

Friedrich-Schiller-Universität Jena
Biologisch-Pharmazeutische Fakultät
Institut für Ernährungswissenschaften
Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie

und

Forschungszentrum Dresden-Rossendorf
Institut für Radiopharmazie
Abteilung für Radiopharmazeutische Biologie

UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS
GLYKATIRTER LIPOPROTEINE GERINGER DICHTEN
AUF DIE HUMANE ADIPOGENESE

Diplomarbeit

zur Erlangung des Grades einer
Diplom-Ernährungswissenschaftlerin
(Dipl.-Troph.)

vorgelegt von
Christin Neuber
aus Grumbach

Dresden, im Oktober 2008

Gutachter:

- 1 PD Dr. rer. nat. habil. Michael Gleii
(Friedrich-Schiller-Universität Jena)

- 2 PD Dr. rer. medic. habil. Jens Pietzsch
(Forschungszentrum Dresden-Rossendorf)

*Ein Rückschlag ist die Möglichkeit,
etwas noch einmal neu und klüger anzufangen.*

Henry Ford

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 als Facetten des Metabolischen Syndroms	1
1.2	Fettgewebe als Speicher- und endokrines Organ	3
1.3	Adipogenese und das 3T3-L1-Modell.....	7
1.4	Entstehung nativer und modifizierter LDL	10
1.4.1	Einteilung der Lipoproteine	10
1.4.2	Endogener Lipidstoffwechsel	10
1.4.3	LDL-Modifikation.....	12
1.5	Katabolismus modifizierter LDL	12
1.5.1	RAGE	13
1.5.2	Scavenger-Rezeptoren (SR).....	14
1.5.3	Veränderung der Rezeptor-Expression während der Adipogenese	15
1.6	Zielstellung	16
2	Material und Methoden.....	17
2.1	Material.....	17
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterial	17
2.1.2	Chemikalien	18
2.1.3	Puffer und Lösungen	19
2.2	Methoden.....	23
2.2.1	Gewinnung und Charakterisierung der humanen LDL	23
2.2.1.1	Plasmagewinnung und Konservierung.....	23
2.2.1.2	Präparation der humanen Lipoproteine mittels very fast- Ultrazentrifugation (VFU).....	23
2.2.1.3	In vitro-Glykatisierung humaner LDL.....	24
2.2.1.4	SDS-PAGE	25
2.2.2	Proteinbestimmung.....	25
2.2.3	Untersuchungen zur Bindung glykatisierter LDL an den löslichen RAGE (sRAGE).....	25
2.2.4	Zellkultur	26
2.2.4.1	Kultur der murinen 3T3-L1-Zellen.....	26
2.2.4.2	Differenzierung der murinen 3T3-L1-Zellen	27

2.2.5	Nachweis und relative Quantifizierung der Differenzierung mittels Oil-Red O (Öl-Rot-Färbung)	27
2.2.6	RNA-Isolierung und Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	29
2.2.6.1	RNA-Isolierung	29
2.2.6.2	DNase-Verdau	30
2.2.6.3	Überprüfung der Primerfunktionalität mittels Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) und Agarose-Gelelektrophorese	30
2.2.6.4	Quantifizierung der mRNA-Expression mittels quantitativer Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)	31
2.2.7	Proteinisolierung und Western Blotting	32
2.2.7.1	Proteinisolierung	32
2.2.7.2	SDS-PAGE	32
2.2.7.3	Western Blotting	32
2.2.8	Untersuchungen zur Aufnahme nativer (nLDL) und glykierter LDL (glykLDL) an 3T3-L1-Zellen	34
2.2.8.1	Herstellung der Hemmstofflösungen	34
2.2.8.2	Radioaktive Markierung von nLDL und glykLDL mittels N-Succinimidyl-4- ¹⁸ F-fluorbenzoat (¹⁸ F]SFB)	34
2.2.8.3	Fluoreszenzmarkierung von nLDL und glykLDL mittels 1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorat (DiI)	35
2.2.8.4	Zellaufnahmestudien an Präadipozyten und Adipozyten	35
2.2.8.5	Fluoreszenz-Mikroskopie	37
2.2.9	Untersuchungen zur Sekretion von Interleukin-6 (IL-6) und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) mittels quantitativem Enzym-gekoppeltem Immunadsorptionstest (ELISA)	38
2.2.9.1	Gewinnung der Zellüberstände	38
2.2.9.2	Maus-IL-6- und -TNF- α -Immunoassay	38
2.2.10	Untersuchungen zum <i>in vivo</i> -Katabolismus von nLDL und glykLDL (Bioverteilung)	39
2.2.11	Statistische Auswertung	39

3	Ergebnisse	40
3.1	Charakterisierung der humanen LDL <i>in vitro</i>	40
3.2	Untersuchungen zur Bindung von glykLDL an sRAGE.....	40
3.3	Charakterisierung der Zelllinie 3T3-L1.....	41
3.4	Relative Quantifizierung des Einflusses von nLDL und glykLDL auf die Differenzierung der 3T3-L1-Zellen	42
3.4.1	Quantifizierung mittels Öl-Rot-Färbung	42
3.4.2	Quantifizierung mittels Pref-1-mRNA-Expression.....	45
3.5	Zellaufnahme von nLDL und glykLDL durch 3T3-L1-Zellen.....	47
3.5.1	Zellaufnahmestudien mit [¹⁸ F]Fluorbenzoyl-LDL ([¹⁸ F]FB-LDL)	47
3.5.2	Zellaufnahmestudien mit 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindo- carbocyaninperchlorat-LDL (DiI-LDL)	53
3.6	Untersuchungen zur Rezeptorexpression an 3T3-L1-Zellen.....	57
3.6.1	Überprüfung der Primerfunktionalität.....	57
3.6.2	Expression des LDL-R	58
3.6.3	Expression des RAGE	58
3.6.3.1	RAGE-mRNA-Expression	58
3.6.3.2	RAGE-Protein-Synthese	60
3.6.4	Expression der SR-A1/A2	61
3.6.5	Expression des CD36	61
3.6.6	Expression des SR-B1	63
3.6.7	Expression des LOX-1	64
3.6.8	Vergleich der Expression der verschiedenen Rezeptoren	64
3.7	Untersuchungen zur Sekretion von IL-6 und TNF- α mittels quantitativem „Sandwich“-ELISA	65
3.7.1	Maus-IL-6-Immunoassay	65
3.7.2	Maus-TNF- α -Immunoassay.....	65
3.8	Untersuchungen zum <i>in vivo</i> -Katabolismus von [¹⁸ F]FB-nLDL und [¹⁸ F]FB- glykLDL (Bioverteilung).....	66
4	Diskussion.....	68
5	Schlussfolgerung	84
6	Ausblick.....	85
7	Zusammenfassung	86

8 Summary	88
Literaturverzeichnis.....	90
Erklärung	100
Danksagung	101

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
AGE-R1/ 2/ 3	AGE-Rezeptor 1/ 2/ 3
AGE	Fortgeschrittene Glykatisierungsprodukte Engl.: advanced glycation endproducts
ALP	Atherogener Lipoprotein-Phänotyp
Apo	Apolipoprotein
BMI	Körpermasse-Index Engl.: body mass index
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serumalbumin Engl.: bovine serum albumin
BCA	Bicinchoninsäure
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat Engl.: cyclic adenosine monophosphate
CD	Gruppe von membrangebundenen Glykoproteinen, die als immunphänotypische Oberflächenmerkmale von Zellen dienen Engl.: cluster of differentiation
CD36	CD Nummer 36 oder Fettsäure-Transporter (FAT)
cDNA	Komplementäre DNA Engl.: complementary DNA
C/EBP α / β / γ	Transkriptionsfaktor Engl.: CCAAT/enhancer binding protein α , β und δ
CMKLR-1	Chemerin-Rezeptor Engl.: chemokine-like receptor-1
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEX	Dexamethason
DiI	1,1'-Diioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin-perchlorat
DM	Diabetes mellitus

DMEM	Nährmedium für die Zellkultur Engl.: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMIX	Differenzierungsmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	Extrazelluläre Matrix Engl.: extracellular matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest Engl.: enzyme linked immunosorbent assay
ERK1/2	In die Signaltransduktion involvierte Kinasen Engl.: extracellular signal-related kinases-1 and -2
FAT	Fettsäure-Transporter, Synonym für CD36 Engl.: fatty acid transporter
[¹⁸ F]FB-LDL	[¹⁸ F]Fluorbenzoyl-LDL
FKS	Fetales Kälberserum
G ₀ / G ₁ / G _D	Phasen des Zellzyklus Engl.: gap phases
GLUT-4	Insulinabhängiger Glukose-Transporter-4
glykBSA (Engl.: glycBSA)	Glykatiertes BSA
glykLDL (Engl.: glycLDL)	Glykatierte LDL
HDL	Lipoproteine hoher Dichte Engl.: high density lipoproteins
HSA	Humanes Serumalbumin
IMBX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IDL	Lipoproteine mittlerer Dichte Engl.: intermediate density lipoproteins
IGT	Gestörte Glukosetoleranz Engl.: impaired glucose tolerance
IKK	Inhibitorische KappaB-Kinase Engl.: inhibitor κB kinase
IL-6	Interleukin-6
IGF-1	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor-1 Engl.: insulin like growth factor 1

IR	Insulin-Rezeptor
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat-1
80-KH	AGE-R1 oder Proteinkinase-C-Substrat
LDL	Lipoproteine geringer Dichte Engl.: low density lipoproteins
LDL-R	LDL-Rezeptor
LOX-1	Lektin-ähnlicher Rezeptor-1 für oxLDL Engl.: lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1
LPL	Lipoproteinlipase
malBSA	Maleinanhidrid-modifiziertes BSA
MAPK	Signaltransduktions-Kinasen Engl.: mitogen activated protein kinases
MCP-1	Monozyten-chemotaktisches Protein-1 Engl.: monocyte chemotactic protein-1
NaOleat	Natriumsalz der Ölsäure
NFκB	Nuklearer Faktor kappa B (Transkriptionsfaktor) Engl.: nuclear factor kappa B
NP-40	Nonidet P40-Substitut
Nrf2	Nuklearer Faktor-E2-verbundener Faktor 2 (Transkriptionsfaktor) Engl.: nuclear factor-E2-related factor 2
oGTT	Oraler Glukose-Toleranz-Test
OST-48	AGE-R2 oder Oligosaccaryl-Transferase-48
oxLDL	Oxidierte LDL
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung Engl.: phosphate buffered saline
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
p.i.	Nach der Injektion Engl.: past injection
PPARγ	Nukleärer Hormonrezeptor, der die Transkription verschiedener Gene reguliert Engl.: peroxisome proliferator-activated receptor γ

Pref-1	Prädipozytenfaktor-1 Engl.: preadipocyte factor-1
P/S	Antibiotika-Gemisch aus Penicillin und Streptomycin
Rb	Retinoblastom-Protein
RAGE	Rezeptor für fortgeschrittene Glykatierungsprodukte Engl.: <i>receptor for advanced glycation endproducts</i>
RPMI-1640-Medium	Medium für die Zellkultur Engl.: Roswell Park Memorial Institut-1640-medium
RT	Raumtemperatur
s	Sedimentationskoeffizient nach <i>Svedberg</i>
S	<i>Svedberg</i> -Einheit
S _f	<i>Svedberg</i> -Einheit der Flotation
SAA3	Serum-Amyloid-A3
sdLDL	Kleine, dichte Lipoproteine geringer Dichte Engl.: small dense low density lipoproteins
[¹⁸ F]SFB	N-Succinimidyl-4-[¹⁸ F]Fluorbenzoat
SR	Scavenger-Rezeptor
sRAGE	Löslicher Rezeptor für <i>advanced glycation endproducts</i> Engl.: soluble receptor for advanced glycation endproducts
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung Engl.: Tris buffered saline
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
VEGF-1	Vaskulärer, endothelialer Wachstumsfaktor-1 Engl.: vascular endothelial growth factor
VLDL	Lipoproteine sehr geringer Dichte
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 als Facetten des Metabolischen Syndroms

Der Begriff des Metabolischen Syndroms wurde in Deutschland erstmals umfassend 1981 publiziert und entsprechend als das „gemeinsame Vorkommen von Fettsucht, Hyper- und Dyslipoproteinämien, maturity onset Diabetes (Typ 2), Gicht und Hypertonie, verbunden mit erhöhter Inzidenz von arteriosklerotischen Gefäßerkrankungen, Fettleber und Cholelithiasis, das bei Überernährung und Bewegungsmangel auf dem Boden einer genetischen Disposition auftritt“ definiert [1, 2]. Für die vorliegende Arbeit war aus dem komplexen Krankheitsbild des Metabolischen Syndroms (**Abbildung 1-1**) insbesondere die Wechselwirkung zwischen Fettsucht (Adipositas), Diabetes mellitus (DM) Typ 2 sowie Hyper- bzw. Dyslipidämien von Interesse.

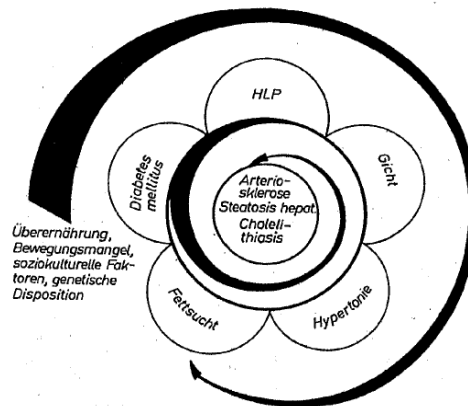


Abbildung 1-1 Übersicht über die im Metabolischen Syndrom miteinander verknüpften Erkrankungen. [1]

Bei Patienten mit gestörter Glukosetoleranz (IGT), Insulinresistenz, Hyperlipoprotein- bzw. Hypertriglyzeridämie oder dem Metabolischen Syndrom wird häufig ein „atherogener Lipoprotein-Phänotyp“ (ALP) beobachtet. Hierbei überwiegen besonders kleine, dichte Lipoproteine geringer Dichte (sdLDL, LDL₃) unabhängig von der Gesamtkonzentration der Lipoproteine geringer Dichte (LDL). Dies wird auch als „LDL-Phänotyp B“ bezeichnet [3]. Die sdLDL weisen eine geringere Affinität zum LDL-Rezeptor auf und werden aufgrund dessen langsamer aus dem Plasma eliminiert. Außerdem zeigen sie eine höhere Suszeptibilität gegenüber oxidativen Veränderungen und binden mit hoher Affinität an Proteoglykane auf der Oberfläche von

Blutgefäßendothelzellen. Dadurch können sie leichter in diese aufgenommen werden und somit die Entstehung von Atherosklerose fördern, weshalb sie als „atherogen“ bezeichnet werden [4].

Während die Wirkung oxidativ veränderter LDL (oxLDL) insbesondere im Hinblick auf die Entstehung von Atherosklerose bereits umfassend beschrieben ist, ist weniger darüber bekannt, welche Effekte durch Glukose und deren Verbindungen modifizierte LDL (glykLDL), z.B. im Fettgewebe, hervorrufen können. GlykLDL entstehen bei Patienten mit Hyperglykämie infolge einer IGT oder eines DM Typ 1 oder 2. Epidemiologische Studien ergaben eine enge Korrelationen insbesondere zwischen DM Typ 2 und Atherosklerose sowie zwischen Adipositas und DM Typ 2 [2]. Welche Rolle glykLDL bei den Wechselwirkungen zwischen diesen verschiedenen Krankheitsbildern spielen, ist bisher nicht bekannt.

1.2 Fettgewebe als Speicher- und endokrines Organ

Ursprünglich war die Speicherung von Energie in Form von Triglyzeriden die einzige bekannte Funktion des weißen Fettgewebes. Heute ist klar, dass das weiße Fettgewebe über die Sekretion von zahlreichen auto-, para- und endokrin wirkenden Hormonen und Zytokinen, die zusammen als Adipokine bezeichnet werden, auch Einfluss auf viele weitere Körperfunktionen nimmt [5]. **Abbildung 1-2** gibt einen Überblick über die vom Fettgewebe sezernierten Adipokine und Enzyme und deren Wirkung im Organismus.

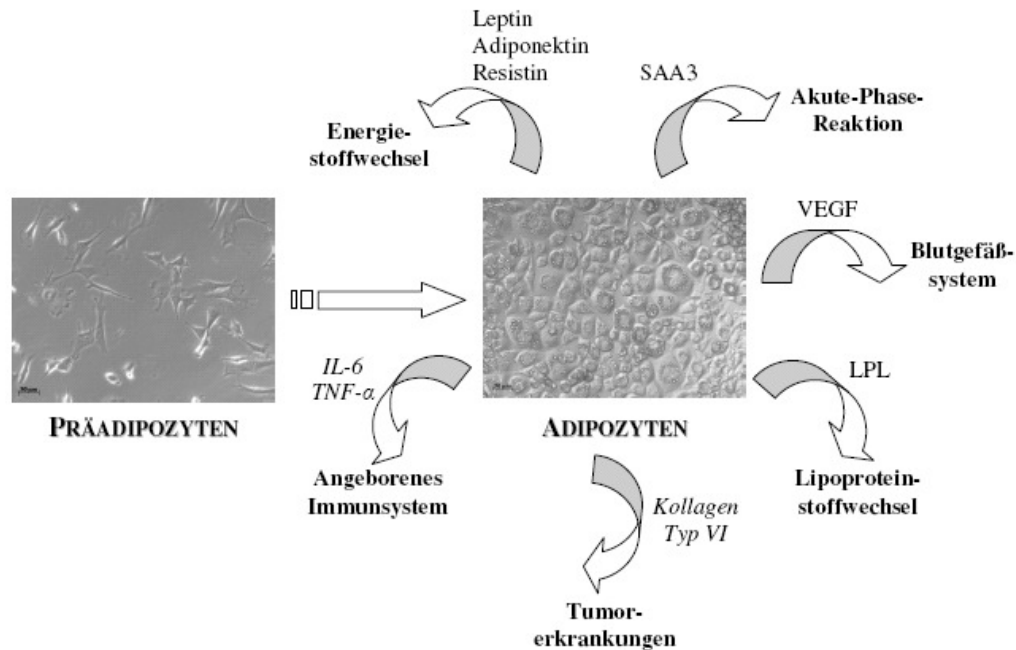


Abbildung 1-2 Überblick über Adipokine und deren Einflussnahme auf verschiedene Körperfunktionen. Modifiziert nach [6]. SAA3: Serum-Amyloid-A3, VEGF: Vaskulärer, endothelialer Wachstumsfaktor, LPL: Lipoproteinlipase, IL-6: Interleukin-6, TNF- α : Tumor-Nekrose-Faktor- α .

Zu den bekanntesten Adipokinen zählen Leptin, Adiponektin und Resistin. Die Sekretion von Leptin und Resistin korreliert positiv, die von Adiponektin negativ mit der Fettmasse bzw. dem Körpermasse-Index (BMI) [7-9]. Leptin trägt zur Regulation der Nahrungsaufnahme und des Energiehaushalts des Körpers bei [6, 10]. Das ausschließlich von Adipozyten sezernierte Adiponektin gilt als bedeutender Regulator der Insulinsensitivität und wirkt antiinflammatorisch, indem es die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-6 (IL-6) und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) hemmt [9, 11]. Resistin führt zu Insulinresistenz und hemmt die Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten [12, 13].

Das Akute-Phase-Protein Serum-Amyloid-A3 (SAA) wird bei Patienten mit Adipositas und DM Typ 2 aufgrund der erhöhten Serumkonzentrationen von IL-6 und TNF- α , und aufgrund der Hyperglykämie verstärkt ausgeschüttet und führt zu Atherosklerose [14].

Für eine Hypertrophie und Hyperplasie von Fettgewebe ist eine ausreichende Versorgung mit Blutgefäßen essentiell. Hierbei spielt wahrscheinlich auch der vaskuläre, endotheliale Wachstumsfaktor-1 (VEGF-1) eine Rolle. Dieser wird u. a. im Fettgewebe produziert [15].

Bei Patienten mit Übergewicht ist die Aktivität der Lipoproteinlipase (LPL) im Fettgewebe erhöht [16]. Dieses Enzym spaltet Triglyzeride aus den im Blut zirkulierenden Lipoproteinen ab und stellt diese somit den umliegenden Geweben zur Energiegewinnung oder Speicherung zur Verfügung.

Studien identifizierten Adipositas als einen wichtigen Risikofaktor für die Entstehung von Tumorerkrankungen. Eine mögliche Verbindung zwischen diesen beiden Krankheitsbildern könnte das Kollagen Typ VI sein. Dieses lösliche Protein der extrazellulären Matrix (ECM) wird von Adipozyten reichlich exprimiert [6 und Referenzen darin].

IL-6 und TNF- α sind zwei wichtige, vom Fettgewebe sezernierte, proinflammatorische Zytokine. Im Gegensatz zu den meisten anderen Zytokinen, die vorrangig auto- und parakrin wirken, wirkt IL-6 v. a. endokrin [17]. IL-6 nimmt über seine Wirkung im Zentralnervensystem (ZNS) Einfluss auf die Energiebilanz des Organismus, indem es die Nahrungsaufnahme bremst und dafür den Energieverbrauch erhöht. Da bei Patienten mit Adipositas die IL-6-Konzentration im Serum erhöht ist, dieses jedoch offensichtlich nicht wirkt, liegt es nahe, dass es bei IL-6, ähnlich wie bei Leptin, zu einer Resistenz der Zielzellen kommt [10]. Infolge dessen führt IL-6 über seine Wirkung auf die Leber und das Endothelgewebe zu einer Adipositas-assoziierten, systemischen Entzündung [10]. Während IL-6 zu großen Teilen von den Adipozyten des Fettgewebes sezerniert wird, stammt der vom Fettgewebe abgegebene TNF- α v. a. aus den dort ansässigen Makrophagen [17]. Auch die Ausschüttung von TNF- α ist bei Patienten mit Adipositas erhöht, wobei dies wahrscheinlich weniger auf die subkutanen, sondern mehr auf die

viszerale Fettdepots zurückzuführen ist [18]. Die Konzentrationen von TNF- α im Serum korreliert mit dem Grad der Insulinresistenz [19]. Neben seiner systemischen Wirkung führt TNF- α unter der Adipositas-assoziierten Entzündung parakrin zu einer Insulinresistenz der Adipozyten. Dies geschieht u. a. durch die in **Abbildung 1-3** dargestellte Reaktion mit dem Insulinrezeptor (IR) und dem Insulinrezeptorsubstrat-1 (IRS-1). Der gleiche Mechanismus liegt wahrscheinlich auch der TNF- α -induzierten Insulinresistenz in der Muskulatur zugrunde, wobei TNF- α hier aus den zwischen den Myozyten liegenden Fettdepots zu stammen scheint [10 und Referenzen darin]. Weitere mögliche Mechanismen der Auslösung einer Insulinresistenz durch TNF- α sind die Erhöhung der freien Fettsäuren im Plasma durch Stimulation der Lipolyse und der hepatischen Lipogenese [20] sowie die TNF- α -induzierte Verminderung der Sekretion von Adiponektin durch Adipozyten, welches für die Insulinsensitivität wichtig ist [21].

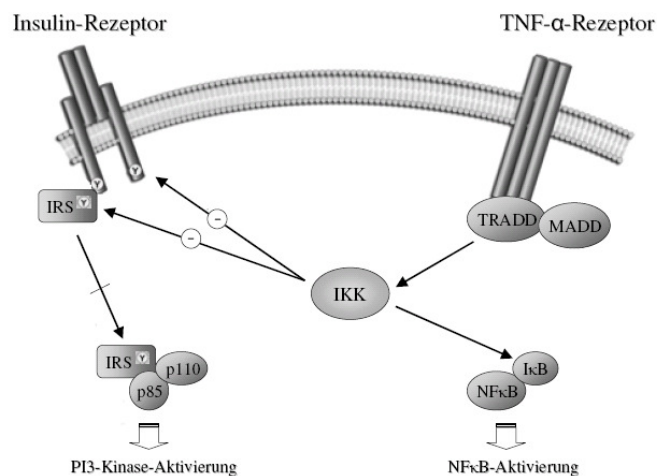


Abbildung 1-3 Einfluss von TNF- α auf den Insulinrezeptor (IR) und das Insulinrezeptorsubstrat-1 (IRS). Modifiziert nach [10]. Der Insulinrezeptor (IR) und das Insulinrezeptorsubstrat-1 (IRS) werden durch die inhibitorische κ B Kinase (IKK) an Serinresten phosphoryliert. Dies verhindert die Phosphorylierung von Tyrosinresten (Y) und führt damit zur Inaktivierung des IR [19, 22]. Gleichzeitig kommt es zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Dieser führt nach seiner Translokation in den Zellkern zur Aktivierung diverser proinflammatorischer Gene.

Sowohl IL-6 als auch TNF- α hemmen die Differenzierung von 3T3-L1-Zellen und die damit verbundene Fetteinlagerung und führen zu einer verstärkten Expression von inflammatorischen Genen [23].

Ein weiteres kürzlich entdecktes Adipokin ist Chemerin. Es wird genau wie sein Rezeptor *chemokine-like*-Rezeptor-1 (CMKLR-1) von weißen Fettzellen der Maus und des Menschen stark exprimiert [24, 25]. Im Verlauf der Adipogenese steigt die Expression von Chemerin und seinem Rezeptor CMKLR-1 an [24]. Wie viele andere Adipokine auch wirkt Chemerin auto- und parakrin und beeinflusst dadurch die Adipogenese in frühen Stadien. Autokrin führt es nach der Bindung an seinen Rezeptor zur Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade über die *extracellular signal-related*-Kinasen-1 und -2 (ERK1/2) und die *mitogen-activated protein*-Kinasen (MAPK). Dadurch kommt es zu einer veränderten Expression von Genen, die Proteine des Lipid- und Glukosestoffwechsels codieren. Dies sind z.B. die Gene für den insulinabhängigen Glukosetransporter-4 (GLUT-4) sowie für Adiponektin und Leptin [24]. Parakrin vermittelt Chemerin die Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten und die Rekrutierung von CMKLR1-exprimierenden Zellen, wie z.B. Makrophagen [25]. Somit kann Chemerin zur Adipositas-assoziierten, lokalen Entzündung im Fettgewebe beitragen. Möglicherweise führt Chemerin darüber hinaus zu Veränderungen im systemischen Stoffwechsel [24].

Das von Adipozyten ausgeschüttete Monozyten-chemotaktische Protein-1 (MCP-1) bewirkt eine verstärkte Einwanderung von Monozyten in das Fettgewebe, die sich dort zu Makrophagen entwickeln. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die vermehrte Ansammlung von Makrophagen im Fettgewebe adipöser Menschen [17]. Des Weiteren bewirkt MCP-1 über die Aktivierung der ERK1/2 eine Verminderung der insulinabhängigen Glukoseaufnahme in Muskelzellen. Als autokrine Wirkung auf das von ihnen sezernierte MCP-1 vermindern die murinen Embryonalzellen 3T3-L1 ihre Glukoseaufnahme [26]. MCP-1 scheint also neben seiner proinflammatorischen Wirkung eine Rolle bei der Ausbildung einer Insulinresistenz durch Übergewicht zu spielen.

Über die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen hinaus, scheinen sich Präadipozyten nach entsprechendem Zell-Zell-Kontakt mit Makrophagen selbst zu makrophagenartigen Zellen differenzieren zu können [27]. Infolge dessen zeigen sie sowohl morphologische Eigenschaften (Expression verschiedener *cluster of differentiation* (CD), wie z.B. CD14, CD45, CD68, CD80 und CD86) als auch funktionelle Eigenschaften (Phagozytoseaktivität) von Makrophagen [27-29]. Diese

verlieren sich jedoch während der Adipogenese wieder [28]. Aufgrund dieser Oberflächenproteine, die z.B. für T-Lymphozyten als Erkennungssignal dienen können (z.B. CD80 und CD86), kommt es zur Aktivierung von Immunzellen. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Zellkultur-Medium, welches für 24 h mit murinen bzw. humanen Makrophagen in Kontakt war, die Differenzierung von 3T3-L1-Prädipozyten zu Adipozyten stark hemmt [30]. Makrophagen scheinen folglich Signalstoffe auszuschütten, welche die Adipogenese hemmen. Sie beeinträchtigen somit die für den Organismus wichtige Funktion des Fettgewebes, überschüssige Fettsäuren sowie Triglyzeride aus dem Blutkreislauf zu eliminieren.

Sowohl Adipozyten als auch Fettgewebs-assoziierte Makrophagen tragen durch die Sekretion von zahlreichen Hormonen und Zytokinen für die mit dem Metabolischen Syndrom assoziierte, chronische Entzündung und die systemische Insulinresistenz bei. Auch zwischen Adipozyten und Fettgewebs-assoziierten Makrophagen kommt es zu ausgeprägten Wechselwirkungen. So beeinflussen Adipokine die lokale Immunantwort und von Makrophagen ausgeschüttete Zytokine modifizieren die Differenzierung der Adipozyten.

1.3 Adipogenese und das 3T3-L1-Modell

Die Ausbildung des weißen Fettgewebes beginnt bereits vor der Geburt und steigt postnatal stark an. Hierbei kommt es zu einer Erhöhung von Größe und Anzahl der Fettzellen. Die Entwicklung neuer Adipozyten ist auch im Erwachsenenalter aus multipotenten, mesodermalen Stammzellen und Prädipozyten, die sich im Bindegewebe von Blutgefäßen des Fettgewebes befinden, möglich [31, 32]. Bei Patienten mit Übergewicht z.B. erfolgt die Erhöhung der Fettmasse durch eine Erhöhung der Anzahl (Hyperplasie) und der Größe (Hypertrophie) der Fettzellen [31, 33].

Als *in vitro*-Modell für die humane Adipogenese (Differenzierung von Prädipozyten zu Adipozyten) dient die Umwandlung von fibroblastenartigen 3T3-L1-Prädipozyten zu ausgereiften, runden Zellen, die sowohl morphologisch als auch physiologisch mit humanen Fettzellen vergleichbar sind. Die Zelllinie 3T3-L1 wurde als Klon aus der murinen Fibroblastenzelllinie 3T3 gewonnen, die wiederum ihren Ursprung in embryonalen Swiss-Maus-Zellen hat [34]. Als Voraussetzung für die Adipogenese

müssen die 3T3-L1-Prädipozyten einen Wachstumsstopp einlegen (Zellzyklusphase G_0/G_1), erneut in den Zellzyklus eintreten und sich weiteren ein bis zwei Zellteilungen unterziehen, wodurch es zur klonalen Expansion kommt. Danach verlassen sie den Zellzyklus endgültig (Zellzyklusphase G_D) und die eigentliche Differenzierung der Zellen beginnt [31, 35]. Während der Adipogenese werden verschiedene Gene, u. a. für Enzyme des Triglyzeridstoffwechsels, exprimiert und die *de novo*-Synthese von Triglyzeriden beginnt. Als Folge dessen können in den ausgereiften Adipozyten „Lipidtropfen“ beobachtet werden [36]. Wie aus **Abbildung 1-4** zu erkennen ist, wird das Fett in 3T3-L1-Adipozyten, im Gegensatz zu ausgereiften, weißen Fettzellen, jedoch in vielen, kleineren Lipidvakuolen, umgeben von relativ viel Zytoplasma, gespeichert und der Zellkern bleibt in seiner zentralen Lage [34].

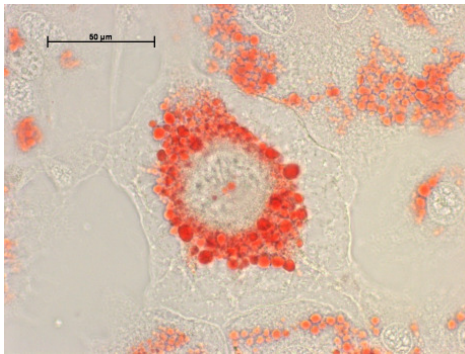


Abbildung 1-4 Repräsentative Aufnahme eines ausdifferenzierten 3T3-L1-Adipozyten. Die Lipidvakuolen wurden mit Oil-Red O angefärbt (Vergrößerung 1 x 40).

Die *CCAAT/enhancer binding proteins* α , β und δ (*C/EBP* $\alpha/\beta/\delta$) sowie der *peroxisome proliferator-activated receptor* γ (*PPAR* γ) sind wichtige Transkriptionsfaktoren, die die Adipogenese regulieren. Wie in **Abbildung 1-5** zu sehen ist, steigt ihre Expression während der Adipogenese stark an [36]. Gemeinsam aktivieren sie die Transkription von Genen, die zum Adipozyten-Phänotyp führen.

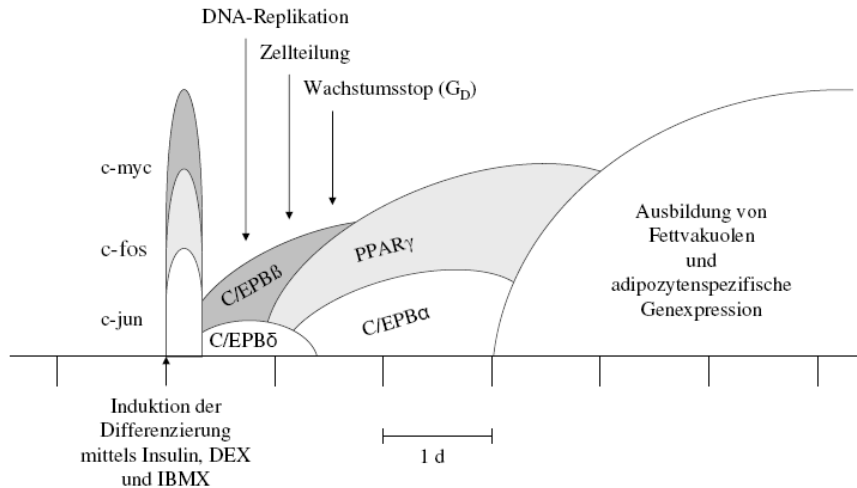


Abbildung 1-5 Schematischer Überblick über den Verlauf der Differenzierung von 3T3-L1-Zellen.
 Modifiziert nach [32].

