruvat kann Glycerol-3-Phosphat gebildet werden. Als lipogener Transkriptionsfaktor spielt hier das Sterol-regulierende Element-bindende Protein 1c (SREBP-1c), das über Insulin stimuliert wird, eine große Rolle. Insulin stimuliert auch die Lipoproteinlipase (EC 3.1.1.3) und das Acylierung-stimulierende Protein, das für die Veresterung der Fettsäuren mit Glycerol-3-Phosphat verantwortlich ist (Wirth 2008).

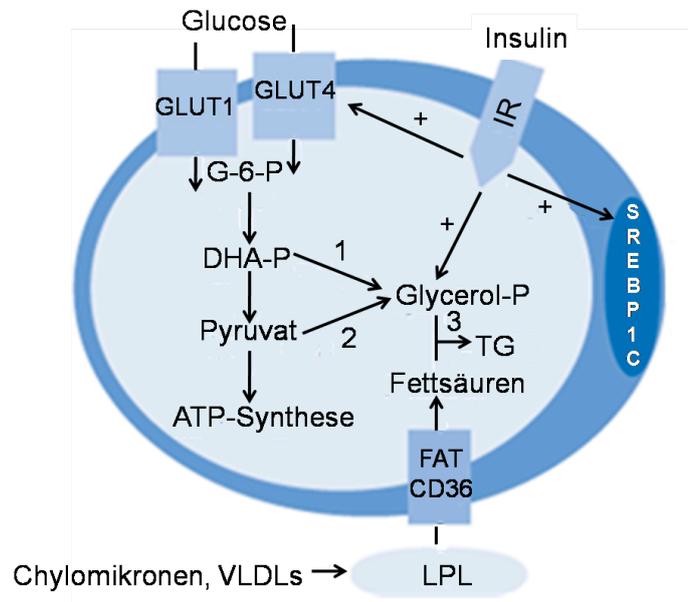


Abbildung 8: Ablauf und Regulation der Lipogenese durch Insulin (Wirth 2008). GLUT: Glucosetransporter; G-6-P: Glucose-6-Phosphat; DHA-P: Dihydroxyaceton-Phosphat; ATP: Adenosin-Triphosphat; IR: Insulinrezeptor; TG: Triglyceride; FAT CD36: Fettsäure Translokase; LPL: Lipoproteinlipase; SREBP1c: Sterol-regulierendes Element-bindendes Protein; VLDL: triglyzeridreiche Lipoproteine mit sehr geringer Dichte.

Einfluss von Insulin auf den Stoffwechsel

Insulin ist ein anaboles Hormon und wird im menschlichen Körper in den β -Zellen des Pankreas gebildet. Es hat die Struktur eines Polypeptids, das aus

3. Physiologie von Adipozyten

zwei Peptidketten, Kette A mit 21 bzw. Kette B mit 30 Aminosäureresten, besteht. Die Peptidketten sind über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden (Thews et al. 1999). Die gesamte Struktur des Insulin, die in Abbildung 9

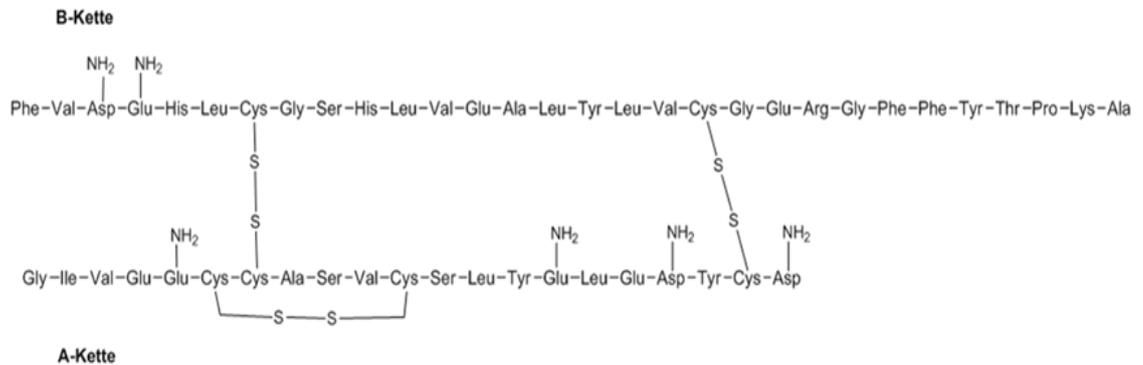


Abbildung 9: Struktur von Rinderinsulin, modifiziert nach Sanger 1960. Beim Menschen: In A-Kette: statt Ala – Thr; statt Val – Ile; in B-Kette: statt Ala – Thr (Thews et al. 1999). Phe = Phenylalanin, Val = Valin, Asp = Asparaginsäure, Glu = Glutamin, His = Histidin, Leu = Leucin, Cy = Cystein, Gly = Glycin, Ser = Serin, Ala = Alanin, Tyr = Tyrosin, Arg = Arginin, Thr = Threonin, Pro = Prolin, Lys = Lysin, Ileu = Isoleucin.

gezeigt ist, wurde von Sanger (1960) nach zwölfjähriger Forschungsarbeit anhand von Rinderinsulin identifiziert. Zwischen den verschiedenen Spezies gibt es nur sehr kleine Unterschiede in der Aminosäuresequenz. Die Wirkungsweise des Insulins ist dabei weitgehend identisch. Menschliches Insulin unterscheidet sich vom Rinderinsulin innerhalb des Disulfidringes der A-Kette. Statt Alanin ist Threonin und anstatt Valin ist Isoleucin eingebaut; als letzte Aminosäure in der B-Kette befindet sich beim Menschen Threonin (Thews et al. 1999).

Der Anreiz für die Insulinfreisetzung ist der Anstieg von Glucose und von freien Aminosäuren, freien Fettsäuren und gastrointestinalen Hormonen im Blut. Die Wirkungen von Insulin auf den Kohlenhydrat-, Lipid- und Proteinstoffwechsel sind in Tabelle 2 zusammengefasst:

Tabelle 2: Insulinwirkungen auf den Stoffwechsel (Thews et al. 1999).

		Effektorzellen	Nettoeffekt	
Kohlenhydratstoffwechsel				
Glucosetransport	↑	M, F	} Blut-Glucosespiegel Glucoseumsatz	↓ ↑
Glycogensynthese	↑	M, F, L		
Glycogenolyse	↓	M, F, L		
Gluconeogenese	↓	L		
Glykolyse	↑	M, F, L		
Lipidstoffwechsel				
Lipogenese	↑	F, L	Freie Fettsäuren im Plasma	↓
Lipolyse	↓	F, L	Ketogenese	↓
Proteinstoffwechsel				
Aminosäuretransport	↑	M, F	} Aminosäuren im Plasma Positive Stickstoff-Bilanz Blut-Glucosespiegel	↓ ↓
Proteinsynthese	↑	M, L		
Proteinabbau	↓	M, L		
Gluconeogenese	↓	L		

Modifiziert nach Thews, Mutschler, Vauper, 1999. M = Muskelzelle, F = Fettzelle, L = Leberzelle, ↑ = Steigerung, ↓ = Hemmung

Durch Insulin wird der Glucosetransport in Muskel- und Fettzellen gefördert, sowie die Lipogenese gesteigert. Diese Wirkung von Insulin wird bei *in vitro* Studien mit Fettzellen genutzt.

Aufnahme von Glucose in Adipozyten durch den Glucosetransporter GLUT 4

Zurzeit sind vier Glucosetransporter bekannt (GLUT1-4), die sich je nach Isoform in anderen Zellarten befinden. GLUT4 ist das Haupttransportprotein für Glucose im Muskel- und Fettgewebe und wurde in den 1980er Jahren entdeckt (Cushman und Wardzala 1980).

Die Diffusionsraten von Glucose durch den GLUT4 sind geschwindigkeitsbestimmend für den gesamten Glucosemetabolismus im Muskel- und Fettgewebe (Armoni et al. 2007).

Die Proteine sind in speziellen Vesikeln im Zellinneren gespeichert. Durch Insulinstimulierung wird der Insulinrezeptor aktiviert. Dieser löst eine über Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-Kinase) (EC 2.7.1.137) und die Proteinkinase B (EC 2.7.11.1) aktivierte Signalkaskade aus (Watson und Pessin 2001), an der ins-

3. Physiologie von Adipozyten

gesamt über 60 Verbindungen beteiligt sind. GLUT4-Proteine werden an die Zelloberfläche transloziert. Der Anteil von GLUT4 an der Oberfläche wird von 10 % auf 50 % gesteigert (Cushman und Wardzala 1980)

Der Effekt von Insulin auf die GLUT4-Verteilung auf der Zelloberfläche ist reversibel (Watson und Pessin 2001). Zeigerer et al. 2002 beschrieben, dass innerhalb einer Stunde nach Insulinstimulierung GLUT4 wieder von der Oberfläche der 3T3-L1-Zellen entfernt und in intrazelluläre Vesikel eingelagert wurde.

Es wurde gezeigt, dass GLUT4 auch ohne Insulinstimulation, unabhängig von der PI3-Kinase (EC 2.7.1.137), an die Oberfläche transportiert werden kann. Die Auslösefaktoren hierzu waren Muskelaktivität oder Hypoxie (Watson und Pessin 2001).

Der Peroxisom-Proliferator aktivierte Rezeptor γ (PPAR γ), der hauptsächlich von insulin-sensitivem Gewebe exprimiert wird, ist ein bedeutender Faktor bei der Adipozytendifferenzierung und im Fettmetabolismus. Im Glucosemetabolismus trägt er vor allem zur Regulierung der GLUT4-Genexpression bei (Armoni et al. 2007). Durch Aktivierung der Proteinkinase B (EC 2.7.11.1) durch PPAR γ wird die GLUT4-Translokation aus den intrazellulären Speichervesikeln an die Zelloberfläche gefördert. Die Aktivierung der Proteinkinase B (EC 2.7.11.1) inhibiert gleichzeitig auch die Apoptose der Zelle (Morrison und Li 2011).

3.3. Lipolyse in Adipozyten

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Lipolyse ist die Abspaltung der ersten Fettsäure vom Triglycerid durch die hormonsensitive Lipase (HSL) (EC 3.1.1.3) und die Adipozyten-spezifische Triglyceridlipase (EC 3.1.1.3). Insulin wirkt auf die HSL hemmend, Katecholamine wirken fördernd. Der Abbau der Fettsäuren erfolgt anschließend durch die β -Oxidation in der mitochondrialen Matrix und liefert Acetyl-CoA-Einheiten, die in weiterer Folge in das Blut abgegeben oder in die Atmungskette und den Citratzyklus eingeschleust werden können (Löffler 2005).

Die Lipolyse wird von der ATP-Konzentration in der Zelle reguliert. Niedrige Konzentrationen an ATP, z. B. nach Entkopplung der oxidativen Phosphorylie-

zung, verringern die Lipolyse, die durch Katecholaminwirkung ausgelöst wird (Kopecky et al. 2001).

3.4. Aufbau der Atmungskette und der Einfluss von Entkopplern auf den Stoffwechsel

Die Enzymkomplexe der Atmungskette und oxidativen Phosphorylierung (siehe Abbildung 10) sind in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Als Substrate für die ATP-Synthase (EC 3.6.3.14) dienen die wasserstoffübertragenden

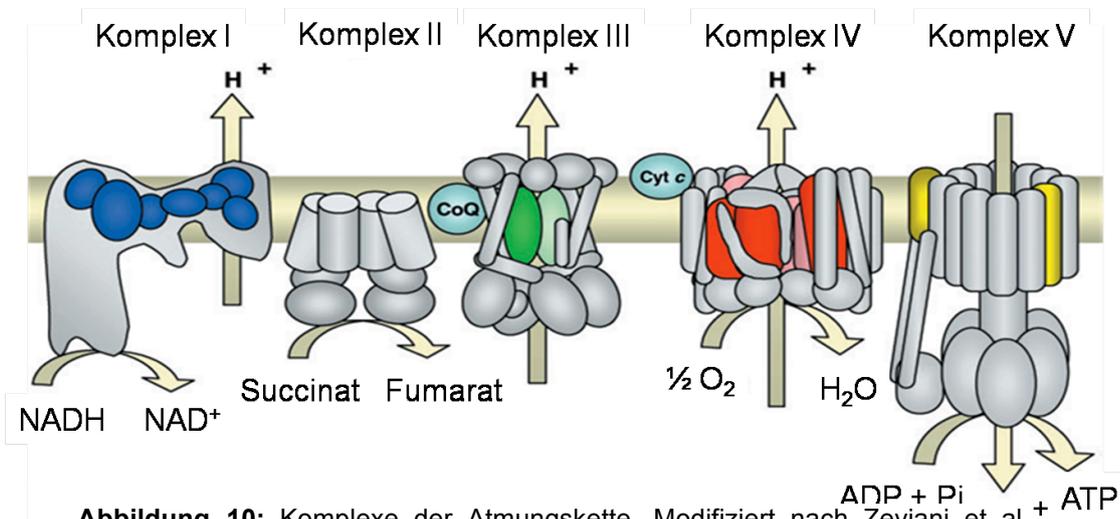


Abbildung 10: Komplexe der Atmungskette. Modifiziert nach Zeviani et al. Komplex I: NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase; Komplex II: Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase; Komplex III: Ubichinol-Cytochrom c-Oxidoreduktase; Komplex IV: Cytochrom c-Oxidase; Komplex V: ATP-Synthase; NADH und NAD: Nicotinamidadenindinukleotid in oxidierter und reduzierter Form; ADP: Adenosindiphosphat; ATP: Adenosintriphosphat; CoQ: Ubiquinon; Cyt c: Cytochrom C. (Zeviani und Di Donato 2004).

Reduktionsäquivalente $NADH_2$ und $FADH_2$ aus dem Citratzyklus und der β -Oxidation der Fettsäuren, deren Enzyme sich in der mitochondrialen Matrix befinden. $NADH_2$ und $FADH_2$ werden mit Sauerstoff als Oxidationsmittel reoxidiert. Durch den Elektronentransport wird in weiterer Folge ein elektrochemisches Potential aufgebaut, das den Transport von Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum ermöglicht. Ein Protonengradient wird aufgebaut, der zur Bildung von ATP genutzt wird (Löffler 2005).

Es gibt Hemmstoffe für einzelne Enzymkomplexe der Atmungskette. Die Tabelle 3 gibt eine Übersicht:

3. Physiologie von Adipozyten

Tabelle 3: Hemmstoffe der Atmungskette (Löffler 2005).

Atmungskomplex	Hemmstoffe
I	Rotenon, Barbiturate
III	Antimycin A
IV	HCN, CO, H ₂ S
V	Oligomycin

3.4.1. Entkoppler der Atmungskette

Durch Entkoppler wird das mitochondriale Membranpotential abgebaut. Es findet keine Verknüpfung von Oxidation und Phosphorylierung statt.

Chemische Entkoppler sind lipophile organische Verbindungen, die leicht protoniert und deprotoniert werden können. Solche als Protonophore bezeichnete Verbindungen können Protonen im Intermembranraum binden, durch die Membran transportieren und in der Matrix wieder abgeben. Der Protonophor kehrt schließlich als Anion wieder in den Intermembranraum zurück. Da der Protonentransport die ATP-Synthase (EC 3.6.3.14) umgeht, erfolgt ein kontinuierlicher Abbau des elektrochemischen Potentials. Die Redoxreaktionen sind damit von der ADP-Phosphorylierung unabhängig. Die Atmungsgeschwindigkeit wird nicht mehr vom vorhandenen ADP bestimmt. Die Energie des elektrochemischen Gradienten wird als Wärme frei (Kopecky et al. 2001; Si et al. 2009)

Chemische Entkoppler sind beispielsweise 2,4-Dinitrophenol und Carbonyl-Cyanid-p-Trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP). Beide können die Atmung bis zum maximalen Sauerstoffverbrauch steigern ohne dass dies mit einer ATP-Bildung einhergeht (Desquiret et al. 2006; Si et al. 2009).

Natürliche Entkoppler sind entkoppelnde Proteine und Fettsäuren. UCPs können als Ionenkanäle Protonen vom mitochondrialen Intermembranraum in die Matrix schleusen. Die ATP-Synthase (EC 3.6.3.14) kann so umgangen werden. Im braunen Fettgewebe werden UCP-1, das auch als Thermogenin bekannt ist, UCP-2 und UCP-3 exprimiert. UCP-1 besitzt die höchste Wirksamkeit zur Entkopplung. Auch im weißen Fettgewebe werden, wie bereits erwähnt, UCPs exprimiert, nämlich UCP-2, UCP-3 und UCP-5 (Dulloo und Samec 2001; Kopecky et al. 2001). UCP-2 und UCP-3 spielen laut Dulloo und Samec (2001) bei der

Wärmebildung wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle. Eine Förderung der Wärmebildung durch UCP-2 konnte auch bei Dikov et al. (2010) nicht gezeigt werden, jedoch konnte eine verringerte Energiebildung bei fettreicher Ernährung gezeigt werden. Es gibt auch Hinweise, dass UCP-2 die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, und UCP-3 den Fettsäurekreislauf in den Mitochondrien reguliert.

UCP-5 wird ebenfalls nur eine sehr geringe Entkoppelungswirkung zugeschrieben (Jezek et al. 2004).

Weitere natürliche Entkoppler sind Fettsäuren. Es wird angenommen, dass die anionischen Formen durch UCPs und ATP/ADP-Antiporter in den Intermembranraum gelangen. Die protonierten Fettsäuren können daraufhin leicht durch die Membran wieder rückdiffundieren und so eine Translokation von Protonen bewirken (Skulachev 1998). Nach Kadenbach et al. (2003) finden diese Vorgänge jedoch nur bei sehr hohen Fettsäurekonzentrationen (10 – 100 μM) statt und sind daher wahrscheinlich *in vivo* nicht von Bedeutung.

Im Zuge der Literaturrecherche konnten keine Studien mit Sulforaphan und schwefelhaltigen Verbindungen im Bezug auf eine entkoppelnde Wirkung gefunden werden. Die entkoppelnden Eigenschaften eines anderen Isothiocyanates, Bromphenylisothiocyanat, bzw. dessen Dithiocarbamate, wurden jedoch bereits 1979 in einer Studie von Terada und Kubota (1979) gezeigt. Durch die Entkopplung mit diesen Substanzen konnte der Protonengradient beeinflusst werden.

Natürliche Substanzen, bei denen entkoppelnde Wirkungen aufgrund von protonophoren Eigenschaften festgestellt werden konnten, sind Platanetin, ein Flavon, das aus dem Baum *Platanus acerifolia* isoliert wurde, Zearalenon, ein Mykotoxin, das in Pflanzen und Pilzen nachgewiesen werden konnte, und Curcumin (Skulachev 1998; Lim et al. 2009).

Curcumin, ein phenolisches Diketon und natürlicher Farbstoff in der Gelbwurzel (*Zingiberaceae*), zeigte bei Lim et al. (2009) sowohl entkoppelnde als auch hemmende Eigenschaften. Bei Konzentrationen unter 50 μM wirkte diese Substanz bei isolierten Mitochondrien von HepG2-Zellen, menschliche Leberkarzinomzellen, als Protonophor. Bei Konzentrationen über 50 μM wirkte Curcumin als Hemmer der Elektronentransportkette. Diese Eigenschaft als sogenannter

3. Physiologie von Adipozyten

„hemmender Entkoppler“ kann laut Lim et al. (2009) auf die Phenolgruppe zurückzuführen sein.

Tejerina et al. (2009) behandelten 3T3-L1-Zellen mit 0,5 μ M FCCP einen Tag bis sechs Tage lang. Die Inkubation fand hier jedoch erst nach der Differenzierungs- und Reifungsphase statt. Es wurde mit Oil Red O der Triglyceridgehalt und die Genexpression der relevanten Gene des Lipidstoffwechsels mittels qPCR bestimmt. Die Ergebnisse zeigten keine Veränderungen im Triglyceridgehalt nach einem Tag, eine Verringerung um 20 % nach drei Tagen und einen um die Hälfte verringerten Triglyceridgehalt in den Zellen nach sechstägiger Inkubation mit FCCP. Eine geringere Expression der Gene CCAT / Enhancer-bindendes Protein δ (C/EBP δ), SREBP1 und PPAR γ wurde außerdem festgestellt.

4. Zellulärer Energiestoffwechsel von Diabetes Typ 2 bei Adipositas

Übergewicht und Adipositas sind Risikofaktoren für die Entstehung von Diabetes Typ 2 (Stolar 2010). Die Entwicklung ist in Abbildung 11 schematisch dargestellt.

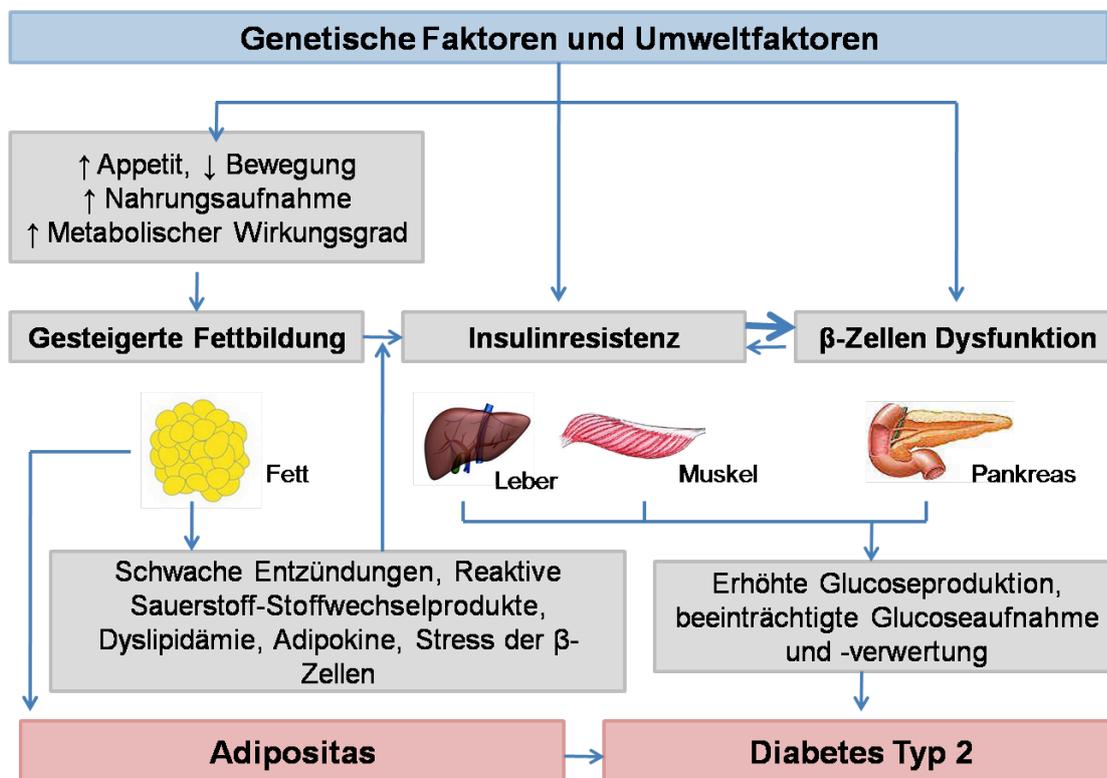


Abbildung 11: Pathogenese von Diabetes Typ 2 bei Adipositas. Modifiziert nach Bailey et al. (Bailey 2011).

Diabetes Typ 2 entsteht in Folge einer beeinträchtigten Insulinwirkung, z. B. durch die Insulinresistenz, zu deren Kompensation anfangs mehr Insulin von den β -Zellen des Pankreas ausgeschüttet wird. Wenn die Insulinproduktion nicht mehr ausreicht, um die Insulinresistenz zu kompensieren, wird nicht mehr genug Glucose in die Zellen aufgenommen. Es entwickelt sich Hyperglykämie. Der fortschreitende Verlust oder das Fehlverhalten der β -Zellen ist die Folge. Komplikationen, die in weiterer Folge auftreten können, sind vor allem durch die auftretenden mikrovaskulären und makrovaskulären Störungen bedingt (Stolar 2010; Bailey 2011).

4. Zellulärer Energiestoffwechsel von Diabetes Typ 2 bei Adipositas

Beim Fortschreiten der Erkrankung, aber auch bei der Entwicklung der vorangehenden Insulinresistenz werden der Glucose und den Fettsäuren eine bedeutende Rolle zugeschrieben. Ein chronisch erhöhter Glucosewert im Blut kann zu einer geringeren Masse der β -Zellen und zu einer verringerten Insulinantwort auf eine Glucosestimulierung führen. Ein erhöhter Gehalt an freien Fettsäuren, der häufig bei Übergewicht auftritt, spielt wahrscheinlich bei der Entstehung der Hyperplasie der β -Zellen, gesteigerter Insulinsekretion und in der Folge niedrigen Glucosespiegeln eine Rolle. Eine anschließende Akkumulierung von langkettigen Fettsäuren in den β -Zellen hemmt die durch Glucose stimulierte Insulinsekretion (Stolar 2010). Auch umgekehrt wird die insulinstimulierte Glucoseaufnahme durch die Bildung von lipotoxischen Fettsäuremetaboliten, die aus freien Fettsäuren entstehen, gehemmt (Dumas et al. 2009).

Bei der Bildung von lipotoxischen Fettsäuremetaboliten spielt der Grad der Fettoxidation eine Rolle (Turner und Heilbronn 2008). *In vitro* Studien mit Skelettmuskelzellen beschäftigten sich mit dem Zusammenhang einer Fehlfunktion in der Atmungskette, der sogenannten mitochondrialen Dysfunktion, und der Entstehung von Insulinresistenz (Turner und Heilbronn 2008; Dumas et al. 2009; Goulet et al. 2009; Kim et al. 2009; Murrow und Hoehn 2010). Die Dysfunktion der mitochondrialen Phosphorylierung zeigt sich durch beeinträchtigten Ablauf der Atmungskette und verringerter Anzahl an Mitochondrien. In einem Review von Murrow et al. (2010) wurden bisherige Studien mit Skelettmuskelzellen verglichen. Die Insulinresistenz konnte in einigen Studien durch eine zu hohe Fettsäureoxidation herbeigeführt werden. Andererseits konnte in anderen Studien gezeigt werden, dass eine Insulinresistenz auch durch eine zu niedrige Fettsäureoxidation, und damit einhergehend eine vermehrte Bildung von lipotoxischen Fettsäuremetaboliten, ausgelöst werden kann (Turner und Heilbronn 2008; Dumas et al. 2009; Murrow und Hoehn 2010).

Bei Gao et al. (2010) konnte die Entstehung einer Dysfunktion in ausdifferenzierten 3T3-L1-Zellen durch Inkubation mit hohen Gehalten an freien Fettsäuren (1 mM) und Glucose (25 mM) für 48 Stunden nachgewiesen werden. Die Aufnahme von radioaktiv markierter 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-Desoxyglucose (2-NBDG) (Inkubation mit 2 μ Ci / mL) sank um 60 %, gleichzeitig konnten Deformationen der Mitochondrien festgestellt werden.

4. Zellulärer Energiestoffwechsel von Diabetes Typ 2 bei Adipositas

Bei Kim et al. (2009) wurde durch eine einstündige Inkubation mit 10 μ M FCCP, das die oxidative Phosphorylierung entkoppelt, eine mitochondriale Dysfunktion ausgelöst, die in weiterer Folge zu einer Insulinresistenz bei 3T3-L1-Zellen führte. Die Aktivität der PI3-Kinase (EC 2.7.1.137), die bei der Translokation von GLUT4 eine Rolle spielt, war um die Hälfte verringert, und 2-NBDG wurde um 75 % weniger aufgenommen. Es wurde gezeigt, dass die entstandenen freien Fettsäuren die Phosphorylierung des Insulin Rezeptor Substrates förderten, was gleichzeitig die Aktivität der PI3-Kinase (EC 2.7.1.137) senkte.

Eine Insulinresistenz kann laut Kim et al. 2009 auch durch das Einwirken von reaktiven Sauerstoffspezies, die in weiterer Folge eine Dysfunktion der oxidativen Phosphorylierung auslösen, entstehen.

Laut Dikov et al. (2010) wird durch die Entkopplung mit FCCP die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies verstärkt, durch Einfluss des UCP-2 wird die Bildung dieser Spezies reguliert.

5. Die 3T3-L-Zelllinie: Merkmale und Differenzierung

Für *in vitro* Studien betreffend des Verhaltens von Fettzellen und -geweben wurde die 3T3-L1-Zelllinie etabliert (Cowherd et al. 1999).

3T3-L1-Zellen sind embryonale Mausfibroblasten, die einschichtig in Zellkulturen wachsen (Abbildung 12) (Green und Meuth 1974), die Insulinrezeptoren besitzen (ATCC 2011) und Triglyceride bilden und einlagern können (Green 1977).

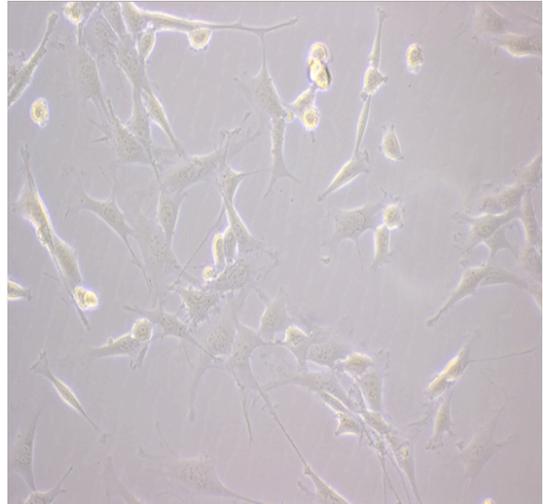


Abbildung 12: Kultivierte 3T3 L1 Zellen, fotografiert am zweiten Tag nach dem Ausstreuen, mit ca. 30 %iger Konfluenz, in zehnfacher Vergrößerung.

Die L1-Linie ist eine Sublinie der 3T3-Zelllinie, die aus Schweizer Albinomäusen durch klonale Isolation 1974 von Todaro und Green entwickelt wurde. Die Zellen besitzen eine schnelle Teilungsfähigkeit und zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, sich in Fettzellen differenzieren zu können. In der Anfangsphase der Reifung ähneln sie braunen Fettzellen, aber schlussendlich können sie eher mit weißen Fettzellen verglichen werden (Green und Meuth 1974). Für die Differenzierung der Präadipozyten zu Adipozyten ist der Zell-Zell-Kontakt keine Bedingung (Gregoire et al. 1998).

Die Differenzierung kann spontan, ohne Zusatz von speziellen Substanzen, nach einigen Wochen erfolgen, in denen die Präadipozyten mit Zusatz von fötalem Rinderserum kultiviert werden (Gregoire et al. 1998). Die Differenzierung kann jedoch auch chemisch induziert werden.

5.1. Entwicklung von pluripotenten Stammzellen zu Adipozyten

Wie in Abbildung 13 ersichtlich, beschreiben mehrere Phasen und unterschiedlichste Einflussfaktoren die Entwicklung einer pluripotenten Stammzelle bis hin zum Adipozyten. Verschiedene Umweltfaktoren und unterschiedliche Expression von Genen beeinflussen den Weg der Zellentstehung, der in mehrere Richtungen führen kann.

Aus pluripotenten Stammzellen entwickeln sich durch noch unbekannt Mechanismen mesenchymale Vorläuferzellen, die multipotent sind. Diese können sich weiter zu Präadipozyten entwickeln, die sich unter bestimmten Voraussetzungen weiter zu Adipozyten differenzieren können (Gregoire et al. 1998).

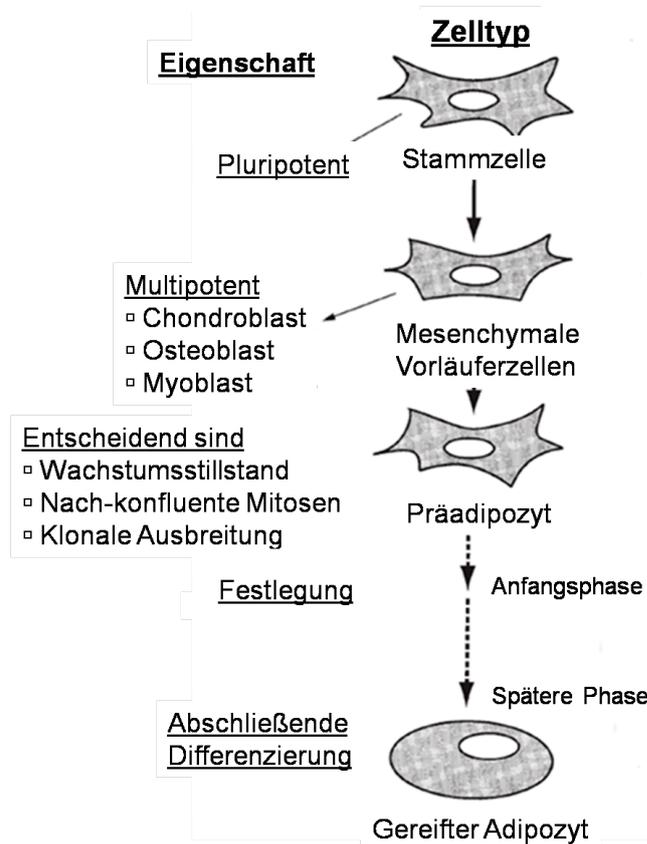


Abbildung 13: Phasen bis zur endgültigen Differenzierung zu Adipozyten (Gregoire et al. 1998). Modifiziert nach Gregoire et al.

Transkriptionsfaktoren bei der Differenzierung zu Adipozyten

Die Transkription ist ein wichtiger Teilprozess der Genexpression, bei der DNA in mRNA umgeschrieben wird. An der Adipozytendifferenzierung sind über 100 intrazelluläre und extrazelluläre Transkriptionsfaktoren beteiligt. Im Zentrum der Gentranskriptionskaskade, die die Adipogenese reguliert, befindet sich PPAR γ , der von einem noch unbekanntem Liganden aktiviert und von Faktoren, die die Fettbildung steigern bzw. senken, reguliert wird. Am Ende der Kaskade steht

5. Die 3T3-L1-Zelllinie: Merkmale und Differenzierung

die Produktion von Genen, wie denen von GLUT4, dem Insulinrezeptor und dem Adipozyten-spezifischen Fettsäure bindenden Protein (Rosen und Spiegelman 2000; Rosen und MacDougald 2006).

Bei der Differenzierung sind hauptsächlich drei Signalwege beteiligt: der Insulin-, Glucokortikoid- und cAMP-vermittelte Signalweg. Glucokortikoide erhöhen die Expression von PPAR γ -Proteinen. Auch cAMP-erhöhende Substanzen fördern in weiterer Folge die PPAR γ -Konzentrationen durch verstärkte Genexpression und steigern daher folgend die Adipozytendifferenzierung (Gregoire et al. 1998; Cowherd et al. 1999; Suzuki et al. 2011). Insulin erhöht die PPAR γ -Spiegel wahrscheinlich durch Erhöhung von SREBP-1c (Rangwala und Lazar 2000; Suzuki et al. 2011).

Hemmende Faktoren auf die Differenzierung von 3T3-L1-Zellen

Eine Hemmung der Differenzierung kann unter anderem durch Zytokine, wie den Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) und Interleukin 1 (IL-1), und Wachstumsfaktoren wie den Plättchenwachstumsfaktor, den Fibroblastwachstumsfaktor und den epidermalen Wachstumsfaktor, erfolgen. Diese können die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) (EC 2.7.11.24) aktivieren, die PPAR γ wiederum phosphoryliert.

Ein weiteres Beispiel für einen hemmenden Faktor ist das Oberflächen-Glycoprotein von Präadipozyten, der Präadipozytenfaktor-1 (PREF-1), der von den Zellen auch als lösliches Molekül freigesetzt werden kann. Während fortschreitender Differenzierung wird dessen Expression herunterreguliert. Er hemmt durch noch unbekannte Mechanismen (Cowherd et al. 1999; Rosen und Spiegelman 2000).

5.1.1. Phasen der Differenzierung von 3T3-L1-Zellen

Die Differenzierung von 3T3-L1-Zellen kann eingeleitet bzw. beschleunigt werden, indem dem Medium das Glucokortikoid Dexamethason, Insulin und die cAMP-erhöhende Substanz Isobutylmethylxanthin (IBMX) zugesetzt werden.

5. Die 3T3-L1-Zelllinie: Merkmale und Differenzierung

Nach viertägiger Behandlung mit diesen Substanzen differenzieren 90 % der Zellen zu Adipozyten (Cowherd et al. 1999).

Folgendes Schema (Abbildung 14) verdeutlicht die Adipozytendifferenzierung, die unter der Behandlung mit Insulin, IBMX und Dexamethason, stattfindet:

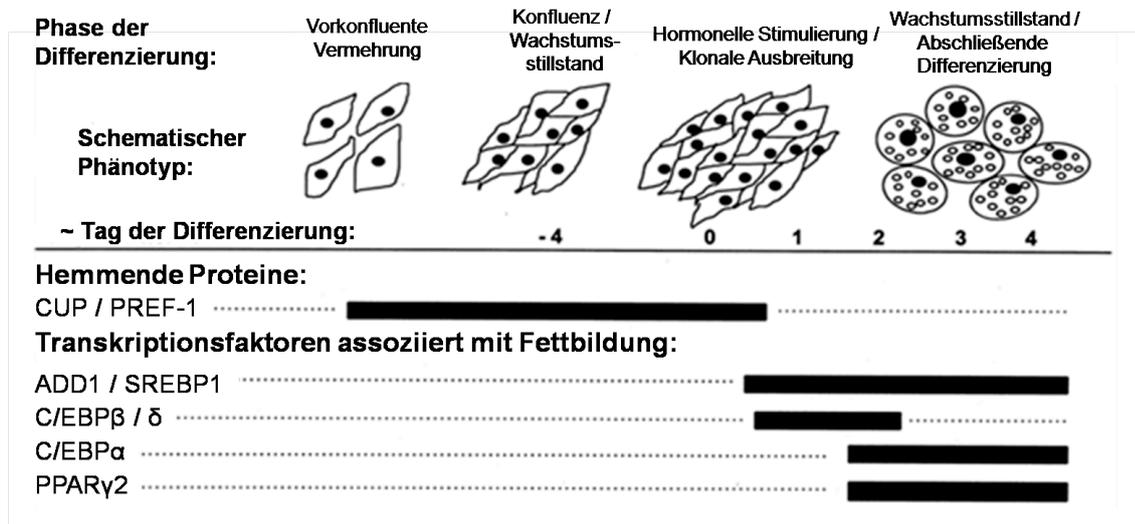


Abbildung 14: In vitro Adipozytendifferenzierung unter Zusatz von Insulin, Isobutylmethylxanthin und Dexamethason an Tag 0. Modifiziert nach Cowherd et al. (Cowherd et al. 1999). Die beeinflussenden Gene und Proteine in den verschiedenen Phasen sind angegeben. Am Tag 0 der Differenzierung sind die Zellen bereits 4 Tage nach-konfluent. CUP: C/EBPα-Nicht-differenzierendes Protein α; PREF-1: Präadipozyten Faktor 1; ADD1: Differenzierungsabhängiger Faktor 1; SREBP1: Sterol-regulierendes Element-bindendes Protein; C/EBP: CCAAT-erhöhendes, bindendes Protein; PPAR: Peroxisom-Proliferator aktivierter Rezeptor.

Die Entwicklung von 3T3-L1 zu Fettzellen kann in vier Phasen eingeteilt werden, wobei in jeder Phase spezifische Gene und Proteine exprimiert werden:

- 1. Phase:** Vorkonfluente Gewebevermehrung. Die Zellen erhalten die präadipöse Prägung.
- 2. Phase:** Konfluenz / Ruhephase. Die Zellen verweilen in der G₀/G₁-Phase des Zellzykluses.
- 3. Phase:** Hormonale Anregung / klonale Vermehrung. Die Zellen treten in die S-Phase des Zellzykluses ein, in der eine Runde bis zwei Runden Mitose stattfindet. Um diese Phase auszulösen sind bestimmte Stimuli notwendig. Charakterisiert wird diese Phase durch die Expression von C/EBPβ und C/EBPδ.

5. Die 3T3-L1-Zelllinie: Merkmale und Differenzierung

4. Phase: Permanente Ruhephase / endgültige Differenzierung. Sie ist charakterisiert durch den Austritt der Zelle aus dem Zellzyklus. Es sind vor allem PPAR γ und C/EBP α von Bedeutung. Die Zelle zeigt nun charakteristische Eigenschaften einer Fettzelle inklusive deutlich sichtbarer Fetttröpfchen (Cowherd et al. 1999; Rangwala und Lazar 2000).

