

**Adipokine in der Entwicklung der muskulären
Insulin-Resistenz:
Charakterisierung mit Hilfe eines Co-Kultur Systems
primärer humaner Fett- und Skelettmuskelzellen**

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Daniela Dietze-Schroeder

aus Osnabrück

2005

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Jürgen Eckel

Korreferent: Prof. Dr. Frank Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 12.05.2005

1. EINLEITUNG	3
1.1 Diabetes Mellitus	3
1.2 Insulinsignalweiterleitung	5
1.3 Insulin-Resistenz	11
1.4 Fettgewebefaktoren	12
1.4.1 TNF α	12
1.4.2 IL-6	13
1.4.3 Angiotensin II	13
1.4.4 Resistin	14
1.4.5 Adiponectin	15
1.5 Ziele	16
2. MATERIAL & METHODEN	17
2.1. Material	17
2.1.1 Chemikalien	17
2.1.2 Adipokine und Inhibitoren	18
2.1.3 Kit-Systeme	18
2.1.4 Antikörper	19
2.1.5 Zellen und Zellkulturmedium	20
2.2 Methoden	22
2.2.1 Kultivierung menschlicher Skelettmuskelzellen	22
2.2.2 Kultivierung menschlicher Adipozyten	23
2.2.3 Co-Kultivierung menschlicher Skelettmuskelzellen und Adipozyten	24
2.2.4 Gewinnung des Fettzellüberstands	25
2.2.5 Solubilisierung humaner Skelettmuskelzellen	26
2.2.6 Immunopräzipitation von IRS-1	26
2.2.7 Proteinbestimmung nach Bio-Rad	27
2.2.8 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	27
2.2.9 Transfer der Proteine auf Membranen	27
2.2.10 Färbetechniken	28
2.2.10.1 Silberfärbung	28
2.2.10.2 Ponceau-S-Technik	28
2.2.11 Immunodetektion mit verstärkter Chemilumineszenz	28
2.2.12. Phosphotyrosinnachweis	29
2.2.13 Strippen von Blotmembranen	29
2.2.14 ELISA	30
2.2.15 Berechnung und Statistik	30
2.2.16 Schematische Darstellung der ausgeführten Experimente	31
3. ERGEBNISSE	32
3.1 Co-Kultur von humanen Myozyten und humanen Adipozyten	32

3.1.1 Die Expression der Insulinsignalketten Proteine IRS-1, Akt und GSK3 α / β	33
3.1.2 Die Insulinsignalweiterleitung	34
3.2 Mögliche Mediatoren der Insulin-Resistenz aus den Fettzellen	39
3.2.1 TNF α	39
3.2.2 IL-6	45
3.2.3 Angiotensin II	47
3.2.4 Resistin	49
3.3 Suche nach neuen Adipokinen, die als Mediatoren der muskulären Insulin-Resistenz in Frage kommen	52
3.3.1 Charakterisierung des Fettzellüberstandes	52
3.3.2 Auftrennungsversuche	55
3.4 Wirkmechanismen von Mediatoren der Insulin-Resistenz aus Fettzellen	60
3.4.2 JNK	60
3.4.2. NF κ B	61
3.5 Die Rolle des Adiponectin	64
3.5.1 Adiponectin in der Co-Kultur	64
3.6 Schematische Übersicht der Ergebnisse	71
4. DISKUSSION	72
4.1 Co-Kultur von humanen Myozyten und humanen Adipozyten	73
4.2 Kandidatenfaktoren	77
4.2.1 TNF α	77
4.2.2 Resistin	79
4.2.3 Angiotensin II	80
4.2.4 IL-6	82
4.3 Fettzellüberstand	83
4.4 Fettzelle und Adiponectin	84
4.5 Fettleibigkeit und Entzündung	86
4.5.1 JNK / NF κ B	87
5. ZUSAMMENFASSUNG	90
6. LITERATURVERZEICHNIS	92
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	117
8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	118

1. Einleitung

1.1 *Diabetes Mellitus*

Die Diagnose Diabetes Mellitus wird im Zuge der Lebensstandarderhöhung weltweit immer häufiger gestellt. So ist diese Erkrankung derzeit die Hauptbedrohung für die Gesundheit der Bevölkerung im 21. Jahrhundert (Zimmet, 2001). Insgesamt schätzt man die Zahl diagnostizierter Diabetiker auf 150 Millionen Menschen und man geht davon aus, dass sich diese Zahl in den nächsten 30 Jahren verdoppeln wird (Amos et al. 1997, King et al, 1998).

Man unterscheidet zwei Haupt-Diabetesformen, den Typ I Diabetes und den Typ II Diabetes. Die Gemeinsamkeit beider Formen liegt in der dauerhaft erhöhten Blutzuckerkonzentration oder auch Hyperglykämie durch mangelnde Insulinwirkung. Die Ursache ist jedoch verschieden. Der Typ I Diabetes resultiert aus einer ungenügenden Insulinkonzentration im Blut. Bei dieser Autoimmun-Krankheit wendet sich das körpereigene Abwehrsystem gegen die β -Zellen der Bauchspeicheldrüse (Pankreas), was zu einer Zerstörung dieser Zellen führt (Iwahashi et al, 1998). Da diese Zellen für die Produktion und Freisetzung von Insulin zuständig sind, resultiert das Fehlen dieser Zellen in einem Verlust von körpereigenem Insulin. Patienten mit Typ I Diabetes sind daher zum Überleben auf körperfremdes Insulin angewiesen.

Anders beim Typ II Diabetes, hier produziert der Körper ausreichende Mengen Insulin, die jedoch im Körper keine Wirkung zeigen. Die fehlende Insulinwirkung an den peripheren Geweben bezeichnet man als Insulinresistenz, einem Charakteristikum des Typ II Diabetes. Um die mangelnde Insulinwirkung auszugleichen, versucht der Körper, mit einer erhöhten Insulinproduktion dem Defizit entgegen zu wirken. Diese anormale kompensatorische Insulinsekretion ist ein weiteres Merkmal des Typ II Diabetes.

Dabei ist der Typ II Diabetes die bei weitem häufigste Diabetesform, ca. 90 % aller Diabetiker sind diesem Typ zuzuordnen. Früher wurde diese Diabetesform als Altersdiabetes bezeichnet, da sie vorwiegend in mittleren oder höheren Lebensjahren auftrat, doch heute erkranken immer mehr junge Menschen, ja sogar Kinder, an dieser Form des Diabetes (Diabetes Care 2000; 23 381-389). Beschränkt man sich in der Betrachtung auf die Bundesrepublik Deutschland, so sind 5% der Bevölkerung schon an Typ II Diabetes erkrankt, Tendenz steigend (Hauner,1998).

Die Dunkelziffer nicht diagnostizierter Diabetiker dürfte schon heute weitaus höher liegen.

Als Hauptursache für die Entwicklung einer Insulin-Resistenz und eines Typ II Diabetes wird die Fettleibigkeit (Adipositas) angesehen. So besteht ein enger Zusammenhang zwischen Körperfettanteil und Diabetesrisiko. Eine Erhöhung des Körperfettanteils erhöht das Diabetesrisiko, wohingegen eine Gewichts- und somit Fettreduktion das Diabetesrisiko senkt (Colditz et al.,1995). Faktoren wie falsche ballaststoffarme Ernährung mit einem hohen Anteil an gesättigten Fettsäuren und zu wenig Bewegung gehen häufig mit der Adipositas einher. Eine genetische Prädisposition für die Entwicklung eines Typ II Diabetes kann man bisher nur für 5-10% der Betroffenen bestimmen. Die Pathophysiologie, die zur Entstehung einer Insulin-Resistenz führt, ist jedoch noch weitestgehend unverstanden. Neben der grundlegenden Typ II Diabetes Behandlung durch Gewichtsreduktion, Ernährungsschulung und körperlicher Aktivität, ist es für die Entwicklung neuer Therapieformen wichtig, die molekularen Mechanismen der Insulinwirkung und ihre Veränderung bei erhöhtem Körperfettanteil zu verstehen.

1.2 Insulinsignalweiterleitung

Das Insulin ist ein Peptidhormon aus den β -Zellen der Langerhansschen Inseln der Pankreas. Es besteht aus 51 Aminosäuren mit einer relativen Molekülmasse von 5700-5800. Das Insulin besteht aus zwei Peptidketten, die durch zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, die A-Kette mit 21 und die B-Kette mit 30 Aminosäuren.

Insulin wurde erstmals 1922 von Banting und Best isoliert und als erstes Protein von Sanger in den Jahren 1951-53 sequenziert. Im Jahre 1978 gelang es, das Insulingen in ein Bakteriengenom einzubauen und dort zu exprimieren. Heutzutage ist humanes Insulin, das von genetisch veränderten Bakterien sezerniert wird, eines der wichtigsten Peptidhormone, die künstlich produziert werden können.

Die Freisetzung von Insulin aus den β -Zellen des Pankreas beginnt, sobald die Glucosekonzentration im Blut über den Wert von 2-3 mmol/l hinauswächst. Die ausgeschüttete Insulinmenge nimmt dabei parallel zur Glucosekonzentration im Blut (bis zu 15 mmol/l) zu. Dabei beträgt die Halbwertszeit von freiem Insulin 10 min, wohingegen sie bei der Rezeptor-gebundenen Form bei 40 min liegt.

Der Insulinrezeptor (IR) besteht aus vier Untereinheiten, von denen je zwei identisch sind. Die beiden α -Untereinheiten befinden sich im extrazellulären Raum, wohingegen die beiden β -Untereinheiten die Zellmembran durchspannen und bis in den intrazellulären Raum reichen. Die einzelnen Untereinheiten werden durch Disulfidbrücken zusammen gehalten (Kasuga et al, 1982). Diese natürliche $(\alpha/\beta)_2$ Struktur ist für die Funktion des Rezeptors essentiell. Der Insulinrezeptor wird mit unterschiedlicher Intensität von fast allen Zellen exprimiert. So reicht seine Expressionsrate von wenigen Hundert Rezeptoren auf Erythrozyten (Bachman et al, 1981) bis zu Hunderttausend auf Skelettmuskel-, Fett- und Leberzellen. Zu den Insulin empfindlichsten Geweben gehören daher vor allem die Muskulatur, das Fettgewebe und die Leber. Hier werden die metabolischen und mitogenen Effekte von Insulin durch Bindung an die Insulinrezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen ausgelöst

Eine der Hauptaufgaben des Insulin ist, die Glucoseaufnahme in die Muskel- und Fettzellen durch eine selektive Permeabilitätserhöhung zu stimulieren. Durch diese Stimulation kommt es nach Insulingaben zu einem raschen Blutzuckerabfall. Für die Glucoseaufnahme in die Zelle ist ein Transportsystem verantwortlich, dass

nach Insulinstimulation Glucosetransportermoleküle (GLUT4) in die Plasmamembran der Zellen verlagert und so die Kapazität der Glucoseaufnahme erhöht. In der Muskelzelle kommt es zu einer gesteigerten Glycogenbiosynthese sowie Glycogen- und Aminosäurespeicherung. In der Fettzelle wird neben der Glycogensynthese auch die Triglyceridsynthese aktiviert. In der Leber induziert Insulin neben der Fettsäurebiosynthese die Synthese und Speicherung von Glycogen. Daneben hemmt es die Enzyme der Gluconeogenese. So ist Insulin einer der wichtigsten Regulatoren des Kohlenhydratstoffwechsels. Eine weitere wichtige Funktion von Insulin liegt in der Regulation von Zellwachstum und Proliferation durch Genregulation (Straus, 1981).

Schnelle Stoffwechselwirkungen von Insulin		
Effekt	Gewebe	Stoffwechselwirkung
↑ Glucosetransport	Fettzelle, Skelettmuskel	↓ Blutglucosekonzentration
	Skelettmuskel	↑ Glycogensynthese; ↓ Glycolyse
	Fettzelle	↑ Triacylglycerinsynthese
↑ Glycogensynthese	Leber, Skelettmuskel	↑ Glycogensynthese
↑ cAMP-spezifische Phosphodiesterase		↓ cAMP Spiegel
	Fettzelle	↓ Lipolyse
	Leber, Skelettmuskel	↓ Glycogenolyse; ↑ Glycogensynthese
	Leber	↓ Gluconeogenese
↑ Aminosäuretransport	Skelettmuskel	↑ zellulären Aminosäurenkonzentration ↑ Proteinbiosynthese

Die Insulinsignalweiterleitung stützt sich auf Proteine, die in ihrer Struktur zwischen den einzelnen Spezies hoch konserviert sind (Paradis et al., 1998). Sie wird durch die Bindung von Insulin an seinen Rezeptor, den Insulin Rezeptor (IR), eingeleitet. Er besteht aus einer extrazellulären Liganden-Bindungsstelle und einer intrazellulären Tyrosin Kinase Domäne (Ullrich et al., 1985). Durch die Bindung von Insulin wird die Konformation des Rezeptors geändert, was zu einer Autophosphorylierung intrazellulärer Tyrosinreste und dadurch zur Aktivierung des Rezeptors führt (Kasuga et al, 1985). An diese Autophosphorylierungsstellen binden daraufhin intrazelluläre Adapterproteine, wie z.B. Insulin **R**ezeptor **S**ubstrat-1 (IRS-1),

die nun ihrerseits an spezifischen Sites Tyrosin-phosphoryliert werden. Neben Proteinen der IRS Familie wird auch eine Reihe anderer verwandter Proteine vom IR rekrutiert. Hierzu zählen unter anderem Shc, APS, SH2B, Gab1/2, Dock1/2 und Cbl (Baumann et al, 2000; Chiang et al., 2001; Kotani et al., 1998; Lock et al., 1999; Noguchi et al., 1999; Pawson and Scott, 1997; Yenush et al., 1998). Von diesen vielfältigen Adapterproteinen ausgehend wird eine Reihe metabolischer und mitogener Wirkungen moduliert. Insgesamt gibt es jedoch zwei Hauptsignalwege: den **Mitogen-Aktivierten-Proteinkinase (MAPK) Signalweg** und den **Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3K) Signalweg**. Neuere Arbeiten belegen, dass fast alle Insulin Antworten, die in den Kohlenhydratstoffwechsel involviert sind, durch die der PI-3K vorgeschalteten Proteine IRS-1 und IRS-2 vermittelt werden (White, 2003).

Die IRS Proteine spielen in unterschiedlichen Bereichen von Wachstum und Metabolismus eine wichtige Rolle. Dabei fehlt es ihnen an eigener katalytischer Aktivität, sie besitzen aber eine Reihe von Interaktions- und Phosphorylierungsstellen. Bislang wurden sechs Mitglieder der IRS-Familie kloniert (IRS-1, IRS-2, IRS-3, IRS-4, IRS-5/DOK4, und IRS-6/DOK5). Diese Proteine zeichnen sich durch unterschiedliche Gewebs-, Subzellularverteilung und Interaktionen mit den Adapterproteinen aus. IRS-1 und IRS-2 sind dabei in weiten Teilen des Körpers exprimiert, wobei im Falle von IRS-1 Skelettmuskel, Hirn, Lunge, Dünndarm und Nieren eine verstärkte Expression aufweisen (Araki et al, 1993). Die IRS-3 Expression findet man ausschließlich im Fettgewebe von Nagern (Lavan et al., 1997). IRS-4 wird in Thymus, Gehirn, Niere und β -Zellen exprimiert (Uchida et al., 2000). IRS-5 wird bis auf Leber und Niere ubiquitär exprimiert, wohingegen die Expression von IRS-6 im Skelettmuskel am prominentesten ist (Cai et al., 2003).

Die Mitglieder der IRS Familie sind durch eine N-Terminale **Pleckstrin Homologe (PH) Domäne** charakterisiert, die an eine **Phospho-Tyrosin Binde (PTB) – Domäne** grenzt. Diesen beiden Domänen folgt ein unterschiedlich langer C-Terminaler Strang mit vielen verschiedenen Tyrosin- und Serin-Phosphorylierungsstellen. Die PH und PTB Domänen sind für die Interaktion der IRS Proteine mit dem Insulin- und IGF-1- Rezeptor zuständig (Burks et al., 1997; Yenush et al., 1998). Die PH Domäne dirigiert die Proteine durch die Interaktion mit Phospholipiden zur Plasmamembran (Burks et al, 1998; Farhang-Fallah et al.,2000). Die PTB Domäne bindet hiernach an ein phosphoryliertes NPXY Motiv im IR bzw.

IGF-1R. Die IRS Proteine können jedoch auch noch mit weiteren Rezeptoren interagieren, die kein NPXY Motiv aufweisen (Wolf et al., 1995).

Der C-Terminale Bereich der IRS Proteine fungiert mit seinen vielen Tyrosin-Phosphorylierungsstellen als Regulator für die Rekrutierung weiterer abwärts gelegener Adapterproteine, die über eine src homolog-2 (SH2) Bindungsstelle verfügen. Bei IRS-1 und IRS-2 befinden sich ca. 15 potentielle Phosphorylierungsstellen auf dem C-Terminale Bereich, von denen jedoch bislang nur wenige genauer charakterisiert sind. Die IRS-1 Tyrosine 608 und 628 scheinen jedoch für die Weiterleitung des Insulinsignals an die nachfolgende **Phosphatidylinositol-3-kinase (PI-3K)** verantwortlich zu sein (Esposito et al., 2001). Die PI-3K leitet das Insulinsignal weiter, wenn sie an die Tyrosin-phosphorylierten IRS Proteine bindet. Neben der Akt werden auch die atypischen **Protein Kinase C (PKC)** Enzyme λ und ζ PI-3K abhängig aktiviert. Diese Enzyme sind ebenso wie die Akt für den Insulin-stimulierten Glucosetransport von Bedeutung. Inwieweit die weiterführenden Signalwege von Akt und PKC miteinander interagieren und welche Rolle ein jeder in der Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran spielt, bedarf noch genauerer Untersuchungen.

Die Akt wurde erstmals als ein Nagerzellen transformierendes, retrovirales Onkogen Produkt v-Akt identifiziert (Bellacosa et al., 1991; Staal, 1987). Schon kurze Zeit später entdeckte man, dass Akt Isoformen bei Brust-, Gebärmutter- und Bauchspeicheldrüsenkrebs überexprimiert sind (Cheng et al.; 1992, 1996; Nakatani et al., 1999). Weiterführende Arbeiten zeigten, dass die Akt in einer konstitutiv aktiven Form Zellen zur Teilung befähigt, die sich eigentlich nicht mehr teilen sollten und darüber hinaus jegliche Apoptose in diesen Zellen verhindert wird. Dadurch wird das Überleben von Tumorzellen sichergestellt, die normalerweise eine Apoptose durchlaufen sollten. Die für diese Arbeit interessante Funktion ist jedoch die Rolle der Akt in der Insulin Signalweiterleitung.

Die Akt ist ein 57 kDa Protein, das in drei Isoformen vorkommt (Akt1, Akt2 und Akt3) (Vanhaesebroeck, Alessi, 2000). Im Skelettmuskel wird überwiegend Akt1 exprimiert, wohingegen im Fettgewebe Akt 2 dominiert (Walker et al., 1998).

Jede Isoform besitzt eine N-Terminale PH-Domäne, eine Kinase Domäne und eine C-Terminale regulatorische Domäne (Coffer et al., 1998). Sie wird nach Insulinstimulus PI-3K-abhängig aktiviert. Diese Aktivierung erfolgt innerhalb weniger Minuten bis zur maximalen Ansprechbarkeit und ist ein zweistufiger Prozess. Im

ersten Schritt werden die durch die PI-3K vermehrt gebildeten PIP2 und PIP3 Moleküle an die PH Domäne der Akt angelagert (Litherland, 2001), was eine Konformationsänderung der Kinase zur Folge hat. Hiernach wird die Kinase vom Zytosol zur Plasmamembran transloziert, wo sie phosphoryliert und somit aktiviert wird (Andjelkovic et al., 1997). Die genauen Mechanismen, die der Translokation der Akt zur Plasmamembran zugrunde liegen, sind noch nicht genau untersucht, doch gibt es Hinweise, dass ein intaktes Aktin-Zytoskelett hierfür von großer Bedeutung ist (Peyrollier et al., 2000). Die Phosphorylierung der Akt findet an zwei verschiedenen Phosphorylierungsstellen statt. Die eine Stelle befindet sich in der Kinase Domäne: Threonin 308 und die andere Stelle in der C-terminalen regulatorischen Region: Serin 473. Die Kinase, die für die Phosphorylierung von Threonin 308 zuständig ist, ist die PDK1 (Alessi et al., 1997; Stokoe et al., 1997). Die Identität der Kinase, die für die Phosphorylierung von Serin 473 zuständig ist, ist noch nicht vollständig geklärt. Zwar spekuliert man darüber, ob es sich hier um die PDK2 handelt, aber auch PDK1 und eine Autophosphorylierung scheinen möglich (Balendran et al., 1999; Toker und Newton, 2000).

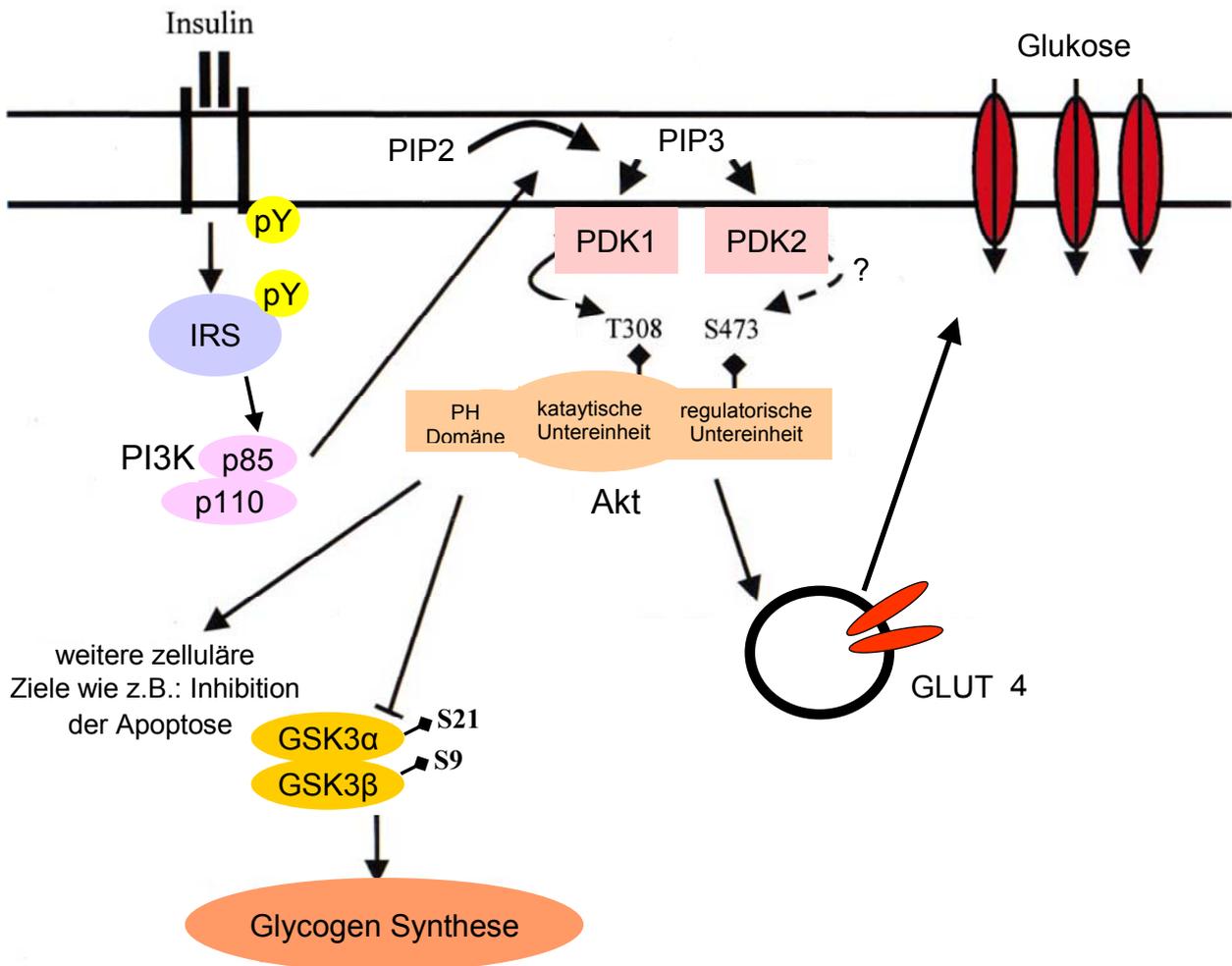


Abb.: Vereinfachte Darstellung der Insulinsignalkette

Die GSK3 war eines der ersten Substrate der Akt, das identifiziert wurde. Seine Phosphorylierung am N-Terminus durch Akt führt zu einer Inaktivierung dieser Kinase (Cross et al., 1995). Sie ist in die Kontrolle vieler zellulärer Mechanismen eingebunden. Dazu gehören die Glycogen- und Proteinsynthese genauso wie die Modulation der Aktivität einiger Transkriptionsfaktoren (Coffer et al., 1998). In unstimulierten Zellen ist die GSK3 aktiv und sorgt so für die Phosphorylierung und Inhibition der Glycogensynthase (Cross et al., 1995). Insulin stimuliert die Glycogensynthese gleichermaßen durch Phosphorylierung der GSK3 und durch Dephosphorylierung der Glycogensynthase. Die Inaktivierung der GSK3 findet durch Phosphorylierung der beiden Untereinheiten GSK3α und GSK3β statt (Cross et al., 1995). An der GSK3α Untereinheit wird Serin 21 und an der GSK3β Untereinheit Serin 9 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung wird durch die PI-3K abhängig von der Akt mediiert.

1.3 Insulin-Resistenz

Die Insulin-Resistenz, die allgemein als eine Unfähigkeit der peripheren Gewebe auf physiologische Dosen von Insulin zu antworten, definiert wird, ist eine der ersten Veränderungen, die zu einem Typ 2 Diabetes führen (Kahn und Flier, 2000; Kruszynska und Olefsky, 1996, Reaven, 1995). Obwohl schon eine Vielzahl von Versuchen unternommen wurde, die Insulinsignalweiterleitung vollständig zu verstehen (Pessin und Saltiel, 2000; White, 2002), sind die molekularen Mechanismen, die zu einer Insulin-Resistenz führen, noch immer nicht aufgeklärt.

Die IRS-1 Proteine scheinen dabei jedoch eine große Rolle zu spielen. So werden sie als Antwort auf einen Insulinstimulus Tyrosin-phosphoryliert. Eine verminderte Tyrosin-Phosphorylierung des IRS-1 ist jedoch normalerweise mit einer Insulin-Resistenz verbunden (White, 2002; Virkamaki et al., 1999; Birnbaum, 2001). Da das IRS-1 ebenfalls an Serin und Threonin Resten phosphoryliert werden kann (Sun et al., 1991), wurde angenommen, dass diese Phosphorylierung eine mögliche negative Rückkopplung darstellt, um die Insulinsignalweiterleitung zu stoppen (Tanti et al., 1994; Hotamisligil et al., 1996; Staubs et al., 1998). Tatsächlich konnte ein enger Zusammenhang zwischen der IRS-1 Serin-Phosphorylierung mit Insulin-Resistenz und Typ 2 Diabetes herausgestellt werden (Virkamaki et al., 1999; Werner et al., 2004; Qiao et al., 2002). So wird z.B. die Phosphorylierung von Serin 307 durch TNF α verstärkt und durch die Serin-Kinasen JNK und IKK β ausgelöst (Rui et al., 2001; Aguirre et al., 2000; Gao et al., 2002). Des Weiteren kann auch die Akt und die GSK3 die Serin-Phosphorylierung von IRS-1 vermitteln (Paz et al., 1999; Eldar-Finkelman und Krebs, 1997). Weitere Studien weisen auf die Aktivität der GSK3 bei Insulin-Resistenz und Diabetes hin. So ist die GSK3 Aktivität im diabetischen Gewebe erhöht (Eldar-Finkelman und Krebs, 1999; Nikoulina et al., 2000) und eine Behandlung mit GSK3 Inhibitoren führt zu einem Effekt, der mit dem von Insulin zu vergleichen ist (Nikoulina et al., 2002).

1.4 Fettgewebefaktoren

1.4.1 TNF α

Tumor Nekrose Faktor- α (TNF α) wird hauptsächlich von Makrophagen sezerniert und existiert in zwei verschiedenen Formen. Zum einen gibt es die 26 kDa große Transmembran-Form des TNF α , zum anderen die durch proteolytische Spaltung der Transmembranform umgewandelte 17 kDa große, lösliche Form. Aufgrund der hohen Aktivität beider Formen sind Auswirkungen auf den Metabolismus sowohl lokal, als auch in weit entfernten Geweben denkbar (Xu et al., 1999). Beim Menschen wurde zusätzlich zur Expression in Makrophagen eine Expression in Adipozyten (Hotamisligil et al., 1995), Kardiomyozyten und im Skelettmuskel nachgewiesen (Saghizadeh et al., 1996).

Seine Wirkung entfaltet das TNF α über zwei verschiedene Rezeptoren. So gibt es den TNF α Rezeptor 1 (TNFR1) und den Rezeptor 2 (TNFR2). Der TNFR1 hat eine Größe von 60 kDa, der TNFR2 ist 80 kDa groß. Wird der TNFR1 aktiviert, so kann das neben Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF κ B und c-Jun (Chen et al., 2002) eine Apoptose (Tartaglia et al. 1993a), oder eine antiapoptische Wirkung zur Folge haben. Der TNFR2 ist unter anderem bei der Rekrutierung von Liganden für den TNFR1 behilflich (Tartaglia et al., 1993b) und inhibiert die frühe Hämatopoese (Vandenaabele et al., 1995).

TNF α wurde in Nagetieren schon früh als ein Faktor angesehen, der in die Entstehung der Insulin-Resistenz involviert ist (Hotamisligil et al., 1993). TNF α induziert eine Phosphorylierung von IRS-1 an Serinresten, was zu einer Inhibition des Insulin Signals führt (Hotamisligil et al., 1996). Darüber hinaus induziert TNF α die Lipolyse, und führt zu einer Downregulation der IRS-1 Expression und damit verbunden der Insulinansprechbarkeit des GLUT4 (Stephens et al., 1997). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die membranständige Form des TNF α , die in Adipösen heraufreguliert ist, in einer autokrinen Weise die Fettzelle massiv stören kann (Xu et al 2002 a/b). Die Neutralisierung von TNF α im Serum stellt die Insulinsensitivität in adipösen Zucker-Ratten (fa/fa), aber nicht im Menschen wieder her (Hotamisligil et al., 1993; Cheung et al., 1998; Ofei et al., 1996). Dabei zeigt sich

in vielen Tiermodellen der genetisch determinierten Insulin-Resistenz eine TNF α Überproduktion (Moller, 2000). Beim Menschen zeigt sich ebenfalls ein direkter Zusammenhang zwischen der mRNA bzw. Proteinexpressionsrate von TNF α im Fettgewebe und der Fettleibigkeit. Nach Gewichtsverlust sinken auch die TNF α Spiegel wieder (Kern et al., 2001, Kern et al., 1995). Die Serumkonzentrationen von TNF α bleiben jedoch ohne Korrelation zur Fettleibigkeit, wenn auf den BMI normiert wird (Bluher et al., 2001)

1.4.2 IL-6

Interleukin-6 (IL-6) wurde ursprünglich als ein von Leukozyten sezerniertes proinflammatorisches Protein identifiziert. Da jedoch rund 30% des IL-6 im Körper vom Fettgewebe ausgeschüttet wird, ist es ebenso als Adipozytokin anzusehen (Mohamed-Ali et al., 1997). Das IL-6 kann die Insulinsensitivität über verschiedene Mechanismen beeinflussen. Das vom omentalen Fett ausgeschüttete IL-6 kann direkt in die Leber gelangen und dort die Triglyceridausschüttung stimulieren (Nonogaki et al., 1995). Darüber hinaus stört das IL-6 die Insulinsignalweiterleitung in Leberzellen von Mäusen und 3T3-L1 Adipozyten durch verminderte Aktivierbarkeit von IRS-1 und PI-3K (Senn et al., 2002; Rotter et al., 2002). Eine Gabe von rekombinatem IL-6 in Ratten und Menschen führt zu einer Glukoneogenese in der Leber, die wiederum eine Hyperglykämie, verbunden mit einer kompensatorischen Hyperinsulinämie, zur Folge hat. (Stith und Luo, 1994; Tsigos et al., 1997). Die Plasmakonzentrationen von IL-6 sind im Menschen und in Mäusen, die eine Fettleibigkeit oder eine Insulin-Resistenz aufweisen, stark erhöht (Vozarova et al., 2001).

1.4.3 Angiotensin II

Angiotensin II (Ang II) ist das Hormon, das als Mitglied des Renin-Angiotensin-Systems in der Regulation von z.B. Blutdruck, kardialer und vaskulärer Funktionen eine Hauptrolle übernimmt. Angiotensin II bindet an zwei Rezeptoren: Angiotensin Rezeptor Typ 1 (AT1) und Typ 2 (AT2). Der AT1 Rezeptor ist im Körper weit verteilt und mediert die meisten der von Ang II ausgelösten Effekte. Der AT2 hingegen wirkt oft als Antagonist der durch den AT1 ausgelösten Effekte (Carey et al., 2000).

Neben der Leber ist das weiße Fettgewebe einer der Hauptexpressionsorte des Angiotensinogens (Philips et al., 1993). Das Angiotensin, das aus dem Angiotensinogen der Adipozyten gebildet wird, löst eine Reihe von physiologischen Effekten aus, wenn es an spezifische Rezeptoren bindet. Neben den kardiovaskulären Effekten ist das Renin Angiotensin System der Fettzellen auch in das Wachstum und die Differenzierung des Fettgewebes einbezogen (Saint-Marc et al., 2001; Janke et al., 2002). Eine Überfütterung führt in Ratten zu einer starken lokalen Zunahme von Angiotensinogen und Angiotensin II im Fettgewebe (Frederich et al., 1992). In verschiedenen Studien am Menschen konnte gezeigt werden, dass eine lokale Zunahme von Ang II im Fettgewebe mit einer Fettleibigkeit und einem Bluthochdruck verbunden ist (Giachetti et al., 2002; Gorzelniak et al., 2002).

Die Gabe eines AT1 Antagonisten führte in Fruktose gefütterten und Zuckerfetten Ratten zu einer Wiederherstellung der Insulinsensitivität (Okada et al., 2004; Ran et al., 2004). Die Blockade dieses Systems in fettleibigen Patienten ohne Bluthochdruck, mit oder ohne Diabetes, führte jedoch zu keiner Verbesserung der Insulinsensitivität (Luzido et al., 2002).

1.4.4 Resistin

Das neu entdeckte Hormon Resistin wurde von Stepan isoliert (2001a/b). Resistin, das auch als „Adipocyte secreted factor“ (ADSF) und „found in inflammatory zone 3“ (FIZZ3) bekannt ist, ist ein niedermolekulares, Cystein-reiches Protein mit nur 104 Aminosäuren beim Menschen und 114 Aminosäuren in Mäusen. Es wurde vermutet, dass dieses Protein die Glucosetoleranz empfindlich stört (Stepan et al., 2001a). Resistin wird von Adipozyten sekretiert und beeinflusst die Insulinsensitivität im Skelettmuskel, in Leberzellen und im Fettgewebe selbst (Shojima et al., 2002). Obwohl ursprünglich postuliert wurde, dass Resistin Fettgewebe spezifisch in Nagetieren exprimiert wird (Kim et al., 2001), konnten weitere Studien zeigen, dass das Protein im Menschen auch in anderen Geweben produziert wird. So findet man es in geringen Konzentrationen in Präadipozyten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen und mononukleären Zellen (Savage et al., 2001).

Es wird angenommen, dass Resistin durch eine Interaktion mit einem oder mehreren Proteinen der Insulinsignalkaskade eine Insulin-Resistenz auslöst und so das molekulare Verbindungsstück zwischen Fettleibigkeit und Typ 2 Diabetes

darstellt. In Übereinstimmung mit dieser Ansicht konnten einige Studien belegen, dass die Genexpression von Resistin bei genetisch bedingter und Diät-induzierter Fettleibigkeit deutlich über dem Durchschnitt liegt und durch Thiazolidindione stark gesenkt werden kann (Steppan et al., 2001a). Dabei sind jedoch Mutationen im Resistingen nicht als epidemiologischer Marker für die Entstehung eines Typ 2 Diabetes und Fettleibigkeit zu sehen (Engert et al., 2002), so dass Veränderungen im Expressions- bzw. Sekretionsmuster von Resistin als auslösende Faktoren angenommen werden können. Tatsächlich belegen einige Studien, dass die Expression von Resistin durch eine Reihe von Faktoren einschließlich Glucose und anderer Faktoren wie $\text{TNF}\alpha$, Insulin und Thiazolidindione, die die Insulinsensitivität beeinflussen können (Fasshauer et al., 2001; Haugen et al., 2001; Shojima et al., 2002), reguliert wird. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde vermutet, dass Resistin die Verbindung zwischen Fettleibigkeit und Diabetes herstellten, und die anti-diabetischen Effekte der Thiazolidindione erklären kann.

1.4.5 Adiponectin

Adiponectin ist ein 30 kDa Protein, das beim Menschen in hohen Konzentrationen als Trimer oder in größeren Komplexen im Plasma zirkuliert (Rajala & Scherer, 2003). Die Arbeitsgruppe von Kadowaki hat kürzlich die Klonierung von zwei Adiponectinrezeptoren beschrieben, die eine differentielle Expression in Muskel und Leber zeigen (Yamauchi et al., 2003). Diese Rezeptoren sind auch in Fettzellen vorhanden und zeigen eine Differenzierungs-abhängige Expression (Fasshauer et al., 2004). Die Mechanismen der Signalauslösung durch Adiponectinrezeptoren sind jedoch weitgehend unbekannt. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Adipokinen sind die Plasmaspiegel von Adiponectin bei Patienten mit Adipositas deutlich vermindert (Arita et al., 1999) und neue Literaturdaten bestätigen den prädiktiven Wert niedriger Adiponectinkonzentrationen für die Entwicklung eines Typ 2 Diabetes beim Menschen (Spranger et al., 2003). Weiterhin wird vermutet, dass Adiponectin als endogenes anti-inflammatorisches Agens auf der Ebene vaskulärer Zellen wirksam ist (Ouchi et al., 2000). Intravenöse Gabe von rekombinantem Adiponectin führte bei verschiedenen Nagermodellen der Adipositas und des Typ 2 Diabetes zu einer Wiederherstellung der normalen Insulinsensitivität (Yamauchi et al., 2001). Es wird vermutet, dass Adiponectin diese Wirkung durch eine Hemmung

der hepatischen Glucoseproduktion und eine Steigerung der Fettsäureoxidation im Muskel unter Beteiligung der AMP-Kinase erzielt (Havel, 2004). Es gibt aber bislang keine Daten, die eine direkte Wirkung von Adiponectin auf den menschlichen Skelettmuskel und eine hiermit verbundene Verbesserung der Insulinwirkung belegen. Ein weiterer Angriffspunkt der Wirkung von Adiponectin ist die Fettzelle, der bislang jedoch nicht untersucht wurde.