C/EBP β und δ sind frühe Regulatoren der Adipogenese [31]. Sie bewirken über die Expression von p21, einem Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen, eine verstärkte Phosphorylierung des Tumorsuppressors Retinoblastom-Protein (Rb). Dies veranlasst den Wachstumsstopp der Präadipozyten. C/EBP β und δ führen des Weiteren zu einer verstärkten Expression von C/EBP α und PPAR γ [37]. C/EBP α reguliert u. a. die Expression der Gene für Leptin [31] und GLUT-4 [38]. Die Anzahl der GLUT-4 [39] und der Insulinrezeptoren auf der Zelloberfläche steigt während der Adipogenese an, was zu einer erhöhten Insulinsensitivität führt [36] und somit die metabolische Wirkung von Insulin beeinflusst [31]. PPAR γ gehört zu einer Familie von nukleären Hormonrezeptoren, die nach Bindung von entsprechenden Liganden die Expression von Genen für die Bindung, Aufnahme und Speicherung von Fettsäuren kontrollieren [31]. Von den verschiedenen PPAR γ -Isoformen spielt PPAR γ 2 eine entscheidende Rolle bei der Adipogenese [31]. Nach ihrer Aktivierung regulieren sich C/EBP α und PPAR γ unabhängig von der verminderten Expression von C/EBP β und δ in ihrer Expression gegenseitig [40].

Die Gene für Aktin, Tubulin und den Adipogeneseinhibitor Präadipozytenfaktor-1 (Pref-1) werden während der Adipogenese herunterreguliert [41]. Dies führt zu morphologischen (z.B. Übergang von fibroblastenartiger zu rundlicher Zellform durch verminderte Aktin- und Tubulin-Biosynthese) und metabolischen Veränderungen der Zelle (z.B. verstärkte LPL-Aktivität) [42].

1.4 Entstehung nativer und modifizierter LDL

1.4.1 Einteilung der Lipoproteine

Lipoproteine sind Lipid-Protein-Komplexe, die u. a. dem Transport der hydrophoben Lipide im Plasma dienen. Sie bestehen aus einem Kern aus Cholesterylestern und Triglyzeriden sowie einer Hülle aus amphiphilen Phospholipiden, geringen Mengen unverestertem Cholesterol und den Apolipoproteinen (Apo). Man unterteilt die Lipoproteine u. a. aufgrund ihrer Dichte in Chylomikronen, Lipoproteine sehr geringer Dichte (VLDL), Lipoproteine mittlerer Dichte (IDL), Lipoproteine geringer Dichte (LDL) und in Lipoproteine hoher Dichte (HDL) [43]. Größe und Dichte der Lipoproteine verhalten sich, wie aus **Tabelle 1-1** hervorgeht, umgekehrt proportional zueinander.

Tabelle 1-1 Überblick über die Eigenschaften der Lipoprotein. Für Funktion und Struktur wichtige Apolipoproteine sind fett hervorgehoben. Modifiziert nach [4].

	Chylo- mikronen	VLDL	IDL	LDL	HDL
Dichte [g/ml]	<1,006	<1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,063-1,210
Durchmesser [nm]	1000-100	70-30	40-25	25-15	10-7,5
Zusammensetzung [%]					
Proteine	2	10	17	23	55
Triglyzeride	90	54	20	4	4
Cholesterol	3	20	43	52	17
Phospholipide	5	16	20	21	24
Apolipoproteine (Apo)	A-IV B-48 C-I-III E	B-100 C-I-III E	B-100 C-I-III E	B-100 C-I-III E	A-I/II/IV C-I-III E
Plasmakonzentration [mg/ml]	<0,1	0,5-2,0	-	2,0-3,5	1,6-3,7

1.4.2 Endogener Lipidstoffwechsel

Für den Transport in der Leber gebildeter Triglyzeride, beispielsweise ins Fettgewebe, sind VLDL verantwortlich. Durch die LPL werden aus zirkulierenden Lipoproteinen freie Fettsäuren abgespalten, wodurch VLDL zu IDL werden. IDL werden, genau wie die Chylomikronen-Remnants, über den ApoB/E-Rezeptor in die Leber aufgenommen. In der Leber kommt es zur Abspaltung der restlichen Triglyzeride, wodurch LDL

entstehen. LDL bestehen zu etwa 50 % aus Cholesterol und dessen Estern, welche sie von der Leber zu den peripheren Geweben transportieren. Jeder LDL-Partikel trägt genau wie ein VLDL-Partikel nur ein etwa 550 kDa großes Apoprotein B-100 (ApoB-100) [44], welches als Erkennungssignal für den ApoB/E-Rezeptor (im Folgenden als LDL-Rezeptor (LDL-R) bezeichnet) dient (**Abbildung 1-6**).

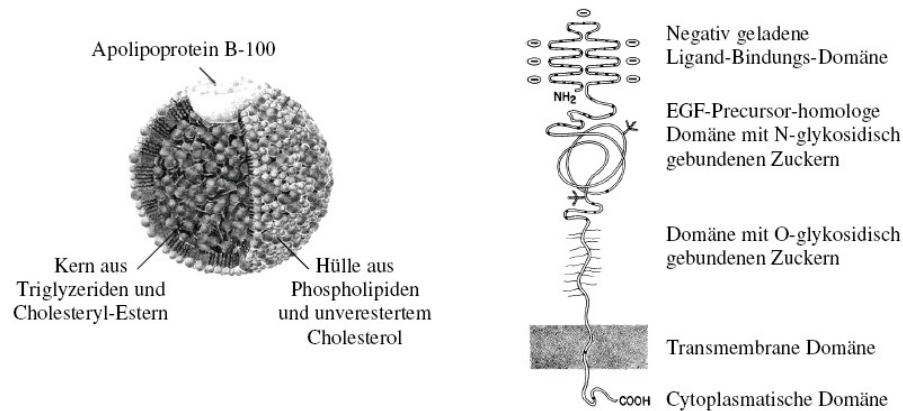


Abbildung 1-6 Schematischer Aufbau eines LDL-Partikels (links) und des LDL-Rezeptors (rechts).
Modifiziert nach [<http://160.114.99.91/astrojan/prot/Ldl.jpg>] und [45].

Der LDL-R besteht aus fünf Domänen [45], wird in unterschiedlicher Stärke von fast allen Geweben exprimiert und vermittelt die Aufnahme der LDL in die peripheren Gewebe [4]. In der Leber, der Nebennierenrinde und den Gonaden sind, bezogen auf das Organgewicht, die meisten LDL-R zu finden [4]. LDL binden über lysinreiche Proteinbereiche des ApoB-100 an den LDL-R. Der LDL-LDL-R-Komplex wird nach Anreicherung in *coatet pits* mit diesen internalisiert. Durch Absenkung des pH-Wertes im Endozytosevesikel kommt es zur Dissoziation der LDL vom LDL-R. Letzterer wird zur Zellmembran zurücktransportiert, wo er für eine erneute LDL-Bindung zur Verfügung steht. Das ApoB-100 und die Cholesterylester der im Vesikel verbliebenen LDL werden nach Fusion mit Lysosomen hydrolysiert. Das freie Cholesterol verlässt die Liposomen und wird in der Zelle als Membranbestandteil oder zur Synthese von Steroidhormonen weiter verwertet [44]. Gleichzeitig kommt es durch das aufgenommene Cholesterol zur Hemmung der LDL-R-Genexpression, wodurch eine weitere Aufnahme von Cholesterol unterbunden wird. Außerdem werden die intrazellulären Enzyme 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) und die Acyl-CoA:Cholesterol-Acyltransferase (ACAT) gehemmt bzw. aktiviert, wodurch die endogene Bildung von Cholesterol vermindert und das aufgenommene Cholesterol schneller verestert wird [46].

1.4.3 LDL-Modifikation

Die Auswirkungen von oxidativen Veränderung der LDL insbesondere im Hinblick auf die Atherosklerose sind hinreichend beschrieben [47-49]. LDL können jedoch auch glykatiert werden. Dies spielt bei Patienten mit Hyperglykämie infolge einer IGT oder eines DM eine Rolle. So konnte bei Patienten mit DM im Vergleich zu gesunden Probanden eine erhöhte Menge glykatiertes LDL bzw. *advanced glycation endproduct*-LDL (AGE-LDL) nachgewiesen werden [50-52]. Hierbei sind neben dem Phospholipidanteil auch die Lysinreste des ApoB-100 betroffen [52, 53]. Durch die Modifikation von basischen Lysin- oder Arginin-Resten des ApoB-100 wird die Affinität zum LDL-R vermindert [45] und infolge der stärker negativen Gesamtladung des ApoB-100 ist eine gesteigerte Interaktion mit Scavenger-Rezeptoren möglich [54]. *Advanced glycation endproducts* (AGE) entstehen im Allgemeinen, wenn Proteine, wie z.B. Albumin oder das ApoB-100 der LDL, für lange Zeit mit reduzierenden Zuckern, wie z.B. Glukose oder deren Reaktionsprodukten, in Kontakt kommen [55]. In der sogenannten Maillard-Reaktion entstehen dabei aus Proteinen und Glukose vorerst Schiff'sche Basen und Amadori-Produkte, die sich nach langer Zeit durch inter- und intramolekulare Umlagerungen, Dehydratations- sowie Oxidations- bzw. Reduktionsreaktionen in AGE umwandeln [52, 55]. Da glykLDL verstärkt oxidiert werden können [56] und oxLDL als Risikofaktor für Atherosklerose bekannt sind, wäre dies eine mögliche Erklärung für das häufige Auftreten von Atherosklerose bei Diabetes-Patienten [57 und Referenzen darin]. Des Weiteren konnte in Untersuchungen mit murinen und humanen Makrophagen gezeigt werden, dass diese durch stark glykatiertes bovines bzw. humanes Serumalbumin (BSA/ HSA) aktiviert werden. Aktivierte Makrophagen beeinflussen die Angiogenese, Entzündung und Koagulation und fördern somit das Auftreten von Komplikationen durch Mikro- und Makroangiopathien bei Patienten mit DM [58].

1.5 Katabolismus modifizierter LDL

OxLDL oder glykLDL zeigen eine verminderte Affinität zum LDL-R [59]. Während oxLDL *in vivo* schnell aus dem Blut eliminiert werden, was wahrscheinlich auf die Interaktion mit Scavenger-Rezeptoren (SR), z.B. auf Kupfferschen Sternzellen, sinusoidalen Leberendothelzellen oder Endothelzellen der Nieren zurückzuführen ist, zeigen glykLDL *in vivo* eine längere Verweilzeit im Plasma [60-62].

Abbildung 1-7 gibt einen Überblick über die bekannten AGE-Rezeptoren und deren Zugehörigkeit zu den verschiedenen Klassen von SR. Bisher wurden sieben verschiedene Rezeptoren für AGE entdeckt. Diese sind der 80K-H (AGE-R2)/ OST-48 (AGE-R1)/ Galectin-3 (AGE-R3)-Komplex, der Rezeptor für AGE (RAGE), die SR der Klasse A Typ eins und zwei (SR-A1/2) sowie CD36 und der SR-B1 als Vertreter der SR Klasse B [55]. Auch der *lectin-like oxLDL receptor-1* (LOX-1), ein SR der Klasse E, scheint neben oxLDL auch AGE binden zu können [61]. Bei den Rezeptoren kommt es oft zu Substrat-Überschneidungen zwischen modifizierten LDL und AGE.

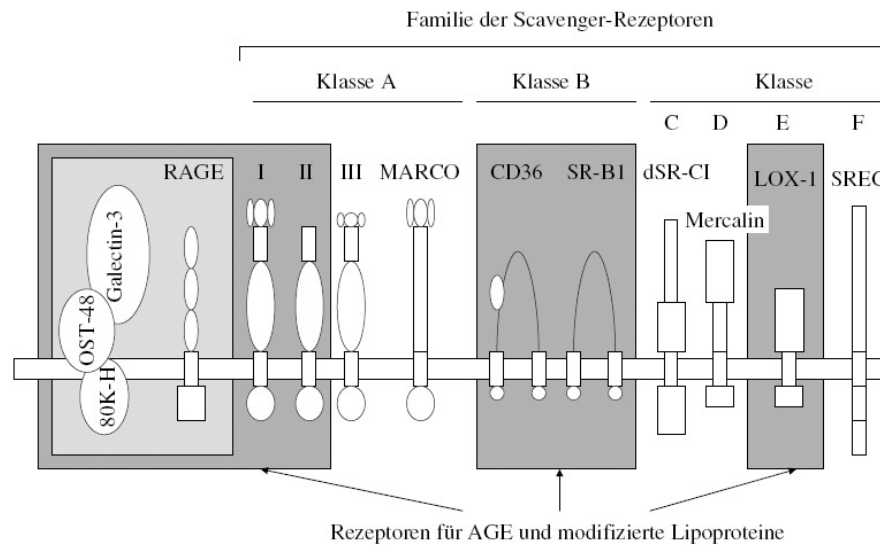


Abbildung 1-7 Übersicht über die verschiedenen Rezeptoren für AGE und modifizierte LDL. Modifiziert nach [61]. Grau hervorgehoben sind die AGE-Rezeptoren, von denen alle bis auf den 80K-H/ OST-48/ Galectin-3-Komple sowie RAGE gleichzeitig auch Rezeptoren für modifizierte LDL (azetylierte und oxidierte LDL) darstellen.

1.5.1 RAGE

Der RAGE wird v. a. auf Endothelzelle exprimiert [55]. Im Gegensatz zu den SR verfügt RAGE über eine enge Ligandspezifität [61]. Nach Bindung der AGE an RAGE kommt es nicht zur Endozytose der Liganden, sondern es wird ein intrazellulärer Signaltransduktionsweg ausgelöst, der in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B resultiert [63]. Untersuchungen mit sRAGE, einer löslichen Form des RAGE, dem die transmembrane Domäne und somit die Möglichkeit zur Signaltransduktion fehlt, haben die Bedeutung von RAGE für atherosklerotische Veränderungen bei Patienten mit DM herausgestellt [57]. Des Weiteren spielt RAGE eine Rolle bei inflammatorischen Prozessen, der Entstehung von Tumorerkrankungen und der Alzheimer-Krankheit [57].

1.5.2 Scavenger-Rezeptoren (SR)

Die Familie der SR besteht aus den Klassen A, B, C, D, E und F. SR der Klasse A (SR-A), B (SR-B) und E (SR-E) erkennen sowohl AGE als auch modifizierte LDL [61]. Im Gegensatz zum LDL-R kommt es bei den SR nicht zu einer negativen Rückkopplung durch das aufgenommene Cholesterol, was die unkontrollierte Internalisierung von Cholesterol, z.B. in Makrophagen, ermöglicht. Dadurch entwickeln sich diese zu Schaumzellen und tragen somit zur Atherogenese bei [4].

Makrophagen können mit Hilfe der SR-A neben oxLDL auch mit Glykolaldehyd behandeltes LDL aufnehmen [64]. Glykolaldehyd ist ein wichtiges Intermediat bei der AGE-Bildung [65]. Für die Aufnahme von AGE spielen v. a. die SR-A Typ eins und zwei (SR-A1/2) eine Rolle [61]. Sie entstehen durch alternatives Spleißen aus einem Gen. Die SR-A verfügen über nur eine transmembrane Domäne [66]. Darüber hinaus gibt es eine dritte Spleißvariante (SR-A3), die jedoch nicht zur Ligand-Internalisierung fähig ist und damit als negativer Regulator der Aufnahme über die SR Klasse A fungieren könnte [67].

CD36 ist ein 88 kDa großes, transmembranes Glykoprotein, das zu den SR der Klasse B gehört und erstmals in Monozyten nachgewiesen wurde [68]. Als Multi-Ligand-Rezeptor bindet CD36 neben oxLDL (Bindungsdomänen zwischen Aminosäuren 155 - 183 [69], 28 - 93 und 120 - 155 [70]) und AGE (Bindungsdomäne zwischen Aminosäuren 155 - 183 [69]) viele weitere Liganden. Auch 3T3-L1-Zellen exprimieren CD36 und sind damit zur Aufnahme von oxLDL und AGE-BSA fähig [71]. Möglicherweise sind glykLDL also auch zur Interaktion mit CD36 in der Lage. Die Aufnahme von AGE-Proteinen über CD36-vermittelte Endozytose führt nach intrazellulärem Abbau zur vermehrten Sekretion von Zytokinen. Dies könnte in Verbindung mit dem Auftreten von Mikro- und Makroangiopathien bei DM-Patienten stehen. Studien, in denen sowohl die SR-A- als auch CD36-Expression auf Schaumzellen in arteriosklerotischen Plaques nachgewiesen wurde, bestätigen diesen Zusammenhang [72].

Der SR-B1, der genau wie CD36 über zwei transmembrane Domänen verfügt, war der erste bekannte Rezeptor für HDL [66]. Nach der Bindung von HDL an den SR-B1 kommt es zur selektiven Aufnahme der Cholesterylester in die Zelle, während das

Apolipoprotein extrazellulär verbleibt [66]. Der SR-B1 wirkt somit durch den reversen Cholesteroltransport aus peripheren Zellen, wie z.B. in der Gefäßwand befindlichen Makrophagen, antiatherogen [73]. In Hepatozyten erfolgt schließlich die selektive Aufnahme des HDL-Cholesterols und dessen Ausscheidung in Form von Gallensäuren [74]. Der SR-B1 ist auch in der Lage AGE-BSA aufzunehmen und lysosomal abzubauen [75]. Obwohl AGE-BSA keinen Effekt auf die Bindung von HDL an den SR-B1 hat, kann es die SR-B1-vermittelte selektive Aufnahme der Cholesterylester aus dem HDL vollständig inhibieren [75]. Auch die Abgabe von Cholesterylestern aus den Zellen an HDL wird durch AGE-BSA inhibiert [75]. AGE-Proteine sind also möglicherweise in der Lage den SR-B1-vermittelten Cholesterolstoffwechsel *in vivo* zu beeinflussen [75]. Als einziger der SR zeigt der SR-B1 eine hohe Affinität zu nativen LDL (nLDL) und ist in der Lage diese zu internalisieren [76].

LOX-1 ist ein Rezeptor für oxLDL [77, 78] und AGE-Proteine [61, 79], wobei oxLDL stärker gebunden und intrazellulär abgebaut werden als AGE-BSA [80]. LOX-1 wird v. a. von Gefäßendothelzellen exprimiert [77].

1.5.3 Veränderung der Rezeptor-Expression während der Adipogenese

Während der Adipogenese von 3T3-L1-Zellen erhöht sich die Expression von CD36 [81, 82] und die CD36-vermittelte Endozytose von AGE-BSA [71] und oxLDL [82]. 3T3-L1-Adipozyten sind also im Vergleich zu den 3T3-L1-Prädipozyten zu einer höheren Bindung, Aufnahme und Degradation dieser Liganden fähig. Das gleiche konnte an humanen, subkutanen Prädipozyten und Adipozyten gezeigt werden. Auf diese Weise ist es möglich, dass AGE und oxLDL aus dem Plasma entfernt werden und somit das Risiko für AGE-induzierte Komplikationen bei Patienten mit DM sinkt [71]. Durch den Transport des Transkriptionsfaktors Nrf2 in den Zellkern verstärkt über CD36 aufgenommenes oxLDL die Expression von CD36 während der Adipogenese zusätzlich [83]. Die mRNA-Expression des SR-B1 verzehnfacht sich während der Adipogenese [84].

1.6 Zielstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu zeigen, ob geringfügig glykatierte LDL, wie sie z.B. im Blut von Patienten mit IGT oder DM vorkommen, einen Einfluss auf die humane Adipogenese haben. Dabei stellten sich die folgenden Fragen.

1. Haben glykLDL einen Einfluss auf die Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten und unterscheidet sich dieser von der Wirkung von nLDL?
2. Führen glykLDL zu einer verminderten oder verstärkten Adipogenese?
3. Resultiert die Beeinflussung der Adipogenese vorrangig auf einer Interaktion mit RAGE und führt dies zu einer erhöhten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine?
4. Oder wirken LDL nach ihrer Aufnahme in die Zellen und welche Rezeptoren könnten für die Internalisierung eine Rolle spielen?

Die Antworten auf diese Fragen sollten Aufschlüsse darüber geben, ob durch eine diabetische Stoffwechsellage veränderte LDL in der Lage sind, Adipositas und die daraus folgende systemische Entzündung und Insulinresistenz zu verstärken und somit zu einem *circulus vitiosus* zu führen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Gerät/ Verbrauchsmaterial	Firma
Aktivimeter Isomed 2000	Nuklear-Medizintechnik Dresden GmbH (Dresden, Deutschland)
Analysenwaage	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Brutschrank HeraCell	Heraeus/ Kendro Laboratory Products GmbH (Hanau, Deutschland)
Dichtemessgerät Density Meter DMA 4500	Anton Paar GmbH (Graz, Österreich)
Gamma Counter Cobra II	Canberra-Packard GmbH (Dreieich, Deutschland)
Gamma Counter Wizard™3''	PerkinElmer (Waltham, Massachusetts, USA)
Gellektrophoresekammer mit Stromversorgung	BioRad (München, Deutschland)
Gelelektrophoresekammer Multiphor II	Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK)
Gelfiltrationssäule	BioRad (Ismaning, Deutschland)
Gelauswertekammer GeneFlash	Syngene Bio Imaging (Cambridge, UK)
Inkubator Titramax 1000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, Deutschland)
96well-Platten „MaxiSorp™“	Nunc (Langenselbold, Deutschland)
Mikroskop AxioVert 40 CFL	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
Mikroskop AxioImager.A1	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
Nitrozellulosemembran	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Sterilbank Steril Gard II A/B3	Baker Company (Sandford, Maine, USA)
Photometer Bio	Eppendorf (Hamburg-Eppendorf, Deutschland)
Photometer Synergy HT	BioTek Instruments (Bad Friedrichshall, Deutschland)
Thermomixer Comfort	Eppendorf (Hamburg-Eppendorf, Deutschland)

Thermozykler MJ Research PTC-200	Global Medical Instrumentation (Ramsey, Minnesota, USA)
Thermozykler Realplex ²	Eppendorf (Hamburg-Eppendorf, Deutschland)
Tischzentrifuge Centrifuge 5415 R	Eppendorf (Hamburg-Eppendorf, Deutschland)
Ultraschallstab UW 2200	Bandelin Electronic (Berlin, Deutschland)
Ultrazentrifuge Optima TM Max 130.000 RPM	Beckman Coulter GmbH (Fullerton, Kalifornien, USA)
Vortexer IKA® Vortex Genius 3	IKA-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Deutschland)
Zellzählgerät CASY®	Schärfe System (Reutlingen, Deutschland)
Zentrifuge Biofuge stratos	Heraeus/ Kendro Laboratory Products GmbH (Hanau, Deutschland)

2.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Firma
Agarose	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
BSA	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Dexamethason (DEX)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Dinatriumphosphat (Na ₂ HPO ₄ × 12 H ₂ O)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethidiumbromid	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Ethylendiaminetetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Fucoidan	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Glukose	Fluka/ Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Insulin (human)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Kaliumchlorid (KCl)	Fluka/ Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Lysozym	Fluka/ Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

Magermilchpulver	Saliter (Obergünzburg, Deutschland)
Maleinanhydrid	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Mercaptoethanol	Pharmazia Biotech (Uppsala, Schweden)
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Nonidet-P40 Substitut (NP-40)	Fluka/ Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Oil Red-O	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Orange Loading Dye	Fermentas Life Sciences (St. Leon Rot, Deutschland)
Polyinosinsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Proteinstandard Precision Plus	BioRad (München, Deutschland)
Proteinstandard High-Range Rainbow Molecular Weight Markers (RPN756)	Amersham Bioscience (Freiberg, Deutschland)
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Tris Ultra Qualität	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Tween 20	Serva Biochemicals (Heidelberg, Deutschland)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Vectashield	Vector Laboratories (Burlingame, Kalifornien, USA)

2.1.3 Puffer und Lösungen

Puffer/ Lösung	Chemikalien	Menge
Blocking-Puffer	Magermilchpulver	2,5 g
	PBS	50 ml
Coomassie-Färbelösung	Coomassie Blue R 250 (G250)	0,5 g
	MeOH	250 ml
	H ₂ O	250 ml
	Eisessig	50 ml
DiI-Stammlösung	DiI	3 mg
	DMSO	1 ml

Dichtemedium 1 (1,006 kg/l)	NaCl	22,4 g
	EDTA-Na ₂	0,2 g
	H ₂ O	2000 ml
	NaOH (1 M)	2 ml
Dichtemedium 2 (1,182 kg/l)	Natriumbromid (getrocknet)	124 g
	Dichtemedium 1	500 ml
Dichtemedium 3 (1,120 kg/l)	Dichtemedium 1	62 ml
	Dichtemedium 2	114 ml
Dichtemedium 4 (1,340 kg/l)	Natriumbromid (getrocknet)	54 g
	Dichtemedium 1	100 ml
Entfärbelösung für SDS-Gele	MeOH (70 %)	100 ml
Entfärbelösung 1	Eisessig (20 %)	100 ml
	MeOH	500 ml (50 %)
	Eisessig	100 ml (10 %)
Entfärbelösung 2	H ₂ O	400 ml
	MeOH	100 ml (10 %)
	Eisessig	50 ml (5 %)
Glykatisierungspuffer (pH 7,2)	H ₂ O	850 ml
	Na ₂ HPO ₄ ×12H ₂ O	5,8018 g (8,1 mM)
	KH ₂ PO ₄	0,2014 g (0,74 mM)
	NaCl	17,532 g (150 mM)
	KCl	0,4026 g (2,7 mM)
	Glukose	72,064 g (200 mM)
	EDTA	0,5956 g (200 µM)
	NaN ₃	2 mg
	H ₂ O	2 l
Lyse-Puffer	Tris-HCl (50 mM, pH 6,8) + 2 % SDS	100 µl
	Lysozym (10 mg/ml)	17 µl
	Pefablock (10 mg/ml)	1 µl
	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	0,12 µl (1:1000)
	Leupeptin	1,2 µl (1:100)

NaCl-EDTA-Lösung zur Dialyse	NaCl	8,91 g (0,15 M)
	EDTA	100 mg (0,01 %)
der DiI-LDL	H ₂ O	1 l
NaOH-SDS	NaOH (1M)	50 ml
	SDS	5 g
	H ₂ O	450 ml
PBS (pH 7,2)	Na ₂ HPO ₄	5,8018 g (8,1 mM)
	KH ₂ PO ₄	0,2014 g (0,74 mM)
	NaCl	17,532 g (150 mM)
	KCl	0,4026 g (2,7 mM)
PBS-Tween	PBS	100 ml
	Tween 20	50 µl (0,05 %)
Plasmakonservator	Saccharose	7 g
	Glutathion (reduziert)	100 mg
	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	5 mg
	Dithiothreitol (DTT)	2 mg
	H ₂ O	10 ml
SDS-Blotpuffer (Bjerrum und Schafer-Nielson Blotpuffer)	Tris	7 g
	Glycin	3,5 g
	SDS (10 %)	480 µl
	Methanol	240 ml
	H ₂ O	960 ml
SDS-Laufpuffer	Tris	6 g
	Glycin	28,9 g
	SDS	2 g
	H ₂ O	2 l

SDS-Probenpuffer (reduzierend)	Sammelgelpuffer	6 ml
	Glyzerol	0,8 ml
	EDTA	0,2 ml
	Mercaptoethanol	3 ml
	Borsäure	6 ml
	SDS	5 ml
	Bromphenolblau	0,05 g
	H ₂ O	5 ml
	Stripping-Puffer	Tris-HCl (0,5 M, pH 6,8)
SDS (10 %)		10 ml (2 %)
H ₂ O		33,75 ml
Mercaptoethanol (frisch zugeben)		7 µl/ml
TAE-Puffer (pH 8,5)	Tris	2,42 g
	Eisessig	570 µl
	EDTA	0,37 g
	H ₂ O	500 ml
TBS-Tween (pH 8,0)	Tris	6,05 g
	NaCl	3,4 g
	H ₂ O	1 l
	Tween 20	500 µl (0,05 %)
Tris-HCl (pH 8,4)	Tris (1 M)	100 ml
	HCl (1 M)	35,46 ml

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung und Charakterisierung der humanen LDL

2.2.1.1 Plasmagewinnung und Konservierung

Gesunden, nüchternen, normoglykämischen und normolipämischen Spendern wurde mit Hilfe von EDTA-Röhrchen Vollblut entnommen und für 10 min bei 6000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Das in der obersten Phase befindliche Plasma wurde abgenommen und 1:10 (v/v) mit Plasmakonservator versetzt. Davon wurden Aliquote von 550 µl hergestellt, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

2.2.1.2 Präparation der humanen Lipoproteine mittels *very fast-Ultrazentrifugation* (VFU)

Die humanen Lipoproteine wurden mittels *very fast-Ultrazentrifugation* (VFU) modifiziert nach Pietzsch und Kollegen [85, 86] aus dem konservierten Blutplasma isoliert. Die Vorteile der VFU gegenüber früheren präparativen Ultrazentrifugationstechniken liegen im geringen Probenvolumen und der vergleichsweise kurzen Präparationszeit. Es konnte gezeigt werden, dass die so gewonnen Lipoproteine keine Verunreinigungen mit anderen Plasmaproteinen, wie z.B. Albumin, aufweisen und die für die Funktion der Lipoproteine wichtigen Apolipoproteine unverändert vorliegen [85].

Es wurden 500 µl konserviertes Plasma mit 500 µl Dichtemedium eins (1,006 kg/l) überschichtet und 61 min zentrifugiert (Optima-MAX Ultrazentrifuge, Rotor MLA-130, 130.000 U/min (entspricht etwa $1.100.000 \times g$), 18 °C). Anschließend wurden 450 mg (450 µl) der obersten milchigen VLDL-Bande (**Abbildung 2-1 links**) abgenommen und 500 µl des gut durchmischten Unterstandes mit 500 µl Dichtemedium drei (1,120 kg/l) versetzt und erneut 61 min bei 18 °C zentrifugiert. Von der obersten gelblichen LDL-Bande (**Abbildung 2-1 rechts**) wurden 475 mg (450 µl) abgenommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert. In diesem zweiten Zentrifugationsschritt wurden alle Lipoproteine im Dichtebereich von >1,006 kg/l bis 1,063 kg/l isoliert, womit in den LDL-Präparaten definitionsgemäß auch IDL enthalten waren. Diese kommen beim gesunden Menschen jedoch nur in sehr geringen Mengen vor, so dass ihr Anteil als vernachlässigbar klein einzustufen war.

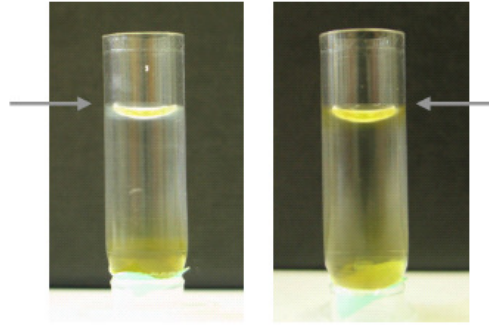


Abbildung 2-1 VLDL- und LDL-Bande nach VFU

Nach Abnahme der LDL wurde der Unterstand gut durchmischt, mit 500 μ l Dichtemedium vier (1,340 kg/l) versetzt und 3,5 h bei 18 °C unter den gleichen Zentrifugationsbedingungen wie für die VLDL und die LDL zentrifugiert. Es wurden 450 mg der oberen gelblichen HDL-Bande abgenommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

Die Präparation der Lipoproteine beruht auf der Bewegung von Partikeln im Zentrifugalfeld, welche u. a. von der Dichte des Lösungsmittels und des zentrifugierten Teilchens bestimmt wird. Abhängig vom Sedimentationskoeffizienten s eines Partikels, welcher in *Svedberg*-Einheiten (S) angegeben wird, kann es zur Sedimentation oder Flotation (negative *Svedberg*-Einheiten oder *Svedberg*-Einheiten der Flotation (S_f)) der Partikel kommen. Aufgrund ihrer geringen Dichte, die unter der des Plasmas oder des zugesetzten Dichtemediums liegt und der daraus resultierenden negativen Sedimentationskoeffizienten (VLDL: S_f 100-400, LDL: S_f 0-12), flotieren die Lipoproteine im angelegten Zentrifugalfeld. Im Gegensatz dazu sedimentieren andere Plasmaproteine, wie z.B. Serumalbumin, aufgrund ihrer deutlich höheren Dichten und der daraus resultierenden Sedimentationskoeffizienten ($S > 0$) [87, 88].

2.2.1.3 *In vitro*-Glykatisierung humaner LDL

Zur Glykatisierung der LDL wurden diese in einen Dialysierschlauch pipettiert und für 144 h bei 37 °C in Glykatisierungspuffer (200 mM Glukose in PBS) inkubiert. Für 4 ml der präparierten LDL wurden etwa 500 ml Glykatisierungspuffer verwendet. Um während der gesamten Inkubationszeit eine ausreichende Glukosekonzentration zu gewährleisten, wurde der Glykatisierungspuffer aller 48 h gewechselt. Zur Minimierung von zusätzlichen oxidativen Veränderungen der LDL, erfolgte die Glykatisierung unter Luft- und Lichtausschluss. Um in der LDL-Lösung enthaltene Reste des

Glykatisierungspuffers zu entfernen, wurden die im Dialysierschlauch enthaltenen LDL nach Ablauf der Inkubationszeit für mehrere Stunden in PBS inkubiert.

2.2.1.4 SDS-PAGE

Zur Überprüfung der Reinheit der gewonnenen LDL-Proben wurden 10 µl LDL mit 10 µl reduzierendem Probenpuffer für 30 min bei 105 °C gekocht und in einem 8-18 %igem Polyacrylamid-Gradientengel elektrophoretisch aufgetrennt. Zum Vergleich wurde ein hochmolekularer Protein-Marker (RPN756) mitgeführt. Das Gel wurde zu Beginn etwa 20 min bei 150 V laufen gelassen, bis die Proben in das Gel ausgewandert waren. Danach konnte die Spannung auf 600 V erhöht werden. Nach weiteren 45 min Laufzeit wurde die Elektrophorese gestoppt und das Gel über Nacht in einer Coomassie-Färbelösung inkubiert. Die Entfärbung des Gels erfolgte für etwa 24 h in einem Gemisch aus gleichen Teilen 20 %iger Essigsäure und 70 %igem Methanol (v/v).