5.1.2. Der gereifte Adipozyt

In Abbildung 15 sind ausdifferenzierte Adipozyten der 3T3-L1-Zelllinie dargestellt.

PPAR γ , der bedeutendste Faktor für die Ausdifferenzierung, ist auch wichtig für die Aufrechterhaltung des Differenzierungszustandes.

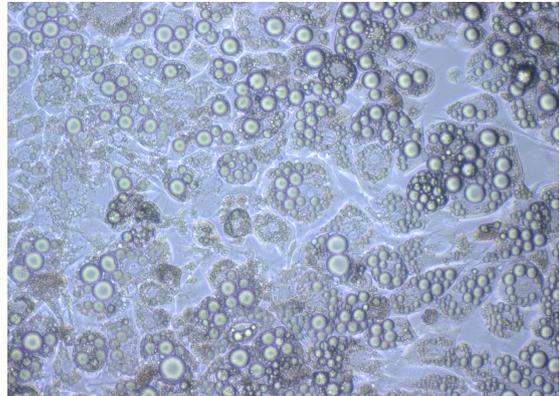


Abbildung 15. Ausdifferenzierte Fettzellen mit zahlreichen Fetteinlagerungen, am 18. Tag nach dem Ausstreuen, nach Initiation der Differenzierung am 4. Tag nach dem Ausstreuen. Kettenförmige Anlagerungen der Fetttröpfchen. Hundertfache Vergrößerung.

5.2. Einfluss von IBMX, Dexamethason und Insulin auf die Differenzierung von 3T3-L1-Zellen zu Adipozyten

IBMX, dessen Struktur in Abbildung 16 dargestellt ist, ist ein Purinalkaloid und Phosphodiesterase-Inhibitor. Durch Hemmung der Phosphodiesterase (EC 3.1.4.1) werden intrazelluläre cAMP-Konzentrationen erhöht. Es kann daher auch synthetisches cAMP statt IBMX eingesetzt werden. IBMX bewirkt die Erhöhung der Konzentrationen von C/EBP β (in weiterer Folge PPAR γ) und reagierendem Element-bindenden Protein (CREB). Gleichzeitig wird durch IBMX die Bildung vom stimulierenden Protein 1, das eine Hemmung von C/EBP α hervorruft, unterdrückt (Gregoire et al. 1998; Rosen und Spiegelman 2000).

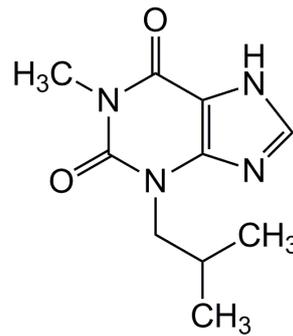


Abbildung 16: IBMX (3-Isobutyl-1-Methylxanthin)

Das in Abbildung 17 dargestellte Dexamethason (9-Fluor-16 α -Methylprednisolon) ist ein synthetisch hergestelltes Glucokorticoide und wird als Differenzierungsreagenz für verschiedene Präadipozyten-Zelllinien verschiedener Spezies (Ratten, Hasen, Schweine, Menschen) eingesetzt. Dexamethason aktiviert den Glucokorticoide Rezeptor. Durch Glucokorticoide wird die Expression des C/EBP δ erhöht und in weiterer Folge die PPAR γ Bildung gesteigert. Außerdem wird der PEF-1, der inhibierend auf die Differenzierung wirkt, durch Dexamethason gehemmt. Von Rosen et al. wurde festgestellt, dass Zellen, die C/EBP δ überexprimieren, auch Dexamethason benötigen. Es wird daher eine noch komplexere Rolle von Dexamethason in der Differenzierung diskutiert.

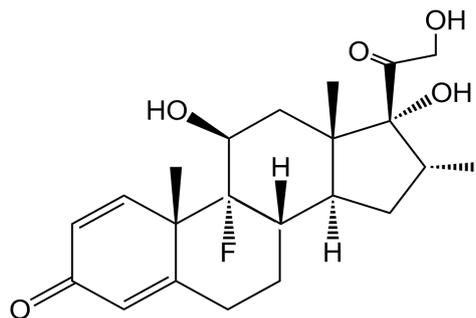


Abbildung 17: Dexamethason (9-Fluor-16 α -Methylprednisolon)

5. Die 3T3-L1-Zelllinie: Merkmale und Differenzierung

Insulin trägt bei der Differenzierung zu einer Erhöhung der ausdifferenzierenden Zellen bei und steigert in ihnen die Lipidakkumulation. Gleichzeitig zeigt es Wirkungen gegen den programmierten Zelltod (Apoptose) (Gregoire et al. 1998; Rosen und Spiegelman 2000).

Prädipozyten besitzen nur wenige Insulinrezeptoren (Rosen und Spiegelman 2000). Während ihrer Differenzierung zu Adipozyten nimmt die Anzahl der Insulinrezeptoren an der Oberfläche zu und die Insulinbindungskapazität steigt. Dafür verantwortlich sind womöglich Änderungen in der Rezeptorsynthese und des -abbaus, sowie geänderte Regulierungen in der Beförderung der Rezeptoren von einem bestehenden Speicherpool zur Plasmamembran (Reed und Lane 1980).

In der späten Phase der Differenzierung ist die Insulinsensitivität erhöht. Durch die steigende Anzahl der Glucosetransporter kann die Glucoseaufnahme auf das fünf- bis fünfzehnfache gesteigert werden. Die Fettbildung steigt deutlich an (Gregoire et al. 1998; Zeigerer et al. 2002).

Die Adipozytendifferenzierung wird durch Insulin im Zuge von mindestens vier Mechanismen gefördert (siehe Abbildung 18). Ein Mechanismus ist die Aktivie-

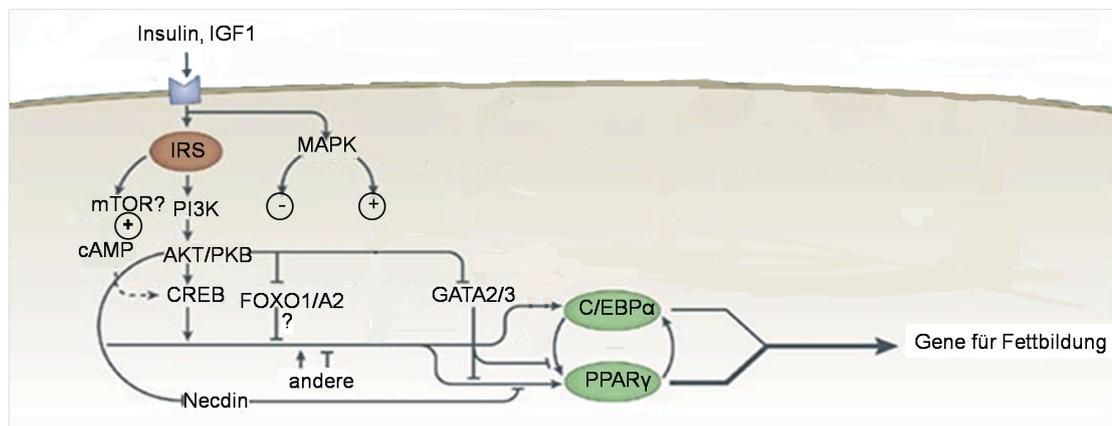


Abbildung 18: Regulierung der Adipogenese über den extrazellulären Faktor Insulin. Modifiziert nach Rosen et al. (Rosen und MacDougald 2006). IGF: Insulin Wachstumsfaktor; IRS: Insulin Rezeptor Substrat; mTOR: Ziel des Rapamycin beim Säugetier; PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase; cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; AKT/PKB: Proteinkinase B; CREB: reagierendes Element-bindendes Protein; MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase; FOXO: Forkhead-Box-Protein; GATA: Transkriptionsfaktor, der an die DNA Sequenz „GATA“ bindet; C/EBPα: CCAAT-erhöhendes, bindendes Protein; PPARγ: Peroxisom-Proliferator aktivierter Rezeptor γ.

rung des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-Rezeptors und den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor 1 (IGF-1) (Rosen und Spiegelman 2000; Rosen und MacDougald 2006). IGF-1 wirkt dosisabhängig und ist außerdem ein we-

sentlicher Bestandteil des fötalen Rinderserums. Bei Behandlung mit serumfreiem Medium kann eine Differenzierung durch Zusatz von IGF-1 erzielt werden (Gregoire et al. 1998; Rosen und Spiegelman 2000).

Durch die Aktivierung des Insulin Rezeptor Substrats (IRS) wird die Bildung des Proteins Necdin hinunter reguliert. Durch die Signalkaskade wird außerdem die Proteinkinase B (EC 2.7.11.1) phosphoryliert und in weiterer Folge das Forkhead Box Protein 1/A2 und GATA2/3 gehemmt. Ein anderer Mechanismus ist die Aktivierung von CREB durch cAMP (Rosen und Spiegelman 2000; Rosen und MacDougald 2006).

Eine Stimulierung der MAPK (EC 2.7.11.24) und von SREBP-1c durch Insulin wird diskutiert. SREBP-1c erhöht in weiterer Folge die PPAR γ -Level (Klemm et al. 2001; Suzuki et al. 2011).

6. Problemstellung

Zahlreiche Human-, Tier- und Zellstudien beschäftigen sich mit dem antikanzerogenen Potential von Sulforaphan (Verkerk et al. 2009). Studien über den Einfluss von Sulforaphan, dessen Metaboliten Sulforaphan-Glutathion, Sulforaphan-Cystein-Glycin, Sulforaphan-Cystein und Sulforaphan-N-Acetyl-Cystein und Indol-3-Carbinol und dessen Metabolit Ascorbigen auf die Glucoseaufnahme und den Fettmetabolismus im Zusammenhang mit der Entstehung von Risikofaktoren des Diabetes Typ 2 wurden bis jetzt noch nicht publiziert.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Dysfunktion in der oxidativen Phosphorylierung bei Adipozyten bzw. eine vermehrte Bildung von lipotoxischen Fettsäuremetaboliten zur Entstehung einer Insulinresistenz beitragen kann (Turner und Heilbronn 2008; Dumas et al. 2009; Murrow und Hoehn 2010).

Einige Studien mit weiteren schwefelhaltigen Substanzen und *Brassicaceae* weisen auf eine hemmende Wirkung auf die Differenzierung und Akkumulierung von Fettzellen hin. Mit dem ethanolischen Extrakt der Pflanze *Brassica campestris spp. rapa*, einer Rübenart aus der Familie der *Brassicaceae*, die hohe Gehalte an Glucosinolaten aufweist, konnte eine Hemmung der Lipidakkumulation mit 10 μM bis 100 μM anhand der 3T3-L1-Zelllinie festgestellt werden (An et al. 2010). Auch Ajoen, eine schwefelhaltige Knoblauchverbindung (siehe Abbildung 19), senkte mit 25 μM bis 200 μM die Lipidakkumulation *in vitro* bei 3T3-L1-Zellen (Ambati et al. 2009).

Wie sich die Glucoseaufnahme zusätzlich zur Lipidakkumulation änderte, wurde bei antidiabetisch wirkenden Pflanzen, z. B. Zimtbaum und Banaba, anhand der 3T3-L1-Zelllinie untersucht. Die Glucoseaufnahme wurde bei unveränderter Lipidaufnahme gesteigert, während die Lipidakkumulation abnahm (Liu et al. 2001; Roffey et al. 2006).

Um eine antidiabetische Wirkung zu erreichen, sollte die Glucoseaufnahme in die Zellen gesteigert werden. Gleichzeitig sollte eine vermehrte Fettentstehung unterdrückt werden. Ein möglicher Mechanismus dafür könnte die Entkopplung der Atmungskette sein; dadurch kann die Energiebereitstellung in Form von

ATP zugunsten der Wärmeentstehung verringert werden. In einigen Studien konnte mit der Entkopplung allerdings die Entstehung einer Insulinresistenz in Verbindung gebracht werden (Turner und Heilbronn 2008; Dumas et al. 2009; Goulet et al. 2009; Kim et al. 2009; Murrow und Hoehn 2010).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in 3T3-L1-Zellen zu untersuchen, ob Sulforaphan und dessen Metabolite im Körper, sowie Indol-3-Carbinol und dessen Metabolit Ascorbigen, ein antidiabetisches Potential besitzen. Änderungen der Glucoseaufnahme in die Zelle wurden mit dem fluoreszierenden Glucosederivat 2-NBDG ermittelt. Es wurde dabei untersucht, ob Inkubationen mit oben genannten Stoffen Einflüsse auf die Glucoseaufnahme haben können bzw. ob durch diese Stoffe die Insulinwirkung beeinflusst wird. Bei Traka et al. 2008 wurde durch Behandlung von Insulin mit Isothiocyanaten die Bildung von Konjugaten und daher eine Beeinträchtigung der Insulinwirkung festgestellt. Änderungen in der Lipidakkumulation wurden mittels Oil Red O Färbung bestimmt. Hier wurde der Einfluss auf die Lipidakkumulierung nach Abhängigkeit einer Inkubation während verschiedener Differenzierungsgrade der Zellen untersucht. In verschiedenen Studien wurde bereits gezeigt, dass Stoffe bzw. Faktoren hemmende oder fördernde Wirkungen auf die 3T3-L1-Differenzierung ausüben können (Gregoire et al. 1998; Cowherd et al. 1999; Rangwala und Lazar 2000). Änderungen im Sauerstoffverbrauch und daraus resultierende Änderungen in der Energieproduktion durch Inkubation mit Sulforaphan wurden polarographisch mit der Clark-Elektrode gemessen.

In bisherigen Studien wurden Substanzen in hohen Konzentrationen, meist von 10 μM bis 200 μM , getestet. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Plasmakonzentrationen von Sulforaphan, dessen Metaboliten, sowie Indol-3-Carbinol und Ascorbigen nach Konsum von Broccoli im unteren nM-Bereich, von 1 nM bis 100 nM, liegen (Vermeulen et al. 2008; Hanlon et al. 2009) (Hau der 2011). In der vorliegenden Arbeit wurden die Versuche daher mit niedrigeren Konzentrationen, von 0,01 nM bis 10 μM durchgeführt.

7. Material und Methoden

7.1. Materialien

Geräte und Software

Autoklav	Tuttnauer, 3870 ML
DNA-Platte	NanoQuant™ Platte, Tecan
Grafikerstellungsprogramm Sigma-Plot	Version 11.0
Inkubator	Binder, Inkubator CO ₂ Binder C150
Magnetrührer	VWR, Advanced VMS-C4
Mikroskop	VWR, Mikroskop invert., IT400 Trino
Mikroskop mit Kamera	Olympus CKX41; Kamera Colorview Olympus U-CMAD3
Plattenlesegerät	Tecan, Infinite M200
Sauerstoffelektrode	Hansatech Instruments, Oxytherm System
Software (Plattenlesegerät)	Tecan, i-control 1.6
Software (Sauerstoffelektrode)	Oxygraph Plus 1.02, 2007
Sterilwerkbank	Telstar, Biostar Plus
Trockenschrank	VWR, Dry-Line
Waage	OHAUS, Pioneer™
Wassersterilisator	VWR, Arium 611VF, sartorius stedim biotech
Zentrifuge	Eppendorf, Centrifuge 5415R
Zentrifuge	Eppendorf, Centrifuge 5804R

Arbeitsmaterialien

10 cm Zellkulturschale	BD Falcon
------------------------	-----------

Cryoröhrchen	Carl Roth, mit Innengewinde, Dichtung, Länge 48 mm, steril, 2 mL
Eppendorf Tubes	Carl Roth, Multi®-SafeSeal®-Tubes
Filter	GE Water & Process, Cameo 25 AS Syringe Filter, steril, 0,22 Micron., 25 mm
Filterpapier, herkömmlich, für Versuche mit Clark Elektrode	Rizla
Einmalspritzen	Carl Roth, Einmalspritzen mit Luer-Anschluß, 2 mL, 10 mL, 20 mL, steril
Hamiltonspritze	Hamilton Bonaduz, Schweiz, bis 10 µl, Microliter TM # 701
Manuelle Mehrkanalpipette	Eppendorf, Research, 10 µl und 100 µl
Manuelle Mikroliterpipetten	Eppendorf, Research, 10 µl – 5000 µl
Mehrfachdispenser	Brand, Handystep
Membran	Hansatech, S4 PTFE Membrane
Multiwell Platte (96 Wells)	BD Falcon, ohne Abdeckplatte, unsteril
Neubauer® Zählkammer	Brand, Neubauer improved Bright-line 0,100 mm Tiefe, 0,0025 mm ²
Pipettierhilfe	Thermo Scientific, Matrix
Röhrchen	Sarstedt, 13 mL
Schaber	Greiner bio-one, Cell Scraper
Zellkultur Multiwell Platte (6 Wells)	Greiner bio-one, mit Abdeckplatte, steril
Zellkultur Multiwell Platte (24 Wells)	Greiner bio-one, mit Abdeckplatte, steril
Zellkultur Multiwell Platte (96 Wells)	Greiner bio-one, mit Abdeckplatte, steril
Zellkulturflaschen (T25, T75, T175)	Greiner bio-one, Cellstar tissue culture flask, 25 cm ³ bzw. 75 cm ³ bzw. 175 cm ³ , PS, red standard cap, sterile

7. Material und Methoden

Chemikalien und Zellen

2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-Desoxyglucose (2-NBDG)	Invitrogen
2-Propanol	Sigma Aldrich, LC-MS Chromasolv®, min 99,9 %
Ameisensäure	Carl Roth, Rotipuran® ≥ 98 %
Antimycin A	Sigma Aldrich, from Streptomyces sp.
1,05 mM Ascorbigen	Synthetisiert von Dr. Marc Pignitter
Bicinchoninsäure (BCA) Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Reagent A (Natriumcarbonat, Natriumdicarbonat, Bicinchoninsäure, Natriumtartrat in 0,1 M Natriumhydroxid), Reagent B (4 % Kupfersulfat)
D-(+)-Glucose wasserfrei	Carl Roth
Dexamethason	Sigma Aldrich, wasserlöslich, Zellkultur getestet
Di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth, ≥ 99 % p. a. ACS, wasserfrei
1,98 mM DL-Sulforaphan	LKT Laboratories
1,40 mM DL-Sulforaphan-Cystein	Synthetisiert von Dr. Marc Pignitter
2,80 mM DL-Sulforaphan-Cystein-Glycin	Synthetisiert von Dr. Marc Pignitter
2,10 mM DL-Sulforaphan-Glutathion	Synthetisiert von Dr. Marc Pignitter
3,38 mM DL-Sulforaphan-N-Acetyl-Cystein	Synthetisiert von Dr. Marc Pignitter
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, für die Zellbiologie, ≥ 99,5 %
Dubecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit Phenolrot	Sigma Aldrich, steril filtriert
Dubecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ohne Phenolrot	Sigma Aldrich, steril filtriert
Ethanol	Carl Roth, vergällt, ≥ 96 %
Carbonyl Cyanid 4-	Sigma Aldrich

(Trifluoromethoxy)Phenyl-Hydrazon (FCCP)	
Flüssiger Stickstoff	Linde Gas
Formaldehyd, Reinheit $\geq 36\%$	Sigma Aldrich, für die Molekularbiologie
Fötales Rinder Serum (FBS)	Gibco, fetal bovine serum
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Sigma Aldrich, minimum 99 %
Indol-3-Carbinol	Sigma Aldrich
Insulin	Sigma Aldrich, von Rinder-Bauchspeicheldrüse
Kaliumchlorid	Carl Roth, $\geq 99,5\%$ p. a.
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, $\geq 99\%$ p. a.
L-Glutamin	Sigma Aldrich, 200 nM, steril filtriert
Natriumchlorid	Sigma Aldrich, mind. 99,8 %
Natriumhydroxid Plätzchen	Sigma Aldrich, mind. 99 %
N-Dodecanoyl-N-Methylglycin Natrium Salz * Sarkosyl NL (N-Lauroylsarcosin Natrium Salz)	Sigma Aldrich, für die Molekularbiologie
Nutrient Mixture F-12 Ham Medium	Sigma Aldrich, steril filtriert
Solvent Red 27*1-([4-(xylylato)xylyl]azo)-2-naphthal (Oil Red O)	Sigma Aldrich
Oligomycin	Sigma Aldrich, von Streptomyces diastatochromogenes, Mix von Oligomycin A, B und C
Penicillin – Streptomycin	Sigma Aldrich, steril, 10000 Einheiten Pen. + 10 mg Streptom. Per mL in 0,9 % NaCl
Protein Standard Lösung	Sigma Aldrich, BSA (bovine serum albumin), 2 mg BSA / mL in 0,9 % NaCl mit 0,05 % NaN_3
Rotenon	Sigma Aldrich
Salzsäure	Sigma Aldrich, mind. 37 %

7. Material und Methoden

Trypanblau	Sigma Aldrich, Lösung (0,4 %) in Natriumchlorid (0,81 % + 0,06 % Kaliumphosphat, steril
Trypsin	Sigma Aldrich, EDTA solution 1x, steril filtriert, 0,5 g Trypsin (Schwein) + 0,2 g EDTA, 4 Na / L

7.2. Zellkultur

7.2.1. Auftauen von 3T3-L1-Zellen

Cryoröhrchen mit den 3T3-L1-Präadipozyten, die in flüssigem Stickstoff lagerten, wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Der Zellsuspension wurde beim Einfrieren Dimethylsulfoxid (DMSO) als Frostschutzmittel in einer Endkonzentration von 10 % (v/v) zugesetzt. Um das zytotoxische DMSO auf 1 % zu verdünnen, wurde die Zellsuspension in ein 15 mL-Röhrchen mit 9 mL Kultivierungsmedium überführt. Nach anschließender Zentrifugierung bei 110xg für zehn Minuten wurde das gebildete Zellpellet mit 10 mL Kultivierungsmedium vorsichtig resuspendiert und die Lösung in eine T25-Zellkulturflasche überführt.

7.2.2. Kultivierung von 3T3-L1-Zellen

Verwendetes Medium:

Kultivierungsmedium (Wachstumsmedium), steril:

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit Phenolrot

+ 10 % Fötale Rinderserum

+ 1 % Penicillin / Streptomycin

+ 4 % Glutamin

Die Zellen wurden im Inkubator bei optimalen Bedingungen von 37 °C und mit 5 % CO₂ in der Atmosphäre in T175-Zellkulturflaschen kultiviert, wo sie als adhärenente Zellen am Flaschenboden wuchsen und sich weitervermehrten (ATCC 2011).

Das optimale Kultivierungsmedium für diese Zelllinie stellt das Dulbecco's Modified Eagle's Medium dar, das aus verschiedenen anorganischen Salzen, Aminosäuren, Vitaminen, Natriumpyruvat, dem pH-Indikator Phenolrot und einem sehr hohen Anteil an D-Glucose – 4500 mg/L besteht (Sigma Aldrich 2011). Zur Kultivierung wurden 10 % Fötale Rinderserum als Nahrung für die Präadipozyten, 1 % Penicillin / Streptomycin und 4 % Glutamin zugesetzt (ATCC 2011, Sigma Aldrich 2011).

7. Material und Methoden

Der Einsatz von Serum spielt in der Zellkultur eine wesentliche Rolle. Serum enthält neben Bindungs- und Transportproteinen, Anheftungs- und Ausbreitungsfaktoren auch Wachstumsfaktoren und Hormone wie Insulin, Corticosteroide und das Wachstumshormon. Auch Vitamine und Spurenelemente sind in hoher Anzahl vorhanden. Weitere Inhaltsstoffe sind Fettsäuren und Lipide, Aminosäuren und verschiedene Kohlenhydrate (auch Glucose). Das im Serum enthaltene Albumin ist wichtig für die Puffereigenschaften der Lösung. Die Proteaseinhibitoren dienen neben dem Stoppen der Trypsinreaktion zur Neutralisierung der aus abgestorbenen Zellen freigesetzten lysosomalen Peptidasen (EC 3.4). Eine weitere Funktion des Serums ist die Detoxifizierung durch unspezifische Bindungsmechanismen (Lindl and Gstraunthaler 2008).

Penicillin bzw. Penicillin-G-Natrium und Streptomycin bzw. Dihydrostreptomycinsulfat werden in Kombination gegen grampositive und gramnegative Bakterien eingesetzt (Lindl and Gstraunthaler 2008).

Glutamin wird in der Zellkultur in höheren Konzentrationen als andere Aminosäuren verwendet, da es neben Glucose und Pyruvat eine wichtige Energiequelle darstellt (Lindl and Gstraunthaler 2008).

7.2.3. Zellernte

Verwendete Pufferlösung:

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), steril:

für 10fach konzentriertes PBS:

1710 mM NaCl	entspricht 99,9324g / L NaCl
100 mM Na ₂ HPO ₄	entspricht 14,1960g / L Na ₂ HPO ₄
34 mM KCl	entspricht 2,5347g / L KCl
18 mM KH ₂ PO ₄	entspricht 2,4496g / L KH ₂ PO ₄

Hatten die Zellen eine Konfluenz von ungefähr 70 – 80 % erreicht, wurden sie mit Hilfe von Trypsin geerntet und mit ihnen Platten für die Versuche angelegt.

Das Kultivierungsmedium der T175-Zellkulturflasche wurde abgesaugt, die Zellen wurden mit 5 mL PBS gewaschen und anschließend mit 2,5 mL Trypsin/EDTA gelöst. Das Waschen mit PBS ist wichtig, damit Reste des Serums, die die Wirkung des Trypsins beeinträchtigen können, entfernt werden.

Trypsin (EC 3.4.4.4), eine alkalische Pankreasprotease, baut durch Spaltung der Membranproteine bei Arginin und Lysin die Zell-Matrix-Verbindungen an und löst die ansonsten adhärenen Zellen so vom Untergrund. EDTA löst als Ca^{2+} -Chelator hauptsächlich Zell-Zell-Verbindungen. Trypsin wirkt am besten bei einem pH-Wert von 7,6 bis 7,8 und bei einer Einwirkzeit von drei bis zehn Minuten. Um die Schädigungen von Trypsin auf die Zellen gering zu halten, ist die Einwirkzeit möglichst zu reduzieren. In den vorliegenden Versuchen wurde eine Einwirkzeit von vier Minuten eingehalten (Lindl and Gstraunthaler 2008). Durch Zugabe von 10 mL Kultivierungsmedium wurde die Reaktion mit Trypsin gestoppt, da das fötale Rinderserum Proteaseinhibitoren besitzt und dieses das Trypsin inaktiviert (Lindl and Gstraunthaler 2008). Bevor die Zellen in ein 50 mL Tube überführt wurden, wurden sie mit Hilfe einer Pipette vereinzelt.

7.2.4. Passagieren

Um die Zellen weiter kultivieren zu können, wurde eine kleine Menge Zelllösung (einige Tropfen bis 1 mL) wieder in die T175-Zellkulturflasche gegeben und mit 40 mL Medium aufgefüllt. Bereits nach einigen Minuten legen sich die Zellen am Flaschenboden an.

7.2.5. Auszählen der Zellen

Mit Hilfe der Neubauer® Zählkammer (siehe Abbildung 19) wurde die Anzahl der lebenden Zellen pro mL in der vorhandenen Lösung bestimmt. Hierfür wur-

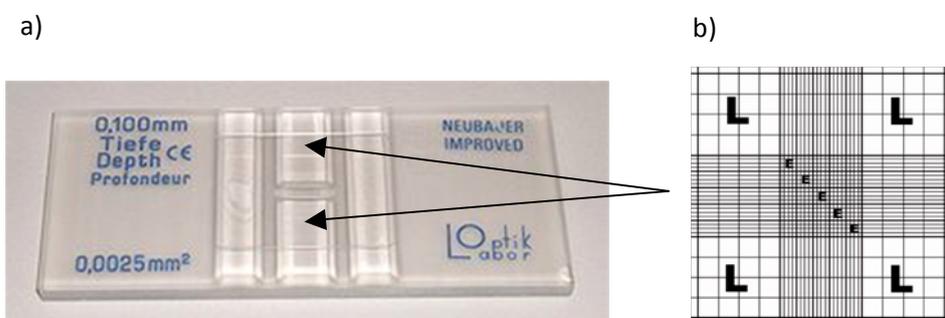


Abbildung 19: Neubauerzählkammer (a) und Zählnetz (b), das bei ca. hundertfacher Vergrößerung sichtbar wird (Carl Roth 2011).

de die Zelllösung mit Trypanblau verdünnt (20 μL Zelllösung und 80 μL Trypan-

7. Material und Methoden

blau) und ca. 10 µL davon unter das aufliegende Deckglas auf der Neubauer® Zählkammer eingespritzt. Trypanblau wird von lebenden Zellen aufgrund eines intakten Transportmechanismus in der Zellmembran nicht aufgenommen. Lebende Zellen erscheinen unter dem Mikroskop als durchsichtige Kreise, während tote Zellen blau sind, da sie aufgrund veränderter Membrandurchlässigkeit durch Trypanblau gefärbt werden (Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie Berlin 2011). Unter dem Mikroskop in hundertfacher Vergrößerung ließ sich das Zählnetz erkennen, das sich insgesamt zwei Mal auf der Kammer befindet. In Zweifachbestimmung wurden jeweils die Zellen, die sich in den äußeren vier Kantenquadraten des Zählnetzes befanden (in Abbildung 20 mit „L“ gekennzeichnet), gezählt, wobei die Zellen, die jeweils auf den Schnittlinien zum grau gefärbten Bereich lagen, nicht berücksichtigt wurden.

Die Zellzahl konnte nun mit Hilfe der folgenden Faktoren berechnet werden:

$$\text{Zellzahl / mL} = \emptyset \text{ Zellzahl der (2 x 4) Kantenquadrate} \times 5 \text{ (Verdünnung)} \times 10000 \text{ (Zählkammerfaktor)}$$

- Der Verdünnungsfaktor errechnete sich aus der Verdünnung mit Trypanblau.
- Der Zählkammerfaktor von 10000 errechnete sich aus dem Volumen der Zählquadrate, da jedes der Kantenquadrate mit dem Deckglas aufgrund der Abmessungen 0,1 cm x 0,1 cm x 0,01 cm (Länge x Breite x Höhe) ein Volumen von 0,0001 mL ergibt (Hansen 2011).

Jede Ernte erhöht das Alter und daher die Passagenzahl der Zellen. Die Passagenzahl der Zellen gibt an, wie viele Wachstums-Ernte-Zyklen die Zellen bereits hinter sich haben. Je höher das Alter und daher die Passagenzahl ist, desto unterschiedlicher sind die Eigenschaften.

7.2.6. Anlegen von Platten und Zellkulturschalen

Die Anzahl der benötigten Zellen je Well wurde durch spezifische Zugabe von Kultivierungsmedium eingestellt. Mittels eines Mehrfachdispensers wurde das benötigte Volumen in die einzelnen Wells eingespritzt. Die Versuche wurden mit Zellen bis zur Passage 22 durchgeführt, da Zellen mit höherer Passagenzahl weniger adhärent waren.

7.2.7. Wachstumskurve

Anhand einer Wachstumskurve konnten die vier Phasen des Wachstums (Anlaufphase, Exponentielle Phase, Stationäre Phase, Absterbephase) der Zelllinie dargestellt werden. Mit Hilfe der Formel für die Generationszahl konnte die Generationszeit (= Verdopplungszeit) berechnet werden (Lindl and Gstraunthaler 2008).

Für das Anlegen einer Wachstumskurve wurden in 6-Well-Platten 25000 Zellen pro Well in jeweils 3 mL Kultivierungsmedium ausgestreut. Es wurde elf Tage lang je eine Platte geerntet und die Anzahl der lebenden und toten Zellen in sechsfacher Bestimmung festgestellt.

Für das Waschen der Zellen nach dem Absaugen des Mediums wurden pro Well 1 mL PBS verwendet, für das Ablösen 250 μ L Trypsin und für das Stoppen der Reaktion 1 mL Wachstumsmedium. Dann wurden mit Hilfe eines sterilen Schabers die Zellen vorsichtig vom Boden abgeschabt, nochmals 500 μ l Medium hinzugegeben, wieder vorsichtig geschabt und anschließend die Zellen nach dem Vereinzeln je Well in ein 15 mL Tube überführt. Jedes Well wurde in doppelter Bestimmung ausgezählt. Die Anzahl der toten und lebenden Zellen wurden jeweils bestimmt.

In Abbildung 20 können die einzelnen Phasen des Wachstums deutlich unterschieden werden.

Nach einer Anlaufphase von 40 Stunden, wurde nach exponentiellem Wachstum die maximale Zellzahl von 1,2 Mio. nach ca. 113 Stunden erreicht. Nach einer kurzen Plateauphase von einigen Minuten sank die Zellzahl wieder ab. Die Verdopplungszeit wurde mit Hilfe der Formel für die Generationszeit und der Gleichung für die exponentielle Kurve ($y = ae^{bx}$) berechnet.

7. Material und Methoden

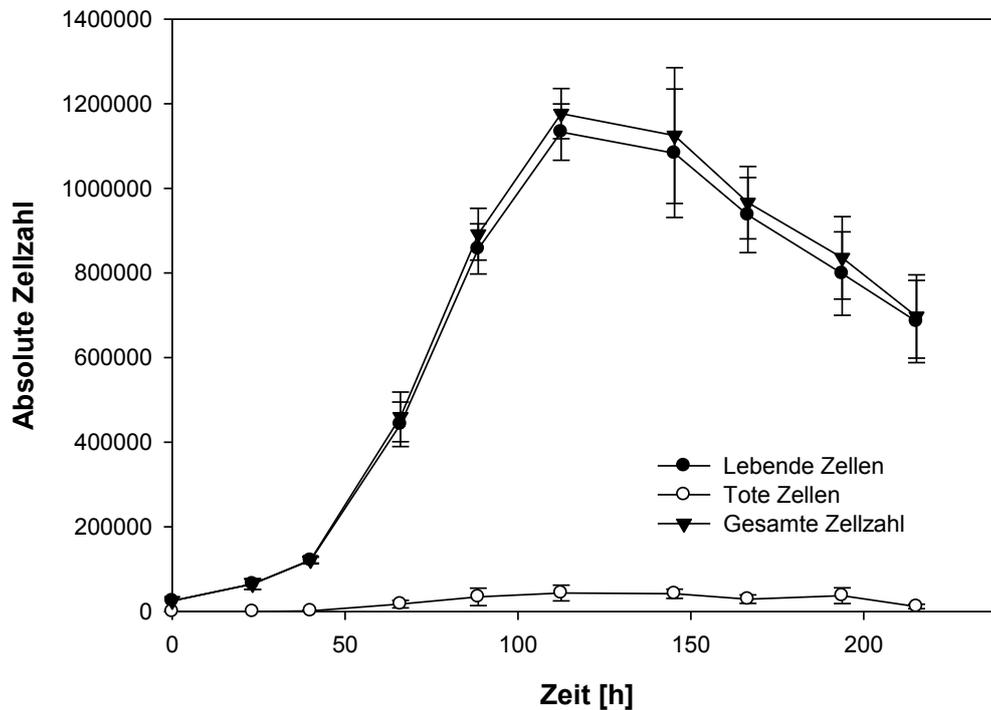


Abbildung 20: Wachstumskurve von 3T3-L1-Zellen. Passage 18; Sechsfach-Bestimmung. Absolute Zellzahl bestimmt durch Zählung mit der Neubauer® Zählkammer.

Als Verdopplungszeit wurde eine Zeit von 16,86 Stunden ermittelt:

Ermittelte Gleichung für die exponentielle Kurve:

$$y = 25088e^{0,041x} \rightarrow a = 25088, b = 0,041$$

Formel Generationszeit:

$$t_g = (\log 2 \times t) / (\log N - \log N_0) \text{ (Lindl and Gstraunthaler 2008)}$$

Durch Einsetzen der ermittelten Zellzahl und Berücksichtigung der Messzeitpunkte konnte nach Auflösen des „log“ die Verdopplungszeit ermittelt werden.

7.3. Methoden

7.3.1. Glucoseaufnahme in 3T3-L1-Zellen mit 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-desoxyglucose (2-NBDG)

Material

Verwendete Medien

Kultivierungsmedium (Wachstumsmedium):

Herstellung siehe Kapitel 8.2.2.

Reifungsmedium:

DMEM mit Phenolrot
+ 10 % Fötale Rinderserum
+ 1 % Penicillin / Streptomycin
+ 4 % Glutamin
+ 10 µg/mL Insulin

Differenzierungsmedium:

DMEM mit Phenolrot
+ 10 % Fötale Rinderserum
+ 1 % Penicillin / Streptomycin
+ 4 % Glutamin
+ 1 µM Dexamethason
+ 0,5 mM IBMX
+ 10 µg/mL Insulin

Basalmedium:

DMEM mit Phenolrot
+ 4 % Glutamin
und
Nutrient Mixture F-12 Ham Medium
+ 1 % Pyruvat
1:1 gemischt.
+ 1 % Penicillin / Streptomycin
+ 1 % Fötale Rinderserum

7. Material und Methoden

Verwendete Stocklösungen

Substanz und Konzentration	Lösungsmittel	Endkonzentration bei Versuch
20 mM 2-NBDG	PBS	100 µM
100 µM DL-SFN	1 %ige Ameisensäure	0,01 nM, 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1000 nM, 10000 nM
100 µM DL-SFN-CYS	1 %ige Ameisensäure	Jeweils 0,1 nM, 1 nM, 10 nM
100 µM DL-SFN-CYS-GLY	1 %ige Ameisensäure	
100 µM DL-SFN-GSH	1 %ige Ameisensäure	
100 µM DL-SFN-NAC	1 %ige Ameisensäure	
100 µM I3C	100 %iges DMSO	
100 µM ASG	1 %ige Ameisensäure	
10 mg/mL Insulin, steril	ddH ₂ O und 1 M HCL gelöst	
		10 µg / mL im Medium
0,994 mM Dexamethason, steril	ddH ₂ O	1 µM im Medium
51,8 mM IBMX, steril	ddH ₂ O und 1N NaOH	0,5 mM im Medium

Verwendete Pufferlösungen

PBS

Waschpuffer

PBS mit 4 g / L D-Glucose

2-NBDG, ein fluoreszierendes D-Glucose-Analog, ist ein Feststoff mit einem Molekulargewicht von 342,26 g/mol (siehe Abbildung 21).

2-NBDG eignet sich gut für die Erforschung von insulinwirksamen Substanzen und den Glucosemetabolismus verschiedener Zelltypen. 2-NBDG hat gegenüber anderen, radioaktiven Substanzen, mit denen Glucoseaufnahmestudien durchgeführt werden, wie 2-Desoxy-D-[¹⁴C]Glucose oder 2-Desoxy-D-[³H]Glucose, den Vorteil, dass kein radioaktiver Abfall anfällt und dass die Glucoseaufnahme in einzelnen lebenden Zellen gemessen werden kann (Zou et al. 2005). 2-NBDG wird von der Insulin-sensitiven 3T3-L1-Zelllinie nach Stimulierung mit Insulin im Vergleich zu anderen Zelllinien in größeren Konzentrationen aufgenommen (Jung et al. 2011).

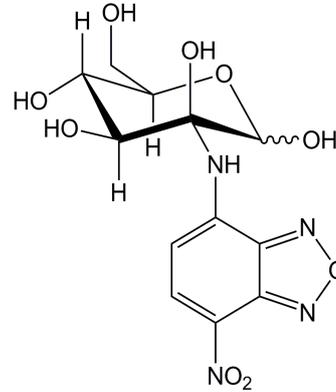


Abbildung 21: 2-(N-(7-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazol-4-yl)Amino)-2-Desoxyglucose (2-NBDG)

Prinzip

3T3-L1-Zellen wurden mit Insulin stimuliert, bevor die Inkubation mit 2-NBDG und der zu untersuchenden Substanz stattfand. Insulin bewirkt eine gesteigerte Anzahl an GLUT4 an der Oberfläche der Zellen (Lampson et al. 2000; Zeigerer et al. 2002; Murrow und Hoehn 2010).

2-NBDG wird durch den Glucosetransporter GLUT4 in die Zellen aufgenommen (Yamada et al. 2007).

Intrazellulär wird 2-NBDG im Rahmen der Glykolyse zu 2-NBDG 6-Phosphat und anschließend zu einem nicht-fluoreszierenden Derivat metabolisiert (Yamada et al. 2007).