1.5 Ziele

Ziel der Arbeit war, in einem humanen *in vitro* System zu überprüfen, ob vom Fettgewebe sezernierte Faktoren die Kapazität besitzen, die Insulinsignalweiterleitung im Skelettmuskel zu stören. Darüber hinaus sollte die Rolle der aus der Literatur bekannten Kandidatenfaktoren analysiert und mögliche neue störende Faktoren eingegrenzt werden. Ebenfalls sollte die Funktion des Adiponectin als „Protektor“ der Muskelzellen vor der Generierung einer Insulin-Resistenz untersucht werden.

2. Material & Methoden

2.1. Material

2.1.1 Chemikalien

Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Collagenase (aus <i>Clostridium histolyticum</i> , lyophilisiert)	Serva, Heidelberg
FCS	Boehringer, Mannheim
Insulin (aus Schweinepankreas)	Fluka, Neu Ulm
Insulin, human, Actrapid®, 100 I.E./ml	Novo Nordisk,
Milchpulver, fettarm	Neuform, Fink GmbH, Herrenberg
Proteasen-Inhibitoren-Cocktail (Tabletten)	Boehringer, Mannheim
PVDF Membran	Sigma, Deisenhofen
Immobilon P, Porengrösse 0,45 µm	
Protein A Trisacryl (GF-2000)	Pierce, Oud Beijerland, NL
Penicillin/Streptomycin (10000U/10000 µg/ml)	Seromed, Berlin
Restore Western Blot Stripping Buffer	Rockford, USA
Rinderserum Albumin (lyophilisiert, reinst)	Behring, Marburg
Rinderserum Albumin (fettsäurefrei, Fraktion V)	Boehringer, Mannheim
Tween 20	
Trypsin/EDTA	Seromed, Berlin
Trypsin, sequencing grade	Sigma, Deisenhofen

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle weiteren Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm), Sigma (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe) und Pharamcia (Freiburg) in *p.A.* Qualität bezogen.

2.1.2 Adipokine und Inhibitoren

Troglitazon:	wurde freundlicherweise von Sankyo, Japan zur Verfügung gestellt
Tumor Nekrose Faktor- α (recombinant human)	Sigma, Deisenhofen
Infliximab:	wurde freundlicherweise von Prof. Hauner zur Verfügung gestellt
Interleukin-6	Hölzel Diagnostics, Köln
Angiotensin II, human	Sigma, Deisenhofen
Adiponectin (C-terminal globular domain)	Tebu, Offenbach
Candesartan	Sigma, Deisenhofen
Resistin (recombinant human)	PreproTech, London, UK
IKK-Inhibitor	wurde freundlicherweise von Aventis, Frankfurt zur Verfügung gestellt
JNK-Inhibitor	wurde freundlicherweise von Aventis, Frankfurt zur Verfügung gestellt

2.1.3 Kit-Systeme

Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
SuperSignal®West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce, Rockford, IL
Restore™Western Blot Stripping Buffer	Pierce, Rockford, IL
SilverQuest™ Silver Staining Kit	Invitrogen Life Technologies Carlsbad, Ca, USA
Human TNF α ELISA Kit	Firma Research Diagnostics Inc. Flanders, NJ, USA
Human Resistin ELISA Kit	Phoenix Pharmaceuticals Inc. Belmont, CA, USA

Human Adiponectin ELISA Kit	B-Bridge Intern., Sunnyvale, CA, USA
-----------------------------	--------------------------------------

Alle Komponenten für die SDS-Gele VivaSpin Columns	Amersham Pharmacia, Freiburg Sartorius, Goettingen
---	---

2.1.4 Antikörper

Anti-IRS-1 (Immunopräzipitation)	Polyklonales Kaninchen Antiserum, gerichtet gegen einen rekombinanten Proteinabschnitt (AS 581-857) des IRS-1 der Ratte (Ouwens et al., 1994)
----------------------------------	---

Anti-IRS-1 (Immunodetektion)	Polyklonales Kaninchen Antiserum, gerichtet gegen einen rekombinanten, C-terminalen Proteinabschnitt des IRS-1 der Ratte (UBI, Lake Placid, NY, USA)
------------------------------	--

Anti-Phospho-Tyrosin (RC-20)	Anti-Phospho-Tyrosin (pY)-RC20 IgG HRPO-gekoppelt, gerichtet gegen rekombinantes Peptid (Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA)
------------------------------	---

Anti-Phospho-Akt	Polyklonales Kaninchen Antiserum, gerichtet gegen ein KLH-gekoppeltes, synthetisches phospho-Ser473 Peptid (Cell Signaling/NEB, Frankfurt)
------------------	--

Anti-Akt	Polyklonales Kaninchen Antiserum, gerichtet gegen ein KLH gekoppeltes, synthetisches Peptid (AS 466-479) der Maus (Cell Signaling/NEB, Frankfurt)
----------	---

Anti-Phospho-GSK3 α/β	Polyklonales Kaninchen Antiserum, gerichtet gegen ein KLH-gekoppeltes, synthetisches phospho-Ser21 Peptid des humanen GSK3 α und gegen ein KLH-gekoppeltes synthetisches phospho-Ser9 Peptid des humanen GSK3 β (Cell Signaling/NEB, Frankfurt)
Anti-GSK3 α/β	Monoclonales Maus Antiserum, gerichtet gegen rekombinantes <i>Xenopus laevis</i> GSK3 β (Stressgen, Victoria; Canada)
Anti-Mouse IgG	Ziege anti-Maus IgG (H + L), Meerrettich Peroxidase gekoppelt (Promega, Mannheim)
Anti-Rabbit IgG	Ziege anti-Kaninchen IgG (H + L), Meerrettich Peroxidase gekoppelt (Promega, Mannheim)

2.1.5 Zellen und Zellkulturmedium

Humane Skelettmuskelzellen (SkMC):	Adhärente Myozyten aus menschlichem Skelettmuskelgewebe im Myoblastenstadium (Promo Cell, Heidelberg)
Humane Fettzellen	Eigenpräparation von Präadipozyten aus Mamma-Fettgewebe. Das Fettgewebe wird freundlicherweise

von Prof. Olbrisch aus dem Florence
Nightingale Krankenhaus, Düsseldorf
zur Verfügung gestellt.

Grundmedien für die Zellkultur:

PBS Dulbecco´s (w/o sodium bicarbonate)	Gibco BRL
Dulbecco´s MEM [mit GLUTAMAX I™]	GibcoBRL
Alpha MEM [mit GLUTAMAX I™ und Aminosäuren]	GibcoBRL
F12 [mit GLUTAMAX I™]	GibcoBRL

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung menschlicher Skelettmuskelzellen

Satellitenzellen wurden durch enzymatischen Verdau mit Trypsin vom M.rectus abdominis gewonnen. Anschließend folgte ein Reinigungsschritt mit Fibroblasten spezifischen magnetischen Kügelchen, um eine Verunreinigung der Kultur mit Fibroblasten zu verhindern. Nach zwei Passagen und einer Konfluenz von 100 % (nach ca. 8 Tagen) schloss sich eine Charakterisierung der Zellen durch den Hersteller (PromoCell) mit Hilfe einer immunochemischen Detektion gegen sarcomeres Myosin an. Die primären humanen Skelettmuskelzellen stammen von gesunden, kaukasischen Spendern. Drei der Spender waren männlich: M28 (28 Jahre alt), M9 (9 Jahre alt) und M5 (5 Jahre alt) und zwei der Spender waren weiblich: W10 (10 Jahre alt) und W48 (48 Jahre alt). Die Zellen wurden als proliferierende Myoblasten von der Firma PromoCell bezogen. Nach Erhalt der Zellen proliferierten sie in Wachstumsmedium bis zu einer Konfluenz von 80 %. Die Fusionierung und Differenzierung der Zellen erfolgte durch eine 4-7 tägige Kultur in Differenzierungsmedium mit 2 % fetal calf serum (FCS). Vor dem Start der Experimente wurden die fusionierten Skelettmuskelzellen für 24 h in Differenzierungsmedium ohne FCS gehalten.

Wachstumsmedium	Differenzierungsmedium
α MEM/F12 (v/v 1:1) mit 5 % Fötale Kälber Serum (v/v) 50 μ g/ml Fetuin vom Rind 10 ng/ml human Epidermal Growth Factor, rec. 50 ng/ml Amphotericin B 1 ng/ml human basic Fibroblast Growth Factor, rec. 10 μ g/ml Insulin vom Rind 400 ng/ml Dexamethasone 50 μ g/ml Gentamicin pH 7,4	α MEM mit 20 μ g/ml Streptomycin 20 U/ml Penicillin pH 7,4

2.2.2 Kultivierung menschlicher Adipozyten

Die Fettgewebstücke, die für die Präparation der Präadipozyten verwendet wurden, stammen aus dem Brustgewebe gesunder Frauen (BMI $26,5 \pm 3,3$), die sich im Alter von $36,3 \pm 8,8$ Jahren einer Brustverkleinerung unterzogen. Alle Spenderinnen zeigten aufgrund von Routineuntersuchungen im Labor keine Prädisposition zu Diabetes. Im Labor erfolgte eine Reinigung der Fettstückchen von allen anderen erkennbaren Gewebsresten wie Bindegewebe und Blutgefäße, hiernach schloss sich eine Zerkleinerung des Fettgewebes an. Ein Verdau der kleinen Fettstücke mit Collagenase und anschließender Filtration führte zur Isolierung der Präadipozyten. Die vorsichtige Zentrifugation des Eluates und Resuspendierung der Präadipozyten in Aussaatmedium schloss die Präparation ab. Die Aussaat erfolgte mit einer Dichte von $3,5 \times 10^6$ Zellen pro Sixwell ($4,3 \text{ cm}^2$). Nach 16 h Inkubation bei 37° C und 5% CO_2 wurden die Zellen mit PBS gewaschen und die Kultur mit Adipozyten Differenzierungsmedium fortgeführt. Der Zusatz von Troglitazon ($1 \text{ } \mu\text{g/ml}$) zum Differenzierungsmedium während der ersten 72 h verbesserte die Differenzierungsrate der Präadipozyten deutlich. Nach 15 Tagen waren 40-80 % der ausgesäten Präadipozyten zu Adipozyten ausdifferenziert. Diese reifen Zellen fanden in den Experimenten Verwendung.

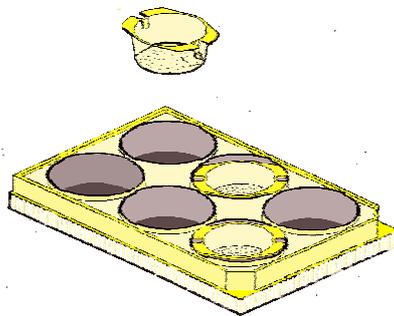
Grundmedium	Aussaatmedium	Differenzierungsmed.
DMEM/F12 (v/v 1:1) mit 15 mM HEPES 14 mM NaHCO_3 33 μM Biotin 17 μM D-Panhotenat	Grundmedium mit 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Gentamycin 10 % (v/v) FCS	Grundmedium mit 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Gentamycin 66 nM Insulin 1 nM Triiodo-L-Thyronin 100 nM Cortisol

2.2.3 Co-Kultivierung menschlicher Skelettmuskelzellen und menschlicher Adipozyten

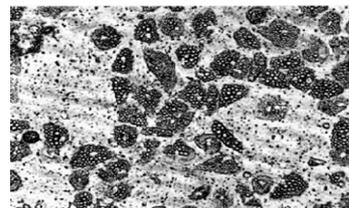
Für die Co-Kultur zweier Zelltypen wurde ein System benötigt, in dem beide Gruppen ohne direkten Kontakt zueinander im gleichen Medium gehalten werden können. Diese Voraussetzungen bot das Companion Plate System von Falcon. Hier wuchs der eine Zelltyp in einem speziellen Einsatz, der in einer abgestimmten Sixwell-Platte hing. Der zweite Zelltyp wuchs auf dem Boden der Sixwell-Platte. Durch diese Anordnung war gewährleistet, dass die Zellen nicht in Kontakt zueinander treten können, da der Boden des Einsatzes 0,9 mm vom Boden der Sixwell-Platte entfernt bleibt. Die Kommunikation der Zelltypen war trotzdem sicher gestellt, da der Boden des hängenden Einsatzes aus einer Membran mit einer Porengröße von 0,4 µm bestand. So konnten die ausgeschütteten Faktoren ungehindert im Medium diffundieren.

Humanes Co-Kultur Modell

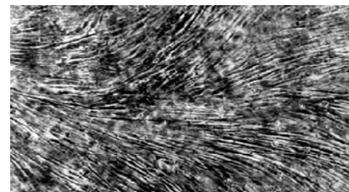
Fettzellen + Muskelzellen



- **humane Präadipozyten auf Membranen kultiviert**
- **humane Skelettmuskelzellen in Multiwell Platten kultiviert**



In vitro diff. Präadipozyten



In vitro diff. Skelettmuskelzellen

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Co-Kultur

Für die Co-Kultur wurden humane Präadipozyten in einer Dichte von $3,5 \times 10^6$ Zellen pro Membraneinsatz ausgesät. Die zugehörige Sixwell-Platte blieb für die Dauer der Differenzierung der Präadipozyten zu Adipozyten ohne weitere Zellen. Um eine Austrocknung der Fettzellen durch die Membran zu verhindern, erfolgte ein Befüllung der Wells mit Medium. In einer separaten, passenden Sixwell-Platte

wurden die Skelettmuskelzellen in einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro Well ausgesät und wie oben beschrieben ausdifferenziert. Nachdem beide Zelltypen *in vitro* ausdifferenziert waren, wurden die humanen Adipozyten mit PBS gewaschen und für 24 h im Skelettmuskelzell Differenzierungsmedium mit 1 pM Insulin inkubiert. Hiernach erfolgte eine erneute Waschung der Adipozyten mit PBS. Das Medium der ausdifferenzierten Skelettmuskelzellen wurde am Tag des Co-Kultur Starts ebenfalls durch Differenzierungsmedium mit 1 pM Insulin ersetzt. Durch das Umsetzen der Einsätze, auf denen sich die ausdifferenzierten Fettzellen befanden, in die Sixwell-Platte, auf deren Boden die fusionierten Skelettmuskelzellen wuchsen, resultierte der Start der Co-Kultur. Die Inkubation der Co-Kultur aus ausdifferenzierten humanen Fett und Muskelzellen ereignete sich für 48 h bei 37° C und 5 % CO₂. Nach Ablauf der 48 h entfernte man die Adipozyten mitsamt Einsatz und die Skelettmuskelzellen wurden weiteren Analysen zugeführt.

2.2.4 Gewinnung des Fettzellüberstands

Nach der Ausdifferenzierung humaner Fettzellen wurden sie mit PBS gewaschen und für 24 h in Skelettmuskelzell Differenzierungsmedium mit 1 pM Insulin inkubiert. Hiernach wurde das Medium verworfen. Daran schloss sich eine erneute Inkubation der Adipozyten mit Skelettmuskelzell Differenzierungsmedium mit 1 pM Insulin für 48 h an. Eine Aufkonzentrierung des nach 48 h abgenommenen Mediums mit Vivaspin Columns (MWCO 5 kDa Sartorius, Goettingen, Germany) und einem Lyophilisator diente der Aufarbeitung der Überstände. Die Einheit „1 Überstand“ bezeichnet das aufkonzentrierte Medium von $3,5 \times 10^6$ ausgesäten Präadipozyten.

2.2.5 Solubilisierung humaner Skelettmuskelzellen

Zur Solubilisierung wurden adhärenente humane Skelettmuskelzellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend in RIPA Lysispuffer abgekratzt. Zur vollständigen Lyse erfolgte eine 2stündige Inkubation auf dem Überkopfschüttler bei 4° C. Die Abtrennung der unlöslichen Zellbestandteile geschah durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 14000 x g. Die Lagerung des Überstands geschah bei -20° C nach Überführung in ein neues Reaktionsgefäß.

RIPA Lysispuffer

50 mM	Tris/HCl (pH 7.4)
1 % (v/v)	NP-40
0,25 % (v/v)	Na-desoxycholat
150 mM	NaCl
1 mM	EGTA
1 mM	Na ₃ VO ₄
1 mM	NaF
	Protease-Inhibitor Complete™-Tabletten

2.2.6 Immunopräzipitation von IRS-1

Eine Proteinmenge von 300 µg bildete die Grundlage der Immunopräzipitation. Zunächst erfolgte eine Preadsorption von 5 µl anti-IRS-1 Antiserum an 20 µl Protein A Trisacryl Beads, die dann zu dem solubilierten Zellüberstand gegeben und über Nacht bei 4° C auf dem Überkopfschüttler inkubiert wurden. Nach einer Zentrifugation schloss sich die 4malige Waschung des Immunopellets mit eiskaltem TBS an. Die Ablösung der Proteine von den Trisacryl Beads geschah durch Kochen der Beads für 10 min bei 95° C mit 20 µl 2x Lämmli-Puffer. Hiernach fand eine kurze Zentrifugation statt und die so gelösten Proteine wurden mit einer Insulinspritze separiert. Die Analyse des gesamten gewonnenen Überstands geschah durch einen Western Blot.

Tris buffered Saline (TBS)

100 mM	NaCl
10 mM	Tris/Cl (pH 7.5)

2.2.7 Proteinbestimmung nach Bio-Rad

Zur Proteinbestimmung der Proben diente ein auf der Methode von Bradford (Bradford, 1976) beruhender Bio-Rad-Proteintest (Bio-Rad, München). Zunächst mussten die zu analysierenden Proteinlysate 1:5 mit Wasser vorverdünnt werden. Die Standard-Proteinlösung bestand aus Rinderserumalbumin (1mg/ml). Jeweils 800 µl wässrige Proteinlösung wurden mit 200 µl Bio-Rad-Reagenz versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Nach Bestimmung der Extinktion ($\lambda=595$ nm) folgte die rechnerische Ermittlung der Proteinkonzentration.

2.2.8 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die Immunopräzipitate bzw. totalen Lysate wurden in 0,5 mm dicken, foliengebundenen SDS-Polyacrylamid Gelen in einer horizontalen Elektrophoresekammer aufgetrennt, als Puffer dienten Excel Pufferstreifen. Als Auftragspuffer

4x Lämmli-Probenpuffer	
40 % (v/v)	Glycerin
8 % (w/v)	SDS
0,02 % (w/v)	Bromphenolblau
10 % (v/v)	β -Mercaptoethanol
250 mM	Tris, pH 6,8

diente modifizierter 4x Laemmli-Probenpuffer (Laemmli, 1970), in dem die Proteine aufgenommen, dann für 10 min bei 95° C denaturiert und auf das Gel geladen wurden. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine fand bei einer konstanten Temperatur von 13,4° C, einer Stromstärke von 50 mA und einer variablen Spannung bis maximal 600 V statt. Als Molekulargewichtsmarker dienten dabei verschiedene Proteinmischungen (z.B. „High Molecularweight“ Marker [53 – 212 kDa], „Low-Molecularweight“ Marker: [14,4 – 94 kDa]).

2.2.9 Transfer der Proteine auf Membranen

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diese mittels des Semidry-Blot-Verfahrens auf PVDF Membranen transferiert. Das dazu verwendete diskontinuierliche Puffersystem bestand aus 3 Pufferlösungen: Anodenlösung I, Anodenlösung II und Kathodenlösung. Zuerst wurden 6 Filterpapiere in Anodenlösung I getränkt und auf die Anodengraphitplatte gelegt. Nach Ablösung des in Anodenlösung II äquilibrierten Gels von der Trägerfolie

erfolgte Aufbringung der PVDF-Membran sowie drei in Anodenlösung II getränkter Filterpapiere auf das Gel und die kopfüber Platzierung dieses Stapels auf den ersten 6 in Anodenlösung I getränkten Filterpapiere. Nach der Entfernung der Trägerfolie vom Gel wurden 9 Filterpapiere in Kathodenlösung getränkt, auf den Stapel gelegt und der gesamte Blot mit der Kathodengraphitplatte abgedeckt.

	Anodenlösung I	Anodenlösung II	Kathodenlösung
Tris	300 mM	25 mM	
Methanol	20 % (v/v)	20 % (v/v)	20 % (v/v)
6-Aminohexansäure			40 mM
SDS			0,01 % (w/v)

2.2.10 Färbetechniken

2.2.10.1 Silberfärbung

Die Silberfärbung erfolgte mit dem SilverQuest™ Silver Staining Kit von Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, Ca, USA). Die Färbung und Entfärbung der Gele wurde streng nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.10.2 Ponceau-S-Technik

Nach Beendigung des Protein-Blots wurde die Membran zur Darstellung der Referenzproteine für 10 min mit Ponceau-S Färbelösung (0,1 % (w/v) Ponceau S in 3% (v/v) Trichloressigsäure) angefärbt. Nach Waschen der Membran für ca. 5 min mit dest. H₂O fand eine Lufttrocknung statt.

2.2.11 Immunodetektion mit verstärkter Chemilumineszenz

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Blotmembranen nach dem Proteintransfer für 1–2 h in Blockierlösung (TBS/Tween 0,01 %, 5 % Magermilchpulver bzw. TBS/Tween 0,1 %, 2 % BSA) bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend 3 x kurz mit TBS/Tween gewaschen und über Nacht bei 6° C mit den

gewünschten spezifischen Antikörperlösungen behandelt. Nach mehrmaligem Waschen der Blotmembranen mit TBS/Tween schloss sich 1 stündige Inkubation bei Raumtemperatur mit einem dem 1. Antikörper-spezifischen sekundären Antikörper in adäquater Verdünnung in Puffer (TBS/Tween 0,1 %, 5 % Magermilchpulver) an. Schließlich wurden die Membranen in TBS/Tween gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte über die ECL (enhanced chemiluminescence) Methode unter Verwendung des SuperSignal Substrats. Dazu wurden die Membranen in einer Mischung von SuperSignal®-Peroxid-Substratlösung und SuperSignal-Luminol-Verstärkerlösung im Volumenverhältnis 1:1 für 5 min inkubiert. Die Analyse und Quantifizierung der Signale ereignete sich mit Hilfe eines LUMI-Imagers und der dazugehörigen LUMI-Analyst-Software.

2.2.12. Phosphotyrosinnachweis

Die Detektion der Tyrosin-Phosphorylierung des Insulin Rezeptor Substrat-1 (IRS-1) nach Insulinstimulation erfolgte mit Hilfe des rekombinanten, monoklonalen Antikörpers RC20. Bei Verwendung dieses Antikörpers entfiel die Inkubation mit einem sekundären Antikörper, weil ersterer direkt mit der Horseradish Peroxidase konjugiert ist. Im Anschluß an den Proteintransfer wurden die Blotmembranen in Blockierlösung (TBS/Tween 0,05 % (v/v); BSA 1 % (w/v)) für 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Darauf folgte eine Inkubation mit dem in Blockierlösung gelösten RC20 (1:10000) über Nacht bei 4° C. Nach 3 x 5 min Waschen mit TBS/Tween-Puffer wurden die Membranen, wie unter 2.2.11. beschrieben, mit dem ECL-System analysiert.

2.2.13 Strippen von Blotmembranen

Zur restlosen Entfernung des primären Antikörpers und des ECL-Komplexes nach der ECL Detektion diente der Restore™ Western Blot Stripping Buffer. Dazu wurde die Membran in dem Stripping Buffer für 30 min bei RT inkubiert, anschließend mit TBS-Tween gewaschen, erneut blockiert und wie unter 2.2.11 beschrieben, redetektiert.

2.2.14 ELISA

Die Messung des von Adipozyten und humanen Skelettmuskelzellen ins Medium sekretierte TNF α , Adiponectin bzw. Resistin erfolgte mit Hilfe verschiedener ELISA Kits (vgl. 2.1.3 Kit-Systeme). Hierzu wurden ausdifferenzierte Skelettmuskelzellen und Fettzellen für 48 h entweder separat, oder unter den oben beschriebenen Co-Kultur Bedingungen gehalten, der Überstand gesammelt und mit Hilfe von Vivaspin Columns 10fach aufkonzentriert. Die Messungen erfolgten streng nach dem Herstellerprotokoll. Alle Messergebnisse stammen aus Doppelbestimmungen. Die Sensitivität der Methode wurde überprüft, indem bekannte Mengen von TNF α , Adiponectin und Resistin einem ansonsten unbehandelten Medium zugegeben und so als Positivkontrolle genutzt wurden.

2.2.15 Berechnung und Statistik

Die statistischen Berechnungen der Signifikanzen wurden entweder nach der Methode des Students t-Test oder mit ANOVA für gepaarte und ungepaarte Daten erhoben. Zur Datenanalyse dienten die Computerprogramme t-ease (ISI, Philadelphia, USA) und Prism (GraphPad, San Diego, CA). Die Daten sind jeweils als Mittelwerte \pm SEM (Standardabweichung der Mittelwerte) dargestellt, die Signifikanzgrenze wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

2.2.16 Schematische Darstellung der ausgeführten Experimente

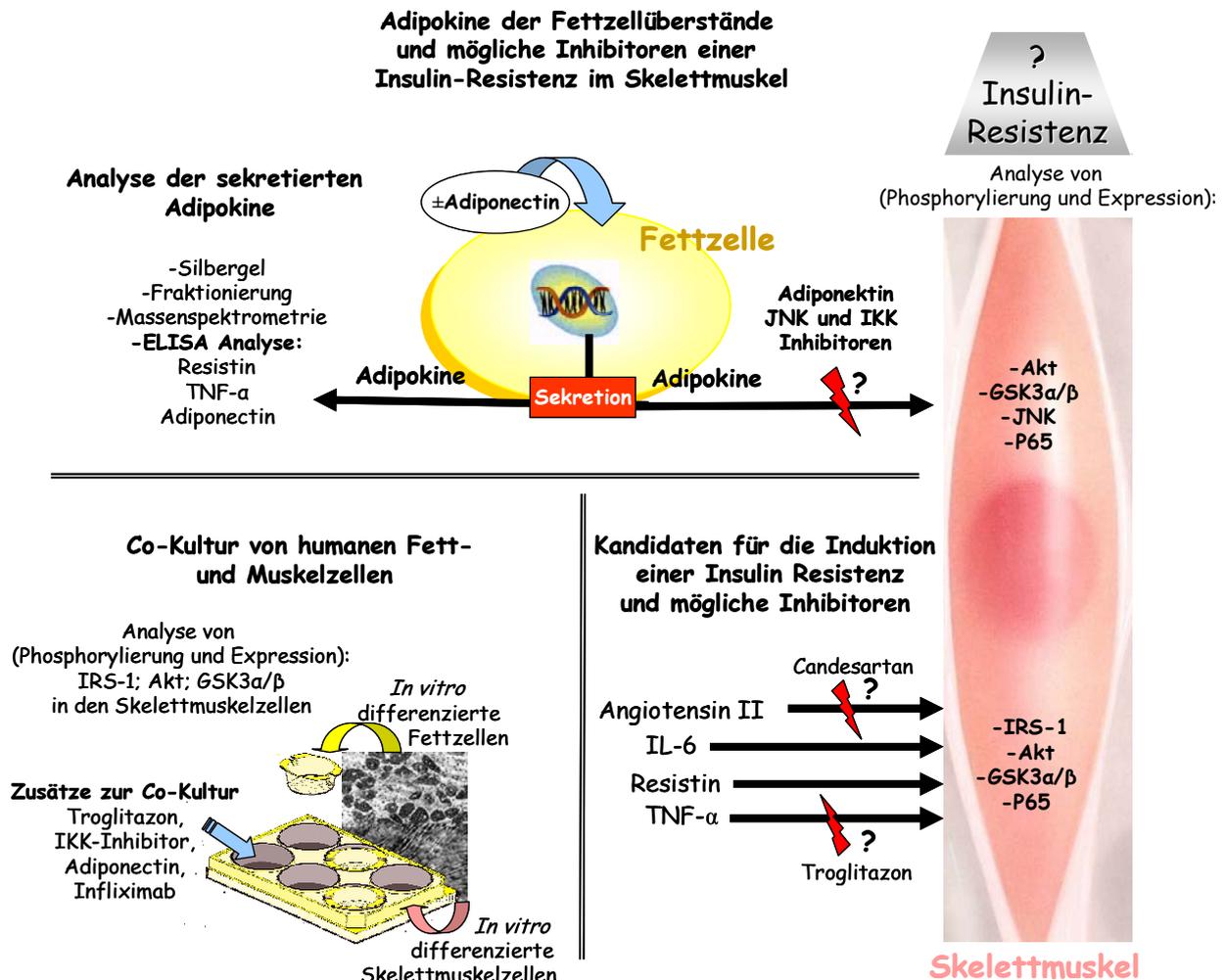


Abbildung 2: Schematische Übersicht aller Versuche

Dargestellt sind alle in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen. Oben: Analyse der Fettzellüberstände, die in Gegenwart oder Abwesenheit von Adiponectin generiert wurden, im Silbergel, durch Massenspektrometrie und ELISA. Analyse der Effekte der so generierten Überstände auf die Skelettmuskelzellen und mögliche Einflussnahme von Adiponectin, JNK-, bzw. IKK-Inhibitoren. Unten Links: Co-Kultur von humanen Fett- und Muskelzellen. Analyse der Insulinsignalweiterleitung im Skelettmuskel und der möglichen Effekte von Troglitazon, IKK-Inhibitor, Adiponectin und Infliximab. Unten Rechts: Analyse der Effekte ausgesuchter Adipokine und spezifischer Inhibitoren bzw. Sensitivierer auf die Skelettmuskelzelle.

3. Ergebnisse

3.1 Co-Kultur von humanen Myozyten und humanen Adipozyten

Die Skelettmuskulatur ist einer der Hauptwirkorte für die Regulation der Glucosehomöostase. Daher stellen primäre humane Skelettmuskelzellen ein bevorzugtes Modell zur Untersuchung der Insulin-Resistenz dar. Da eine erhöhte Fettmasse einer der Hauptrisikofaktoren für die Entstehung einer Insulin-Resistenz und nachfolgend eines Typ II Diabetes darstellt, ist es in diesem Zusammenhang interessant, die Auswirkungen des Fettgewebes auf die Skelettmuskulatur im Hinblick auf die Insulinsignalweiterleitung zu untersuchen. In Vorarbeiten innerhalb unserer Arbeitsgruppe ist es gelungen, primäre humane Adipozyten zusammen mit primären humanen Skelettmuskelzellen für 48 h zu co-kultivieren, ohne dass sich mikroskopisch sichtbare Veränderungen an den Zellen zeigen. Somit war es gelungen, eine Methodik zu etablieren, die es ermöglicht, die Einflüsse der Fettzelle auf die Muskelzelle in einem kontrollierten *in vitro* System zu untersuchen.

Um die Auswirkungen der Fettzellprodukte auf die Insulinsignalweiterleitung besser zu verstehen, lag der Fokus bei den nachfolgend beschriebenen Versuchen primär auf der Analyse von ausgesuchten Proteinen der Insulinsignalkette (IRS-1, Akt, GSK3 α/β). Dabei waren Messungen des Glucosetransportes leider nicht möglich, da Skelettmuskelzellen in Kultur nur sehr wenig GLUT4 exprimieren. Ein Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe hat dieses Problem erst kürzlich durch adenoviralen Gentransfer von GLUT4 myc in Myotuben lösen können, so dass dieser Punkt in einer nachfolgenden Arbeit behandelt werden wird.

Analysiert wurde neben den Auswirkungen der Fettzellprodukte ebenso die Wirkung von Troglitazon auf die Insulinsignalkette im Skelettmuskel. Dieser Wirkstoff gehört zur Gruppe der Thiazolidindione, die erfolgreich in der Therapie der Insulin-Resistenz eingesetzt werden und im Patienten stark Insulin-sensitivierend wirken. Hier stellte sich die Frage, ob Troglitazon unter Co-Kultur Bedingungen einen positiven Effekt auf die Insulinsignalkette im Skelettmuskel ausübt.

3.1.1 Die Expression der Insulinsignalketten Proteine IRS-1, Akt und GSK3 α/β

Die einleitenden Versuche zeigen eindeutig, dass die Co-Kultur von humanen Fettzellen und Skelettmuskelzellen die Proteinexpression der untersuchten Proteine nicht stark beeinflusst. So ist keine Reduktion der IRS-1 und Akt Proteinmenge im Skelettmuskel zu beobachten (Abb. 3). Die GSK3 α Expression wird unter Co-Kulturbedingungen leicht, jedoch nicht signifikant vermindert. Die Expression der GSK3 β wird hingegen signifikant vermindert (100 % Kontrolle vs. $77,4 \pm 6,9$ % nach Co-Kultur). Dieser Effekt der verminderten GSK3 Expression bleibt auch nach Zugabe von Troglitazon während der Co-Kultur bestehen. Troglitazon alleine zeigt nur auf der Ebene der Akt Expression eine statistisch abgesicherte Steigerung der Expression (100 % Kontrolle vs. $143,8 \pm 15,7$ % Troglitazon behandelt). Diese erhöhte Expression der Akt ist auch dann zu beobachten, wenn Troglitazon während der Co-Kultur anwesend ist (100 % Kontrolle vs. $212,4 \pm 45,75$ % Troglitazon behandelte Co-Kultur).

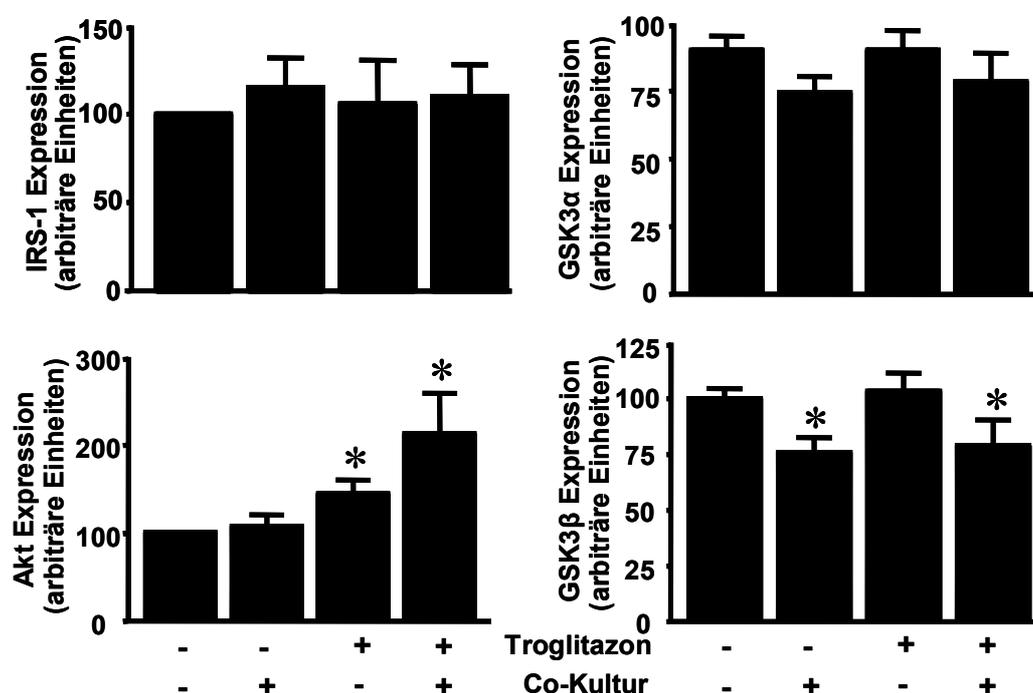


Abbildung 3: Expression von IRS-1, Akt und GSK3 nach Co-Kultur mit Troglitazon

Die Muskelzellen wurden für 48 h mit den Fettzellen co-kultiviert (siehe Methoden). Hiernach wurden die Fettzellen entfernt und die Muskelzellen solubilisiert. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit IRS-1, Akt oder GSK3 α/β Antikörpern immunodetektiert. Die Signale wurden mittels ECL ausgewertet. Die Quantifikation der Blots erfolgte am LUMI Imager mit der entsprechenden Software. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 10 Experimenten mit 3 unterschiedlichen Skelettmuskelzellspendern. (M9: n=3; W10: n=4; M28: n=3).

*signifikant unterschiedlich von dem jeweiligen Kontrollwert ($p < 0.05$).

3.1.2 Die Insulinsignalweiterleitung

Muskelzellen von 3 verschiedenen Spendern wurden jeweils mit Fettzellen von bis zu 4 unterschiedlichen Spenderinnen über 48 h co-kultiviert. Hiernach wurden die Fettzellen entfernt und die Myotuben akut mit Insulin stimuliert. Unter Kontrollbedingungen kann für alle Muskelzellspender eine sehr gute Ansprechbarkeit der untersuchten Proteine IRS-1, Akt und GSK3 α/β gegenüber Insulin nachgewiesen werden. Dieses zeigt sich deutlich in einer stark erhöhten Phosphorylierung.

Die Co-Kultur der Muskelzellspender M9 (männlich, 9 Jahre) und W10 (weiblich, 10 Jahre) mit unterschiedlichen Fettzellspendern zeigt übereinstimmend eine stark verminderte IRS-1 Tyrosin-Phosphorylierung nach akuter Insulinstimulation im Vergleich zur Kontrollsituation (Abb. 4A) (100 % Insulin-stimulierte Kontrolle vs. $54,6 \pm 13,6$ % Insulin-stimulierte Co-Kultur). Für Spender M28 (männlich, 28 Jahre), zeigt sich eine reproduzierbare Erhöhung der basalen IRS-1 Tyrosin Phosphorylierung unter Co-Kultur Bedingungen ($46,5 \pm 9,9$ % Kontrolle vs. $116,4 \pm 35,3$ % nach Co-Kultur). Doch auch bei diesem Spender bleibt eine akute Insulin-Stimulation in der Co-Kultur ohne weiteren signifikanten Effekt auf die IRS-1 Tyrosin-Phosphorylierung. Die Quantifizierung aller Daten der drei Muskelzellspender zeigt, dass Insulin trotz individueller Unterschiede im Mechanismus nicht in der Lage ist, eine signifikant erhöhte IRS-1 Phosphorylierung im humanen Skelettmuskel nach Co-Kultur mit Fettzellen zu produzieren (Abb.4B).

Im Rahmen der beschriebenen Experimente wurde auch die Auswirkung des Thiazolidindions Troglitazon auf die humanen Skelettmuskelzellen untersucht. Hier zeigt sich, dass Troglitazon ein prominenter Insulin Sensitizer ist, der die Muskelzellen auf der Ebene der IRS-1 Tyrosin-Phosphorylierung stark anspricht. So kann ein 2fach erhöhter Anstieg der Phosphorylierung nach Insulinstimulus im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden ($192,9 \pm 38,1$ % mit Troglitazon vs. 100 % Kontrolle). Unter Co-Kultur Bedingungen verhindert Troglitazon zum einen die Entstehung einer Insulin-Resistenz vollständig, zum anderen sensitiviert es die Skelettmuskelzellen in dem selben Maße gegenüber Insulin wie in Abwesenheit der Fettzellen. Auch hier zeigt sich eine 2-3fache Erhöhung der IRS-1 Tyrosin-Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4).