2.2.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung der gewonnenen LDL-Proben erfolgte mittels Bicinchoninsäure- (BCA-) Kit (Pierce, Rockford, USA) und Rinder-Serumalbumin (BSA) als Standard. Dazu wurden jeweils 25 µl Probe als Doppelbestimmung in eine 96well-Platte aufgetragen und mit 200 µl einer Arbeitslösung aus 50 Teilen Lösung A und einem Teil Lösung B (v/v) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C wurde die Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 562 nm mit Hilfe eines Synergy HT-Photometers bestimmt.

2.2.3 Untersuchungen zur Bindung glykatisierter LDL an den löslichen RAGE (sRAGE)

Um nachzuweisen, dass die *in vitro*-glykatisierten LDL potenzielle RAGE-Liganden darstellen, wurden jeweils 2,5 µg rekombinanter, löslicher RAGE (sRAGE)¹ und zur Kontrolle 2,5 µg BSA in Bicarbonatpuffer (pH 9,6, 50 mM) gelöst und über Nacht auf einer „MaxiSorp™“-Platte inkubiert. Auf diese Weise wurden der sRAGE und BSA auf der Platte immobilisiert. Die Lösungen wurden abgenommen und die Platte dreimal mit 250 µl Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) + 0,05 % Tween 20 (PBS-Tween) (v/v) je Kavität gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde die Platte anschließend für 2 h bei Raumtemperatur (RT) mit 100 µl PBS + 2 % BSA (v/w) inkubiert. Daraufhin wurde die Platte für 2 h mit 100 µl DiI-markierten glykLDL (siehe

¹ Der rekombinante sRAGE wurde freundlicherweise von Frau Dipl.-Biologin Susan Hoppmann zur Verfügung gestellt.

Kapitel 2.2.9.2) in serumfreiem DMEM (0,1 mg/ml (v/v)) bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Zur Ermittlung der unspezifischen Bindung wurde mit einem fünffachen Überschuss an nicht markierten glykLDL (50 µg) vorinkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 250 µl PBS-Tween (v/v) je Kavität, wurde das gebundene DiI-glykLDL durch Zugabe von 100 µl Isopropanol für 15 min extrahiert. Nach dieser Zeit wurden die Überstände komplett abgenommen und die Fluoreszenz der Proben in einer Einfachbestimmung bestimmt. Nach Anregung bei 520 nm wurde die Emission bei einer Wellenlänge von 580 nm im Synergy HT-Photometer bestimmt.

2.2.4 Zellkultur

2.2.4.1 Kultur der murinen 3T3-L1-Zellen

Die 3T3-L1-Zellen (Passage 1 - 10) wurden zu Beginn der Diplomarbeit in Hinblick auf geplante Kokultivierungsexperimente mit Makrophagen in RPMI (Roswell Park Memorial Institut)-1640-Medium supplementiert mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) kultiviert. Da eine hinreichende Differenzierung der Zellen in RPMI-Kulturmedium zu Beginn nicht reproduzierbar war, wurden die Zellen schließlich in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplementiert mit 10 % FKS und 1 % P/S kultiviert und differenziert (Standardkulturbedingungen: 37 °C, 95 % relative Luftfeuchte, 5 % CO₂). Die Zellen wurden alle 3 - 4 Tage passagiert, indem sie für etwa 30 s bei RT mit Trypsin und für weitere 3 min bei 37 °C ohne Trypsin inkubiert wurden. Die abgelösten Zellen wurden in DMEM aufgenommen und nach entsprechender Verdünnung mit DMEM in eine neue Zellkulturflasche überführt. Alle Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen.

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese ebenfalls durch Inkubation mit Trypsin in Suspension gebracht, in 2 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) + 90 % FKS aufgenommen, in Einfriereröhrchen überführt und mit Hilfe einer Einfrierbox langsam bei -70 °C eingefroren. Nach mindestens 24 h in der Einfrierbox konnten die Zellen zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt werden. Bei Bedarf wurden die Zellen zügig aufgetaut, mit etwa 5 ml DMEM versetzt und 5 min bei 1500 × g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, das Zellpellet in DMEM resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

2.2.4.2 Differenzierung der murinen 3T3-L1-Zellen

Die Differenzierung der 3T3-L1-Zellen wurde in Bezug auf die Zelldichte bei Induktion der Differenzierung sowie die verschiedenen Konzentrationen an Insulin, Dexamethason (DEX) und 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) im Differenzierungsmedium etabliert. Die folgende Methode erwies sich als beste Variante und wurde für alle anschließenden Versuche angewendet.

Zur Differenzierung der 3T3-L1-Präadipozyten (im Folgenden nur noch als Präadipozyten bezeichnet) zu 3T3-L1-Adipozyten (im Folgenden nur noch als Adipozyten bezeichnet) wurden diese in die entsprechenden Kulturgefäße ausgesät (24 well-Platte: 10.000 Zellen/ Kavität bzw. chamber slide: 5.000 Zellen/ Kavität (drei Tage vor Induktion der Differenzierung)). Bei ca. 100 % Konfluenz der Zellen wurde das Kulturmedium durch Differenzierungsmedium (DMIX) ersetzt (Tag null nach Induktion der Differenzierung). Das DMIX enthielt im Gegensatz zum Kulturmedium zusätzlich 10 µg/ml Insulin, 1 µM DEX und 0,5 mM IBMX. Nach 48 h (Tag zwei nach Induktion der Differenzierung) wurde das DMIX durch Kulturmedium mit 10 µg/ml Insulin ersetzt. Nachfolgend wurde dieses Medium aller zwei bis drei Tage gewechselt, bis die Adipozyten für Versuche eingesetzt wurden.

2.2.5 Nachweis und relative Quantifizierung der Differenzierung mittels Oil-Red O (Öl-Rot-Färbung)

Zum Nachweis der erfolgreichen Differenzierung der Zellen wurden die während der Adipogenese gebildeten Fettvakuolen mit Hilfe von Oil-Red O angefärbt. Dazu wurde das Medium abgenommen und die Zellen für 1 h bei RT mit Hilfe einer 4 %igen Formaldehydlösung in PBS (v/v) fixiert. Anschließend wurde die Formaldehydlösung entfernt und durch eine 0,6 %ige Oil-Red O-Lösung (w/v) in einem Gemisch aus Isopropanol (60 %) und Wasser (40 %) (v/v) ersetzt. Die Zellen wurden für mindestens 1 h bei RT mit der Oil-Red O-Lösung inkubiert, so dass die Fettvakuolen vollständig angefärbt wurden. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Die Auswertung der Menge der gefärbten Zellen erfolgte wie nachfolgend beschrieben.

Zur relativen Quantifizierung der mit Oil-Red O gefärbten Zellen pro Kavität wurden die Zellen in *chamber slides* ausgesät, unter dem Einfluss von 0,1 mg/ml nLDL bzw. glykLDL (je 2 Kavitäten) differenziert und mit PBS gewaschen. Am Tag 14 nach

Induktion der Differenzierung wurden die Zellen mit Oil-Red O gefärbt und erneut gewaschen. Anschließend wurde der obere Teil des *chamber slides* entfernt und der Objektträger mit den darauf befindlichen Zellen mit Hilfe von Vectashield-Einbettmedium und einem Deckgläschen abgedeckt und mit Nagellack verschlossen. Das so hergestellte Präparat wurde an einem AxioImager.A1-Mikroskop im „MosaiX-Modus“ fotografiert (Vergrößerung 1×10). Auf diese Weise wurde die gesamte Fläche einer Kavität in vier Fotos erfasst. Anschließend wurde der prozentuale Anteil der rot gefärbten Fläche an der Gesamtfläche mit Hilfe der AxioVision Release 4.6 Software (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) ermittelt.

Eine weitere Möglichkeit die Menge der differenzierten Zellen relativ zu quantifizieren, war die Extraktion des aufgenommenen Oil-Red O und die anschließende spektrophotometrische Auswertung am Synergy HT-Photometer. Hierzu wurden die Zellen in *24well*-Platten ausgesät, unter dem Einfluss von 0,1 mg/ml nLDL bzw. glykLDL (je acht Kavitäten) differenziert und ebenfalls mit Oil-Red O angefärbt. Nach den üblichen Waschschritten wurde der aufgenommene Farbstoff mit Hilfe von 200 μ l einer 4 %igen Nonidet P40-Substitut (NP-40)-Lösung in Isopropanol (*v/v*) für mindestens 30 min bei RT extrahiert, vollständig abgenommen und bis zur Messung bei 4 °C gelagert. Die Extinktion von 50 μ l der so gewonnenen Farbstofflösung wurde in einer Doppelbestimmung bei einer Wellenlänge von 517 nm (Absorptionsmaximum) am Synergy HT-Photometer gemessen. Als Eichkurve dienten Lösungen von Oil-Red O in 4 %iger NP-40-Lösung in Isopropanol (*v/v*) mit Konzentrationen zwischen 0 mM und 15 mM Oil-Red O (*w/v*).

2.2.6 RNA-Isolierung und Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

2.2.6.1 RNA-Isolierung

Zur Isolierung der zellulären RNA wurden die 3T3-L1-Zellen in *6well*-Platten ausgesät. Die Differenzierung der Zellen erfolgte nach dem Standardprotokoll, nach dem Standardprotokoll mit anschließender einstündiger Inkubation mit 0,1 mg/ml nLDL bzw. glykLDL oder unter Einfluss von 0,1 mg/ml nLDL bzw. glykLDL während der gesamten Differenzierung. Zur Kontrolle wurden 3T3-L1-Zellen zwei bis drei Tage vor der RNA-Isolierung ausgesät, so dass diese am Tag der RNA-Isolierung etwa 100 % konfluent waren. Diese wurden ebenfalls für 1 h mit 0,1 mg/ml nLDL bzw. glykLDL inkubiert oder sie standen bis zum Erreichen der Konfluenz unter dem Einfluss der LDL. Die RNA-Isolierung erfolgte mittels miniRNeasy-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Zu Beginn wurde das Medium vollständig abgenommen und die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 700 µl *Qiazol Lysis*-Reagenz konnten die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers von der Platte abgelöst und in ein Eppendorf-Röhrchen überführt werden. Der Ansatz wurde gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 140 µl Chloroform zugegeben, erneut gemischt und für weitere 2 bis 3 min bei RT inkubiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei $12.000 \times g$ und $4^\circ C$ wurde der klare wässrige Überstand in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und mit dem eineinhalbfachen Volumen an 100 %igem Ethanol vermischt. Es wurden 700 µl des Ansatzes auf eine Säule pipettiert und bei RT für 30 s bei $8.000 \times g$ zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule einmal mit 700 µl RWT-Puffer und zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen (30 sec, $8.000 \times g$, RT). Danach wurde die Säule einmal bei $12.000 \times g$ für 2 min trocken zentrifugiert. Schließlich wurde die RNA mit Hilfe von 50 µl RNase-freiem Wasser und 1 min Zentrifugation bei $8.000 \times g$ von der Säule eluiert. Der RNA-Gehalt sowie die Qualität der Probe wurden spektrophotometrisch mit Hilfe eines Bio-Photometers bestimmt. Der Quotient aus der Absorption bei 260 nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) und 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) machte Aussage über die Reinheit der Probe und sollte zwischen 1,9 und 2,1 liegen. Die Lagerung der RNA-Proben erfolgte bei $-70^\circ C$.

2.2.6.2 DNase-Verdau

Um die in den RNA-Isolaten enthaltene DNA zu inaktivieren, wurden die RNA-Proben einem DNase-Verdau unterzogen. Dazu wurden 2 µg RNA mit 2 µl zehnfach-konzentriertem Puffer und RNase-freiem Wasser versetzt und nach Zugabe von 2 µl DNase (1 *Unit*/µl, Fermentas Life Sciences, St. Leon Rot, Deutschland) 15 min bei RT inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Reaktion mit 2 µl EDTA (25 mM) abgestoppt und die Probe für 10 min auf 65 °C erhitzt. Danach wurde der RNA-Gehalt erneut im Bio-Photometer bestimmt.

2.2.6.3 Überprüfung der Primerfunktionalität mittels Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) und Agarose-Gelelektrophorese

Um die Funktionalität und Spezifität der verwendeten Primer zu überprüfen, wurde eine RT-PCR mit dem SuperScriptTMIII-Reverse Transkriptase/ Platinum®Taq-DNA-Polymerase-Kit (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurden 100 ng RNA (x µl); 10,5 – x µl RNase-freies Wasser; 0,4 µl *forward*-Primer (10 µM); 0,4 µl *reversed*-Primer (10 µM) sowie 10 µl des doppelkonzentrierten Reaktionsmixes (1,6 mM MgSO₄ und jeweils 200 µM jedes Desoxynukleosidtriphosphates) mit 0,15 µl SuperScriptTMIII-Reverse Transkriptase/ Platinum®Taq-DNA-Polymerase-Mix versetzt und zur cDNA-Synthese im Thermozykler PTC-200 inkubiert. Die gewonnene cDNA konnte anschließend in einem 2 %igem Agarosegel aufgetrennt werden. Dazu wurden 15 µl des PCR-Ansatzes mit 4 µl sechsfachkonzentriertem *Orange Loading Dye* versetzt und in die Geltasche pipettiert. Das Gel wurde für etwa 20 min einer Spannung von 100 V ausgesetzt, so dass sich die DNA der Größe nach auftrennen konnte. Schließlich wurde das Gel für etwa 30 min in einer Ethidiumbromid-Lösung inkubiert. Als Primer für die ausgewählten, murinen Gene dienten die in **Tabelle 2-1** dargestellten Oligonukleotide (Metabion, Martinsried, Deutschland).

Tabelle 2-1 Überblick über die Eigenschaften der verwendeten Primer und des gebildeten Produktes.

Gen	Richtung	Primer-Lokalisation	Primer-Sequenz	Produktgröße
Pref-1	<i>forward</i>	Exon 4	5'-TCC CCT CTG TGA CAA CTG TG-3'	214 bp
	<i>reversed</i>	Exon 5	5'-CTT TCC AGA GAA CCC AGG TG-3'	
LDL-R	<i>forward</i>	Exon 5	5'-CCG ACC TGA TGA ATT CCA GT-3'	175 bp
	<i>reversed</i>	Exon 6	5'-CTT GTC CAA GCT GAT GCA CT-3'	
RAGE	<i>forward</i>	Exon 7/8	5'-TCCACTGGATAAAGGATGGTG-3'	159 bp
	<i>reversed</i>	Exon 8	5'-GACCCTGATGCTGACAGGAG-3'	
SR-A1/2	<i>forward</i>	Exon 3	5'-TGC CCT CAT TGC TCT CTA CC-3'	221 bp
	<i>reversed</i>	Exon 4	5'-CGA TTC TCT CCT CCA TGT CC-3'	
SR-B1	<i>forward</i>	Exon 1/2	5'-AGC AGC AGG TGC TCA AGA AT-3'	155 bp
	<i>reversed</i>	Exon 2	5'-CTC CCG GAC TAC TGG CTT C-3'	
CD36	<i>forward</i>	Exon 3	5'-TGT GTT TGG AGG CAT TCT CA-3'	160 bp
	<i>reversed</i>	Exon 4	5'-TGG GTT TTG CAG ATC AAA GA-3'	
LOX-1	<i>forward</i>	Exon 2	5'-GGT TCC CTG CTG CTA TGA CT-3'	168 bp
	<i>reversed</i>	Exon 3	5'-CCT TCT GCT GGG CTA ACA TC-3'	
β-Aktin	<i>forward</i>	Exon 4	5'-ACC TTC AAC ACC CCA GCC ATG-3'	210 bp
	<i>reversed</i>	Exon 4	5'-GCT CGG TCA GGA TCT TCA TGA GG-3'	

2.2.6.4 Quantifizierung der mRNA-Expression mittels quantitativer Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)

Mit Hilfe der qRT-PCR sollte die Expression des Differenzierungsmarkers Pref-1 sowie verschiedener Rezeptoren (LDL-R, RAGE, SR-A1/2, SR-B1, CD36 und LOX-1) auf mRNA-Ebene bestimmt werden. Als Haushaltsgen diente die Expression von β-Aktin. Während die mRNA-Expression für Pref-1, CD36 und RAGE im Verlauf der Differenzierung untersucht wurde, beschränkte sich die Analyse für den LDL-R, den SR-A1/2, SR-B1 und LOX-1 auf die mRNA-Expression in Präadipozyten und Adipozyten als relevante Endpunkte. Die qRT-PCR erfolgte mittels QuantiTect RT-PCR-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Für jede Probe wurde in Vorbereitung auf die qRT-PCR ein 20 µl-Ansatz aus 10 µl doppelkonzentriertem Puffer, 1 µl *forward*-Primer (10 µM), 1 µl *reversed*-Primer (10 µM), 0,15 µl *Quanti Tect*, 100 ng RNA (x µl) sowie (7,85 - x) µl RNase-freiem Wasser hergestellt. Die Reverse Transkription (RT), die Polymerase Kettenreaktion (PCR) sowie die Schmelzkurvenanalyse erfolgten im Thermozykler Realplex².

2.2.7 Proteinisolierung und Western Blotting

2.2.7.1 Proteinisolierung

Für die Proteinisolierung wurden 3T3-L1-Zellen in *6well*-Platten ausgesät und bei Konfluenz wie in Kapitel 2.2.4.2 beschrieben, mit 5 ml DMIX pro Kavität zu Adipozyten differenziert. Zur Kontrolle wurden 3T3-L1-Zellen zwei bis drei Tage vor der Proteinisolierung ebenfalls in *6well*-Platten eingesät, so dass sie am Versuchstag etwa 100 % konfluent waren. Nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit mindestens 100 µl Lyse-Puffer versetzt. Die lysierten Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden gelöst und in ein Eppendorf-Röhrchen überführt. Die Denaturierung der Proteine erfolgte durch Behandlung mit einem Ultraschallstab für 15 s. Der Proteingehalt des Gesamtzelllysates wurde nach Verdünnung mit PBS im Verhältnis 1:25 (v/v), wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, bestimmt.

2.2.7.2 SDS-PAGE

Zur Auftrennung der gewonnenen Gesamtzelllysate wurden 100 µg Protein 1:7 (v/v) mit siebenfachkonzentriertem Probenpuffer (reduzierend) vermischt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Davon wurden ca. 30 µl auf ein 10 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte für die ersten 15 min bei einer Spannung von 120 V und danach für weitere 50 min bei 140 V in SDS-Laufpuffer. Parallel zu den Proben wurde ein Größenmarker (Precision Plus Protein Standard) mitgeführt.

2.2.7.3 Western Blotting

Im Anschluss wurden die im Gel befindlichen Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dazu wurde das Gel in einer Semi-Dry-Blotting-Apparatur auf eine mit Blotting-Puffer befeuchtete Nitrozellulose-Membran gelegt und für 90 min einer Spannung von 10 V ausgesetzt.

Durch die Inkubation der Membran für mindestens 1 h in einer 5 %igen Magermilchlösung in PBS (w/v) (Blocking-Puffer) wurden alle unspezifischen Bindungsstellen geblockt. Parallel dazu wurden die im SDS-Gel verbliebenen Proteine für 30 min mittels Coomassie-Färbelösung gefärbt. Nach dieser Zeit wurde das Gel zuerst für etwa 3 min in Entfärber eins und schließlich für mindestens 2 h in Entfärber zwei inkubiert und somit entfärbt.

Zur Detektion von RAGE wurde die geblockte Membran über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper (polyklonaler anti-RAGE-Antikörper aus der Ziege (N-16), Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland) inkubiert. Dieser wurde in einem Verhältnis von 1:700 (v/v) in Blocking-Puffer verdünnt eingesetzt. Nach dreimaligem Waschen für 5 min mit TBS + 0,05 % Tween (v/v) (TBS-Tween) wurde die Membran für 1 h bei RT mit dem sekundären Antikörper (Peroxidase-gekoppelter Anti-Ziegen-IgG-Antikörper aus der Maus (A5420), Sigma-Aldrich, München, Deutschland) inkubiert. Dieser wurde 1:10.000 (v/v) im Blocking-Puffer verdünnt eingesetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Membran für mindestens 2 h in TBS-Tween gewaschen. Dabei wurde der Puffer alle 20 bis 30 min gewechselt. Die Detektion von RAGE erfolgte mit Hilfe der an den sekundären Antikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase. Nach Zugabe von im Verhältnis 1:1 vermishtem Chemilumineszenzreagenz A und B (SuperSignal WestPico und wenn nötig SuperSignal WestDura, Pierce, Rockford, IL, USA) kam es zur Umsetzung des darin enthaltenen Substrates und damit zu Chemilumineszenz, welche zur Belichtung eines Kodak-Films genutzt wurde.

Um die Proteinmenge von RAGE zu β -Aktin ins Verhältnis setzen zu können, wurden alle auf der Membran befindlichen Antikörper wieder entfernt. Dazu wurde die Membran für 5 min mit TBS-Tween gewaschen, für 20 min bei 55 °C in einem Hybridisierungssofen mit Stipping-Puffer inkubiert und erneut für etwa 1 h mit TBS-Tween gewaschen.

Nach erneutem Blocken der Membran wurde β -Aktin in der gleichen Vorgehensweise wie bei RAGE nachgewiesen. Als primärer Antikörper diente ein monoklonaler anti- β -Aktin-Antikörper aus der Maus (A5316, Sigma-Aldrich, München, Deutschland), der 1:2.000 in Blocking-Puffer verdünnt eingesetzt wurde sowie als sekundärer Antikörper ein Peroxidase-gekoppelter anti-Maus-IgG-Antikörper (A9044, Sigma-Aldrich, München, Deutschland), der 1:10.000 verdünnt eingesetzt wurde.

2.2.8 Untersuchungen zur Aufnahme nativer (nLDL) und glykatisierter LDL (glykLDL) an 3T3-L1-Zellen

2.2.8.1 Herstellung der Hemmstofflösungen

Zur Herstellung glykatisierter BSA (glykBSA) wurden 5 mg/ml BSA in PBS gelöst und analog der Herstellung der glykLDL in einem Dialyseschlauch für 144 h bei 37 °C in einer 200 mM Glukoselösung inkubiert. Zur Entfernung der Glukoselösung wurde anschließend für mehrere Stunden gegen PBS dialysiert. Zur Herstellung von maleyliertem BSA (malBSA) wurden 9 mg/ml BSA in Tris-HCl gelöst und durch Zugabe kleiner Mengen Maleinanhydrid modifiziert. Der dabei auftretende Abfall des pH-Wertes der Lösung wurde durch Zugabe kleine Mengen Na₂CO₃ jeweils wieder auf den anfänglichen pH-Wert von 8,4 erhöht. Auf diese Weise wurden Maleinanhydrid und Na₂CO₃ im Wechsel zugegeben, bis die Zugabe von Maleinanhydrid zu keiner pH-Wert-Senkung mehr führte. Insgesamt wurden für 25 ml BSA-Lösung etwa 1 g Maleinanhydrid und 1,3 g Na₂CO₃ verbraucht. Der Ansatz wurde im Anschluss für mindestens 48 h bei 4 °C gegen PBS dialysiert. Natriumoleat (NaOleat) wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in einem Gemisch aus Isopropanol und doppelt destilliertem Wasser (60:40 (v/v)) gelöst. Fucoidan und Polyinosinsäure wurden in einer Konzentration von 60 µg/ml in serumfreiem DMEM gelöst. Die humanen LDL und HDL wurden, wie in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben, aus dem Plasma gesunder, nüchterner Spender isoliert, bei Bedarf *in vitro* glykatisiert und entsprechend verdünnt für die Zellaufnahmestudien eingesetzt.

2.2.8.2 Radioaktive Markierung von nLDL und glykLDL mittels N-Succinimidyl-4-[¹⁸F]fluorbenzoat ([¹⁸F]SFB)

Zur Markierung des ApoB-100 der LDL-Partikel mit dem Positronen-Emitter ¹⁸F wurde 1 ml nLDL bzw. glykLDL (1,49 - 2,04 mg/ml) für 20 min bei RT mit in 200 µl Acetonitil gelöstem N-Succinimidyl-4-[¹⁸F]Fluorbenzoat ([¹⁸F]SFB) inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde während dieser Zeit mehrmals geschwenkt. Anschließend wurde das entstandene [¹⁸F]Fluorbenzoyl-LDL ([¹⁸F]FB-LDL) mit Hilfe einer Gelfiltrationssäule (Flussrate 1 ml/min) von niedermolekularen Verbindungen, wie z.B. nicht markiertem [¹⁸F]SFB sowie als Nebenprodukt entstehender [¹⁸F]Fluorbenzoesäure, getrennt. Dabei wurden Fraktionen von jeweils 0,5 ml gewonnen und anschließend deren Radioaktivität mit dem Aktivimeter Isomed 2000 bestimmt. Die Fraktionen, die das gereinigte [¹⁸F]FB-LDL enthielten, wurden zum

Präparat vereinigt und erneut gemessen. Das so gewonnene Präparat wurde mit serumfreiem DMEM verdünnt. Für die Zellaufnahmestudien wurden je Kavität 0,02 - 0,1 MBq [¹⁸F]FB-LDL eingesetzt.

2.2.8.3 Fluoreszenzmarkierung von nLDL und glykLDL mittels 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorat (DiI)

Zur Untersuchung der Aufnahme von nLDL bzw. glykLDL durch die 3T3-L1-Zellen wurden die LDL-Partikel neben der radioaktiven Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorat (DiI) markiert. Dies erfolgte in Anlehnung an die von Stephan und Yuracheck veröffentlichte Methode [89]. Hierzu wurden LDL-Proben vereinigt und mit PBS auf einen Proteingehalt von 0,6 mg/ml verdünnt. Zur Herstellung der DiI-Stammlösung wurden 3 mg DiI in 1 ml DMSO gelöst und bis zur Verwendung bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Zur Markierung wurden 50 µg DiI/mg LDL bei RT über Nacht (maximal 15 h) inkubiert. Die Abtrennung von überschüssigem DiI erfolgte durch eine 24-stündige Dialyse gegen dreimal 1 l einer NaCl-EDTA-Lösung. Der Proteingehalt der DiI-markierten LDL wurde erneut bestimmt.

2.2.8.4 Zellaufnahmestudien an Präadipozyten und Adipozyten

In Vorbereitung der Zellaufnahmestudien wurden je 1×10^5 Präadipozyten je Kavität in 24well-Platten ausgesät und bei 100 % Konfluenz wie in Kapitel 2.2.4.2 beschrieben differenziert. Am Tag neun nach Induktion der Differenzierung wurde diese lichtmikroskopisch gegebenenfalls nach Anfärbung der Fettvakuolen mit Oil-Red O überprüft. Zum Vergleich wurden 2 d vor dem Zellversuch 4×10^5 Präadipozyten je Kavität in 24well-Platten ausgesät und ebenfalls untersucht.

Zu Beginn des Versuches wurde das Zellkulturmedium abgenommen und durch 100 µl serumfreies DMEM (ungehemmte Kontrolle) bzw. 100 µg nicht markierte nLDL bzw. glykLDL, 100 µg glykBSA (Inhibitor für RAGE), 100 µg malBSA (Inhibitor für alle SR außer LOX-1), 6 µg NaOleat (Inhibitor für CD36), 6 µg Fucoidan bzw. 6 µg Polyinosinsäure (Inhibitoren für SR-A und LOX-1) in 100 µl serumfreiem DMEM (Hemmlösungen) ersetzt. Durch diese Vorinkubation sollte eine Hemmung potenzieller Rezeptoren für die Aufnahme von nLDL und glykLDL erzielt werden. Nach 15 min wurden jeweils 400 µl der fluoreszenz- oder radioaktivmarkierten LDL-Lösung (Inkubationslösung, etwa 5 µg [¹⁸F]FB-LDL bzw. 50 µg DiI-LDL/Kavität) zugegeben.

Die Platten wurden so für 30 min, 60 min bzw. 120 min bei 4 °C und 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Im Falle der fluoreszenzmarkierten LDL wurden nun zur Extraktion des gebundenen bzw. aufgenommenen DiI-LDL 1000 µl Isopropanol zugegeben und der Ansatz vorsichtig bei RT 15 min geschüttelt. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der Überstand vollständig abgenommen und bis zur Messung bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Im Falle der radioaktivmarkierten LDL entfiel dieser Schritt und es wurde analog zum Zellversuch mit DiI-LDL wie folgt vorgegangen. Durch Zugabe von 500 µl NaOH-SDS pro Kavität und kräftiges Schütteln für mindestens 30 min bei RT wurden die Zellen abgelöst. Anschließend wurde von je 25 µl des gut durchmischten Zellrückstandes der Proteingehalt in einer Doppelbestimmung bestimmt.

Zur Bestimmung der Radioaktivitätskonzentration in den Zelllysaten wurden vom Zellrückstand je 250 µl in einem Cobra II *Gamma Counter* gemessen. Als Standard („100 % injizierte Dosis (ID)“) dienten beim Zellversuch mit [¹⁸F]FB-LDL eine Dreifachbestimmung von jeweils 40 µl der Inkubationslösung verdünnt mit 200 µl NaOH-SDS. Die gebundene bzw. aufgenommene Menge an DiI-LDL wurde durch Messung der Fluoreszenzintensität (Exzitation 530/25 nm und Emission 590/35 nm, Sensitivität 80) von 50 µl der abgenommenen DiI-Lösung bestimmt. Hierbei diente die Inkubationslösung nach 1:100 Verdünnung mit NaOH-SDS in einer Doppelbestimmung als 100 % ID sowie DiI-Lösungen von 0 bis 800 ng DiI/ ml als Standards.

In einem Versuch wurden für jede Zeit, Temperatur und Hemmung bzw. Kontrolle vier Einzelwerte erhoben. Für die Aufnahme von [¹⁸F]FB-LDL wurden für nLDL und glykLDL an Präadipozyten je drei und an Adipozyten je zwei unabhängige Versuche durchgeführt. Die Aufnahme von DiI-LDL an Präadipozyten und Adipozyten wurde aus je drei unabhängigen Experimenten sowohl für nLDL als auch für glykLDL ermittelt.

Zum Vergleich des Ausmaßes der LDL-Aufnahme wurden HepG2-Zellen aufgetaut, im RPMI-Medium + 10 % FKS + 1 % P/S kultiviert und analog zu den 3T3-L1-Zellen mit [¹⁸F]FB-LDL auf ihre Fähigkeit zur LDL-Aufnahme untersucht.

2.2.8.5 Fluoreszenz-Mikroskopie

Die von den 3T3-L1-Zellen aufgenommenen, DiI- (**Abbildung 2-2 links**) markierten LDL wurden mittels Fluoreszenz-Mikroskopie sichtbar gemacht. Dazu wurden die Präadipozyten in *chamber slides* kultiviert und bei einer Konfluenz von etwa 80-90 % für 2 h bei 37 °C im Dunkeln mit 100 µl DiI-nLDL oder DiI-glykLDL (0,1 mg/ml in serumfreiem DMEM) inkubiert. Zur besseren Visualisierung der einzelnen Zellen, wurde die Zellmembran für 15 min mit 3,3'-Dioctadecyloxycarbocyaninperchlorat (DiO, **Abbildung 2-2 Mitte**) bei 37 °C angefärbt. Nach fünfmaligem Waschen mit eiskaltem PBS wurden die Zellen bei RT für 1 h mit 4 % Formaldehyd in PBS (v/v) fixiert. Das Anfärben der Zellkerne erfolgte durch eine fünfminütige Inkubation mit 50 µl einer 200 nM 4',6-Diamidino-2-phenylindol- (DAPI, **Abbildung 2-2 rechts**) Lösung. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS konnten die Präparate mit Hilfe von Vectashield eingebettet und mit einem Deckgläschen abgedeckt werden und standen somit zur Fluoreszenz-Mikroskopie zur Verfügung.

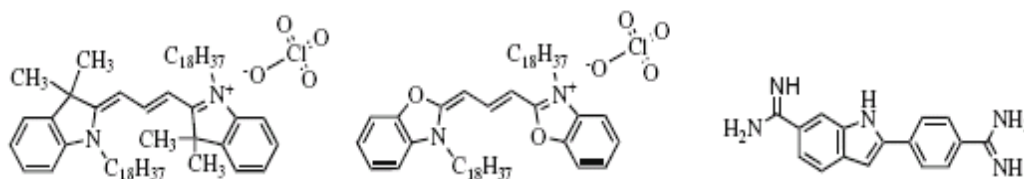


Abbildung 2-2 Strukturformeln der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe DiI (links), DiO (Mitte) und DAPI (rechts).

Die für die einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe verwendeten Exzitations- und Emissions-Wellenlängen sind in **Tabelle 2-2** zusammengefasst.

Tabelle 2-2 Überblick über die Exzitations- und Emissions-Wellenlängen und die daraus resultierende Farbe der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe. Dargestellt sind die Wellenlängen am Anregungs- und Emissions-Maximum sowie deren Bandbreite. In Klammern angegeben ist der damit abgedeckte Wellenlängen-Bereich.

Farbstoff	Exzitations-Wellenlänge	Emission-Wellenlänge	Farbe
DAPI	365 nm	445/50 nm (420-470 nm)	blau
DiI	546/12 nm (540-550 nm)	608/65 nm (575-640 nm)	orange
DiO	470/40 (450-490 nm)	525/50 nm (500-550 nm)	grün

2.2.9 Untersuchungen zur Sekretion von Interleukin-6 (IL-6) und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) mittels quantitativem Enzym-gekoppeltem Immunadsorptionstest (ELISA)

2.2.9.1 Gewinnung der Zellüberstände

Zur Gewinnung der Zellüberstände für die ELISA-Untersuchungen wurden Präadipozyten in vier *24well*-Platten ausgesät. Zwei der Platten wurde nach Erreichen von 100 % Konfluenz, wie in Kapitel 2.2.4.2 beschrieben, zu Adipozyten differenziert und am Tag neun nach Induktion der Differenzierung untersucht. Die anderen beiden Platten dienten nach Erreichen von etwa 80 % Konfluenz der Untersuchung der Sekretion von Präadipozyten. Auf allen Platten wurde 12 h vor Versuchsbeginn das Zellkulturmedium abgenommen und durch serumfreies DMEM ersetzt. Zu Beginn des Versuches wurde dieses Medium erneut abgenommen und durch je 500 μ l serumfreies DMEM, welches 0,1 mg/ml nLDL bzw. glykLDL enthielt, ersetzt. Als Kontrolle dienten Zellen, die für die gleiche Zeit mit serumfreiem DMEM ohne LDL inkubiert wurden. Nach einer Inkubationszeit von 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h sowie 24 h wurde der Zellüberstand vollständig abgenommen, gut vermischt, aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zu Untersuchung bei -70 °C gelagert.