7. Material und Methoden

Die Fluoreszenz wurde nach der Inkubation bei $\lambda_{\text{Ex}} = 480 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Em}} = 550 \text{ nm}$ bestimmt. Durch Vergleich mit Zellen, die mit der Kontrollösung inkubiert wurden, konnten Veränderungen in der Glucoseaufnahme festgestellt werden.

Die gesamte Durchführung erstreckte sich über elf Tage und ist in Abbildung 22 zusammenfassend dargestellt.

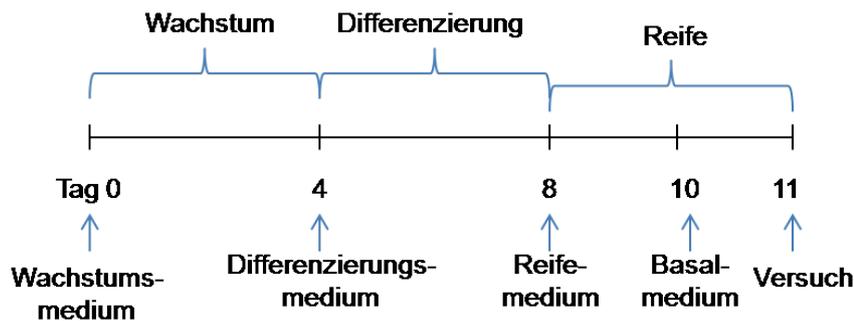


Abbildung 22: Behandlungsschema der Zellen bis zum Versuch am Tag 11 nach dem Ausstreuen.

Vorbereitung der Zellen

- Tag 0:** 7500 Zellen in 200 μl Kultivierungsmedium / Well wurden in sterile 96-Well-Platten ausgestreut. Damit für jedes Well gleiche Inkubierungsbedingungen vorherrschten, wurde in die Wells des äußeren Randes der Platte PBS eingefüllt. Die Zellen wuchsen vier Tage unter den in Kapitel 8.2.2. genannten Inkubationsbedingungen bis sie einen konfluenten Status erreicht hatten.
- Tag 4:** Das Kultivierungsmedium wurde durch 200 μL Differenzierungsmedium ersetzt, um eine Zelldifferenzierung auszulösen.
- Tag 8:** Das Differenzierungsmedium wurde gegen das Reifungsmedium, das aus Kultivierungsmedium mit Zusatz von 10 $\mu\text{g/mL}$ Insulin bestand, getauscht. Die Adipozyten reiften weiter und die Anzahl der Fetttröpfchen stieg.
- Tag 10:** Das Reifungsmedium wurde gegen das Basalmedium getauscht. Das Basalmedium enthielt kein Insulin, damit die Zellen für den anschließenden Versuch am Folgetag vorbereitet werden konnten. Die Empfindlichkeit von 3T3-L1-Zellen auf zugesetztes Insulin kann erhöht

werden, wenn im zugesetzten Serum oder im Kultivierungsmedium bzw. dem Testmedium kein Insulin vorhanden ist (Green und Kehinde 1975).

Versuchsdurchführung

Am elften Tag nach dem Ausstreuen fand der eigentliche Versuch statt.

1. Kurz bevor die Zellen mit Insulin stimuliert wurden, wurde das Medium abgesaugt. Es wurde je nach Aufgabenstellung zwischen einer Minute und 20 Minuten mit 100 μ l 100 μ g/mL Insulin bzw. für die Kontrolle nur mit PBS stimuliert, d. h. PBS mit Insulin bzw. ohne Insulin wurde eine Minute bis 20 Minuten vor dem eigentlichen Versuch lang auf den Zellen belassen.
2. Nach der Inkubationszeit wurde das Insulin entfernt und die Zellen für 20 Minuten mit 100 μ M 2-NBDG und der Testsubstanz inkubiert. Die Lösung setzte sich für eine Spalte folgendermaßen zusammen: 788 μ L PBS + 4 μ L 2-NBDG Stocklösung+ 8 μ L der hundertfach konzentrierten zu testenden Substanz.
2. Nach der Inkubationszeit wurde die Lösung entfernt und mit je 200 μ L pro Well PBS mit 4 g/L D-Glucose, mit einer Einwirkzeit von fünf Minuten, gewaschen. Durch das Waschen sollten 2-NBDG-Reste an den Wänden der Wells entfernt werden. Durch die D-Glucose werden die 2-NBDG-Moleküle von der Zelloberfläche verdrängt und lösen sich ab (Zou et al. 2005).
3. Die Fluoreszenz wurde bei λ_{Ex} = 480 nm und λ_{Em} = 550 nm gemessen.
4. Wurde in weiterer Folge die Proteinwerte bestimmt, wurden 200 μ L PBS mit 4 g / L D-Glucose auf die Zellen pipettiert, wurden die DNA-Werte festgestellt, wurden 50 – 100 μ L Lysepuffer auf die Zellen gegeben. In beiden Fällen wurden die Platten mit Parafilm seitlich umwickelt. Die Platten für die Proteinbestimmungen wurden im Gefrierschrank bei – 80 °C gelagert, die Platten für die DNA-Bestimmung wurden im Kühlschrank bei + 4 °C gelagert.

7.3.2. Messung des Proteingehaltes anhand der Bicinchoninsäure (BCA) Protein-Untersuchungsmethode

Verwendete Standardstocklösung

2 mg / mL Rinderalbumin (BSA)

Eingesetzte Konzentrationen: 0,05 mg / mL, 0,1 mg / mL; 0,2 mg / mL; 0,4 mg / mL; 0,5 mg / mL; 0,6 mg / mL; 0,8 mg / mL; 1,0 mg / mL; 1,2 mg / mL.

Prinzip

Bei -80 °C werden Zellen physikalisch aufgeschlossen und lysiert. Anschließend kann der Proteingehalt bestimmt werden.

Cu^{2+} wird im alkalischen Milieu unter Einwirkung von Proteinen zu Cu^{1+} reduziert. Diese einwertigen Kupferionen reagieren mit Bicinchoninsäure zu einer Komplexverbindung in violetter Farbe, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch gemessen werden kann. Dieses Prinzip ist vor allem bei Messungen kleiner Proteinmengen geeignet. Da die Produktion von Cu^{1+} von der Proteinkonzentration und der Inkubationszeit abhängt, ist es notwendig, gleichzeitig eine Standardkurve herzustellen (Walker 1994).

Für die Untersuchung wurde das Reagenz A (Natriumcarbonat, Natriumdicarbonat, Bicinchoninsäure, Natriumtartrat in 0,1 M Natriumhydroxid) mit dem Reagenz B (4 % Kupfersulfat) im Verhältnis 50:1 gemischt.

Die Standardstocklösung 2 mg / mL BSA wurde sorgfältig gevortext und die Konzentrationen 0,05 mg / mL bis 1,2 mg / mL mit destilliertem Wasser hergestellt.

Für die Ermittlung der Standardgeraden wurden von den Verdünnungen jeweils 25 µl im Dreifachansatz in Wells unsteriler 96-Well-Platten pipettiert. Die Proben wurden bei Raumtemperatur langsam aufgetaut und im Doppelansatz 25 µl pro Probe in Wells überführt.

1. Je 200 μl der Lösung aus Reagenz A und Reagenz B wurden hinzugegeben.
2. Die Platten wurden von Hand vorsichtig geschüttelt.
3. Die Zellen wurden für ca. 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.
4. Anschließend wurden die Platten für ca. fünf Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt.
5. Bei $\lambda = 562 \text{ nm}$ wurde die Absorption im Plattenlesegerät gemessen.
6. Die Standardgerade wurde ermittelt und mittels Geradengleichung die Konzentrationen des vorhandenen Proteins in den Proben bestimmt.

7.3.3. DNA-Bestimmung

Verwendete Pufferlösung

Lysepuffer

1 g N-Lauroylsarcosinnatriumsalz (N-Dodecanoyl-N-Methylglycin Natrium Salz * Sarkosyl NL) mit 100 mL PBS vermischt

Prinzip

Für die DNA-Bestimmung wurden 50 – 100 μL Lysepuffer pro Well verwendet, die Platte mit Parafilm umwickelt und bei +4 °C für mindestens einen Tag gelagert. N-Lauroylsarcosinnatriumsalz, ein anionisches Detergens, bewirkte durch alkalische Lyse die Auflösung der Zellmembran und des Zellkerns. Somit war die Bestimmung der DNA spektrometrisch möglich.

Vor der Messung wurden mit PBS auf ein Volumen von 200 μL pro Well aufgefüllt und mit einem Plattenvortexer mindestens eine halbe Stunde geschüttelt. Die DNA verteilte sich dadurch gleichmäßig im Well.

Die Bestimmung der dsDNA wurde mit der NanoQuant™ Platte von Tecan in Vierfachbestimmung durchgeführt. Jeweils 2 μl wurden auf die Platte aufgetragen und die Absorptionen bei $\lambda = 260$ und $\lambda = 280 \text{ nm}$ bestimmt. Aus den Absorptionen bei 260 nm und den Absorptionen der Kontrollwerte (nur mit PBS) wurden die Konzentrationen der doppelsträngigen DNA in ng / μl errechnet. Der vom Softwareprogramm Tecan, i-control 1.6 ermittelte Quotient der Absorptio-

7. Material und Methoden

nen der Wellenlängen 260 nm und 280 nm diente der Reinheitsbestimmung der Proben. Diese lag bei den Versuchen zwischen 1,5 und 1,8.

7.3.4. Bestimmung der Lipidakkumulation in 3T3-L1-Zellen mit Oil Red O

Material

Verwendete Medien

Kultivierungsmedium, steril

Differenzierungsmedium, steril

Reifungsmedium, steril

Verwendete Stocklösungen

10 mg/mL Insulin, steril

0,994 mM Dexamethason, steril

51,8 mM IBMX, steril

20 mM 2-NBDG

Stöcklösung	Lösungsmittel	Endkonzentration
8,57 mM Oil Red O	Isopropanol	1,43 mM

Stocklösungen getesteter Substanzen

100 µM DL-Sulforaphan

100 µM DL-Sulforaphan-Cystein

100 µM DL-Sulforaphan-Cystein-Glycin

100 µM DL-Sulforaphan-Glutathion

100 µM DL-Sulforaphan-N-Acetyl-Cystein

100 µM Indol-3-Carbinol

100 µM Ascorbigen

Konzentration im Medium

Die Substanzen wurden dem Medium in den Konzentrationen 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM und 1000 nM zugegeben.

Verwendete Pufferlösung

PBS

Prinzip

Oil Red O (Solvent Red 27*1-([4-(Xylylato)Xylyl]azo)-2-Naphthal) (siehe Abbildung 23) hat ein Molekulargewicht von 408,49 g/Mol. Der Farbstoff wird von den Adipozyten aufgenommen (Beispiel siehe Abbildung 24) und die Absorption bei $\lambda = 520$ nm gemessen. Schon seit den 40er Jahren des vorigen Jahrhunderts wird Oil Red O zur Färbung von Triglyceriden eingesetzt (Kutt und Tsaltas 1959).

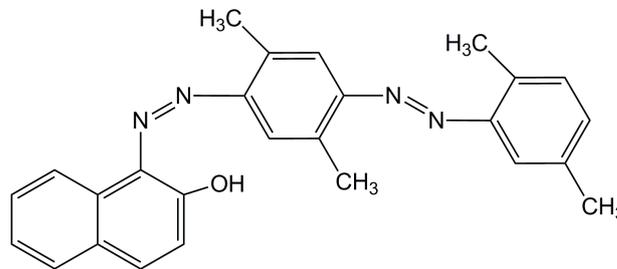


Abbildung 23: Oil Red O

Green und Kehinde (1975) demonstrierten 1975 damit den Effekt von Insulin auf die Lipidakkumulation in der 3T3-L1-Zelllinie. Der Effekt von Insulin war schon bei Zugabe von 0,01 $\mu\text{g} / \text{mL}$ deutlich. Die Zellen waren größer und lagerten bis zu vier Mal mehr Triglyceride ein als ohne Insulinzusatz. Bei

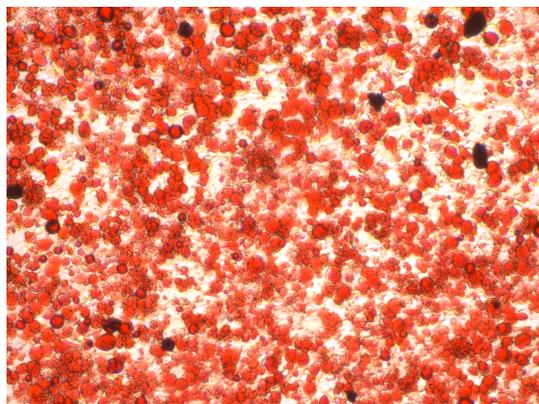


Abbildung 24: Mit Oil Red O gefärbte Adipozyten. Die hier dargestellten Adipozyten wurden während der Differenzierungsphase mit 10 nM Sulforaphan inkubiert und am 18. Tag, nach 14 Tagen Reifung gefärbt.

einem Zusatz von 1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ Insulin wurde im Vergleich zur Kontrolle mehr als das Doppelte der Glucose in Triglyceride umgewandelt. Sowohl der Protein- als auch der DNA-Gehalt stiegen. Der DNA-Gehalt jedoch nicht in so großem Maße.

7. Material und Methoden

Die Zellen wurden, wie in Abbildung 25 gezeigt, über 18 Tage im Zuge dreier

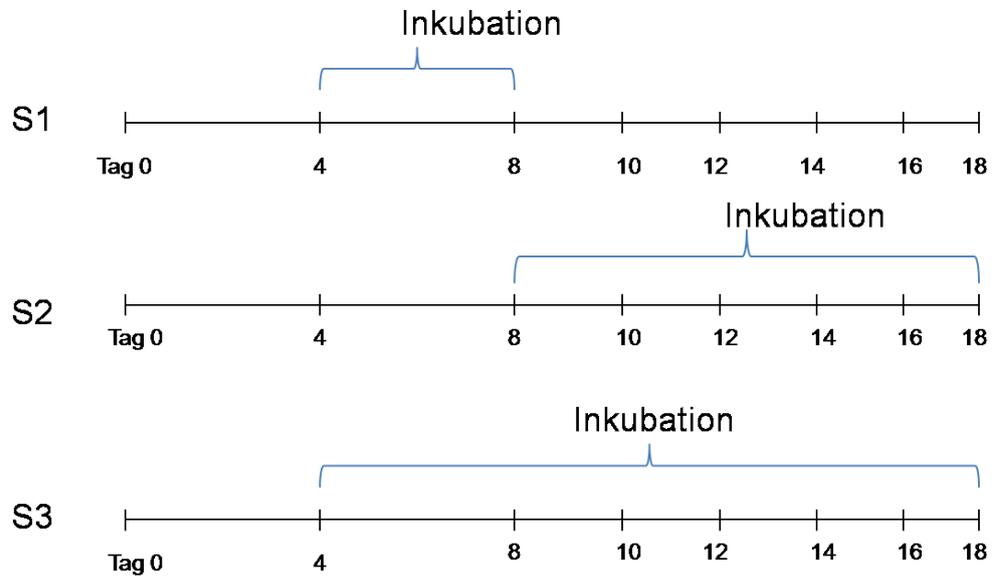


Abbildung 25: Die drei Szenarien des Lipidakkumulations-Versuches. Bei Szenario 1 fand die Inkubation mit der Substanz von Tag 4 bis 8 statt, bei Szenario 2 von Tag 8 bis 18 und bei Szenario 3 von Tag 4 bis 18.

verschiedener Szenarien mit den zu testenden Substanzen in den Konzentrationen 0 nM (Kontrolle), 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM und 1000 nM inkubiert. Bei Szenario 1 wurden die Zellen von Tag 4 bis Tag 8 inkubiert, d. h. während der Differenzierungsphase. Die Inkubation innerhalb des Szenarios 2, die von Tag 8 bis Tag 18 stattfand, betraf bereits ausdifferenzierte Zellen, die sich in der anschließenden Reifung befanden. Von Tag 4 bis Tag 18 wurden die Zellen im Rahmen des dritten Szenarios inkubiert. Hier war sowohl die Differenzierungs- als auch die Reifungsphase betroffen.

Vorbereitung

Vorbereitung der Oil Red O Stocklösung (endgültige Konzentration 1,43 mM)

0,7 g Oil Red O wurden in 200 mL 100 %igem Isopropanol gelöst, die Flasche mit Alufolie abgedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde nun durch einen 0,22 µM Spritzenfilter filtriert und bei +4 °C gelagert.

Vorbereitung der Zellen

- Tag 0:** Die Zellen wurden geerntet, ausgezählt und in sterile 24-Well-Platten ausgestreut. Pro Well wurden dabei 20000 Zellen in 1 mL Wachstumsmedium ausgestreut.
- Tag 4:** Das Wachstumsmedium wurde durch Differenzierungsmedium, wie in Kapitel 8.3.1. beschrieben, ersetzt. Zusätzlich wurde bei Szenario 1 und 3 zum Medium noch 1 % des Mediumvolumens an Substanz der jeweiligen Konzentration hinzugefügt. Als Kontrollsubstanz diente das Lösungsmittel. Dies war 1 %ige Ameisensäure, bzw. bei Indol-3-Carbinol 100 %iges DMSO.
- Tag 8:** Am Tag 8 wurde das Differenzierungsmedium durch das Wachstumsmedium ersetzt. Bei den Platten des Szenarios 2 und 3 fand der Zusatz der Substanzen bzw. des Lösungsmittels statt.
- Tag 10 bis Tag 16:** Bei Szenario 2 und 3 wurde jeden zweiten Tag die Hälfte des Wachstumsmediums durch neues Wachstumsmedium mit Zusatz (1 % des Volumens) der jeweiligen Substanz in der jeweiligen Konzentration ersetzt. Bei Szenario 1 wurde in gleicher Weise vorgegangen, jedoch dem Medium keine Substanz zugesetzt.
- Tag 18:** Folgende Schritte fanden statt:
1. Die Oil Red O Arbeitslösung wurde hergestellt. Nach 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Arbeitslösung durch einen 0,22 µm Spritzenfilter filtriert.
 2. Das Medium der einzelnen Wells wurde bis auf ca. 100 µl abgesaugt.
 3. Mit 500 µl 10 %igem Formaldehyd (mit PBS verdünnt) wurde für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und gleichzeitig fixiert (Lee et al. 2007).
 4. Das Formaldehyd wurde durch neues Formaldehyd (500 µl) ersetzt und mindestens für eine Stunde (eine Inkubation über mehrere Tage war auch möglich) bei Raumtemperatur inkubiert. Eine Abdichtung der Platten mit Parafilm war notwendig, damit sich das Formaldehyd nicht verflüchtigte.
 5. Nach der Inkubationszeit wurde mit je 500 µl 60 %igem Isopropanol gewaschen und die Platten offen trocknen gelassen.

7. Material und Methoden

6. Anschließend kam jeweils für zehn Minuten 200 µl Oil Red O Arbeitslösung in die Wells. In dieser Zeit wurde von den Triglyceriden in den Zellen der Farbstoff aufgenommen. Es war ratsam nach zehn Minuten den Fortschritt mikroskopisch zu kontrollieren, da die gleichmäßige Aufnahme des Farbstoffes in die Fettzellen unterschiedlich lange dauern konnte.
7. Nach der Inkubationszeit wurde vier Mal mit jeweils 500 µL ddH₂O gewaschen. Sollten lichtmikroskopische Aufnahmen der gefärbten Lipidakkumulation gemacht werden, wurde das ddH₂O währenddessen auf den Zellen belassen.
8. Lichtmikroskopische Aufnahmen wurden in zehnfacher Vergrößerung mittels der Kamera Olympus Colorview gemacht.
9. DdH₂O wurde entfernt und der gespeicherte Farbstoff in den Fetttröpfchen durch Zugabe von 750 µL 100 %igem Isopropanol herausgelöst.
10. Die Absorption wurde bei $\lambda = 520$ nm gemessen.

7.3.5. Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs

Material

Verwendete Medien

Kultivierungsmedium, steril

Differenzierungsmedium, steril

Reifungsmedium, steril

Resuspendierungsmedium

DMEM ohne Phenolrot

+ 4 % Glutamin

Verwendete Stocklösungen

10 mg/mL Insulin, steril

0,994 mM Dexamethason, steril

51,8 mM IBMX, steril

Stocklösung	Lösungsmittel	Endkonzentration in der Zelllösung (1 mL)
100 μM DL-Sulforaphan	1 %ige Ameisensäure	10 nM
8 mg / mL Oligomycin	96 %iger Ethanol	8 μg / mL
10 mM FCCP (Carbonyl cyanide 4- (trifluoromethoxy)phenyl- hydrazone)	96 %iger Ethanol	1000 nM
12,5 mM Rotenone	96 %iger Ethanol	0,25 μM
15mM Antimycin A	96 %iger Ethanol	6 μM

Verwendete Pufferlösung

PBS

7. Material und Methoden

Prinzip

Die polarographische Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauches erfolgte mittels einer Clark Elektrode (Hansatech Instruments) (Aufbau siehe Abbildung 26). Sie wurde 1956 von Leland Clark im Rahmen von Blutsauerstoff-

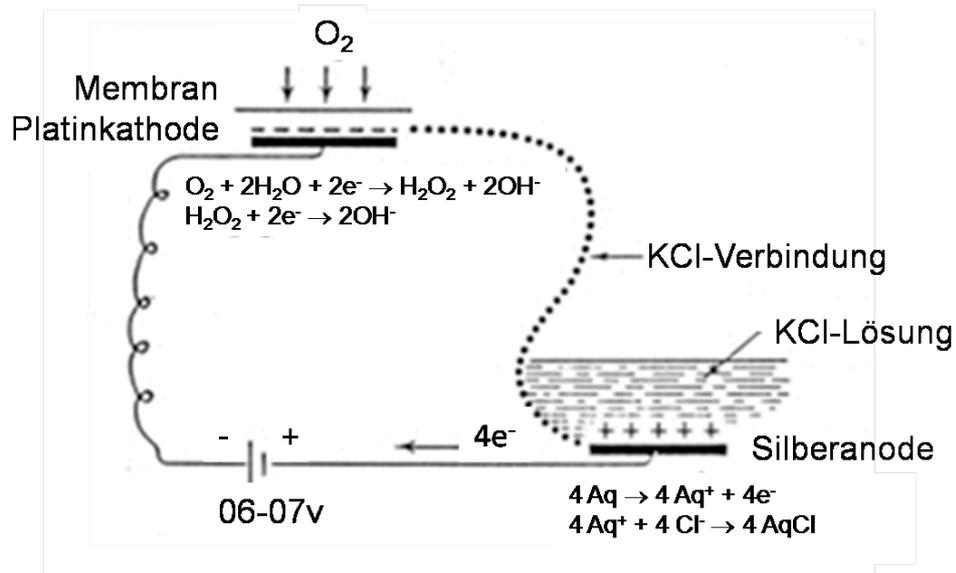


Abbildung 27: Stromfluss in der Elektrode nach Anlegung einer Spannung von 700 mV (Hansatech Instruments Ltd.2011).

messungen entwickelt. Die Elektrode bestand aus einer Platinkathode und einer Silberanode, die über eine 50 % gesättigte KCl-Lösung miteinander verbunden waren. Durch Anlegen einer Spannung von 700 mV diffundierte der Sauerstoff in der Messlösung durch die gasdurchlässige Membran und wurde dort unter Bildung von Wasser reduziert (siehe Darstellung Abbildung 27). Die Chlo-

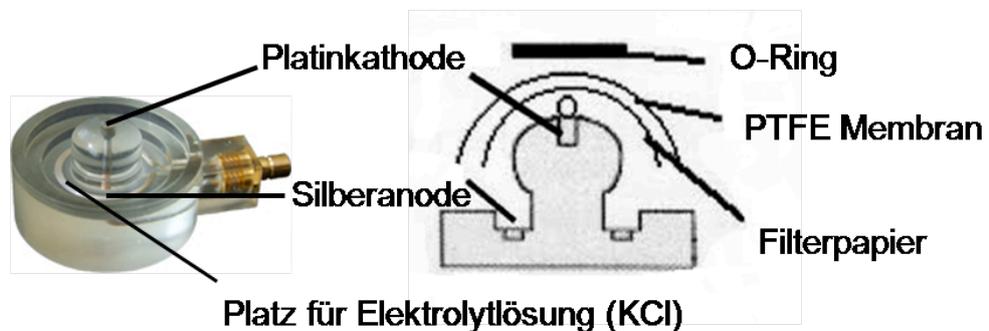


Abbildung 26: Aufbau der Clark Elektrode (a) und Vorbereitung für die Versuchsdurchführung (b). PTEF: Polytetrafluorethylen (Hansatech Instruments Ltd. 2006, 2011; H. Saur Laborbedarf 2011).

ridanionen wanderten zur Anode und gaben Elektronen ab. Dadurch entstand ein Elektronenfluss und daraus resultierend ein Stromfluss, der proportional zum gelösten Sauerstoff in der Messlösung war. Die Spannungsänderungen an den Elektroden wurden mit Hilfe eines A/D Wandlers digitalisiert und an einen Computer übertragen, wo mit dem dazugehörigen Programm (Oxygraph plus) die Berechnung des Sauerstoffgehaltes nach folgender Formel unter Berücksichtigung der während der Kalibrierung erhaltenen Daten, stattfand.

$$C_S = 14,16 - (0,394 * T) + (0,007714 * T^2) - (0,0000646 * T^3)$$

(C_S = Sauerstoffkonzentration in ppm, T = Temperatur in °C)

Wobei 1 ppm = 31,25 nmol/mL

(Nach Truesdale and Downing 1954; Hansatech Instruments Ltd. 2011)

Änderungen im Sauerstoffverbrauch konnten so in Echtzeit dargestellt werden. Die Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauches entsprach dabei der Steigung der aufgezeichneten Kurve und wurde in nmol O₂ / mL / min angegeben (Hansatech Instruments Ltd. 2011).

Die gleichmäßige Verteilung des Sauerstoffes in der Messlösung wurde durch einen Magnetrührer erreicht.

Vor der Versuchsdurchführung wurde eine Zweipunktkalibrierung mit sauerstoffgesättigtem und sauerstofffreiem ddH₂O durchgeführt. Um sauerstofffreies Wasser zu erhalten wurde Stickstoffgas in das Wasser des Reaktionsraumes eingebracht.

Versuchsdurchführung

Vorbereitung der Zellen

In 10 cm-Zellkulturschalen wurden 500000 Zellen, wie bereits beschrieben, ausdifferenziert. Genau 30 Minuten vor der Zellernte an Tag 11 wurde das Medium zu Wachstumsmedium gewechselt um für jeden Versuch gleiche Inkubationsbedingungen zu schaffen.

7. Material und Methoden

1. Die Zellen wurden mit 3 mL PBS gewaschen und mit ca. 1 mL Trypsin geerntet. Die Reaktion wurde zuvor mit 5 mL Kultivierungsmedium gestoppt.
2. Die Zelllösung wurde in ein 50 mL Tube überführt und bei 110 xg für fünf Minuten zentrifugiert.
3. Die Zellzahl wurde mit Resuspendierungsmedium auf 1,5 Millionen Zellen pro mL eingestellt.
4. Nun wurde 1 mL der Zelllösung mit dem Rührfisch in die Reaktionskammer gegeben.
5. Die Messung des initialen Sauerstoffverbrauches erfolgte anschließend für ca. zwei Minuten.
6. Nach Direktzugabe der Testsubstanz (10 nM Sulforaphan) wurde die Basalatmung für ca. fünf Minuten gemessen. Der direkte Effekt der Substanz auf die Sauerstoffabnahme konnte so ermittelt werden.
7. Anschließend erfolgte die Zugabe von Oligomycin (8 μg / mL) und die Aufzeichnung des Sauerstoffverbrauches für ca. zwei Minuten. Durch Oligomycin wurde die ATP-Synthase (EC 3.6.3.14) gehemmt und der nicht-phosphorylierende Sauerstoffverbrauch konnte gemessen werden.
8. Durch Zugabe von 1000 nM FCCP erfolgte die Entkopplung der Atmung und die Bestimmung der maximalen Atmungskapazität. Die optimale Konzentration für die maximale Entkopplung wurde in Vorversuchen mittels Titration bestimmt. Die Messung erfolgte für ca. zwei Minuten.
9. Aufgrund von Kontrollbestimmungen wurden anschließend 0,25 μM Rotenon für ca. zwei Minuten und 6 μM Antimycin A hinzugegeben. Rotenon hemmt Komplex I und Antimycin A hemmt Komplex II der mitochondrialen Phosphorylierung.

Der Kurvenverlauf des Versuches ist in Abbildung 28 dargestellt:

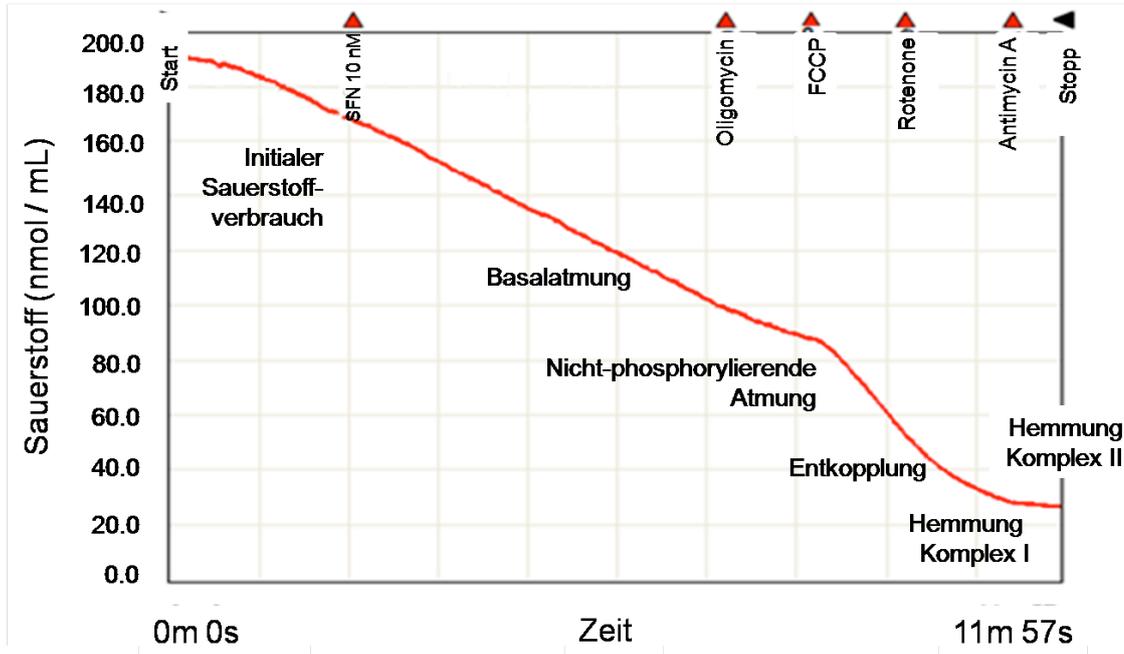


Abbildung 28: Kurve der Messung des Sauerstoffverbrauches. Aufgezeichnet mit dem Programm Oxygraph plus.

7.4. Statistik

7.4.1. Auswertung der 2-NBDG Glucoseaufnahme

Für die Ermittlung einer Standardgeraden wurde die Fluoreszenz von sieben Konzentrationen zwischen 0,01 μM und 1,5 μM von 2-NBDG gemessen. Aus Vorversuchen war bekannt, dass sich die Werte der Glucoseaufnahme-Untersuchung innerhalb dieser Konzentrationen befinden. Von jeder Konzentration wurde jeweils in Dreifachbestimmung 100 μL in ein Well ohne Zellen in eine 96-Well-Platte gegeben und im Plattenlesegerät die Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{Ex}} = 480$ nm und $\lambda_{\text{Em}} = 550$ nm von unten gemessen. Die Funktionsgleichung der Standardgeraden (siehe Abbildung 29) konnte nach Abzug des Kontrollwertes (0 μM , nur PBS) ermittelt werden.

7. Material und Methoden

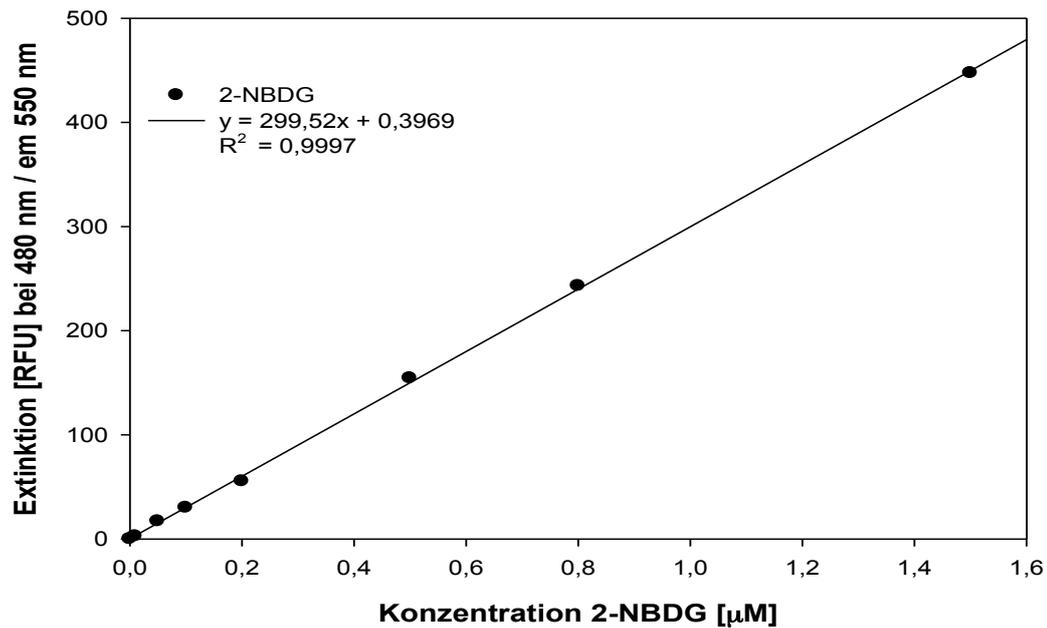


Abbildung 29: Standardgerade für verschiedene 2-NBDG-Konzentrationen. $n = 1$; $tr = 3$. Fluoreszenz gemessen von unten bei $\lambda_{\text{Ex}} = 480 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Em}} = 550 \text{ nm}$. $110 \mu\text{L}$ pro Well.

1. Die Berechnung erfolgte mit den Werten nach ein Mal Waschen mit PBS und 4 g / L Glucose.
2. Der Mittelwert des Proteingehaltes [mg/mL] wurde anhand der mitgeführten Standardgeraden errechnet bzw. der Mittelwert des DNA-Gehaltes [mg/mL] wurde errechnet.
3. Die Fluoreszenzwerte der Messung der 2-NBDG-Aufnahme wurden abzüglich der Blankwerte (Fluoreszenz nur PBS und $4 \text{ g D-Glucose / L}$) bestimmt und anschließend die 2-NBDG-Konzentration [μM] anhand der Geradengleichung errechnet.
4. Der 2-NBDG-Gehalt [μM] pro mg DNA oder Protein wurde bestimmt.
5. Als Bezugswert bzw. Kontrollwert wurde der Wert ohne Insulinstimulation und ohne Zusatz der zu testenden Substanz bei der 2-NBDG Inkubation ermittelt (= 100%).
6. Alle Werte wurden auf diesen Mittelwert bezogen und um bei der grafischen Darstellung die Veränderungen gegenüber der Kontrolle deutlich zu machen, jeweils der Wert 100 subtrahiert. Es ergab sich so die Darstellungsweise $\Delta T/C [\%]$ auf der y-Achse.
7. Der Standardfehler (SEM) wurde ermittelt.

8. Ein Ausreißertest nach Nalimov wurde durchgeführt. Anschließend wurden die Signifikanzen durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse („ANOVA“) der zeit- und konzentrationsabhängige Effekt durch eine einseitige Varianzanalyse geprüft.
9. Ein f-Test auf Varianzgleichheit und ein anschließender zweiseitiger studentischer t-test wurden paarweise und gegen die Kontrolle durchgeführt.

7.4.2. Auswertung des Proteingehaltes anhand der Bicinchoninsäure (BCA) Protein-Untersuchungsmethode

Durch Ermittlung einer Standardgeraden wurden anhand der Geradengleichung die Konzentrationen des vorhandenen Proteins in den Proben bestimmt.

7.4.3. Auswertung der Lipidakkumulation in 3T3-L1-Zellen mit Oil Red O

1. Von den ermittelten Absorptionen wurde der Kontrollwert (= Absorption ohne Zellen nach Oil Red O Färbung) abgezogen. Die Absorptionen der einzelnen Konzentrationen wurden auf den Mittelwert der mitgemessenen Kontrolle (Inkubation nur mit dem Lösungsmittel (= 100 %) bezogen.
2. Ein Ausreißertest nach Nalimov wurde durchgeführt und anschließend die Signifikanzen durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse („ANOVA“) ermittelt. Der zeit- und konzentrationsabhängige Effekt wurde durch eine einseitige Varianzanalyse geprüft. Weiters wurde ein f-Test auf Varianzgleichheit und ein anschließender zweiseitiger studentischer t-test paarweise und gegen die Kontrolle durchgeführt.
3. Um bei der grafischen Darstellung die Veränderungen gegenüber der Kontrolle deutlich zu machen, wurde jeweils der Wert 100 subtrahiert. Es ergab sich die Darstellungsweise $\Delta T/C$ [%] auf der y-Achse.
4. Die jeweiligen Standardfehler der Mittelwerte (SEM) wurden ermittelt.

7.4.4. Auswertung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs

Der Sauerstoffgehalt in der Lösung wurde vom Softwareprogramm in $\text{nmol O}_2 / \text{mL} / \text{min}$ ermittelt und als Kurve dargestellt. Durch die Ermittlung der durchschnittlichen Steigung der Kurve pro zugesetztem Reagenz und Bezug auf den initialen Sauerstoffverbrauch konnten die Änderungen im durchschnittlichen Sauerstoffverbrauch ermittelt werden.

Nach Durchführung eines Ausreißertests nach Nalimov wurden anschließend die Varianzgleichheit (f-Test) und die Signifikanzen (studentischer t-Test, zweiseitig) geprüft.

Der Respiratorische Kontrollindex (RCI) beschreibt die Kopplung zwischen Substratoxidation und ATP-Bildung. Er ergibt sich aus dem Verhältnis von Sauerstoffverbrauch während der Entkopplung mit FCCP und Sauerstoffverbrauch während der ATP-Synthase-Hemmung mit Oligomycin.

8. Ergebnisse und Diskussion

8.1. 2-NBDG-Aufnahme in 3T3-L1-Zellen

In Vorversuchen zeigte sich zunächst kein großer Unterschied in der 2-NBDG-Aufnahme zwischen der Inkubation mit Insulin und ohne Insulin. Reste des 2-NBDG, die an den Wänden der Wells haften blieben, wurden hierfür verantwortlich gemacht. Ein fünfminütiger Waschschrift mit PBS mit 4 g/L D-Glucose wurde daher durchgeführt. D-Glucose wirkte durch Verdrängung von 2-NBDG von der Oberfläche der Zellen und hemmte so die weitere Aufnahme (Zou et al. 2005).

Der erste Schritt war die Ermittlung der optimalen Inkubationszeit und der optimalen Insulinkonzentration, die die Glucoseaufnahme in 3T3-L1-Adipozyten am deutlichsten steigern konnten. Die eingesetzten Konzentrationen von Insulin waren 100 µg/mL und 250 µg/mL (Bytof et al. 2008), die getesteten Inkubationszeiten lagen zwischen einer Minute und vier Stunden. Die Messungen der Fluoreszenz wurden nach einmaligem Waschen durchgeführt.

Als optimal zeigte sich eine Inkubationszeit mit 100 µg / mL Insulin von fünf Minuten, da sich bei diesem Zeitpunkt in Gegenwart von Insulin eine Steigerung der 2-NBDG-Aufnahme von 13 % ($p < 0,05$) ergab.

8.2. Sulforaphan

Das Isothiocyanat Sulforaphan wird aus dem Glucosinolat Glucoraphanin gebildet, das in *Brassicaceae* in höheren Konzentrationen vorkommt. Im Körper wird Sulforaphan weiter metabolisiert. In Humanstudien, bei denen Broccoli verabreicht wurde, wurde freies Sulforaphan jedoch in höheren Konzentrationen als dessen Metabolite im Plasma detektiert (Vermeulen et al. 2008; Hanlon et al. 2009). Daher wurde zunächst der Einfluss von Sulforaphan auf die Glucoseaufnahme und Lipidakkumulation untersucht.