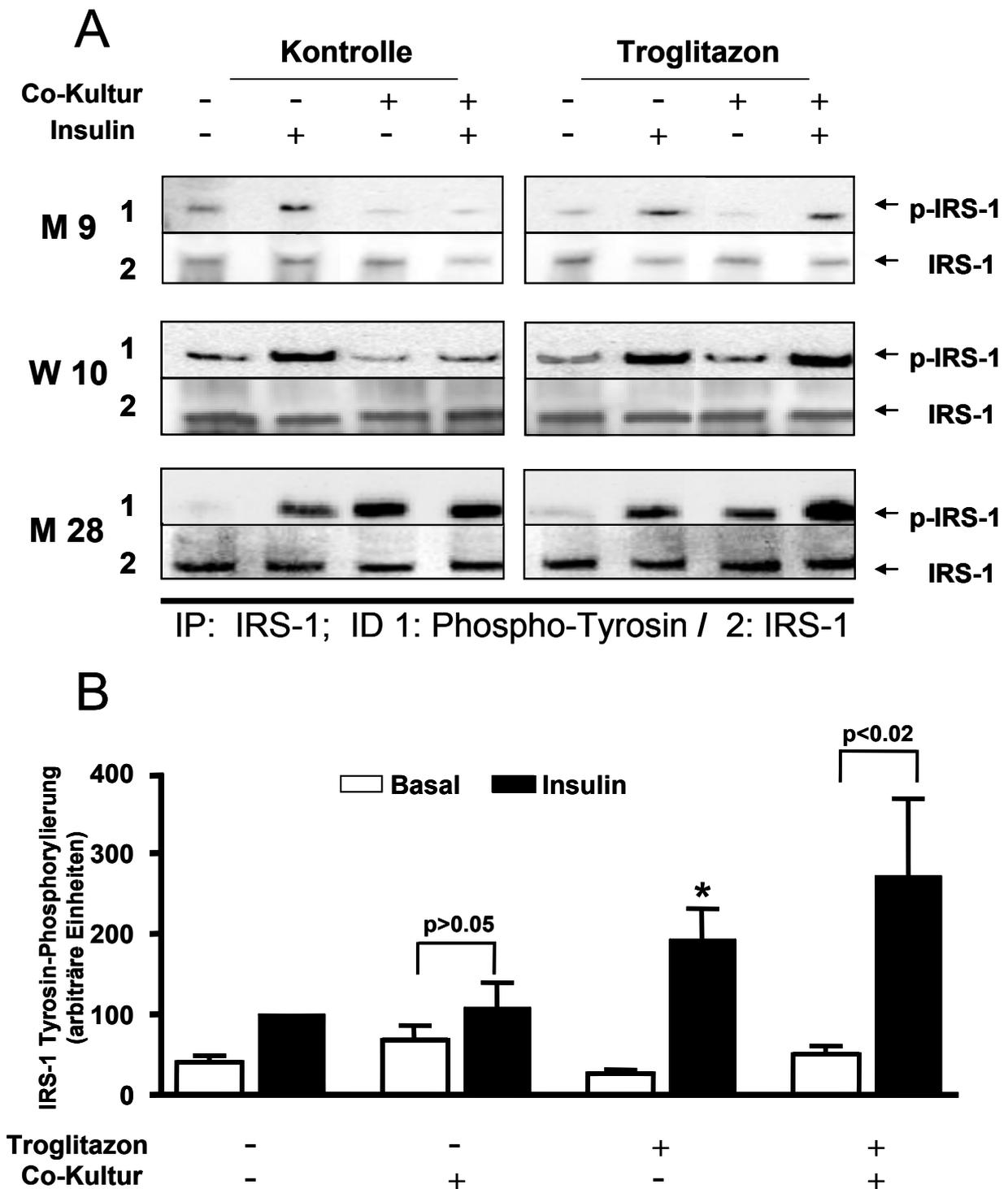


Abbildung 4: Die IRS-1 Phosphorylierung nach Co-Kultur mit Troglitazon

Die Co-Kultur der Muskelzellen erfolgte wie unter Abb 3 beschrieben. Die Muskelzellen wurden anschließend mit Insulin stimuliert (10^{-7} M; 10 min), solubilisiert und IRS-1 präzipitiert. A: IRS-1 Immunopräzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Phospho-Tyrosin (RC-20) oder IRS-1 Antikörpern immunodetektiert. Die Signale wurden mittels ECL ausgewertet. Gezeigt sind repräsentative Blots für alle Muskelzellspender. B: Die Quantifikation der Blots erfolgte am LUMI-Imager mit der entsprechenden Software. Die Ergebnisse wurden auf die präzipitierte IRS-1 Menge normiert und werden bezogen auf die Insulin-stimulierte Kontrolle dargestellt. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 10-12 Experimenten mit drei unterschiedlichen Skelettmuskelzellspendern (M9: n=3; W10: n=4; M28: n=3-5).

*signifikant unterschiedlich vom Insulin-stimulierten Kontrollwert ($p < 0.05$).

Ähnliche Befunde zeigen sich auch auf der Ebene der Serin-/Threonin-Kinase Akt. Unter Kontrollbedingungen liegt der Anstieg der Serin 473-Phosphorylierung der Akt nach Insulinstimulus im Durchschnitt bei $68,7 \pm 11,9$ %. Nach Co-Kultur mit Fettzellen wird dieser Effekt gemittelt über alle Muskelzellspender bis auf $27,1 \pm 3,2$ % vermindert. Zwar bleibt die Kinase signifikant stimulierbar, jedoch ist der Insulineffekt verglichen mit der Kontrollsituation um 65 % reduziert (Abb. 5).

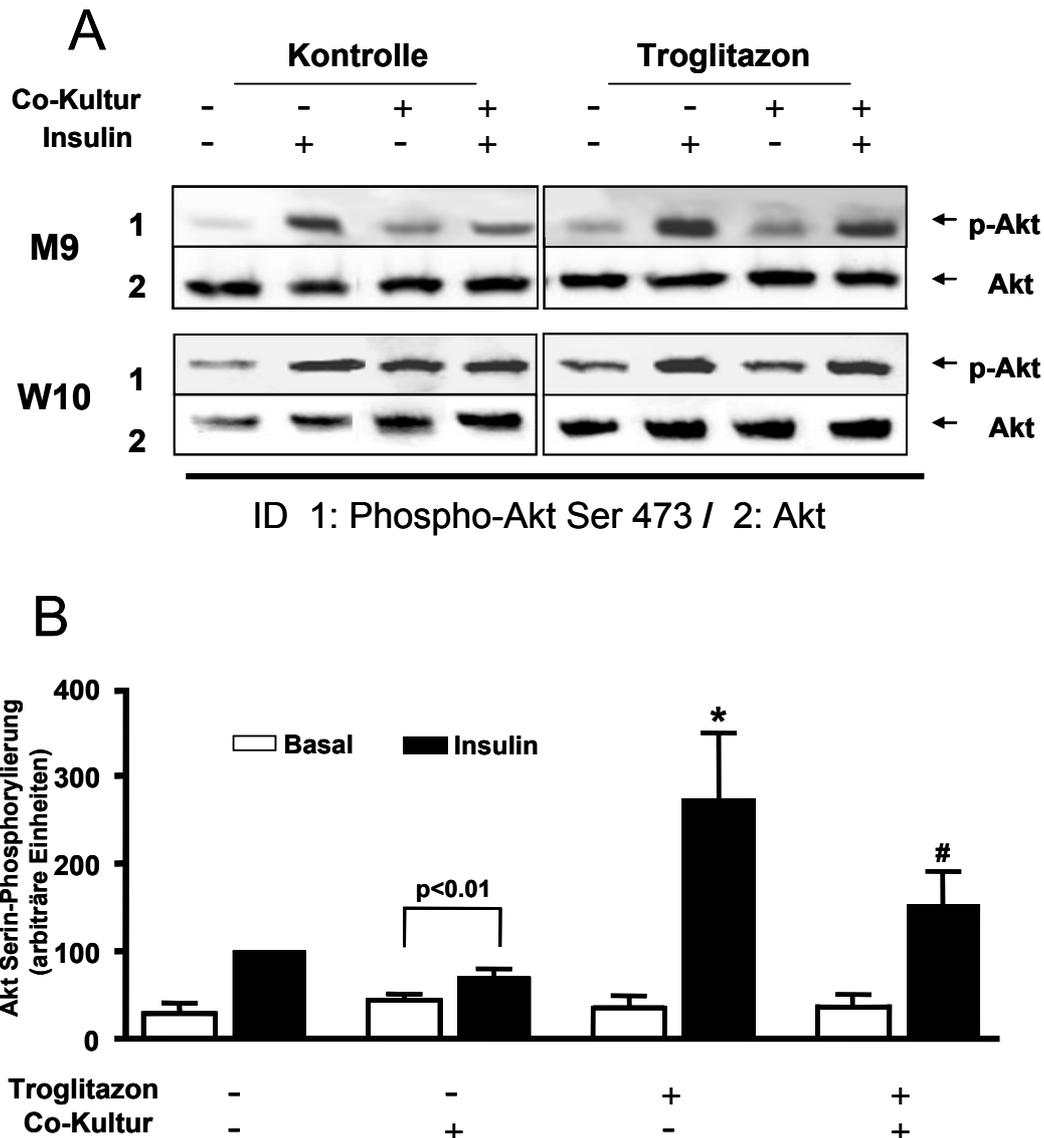


Abbildung 5: Die Akt Phosphorylierung nach Co-Kultur mit Troglitazon

Der Versuch fand wie unter Abb. 4 beschrieben statt. A: Zellysate werden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Akt (Ser 473) spezifischen Phosphoserin oder Akt Antikörpern immunodetektiert. Die Signale werden mittels ECL ausgewertet. Gezeigt sind repräsentative Blots für zwei Muskelzellspender. B: Die Quantifikation und Normierung der Blots erfolgte wie unter Abb. 4 beschrieben. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 6-7 Experimenten (M9: n=3; W10: n=3-4). *signifikant unterschiedlich von allen anderen Insulin-stimulierten Werten ($p < 0.05$). # nicht signifikant unterschiedlich von der Kontrolle ($p > 0.05$)

Troglitazon hat einen stark sensitivierenden Effekt auf die Insulin vermittelte Serin-Phosphorylierung der Akt. Durch eine Stimulation mit Troglitazon ist es möglich, den Insulineffekt um das $3,4 \pm 0,7$ fache zu erhöhen. Darüber hinaus führt die Troglitazonbehandlung der Skelettmuskelzellen zu einer $1,4 \pm 0,2$ fach gesteigerten Expression der Akt (Abb. 3). Unter Co-Kultur Bedingungen hat Troglitazon ähnliche Auswirkungen auf die Muskelzelle und erhöht die Akt Expression um das $2,1 \pm 0,5$ fache (Abb. 3). Darüber hinaus lässt sich unter Co-Kultur Bedingungen in der Gegenwart von Troglitazon, im Gegensatz zu der Co-Kultur ohne das Thiazolidindion, keine verminderte Akt Phosphorylierung beobachten ($152,2 \pm 38,6$ % für die Insulin-stimulierte mit Troglitazon behandelte Co-Kultur vs. $70,4 \pm 9,4$ % für die Insulin-stimulierte Co-Kultur). Auch hier liegt ein Trend zu einer Sensitivierung der Zellen gegenüber Insulin vor, der jedoch keine statistische Signifikanz erreicht (Abb. 5).

Auch die weiter stromabwärts gelegene Kinase GSK3 wird in ihrer Ansprechbarkeit gegenüber Insulin durch die Co-Kultur der Muskelzellen mit den Fettzellen gestört. Die basale Serin-Phosphorylierung von GSK3 α und GSK3 β ist nach einer Co-Kultur signifikant erhöht (Erhöhung: $51,3 \pm 2,8$ % für GSK3 α und $49,5 \pm 3,2$ % für GSK3 β gegenüber der basalen Kontrolle) (Abb. 6). In Bezug auf die GSK3 β erreicht die basale Phosphorylierung sogar eine Stärke, die sich statistisch nicht von der Insulin-stimulierten Intensität unter Kontrollbedingungen abhebt. Aufgrund dieser stark erhöhten basalen Phosphorylierung ist der Insulineffekt, verglichen mit der Situation in humanen Skelettmuskelzellen, die keiner Co-Kultur ausgesetzt waren, deutlich vermindert (Insulineffekt: $1,7 \pm 0,3$ fach Co-Kultur GSK3 α vs. $2,5 \pm 0,2$ fach Kontrolle GSK3 α ; $1,9 \pm 0,4$ fach Co-Kultur GSK3 β vs. $3,7 \pm 0,9$ fach Kontrolle GSK3 β) (Abb. 6).

Eine Behandlung mit Troglitazon alleine zeigt keinen signifikanten Effekt auf die basale oder Insulin-stimulierte Serin-Phosphorylierung der GSK3. Auch kann die erhöhte basale Phosphorylierung der Kinase unter Co-Kultur Bedingungen nicht verhindert werden. Im Gegensatz zu den weiter stromaufwärts gelegenen Signalkaskadenproteinen Akt und IRS-1 kann Troglitazon hier die Störung der Insulinsignalweiterleitung auf der Ebene der GSK3 nicht durch eine Wiederherstellung der Phosphorylierungssituation wie unter Kontrollbedingungen

aufheben (Abb. 6). Der Effekt der verminderten GSK3 Expression nach der Co-Kultur (Abb. 3) wird in der Auswertung durch Normierung auf die entsprechenden Proteinwerte berücksichtigt.

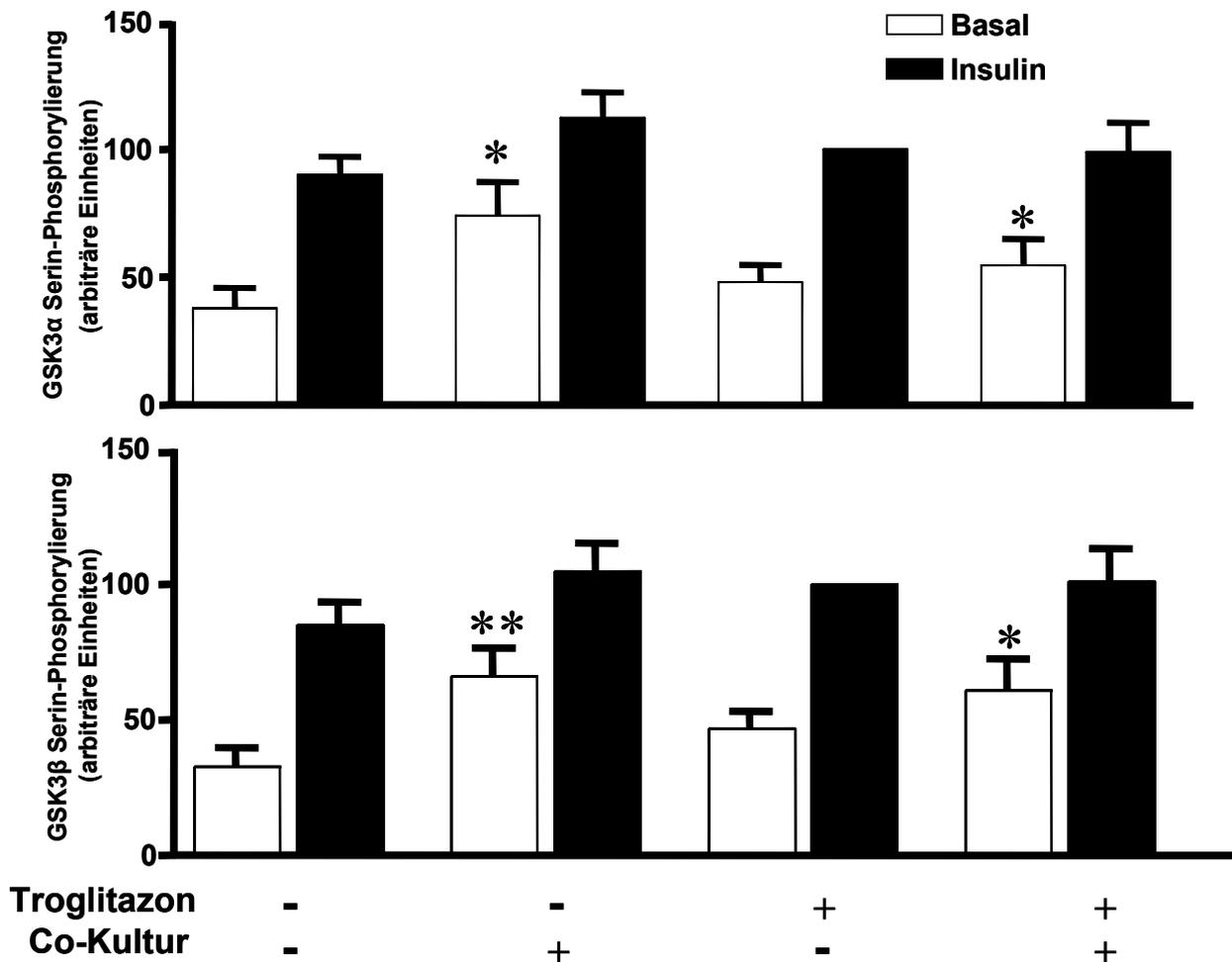


Abbildung 6: Die GSK3 Phosphorylierung nach Co-Kultur mit Troglitazon

Der Versuch fand wie unter Abb. 4 beschrieben statt. IRS-1 Immunofällungen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit GSK3α (Ser 21) und GSK3β (Ser 9) spezifischen Phosphoserin- oder Protein-Antikörpern immunodetektiert. Die Signale wurden mittels ECL ausgewertet. Die Quantifikation erfolgte wie unter Abb. 3 beschrieben. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 10 Experimenten mit drei unterschiedlichen Skelettmuskelzellspendern. (M28: n=3; M9: n=3; W10: n=4).

*signifikant unterschiedlich von der basalen Kontrolle ($p < 0.05$)

**signifikant unterschiedlich von der basalen Kontrolle ($p < 0.01$)

3.2 Mögliche Mediatoren der Insulin-Resistenz aus den Fettzellen

3.2.1 TNF α

Es ist allgemein bekannt, dass TNF α in humanen Adipozyten über verschiedene Mechanismen eine Insulin-Resistenz auslösen kann. Dabei ist nicht nur der Glucosetransport, sondern auch die Insulinsignalweiterleitung stark gestört. Literaturdaten belegen, dass dieses Zytokin im Serum stark adipöser Menschen erhöht ist. In verschiedenen Tiermodellen wurden ebenfalls vergleichbare Beobachtungen gemacht. Hier verhindert eine Blockierung der TNF α Rezeptoren die Auslösung einer Insulin-Resistenz. Im Menschen werden die Auswirkungen von TNF α Antikörpern auf die Insulinsensitivität jedoch kontrovers diskutiert. Vor diesem Hintergrund ist die Wirkung von TNF α auf die Insulinsignalweiterleitung in menschlichen Skelettmuskelzellen von großem Interesse.

Um die Rolle des TNF α dezidiert zu untersuchen, wurden die Skelettmuskelzellen für 48 h mit unterschiedlichen Dosen des Zytokins inkubiert. Die Zeitspanne 48 h wurde gewählt, um die gewonnenen Ergebnisse mit denen aus den Co-Kultur Experimenten vergleichen zu können. Zunächst wurden die Zellen mit sehr hohen Dosen TNF- α behandelt.

Eine Gabe von 2,5 nM TNF α führt sowohl auf der Ebene der IRS-1 Tyrosin-, als auch auf Ebene der Akt Serin-Phosphorylierung, zu einer massiven Reduktion der Ansprechbarkeit gegenüber Insulin. Im Falle der IRS-1 Tyrosin-Phosphorylierung wird der Insulineffekt um $65,1 \pm 2,9$ % und im Falle der Akt Serin-Phosphorylierung um $52,9 \pm 2,2$ % reduziert (Abb. 7). Werden die Zellen gleichzeitig mit TNF α und dem Insulin Sensitizer Troglitazon über 48 h inkubiert, führt dies zu einer normalen Insulinantwort auf Ebene der IRS-1 Phosphorylierung. Noch stärker ist der Effekt auf der Ebene der Akt Phosphorylierung. Hier kann durch Troglitazon Gabe eine Überschusskompensation der durch TNF α ausgelösten Insulin-Resistenz beobachtet werden (100 % Insulin-stimulierte Kontrolle vs. $390,9 \pm 47,1$ % Insulin stimuliert nach Inkubation mit Troglitazon + TNF α) (Abb. 7).

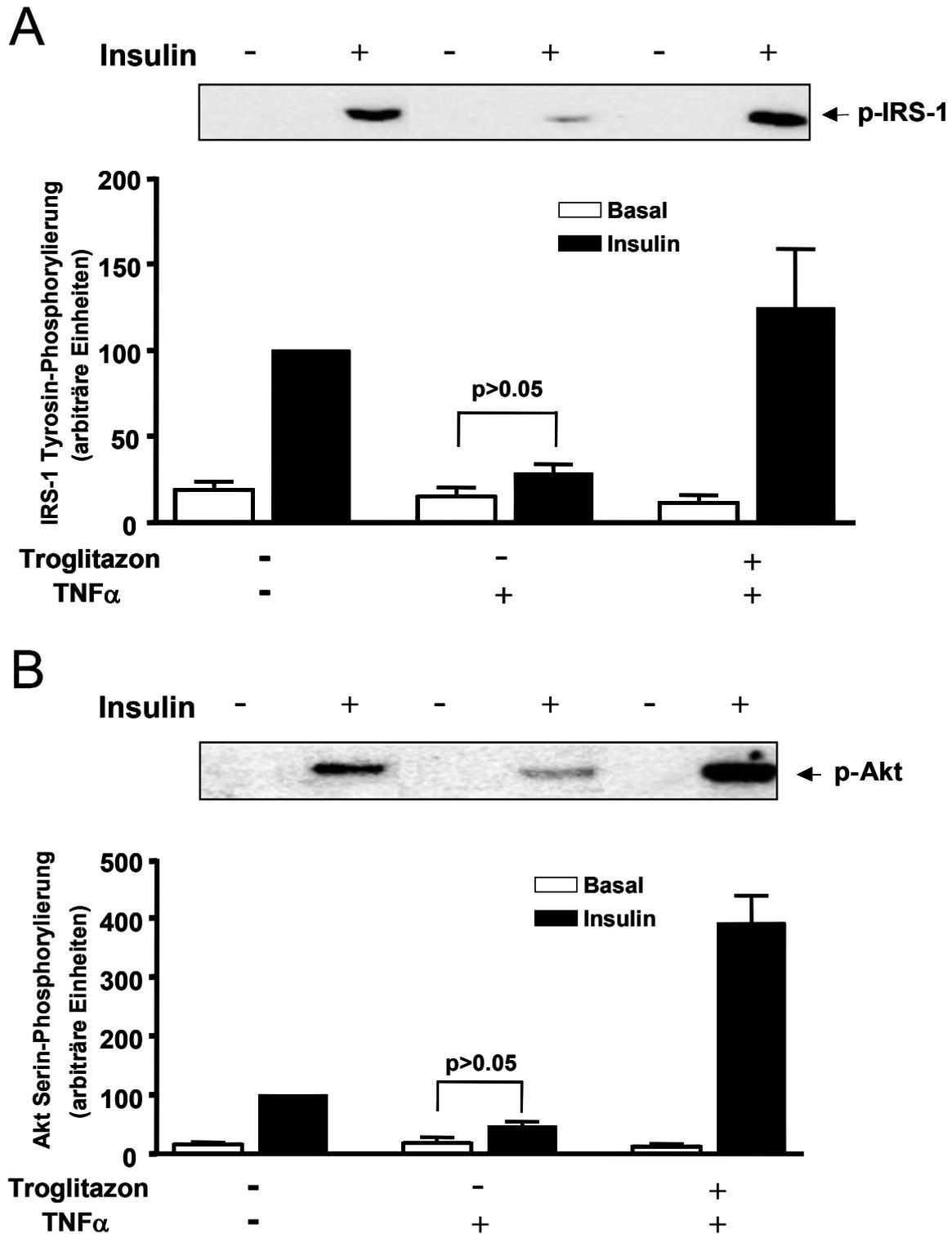


Abbildung 7: Die IRS-1 und Akt Phosphorylierung nach TNF α und Troglitazon Behandlung

Die Muskelzellen wurden für 48 h in Gegenwart oder Abwesenheit von 2,5 nM TNF α mit oder ohne 5 μ M Troglitazon inkubiert. A: Nach Insulinstimulation (100 nM für 10 min), wurde IRS-1 präzipitiert und analysiert wie bei Abb. 4 beschrieben. B: Die Zellen wurden wie oben beschrieben, kultiviert und die Akt Phosphorylierung wie unter Abb. 4 beschrieben, gemessen.

Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus 15 unabhängigen Experimenten mit 3 verschiedenen Skelettmuskelzell-Spendern. Alle Daten wurden auf die jeweilige Proteinexpression normiert und sind relativ zur Insulin-stimulierten Kontrolle dargestellt.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen unter Co-Kultur Bedingungen zeigt sich bei einer Behandlung mit 2,5 nM TNF α jedoch eine signifikante Verminderung der IRS-1 Expression auf $62,8 \pm 8,3$ % der unbehandelten Kontrolle. Eine gleichzeitige Inkubation von TNF α und Troglitazon kann die zellinterne Absenkung des IRS-1 Spiegels verhindern. Troglitazon alleine weist keinen Effekt auf die IRS-1 Expression auf (Abb. 8).

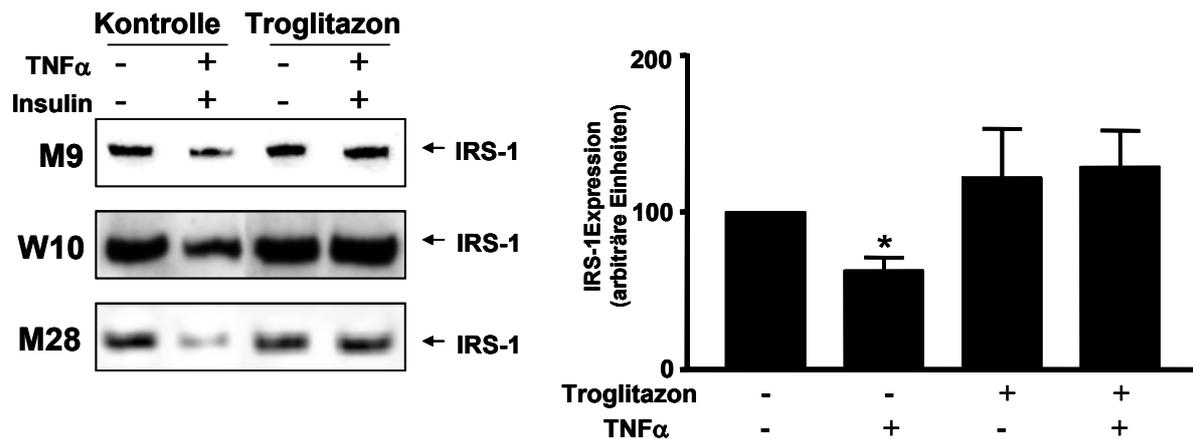


Abbildung 8: Die IRS-1 Expression nach TNF α und Troglitazon Behandlung

Die Muskelzellen wurden für 48 h in Gegenwart oder Abwesenheit von 2,5 nM TNF α mit oder ohne 5 μ M Troglitazon inkubiert und analysiert wie bei Abb. 4 beschrieben. Gezeigt werden repräsentative Western Blots für jeden Skelettmuskelzell Spender. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus 15 unabhängigen Experimenten mit 3 verschiedenen Skelettmuskelzell-Spendern
*signifikant unterschiedlich vom Kontrollwert mit $p < 0.05$.

Die weiteren Untersuchungen beschäftigen sich mit der Frage, ob auch geringere, physiologisch relevante Dosen in der Lage sind, eine solch massive Störung in den Muskelzellen hervorzurufen. Wie aus Abbildung 9 ersichtlich, haben 150 pM und 1 nM TNF α keinen Einfluss auf die IRS-1 Tyrosin-Phosphorylierung im humanen Skelettmuskel. Nur sehr hohe Konzentrationen von 2,5 nM TNF α zeigen eine mit der Co-Kultur vergleichbare Reduktion der Insulinwirkung. Die IRS-1 Proteinmenge wird dosisabhängig reduziert. Schon bei 150 pM TNF α zeigt sich ein Trend zur verminderten IRS-1 Expression ($19,2 \pm 7,3$ %). 1 nM TNF α reduziert die IRS-1 Expression um $28,9 \pm 9,4$ %. Bei einer Konzentration von 2,5 nM TNF α ist die IRS-1 Expression um 40 % vermindert (Abb. 9).

Die Insulinsignalweiterleitung zur Akt wird ebenso dosisabhängig blockiert. Doch auch hier zeigt sich bei einer Konzentration von 1 nM TNF α nur eine Hemmung von 30 %. Erst bei einer Konzentration von 2,5 nM TNF α spiegelt sich die Hemmung der Co-Kultur wieder. Die Expression der Akt wird von keiner der untersuchten TNF α Konzentrationen beeinflusst (Abb. 9).

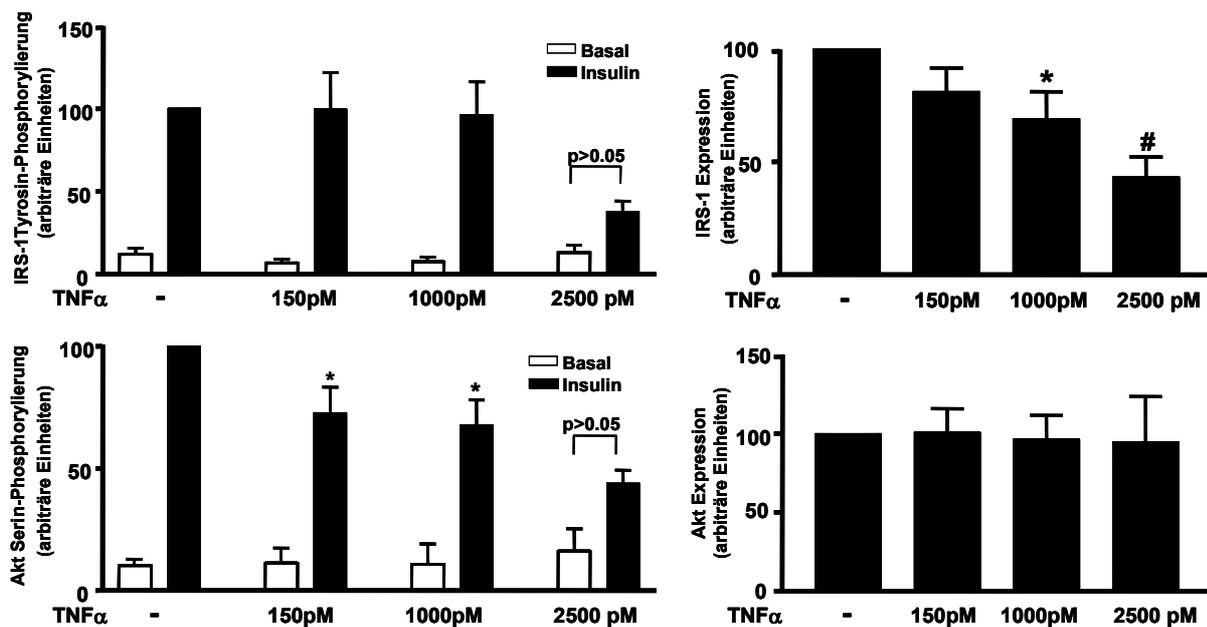


Abbildung 9: Die zeitabhängige IRS-1 und Akt Expression und Phosphorylierung nach TNF α Behandlung

Die Muskelzellen wurden für 48 h mit den angegebenen TNF α Konzentrationen inkubiert. IRS-1 und Akt Phosphorylierung und Proteinexpression wurden durch Westernblot Analysen, wie in Abb. 4 beschrieben, analysiert. Die Ergebnisse sind relativ zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. Aufgetragen sind Mittelwerte \pm SEM von 10 unabhängigen Experimenten.

*signifikant unterschiedlich von der Kontrolle mit $p < 0.05$

signifikant unterschiedlich von der Kontrolle mit $p < 0.005$

Keine der beiden GSK3 Untereinheiten wird in ihrer Expression durch TNF α beeinflusst. Betrachtet man die GSK3 Serin-Phosphorylierung, so zeigt sich bei beiden Untereinheiten ein leicht verminderter Insulineffekt, der jedoch keine statistische Signifikanz erreicht (Abb. 10).

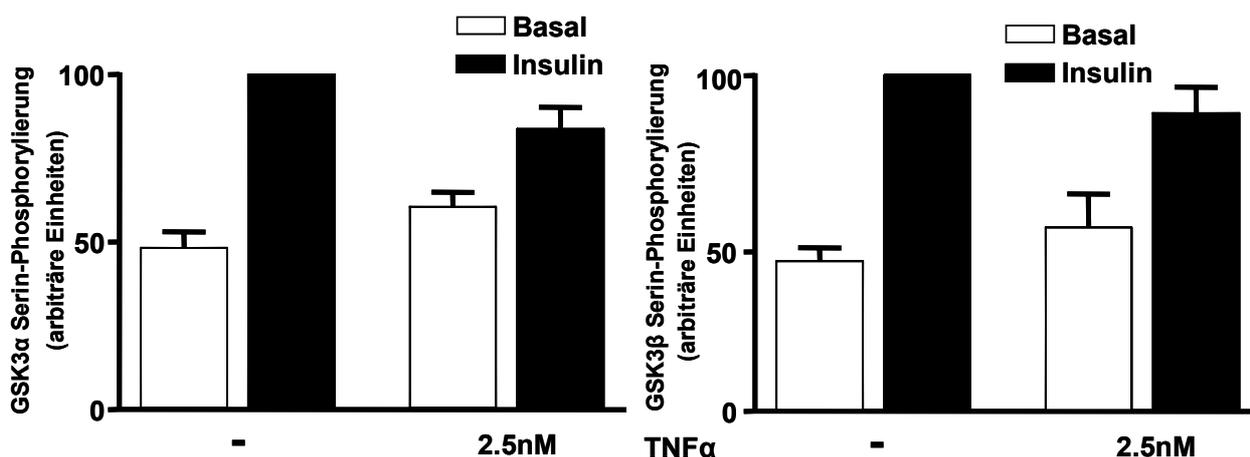


Abbildung 10: Die GSK3 Phosphorylierung nach TNF α Behandlung

Die Muskelzellen wurden für 48 h mit 2,5 nM TNF α inkubiert. Die Insulin-induzierte Serin-Phosphorylierung von GSK3 α/β wurde durch Westernblot Analysen, wie in Abb. 4 beschrieben, analysiert. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 10 unabhängigen Experimenten.

Um die mögliche Bedeutung von TNF α als Induktor der Insulin-Resistenz in unserem Co-Kultur Modell weiter zu charakterisieren, wurde die TNF α Konzentration im Medium mit Hilfe eines ELISA gemessen. Mit dem TNF α ELISA kann nach 10facher Aufkonzentrierung des Mediums weder bei den Überständen der Skelettmuskelzellen alleine, noch bei denen aus der Co-Kultur bzw. der Adipozyten ein messbarer TNF α Wert im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Jedoch ist es möglich, definierte Mengen TNF α , die einem nicht konditionierten Medium als Positivkontrolle zugesetzt werden, nach Aufbereitung mit dem ELISA zu detektieren. Des weiteren kann aus dem Überstand frisch isolierter, reifer Fettzellen eine TNF α Menge von 44,4 pg/ml Medium detektiert werden.

Darüber hinaus wurde versucht, mit Hilfe von Infliximab, einem TNF α spezifischen Antikörper, die Entstehung der Insulin-Resistenz im Co-Kultur Modell zu unterbinden. Hierzu wurde Infliximab der Co-Kultur für 48 h zugesetzt.

Auf der Ebene der IRS-1 Tyrosin Phosphorylierung führt Infliximab alleine, ähnlich einem Insulin Sensitivierer, zu einer signifikant verstärkten Insulinantwort (100 % für die Kontrolle vs. $137,7 \pm 13,2$ %) (Abb. 11). Jedoch ist Infliximab nicht in der Lage, die durch die Co-Kultur verursachte Hemmung der Insulinsignalweiterleitung zu verhindern. Hier zeigt sich mit und ohne Infliximab Therapie eine vergleichbare Hemmung der IRS-1 Tyrosin-Phosphorylierung.

Auf der Ebene der Akt Serin-Phosphorylierung zeigt sich ein überraschendes Bild. Hier wird die basale Serin-Phosphorylierung der Akt durch Infliximab signifikant über den Insulin-stimulierten Kontrollwert angehoben (100 % für die Insulin-stimulierte Kontrolle vs. $153,9 \pm 14,0$ % für den basalen Infliximab behandelten Wert). Die Ansprechbarkeit gegenüber Insulin wird dadurch um 55 % verringert ($3,6 \pm 1,3$ fach für die Kontrolle vs. $1,6 \pm 1,3$ fach für die Infliximab behandelten Zellen). Diese Reduktion erreicht jedoch keine statistische Signifikanz ($p=0,0571$). Eine Inkubation der Co-Kultur gemeinsam mit Infliximab führt zwar zu dem schon beobachteten signifikanten Anstieg der basalen Phosphorylierung durch Infliximab, jedoch bleibt auch hier eine Stimulation mit Insulin ohne zusätzlichen Effekt auf die Signalstärke ($185,6 \pm 9,9$ % für den Basalwert vs. $195,5 \pm 38,9$ % nach Insulinstimulation) (Abb. 11). Weder die IRS-1 noch die Akt Expression werden von Infliximab beeinflusst. So kann gesagt werden, dass Infliximab weder auf der Ebene des IRS-1 noch auf der Ebene der Akt in der Lage ist, die durch die Co-Kultur ausgelöste Insulin-Resistenz zu beheben.