2.2.9.2 Maus-IL-6- und -TNF- α -Immunoassay

Zur Bestimmung des in den Zellüberständen befindlichen IL-6 bzw. TNF- α wurde ein kommerzieller Maus-IL-6- bzw. Maus-TNF- α -Immunoassay der Firma R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) verwendet. Die Zellüberstände wurden aufgetaut und für 5 min bei $9.000 \times g$ zentrifugiert, um alle Zellbestandteile zu entfernen. Im weiteren Verlauf wurde der Immunoassay nach Herstellerangaben durchgeführt. Zu 50 μ l *Assay Diluent* pro Kavität wurden jeweils 50 μ l Standard, Kontrolle bzw. Probe auf die ELISA-Platten pipettiert. Als Standard und Kontrolle diente mitgeliefertes, rekombinantes Maus-IL-6 bzw. TNF- α . Der Ansatz wurde 2 h bei RT inkubiert, so dass das im Zellüberstand befindlich IL-6 bzw. TNF- α an die auf der Platte immobilisierten anti-IL-6- bzw. anti-TNF- α -Antikörper binden konnte. Anschließend wurde die Flüssigkeit abgenommen und die Platte fünfmal mit mitgeliefertem Waschpuffer gewaschen. Durch Zugabe von 100 μ l mitgeliefertem Konjugat und erneuter Inkubation für 2 h bei RT konnte der darin enthaltene Antikörper an das vom ersten Antikörper gebundene IL-6 oder TNF- α binden. Nach fünfmaligem Waschen mit Waschpuffer, wurde 100 μ l Substratlösung zugegeben, die vorher zu gleichen Teilen aus der Substratlösung A und B angemischt wurde. Die am zweiten

Antikörper befindliche Meerrettich-Peroxidase setzte schließlich das darin enthaltene Substrat um, was zu einer Blaufärbung der Lösung führte. Nach einer 30-minütigen Inkubation im Dunkeln wurden pro Kavität 100 µl der mitgelieferten Stopplösung zugegeben, was zu einem Farbumschlag von blau nach gelb führte. Die Extinktion dieser Lösung wurde innerhalb von 30 min bei 450 nm und zur Korrektur von Plattenunregelmäßigkeiten bei 570 nm bestimmt.

2.2.10 Untersuchungen zum *in vivo*-Katabolismus von nLDL und glykLDL (Bioverteilung)

Die Untersuchung der Bioverteilung von [¹⁸F]FB-nLDL und [¹⁸F]FB-glykLDL erfolgte an jeweils acht männlichen Wistar-Unilever-Ratten (Körpergewicht 160 - 200 g)². Jeweils vier Versuchstiere wurde 5 bzw. 60 min nach Injektion von 0,8 - 1,2 MBq [¹⁸F]FB-nLDL bzw. [¹⁸F]FB-glykLDL in 0,5 - 1 ml PBS (pH 7,2 - 7,4) in die Schwanzvene unter Ethernarkose getötet. Die Organe wurden entnommen, gewogen und deren Radioaktivität mittels Wizard™3'' Gamma Counter bestimmt.

2.2.11 Statistische Auswertung

Im Ergebnisteil sind alle Werte als Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) dargestellt. Aufgrund der zu geringen Anzahl an Einzelwerten wurde für die Wachstumskurven, die mRNA-Expressionsdaten und die Auswertung der Öl-Rot-Färbung mittels AxioVision Release 4.6-Software auf die Anwendung eines statistischen Tests verzichtet. Die erhobenen Werte aus der spektrophotometrischen Oil-Red O-Messung, den sRAGE-Bindungsversuchen und den Zellaufnahmestudien wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) auf ihre Varianz und mittels Bonferroni-Post-Hoc-Test auf signifikante Unterschiede zur unbehandelten oder ungehemmten Kontrolle geprüft. Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit <5 % (p<0,05) galten als statistisch signifikant und wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

² Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden entsprechend der genehmigungsrechtlichen Erfordernisse unter Leitung von Herrn PD Dr. Jens Pietzsch durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der humanen LDL *in vitro*

Zur Überprüfung der Reinheit der gewonnenen LDL wurden diese in einem 8-18 %igen Polyacrylamidgradientengel elektrophoretisch aufgetrennt (**Abbildung 3-1**).

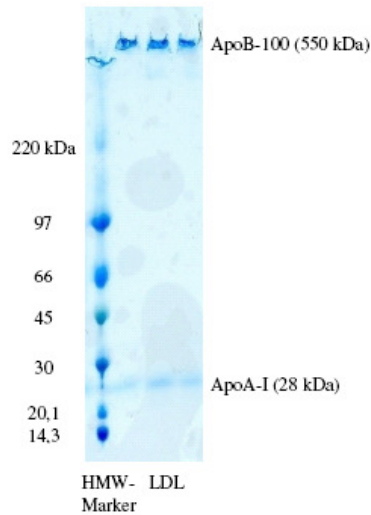


Abbildung 3-1 Repräsentative Auftrennung der LDL in einem 8 – 18 %igen Acrylamidgel mit anschließender Coomassie-Färbung der Apolipoproteine. Dargestellt sind der hochmolekulare Proteinmarker (HMW-Marker) sowie drei LDL-Proben.

Der Vergleich mit dem mitgeführten, hochmolekularen Proteinmarker (RPN756) ergab, dass in den LDL-Proben neben der typischen ApoB-100-Bande zum Teil auch Spuren von Albumin (66 kDa, nicht gezeigt) und ApoA-I (28 kDa) enthalten waren. Diese konnten aber als nicht störend eingestuft werden und fehlten bei späteren Präparationen wieder. Der Proteingehalt der eingesetzten LDL lag zwischen 1,4 und 2,6 mg/ml.

3.2 Untersuchungen zur Bindung von glykLDL an sRAGE

Die in **Abbildung 3-2** dargestellte Bindung von DiI-glykLDL an den immobilisierten sRAGE unterschied sich signifikant von der Bindung an Kavitäten ohne immobilisiertes Protein bzw. mit immobilisiertem BSA. Die Bindung von glykLDL an sRAGE wurde durch eine 15-minütige Vorinkubation mit nicht markierten glykLDL signifikant gehemmt.

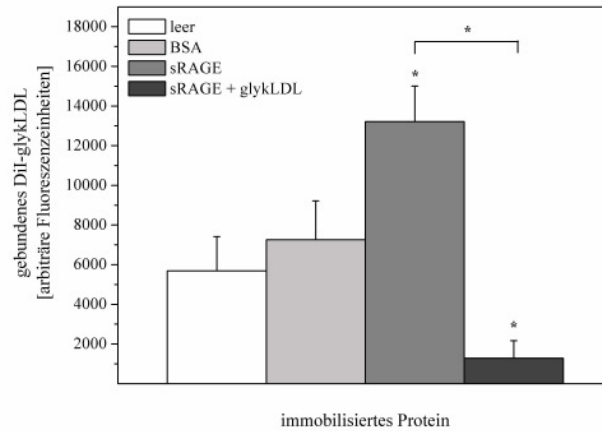


Abbildung 3-2 Bindung von DiI-glykLDL an immobilisiertes BSA, sRAGE und sRAGE unter gleichzeitiger Hemmung durch nicht markierte glykLDL im Vergleich zu Kavitäten ohne immobilisiertes Protein (leer). Dargestellt sind die Mittelwerte + SD aus drei unabhängigen Versuchen. Mit * gekennzeichnete Werte unterscheiden sich statistisch signifikant von der Kontrolle (Kavitäten ohne immobilisiertes Protein) bzw. untereinander.

3.3 Charakterisierung der Zelllinie 3T3-L1

Die 3T3-L1-Zellen ließen sich sowohl in RPMI-Medium als auch in DMEM kultivieren und differenzieren. Die Verdopplungszeit wurde mit Hilfe von Wachstumskurven (Abbildung 3-3) ermittelt und lag für beide Medien bei etwa 20 h. Auch zwischen den unterschiedlichen Passagen konnte bezüglich der Teilungsfähigkeit der Zellen kein deutlicher Unterschied festgestellt werden.

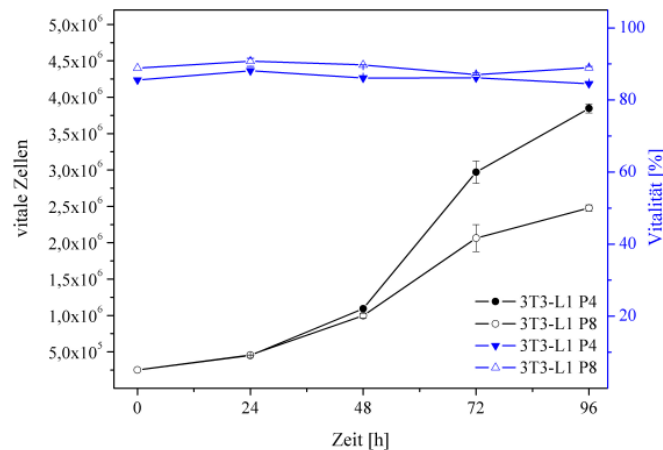


Abbildung 3-3 Repräsentative Wachstumskurve von 3T3-L1 Zellen der Passage 4 und 8 über 96 h. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD der vitalen Zellen und der Vitalität aus je zwei Einzelwerten eines Versuches.

Im Gegensatz zur Teilungsfähigkeit zeigte die Differenzierungsfähigkeit der Präadipozyten eine deutliche Abhängigkeit von der Passagenzahl. Mit zunehmender Passagenzahl nahm diese stark ab, so dass ab Passage 12 keine Fettvakuolen mehr ausgebildet wurden. Aufgrund dessen wurden für alle nachfolgend beschriebenen Experimente nur 3T3-L1-Zellen der Passagen 1 - 10 verwendet. Erste Fettvakuolen wurden am Tag drei nach Induktion der Differenzierung beobachtet. Am Tag neun nach Induktion der Differenzierung lagen etwa 70 % der Zellen als Adipozyten vor. Im weiteren Verlauf nahm die Anzahl der differenzierten Zellen zu, so dass am Tag 21 nach Induktion der Differenzierung etwa 95 % der Zellen mit Oil-Red O-anfärbbare Fettvakuolen aufwiesen (**Abbildung 3-4**).

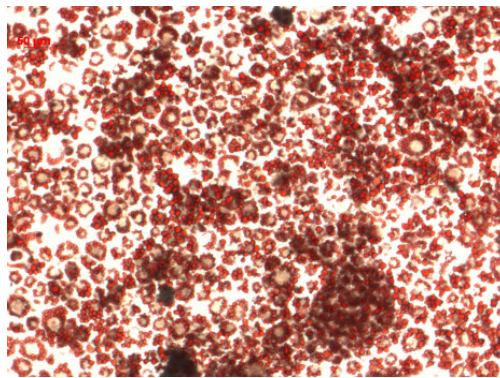


Abbildung 3-4 Repräsentative Aufnahme von Adipozyten (Passage 2) am Tag 21 nach Induktion der Differenzierung. Die Fettvakuolen wurden mit Oil-Red O angefärbt (Vergrößerung 1×5).

3.4 Relative Quantifizierung des Einflusses von nLDL und glykLDL auf die Differenzierung der 3T3-L1-Zellen

3.4.1 Quantifizierung mittels Öl-Rot-Färbung

Um den Einfluss von nLDL und glykLDL auf die Adipogenese der 3T3-L1-Zellen untersuchen zu können, war es nötig, diese relativ zu quantifizieren. Die während der Differenzierung gebildeten Fettvakuolen ließen sich mit Hilfe von Oil-Red O anfärben und somit besser sichtbar machen. Eine anschließende visuelle oder digitale Bildauswertung bzw. die spektrophotometrische Messung nach Extraktion des gebundenen Oil-Red O ermöglichte die relative Quantifizierung der Differenzierung.

Wie in **Abbildung 3-5** zu sehen ist, beeinflusste das Vorhandensein von 0,1 mg/ml nLDL bzw. glykLDL während der Differenzierung die Ausbildung von Fettvakuolen. Die Anwesenheit von nLDL und glykLDL wirkte sich hierbei unterschiedlich aus. Während die Ausbildung von Fettvakuolen unter nLDL deutlich vermindert war, konnten bei glykLDL im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (ohne LDL) mehr Fettvakuolen beobachtet werden. Dieses Ergebnis bestätigte sich in vier unabhängigen Versuchen.

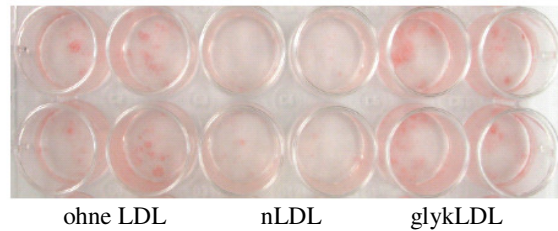


Abbildung 3-5 Repräsentative Aufnahme von Adipozyten am Tag 9 nach Induktion der Differenzierung. Die Fettvakuolen wurden mit Oil Red-O angefärbt.

Die Menge der mit Oil-Red O-angefärbten Fettvakuolen, als Marker für die Differenzierung, konnte lichtmikroskopisch mit Hilfe der AxioVision Release 4.6 Software („MosaiX-Modus“) quantifiziert werden. Es wurde der prozentuale Anteil der rot gefärbten Fläche an der Gesamtfläche bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass Adipozyten, die unter der Einwirkung von 0,1 mg/ml nLDL bzw. 0,1 mg/ml glykLDL differenziert wurden, weniger bzw. mehr Fettvakuolen aufwiesen als Adipozyten, deren Differenzierung nach dem Standardprotokoll erfolgte (**Abbildung 3-6**). Die Präadipozyten konnten, wie zu erwarten war, nicht mit Oil-Red O angefärbt werden (Daten nicht gezeigt).

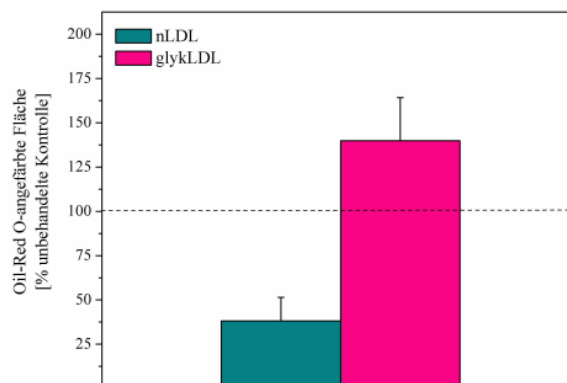


Abbildung 3-6 Einfluss von 0,1 mg/ml nLDL bzw. glykLDL auf die Menge der ausgebildeten Fettvakuolen. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD des Anteils der rot gefärbten Fläche an der Gesamtfläche als Prozentwert der unbehandelten Kontrolle (=100 %) aus drei unabhängigen Versuchen.

Das in den Fettvakuolen gebundene Oil-Red O konnte mit Hilfe von 4 % NP-40 in Isopropanol (w/v) wieder aus diesen herausgelöst werden. Die anschließende Bestimmung der Extinktion der extrahierten Farbstofflösung sollte die visuell festgestellten Unterschiede in der Anzahl der Fettvakuolen unter Einfluss von 0,1 mg/ml nLDL bzw. glykLDL bestätigen.

In Vorbereitung dessen wurde das Absorptionsmaximum der Oil-Red O-Lösung bestimmt. Wie aus **Abbildung 3-7** zu erkennen ist, lag das Absorptionsmaximum bei 517 nm. Alle folgenden Messungen wurden daher bei dieser Wellenlänge durchgeführt.

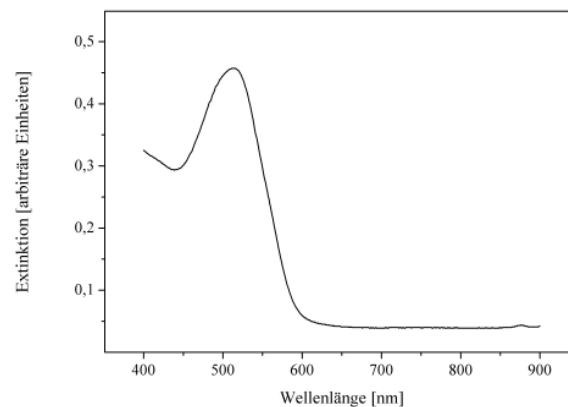


Abbildung 3-7 Repräsentatives Absorptionsspektrum der Oil-Red O-Lösung.

Wie in **Abbildung 3-8** zu sehen ist, war die Extinktion der extrahierten Oil-Red O-Lösungen unter Einwirkung von 0,1 mg/ml nLDL signifikant niedriger als bei Adipozyten, die nach dem Standardprotokoll differenziert wurden (unbehandelte Kontrolle = 100 %). Bei glykLDL hingegen wurde eine signifikant höhere Extinktion der Oil-Red O-Extrakte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gemessen. Die Bestimmung der Extinktion der extrahierten Oil-Red O-Lösungen bestätigte die bei der visuellen Auswertung gefundenen Unterschiede im Einfluss von nLDL und glykLDL auf die Adipogenese der 3T3-L1-Zellen.

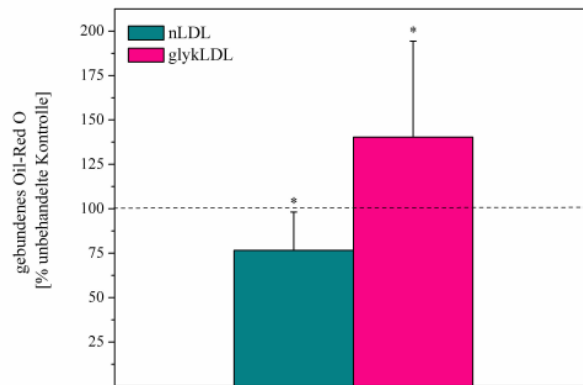


Abbildung 3-8 Einfluss von 0,1 mg/ml nLDL bzw. glykLDL auf die in den Fettvakuolen gebundene Menge an Oil-Red O. Dargestellt sind die Mittelwerte der Extinktionswerte bei 517 nm + SD als Prozentwert der unbehandelten Kontrolle (=100 %) aus vier unabhängigen Versuchen. Mit * gekennzeichnete Werte unterscheiden sich signifikant von der unbehandelten Kontrolle (ohne LDL).

3.4.2 Quantifizierung mittels Pref-1-mRNA-Expression

Die Quantifizierung der in den 3T3-L1-Zellen enthaltenen mRNA-Menge für Pref-1 wurde als weiterer Parameter gewählt, um den Einfluss von nLDL und glykLDL auf die Differenzierung der 3T3-L1-Zellen zu beurteilen.

Unter den gewählten Differenzierungsbedingungen nahm die Pref-1-mRNA-Menge im Verlauf der Differenzierung stetig zu (**Abbildung 3-9**). Am Tag neun nach Induktion der Differenzierung hatte sich die Pref-1-mRNA-Menge im Vergleich zur den 3T3-L1-Zellen am Tag null nach Induktion der Differenzierung etwa vervierfacht. Bei Anwesenheit von 0,1 mg/ml nLDL bzw. glykLDL während der Differenzierung kam es analog zur unbehandelten Kontrolle zu einem Anstieg der Pref-1-mRNA-Expression und es konnte kein Einfluss der LDL auf die Pref-1-mRNA-Menge nachgewiesen werden.

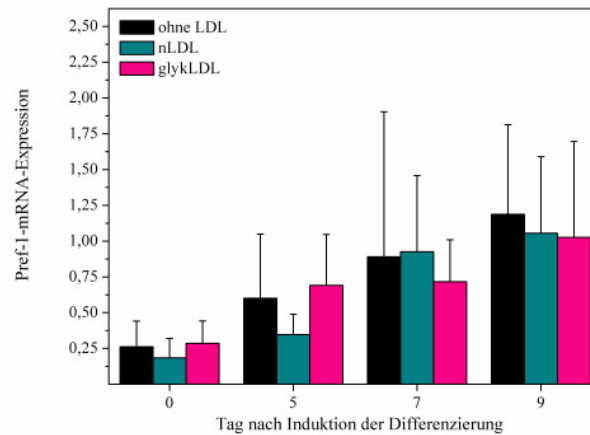


Abbildung 3-9 mRNA-Expression von Pref-1 am Tag 0, 5, 7 und 9 nach Induktion der Differenzierung von 3T3-L1-Zellen ohne bzw. mit Anwesenheit von 0,1 mg/ml nLDL bzw. glykLDL. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD der Expressionslevel, die als $2^{-\Delta Ct}$ berechnet wurden, aus mindestens vier Einzelwerten.

Des Weiteren wurde der Einfluss einer einstündigen Inkubation mit 0,1 mg/ml nLDL bzw. glykLDL auf die Pref-1-mRNA-Expression untersucht. Auch hier zeigten sich keine Unterschiede in der Pref-1-mRNA-Menge in Präadipozyten (Tag null) und Adipozyten (Tag neun) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (**Abbildung 3-10**).

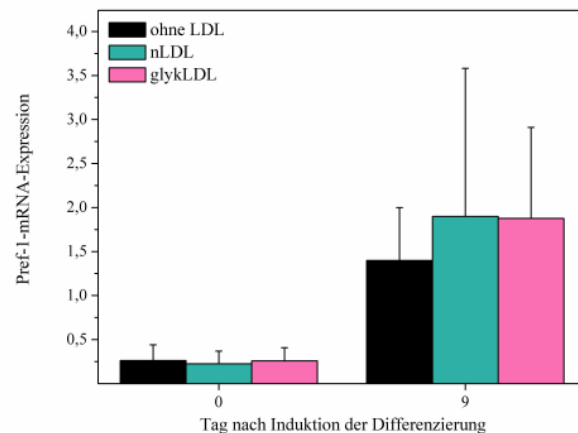


Abbildung 3-10 mRNA-Expression von Pref-1 am Tag 0 und 9 nach Induktion der Differenzierung von 3T3-L1-Zellen ohne bzw. mit 1-stündiger Inkubation mit 0,1 mg/ml nLDL bzw. glykLDL. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD der Expressionslevel, die als $2^{-\Delta Ct}$ berechnet wurden, aus mindestens vier Einzelwerten.

3.5 Zellaufnahme von nLDL und glykLDL durch 3T3-L1-Zellen

3.5.1 Zellaufnahmestudien mit [¹⁸F]Fluorbenzoyl-LDL ([¹⁸F]FB-LDL)

Zur Untersuchung der Aufnahme von nLDL und glykLDL durch die 3T3-L1-Zellen wurden diese durch eine 20-minütige Inkubation mit [¹⁸F]SFB vorrangig am N-terminalen Ende des ApoB-100 mit dem Positronen-Emitter ¹⁸F markiert (Abbildung 3-11) [86]. Das dabei entstehende [¹⁸F]FB-LDL verfügt über die gleiche biologische Aktivität und Funktionalität wie nicht markierte LDL [86]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass es infolge der ¹⁸F-Markierung zu keinen oxidativen Veränderungen des Lipid- oder Proteinanteils der LDL kommt [86].

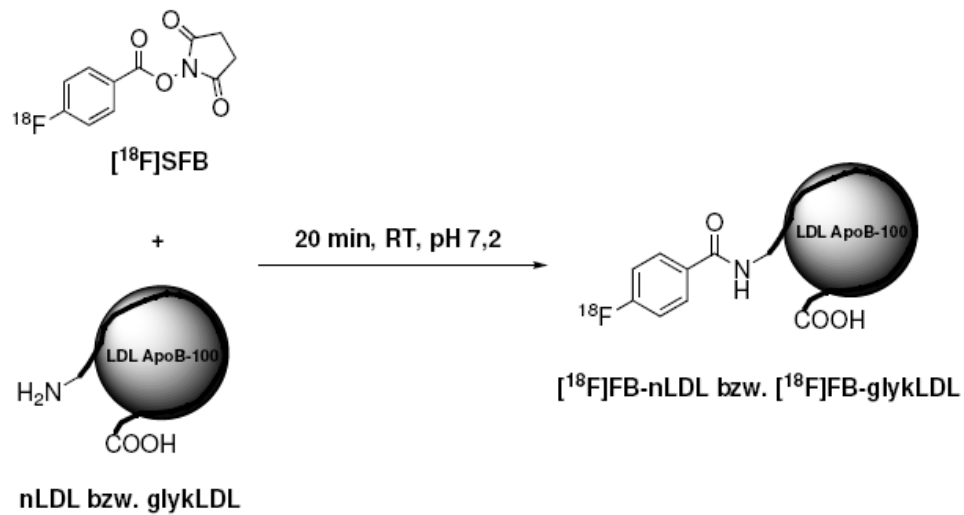


Abbildung 3-11 Reaktionsschema der radioaktiven Markierung von nLDL bzw. glykLDL am N-terminalen Ende des ApoB-100 mittels [¹⁸F]SFB.

Im Anschluss an die Markierung wurde der Reaktionsansatz mittels Gelfiltration gereinigt (**Abbildung 3-12**). Auf diese Weise konnte das gewünschte Produkt [^{18}F]FB-LDL (Peak eins) von nicht umgesetztem [^{18}F]SFB und Nebenprodukten wie [^{18}F]Fluorbenzoesäure (Peak zwei) getrennt werden [86].

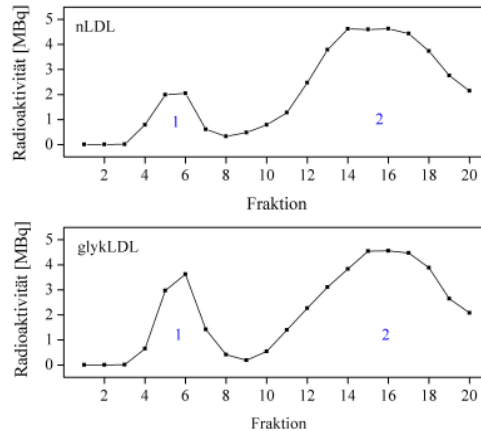


Abbildung 3-12 Repräsentative Radiochromatogramme nach Gelfiltration von [^{18}F]FB-nLDL (oben) und [^{18}F]FB-glykLDL (unten). Peak 1 umfasst [^{18}F]FB-LDL. Die Aktivität von Peak 2 resultiert aus nicht umgesetztem [^{18}F]SFB sowie Nebenprodukten wie [^{18}F]Fluorbenzoesäure.

Die halbwegszeitkorrigierte Markierungsausbeute lag für nLDL und glykLDL bei etwa 10 %. Die markierten und gereinigten [^{18}F]FB-LDL konnten nun für Zellaufnahmestudien eingesetzt werden. Die Inkubation der Zellen bei 4 °C gibt Aufschluss über die Bindung von [^{18}F]FB-LDL an auf der Zelloberfläche befindliche LDL-R und SR [60, 82]. Die Inkubation der Zellen bei 37 °C hingegen beinhaltet die Bindung und Internalisierung von [^{18}F]FB-LDL [82, 90]. Aus der Differenz der Messwerte bei 37 °C und 4 °C ergibt sich schließlich die Internalisierung (Aufnahme) durch die Zellen [60].

Wie aus **Abbildung 3-13** zu erkennen ist, wurden sowohl nLDL als auch glykLDL zeitabhängig von 3T3-L1-Zellen aufgenommen. Präadipozyten nahmen im Mittel etwa zehnmal mehr nLDL und glykLDL auf als Adipozyten am Tag neun nach Induktion der Differenzierung.

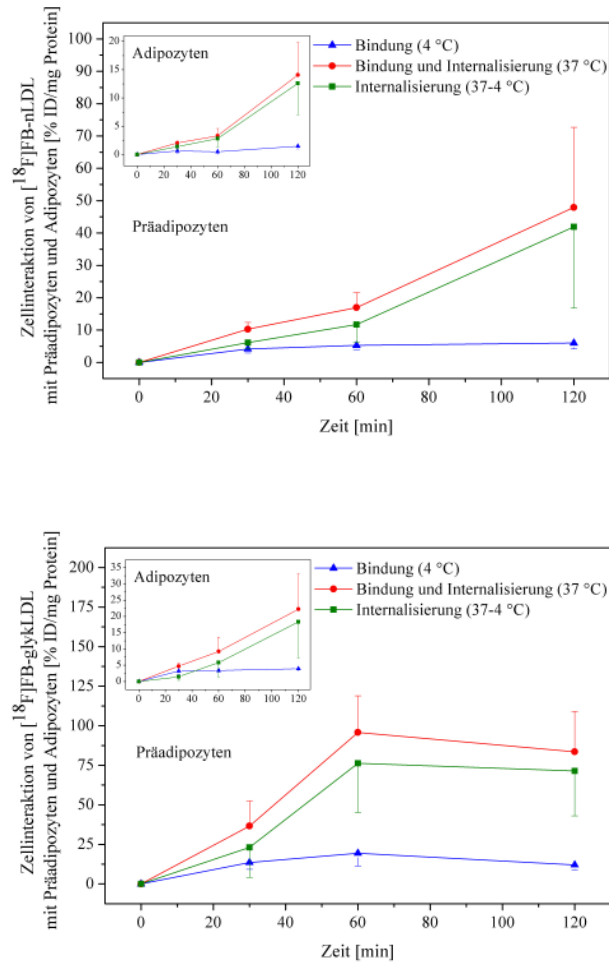


Abbildung 3-13 Repräsentative Zellaufnahmekurven von $[^{18}\text{F}]$ FB-nLDL (oben) und glykLDL (unten) an Präadipozyten und Adipozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der erhobenen Werte bei 4 °C und 37 °C sowie der daraus berechneten Differenz (37-4 °C) aus vier Einzelwerten eines Versuches.

Die Aufnahme von nLDL durch Präadipozyten war mit der von HepG2, einer humanen Hepatom-Zelllinie, die aufgrund ihrer vielen LDL-R für eine starke Aufnahme von nLDL bekannt ist [86], vergleichbar (**Abbildung 3-14**).

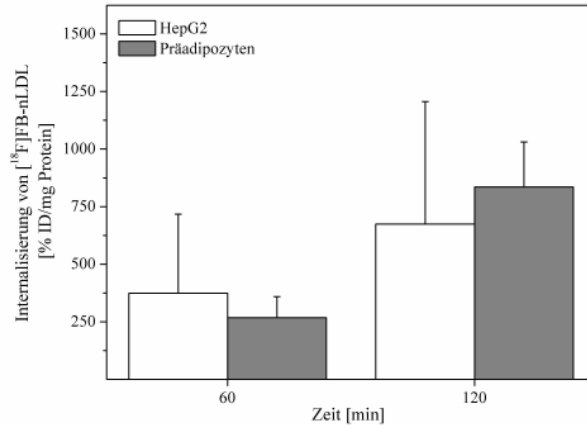


Abbildung 3-14 Internalisierung von $[^{18}\text{F}]\text{FB-nLDL}$ durch HepG2 und 3T3-L1-Präadipozyten nach 60 bzw. 120min. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD aus vier Einzelwerten.

Um Rückschlüsse auf die Beteiligung verschiedener Rezeptoren an der Aufnahme der nLDL bzw. glykLDL ziehen zu können, erfolgte vor Zugabe der $[^{18}\text{F}]\text{FB-nLDL}$ bzw. $[^{18}\text{F}]\text{FB-glykLDL}$ eine 15-minütige Vorinkubation mit verschiedenen Hemmstoffen. GlykBSA ist als Ligand für RAGE bekannt und wurde deshalb experimentell als Inhibitor für diesen eingesetzt [91]. Bei der Herstellung von malBSA kommt es zur Maleylierung von ϵ -Aminogruppen der Lysinreste des BSA und damit zu einer stärker negativen Gesamtladung des Proteins, welche die Interaktion mit einer Reihe von SR ermöglicht [54]. Im Gegensatz zu malBSA richten sich die polyanionischen Verbindungen Fucoidan, ein sulfatiertes Polysaccharid, und Polyinosinsäure, ein Polynukleotid, spezifisch gegen SR der Klasse A [76] und LOX-1 [78, 80]. NaOleat wurde als CD36-Inhibitor eingesetzt, da langkettige Fettsäuren, insbesondere Ölsäure, eine Affinität zu CD36 zeigen und die Bindung von oxLDL durch diesen hemmen [92]. Zur Beurteilung der Spezifität der Bindung wurde außerdem mit einem Überschuss an nicht markierten nLDL bzw. glykLDL vorinkubiert [82]. Aufgrund der Variation der relativen spezifischen Aktivität der $[^{18}\text{F}]\text{FB-LDL}$ zwischen den unabhängigen Versuchen wurde zur Beurteilung der Effekte der verschiedenen Hemmstoffe die Darstellung der Internalisierung als %-Wert von der ungehemmten Kontrolle (= 100 %) gewählt.

Die Auswertung drei unabhängiger Experimente ergab, dass die Aufnahme von nLDL durch Präadipozyten nach 120 min durch 100 µg glykBSA, 100 µg malBSA, 6 µg Fucoidan, 6 µg Polyinosinsäure und 100 µg nicht markierte nLDL signifikant gehemmt wurde (**Abbildung 3-15 oben**). MalBSA und der Überschuss an nicht markierten nLDL zeigten hierbei die stärksten Effekte. MalBSA bewirkte eine um etwa 60 % verminderte Aufnahme von nLDL im Vergleich zur ungehemmten Kontrolle. Die Aufnahme von nLDL durch Adipozyten wurde nach 120 min nur von dem Überschuss an nicht markierten nLDL signifikant gehemmt (**Abbildung 3-15 unten**). Auch glykBSA und malBSA zeigten tendenziell einen Hemmeffekt, der mit etwa 35 % für malBSA jedoch deutlich schwächer als bei den Präadipozyten ausfiel.