8. Ergebnisse und Diskussion

8.2.1. Einfluss verschiedener Sulforaphan-Konzentrationen auf die Glucoseaufnahme in 3T3-L1-Adipozyten

Veränderungen in der Glucoseaufnahme unter Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Sulforaphan wurden mit dem fluoreszierenden Glucosederivat 2-NBDG ermittelt. In Abbildung 30 sind die Ergebnisse der Inkubation mit 0,01 nM bis 10 μ M Sulforaphan dargestellt.

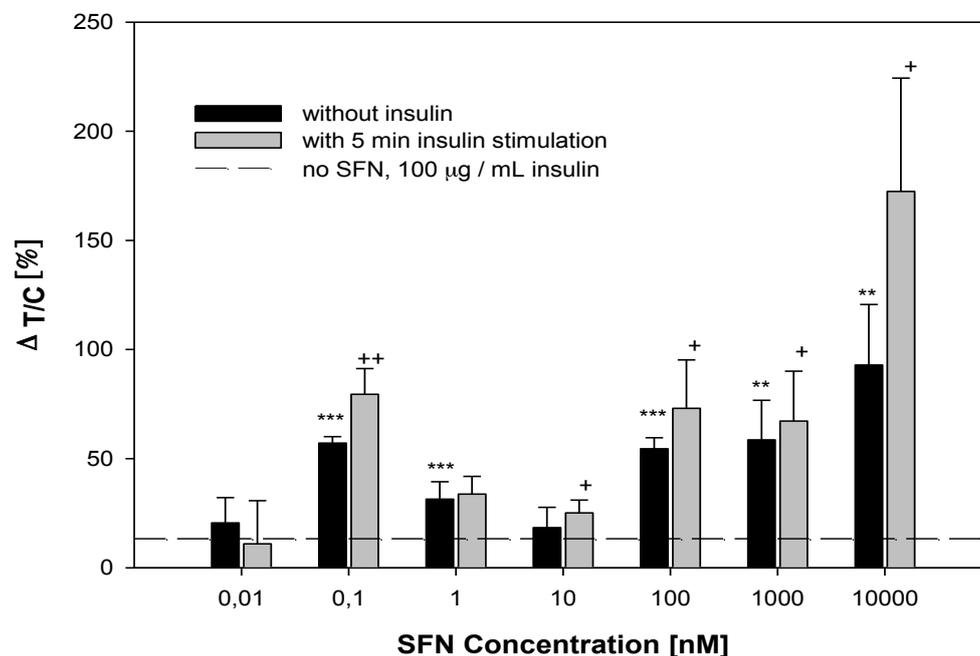


Abbildung 30: Veränderung der 2-NBDG Aufnahme in differenzierten 3T3-L1-Adipozyten nach Inkubation verschiedener Konzentrationen von SFN, normalisiert auf den DNA-Gehalt und bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, $n = 3$; $tr = 5 - 9$. Insulinstimulierung mit 100 μ g / mL fünf Minuten vor der Versuchsdurchführung. Inkubation mit 2-NBDG und der Substanz 20 Minuten. Signifikanzen wurden über ANOVA, f-Test auf Varianzgleichheit und anschließenden zweiseitigen t-test berechnet und sind gekennzeichnet mit: * = signifikant gegenüber „ohne Insulin, ohne Sulforaphan“, $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; + = signifikant gegenüber „mit Insulin, ohne Sulforaphan“, $p < 0,05$; ++ = $p < 0,01$. Mittelwert \pm SEM in %.

Ohne Zusatz von Sulforaphan konnte die Glucoseaufnahme mit vorheriger Insulinstimulierung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (= 0) um 13,28 % gesteigert werden (gestrichelte Linie) ($p < 0,05$). Nach Zugabe von Sulforaphan ergab die zweiseitige Varianzanalyse bei den Werten mit und ohne Insulin aller Konzentrationen einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$). Bei den Konzentrationen 0,1 nM, 100 nM und 1 μ M fand eine deutliche Steigerung der Glucoseaufnahme mit und ohne Insulinstimulierung statt, die sich im Bereich von + 50

% bis + 80 % im Vergleich zur Kontrolle bewegte. Bereits eine Inkubation nur mit Sulforaphan (ohne Insulin) zeigte bei diesen Konzentrationen eine deutliche Steigerung der Glucoseaufnahme, bezogen auf die Kontrolle ($p < 0,001$). Eine insulinähnliche Wirkungsweise von Sulforaphan konnte daher hier gezeigt werden. Eine zusätzliche Steigerung in der Glucoseaufnahme mit Insulin festgestellt konnte nicht festgestellt werden.

Es zeigte sich ein konzentrationsabhängiger, ansteigender Effekt in der Glucoseaufnahme mit einer Insulinbehandlung von 1 nM bis 10 μ M (mit ANOVA geprüft, $p < 0,05$). Die 2-NBDG Aufnahme in 3T3-L1-Adipozyten während einer Inkubation mit DL-Sulforaphan war wertmäßig mit + 172 % am höchsten bei einer Inkubation mit 10 μ M.

In der nachfolgenden Abbildung 31 ist die Gegenüberstellung der physiologisch erreichbaren Konzentrationen 0,1 nM, 1 nM und 10 nM von Sulforaphan zu sehen.

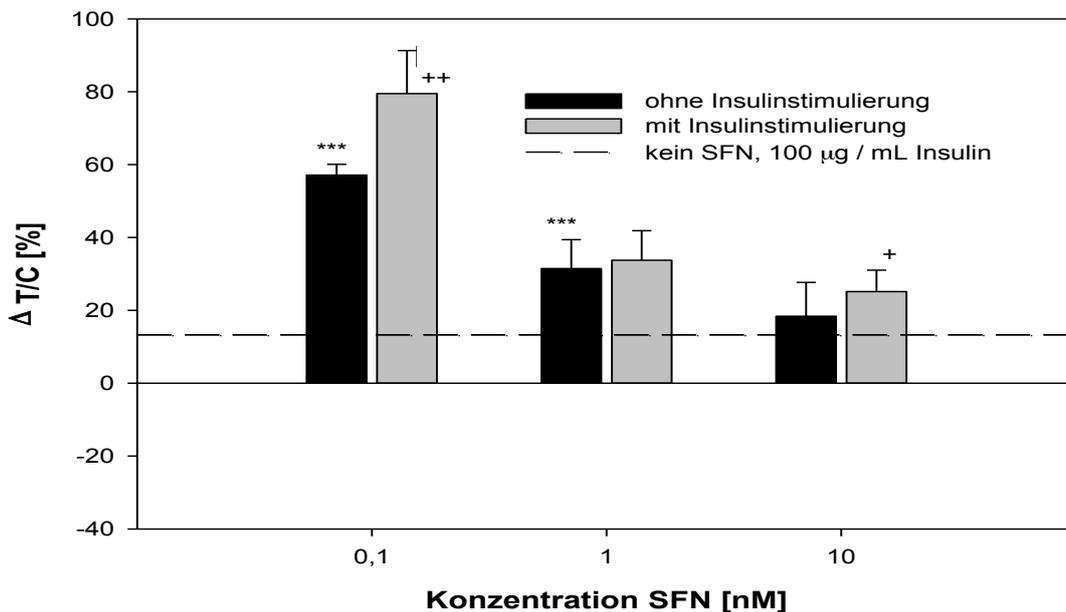


Abbildung 31: Veränderung der 2-NBDG Aufnahme in differenzierten 3T3-L1-Adipozyten nach Inkubation verschiedener Konzentrationen von SFN, normalisiert auf den DNA-Gehalt und bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, $n = 3$; $tr = 5 - 9$. Insulinstimulierung mit 100 μ g / mL fünf Minuten vor der Versuchsdurchführung. Inkubation mit 2-NBDG und der Substanz 20 Minuten. Signifikanzen wurden über ANOVA, f-Test auf Varianzgleichheit und anschließenden zweiseitigen t-test berechnet und sind gekennzeichnet mit: * = signifikant gegenüber „ohne Insulin, ohne Sulforaphan“, $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; + = signifikant gegenüber „mit Insulin, ohne Sulforaphan“, $p < 0,05$; ++ = $p < 0,01$. Mittelwert \pm SEM in %.

8. Ergebnisse und Diskussion

Bei den Wirkungen auf die Glucoseaufnahme konnte sowohl mit als auch ohne Insulinstimulation mit steigender Konzentration ein gegenläufiger Effekt gesehen werden (mit ANOVA geprüft, $p < 0,05$). Bei 0,1 nM wurde der deutlichste Anstieg der Glucoseaufnahme, ohne Insulinbehandlung mit 57 % festgestellt, der mit Insulinstimulierung jedoch nicht gesteigert werden konnte.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, die Behandlung mit Insulin die Glucoseaufnahme in die Zellen steigerte.

Die Glucoseaufnahme in die Zellen konnte mit alleiniger SFN-Behandlung, ohne Insulinstimulierung, vor allem mit den Konzentrationen 0,1 nM, 100 nM und 1 μ M gesteigert werden. Eine vorherige Insulinstimulierung hatte keinen zusätzlichen Effekt.

8.2.2. Einfluss von verschiedenen Sulforaphan-Konzentrationen auf die Lipidakkumulation in 3T3-L1-Zellen

Der Einfluss von Sulforaphan wurde anhand von drei Inkubationszeiträumen untersucht. Es wurde ermittelt, wie sich unterschiedliche Konzentrationen von Sulforaphan als Zusatz im Medium während der Differenzierungsphase (Tag 4 bis Tag 8), während der Reifungsphase (Tag 8 bis Tag 18) und während der Differenzierungs- und Reifungsphase (Tag 4 bis Tag 18) auf die Lipidakkumulation auswirkten. Je nach Entwicklungsphase können unterschiedliche (Transkriptions-)Faktoren Einfluss auf das weitere Wachstum haben (siehe Einleitungsteil).

In Abbildung 32 sind die Veränderungen in der Lipidakkumulation bei den drei verschiedenen Inkubationzeiten und den Konzentrationen 0,1 nM bis 1 μ M von Sulforaphan dargestellt.

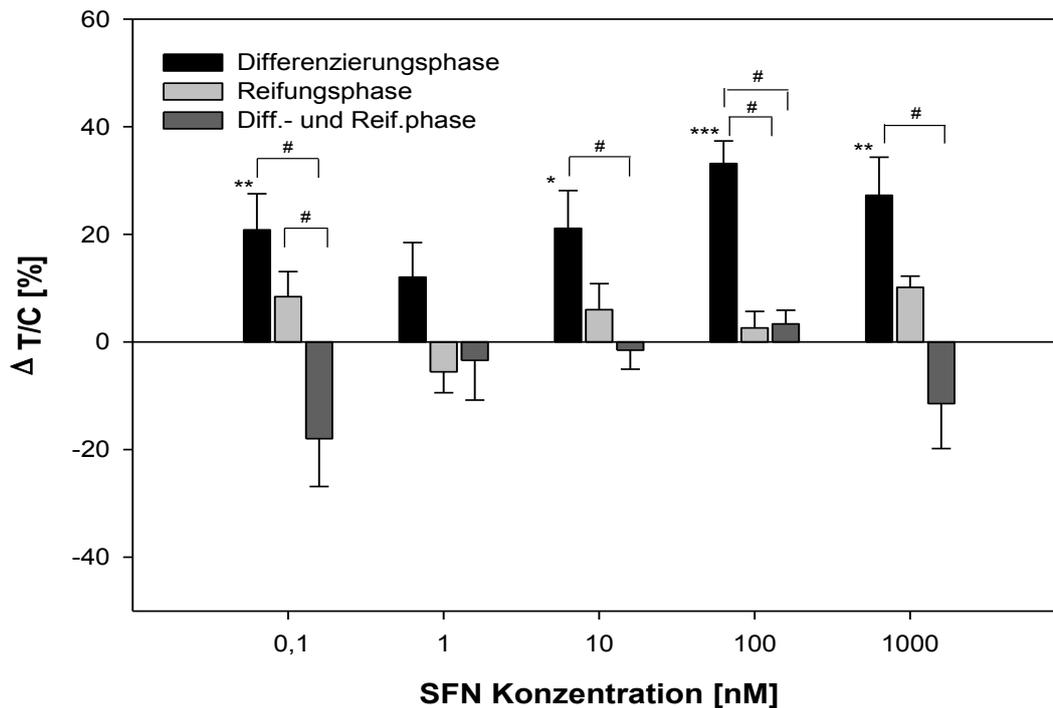


Abbildung 32: Veränderungen in der Lipidakkumulation in differenzierten 3T3-L1-Adipozyten unter Inkubation mit SFN in verschiedenen Konzentrationen und Zeitspannen, $n = 2$; $tr = 2 - 4$. Endkonzentration von SFN in den jeweiligen Medien. Bezogen auf die Kontrolle (behandelt nur mit dem Lösungsmittel 0,01 %ige Ameisensäure). Signifikanzen wurden über ANOVA, f-Test auf Varianzgleichheit und anschließenden zweiseitigen t-test berechnet und sind gekennzeichnet mit: * = signifikant gegen die Kontrolle, $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; # = signifikant im Vergleich mit anderer Inkubationszeit, $p < 0,05$. Mittelwert \pm SEM in %.

Die Zugabe von SFN während der Differenzierungsphase führte zu einer höheren Lipidakkumulation als die Zugabe von SFN in der Reifungsphase und in der Differenzierungs- und Reifungsphase. Nach Durchführung einer zweifaktoriellen Varianzanalyse konnte ein signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied zwischen den drei je nach Reifungsphase unterschiedlichen Inkubationszeiträumen festgestellt werden. Eine Inkubation während der Differenzierungsphase ließ die Lipidakkumulation ansteigen, wobei der Anstieg mit der Konzentration von 100 nM mit 33 % am deutlichsten ausgeprägt war ($p < 0,001$). Die Inkubation während der Reifungsphase zeigte keinen Einfluss auf eine Veränderung in der Akkumulation. Die Inkubation während der Differenzierungs- und Reifungsphase führte nach Einsatz jeder Konzentration (außer mit 1 nM) im Vergleich zur Inkubation während der Differenzierungsphase zu einer Senkung der Lipidakkumulation; bei 0,1 nM konnte die Senkung im Bezug zu den beiden anderen Inkubationszeiträumen festgestellt werden ($p < 0,05$).

8. Ergebnisse und Diskussion

Die Konzentration 0,1 nM, die die größte Wirkung bei der Glucoseaufnahme der physiologischen Konzentrationen zeigte, und ähnliche Steigerungen im Vergleich zu 100 nM aufwies, zeigte bei der Lipidakkumulation bei der Inkubation während der Differenzierung eine Steigerung von 21 % ($p < 0,01$). Die Inkubation während der Differenzierungs- und Reifungsphase mit der Konzentration 0,1 nM bewirkte im Gegensatz zur Konzentration von 100 nM eine starke Senkung der Lipidakkumulation von 20 %.

Da die Lipidakkumulation nach Inkubation mit Sulforaphan während der Differenzierungs- und Reifungsphase im Vergleich zu einer Inkubation während der Differenzierungsphase gesenkt wurde ($p < 0,05$) obwohl die Glucoseaufnahme gestiegen war, wurde untersucht, ob ein eventueller Entkopplungseffekt der Substanz für diesen Effekt verantwortlich sein könnte.

8.2.3. Einfluss von Sulforaphan auf den Sauerstoffverbrauch von 3T3-L1-Adipozyten

In Abbildung 33 sind die Änderungen im Sauerstoffverbrauch von 3T3-L1-Adipozyten nach der Zugabe von 10 nM Sulforaphan bzw. 0,001 % Ameisensäure, die als Lösungsmittel zugesetzt wurde und als Kontrolle diente, ersichtlich. Der respiratorische Kontrollindex lag bei der Behandlung mit HCOOH bei $3,27 \pm 0,20$ und bei der Inkubation mit SFN bei $3,24 \pm 0,08$.

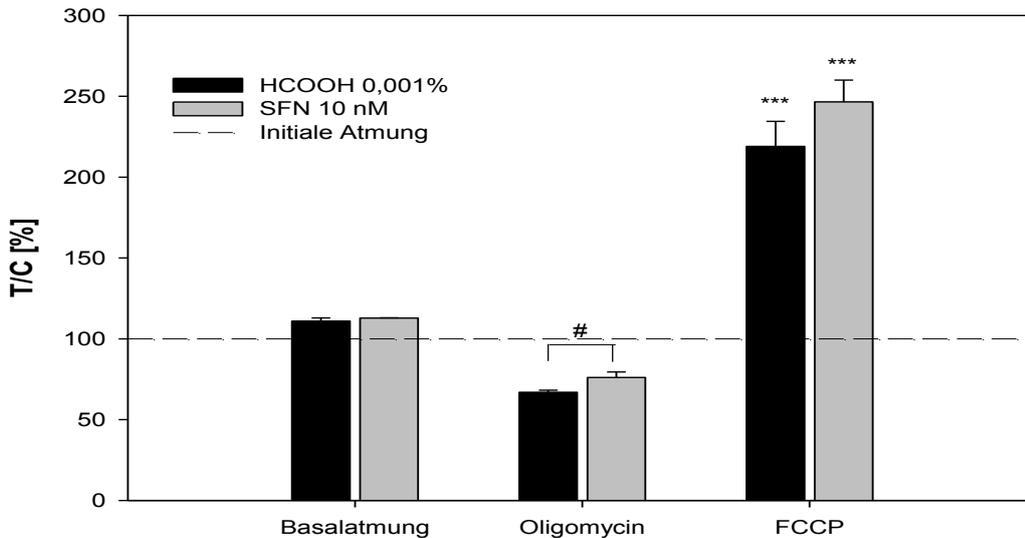


Abbildung 33: Wirkung einer Direktzugabe von 10 nM Sulforaphan auf die mitochondriale Atmung von 3T3-L1-Adipozyten im Vergleich zur Wirkung des Lösungsmittels 0,001 %ige HCOOH, $n = 4 - 6$. Messung der Sauerstoffabnahme unter Zugabe der Substanzen 0,001 % HCOOH bzw. 10 nM SFN und 8 $\mu\text{g} / \text{mL}$ Oligomycin und 1000 nM FCCP mit der Clark Elektrode und Bezug auf die initiale Atmung ($\text{nmol O}_2 / \text{min}$). Mittelwert \pm SEM in %. Tests auf Varianzgleichheit (f-Test) und anschließender Test auf Signifikanzen (studentischer t-Test, zweiseitig). *** = signifikant gegenüber Basalatmung, $p < 0,001$; # = gegeneinander signifikant ($p < 0,05$)

Der Sauerstoffverbrauch nach Zugabe von 10 nM Sulforaphan war im Vergleich zum initialen Sauerstoffverbrauch nicht erhöht. Eine anschließende Zugabe von Oligomycin, und daher eine Hemmung der ATP-Synthase (EC 3.6.3.14), führte jedoch zu einer Verminderung des Sauerstoffverbrauchs im Vergleich zur alleinigen Zugabe des Lösungsmittels ($p < 0,05$). Bei vorheriger Zugabe von SFN war die Hemmung weniger stark ausgeprägt (76 %) als bei der Lösungsmittelkontrolle (67 %). Die Entkopplung mit FCCP ließ den Sauerstoffverbrauch ansteigen ($p < 0,001$), wobei sich der Anstieg bei SFN (246,52 %) von dem der Lösungsmittelkontrolle (219 %) nicht signifikant unterschied.

8.2.4. Diskussion zu Sulforaphan

Sulforaphan zeigte eine insulinähnliche Wirkungsweise in differenzierten Adipozyten, da es in allen Konzentrationen, außer in der niedrigsten Konzentration von 0,01 nM, die Glucoseaufnahme förderte. Der wertmäßig größte fördernde Effekt konnte bei 10 μM mit + 172 % gesehen werden ($p < 0,05$ mit Insulinstimu-

8. Ergebnisse und Diskussion

lierung, $p < 0,01$ ohne Insulinstimulierung). Aber auch bereits die geringeren Konzentrationen 0,1 nM, 10 nM, 100 nM und 1 μ M wirkten sich sowohl ohne als auch nach vorheriger Insulinstimulierung steigernd auf die Glucoseaufnahme aus ($p < 0,05$ bis $p < 0,001$). Im Vergleich zu bereits publizierten Studien mit schwefelhaltigen Knoblauchverbindungen oder antidiabetisch wirksamen Substanzen konnte ein Effekt in den Versuchen der vorliegenden Arbeit schon bei weit geringeren Konzentrationen festgestellt werden (Liu et al. 2001; Lee et al. 2007). Die gesteigerte Glucoseaufnahme könnte mit einer erhöhten Expression der PI3-Kinase (EC 2.7.1.137) und dadurch ausgelöster erhöhter Translokation von GLUT4 erklärt werden, da die Expression der PI3-Kinase (EC 2.7.1.137) normalerweise durch Insulinstimulierung ausgelöst wird. Roffey et al. (2006) konnten mit antidiabetisch wirkendem Zimtextrakt eine gesteigerte Glucoseaufnahme durch gesteigerte Expression der PI3-Kinase (EC 2.7.1.137) zeigen. Nach vorheriger Insulinstimulierung konnte die Glucoseaufnahme im Vergleich zu keiner Insulinstimulierung bei keiner Konzentration gesteigert werden. Die Unwirksamkeit des Insulins bei den anderen Konzentrationen könnte womöglich durch dessen Wechselwirkung mit Sulforphan herbeigeführt werden, indem Aminosäuren mit der Schwefelgruppe des Sulforaphans reagieren (Traka et al. 2008).

Die Lipidakkumulation stieg nur bei der Inkubation während der Differenzierungsphase, obwohl diese Phase den kürzesten Zeitraum darstellte. Eine Inkubation während Differenzierungs- und Reifungsphase ließ die Lipidakkumulation im Vergleich zur Inkubation während der Differenzierungsphase bei den Konzentrationen 0,1 nM, 10 nM, 100 nM und 1 μ M sinken ($p < 0,05$). Ein ähnlicher Effekt wurde in der Studie von Lee et al. (2007) festgestellt, bei der 3T3-L1-Zellen mit 50 μ M bis 200 μ M Diallyl-Disulfid inkubiert wurden. Eine die Adipogenese fördernde Wirkung wurde nur in den ersten beiden Differenzierungstagen erreicht, bei der außerdem eine erhöhte Expression des transkriptionsfördernden Gens PPAR γ festgestellt wurde. Eine nachfolgende Inkubation zeigte keinen zusätzlichen Effekt. Auch bei Ambati et al. (2009) wurde eine sinkende Lipidakkumulation mit 12,5 μ M bis 200 μ M Ajoen während einer sechstägigen Differenzierungsphase festgestellt. Im Gegensatz zu den Studien von Lee et al. (2007) und Ambati et al. (2009) konnten in der vorliegenden Arbeit die

Effekte auf die Lipidakkumulation, wie es auch schon bei der Glucoseaufnahme der Fall war, schon mit weit geringeren Konzentrationen festgestellt werden.

Da die Glucosemoleküle in differenzierten Adipozyten nicht in Triglyceride umgewandelt wurden, stellt sich die Frage nach ihrem weiteren Stoffwechselweg. Aufgrund der polarographischen Versuche mit der Clark Elektrode konnte eine abgeschwächte Wirkung von Oligomycin auf den Sauerstoffverbrauch durch Direktzugabe von 10 nM Sulforaphan festgestellt werden. Da die Basalatmung unverändert blieb, könnte das Ergebnis auf eine mögliche Reaktion von Sulforaphan mit Oligomycin hindeuten, die in weiterer Folge einen Schutz vor Entkopplern bewirkte. Bereits 1979 wurde von Terada und Kubota die Wirkung von 50 μM 4-Bromophenylisothiocyanat auf Rattenleber-Mitochondrien beschrieben. Mit der Substanz wurde die durch Oligomycin gehemmte ATP-Synthase (EC 3.6.3.14) aktiviert. Es war jedoch nicht sicher, ob die Wirkung vom Isothiocyanat oder dessen Metabolisierungsprodukten herrührte.

In einer Studie von An et al. (2010) wurden mit 10 μM bis 100 μM des Extraktes von *Brassica campestris* spp. *rapa* 3T3-L1-Zellen für zehn Tage (Differenzierungs- und Reifungsphase) inkubiert. Der Extrakt, der reich an Glucoraphanin war, trug zur Senkung der Lipidakkumulation und zur verstärkten Expression des UCP-2 bei.

UCP-2 beugt einer mitochondrialen Dysfunktion und damit einer einhergehenden Insulinresistenz vor, indem es die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies beeinflusst (Kim et al. 2009; Dikov et al. 2010). Es wäre möglich, dass in der vorliegenden Arbeit Sulforaphan die Expression des UCP-2 verstärkte, wie bei An et al. (2010).

Eine Erklärung für anfänglich gesteigerte Lipidakkumulation könnte in der Hemmung der Histon Deacylase (HDAC) (EC 3.5.1.98) liegen. Histon Deacylasen können die Genexpression unterdrücken indem sie Histone, andere Proteine und Transkriptionsfaktoren deacylieren (Yoo et al. 2006). Durch die Hemmung von HDAC können in weiterer Folge PPAR γ -Gene verstärkt exprimiert und die Expression von GLUT4-Genen gesteigert werden. Bei Weems et al. 2011 wurde diese Wirkung in Präadipozyten festgestellt (Lee et al. 2007; Nian

8. Ergebnisse und Diskussion

et al. 2009; Weems und Olson 2011). Es wurde nachgewiesen, dass schwefelhaltige Knoblauchverbindungen die Fähigkeit hatten, die HDAC zu hemmen. Nian et al. (2009) konnten einen hemmenden Effekt von Sulforaphan auf die HDAC bei einer Gewebekonzentration von 3 μM bis 30 μM in menschlichen Darmkrebszellen beschreiben.

Von Zhang und Talalay (1998) wurde festgestellt, dass Sulforaphan schnell in 3T3-L1-Zellen aufgenommen wird und darin akkumuliert. Nach bereits 30minütiger Inkubation mit 5 μM Sulforaphan war die intrazelluläre Konzentration 80 Mal so hoch als die extrazelluläre Anfangskonzentration. Bei Lee et al. (2007) wurde festgestellt, dass bei intrazellulären Konzentrationen im dreistelligen μM -Bereich schwefelhaltige Knoblauchinhaltsstoffe keinen hemmenden Effekt mehr auf die HDAC haben und PPAR γ -Gene nicht mehr verstärkt exprimiert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Sulforaphan durch dessen Struktur möglicherweise einen hemmenden Effekt auf die HDAC haben kann. Zu Beginn der Differenzierung ist dieser Effekt womöglich hoch, sodass dadurch die Lipidakkumulation ansteigt. Bei steigender Inkubationsdauer und Konzentration sowie in gereiften Adipozyten lässt die Wirkung womöglich nach, was einen Einfluss auf die Lipidakkumulation haben kann. In ausdifferenzierten Adipozyten wirkt Sulforaphan insulinähnlich und fördert die Glucoseaufnahme.

Im Rahmen des Stoffwechselweges im Körper wird Sulforaphan weiter metabolisiert zu SFN-CYS-GLY, SFN-GSH, SFN-CYS und SFN-NAC. Auch mit diesen Metaboliten wurden Glucoseaufnahme- und Lipidakkumulationsversuche durchgeführt.

8.3. Sulforaphan-Cystein-Glycin

SFN-CYS-GLY entsteht extrazellulär aus SFN-GSH durch die Glutamyltranspeptidase (EC 2.3.2.2) und wurde im Plasma nach 200 g Konsum von rohem bzw. gekochtem Broccoli bei Vermeulen et al. 2008 bzw. 300 mL Broccoliensaft bei Hanlon et al. 2009 neben Sulforaphan in höheren Konzentrationen detektiert.

8.3.1. Einfluss verschiedener SFN-CYS-GLY-Konzentrationen auf die Glucoseaufnahme in 3T3-L1-Adipozyten

In Abbildung 34 sind die Ergebnisse der 2-NBDG-Aufnahme mit gleichzeitiger, zwanzigminütiger Inkubation von 0,1 nM bis 10 nM SFN-CYS-GLY zu sehen.

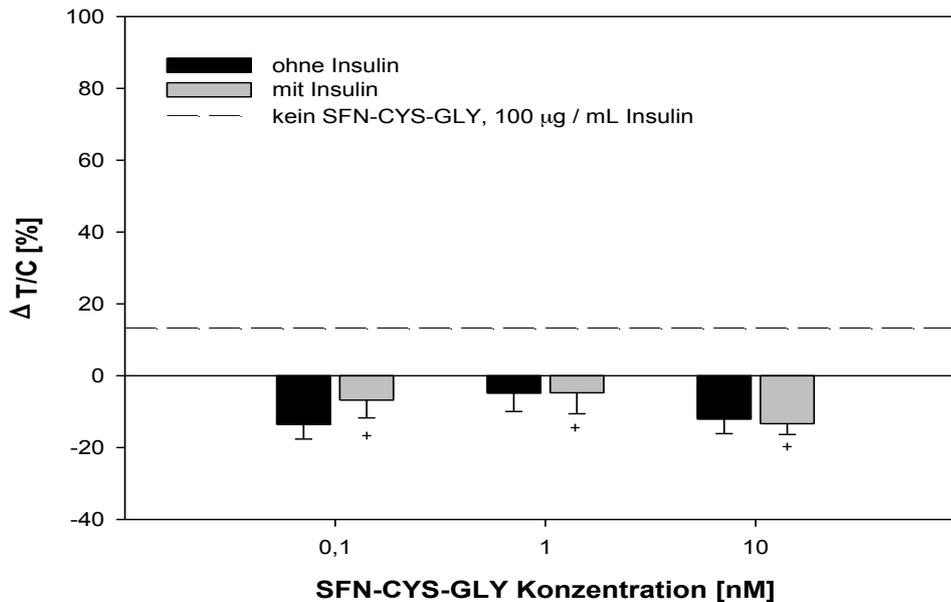


Abbildung 34: Veränderung der 2-NBDG Aufnahme in differenzierten 3T3-L1-Adipozyten nach Inkubation verschiedener Konzentrationen von SFN-CYS-GLY, normalisiert auf den DNA-Gehalt und bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, $n = 2$; $tr = 3 - 10$. Insulinstimulierung mit $100 \mu\text{g} / \text{mL}$ fünf Minuten vor der Versuchsdurchführung. Inkubation mit 2-NBDG und der Substanz 20 Minuten. Signifikanzen wurden über ANOVA, f-Test auf Varianzgleichheit und anschließenden zweiseitigen t-test berechnet und sind gekennzeichnet mit: + = signifikant gegenüber „mit Insulin, ohne SFN-CYS-GLY“, $p < 0,05$; Mittelwert \pm SEM in %.

Durch eine Inkubation mit SFN-CYS-GLY konnte keine signifikante Veränderung in der Glucoseaufnahme festgestellt werden. Es zeigte sich jedoch, dass nach Inkubation mit vorhergehender Insulinstimulierung die 2-NBDG-Aufnahme im Vergleich zur Insulinkontrolle sank und sich die Werte jeweils signifikant von dieser Kontrolle unterschieden ($p < 0,05$). Nach der Behandlung mit 10 nM betrug die Senkung in der Glucoseaufnahme im Vergleich zur Insulinkontrolle 27 %. Insulin zeigte in Verbindung mit der Substanz im Vergleich zu einer Behandlung ohne vorheriger Insulinstimulierung in allen getesteten Konzentrationen keine Glucoseaufnahme-steigernde Wirkung. Eine Inkubation mit der Konzent-

8. Ergebnisse und Diskussion

ration 1 nM und Insulinstimulation zeigte die geringste Senkung in der Glucoseaufnahme.

8.3.2. Einfluss verschiedener SFN-CYS-GLY-Konzentrationen auf die Lipidakkumulation

Die Lipidakkumulation, die über drei Inkubationszeiträume in den Konzentrationen 0,1 nM bis 1 μ M durchgeführt wurde, zeigte die in Abbildung 35 dargestellten Ergebnisse.

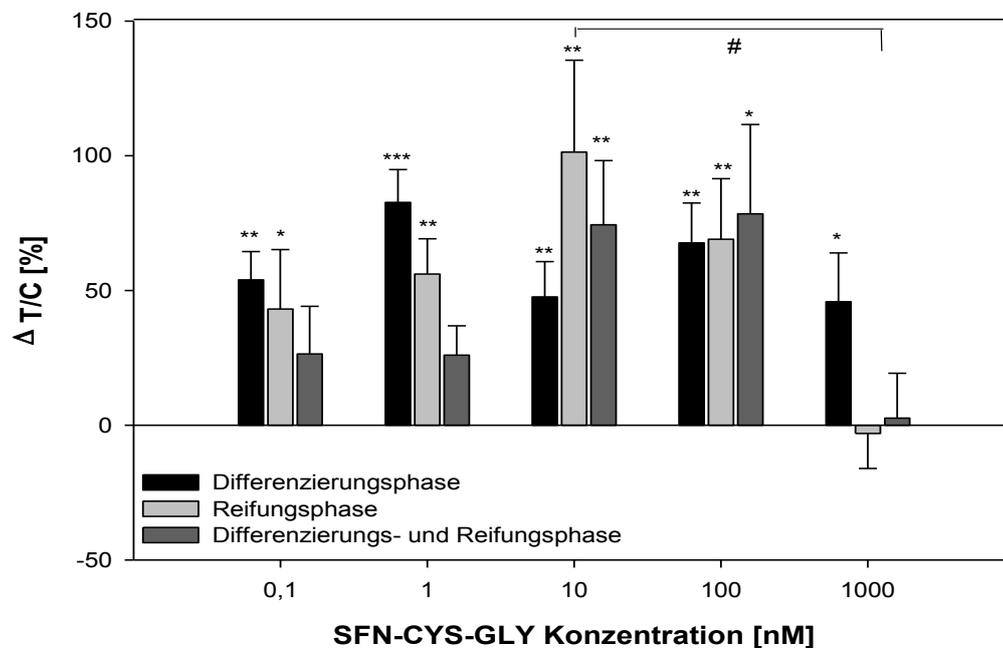


Abbildung 35: Veränderungen in der Lipidakkumulation bei differenzierten 3T3-L1-Adipozyten unter Inkubation mit SFN-CYS-GLY in verschiedenen Konzentrationen und Zeitspannen, $n = 3$; $tr = 2 - 4$. Endkonzentration von SFN-CYS-GLY in den jeweiligen Medien. Bezogen auf die Kontrolle (behandelt nur mit dem Lösungsmittel 0,01 %ige Ameisensäure). Signifikanzen wurden über ANOVA, f-Test auf Varianzgleichheit und anschließenden zweiseitigen t-test berechnet und sind gekennzeichnet mit: * = signifikant gegen die Kontrolle, $p = < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; # = signifikant gegeneinander $p < 0,05$; Mittelwert \pm SEM in %.

SFN-CYS-GLY zeigte eine sehr stark ausgeprägte Steigerung der Lipidakkumulation im Vergleich zur Kontrolle bei einer Inkubation während der Differenzierungsphase sowie bei einer Inkubation während der Reifungsphase in nahezu allen Konzentrationen ($p < 0,001$ bis $p < 0,05$). Eine Inkubation während der Differenzierungs- und Reifungsphase zeigte nur mit 10 nM mit + 74 % und 100

nM mit + 78 % Effekte ($p < 0,001$ bis $p < 0,05$). Es konnte aufgrund einer durchgeführten ANOVA kein konzentrationsabhängiger Effekt gefunden werden. Hingegen unterscheiden sich die Ergebnissen aller drei Inkubationsvarianten mit 10 nM, sowie mit 100 nM von den Ergebnissen der drei Inkubationsvarianten mit 1 μ M ($p < 0,05$). Die Konzentration 1 μ M hatte dabei eine geringere Wirkung als die anderen Konzentrationen. Bei der Behandlung während der Reifungsphase wurde mit 10 nM der größte Effekt mit einer Steigerung von 101 % bei der Glucoseaufnahme von allen Behandlungsmöglichkeiten und Konzentrationen gemessen. Dieses Ergebnis unterschied sich dabei von dem mit 10 nM ($p < 0,05$).

Eine Behandlung der 3T3-L1-Zellen mit 100 nM brachte bei allen drei Inkubationsmöglichkeiten vergleichbare Steigerungen mit sich. Bei der Inkubationsvariante während der Differenzierung war nach Inkubation mit 1 nM die größte Steigerung in der Glucoseaufnahme mit 83 % zu sehen ($p < 0,001$).

8.3.3. Diskussion zu Sulforaphan-Cystein-Glycin

Inwieweit SFN-CYS-GLY in Zellen aufgenommen wird und akkumuliert ist noch unklar (Ye et al. 2002). Bei der 2-NBDG-Aufnahme zeigte sich eine Abnahme mit und ohne Insulinstimulierung was auf einen Einfluss von SFN-CYS-GLY auf die Glucoseaufnahme hindeuten könnte, der durch Insulineinwirkung nicht verändert werden konnte. Bei der Lipidakkumulation wurde eine Zunahme bei allen Inkubationszeiträumen ermittelt. Einzig die Konzentration von 1000 nM zeigte bei der Lipidakkumulation eine geringere Wirkung im Vergleich zu den anderen.

In der Literatur konnten keine vergleichbaren Studien bezüglich dieser Wirkungsweise und über SFN-CYS-GLY gefunden werden. Vom Prinzip her sind eine gesenkte Glucoseaufnahme bei unveränderter Lipidaufnahme und eine gesteigerte Lipidakkumulation widersprüchlich. In bisherigen Studien wurde eine gesteigerte Glucoseaufnahme mit einer gesteigerten Lipidakkumulation in Verbindung gebracht (Cho et al. 2010) oder trotz gesteigerter Glucoseaufnahme keine Änderungen oder eine Senkung in der Lipidakkumulation festgestellt

8. Ergebnisse und Diskussion

(Liu et al. 2001; Alonso-Castro und Salazar-Olivo 2008). Letzteres könnte auf eine Entkopplungswirkung der Substanzen zurückzuführen sein.

Von Liu et al. (2001) konnte ebenfalls eine um 20 % verringerte Wirkung von Insulin auf differenzierte 3T3-L1-Adipozyten mit 15minütiger Inkubation von 0,1 g / L des Extraktes von *Lagerstroemia speciosa* L. gezeigt werden. Diese Verringerung in der Insulinwirkung bewirkte jedoch auch eine verringerte Lipidakkumulation.

Eine gesteigerte Lipidakkumulation, die wie bei Cho et al. (2010) mit Inkubation von 1 μ M und 10 μ M Daidzein und dessen Metaboliten Equol über acht Tage, inklusive der Differenzierungsphase, erreicht werden konnte, wurde mit gesteigerter PPAR γ -Proteinexpression in Verbindung gebracht, die sich gleichzeitig auch fördernd auf die Translokation von GLUT4 an die Zelloberfläche und gesteigerter Glucoseaufnahme auswirkten.

Eine erhöhte Expression von GLUT4, die laut Weems et al. (2011) vor allem in Präadipozyten stark ausgeprägt ist, kann durch Hemmung der HDAC ausgelöst werden (Lee et al. 2007; Weems und Olson 2011)). Laut Nian et al. (2009) ist die dem SFN-CYS-GLY ähnliche Substanz, SFN-CYS, der optimale HDAC Inhibitor, da diese aufgrund seiner Struktur genau in das Zentrum der HDAC passt und diese dadurch hemmen kann.

Die Glucoseaufnahme in die Zellen wurde am Tag 11 nach dem Ausstreuen bestimmt. Zu Beginn der Differenzierung wurden keine Versuche diesbezüglich durchgeführt. Möglicherweise wurde die Glucoseaufnahme in noch nicht ausgereiften Zellen, zu Beginn der Inkubationszeiten, nicht beeinträchtigt bzw. aufgrund der Hemmung der HDAC gefördert. Es wäre möglich, dass aufgrund der hohen Lipidbildung die Anzahl der freien Fettsäuren zunahm. Eine hohe Konzentration an freien Fettsäuren kann zur Bildung einer Insulinresistenz aufgrund von lipotoxischen Fettsäuremetaboliten beitragen (Dumas et al. 2009).