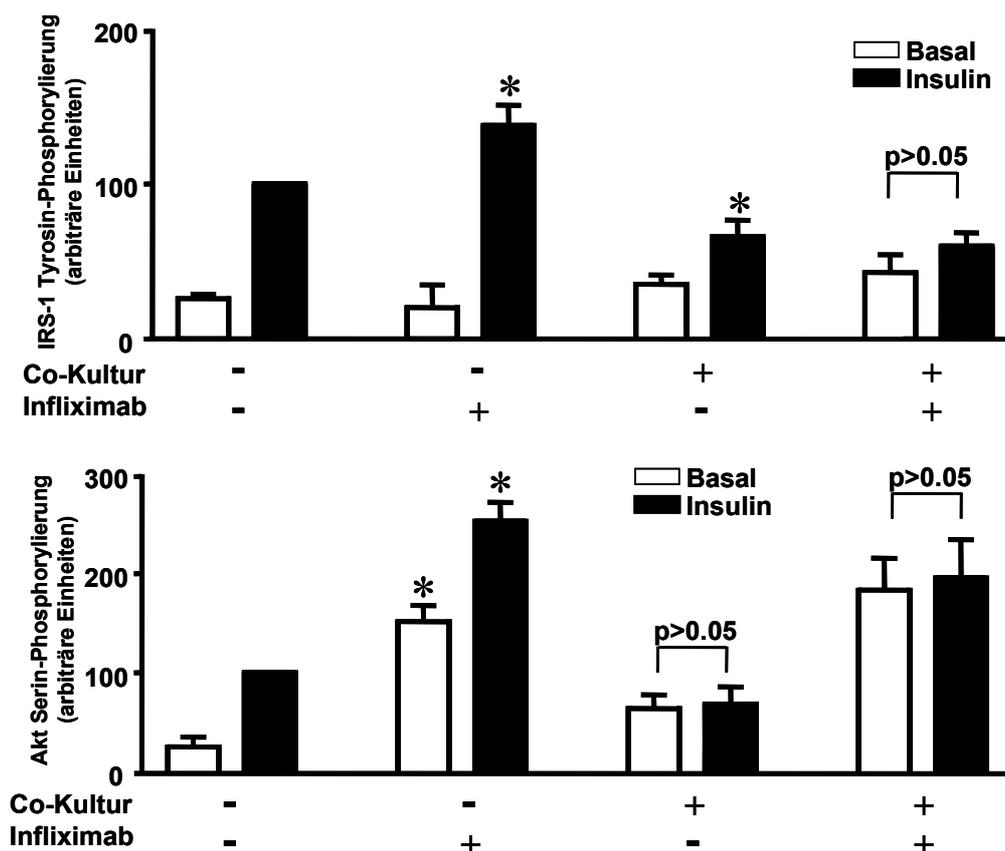


Abbildung 11: Die IRS-1 und Akt Phosphorylierung nach Co-Kultur mit Infliximab

Die Muskelzellen wurden für 48 h in Gegenwart oder Abwesenheit der Co-Kultur mit oder ohne 5 μ M Infliximab inkubiert und analysiert wie bei Abb. 4 beschrieben. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus 4 unabhängigen Experimenten mit Skelettmuskelzell-Spender M9

*signifikant unterschiedlich von der Insulin-stimulierten Kontrolle mit $p < 0.05$.

3.2.2 IL-6

Literaturdaten zeigen, dass IL-6 möglicherweise einen wichtigen Beitrag zur Entstehung der muskulären Insulin-Resistenz leistet. So gibt es Hinweise darauf, dass die IL-6 Konzentration im Blut mit zunehmendem BMI ansteigt. Des weiteren gibt es Korrelationen zwischen Insulinsensitivität und IL-6 Sekretion. Jedoch fehlen bislang Daten über die Auswirkungen von IL-6 auf die Insulinsignalweiterleitung im humanen Skelettmuskel.

Untersuchungen von Henrike Sell aus unserer Arbeitsgruppe belegen, dass die in dieser Arbeit eingesetzten Fettzellen messbare Mengen (22 ± 6 ng/ml) IL-6 in das Medium abgeben. Aus diesem Grund wurden verschiedene IL-6 Konzentrationen bezüglich ihrer Fähigkeit, die Insulinsignalweiterleitung im humanen Skelettmuskel zu beeinflussen, untersucht. Dazu wurden die Myotuben für 48 h mit der entsprechenden IL-6 Konzentration inkubiert.

Die Ergebnisse belegen, dass nur sehr hohe Dosen von IL-6 (10 nM) die Insulinsignalweiterleitung auf der Ebene der Akt Serin-Phosphorylierung in Form einer Hemmung um $20,2 \pm 3,9 \%$ reduzieren können. Geringere, eher physiologische Dosen (1 nM und 0,1 nM), weisen diesen Effekt nicht mehr auf. Diese Beobachtung ist für 3 Skelettmuskelzellspender konsistent (Abb. 12). Die Akt Expression bleibt von IL-6 unbeeinflusst.

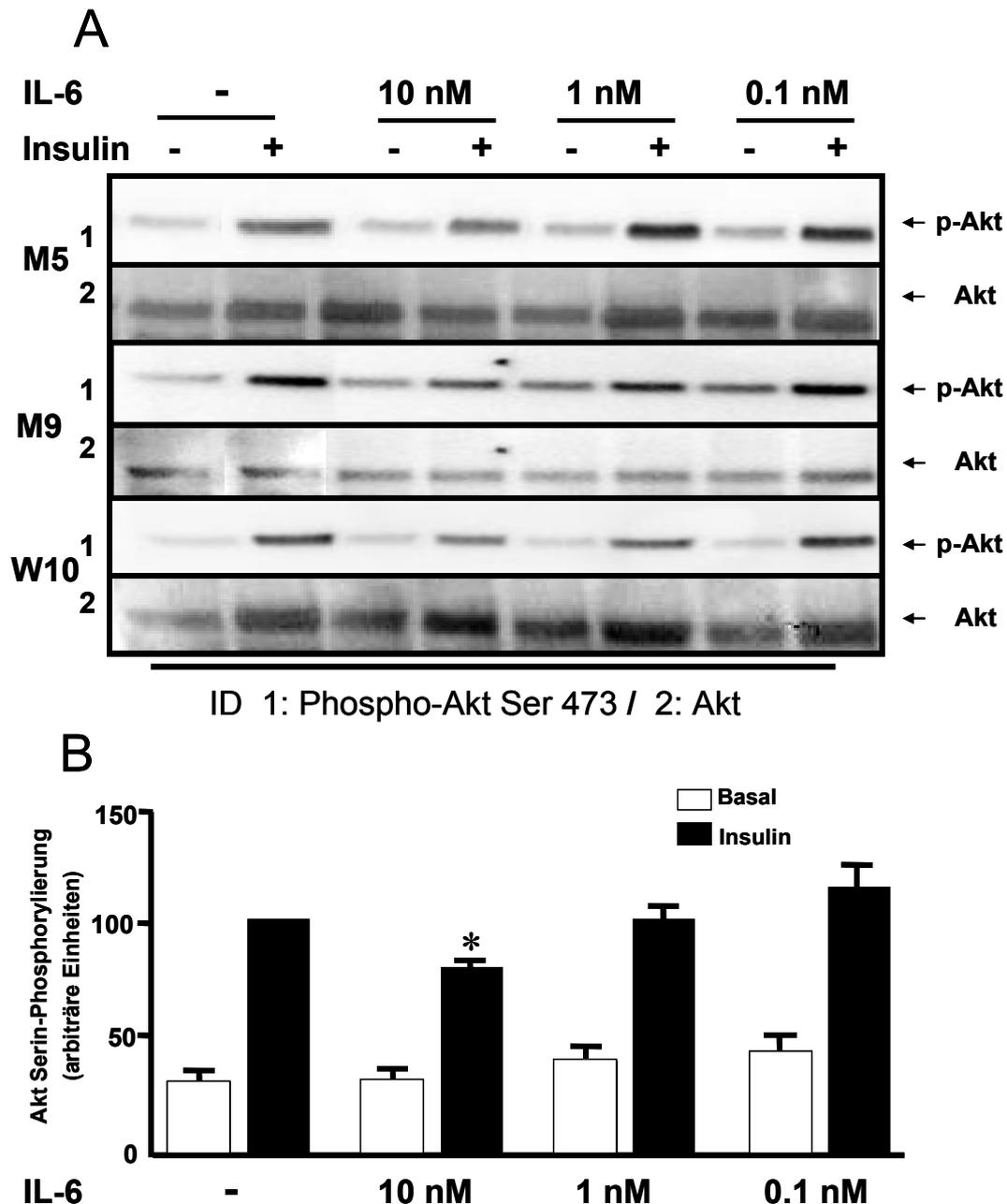


Abbildung 12: Die Akt Phosphorylierung nach IL-6 Behandlung

Die Skelettmuskelzellen wurden für 48 h mit den angegebenen IL-6 Konzentrationen inkubiert. A: Zelllysate wurden, wie unter Abb 4 beschrieben, präpariert und detektiert. Gezeigt sind repräsentative Blots für drei Muskelzellspender. B: Die Quantifizierung der Blots erfolgte wie unter Abb 4 beschrieben. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 10 Experimenten mit 3 unterschiedlichen Skelettmuskelzellspendern.

*signifikant unterschiedlich von der Insulin-stimulierten Kontrolle $p < 0.05$.

Dieser schwache Effekt ist jedoch nur auf Ebene der Akt Serin-Phosphorylierung zu beobachten und pflanzt sich nicht auf Ebene der GSK3 fort. Keine der untersuchten IL-6 Konzentrationen beeinflusst die GSK3 Phosphorylierung. Ebenso lässt sich kein Effekt von IL-6 auf die Expressionsmuster der GSK3 nachweisen.

3.2.3 Angiotensin II

Die Rolle von Angiotensin II in der Entstehung der muskulären Insulin-Resistenz wird sehr kontrovers diskutiert. Zwar ist allgemein bekannt, dass eine Blockierung des Renin-Angiotensin-Systems zu einer Verbesserung der Insulinsensitivität bei einer peripheren Insulin-Resistenz und zu einer Verminderung des Diabetesrisikos in Nagetieren führt, jedoch sind die Auswirkungen von Angiotensin II beim Menschen noch nicht hinreichend analysiert. Aus diesem Grund wurde die Wirkung hoher Dosen Angiotensin II (10 μ M) auf den humanen Skelettmuskel in An- bzw. Abwesenheit seines spezifischen Rezeptorantagonisten Candesartan untersucht.

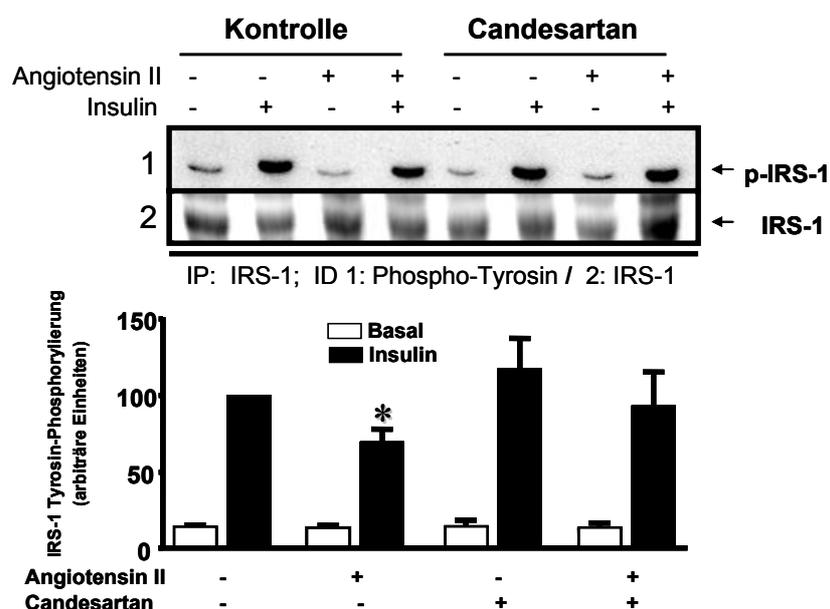


Abbildung 13: Die IRS-1 Phosphorylierung nach Angiotensin und Candesartan Behandlung

Die Muskelzellen wurden für 48 h in Gegenwart oder Abwesenheit von 10^{-5} M Angiotensin II mit oder ohne 10^{-4} M Candesartan inkubiert. Nach Insulinstimulation (100 nM für 10 min) wurde IRS-1 präzipitiert und analysiert wie bei Abb. 4 beschrieben. Gezeigt wird ein repräsentativer Western Blot. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 5 unabhängigen Experimenten mit Skelettmuskelzell-Spender M9.

*signifikant unterschiedlich von der Insulin-stimulierten Kontrolle

Eine Inkubation der humanen Skelettmuskelzellen mit 10 μM Angiotensin II führt zu einer $22,3 \pm 8,2$ % verminderten Insulinantwort auf der Ebene der IRS-1 Tyrosin-Phosphorylierung nach akuter Stimulation mit Insulin. 100 μM Candesartan stellen hier bei gleichzeitiger Inkubation mit Angiotensin II eine normale Insulinantwort wieder her, wobei Candesartan allein ohne Effekt auf die IRS-1 Phosphorylierung bleibt (Abb. 13). Die IRS-1 Expression wird weder von Angiotensin II noch von Candesartan beeinflusst.

Angiotensin II und Candesartan haben auf weiter abwärts gelegene Proteine wie Akt und GSK3 α/β weder im Expressionsmuster noch in Ansprechbarkeit gegenüber Insulin eine Auswirkung (Abb. 14). Geringere Dosen von Angiotensin II (2,5 μM und 0,5 μM) weisen keinerlei Effekt auf die beschriebenen Elemente der Insulinsignalkaskade auf.

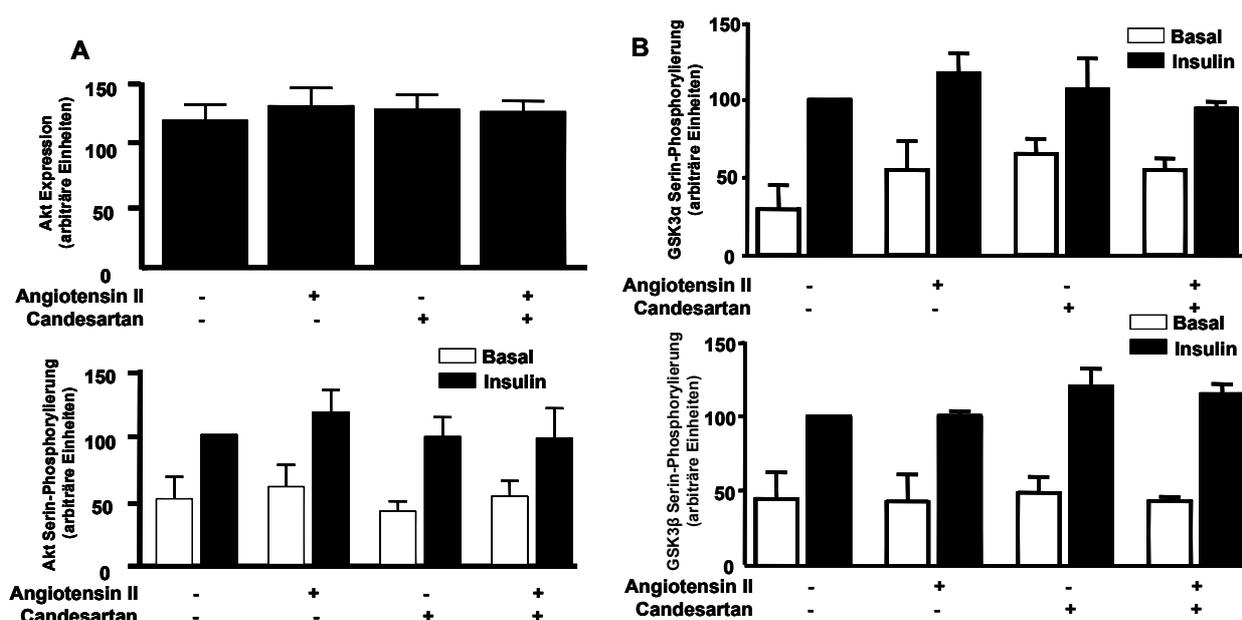


Abbildung 14: Die Akt und IRS-1 Phosphorylierung und Akt Expression nach Behandlung mit Angiotensin und Candesartan

A: Die Zellen wurden wie unter Abb. 13 beschrieben, kultiviert und die Akt Phosphorylierung und Expression, wie unter Abb. 5 beschrieben, gemessen und analysiert.

B: Die Zellen wurden wie unter Abb. 13 beschrieben, kultiviert und die GSK3 Phosphorylierung, wie unter Abb. 4 beschrieben, gemessen und analysiert.

Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus jeweils 6 unabhängigen Experimenten mit 2 verschiedenen Skelettmuskelzell-Spendern.

3.2.4 Resistin

Der Hauptsekretionsort des Hormons liegt beim Menschen in den mononukleären Zellen. Anders als beim Nagetier werden beim Menschen vom Fettgewebe nur sehr geringe Resistin Mengen ausgeschüttet. Literaturdaten weisen auf eine Beteiligung von Resistin in der Entstehung der Insulin-Resistenz in Nagern hin. Die Literaturlage bleibt jedoch in Bezug auf den Einfluss des Hormons auf die Pathogenese der Insulin-Resistenz im Menschen kontrovers. Aus diesem Grund wurden die Auswirkungen unterschiedlicher Resistinkonzentrationen auf die Insulinsignalweiterleitung im humanen Skelettmuskel untersucht.

Es kann gezeigt werden, dass keine der getesteten Resistinkonzentrationen von 10 ng, 100 ng und 1000 ng eine Störung der Insulinsignalweiterleitung auf Ebene der Akt auslöst. Ebenso bleibt die Akt Expression von Resistin unbeeinflusst (Abb. 15).

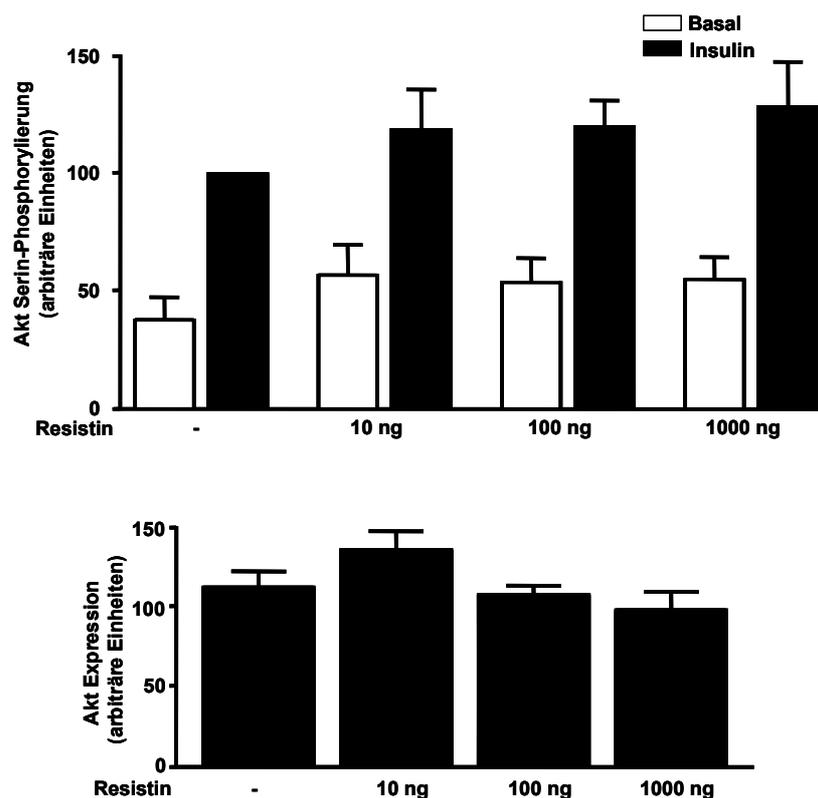


Abbildung 15: Die Akt Phosphorylierung und Expression nach Resistin Behandlung

Die Muskelzellen wurden für 48 h in Gegenwart der angegebenen Resistinkonzentrationen inkubiert. Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Akt (Ser 473) spezifischen Phospho-Serin oder Akt Antikörpern immunodetektiert. Die Signale wurden mittels ECL ausgewertet. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 7 unabhängigen Experimenten mit 3 verschiedenen Skelettmuskelzell-Spendern.

Auf der Ebene der GSK3 α/β führt Resistin allerdings bei beiden Untereinheiten zu einer gestörten Ansprechbarkeit gegenüber Insulin. Bei Konzentrationen von 100 ng und 1000 ng Resistin findet man bei beiden Untereinheiten keine signifikante Steigerung der Serin-Phosphorylierung nach akuter Stimulation mit Insulin. Bei einer Konzentration von 10 ng Resistin liegt ein Trend zur verstärkten Phosphorylierung nach Insulingabe vor, der in Bezug auf die β -Untereinheit statistische Signifikanz erreicht. Der Insulineffekt bleibt mit $1,6 \pm 0,8$ fach für Skelettmuskelzellen, die mit 10 ng Resistin behandelt sind, im Vergleich zu $2,2 \pm 0,7$ fach für die unbehandelte Kontrollsituation jedoch vergleichbar und erreicht keine statistische Signifikanz. Die Expression beider Untereinheiten wird von keiner Resistinkonzentrationen beeinflusst (Abb. 16).

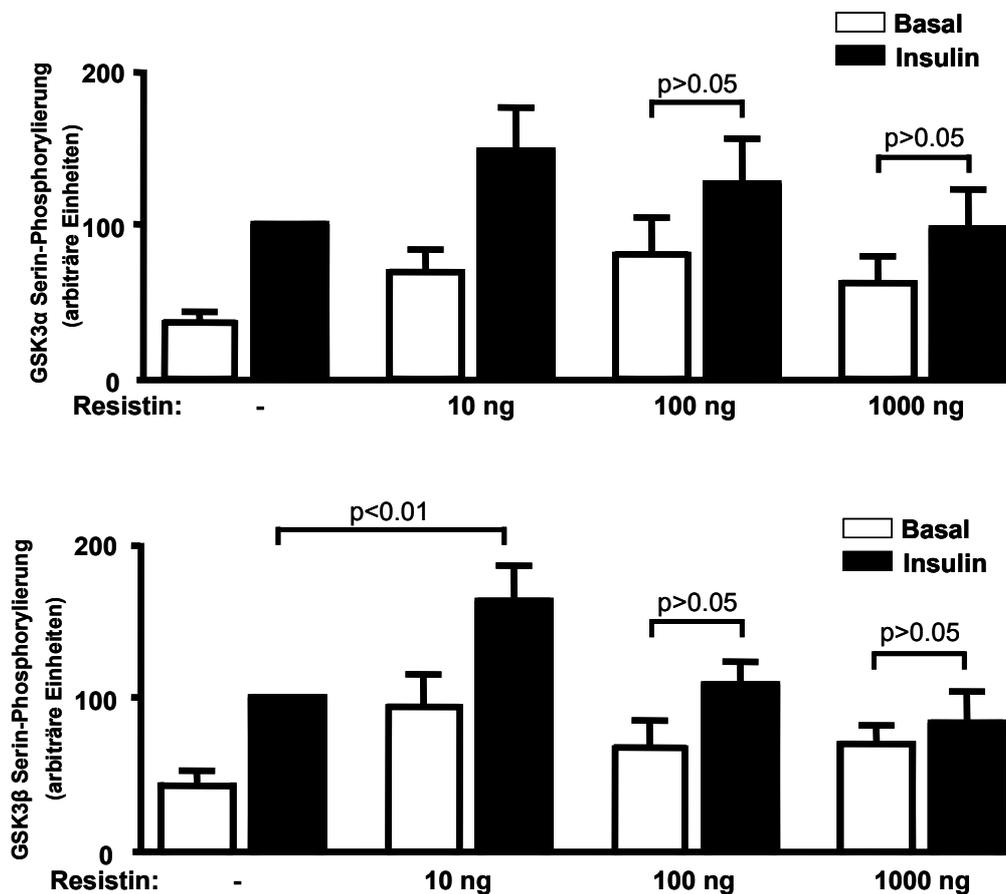


Abbildung 16: Die GSK3 Phosphorylierung nach Resistinbehandlung

Die Muskelzellen wurden für 48 h in Gegenwart der angegebenen Resistinkonzentrationen inkubiert. Zelllysate wurden, wie unter Abb.4 beschrieben, präpariert und analysiert.

Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 7 unabhängigen Experimenten mit 3 verschiedenen Skelettmuskelzellspendern.

Die Messung der Resistinkonzentration im Zellkulturmedium führte zu überraschenden Ergebnissen. Der Resistin ELISA zeigte zunächst, dass manuell zugesetzte, definierte Resistin Mengen als positiv Kontrolle in nicht konditioniertem Medium nach Aufarbeitung (10fache Aufkonzentrierung) mit dem ELISA wieder gefunden werden. Bei den durch Skelettmuskelzellen konditionierten Medien (n=8) kann Resistin in einer Konzentration von $15,5 \pm 4,2$ pg/ml Medium detektiert werden. Die Gabe von Troglitazon zeigt keinen signifikanten Effekt auf die ausgeschüttete Resistin Menge. Weder bei Adipozyten aus Kultur noch bei frisch isolierten, reifen Fettzellen kann Resistin im Medium nachgewiesen werden. Die Resistinkonzentration im Co-Kultur Medium beträgt $6,5 \pm 1,5$ pg/ml Medium (n=8).

3.3 Suche nach neuen Adipokinen, die als Mediatoren der muskulären Insulin-Resistenz in Frage kommen

3.3.1 Charakterisierung des Fettzellüberstandes

Die Suche nach neuen Insulin-Resistenz-auslösenden Faktoren führt zu den Fettzellüberständen. Faktoren, die in der Co-Kultur an der Entstehung der gestörten Insulinsensitivität beteiligt sind, müssen von den Fettzellen ins Medium abgegeben werden. Aus diesem Grund wurden die Fettzellen bis zur vollständigen Differenzierung kultiviert und anschließend für 48 h mit einem speziellen Sammelmedium im Brutschrank gehalten. Danach wurde das Medium abgenommen, lyophilisiert, in einem definierten Volumen aufgenommen und filtriert. Die so gewonnenen Überstände wurden in die Analysen eingesetzt. Um zu überprüfen, ob die Fettzellen tatsächlich die gewünschten Faktoren ausschütten, wurden zunächst die Skelettmuskelzellen über Nacht mit den Fettzellüberständen behandelt.

Eine Dosiswirkungskurve von Fettzellüberständen zeigt, dass nur die Überstände eine mit der Co-Kultur vergleichbare Hemmung der Insulinsignalweiterleitung auf der Ebene der Akt im Skelettmuskel verursachen (100 % für die Kontrolle vs. $59,2 \pm 7,8$ % für die mit Überstand behandelten Zellen), die von einer, der Co-Kultur äquivalenten, Fettzellzahl gewonnen werden (Abb. 17). Diese, der Co-Kultur entsprechende Konzentration an Fettzellfaktoren wird als Einheit „1 Überstand“ definiert. Die Akt Serin-Phosphorylierung wird durch 0,25 Überstände auf $89,6 \pm 12,7$ % nicht signifikant und durch 0,5 Überstände auf $80,9 \pm 8,1$ % signifikant vermindert.

Ebenso wie unter Co-Kultur Bedingungen kommt es zu einer signifikant gesteigerten basalen Phosphorylierung der GSK3 α/β , wenn die Skelettmuskelzellen über Nacht mit 1 Überstand inkubiert werden (für GSK3 α : $88,5 \pm 12,7$ % für mit Überstand behandelte Zellen vs. $54,2 \pm 6,2$ % für die Kontrolle; GSK3 β : $77,2 \pm 7,8$ % für mit Überstand behandelte Zellen vs. $50,2 \pm 4,5$ % für die Kontrolle) (Abb. 17). Auf der Ebene der GSK3 α bleibt eine akute Insulingabe nach Behandlung mit 1 Überstand ohne weiteren Effekt auf die Serin-Phosphorylierung. Auf der Ebene der GSK3 β findet sich noch ein stark reduzierter Insulineffekt.

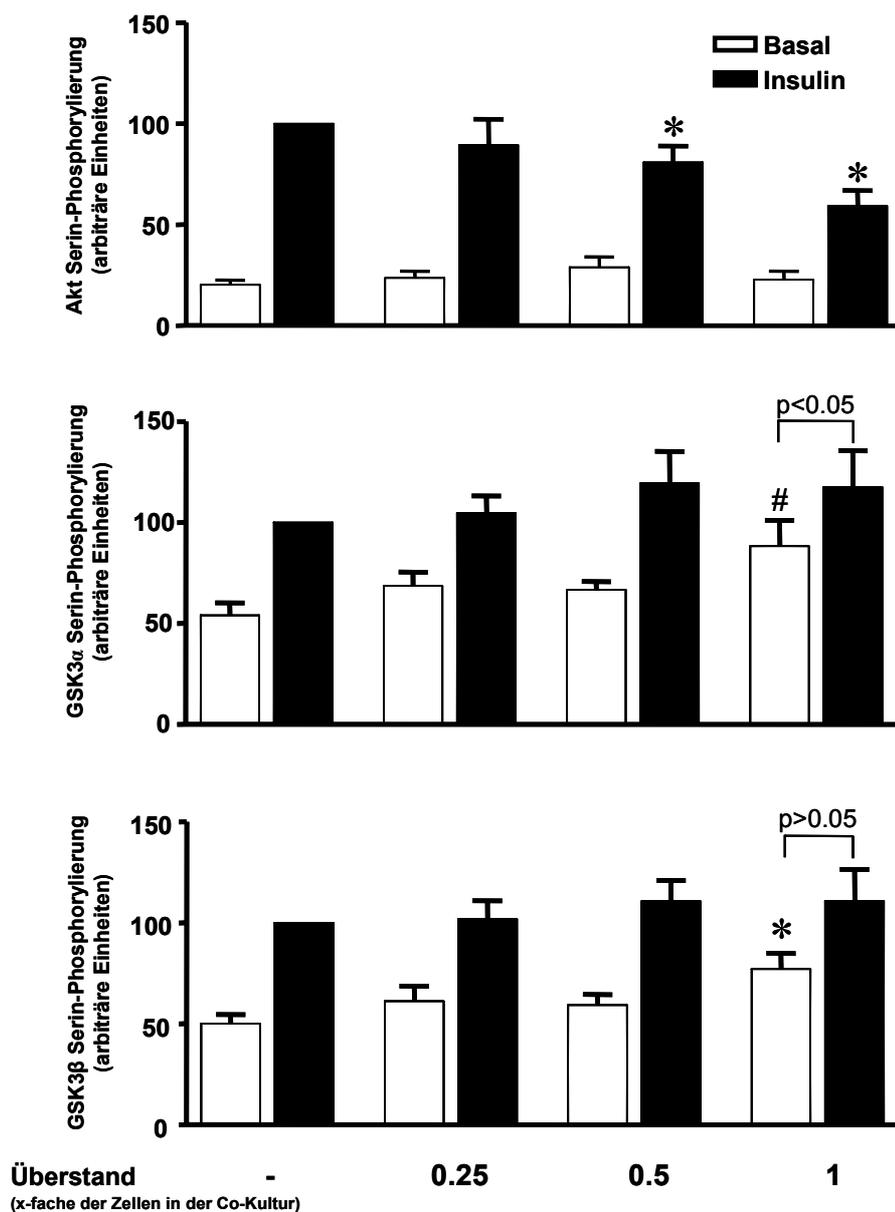


Abbildung 17: Die Akt und GSK3 Phosphorylierung nach Behandlung mit Fettzellüberständen

Humane Skelettmuskelzellen wurden über Nacht mit Fettzellüberständen, die von 3 verschiedenen Fettzellspendern gewonnen wurden, inkubiert. Die Überstandskonzentration „1“ bedeutet: der Überstand wurde von so vielen Fettzellen konditioniert, wie sie auch in der Co-Kultur eingesetzt wurden. Die Muskelzellen wurden mit Insulin stimuliert (100 nM; 10 min) und, wie unter Abb. 4 beschrieben, präpariert und analysiert. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 9 unabhängigen Experimenten mit drei unterschiedlichen Skelettmuskelzellspendern. (M5: n=3; M9: n=3; W10: n=3). *signifikant unterschiedlich von der Insulin-stimulierten und basalen Kontrolle ($p < 0.05$)
nicht signifikant unterschiedlich von der Insulin-stimulierten Kontrolle ($p > 0.05$) aber signifikant von der basalen Kontrolle ($p < 0.05$)

Mit der so bestimmten, die Co-Kultur mimickierenden Überstandskonzentration, kann durch insgesamt 5 Fettzellspender bei jeweils 4 unterschiedlichen Skelettmuskelzellspendern eine $42,8 \pm 7,3$ %ige Hemmung der Insulin-stimulierten Akt Serin-Phosphorylierung hervorgerufen werden (Abb. 18).

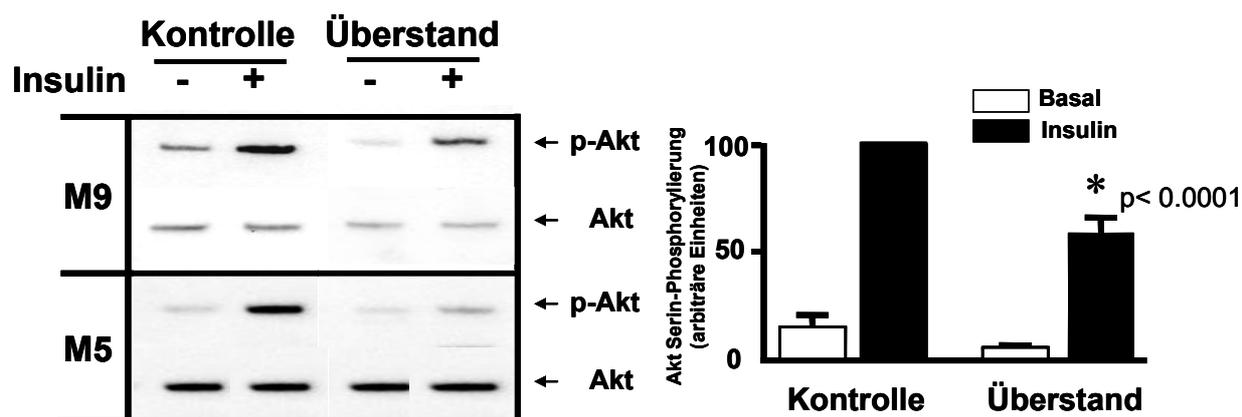


Abbildung 18: Die Akt Phosphorylierung nach Behandlung mit Fettzellüberständen

Humane Skelettmuskelzellen werden über Nacht mit Fettzellüberständen von 5 verschiedenen Spendern inkubiert, die Muskelzellen mit Insulin stimuliert (100 nM; 10 min) und solubilisiert. Die Präparation und Analyse erfolgte wie unter Abb. 4 beschrieben.

Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 19 unabhängigen Experimenten mit vier unterschiedlichen Skelettmuskelzellspendern. (M5: n=5; M9: n=5; W10: n=5; W48: n=4).

*signifikant unterschiedlich von der Insulin-stimulierten Kontrolle ($p < 0.0001$)

Weitere Analysen der Auswirkungen von Fettzellüberständen auf die Skelettmuskelzellen zeigen eine hohe Variabilität zwischen den einzelnen Fett- und Muskelzellspendern auf. Drei der fünf Fettzellspender (CM-b, CM-c und CM-e) hemmen die Insulin-stimulierte Serin Phosphorylierung der Akt um ca. 60 %, wohingegen zwei der Fettzellspender (CM-a und CM-d) keinen signifikanten Einfluss auf die Akt besitzen (Abb. 19). Werden die BMI Werte der einzelnen Fettzellspenderinnen mit in die Analysen einbezogen, so lässt sich kein Zusammenhang zwischen BMI und der Fähigkeit, die Insulinsignalweiterleitung im Skelettmuskel zu beeinflussen, beobachten.

Im umgekehrten Fall sprechen nicht alle Muskelzellspender gleich gut auf die Fettzellspender an. Hier zeigen sich bei gleichem Versuchsaufbau individuelle Schwankungen der durchschnittlichen Hemmung der Akt Phosphorylierung zwischen 20 und 65 % (Abb. 19). Doch auch hier ließ sich kein Zusammenhang zwischen der Sensitivität der Skelettmuskelzellen gegenüber den Fettzellfaktoren und dem Alter oder Geschlecht der Muskelzellspender feststellen.

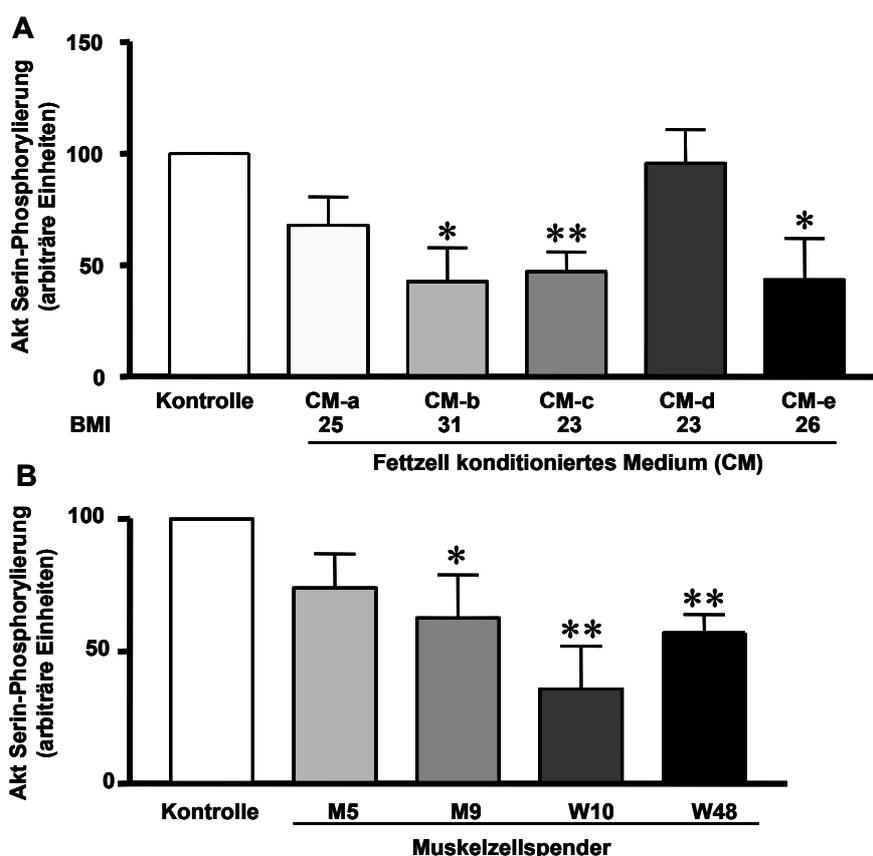


Abbildung 19: Die Akt Phosphorylierung in Abhängigkeit von den verwendeten Spendern

A: Humane Skelettmuskelzellen wurden über Nacht mit fünf verschiedenen Fettzellüberständen (CM-a – CM-d) inkubiert, Insulin-stimuliert und die Serin-Phosphorylierung von Akt wurde analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte von jedem einzelnen Überstand, der einmal zu jedem Skelettmuskelzellspender gegeben wurde. Die Ergebnisse wurden auf die Akt Expression normiert. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 3-4 unabhängigen Experimenten (CM-a, CM-b, CM-c, CM-d: n=4; CM-e: n=3). B: Effekt der Überstände CM-a – CM-e auf die Akt Serin-Phosphorylierung der unterschiedlichen Skelettmuskelspender. Die Ergebnisse wurden auf die Akt Expression normiert. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 4-5 unabhängigen Experimenten (M5: n=5; M9: n=5; W10: n=5; W48: n=4). * signifikant unterschiedlich von der Kontrolle ($p < 0.05$); ** signifikant unterschiedlich von der Kontrolle ($p < 0.01$)

3.3.2 Auftrennungsversuche

Um den Resistenz-auslösenden Faktor weiter einzugrenzen, wurden die Überstände gekocht, mit ProteinaseK verdaut oder ultrafiltriert. Hier erweisen sich die Zielfaktoren als äußerst robust, denn Kochen der Überstände führt zu keinem Verlust der inhibitorischen Wirkung. Werden die Überstände jedoch mit ProteinaseK verdaut, kommt die Hemmung der Akt Serin-Phosphorylierung nicht mehr zustande. Weitere

Experimente mit einem Cut-Off Filter der Größe 5 kDa weisen darauf hin, dass der gesuchte Faktor größer als 5 kDa sein muss, da nur diese Fraktion eine mit dem kompletten Überstand vergleichbare Hemmung der Akt Phosphorylierung hervorruft (Abb. 20).