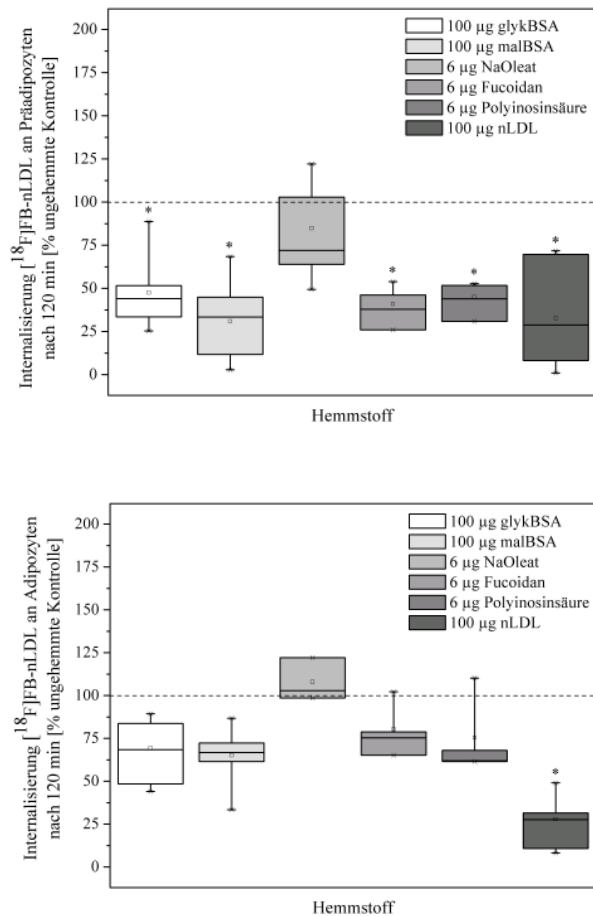


Abbildung 3-15 Internalisierung von [¹⁸F]FB-nLDL durch Präadipozyten (oben) und Adipozyten (unten) nach 120 min unter Einfluss verschiedener Hemmstoffe. Die Werte innerhalb der Box liegen zwischen der 25. und 75. Perzentile. Die Abweichungsbalken umfassen die 5. und 95. Perzentile. Dargestellt sind außerdem Median (mittlere Linie der Box) und Mittelwert (□) aus drei (Präadipozyten) bzw. zwei unabhängigen Versuchen (Adipozyten). Mit * gekennzeichnete Werte unterscheiden sich statistisch signifikant gegenüber der ungehemmten Kontrolle (= 100 %) mit p<0,05.

Die Aufnahme von glykLDL durch Präadipozyten wurde von glykBSA, malBSA, Polyinosinsäure und dem Überschuss an nicht markierten glykLDL signifikant gehemmt (**Abbildung 3-16 oben**). Den stärksten Effekt hatten die nicht markierten glykLDL sowie malBSA mit einer über 80 % bzw. etwa 75 % erniedrigten Aufnahme. Die Aufnahme von glykLDL durch Adipozyten wurde nur durch den Überschuss an nicht markierten glykLDL und malBSA signifikant gehemmt (**Abbildung 3-16 unten**). Jedoch fiel auch hier, analog zu den Untersuchungen mit [¹⁸F]FB-nLDL, der Hemmeffekt von malBSA mit fast 55 % im Vergleich zu den Präadipozyten schwächer aus.

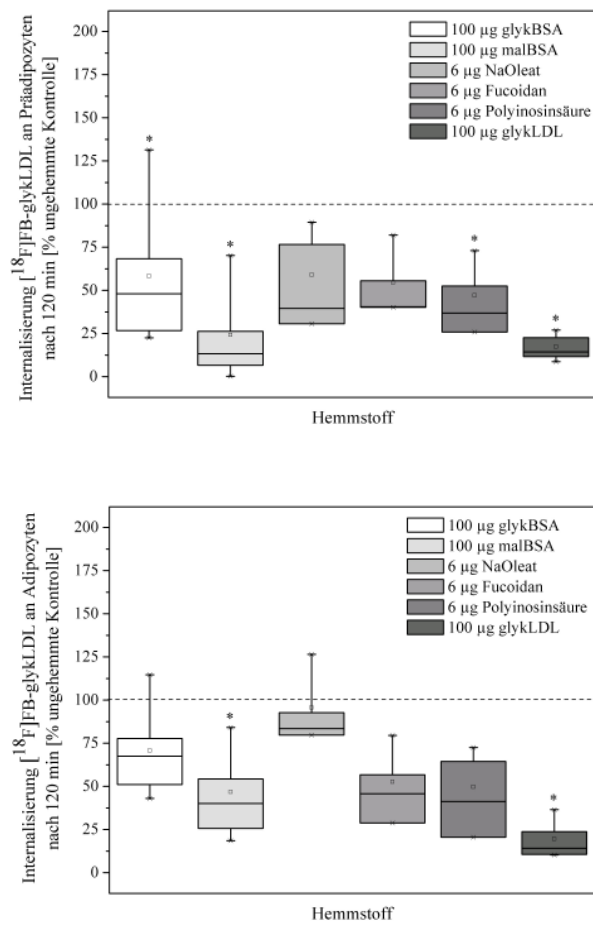


Abbildung 3-16 Internalisierung von [¹⁸F]FB-glykLDL durch Präadipozyten (oben) und Adipozyten (unten) nach 120 min unter Einfluss verschiedener Hemmstoffe. Die Werte innerhalb der Box liegen zwischen der 25. und 75. Perzentile. Die Abweichungsbalken umfassen die 5. und 95. Perzentile. Dargestellt sind außerdem Median (mittlere Linie der Box) und Mittelwert (□) aus drei (Präadipozyten) bzw. zwei unabhängigen Versuchen (Adipozyten). Mit * gekennzeichnete Werte unterscheiden sich statistisch signifikant gegenüber der ungehemmten Kontrolle (= 100 %) mit p<0,05.

3.5.2 Zellaufnahmestudien mit 1,1'-Diocetadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorat-LDL (DiI-LDL)

Neben der Markierung der LDL-Partikel mit [¹⁸F]SFB wurden diese auch mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiI markiert und für Zellaufnahmestudien eingesetzt. In **Abbildung 3-17** sind repräsentative Zellaufnahmekurven an Präadipozyten und Adipozyten dargestellt. DiI-nLDL und Di-glykLDL wurden, analog zu den Versuchen mit [¹⁸F]FB-LDL, zeitabhängig aufgenommen, wobei Präadipozyten deutlich mehr nLDL bzw. glykLDL aufnahmen als Adipozyten. Bei den 3T3-L1-Zellen am Tag neun nach Induktion der Differenzierung kam es sowohl für die DiI-nLDL als auch für die DiI-glykLDL zu einem verminderten Anstieg in den Aufnahmekurven, was auf eine Sättigung der zur Verfügung stehenden Rezeptoren hindeutete. Die Aufnahme von DiI-nLDL lag etwa um den Faktor zwei über der von DiI-glykLDL.

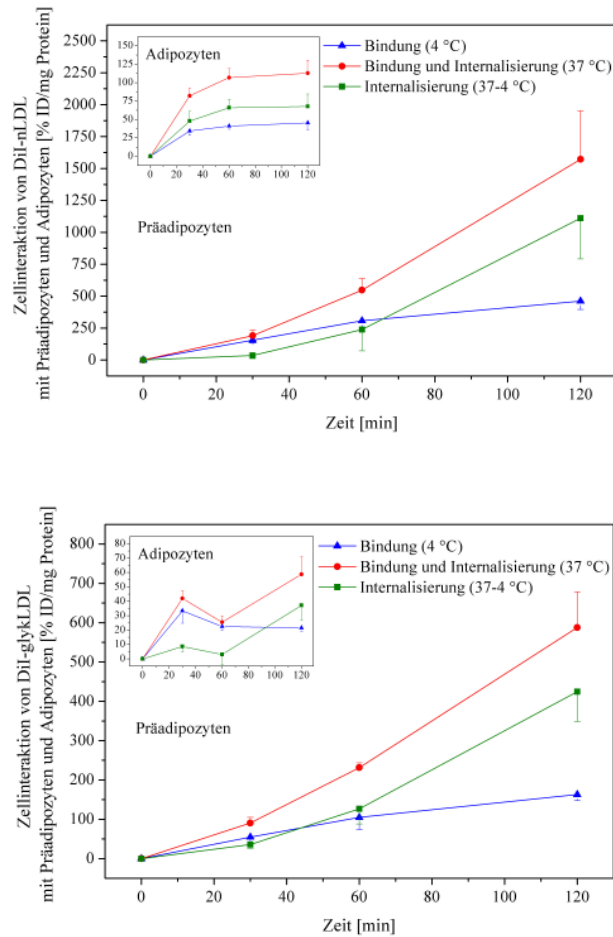


Abbildung 3-17 Repräsentative Zellaufnahmekurven von DiI-nLDL (oben) und DiI-glykLDL (unten) an Präadipozyten und Adipozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD der erhobenen Werte bei 4 °C und 37 °C sowie der daraus berechneten Differenz (37-4 °C) aus vier Einzelwerten eines Versuches.

Im Vergleich zu den Zellaufnahmekurven mit [^{18}F]FB-LDL (siehe Kapitel 3.5.1) zeigte sich bei den Zellaufnahmekurven mit DiI-LDL eine höhere Bindung bei 4 °C.

Wie aus den **Abbildungen 3-18** und **3-19** zu erkennen ist, konnte die Aufnahme der DiI-nLDL und DiI-glykLDL auch fluoreszenzmikroskopisch bestätigt werden. Insbesondere bei den glykLDL waren intrazellulär vesikuläre Strukturen zu erkennen, die sich in der Nähe des Zellkerns anreicherten.

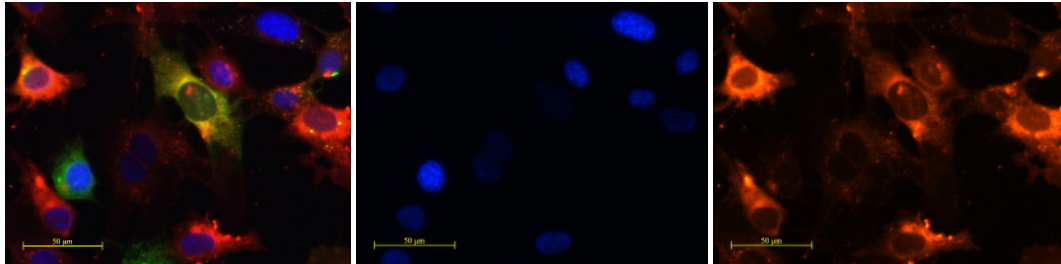


Abbildung 3-18 Präadipozyten nach 2 h Inkubation mit DiI-nLDL (orange) bei 37 °C. Zur besseren Visualisierung wurden die Zellkerne mit DAPI (blau) sowie die Zellmembran mit DiO (grün) angefärbt (Vergrößerung 1 × 40). Dargestellt sind links: DiI-nLDL, Zellkerne und Zellmembran; Mitte: Zellkerne und rechts: DiI-nLDL.

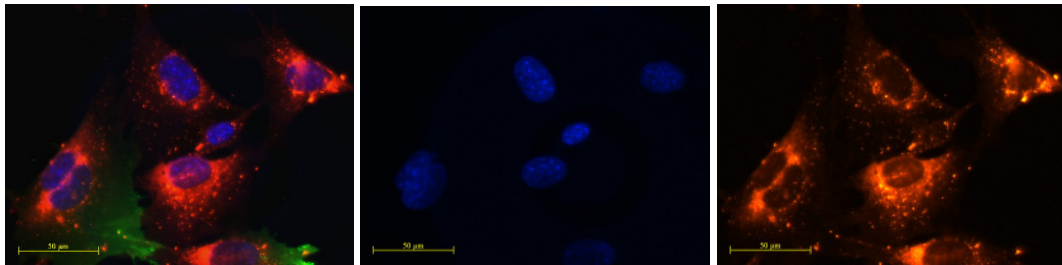


Abbildung 3-19 Präadipozyten nach 2 h Inkubation mit DiI-glykLDL (orange) bei 37 °C. Zur besseren Visualisierung wurden die Zellkerne mit DAPI (blau) sowie die Zellmembran mit DiO (grün) angefärbt (Vergrößerung 1 × 40). Dargestellt sind links: DiI-glykLDL, Zellkerne und Zellmembran; Mitte: Zellkerne und rechts: DiI-glykLDL.

Um weitere Informationen über die Beteiligung verschiedener Rezeptoren an der Aufnahme der nLDL und glykLDL in die 3T3-L1-Zellen zu bekommen, wurde auch bei den Versuchen mit DiI-LDL 15 min mit 100 µg glykBSA, 100 µg malBSA, 6 µg NaOleat, 6 µg Fucoidan, 6 µg Polyinosinsäure und 100 µg nicht markierten nLDL bzw. glykLDL vorinkubiert. Zusätzlich wurde mit 100 µg HDL gehemmt, da der SR-B1 eine hohe Affinität für HDL aufweist und auch zur Aufnahme von nLDL fähig ist [76]. Bei der Hemmung mit glykBSA wurden Aufnahmen von bis zu 250 % der ungehemmten Kontrolle ermittelt. Dies war ein Indiz für die Bindung von glykBSA durch in der DiI-LDL-Lösung enthaltenes, überschüssiges DiI. Aufgrund dessen wurden die Kavitäten mit glykBSA-Hemmung aus der Auswertung ausgeschlossen.

Wie in **Abbildung 3-20 (oben)** zu sehen ist, wurde die Bindung und Aufnahme der DiI-nLDL durch die Präadipozyten von malBSA, Fucoidan, HDL und dem Überschuss an nicht markierten nLDL signifikant gehemmt. Bei den Adipozyten wurde die DiI-nLDL-Bindung und -Aufnahme nur durch HDL und den Überschuss an nicht markierten nLDL signifikant gehemmt (**Abbildung 3-20 unten**). Für diese beiden Inhibitoren war die Stärke des Hemmeffekts bei Präadipozyten und Adipozyten vergleichbar. Alle anderen Hemmstoffe zeigen, analog zu den Versuchen mit [¹⁸F]FB-LDL, eine deutlich verminderte bzw. keine inhibitorische Wirkung bei den Adipozyten im Vergleich zu den Präadipozyten.

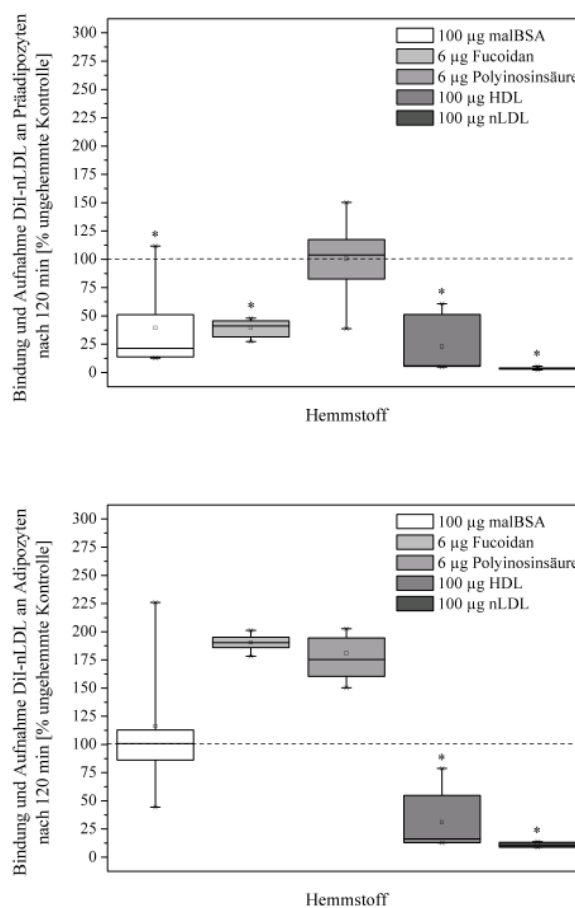


Abbildung 3-20 Bindung und Aufnahme von DiI-nLDL durch Präadipozyten (oben) und Adipozyten (unten) nach 120 min unter Einfluss verschiedener Hemmstoffe. Die Werte innerhalb der Box liegen zwischen der 25. und 75. Perzentile. Die Abweichungsbalken umfassen die 5. und 95. Perzentile. Dargestellt sind außerdem Median (mittlere Linie der Box) und Mittelwert (□) aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen. Mit * gekennzeichnete Werte unterscheiden sich statistisch signifikant gegenüber der ungehemmten Kontrolle (= 100 %) mit $p < 0,05$.

Wie aus **Abbildung 3-21 (oben)** zu erkennen ist, bewirkten malBSA, HDL und der Überschuss an nicht markierten glykLDL eine signifikante Hemmung der DiI-glykLDL-Aufnahme durch die Präadipozyten. Der Überschuss an nicht markierten glykLDL und HDL zeigte hierbei die stärksten Hemmeffekte. Bei den Adipozyten wirkte nur HDL und der Überschuss an nicht markierten glykLDL signifikant hemmend auf die Aufnahme von DiI-glykLDL (**Abbildung 3-21 unten**).

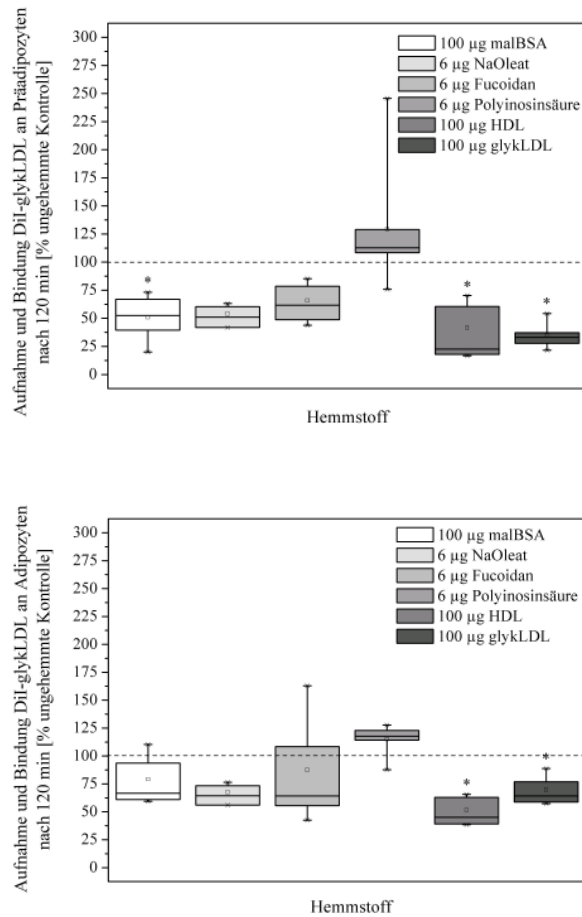


Abbildung 3-21 Bindung und Aufnahme von DiI-glykLDL durch Präadipozyten (oben) und Adipozyten (unten) nach 120 min unter Einfluss verschiedener Hemmstoffe. Die Werte innerhalb der Box liegen zwischen der 25. und 75. Perzentile. Die Abweichungsbalken umfassen die 5. und 95. Perzentile. Dargestellt sind außerdem Median (mittlere Linie der Box) und Mittelwert (□) aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen. Mit * gekennzeichnete Werte unterscheiden sich statistisch signifikant gegenüber der ungehemmten Kontrolle (= 100 %) mit $p < 0,05$.

3.6 Untersuchungen zur Rezeptorexpression an 3T3-L1-Zellen

3.6.1 Überprüfung der Primerfunktionalität

Um die Funktionalität und Spezifität der gewählten Primer zu überprüfen, wurde die in der RT-PCR gebildete cDNA in einem 2 %-igen Agarosegel aufgetrennt und anschließend durch Anfärben mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Wie aus **Abbildung 3-22** ersichtlich wird, wurde mit allen verwendeten Primern nur ein Produkt der erwarteten Größe gebildet. Die Funktionalität und Spezifität aller verwendeten Primer war somit nachgewiesen.

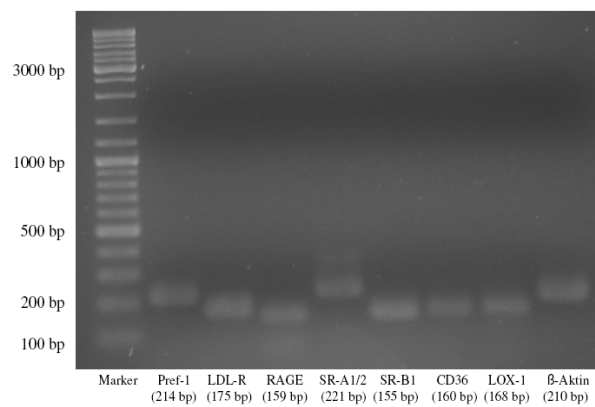


Abbildung 3-22 Repräsentative Auftrennung der cDNA-Fragmente für Pref-1, LDL-R, RAGE, SR-A1/2, SR-B1, CD36, LOX-1 und β -Aktin in einem 2 %-igen Agarosegel nach Anfärbung mit Ethidiumbromid.

3.6.2 Expression des LDL-R

Wie aus **Abbildung 3-23** zu entnehmen ist, zeigten Präadipozyten eine leicht niedrigere LDL-R-mRNA-Expression als Adipozyten am Tag neun nach Induktion der Differenzierung ($0,00951 \pm 0,00362$ vs. $0,00588 \pm 0,00063$). An den Präadipozyten bewirkte die Inkubation mit nLDL und glykLDL für 1 h bzw. 2 d keine deutliche Änderung der LDL-R-mRNA-Menge. Lediglich nach der einstündigen Inkubation mit den nLDL deutete sich eine verstärkte LDL-R-Expression an. Bei den Adipozyten hingegen war ein deutlicher Einfluss der Inkubation mit den LDL auf die LDL-R-mRNA-Menge zu verzeichnen. Während die einstündige Inkubation sowohl mit nLDL als auch mit glykLDL zu einer Zunahme der LDL-R-mRNA führte, wirkte sich die LDL-Inkubation für 9 d hemmend auf die LDL-R-mRNA-Expression aus.

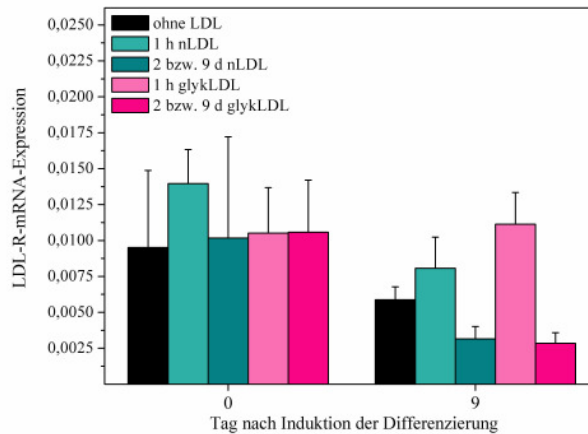


Abbildung 3-23 mRNA-Expression des LDL-R an Präadipozyten und Adipozyten unter Einfluss von nLDL bzw. glykLDL (1 h oder 2 (Präadipozyten) bzw. 9 d (Adipozyten)). Dargestellt sind die Mittelwerte + SD der Expressionslevel, die als $2^{-\Delta C_t}$ berechnet wurden, aus vier Einzelwerten.

3.6.3 Expression des RAGE

3.6.3.1 RAGE-mRNA-Expression

RAGE stellt den wahrscheinlich wichtigsten Rezeptor für die Signalübertragung der glykLDL ins Zellinnere dar. Aufgrund dessen wurde die Expression von RAGE sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene im Verlauf der Differenzierung der 3T3-L1-Zellen untersucht.

Wie in **Abbildung 3-24** zu sehen ist, stieg die mRNA-Expression von RAGE während der Differenzierung der 3T3-L1-Zellen leicht an ($2,99 \pm 1,68 \times 10^{-5}$ in Präadipozyten vs.

$9,75 \pm 6,02 \times 10^{-5}$ in Adipozyten). Die Anwesenheit von 0,1 mg/ml glykLDL führte am Tag sieben nach Induktion der Differenzierung zu einer deutlich niedrigeren mRNA-Expression. Ansonsten konnte kein Einfluss der LDL auf die RAGE-Expression nachgewiesen werden.

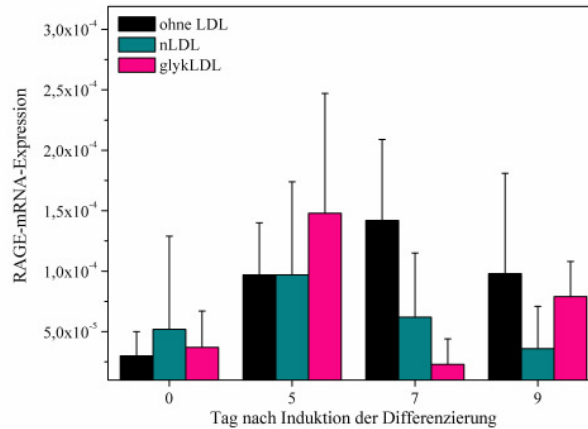


Abbildung 3-24 mRNA-Expression von RAGE am Tag 0, 5, 7 und 9 nach Induktion der Differenzierung von 3T3-L1-Zellen ohne bzw. mit 0,1 mg/ml nLDL bzw. glykLDL. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD der Expressionslevel, die als $2^{-\Delta Ct}$ berechnet wurden, aus mindestens vier Einzelwerten.

Die einstündige Inkubation der Präadipozyten und Adipozyten mit nLDL bzw. glykLDL führte zu keiner Veränderung der RAGE-mRNA-Expression (**Abbildung 3-25**).

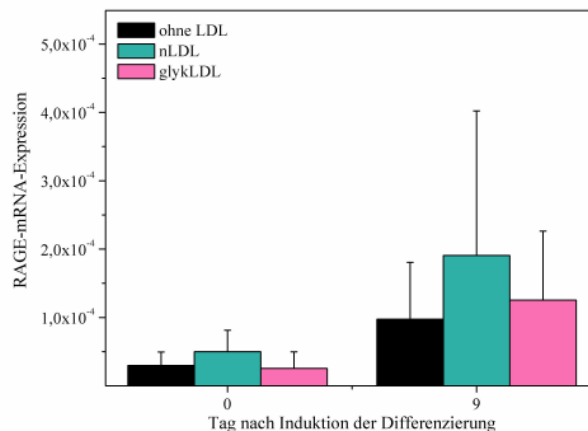


Abbildung 3-25 mRNA-Expression von RAGE am Tag 0 und 9 nach Induktion der Differenzierung von 3T3-L1 ohne bzw. mit 1h Inkubation mit 0,1 mg/ml nLDL bzw. glykLDL. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD der Expressionslevel, die als $2^{-\Delta Ct}$ berechnet wurden, aus mindestens vier Einzelwerten.

3.6.3.2 RAGE-Protein-Synthese

Zum Nachweis von RAGE und β -Aktin auf Proteinebene wurden 100 μ g Gesamtzelllysate von Präadipozyten und Adipozyten mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und nach Inkubation mit dem primären und sekundären Antikörper mittels Chemilumineszenz detektiert (**Abbildung 3-26**).

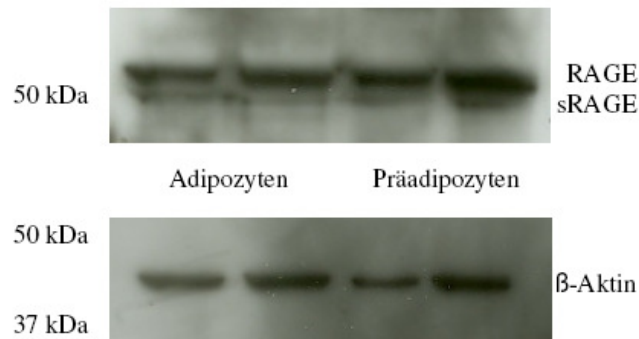


Abbildung 3-26 RAGE- und β -Aktin-Western Blot nach Chemilumineszenz-Entwicklung von 3T3-L1-Adipozyten und Präadipozyten.

Nach Normalisierung auf Aktin, welches als interne Kontrolle diente, konnte, wie aus **Abbildung 3-27** ersichtlich wird, gezeigt werden, dass Präadipozyten mehr RAGE-Protein als Adipozyten synthetisierten. Die Trends auf mRNA- und Proteinebene waren unter den gewählten Versuchsbedingungen gegenläufig.

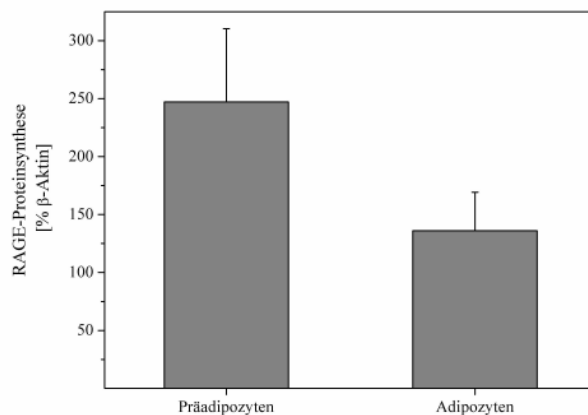


Abbildung 3-27 RAGE-Proteinsynthese von Präadipozyten und Adipozyten. Dargestellt sind die auf Aktin normalisierten Mittelwerte + SD aus zwei Einzelwerten.

Da eine Reproduktion unter den gleichen Versuchsbedingungen nicht gelang, wurde die eingesetzte Proteinmenge erhöht und ein stärkerer Entwickler kam zum Einsatz. Jedoch gelang es auch damit nicht, RAGE erneut nachzuweisen.

3.6.4 Expression der SR-A1/A2

Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnte in den 3T3-L1-Zellen keine Expression des SR-A1/2 auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Zur Überprüfung der Funktionalität der Primer wurden diese an RAW-Makrophagen³ getestet. Sowohl die RT-PCR als auch die anschließende Agarose-Gelelektrophorese bestätigten die Bildung eines einzigen Produktes mit der erwarteten Größe von 221 bp.

3.6.5 Expression des CD36

Während RAGE für die Signalübertragung von glykLDL ins Zellinnere favorisiert wurde, wurde angenommen, dass CD36 für die Internalisierung der glykLDL von Bedeutung ist, da dieser Multi-Ligand-Rezeptor auch zur Aufnahme von oxLDL und AGE-BSA fähig ist. Aufgrund dessen wurde die CD36-mRNA-Expression im Verlauf der Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten untersucht.

Abbildung 3-28 zeigt den starken Anstieg der CD36-mRNA-Menge während der Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten. Letztere wiesen etwa die 2.400-fache CD36-mRNA-Menge auf als Präadipozyten. Sowohl nLDL als auch glykLDL bewirkten am Tag fünf nach Induktion der Differenzierung tendenziell einen Anstieg der CD36-mRNA-Menge. Für nLDL konnte zu den anderen Zeitpunkten kein Einfluss auf die in den Zellen enthaltene CD36-mRNA-Menge nachgewiesen werden, wohingegen glykLDL am Tag sieben und neun ebenfalls zu einer tendenziell erhöhten CD36-mRNA-Expression führten.

³ Das RNA-Isolat von RAW-Makrophagen wurde freundlicherweise von Dipl.-Biologin Susann Wolf zur Verfügung gestellt.

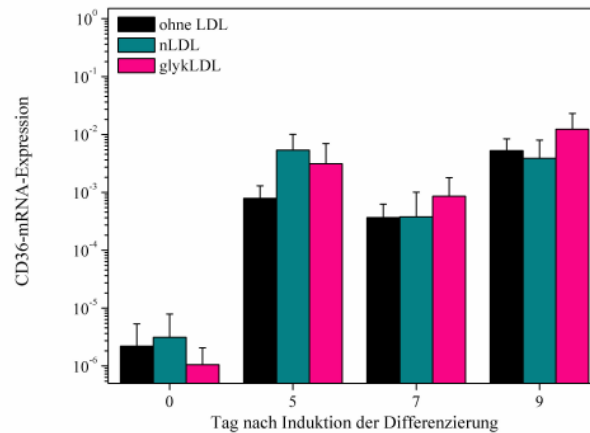


Abbildung 3-28 mRNA-Expression von CD36 am Tag 0, 5, 7 und 9 nach Induktion der Differenzierung von 3T3-L1-Zellen ohne bzw. mit 0,1 mg/ml nLDL bzw. glykLDL. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD der Expressionslevel, die als $2^{-\Delta Ct}$ berechnet wurden, aus mindestens vier Einzelwerten.

Die einstündige Inkubation der Zellen mit 0,1 mg/ml nLDL bzw. glykLDL brachte keine deutliche Veränderung in der CD36-mRNA-Expression von Präadipozyten und Adipozyten (**Abbildung 3-25**). Tendenziell konnte jedoch bei den Präadipozyten eine erhöhte CD36-mRNA-Expression durch nLDL und bei den Adipozyten durch nLDL und glykLDL festgestellt werden.

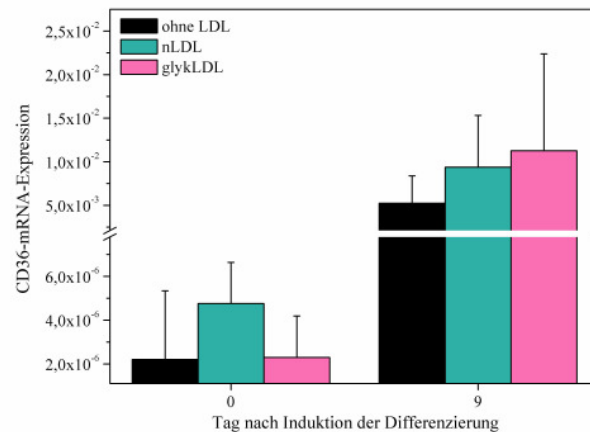


Abbildung 3-29 mRNA-Expression von CD36 am Tag 0 und 9 nach Induktion der Differenzierung von 3T3-L1-Zellen ohne bzw. mit 1h Inkubation mit 0,1 mg/ml nLDL bzw. glykLDL. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD der Expressionslevel, die als $2^{-\Delta Ct}$ berechnet wurden, aus mindestens vier Einzelwerten.

3.6.6 Expression des SR-B1

Die Auswertung der Expression des SR-B1 auf mRNA-Ebene (**Abbildung 3-30**) zeigte, dass es keinen deutlichen Unterschied zwischen Präadipozyten und Adipozyten gab. Die Inkubation der Präadipozyten mit 0,1 mg/ml nLDL und glykLDL für 1 h oder 2 d brachte keine deutliche Veränderung der Rezeptor-Expression. Tendenziell schien sich die einstündige Inkubation jedoch eher hemmend und die Inkubation über 2 d eher stimulierend auf die Expression des SR-B1 auf mRNA-Ebene ausgewirkt zu haben. Bei den Adipozyten hingegen war ein gegenläufiger Trend zu beobachten. Hier führte die einstündige Inkubation mit nLDL und glykLDL zu einer Stimulation der Rezeptor-Expression.