Eine Insulinresistenz kann auch durch gebildete Entzündungsfaktoren (z. B. Zytokine) gefördert werden. Nach Zhao et al. (2011) besitzt Sulforaphan aufgrund der Isothiocyanatstruktur die Fähigkeit, den Toll-ähnlichen Rezeptor 4 (TLR4) durch Bindung an dessen Cysteingruppe zu hemmen. In weiterer Folge wird die Entstehung der Entzündungsfaktoren gehemmt. SFN-CYS-GLY konnte

aufgrund der Studie von Zhao et al. (2011) einer Entstehung der Insulinresistenz nicht entgegenwirken, da eine Hemmung des Toll-ähnlichen Rezeptors 4 (TLR4), die anschließend die Entstehung von Entzündungsmediatoren hemmt, die eine Insulinresistenz verursachen können, nur mit freiem Sulforaphan möglich ist, da sonst keine Bindung an das Cystein des TLR4 erfolgen kann.

Eine starke Lipidakkumulation konnte trotzdem auch bei einer Inkubation während der Reifung gesehen werden, obwohl eine verringerte Glucoseaufnahme vorherrschte. Dies könnte womöglich durch weiterhin hohe PPAR γ -Konzentrationen begründet sein, die einer De-differenzierung entgegen wirkten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die stark erhöhte Fähigkeit von SFN-CYS-GLY zur Steigerung der Lipidakkumulation womöglich an einer Hemmung der HDAC liegen kann. Durch die sehr hohe Lipidbildung könnten viele freie Fettsäuren gebildet worden sein, die zur Ausbildung einer Insulinresistenz beitragen konnten und die SFN-CYS-GLY nicht verhindern konnte. Die Wirkung zur Hemmung der HDAC war jedoch womöglich so stark ausgeprägt, dass der Differenzierungszustand nach Ausbildung der Insulinresistenz beibehalten werden konnte. Aufgrund der Tatsache, dass es jedoch bei den Versuchsdurchführungen vermehrt zu Kontaminationen gekommen war, kann eine Beeinträchtigung dadurch an der Wirkung von SFN-CYS-GLY nicht ausgeschlossen werden.

8.4. Sulforaphan-Glutathion

8.4.1. Einfluss verschiedener SFN-GSH-Konzentrationen auf die Glucoseaufnahme in 3T3-L1-Adipozyten

Der Metabolit Sulforaphan-Glutathion konnte im Plasma in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden, was möglicherweise für eine höhere intrazelluläre Akkumulierung spricht (Ye et al. 2002). Dieser Metabolit entsteht intrazellulär aus Sulforaphan und Glutathion durch die Glutathion-S-Transferase (EC

8. Ergebnisse und Diskussion

2.5.1.18). Nach dem Export aus der Zelle kann er wieder zu Sulforaphan regeneriert oder weiter zur SFN-CYS-GLY metabolisiert werden.

In Abbildung 36 sind die Ergebnisse der 2-NBDG-Aufnahme mit gleichzeitiger 20minütiger Inkubation mit 0,1 nM bis 10 nM SFN-GSH dargestellt.

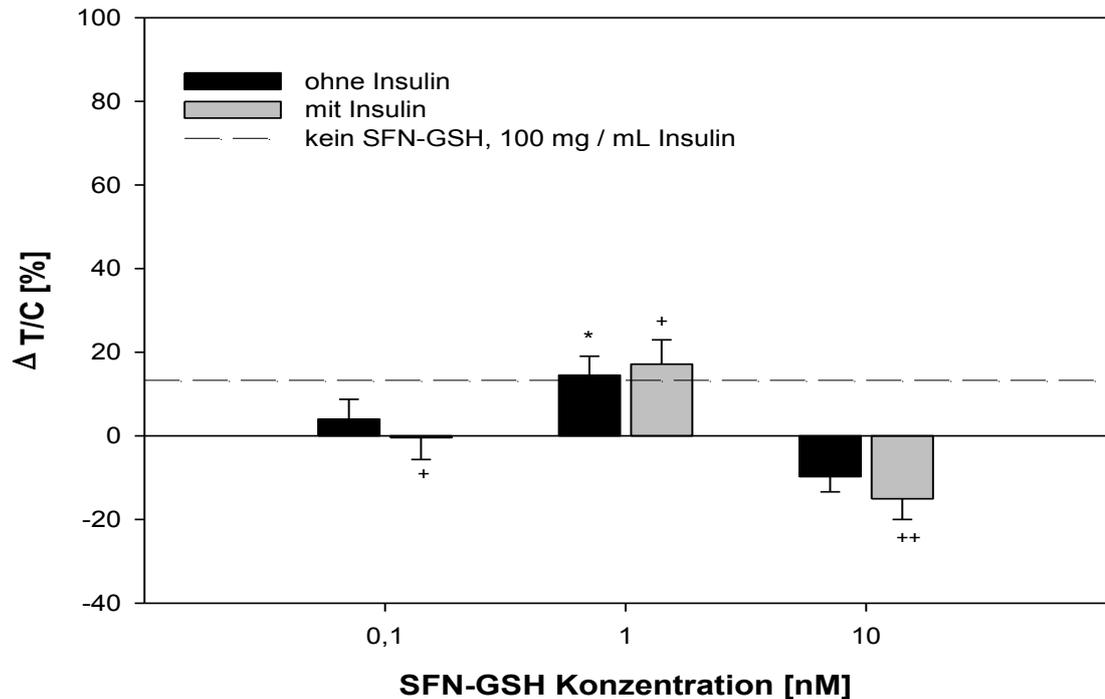


Abbildung 36: Veränderung der 2-NBDG Aufnahme in differenzierten 3T3-L1-Adipozyten nach Inkubation verschiedener Konzentrationen von SFN-GSH, normalisiert auf den DNA-Gehalt und bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, $n = 2$; $tr = 5 - 8$. Insulinstimulierung mit $100 \mu\text{g} / \text{mL}$ fünf Minuten vor der Versuchsdurchführung. Inkubation mit 2-NBDG und der Substanz 20 Minuten. Signifikanzen wurden über ANOVA, f-Test auf Varianzgleichheit und anschließenden zweiseitigen t-test berechnet und sind gekennzeichnet mit: * = signifikant gegenüber „ohne Insulin, ohne SFN-GSH“, $p < 0,05$; + = signifikant gegenüber „mit Insulin, ohne SFN-GSH“, $p < 0,05$; ++ = $p < 0,01$; Mittelwert \pm SEM in %.

Nach alleiniger Inkubation mit 1 nM SFN-GSH, ohne Insulinstimulierung, konnte eine Veränderung in der Glucoseaufnahme zur Kontrolle mit + 17 % festgestellt werden ($p < 0,05$), die jedoch mit 0,1 nM und 10 nM SFN-GSH nicht vorhanden war. Eine vorherige Insulinstimulierung bei dieser Konzentration zeigte keinen zusätzlichen Effekt, obwohl die Steigerung im Vergleich zur Insulinkontrolle mit + 4 % signifikant war ($p < 0,05$).

Die Ergebnisse der beiden anderen getesteten Konzentrationen nach Insulinstimulierung waren im Vergleich zur Insulinkontrolle signifikant ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$). Nach Inkubation mit 0,1 nM und 10 nM bewirkte die vorhergehende Stimulierung mit Insulin eine Senkung der Glucoseaufnahme von um 14 % bzw. um 28 % im Vergleich zur Insulinkontrolle.

8.4.2. Einfluss verschiedener SFN-GSH-Konzentrationen auf die Lipidakkumulation in 3T3-L1-Zellen

Um das Ausmaß der Lipidakkumulation unter Inkubation mit 0,1 nM bis 1 μ M SFN-GSH zu ermitteln, wurden die Zellen auch hier über drei verschiedene Inkubationszeiträume mit der Substanz behandelt und mittels Oil Red O Färbung der Triglyceridgehalt bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 37 dargestellt.

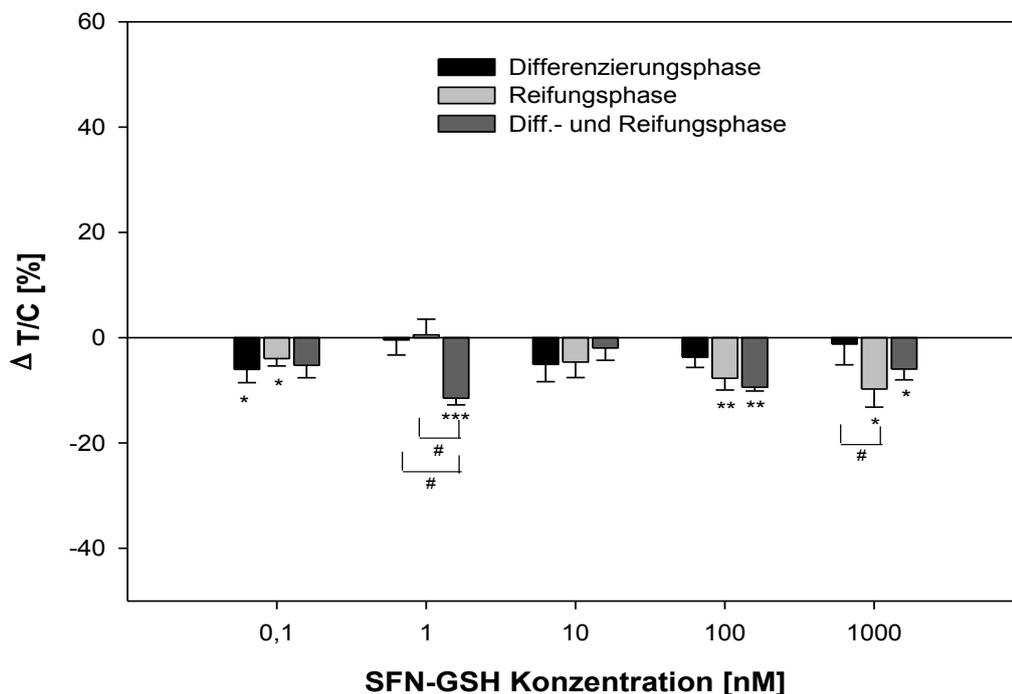


Abbildung 37: Veränderungen in der Lipidakkumulation bei differenzierten 3T3-L1-Adipozyten unter Inkubation mit SFN-GSH in verschiedenen Konzentrationen und Zeitspannen, $n = 2$; $tr = 2 - 4$. Endkonzentration von SFN-GSH in den jeweiligen Medien. Bezogen auf die Kontrolle (behandelt nur mit dem Lösungsmittel 0,01 %ige Ameisensäure). Signifikanzen wurden über ANOVA, f-Test auf Varianzgleichheit und anschließenden zweiseitigen t-test berechnet und sind gekennzeichnet mit: * = signifikant gegen die Kontrolle, $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; # = signifikant im Vergleich mit anderer Inkubationszeit, $p < 0,05$. Mittelwert \pm SEM in %.

8. Ergebnisse und Diskussion

Wie in Abbildung 37 ersichtlich, sank die Lipidakkumulation bei allen drei Inkubationszeiträumen, wobei diese Senkung jedoch nicht überall signifikant war. Nach Inkubation von 1 nM während der Differenzierungs- und Reifungsphase war die Senkung mit 12 % am höchsten ausgeprägt ($p < 0,001$) und gleichzeitig unterschiedlich im Vergleich zu den Ergebnissen der anderen Inkubationszeiten ($p < 0,05$). Die zweifaktorielle Varianzanalyse ergab signifikante Änderungen in der Lipidakkumulation bei allen drei Varianten mit den Konzentrationen 0,1 nM, 100 nM und 1000 nM im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$). Bei letzt genannter Konzentration unterschied sich das Ergebnis der Inkubation während der Reifungsphase signifikant von dem während der Differenzierungsphase ($p < 0,05$).

Mit der Konzentration 1 nM, die bei der Glucoseaufnahme die größte Steigerung bewirkte, wurde bei der Lipidakkumulation der größte Effekt bei der längsten Inkubationszeit ermittelt. Bei den anderen beiden Inkubationszeiträumen wurden keine Veränderungen festgestellt. Die Konzentration 10 nM, die bei der 2-NBDG-Aufnahme nach vorheriger Insulinstimulierung eine ausgeprägte ($p < 0,01$) Senkung zeigte, bewirkte bei allen drei Inkubationsvarianten in der Fettentwicklung keinen Unterschied zur Kontrolle.

8.5. Sulforaphan-Cystein

8.5.1. Einfluss verschiedener SFN-CYS-Konzentrationen auf die Glucoseaufnahme in 3T3-L1-Adipozyten

Wie bereits vorhin erwähnt, ist der Metabolit SFN-CYS in höheren Konzentrationen im Plasma nach Broccolikonsum zu finden (Hauder 2011). Dieser Metabolit entsteht extrazellulär durch die das Enzym Cysteinylglycinase (EC 3.4.11.2) aus SFN-CYS-GLY. Dessen Einfluss auf die Glucoseaufnahme und Lipidakkumulation wurde untersucht.

Auch mit SFN-CYS wurde die 2-NBDG-Aufnahme während Inkubation mit 0,1 nM bis 10 nM ermittelt. Bei diesem Metaboliten (in Abbildung 38 ersichtlich) wirkte sich eine Inkubation mit den Konzentrationen 0,1 nM, 1 nM und 10 nM

nicht auf Glucoseaufnahme aus. Nach vorhergehender Insulinstimulierung konnte sogar ein die Glucoseaufnahme senkender Effekt bei 0,1 nM von 23 % und 1 nM von 7 % gesehen werden ($p < 0,05$).

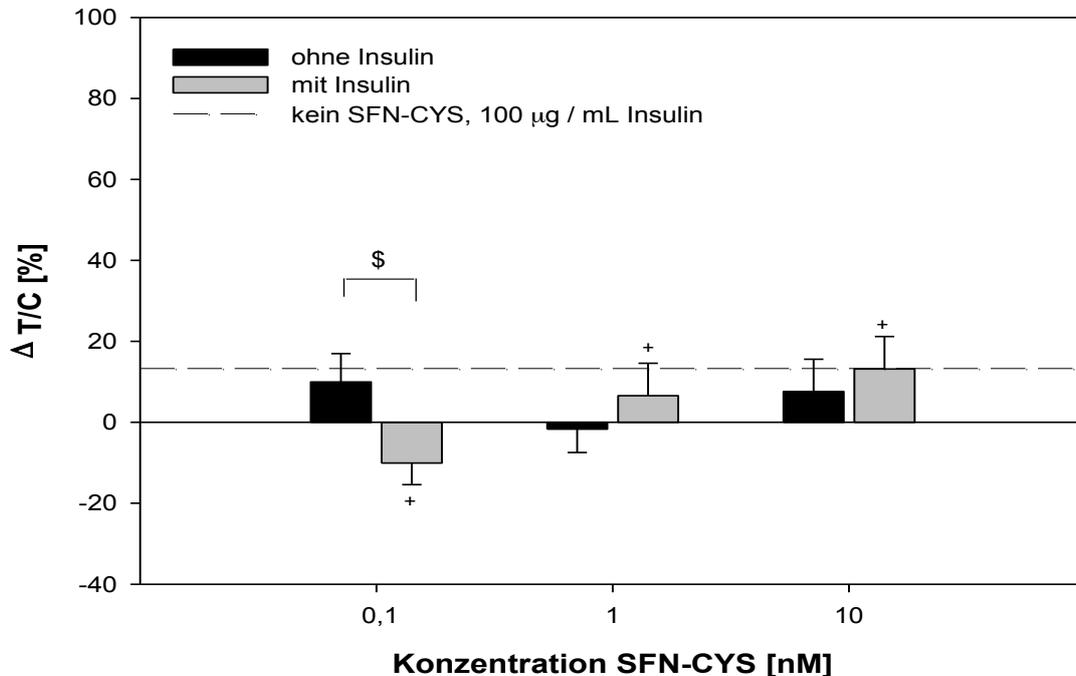


Abbildung 38: Veränderung der 2-NBDG Aufnahme in differenzierten 3T3-L1-Adipozyten nach Inkubation verschiedener Konzentrationen von SFN-CYS, normalisiert auf den DNA-Gehalt und bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, $n = 3$; $tr = 6 - 8$. Insulinstimulierung mit $100 \mu\text{g} / \text{mL}$ fünf Minuten vor der Versuchsdurchführung. Inkubation mit 2-NBDG und der Substanz 20 Minuten. Signifikanzen wurden über ANOVA, f-Test auf Varianzgleichheit und anschließenden zweiseitigen t-test berechnet und sind gekennzeichnet mit: * = signifikant gegenüber „ohne Insulin, ohne SFN-CYS“, $p < 0,05$; + = signifikant gegenüber „mit Insulin, ohne SFN-CYS“, $p < 0,05$. Mittelwert \pm SEM in %. \$ = signifikant gegeneinander, $p < 0,05$.

Die Änderung in der Glucoseaufnahme nach Inkubation mit SFN-CYS in der Konzentration von 0,1 nM war signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$).

8.5.2. Einfluss verschiedener SFN-CYS-Konzentrationen auf die Lipidakkumulation in 3T3-L1-Zellen

Versuche zur Lipidakkumulation (siehe Abbildung 39) mit dem Metaboliten SFN-CYS wurden ebenfalls über drei verschiedene Inkubationszeiträume durchgeführt.

8. Ergebnisse und Diskussion

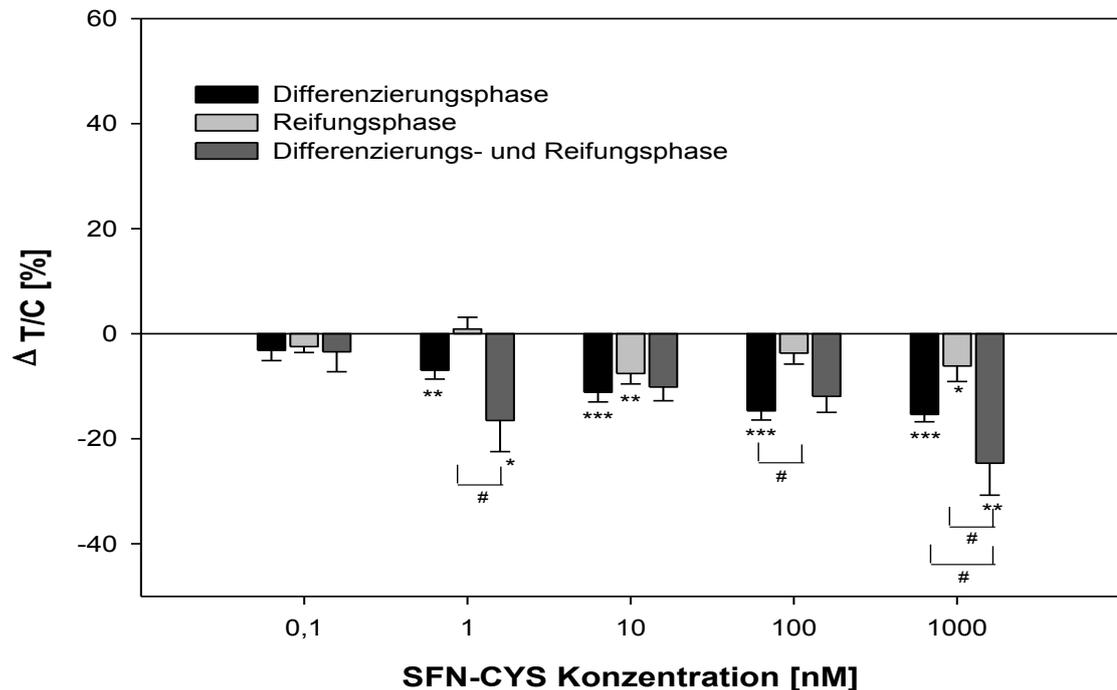


Abbildung 39: Veränderungen in der Lipidakkumulation bei differenzierten 3T3-L1-Adipozyten unter Inkubation mit SFN-CYS in verschiedenen Konzentrationen und Zeitspannen, $n = 3$; $tr = 2 - 4$. Endkonzentration von SFN-CYS in den jeweiligen Medien. Bezogen auf die Kontrolle (behandelt nur mit dem Lösungsmittel 0,01 %ige Ameisensäure). Signifikanzen wurden über ANOVA, f-Test auf Varianzgleichheit und anschließenden zweiseitigen t-test berechnet und sind gekennzeichnet mit: * = signifikant gegen die Kontrolle, $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; # = signifikant im Vergleich mit anderer Inkubationszeit, $p < 0,05$. Mittelwert \pm SEM in %.

Die Ergebnisse zur Lipidakkumulation nach Inkubation mit den Konzentrationen 0,1 nM bis 1 μ M zeigten vor allem nach Inkubation während der Differenzierungsphase und nach Inkubation während Differenzierungs- und Reifungsphase die größten Effekte, die signifikante Unterschiede zur Kontrolle waren ($p < 0,05$ bis $p < 0,001$). Die Ergebnisse dieser beiden Inkubationszeiträume waren jeweils unterschiedlich zu denen der Inkubation während der Reifungsphase (ANOVA, $p < 0,05$), bei der außer bei 10 nM ($p < 0,01$) und 1 μ M ($p < 0,05$) keine Effekte erkennbar waren.

Bei der Inkubation während der Differenzierungsphase konnte anhand einer zweifaktoriellen Varianzanalyse eine konzentrationsabhängige Senkung in der Lipidakkumulation festgestellt werden ($p < 0,05$).

Nach Inkubation mit der Konzentration 0,1 nM zeigten die Ergebnisse keinen signifikanten Unterschied bei allen Inkubationszeiträumen.

Nach Zugabe von 1 μ M SFN-CYS wurde nach der längsten Inkubationszeit die höchste Senkung mit 25 % erreicht ($p < 0,01$); diese war außerdem unterschiedlich zu der Wirkung von der Inkubation nur während der Differenzierungsphase ($p < 0,05$). Außerdem wurde bei dieser längsten Inkubationsvariante im Zuge der paarweisen Varianzanalyse ein Unterschied zwischen der Fettakkumulierung der Konzentrationen 0,1 nM und 1000 nM, 10 nM und 1000 nM sowie 0,1 nM und 1 nM festgestellt ($p < 0,05$).

8.6. Sulforaphan-N-Acetyl-Cystein

Der Metabolit SFN-NAC stellt das Ausscheidungsprodukt von Sulforaphan dar und kann nach Broccolikonsum in hohen Konzentrationen im Urin nachgewiesen werden (Hauder 2011). Er entsteht im Rahmen des Mercaptursäureweges extrazellulär aus SFN-CYS durch die Acetyltransferase (EC 2.3.1).

8.6.1. Einfluss verschiedener SFN-NAC-Konzentrationen auf die Glucoseaufnahme in 3T3-L1-Adipozyten

Die Ergebnisse zur Veränderung der Glucoseaufnahme, die durch Inkubation der 3T3-L1-Zellen mit 0,1 nM, 1 nM und 10 nM SFN-NAC bewirkt wurden, sind in Abbildung 40 dargestellt.

8. Ergebnisse und Diskussion

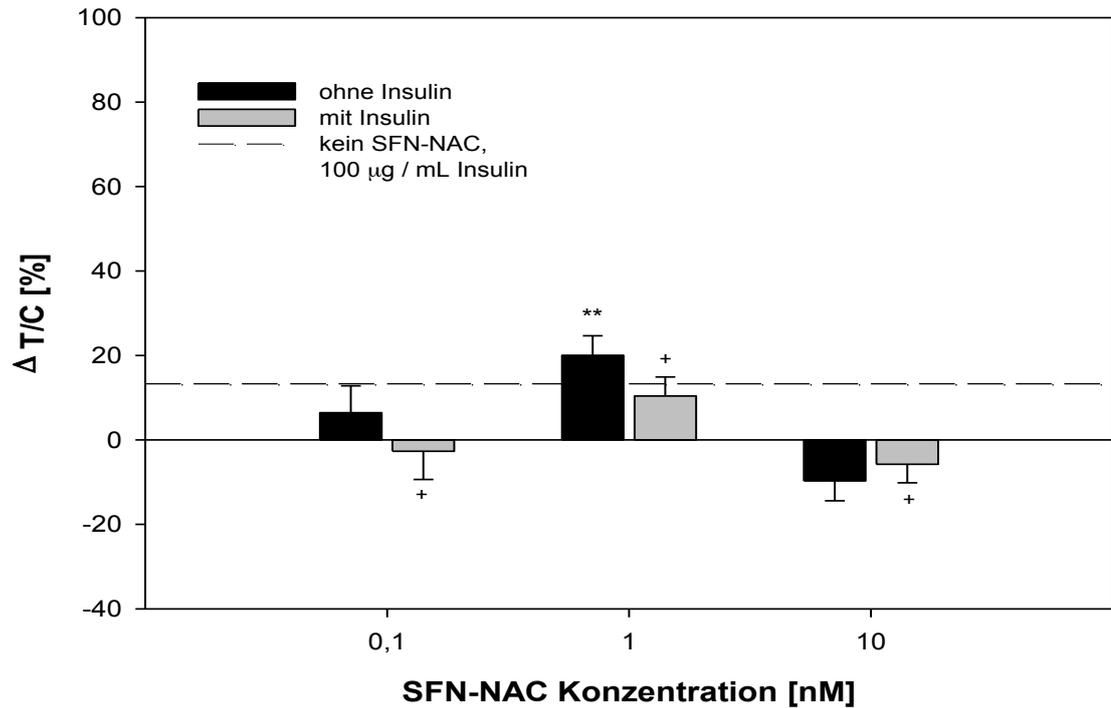


Abbildung 40: Veränderung der 2-NBDG Aufnahme in differenzierten 3T3-L1-Adipozyten nach Inkubation verschiedener Konzentrationen von SFN-NAC, normalisiert auf den DNA-Gehalt und bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, $n = 3$; $tr = 4 - 8$. Insulinstimulierung mit $100 \mu\text{g} / \text{mL}$ fünf Minuten vor der Versuchsdurchführung. Inkubation mit 2-NBDG und der Substanz 20 Minuten. Signifikanzen wurden über ANOVA, f-Test auf Varianzgleichheit und anschließenden zweiseitigen t-test berechnet und sind gekennzeichnet mit: * = signifikant gegenüber „ohne Insulin, ohne SFN-NAC“, $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; + = signifikant gegenüber „mit Insulin, ohne SFN-NAC“, $p < 0,05$. Mittelwert \pm SEM in %.

Es zeigte sich, dass eine Inkubation mit 1 nM SFN-NAC als einzige eingesetzte Konzentration eine signifikante Steigerung der Glucoseaufnahme mit 20 % ohne vorangehende Insulinstimulierung bewirkte ($p < 0,01$). Der Effekt mit zusätzlicher Insulinstimulierung war bei dieser Konzentration geringer, jedoch nicht signifikant unterschiedlich, und lag mit + 10 % unter dem Insulinkontrollwert ($p < 0,05$). Die Insulinstimulierung bewirkte bei den Konzentrationen 0,1 nM und 10 nM eine Senkung in der Glucoseaufnahme von 16 % bzw. 18 % bezogen auf die Insulinkontrolle ($p < 0,01$).

8.6.2. Einfluss verschiedener SFN-NAC-Konzentrationen auf die Lipidakkumulation in 3T3-L1-Zellen

Es zeigten sich bei der Lipidakkumulation (Abbildung 41), die nach Inkubation mit mit 0,1 nM bis 1 μ M gemessen wurde, im Gegensatz zur Glucoseaufnahme, bei allen Konzentrationen Senkungen.

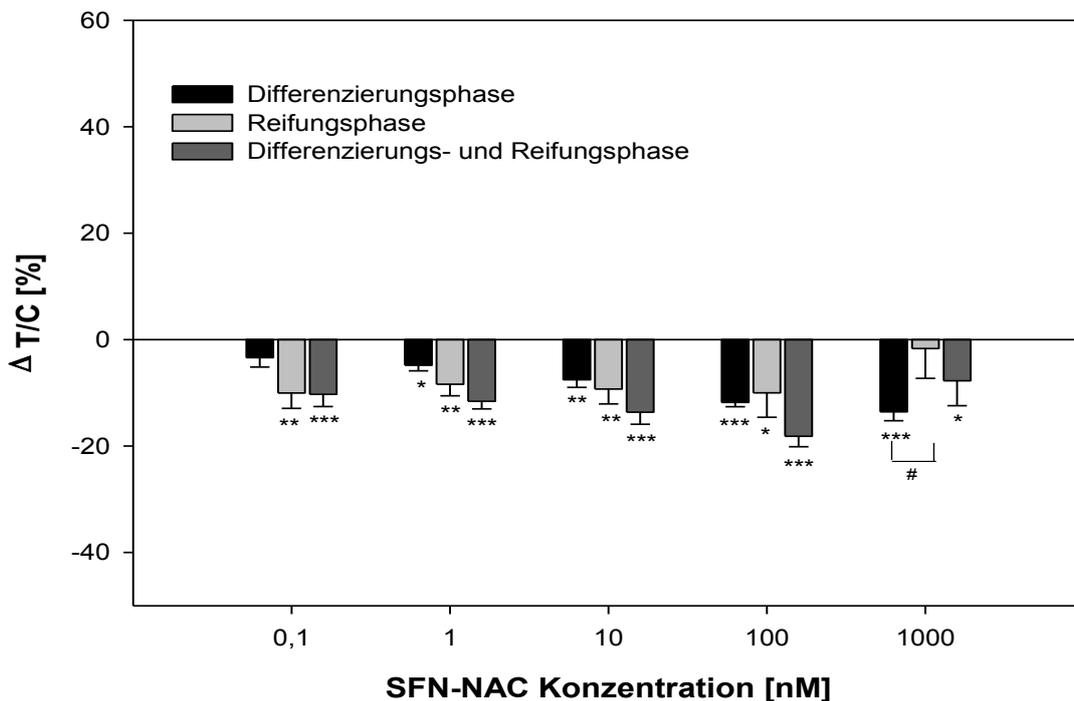


Abbildung 41: Veränderungen in der Lipidakkumulation bei differenzierten 3T3-L1-Adipozyten unter Inkubation mit SFN-NAC in verschiedenen Konzentrationen und Zeitspannen, $n = 3$; $tr = 3 - 4$. Endkonzentration von SFN-NAC in den jeweiligen Medien. Bezogen auf die Kontrolle (behandelt nur mit dem Lösungsmittel 0,01 %ige Ameisensäure). Signifikanzen wurden über ANOVA, f-Test auf Varianzgleichheit und anschließenden zweiseitigen t-test berechnet und sind gekennzeichnet mit: * = signifikant gegen die Kontrolle, $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; # = signifikant im Vergleich mit anderer Inkubationszeit, $p < 0,05$. Mittelwert \pm SEM in %.

Die Behandlung mit der Substanz während der Differenzierungsphase ließ aufgrund einer durchgeführten zweifaktoriellen Varianzanalyse eine konzentrationsabhängige Senkung erkennen ($p < 0,05$). Nach Inkubation mit SFN-NAC konnte bei nahezu allen Inkubationszeiträumen und Konzentrationen eine Senkung der Lipidakkumulierung festgestellt werden ($p < 0,001$ bis $p < 0,05$), wobei die prozentuale Senkung nach Inkubation mit 100 nM bei der Inkubation wäh-

8. Ergebnisse und Diskussion

rend der Differenzierungs- und Reifungsphase mit 18 % am deutlichsten ausgeprägt war ($p < 0,001$).

Nach Inkubation mit 1 μM SFN-NAC zeigten die Ergebnisse einer Inkubation während der Differenzierung die größten Ausprägungen von allen Konzentrationen, die außerdem signifikant unterschiedlich zur Inkubation während der Reifungsphase war ($p < 0,05$).

8.6.3. Diskussion zu Sulforaphan-Glutathion, Sulforaphan-Cystein und Sulforaphan-N-Acetylcystein

Die Ergebnisse dieser drei Metaboliten von Sulforaphan zeigten bei der Glucoseaufnahme nach Inkubation mit annähernd allen Konzentrationen eine geringere Insulinwirkung im Vergleich zur Insulinkontrolle. Dies könnte auch hier auf eine Wechselwirkung dieser Isothiocyanate mit Insulin hinweisen, die zu einer Beeinträchtigung der Insulinwirkung führen kann (Traka et al. 2008). Die Lipidakkumulation wurde ebenfalls mit allen Konzentrationen und Zeiträumen vermindert.

SFN wird als L-Cystein-Derivat in Zellen aufgenommen (Ye et al. 2002; Verkerk et al. 2009). SFN-CYS stellt laut Nian et al. (2009) aufgrund dessen Struktur den optimalen Hemmstoff der HDAC dar und hätte so das Potential die Glucoseaufnahme und die Adipogenese in 3T3-L1-Prädipozyten zu fördern (Nian et al. 2009; Weems und Olson 2011). Dieser Effekt konnte hier nicht festgestellt werden. Womöglich waren die eingesetzten Konzentrationen von 0,1 nM bis 10 μM zu gering. In den vorliegenden Ergebnissen ließ sich eine konzentrations- und zeitabhängige Senkung in der Lipidakkumulation bei der Inkubation während der Differenzierungsphase erkennen ($p < 0,05$), die bei 1000 nM am stärksten ausgeprägt war ($p < 0,001$). Die Ergebnisse der Inkubation während der Differenzierungsphase und während der Differenzierungs- und Reifungsphase waren jeweils unterschiedlich zu denen der Inkubation während der Reifungsphase (ANOVA, $p < 0,05$). In letzt genannter war der Einfluss des SFN-CYS auf die Verringerung der Lipidakkumulation weniger stark ausgeprägt.

SFN-GSH ist der Metabolit, der laut Callaway et al. (2004) in den höchsten Konzentrationen von allen Metaboliten in den Zellen akkumuliert. Einzig mit 1 nM SFN-GSH konnten gesteigerte Glucoseaufnahmen sowohl mit als auch ohne Insulinstimulierung gezeigt werden ($p < 0,05$). Eine Inkubation von 1 nM SFN-GSH bewirkte jedoch nur bei der längsten Inkubationszeit bei der Lipidakkumulation eine Senkung ($p < 0,001$).

SFN-NAC findet sich vor allem im Urin als Ausscheidungsprodukt. Die Aufnahme in die Zellen sowie der zugrunde liegende Mechanismus hierfür sind unklar (Ye et al. 2002). Einzig unter Inkubation mit 1 nM konnte die Glucoseaufnahme gesteigert werden.

Liu et al. konnten 2001 mit dem Extrakt von *Lagerstroemia speciosa* L. ähnliche Effekte nachweisen. Die genaue chemische Zusammensetzung von *Lagerstroemia speciosa* L. ist nicht bekannt, jedoch wird diese Pflanze auf den Philippinen zur Behandlung von Diabetes und Nierenerkrankungen eingesetzt. *Lagerstroemia speciosa* L. zeigte in der Konzentration von 0,1 g / L nach 15minütiger Inkubation 50 % der Insulinwirkung. In dieser Studie konnte ein die Glucoseaufnahme steigender Effekt in gereiften Adipozyten und ein die Glucoseaufnahme hemmender Effekt in Präadipozyten bzw. differenzierenden Adipozyten gezeigt werden. Der Differenzierungsgrad war durch die geringere Glucoseaufnahme geringer. Bei den Versuchen zur Lipidakkumulation wurde der Extrakt zu verschiedenen Zeitpunkten und Konzentrationen (0,02 g / L bis 0,5 g / L) während und nach der Differenzierung dem Medium zugegeben. Hemmende Effekte des Extraktes auf Dexamethason-IBMX induziertes PPAR γ und GLUT4 und daher verminderte Differenzierungs- und Reifungsneigungen wurden dafür verantwortlich gemacht.

Da laut Terada und Kubota (1979) eine Entkopplungswirkung von Dithiocarbamaten durch Beeinflussung des Protonengradienten möglich ist, könnte die Entkopplungswirkung so hoch gewesen sein, dass eine Insulinresistenz ausgelöst wurde, die sich in der verringerten Insulinwirkung in gereiften 3T3-L1-Adipozyten zeigte. Da Sulforaphan-Proteinverbindungen nach Zhao et al. (2011) kein Potential besitzen, durch Hemmung des TLR4 einer Insulinresistenz

8. Ergebnisse und Diskussion

entgegenzuwirken, könnte dies dadurch noch gefördert worden sein. Womöglich war die Glucoseaufnahme unter Inkubation mit den Metaboliten in Präadipozyten nicht beeinträchtigt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Metaboliten Sulforaphan-Glutathion, Sulforaphan-Cystein und Sulforaphan-N-Acetylcystein zu einer Senkung der Lipidakkumulation in 3T3-L1-Adipozyten beitragen konnten. Die Glucoseaufnahme in Adipozyten mit vorheriger Insulinstimulierung war, bis auf SFN-GSH 1 nM, um 13 % bzw. 28 % im Vergleich zur Insulinkontrolle reduziert, was auf eine sich entwickelnde Insulinresistenz bzw. auf eine Beeinflussung der Insulinwirkung hindeuten könnte.

8.7. Indol-3-Carbinol

Aus dem Glucosinolat Glucobrassicin entsteht das Isothiocyanat Indol-3-Methylisothiocyanat, das weiter zu Indol-3-Carbinol und Ascorbigen metabolisiert wird. Bei Hauder et al. (2011) konnte *in vivo* kein Indol-3-Carbinol detektiert werden, was wahrscheinlich an der Wechselwirkung mit Indol-3-Carbonsäure liegen kann, die im Zuge des Tryptophan-Metabolismus entsteht. Da jedoch bei Bradfield et al. (1987) der Hauptmetabolit *in vitro* Indol-3-Carbinol war, wurde in den Versuchen der vorliegenden Arbeit diese Substanz getestet.

8.7.1. Einfluss von verschiedenen Indol-3-Carbinol-Konzentrationen auf die Glucoseaufnahme in 3T3-L1-Adipozyten

In nachfolgender Abbildung 42 sind die Ergebnisse der Glucoseaufnahme nach Inkubation mit den Konzentrationen 0,1 nM, 1 nM und 10 nM von Indol-3-Carbinol dargestellt.

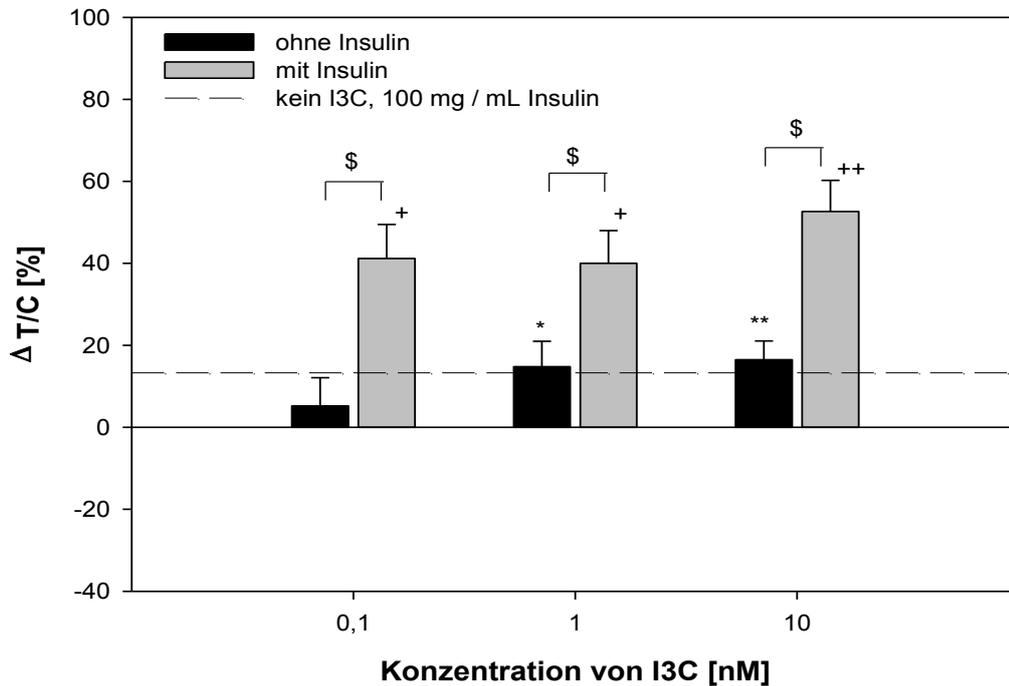


Abbildung 42: Veränderung der 2-NBDG Aufnahme in differenzierten 3T3-L1-Adipozyten nach Inkubation verschiedener Konzentrationen von I3C, normalisiert auf den DNA-Gehalt und bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, $n = 3$; $tr = 5 - 8$. Insulinstimulierung mit $100 \mu\text{g} / \text{mL}$ fünf Minuten vor der Versuchsdurchführung. Inkubation mit 2-NBDG und der Substanz 20 Minuten. Signifikanzen wurden über ANOVA, f-Test auf Varianzgleichheit und anschließenden zweiseitigen t-test berechnet und sind gekennzeichnet mit: * = signifikant gegenüber „ohne Insulin, ohne I3C“, $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; + = signifikant gegenüber „mit Insulin, ohne I3C“, $p < 0,05$; ++ = $p < 0,01$; Mittelwert \pm SEM in %. \$ = signifikant gegeneinander, $p < 0,001$.