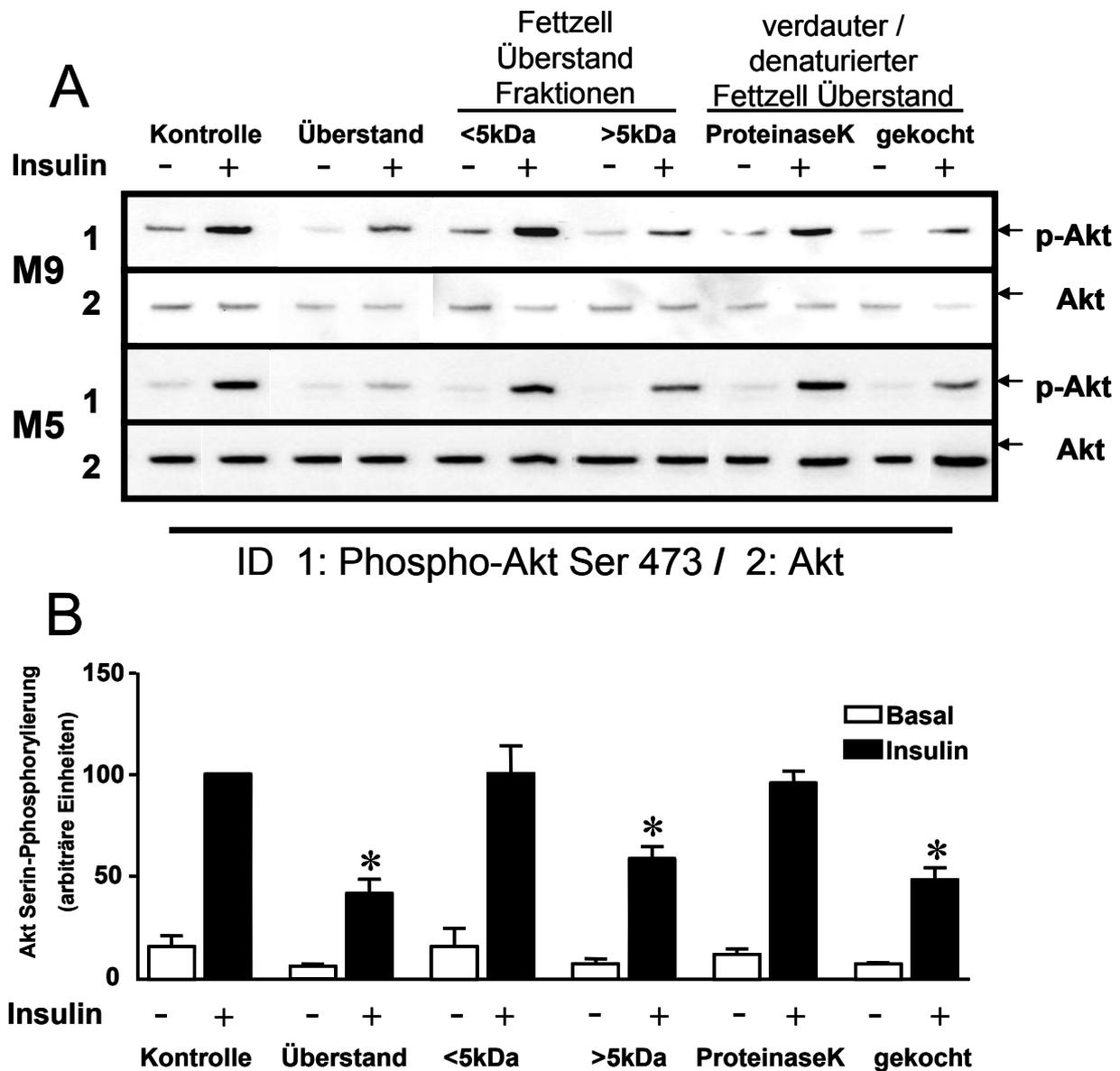


Abbildung 20: Die Akt Phosphorylierung nach Auftrennung der Fettzellüberstände

Fettzellüberstände wurden entweder Pur, mit VivaSpin Columns fraktioniert, mit ProteinaseK verdaut oder gekocht. A: Die humanen Skelettmuskelzellen wurden über Nacht mit den aufgearbeiteten Überständen inkubiert. Die Muskelzellen wurden hiernach mit Insulin stimuliert (100 nM; 10 min) und solubilisiert. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit phosphospezifischen Akt oder Akt Antikörpern immunodetektiert. Die Signale wurden mittels ECL ausgewertet. Gezeigt sind repräsentative Blots. B: Die Quantifizierung der Blots erfolgte am LUMI-Imager mit der entsprechenden Software. Die Ergebnisse wurden auf die Akt Expression normiert und werden bezogen auf die Insulin-stimulierte Kontrolle dargestellt. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 6 unabhängigen Experimenten mit 3 unterschiedlichen Skelettmuskelzellspendern. (M5: n=1; M9: n=1; W10: n=4;).

*signifikant unterschiedlich von allen anderen Insulin-stimulierten Werten ($p < 0.05$)

Eine weitere Auftrennung der Überstände in 5 verschiedene Fraktionen ergab keine definierte Antwort auf die Frage nach der Größe des gesuchten Faktors. In den Fraktionen >50 kDa und 5-10 kDa zeigt sich eine signifikante, aber nur sehr geringe Hemmung der Akt Serin-Phosphorylierung nach Insulinstimulation (Abb. 21). In keiner der getesteten Fraktionen kann eine mit dem vollständigen Überstand vergleichbare Hemmung der Akt Aktivierung beobachtet werden. Deswegen kann man davon ausgehen, dass nicht nur ein Faktor, sondern das Zusammenspiel verschiedener Adipokine zur Insulin-Resistenz im Skelettmuskel führt.

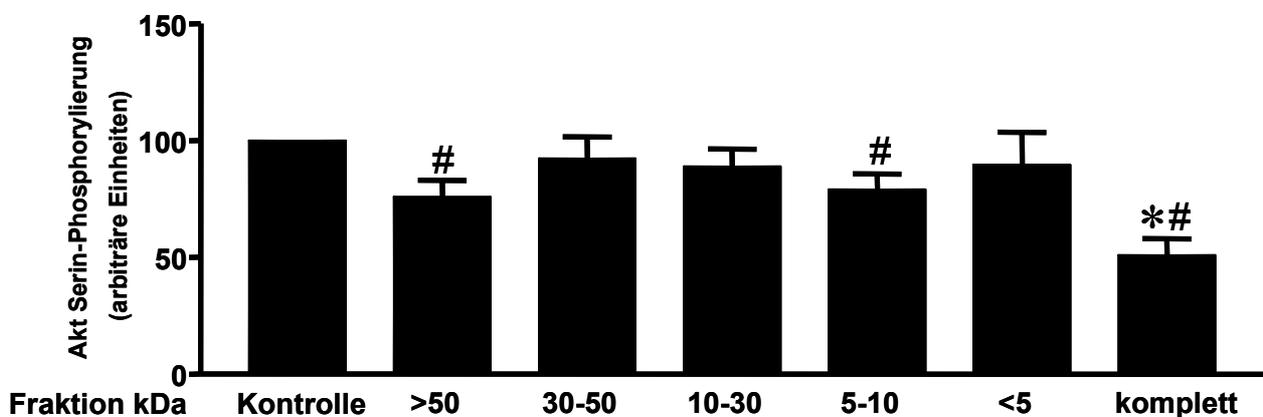


Abbildung 21: Die Akt Phosphorylierung nach Behandlung mit fraktionierten Fettzellüberständen
Fettzellüberstände wurden entweder Pur oder mit VivaSpin Columns fraktioniert über Nacht mit den humanen Skelettmuskelzellen inkubiert. Die Zellen wurden wie unter Abb. 4 beschrieben, präpariert und analysiert.

Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 9 unabhängigen Experimenten mit 3 unterschiedlichen Skelettmuskelzellspendern. (M5: n=3; M9: n=3; W10: n=3;).

*signifikant unterschiedlich von allen anderen Insulin-stimulierten Werten ($p < 0.05$);

signifikant unterschiedlich von der Kontrolle ($p < 0.05$)

Um diese Hypothese weiter zu testen, wurde ein vergleichendes Silbergel zwischen einem Resistenz-auslösenden und einem nicht Resistenz-auslösenden Überstand angefertigt. Dieses Gel weist bei unterschiedlichen Molekulargewichten Banden auf, die im jeweils anderen Überstand nicht vorhanden sind (Abb. 22).

Vergleich von zwei Überständen in der Silberfärbung

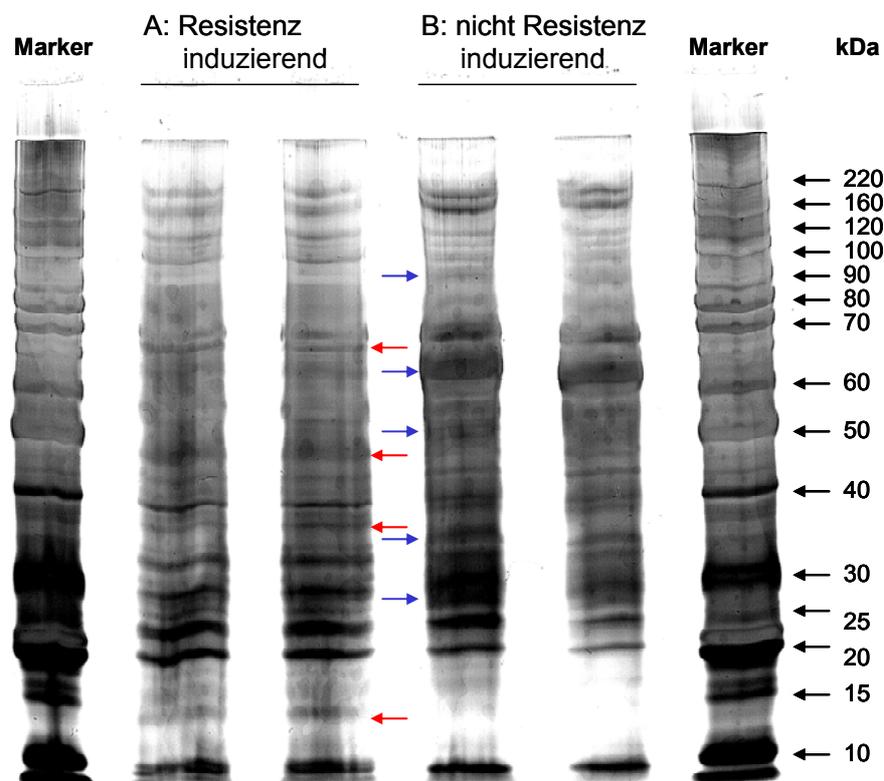


Abbildung 22: Silbergelauftrennung eines inhibitorisch wirksamen und eines unwirksamen Überstands

Ein Resistenz-induzierender und ein nicht Resistenz-induzierender Überstand wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und mit dem SilverQuest™ Kit gefärbt. Die Pfeile markieren Banden, die im jeweils anderen Überstand entweder nicht zu sehen oder wesentlich schwächer ausgeprägt sind.

Mit dieser Erkenntnis, die die Annahme von verschiedenen Faktoren als Auslösung der Insulin-Resistenz unterstützt, wurde versucht, mit Hilfe der Massenspektrometrie (in Zusammenarbeit mit dem BMFZ der Heinrich-Heine-Universität) einige der prominenten Banden zu analysieren. Dazu wurden einzelne Banden aus dem oben gezeigte Silbergel ausgeschnitten, entfärbt und einem „in Gel

Trypsinverdau“ unterzogen. Nach Elution der Peptide wurden die so gewonnenen Proben am Massenspektrometer untersucht.

Um einen störenden Einfluss der vorangegangenen Silberfärbung auszuschließen, wurde parallel BSA im Gel aufgetrennt und entsprechend der Überstandsproben behandelt. Dieses BSA wurde ohne Probleme in der massenspektrometrischen Analyse detektiert (Abb. 23).

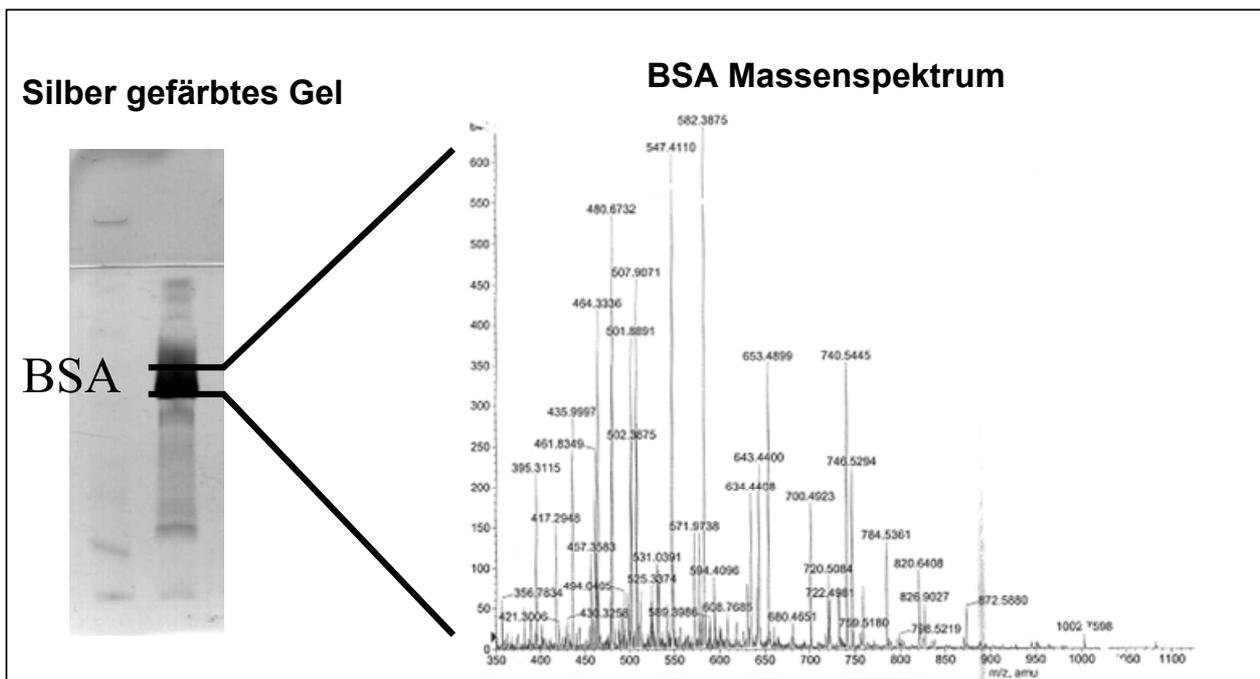


Abbildung 23: BSA Sequenz im Massenspektrometer

1 µg BSA wurde in einem Gel aufgetrennt und mit dem Silver Quest™ Kit angefärbt. Anschließend wurde die BSA-Bande ausgeschnitten, mit Trypsin im Gel verdaut. Anschließend wurden die Peptide auf dem Gel eluiert und nach einer Umfällung im Massenspektrometer analysiert. Gezeigt ist eine für BSA typische Massensequenz.

Bei den Proben der Überstände waren die Proteinmengen jedoch leider zu gering, so dass aufgrund des hohen Hintergrundes, der vom Trypsin verursacht wurde, eine genaue Analyse der Proteine nicht möglich war.

Um die Gruppe der Resistenz-auslösenden Faktoren trotzdem weiter einzugrenzen, wurden möglich Signalwege untersucht.

3.4 Wirkmechanismen von Mediatoren der Insulin-Resistenz aus Fettzellen

3.4.2 JNK

Um eine mögliche Involvierung der c-Jun NH(2)-terminal Kinase (JNK) in der Entstehung der muskulären Insulin-Resistenz zu untersuchen, wurden die Skelettmuskelzellen über Nacht in An- bzw. Abwesenheit eines spezifischen JNK Inhibitors mit Fettzellüberständen inkubiert. Die Wirksamkeit des Inhibitors wurde zuvor an den Skelettmuskelzellen getestet.

Nach einer akuten Insulinstimulation zeigte sich, dass der JNK Inhibitor alleine die Insulin Antwort auf der Ebene der Akt signifikant sensitiviert (100 % der Insulin-stimulierten Kontrolle vs. $141 \pm 24,9$ % Insulinstimulation nach $1 \mu\text{M}$ JNK Inhibitor und $133,2 \pm 9,5$ % Insulinstimulation nach $5 \mu\text{M}$ JNK Inhibitor). Die basale Phosphorylierung der Akt wird durch den JNK Inhibitor nicht beeinflusst. Der Fettzellüberstand bewirkt eine Hemmung der Insulinantwort auf der Ebene der Akt von 100 % auf $45,1 \pm 7,6$ %. Diese Hemmung kann durch den JNK Inhibitor nicht aufgehoben werden (Abb. 24). Zwar zeigt sich eine tendenzielle Besserung der Insulinansprechbarkeit, diese erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Die Akt Proteinexpression bleibt vom JNK Inhibitor unbeeinflusst.

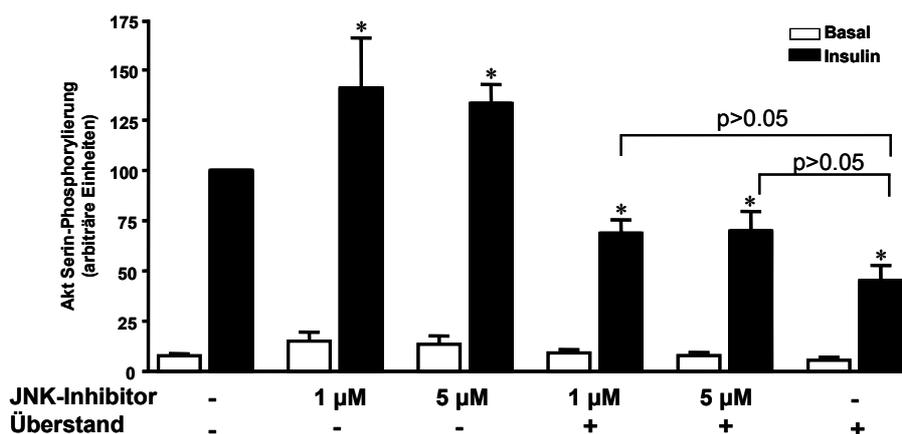


Abbildung 24: Die Akt Phosphorylierung nach Behandlung mit Fettzellüberständen und JNK Inhibitor

Die Skelettmuskelzellen wurden über Nacht mit Fettzellüberständen in An-, bzw. Abwesenheit von 2 verschiedenen JNK Inhibitor Konzentrationen inkubiert. Hiernach erfolgte eine akute Insulinstimulation, die Muskelzellen wurden solubilisiert und im SDS-Gel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mittels p-Akt bzw. Akt Antikörper. Die Quantifizierung wurde am LUMI-Imager durchgeführt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM von 4 unabhängigen Experimenten.

* signifikant unterschiedlich von der Insulin-stimulierten Kontrolle

3.4.2. NF κ B

Um die Entstehung der muskulären Insulin-Resistenz besser zu verstehen, wurden Versuche zum molekularen Mechanismus der Resistenzauslösung durchgeführt. Vor dem Hintergrund eines möglichen Zusammenhangs zwischen chronischer Inflammation und Insulin-Resistenz war die mögliche Aktivierung des NF κ B Weges durch die Fettzellefaktoren von besonderem Interesse. Für die beschriebenen Untersuchungen wurde ein spezifischer Inhibitor (I229) der I κ B Kinase (IKK) benutzt. I229 ist ein Benzimidazol Derivat mit einem IC₅₀ von 1,9 nM gegen den IKK Komplex.

Wie die Abbildung 25 zeigt, handelt es sich bei der Substanz I229 um einen sehr potenten Inhibitor der IKK. Eine durch TNF α hervorgerufene massive Phosphorylierung der P65 Untereinheit des Nf κ B ist nach Vorinkubation mit 10 μ M I229 nicht mehr zu beobachten. Damit ist die Aktivität des Inhibitors in unserem System bestätigt.

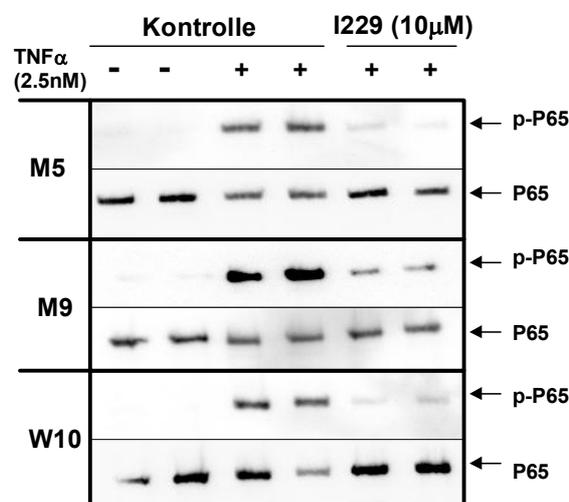


Abbildung 25: Aktivierung der P65 durch TNF α und Inhibition durch den IKK-Inhibitor

Muskelzellen wurden für 10 min in Anwesenheit oder Abwesenheit von 2,5 nM TNF α mit oder ohne 10 μ M I229 inkubiert. Die Zellen wurden lysiert, im SDS Gel aufgetrennt und mit einem anti-phospho-NF κ B (P65) Antikörper immunodetektiert. Die Signale wurden mittels ECL ausgewertet. Repräsentative Blots von 3 verschiedenen Skelettmuskelzellspendern sind gezeigt. (M9: n=2; W10: n=2; M5: n=2).

Untersuchungen an mit Fettzellüberständen inkubierten Skelettmuskelzellen zeigen, dass Fettzellfaktoren die P65 Untereinheit deutlich (2fach) und rasch (nach 30 min) phosphorylieren. Werden die Skelettmuskelzellen zeitgleich mit dem Inhibitor I229 inkubiert, so findet sich keine signifikante Erhöhung der Phosphorylierung der P65 Untereinheit durch die Fettzellüberstände (Abb. 26). Kürzere Inkubationszeiten von 10 min führen in den Skelettmuskelzellen zu keiner signifikant erhöhten P65 Phosphorylierung, doch kann eine zusätzliche Inkubation mit I229 hier die Stärke der Phosphorylierung signifikant im Vergleich zum basalen Wert reduzieren (Abb. 26). Fettzellüberstände, die die Insulinsignalweiterleitung nicht beeinflussen, rufen auch keine erhöhte P65 Phosphorylierung in den Muskelzellen hervor.

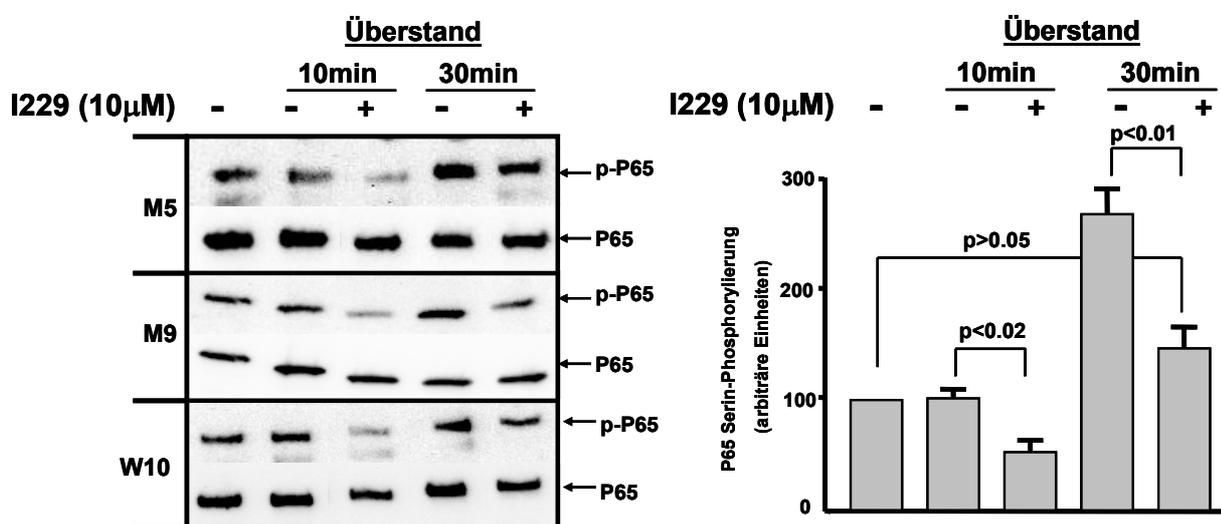


Abbildung 26: P65 Phosphorylierung nach Behandlung mit Fettzellüberständen

Humane Skelettmuskelzellen werden mit unbehandeltem Kontrollmedium oder mit durch Fettzellen konditioniertem Medium in Anwesenheit oder Abwesenheit von 10 µM I229 stimuliert (10 min oder 30 min). Die Zellysate wurden mittels SDS Page aufgetrennt und mit phosphospezifischem P65 Antikörper und einem P65 Antikörper immunodetektiert. Dargestellt sind repräsentative Blots. Die Quantifizierung der Daten erfolgte wie in Abb. 4 beschrieben. Alle Daten sind auf die P65 Proteinmenge normiert und relativ zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 6 unterschiedlichen Experimenten mit 3 verschiedenen Skelettmuskelzellenspendern (M5: n=2; M9: n=2; W10: n=2).

Um die Rolle des NFκB Weges in der Entstehung der Insulin-Resistenz im Co-Kultur Modell auf der Ebene der Akt zu untersuchen, wurden die Skelettmuskelzellen zusammen mit I229 inkubiert. Es zeigte sich, dass mit I229 behandelte Skelettmuskelzellen einen Trend zur verstärkten Akt Phosphorylierung aufweisen (Insulin-stimuliert: $182,8 \pm 3,2$ % für I229 behandelte Zellen vs. 100 % für die Kontrolle), der jedoch keine statistische Signifikanz im Vergleich zur Insulin-stimulierten Kontrolle erreichte ($p=0,058$). Darüber hinaus scheint die basale

Phosphorylierung der Akt unter Anwesenheit von I229 reduziert zu sein ($44,4 \pm 9,8$ % für die Kontrolle vs. $17,9 \pm 1,8$ % für I229 behandelte Zellen), doch auch dies erreicht keine statistische Signifikanz ($p=0,062$). Die durch Co-Kultur induzierte Insulin-Resistenz auf der Ebene der Akt (Insulineffekt: $2,8 \pm 0,5$ fach für die Kontrolle vs. $1,3 \pm 0,06$ fach für die Co-Kultur) wurde jedoch durch die Anwesenheit des IKK-Inhibitors vollständig verhindert (Insulineffekt: $5,2 \pm 0,6$ fach) (Abb. 27). Die Phosphorylierung der Akt nach Co-Kultur wurde durch Inkubation mit I229 auf einen der Kontrolle vergleichbaren Wert zurück gebracht (Insulinstimulation: $102 \pm 17,1$ % für I229 behandelte Co-Kultur vs. 100 % Kontrolle). Der scheinbar verstärkte Insulineffekt ist auf eine verminderte basale Phosphorylierung in Anwesenheit von I229 zurück zu führen, doch erreicht er keine statistische Signifikanz.

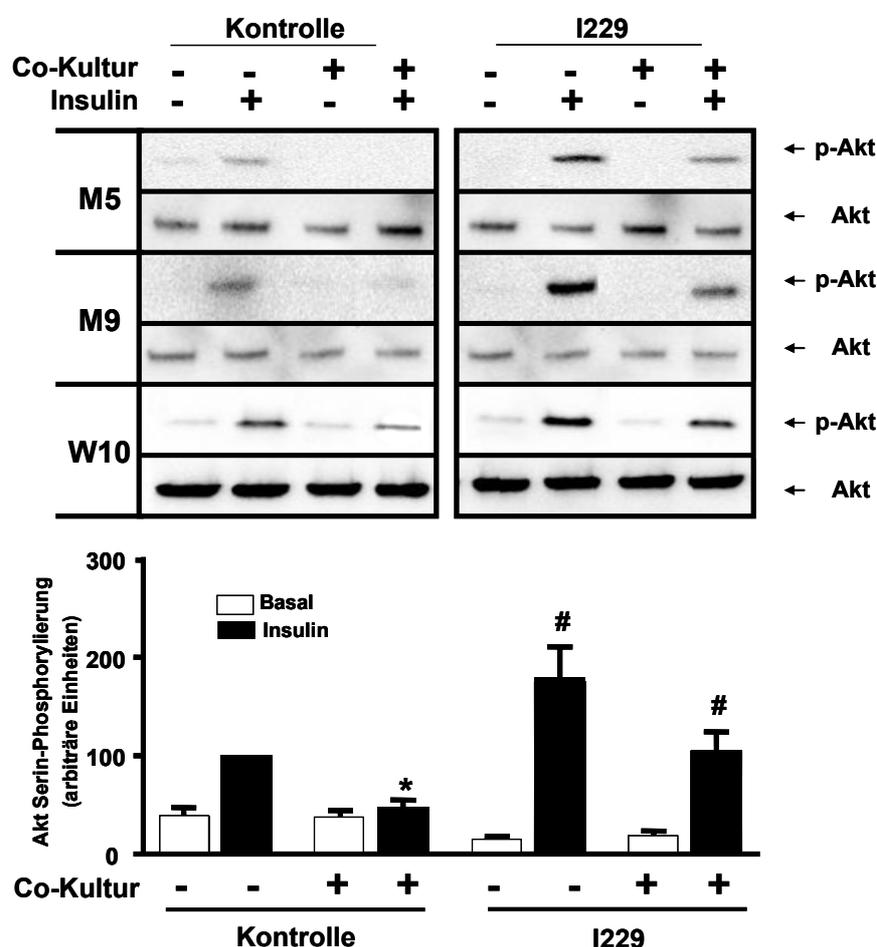


Abbildung 27: Die Akt Phosphorylierung nach Co-Kultur mit IKK-Inhibitor

Die Muskelzellen wurden für 48 h wie in den Methoden beschrieben, in Anwesenheit oder Abwesenheit von $10 \mu\text{M}$ I229 mit den Fettzellen co-kultiviert. Die Präparation und Auswertung erfolgte wie unter Abb. 4 beschrieben.

Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von 7 unabhängigen Experimenten mit 3 unterschiedlichen Skelettmuskelzellspendern. (M5: $n=3$; M9: $n=3$; W10: $n=2$).

*signifikant unterschiedlich von allen Insulin-stimulierten Werten ($p<0.05$);

#nicht signifikant unterschiedlich von der Kontrolle ($p>0.05$)

Mit dem Co-Kultur Modell konnte somit erstmalig gezeigt werden, dass im parakrinen Dialog zwischen humaner Fett- und Muskelzelle der IKK/NF κ B Signalweg involviert ist und eine essentielle Rolle übernimmt. Dieses stimmt mit neueren Daten überein, die belegen, dass eine Verbindung von inflammatorischen und metabolischen Signalwegen Ausgangspunkt für eine Insulin-Resistenz ist.

3.5 Die Rolle des Adiponectin

3.5.1 Adiponectin in der Co-Kultur

Zahlreiche freigesetzte Adipokine haben eine proinflammatorische Wirkung und eine vermehrte Produktion und Abgabe in das umgebende Milieu führt zu den metabolischen und kardiovaskulären Komplikationen der Adipositas. In diesem Zusammenhang ist die enge Verbindung zwischen Inflammation und Insulinresistenz besonders zu beachten. Adiponectin stellt das einzig bekannte Adipokin dar, dessen Freisetzung bei Patienten mit erhöhter Körperfettmasse deutlich vermindert ist. Darüber hinaus ist es das einzige bekannte anti-diabetische und anti-inflammatorische Adipokin.

Um zu untersuchen, ob Adiponectin die Fähigkeit besitzt, die Entstehung einer Insulin-Resistenz im Skelettmuskel nach Co-Kultur mit Adipozyten zu verhindern, wurden die beiden Zelltypen in An- bzw. Abwesenheit von 10 nM Adiponectin für 48 h co-kultiviert. Hiernach wurde die Insulinsignalweiterleitung auf der Ebene der Akt Kinase nach akuter Insulinstimulation untersucht.

Die Ergebnisse belegen deutlich, dass Adiponectin der Entstehung einer Insulin-Resistenz nach Co-Kultur auf der Ebene der Akt entgegenwirken kann. Es kann keine signifikante Hemmung des Phosphorylierungsstatus der Akt im Vergleich zur Kontrolle nach akuter Insulinstimulation in der Co-Kultur in Gegenwart von Adiponectin beobachtet werden (Insulin stimuliert: 100 % für Kontrolle vs. $86,8 \pm 9,6$ % für Co-Kultur + Adiponectin) (Abb. 28).

Dieses steht in deutlichem Kontrast zu der in diesem Experiment beobachteten, unter Co-Kultur Bedingungen induzierten Störung der Insulinsignalweiterleitung auf der Ebene der Akt Kinase (Insulin-stimuliert: $49,4 \pm 7,3$ % für die Co-Kultur vs. 100 % für die Kontrolle). Ebenso blieb die basale Phosphorylierung und die Expression der Akt durch Adiponectin unbeeinflusst.

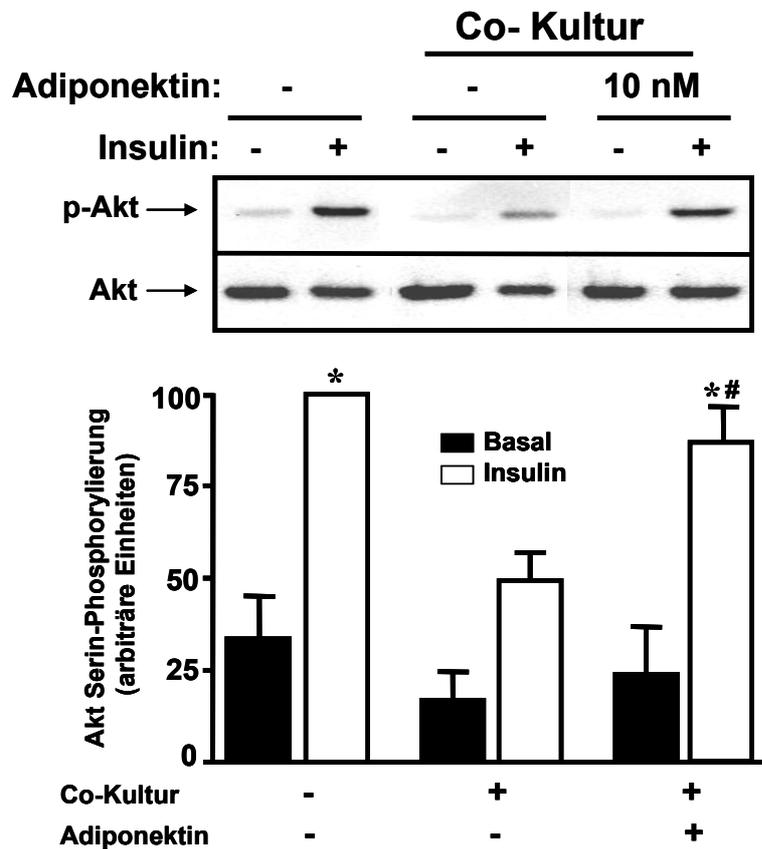


Abbildung 28: Die Akt Phosphorylierung nach Co-Kultur mit Adiponectin

A: Humane Skelettmuskelzellen wurden für 48 h in An- bzw. Abwesenheit von 10 nM Adiponectin mit Fettzellen co-kultiviert. Die Präparation und Analyse erfolgte wie unter Abb. 4 beschrieben. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 4 unabhängigen Versuchen mit 3 verschiedenen Skelettmuskelzell-Spendern.

* signifikant unterschiedlich von der Insulin-stimulierten Co-Kultur ($p < 0.001$).

nicht signifikant unterschiedlich von der Kontrolle ($p > 0.05$)

Um auszuschließen, dass die Aufhebung der Insulin-Resistenz auf der Ebene der Akt Kinase durch einen direkten Effekt von Adiponectin auf diese Kinase ausgelöst wird, wurden die direkten Effekte von Adiponectin auf die Kinase untersucht. Hier zeigt sich, dass eine Inkubation der Skelettmuskelzellen mit dem Adipokin auch nach verschiedenen langen Inkubationszeiten zu keiner Beeinflussung der Akt Expression führt. Auch wird die Insulin-stimulierte Phosphorylierung der Akt nicht durch Adiponectin verstärkt oder vermindert. Daher kann gesagt werden, dass

die Aufhebung der Insulin-Resistenz in den Skelettmuskelzellen unter Co-Kultur Bedingungen nicht mit einer Sensitivierung der Insulinsignalweiterleitung im Skelettmuskel begründet werden, da Adiponectin alleine keinen signifikanten Einfluss auf die Akt Phosphorylierung nach Insulinstimulation besitzt (Abb. 29).

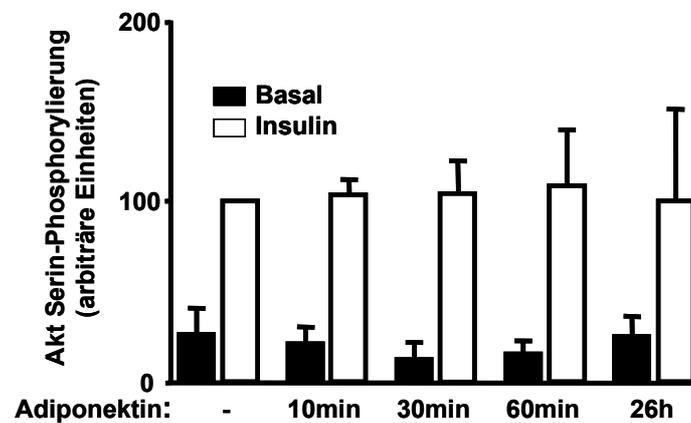


Abbildung 29: Die Akt Phosphorylierung nach Behandlung mit Adiponectin

Skelettmuskelzellen wurden für die angegebenen Zeiten mit 10 nM Adiponectin behandelt. Anschließend wurde die Insulinsignalweiterleitung, wie oben beschrieben, untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 4 unabhängigen Versuchen mit 4 verschiedenen Skelettmuskelzell-Spendern.

Da es fraglich war, ob die *in vitro* differenzierten Skelettmuskelzellen überhaupt Rezeptoren für Adiponectin exprimieren, wurde das Vorhandensein mittels PCR und Western Blot Analysen überprüft. So konnte das Vorhandensein der Adiponectin Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 in den verwendeten Skelettmuskelzellen von Henrike Sell bestätigt werden. Daher galt es nun zu prüfen, ob Adiponectin die Störung der Insulinsignalweiterleitung im Skelettmuskel durch einen direkten Effekt auf die Muskelzellen verhindern kann oder indirekt über eine Beeinflussung der Fettzellen wirkt.