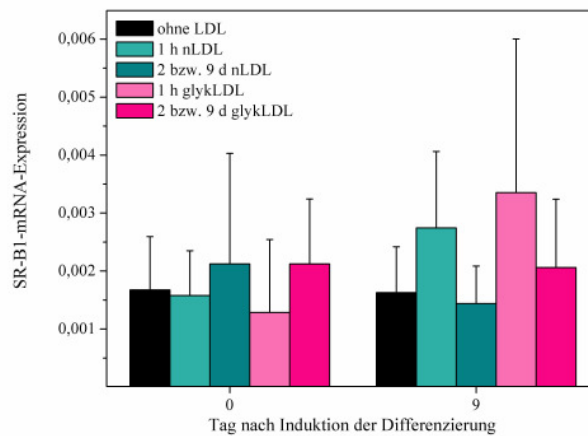


Abbildung 3-30 mRNA-Expression des SR-B1 am Tag 0 und 9 nach Induktion der Differenzierung unter Einfluss von nLDL bzw. glykLDL (1 h oder 2 (Präadipozyten) bzw. 9 d (Adipozyten)). Dargestellt sind die Mittelwerte + SD der Expressionslevel, die als $2^{-\Delta Ct}$ berechnet wurden, aus vier Einzelwerten.

3.6.7 Expression des LOX-1

Wie aus **Abbildung 3-31** zu erkennen ist, konnte auch die Expression von LOX-1 auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Wie bei CD36 kam es während der Differenzierung der 3T3-L1-Zellen zu einer Verstärkung der Rezeptor-Expression. Bei den Präadipozyten (Tag null) wirkte nur die Anwesenheit von nLDL über 2 d stimulierend auf die LOX-1-Transkription. Im Gegensatz dazu führten bei den Adipozyten sowohl die einstündige Inkubation mit nLDL und glykLDL als auch die Anwesenheit von glykLDL während der ganzen Differenzierung zu einer tendenziell erhöhten LOX-1-mRNA-Menge.

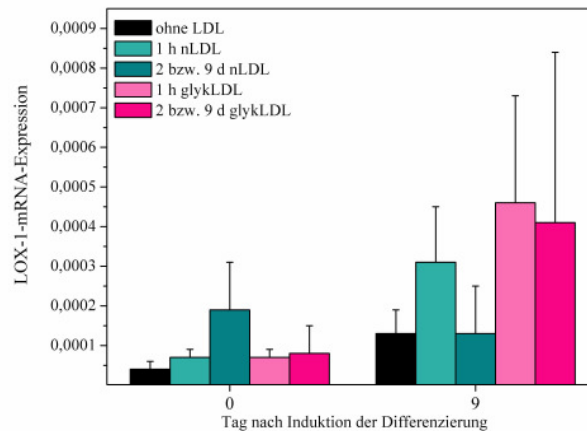


Abbildung 3-31 mRNA-Expression des LOX-1 am Tag 0 und 9 nach Induktion der Differenzierung unter Einfluss von nLDL bzw. glykLDL (1 h Inkubation oder über 2 bzw. 9 d). Dargestellt sind die Mittelwerte + SD der Expressionslevel, die als $2^{-\Delta C_t}$ berechnet wurden, aus vier Einzelwerten.

3.6.8 Vergleich der Expression der verschiedenen Rezeptoren

Der Vergleich der mRNA-Expression der verschiedenen potenziellen Rezeptoren für nLDL und glykLDL (**Abbildung 3-32**) ergab, dass der LDL-R und der SR-B1 von Präadipozyten und Adipozyten relativ stark exprimiert wurden und dass die Transkription dieser beiden Gene in Präadipozyten etwas stärker als in Adipozyten (LDL-R) bzw. mit der in Adipozyten vergleichbar war (SR-B1). Bei RAGE, CD36 und LOX-1 hingegen kam es im Verlauf der Differenzierung zu einem leichten bzw. sehr starken Anstieg der mRNA-Expression. Präadipozyten exprimierten die Gene für den LDL-R, SR-B1, LOX-1, RAGE und CD36 in abnehmender Reihenfolge. Bei den Adipozyten wurden der LDL-R und CD36 in etwa gleichem Maße exprimiert, gefolgt vom SR-B1, LOX-1 und RAGE.

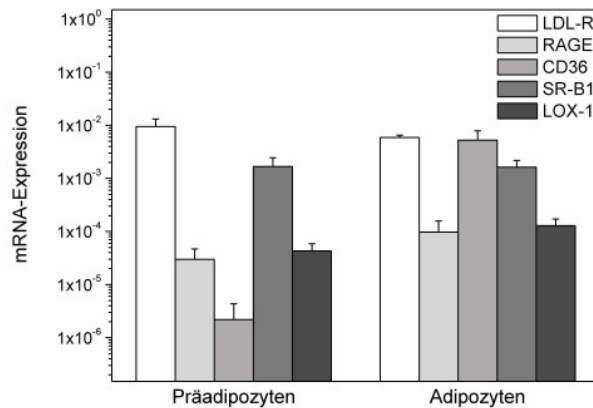


Abbildung 3-32 Überblick über die mRNA-Expression der untersuchten Rezeptoren an Präadipozyten und Adipozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD der Expressionslevel, die als $2^{-\Delta Ct}$ berechnet wurden, aus mindestens vier Einzelwerten.

3.7 Untersuchungen zur Sekretion von IL-6 und TNF- α mittels quantitativem „Sandwich“-ELISA

3.7.1 Maus-IL-6-Immunoassay

Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnte in den Zellüberständen der Adipozyten nach 4 h (+ glykLDL), nach 8 h (ohne LDL) und nach 24 h (+ glykLDL) IL-6 nachgewiesen werden. Die dabei bestimmten IL-6-Konzentrationen lagen bei 20,32; 28,13 und 6,48 pg/ml Zellüberstand. Für Präadipozyten konnte zu keinem Zeitpunkt eine IL-6-Sekretion nachgewiesen werden.

3.7.2 Maus-TNF- α -Immunoassay

TNF- α konnte unter den gewählten Versuchsbedingungen in den Zellüberständen, die nach 4 h (+ glykLDL) und 8 h (+ glykLDL) von den Adipozyten abgenommen worden waren, nachgewiesen werden. Die gemessenen Konzentrationen lagen bei 21,43 und 15,46 pg/ml Zellüberstand. Die von den Präadipozyten sezernierte Menge an TNF- α lag, analog zu IL-6, unter oder nur geringfügig über der Nachweisgrenze des verwendeten Immunoassays. Bei Präadipozyten konnte auch für TNF- α zu keinem Zeitpunkt eine Sekretion nachgewiesen werden.

3.8 Untersuchungen zum *in vivo*-Katabolismus von [¹⁸F]FB-nLDL und [¹⁸F]FB-glykLDL (Bioverteilung)

Zur Beurteilung der Unterschiede im Katabolismus von nLDL und glykLDL *in vivo* wurden Untersuchungen zur Bioverteilung von [¹⁸F]FB-nLDL bzw. [¹⁸F]FB-glykLDL an jeweils acht männlichen Wistar-Unilever-Ratten durchgeführt. Jeweils vier Tiere wurden 5 bzw. 60 min nach Injektion der [¹⁸F]FB-LDL getötet, die Organe entnommen und deren Radioaktivität mittels Wizard™3'' *Gamma Counter* bestimmt. Während innerhalb von 5 min nur eine Perfusion der Organe möglich ist, resultieren die Werte nach 60 min aus einer Anreicherung und Elimination in den entsprechenden Organen.

Abbildung 3-33 und 3-34 veranschaulichen die Radioaktivitätskonzentration ausgewählter Organe 5 bzw. 60 min p.i. von [¹⁸F]FB-nLDL bzw. [¹⁸F]FB-glykLDL.

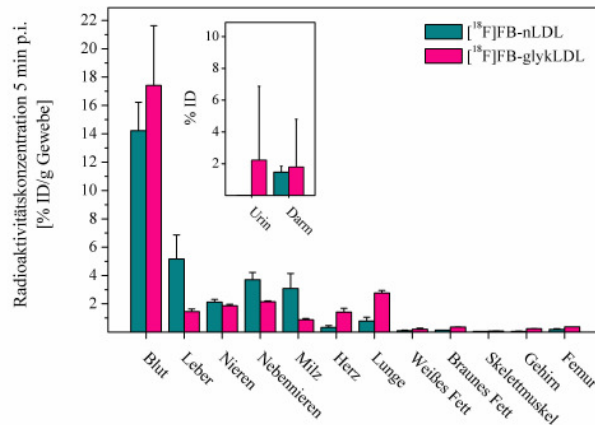


Abbildung 3-33 Radioaktivitätskonzentration verschiedener Organe 5 min p.i. von [¹⁸F]FB-nLDL bzw. [¹⁸F]FB-glykLDL. Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Radioaktivitätskonzentration als % ID/g Gewebe bzw. als % ID + SD von jeweils vier Versuchstieren. Die Radioaktivitätskonzentration im Urin wurde auf das Gesamtvolumen an Urin hochgerechnet.

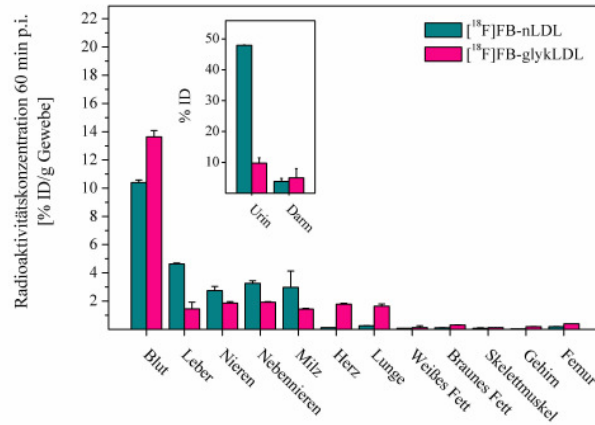


Abbildung 3-34 Radioaktivitätskonzentration verschiedener Organe 60 min p.i. von $[^{18}\text{F}]$ FB-nLDL bzw. $[^{18}\text{F}]$ FB-glykLDL. Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Radioaktivitätskonzentration als % ID/g Gewebe bzw. als % ID + SD von jeweils vier Versuchstieren. Die Radioaktivitätskonzentration im Urin wurde auf das Gesamtvolumen an Urin hochgerechnet.

Im Vergleich zu den $[^{18}\text{F}]$ FB-nLDL wiesen die $[^{18}\text{F}]$ FB-glykLDL eine längere Verweilzeit im Plasma auf. Während bei den $[^{18}\text{F}]$ FB-nLDL 60 min p.i. noch etwa 10 % der ID/g Gewebe im Blut enthalten waren, waren dies bei den $[^{18}\text{F}]$ FB-glykLDL fast 14 %. Im Gegensatz dazu reicherten sich die $[^{18}\text{F}]$ FB-nLDL stärker in der Leber, den Nieren, den Nebennieren und der Milz an. Im Herz konnte zu beiden Zeitpunkten für die $[^{18}\text{F}]$ FB-glykLDL eine höhere Radioaktivitätskonzentration gemessen werden. Auffällig war auch die deutlich höhere Affinität von $[^{18}\text{F}]$ FB-glykLDL zur Lunge. Im Fettgewebe, in der Skelettmuskulatur sowie im Gehirn und Femur kam es zu keiner nennenswerten Anreicherung von $[^{18}\text{F}]$ FB-nLDL und $[^{18}\text{F}]$ FB-glykLDL. Während sich bei den $[^{18}\text{F}]$ FB-nLDL nach 5 min nur im Darm radioaktive Metabolite der LDL nachweisen ließen, überwog nach 60 min deren renale Ausscheidung. Im Gegensatz dazu war die messbare Radioaktivitätskonzentration bei $[^{18}\text{F}]$ FB-glykLDL für Urin und Darm nach 5 und 60 min vergleichbar, wobei die renal ausgeschiedenen Metabolite auch hier nach 60 min überwogen. Beide Substanzen wurden also nach entsprechender Metabolisierung sowohl hepatobiliär als auch renal ausgeschieden.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Effekte geringfügig glykatisierter LDL auf die humane Adipogenese am Modell der murinen 3T3-L1-Zellen zu untersuchen. Dabei konnte gezeigt werden, dass glykLDL im Gegensatz zu nLDL die Adipogenese der 3T3-L1-Zellen stimulierten. Dies ist ein wichtiges Indiz für eine Verbindung zwischen zwei wichtigen Facetten des Metabolischen Syndroms, dem DM Typ 2 und der Adipositas. Die Diagnose des DM Typ 2 erfolgt anhand des oralen Glukose-Toleranz-Testes (oGTT). Definitionsgemäß liegt ein DM vor, wenn der Blutglukosespiegel 120 min nach oraler Gabe von 75 g in Wasser gelöster Glukose $\geq 11,1$ mM liegt [93]. Patienten mit einem Blutzuckerspiegel $\geq 7,8$ und $< 11,1$ mM 120 min nach Gabe der Glukose-Lösung leiden unter einer IGT, einer Vorstufe des manifesten DM Typ 2 [93]. Die bei diesen Blutglukosespiegeln *in vivo* stattfindenden, glykatischen Veränderungen der zirkulierenden LDL wurden durch eine *in vitro*-Glykatisierung der humanen LDL in einer 200 mM Glukose-Lösung über einen Zeitraum von 6 d simuliert. Bucala und Kollegen bestimmten bei LDL, die für 7 d in einer 200 mM Glukoselösung inkubiert wurden, etwa 10 AGE-Apo-B U/mg Protein [59]. Im Vergleich dazu wiesen sie bei Patienten mit DM Typ 2 im Mittel 4 AGE-ApoB U/mg Protein nach [59]. Obwohl 200 mM Glukose also weit über dem physiologischen Blutglukosespiegel eines nüchternen, gesunden Menschen von etwa 4,5 - 6,1 mM [93] lagen, konnte davon ausgegangen werden, dass damit Glykatisierungsgrade erreicht wurden, die mit denen von LDL aus Patienten mit IGT oder DM Typ 2 vergleichbar waren. Von den Glukose-induzierten Modifikationen waren sowohl der Protein- (ApoB-100) als auch der Lipidanteil der LDL betroffen. Dies wurde ebenfalls durch Bucala und Kollegen an *in vitro*-glykatisierten LDL und auch an LDL aus Patienten mit DM nachgewiesen [52]. Bei den Veränderungen am ApoB-100 handelt es sich v. a. um frühe glykative Veränderungen innerhalb der Maillard-Reaktion, wie z.B. die Bildung von N^ε-Carboxymethyl-Lysin (CML) [62]. Es konnte davon ausgegangen werden, dass nicht alle in der Probe enthaltene LDL-Partikel von den glykatischen Veränderungen betroffen waren. Durch die Glykatisierung kam es zwar zu einer Verminderung, nicht jedoch zu einem vollständigen Verlust der Affinität der glykLDL zum LDL-R. Auch leichte oxidative Veränderungen am ApoB-100 konnten unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht ausgeschlossen werden, so dass es sich bei den glykLDL im Grunde um glykLDL mit geringfügigen oxidativen Veränderungen handelte, welche

auch *in vivo* von Bedeutung sind. Letzteres zeigten Untersuchungen, in denen bei Patienten mit IGT im Vergleich zu normoglykämischen Personen erhöhte Mengen an glykoxidierten LDL nachgewiesen werden konnten [94].

Als Modell für die humane Adipogenese diente die murine Zelllinie 3T3-L1, welche 1973 durch Green und Kollegen als Klon der murinen Fibroblastenzelllinie 3T3 isoliert wurde [95]. Die Zellen zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, Triglyzeride in Form von Fettvakuolen zu speichern und sich somit morphologisch und physiologisch von präadipozyten- zu adipozytenartigen Zellen zu differenzieren [34]. Die Differenzierung der Zellen erfolgte mit einer, in der Literatur oft beschriebenen, Kombination aus Insulin, IBMX und DEX in Zellkulturmedium. Während Insulin über den *insulin like growth-factor 1* (IGF-1)-Rezeptor wirkt, stimuliert der synthetische Glukokortikoid-Agonist DEX über den Glukokortikoid-Rezeptor die Bildung von zyklischem Adenosin-Monophosphat (cAMP) [32, 37]. Bei IBMX handelt es sich um einen Phosphodiesterase-Hemmer, der somit den Abbau von cAMP verhindert [24, 36]. Die Adipogenese-induzierende Wirkung dieses Differenzierungsmediums konnte bestätigt werden, wobei sich kein deutlicher Einfluss des im Differenzierungsmedium enthaltenen Zellkulturmediums auf die Differenzierungsfähigkeit der Zellen nachgewiesen ließ. Constant und Kollegen hingegen zeigten, dass es bei der Differenzierung in RPMI-Medium zu einer stärkeren Lipidanreicherung während der Adipogenese kommt als in DMEM [30]. Weitaus wichtiger als die Art des Mediums war hingegen die Passagenzahl der Zellen für deren Differenzierungsfähigkeit. Letztere nahm mit zunehmender Passagenzahl drastisch ab, so dass etwa ab Passage 12 keine Fettvakuolen mehr gebildet wurden. Ohne weitere Angabe von Gründen verwendeten auch Constant und Kollegen nur 3T3-L1-Zellen niedriger Passagen [30].

In Anlehnung an die Arbeit von Masella und Kollegen, die 2006 erstmalig einen Einfluss von oxLDL auf die Differenzierung von 3T3-L1-Zellen nachweisen konnten [96], sollte in der vorliegenden Arbeit geprüft werden, ob geringfügig glykatierte LDL, wie sie bei Patienten mit IGT oder DM vorkommen, ebenfalls einen Einfluss auf die Differenzierung der 3T3-L1-Zellen haben. Masella und Kollegen zeigten, dass oxLDL die Differenzierung der 3T3-L1-Zellen hemmen und im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu einer erhöhten Pref-1-mRNA-Expression führen [96]. Leider wurden durch die Arbeitsgruppe keine vergleichenden Untersuchungen mit nLDL

publiziert. Um unterscheiden zu können, ob eventuelle Effekte durch die LDL an sich oder die daran induzierten glykativen Veränderungen hervorgerufen wurden, erfolgten in der vorliegenden Arbeit alle Untersuchungen an nLDL und glykLDL parallel. Die lichtmikroskopische und spektrophotometrische Auswertung ergab, dass nLDL die Ausbildung von Fettvakuolen signifikant verminderten, während glykLDL diese hoch signifikant verstärkten. Aus dem Vergleich der Ergebnisse von Masella und Kollegen und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wird deutlich, dass sich oxLDL und glykLDL gegenteilig auf die Differenzierung von 3T3-L1-Zellen auswirkten. Da glykLDL nachweislich susceptibler für nachfolgende oxidative Veränderungen sind [56], würde die Untersuchung des Einflusses glykoxidierter LDL auf die Differenzierung der 3T3-L1-Zellen eine interessante Fragestellung für weiterführende Experimente darstellen. Stanton und Kollegen untersuchten den Einfluss von nLDL auf die Adipogenese von 3T3-L1-Zellen. Während in der vorliegenden Arbeit eine inhibitorische Wirkung der nLDL auf die Adipogenese nachgewiesen werden konnte, zeigten die Untersuchungen von Stanton und Kollegen, dass nLDL die Ausbildung von Fettvakuolen sowie die Aktivität der Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase, einem wichtigen Enzyms der Triglyzeridsynthese, verstärken [97]. Unter den LDL-Subfraktionen erwiesen sich v. a. die LDL im Dichtebereich von 1,037 mg/ml bis 1,060 mg/ml als Adipogenese-fördernd [98]. Im Vergleich zu den für die vorliegende Arbeit verwendeten LDL (Dichtebereich >1,006 - 1,063 mg/ml), verwendeten Stanton und Kollegen somit die kleineren, dichteren LDL-Subtypen, die für ihre Atherogenität bekannt sind. Die Isolation der LDL für die vorliegende Arbeit erfolgte mittels VFU, welche eine Gesamtpräparationszeit von etwa 3 h benötigt. Dadurch konnten oxidative Veränderungen der LDL weitestgehend reduziert werden. Im Gegensatz dazu erfolgte die LDL-Präparation durch Stanton und Kollegen über einen Zeitraum von über 40 h, wodurch oxidative Veränderungen dieser LDL nicht ausgeschlossen werden konnten. Insgesamt sind die Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen aufgrund der unterschiedlichen Differenzierungs-, LDL-Präparations- und LDL-Modifikationsbedingungen nur bedingt vergleichbar. Zum Zeitpunkt der Erstellung der vorliegenden Arbeit lagen keine Berichte anderer Arbeitsgruppen über die Effekte von glykLDL auf die Differenzierung von 3T3-L1-Zellen vor, weshalb dies Gegenstand der vorliegenden Arbeit sein sollte.

Pref-1 wurde 1993 von Smas und Sul als transmembranes Protein identifiziert, dass sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene nur von Präadipozyten, nicht jedoch von Adipozyten exprimiert wird [99]. Aufgrund dessen wurde die mRNA-Expression von Pref-1 als Parameter für die Differenzierung der 3T3-L1-Zellen ausgewählt. Ziel war es, zusätzlich zur lichtmikroskopischen und spektrophotometrischen Auswertung, den Einfluss der nLDL und glykLDL auf die Adipogenese zu quantifizieren. Jedoch mussten auch schon Smas und Sul feststellen, dass es sich bei den 3T3-L1-Zellen sieben Tage nach Induktion der Differenzierung um eine gemischte Population aus Präadipozyten (25 %) und Adipozyten (75 %) handelt [99], so dass ein vollständiges Fehlen der Pref-1-mRNA am Tag neun nach Induktion der Differenzierung nicht zu erwarten war. Unter den gewählten Versuchsbedingungen kam es jedoch zu einem Anstieg der Pref-1-mRNA-Menge im Verlauf der Differenzierung. Die Anwesenheit von nLDL bzw. glykLDL während der Differenzierung führte zu keiner deutlichen Veränderung der Pref-1-Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Da die Funktionalität der Primer nachgewiesen wurde, konnte davon ausgegangen werden, dass eine Reduktion der Pref-1-mRNA-Menge nicht essentiell für eine erfolgreiche Differenzierung der 3T3-L1-Zellen war. Im Gegensatz dazu wurde eine verminderte Expression von Pref-1 auf mRNA- und Protein-Ebene in verschiedenen Literaturstellen als eine notwendige Voraussetzung für die Differenzierung von 3T3-L1-Zellen herausgestellt [99]. Es ist bekannt, dass die im DMIX enthaltene Konzentration an DEX einen entscheidenden Einfluss auf die Pref-1-Expression hat. Da sich die Zusammensetzung des DMIX an einer Vielzahl von Arbeiten orientierte und die darin enthaltene DEX-Konzentration mit 1 μM über der der meisten Arbeiten lag, die eine Erniedrigung von Pref-1 zeigen konnten (z.B. 0,25 μM [96]), erschien es unwahrscheinlich, dass eine zu niedrige DEX-Konzentration der Grund für den fehlenden Abfall der Pref-1-mRNA war. Auch Boney und Kollegen stellten Pref-1 als einen geeigneten Marker für das Ausmaß der Differenzierung der 3T3-L1-Zellen in Frage. Sie konnten zeigen, dass IL-11, ein bekannter Adipogeneseinhibitor, wie erwartet, die Ausbildung von Fettvakuolen hemmt, dies jedoch mit einer signifikant verminderten Pref-1-Expression einhergeht. Sie schlussfolgerten daraus, dass es keine direkte Korrelation zwischen der Pref-1-Expression und dem Ausmaß der Differenzierung gibt [100]. Die vorliegende Arbeit konnte ebenfalls bestätigen, dass es keine negative Korrelation zwischen diesen beiden Parametern gibt.

Im Mittelpunkt der Arbeitshypothese, welche Mechanismen der glykLDL-induzierten Stimulation der Adipogenese zu Grunde liegen könnten, stand zu Beginn der nicht internalisierende Rezeptor RAGE als einer der wichtigsten Rezeptoren für AGE und Mediator proinflammatorischer Prozesse [57]. Nach Aktivierung von RAGE durch AGE kommt es zur Auslösung einer intrazellulären Signalkaskade, welche über die Aktivierung von NF- κ B u. a. zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine führt [91]. Somit könnte RAGE eine mögliche Verbindung zwischen DM und einer Adipositas-assoziierten Entzündung darstellen.

In den *in vitro*-Versuchen zur Bindung der glykLDL an den immobilisierten sRAGE erwiesen sich die glykLDL als potenzielle RAGE-Liganden. Die Spezifität der Bindung wurde durch eine signifikant verminderte Assoziation der DiI-glykLDL an sRAGE infolge der Vorinkubation mit nicht markierten glykLDL nachgewiesen. Die Bioverteilungsexperimente lieferten des Weiteren Indizien dafür, dass die glykLDL auch *in vivo* zur Interaktion mit RAGE fähig waren. Dies zeigte sich in der vermehrten Interaktion der glykLDL mit dem Lungengewebe, welches für seine sehr starke RAGE-mRNA-Expression und -Proteinbiosynthese bekannt ist [101]. Erwartungsgemäß konnten diese Effekte für nLDL nicht beobachtet werden. Voraussetzung für die Beteiligung von RAGE an den glykLDL-induzierten Effekten auf die Adipogenese der 3T3-L1-Zellen ist dessen Vorhandensein auf diesen. Deshalb wurde die mRNA-Expression und Protein-Biosynthese von RAGE in den 3T3-L1-Zellen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die 3T3-L1-Zellen zwar das Gen für RAGE transkribierten, eine entsprechende Proteinsynthese konnte jedoch nicht sicher nachgewiesen werden. Während der Differenzierung kam es zu einem leichten Anstieg der RAGE-mRNA-Menge, wobei das Gen am Tag sieben nach Induktion der Differenzierung am stärksten exprimiert wurde. Unoki und Kollegen konnten am Tag eins nach Induktion der Differenzierung signifikant mehr RAGE-mRNA und am Tag zwei, vier und sechs nach Induktion der Differenzierung im Vergleich zu den Präadipozyten eine vermehrte RAGE-Proteinbiosynthese nachweisen [102]. Da bereits relativ große Proteinmengen für die SDS-PAGE und das Western Blotting eingesetzt wurden und RAGE mit dem verwendeten Antikörper in anderen Zelllinien unter Einsatz von weniger Protein erfolgreich nachgewiesen werden konnte (unveröffentlichte Daten von Frau Dipl.-Biol. Susan Hoppmann), deutet dies darauf hin, dass die 3T3-L1-Zellen unter den gewählten Versuchsbedingungen nur sehr wenig funktionelles RAGE-Protein besaßen. In den Zellaufnahmestudien wurde glykBSA als Inhibitor für RAGE

eingesetzt. Da RAGE kein internalisierender Rezeptor ist, sollte glykBSA nur die Bindung und nicht die Aufnahme der LDL hemmen. GlykBSA hatte keinen Einfluss auf die Bindung von nLDL bzw. glykLDL, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass RAGE bei der Bindung der LDL an die 3T3-L1-Zellen keine maßgebliche Rolle gespielt hat. Des Weiteren wurde geprüft, ob es infolge einer eventuell stattfindenden RAGE-Aktivierung durch die glykLDL zu einer vermehrten Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α kam. Es konnte jedoch nur eine sehr geringe bis keine Produktion dieser Adipokine gezeigt werden, was ebenfalls darauf hindeutet, dass RAGE bei den Effekten, die durch die geringfügig glykatierten LDL hervorgerufen wurden, nur eine untergeordnete Rolle gespielt hat.

Aufgrund dessen wurde die Arbeitshypothese dahingehend erweitert, dass die glykLDL durch die 3T3-L1-Zellen internalisiert werden und nach einer möglicherweise stattfindenden intrazellulären Metabolisierung, welche jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit sein sollte, zur Beeinflussung der Adipogenese führen. Vielmehr galt es zu prüfen, ob die 3T3-L1-Zellen zur Aufnahme der LDL fähig sind und welche Rezeptoren bei der Aufnahme der verschiedenen LDL-Spezies eine Rolle spielen könnten. Neben dem LDL-R standen hierbei, insbesondere für die Internalisierung der glykLDL, verschiedene SR zur Diskussion. Die SR wurden ursprünglich als Multi-Ligand-Rezeptoren auf Makrophagen identifiziert, die zur Internalisierung modifizierter LDL und AGE führen. Aus der Familie der SR waren für modifizierte LDL und AGE v. a. Mitglieder der Klassen A (SR-A1/2), B (SR-B1 und CD36) und E (LOX-1) von Bedeutung.

Aus den Zellaufnahmestudien wurde deutlich, dass sowohl nLDL als auch glykLDL von den 3T3-L1-Zellen zeitabhängig aufgenommen wurden, wobei nLDL etwa zweimal mehr internalisiert wurden als glykLDL. Präadipozyten nahmen im Mittel zehnmal mehr nLDL bzw. glykLDL auf als Adipozyten. Frühere Untersuchungen von Stanton und Kollegen verzeichneten eine stärkere Aufnahme von [125 I]-LDL_{II/III} durch 3T3-L1-Adipozyten im Vergleich zu 3T3-L1-Präadipozyten [103]. Stanton und Kollegen zitierten des Weiteren Steinberg und Kollegen, die im Jahr 1983 ebenfalls eine signifikant höhere Aufnahme von LDL an 3T3-L1-Adipozyten als an 3T3-L1-Präadipozyten nachweisen konnten, was mit einer verstärkten Expression des LDL-R bei den Adipozyten einherging [103]. Unter den vorliegenden Untersuchungsbedingungen hingegen wurde eine verminderte Expression des LDL-R in Adipozyten im Vergleich zu Präadipozyten festgestellt, was im Einklang mit der

verminderten LDL-Aufnahmekapazität der Adipozyten steht. Stanton und Kollegen verwendeten, im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit, [¹²⁵I]-LDL. Pietzsch und Kollegen wiesen auf verschiedene Arbeiten hin, in denen gezeigt werden konnte, dass die Radioiodierung von LDL zu oxidativen Modifikationen des Lipid- und Proteinanteils der LDL führt und somit deren Interaktion mit dem LDL-R und verschiedenen SR sowie die *in vivo-Clearance* der LDL beeinflusst [86]. Möglicherweise wurden die von Stanton und Kollegen verwendeten LDL also aufgrund ihrer oxidativen Modifikationen verstärkt von den Adipozyten internalisiert. Untersuchungen, die eine deutlich stärkere Bindung und Internalisierung von oxLDL durch 3T3-L1-Adipozyten zeigen konnten, würden dies bestätigen [82].

Die Vorkubation mit verschiedenen Hemmstoffen (glykBSA, malBSA, NaOleat, Fucoidan, Polyinosinsäure, HDL sowie unmarkierte nLDL bzw. glykLDL) und der anschließende Vergleich mit der ungehemmten Kontrolle, sollten Indizien dafür liefern, welche Rezeptoren an der Internalisierung der LDL beteiligt sein könnten.

In allen Versuchen bewirkte die Anwesenheit von nicht markierten nLDL bzw. glykLDL eine signifikante Hemmung der Aufnahme der markierten nLDL bzw. glykLDL. Dies deutet auf eine geringe unspezifische Bindung an die Zelloberfläche hin [82]. Bei den Versuchen mit DiI-LDL war die Bindung bei 4 °C in Relation zur Aufnahme und Bindung bei 37 °C im Allgemeinen höher als bei den Versuchen mit [¹⁸F]FB-LDL. Dies ist ein Indiz dafür, dass bei den Versuchen mit DiI-LDL unspezifische Bindungseffekte eine größere Rolle gespielt haben. Möglicherweise war trotz intensiver Dialysebedingungen noch freies DiI in der Lösung vorhanden, welches zur Markierung der Zellmembranen führte.

MalBSA wird als Ligand und damit experimenteller Inhibitor für alle SR außer LOX-1 beschrieben [76, 78]. MalBSA zeigte in allen Versuchen, insbesondere bei den Präadipozyten, einen deutlichen Hemmeffekt auf die Internalisierung der LDL. SR scheinen also sowohl bei der Aufnahme der nLDL als auch der glykLDL eine maßgebliche Rolle gespielt zu haben. Die inhibitorische Wirkung fiel bei den Adipozyten jeweils schwächer aus. Dies war wahrscheinlich auf die leichte bis sehr starke Steigerung der mRNA-Expression aller SR, außer dem SR-B1, zurückzuführen, wodurch die gleichbleibende Konzentration von malBSA offensichtlich nicht mehr reichte, um alle Rezeptoren zu blockieren. Die signifikante Hemmung der nLDL-Aufnahme durch malBSA entsprach nicht den Erwartungen. Hierfür gibt es drei mögliche Erklärungen: Erstens eine Beteiligung von SR, beispielsweise des SR-B1, an

der Aufnahme von nLDL (und glykLDL), zweitens eine unspezifische Hemmwirkung von malBSA oder drittens eine zellinduzierte Modifikation der eingesetzten nLDL. Hinweise für letzteres gaben Untersuchungen, in denen die Inkubation mit Muskelzellen bzw. Monozyten/ Makrophagen zu oxidativen Veränderungen der LDL führte [104]. Dies war bei Monozyten/ Makrophagen zu erwarten gewesen, da Immunzellen zur Abwehr von Fremdkörper reaktive Sauerstoffspezies produzieren, die auch zur Oxidation von Proteinen und Lipiden führen können. Auch 3T3-L1-Zellen produzieren ROS [96]. Jedoch war kein Anstieg des inhibitorischen Effekts von malBSA im Verlauf der Zeit erkennbar (Daten nicht gezeigt), was einer zunehmenden Oxidation der LDL durch die Zellen widerspricht. Auch die Spezifität der inhibitorischen Wirkung von malBSA war zu hinterfragen. Möglicherweise richtete sich dieser Multi-Rezeptor-Ligand nicht nur gegen SR, sondern interagiert auch mit dem LDL-R. Erste Positronen-Emissions-Tomographie- (PET-) Daten an Wistar-Unilever-Ratten, in denen malBSA *in vivo* zu einer Hemmung des LDL-R führte, bestätigten dies (unveröffentlichte Daten von Herrn PD Dr. Jens Pietzsch). Da die Hemmung mit malBSA keine weiteren Anhaltspunkte für die Beteiligung der einzelnen SR gab, wurden des Weiteren Fucoidan und Polyinosinsäure als bekannte Inhibitoren der SR-A1/2 und LOX-1 sowie NaOleat und HDL als potenzielle Inhibitoren der SR der Klasse B eingesetzt.