Eine Inkubation mit Indol-3-Carbinol ohne vorherige Insulinstimulierung, in den Konzentrationen 1 nM und 10 nM, erhöhte die 2-NBDG-Aufnahme in die Adipozyten um 15 % bzw. 16 % ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$). Bei vorherigem Zusatz von Insulin und Behandlung mit I3C zeigten sich bei allen Konzentrationen deutlich ausgeprägte verstärkende Wirkungen, die Steigerungen in der Glucoseaufnahme von 26 % bis 40 % verglichen mit der Insulinkontrolle aufzeigten ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,001$). Beispielsweise war mit Inkubation von 0,1 nM die Differenz in der Glucoseaufnahme zwischen Insulinstimulierung und keiner Insulinstimulierung 36 % ($p < 0,05$). Bei 10 nM erreichte die Wirkung der Substanz gemeinsam mit Insulin mit einer Steigerung von 53 % die höchste Veränderung in der Aufnahme ($p < 0,01$). Sie lag hier um 37 % signifikant höher als ohne Insulinstimulierung. Bei dieser Konzentration war die Steigerung in der

8. Ergebnisse und Diskussion

Glucoseaufnahme ohne Insulinstimulierung am höchsten ausgeprägt ($p < 0,01$), wobei diese die Insulinkontrolle mit + 3% überschritt.

8.7.2. Einfluss von verschiedenen Indol-3-Carbinol-Konzentrationen auf die Lipidakkumulation in 3T3-L1-Zellen

Bei der Lipidakkumulation, die in Abbildung 43 dargestellt ist und mit den Konzentrationen von 0,1 nM bis 1 μM durchgeführt wurde, bewirkte Indol-3-Carbinol eine starke Senkung in der Lipidakkumulation mit allen Konzentrationen und allen Inkubationszeiten ($p < 0,05$ bis $p < 0,01$).

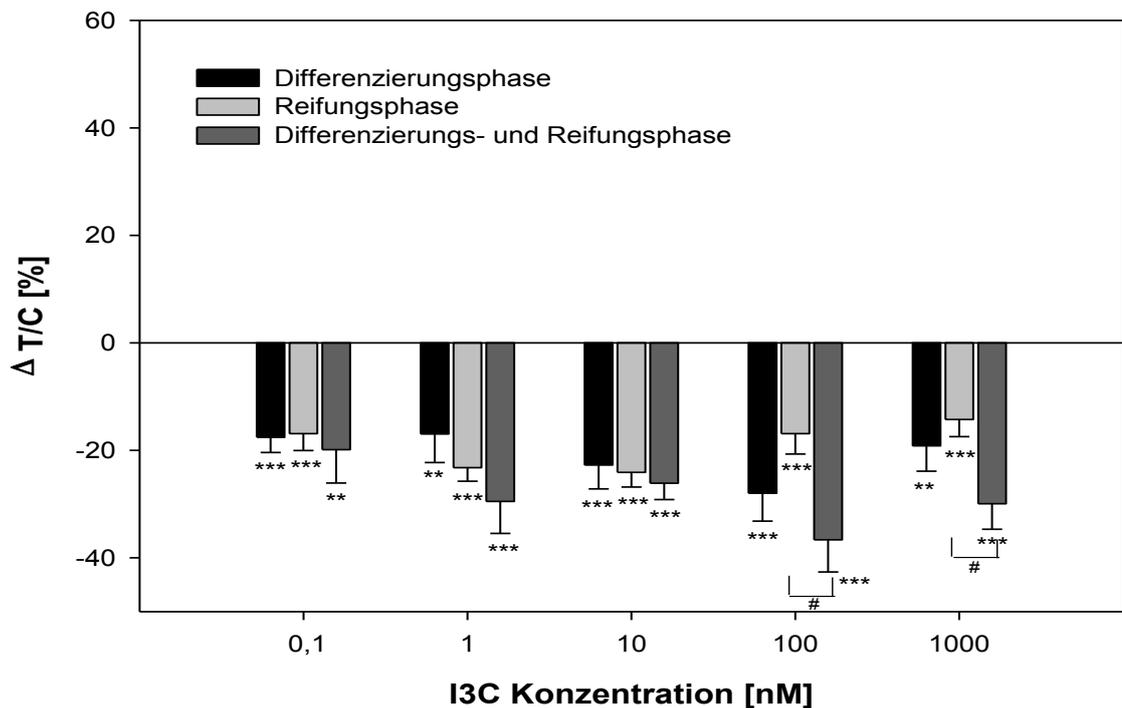


Abbildung 43: Veränderungen in der Lipidakkumulation bei differenzierten 3T3-L1-Adipozyten unter Inkubation mit I3C in verschiedenen Konzentrationen und Zeitspannen, $n = 3$; $tr = 2 - 4$. Endkonzentration von I3C in den jeweiligen Medien. Bezogen auf die Kontrolle (behandelt nur mit dem Lösungsmittel 0,01 %ige Ameisensäure). Signifikanzen wurden über ANOVA, f-Test auf Varianzgleichheit und anschließenden zweiseitigen t-test berechnet und sind gekennzeichnet mit: * = signifikant gegen die Kontrolle, $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; # = signifikant im Vergleich mit anderer Inkubationszeit, $p < 0,05$. Mittelwert \pm SEM in %.

Die Ergebnisse der Inkubation während der Differenzierungs- und Reifungsphase zeigten bei allen Konzentrationen die größten prozentualen Senkungen

($p < 0,001$). Laut zweifaktorieller Varianzanalyse wurde dabei ein signifikanter Unterschied zu den anderen beiden Inkubationszeiträumen festgestellt ($p < 0,05$). Der größte senkende Effekt wurde nach Behandlung der Zellen mit 100 nM I3C mit 37 % erreicht.

Die Senkungen in der Lipidakkumulation mit 100 nM und 1000 nM unterschieden sich des Weiteren zwischen dem längsten Inkubationszeitraum und der Inkubation nur in der Reifungsphase ($p < 0,05$).

Bei der Inkubationszeit während der Differenzierungsphase wurde die größte Senkung mit einer Inkubation mit 100 nM mit 28 %, bei der Inkubation während der Reifungsphase mit 10 nM mit 26 % erreicht ($p < 0,001$).

Die stärkste Senkung bei den getesteten physiologischen Konzentrationen wurde mit 1 nM mit bei der Inkubation während der Differenzierungs- und Reifungsphase mit 29 % festgestellt ($p < 0,001$). Die Effekte der anderen Inkubationszeiträume waren bei dieser Konzentration mit 17 % bzw. 23 % geringer ausgeprägt, jedoch auch signifikant im Vergleich zur Kontrolle. Nach Inkubation mit 10 nM waren bei allen drei Inkubationszeiträumen wertmäßig ähnliche Veränderungen in der Senkung mit 23 %, 24 % und 26 % zu sehen ($p < 0,001$).

8.8. Ascorbigen

Preobrazhenskaya et al. (1993) zeigten, dass Ascorbigen *in vitro* der Hauptmetaboliten von Glucobrassicin ist.

8.8.1. Einfluss verschiedener Ascorbigen-Konzentrationen auf die Glucoseaufnahme in 3T3-L1-Adipozyten

Die Ergebnisse zur Glucoseaufnahme mit dem Metaboliten ASG in den Konzentrationen 0,1 nM bis 10 nM sind in Abbildung 44 ersichtlich.

8. Ergebnisse und Diskussion

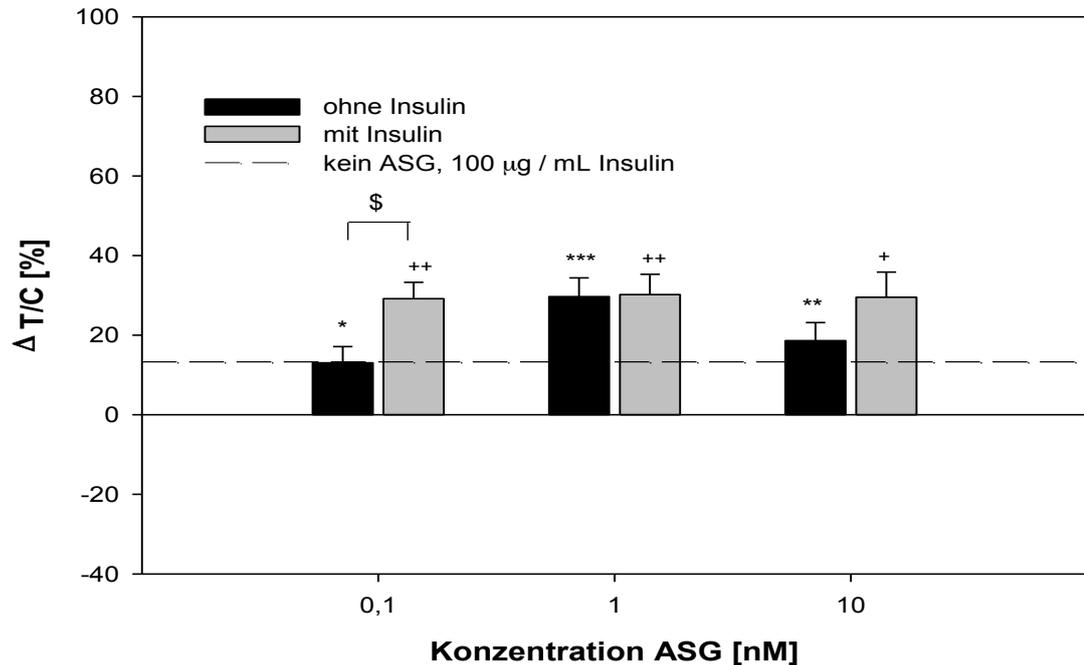


Abbildung 44: Veränderung der 2-NBDG Aufnahme in differenzierten 3T3-L1-Adipozyten nach Inkubation verschiedener Konzentrationen von ASG, normalisiert auf den DNA-Gehalt und bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, $n = 3$; $tr = 6 - 8$. Insulinstimulierung mit $100 \mu\text{g} / \text{mL}$ fünf Minuten vor der Versuchsdurchführung. Inkubation mit 2-NBDG und der Substanz 20 Minuten. Signifikanzen wurden über ANOVA, f-Test auf Varianzgleichheit und anschließenden zweiseitigen t-test berechnet und sind gekennzeichnet mit: * = signifikant gegenüber „ohne Insulin, ohne ASG“, $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; + = signifikant gegenüber „mit Insulin, ohne ASG“, $p < 0,05$, ++ = $p < 0,01$. Mittelwert \pm SEM in %. \$ = signifikant gegeneinander, $p < 0,01$.

Es zeigten sich relativ einheitliche Steigerungen der Glucoseaufnahme von 29 % bis 30 % sowohl mit als auch ohne Insulinbehandlung ($p < 0,01$ bis $p < 0,001$). Ein signifikanter Unterschied zwischen mit und ohne Insulinbehandlung konnte aufgrund eines zweiseitigen t-Tests bei 0,1 nM festgestellt werden ($p < 0,05$). Die höchste Steigerung in der Glucoseaufnahme ohne Insulinstimulierung wurde bei der Inkubation mit 1 nM ASG erreicht (30 %) ($p < 0,001$). Alle Erhöhungen der Glucoseaufnahme, außer mit 0,1 nM ohne Insulinbehandlung, lagen wertmäßig mit Steigerungen von 4 % bis 17 % über dem Insulinkontrollwert.

8.8.2. Einfluss verschiedener Ascorbigen-Konzentrationen auf die Lipidakkumulation 3T3-L1-Zellen

Die nachfolgende Abbildung 45 zeigt die Lipidakkumulation in 3T3-L1-Zellen während drei unterschiedlichen Inkubationszeiträumen von 0,1 nM bis 1 μ M Ascorbigen.

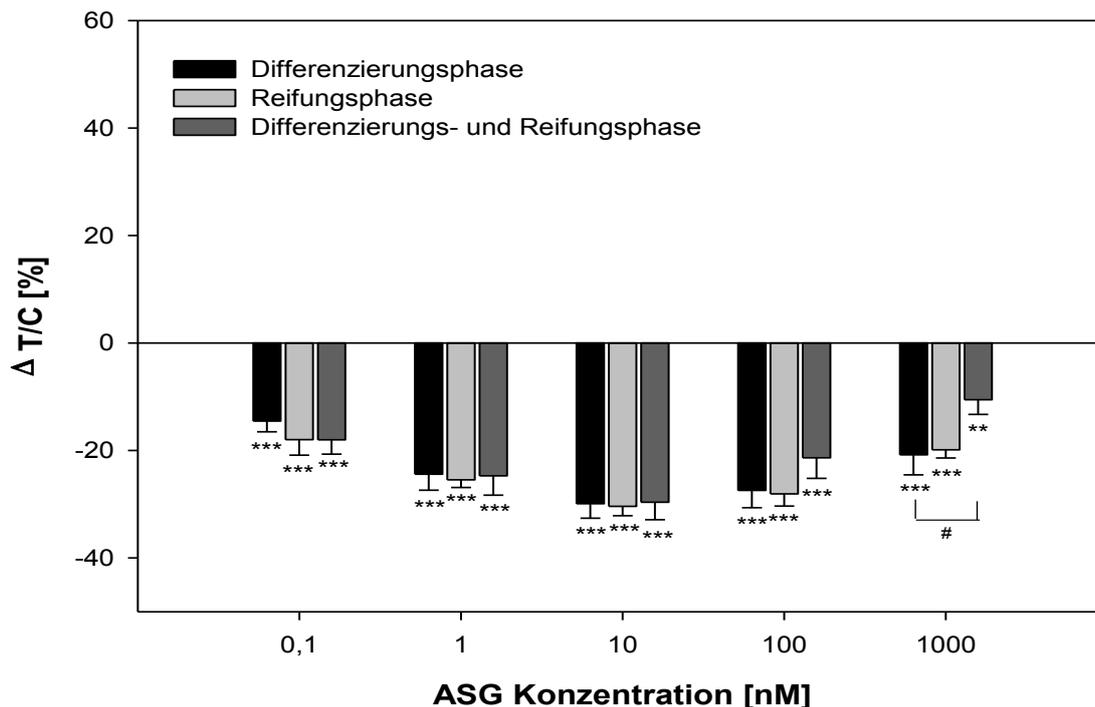


Abbildung 45: Veränderungen in der Lipidakkumulation bei differenzierten 3T3-L1-Adipozyten unter Inkubation mit ASG in verschiedenen Konzentrationen und Zeitspannen, $n = 3$; $tr = 2 - 4$. Endkonzentration von ASG in den jeweiligen Medien. Bezogen auf die Kontrolle (behandelt nur mit dem Lösungsmittel 0,01 %ige Ameisensäure). Signifikanzen wurden über ANOVA, f-Test auf Varianzgleichheit und anschließenden zweiseitigen t-test berechnet und sind gekennzeichnet mit: * = signifikant gegen die Kontrolle, $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; # = signifikant im Vergleich mit anderer Inkubationszeit, $p < 0,05$. Mittelwert \pm SEM in %.

Es konnten bei allen Konzentrationen und Inkubationszeiten ausgeprägte Senkungen festgestellt werden ($p < 0,01$ bis $p < 0,001$), wobei sich insgesamt laut ANOVA die Ergebnisse der Inkubation während der Differenzierungs- und Reifungsphase von denen während der Differenzierungsphase sowie von denen während der Reifungsphase unterschieden ($p < 0,05$). Laut Prüfung durch die zweifaktorielle Varianzanalyse erfolgten die Reduktionen bei allen Inkubationszeiten konzentrationsabhängig ($p < 0,05$), wobei sie bei 10 nM mit 30 % den

8. Ergebnisse und Diskussion

Maximalpunkt erreichten und dann wieder abnahmen. Die geringeren Senkungen, die bei Inkubation der Konzentrationen 10 nM bis 1 μ M zu sehen waren, waren laut durchgeführter ANOVA bei der Inkubation während der Reifungsphase und der Inkubation während der Reifungs- und Differenzierungsphase konzentrationsabhängig ($p < 0,05$). Insgesamt betrachtet waren die Senkungen bei den drei Inkubationszeiten pro Konzentration, außer nach Behandlung der Zellen mit 1000 nM, wertmäßig relativ einheitlich. Nach Behandlung mit 0,1 nM betrug die Senkung um 18%, bei 1 nM ca. 25 %, bei 10 nM ca. 30 % und bei 100 nM um die 27 %.

Nach Behandlung der Zellen mit 1000 nM waren die Änderungen nach der Inkubation während der Differenzierungsphase gegenüber der Inkubation während der Differenzierungs- und Reifungsphase signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). Es zeigten sich anhand der zweifaktoriellen Varianzanalyse auch noch weitere Signifikanzen zwischen den verschiedenen Konzentrationen der unterschiedlichen Inkubationsvarianten; so waren bei der Inkubation während der Differenzierungsphase die Werte der Konzentrationen 10 nM zu 0,1 nM und 100 nM zu 0,1 nM signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). Bei der Inkubation während der Reifungsphase ergab sich eine Signifikanz zwischen den Werten der Konzentrationen 10 nM und 0,1 nM ($p < 0,05$). Bei der längsten Inkubationsphase waren die Ergebnisse nach Inkubation mit 1000 nM signifikant anders als mit 10 nM und 1 nM und die Ergebnisse mit 10 nM anders als mit 0,1 nM ASG ($p < 0,05$).

Bei den physiologischen Konzentrationen wurde durch eine Inkubation mit 10 nM die deutlichste Senkung festgestellt ($p < 0,001$).

8.8.3. Diskussion zu Indol-3-Carbinol und Ascorbigen

Die Metabolite Indol-3-Carbinol und Ascorbigen zeigten ausgeprägte, die Glucoseaufnahme fördernde, insulinähnliche Wirkungen in allen getesteten Konzentrationen in gereiften 3T3-L1-Adipozyten ($p < 0,05$ bis $p < 0,001$), wobei jedoch nur Indol-3-Carbinol nach Einsatz aller getesteten Konzentrationen und Ascorbigen mit der Konzentration 0,1 nM nach Insulinstimulierung die Insulin-

wirkung ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,001$) förderte. Nach Inkubation mit 10 nM Indol-3-Carbinol und vorhergehender Insulinwirkung wurde die 2-NBDG-Aufnahme um 300 % gesteigert ($p < 0,05$). Die Lipidakkumulation wurde hingegen bei allen Konzentrationen und Inkubationszeiträumen relativ gleichmäßig gesenkt ($p < 0,01$ bis $p < 0,001$). Nach Auswertung der Daten aus der Inkubation mit Ascorbigen mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse konnten bei allen Inkubationszeiträumen eine konzentrationsabhängige Senkung der Lipidakkumulation bis 10 nM und eine anschließende konzentrationsabhängige Steigung bis 1 μ M festgestellt werden ($p < 0,05$). Ein Vergleich mit antidiabetisch wirkenden Pflanzenwirkstoffen in der Literatur scheint daher angebracht. Als diabetisch wirkende Stoffe wurden vor allem Extrakte aus Teilen verschiedener Baumarten, die in der traditionellen Medizin verwendet werden, untersucht. Die genauen chemischen Zusammensetzungen dieser Pflanzen sind nicht bekannt. Bei *Guazuma ulmifolia Lam* konnten hohe Gehalte an Phenolen, Flavonoiden, Tanninen, Alkaloiden, Procyaniden und cyanogenen Glycosiden detektiert werden (Alonso-Castro und Salazar-Olivo 2008).

Eine Studie, in der ein Extrakt die Insulinwirkung in diesem prozentualen Ausmaß verstärkte war die von Cho et al. (2010). Die 2-NBDG-Aufnahme in gereiften Adipozyten konnte durch Stimulation mit Insulin und Inkubation mit 1 μ M und 10 μ M Daidzein, einem Isoflavon mit Phenolgruppen, und dessen Metaboliten Equol um mehr als 100 % gesteigert werden. Die Wirkung wurde mit einer verstärkten Expression von PPAR γ und GLUT4 in Verbindung gebracht. In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Effekt mit viel geringeren Konzentrationen von I3C und ASG gezeigt werden. Die Lipidakkumulation wurde in der Studie von Cho et al. (2010) jedoch erhöht, sodass eine unterschiedliche Wirkungsweise im Vergleich zu Indol-3-Carbinol und Ascorbigen angenommen werden kann.

Die Ergebnisse von Indol-3-Carbinol und Ascorbigen lassen sich aufgrund ähnlicher Versuchsdurchführungen am ehesten mit denen der Studie von Liu et al. (2001) vergleichen, in der Extrakte von *Lagerstroemia speciosa L.* getestet wurden. *Lagerstroemia speciosa L.* zeigte in der Konzentration von 0,1 g / L nach 15minütiger Inkubation 50 % der Insulinwirkung. Die Wirkung von Insulin wurde durch Zugabe des Extraktes jedoch im Vergleich zu den vorliegenden Ergebnissen von Indol-3-Carbinol und Ascorbigen gesenkt. In dieser Studie

8. Ergebnisse und Diskussion

konnte ein die Glucoseaufnahme steigender Effekt in gereiften Adipozyten und ein die Glucoseaufnahme hemmender Effekt in Präadipozyten bzw. differenzierenden Adipozyten gezeigt werden. Der Differenzierungsgrad war durch die verringerte Glucoseaufnahme geringer. Bei den Versuchen zur Lipidakkumulation wurde der Extrakt zu verschiedenen Zeitpunkten und Konzentrationen (0,02 g / L bis 0,5 g / L) während und nach der Differenzierung dem Medium zugegeben. Eine stark verringerte Lipidakkumulation wie unter Inkubation mit Indol-3-Carbinol und Ascorbigen, wurde auch durch Inkubation mit *Lagerstroemia speciosa* L gesehen. Ein hemmender Effekt des Extraktes auf Dexamethason-IBMX induziertes PPAR γ und GLUT4 wurde dafür verantwortlich gemacht.

Die Tatsache, dass bei der Lipidakkumulation bei Indol-3-Carbinol und Ascorbigen auch durch eine Inkubation mit den Substanzen nach der Differenzierungsphase, nur während der Reifungsphase, eine verringerte Fettentwicklung zu sehen war, kann dadurch jedoch nicht erklärt werden. Möglicherweise wurde PPAR γ auch in differenzierten Adipozyten negativ beeinflusst, sodass eine De-differenzierung erfolgen konnte (Rosen und MacDougald 2006).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Insulin-verstärkende Wirkung und gesteigerte Glucoseaufnahme über erhöhte Expression der Phosphoinositid-3-Kinase (EC 2.7.1.137) und GLUT4 hergestellt werden könnten. Die stark verringerte Lipidakkumulation könnte über eine De-differenzierung, z. B. durch negative Beeinflussung von PPAR γ , erreicht worden sein.

9. Schlußbetrachtung

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Einfluss von Sulforaphan, dessen Metaboliten SFN-CYS-GLY, SFN-GSH, SFN-CYS und SFN-NAC sowie Indol-3-Carbinol und Ascorbigen auf die Glucoseaufnahme und Lipidakkumulation in 3T3-L1-Zellen untersucht. Im Zuge der Glucoseaufnahme wurde ein eventueller Einfluss der Substanzen auf die Insulinwirkung untersucht; im Zuge der Lipidakkumulation wurde getestet, ob sich die Substanzen je nach Differenzierungsgrad der Zellen unterschiedlich auf die Akkumulierung auswirkten.

Da eine Plasmakonzentration von Sulforaphan und dessen Metaboliten im unteren nanomolaren Bereich in einigen Studien nachgewiesen werden konnte (Hanlon et al. 2008; Vermeulen et al. 2008; Hauder et al. 2011), sind die Ergebnisse der Glucoseaufnahme und der Lipidakkumulation nach Inkubation mit den dafür repräsentativen physiologisch vorkommenden 10 nM in den Abbildungen 46 und 47 für alle getesteten Substanzen gegenübergestellt.

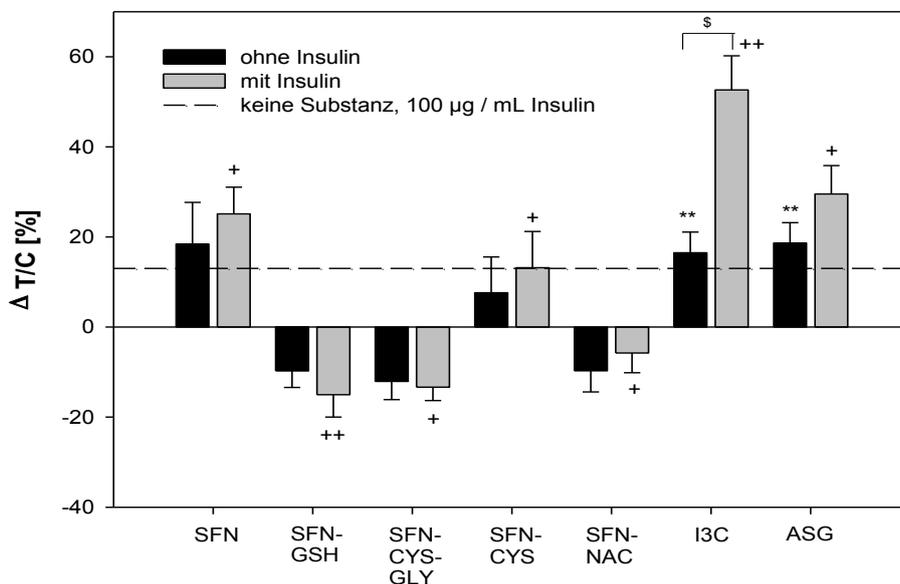


Abbildung 46: Gegenüberstellung aller Substanzen in der 2-NBDG Aufnahme in differenzierten 3T3-L1-Adipozyten nach Inkubation mit 10 nM Substanz, normalisiert auf den DNA-Gehalt und bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, n = 2 - 3; tr = 2 - 10. Insulinstimulierung mit 100 µg / mL fünf Minuten vor der Versuchsdurchführung. Inkubation mit 2-NBDG und der Substanz 20 Minuten. Signifikanzen wurden über ANOVA, f-Test auf Varianzgleichheit und anschließenden zweiseitigen t-test berechnet und sind gekennzeichnet mit: + = signifikant gegenüber „mit Insulin, ohne Substanz“, p < 0,05; ++ = p < 0,01; * = signifikant gegenüber „ohne Insulin, ohne Substanz“, p < 0,05; ** = p < 0,01; Mittelwert ± SEM in %. F-Test auf Varianzgleichheit, anschließend zweiseitiger t-test. \$ = signifikant gegeneinander, p < 0,001.

9. Schlußbetrachtung

Eine Behandlung mit Insulin bewirkte eine gesteigerte Glucoseaufnahme von 13 % ($p < 0,05$). Es zeigte sich, dass durch die Inkubation mit 10 nM I3C und ASG die Glucoseaufnahme ohne Insulinstimulierung gesteigert werden konnte ($p < 0,01$). Diese Substanzen zeigten daher dem Insulin ähnliche Wirkungsweisen. Nach Zusatz von 10 nM I3C, Ascorbigen und SFN und vorheriger Insulinstimulierung wurde die Glucoseaufnahme ebenfalls signifikant zur Insulinkontrolle gesteigert ($p < 0,05$ bis $p < 0,01$). Die prozentuale Steigerung durch Inkubation mit SFN und vorheriger Insulinstimulierung war dabei ähnlich ausgeprägt wie mit ASG. Eine besonders starke Steigerung von circa 300 % ($p < 0,01$, getestet gegen Insulinkontrolle) konnte mit vorheriger Insulinstimulierung und nach Inkubation mit I3C festgestellt werden ($p < 0,05$), woraus sich schließen lässt, dass diese Substanz in der vorliegenden Konzentrationen womöglich die Wirkungen des Insulins steigern konnte. Durch Inkubation mit 10 nM SFN-GSH, SFN-CYS-GLY und SFN-NAC und vorheriger Insulinstimulierung wurde die Glucoseaufnahme im Vergleich zur Insulinkontrolle gesenkt ($p < 0,05$ bis $p < 0,01$). Hier fand womöglich eine Wechselwirkung mit Insulin statt, die die Insulinwirkung abschwächte (Traka et al. 2008).

Die Ergebnisse der Lipidakkumulation unter Inkubation mit den Substanzen über die Differenzierungs- und Reifungsphase sind in Abbildung 47 dargestellt. Die Differenzierungs- und Reifungsphase erstreckte sich über insgesamt 14 Tage. Eine Inkubation mit den oben genannten Substanzen konnte daher Einfluss auf verschiedene Faktoren haben, die die Wirkung auf die 3T3-L1-Differenzierung hemmen oder fördern können (Gregoire et al. 1998; Cowherd et al. 1999; Rangwala und Lazar 2000). Die Ergebnisse nach Inkubation mit SFN-CYS-GLY sind in der nachfolgenden Abbildung nicht enthalten, da aufgrund von Kontaminationen eine Beeinträchtigung dadurch nicht ausgeschlossen werden kann.

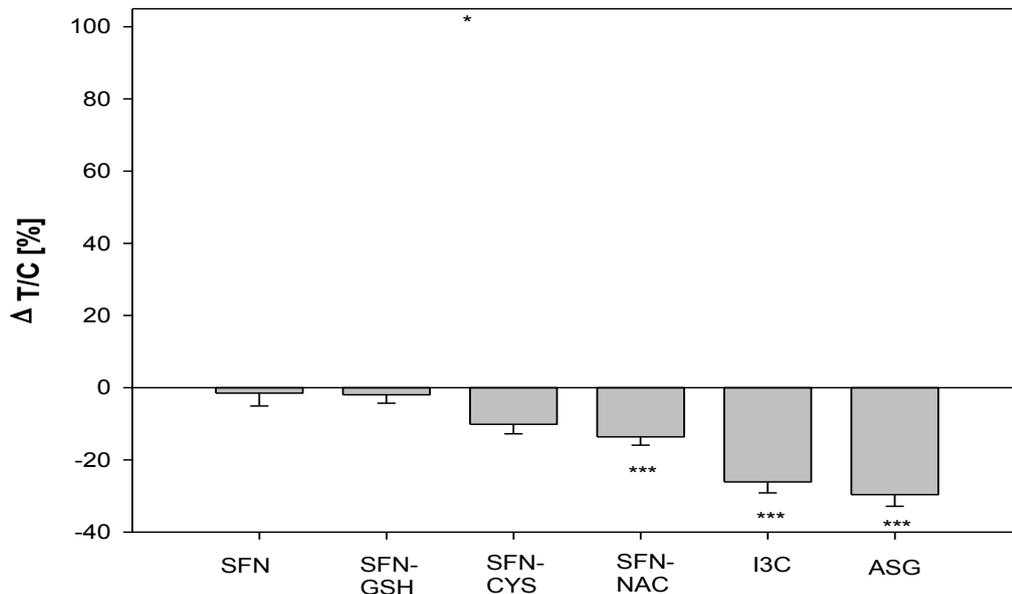


Abbildung 47: : Gegenüberstellung aller Substanzen in der Lipidakkumulation bei differenzierten 3T3-L1-Adipozyten unter Inkubation mit 10 nM über die Differenzierungs- und Reifungsperiode, n = 2 -3; tr = 2 – 4. 10 nM Endkonzentration in den jeweiligen Medien. Bezogen auf die Kontrolle (behandelt nur mit dem Lösungsmittel 0,01 %ige Ameisensäure bzw. bei I3C 100 %ige DMSO). Signifikanzen wurden über ANOVA, f-Test auf Varianzgleichheit und anschließenden zweiseitigen t-test berechnet und sind gekennzeichnet mit: * = signifikant gegen die Kontrolle, p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001. Mittelwert ± SEM in %.

Es zeigte sich, dass eine Inkubation mit SFN-NAC, I3C und ASG die Lipidakkumulation senkte (p < 0,001), während SFN, SFN-GSH sowie SFN-CYS keinen Einfluss zeigten.

Die Tatsache, dass im Gegensatz zur gesteigerten Glucoseaufnahme bei I3C und ASG, die Lipidakkumulation gesunken war, könnte auf eine antidiabetische Wirkungsweise hindeuten.

Die Gesamtergebnisse der Glucoseaufnahme mit 0,1 nM, 1 nM und 10 nM sowie der Lipidakkumulation mit 0,1 nM bis 1 µM der einzelnen Substanzen waren unterschiedlich ausgeprägt. Während mit Indol-3-Carbinol und Ascorbigen die Glucoseaufnahme mit allen Konzentrationen gesteigert werden konnte und gleichzeitig die Lipidakkumulation über alle Inkubationszeiten gesenkt wurde, wurde nach Inkubation mit Sulforaphan die Glucoseaufnahme durchwegs gesteigert, die Lipidakkumulation konnte jedoch nur im Zuge der längsten Inkubationsdauer gesenkt werden.

9. Schlußbetrachtung

Indol-3-Carbinol zeigte als einzige Substanz fördernde Effekte auf die Insulinwirkung bei allen eingesetzten Konzentrationen. ASG ließ die Insulinwirkung nach Inkubation mit 0,1 nM ansteigen. Die Ergebnisse nach Inkubation mit SFN und dessen Metabolite deuten auf die Insulinwirkung abschwächende Eigenschaften der Substanzen, hin.

Es zeigte sich, dass Sulforaphan anders wirkte bzw. keine einheitliche Tendenz in der Lipidakkumulation zeigte wie dessen Metabolite SFN-GSH, SFN-CYS und SFN-NAC, die mit Aminosäuren konjugiert sind.

Mit SFN-GSH, SFN-CYS und SFN-NAC konnte die Tendenz zur gesenkten Lipidakkumulation festgestellt werden (mit ANOVA geprüft), die jedoch wertmäßig nicht so eindeutig ausgeprägt waren als mit I3C und Ascorbigen.

Welche Inkubationszeit bei der Lipidakkumulierung die Differenzierung am deutlichsten beeinflusste konnte nicht eindeutig bestimmt werden.

Eine Konzentration, bei der die Effekte durchgehend am deutlichsten waren, konnte ebenfalls nicht identifiziert werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Wirkungen schon mit deutlich geringeren Konzentrationen als in bisherigen Studien getestet wurden, möglich sind.

Vor allem die Ergebnisse nach Behandlung mit Indol-3-Carbinol und Ascorbigen zeigten ausgeprägte, die Wirkung von Insulin fördernde, sowie die Lipidakkumulierung senkende Wirkungsweisen. Da Plasmakonzentrationen in ähnlichen molaren Bereichen nachgewiesen werden konnten (Hanlon et al. 2008; Vermeulen et al. 2008; Hauder et al. 2011), könnten weitere Versuchsdurchführungen genauere Aufschlüsse über die Reaktionsvorgänge im Körper mit diesen Konzentrationen geben. Bei der Wirkung von Sulforaphan auf die nicht-phosphorylierende Atmung ist die Abklärung der genauen Mechanismen notwendig, damit die Entwicklung einer Insulinresistenz ausgeschlossen werden kann.

10. Zusammenfassung

In Broccoli sind, im Vergleich zu anderen Gemüsen der *Brassicaceae*, hohe Konzentrationen der Glucosinolate Glucoraphanin und Glucobrassicin enthalten (Holst und Williamson 2004). Aus Glucoraphanin entsteht durch Einwirkung der Myrosinase (EC 3.2.1.147) Sulforaphan, aus Glucobrassicin das instabile Indol-3-Methylisothiocyanat, aus dem in weiterer Folge Indol-3-Carbinol gebildet wird. Im menschlichen Körper wird Sulforaphan metabolisiert zu Sulforaphan-Glutathion, Sulforaphan-Cystein-Glycin, Sulforaphan-Cystein und Sulforaphan-N-Acetyl-Cystein. Aus Indol-3-Carbinol entsteht Ascorbigen (Bradfield et al. 1987).

Die Anzahl an übergewichtigen Menschen steigt weltweit an. Im Rahmen der Lipogenese in den Adipozyten werden aus Glucosemolekülen Triglyceride gebildet. Glucose wird durch den Glucosetransporter GLUT4 in die Zellen aufgenommen, dessen Translokation aus interzellulären Speichern durch Insulin ausgelöst wird. Bei einer Insulinresistenz, die in weiterer Folge zu Diabetes Typ 2 führen kann, spricht das Gewebe aus verschiedenen Gründen nicht gut auf Insulin an.

Ein Ziel aktueller Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet ist es, durch antidiabetisch wirkende, natürliche Substanzen die Glucoseaufnahme in die Zellen zu steigern. Gleichzeitig soll die weitere Fettentstehung unterdrückt werden. Durch die Entkopplung der Atmungskette kann die Energieentstehung zugunsten der Wärmeentstehung verschoben werden.

Anhand der 3T3-L1-Zelllinie wurde mit Sulforaphan, dessen Metaboliten Sulforaphan-Glutathion, Sulforaphan-Cystein-Glycin, Sulforaphan-Cystein und Sulforaphan-N-Acetyl-Cystein, sowie Indol-3-Carbinol und Ascorbigen deren Einfluss auf die Glucoseaufnahme und auf die Lipidakkumulation in Konzentrationen im nanomolaren Bereich untersucht, da dieser Konzentrationsbereich durch orale Aufnahme von Glucosinolaten im Blut erreicht werden kann. Mit 10 nM Sulforaphan wurden polarographische Versuche bezüglich dem Einfluss auf die mitochondriale Phosphorylierung durchgeführt.

10. Zusammenfassung

Mit Sulforaphan konnte ein antidiabetisches Potential bei der längsten Inkubationsdauer im Zuge der Lipidakkumulation festgestellt werden; zusätzlich konnte ein Einfluss von Sulforaphan auf die mitochondriale Atmung unter dem gleichzeitigen Einwirken von Oligomycin gezeigt werden. Die Metabolite von Sulforaphan zeigten ein geringeres antidiabetisches Potential.

Antidiabetisches Potential konnte vor allem mit Indol-3-Carbinol und Ascorbigen festgestellt werden.

11. Abstract

Broccoli contains, in contrast to other vegetables of the *Brassicaceae*, high contents of the glucosinolates glucoraphanine and glucobrassicin (Holst und Williamson 2004). Through action of the enzyme myrosinase (EC 3.2.1.147), sulforaphane is formed out of glucoraphanine, and the instabile indole-3-methylisothiocyanate out of glucobrassicin. Subsequently, out of the latter mentioned substance, indole-3-carbinole is formed. In the human body, sulforaphane is metabolized to sulforaphane-glutathione, sulforaphane-cysteine-glycine, sulforaphane-cysteine and sulforaphane-N-acetyl-cysteine. Ascorbigen is formed out of indole-3-carbinole (Bradfield et al. 1987).

The number of overweight people increases worldwide. Within lipogenesis in adipocytes, triglycerides are formed out of glucose molecules. Previously, glucose is transported into the cells via the glucose transporter GLUT4, which is activated through the influence of insulin. In case of an insulin resistance which can further lead to diabetes type 2, the response of tissue to insulin is reduced. The aim of current research in this area is to investigate natural substances which are able to act antidiabetically and therefore have the potential to increase glucose uptake into cells and to decrease further accumulation of lipids at the same time. Through uncoupling the respiratory chain it would be possible to create heat instead of energy.

With the help of the 3T3-L1-cell line, glucose uptake and lipid accumulation has been investigated under incubation of nanomolar concentrations of sulforaphane, its metabolites sulforaphane-glutathione, sulforaphane-cysteine-glycine, sulforaphane-cysteine and sulforaphane-N-acetyl-cysteine, and indole-3-carbinole and ascorbigen. Nanomolar concentration of glucosinolates in plasma can be reached after oral administration. Effects on the mitochondrial respiration have been investigated with 10 nM sulforaphane.

Antidiabetic effects have been found in lipid accumulation experiments after incubation with sulforaphane. In addition, sulforaphane together with oligomycin, had effects on the mitochondrial respiration. The metabolites of sulforaphane showed lower antidiabetic effects.

11. Summary

Considerably antidiabetic effects have been shown after incubation with indole-3-carbinole and ascorbigen.