Aus diesem Grund wurden humane Skelettmuskelzellen über Nacht mit Fettzellüberständen in Anwesenheit bzw. in Abwesenheit von 10 nM Adiponectin inkubiert. Die Überstände haben, wie schon zuvor beobachtet, eine Reduktion der Akt Phosphorylierung nach Insulinstimulus in den Skelettmuskelzellen für CM1 auf $45,1 \pm 4,7$ % und für CM2 auf $42,9 \pm 11,6$ % zur Folge (Abb. 30). Eine zeitgleiche Inkubation der Skelettmuskelzellen mit Fettzellüberstand und Adiponectin kann die Skelettmuskelzellen jedoch nicht davor schützen, eine gestörte Insulinsignalweiterleitung zu generieren. Auch hier bleibt die Ansprechbarkeit der Akt Kinase im gleichen Maße reduziert wie ohne eine zeitgleiche Inkubation mit

Adiponectin (Hemmung der Phosphorylierung auf CM1: $64,4 \pm 12,9$ % und CM2: $33,1 \pm 8,1$ %) (Abb. 30). Diese Beobachtungen führen zu der Vermutung, dass die durch Adiponectin ausgelöste Besserung der Insulin-Resistenz im Co-Kulturmodell indirekt durch eine Wirkung von Adiponectin auf die Fettzelle zurückzuführen ist.

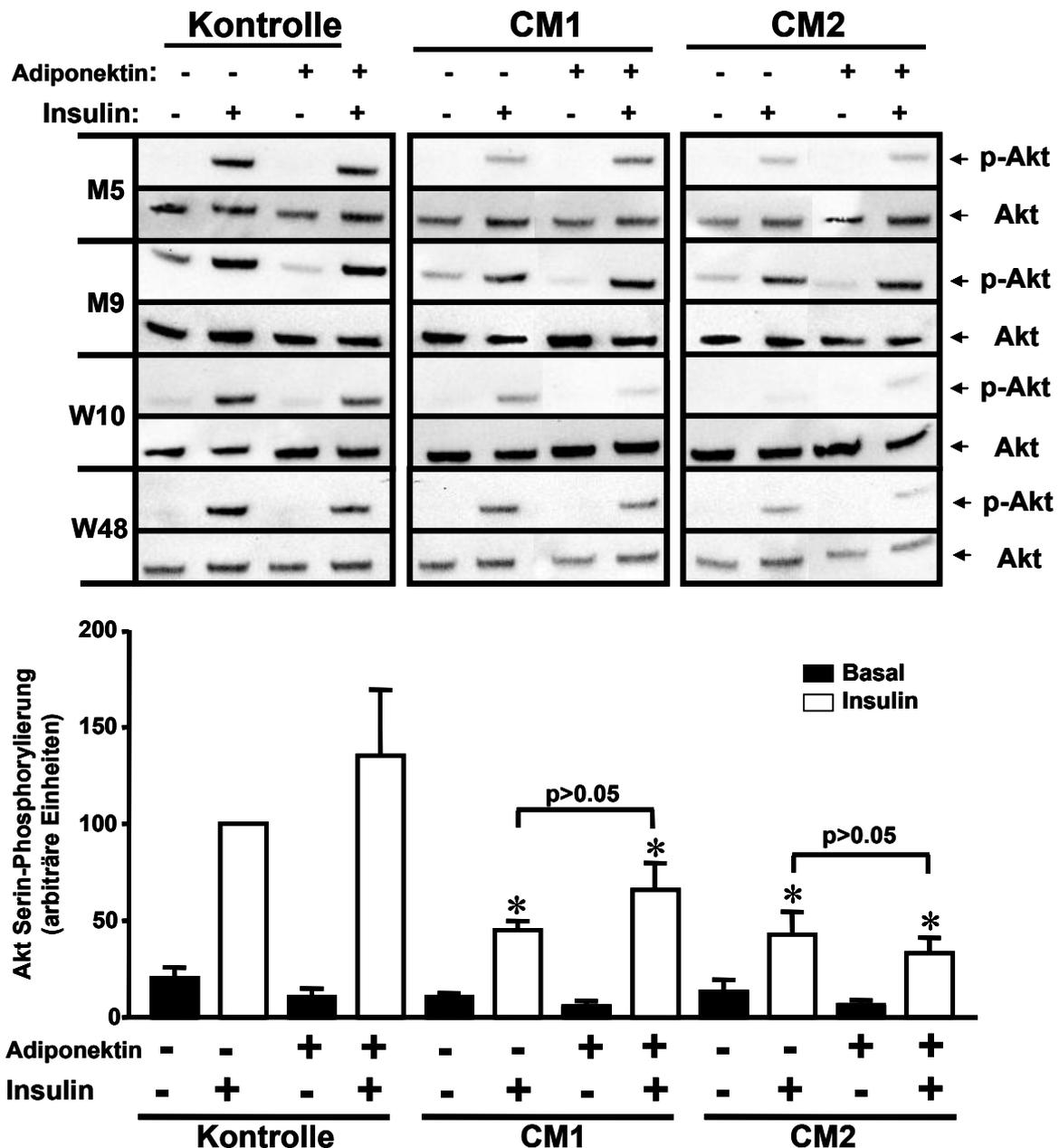


Abbildung 30: Die Akt Phosphorylierung nach Behandlung mit Fettzellüberständen und Adiponectin

Vier verschiedene Muskelzellspender wurden für 18 h mit konditionierten Medien von zwei verschiedenen Fettzellspendern (CM1 und CM2) in Gegenwart bzw. Abwesenheit von 10 nM Adiponectin inkubiert. Nach akuter Insulinstimulation wurde die Insulinsignalweiterleitung auf der Ebene der Akt untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 6 unabhängigen Versuchen. Alle Daten wurden auf die Akt Expression normiert und werden bezogen auf den Insulin-stimulierten Kontrollwert dargestellt.

*signifikant unterschiedlich von der Insulin-stimulierten Kontrolle ($p < 0.01$)

Um die mögliche autokrine Wirkung von Adiponectin auf die Fettzelle zu untersuchen, wurden Fettzellüberstände von ein und demselben Spender in An- bzw. Abwesenheit von Adiponectin generiert. Die so konditionierten Medien wurden über Nacht auf die Skelettmuskelzellen übertragen und die Insulinsignalweiterleitung auf der Ebene der Akt Phosphorylierung untersucht. Wie aus der Abbildung 31 ersichtlich, wurde die Fähigkeit der Fettzellüberstände eine Insulin-Resistenz auf der Ebene der Akt im Skelettmuskel auszulösen ($49,2 \pm 8,6$ % Hemmung der Insulin-stimulierten Phosphorylierung), durch die Konditionierung der Überstände in Gegenwart von Adiponectin unterdrückt (nach Insulinstimulation: 100 % für die Kontrolle vs. $78,3 \pm 11,2$ % für Überstände mit Adiponectin generiert). Die so generierten Überstände führen zu keiner signifikanten Veränderung der Ansprechbarkeit der Akt gegenüber Insulin. Ebenso bleiben die basalen Akt Werte unbeeinflusst. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass Adiponectin durch eine Beeinflussung der Fettzelle die Entstehung einer Insulin-Resistenz im Skelettmuskel verhindert.

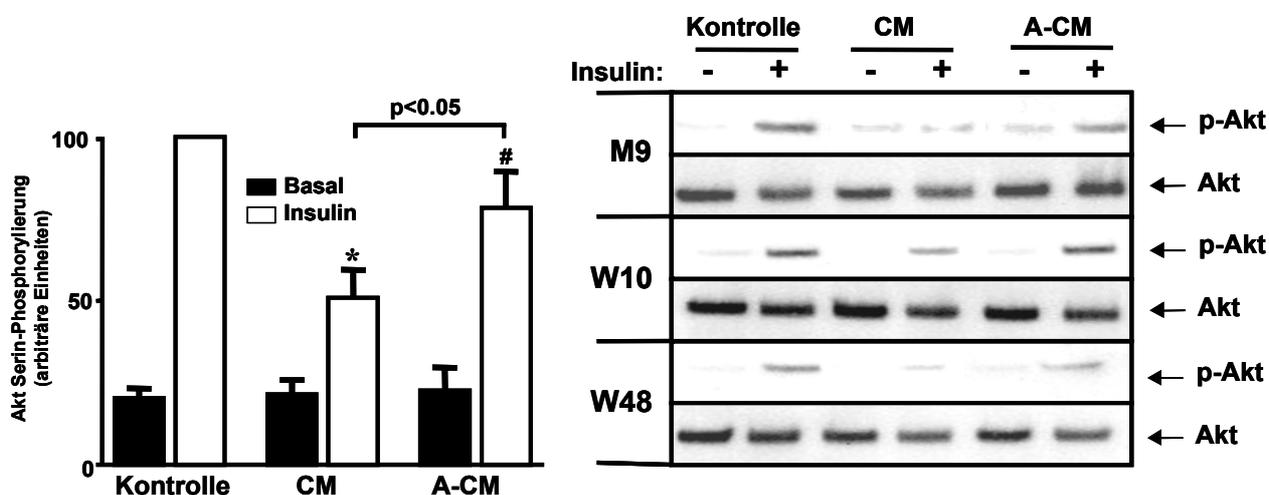


Abbildung 31: Die Akt Phosphorylierung nach Behandlung mit in Gegenwart von Adiponectin konditionierten Fettzellüberständen

A-CM: In Gegenwart von Adiponectin generierter Überstand. Skelettmuskelzellen von drei verschiedenen Spendern wurden entweder unter Kontrollbedingungen gehalten oder mit Fettzellüberständen inkubiert, die in An- bzw. Abwesenheit von 5 nM Adiponectin generiert wurden. Nach akuter Insulinstimulation wurde die Insulinsignalweiterleitung auf der Ebene der Akt untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 4 unabhängigen Versuchen. Alle Daten wurden auf die Akt Expression normiert und werden bezogen auf den Insulin-stimulierten Kontrollwert dargestellt. *signifikant unterschiedlich von der Insulin-stimulierten Kontrolle ($p < 0.001$), # nicht signifikant unterschiedlich von der Insulin-stimulierten Kontrolle ($p > 0.05$)

Um diese Vermutung zu untermauern, wurden die endogen sekretierten Adiponectin Konzentrationen in den Fettzellüberständen gemessen. Hier zeigt sich eine enge Korrelation von Adiponectin Konzentration im Überstand und der inhibitorischen Aktivität bezogen auf die Phosphorylierung der Akt im Skelettmuskel. So zeigen Fettzellüberstände mit einer geringen Adiponectin Konzentration im Medium eine hohe Effektivität in der Störung der Insulinsignalweiterleitung, wohingegen die Überstände mit 10-20fach höheren endogenen Adiponectin Konzentrationen das Insulinsignal im Skelettmuskel nicht beeinflussen (Tabelle 1). Die Zugabe von globulärem Adiponectin während der Mediumkonditionierung beeinflusst die Sekretion von endogenem Adiponectin nicht.

Konditioniertes Medium (CM)	Adiponectin Konzentration (ng/ml)	Inhibition der Akt Phosphorylierung	Anzahl der Experimente
CM 1	1.13	55 ± 4.7 %	n=6
CM 2	0.43	57 ± 11.6 %	n=6
CM 3	0.83	29 ± 5.6 %	n=3
CM 4	0.74	43 ± 7.3 %	n=5
CM 5	0.74	30 ± 10.4 %	n=5
CM 6	0.80	38 ± 4.2 %	n=2
CM 7	9.06	0	n=3
CM 8	17.40	0	n=3

Tabelle 1: Adiponectin Konzentrationen in konditioniertem Medium

Konditioniertes Medium von 8 verschiedenen Fettzellspendern wurde, wie in den Methoden beschrieben, gewonnen.

Eine Analyse der Fettzellüberstände im Silbergel zeigt deutlich, dass einige Banden in den Größen von 10-50 kDa in den Überständen, die in Gegenwart von Adiponectin generiert wurden, verschwinden oder deutlich schwächer ausgeprägt sind (Abb. 32). Diese Beobachtung unterstützt zum einen die Vermutung, dass mehrere Faktoren an der Auslösung der Insulin-Resistenz beteiligt sein können und zum anderen, dass Adiponectin das Sekretionsprofil der Fettzelle verändert und so indirekt der gestörten Insulinsignalweiterleitung im Skelettmuskel entgegenwirkt.

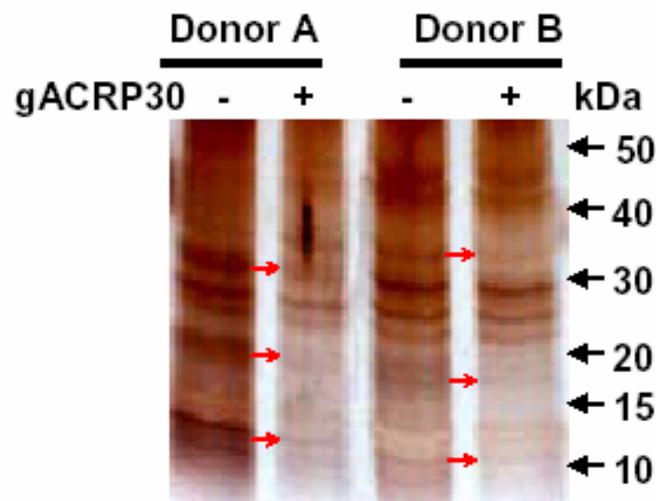


Abbildung 32: Silbergelauf trennung von in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Adiponectin konditionierten Fettzellüberständen

Konditioniertes Medium wurde in An- bzw. Abwesenheit von 5 nM Adiponectin gewonnen. Der Überstand von $7,5 \times 10^5$ Fettzellen wurde im SDS Gel aufgetrennt und mit dem SilverQuest™ Kit eingefärbt. Zwei repräsentative Profile sind dargestellt. Die Pfeile markieren Banden, die in den mit Adiponectin konditionierten Medien reduziert erscheinen.

3.6 Schematische Übersicht der Ergebnisse



Abbildung 33: Schematische Übersicht der Ergebnisse bezogen auf die Insulinsignalweiterleitung im humanen Skelettmuskel.

4. Diskussion

In der Skelettmuskulatur werden rund 80 % der Blutglucose nach Insulinstimulus metabolisiert (DeFronzo et al., 1981). Defekte in der Insulinsignalweiterleitung in diesem Gewebe stellen daher einen zentralen Ausgangspunkt für die Pathogenese eines Typ 2 Diabetes dar. Basierend auf Studien mit Labortieren wird postuliert, dass eine Überproduktion einiger Adipokine, wie z.B. TNF α und Resistin zu einem Typ 2 Diabetes führen können (Hotamisligil, 2000; Stepan, et al., 2001). Somit könnte eine Verbindung zwischen Fettgewebefaktoren und gestörter Insulinwirkung hergestellt werden. Ob dieses Modell jedoch auch auf den menschlichen Metabolismus übertragen werden kann ist nach wie vor fraglich (Ofei, et al., 1996; Savage, et al., 2001). Fest steht allerdings, dass die Fettleibigkeit eine der Hauptrisikofaktoren für die Entstehung eines Typ 2 Diabetes und damit verbunden einer reduzierten Insulinsensitivität ist (Scheen, 2000).

Beim Menschen findet sich Fettgewebe allerdings auch innerhalb der Muskulatur (Goodpaster et al., 2000) und die Masse dieses Fettgewebes nimmt mit fortschreitender Fettleibigkeit ebenfalls zu (Malenfant et al., 2001). Dies kann zu einer parakrinen Interaktion zwischen Fett- und Muskelgewebe führen, bei denen schon geringe Adipokinkonzentrationen die Insulinsignalweiterleitung im Skelettmuskel beeinflussen können. Einige Studien konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass Veränderungen in der Physiologie und Biochemie des Skelettmuskel zu beobachten waren, wenn sich vermehrt Lipide im Muskel befanden. Dies führte zu einer gestörten Insulinwirkung und somit zu einer Insulin-Resistenz (Kelley, 2002; Hegarty et al., 2003). Aus diesem Grund war es ein Ziel dieser Arbeit, die parakrine Interaktion von Fett- und Muskelzelle in einem Co-Kultur System zu untersuchen. Dieses System ist allgemein für die Untersuchung von Interaktionen zwischen zwei Zelltypen akzeptiert (Shillabeer et al., 1996; Honda et al., 1994).

Diese Arbeit zeigt einen direkten Zusammenhang zwischen einer gestörten Insulinsignalweiterleitung im humanen Skelettmuskel und der Anwesenheit von Adipokinen. Dies zeigt sich durch eine starke Störung der Phosphorylierung einiger Proteine der Insulinsignalkette. Darüber hinaus kann beobachtet werden, dass Kandidaten wie TNF α , IL-6, Angiotensin II und Resistin nicht alleine für die Störung der Signalkette verantwortlich gemacht werden können. Des Weiteren wird eine

Involvierung des JNK Signalweges im Skelettmuskel in der Pathogenese der Insulinresistenz im Co-Kultur Modell ausgeschlossen, der inflammatorische Signalweg über NF- κ B spielt jedoch eine große Rolle.

Im Laufe der Untersuchungen zeigten sich bei einigen Experimenten in den Muskelzellen starke Schwankungen. Diese Schwankungen lassen sich jedoch eher auf eine individuell unterschiedliche Ansprechbarkeit der Muskelzellen gegenüber den Adipokinen als auf einen Einfluss des Spender Alters zurückführen. So zeigen sich teilweise mechanistische Unterschiede, die im Endeffekt aber doch zum selben Ergebnis führen. Außerdem wurde das Expressionsmuster von IRS-1, IRS-2, Akt und GSK3 aller Spender untersucht und es konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Im Gegensatz zu der Situation in Nagetieren, haben humane Muskelzellen von 9 bis 60jährigen Spendern eine vergleichbare Teilungskapazität, ebenso wie eine identische Differenzierungsrate der Satellitenzellen. Stammen die Zellen jedoch von Spendern, die über 60 Jahre alt sind, so bilden die Satellitenzellen nach Differenzierung dünnere, zerbrechliche Myotuben (Renault et al., 2000). Aufgrund dieser Fakten kann angenommen werden, dass individuelle Schwankungen während der Versuche nicht auf altersbedingte Unterschiede der Muskelzellspender zurückgeführt werden können, da das Alter der verwendeten Muskelzellspender im Fenster zwischen 9 und 60 Jahren lag.

4.1 Co-Kultur von humanen Myozyten und humanen Adipozyten

In dem System der Co-Kultur humaner Fett- und Muskelzellen kann nach einer gemeinsamen Inkubation über 48 h eine Störung der Insulinsignalweiterleitung im humanen Skelettmuskel nachgewiesen werden. Dies zeigt sich dadurch, dass nach akuter Stimulation mit Insulin in den Muskelzellen keine signifikante Steigerung der Tyrosin-Phosphorylierung des IRS-1 nachgewiesen werden kann. In Folge dessen reagieren weiterleitende Proteine der Insulinsignalkette nur vermindert auf den Insulinstimulus. Die Expression von IRS-1, Akt, und GSK3 α bleiben unverändert, jedoch wird die Expression von GSK3 β leicht vermindert.

Einige Studien beschäftigten sich mit der Insulinsignalweiterleitung im Muskel von Patienten mit Typ 2 Diabetes. Hier konnte gezeigt werden, dass Insulin nicht in

der Lage war, in Muskel Biopsien der Patienten den PI3-Kinase Weg anzusteuern. Begründet wurde dies durch eine fehlende Phosphorylierung des IRS-1 und einer fehlenden Aktivierung der PI3-Kinase nach Insulinstimulus (Bjornholm et al., 1997; Kim et al., 1999; Cusi et al., 2000)

Diese Ergebnisse stimmen mit den gezeigten Daten der Co-Kultur überein. Wenn die Fettzellen und Muskelzellen co-kultiviert werden, wird die Insulinantwort in den Muskelzellen auf der Ebene des IRS-1 vollständig verhindert. Somit wird dem IRS-1 eine besondere Stellung in der Entwicklung der Insulin-Resistenz zugewiesen.

Darüber hinaus induziert die Co-Kultur dieser beiden Zelltypen auch eine weiter stromabwärts gelegene Störung der Insulinsignalweiterleitung. So wird die Phosphorylierung der Akt, einer zentralen Kinase des Insulin-abhängigen Signalweges (Hajdich et al., 2001), stark vermindert. Die Hemmung der Insulin-abhängigen Akt Phosphorylierung unter Co-Kultur Bedingungen kann nicht auf eine verminderte Expression der Kinase zurück geführt werden.

Die Bedeutung einer verminderten Akt Aktivierung für eine gestörte GLUT4 Translokation von den intrazellulären Pools zur Plasmamembran und der daraus resultierenden verminderten Glucose Aufnahme in die Muskelzelle, wie bei Typ 2 Diabetes Patienten beobachtet, wird jedoch noch kontrovers diskutiert. So konnte die Arbeitsgruppe um Krook zeigen, dass Muskelfasern von Typ 2 Diabetes Patienten *in vitro* eine stark verminderte Akt Aktivierung nach Insulinstimulation besitzen (Krook et al., 1998). Eine andere Arbeitsgruppe um Kim (1999) zeigte in einer *in vivo* Studie eine normale Ansprechbarkeit aller drei Akt Isoformen gegenüber Insulin im Skelettmuskel von Typ 2 Diabetikern. In Übereinstimmung mit Krook zeigt diese Arbeit eine stark gestörte Ansprechbarkeit der Akt Kinase nach Insulin Stimulus im Dialog zwischen Fett- und Muskelzelle. Einige Eigenarten des *in vitro* Co-Kultur Systems können herangezogen werden, um diese Unterschiede zu erklären. So kann die Desensibilisierung der Akt Kinase *in vivo* als vorübergehend und reversibel betrachtet werden. Ferner wurden Muskelfaser-spezifische Unterschiede in der Insulinsignalweiterleitung beschrieben, die auch hier in dem *in vitro* System eine Rolle spielen können (Song et al., 1999). Des weiteren ist die Muskelmasse, die *in vivo* in einem vergleichbar engen, parakrinen Interaktionsverhältnis wie in der Co-Kultur steht, verhältnismäßig klein, so dass die *in vitro* beobachteten Effekte durch größere Muskelproben nicht mehr auffindbar sind. Jedoch gibt es auch neuere

Hinweise, dass die Aktivierung der Akt in der Entstehung des Typ 2 Diabetes eine Rolle spielt. So konnte gezeigt werden, dass erstgradig Verwandte von Typ 2 Diabetes Patienten nach einer *in vivo* Stimulation mit Insulin eine Tendenz zu einer verminderten Aktivierung der Akt aufweisen (Storgaard et al., 2001). Es werden jedoch noch weitere Untersuchungen erforderlich sein, um die Rolle der Akt endgültig zu klären.

Unter Co-Kultur Bedingungen wurde eine erhöhte basale Phosphorylierung der GSK3 α/β beobachtet, durch die sich der Insulineffekt deutlich verminderte. Diese Beobachtung der erhöhten basalen Phosphorylierung wurde auch von Nikoulina et al. (2002) unter chronischer Insulin Behandlung bestätigt. Dort wurde gezeigt, dass trotz phosphorylierter, inaktiver GSK3 keine Glucose in die Zelle aufgenommen wurde. Auch blieben erneute Insulingaben ohne Effekt auf die Glucoseaufnahme in der Skelettmuskelzelle. Die chronische Exposition der Zellen gegenüber Insulin bewirkte darüber hinaus eine Abnahme der Proteinmengen von GSK3 α/β , wie sie auch unter Co-Kultur Bedingungen beobachtet werden konnte.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten berichten, dass die Proteinexpression der Glycogen Synthase (GS) im Skelettmuskel von Typ 2 Diabetes Patienten normal ist (Thorburn et al., 1990; Vestergaard et al., 1993). Zusammen mit der Tatsache, dass die GSK3 Expression im Skelettmuskel von Typ 2 Diabetikern erhöht ist (Henry et al., 1996), kann man vermuten, dass ein anomales GS/GSK3 Verhältnis eine Grundlage für die muskuläre Insulin-Resistenz darstellt. So kann die zelluläre Balance zu Gunsten der Inaktivierung der GS verschoben werden. Aus diesem Grund kann die verminderte GSK3 Expression in der Co-Kultur ein Versuch sein, aufgrund der erhöhten Inaktivierung der GSK3 und damit verbundenen Desensibilisierung der GS, durch Verminderung der Expression der Kinase ein normal aktivierbares GS/GSK3 Verhältnis wieder herzustellen

Die Thiazolidindione stellen eine neue Klasse von Insulinsensitivierern dar, die auch schon in der klinischen Behandlung von Typ 2 Diabetes und Insulin-Resistenz eingesetzt werden. Das Thiazolidindion Troglitazon verhindert die Entstehung einer Insulin-Resistenz im Skelettmuskel, wenn es während der Co-Kultur mit Fettzellen anwesend ist. Diese Beobachtung schließt unspezifische Veränderungen und irreparable Schäden der Muskelzelle unter Co-Kultur Bedingungen aus.

Es wird im Allgemeinen angenommen, dass diese Stoffklasse der Thiazolidindione primär über die Fettzelle wirkt, indem sie dort an den „peroxisome proliferator-activated receptor- γ “ (PPAR- γ) bindet und dass die Insulin-sensitivierende Wirkung in den Muskelzellen der Insulin resistenten Patienten indirekt ist (Stummvoll und Häring; 2001). Der PPAR- γ ist jedoch auch in primären humanen Skelettmuskelzellen nachweisbar und seine Expression nimmt nach Stimulation der Zellen mit Troglitazon zu (Park et al., 1998). Dies konnte von Miriam Klähn aus unserer Arbeitsgruppe auch für die in dieser Arbeit eingesetzten Skelettmuskelzellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Mit den verwendeten Skelettmuskelzellen wurde eine starke Sensitivierung der Zellen gegenüber Insulin auf der Ebene von IRS-1 und Akt in der Anwesenheit von Troglitazon nachgewiesen. Da Troglitazon auch auf die Muskelzelle alleine sensitivierend wirkt, ist es nicht möglich, eine genaue Aussage über den Hauptwirkort des Troglitazons zu machen. Zum einen zeigen die Daten aus der Co-Kultur deutlich eine Sensitivierung der Skelettmuskelzellen gegenüber Insulin in der Anwesenheit von Troglitazon, zum anderen sind auch indirekte Effekte über ein verändertes Sekretionsverhalten der Fettzellen denkbar. Dies wird durch Studien bestätigt, die berichten, dass Troglitazon über eine Veränderung des Sekretionsprofils der Fettzelle oder über eine veränderte Körperfettverteilung im Patienten einer Insulin-Resistenz entgegenwirkt (Lebovitz et al., 2001; Park et al., 1998). Jedoch gibt es auch Berichte über Studien an Mäusen, in denen der PPAR γ Muskel-spezifisch ausgeschaltet wurde. Hier wird erörtert, dass die Insulinsensitivität im ganzen Organismus zumindest teilweise von einem funktionierenden PPAR γ System im Skelettmuskel abhängt (Reviewed von Kintscher und Law, 2005).

In der vorliegenden Studie zeigte Troglitazon einen starken sensitivierenden Effekt der Akt Kinase gegenüber Insulin verbunden mit einer vermehrten Expression der Kinase. Besonders hervorzuheben ist jedoch die Tatsache, dass Troglitazon der Entstehung einer Insulin-Resistenz auf der Ebene der Insulinsignalweiterleitung im Skelettmuskel unter Co-Kultur Bedingungen entgegenwirkt. Dies zeigt, dass das Co-Kultur System von großer Bedeutung für die Entwicklung von pharmakologisch wirksamen Bestandteilen sein kann, die den Dialog von Fett und Muskelzelle positiv beeinflussen.

4.2 Kandidatenfaktoren

Verschiedene Übersichtsartikel haben die Funktion des Fettgewebes als endokrines Organ, das in die Entstehung des Typ 2 Diabetes involviert ist, herausgestellt. Diese Einflussnahme kann möglicherweise auf eine Sekretion verschiedener Faktoren zurückgeführt werden, denen eine Rolle in der Entwicklung der Insulin-Resistenz nachgesagt wird (Prins, 2002; Greenberg and McDaniel, 2002).

Ebenso wie Zytokine können jedoch auch freie Fettsäuren in den negativen Dialog zwischen Fett- und Muskelzelle einbezogen sein (Dresner et al;1999). Studien von Kausch (Kausch et al., 2001) konnten allerdings zeigen, dass Palmitat, 2-Bromo-Palmitat und Linoleat die Insulinsignalweiterleitung in primären humanen Skelettmuskelzellen nicht beeinflussen. Erste Untersuchungen von Marlis Koenen aus unserer Arbeitsgruppe konnten diese Ergebnisse bestätigen (Daten nicht gezeigt) und lassen eine Beteiligung freier Fettsäuren an den Ergebnissen der Co-Kultur Experimente unwahrscheinlich werden.

4.2.1 TNF α

Da das Fettgewebe einen Hauptsekretionsort von TNF α darstellt und die Expression dieses Zytokins in Tiermodellen fettleibiger Nager stark erhöht ist, stellt es einen möglichen Auslöser der durch eine erhöhte Körperfettmasse induzierten Insulin-Resistenz dar (Moller, 2000).

In der vorliegenden Arbeit waren hohe TNF α Konzentrationen (2,5 nM) in der Lage, die Insulinsignalweiterleitung auf der Ebene der IRS-1-, und AKT Phosphorylierung, vergleichbar mit der unter Co-Kultur beobachteten Intensität, zu stören. Konzentrationen von 1000 pM zeigten nur marginale Effekte auf die IRS-1 Phosphorylierung. Auf der Ebene der Akt Phosphorylierung wurden noch 30 % Hemmung erzielt. Damit konform geht eine Studie, die besagt, dass 300 pM TNF α nicht in der Lage sind, eine Insulin-induzierte Aktivierung der Akt in humanen Skelettmuskelzellen zu verhindern (Halse et al., 2001). Im Gegensatz dazu existiert eine neuere Untersuchung, die darstellt, dass TNF α in der Lage ist, die IRS-1 und Akt Phosphorylierung in Muskelzellen zu stören und so zu einer Insulin-Resistenz führt (DeAlvaro et al., 2004). Damit übereinstimmend ist die etablierte Sichtweise von

TNF α als Mediator der Insulin-Resistenz im Fettgewebe (Qi et al., 2000; Greenberg and McDaniel, 2002). Diese Ergebnisse konnten in unserem Labor in früheren Studien ebenfalls belegt werden. Es wurde gezeigt, dass TNF α schon bei geringen Konzentrationen von 10 pM die Insulinsignalweiterleitung in humanen Fettzellen inhibiert (Hube und Hauner, 1999; Liu et al., 1998). So können die auto- bzw. parakrinen Wirkungen des TNF α auf die Fettzelle selbst von größerer Bedeutung in der Entstehung der Insulin-Resistenz im Fettgewebe sein als die Effekte des Zytokins auf den Skelettmuskel.

Interessanterweise konnte kein TNF α im Medium der Fettzellen, Muskelzellen und der Co-Kultur nachgewiesen werden. Obwohl ein hochsensitiver ELISA mit einer Detektionsgrenze von 0,2 pM benutzt, und das Medium 10fach aufkonzentriert in den Versuch eingesetzt wurde, lag die TNF α Konzentration unter diesem Schwellenwert. Daher kann eine TNF α Konzentration von unter 0,02 pM im Medium angenommen werden. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass TNF α nicht bzw. nicht allein für die gestörte Insulinsignalweiterleitung im Skelettmuskel nach der Co-Kultur verantwortlich sein kann.

Übereinstimmend mit dieser Hypothese konnte keine Verbindung zwischen Insulinsensitivität und der TNF α Expression des Unterhautfettgewebes in fettleibigen Typ 2 Diabetikern festgestellt werden (Koistinen et al., 2000). Weiterhin wird das TNF α im menschlichen Fettgewebe in weit geringeren Konzentrationen exprimiert als im Nager (Montague et al., 1998), so dass direkte Vergleiche der beiden Systeme schwierig sind.

Wurde Infliximab, ein chimärer, hoch affiner monoklonaler Antikörper gegen lösliches und transmembranes TNF α , in die Co-Kultur gegeben, so zeigt sich keine Verbesserung der Insulin-Resistenz im diesem Modell. Die fehlende Wirkung von Infliximab spricht demnach gegen eine alleinige Verantwortung von TNF α für die Induktion der Insulin-Resistenz im Co-Kultur Modell. Allerdings ist die Literaturlage bezüglich der Effektivität von Infliximab *in vivo* sehr unterschiedlich. So besagen zwei Studien, dass Infliximab eine verbesserte Insulinsensitivität zur Folge hat (Kiortsis et al., 2004; Yazdani-Biuki et al., 2004) und zwei andere Studien bestreiten diesen Effekt (DiRocco et al., 2004; Gentile et al., 2002).

Daher kann es nicht ausgeschlossen werden, dass TNF α intra-individuell in einer synergistischen Weise gemeinsam mit anderen bisher unbekanntem Fettzellfaktoren an der Entstehung einer muskulären Insulin-Resistenz beteiligt ist.

4.2.2 Resistin

Resistin ist ein Peptidhormon, das während der Adipozytendifferenzierung ausschließlich vom Fettgewebe exprimiert wird. In verschiedenen Mausmodellen wurden stark erhöhte Konzentrationen von Resistin im Serum beobachtet. Darüber hinaus ist es gelungen, durch eine Verabreichung dieses Hormons in gesunden Mäusen eine Insulin-Resistenz zu induzieren (Steppan et al., 2001). Weitere Studien über den Effekt von Resistin auf die Induktion der Insulin-Resistenz berichten von einer Resistin-vermittelten, stark reduzierten Glucoseaufnahme in den Skelettmuskel von Ratten (Pravenec et al., 2003) und in der Muskelzelllinie L6 (Moon et al., 2003). Die Insulinsignalweiterleitung und GLUT4 Translokation in der L6 Zelllinie konnte durch Resistin jedoch nicht beeinflusst werden. Im Gegensatz dazu fand eine Studie keinen Zusammenhang zwischen der Resistin Genexpression in Fettzellen des Unterhautfettgewebes und dem Körpergewicht oder der Insulinsensitivität der Patienten (Janke et al., 2002). Desweiteren konnte keine Resistin mRNA in Fettzellen eines schwer Insulin-resistenten Patienten (Savage et al., 2001), kein Zusammenhang zwischen Insulinresistenz, Typ 2 Diabetes und Resistin Expression im Fettgewebe (Nagaev und Smith, 2001) und keine Korrelation von Resistinkonzentration im Blut und Insulin-Resistenz (Kielstein et al., 2003) entdeckt werden. Vor dem Hintergrund der uneinheitlichen Literaturlage waren die Auswirkungen einer Exposition des Skelettmuskels gegenüber Resistin von großem Interesse.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass eine Exposition von primären, humanen Skelettmuskelzellen gegenüber Resistin zu keiner gestörten Insulinsignalweiterleitung auf der Ebene der Akt Kinase führt. Dies stimmt mit den fehlenden Effekten von Resistin auf die Komponenten der Insulinsignalweiterleitung überein, wie sie von Moon (2003) gefunden wurden. Im Gegensatz dazu stehen die Beobachtungen der erhöhten basalen Phosphorylierung von GSK3, die bei Inkubationen mit 100 ng und 1000 ng Resistin keinen zusätzlichen Insulineffekt mehr zulassen. In der Literatur existieren keine Berichte über Studien, die diesen Effekt von Resistin auf die Muskelzellen untermauern können. Zwar gibt es Berichte über eine gestörte Phosphorylierung der Komponenten der Insulinsignalweiterleitung in Resistin-behandelten Mäusen (Kitagawa et al., 2004), doch wird hier als auslösender

Mechanismus der Störung im Skelettmuskel eine erhöhte TNF α Expression des visceralen Fettgewebes nach Resistinbehandlung angesehen. Weitere Berichte über Resistin als Promotor der Präadipozytendifferenzierung (Gong et al., 2004) und als autokriner Regulator der Freisetzung prodiabetischer Faktoren aus dem Fettgewebe (Pravenec et al., 2003) lassen im Kontext der kontroversen Literaturlage direkte Effekte auf die Skelettmuskulatur unwahrscheinlich erscheinen. So kann die beobachtete basal erhöhte Phosphorylierung der GSK3 auch indirekt durch Ausschüttung autoregulatorischer Faktoren zustande gekommen sein. Dies würde auch die Abwesenheit des Effektes bei fehlender Überschreitung eines Schwellenwertes erklären. Daher scheint dieses Hormon in der Entwicklung der Insulin-Resistenz im Menschen als direkter Mediator nur eine untergeordnete oder indirekte Rolle zu spielen. Auch konnte diese Arbeit kein Resistin in den Überständen von ausdifferenzierten Adipozyten nachweisen. Ein Einfluss von Alter und Gewicht der Spenderinnen auf das Sekretionsniveau von Resistin kann neueren Studien zufolge ausgeschlossen werden (Schaffler et al., 2004). Interessanterweise scheinen die unbehandelten Skelettmuskelzellen Resistin auszuschütten. Diese Beobachtung wird auch von Lappas (2004) geteilt. Die ausgeschüttete Resistinmenge wird unter Co-Kultur Bedingungen jedoch stark vermindert. Dies lässt den Schluss einer weitgehenden Beeinflussung des Skelettmuskels durch Fettzelle im Co-Kultursystem zu.

Insgesamt ergibt sich, dass Resistin in unserem Co-Kultursystem nicht direkt für die Auslösung der Insulin-Resistenz im Skelettmuskel verantwortlich ist.

4.2.3 Angiotensin II

Der Adipozytenfaktor Angiotensin II (Ang II) ist nachweislich in die Entstehung der Insulin-Resistenz involviert und eine Blockade seines Signalweges führt zu einer verbesserten Insulinsensitivität und reduziert das Risiko, an Typ 2 Diabetes zu erkranken (Yusuf et al., 2001; Dahlof et al., 2002). Ein negativer Dialog zwischen dem Ang II und dem Insulin Signalweg auf der Ebene der PI-3K Tyrosin Phosphorylierung und Aktivierung wurde dabei als Mechanismus für die Ang II-induzierte muskuläre Insulin-Resistenz vorgeschlagen (Folli et al., 1997). Tatsächlich führt eine Hemmung des Renin-Angiotensin-Systems in Nagetieren zu einer Verstärkung des Glucosetransportes im Skelettmuskel. Dies korreliert mit einer

verstärkten Insulinsignalweiterleitung auf der Ebene der IRS-1 Tyrosin Phosphorylierung und der PI-3K Aktivität und einer erhöhten GLUT4 Expression (Henriksen und Jacob, 2003). Im Gegensatz dazu zeigte eine Studie an Ratten, dass eine Ang II-induzierte Insulin-Resistenz nicht auf eine Störung des initialen Insulinsignalweges zurück zu führen ist, da die Aktivierung von IRS-1, PI-3K und Akt nach Infusion mit Angiotensin II sogar verstärkt ist. (Stouthard et al., 1996). Neueste Studien finden nach Stimulation mit Angiotensin II *in vivo* und *in vitro* im Fettgewebe von Ratten sogar eine stark erhöhte Glucoseaufnahme verbunden mit einer verstärkten GLUT4 Translokation (Juan et al., 2005). Im Gegensatz der durch Ang II hervorgerufenen Sensitivierung des Insulinsignalweges in Ratten steht eine Studie, die besagt, dass Angiotensin-Rezeptor-1 (AT1) Blocker die Insulininduzierte Phosphorylierung von IRS-1, die Assoziation mit der PI-3K, die Aktivität der PI-3K und die GLUT4 Translokation im Skelettmuskel diabetischer Mäuse verstärkt (Shiuchi et al., 2004). Gleichermaßen wird die Insulin-induzierte Akt Phosphorylierung im Gefäßsystem durch Ang II gehemmt (Motley et al., 2003). Weitere *in vitro* Studien belegen, dass Angiotensin II die Insulinsignalweiterleitung in der vasculären Muskulatur durch Serin-Phosphorylierung der initialen Proteine negativ beeinflussen kann (Folli et al., 1999; Folli et al., 1997). So kontrovers wie die Lage in Nagetieren ist, so uneinheitlich findet sie sich auch im Menschen wieder. So führt eine Blockade des Renin-Angiotensin Systems bei Bluthochdruck-Patienten zu einer verbesserten Insulinsensitivität (Furuhashi et al., 2003), ein AT1 Blocker hat jedoch keinen verbessernden Effekt auf die Insulinsensitivität in fettleibigen Patienten mit oder ohne Typ 2 Diabetes (Luzio et al., 2002). Im Gegensatz dazu führte die Infusion von Ang II in gesunden Patienten und nicht Insulin abhängigen Diabetikern sogar zu einer Verbesserung der Insulinsensitivität (Fliser et al., 1993; Morris et al., 1994).