Die polyanionischen Verbindungen Fucoidan und Polyinosinsäure werden experimentell als Inhibitoren der SR-A1/2 eingesetzt [76, 105]. Darüber hinaus konnte aber auch eine Hemmung von LOX-1 durch Polyinosinsäure u. a. polyanionische Verbindungen nachgewiesen werden [78, 106]. Während Polyinosinsäure bei den Versuchen mit [¹⁸F]FB-nLDL und [¹⁸F]FB-glykLDL an Präadipozyten eine signifikante Hemmung der Aufnahme bewirkte, konnte Fucoidan nur die Aufnahme von [¹⁸F]FB-nLDL und DiI-nLDL an Präadipozyten signifikant hemmen. Dies würde auf eine Beteiligung von SR-A1/2 oder LOX-1 an der Aufnahme der LDL schließen lassen. Aufgrund der fehlenden mRNA-Expression der SR-A1/2 in den 3T3-L1-Zellen, die auch durch Kuniyasu und Kollegen bestätigt wurde [82], war die Beteiligung von SR der Klasse A jedoch eher unwahrscheinlich. Auch Kuniyasu und Kollegen verzeichneten trotz fehlender SR-A-Expression eine inhibitorische Wirkung von Fucoidan bei der Bindung und Internalisierung von [¹²⁵I]AGE-BSA durch 3T3-L1-Adipozyten [71], was die Vermutung zulässt, dass LOX-1 auch an der Internalisierung der glykLDL beteiligt war. Bisher konnte jedoch keine Affinität von

LOX-1 für nLDL nachgewiesen werden, was die Spezifität dieser Hemmstoffe in Frage stellt.

Unter den SR der Klasse B ist CD36 insbesondere für die Internalisierung von oxLDL durch 3T3-L1-Zellen von Bedeutung [82, 107]. Darüber hinaus fungiert CD36 in 3T3-L1-Zellen als Rezeptor für AGE [71, 72]. Aufgrund dessen erschien CD36 als ein wichtiger potenzieller Rezeptor bei der Internalisierung der glykLDL. Um dies zu überprüfen, wurde NaOleat als Inhibitor eingesetzt, da langkettige Fettsäuren, insbesondere Ölsäure, Affinitäten zu CD36 zeigen und zur Hemmung der oxLDL-Bindung durch diesen in der Lage sind [92]. Die Erkennung der oxLDL durch CD36 erfolgt über den Lipidanteil des Lipoproteins [92]. Während sich NaOleat in den Untersuchungen von Nicholson und Kollegen als signifikant hemmend auf die Bindung von [¹²⁵I]-oxLDL durch CD36-transfizierte 3T3-Zellen erwies [92], konnte in der vorliegenden Arbeit kein Hemmeffekt von NaOleat auf die Bindung und Aufnahme von nLDL oder glykLDL nachgewiesen werden. Im Verlauf der Differenzierung der 3T3-L1-Zellen kam es zu einem drastischen Anstieg der CD36-mRNA-Expression. Auch Kuniyasu und Kollegen beobachteten dies [82]. CD36 konnte also nur bei den Adipozyten eine wesentliche Rolle für die LDL-Aufnahme gespielt haben. Im Gegensatz zu Versuchen mit oxLDL, welche durch 3T3-L1-Adipozyten deutlich stärker gebunden und internalisiert wurden als durch Präadipozyten [82], internalisierten die Adipozyten unter den vorliegenden Versuchsbedingungen deutlich weniger glykLDL als die Präadipozyten. Dies deutet darauf hin, dass CD36, entgegen seiner Bedeutung für die Aufnahme von oxLDL, nicht maßgeblich an der Bindung und Internalisierung der glykLDL beteiligt war. Möglicherweise stellte NaOleat auch keinen geeigneten Hemmstoff für CD36 dar, da dieser SR der Klasse B über zwei unterschiedliche Bindungsdomänen verfügt [108]. Jedoch werden AGE und oxLDL über die gleiche Bindungsstelle an den Aminosäuren 155 bis 183 internalisiert [108], so dass eine erfolgreiche Hemmung der oxLDL-Aufnahme durch NaOleat [92] das gleiche Ergebnis für die Aufnahme der glykLDL, als eine Art AGE, liefern sollte. Aufgrund der notwendigen Lösung von NaOleat in einem Gemisch aus Isopropanol und doppelt destilliertem Wasser konnten auch cytotoxische Effekte nicht ausgeschlossen werden. Neben RAGE ist auch CD36 nach Stimulation durch entsprechende Liganden in der Lage, die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine hervorzurufen [109]. Die Ausschüttung von IL-6 und TNF- α durch die 3T3-L1-Zellen war nur sehr gering bis nicht nachweisbar, was darauf hindeutete, dass es unter den gewählten

Versuchsbedingungen analog zu RAGE auch zu keiner maßgeblichen Aktivierung von CD36 kam.

Ein weiterer SR der Klasse B ist der SR-B1. Dieses transmembrane Protein wurde ursprünglich als HDL-Rezeptor identifiziert [66]. Acton und Kollegen konnten jedoch auch eine hohe Affinität für nLDL nachweisen [76], womit der SR-B1 neben dem LDL-R eine weitere Möglichkeit für die Aufnahme der nLDL durch die 3T3-L1-Zellen darstellt. Während der LDL-R in unterschiedlicher Anzahl auf fast allen Zellen zu finden ist, wird der SR-B1 im Säugetier v. a. von Zellen der Nebennieren, der Ovarien und der Leber in nennenswerter Menge exprimiert [4, 110]. Acton und Kollegen konnten ferner eine im Vergleich zu anderen Geweben relativ starke Expression des SR-B1 im murinen Fettgewebe nachweisen [76]. Auch die verwendeten 3T3-L1-Zellen transkribierten das Gen für den SR-B1, was ebenfalls durch Acton und Kollegen bestätigt wurde [76]. Um Hinweise über eine Beteiligung des SR-B1 an der LDL-Aufnahme zu bekommen, wurden in den Zellaufnahmestudien mit DiI-LDL HDL zur Hemmung des SR-B1 eingesetzt. Die HDL bewirkten sowohl bei den Präadipozyten als auch bei den Adipozyten eine signifikante Hemmung der Bindung und Aufnahme von nLDL und glykLDL. Da der Anteil der Bindung in allen Kavitäten vergleichbar war, deutet dies auf eine Beteiligung des SR-B1 an der Internalisierung der LDL hin. Möglicherweise wurden im Gegensatz zum LDL-R nicht die ganzen LDL-Partikel, sondern nur deren Cholesterylester internalisiert, da der SR-B1 im Falle der HDL nur zum Transfer der Cholesterylester fähig ist, während das Apolipoprotein extrazellulär verbleibt und zur erneuten Aufnahme von Lipiden und Cholesterylestern zur Verfügung steht [66]. Der SR-B1 zeigt des Weiteren Affinitäten zu azetyliertem LDL (acLDL), oxLDL und malBSA, jedoch nicht zu Fucoidan und Polyinosinsäure [76]. Ohgami und Kollegen zeigten, dass auch AGE-BSA über den SR-B1 gebunden und internalisiert wird [72]. OxLDL und acLDL sind im Gegensatz zu HDL in der Lage die AGE-BSA-Aufnahme komplett zu inhibieren, während nLDL nur eine hemmende Wirkung von < 20 % entfaltet [75]. Untersuchungen von Acton und Kollegen ergaben eine deutliche inhibitorische Wirkung von nLDL auf die Bindung von [¹²⁵I]-acLDL an SR-B1-transfizierte Zellen [76]. Dies deutete darauf hin, dass AGE-BSA und nLDL bzw. modifizierte LDL die gleiche Bindungsstelle im Rezeptor haben, welche sich von der für HDL unterscheidet. Interessanterweise behindert AGE-BSA trotz der offensichtlich unterschiedlichen Bindungsstellen die Aufnahme von HDL in die untersuchten Zellen [75]. Es liegt nahe, dass das für die vorliegende Arbeit hergestellte

glykBSA ebenfalls einen SR-B1-Ligand darstellte und somit mit den LDL um den Rezeptor konkurrierte. Dies wurde dadurch bestätigt, dass glykBSA, welches ursprünglich als Inhibitor für RAGE eingesetzt wurde, zu einer signifikanten Hemmung der Aufnahme von nLDL und glykLDL an Präadipozyten führte. In Anbetracht der inhibitorischen Wirkung von HDL und glykBSA wäre es also möglich, dass der SR-B1 neben dem LDL-R eine Rolle bei der Aufnahme von nLDL und glykLDL durch die 3T3-L1-Zellen gespielt hat. Die im Gegensatz zu den anderen eingesetzten Inhibitoren, wie z.B. malBSA, vergleichbare Hemmwirkung bei Präadipozyten und Adipozyten deutet auf eine etwa gleichbleibende Rezeptorexpression während der Adipogenese hin, welche durch die qRT-PCR bestätigt werden konnte.

LOX-1, ein SR der Klasse E, wurde ebenfalls von den 3T3-L1-Zellen exprimiert. Während der Differenzierung kam es zu einem Anstieg der mRNA-Expression. Neben der Aufnahme von oxLDL ist LOX-1 auch zur Bindung, jedoch nicht zur Internalisierung von AGE-BSA fähig [79, 80], was ebenfalls ein Grund für die inhibitorische Wirkung der verwendeten glykBSA gewesen sein könnte. Da in den Zellaufnahmestudien keine speziellen Hemmstoffe gegen LOX-1 eingesetzt wurden, konnten keine weiteren Aussagen über eine Beteiligung dieses Rezeptors an der glykLDL-Aufnahme getroffen werden. Die Durchführung spezieller Hemmexperimente, beispielsweise mit LOX-1-Antikörpern, könnte daher Inhalt weiterführender Untersuchungen sein. OxLDL wären als Inhibitor für LOX-1 nur bedingt geeignet, da diese auch zur Interaktion mit CD36 fähig sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die Aufnahme der LDL durch die 3T3-L1-Zellen neben dem LDL-R höchstwahrscheinlich SR eine Rolle gespielt haben. Für die Aufnahme der nLDL und glykLDL scheint neben dem LDL-R insbesondere der SR-B1 von Bedeutung gewesen zu sein, da die SR-A1/2 von beiden Zelltypen nicht und CD36 nur von Adipozyten in nennenswerter Menge exprimiert wurde. Auch eine Beteiligung von LOX-1 an der Aufnahme der glykLDL wäre möglich. Das 3T3-L1-Modell zeigte somit Gemeinsamkeiten mit der *in vivo*-Situation, denn auch im Fettgewebe sind SR an der LDL-Clearance beteiligt. Während in der Leber etwa 90 % der Gesamt-LDL-Clearance über den LDL-R erfolgen, übernimmt dieser im Fettgewebe nur etwa 10 % der Gesamt-LDL-Clearance [104].

Weiterführend wurde untersucht, ob die LDL neben der Aufnahme über die verschiedenen Rezeptoren, möglicherweise aktiv deren Expression in den

3T3-L1-Zellen beeinflussen und somit wiederum die Bedingungen für eine weitere Internalisierung der LDL modifizieren. Beispielsweise ist für CD36 bekannt, dass eine einstündige Inkubation mit glykoxidierten LDL, die aus Patienten mit IGT isoliert wurden, zu einem signifikanten Anstieg der CD36-mRNA-Expression an RAW-Makrophagen führt [94]. Auch an den 3T3-L1-Adipozyten konnte sowohl nach der einstündigen Inkubation mit glykLDL, als auch bei Anwesenheit der glykLDL während der gesamten Differenzierung ein leicht stimulierender Effekt auf die CD36-Expression nachgewiesen werden. Möglicherweise waren die 3T3-L1-Zellen weniger suszeptibel bezüglich ihrer CD36-Regulation durch glykLDL als RAW-Makrophagen oder aber es waren eher die glykoxidativen Veränderungen der LDL, die die CD36-Expression in den RAW-Makrophagen stimulierten. Letzteres wird dadurch bekräftigt, dass auch oxLDL in der Lage sind die CD36-RNA-Expression an RAW-Makrophagen [111] und 3T3-L1-Zellen zu verstärken [83]. Als mögliche Mechanismen für diesen Effekt in den 3T3-L1-Zellen wurde der Transport des Transkriptionsfaktors Nrf2 in den Zellkern diskutiert [83]. Nach der Stimulation von CD36 durch oxLDL kommt es an RAW-Makrophagen zur Aktivierung von PPAR γ [112], welcher daraufhin mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) heterodimerisiert und durch Bindung an den CD36-Promotor zu einer erhöhten CD36-Transkription führt [113]. Feng und Kollegen konnten des Weiteren zeigen, dass die Proteinkinase C, nicht jedoch die Proteinkinase A, eine Rolle bei der oxLDL-induzierten Stimulation der CD36-Transkription an Makrophagen spielt [114].

In den 3T3-L1-Zellen konnte eine, im Vergleich zu den anderen untersuchten SR, relativ starke SR-B1-Transkription nachgewiesen werden, die bei Präadipozyten und Adipozyten vergleichbar war. Andere Arbeitsgruppen konnten einen signifikanten Anstieg der SR-B1-mRNA-Expression und -Proteinbiosynthese im Verlauf der Differenzierung von 3T3-L1-Zellen feststellen [84, 115]. Die einstündige Inkubation mit nLDL und glykLDL führte bei den Adipozyten tendenziell zu einem Anstieg der SR-B1-Transkription. Dies deutet darauf hin, dass es insbesondere bei den Adipozyten zumindest kurzfristig zu einer Stimulation der SR-B1-mRNA-Expression durch die LDL kam. Möglicherweise spielt die transkriptionale Regulation beim SR-B1 nur eine untergeordnete Rolle, denn wie Untersuchungen von Tondou und Kollegen zeigten, kann der SR-B1 innerhalb kürzester Zeit aus intrazellulären Speichern an die Zelloberfläche transloziert werden [84]. Durch Han und Kollegen konnte eine oxLDL-induzierte

Verminderung der SR-B1-Transkription an RAW-Makrophagen nachgewiesen werden [116].

Während die LOX-1-Transkription bei Präadipozyten nur durch die zweitägige Inkubation mit nLDL deutlich stimuliert wurde, konnte bei den Adipozyten unter Einwirkung von nLDL und glykLDL für 1 h sowie glykLDL für 9 d eine erhöhte mRNA-Menge festgestellt werden, was auf eine Regulation von LOX-1 durch nLDL und insbesondere durch glykLDL bei den Adipozyten schließen lässt.

Die verstärkte Transkription der meisten untersuchten SR im Verlauf der Adipogenese erklärte nicht die deutlich verminderte Internalisierung von nLDL und glykLDL durch die Adipozyten im Vergleich zu den Präadipozyten. Aufgrund dessen wurde auch die Expression des LDL-R auf mRNA-Ebene untersucht. Hierbei zeigte sich, dass Präadipozyten das Gen für den LDL-R stärker exprimierten als Adipozyten am Tag neun nach Induktion der Differenzierung. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die geringeren LDL-Aufnahmen der Adipozyten. Des Weiteren konnte eine Beeinflussung der LDL-R-Transkription durch die LDL in den Adipozyten beobachtet werden. Während die einstündige Inkubation zu einer vermehrten LDL-R-Expression führte, wirkte sich die neuntägige Inkubation mit den LDL hemmend auf die Transkription des LDL-R aus. Die Effekte der nLDL und glykLDL unterschieden sich hierbei nicht, was darauf hindeutet, dass auch die glykLDL, wie erwartet, Liganden für den LDL-R darstellten. Für die Regulation der LDL-R-Transkription scheint die Inkubationszeit somit von größerer Bedeutung gewesen zu sein, als das Vorhandensein leichter glykativer Modifikation an den LDL. Sowohl nLDL als auch glykLDL waren demnach in der Lage, die LDL-R-Expression kurzfristig zu stimulieren, um z.B. im Blut vorübergehend anflutende LDL zu eliminieren. Im Gegensatz dazu führte das dauerhaft hohe Angebot an LDL zu einer negativen Rückkopplung auf die LDL-R-Transkription, wie sie bereits durch Brown und Goldstein beschrieben wurde [46].

Infolge der Inkubation der 3T3-L1-Zellen mit den nLDL und glykLDL kam es zu keiner verstärkten Expression von RAGE, wie sie bereits infolge der Interaktion mit AGE beschrieben wurde [57].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern Indizien dafür, dass die nLDL und glykLDL nach ihrer Internalisierung, welche wahrscheinlich vorrangig durch den LDL-R und den SR-B1 erfolgt, und einer eventuellen intrazellulären Metabolisierung Einfluss auf die Adipogenese der 3T3-L1-Zellen nehmen. Über die intrazellulären

Wirkmechanismen können nur Vermutungen angestellt werden, da deren Aufklärung aufgrund des begrenzten Zeitrahmens nicht Inhalt der vorliegenden Arbeit sein konnte. Eine mögliche Erklärung für die stimulierende Wirkung der glykLDL auf die Lipidakkumulation wäre die Aktivierung der Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase (GPDH). Die GPDH ist ein wichtiges Enzym für die Triglyzeridsynthese, da sie die Dehydrierung von Dihydroxyacetonphosphat, einem Zwischenprodukt der Glykolyse, zu Glycerin-3-Phosphat katalysiert, welches wiederum zur Triglyzeridsynthese benötigt wird. Die GPDH spielt insbesondere im Fettgewebe und der Muskulatur eine Rolle, da diese Gewebe im Gegensatz zur Leber oder den Nieren keine ausreichende Aktivität der Glycerinkinase besitzen und somit auf die Bereitstellung von aktiviertem Glycerin in Form von Glycerin-3-Phosphat durch die GPDH angewiesen sind. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Lipoproteinen während der Adipogenese von 3T3-L1-Zellen zu einer verstärkten Enzymaktivität der GPDH führt [97]. Yvan-Charvet und Kollegen zitierten zwei Arbeitsgruppen, welche den nuklearen Leber-X-Rezeptor (LXR) als Regulator der Lipidakkumulation in Adipozyten herausstellen. Der LXR wird durch Oxysterole aktiviert. Dies sind Metabolite des Cholesterols, welche entstehen, wenn Cholesterin intrazellulär aus den Lipoproteinen freigesetzt wird. Infolge dessen führt der LXR zur Aktivierung verschiedener Gene, die wiederum in die Lipogenese und die Lipidakkumulation der Adipozyten involviert sind [115].

Da es sich bei den 3T3-L1-Zellen nur um ein *in vitro*-Modell handelt, sollte mit Hilfe von Bioverteilungsexperimenten an männlichen Wistar-Unilever-Ratten gezeigt werden, wie die nLDL und glykLDL *in vivo* katabolisiert werden und ob sich dabei Unterschiede zeigen, die auf die Glykatisierung der LDL zurückzuführen sind. Die Untersuchungen zur Bioverteilung der [¹⁸F]FB-LDL ergaben, dass sich die verwendeten [¹⁸F]FB-nLDL und [¹⁸F]FB-glykLDL *in vivo* in ihrem Metabolismus unterschieden. Die [¹⁸F]FB-glykLDL zeigten eine längere Verweilzeit im Plasma als [¹⁸F]FB-nLDL, welche wahrscheinlich auf eine verminderte Affinität der [¹⁸F]FB-glykLDL zum LDL-R zurückzuführen war. Dies wurde bereits in früheren Untersuchungen beobachtet [62]. Im Gegensatz dazu reichert sich die [¹⁸F]FB-nLDL stärker in der Leber an, was durch eine Interaktion mit LDL-R der Hepatozyten und mit SR der Kupfferschen Sternzellen oder der hepatischen Endothel- und Parenchymzellen [117], bedingt gewesen sein könnte. Sowohl [¹⁸F]FB-nLDL als auch [¹⁸F]FB-glykLDL interagierten nach 5 und 60 min mit den Nieren, den Nebennieren und der Milz. Zu beiden

Zeitpunkten zeigten [^{18}F]FB-nLDL eine höhere Affinität zu diesen Organen. Die Anreicherung in Nieren und Milz könnte neben der Interaktion mit LDL-R auch auf der Interaktion mit verschiedenen SR auf dort ansässigen Makrophagen beruhen. Letztere könnten z.B. die Mesangialzellen der Niere und Marginalzonen-Makrophagen der Milz gewesen sein [62]. Der Grund für die relativ starke Interaktion insbesondere der [^{18}F]FB-nLDL mit den Nebennieren waren möglicherweise die dort exprimierten SR-B1. Die erhöhte Radioaktivitätskonzentration für [^{18}F]FB-glykLDL im Herz war wahrscheinlich auf noch im Organ befindliches Blut und die längere Verweilzeit der [^{18}F]FB-glykLDL in diesem zurückzuführen. Eine deutliche Interaktion der [^{18}F]FB-glykLDL wurde mit der Lunge verzeichnet. Da die Lunge über eine starke Expression und Proteinbiosynthese von RAGE verfügt [101], ist dies eine Indiz dafür, dass die [^{18}F]FB-glykLDL *in vivo* zur Interaktion mit RAGE fähig waren. Aber auch eine Interaktion der [^{18}F]FB-glykLDL mit Alveolar-Makrophagen könnte stattgefunden haben. Es kam zu keiner direkten Akkumulation der LDL im Fettgewebe. Die niedrige Radioaktivitätskonzentration im Gehirn war ein Zeichen dafür, dass die LDL die Blut-Hirn-Schranke erwartungsgemäß nicht passieren konnten. Auch der Gehalt im Skelettmuskel war, wie erwartet, sehr gering, da die Muskulatur vorrangig Glukose metabolisiert. Dass im Femur keine nennenswerte Radioaktivität gemessen werden konnte, bestätigte die Stabilität von [^{18}F]FB-nLDL und [^{18}F]FB-glykLDL gegenüber Defluorierungen *in vivo*, da es beim Zerfall der Substanzen zu einer raschen Anreicherung von ^{18}F im Knochen gekommen wäre. Beide Substanzen wurden nach ihrer Metabolisierung sowohl hepatobiliär als renal ausgeschieden. Nach 5 min waren bei [^{18}F]FB-nLDL nur im Darm radioaktive Metabolite messbar, während nach 60 min die Ausscheidung mit dem Urin deutlich überwog. Dies deutet darauf hin, dass Abbauprodukte der [^{18}F]FB-nLDL innerhalb kürzester Zeit hepatobiliär ausgeschieden wurden, während ihre Verstoffwechslung zu hydrophileren Metaboliten und deren Ausscheidung einiger Zeit bedurfte. Bei den [^{18}F]FB-glykLDL waren die renale und die hepatobiliäre Ausscheidung von radioaktiven Abbauprodukten zu beiden Zeitpunkten jeweils vergleichbar. Die Analyse der radioaktiven Metabolite im Urin ergab, dass die [^{18}F]FB-LDL vorrangig in Form von N-4-[^{18}F]Fluorhippursäure (N-4-[^{18}F]Fluorbenzoylglyzin) ausgeschieden werden [60]. Daneben finden sich im Urin zwei weitere, nicht identifizierte Metabolite, die zusammen ca. 10 % der renal ausgeschiedenen Radioaktivität ausmachen [60]. Die Bioverteilungsexperimente bestätigten, dass es sich bei den isolierten und *in vitro*-glykatierten LDL um Lipoproteine mit physiologischen

Eigenschaften handelt, die sich aufgrund ihres Glykatisierungsgrades in ihrem *in vivo*-Katabolismus unterscheiden. Aufgrund der z. T. erheblichen Unterschiede im Lipoproteinstoffwechsel zwischen Nagetieren und Menschen sind die am Tiermodelle erhobenen Daten jedoch nur bedingt auf den Menschen übertragbar.

Abschließend lässt sich sagen, dass ein stimulierender Einfluss der glykLDL auf die Differenzierung der 3T3-L1-Zellen als Modell für die humane Adipogenese nachgewiesen werden konnte. Die Konsequenzen dessen für den Organismus sind jedoch differenziert zu betrachten. Zum Einen führt eine verstärkte Adipogenese zu mehr Adipozyten und damit zu Übergewicht mit dessen Komplikationen für den Gesamtorganismus. Auf der anderen Seite ist eine ungestörte Funktion der Adipozyten unerlässlich, um Fettsäuren und Triglyzeride aus dem Blut zu entfernen, so dass diese nicht in anderen Geweben, wie z.B. der Muskulatur, abgelagert werden müssen, wo sie zu Funktionsstörungen der entsprechenden Organe führen würden.

5 Schlussfolgerung

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lassen sich folgende Schlussfolgerungen ableiten.

1. GlykLDL haben einen Einfluss auf die Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten, der sich von dem von nLDL unterscheidet und somit auf die glykativen Veränderungen am LDL-Partikel zurückzuführen ist.
2. GlykLDL verstärken die Ausbildung von Fettvakuolen als morphologisches Zeichen der Differenzierung signifikant. Im Gegensatz dazu führen nLDL zu einer signifikant verminderten Adipogenese.
3. Der nicht internalisierende Rezeptor RAGE hat keine zentrale Rolle bei der Vermittlung der Adipogenese-stimulierenden Wirkung der glykLDL und es kommt auch nicht zu einer für die Aktivierung von RAGE typischen, verstärkten Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α .
4. Die Adipogenese-stimulierende Wirkung der glykLDL ist auf eine rezeptorvermittelte Internalisierung dieser zurückzuführen, welche vorrangig durch den LDL-R, aber auch über SR, von denen v.a. der SR-B1 und möglicherweise auch LOX-1 von Bedeutung sind, erfolgt. CD36 ist, entgegen seiner durch andere Arbeitsgruppen belegten Bedeutung für die Internalisierung von oxLDL, für die Internalisierung der glykLDL wahrscheinlich von untergeordneter Bedeutung. Eine Beteiligung der SR-A1/2 ist aufgrund der fehlenden mRNA-Expression nicht anzunehmen. Die Ausdifferenzierung der Zellen geht mit einer verminderten LDL-Aufnahme einher.
5. *In vivo* konnten die physiologischen Eigenschaften der *in vitro* glykatierten LDL bestätigt werden und es zeigten sich deutlich Unterschiede im Katabolismus und der Organverteilung von nLDL und glykLDL.

Zusammenfassend kann man sagen, dass bereits geringfügig glykatierte LDL die Adipogenese verstärken und somit möglicherweise zu einem *circulus vitiosus* zwischen DM Typ 2 und Adipositas beitragen. Aufgrund dessen sollte bereits beim Auftreten einer IGT mit einer Therapie, beispielsweise durch Interventionen in das Ernährungs- und Bewegungsverhalten der Patienten, begonnen werden, um negative Auswirkungen auf das Fettgewebe, eine Verstärkung der Insulinresistenz und die daraus folgenden Komplikationen zu verhindern.

6 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit veranschaulichten die Effekte von nLDL und *in vitro*-glykierten LDL auf die Differenzierung der murinen Zelllinie 3T3-L1. Durch vergleichende Experimente mit LDL aus Patienten mit IGT, DM Typ 2 oder dem Metabolischen Syndrom könnte gezeigt werden, inwieweit die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf die *in vivo*-Situation übertragbar sind. Weiterführende Untersuchungen könnten sich außerdem dem Effekt glykoxidierter LDL, welche ebenfalls *in vivo* vorkommen, widmen. Dabei wäre die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der GPDH, welche insbesondere im Fettgewebe ein wichtiges Enzym der Triglyzeridsynthese darstellt, möglicherweise ein besserer Marker als Pref-1, um den Einfluss der Lipoproteine auf die Differenzierung zu beurteilen. Wichtig wäre es außerdem, zu prüfen, ob sich die Erkenntnisse über die mRNA-Expression der verschiedenen Rezeptoren auf deren Protein-Biosynthese und Rezeptordichte auf der Zelloberfläche übertragen lassen. Da es sich bei der Differenzierung der 3T3-L1-Zellen nur um ein Modell für die humane Adipogenese handelt und sich Nagetiere in ihrem Lipoproteinstoffwechsel deutlich vom Menschen unterscheiden, wäre auch die Verwendung humaner, möglicherweise primärer Präadipozyten und deren Differenzierung ein interessanter Ansatzpunkt für weiterführende Experimente.

7 Zusammenfassung

Diabetes mellitus (DM) Typ 2 und Adipositas sind zwei wichtige Facetten des Metabolischen Syndroms. Untersuchungen zeigten eine enge Korrelation zwischen diesen beiden Krankheitsbildern, die möglicherweise durch glykatierte Lipoproteine geringer Dichte (glykLDL), eine frühe Form von *advanced glycation endproducts* (AGE), bedingt sein könnte. Erhöhte Mengen glykLDL wurden im Blut von Patienten mit gestörter Glukosetoleranz (IGT) oder DM Typ 2 gefunden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu zeigen, ob glykLDL im Vergleich zu nativen LDL (nLDL) einen Einfluss auf die humane Adipogenese haben und welche Mechanismen dem zu Grunde liegen. Durch die Inkubation humaner LDL mit 200 mM Glukose für 144 h, wurden die unter Hyperglykämie *in vivo* stattfindenden, glykativen Veränderungen am Apolipoprotein B-100 (ApoB-100) der LDL simuliert. Als Modell für die humane Adipogenese diente die Umwandlung von murinen 3T3-L1-Prädipozyten zu ausgereiften, runden Zellen, die sowohl morphologisch als auch physiologisch mit humanen Fettzellen vergleichbar sind. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nLDL und glykLDL einen Einfluss auf die Adipogenese von 3T3-L1-Zellen hatten, der unterschiedlich ausfiel. Während nLDL die Differenzierung von Prädipozyten zu Adipozyten signifikant hemmten, kam es unter dem Einfluss der glykLDL zu einer signifikant verstärkten Adipogenese (**Abbildung 7-1**). Die mRNA-Expression des Prädipozytenfaktors-1 (Pref-1) nahm entgegen den Erwartungen während der Differenzierung stetig zu und blieb von den LDL unbeeinflusst. Obwohl glykLDL sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als potenzielle Liganden für den Rezeptor für *advanced glycation endproducts* (RAGE) bestätigt werden konnten, schien RAGE bei den durch die glykLDL induzierten Effekten auf die Differenzierung der 3T3-L1-Zellen nur eine untergeordnete Rolle gespielt zu haben, da die 3T3-L1-Zellen nur sehr wenig funktionelles RAGE-Protein aufwiesen. Außerdem konnte keine bedeutsame Sekretion der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-6 (IL-6) und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) nachgewiesen werden, wie sie infolge einer RAGE-Aktivierung zu erwarten war. Die Untersuchungen mit DiI- und [^{18}F]-markierten LDL zeigten, dass sowohl nLDL als auch glykLDL von Prädipozyten und Adipozyten aufgenommen wurden, wobei Prädipozyten etwa zehnmal mehr LDL internalisierten als Adipozyten. Die Bindung und Internalisierung von nLDL lag etwa um den Faktor zwei über der von glykLDL, was auf eine verminderte Affinität der glykLDL, beispielsweise zum

LDL-Rezeptor (LDL-R), hindeutet. Mit Ausnahme der Scavenger Rezeptoren (SR) A eins und zwei (SR-A1/2) exprimierten die 3T3-L1-Zellen alle untersuchten Rezeptoren (LDL-R, RAGE, SR-B1, *cluster of differentiation 36* (CD36) und *lectin-like oxidized LDL-Rezeptor* (LOX-1)). Der Vergleich zwischen Präadipozyten und Adipozyten ergab, dass letztere weniger LDL-R, gleich viel SR-B1 und mehr mRNA für RAGE, CD36 und LOX-1 aufwiesen als Präadipozyten. Insbesondere bei CD36, einem SR der Klasse B, kam es im Verlauf der Differenzierung zu einem sehr starken Anstieg der Transkription. In Kombination mit den Ergebnissen der Zellaufnahmestudien lieferte die Analyse der mRNA-Expression Indizien dafür, dass der LDL-R, der SR-B1 und möglicherweise auch LOX-1 für die Internalisierung der LDL von Bedeutung sind. RAGE, CD36 und die SR-A1/2 hingegen scheinen nur eine untergeordnete bis keine Rolle gespielt zu haben (**Abbildung 7-1**). Mögliche intrazelluläre Mechanismen, wie die Aktivierung von NF- κ B, dem nukleären Leber-X-Rezeptor (LXR) und der Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase, könnten Inhalt weiterführender Untersuchungen sein. *In vivo*-Untersuchungen an Wistar-Unilever-Ratten bestätigten den physiologischen Charakter der LDL und zeigten Unterschiede im Katabolismus von [18 F]FB-nLDL und [18 F]FB-glykLDL auf, die auf Veränderungen in der Rezeptorinteraktion der glykLDL zurückzuführen sind. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lässt sich schlussfolgern, dass bereits geringfügig glykatierte LDL die Adipogenese verstärken und somit möglicherweise zu einem *circulus vitiosus* zwischen DM Typ 2 und Adipositas beitragen.

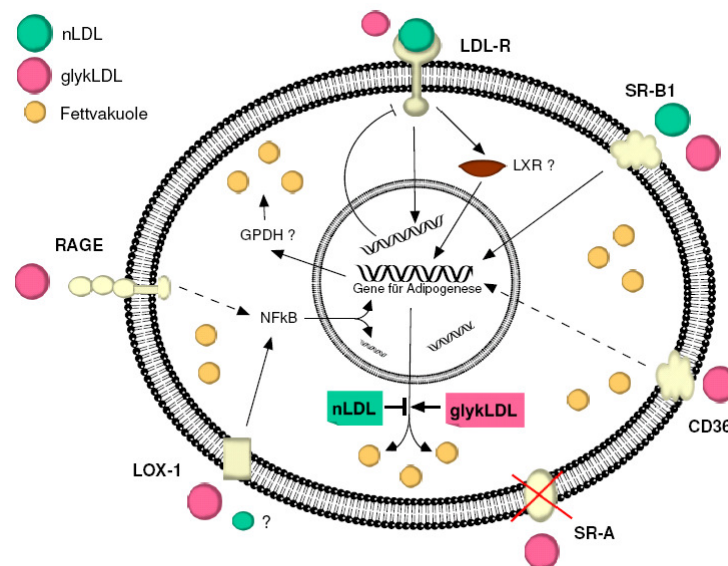


Abbildung 7-1 Schematischer Überblick über mögliche Mechanismen der LDL-induzierten Effekte auf die Adipogenese der 3T3-L1-Zellen und daran beteiligten Rezeptoren.