12. Literaturverzeichnis

- American Type Culture Collection (ATCC™): CL-173™ Product Description. Internet:
<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CL-173&Template=cellBiology#3491>
 (Stand 17.07.2011)
- American Type Culture Collection (ATCC™): Chemically-Induced Differentiation of AT CC® CL-173™ (3T3-L1) using Single-Component Commercially-available Reagents. Manassas, 2011. Internet:
<http://www.atcc.org/attachments/22129.pdf> (Stand: 12.07.2011)
- Agudo, A., R. Ibanez, et al. (2008). "Consumption of cruciferous vegetables and glucosinolates in a Spanish adult population." *Eur J Clin Nutr* **62**(3): 324-331.
- Alonso-Castro, A. J. and L. A. Salazar-Olivo (2008). "The anti-diabetic properties of *Guazuma ulmifolia* Lam are mediated by the stimulation of glucose uptake in normal and diabetic adipocytes without inducing adipogenesis." *J Ethnopharmacol* **118**(2): 252-256.
- Ambati, S., J. Y. Yang, et al. (2009). "Ajoene exerts potent effects in 3T3-L1 adipocytes by inhibiting adipogenesis and inducing apoptosis." *Phytother Res* **23**(4): 513-518.
- An, S., J. I. Han, et al. (2010). "Ethanol extracts of *Brassica campestris* spp. rapa roots prevent high-fat diet-induced obesity via beta(3)-adrenergic regulation of white adipocyte lipolytic activity." *J Med Food* **13**(2): 406-414.
- Armoni, M., C. Harel, et al. (2007). "Transcriptional regulation of the GLUT4 gene: from PPAR-gamma and FOXO1 to FFA and inflammation." *Trends Endocrinol Metab* **18**(3): 100-107.
- Bailey, C. J. (2011). "The challenge of managing coexistent type 2 diabetes and obesity." *BMJ* **342**: d1996.
- Brown, W. V., K. Fujioka, et al. (2009). "Obesity: why be concerned?" *Am J Med* **122**(4 Suppl 1): S4-11.
- Bones, A. M., Rossiter, J. T. (1996). "The myrosinase-glucosinolate system. – an innate defense system in plants." *Physiol. Plantarum* **97**(1): 194-208.
- Bradfield, C. A. and Bjeldanes, L. F. (1987). "High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Anticarcinogenic Indoles in *Brassica oleracea*." *J. Agric. Food Chem.* **35**(1): 46–49.
- Callaway, E. C., Zhang, Y., et al. (2004). "Cellular accumulation of dietary anticarcinogenic isothiocyanates is followed by transporter-mediated export as dithiocarbamates." *Cancer Lett* **204**(1): 23-31.
- Carl Roth GmbH + Co. KG: Zählkammern Neubauer improved. Internet:
<http://www.carlroth.com/catalogue/catalogue.do;jsessionid=AFE85682A>

12. Literaturverzeichnis

- 05D3ED892529DEF51407D1F?favOid=000000000014b2c00030023&act=showBookmark&lang=de-de&market=DE (Stand: 19.07.2011)
- Cho, K. W., O. H. Lee, et al. (2010). "Daidzein and the daidzein metabolite, equol, enhance adipocyte differentiation and PPARgamma transcriptional activity." *J Nutr Biochem* **21**(9): 841-847.
- Clark, L. C., G. F. Combs, Jr., et al. (1996). "Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group." *JAMA* **276**(24): 1957-1963.
- Cieslik, E., Leszczynska, T., et al. (2007). "Effects of some technological processes on glucosinolate contents in cruciferous vegetables." *Food Chemistry* **105**(3) 976–981.
- Cowherd, R. M., R. E. Lyle, et al. (1999). "Molecular regulation of adipocyte differentiation." *Seminars in cell & developmental biology* **10**(1): 3-10.
- Cushman, S. W. and L. J. Wardzala (1980). "Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane." *J Biol Chem* **255**(10): 4758-4762.
- Desquiret, V., D. Loiseau, et al. (2006). "Dinitrophenol-induced mitochondrial uncoupling in vivo triggers respiratory adaptation in HepG2 cells." *Biochim Biophys Acta* **1757**(1): 21-30.
- Dikov, D., A. Aulbach, et al. (2010). "Do UCP2 and mild uncoupling improve longevity?" *Exp Gerontol* **45**(7-8): 586-595.
- Dulloo, A. G. and S. Samec (2001). "Uncoupling proteins: their roles in adaptive thermogenesis and substrate metabolism reconsidered." *Br J Nutr* **86**(2): 123-139.
- Dumas, J. F., G. Simard, et al. (2009). "Is skeletal muscle mitochondrial dysfunction a cause or an indirect consequence of insulin resistance in humans?" *Diabetes Metab* **35**(3): 159-167.
- Elmadfa, I., Leitzmann, C. Vitamine. Mineralstoffe: Mengen- und Spurenelemente. In: Ernährung des Menschen, 4. Auflage. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart, 2004.
- Fahey, J. W., A. T. Zalcmann, et al. (2001). "The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants." *Phytochemistry* **56**(1): 5-51.
- Gao, C. L., C. Zhu, et al. (2010). "Mitochondrial dysfunction is induced by high levels of glucose and free fatty acids in 3T3-L1 adipocytes." *Mol Cell Endocrinol* **320**(1-2): 25-33.
- Gasper, A. V., A. Al-Janobi, et al. (2005). "Glutathione S-transferase M1 polymorphism and metabolism of sulforaphane from standard and high-glucosinolate broccoli." *Am J Clin Nutr* **82**(6): 1283-1291.
- Goulet, E. D., A. Hassaine, et al. (2009). "Frailty in the elderly is associated with insulin resistance of glucose metabolism in the postabsorptive state

only in the presence of increased abdominal fat." *Exp Gerontol* **44**(11): 740-744.

- Green, H. (1977). "Triglyceride-accumulating clonal cell line." United States Patent 4,003,789. Internet: <http://www.google.com/patents?id=YdETAAAAEBAJ&printsec=abstract&zoom=4#v=onepage&q&f=false> (Stand: 14.05.2011)
- Green, H. and O. Kehinde (1975). "An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion." *Cell* **5**(1): 19-27.
- Green, H. and M. Meuth (1974). "An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture." *Cell* **3**(2): 127-133.
- Gregoire, F. M. (2001). "Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell." *Experimental biology and medicine* **226**(11): 997-1002.
- Gregoire, F. M., C. M. Smas, et al. (1998). "Understanding adipocyte differentiation." *Physiological reviews* **78**(3): 783-809.
- Guh, D. P., W. Zhang, et al. (2009). "The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis." *BMC Public Health* **9**: 88.
- Hahn, A., Ströhle, A., Wolters, M. (2005). "Sekundäre Pflanzenstoffe – die neuen „Vitamine“?" Ernährung heute. *Deutsche Apotheker Zeitung* **145**(5): 73-81.
- H. Saur Laborbedarf: Sauerstoffmessung. Internet: <http://www.h-saur.com/wissenswertes/sauerstoffmessung/index.html> (Stand: 05.07.2011)
- Hanlon, N., N. Coldham, et al. (2008). "Absolute bioavailability and dose-dependent pharmacokinetic behaviour of dietary doses of the chemopreventive isothiocyanate sulforaphane in rat." *Br J Nutr* **99**(3): 559-564.
- Hanlon, N., N. Coldham, et al. (2009). "Repeated intake of broccoli does not lead to higher plasma levels of sulforaphane in human volunteers." *Cancer Lett* **284**(1): 15-20.
- Hansatech Instruments Ltd: General Oxygen Electrode Measurement Principles. Internet: http://www.hansatech-instruments.co.uk/oxygen_general_principles.htm (Stand: 5.7.2011)
- Hansatech Instruments Ltd: Oxygen Electrode Discs. Internet: http://www.hansatech-instruments.co.uk/electrode_discs.htm (Stand: 05.07.2011)
- Hansatech Instruments Ltd. Setup, Installaton & Maintenance. In: Operations Manual Version 2.1.2006, Norfolk, England.
- Hansen, P. J.: Use of a Hemacytometer. Internet: <http://www.animal.ufl.edu/hansen/protocols/hemacytometer.htm> (Stand: 19.07.2011)

12. Literaturverzeichnis

- Hauder, J.: "Charakterisierung der antioxidativen Wirksamkeit von Röstkaffees und deren Inhaltsstoffen in vitro und in vivo." Dissertation, München 2011.
- Hauder, J., S. Winkler, et al. (2011). "LC-MS/MS Quantification of Sulforaphane and Indole-3-carbinol Metabolites in Human Plasma and Urine after Dietary Intake of Selenium-Fortified Broccoli." *J Agric Food Chem* **59**(15): 8047-8057.
- Holst, B. and G. Williamson (2004). "A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds." *Nat Prod Rep* **21**(3): 425-447.
- Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie Berlin: Zellzählung und Vitalitätstest mit Trypanblau. 2000. Internet: http://www.molim.uni-erlangen.de/lehrInfo/F1_neubauer1.pdf (Stand: 15.08.2011)
- Jezeck, P., M. Zackova, et al. (2004). "Mitochondrial uncoupling proteins--facts and fantasies." *Physiol Res* **53 Suppl 1**: S199-211.
- Jung, D. W., H. H. Ha, et al. (2011). "Novel use of fluorescent glucose analogues to identify a new class of triazine-based insulin mimetics possessing useful secondary effects." *Mol Biosyst* **7**(2): 346-358.
- Kadenbach, B. (2003). "Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation." *Biochim Biophys Acta* **1604**(2): 77-94.
- Kanasaki, K. and D. Koya (2011). "Biology of obesity: lessons from animal models of obesity." *J Biomed Biotechnol* **2011**: 197636.
- Kim, S. and N. Moustaid-Moussa (2000). "Secretory, endocrine and autocrine/paracrine function of the adipocyte." *The Journal of nutrition* **130**(12): 3110S-3115S.
- Kim, T., J. Wayne Leitner, et al. (2009). "Knockdown of JNK rescues 3T3-L1 adipocytes from insulin resistance induced by mitochondrial dysfunction." *Biochem Biophys Res Commun* **378**(4): 772-776.
- Klemm, D. J., J. W. Leitner, et al. (2001). "Insulin-induced adipocyte differentiation. Activation of CREB rescues adipogenesis from the arrest caused by inhibition of prenylation." *The Journal of biological chemistry* **276**(30): 28430-28435.
- Kopecky, J., M. Rossmeisl, et al. (2001). "Mitochondrial uncoupling and lipid metabolism in adipocytes." *Biochem Soc Trans* **29**(Pt 6): 791-797.
- Kumar, A. and G. Sabbioni (2010). "New biomarkers for monitoring the levels of isothiocyanates in humans." *Chem Res Toxicol* **23**(4): 756-765.
- Kutt, H. and T. T. Tsaltas (1959). "Staining properties of oil red O and a method of partial purification of the commercial product." *Clinical chemistry* **5**(2): 149-160.
- Lampson, M. A., A. Racz, et al. (2000). "Demonstration of insulin-responsive trafficking of GLUT4 and vpTR in fibroblasts." *Journal of cell science* **113** (Pt 22): 4065-4076.
- Ledoux, T. A., M. D. Hingle, et al. (2011). "Relationship of fruit and vegetable intake with adiposity: a systematic review." *Obes Rev* **12**(5): e143-150.

- Lee, J. H., K. A. Kim, et al. (2007). "Diallyl disulfide accelerates adipogenesis in 3T3-L1 cells." *Int J Mol Med* **20**(1): 59-64.
- Lim, H. W., H. Y. Lim, et al. (2009). "Uncoupling of oxidative phosphorylation by curcumin: implication of its cellular mechanism of action." *Biochem Biophys Res Commun* **389**(1): 187-192.
- Lindl, T., Gstraunthaler, G. Zell- und Gewebekultur. Von den Grundlagen zur Laborbank. 6. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2008.
- Liu, F., J. Kim, et al. (2001). "An extract of *Lagerstroemia speciosa* L. has insulin-like glucose uptake-stimulatory and adipocyte differentiation-inhibitory activities in 3T3-L1 cells." *J Nutr* **131**(9): 2242-2247.
- Löffler, G. Citratzyklus. Atmungskette und oxidative Phosphorylierung. In: Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie, 6. Auflage. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2005.
- McNaughton, S. A. and G. C. Marks (2003). "Development of a food composition database for the estimation of dietary intakes of glucosinolates, the biologically active constituents of cruciferous vegetables." *Br J Nutr* **90**(3): 687-697.
- Morrison, A. and J. Li (2011). "PPAR-gamma and AMPK - Advantageous targets for myocardial ischemia/reperfusion therapy." *Biochem Pharmacol* **82**(3): 195-200.
- Murrow, B. A. and K. L. Hoehn (2010). "Mitochondrial regulation of insulin action." *Int J Biochem Cell Biol* **42**(12): 1936-1939.
- Nian, H., B. Delage, et al. (2009). "Modulation of histone deacetylase activity by dietary isothiocyanates and allyl sulfides: studies with sulforaphane and garlic organosulfur compounds." *Environ Mol Mutagen* **50**(3): 213-221.
- Padilla, G., M. E. Cartea, et al. (2007). "Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica rapa*." *Phytochemistry* **68**(4): 536-545.
- Petri, N., C. Tannergren, et al. (2003). "Absorption/metabolism of sulforaphane and quercetin, and regulation of phase II enzymes, in human jejunum in vivo." *Drug Metab Dispos* **31**(6): 805-813.
- Preobrazhenskaya, M. N., V. M. Bukhman, et al. (1993). "Ascorbigen and other indole-derived compounds from *Brassica* vegetables and their analogs as anticarcinogenic and immunomodulating agents." *Pharmacol Ther* **60**(2): 301-313.
- Rangwala, S. M. and M. A. Lazar (2000). "Transcriptional control of adipogenesis." *Annual review of nutrition* **20**: 535-559.
- Reed, B. C. and M. D. Lane (1980). "Insulin receptor synthesis and turnover in differentiating 3T3-L1 preadipocytes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**(1): 285-289.
- Roffey, B., A. Atwal, et al. (2006). "Cinnamon water extracts increase glucose uptake but inhibit adiponectin secretion in 3T3-L1 adipose cells." *Mol Nutr Food Res* **50**(8): 739-745.

12. Literaturverzeichnis

- Rosen, E. D. and O. A. MacDougald (2006). "Adipocyte differentiation from the inside out." *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**(12): 885-896.
- Rosen, E. D. and B. M. Spiegelman (2000). "Molecular regulation of adipogenesis." *Annual review of cell and developmental biology* **16**: 145-171.
- Sanger, F. (1960). "Chemistry of insulin." *British medical bulletin* **16**: 183-188.
- Si, Y., H. Shi, et al. (2009). "Metabolic flux analysis of mitochondrial uncoupling in 3T3-L1 adipocytes." *PLoS One* **4**(9): e7000.
- Sigma Aldrich Co. LLC.: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM).
Internet: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/cell-culture-products.html?TablePage=9630427> (Stand: 19.07.2011)
- Skulachev, V. P. (1998). "Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics." *Biochim Biophys Acta* **1363**(2): 100-124.
- Stolar, M. W. (2010). "Defining and achieving treatment success in patients with type 2 diabetes mellitus." *Mayo Clin Proc* **85**(12 Suppl): S50-59.
- Suzuki, R., M. Tanaka, et al. (2011). "Anthocyanidins-enriched bilberry extracts inhibit 3T3-L1 adipocyte differentiation via the insulin pathway." *Nutr Metab (Lond)* **8**: 14.
- Traka, M., A. V. Gasper, et al. (2008). "Broccoli consumption interacts with GSTM1 to perturb oncogenic signalling pathways in the prostate." *PLoS One* **3**(7): e2568.
- Tejerina, S., A. De Pauw, et al. (2009). "Mild mitochondrial uncoupling induces 3T3-L1 adipocyte de-differentiation by a PPARgamma-independent mechanism, whereas TNFalpha-induced de-differentiation is PPARgamma dependent." *J Cell Sci* **122**(Pt 1): 145-155.
- Terada, H. and S. Kubota (1979). "Does hydrophobic isothiocyanate really uncouple oxidative phosphorylation in mitochondria? Uncoupling activity of a product of isothiocyanate in dimethylsulfoxide solution." *FEBS Lett* **100**(1): 37-40.
- Thermo Fisher Scientific Inc.: Pierce® Microplate BCA Protein Assay Kit – Reducing Agent Compatible. Rockford, USA, 2011. Internet: <http://www.piercenet.com/instructions/2161745.pdf> (Stand: 18.07.2011)
- Thews, G., Mutschler, E., Vaupel, P. Pankreashormone und Blutzuckerregulation. In: Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen, 5. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1999, 512-514.
- Turner, N. and L. K. Heilbronn (2008). "Is mitochondrial dysfunction a cause of insulin resistance?" *Trends Endocrinol Metab* **19**(9): 324-330.
- Truesdale, G. A., Downing, A. L. (1954). "Solubility of oxygen in water." *Nature* **173**: 1236.
- University of Leeds: Oxygen electrode (oxygraph) recordings. Internet: <http://www.bmb.leeds.ac.uk/illingworth/oxphos/oxygraph.htm> (Stand: 15.08.2011)

- Verkerk, R., M. Schreiner, et al. (2009). "Glucosinolates in Brassica vegetables: the influence of the food supply chain on intake, bioavailability and human health." *Mol Nutr Food Res* **53 Suppl 2**: S219.
- Vermeulen, M., I. W. Klopping-Ketelaars, et al. (2008). "Bioavailability and kinetics of sulforaphane in humans after consumption of cooked versus raw broccoli." *J Agric Food Chem* **56**(22): 10505-10509.
- Walker, J. M. (1994). "The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation." *Methods in molecular biology* **32**: 5-8.
- Watson, R. T. and J. E. Pessin (2001). "Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation." *Recent progress in hormone research* **56**: 175-193.
- Weems, J. and A. L. Olson (2011). "Class II histone deacetylases limit GLUT4 gene expression during adipocyte differentiation." *J Biol Chem* **286**(1): 460-468.
- Wirth, A. Stoffwechsel der Adipozyten. In: Adipositas. Ätiologie, Folgekrankheiten, Diagnose, Therapie. Springer Verlag, 2008.
- Yamada, K., M. Saito, et al. (2007). "A real-time method of imaging glucose uptake in single, living mammalian cells." *Nat Protoc* **2**(3): 753-762.
- Ye, L., A. T. Dinkova-Kostova, et al. (2002). "Quantitative determination of dithiocarbamates in human plasma, serum, erythrocytes and urine: pharmacokinetics of broccoli sprout isothiocyanates in humans." *Clin Chim Acta* **316**(1-2): 43-53.
- Yoo, E. J., J. J. Chung, et al. (2006). "Down-regulation of histone deacetylases stimulates adipocyte differentiation." *J Biol Chem* **281**(10): 6608-6615.
- Zeigerer, A., M. A. Lampson, et al. (2002). "GLUT4 retention in adipocytes requires two intracellular insulin-regulated transport steps." *Molecular biology of the cell* **13**(7): 2421-2435.
- Zeviani, M. and S. Di Donato (2004). "Mitochondrial disorders." *Brain* **127**(Pt 10): 2153-2172.
- Zhang, Y. and P. Talalay (1998). "Mechanism of differential potencies of isothiocyanates as inducers of anticarcinogenic Phase 2 enzymes." *Cancer Res* **58**(20): 4632-4639.
- Zhao, L., J. Y. Lee, et al. (2011). "Inhibition of pattern recognition receptor-mediated inflammation by bioactive phytochemicals." *Nutr Rev* **69**(6): 310-320.
- Zou, C., Y. Wang, et al. (2005). "2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement." *J Biochem Biophys Methods* **64**(3): 207-215.

13. Anhang

Rohdaten zur Ermittlung des Kontrollwertes für die Aufnahme von 2-NBDG in 3T3-L1-Zellen nach fünf Minuten Insulinstimulierung.

Angegeben sind alle Kontrollwerte, die im Rahmen der einzelnen Versuche ohne Inkubation mit der jeweiligen Substanz erhalten wurden, Ausreißerbereinigt.

ohne Insulin [2-NBDG [μ M] pro mg Protein]	mit Insulin [2-NBDG [μ M] pro mg Protein]	Steigerung mit Insulin	Werte im Rahmen des Versuches mit...	
167,73	311,58	185,76%	SFN	
306,87	301,10	98,12%		
	239,95			
188,28	284,15	150,91%		
	196,55			
178,44	184,08	103,16%		
	354,23			
209,88	281,81	134,27%		
264,88	319,25	120,53%		
195,58	172,12	88,00%		
180,35	317,06	175,80%		
239,72	298,70	124,60%		
200,56	222,46	110,92%		
194,39	218,23	112,26%		
239,39	238,81	99,76%		
235,83	147,04	62,35%		
184,39	177,64	96,34%		
188,86	345,81	183,10%		
88,59	98,44	111,12%		SFN-NAC
84,23	68,32	81,11%		
108,80	101,57	93,35%		
103,12	89,46	86,75%		
57,61	59,40	103,11%		
53,03	113,37	213,78%		
75,09	53,90	71,78%		
48,64	56,26	115,68%		
72,71	73,53	101,13%		
124,37	55,31	44,47%		
85,99	56,11	65,25%		
44,17	57,00	129,03%		
59,36	59,29	99,89%		
48,05	74,76	155,59%		
90,15	45,88	50,90%		
74,45	61,65	82,81%		
58,45	82,99	141,99%		
68,40	78,82	115,24%		

262,43	198,55	75,66%	SFN-GSH	
205,06	271,19	132,25%		
127,83	227,88	178,27%		
	354,51			
	341,39			
	337,11			
238,26	293,11	123,02%		
299,65	315,35	105,24%		
	318,40			
	298,41			
	353,30			
105,61	137,45	130,15%		SFN-CYS
218,90	130,63	59,68%		
96,45	110,57	114,65%		
85,07	137,76	161,94%		
229,67	95,05	41,39%		
195,54	85,12	43,53%		
149,43	149,96	100,36%		
95,90	130,87	136,46%		
95,82	106,98	111,65%		
136,21	152,70	112,10%		
77,77	93,23	119,88%		
121,08	90,78	74,97%		
96,94	74,33	76,67%		
78,17	80,51	103,00%		
90,77	124,88	137,58%		
103,13	111,03	107,66%		
133,69	135,44	101,31%		
93,98	100,41	106,85%		

13. Anhang

253,79	189,65	74,73%	I3C
277,52	166,47	59,99%	
255,96			
161,88	160,25	98,99%	
225,88	226,29	100,18%	
214,80	296,98	138,26%	
162,00	244,77	151,09%	
111,16	168,26	151,38%	
154,08	133,19	86,44%	
179,24	213,08	118,88%	
160,66	171,71	106,87%	
182,14	258,80	142,09%	
	336,56		
259,25			
113,00	95,05	84,12%	ASG
55,55	96,50	173,70%	
83,75	104,03	124,21%	
112,81	91,90	81,47%	
98,20	120,18	122,39%	
115,07	133,46	115,98%	
120,63	137,69	114,14%	
126,69	155,65	122,85%	
120,01	133,40	111,16%	
114,40	152,15	133,00%	
120,15	165,43	137,70%	
123,29	118,26	95,92%	
182,42	179,54	98,42%	
217,06	219,12	100,95%	
176,14	202,12	114,75%	
187,63	194,57	103,70%	
164,91	252,65	153,20%	
193,36	206,30	106,69%	
228,30	110,80	48,53%	SFN- CYS- GLY
132,91	125,05	94,09%	
92,55	107,99	116,68%	
282,45	170,32	60,30%	
154,83	96,45	62,29%	
93,38	123,65	132,42%	
175,71	114,75	65,31%	
166,45	105,46	63,36%	

	127,24	161,50	126,93%
	198,61	123,08	61,97%
	147,31	150,83	102,39%
	118,70	152,18	128,20%
Mittelwert	149,49	169,34	113,28%
SEM	6,58	8,40	
Signifikanz			*
ttest		0,032	
ftest		0,005	

13. Anhang

1. Rohdaten zu Abbildung 27: Aufnahme der 2-NBDG nach 20 Minuten Inkubation in differenzierten 3T3-L1-Adipozyten bei unterschiedlichen Inkubationszeiten mit 100 µg / mL Insulin

2-NBDG [µM] pro mg Protein

Inkubationszeit	1 min	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min	1 h	2 h	4 h
mit Insulin	26,82	15,29	34,65	16,67	42,86	13,49	28,59	10,20	11,58
	7,43	14,26	12,51	38,31	9,52	30,45	31,06	0	38,78
	12,46	10,88	25,69	17,84	11,85	23,78	10,55	0	0
Mittelwert mit Insulin	15,57	13,48	24,28	24,27	21,41	22,57	23,40	3,40	16,78
SEM	5,81	1,33	6,43	7,03	10,75	4,93	6,47	3,40	11,49
ohne Insulin	10,83	8,51	20,51	12,63	10,42	13,88	7,60	20,47	35,24
	13,11	21,87	9,26	10,12	9,55	20,77	11,38	12,75	35,34
	9,15	6,85	9,78	8,23	17,14	16,32	17,22	22,04	48,41
Mittelwert ohne Insulin	11,03	12,41	13,19	10,33	12,37	16,99	12,07	18,42	39,66
SEM	1,15	4,75	3,67	1,27	2,40	2,02	2,80	2,87	4,37

2. Rohdaten zu Abbildung 28: Darstellung der Veränderungen in der 2-NBDG-Aufnahme nach Insulinstimulierung in differenzierten 3T3-L1-Adipozyten mit unterschiedlichen Bezugsgrößen

Ermittlung der Veränderung in % (für Darstellung): $(\text{Mittelwert}-1) \cdot 100$

DNA-Werte

Bezogen auf die Mittelwerte der Absolutwerte [μg 2-NBDG/ mg DNA] der Kontrolle [%], Ausreißerbereinigt

Inkubationszeit	1 min	5 min	10 min	15 min	20 min	
mit Insulin	116,12%	127,32%	93,85%	161,26%	88,36%	n1
	127,83%	101,86%	129,18%	167,47%	111,64%	
	137,27%	113,78%	103,57%	131,93%	126,11%	
	88,36%	119,30%	111,29%	58,74%	75,88%	
	86,11%	116,64%	103,03%	66,31%	116,85%	
	68,97%	80,17%	74,91%	74,36%	69,41%	
	97,82%	100,84%	71,39%	104,41%	95,76%	n2
	81,60%	148,26%	75,89%	102,70%	120,00%	
	107,77%	129,42%	99,62%	85,94%	119,50%	
	144,00%	121,00%	73,21%	62,42%	65,60%	n3
	165,92%		58,64%	119,73%	112,88%	
	136,25%	149,00%	112,41%	96,84%	103,18%	n4
	78,67%	133,31%	106,62%	97,89%		
	82,03%	93,03%	63,19%	91,96%	63,44%	
	156,31%	150,48%	105,15%	109,97%	104,51%	
		96,48%		132,22%	108,46%	n5
136,60%	94,95%		153,28%	113,82%		
119,49%	96,45%	120,83%	83,74%	87,50%		
Mittelwert mit Insulin	113,60%	116,02%	93,92%	105,62%	99,00%	
SEM	7,24%	5,22%	5,37%	7,80%	4,95%	
ttest	0,05987853	0,0076965	0,20938138	0,25615209	0,44836164	
ftest	0,10334736	0,16371212	0,97757777	0,00074854	0,4560813	

13. Anhang

BCA-WerteBezogen auf die Mittelwerte der Absolutwerte [$\mu\text{g 2-NBDG/ mg Protein}$] der Kontrolle [%], Ausreißerbereinigt

Inkubationszeit	1 min	5 min	10 min	15 min	20 min		
mit Insulin	85,52%	70,63%	53,25%	87,96%	103,74%	Platte 1	n1
	71,46%	62,43%	78,30%	87,28%	98,64%		
	65,76%	83,55%	72,13%	90,24%	173,10%		
	83,70%	69,51%	73,88%	106,31%	84,28%		
	78,36%	73,94%	55,93%	74,84%	69,20%		
	90,12%	70,68%	70,81%	93,46%	82,83%		
	76,64%	69,88%	62,59%	88,72%	86,55%	Platte 2	
	61,13%	79,92%	83,40%	81,61%	88,46%		
	82,57%	85,10%	90,69%	89,49%	102,34%		
	105,98%	129,78%	72,95%	111,92%	118,47%		
	79,12%	122,30%	98,35%	110,42%	102,74%		
	78,85%	81,17%	83,68%	113,99%	111,35%		
	63,46%	95,75%	80,66%	103,96%	96,68%	Platte 3	n2
	59,06%	72,23%	66,03%	67,60%	79,30%		
	77,37%	72,53%	57,57%	98,34%	102,42%		
	83,94%	114,37%	105,70%	137,57%	105,52%		
	80,61%	105,19%	127,02%	109,91%	109,68%		
	98,56%	81,85%	79,03%	100,18%	111,13%		
	230,47%	192,99%	230,88%			Platte 1	n3
		211,13%	223,46%	137,35%	224,54%		
	259,04%	209,36%	191,31%	135,27%	163,11%		
	239,39%	141,19%	231,71%	144,42%	186,33%		
140,81%	163,07%	214,85%	259,01%	394,77%	Platte 2	n4	
139,71%	134,00%			301,85%			
173,83%	131,27%	115,78%	55,15%	57,48%			
243,14%	147,67%	137,27%	53,64%	60,65%			
142,23%	81,67%	92,20%	71,13%	69,69%			
177,72%		186,62%	205,41%	109,00%			
143,22%	109,56%	128,63%	124,66%	86,28%	Platte 3		
106,43%	113,10%	105,74%	121,82%	100,91%			
77,92%	143,36%	103,50%	146,90%	117,93%			
72,43%	136,03%	79,73%	100,30%	88,52%			
65,65%	122,56%	107,74%	106,66%	117,89%			
Mittelwert mit Insulin	113,57%	111,81%	111,29%	110,18%	122,04%		
SEM	10,42%	7,33%	9,63%	7,39%	12,41%		
ttest	0,1457165	0,1081075	0,2043007	0,1650872	0,06676218		
ftest	0,0407649	0,2089735	0,8266319	0,9256017	0,00399258		

3. Rohdaten zu Abbildung 29 und Abbildung 30: Veränderung der 2-NBDG Aufnahme in differenzierten 3T3-L1-Adipozyten nach Inkubation von 0,01 nM bis 10 µM SFN

Bezogen auf die Mittelwerte der Absolutwerte [µg 2-NBDG/ mg DNA] der Kontrolle [%], Ausreißerbereinigt
Ermittlung der Veränderung in % (für Darstellung): (Mittelwert-1)*100

Inkubationszeit	5 min													
mit Insulin	56,28%	56,77%	225,33%		118,64%	132,79%	108,67%	141,69%	228,71%	252,50%	169,90%	197,55%	120,46%	246,52%
	178,69%	143,85%	170,53%	175,73%	155,03%	113,57%	135,03%	118,46%	118,38%	134,65%	98,29%	239,51%	268,11%	471,52%
	109,39%	120,99%	158,92%	166,93%	148,75%		121,79%	150,85%		153,20%	104,19%	194,01%	357,31%	170,42%
Mittelwert	111,00%		179,49%		133,76%		125,10%		173,05%		167,24%		272,39%	
SEM	19,75%		11,78%		8,11%		5,90%		22,18%		22,80%		51,97%	
ohne Insulin	93,52%	106,76%	150,78%	150,76%	160,10%	122,56%	135,66%	95,03%	148,00%	150,50%	182,86%	218,19%	251,50%	125,92%
	101,21%	109,58%	164,45%	151,47%	117,46%		114,66%	146,29%	174,62%	151,89%	181,03%	94,41%	282,44%	110,87%
	151,59%	160,87%	158,29%	166,90%	137,12%	120,06%	129,07%	89,71%	147,59%	127,26%		147,92%	207,47%	179,29%
Mittelwert	120,59%		157,11%		131,46%		118,40%		154,52%		158,61%		192,92%	
SEM	11,55%		2,96%		7,93%		9,30%		5,09%		18,13%		27,73%	
Konzentration in nM	0,01		0,1		1		10		100		1000		10000	

13. Anhang

4. Rohdaten zu Abbildung 31: Veränderungen in der Lipidakkumulation bei differenzierten 3T3-L1-Adipozyten unter Inkubation mit SFN in verschiedenen Konzentrationen und Zeitspannen

Bezogen auf die Kontrolle [%],
Ausreißerbereinigt

Inkubation während der Differenzierungsphase

Konzentration [nM]	0	0,1	1	10	100	1000	
	-8,66	14,28	16,68	25,97	31,83	34,77	n1
	-3,24	27,48	28,05	30,07	36,22	42,93	
	8,60	25,49	30,07	34,32	32,80	36,81	
	3,30	25,17	34,96	49,67	49,72	54,27	
	-6,81	-5,16	4,44	-4,16	17,90	-0,08	n2
	-5,60	35,21	-11,44	0,36		16,13	
	-2,73	-5,27	-10,45	-0,41		33,78	
	15,14	49,44	4,11	33,01	30,47	-0,41	
Mittelwert	1,78E-15	20,83	12,05	21,10	33,16	27,27	
SEM	2,94	6,69	6,42	7,03	4,19	7,07	

Inkubation während der Reifungsphase

Konzentration [nM]	0	0,1	1	10	100	1000	
	7,13	-14,40	-8,57	-4,63	6,57	6,09	n1
	-4,98	-2,71	0,46	-4,11	-0,49	5,75	
	0,81	1,22	0,60	2,11	3,16	9,54	
	-2,96	6,32	10,67	12,63	14,96	18,36	
	36,57	18,73		26,88			n2
	-31,34	14,01	-20,51	-7,13	-1,91	14,14	
	-30,20	20,00	-12,87	16,18	-6,63		
	24,97	24,08	-8,66			7,01	
Mittelwert	1,78E-15	8,41	-5,56	5,99	2,61	10,15	
SEM	8,39	4,66	3,88	4,85	3,8	2,08	

Inkubation während Differenzierungs- und Reifungsphase

Konzentration [nM]	0	0,1	1	10	100	1000	
	-4,70	-7,78	2,27	-1,22	7,63	11,34	n1
	-5,77	-9,04	2,01	-2,02	2,08	8,00	
	6,15	5,48	3,01	4,35	3,82	4,58	
	4,32	4,85	8,00	6,16	8,30	15,65	
	66,05	5,10	16,51	13,43		-35,44	n2
	-39,74	-47,52	-34,64	-13,43	6,71	-32,09	
	4,97	-52,09	-37,72	-17,05		-41,35	
	-31,28	-42,69	13,29	-2,42	-8,46	-22,29	
Mittelwert	2,66E-15	-17,96	-3,41	-1,53	3,35	-11,45	
SEM	11,23	8,90	7,39	3,54	2,55	8,35	

Rohdaten zu Abbildung 32: Wirkung einer Direktzugabe von 10 nM Sulforaphan auf die mitochondriale Atmung von 3T3-L1-Adipozyten

Absolutwerte bezogen auf die initiale Atmung, Ausreißerbereinigt

HCOOH

	Basalatmung	HCOOH	Oligomycin	FCCP	RCI (von Absolutwerten FCCP/Oligo)
Passage 10-1	100,00%	116,75%	71,48%	248,85%	3,48
Passage 10-2	100,00%	102,95%	69,21%	269,12%	3,89
Passage 10-3	100,00%	114,53%	64,91%	223,96%	3,45
Passage 10-4	100,00%	111,87%	63,70%	174,27%	2,74
Passage 12-1	100,00%	112,03%	68,32%	176,85%	2,59
Passage 12-4	100,00%	107,03%	64,05%	220,92%	3,45
Mittelwert	100,00%	110,86%	66,95%	219,00%	3,27
SEM	0,00%	2,06%	1,30%	15,50%	0,20

Sulforaphan

	Basalatmung	Sulforaphan	Oligomycin	FCCP	RCI (von Absolutwerten FCCP/Oligo)
Passage 11-1	100,00%	112,60%	79,77%	248,55%	3,12
Passage 11-2	100,00%		69,19%	222,26%	3,21
Passage 11-3	100,00%	112,70%	79,17%	268,76%	3,39
Passage 11-4	100,00%	113,21%			
Mittelwert	100,00%	112,84%	76,04%	246,52%	3,24
SEM	0,00%	0,19%	3,43%	13,46%	
ttest (Sulforaphan gegen HCOOH)		0,384	0,018	0,295	0,937
ftest (Sulforaphan gegen HCOOH)		0,008	0,225	0,592	0,153

Rohdaten zu Abbildung 33: Veränderung der 2-NBDG Aufnahme in differenzierten 3T3-L1-Adipozyten nach Inkubation verschiedener Konzentrationen von SFN-CYS-GLY

Bezogen auf die Mittelwerte der Absolutwerte [μg 2-NBDG/ mg DNA] der Kontrolle [%], Ausreißerbereinigt
Ermittlung der Veränderung in % (für Darstellung): $(\text{Mittelwert}-1)*100$

Inkubationszeit	5 min	5 min	5 min	
mit Insulin	71,7%	88,1%	72,3%	n1
	97,4%	73,1%	99,1%	
	88,2%	94,0%	91,7%	
	94,2%		84,7%	
	63,8%	58,8%	75,7%	
	79,2%	77,1%	77,4%	
	79,6%	109,0%	110,2%	
	82,0%	57,1%	89,1%	
	100,0%	93,0%	101,8%	
	89,8%	96,5%		
	96,9%	118,9%	78,1%	n2
	93,7%	96,6%		
		133,9%	105,1%	
		92,2%	115,4%	
	122,4%	133,4%		
	90,1%	117,9%	71,0%	
Mittelwert	86,7%	95,3%	93,2%	
SEM	3,0%	5,8%	4,9%	
ohne Insulin		67,7%	91,0%	n1
	85,5%	131,1%	81,3%	
	75,2%	80,7%	90,5%	
	94,7%	93,9%	68,7%	
	58,8%	97,5%		
	72,6%	98,5%	83,9%	
		76,2%	89,0%	
	76,8%	113,0%	91,5%	
	100,8%	93,5%	81,2%	n2
	86,6%	110,1%	66,4%	
	116,4%	113,8%		
	99,5%	73,0%	78,9%	
	75,5%	110,1%	93,9%	
	90,9%			
96,0%	73,0%			
101,8%		120,6%		
Mittelwert	87,9%	95,1%	86,4%	
SEM	4,0%	5,1%	4,0%	
Konzentration in nM	10	1	0.1	

Rohdaten zu Abbildung 34: Veränderungen in der Lipidakkumulation bei differenzierten 3T3-L1-Adipozyten unter Inkubation mit SFN-CYS-GLY in verschiedenen Konzentrationen und Zeitspannen

Bezogen auf die Kontrolle [%]

Inkubation während der Differenzierungsphase

Konzentration [nM]	0,00	0,10	1,00	10,00	100,00	1000,00	
	-35,09	68,30	72,69	32,84	93,57	93,47	n1
	15,16	87,18	76,39	62,30	112,45	113,45	
	44,13	109,05	71,19	107,45	142,31	122,14	
	-24,20	16,26	10,46	14,46	107,35	47,22	n2
	-87,54						
	17,88	28,31	103,19	99,65	61,09	17,14	
	-5,40			-11,73	111,01	46,19	
	75,06	35,76	106,36	24,03	18,81		n3
	-49,71	58,97	54,62	-6,61	52,01		
	17,61	1,58	66,42	51,89	44,81	10,40	
	26,42	73,00	111,75	38,35	8,66	-2,02	
	5,68	61,08	153,61	111,01	-7,48	-35,68	
Mittelwert	0,00	53,95	82,67	47,60	67,69	45,81	
SEM	12,66	10,51	12,20	13,13	14,78	18,13	

Inkubation während der Reifungsphase

Konzentration [nM]	0,00	0,10	1,00	10,00	100,00	1000,00	
	11,86	27,67	32,03	87,02	106,01	-6,50	n1
	32,94	68,75	62,66	110,19	115,82	26,40	
	15,68	110,01	131,73	137,18	99,83	25,58	
	-60,48	20,31	31,94	55,48	15,40	-37,12	n2
		3,09		-11,26	21,02	48,52	
	17,14		69,45	264,34		49,42	
	24,01	220,40	79,01	296,92	246,11	72,74	
	-41,15	-28,60		275,10	36,57	-50,72	n3
	-43,36	-39,12	80,50	-15,57	-36,95	-41,98	
	29,86	6,21	27,00	26,11	73,01	-53,11	
	-5,12	68,97	68,88	7,78	24,44	-35,28	
	18,62	16,75	-21,97	-17,14	58,04	-34,68	
Mittelwert	0,00	43,13	56,12	101,35	69,03	-3,06	
SEM	9,93	22,06	13,05	34,10	22,45	13,01	