Die in dieser Arbeit gezeigten Daten belegen, dass Ang II Behandlung im humanen Skelettmuskel auf der Ebene der IRS-1 Tyrosin-Phosphorylierung eine leichte Inhibition des Insulineffektes hervorruft, die durch den AT1 Blocker Candesartan aufgehoben werden kann. In Übereinstimmung mit der Arbeit von Stouthard wurde jedoch keine Beeinflussung der Akt und der GSK3 beobachtet. Die Rolle von Angiotensin II in der Entstehung der muskulären Insulin-Resistenz bleibt nach wie vor undurchsichtig. Weitere Studien werden nötig sein, um die Effekte von Ang II auf die einzelnen Gewebe in den unterschiedlichen Organismen zu verstehen.

4.2.4 IL-6

IL-6 wird sowohl von Skelettmuskelzellen als auch von Fettzellen sekretiert (Keller et al., 2003). Auch die im vorliegenden System benutzten *in vitro* differenzierten Fettzellen sekretieren messbare IL-6 Mengen. Literaturhinweise über die Involvierung von IL-6 in der Entstehung der Insulin-Resistenz bleiben jedoch kontrovers (Carey und Febbraio, 2004). So berichtet eine Studie darüber, dass eine Behandlung mit IL-6 in 3T3-L1 Adipozyten zu einer vermehrten basalen und Insulin-stimulierten Glucoseaufnahme in die Zellen führt (Stouthard et al., 1996), eine weitere Studie an 3T3-L1 Adipozyten erklärt, dass IL-6 eine Insulin-Resistenz in den Zellen auslöst (Rotter et al., 2003; Rotter-Sopasakis et al., 2004). Darüber hinaus zeigen IL-6-defiziente Mäuse in einer anderen Studie im Vergleich zu gesunden Kontroll- Mäusen eine gestörte Glucoseverwertung (Wallenius et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von 10 nm IL-6 eine 20 %ige Reduktion der Ansprechbarkeit der Akt Kinase in humanen Muskelzellen *in vitro* erreicht, geringere Konzentrationen zeigen keinen Effekt. Dies steht im Gegensatz zu einigen *in vivo* Berichten an Rattenmodellen und Patientenuntersuchungen. Hier konnte gezeigt werden, dass eine Infusion von IL-6 keinen Effekt auf die Phosphorylierung von IRS-1 und Akt hat. Darüber Hinaus finden die Studien keinen Einfluss von IL-6 auf die Glycogen Synthese und die Adiponectin Expression (Rotter et al., 2004; Weigert et al., 2004). Erhöhte IL-6 Konzentrationen im Blut können jedoch neueren Studien zufolge bei Diabetikern nur mit einer erhöhten Körperfettmasse, nicht aber mit einer gestörten Insulinsensitivität oder verminderten Glucoseaufnahme in Verbindung gebracht werden und stellen somit keinen Indikator für eine Insulin-Resistenz dar (Carey et al., 2004). Andere Studien berichten über einen möglichen Zusammenhang zwischen der Konzentration des Zytokins und der Entstehung einer Insulin-Resistenz im Typ 2 Diabetes und bei Fettleibigkeit (Kern et al., 2001; Bastard et al., 2002).

Nimmt man die kontroversen Berichte zusammen, so wird denkbar, dass IL-6 im Sinne eines synergistischen Faktors zusammen mit anderen noch unbekanntem Faktoren in die Entstehung einer Insulin-Resistenz involviert ist.

4.3 Fettzellüberstand

Obwohl die Co-Kultur für 48 h stattfand, können die Ergebnisse der Versuche mit den Fettzellüberständen schon nach 18 h beobachtet werden. Dies kann damit erklärt werden, dass die Fettzellen zuvor ihre Adipokine über 48 h in das später in die Versuche eingesetzte Medium sekretierten. Diese Zeitspanne stimmt mit der Sekretionszeitspanne unter Co-Kultur Bedingungen überein. Deutlich wird jedoch, dass eine bestimmte Konzentration von Adipokinen im Medium vorliegen muss, um einen Effekt auf die Insulinsignalweiterleitung zu beobachten. Darüber hinaus ist die Verwendung der Fettzellüberstände von besonderem Interesse, da hier ausschließlich die Wirkung der Adipokine auf die Muskelzelle untersucht werden kann. Im Rahmen der Co-Kultur ist es möglich, dass Myokine das Sekretionsverhalten der Fettzelle derart beeinflussen, dass Unterschiede in der Auswirkung auf die Insulinsignalweiterleitung zu beobachten sind.

Das durch Fettzellen konditionierte Medium ist in der Lage, in den Muskelzellen eine Störung der Insulinsignalweiterleitung auf der Ebene der Akt und GSK3 hervor zu rufen, die mit der Störung unter Co-Kultur Bedingungen vergleichbar ist. Hier war jedoch eine hohe individuelle Schwankung in der Stärke der Hemmung der Insulinsignalweiterleitung zu beobachten. So führten drei der untersuchten Überstände zu einer Hemmung der Insulinsignalweiterleitung von ca. 60 % wohingegen 2 Spender im Durchschnitt keine signifikante Hemmung in den Muskelzellen erzielten. Dies kann nicht durch metabolische Unterschiede der Fettzellspender erklärt werden, da sich die Zellen vor der Medium Ernte schon für über 2 Wochen in Kultur befanden. Darüber hinaus waren alle Spender gesund und besaßen einen normalen BMI. Daher kann man vermuten, dass genetische Faktoren den Grundstein für die individuelle Sekretion Resistenz auslösender Faktoren durch die Fettzelle bilden. Die Daten weisen ebenfalls auf eine hohe individuelle Ansprechbarkeit der einzelnen Muskelzellspender gegenüber den ausgeschütteten Fettzellfaktoren hin. Hier zeigen sich im Durchschnitt über die verwendeten Fettzellüberstände 30 bis 65 % Hemmung des Insulinsignals in den Muskelzellen. Dies verdeutlicht die hohe Komplexität der Kommunikation von Fett- und Muskelzelle *in vivo*.

Die Identität der Resistenz-auslösenden Faktoren bleibt jedoch noch weitestgehend ungeklärt. Eine versuchte Eingrenzung der Resistenz-auslösenden

Faktoren führte zu dem Ergebnis, dass der gesuchte Faktor größer als 5 kDa sein muss. Darüber hinaus ist er hitzestabil, aber mit Proteinase K zu verdauen. Eine Auftrennung über verschiedene Molekulargewichtsfiter machte deutlich, dass vermutlich mehrere Faktoren zusammen agieren müssen, um die muskuläre Resistenz auszulösen. Dies lässt sich daraus schließen, dass keine der Fraktionen in der Lage war, in den Muskelzellen eine Insulin-Resistenz auszulösen, die mit dem vollen Überstand erreicht wurde. Diese Ansicht konnte durch eine Silbergelanalyse untermauert werden. Hier waren mehrere Banden aus einem aktiven Überstand in einem inaktiven Überstand nicht vorhanden.

Der Versuch, die Resistenz-auslösenden Faktoren mittels Massenspektrometrie zu untersuchen, schlug fehl. Die Annahme, die verwendete Silberfärbung könnte die massenspektrometrischen Analysen stören, konnte durch die Tatsache widerlegt werden, dass im Gel aufgetrenntes BSA nach einer Silberfärbung problemlos identifiziert werden konnte. Weitere Analysen ließen nur den Schluss zu, dass das Verhältnis von Verdauungsenzym zum Probenmaterial aufgrund ungenügender Proteinkonzentrationen nicht optimiert werden konnte und somit eine Analyse der Überstände mit den gegebenen Möglichkeiten nicht durchführbar war.

4.4 Fettzelle und Adiponectin

Die Konzentrationen verschiedener Fettzellefaktoren wie TNF α und IL-6 sind im Serum fettleibiger Patienten stark erhöht und gelten als gute Anhaltspunkte für die Berechnung der Wahrscheinlichkeit, an Typ 2 Diabetes zu erkranken (Pradhan et al., 2001; Festa et al., 2002). Dabei bedingt die Fettleibigkeit ein pro-inflammatorisches Milieu, das durch die Sekretion verschiedener pro-inflammatorischer Faktoren durch das Fettgewebe aufrecht erhalten wird. Adiponectin ist das einzig bekannte Adipozytokin, dessen Produktion und Sekretion bei Fettleibigkeit herunter reguliert wird. Interessanterweise sind die Plasma Konzentrationen von Adiponectin invers mit denen von IL-6, Insulin-Resistenz und Fettleibigkeit korreliert (Bruun et al., 2003). Die Adiponectin Expression im Fettgewebe wird durch verschiedene Faktoren wie TNF α und Wachstumshormone, die auch die Insulinsensitivität beeinflussen, reguliert (Fassauer et al., 2002, 2004). Die Behandlung mit Adiponectin führt in Fettzellen

selbst zu einer verstärkten Glucoseaufnahme in die Zelle (Wu et al., 2003). Es ist jedoch noch wenig über die Rolle des Adiponectin in der Kommunikation von Fettgewebe und Skelettmuskel bekannt.

Zwar fokussieren einige Studien auf die Wirkung von Adiponectin im Skelettmuskel und im Fettgewebe, doch bleiben Untersuchungen direkter Interaktionen der beiden Zelltypen offen. In Studien an Muskelzellen konnte so zum Beispiel gezeigt werden, dass Adiponectin die AMP-Kinase im Skelettmuskel (Yamauchi et al., 2002), abhängig vom Muskeltyp (Tomas et al., 2002), aktiviert. In Myozyten kann Adiponectin darüber hinaus noch den NF κ B Signalweg ansteuern (Tsao et al., 2002). Des Weiteren führt Adiponectin zu einer vermehrten Fettsäureoxidation und einem erhöhten Glucosetransport im Skelettmuskel.

Alle vorliegenden Versuche wurden mit der globulären Domäne von Adiponectin durchgeführt. Adiponectin liegt im Serum als Trimer, Hexamer oder als „High Molecular Weight“ Form vor, denen unterschiedliche biologische Aktivität nachgesagt wird (Kobayashi et al., 2004). Die globuläre Domäne wird durch die Leukozyten Elastase produziert (Waki et al., 2004) und ist in geringen Konzentrationen im Blut zu finden (Fruebis et al., 2001). Darüber hinaus bindet die globuläre Form an die Adiponectin Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2, und eine transgene Expression der Domäne schützt ob/ob Mäuse vor der Entwicklung eines Diabetes (Yamauchi et al., 2003). Es werden jedoch noch weitere Studien nötig sein, um den funktionalen Zusammenhang zwischen den verschiedenen Adiponectin Isoformen und der globulären Form zu verstehen.

In der vorliegenden Studie wurde auf den Dialog zwischen Fett- und Muskelzelle, die beide in die Pathogenese der Insulin-Resistenz einbezogen sind, fokussiert. Es konnte gezeigt werden, dass Adiponectin alleine keinen Effekt auf die Insulinsignalweiterleitung auf der Ebene der Akt Kinase besitzt. In Kombination mit Fettzell-konditioniertem Medium zeigte sich keine Verbesserung der, durch das konditionierte Medium ausgelösten, muskulären Insulin-Resistenz, obwohl die Skelettmuskelzellen beide Typen der Adiponectin Rezeptoren exprimieren. Daher lässt sich sagen, dass der positive Effekt des Adiponectin in der Co-Kultur auf die Insulinsensitivität des Skelettmuskels von der autokrinen Beeinflussung der Fettzelle abhängt. Diese Vermutung wird durch die Tatsache bestätigt, dass der Fettzellüberstand, welcher in der Gegenwart von Adiponectin konditioniert wurde,

nicht in der Lage ist, eine muskuläre Insulin-Resistenz auszulösen. Darüber hinaus zeigt eine Silbergelanalyse der Fettzellüberstände eine stark verändertes Expressionsmuster, wenn die Überstände in Gegenwart von Adiponectin konditioniert wurden.

Diese Studie kann zum ersten Mal Adiponectin als einen autokrinen Regulator der Adipozytokinsekretion identifizieren. Durch eine Veränderung der Adipozytokinfreisetzung schützt das Adiponectin die Skelettmuskelzellen im dargestellten Co-Kultur Modell davor, resistent gegenüber Insulin zu werden. Dabei ist die Wirkweise von Adiponectin als auto-, parakriner Regulator in der Literatur bekannt. So konnte gezeigt werden, dass Adiponectin die Fettzell-Entwicklung im Knochenmark beeinflusst (Yokota et al., 2002) und die Fettzeldifferenzierung und Insulinsensitivität steigert (Fu et al., 2004). Darüber hinaus wird postuliert, dass Adiponectin den Energiestoffwechsel autokrin reguliert (Jacobi et al., 2004).

Die Entstehung der Insulin-Resistenz im Co-Kultur Modell könnte darin begründet liegen, dass die Adiponectinsekretion aus den *in vitro* differenzierten Adipozyten sehr gering ist. Dies stimmt mit Studien überein, die das Sekretionsverhalten frisch isolierter, reifer Adipozyten untersucht haben (Fain et al., 2004). Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die von den humanen Fettzellen *in vitro* sekretierte Adiponectinkonzentration negativ mit der Ausschüttung von Insulin-Resistenz-auslösender Faktoren korreliert. Daher stellt die Co-Kultur ein ideales Modell eines Adiponectin-Mangel-Systems dar, in dem der Einfluss von Adiponectin auf den Dialog von Fett und Muskelzelle untersucht werden kann.

Aufgrund der Ergebnisse scheint das neue Modell der auto-/parakrinen Wirkung von Adiponectin auf die Adipokinsekretion der Fettzellen den wichtigsten Faktor für die Erhaltung der muskulären Insulinsensitivität darzustellen.

4.5 Fettleibigkeit und Entzündung

Die Hinweise auf einen Zusammenhang von Insulin-Resistenz, Fettleibigkeit und anderen Komponenten des metabolischen Syndroms mit Entzündungsfaktoren verdichten sich zusehends (Das, 2002; Haffner, 2003 Lyon et al., 2003). Dies basiert

auf der Beobachtung, dass Entzündungsmarker wie das C-reaktive Protein (CRP), der Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) und IL-6 in Patienten mit Insulin-Resistenz stark erhöht sind und als Marker für die Entwicklung eines Typ II Diabetes gelten (Festa et al., 2002; Pradhan et al., 2001). Die Fettleibigkeit begünstigt ein pro-inflammatorisches Milieu (Yudkin et al., 1999) und es wurde erkannt, dass das Fettgewebe als endokrin-aktives Organ eine Reihe von Pro-inflammatorischen Faktoren ausschüttet (Coppack et al., 2001). Mit Hilfe des Co-Kultur Systems wurde gezeigt, dass in der parakrinen Interaktion von Fett- und Muskelzelle der IKK/NFκB Signalweg im Muskel angesteuert wird und dass diese Aktivierung zu einer gestörten Insulinsignalweiterleitung im Skelettmuskel führt. Dies stimmt mit der Ansicht überein, dass ein Dialog zwischen inflammatorischem und metabolischem Signalweg in die Entstehung der Insulin-Resistenz involviert ist.

4.5.1 JNK / NFκB

Die JNK Kinase wird im Skelettmuskel hoch expremiert und wird stark durch Muskelkontraktionen aktiviert. Bisher ist nur wenig über die biologische Funktion dieses Proteins im Muskel bekannt, obwohl postuliert wird, dass es die Insulin-stimulierte Glycogensynthese im Skelettmuskel von Mäusen reguliert. Eine Überexpression der Kinase bewirkt jedoch eine gesteigerte basale Phosphorylierung von verschiedenen Proteinen aus der Insulinsignalkaskade wie z.B. Akt und GSK3 (Fujii et al., 2004). Zwar wird unter Co-Kultur Bedingungen eine erhöhte basale Phosphorylierung der GSK3 beobachtet, doch ist es eher unwahrscheinlich, dass diese Erhöhung durch die JNK vermittelt wird. Wird die JNK durch spezifische Antagonisten im durch TNFα Insulin-resistent gemachten Muskel blockiert, so hat dies keine Verbesserung der gestörten Insulinsignalweiterleitung zur Folge (DeAlvaro et al., 2004). Nur eine Blockierung der p38 MAPK führt im selben Fall zu einer Aufhebung der Insulin-Resistenz über eine IκB-Kinase-abhängigen Signalweg (DeAlvaro et al., 2004). Auch im verwendeten System mit humanen Skelettmuskelzellen war ein JNK Inhibitor nicht in der Lage, die durch Fettzellüberstände ausgelöste Insulin-Resistenz auf der Ebene der Akt zu verhindern. Zwar besitzt die JNK die Kapazität das IRS-1 am Serin 307 zu phosphorylieren, was anschließend eine Degradation des Proteins korrespondierend mit einer verminderten Aktivität der Akt zur Folge hat und zu einer gestörten

Insulinsignalweiterleitung führen kann (Hilder et al., 2003), doch spricht der fehlende Effekt des JNK Inhibitors im verwendeten System eher gegen eine essentielle Aufgabe der Kinase in der Induktion der Insulin-Resistenz. Dies lässt auf eine größere Rolle eines anderen Signalweges in der Störung der Insulinsensitivität im humanen Skelettmuskel schließen.

Einige Studien konnten zeigen, dass Faktoren, die in die Entwicklung einer Insulin-Resistenz involviert zu sein scheinen, in der Lage sind, die IKK und den NFκB zu aktivieren (Karin und Ben Neria, 2000; Itani et al., 2002). Zu diesen Faktoren zählen neben TNFα (Hotamisligil, 1999) auch die freien Fettsäuren (Shulman, 2000). Eine neuere Studie bestätigt sogar, dass für die Induktion der Insulin-Resistenz im Skelettmuskel durch TNFα die Aktivierung der IκB-Kinase und des NFκB essentiell ist (de Alvaro et al., 2004). Hier zeigt sich ein direkter Zusammenhang zwischen der Aktivierung der Kinase und der Induktion der Insulin-Resistenz. Für TNFα behandelte Zellen konnte zudem nachgewiesen werden, dass es zu einer erhöhten IRS-1 Serin-Phosphorylierung kommt, was letztendlich in eine gestörte Insulinsignalweiterleitung mündet (Hotamisligil et al., 1996; Feinstein et al., 1993). Neuere Daten zeigen jedoch, dass viele verschiedene Serin/Threonin Kinasen wie die IKK, JNK, Akt/PKB, ERK und weitere in die Entwicklung der Insulin-Resistenz nach Serin-Phosphorylierung von IRS-1 involviert sind (Gao et al., 2003). Ein ähnlich komplexes Netzwerk von Kinasen kann daher auch an der Generierung der muskulären Insulin-Resistenz im Zuge des parakrinen Dialogs zwischen Fett- und Muskelzelle beteiligt sein. Dabei ist es denkbar, dass IKK als weiter stromaufwärts gelegene regulatorische Kinase wirkt, da ein hoch sensibler IKK Inhibitor in der Lage ist, eine Störung des Insulinsignals in der Skelettmuskelzelle zu verhindern und der Zelle so zu einer normalen Insulinantwort zu verhelfen. Dabei sind die molekularen Mechanismen, die den Dialog zwischen der NFκB Aktivierung und dem Insulinsignalweg vermitteln, noch gänzlich unbekannt. Zusätzlich zur Serin- und Threonin-Phosphorylierung des IRS-1 durch die IKK (Gao et al., 2002) sind als Mechanismus auch veränderte, NFκB-abhängige, Genexpressionen denkbar. Hier werden noch weitere Untersuchungen folgen müssen, um die komplexen Signalwege, die letztendlich an der Entstehung der muskulären Insulin-Resistenz beteiligt sind, zu entschlüsseln.

Auch in der vorliegenden Studie führt eine Stimulation der humanen Skelettmuskelzellen mit TNF α zu einer starken Aktivierung des NF κ B Signalweges und in hohen Dosen gleichzeitig zu einer gestörten Insulinsignalweiterleitung. Darüber hinaus wird NF κ B in den Muskelzellen durch Fettzell-konditioniertes Medium, das die Insulinsignalweiterleitung stört, aktiviert; wohingegen inaktives Fettzell-konditioniertes Medium nicht in der Lage ist, den IKK/NF κ B Signalweg anzusteuern. Letztendlich hat eine Co-Kultur von Fett- und Muskelzellen die in Anwesenheit eines spezifischen IKK Inhibitors durchgeführt wird, keine Störung der Insulinsignalkaskade zur Folge. Die vorliegenden Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Aktivierung des IKK/NF κ B Signalweges eine zentrale Rolle in der Entwicklung der muskulären Insulin-Resistenz spielt.

Die Ergebnisse, die in der Co-Kultur mit Hilfe des IKK Inhibitors erzielt werden, weisen eine gewisse Parallele zu den Co-Kultur Experimenten in Gegenwart von Troglitazon auf. Auch Troglitazon ist in der Lage, die Insulin-Resistenz im Skelettmuskel aufzuheben und die Zellen gegenüber Insulin zu sensitivieren. Der IKK Inhibitor sensitiviert die Muskelzellen zwar nicht gegenüber Insulin, doch sind sie in seiner Gegenwart zu einer normalen Insulinsignalweiterleitung befähigt.

Interessanterweise zeigt eine Studie, dass Troglitazon die NF κ B-abhängige selektive Unterdrückung verschiedener Fettzell spezifischer Gene blockieren kann (Ruan et al., 2003). Darüber hinaus bestätigt eine Studie mit Pioglitazon, einem weiteren Thiazolidindion, dass eine Inkubation von Fettzellen mit diesem Faktor zu einer stark erhöhten Adiponectinausschüttung führt (Miyazaki et al., 2004). Dies lässt die Vermutung zu, dass die Unterdrückung der NF κ B Aktivität und die vermehrte Ausschüttung von Adiponectin ein Mechanismus sein könnte, über den die PPAR γ Liganden zu einer Insulinsensitivität beitragen. Diese Daten unterstützen noch einmal die Annahme, dass die Aktivierung des IKK/NF κ B Signalweges gewebsübergreifend von zentraler Bedeutung für die Pathogenese der Insulin-Resistenz ist.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde das Modell der Co-Kultur von *in vitro* differenzierten, primären humanen Fett- und Muskelzellen als neues System für Studien der Interaktion zwischen Fett- und Muskelzelle vorgestellt. Die vorgelegten Daten zeigen eine Störung der Insulinsignalweiterleitung nach akuter Stimulation mit Insulin im humanen Skelettmuskel auf der Ebene der IRS-1, Akt und GSK3 Phosphorylierung. Diese Störung kann durch Troglitazon, einem Insulinsensitivierer verhindert werden.

Gleichzeitige Inkubation mit dem IKK Inhibitor I229 in der Co-Kultur hilft ebenfalls, die Insulin-Resistenz im Skelettmuskel zu verhindern. Da die Fettzell-konditionierten Medien außerdem nur dann in der Lage sind, eine muskuläre Insulin-Resistenz zu induzieren, wenn sie gleichzeitig die P65 Untereinheit des NFκB aktivieren, scheint der IKK/NFκB Signalweg eine wichtige Funktion in der Induktion der muskulären Insulin-Resistenz einzunehmen. Möglicherweise bietet er einen Angriffspunkt für die Entwicklung neuer Therapieformen.

Die Adipokine TNFα, IL-6, Resistin und Angiotensin II können trotz Beeinflussung einzelner Komponenten der Insulinsignalweiterleitung im humanen Skelettmuskel *in vitro* als alleinige Induktoren der Insulin-Resistenz *in vivo* ausgeschlossen werden. Denkbar sind jedoch sekundäre Effekte dieser Adipokine, entweder durch synergistische Funktion oder durch Veränderung der Expressionsmuster von Fett- und Muskelgewebe. Darüber hinaus wird angenommen, dass ein komplexes Gemisch verschiedener Adipokine für die Induktion der Insulin-Resistenz im Skelettmuskel verantwortlich ist. Diese Hypothese stützt sich auf die Tatsache, dass sich die Sekretionsprofile von Resistenz-induzierenden und nicht Resistenz-induzierenden Fettzellen im Silbergel in verschiedenen Molekulargewichten deutlich voneinander unterscheiden. Des Weiteren ist der Resistenz induzierenden Effekt von einzelnen Fraktionen des Fettzell-konditionierten Mediums nicht mit dem des kompletten Überstands zu vergleichen.

Ein ähnliches Bild im Silbergel ergibt sich, wenn die Fettzellüberstände in Gegenwart von Adiponectin, dem einzigen bekannten Adipokin dessen Expression negativ mit der Insulin-Resistenz verknüpft ist, konditioniert werden. Die so konditionierten Überstände verlieren im Gegensatz zu den unbehandelten Überständen ihre Kapazität die Insulinsignalweiterleitung im humanen Skelettmuskel zu stören. Da eine Induktion der Resistenz im Co-Kultur Modell ebenfalls durch

Zugabe von Adiponectin verhindert werden kann, eine Zugabe von Adiponectin zu bereits konditionierten Fettzellüberständen jedoch keine Besserung der Insulin-Resistenz zur Folge hat, lässt darauf schließen, dass die durch Adiponectin veränderte Adipokinsekretion die Ursache der unveränderten Insulinsensitivität der Skelettmuskelzellen darstellt.

6. Literaturverzeichnis

AGUIRRE V, UCHIDA T, YENUSH L, DAVIS R, WHITE MF. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem*, 275: 9047-9054, **2000**.

ALESSI DR, JAMES SR, DOWNES CP, HOLMES AB, GAFFNEY PRJ, REESE CB, COHEN P. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balph α . *Curr Biol*, 7: 261-269, **1997**.

AMOS AF, McCARTY DJ, ZIMMET P. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diabet Med*, 14: 1-85, **1997**.

ANDJELKOVIC M, ALESSI DR, MEIER R, FERNANDEZ A, LAMB NJC, FRECH M, CRON P, COHEN P, LUCOCQ JM, HEMMINGS BA. Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem*, 272: 31515-31524, **1997**.

ARAKI E, SUN XJ, HAAG BL 3RD, CHUANG LM, YANG-FENG TL, WHITE MF, KAHN CR. Human skeletal muscle IRS-1: Characterization of the cDNA, gene and chromosomal localization. *Diabetes*, 42: 1041-1049, **1993**.

BACHMANN W, SIEGER C, LACHER F, LOTZ N. Binding of biosynthetic human insulin to erythrocytes of normal and insulin-dependent diabetic subjects: comparison with pork and human pancreatic insulin. *Diabetes Care*, 4: 215-219, **1981**.

BALENDRAN A, CASAMAYOR A, DEAK M, PATERSON A, GAFFNEY P, CURRIE R, DOWNS CP, ALESSI DR. PDK1 acquires PDK2 activity in the presence of a synthetic peptide derived from the carboxyl terminus of PRK2. *Curr Biol*, 9: 393-404, **1999**.

BANTING FG, BEST CH, COLLIP JB, CAMPBELL WR, FLETCHER AA. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. *Can Med Assoc J*, 12: 141-146, **1922**.

BASTARD JP, MAACHI M, VAN NHIEU JT, JARDEL C, BRUCKERT E, GRIMALDI A, ROBERT JJ, CAPEAU J, HAINQUE B. Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, 87, 2084-2089, **2002**.

BAUMANN CA, RIBON V, KANZAKI M, THURMOND DC, MORA S, SHIGEMATSU S, BICKEL PE, PESSIN JE, SALTIEL. CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature*, 407: 2002-2207, **2000**.

BELLACOSA A, TESTA JR, STAAL SP, TSICHLIS PN. A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* 254: 274-277, **1991**.

BIRNBAUM MJ. Turning down insulin signaling. *J Clin Invest*, 108: 655-659, **2001**.

BJORNHOLM M, KAWANO Y, LEHTIHET M, ZIERATH JR. Insulin receptor substrate-1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase activity in skeletal muscle from NIDDM subjects after in vivo insulin stimulation. *Diabetes*, 46: 524-527, **1997**.

BLUHER M, KRATZSCH J, PASCHKE R. Plasma levels of tumor necrosis factor- α , angiotensin II, growth hormone, and IGF-I are not elevated in insulin-resistant obese individuals with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care*, 24: 328-334, **2001**.

BRUUN JM, LIHN AS, VERDICH C, PEDERSEN SB, TOUBRO S, ASTRUP A, RICHELSEN B. Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285: E527-E533, **2003**.

BURKS DJ, PONS S, TOWERY H, SMITH-HALL J, MEYERS MG, YENUSH L, WHITE MF. Heterologous PH domains do not mediate coupling of IRS-1 to the insulin receptor. *J Biol Chem*, 272: 27716-27721, **1997**.

BURKS DJ, WANG J, TOWERY H, ISHIBASHI O, LOWE D, RIEDEL H, WHITE MF. IRS pleckstrin homology domains bind to acidic motifs in proteins. *J Biol Chem*, 273: 31061-31067, **1998**.

CAI D, DHE-PAGANON S, MELENDEZ PA, LEE J, SHOELSON SE. Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *J Biol Chem*, 278: 25323-25330, **2003**.

CAREY AL, BRUCE CR, SACCHETTI M, ANDERSON MJ, OLSEN DB, SALTIN B, HAWLEY JA, FEBBRAIO MA. Interleukin-6 and tumor necrosis faktor-alpha are not increased in patients with type 2 diabetes: evidence that plasma interleukin-6 is related to fat mass and not insulin responsiveness. *Diabetologia*, 47: 1029-1037, **2004**.

CAREY AL, FEBBRAIO MA. Interleukin-6 and insulin sensitivity: friend or foe? *Diabetologia*, 47: 1135-1142, **2004**.

CAREY RM, WANG ZQ, SIRAGY HM. Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension*, 35: 155-163, **2000**.

CHEN G, GOEDEL DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*, 296: 1634-1635, **2002**.

CHENG JQ, GODWIN AK, BELLACOSA A, TAGUCHI T, FRANKE TF, HAMILTON TC, TSICHLIS PN, TESTA JR. AKT2, aputative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 9267-10271, **1992**.

CHEUNG AT, REE D, KOLLS JK, FUSELIER J, COY DH, BRYER-ASH M. An in vivo model for elucidation of the mechanism of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-induced insulin resistance: evidence for differential regulation of insulin signaling by TNF-alpha. *Endocrinology*, 139: 4928–4935, **1998**.

CHIANG SH, BAUMANN CA, KANZAKI M, THURMOND DC, WATSON RT, NEUDAUER CL, MACARA IG, PESSIN JE, SALTIEL AR. Insulin-stimulated GLUT4 translokation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature*, 410: 944-948, **2001**.

COFFER PJ, JIN J, WOODGETT JR. Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem J*, 335:1-13, **1998**.

COLDITZ GA, WILLETT WC, ROTNITZKY A, MANSON JE. Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. *Ann Intern Med*, 122: 481-486, **1995**.

COPPACK SW. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc*, 60: 349-356, **2001**.

CROSS DAE, ALESSI DR, COHEN P, ANDJELKOVIC M, HEMMINGS BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, 378: 785-789, **1995**.

CUSI K, MAEZONO K, OSMAN A, PENDERGRASS M, PATTI ME, PRATIPANAWATR T, DEFRONZO RA, KAHN CR, MANDARINO LJ. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest*, 105: 311-320, **2000**.

DAHLOF B, DEVEREUX RB, KJELDSSEN SE, JULIUS S, BEEVERS G, FAIRE U, FYHRQUIST F, IBSEN H, KRISTIANSSON K, LEDERBALLE-PEDERSEN O, LINDHOLM LH, NIEMINEN M.S, OMKVİK P, OPARIL S, WEDEL H. LIFE Study Group. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet*, 359: 995-1003, **2002**.

DAS UN. Is metabolic syndrome X an inflammatory condition? *Exp Biol Med*, 227: 989-997, **2002**.

DEALVARO C, TERUEL T, HERNANDEZ R, LORENZO M. Tumor necrosis factor alpha produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor kappaBkinase in a p38 MAPK-dependent manner. *J Biol Chem*, 279: 17070-17078, **2004**.

DEFRONZO RA, JACOT E, JEQUIER E, MAEDER E, WAHREN J, FELBER JP. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes*, 30: 1000-1007, **1981**.

DIABETES CARE. American Diabetes Association (keine Autoren angegeben) Type 2 diabetes in children and adolescents. *Diabetes Care*, 23: 381-9, **2000**.

DIROCCO P, MANCO M, ROSA G, GRECO AV, MINGRONE G. Lowered tumor necrosis factor receptors, but not increased insulin sensitivity, with infliximab. *Obes Res*, 12: 734-9, **2004**.

DRESNER A, LAURENT D, MARCUCCI M, GRIFFIN ME, DUFOUR S, CLINE GW, SLEZAK LA, ANDERSEN DK, HUNDAL RS, ROTHMAN DL, PETERSEN KF, SHULMAN GI. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest*, 103: 253-259, **1999**.

ELDAR-FINKELMANN H, KREBS EG. Phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by glycogen synthase kinase 3 impairs insulin action. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 9660-9664, **1997**.

ELDAR-FINKELMANN H, SCHREYER SA, SHINOHARA MM, LEBOEUF RC, KREBS EG. Increased glycogen synthase kinase-3 activity in diabetes- and obesity-prone C57BL/6J mice. *Diabetes*, 48: 1662-1666, **1999**.

ENGERT JC, VOHL MC, WILLIAMS SM, LEPAGE P, LOREDO-OSTI JC, FAITH J, DORE C, RENAUD Y, BURTT NP, VILLENEUVE A, HIRSCHHORN JN, ALTSHULER D, GROOP LC, DESPRES JP, GAUDET D, HUDSON TJ. 5' flanking variants of resistin are associated with obesity. *Diabetes*, 51:1629-34, **2002**.

ESPOSITO DL, LI Y, CAMA A, QUON MJ. Tyr(612) and Tyr(632) in human insulin receptor substrate-1 are important for full activation of insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase activity and translocation of GLUT4 in adipose cells. *Endocrinology*, 142: 2833-40, **2001**.

FAIN JN, MADAN AK, HILER ML, CHEEMA P, BAHOUTH SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology*, 145: 2273-2282, **2004**.

FARHANG-FALLAH J, YIN X, TRENTIN G, CHEN AM, ROZAKIS-ADCOCK M. Cloning and characterisation of PHIP, a novel insulin receptor substrate-1 pleckstrin homology domain interacting protein. *J Biol Chem*, 275: 40492-40497, **2000**.

FASSHAUER M, KLEIN J, KRALISCH S, KLIER M, LOSSNER U, BLUHER M, PASCHKE R. Growth hormone is a positive regulator of adiponectin receptor 2 in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett*, 558: 27-32, **2004**.

FASSHAUER M, KLEIN J, NEUMANN S, ESZLINGER M, PASCHKE R. Isoproterenol inhibits resistin gene expression through a G(S)-protein-coupled pathway in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett*, 500: 60-63, **2001**.

FASSHAUER M, KLEIN J, NEUMANN S, ESZLINGER M, PASCHKE R. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 290: 1084-1089, **2002**.

FEINSTEIN R, KANETY H, PAPA MZ, LUNENFELD B, KARASIK A. Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. *J Biol Chem*, 268: 26055-26058, **1993**.

FESTA A, D'AGOSTINO R^{JR}, TRACY RP, HAFFNER SM. Insulin Resistance Atherosclerosis Study. Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes*, 51: 1131-1137, **2002**.

FLISER D, ARNOLD U, KOHL B, HARTUNG R, RITZ E. Angiotensin II enhances insulin sensitivity in healthy volunteers under euglycemic conditions. *J Hypertens*, 11: 983-988, **1993**.

FOLLI F, SAAD MJ, VELLOSO L, HANSEN H, CARANDENTE O, FEENER EP, KAHN CR. Crosstalk between insulin and angiotensin II signalling systems. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 107: 133-139, **1999**.

FOLLI F, KAHN CR, HANSEN H, BOUCHIE JL, FEENER EP. Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels. A potential role for serine phosphorylation in insulin/angiotensin II crosstalk. *J Clin Invest*, 100: 2158-2169, **1997**.

FREDERICH RC^{JR}, KAHN BB, PEACH MJ, FLIER JS. Tissue-specific nutritional regulation of angiotensinogen in adipose tissue. *Hypertension*, 19: 339-344, **1992**.

FRUEBIS J, TSAO TS, JAVORSCHI S, EBBETS-REED D, ERICKSON MR, YEN FT, BIHAIN BE, LODISH HF. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 2005-2010, **2001**.

FU Y, LUO N, GARVEY GT. Overexpression of Adiponectin but Not Resistin Enhances Adipocyte Differentiation and Insulin Sensitivity. In *64. ADA Scientific Sessions Orlando, Florida*: 338-OR, **2004**.

FUJII N, BOPPART MD, DUFRENSE SD, CROWLEY PF, JOZSI AC, SAKAMOTO K, YU H, ASCHENBACH WG, KIN S, MIYAZAKI H, WHITE MF, HIRSHMAN MF, GOODYEAR LJ. Overexpression or ablation of JNK in skeletal muscle has no effect on glycogen synthase activity. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287: C200-C208, **2004**.

FURUHASHI M, URA N, HIGASHIURA K, MURAKAMI H, TANAKA M, MONIWA N, YOSHIDA D, SHIMAMOTO K. Blockade of the renin-angiotensin system increases adiponectin concentrations in patients with essential hypertension. *Hypertension*, 42: 76-81, **2003**.

GAO Z, HWANG D, BATAILLE F, LEFEVRE M, YORK D, QUON MJ, YE J. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. *J Biol Chem*, 277: 48115-48121, **2002**.

GAO Z, ZUBERI A, QUON MJ, DONG Z, YE J. Aspirin inhibits serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 in tumor necrosis factor-treated cells through targeting multiple serine kinases. *J Biol Chem*, 278: 24944-24950, **2003**.