8 Summary

Type 2 diabetes mellitus (DM) and obesity are two important facets of the metabolic syndrome. Studies showed a close correlation between obesity and Type 2 DM, which could possibly be mediated through glycated low density lipoproteins (glycLDL), which represent an early form of advanced glycation endproducts (AGE). Higher amounts of glycLDL were found in the blood of patients with impaired glucose tolerance (IGT) or Type two DM. The aim of the present study was to investigate, if glycLDL in comparison to native low density lipoproteins (nLDL) influence human adipogenesis and which mechanism could be involved. *In vivo* hyperglycaemia causes glycation of the apolipoprotein B-100 (apoB-100) of the LDL. This was achieved *in vitro* by incubation of human nLDL with 200 mM glucose for 144 h. Differentiation of 3T3-L1 preadipocytes to adipocytes served as a well characterized model for human adipogenesis. In the present study nLDL and glycLDL could be shown to influence adipogenesis in a different manner. While nLDL significantly reduced differentiation of preadipocytes to adipocytes, glycLDL could significantly increase adipogenesis (**figure 8-1**). In contrast to previous investigations, mRNA expression of preadipocyte factor-1 (Pref-1) increased during differentiation and remained unaffected by LDL. *In vitro* as well as *in vivo* glycLDL could be demonstrated to interact with the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE). However, involvement of RAGE in glycLDL mediated effects on adipogenesis of 3T3-L1 cells is limited because of slight protein synthesis of the cells. Furthermore, there could not be shown any important secretion of the proinflammatory cytokines interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), which would be expected after induction of RAGE by its ligands. Investigations with DiI- and [18 F]-labeled LDL revealed cellular binding and uptake of both nLDL and glycLDL by preadipocytes and adipocytes, while LDL were internalized up to tenfold more by preadipocytes in comparison to adipocytes. Binding and uptake of nLDL was two times higher than binding and uptake of glycLDL, indicating a lower affinity of glycLDL for example to the LDL receptor (LDL-R). Except for the scavenger receptors (SR) A one and two (SR-A1/2) 3T3-L1 cells expressed genes for all investigated receptors (LDL-R, RAGE, SR-B1, cluster of differentiation 36 (CD36) and lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1)). In comparison to preadipocytes, adipocytes expressed lower amounts of mRNA for LDL-R, similar amounts of mRNA for SR-B1 and higher amounts of mRNA for RAGE, CD36 and LOX-1. Particularly,

for CD36, a SR of class B, mRNA expression substantially increased during differentiation. Together with the results of the cellular uptake studies analysis of mRNA expression provided evidence that LDL-R, SR-B1 and possibly LOX-1 are of prime importance for uptake of LDL through 3T3-L1 cells. However, RAGE, CD36 and SR-A1/2 are of little or no importance for LDL internalization (**figure 8-1**). Investigations in possible intracellular mechanism, like activation of NF-κB, nuclear liver X receptor (LXR) and glycerol-3-phosphate-dehydrogenase, could be the aim of further studies. Insights from *in vivo* investigations with Wistar rats revealed physiological behavior of nLDL and glycLDL and showed differences in catabolism of [¹⁸F]FB-nLDL and [¹⁸F]FB-glycLDL, which is due to changes in interaction with different receptors. In summary results of the present study indicate that mildly glycosylated LDL stimulated adipogenesis and because of this possibly contribute to vicious circle between Type 2 DM and obesity.

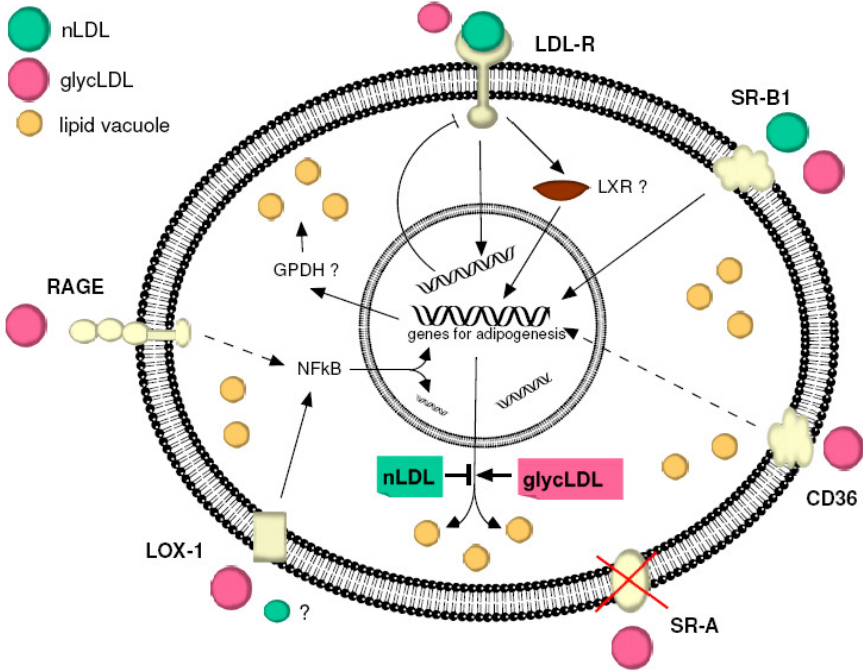


Figure 8-1 Schematic overview of possible mechanism and receptors involved in glycLDL mediated effects on adipogenesis of 3T3-L1 cells.

Literaturverzeichnis

- [1] Hanefeld, M. [The metabolic syndrome: where are we going and for what benefits?]. *Dtsch Med Wochenschr* **131 Suppl 8** (2006) S236-9.
- [2] Hanefeld, M. Das metabolische Syndrom. *Dt.Gesundh.-Wesen* **36** (1981) 545-551.
- [3] Packard, C. J.; Shepherd, J. Lipoprotein heterogeneity and apolipoprotein B metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17** (1997) 3542-56.
- [4] Kostner, G. M.; Scharnagl, H.; Kostner, K.; März, W. Zusammensetzung und Stoffwechsel der Lipoproteine. In P. Schwandt und K.G. Parhofer: *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen (Schattauer Verlag)* **3.Auflage** (2006) 2-57.
- [5] Kershaw, E. E.; Flier, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* **89** (2004) 2548-56.
- [6] Rajala, M. W.; Scherer, P. E. Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* **144** (2003) 3765-73.
- [7] Friedman, J. M. The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. *Nutr Rev* **60** (2002) S1-14; discussion S68-84, 85-7.
- [8] Zhang, J.; Qin, Y.; Zheng, X.; Qiu, J.; Gong, L.; Mao, H.; Jia, W.; Guo, J. [The relationship between human serum resistin level and body fat content, plasma glucose as well as blood pressure]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **82** (2002) 1609-12.
- [9] Arita, Y.; Kihara, S.; Ouchi, N.; Takahashi, M.; Maeda, K.; Miyagawa, J.; Hotta, K.; Shimomura, I.; Nakamura, T.; Miyaoka, K.; Kuriyama, H.; Nishida, M.; Yamashita, S.; Okubo, K.; Matsubara, K.; Muraguchi, M.; Ohmoto, Y.; Funahashi, T.; Matsuzawa, Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* **257** (1999) 79-83.
- [10] Wisse, B. E. The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *J Am Soc Nephrol* **15** (2004) 2792-800.
- [11] Pajvani, U. B.; Hawkins, M.; Combs, T. P.; Rajala, M. W.; Doebber, T.; Berger, J. P.; Wagner, J. A.; Wu, M.; Knopps, A.; Xiang, A. H.; Utzschneider, K. M.; Kahn, S. E.; Olefsky, J. M.; Buchanan, T. A.; Scherer, P. E. Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem* **279** (2004) 12152-62.
- [12] Stepan, C. M.; Bailey, S. T.; Bhat, S.; Brown, E. J.; Banerjee, R. R.; Wright, C. M.; Patel, H. R.; Ahima, R. S.; Lazar, M. A. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* **409** (2001) 307-12.

- [13] Blagoev, B.; Kratchmarova, I.; Nielsen, M. M.; Fernandez, M. M.; Voldby, J.; Andersen, J. S.; Kristiansen, K.; Pandey, A.; Mann, M. Inhibition of adipocyte differentiation by resistin-like molecule alpha. Biochemical characterization of its oligomeric nature. *J Biol Chem* **277** (2002) 42011-6.
- [14] Yang, R. Z.; Lee, M. J.; Hu, H.; Pollin, T. I.; Ryan, A. S.; Nicklas, B. J.; Snitker, S.; Horenstein, R. B.; Hull, K.; Goldberg, N. H.; Goldberg, A. P.; Shuldiner, A. R.; Fried, S. K.; Gong, D. W. Acute-phase serum amyloid A: an inflammatory adipokine and potential link between obesity and its metabolic complications. *PLoS Med* **3** (2006) e287.
- [15] Mick, G. J.; Wang, X.; McCormick, K. White adipocyte vascular endothelial growth factor: regulation by insulin. *Endocrinology* **143** (2002) 948-53.
- [16] Kern, P. A. Potential role of TNFalpha and lipoprotein lipase as candidate genes for obesity. *J Nutr* **127** (1997) 1917S-1922S.
- [17] Weisberg, S. P.; McCann, D.; Desai, M.; Rosenbaum, M.; Leibel, R. L.; Ferrante, A. W., Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* **112** (2003) 1796-808.
- [18] Hotamisligil, G. S.; Arner, P.; Caro, J. F.; Atkinson, R. L.; Spiegelman, B. M. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* **95** (1995) 2409-15.
- [19] Tsigos, C.; Kyrou, I.; Chala, E.; Tsapogas, P.; Stavridis, J. C.; Raptis, S. A.; Katsilambros, N. Circulating tumor necrosis factor alpha concentrations are higher in abdominal versus peripheral obesity. *Metabolism* **48** (1999) 1332-5.
- [20] Grunfeld, C.; Feingold, K. R. The metabolic effects of tumor necrosis factor and other cytokines. *Biotherapy* **3** (1991) 143-58.
- [21] Kern, P. A.; Di Gregorio, G. B.; Lu, T.; Rassouli, N.; Ranganathan, G. Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression. *Diabetes* **52** (2003) 1779-85.
- [22] Qiao, L. Y.; Goldberg, J. L.; Russell, J. C.; Sun, X. J. Identification of enhanced serine kinase activity in insulin resistance. *J Biol Chem* **274** (1999) 10625-32.
- [23] Gustafson, B.; Smith, U. Cytokines promote Wnt signaling and inflammation and impair the normal differentiation and lipid accumulation in 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem* **281** (2006) 9507-16.
- [24] Goralski, K. B.; McCarthy, T. C.; Hanniman, E. A.; Zabel, B. A.; Butcher, E. C.; Parlee, S. D.; Muruganandan, S.; Sinal, C. J. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *J Biol Chem* **282** (2007) 28175-88.

- [25] Zabel, B. A.; Ohyama, T.; Zuniga, L.; Kim, J. Y.; Johnston, B.; Allen, S. J.; Guido, D. G.; Handel, T. M.; Butcher, E. C. Chemokine-like receptor 1 expression by macrophages in vivo: regulation by TGF-beta and TLR ligands. *Exp Hematol* **34** (2006) 1106-14.
- [26] Sell, H.; Dietze-Schroeder, D.; Kaiser, U.; Eckel, J. Monocyte Chemotactic Protein-1 Is a Potential Player in the Negative Cross-Talk between Adipose Tissue and Skeletal Muscle. *Endocrinology* **147** (2006) 2458-2467.
- [27] Charriere, G.; Cousin, B.; Arnaud, E.; Andre, M.; Bacou, F.; Penicaud, L.; Casteilla, L. Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J Biol Chem* **278** (2003) 9850-5.
- [28] Cousin, B.; Munoz, O.; Andre, M.; Fontanilles, A. M.; Dani, C.; Cousin, J. L.; Laharrague, P.; Casteilla, L.; Penicaud, L. A role for preadipocytes as macrophage-like cells. *Faseb J* **13** (1999) 305-12.
- [29] Khazen, W.; M'Bika J, P.; Tomkiewicz, C.; Benelli, C.; Chany, C.; Achour, A.; Forest, C. Expression of macrophage-selective markers in human and rodent adipocytes. *FEBS Lett* **579** (2005) 5631-4.
- [30] Constant, V. A.; Gagnon, A.; Landry, A.; Sorisky, A. Macrophage-conditioned medium inhibits the differentiation of 3T3-L1 and human abdominal preadipocytes. *Diabetologia* **49** (2006) 1402-11.
- [31] Otto, T. C.; Lane, M. D. Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **40** (2005) 229-42.
- [32] Ntambi, J. M.; Young-Cheul, K. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* **130** (2000) 3122S-3126S.
- [33] Couillard, C.; Mauriege, P.; Imbeault, P.; Prud'homme, D.; Nadeau, A.; Tremblay, A.; Bouchard, C.; Despres, J. P. Hyperleptinemia is more closely associated with adipose cell hypertrophy than with adipose tissue hyperplasia. *Int J Obes Relat Metab Disord* **24** (2000) 782-8.
- [34] Green, H.; Meuth, M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* **3** (1974) 127-33.
- [35] Scott, R. E.; Florine, D. L.; Wille, J. J., Jr.; Yun, K. Coupling of growth arrest and differentiation at a distinct state in the G1 phase of the cell cycle: GD. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79** (1982) 845-9.
- [36] Gregoire, F. M.; Smas, C. M.; Sul, H. S. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* **78** (1998) 783-809.
- [37] Camp, H. S.; Ren, D.; Leff, T. Adipogenesis and fat-cell function in obesity and diabetes. *Trends Mol Med* **8** (2002) 442-7.

- [38] Wu, Z.; Rosen, E. D.; Brun, R.; Hauser, S.; Adelmant, G.; Troy, A. E.; McKeon, C.; Darlington, G. J.; Spiegelman, B. M. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell* **3** (1999) 151-8.
- [39] Yokomori, N.; Tawata, M.; Onaya, T. DNA demethylation during the differentiation of 3T3-L1 cells affects the expression of the mouse GLUT4 gene. *Diabetes* **48** (1999) 685-90.
- [40] Shao, D.; Lazar, M. A. Peroxisome proliferator activated receptor gamma, CCAAT/enhancer-binding protein alpha, and cell cycle status regulate the commitment to adipocyte differentiation. *J Biol Chem* **272** (1997) 21473-8.
- [41] Sul, H. S.; Smas, C.; Mei, B.; Zhou, L. Function of pref-1 as an inhibitor of adipocyte differentiation. *Int J Obes Relat Metab Disord* **24 Suppl 4** (2000) S15-9.
- [42] Gregoire, F. M. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp Biol Med (Maywood)* **226** (2001) 997-1002.
- [43] Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Prinzipien der Biochemie* **2. Auflage** (1994).
- [44] Brown, M. S.; Goldstein, J. L. Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76** (1979) 3330-7.
- [45] Brown, M. S.; Goldstein, J. L. In *Angewandte Chemie*, **25** (1986), 583 - 660.
- [46] Brown, M. S.; Goldstein, J. L. Regulation of the activity of the low density lipoprotein receptor in human fibroblasts. *Cell* **6** (1975) 307-16.
- [47] Young, I. S.; McEneny, J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* **29** (2001) 358-62.
- [48] Hamilton, C. A. Low-density lipoprotein and oxidised low-density lipoprotein: their role in the development of atherosclerosis. *Pharmacol Ther* **74** (1997) 55-72.
- [49] Jialal, I.; Devaraj, S. The role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Nutr* **126** (1996) 1053S-7S.
- [50] Yegin, A.; Ozben, T.; Yegin, H. Glycation of lipoproteins and accelerated atherosclerosis in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Int J Clin Lab Res* **25** (1995) 157-61.
- [51] Bucala, R.; Mitchell, R.; Arnold, K.; Innerarity, T.; Vlassara, H.; Cerami, A. Identification of the major site of apolipoprotein B modification by advanced glycosylation end products blocking uptake by the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* **270** (1995) 10828-32.

- [52] Bucala, R.; Makita, Z.; Koschinsky, T.; Cerami, A.; Vlassara, H. Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90** (1993) 6434-8.
- [53] Zimmermann, R.; U, P.; A, W.; S, L.-F.; Graier W, G. O.; G, F.; GM, K.; R, Z. Lipoprotein Lipase Mediates the Uptake of Glycated LDL in Fibroblasts, Endothelial Cells, and Macrophages. *Diabetes* **50** (2001) 1643-1653.
- [54] Brown, M. S.; Basu, S. K.; Falck, J. R.; Ho, Y. K.; Goldstein, J. L. The scavenger cell pathway for lipoprotein degradation: specificity of the binding site that mediates the uptake of negatively-charged LDL by macrophages. *J Supramol Struct* **13** (1980) 67-81.
- [55] Miyazaki, A.; Nakayama, H.; Horiuchi, S. Scavenger receptors that recognize advanced glycation end products. *Trends Cardiovasc Med* **12** (2002) 258-62.
- [56] Sobal, G.; Menzel, J.; Sinzinger, H. Why is glycated LDL more sensitive to oxidation than native LDL? A comparative study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **63** (2000) 177-86.
- [57] Hudson, B. I.; Hofmann, M. A.; Bucciarelli, L.; Wendt, T.; Moser, B.; Lu, Y.; Qu, W.; Stern, D. M.; D'Agati, V.; Yan, S. D.; Yan, S. F.; Grant, P. J.; Schmitdt, A. M. Glycation and diabetes: The RAGE connection. *Current Science* **83** (2002) 1515-1521.
- [58] Pertynska-Marczewska, M.; Kiriakidis, S.; Wait, R.; Beech, J.; Feldmann, M.; Paleolog, E. M. Advanced glycation end products upregulate angiogenic and pro-inflammatory cytokine production in human monocyte/macrophages. *Cytokine* **28** (2004) 35-47.
- [59] Bucala, R.; Makita, Z.; Vega, G.; Grundy, S.; Koschinsky, T.; Cerami, A.; Vlassara, H. Modification of low density lipoprotein by advanced glycation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** (1994) 9441-5.
- [60] Pietzsch, J.; Bergmann, R.; Wuest, F.; Pawelke, B.; Hultsch, C.; van den Hoff, J. Catabolism of native and oxidized low density lipoproteins: in vivo insights from small animal positron emission tomography studies. *Amino Acids* **29** (2005) 389-404.
- [61] Horiuchi, S.; Sakamoto, Y.; Sakai, M. Scavenger receptors for oxidized and glycated proteins. *Amino Acids* **25** (2003) 283-92.
- [62] Schwietzke, U. Untersuchung zum *in vivo*-Metabolismus glykierter Lipoproteine geringer Dichte (LDL) am Tiermodell mittels Positronen-Emissions-Tomographie. *Diplomarbeit* (2006).
- [63] Kislinger, T.; Fu, C.; Huber, B.; Qu, W.; Taguchi, A.; Du Yan, S.; Hofmann, M.; Yan, S. F.; Pischetsrieder, M.; Stern, D.; Schmidt, A. M. N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *J Biol Chem* **274** (1999) 31740-9.

- [64] Jinnouchi, Y.; Sano, H.; Nagai, R.; Hakamata, H.; Kodama, T.; Suzuki, H.; Yoshida, M.; Ueda, S.; Horiuchi, S. Glycolaldehyde-modified low density lipoprotein leads macrophages to foam cells via the macrophage scavenger receptor. *J Biochem (Tokyo)* **123** (1998) 1208-17.
- [65] Nagai, R.; Matsumoto, K.; Ling, X.; Suzuki, H.; Araki, T.; Horiuchi, S. Glycolaldehyde, a reactive intermediate for advanced glycation end products, plays an important role in the generation of an active ligand for the macrophage scavenger receptor. *Diabetes* **49** (2000) 1714-23.
- [66] Acton, S.; Rigotti, A.; Landschulz, K. T.; Xu, S.; Hobbs, H. H.; Krieger, M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* **271** (1996) 518-20.
- [67] Gough, P. J.; Greaves, D. R.; Gordon, S. A naturally occurring isoform of the human macrophage scavenger receptor (SR-A) gene generated by alternative splicing blocks modified LDL uptake. *J Lipid Res* **39** (1998) 531-43.
- [68] Talle, M. A.; Rao, P. E.; Westberg, E.; Allegar, N.; Makowski, M.; Mittler, R. S.; Goldstein, G. Patterns of antigenic expression on human monocytes as defined by monoclonal antibodies. *Cell Immunol* **78** (1983) 83-99.
- [69] Navazo, M. D.; Daviet, L.; Savill, J.; Ren, Y.; Leung, L. L.; McGregor, J. L. Identification of a domain (155-183) on CD36 implicated in the phagocytosis of apoptotic neutrophils. *J Biol Chem* **271** (1996) 15381-5.
- [70] Pearce, S. F.; Roy, P.; Nicholson, A. C.; Hajjar, D. P.; Febbraio, M.; Silverstein, R. L. Recombinant glutathione S-transferase/CD36 fusion proteins define an oxidized low density lipoprotein-binding domain. *J Biol Chem* **273** (1998) 34875-81.
- [71] Kuniyasu, A.; Ohgami, N.; Hayashi, S.; Miyazaki, A.; Horiuchi, S.; Nakayama, H. CD36-mediated endocytic uptake of advanced glycation end products (AGE) in mouse 3T3-L1 and human subcutaneous adipocytes. *FEBS Lett* **537** (2003) 85-90.
- [72] Ohgami, N.; Nagai, R.; Ikemoto, M.; Arai, H.; Kuniyasu, A.; Horiuchi, S.; Nakayama, H. Cd36, a member of the class b scavenger receptor family, as a receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem* **276** (2001) 3195-202.
- [73] Chinetti, G.; Gbaguidi, F. G.; Griglio, S.; Mallat, Z.; Antonucci, M.; Poulain, P.; Chapman, J.; Fruchart, J. C.; Tedgui, A.; Najib-Fruchart, J.; Staels, B. CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation* **101** (2000) 2411-7.
- [74] Krieger, M. Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *J Clin Invest* **108** (2001) 793-7.

- [75] Ohgami, N.; Nagai, R.; Miyazaki, A.; Ikemoto, M.; Arai, H.; Horiuchi, S.; Nakayama, H. Scavenger receptor class B type I-mediated reverse cholesterol transport is inhibited by advanced glycation end products. *J Biol Chem* **276** (2001) 13348-55.
- [76] Acton, S. L.; Scherer, P. E.; Lodish, H. F.; Krieger, M. Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J Biol Chem* **269** (1994) 21003-9.
- [77] Nagase, M.; Kaname, S.; Nagase, T.; Wang, G.; Ando, K.; Sawamura, T.; Fujita, T. Expression of LOX-1, an oxidized low-density lipoprotein receptor, in experimental hypertensive glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* **11** (2000) 1826-36.
- [78] Moriwaki, H.; Kume, N.; Sawamura, T.; Aoyama, T.; Hoshikawa, H.; Ochi, H.; Nishi, E.; Masaki, T.; Kita, T. Ligand specificity of LOX-1, a novel endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18** (1998) 1541-7.
- [79] Chen, X.; Zhang, T.; Du, G. Advanced glycation end products serve as ligands for lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1(LOX-1): biochemical and binding characterizations assay. *Cell Biochem Funct* (2008).
- [80] Jono, T.; Miyazaki, A.; Nagai, R.; Sawamura, T.; Kitamura, T.; Horiuchi, S. Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) serves as an endothelial receptor for advanced glycation end products (AGE). *FEBS Lett* **511** (2002) 170-4.
- [81] Archivio, M. D.; Vari, R.; Scazzocchio, B.; Sanchez, M.; Giovannini, C.; Masella, R. Increased Expression of CD36 in 3T3-L1 cells, induced by oxidized LDL, involves NRF2 Activation. *XIV International Symposium on Atherosclerosis* (2006).
- [82] Kuniyasu, A.; Hayashi, S.; Nakayama, H. Adipocytes recognize and degrade oxidized low density lipoprotein through CD36. *Biochem Biophys Res Commun* **295** (2002) 319-23.
- [83] D'Archivio, M.; Scazzocchio, B.; Filesi, C.; Vari, R.; Maggiorella, M. T.; Sernicola, L.; Santangelo, C.; Giovannini, C.; Masella, R. Oxidised LDL up-regulate CD36 expression by the Nrf2 pathway in 3T3-L1 preadipocytes. *FEBS Lett* **582** (2008) 2291-8.
- [84] Tondu, A. L.; Robichon, C.; Yvan-Charvet, L.; Donne, N.; Le Liepvre, X.; Hajdouch, E.; Ferre, P.; Dugail, I.; Dagher, G. Insulin and angiotensin II induce the translocation of scavenger receptor class B, type I from intracellular sites to the plasma membrane of adipocytes. *J Biol Chem* **280** (2005) 33536-40.
- [85] Pietzsch, J.; Subat, S.; Nitzsche, S.; Leonhardt, W.; Schentke, K. U.; Hanefeld, M. Very fast ultracentrifugation of serum lipoproteins: influence on lipoprotein separation and composition. *Biochim Biophys Acta* **1254** (1995) 77-88.

- [86] Pietzsch, J.; Bergmann, R.; Rode, K.; Hultsch, C.; Pawelke, B.; Wuest, F.; van den Hoff, J. Fluorine-18 radiolabeling of low-density lipoproteins: a potential approach for characterization and differentiation of metabolism of native and oxidized low-density lipoproteins in vivo. *Nucl Med Biol* **31** (2004) 1043-50.
- [87] Packard, C. J.; Munro, A.; Lorimer, A. R.; Gotto, A. M.; Shepherd, J. Metabolism of apolipoprotein B in large triglyceride-rich very low density lipoproteins of normal and hypertriglyceridemic subjects. *J Clin Invest* **74** (1984) 2178-92.
- [88] Karlson, P.; Doenecke, D.; Koolman, J. Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. **14., neubearbeitete Auflage** (1994).
- [89] Stephan, Z. F.; Yurachek, E. C. Rapid fluorometric assay of LDL receptor activity by DiI-labeled LDL. *J Lipid Res* **34** (1993) 325-30.
- [90] Munteanu, A.; Taddei, M.; Tamburini, I.; Bergamini, E.; Azzi, A.; Zingg, J. M. Antagonistic effects of oxidized low density lipoprotein and alpha-tocopherol on CD36 scavenger receptor expression in monocytes: involvement of protein kinase B and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Biol Chem* **281** (2006) 6489-97.
- [91] Valencia, J. V.; Mone, M.; Zhang, J.; Weetall, M.; Buxton, F. P.; Hughes, T. E. Divergent pathways of gene expression are activated by the RAGE ligands S100b and AGE-BSA. *Diabetes* **53** (2004) 743-51.
- [92] Nicholson, A. C.; Frieda, S.; Pearce, A.; Silverstein, R. L. Oxidized LDL binds to CD36 on human monocyte-derived macrophages and transfected cell lines. Evidence implicating the lipid moiety of the lipoprotein as the binding site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15** (1995) 269-75.
- [93] http://www.med4you.at/laborbefunde/lbef2/lbef_blutzuckerbelastung.htm (Download 08.10.2008).
- [94] Graessler, J.; Pietzsch, J.; Westendorf, T.; Julius, U.; Bornstein, S. R.; Kopprasch, S. Glycosidised LDL isolated from subjects with impaired glucose tolerance increases CD36 and peroxisome proliferator-activator receptor gamma gene expression in macrophages. *Diabetologia* **50** (2007) 1080-8.
- [95] Green, H.; Kehinde, O. Sublines of Mouse 3T3 Cells That Accumulate Lipid. *Cell* **1** (1974) 113-116.
- [96] Masella, R.; Vari, R.; D'Archivio, M.; Santangelo, C.; Sczzocchio, B.; Maggiorella, M. T.; Sernicola, L.; Titti, F.; Sanchez, M.; Di Mario, U.; Leto, G.; Giovannini, C. Oxidised LDL modulate adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes by affecting the balance between cell proliferation and differentiation. *FEBS Lett* **580** (2006) 2421-9.
- [97] Stanton, L. A.; van de Venter, M.; Litthauer, D.; Oelofsen, W. Effect of lipoproteins on the differentiation of 3T3-L1 and human preadipocytes in cell culture. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **116** (1997) 65-73.

- [98] Stanton, L. A.; van de Venter, M.; Oelofsen, W. The influence of plasma lipoprotein subfractions on 3T3-L1 and human preadipocyte differentiation in cell culture. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **120** (1998) 507-16.
- [99] Smas, C. M.; Sul, H. S. Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell* **73** (1993) 725-34.
- [100] Boney, C. M.; Fiedorek, F. T., Jr.; Paul, S. R.; Gruppuso, P. A. Regulation of preadipocyte factor-1 gene expression during 3T3-L1 cell differentiation. *Endocrinology* **137** (1996) 2923-8.
- [101] Hoppmann, S.; Haase C; Richter S; Strobel K; Steinbach J; J, P. Fluorine-18 radiolabeling of S100/calgranulins: potential probes for molecular imaging of receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in vivo. *Chen S (ed) Recent Advances of Bioconjugate Chemistry in Molecular Imaging, Research Signpost, Trivandrum (Kerala), India* (2008 (Im Druck)).
- [102] Unoki, H.; Bujo, H.; Yamagishi, S.; Takeuchi, M.; Imaizumi, T.; Saito, Y. Advanced glycation end products attenuate cellular insulin sensitivity by increasing the generation of intracellular reactive oxygen species in adipocytes. *Diabetes Res Clin Pract* **76** (2007) 236-44.
- [103] Stanton, L. A.; van de Venter, M.; Oelofsen, W. Interaction of plasma lipoprotein subfractions with differentiating 3T3-L1 and human mammary preadipocytes in culture. *J Cell Biochem* **74** (1999) 181-93.
- [104] Schwandt, P.; Parhofer, K. G. Handbuch der Fettstoffwechselstörungen. *Schattauer Verlag* **3.Auflage** (2006) 2-57.
- [105] Raynal, I.; Prigent, P.; Peyramaure, S.; Najid, A.; Rebutzi, C.; Corot, C. Macrophage endocytosis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: mechanisms and comparison of ferumoxides and ferumoxtran-10. *Invest Radiol* **39** (2004) 56-63.
- [106] Oka, K.; Sawamura, T.; Kikuta, K.; Itokawa, S.; Kume, N.; Kita, T.; Masaki, T. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates phagocytosis of aged/apoptotic cells in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (1998) 9535-40.
- [107] Endemann, G.; Stanton, L. W.; Madden, K. S.; Bryant, C. M.; White, R. T.; Protter, A. A. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem* **268** (1993) 11811-6.
- [108] Collot-Teixeira, S.; Martin, J.; McDermott-Roe, C.; Poston, R.; McGregor, J. L. CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* **75** (2007) 468-77.
- [109] Janabi, M.; Yamashita, S.; Hirano, K.; Sakai, N.; Hiraoka, H.; Matsumoto, K.; Zhang, Z.; Nozaki, S.; Matsuzawa, Y. Oxidized LDL-induced NF-kappa B activation and subsequent expression of proinflammatory genes are defective in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20** (2000) 1953-60.

- [110] Landschulz, K. T.; Pathak, R. K.; Rigotti, A.; Krieger, M.; Hobbs, H. H. Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *J Clin Invest* **98** (1996) 984-95.
- [111] Han, J.; Hajjar, D. P.; Febbraio, M.; Nicholson, A. C. Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36. *J Biol Chem* **272** (1997) 21654-9.
- [112] Zhao, M.; Liu, Y.; Wang, X.; New, L.; Han, J.; Brunk, U. T. Activation of the p38 MAP kinase pathway is required for foam cell formation from macrophages exposed to oxidized LDL. *APMIS* **110** (2002) 458-68.
- [113] Tontonoz, P.; Nagy, L.; Alvarez, J. G.; Thomazy, V. A.; Evans, R. M. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* **93** (1998) 241-52.
- [114] Feng, J.; Han, J.; Pearce, S. F.; Silverstein, R. L.; Gotto, A. M., Jr.; Hajjar, D. P.; Nicholson, A. C. Induction of CD36 expression by oxidized LDL and IL-4 by a common signaling pathway dependent on protein kinase C and PPAR-gamma. *J Lipid Res* **41** (2000) 688-96.
- [115] Yvan-Charvet, L.; Bobard, A.; Bossard, P.; Massiera, F.; Rousset, X.; Ailhaud, G.; Teboul, M.; Ferre, P.; Dagher, G.; Quignard-Boulange, A. In vivo evidence for a role of adipose tissue SR-BI in the nutritional and hormonal regulation of adiposity and cholesterol homeostasis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27** (2007) 1340-5.
- [116] Han, J.; Nicholson, A. C.; Zhou, X.; Feng, J.; Gotto, A. M., Jr.; Hajjar, D. P. Oxidized low density lipoprotein decreases macrophage expression of scavenger receptor B-I. *J Biol Chem* **276** (2001) 16567-72.
- [117] Nagelkerke, J. F.; Barto, K. P.; van Berkel, T. J. In vivo and in vitro uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein by rat liver endothelial, Kupffer, and parenchymal cells. *J Biol Chem* **258** (1983) 12221-7.

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Dresden, den 17.10.2008

A handwritten signature in blue ink that reads "Christin Neuber". The signature is written in a cursive style and is placed on a light blue rectangular background.

Christin Neuber

Danksagung

Ich danke allen, die mich bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben, insbesondere Herrn PD Dr. Michael Glei und Herrn PD Dr. Jens Pietzsch für die Überlassung des interessanten Themas, die stetig motivierende Unterstützung und die anregenden Diskussionen. Herrn PD Dr. Pietzsch danke ich außerdem für die Unterstützung bei den [^{18}F]SFB-Markierung der LDL.

Frau Mareike Barth, Frau Dipl.-Biol. Susan Hoppmann und allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Radiopharmazie danke ich für die geduldige Unterstützung im Labor, die fortwährende Hilfsbereitschaft und guten Ratschläge sowie für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Des Weiteren danke ich Frau Uta Lenkeit für die Unterstützung bei der LDL-Präparation, Frau Uta Lenkeit und Frau Dipl.-Chem. Susan Richter für die [^{18}F]SFB-Herstellung sowie Frau Regina Herrlich für die radiopharmakologischen Untersuchungen am Tier.

Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung während des gesamten Studiums.