Inkubation während der Differenzierungs- und Reifungsphase

Konzentration [nM]	0,00	0,10	1,00	10,00	100,00	1000,00	
	-10,31	80,59	-11,23	131,30	102,85	23,81	n1
	15,77	110,49	79,27	168,98	235,24	29,47	
	27,76	34,48	78,22	151,85	242,48	19,73	
	-33,23	18,41		168,58	214,95	8,53	
		-82,74	-24,97	101,76	-83,79		n2
	32,96	-6,35	66,32	1,99	114,86	-75,45	
	-51,47	68,10	34,00	178,74	158,04	56,04	
	18,51	112,33	8,39	29,68	4,81	90,74	
	-45,14	-55,17	-7,94	-25,45	-45,07		n3
	-19,35	1,00	14,52	-3,36	15,82	-64,69	
	-13,97	44,67	35,37	-12,01	-16,22	-33,01	
	78,46	-8,08	13,93	0,85	-2,49	-28,79	
Mittelwert	0,00	26,48	25,99	74,41	78,46	2,64	
SEM	11,71	17,64	10,90	23,81	33,12	16,67	

13. Anhang

Rohdaten zu Abbildung 35: Veränderung der 2-NBDG Aufnahme in differenzierten 3T3-L1-Adipozyten nach Inkubation verschiedener Konzentrationen von SFN-GSH

Bezogen auf die Mittelwerte der Absolutwerte [μg 2-NBDG/ mg DNA] der Kontrolle [%], Ausreißerbereinigt

Ermittlung der Veränderung in % (für Darstellung): $(\text{Mittelwert}-1)*100$

Inkubationszeit	5 min	5 min	5 min	
mit Insulin	97,3%	110,9%		n1
	100,2%	135,0%	103,2%	
	88,4%	139,8%	126,4%	
	61,4%	85,8%	73,5%	
	106,2%	110,4%	118,6%	
	106,9%	112,6%	100,5%	
	60,1%	109,5%		n2
	99,9%	89,4%	117,9%	
	80,9%	153,8%	76,2%	
	59,8%	117,7%	95,9%	
		90,3%	86,3%	
	75,8%	138,9%	99,0%	
	70,3%	143,1%	117,6%	
	97,4%	103,1%	79,6%	
Mittelwert	85,0%	117,2%	99,6%	
SEM	5,0%	5,8%	5,2%	
ohne Insulin	90,7%	144,1%	113,5%	n1
	107,5%		109,5%	
	79,0%	102,5%		
	99,8%		95,9%	
	90,3%	142,8%	78,3%	
	111,0%	114,1%	77,5%	
	75,0%	124,9%	112,8%	n2
	103,5%	105,6%	123,1%	
	70,7%	117,8%	78,7%	
	69,7%	107,7%	128,2%	
	101,5%	97,5%	104,2%	
	95,6%	110,0%	118,5%	
	89,6%	110,8%	101,3%	
	79,4%	96,1%	110,8%	
Mittelwert	90,2%	114,5%	104,0%	
SEM	3,7%	4,6%	4,7%	
Konzentration [nM]	10	1	0,1	

Rohdaten zu Abbildung 36: Veränderungen in der Lipidakkumulation bei differenzierten 3T3-L1-Adipozyten unter Inkubation mit SFN-GSH in verschiedenen Konzentrationen und Zeitspannen

Bezogen auf die Kontrolle [%], Ausreißerbereinigt

Inkubation während der Differenzierungsphase

Konzentration [nM]	0	0,1	1	10	100	1000	
	1,70	-8,898	-7,99	-6,088		8,35	n1
	-2,38	-14,87	1,29	-13,10	-2,06	0,29	
	-7,45	-8,67	-9,17	-19,35	-4,59	-5,54	
	8,12	5,68	2,87	-3,73		9,66	
	7,47	-13,55	-11,21	-12,21	-9,21	-12,60	n2
	-6,13	-6,78	3,00	3,95	-7,43	-3,21	
	-5,13	-1,87	6,91	4,30	-3,17	12,38	
	3,78	0,65	10,95	5,86	4,04	-19,03	
Mittelwert	1,78E-15	-6,04	-0,42	-5,05	-3,74	-1,21	
SEM	2,17	2,50	2,86	3,30	1,90	3,93	

Inkubation während der Reifungsphase

Konzentration [nM]	0	0,1	1	10	100	1000	
	-0,25	-9,04	-1,41	0,35	-16,14	-10,95	n1
	-0,81	-6,61	-4,93	-16,11	-10,95	-15,06	
	-2,94	-6,76	-5,64	-11,39	-8,55	-14,98	
	4,01	1,36	7,37	-2,68	-5,79	-6,46	
	-0,73		14,97	5,14	-3,02E-06	6,84	n2
	6,92	-1,05	5,91	6,39	0,93	1,25	
	1,54	-3,24	-0,89	-6,92	-6,11	-21,45	
	-7,73	-2,51	-11,25	-11,90	-15,10	-17,28	
Mittelwert	0	-3,98	0,52	-4,64	-7,71	-9,76	
SEM	1,56	1,38	2,98	2,93	2,22	3,43	

Inkubation während der Differenzierungs- und Reifungsphase

Konzentration [nM]	0	0,1	1	10	100	1000	
	12,75	-0,75		1,29		-1,37	n1
	-7,21	-13,82	-10,29	-3,98	-7,98	-4,67	
	-6,40	-13,02	-17,40	-11,63	-11,83	-11,67	
	0,87	-2,25	-9,83	-5,71	-9,98	-13,17	
	1,46	-1,29	-9,63		-7,86	2,99	n2
	2,34	-5,81	-12,61	-2,32	-6,70	-11,36	
	-1,94	-10,33	-9,21	7,98	-10,28	-1,85	
	-1,85	5,42		0,66	-11,22	-6,65	
Mittelwert	0	-5,23	-11,50	-1,96	-9,41	-5,97	
SEM	2,20	2,39	1,28	2,33	0,72	2,04	

Rohdaten zu Abbildung 37: Veränderung der 2-NBDG Aufnahme in differenzierten 3T3-L1-Adipozyten nach Inkubation verschiedener Konzentrationen von SFN-CYS

Bezogen auf die Mittelwerte der Absolutwerte [μg 2-NBDG/ mg DNA] der Kontrolle [%],
Ausreißerbereinigt
Ermittlung der Veränderung in % (für Darstellung): $(\text{Mittelwert}-1)*100$

Inkubationszeit	5 min	5 min	5 min	
mit Insulin	65,57%	48,47%	71,09%	n1
	49,78%	37,06%	86,31%	
	61,41%	82,07%	88,12%	
	62,29%		78,75%	
	86,77%	154,70%	62,04%	
	187,45%	68,72%	57,33%	
	106,41%	63,26%	60,64%	
	88,54%	60,91%	85,05%	
	131,55%	123,75%	144,82%	n2
	93,49%	146,38%		
	178,87%	81,63%	145,14%	
	105,32%	113,98%	99,01%	
	122,64%	124,36%		
	121,47%	151,47%	85,91%	
	99,60%	111,21%	79,51%	
	127,65%	60,26%	102,68%	
	108,12%	143,85%	115,93%	n3
	112,79%	82,55%	119,53%	
	180,01%	133,67%	94,83%	
	124,99%	116,23%	87,09%	
	86,56%	117,74%		
178,05%	177,98%	75,94%		
88,10%	134,86%	70,00%		
148,86%	115,96%	78,55%		
Mittelwert	113,18%	106,57%	89,92%	
SEM	8,02%	8,01%	5,34%	
Konzentration [nM]	10	1	0,1	

Inkubationszeit	5 min	5 min	5 min	
ohne Insulin	142,65%		103,59%	n1
	62,75%	60,57%	56,07%	
	62,96%		157,58%	
	63,49%	47,49%	152,78%	
	75,25%	63,97%	82,58%	
	52,70%	90,38%	79,54%	
	76,47%	67,47%	72,45%	
	64,45%	91,14%	124,42%	
	140,99%	156,26%	112,24%	n2
	132,62%	91,88%	59,28%	
	91,06%	126,37%	148,29%	
	62,82%	124,43%	127,49%	
	165,76%	92,30%	119,73%	
		109,57%	160,58%	
	131,39%	93,78%	94,42%	
	113,65%		117,42%	
	98,45%	101,45%	99,89%	n3
	118,82%	96,44%	104,03%	
	149,74%	122,44%	166,91%	
	89,74%	123,98%	125,37%	
	162,86%	103,83%	149,42%	
	126,70%		91,85%	
	171,58%	99,69%	71,20%	
	118,21%	102,79%	61,89%	
Mittelwert	107,61%	98,31%	109,96%	
SEM	7,95%	5,76%	6,99%	
Konzentration [nM]	10	1	0,1	

Rohdaten zu Abbildung 38: Veränderungen in der Lipidakkumulation bei differenzierten 3T3-L1-Adipozyten unter Inkubation mit SFN-CYS in verschiedenen Konzentrationen und Zeitspannen

Bezogen auf die Kontrolle [%], Ausreißerbereinigt

Inkubation während der Differenzierungsphase

Konzentration [nM]	0	0,1	1	10	100	1000	
	-6,10	-3,51	-9,24	-5,93	-13,24	-9,21	n1
	-2,66	3,23	-1,41	-6,36	-5,89	-12,82	
	4,42	4,11	-0,98	-6,10	-12,73	-18,79	
	4,34	-1,17	-0,47	-4,81	-5,16	-7,26	
	-4,46	-3,54	-9,12	-14,26	-14,05	-18,61	n2
	2,62	-4,55	-3,02	-15,27	-19,67	-19,54	
	6,20	8,11	-1,90	-16,55	-24,04	-14,20	
	-4,36	0,53	-2,87	-7,57	-8,94	-9,33	
	14,20	-8,48	-15,92	-11,09	-14,21	-21,23	n3
	-6,59	-15,30	-15,84	-22,19	-17,56	-21,02	
	-3,18	-4,28	-12,56	-20,13	-22,87	-17,51	
	-4,43	-12,95	-10,01	-3,31	-17,71	-14,97	
Mittelwert	0,00	-3,15	-6,94	-11,13	-14,67	-15,37	
SEM	1,83	1,97	1,69	1,84	1,75	1,40	

Inkubation während der Reifungsphase

Konzentration [nM]	0	0,1	1	10	100	1000	
	-6,27	-4,45	-2,85	-3,64	-5,67	-7,94	n1
	-2,83	-3,71	-3,66	-5,08	-4,57	-11,83	
	9,48	0,43	-2,88	-10,57	-7,47	-8,75	
	-0,38	-1,30	2,19	-1,16	0,77	-6,01	
	2,43	0,29	0,53	-18,33	-14,59	-14,48	n2
	-3,67		-12,62	-13,76	-9,58	-18,87	
	1,13	-4,39	-7,01	-12,83	-14,18	-20,69	
	0,11	-6,71	3,60	-6,04	-3,76	-10,28	
	2,46		14,28		3,94	7,63	n3
	-4,63	-5,73	1,81	2,50	7,23	3,54	
	0,92	3,39	3,97	-6,81	-2,85	3,14	
	1,25		13,54		6,57	10,79	
Mittelwert	0,00	-2,46	0,91	-7,57	-3,68	-6,15	
SEM	1,19	1,12	2,22	1,99	2,11	2,96	

Inkubation während der Differenzierungs- und Reifungsphase

Konzentration [nM]	0	0,1	1	10	100	1000	
	-8,25	-16,21	-44,47			-59,46	n1
	0,83	-9,01	-13,38	-12,69	-13,91	-20,27	
	5,06	-2,22	-11,59	-14,25	-14,68	-16,28	
	2,37	1,35	-5,29	-5,92	-5,97	-11,65	n2
	-59,96		-47,53	-15,99	-28,01	-55,86	
	18,51	3,95	10,63	0,51	1,78	-47,30	
	20,38	16,26	-1,49	-6,51	-6,38	-3,99	n3
	21,07	10,53	12,30	3,49	0,45	-1,59	
	0,91	-24,70	-47,25				
	-3,57	-18,73	-16,78	-21,94	-22,01	-19,39	n3
	-2,16	-1,15	-18,80	-19,01	-19,42	-21,28	
	4,82	1,93	-14,45	-9,28	-11,02	-13,95	
Mittelwert	0,00	-3,45	-16,51	-10,16	-11,92	-24,64	
SEM	6,12	3,79	5,94	2,60	3,05	6,08	

Rohdaten zu Abbildung 39: Veränderung der 2-NBDG Aufnahme in differenzierten 3T3-L1-Adipozyten nach Inkubation verschiedener Konzentrationen von SFN-NAC

Bezogen auf die Mittelwerte der Absolutwerte [μg 2-NBDG/ mg DNA] der Kontrolle [%], Ausreißerbereinigt

Ermittlung der Veränderung in % (für Darstellung): $(\text{Mittelwert}-1)*100$

Inkubationszeit	5 min	5 min	5 min		
mit Insulin	58,90%	110,02%	176,48%	n1	
	82,50%	84,76%			
	58,26%	119,34%	120,52%		
	104,00%	84,49%	57,14%		
	124,46%	94,00%	99,61%		
		137,26%	40,90%		
	115,54%	129,69%	108,01%		
	69,43%	100,29%	64,31%		
	98,50%	127,53%	119,08%	n2	
	112,06%	79,29%	64,29%		
	83,67%	103,86%	89,89%		
	77,47%	131,12%	85,83%		
		113,38%			
	86,20%	80,81%	74,00%		
	88,67%	104,79%	81,66%		
	80,79%	81,93%	96,69%		
	115,24%		101,51%	n3	
	120,98%	104,30%	109,41%		
	112,40%		139,18%		
	111,23%	150,32%	122,81%		
	80,36%	126,43%	79,07%		
	122,88%	144,46%	96,34%		
	75,36%	103,63%	116,79%		
	94,42%	116,77%			
	Mittelwert	94,24%	110,39%	97,31%	
	SEM	4,39%	4,53%	6,66%	
	Konzentration [nM]	10	1	0,1	

Inkubationszeit	5 min	5 min	5 min	
ohne Insulin	119,54%	85,24%	79,66%	n1
	100,57%	121,41%	100,13%	
	54,54%	95,03%	65,85%	
	51,38%	122,47%	78,75%	
	70,45%	143,18%	128,36%	
	74,67%	146,84%	134,92%	
	112,24%	127,19%	76,15%	
	53,10%	94,68%	53,52%	
	109,24%	150,23%	130,91%	n2
	103,90%	114,65%	148,99%	
	91,11%	96,12%	70,47%	
	121,86%	147,08%	115,65%	
	80,42%	122,12%	91,71%	
	64,50%	114,28%	96,97%	
	99,09%	88,63%	81,76%	
	94,57%	130,19%	96,08%	
	93,34%	143,68%		n3
	120,20%	130,00%	134,32%	
	115,16%		161,64%	
	100,29%		117,89%	
61,31%	104,17%	142,58%		
90,23%		126,40%		
95,02%	123,55%			
		109,59%		
Mittelwert	90,29%	120,04%	106,47%	
SEM	4,69%	4,61%	6,36%	
Konzentration [nM]	10	1	0,1	

Rohdaten zu Abbildung 40: Veränderungen in der Lipidakkumulation bei differenzierten 3T3-L1-Adipozyten unter Inkubation mit SFN-NAC in verschiedenen Konzentrationen und Zeitspannen

Bezogen auf die Kontrolle [%], Ausreißerbereinigt

Inkubation während der Differenzierungsphase

Konzentration [nM]	0	0,1	1	10	100	1000	
	-6,39	-5,61	-9,02	1,64	-8,24	-8,96	n1
	-1,42	-6,31	-4,01	-9,00	-11,58	-10,72	
	-0,20	7,66	-3,73		-14,27	-14,47	
	8,02	2,00	-1,06	-10,10	-11,78	-8,86	
	-7,76	-10,43	-3,90	-2,64	-10,61	-21,31	n2
	-9,30	-9,02	-8,33		-11,16	-5,73	
	4,62	-3,63	-1,87	-8,40	-15,48	-18,49	
	12,44	4,49	1,62	-5,95	-8,49	-5,82	
	-10,26	-0,32	-7,81	-7,36	-13,61	-12,92	n3
	7,26	-9,84	-10,89	-7,46	-7,18	-13,85	
	3,83	0,61	-2,82	-15,13	-14,62	-22,22	
	-0,83	-10,09	-5,87	-10,96	-14,62	-19,47	
Mittelwert	0,00	-3,37	-4,81	-7,53	-11,80	-13,57	
SEM	2,14	1,78	1,06	1,45	0,81	1,67	

Inkubation während der Reifungsphase

Konzentration [nM]	0	0,1	1	10	100	1000	
	-0,43	-1,74	-1,56	-7,18	15,22	15,46	n1
	4,87	-3,95	-11,52	-18,56	-0,68	3,13	
	-5,12	-2,06	-5,19	3,20	-3,70	18,70	
	0,68		0,60	4,09	9,46	1,24	
	1,17	-2,95	-1,43	-4,06	-8,21	-17,46	n2
	4,52	-20,60	-17,43	-9,80	-36,94	-25,43	
	1,68	-24,79	-16,25	-23,94	-28,27	-27,18	
	-7,37	0,63	4,21	-8,52	-23,27	-29,38	
	6,20	-13,16	-9,80	-0,25	-3,87	-9,37	n3
	-5,31	-21,14	-16,96	-22,93	-19,14	20,99	
	-9,50	-17,65	-15,30	-17,92	-22,15	10,04	
	8,60	-3,04	-9,80	-5,57	1,71	19,03	
Mittelwert	0,00	-10,04	-8,37	-9,29	-9,99	-1,69	
SEM	1,65	2,87	2,17	2,79	4,59	5,58	

Inkubation während der Differenzierungs- und Reifungsphase

Konzentration [nM]	0	0,1	1	10	100	1000	
	-0,59	-6,34	-4,26	-15,51	-13,85	-3,65	n1
	-1,09	-5,88	-12,76	-14,91	-16,57	-16,04	
	-3,77	-6,22	-7,85	-16,19	-22,61	-22,01	
	5,45			0,27		-10,04	
	6,20	-13,16	-9,80	-0,25	-3,87	-9,37	n2
	-5,31	-21,14	-16,96	-22,93	-19,14	20,99	
	-9,50	-17,65	-15,30	-17,92	-22,15	10,04	
	8,60	-3,04	-9,80	-5,57		19,03	
	1,72	2,49		-10,08	-15,99	-12,01	n3
	-6,67	-9,65	-16,38	-20,75	-19,09	-24,23	
	-1,72	-21,83	-15,65	-19,28	-25,78	-23,88	
	6,67	-10,58	-7,17	-20,29	-22,53	-21,60	
Mittelwert	0,00	-10,27	-11,59	-13,62	-18,16	-7,73	
SEM	1,68	2,30	1,40	2,29	1,96	4,69	

Rohdaten zu Abbildung 41: Veränderung der 2-NBDG Aufnahme in differenzierten 3T3-L1-Adipozyten nach Inkubation verschiedener Konzentrationen von I3C

Bezogen auf die Mittelwerte der Absolutwerte [μg 2-NBDG/ mg DNA] der Kontrolle [%], Ausreißerbereinigt

Ermittlung der Veränderung in % (für Darstellung): $(\text{Mittelwert}-1)*100$

Inkubationszeit	5 min	5 min	5 min	
mit Insulin	123,35%	112,53%	87,12%	n1
	93,52%	112,48%	111,71%	
	213,20%	114,72%	123,99%	
	206,58%	111,22%	155,87%	
	115,46%	135,94%	99,76%	
	102,59%	69,36%	154,77%	
	123,64%	73,38%	87,82%	
	106,75%	96,68%	143,56%	n2
	156,22%	171,44%	159,68%	
	105,54%		217,65%	
	151,60%	172,58%	134,63%	
	158,68%	182,16%		
	170,98%	172,60%	178,78%	
	160,95%	214,96%	128,17%	
	107,69%	186,02%	165,55%	n3
		130,90%	195,04%	
	196,50%	141,67%	76,77%	
	185,46%	142,89%	171,02%	
	198,96%	121,96%	192,16%	
	169,70%		119,96%	
	150,32%	168,58%		
176,95%	173,27%	178,30%		
160,58%	142,13%	123,91%		
175,39%	132,49%	100,15%		
Mittelwert	152,63%	140,00%	141,20%	
SEM	7,58%	7,97%	8,30%	
Konzentration [nM]	10	1	0,1	

Inkubationszeit	5 min	5 min	5 min	
ohne Insulin	109,85%	81,81%	56,48%	n1
	124,06%	92,35%	105,64%	
	88,77%	69,73%	61,35%	
	124,85%	121,81%	69,07%	
	142,00%	138,19%	91,99%	
	126,06%	90,37%	119,14%	
	105,81%	113,87%	106,44%	
	80,62%	96,70%	93,24%	
	112,20%	82,34%		n2
	76,13%	130,58%	140,48%	
	86,92%	132,42%	153,84%	
	153,68%		167,75%	
	108,00%		132,20%	
	138,53%	182,42%	110,49%	
	130,12%	161,12%	160,94%	
	140,69%		91,40%	
	120,75%	103,80%	113,69%	n3
	111,83%	147,32%	142,82%	
	95,02%	141,08%	95,44%	
	132,02%	105,31%	114,54%	
132,18%	118,40%	91,29%		
145,75%	100,33%	68,49%		
	104,58%	67,30%		
93,37%	95,85%	66,34%		
Mittelwert	116,49%	114,78%	105,23%	
SEM	4,60%	6,20%	6,87%	
Konzentration [nM]	10	1	0,1	

Rohdaten zu Abbildung 42: Veränderungen in der Lipidakkumulation bei differenzierten 3T3-L1-Adipozyten unter Inkubation mit I3C in verschiedenen Konzentrationen und Zeitspannen

Bezogen auf die Kontrolle [%], Ausreißerbereinigt

Inkubation während der Differenzierungsphase

Konzentration [nM]	0	0,1	1	10	100	1000	
	2,89	-18,12	13,32			8,47	n1
	-4,10	-1,48	-1,48	-7,58	-8,01	-3,69	
	1,19		-3,18	-5,50	-13,38	-11,06	
	0,03		12,03	-0,81	-5,34	-12,86	n2
	-11,65	-13,92	-38,54	-22,03	-40,92	-37,05	
	1,44	-20,43	-41,75		-46,72		
	7,73	-30,26	-34,02	-44,95	-53,57	-45,72	n3
	2,48	-27,72	-24,35	-33,41	-30,76	-17,17	
	-4,60	-15,01	-19,11	-24,68	-28,89	-27,67	
	-4,21	-23,72	-22,75	-30,02	-35,22	-29,34	n3
	-4,66	-18,88	-23,26	-30,53	-38,73	-24,79	
	13,47	-6,19	-20,46	-27,79	-6,07	-9,95	
Mittelwert	0,00	-17,57	-16,96	-22,73	-27,96	-19,17	
SEM	1,89	2,83	5,30	4,42	5,18	4,70	

Inkubation während der Reifungsphase

Konzentration [nM]	0	0,1	1	10	100	1000	
	11,71	-11,44		-11,26	2,99	1,68	n1
	-7,70	-36,19	-34,49	-36,82	-38,75	-25,74	
	-9,14	-30,43	-28,39	-32,47	-31,55	-12,25	
	5,13	2,12	-8,98	-10,87	-8,72	5,45	n2
	5,78	-8,96	-11,16	-23,76	1,73	-4,44	
	1,73	-20,98	-28,82	-30,48	-20,26	-23,37	
	-7,87	-3,47	-21,06	-23,84	-29,15	-24,41	n3
	0,36	-18,35	-21,52	-25,75	-5,96	-19,50	
	6,33	-12,27	-16,63	-8,61	-13,08	-6,47	
	1,91	-25,27	-33,29	-33,98	-26,23	-26,10	n3
	-8,39	-17,59	-25,96	-29,81	-20,22	-15,31	
	0,15	-19,80	-25,00	-21,32	-13,37	-20,63	
Mittelwert	0,00	-16,89	-23,21	-24,08	-16,88	-14,26	
SEM	1,98	3,15	2,52	2,74	3,80	3,17	

Inkubation während der Differenzierungs- und Reifungsphase

Konzentration [nM]	0	0,1	1	10	100	1000	
	11,88	-9,34	-12,11	-19,49	-31,14	-44,60	n1
	-8,42	-12,11	-17,26	-27,64	-35,95	-40,56	
	-9,46	-2,46	-16,42	-29,57	-28,95	-6,11	
	6,00	2,31	-11,73	-20,19	-10,96	-14,23	
	-20,67	-54,90	-57,07		-66,30		n2
	26,37	-48,10	-64,00	-38,62	-52,97		
	-18,36	-49,64	-51,56	-35,80	-57,84	-37,97	
	12,66	-38,87	-49,38	-18,36	-45,15	-30,92	
	-17,07	-6,76	-27,37	-40,26	-27,22	-40,65	n3
	-3,71	-7,54	-22,22	-14,80	-9,96	-46,43	
	2,93	-13,63	-24,56	-16,52		-9,26	
	17,85	2,77	-0,27			-28,62	
Mittelwert	0,00	-19,86	-29,50	-26,12	-36,65	-29,94	
SEM	4,43	6,22	5,97	3,03	5,98	4,74	

Rohdaten zu Abbildung 43: Veränderung der 2-NBDG Aufnahme in differenzierten 3T3-L1-Adipozyten nach Inkubation verschiedener Konzentrationen von ASG

Bezogen auf die Mittelwerte der Absolutwerte [μg 2-NBDG/ mg DNA] der Kontrolle [%], Ausreißerbereinigt

Ermittlung der Veränderung in % (für Darstellung): $(\text{Mittelwert}-1)*100$

Inkubationszeit	5 min	5 min	5 min	
mit Insulin	103,95%	146,67%	127,98%	n1
	126,33%	96,61%		
	170,04%	147,03%		
	101,46%	149,90%	118,90%	
	155,06%	112,55%	101,02%	
	182,78%		96,67%	
	130,74%		153,39%	
	171,55%	108,97%	143,41%	
	131,52%	169,92%	155,78%	n2
	138,49%	158,58%	146,88%	
	106,58%	132,41%	131,65%	
	109,14%	155,11%	154,07%	
		140,50%	133,04%	
	156,05%	152,40%	141,27%	
	133,65%	166,70%	157,16%	
	182,07%	127,65%	116,18%	
	97,25%	95,08%	114,69%	n3
	100,42%	110,81%	110,09%	
	97,80%	126,70%	120,99%	
	126,90%	123,88%	116,79%	
86,96%	128,93%	108,13%		
85,22%	124,67%	121,75%		
155,47%	93,46%			
129,62%	95,50%	143,00%		
Mittelwert	129,52%	130,18%	129,18%	
SEM	6,32%	5,10%	4,08%	
Konzentration [nM]	10	1	0,1	

Inkubationszeit	5 min	5 min	5 min	
ohne Insulin	132,90%	117,69%	117,75%	n1
	131,57%	124,33%	130,97%	
	113,82%	150,35%	148,88%	
	117,98%	154,63%	88,05%	
	116,57%	99,62%	92,55%	
	98,47%	89,06%		
	157,36%	132,06%	94,53%	
	139,35%	141,67%	101,24%	
	129,42%	129,15%	112,98%	n2
	134,00%	164,08%	100,34%	
	134,20%	169,13%	136,79%	
	141,44%	160,46%	109,63%	
		157,52%	134,37%	
	133,59%	123,90%		
		123,07%	149,41%	
	151,25%	158,56%	84,54%	
	114,56%	113,76%	99,61%	n3
	85,37%	90,63%	103,12%	
	90,42%	109,24%	118,69%	
	96,52%	128,71%	133,70%	
96,84%	126,33%	96,61%		
89,76%	112,39%	109,67%		
109,17%	115,16%	108,62%		
95,49%	121,31%	115,43%		
Mittelwert	118,64%	129,70%	113,07%	
SEM	4,53%	4,68%	4,04%	
Konzentration [nM]	10	1	0,1	

Rohdaten zu Abbildung 44: Veränderungen in der Lipidakkumulation bei differenzierten 3T3-L1-Adipozyten unter Inkubation mit ASG in verschiedenen Konzentrationen und Zeitspannen

Bezogen auf die Kontrolle [%], Ausreißerbereinigt

Inkubation während der Differenzierungsphase

Konzentration [nM]	0	0,1	1	10	100	1000	
	8,67	-5,90	-17,99	-20,68	-11,65	-5,95	n1
	-14,17	-26,04	-33,57	-34,36	-27,29	-28,05	
	-1,72	-20,41	-31,58	-32,12	-33,62	-16,00	
	7,22	-15,29	-5,74	-25,17	-17,08	-3,67	n2
	-2,04	-12,93	-26,04	-31,05	-24,83	-3,41	
	-10,29		-37,13	-43,29	-35,31	-21,10	
	-3,48	-20,28	-34,80	-42,39	-45,83	-16,25	n3
	15,81	-6,79	-19,14	-27,63	-20,16	-17,64	
	3,51	-9,00	-8,47	-15,26	-18,42	-25,49	
	-0,22	-19,71	-28,32	-36,30	-37,19	-35,50	n3
	-5,04	-14,82	-31,71	-35,12	-41,93	-43,18	
	1,75	-8,68	-18,31	-15,39	-15,67	-33,38	
Mittelwert	0,00	-14,53	-24,40	-29,90	-27,41	-20,80	
SEM	2,37	1,98	3,00	2,71	3,23	3,71	

Inkubation während der Reifungsphase

Konzentration [nM]	0	0,1	1	10	100	1000	
	10,87	-17,87		-25,18			n1
	-8,27	-24,60	-26,97	-36,43	-30,54	-21,99	
	-10,39	-26,23	-27,85	-33,35	-39,10	-18,50	
	7,79	-12,45	-23,12	-28,12	-30,96	-16,71	n2
	-2,04	-10,13	-19,26	-24,23	-16,71	-15,50	
	-2,36	-24,81	-24,00	-35,10	-26,10	-28,50	
	-1,22	-35,17	-21,76	-33,87	-36,13	-18,09	n3
	5,62	-18,96	-25,56	-23,04	-19,26	-12,70	
	8,51	-0,35			-18,99		
	-2,64	-22,41	-32,61		-34,35	-25,37	n3
	-5,90	-19,66	-32,25	-37,56	-32,66	-22,68	
	0,03	-3,07	-21,26	-27,20	-23,85	-18,70	
Mittelwert	0,00	-17,98	-25,46	-30,41	-28,06	-19,87	
SEM	1,97	2,89	1,43	1,72	2,28	1,51	

Inkubation während der Differenzierungs- und Reifungsphase

Konzentration [nM]	0	0,1	1	10	100	1000	
	0,32	-19,27	-19,80	-17,48	-1,85		n1
	-6,03	-33,43	-42,61	-41,50	-28,78	-12,94	
	-6,58	-26,57	-42,35	-36,68	-40,57	-7,14	
	12,30	-6,95	-14,32	-16,48	-15,80	3,06	n2
	7,39	-14,55	-15,14	-26,59	-19,51	-11,34	
	-6,46	-26,86	-29,22	-35,05	-35,59	-24,26	
	-2,17	-22,59	-31,47	-38,46	-26,59	-16,02	
	1,24	-16,69	-9,67	-28,90	0,65	-16,93	n3
	12,46	-5,80	-11,79		-13,22		
	-4,52	-19,65	-37,52	-43,22	-34,55	-13,14	
	-10,77	-21,27	-31,63	-30,30	-28,06	-10,54	
	2,83	-2,33	-11,06	-11,24	-12,59	3,74	
Mittelwert	0,00	-18,00	-24,71	-29,63	-21,37	-10,55	
SEM	2,19	2,69	3,60	3,24	3,81	2,73	

Rohdaten zu Abbildung 45: Gegenüberstellung aller Substanzen in der 2-NBDG Aufnahme in differenzierten 3T3-L1-Adipozyten nach Inkubation mit 10 nM Substanz

Bezogen auf die Mittelwerte der Absolutwerte [μg 2-NBDG/ mg DNA] der Kontrolle [%], Ausreißerbereinigt

Ermittlung der Veränderung in % (für Darstellung): $(\text{Mittelwert}-1)*100$

Inkubationszeit	5 min	5 min	5 min	5 min	5 min	5 min	5 min
mit Insulin	108,67%	97,29%	71,72%	65,57%	58,90%	123,35%	103,95%
	135,03%	100,21%	97,44%	49,78%	82,50%	93,52%	126,33%
	121,79%	88,42%	88,22%	61,41%	58,26%	213,20%	170,04%
	141,69%	61,40%	94,17%	62,29%	104,00%	206,58%	101,46%
	118,46%	106,25%	63,79%	86,77%	124,46%	115,46%	155,06%
		106,86%	79,19%	187,45%		102,59%	182,78%
		60,13%	79,63%	106,41%	115,54%	123,64%	130,74%
		99,87%	81,98%	88,54%	69,43%	106,75%	171,55%
		80,94%	99,96%	131,55%	98,50%	156,22%	131,52%
		59,78%	89,76%	93,49%	112,06%	105,54%	138,49%
			96,87%	178,87%	83,67%	151,60%	106,58%
		75,78%	93,71%	105,32%	77,47%	158,68%	109,14%
		70,28%		122,64%		170,98%	
		97,41%		121,47%	86,20%	160,95%	156,05%
				99,60%	88,67%	107,69%	133,65%
			90,07%	127,65%	80,79%		182,07%
				108,12%	115,24%	196,50%	97,25%
				112,79%	120,98%	185,46%	100,42%
				180,01%	112,40%	198,96%	97,80%
				124,99%	111,23%	169,70%	126,90%
			86,56%	80,36%	150,32%	86,96%	
			178,05%	122,88%	176,95%	85,22%	
			88,10%	75,36%	160,58%	155,47%	
			148,86%	94,42%	175,39%	129,62%	
Mittelwert	125,10%	84,97%	86,65%	113,18%	94,24%	152,63%	129,52%
SEM	5,90%	4,95%	3,00%	8,02%	4,39%	7,58%	6,32%
ohne Insulin	135,66%	90,72%		142,65%	119,54%	109,85%	132,90%
	114,66%	107,55%	85,47%	62,75%	100,57%	124,06%	131,57%
	129,07%	79,04%	75,21%	62,96%	54,54%	88,77%	113,82%
	95,03%	99,75%	94,69%	63,49%	51,38%	124,85%	117,98%
	146,29%	90,30%	58,80%	75,25%	70,45%	142,00%	116,57%
	89,71%	110,97%	72,55%	52,70%	74,67%	126,06%	98,47%
		75,04%		76,47%	112,24%	105,81%	157,36%
		103,46%	76,79%	64,45%	53,10%	80,62%	139,35%
		70,75%	100,76%	140,99%	109,24%	112,20%	129,42%

13. Anhang

		69,67%	86,56%	132,62%	103,90%	76,13%	134,00%
		101,52%	116,37%	91,06%	91,11%	86,92%	134,20%
		95,64%	99,55%	62,82%	121,86%	153,68%	141,44%
		89,64%	75,53%	165,76%	80,42%	108,00%	
		79,41%	90,89%		64,50%	138,53%	133,59%
			96,04%	131,39%	99,09%	130,12%	
			101,81%	113,65%	94,57%	140,69%	151,25%
				98,45%	93,34%	120,75%	114,56%
				118,82%	120,20%	111,83%	85,37%
				149,74%	115,16%	95,02%	90,42%
				89,74%	100,29%	132,02%	96,52%
				162,86%	61,31%	132,18%	96,84%
				126,70%	90,23%	145,75%	89,76%
				171,58%	95,02%		109,17%
				118,21%		93,37%	95,49%
Mittelwert	118,40%	90,25%	87,93%	107,61%	90,29%	116,49%	118,64%
SEM	9,30%	3,65%	4,03%	7,95%	4,69%	4,60%	4,53%
Substanz 10 nM	SFN	SFN-GSH	SFN-CYS-GLY	SFN-CYS	SFN-NAC	I3C	ASG

Rohdaten zu Abbildung 46: Gegenüberstellung aller Substanzen in der Lipidakkumulation bei differenzierten 3T3-L1-Adipozyten unter Inkubation mit 10 nM über die Differenzierungs- und Reifungsperiode

Bezogen auf die Kontrolle [%], Ausreißerbereinigt

Inkubation während der Differenzierungs- und Reifungsphase

Konzentration [nM]	10	10	10	10	10	10	10
	-1,22	1,29	131,30		-15,51	-19,49	-17,48
	-2,02	-3,98	168,98	-12,69	-14,91	-27,64	-41,50
	4,35	-11,63	151,85	-14,25	-16,19	-29,57	-36,68
	6,16	-5,71	168,58	-5,92	0,27	-20,19	-16,48
	13,43		101,76	-15,99	-0,25		-26,59
	-13,43	-2,32	1,99	0,51	-22,93	-38,62	-35,05
	-17,05	7,98	178,74	-6,51	-17,92	-35,80	-38,46
	-2,42	0,66	29,68	3,49	-5,57	-18,36	-28,90
			-25,45		-10,08	-40,26	
			-3,36	-21,94	-20,75	-14,80	-43,22
			-12,01	-19,01	-19,28	-16,52	-30,30
			0,85	-9,28	-20,29		-11,24
Mittelwert	-1,53	-1,96	74,41	-10,16	-13,62	-26,12	-29,63
SEM	3,54	2,33	23,81	2,60	2,29	3,03	3,24
Substanz	SFN	SFN-GSH	SFN-CYS-GLY	SFN-CYS	SFN-NAC	I3C	ASG

Claudia Habersack

Lebenslauf



Persönliche Daten:

Adresse: Radetzkystraße 4, 1030 Wien
Telefon: 0699/11213850
Email: c.habersack@gmail.com
Geburtsdatum: 27.4.1982
Geburtsort: Eisenstadt
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: Österreich

Aus- und Weiterbildung:

- 05/2010 – 04/2011:** **Praktische Diplomarbeit** am Institut für Ernährungsphysiologie und Physiologische Chemie
Thema: „Einfluss von Abbauprodukten ausgewählter Glucosinolate auf die Glucoseaufnahme und Fettakkumulierung in 3T3-L1-Adipozyten“
- seit 10/2005:** **Studium der Ernährungswissenschaften** an der Universität Wien, Schwerpunkt Ernährungsökonomie
- 1996 – 2001:** **Handelsakademie** Neusiedl am See mit dem Ausbildungsschwerpunkt Marketing (Matura)
- 1992 – 1996:** **Gymnasium** Neusiedl am See
- 1988 – 1992:** **Volksschule** Weiden am See

Berufliche Tätigkeiten:

- seit 08/2011:** **American Chemical Society**
Editoriale Assistenz für das *Journal of Agricultural and Food Chemistry*
- seit 01/2011:** **Universität Wien**
Institut für Ernährungsphysiologie und Physiologische Chemie
Administrative Assistentin
- Seit 09/2011:** Mitarbeit in der Administration und Budgetabwicklung des Christian Doppler Labors für Bioaktive Aromastoffe am Institut für Ernährungsphysiologie und Physiologische Chemie
- 01/2010 – 01/2011:** **Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH**
Abteilung Interne Revision
Karenzvertretung Sekretariat
- 12/2009:** **MA 38 Lebensmitteluntersuchungsanstalt der Stadt Wien**
Bereiche Bakteriologie und Chemie II
Praktikum

- 07/2009 – 09/2009:** **Bundesministerium für Gesundheit**
Abteilung Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz, rechtliche Angelegenheiten, Koordination der Kontrolle
Praktikum
- 05/2009 – 06/2009:** **Arbeitsgemeinschaft für klinische Ernährung**
Mitarbeit beim „nutritionDay in Europe“
Projekt
- 10/2001 – 01/2009:** **Mediaprint Zeitungs- und Zeitschriftenverlag GesmbH & Co. KG, Wien**
davon:
07/2008 – 01/2009 Hauptbuchhaltung
10/2001 – 06/2008 Sachbearbeiterin in der Abonnenten-Buchhaltung
- 07/2001:** **Tupack Verpackungen GesmbH, Wien**
Sekretariat
Ferialjob
- 07/1999:** **Borealis Polyolefine GmbH, Schwechat-Mannswörth**
DV-Abteilung
Ferialjob

Poster:

Walker, J., Habersack, C., Pignitter, M., Somoza, V. „Wirkung von Glucosinolatmetaboliten auf die Glukoseaufnahme und die Lipidakkumulierung in 3T3-L1-Adipozyten.“ Deutscher Lebensmittelchemikertag, 12. – 14. September 2012, Münster.

Besondere Kenntnisse:

- Fremdsprachen: Englisch: gute Kenntnisse in Wort und Schrift
Französisch: Maturaniveau, 2-wöchiger Sprachkurs in Cannes 2000
- Software/EDV: gesamtes MS Office-Paket, Lotus, BLS, SAP, SPSS, SigmaPlot, Endnote, CRM-System „Abo“, IGEL, Internetanwendungen
- Führerschein: B, F

Interessen:

Lesen, gesunde Ernährung und Kochen, Acrylmalerei, Musik