GENTILE S, GUARINO G, BIZZARO A, DE BELLIS A, TORELLA R. Infliximab does not interfere with insulin secretion, insulin resistance and production of GAD and islet cell antibodies in patients with Crohn's disease. *Diabetes Obes Metab*, 4: 276-277, **2002**.

GIACCHETTI G, FALOAIA E, MARINIELLO B, SARDU C, GATTI C, CAMILLONI MA, GUERRIERI M, MANTERO F. Overexpression of the renin-angiotensin system in human visceral adipose tissue in normal and overweight subjects. *Am J Hypertens*, 15: 381-388, **2002**.

GONG H, NI Y, GUO X, FEI L, PAN X, GUO M, CHEN R. Resistin promotes 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Eur J Endocrinol*, 150: 885-892, **2004**.

GOODPASTER BH, THAETE FL, KELLEY DE. Thigh adipose tissue distribution is associated with insulin resistance in obesity and in type 2 diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*, 71: 885-892, **2000**.

GORZELNIAK K, ENGELI S, JANKE J, LUFT FC, SHARMA AM. Hormonal regulation of the human adipose-tissue renin-angiotensin system: relationship to obesity and hypertension. *J Hypertens*, 20: 965-973, **2002**.

GREENBERG AS, MCDANIEL ML. Identifying the links between obesity, insulin resistance and beta-cell function: potential role of adipocyte-derived cytokines in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Eur J Clin Invest* 32: 24-34, **2002**.

HAFFNER SM. Insulin resistance, inflammation, and the prediabetic state. *Am J Cardiol*, 92: 18J-26J, **2003**.

HAJDUCH E, LITHERLAND GJ, HUNDAL HS. Protein kinase B (PKB/Akt)-a key regulator of glucose transport? *FEBS Lett*, 492: 199-203, **2001**.

HALSE R, BONAUAUD SM, ARMSTRONG JL, McCORMACK JG, YEAMAN SJ. Control of glycogen synthesis by glucose, glycogen, and insulin in cultured human muscle cells. *Diabetes*, 50: 720-726, **2001**.

HAUGEN F, JORGENSEN A, DREVON CA, TRAYHURN P. Inhibition by insulin of resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett*, 507: 105-108, **2001**.

HAUNER H. Occurrence of diabetes mellitus in Germany. *Dtsch Med Wochenschr*, 123: 777-82, **1998**.

HEGARTY BD, FURLER SM, YE J, COONEY GJ, KRAEGEN EW. The role of intramuscular lipid in insulin resistance. *Acta Physiol Scand*, 178: 373-383, **2003**.

HENRIKSEN EJ, JACOB S. Modulation of metabolic control by angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition. *J Cell Physiol*, 196: 171-179, **2003**.

HENRY RR, CIARALDI TP, ABRAMS-CARTER L, MUDALIAR S, PARK KS, NIKOULINA SE: Glycogen synthase activity is reduced in cultured skeletal muscle cells of non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects: biochemical and molecular mechanisms. *J Clin Invest*, 98: 1231–1236, **1996**.

HILDER TL, TOU JC, GRINDELAND RE, WADE CE, GRAVES LM. Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 serine 307 correlates with JNK activity in atrophic skeletal muscle. *FEBS Lett*, 553: 63-67, **2003**.

HONDA R, MATSUURA K, FUKUMATSU Y, KAWANO T, OKAMURA H. In-vitro enhancement of mouse embryonic development by co-culture with peritoneal macrophages. *Hum Reprod*, 9: 692-696, **1994**.

HOTAMISLIGIL GS, ARNER P, CARO JF, ATKINSON RL, SPIEGELMAN BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*, 95: 2409-2415, **1995**.

HOTAMISLIGIL GS, PERALDI P, BUDAVARI A, ELLIS R, WHITE MF, SPIEGELMAN BM. IRS-1 mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha - and obesity-induced insulin resistance. *Science*, 271: 665-668, **1996**.

HOTAMISLIGIL GS, SHARGILL NS, SPIEGELMAN BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259: 87-91, **1993**.

HOTAMISLIGIL GS. The role of TNFalpha and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *J Intern Med*, 245: 621-625, **1999**.

HOTAMISLIGIL GS. Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 24: S23-27, **2000**.

HUBE F, HAUNER H. The role of TNF-alpha in human adipose tissue: prevention of weight gain at the expense of insulin resistance? *Horm Metab Res*, 31: 626-631, **1999**.

ITANI SI, RUDERMAN NB, SCHMIEDER F, BODEN G. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I kappa B-alpha. *Diabetes*, 51: 2005-2011, **2002**.

IWAHASHI H, ITOH N, YAMAGATA K, IMAGAWA A, NAKAJIMA H, TOMITA K, MORIWAKI M, WAGURI M, YAMAMOTO K, MIYAGAWA J, NAMBA M, HANAFUSA T, MATSUZAWA Y. Molecular mechanisms of pancreatic beta-cell destruction in autoimmune diabetes: potential targets for preventive therapy. *Cytokines Cell Mol Ther*, 4: 45-51, **1998**.

JACOBI SK, AJUWON KM, WEBER TE, KUSKE JL, DYER CJ, SPURLOCK ME. Cloning and expression of porcine adiponectin, and its relationship to adiposity, lipogenesis and the acute phase response. *J Endocrinol*, 182: 133-144, **2004**.

JANKE J, ENGELI S, GORZELNIAK K, LUFT FC, SHARMA AM. Mature adipocytes inhibit in vitro differentiation of human preadipocytes via angiotensin type 1 receptors. *Diabetes*, 51: 1699-1707, **2002**.

JANKE J, ENGELI S, GORZELNIAK K, LUFT FC, SHARMA AM. Resistin gene expression in human adipocytes is not related to insulin resistance. *Obes Res*, 10: 1-5, **2002**.

JUAN CC, CHIEN Y, WU LY, YANG WM, CHANG CL, LAI YH, HO PH, KWOK CF, HO LT. Angiotensin II Enhances Insulin Sensitivity in vitro and in vivo. *Endocrinol*, Epub ahead of print, **2005**.

KAHN BB, FLIER JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*, 106: 473-481, **2000**.

KARIN M, BEN-NERIAH Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol*, 18: 621-663, **2000**.

KASUGA M, HEDO JA, YAMADA KM, KAHN CR. The structure of insulin receptor and its subunits. Evidence for multiple nonreduced forms and a 210,000 possible proreceptor. *J Biol Chem*, 257: 10392-10399, **1982**.

KASUGA M, WHITE MF, KAHN CR. Phosphorylation of the insulin receptor in cultured hepatoma cells and a solubilized system. *Methods Enzymol*, 109: 609-621, **1985**.

KAUSCH C, KRÜTZFELDT J, MATTHAEI S, HÄRING HU, STUMVOLL M. Skeletal muscle cells from insulin resistant (non-diabetic) individuals are susceptible to insulin desensitization by fatty acids. *Diabetologia*, 44: A174, **2001**.

KELLER P, KELLER C, CAREY AL, JAUFFRED S, FISCHER CP, STEENSBERG A, PEDERSEN BK. Interleukin-6 production by contracting human skeletal muscle: autocrine regulation by IL-6. *Biochem Biophys Res Commun*, 310: 550-554, **2003**.

KELLEY DE. Skeletal muscle triglycerides: an aspect of regional adiposity and insulin resistance. *Ann NY Acad Sci*, 967: 135-145, **2002**.

KERN PA, RANGANATHAN S, LI C, WOOD L, RANGANATHAN G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 280: E745-751, **2001**.

KERN PA, SAGHIZADEH M, ONG JM, BOSCH RJ, DEEM R, SIMSOLO RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest*, 95: 2111–2119, **1995**.

KIELSTEIN JT, BECKER B, GRAF S, BRABANT G, HALLER H, FLISER D. Increased resistin blood levels are not associated with insulin resistance in patients with renal disease. *Am J Kidney Dis*, 42: 62-66, **2003**.

KIM KH, LEE K, MOON YS, SUL HS. A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, 276: 11252–11256, **2001**.

KIM YB, NIKOULINA SE, CIARALDI TP, HENRY RR, KAHN BB. Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes. *J Clin Invest*, 104: 733-741, **1999**.

KING H, AUBERT RE, HERMAN WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care*, 21:1414-31, **1998**.

KINTSCHER U, LAW RE. PPARgamma-mediated insulin sensitization: the importance of fat versus muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 288): E287-E291, **2005**.

KIORTIS DN, MAVRIDIS AK, VASAKOS S, NIKAS SN, DROSOS AA. Effects of Infliximab treatment on insulin resistance in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*, Epub ahead of print, **2004**.

KITAGAWA Y, BUJO H, TAKAHASHI K, SHIBASAKI M, ISHIKAWA K, YAGUI K, HASHIMOTO N, NODA K, NAKAMURA T, YANO S, SAITO Y. Impaired glucose tolerance in accompanied by decreased insulin sensitivity in tissues of mice implanted with dells that overexpress resistin. *Diabetologia*, 47: 1847-1853, **2004**.

KOBAYASHI H, OUCHI N, KIHARA S, WALSH K, KUMADA M, ABE Y, FUNAHASHI T, MATSUZAWA Y. Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin. *Circ Res*, 94: 27-31, **2004**.

KOISTINEN HA, BASTARD JP, DUSSERRE E, EBELING P, ZEGARI N, ANDREELLI F, JARDEL C, DONNER M, MEYER L, MOULIN P, HAINQUE B, RIOU JP, LAVILLE M, KOIVISTO VA, VIDAL H. Subcutaneous adipose tissue expression of tumour necrosis factor-alpha is not associated with whole body insulin resistance in obese non-diabetic or in type-2 diabetic subjects. *Eur J Clin Invest*, 30: 302-310, **2000**.

KOTANI K, WILDEN P, PILLAY TS. SH2-Balpa is an insulin-receptor adaptor protein and substrate that interacts with the activation loop of the insulin-receptor kinase *Biochem J*, 335: 103-109, **1998**.

KROOK A, ROTH RA, JIANG XJ, ZIERATH JR, WALLBERG-HENRIKSSON H. Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects. *Diabetes*, 47: 1281-1286, **1998**.

KRUSZYNSKA YT, OLEFSKEY JM. Cellular and molecular mechanisms of non-insulin dependent diabetes mellitus *J Investig Med*, 44: 413-428, **1996**.

LAVAN BE, LANE WS, LIENHARD GE. The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem*, 272: 11439-11443, **1997**.

LEBOVITZ HE, BANERJI MA. Insulin resistance and its treatment by thiazolidinediones. *Recent Prog Horm Res*, 56: 265-294, **2001**.

LITHERLAND GJ, HAJDUCH E, HUNDAL HS. Intracellular signalling mechanisms regulating glucose transport in insulin-sensitive tissues. *Mol Membr Biol*, 18: 195-204, **2001**.

LIU LS, SPELLEKEN M, RÖHRIG K, HAUNER H, ECKEL J. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha acutely inhibits insulin signaling in human adipocytes: implication of the p80 TNF receptor. *Diabetes* 47, 515-522, **1998**.

LOCK P, CASAGRANDA F, DUNN AR. Independent SH2-binding sites mediate interaction of Dok-related protein with RasGTPase activating protein and Nck. *J Biol Chem*, 274: 22775-22784, **1999**.

LYON CJ, LAW RE, HSUEH WA. Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. *Endocrinology*, 144: 2195-2200, **2003**.

MALENFANT P, JOANISSE DR, THERIAULT R, GOODPASTER BH, KELLEY DE, SIMONEAU JA. Fat content in individual muscle fibers of lean and obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 25: 1316-1321, **2001**.

McTERNAN PG, McTERNAN CL, CHETTY R, JENNER K, FISHER FM, LAUER MN, CROCKER J, BARNETT AH, KUMAR S. Increased resistin gene and protein expression in human abdominal adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 2407, **2002**.

MOHAMED-ALI V, GOODRICK S, RAWESH A. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*, 82: 4196-4200, **1997**.

MOLLER DE. Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab*, 11: 212-217, **2000**.

MONTAGUE CT, PRINS JB, SANDERS L, ZHANG J, SEWTER CP, DIGBY J, BYRNE CD, O'RAHILLY S. Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. *Diabetes*, 47: 1384-1391, **1998**.

MOON B, KWAN JJ, DUDDY N, SWEENEY G, BEGUM N. Resistin inhibits glucose uptake in L6 cells independently of changes in insulin signaling and GLUT4 translocation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285: E106-E115, **2003**.

MORRIS AD, PETRIE JR, UEDA S, CONNELL JM, ELLIOTT HL, SMALL M, DONNELLY R. Pressor and subpressor doses of angiotensin II increase insulin sensitivity in NIDDM. Dissociation of metabolic and blood pressure effects. *Diabetes*, 43: 1445-1449, **1994**.

MOTLEY ED, EGUCHI K, GARDNER C, HICKS AL, REYNOLDS CM, FRANK GD, MIFUNE M, OHBA M, EGUCHI S. Insulin-induced Akt activation is inhibited by angiotensin II in the vasculature through protein kinase C- α . *Hypertension*, 41: 775-780, **2003**.

NAGAEV I, SMITH U. Insulin resistance and type 2 diabetes are not related to resistin expression in human fat cells or skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, 285: 561-564, **2001**.

NAKATANI K, THOMPSON DA, BARTHEL A, SAKAUE H, LIU W, WEIGEL RJ, ROTH RA. Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. *J Biol Chem*, 274: 21528-21532, **1999**.

NIKOULINA SE, CIARALDI TP, MUDALIAR S, CARTER L, JOHNSON K, HENRY RR. Inhibition of Glycogen Synthase Kinase 3 Improves Insulin Action and Glucose Metabolism in Human Skeletal Muscle. *Diabetes*, 51: 2190-2198, **2002**.

NIKOULINA SE, CIARALDI TP, MUDALIAR S, MOHIDEEN O, CARTER L, HENRY RR. Potential role of glycogen synthase kinase-3 in skeletal muscle insulin resistance of type 2 diabetes. *Diabetes*, 49: 263-271, **2000**.

NOGUCHI T, MATOZAKI T, INAGAKI K, TSUDA M, FUKUNAGA K, KITAMURA Y, KITAMURA T, SHII K, YAMANASHI Y, KASUGA M. Tyrosine phosphorylation of p62(Dok) induced by cell adhesion and insulin: possible role in cell migration. *EMBO J*, 18: 1748-1760, **1999**.

NONOGAKI K, FULLER GM, FUENTES NL. Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats. *Endocrinology*, 136: 2143–2149, **1995**.

OFEI F, HUREL S, NEWKIRK J, SOPWITH M, TAYLOR R. Effects of an engineered human anti-TNF-alpha antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glyceimic control in patients with NIDDM. *Diabetes*, 45: 881-885, **1996**.

OKADA K, HIRANO T, RAN J, ADACHI M. Olmesartan medoxomil, an angiotensin II receptor blocker ameliorates insulin resistance and decreases triglyceride production in fructose-fed rats. *Hypertens Res*, 27: 293-299, **2004**.

PARADIS S, RUVKUN G. Caenorhabditis elegans Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI-3 kinase to the DAF-16 transcription factor. *Genes Dev*, 12: 2488-2498, **1998**.

PARK KS, CIARALDI TP, LINDGREN K, ABRAMS-CARTER L, MUDALIAR S, NIKOULINA SE, TUFARI SR, VEERKAMP JH, VIDAL-PUIG A, HENRY RR. Troglitazone effects on gene expression in human skeletal muscle of type II diabetes involve up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Clin Endocrinol Metab*, 83: 2830-2835, **1998**.

PÄTH G, BORNSTEIN SR, GURNIAC M, CHROUSOS GP, SCHERBAUM WA, HAUNER H. Human breast adipocytes express interleukin-6 (IL-6) and its receptor system: Increased IL-6 production by beta-adrenergic activation and effects of IL-6 on adipocyte function. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 2281-2288, **2001**.

PAWSON T, SCOTT JD. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science*, 278: 2075-2080, **1997**.

PAZ K, LIU YF, SHORER H, HEMI R, LEROITH D, QUAN M, KANETY H, SEGER R, ZICK Y. Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) by protein kinase B positively regulates IRS-1 function. *J Biol Chem*, 274: 28816-28822, **1999**.

PESSIN JE, SALTIEL AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest*, 106: 165-169, **2000**.

PEYROLLIER K, HAJDUCH E, GRAY A, LITHERLAND GJ, PRESCOTT A, LESLIE NR, HUNDAL HS. A role for the actin cytoskeleton in the hormonal and growth-factor-mediated activation of protein kinase B. *Biochem J*, 352: 617-622, **2000**.

PHILLIPS MI, SPEAKMAN EA, KIMURA B. Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. *Regul Pept*, 43: 1-20, **1993**.

PRADHAN AD, MANSON JE, RIFAI N, BURING JE, RIDKER PM. C-reactive protein, interleukin-6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA*, 286: 327-334, **2001**.

PRAVENEK M, KAZDOVA L, LANDA V, ZIDEK V, MLEJNEK P, JANSKA P, WANG J, QI N, KURTZ TW. Transgenic and recombinant resistin impair skeletal muscle glucose metabolism in the spontaneously hypertensive rat. *J Biol Chem*, 278:4509-4515, **2003**.

PRINS JB. Adipose tissue as an endocrine organ. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 16: 639-651, **2002**.

QI C, PEKALA PH. Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in adipocytes. *Proc Soc Exp Biol Med*, 223: 128-135, **2000**.

QIAO LY, ZHANDAE R, JETTON TL, ZHOU G, SUN XJ. In vivo phosphorylation of insulin receptor substrate 1 at serine 789 by a novel serine kinase in insulin-resistant rodents. *J Biol Chem*, 277: 26530-26539, **2002**.

RAJALA MW, OBICI S, SCHERER PE, ROSSETTI L. Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. *J Clin Invest*, 111: 225-230, **2003**.

RAN J, HIRANO T, ADACHI M. Angiotensin II type 1 receptor blocker ameliorates overproduction and accumulation of triglyceride in the liver of Zucker fatty rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 287: E227-E232, **2004**.

REAVEN GM. Pathophysiology of insulin resistance in human disease. *Physiol Rev*, 75: 473-486, **1995**.

RENAULT V, PIRON-HAMELIN G, FORESTIER C, DiDONNA S, DECARY S, HENTATI F, SAILLANT G, BUTLER-BROWNE GS, MOULY V. Skeletal muscle regeneration and the mitotic clock. *Exp Gerontol*, 35: 711-719, **2000**.

ROTTER V, NAGAEV I, SMITH U. Interleukin-6 (IL-6) reduces gene and protein expression of IRS-1 and GLUT4 and is overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *Diabetes*, 51: A303, **2002**.

ROTTER V, NAGAEV I, SMITH U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem*, 278: 45777-45784, **2003**.

RUAN H, POWNALL HJ, LODISH HF. Troglitazone antagonizes tumor necrosis factor-alpha-induced reprogramming of adipocyte gene expression by inhibiting the transcriptional regulatory functions of NF-kappaB. *J Biol Chem*, 278: 28181-28192, **2003**.

RUI L, AGUIRRE V, KIM JK, SHULMAN GI, LEE A, CORBOULD A, DUNAIF A, WHITE MF. Insulin/IGF-1 and TNF-alpha stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser307 via distinct pathways. *J Clin Invest*, 107: 181-189, **2001**.

SAGHIZADEH M, ONG JM, GARVEY WT, HENRY RR, KERN PA. The expression of TNF α by human muscle. *J Clin Invest*, 97: 1111-1116, **1996**.

SAINT-MARC P, KOZAK LP, AILHAUD G, DARIMONT C, NEGREL R. Angiotensin II as a trophic factor of white adipose tissue: stimulation of adipose cell formation. *Endocrinology*, 142: 487-492, **2001**.

SANGER F, TUPPY H. The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin. I. The identification of lower peptides from partial hydrolysates. *Biochem J*, 49: 463-481, **1951**.

SANGER F, TUPPY H. The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin. II. The investigation of peptides from enzymic hydrolysates. *Biochem J*, 49: 481-90, **1951.**

SANGER F, THOMPSON EO. The amino-acid sequence in the glycyl chain of insulin. *Biochem J*, 52: **1952.**

SANGER F, THOMPSON EO. The amino-acid sequence in the glycyl chain of insulin. I. The identification of lower peptides from partial hydrolysates. *Biochem J*, 53: 353-366 **1953.**

SANGER F, THOMPSON EO. The amino-acid sequence in the glycyl chain of insulin. II. The investigation of peptides from enzymic hydrolysates. *Biochem J*, 53: 366-374, **1953.**

SAVAGE DB, SEWTER CP, KLENK ES, SEGAL DG, VIDAL-PUIG A, CONSIDINE RV, O'RAHILLY S. Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes*, 50, 2199-2202, **2001.**

SCHAFFLER A, BUCHLER C, MUELLER-LADNER U, HERFARTH H, EHLING A, PAUL G, SCHOLMERICH J, ZIETZ B. Identification of variables influencing resistin serum levels in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Horm Metab Res*, 36: 702-707, **2004.**

SCHEEN AJ. From obesity to diabetes: why, when and who? *Acta Clin Belg*, 55: 9-15, **2000.**

SENN JJ, KLOVER PJ, NOWAK IA, MOONEY RA. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes*, 51: 3391–3399, **2002.**

SHILLABEER G, LI ZH, HATCH G, KUMAR V, LAU DC. A novel method for studying preadipocyte differentiation in vitro. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 20: S77-83, **1996.**

SHIUCHI T, IWAI M, LI HS, WU L, MIN LJ, LI JM, OKUMURA M, CUI TX, HORIUCHI M. Angiotensin II type-1 receptor blocker valsartan enhances insulin sensitivity in skeletal muscles of diabetic mice. *Hypertension*, 43: 1003-1010, **2004**.

SHOJIMA N, SAKODA H, OGIHARA TM, FUJISHIRO MH, KATAGIRI HM, ANAI MY, ONISHI YH, ONO HK, INUKAI KM, ABE MY, FUKUSHIMA YM, KIKUCHI MY, OKA YT, ASANO T. Humoral regulation of resistin expression in 3T3-L1 and mouse adipose cells *Diabetes*, 51: 1737–1744, **2002**.

SHULMAN GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*, 106: 171-176, **2000**.

SONG XM, RYDER JW, KAWANO Y, CHIBALIN AV, KROOK A, ZIERATH JR. Muscle fiber type specificity in insulin signal transduction. *Am J Physiol*, 277: 1690-1696, **1999**.

STAUBS PA, NELSON JG, REICHARD DR, OLEFSKY JM. Platelet-derived growth factor inhibits insulin stimulation of insulin receptor substrate-1 associated phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes without affecting glucose transport. *J Biol Chem*, 273: 25139-25147, **1998**.

STEPHENS JM, LEE J, PILCH PF. Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. *J Biol Chem*, 272: 971–976, **1997**.

STEPPAN CM, BAILEY ST, BHAT S, BROWN EJ, BANERJEE RR, WRIGHT CM, PATEL HR, AHIMA RS, LAZAR MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, 409: 307-312, **2001 a**.

STEPPAN CM, BROWN EJ, WRIGHT CM. A family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 502–506, **2001 b**.

STITH RD, LUO J. Endocrine and carbohydrate responses to interleukin-6 in vivo. *Circ Shock*, 44: 210–215, **1994**.

STOKOE D, STEPHENS LR, COPELAND T, GAFFNEY PRJ, REESE CB, PAINTER GF, HOLMES AB, MCCORMICK F, HAWKINS PT. Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science*, 277: 567-570, **1997**.

STORGAARD H, SONG XM, JENSEN CB, MADSBAD S, BJORNHOLM M, VAAG A, ZIERATH JR. Insulin Signal Transduction in Skeletal Muscle From Glucose-Intolerant Relatives With Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 50: 2770-2778, **2001**.

STOUTHARD JM, OUDE ELFERINK RP, SAUERWEIN HP. Interleukin-6 enhances glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 220: 241-245, **1996**.

STRAUS DS. Effects of insulin on cellular growth and proliferation. *Life Sci*, 29: 2131-2139, **1981**.

STUMVOLL M, HARING H. Insulin resistance and insulin sensitizers. *Horm Res*, 55: 3-13, **2001**.

SUN XJ, ROTHENBERG P, KAHN CR, BACKER JM, ARAKI E, WILDEN PA, CAHILL DA, GOLDSTEIN BJ, WHITE MF. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature*, 352: 73-77, **1991**.

TANTI JF, GREMEAUX T, VAN OBERGHEN E, LE MARCHAND-BRUSTEL Y. Serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 modulates insulin receptor signaling. *J Biol Chem*, 269: 6051-6057, **1994**.

TARTAGLIA LA, ROTHE M, HU YF, GOEDEL D. Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. *Cell*, 73: 213-216, **1993 a**.

TARTAGLIA LA, PENNICA P, GOEDEL D. Ligand passing: The 75 kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55 kDa-TNF receptor. *J Biol Chem*, 268: 18542-18548, **1993 b**.

THORBURN AW, GUMBINER B, BULACAN F, WALLACE P, HENRY RR. Intracellular glucose oxidation and glycogen synthase activity are reduced in non-insulin-dependent (type II) diabetes independent of impaired glucose uptake. *J Clin Invest*, 85: 522–529, **1990**.

TOKER A, NEWTON AC. Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J Biol Chem*, 275: 8271-8274, **2000**.

TOMAS E, TSAO TS, SAHA AK, MURREY HE, ZHANG Cc C, ITANI SI, LODISH HF, RUDERMAN NB. Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 16309-16313, **2002**.

TSAO TS, MURREY HE, HUG C, LEE DH, LODISH HF. Oligomerization state-dependent activation of NF-kappa B signaling pathway by adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30). *J Biol Chem*, 277: 29359-29362, **2002**.

TSIGOS C, PAPANICOLAOU DA, KYROU I, DEFENSOR R, MITSIADIS CS, CHROUSOS GP. Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on glucose regulation. *J Clin Endocrinol Metab*, 82: 4167–4170, **1997**.

UCHIDA T, MYERS MG, WHITE MF. IRS-4 mediates activation of PKB/Akt during insulin stimulation without inhibition of apoptosis. *Mol Cell Biol*, 20: 126-138, **2000**.

ULLRICH A, BELL JR, CHEN EY, HERRERA R, PETRUZELLI LM, DULL TJ, GRAY A, COUSSENS L, LIAO YC, TSUBOKAWA M, MASON A, SEEBURG PH, GRUNFELD C, ROSEN OM, RAMACHANDRAN J. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature*, 313: 756-761, **1985**.

VANDENABEELE P, DECLERQ W, BEYAERT R, FIERS W. Two tumor necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol*, 5: 392-399, **1995**.

VANHAESEBROECK B, ALESSI DR. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J*, 346: 561-576, **2000**.

VESTERGAARD H, LUND S, LARSEN FS, BJERRUM OJ, PEDERSEN O. Glycogen synthase and phosphofructokinase protein and mRNA levels in skeletal muscle from insulin-resistant patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 91: 2342–2350, **1993**.

VIRKAMAKI A, UEKI K, KAHN R. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*, 103: 931-943, **1999**.

VOZAROVA B, WEYER C, HANSON K, TATARANNI PA, BOGARDUS C, PRATLEY RE. Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes Res*, 9: 414–417, **2001**.

WAKI H, YAMAUCHI T, KAMON J, KITA S, ITO Y, HADA Y, UCHIDA S, TSUCHIDA A, TAKEKAWA S, KADOWAKI T. Generation of Globular Fragment of Adiponectin by Leukocyte Elastase Secreted by Monocytic Cell Line THP-1. *Endocrinology*, epub Nov 4, **2004**.

WALKER KS, DEAK M, PATERSON A, HUDSON K, COHEN P, ALESSI DR. Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B alpha. *Biochem J*, 331: 299-308, **1998**.

WALLENIUS V, WALLENIUS K, AHREN B, RUDLING M, CARLSTEN H, DICKSON SL, OHLSSON C, JANSSON JO. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med*, 8: 75-79, **2002**.

WEIGERT C, BRODBECK K, STAIGER H, KAUSCH C, MACHICAO F, HARING HU, SCHLEICHER ED. Palmitate, but not unsaturated fatty acids, induces the expression of interleukin-6 in human myotubes through proteasome-dependent activation of nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem*, 279: 23942-23952, **2004**.

WERNER ED, LEE JH, HANSEN L, YUAN M, SHOELSON SE. Insulin resistance due to phosphorylation of insulin receptor substrate-1 at serine 302. *J Biol Chem*, 279: 35298-35305, **2004**.

WHITE MF. Insulin signalling in health and disease. *Science*, 302: 1710-1711, **2003**.

WHITE MF. IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 283: E413-E422, **2002**.

WOLF G, TRUB T, OTTINGER E, GRONINGA L, LYNCH A, WHITE MF, MIYAZAKI M, LEE J, SHIELSON SE. The PTB domains of IRS-1 and Shc have distinct but overlapping specificities. *J Biol Chem*, 270: 27407-27410, **1995**.

WU X, MOTOSHIMA H, MAHADEV K, STALKER TJ, SCALIA R, GOLDSTEIN BJ. Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. *Diabetes*, 52: 1355-1363, **2003**.

XU H, UYSAL KT, BECHERER JD, ARNER P, HOTAMISLIGIL GS. Altered tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) processing in adipocytes and increased expression of transmembrane TNF-alpha in obesity. *Diabetes*, 51: 1876-1883, **2002 a**.

XU H, HIROSUMI J, UYSAL KT, GULER AD, HOTAMISLIGIL GS. Exclusive action of transmembrane TNF alpha in adipose tissue leads to reduced adipose mass and local but not systemic insulin resistance. *Endocrinology*, 143: 1502-1511, **2002 b**.

XU H, SETHI JK, HOTAMISLIGIL GS. Transmembrane tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits adipocyte differentiation by selectively activating TNF receptor 1. *J Biol Chem*, 274: 26287-26295, **1999**.

YAMAUCHI T, KAMON J, MINOKOSHI Y, ITO Y, WAKI H, UCHIDA S, YAMASHITA S, NODA M, KITA S, UEKI K, ETO K, AKANUMA Y, FROGUEL P, FOUFELLE F, FERRE P, CARLING D, KIMURA S, NAGAI R, KAHN BB, KADOWAKI T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*, 8: 1288-1295, **2002**.

YAMAUCHI T, KAMON J, WAKI H, IMAI Y, SHIMOZAWA N, HIOKI K, UCHIDA S, ITO Y, TAKAKUWA K, MATSUI J, TAKATA M, ETO K, TERAUCHI Y, KOMEDA K, TSUNODA M, MURAKAMI K, OHNISHI Y, NAITOH T, YAMAMURA K, UHEYAMA Y, FROGUEL P, KIMURA S, NAGAI R, KADOWAKI T. Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. *J Biol Chem*, 278: 2461-2468, **2003**.

YAZDANI-BIUKI B, STELZEL H, BREZINSCEK HP, HERMANN J, MUELLER T, KRIPPL P, GRANINGER W, WASCHER TC. Improvement of insulin sensitivity in insulin resistant subjects during prolonged treatment with anti-TNF-alpha antibody Infliximab. *Eur J Clin Invest*, 34: 641-642, **2004**.

YENUSH L, ZANELLA C, UCHIDA T, BERNAL D, WHITE MF. The pleckstrin homology and phosphotyrosine binding domains of insulin receptor substrate 1 mediate inhibition of apoptosis by insulin. *Mol Cell Biol*, 18: 6784-6794, **1998**.

YOKOTA T, MEKA CS, MEDINA KL, IGARASHI H, COMP PC, TAKAHASHI M, NISHIDA M, ORITANI K, MIYAGAWA J, FUNAHASHI T, TOMIYAMA Y, MATSUZAWA Y, KINCADE PW. Paracrine regulation of fat cell formation in bone marrow cultures via adiponectin and prostaglandins. *J Clin Invest*, 109: 1303-1310, **2002**.

YUDKIN JS, STEHOUWER CD, EMEIS JJ, COPPACK SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19: 972-978, **1999**.

YUSUF S, GERSTEIN H, HOOGWERF B, POGUE J, BOSCH J, WOLFFENBUTTEL BH, ZINMAN B. HOPE Study Investigators. Ramipril and the development of diabetes. *JAMA*, 286: 1882-1885, **2001**.

ZIMMET P, ALBERTI KG, SHAW J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 414: 782-787, **2001**.

7. Abkürzungsverzeichnis

Akt	Proteinkinase B
Ang II	Angiotensin II
BSA	Rinderserumalbumin
DMEM-Medium	Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	Verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FCS	Fötale Kälberserum (auch Rinderserum)
GLUT	Glucosetransporter
GSK	Glycogensynthasekinase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-N-2-ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
IKK	Inhibitor der κ B Kinase
IL-6	Interleukin-6
IP	Immunopräzipitation
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
IR	Insulinrezeptor
JNK	c-Jun-NH ₂ -terminale Kinase
NF κ B	Nuklearer Faktor κ B
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDK	Phospholipidabhängige Kinase
PH-Domäne	Pleckstrin homologe Domäne
PI-3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B (entspr. Akt)
PKC	Proteinkinase C
PTB-Domäne	Phosphotyrosinbindende Domäne
PVDF	Polyvinylidendifluorid
pY	Phosphotyrosin
RIPA	Radioimmunopräzipitationsassay
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH2-Domäne	Src-homologe Domäne
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin Tris Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Co-Kultur	24
Abbildung 2: Schematische Übersicht aller Versuche	31
Abbildung 3: Expression von IRS-1, Akt und GSK3 nach Co-Kultur mit Troglitazon	33
Abbildung 4: Die IRS-1 Phosphorylierung nach Co-Kultur mit Troglitazon	35
Abbildung 5: Die Akt Phosphorylierung nach Co-Kultur mit Troglitazon	36
Abbildung 6: Die GSK3 Phosphorylierung nach Co-Kultur mit Troglitazon	38
Abbildung 7: Die IRS-1 und Akt Phosphorylierung nach TNF α und Troglitazon Behandlung	40
Abbildung 8: Die IRS-1 Expression nach TNF α und Troglitazon Behandlung	41
Abbildung 9: Die zeitabhängige IRS-1 und Akt Expression und Phosphorylierung nach TNF α Behandlung	42
Abbildung 10: Die GSK3 Phosphorylierung nach TNF α Behandlung	43
Abbildung 11: Die IRS-1 und Akt Phosphorylierung nach Co-Kultur mit Infliximab	45
Abbildung 12: Die Akt Phosphorylierung nach IL-6 Behandlung	46
Abbildung 13: Die IRS-1 Phosphorylierung nach Angiotensin und Candesartan Behandlung	47
Abbildung 14: Die Akt und IRS-1 Phosphorylierung und Akt Expression nach Behandlung mit Angiotensin und Candesartan	48
Abbildung 15: Die Akt Phosphorylierung und Expression nach Resistin Behandlung	49
Abbildung 16: Die GSK3 Phosphorylierung nach Resistinbehandlung	50
Abbildung 17: Die Akt und GSK3 Phosphorylierung nach Behandlung mit Fettzellüberständen	53
Abbildung 18: Die Akt Phosphorylierung nach Behandlung mit Fettzellüberständen	54

Abbildung 19: Die Akt Phosphorylierung in Abhängigkeit von den verwendeten Spendern	55
Abbildung 20: Die Akt Phosphorylierung nach Auftrennung der Fettzellüberstände	56
Abbildung 21: Die Akt Phosphorylierung nach Behandlung mit fraktionierten Fettzellüberständen	57
Abbildung 22: Silbergelauftrennung eines inhibitorisch wirksamen und eines unwirksamen Überstands	58
Abbildung 23: BSA Sequenz im Massenspektrometer	59
Abbildung 24: Die Akt Phosphorylierung nach Behandlung mit Fettzellüberständen und JNK Inhibitor	60
Abbildung 25: Aktivierung der P65 durch TNF α und Inhibition durch den IKK-Inhibitor	61
Abbildung 26: P65 Phosphorylierung nach Behandlung mit Fettzellüberständen	62
Abbildung 27: Die Akt Phosphorylierung nach Co-Kultur mit IKK-Inhibitor	63
Abbildung 28: Die Akt Phosphorylierung nach Co-Kultur mit Adiponectin	65
Abbildung 29: Die Akt Phosphorylierung nach Behandlung mit Adiponectin	66
Abbildung 30: Die Akt Phosphorylierung nach Behandlung mit Fettzellüberständen und Adiponectin	67
Abbildung 31: Die Akt Phosphorylierung nach Behandlung mit in Gegenwart von Adiponectin konditionierten Fettzellüberständen	68
Abbildung 32: Silbergelauftrennung von in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Adiponectin konditionierten Fettzellüberständen	70
Abbildung 33: Schematische Übersicht der Ergebnisse bezogen auf die Insulinsignalweiterleitung im humanen Skelettmuskel.	71

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgesellschaft im Rahmen der Forschergruppe 441, Teilprojekt 7; durch das Ministerium für Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen; durch EU COST Action B 17, durch Zuschüsse von Sankyo Co., Tokyo, und von Aventis Pharma, Frankfurt, unterstützt.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. R.Olbrisch und seinem Team der Abteilung für plastische Chirurgie des Florence-Nightingale-Krankenhauses in Düsseldorf für die Unterstützung in der Gewinnung von Fettgewebsproben.

Weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jürgen Eckel. Ihm möchte ich ganz besonders danken, dass er es mir ermöglichte, diese interessante Arbeit in seiner Arbeitsgruppe am Deutschen-Diabetes-Forschungsinstitut durchzuführen. Ihm danke ich für die intensive Unterstützung, seine stete Diskussionsbereitschaft, sein entgegengebrachtes Interesse an meiner Arbeit und seine hilfreichen Ratschläge. Außerdem ermöglichte er es, durch die Teilnahme an einer Reihe von Kongressen Anregungen und Ideen zu sammeln.

Herrn Prof. Dr. Frank Wunderlich möchte ich für die Übernahme des Korreferats und das Interesse an der Arbeit danken.

Allen in der Arbeitsgruppe danke ich für die freundliche Atmosphäre. Besonders danke ich Marlis für die ausgezeichnete Einarbeitung, Birgit für die Hilfe bei so manchen Problemen, Mark für die fachlichen Diskussionen, Steffi für die Unterstützung, wenn es zeitlich wieder eng wurde, Dani einfach für alles und allen zusammen für die vielen lustigen und glücklichen Stunden.

Danke auch der Unterstützung von Frau Schubert, die sich täglich um den Laborspül kümmerte, den Putzfrauen, den Damen von der Zentrale, von denen man morgens mit einem Lächeln begrüßt wurde, Frau Stangwald und Frau Blaha für die offenen Ohren, Frau Ullrich und Frau Schrubkowski für die schnelle Bearbeitung von Bestellungen, wenn es mal wieder schnell gehen musste, und all denen, die sich für einen reibungslosen Ablauf der Forschung einsetzen.

Schließlich danke ich ganz besonders meinen Eltern für die lange und liebevolle Unterstützung, meinem Bruder Michael, seiner Frau Melanie und Ihrem Sohn Sebastian, meiner Schwägerin Susanne und meinen Schwiegereltern für die stete Anteilnahme am Fortschreiten der Dissertation und vor allem meinem Mann Oliver für seine Geduld und sein Verständnis, wenn das Wochenende wieder vor dem Computer oder im Labor verbracht wurde.