Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Kinder- und Jugendmedizin

Ärztlicher Direktor:
Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

Wirkung von Resveratrol auf die Biologie humaner Fettzellen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

Vera Kukulus
Geburtsort Ichenhausen

2007

Amtierender Dekan: Prof. Dr. med. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martin Wabitsch

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Nikolaus Marx

Tag der Promotion: 19.06.2008

Inhaltsverzeichnis **Seite**

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1. Fragestellung 3

2. Material und Methoden 4

2.1. Material 4

2.1.1. Biologisches Material 4
2.1.2. Reagenzien 4
2.1.3. Radiochemikalien 5
2.1.4. Enzyme und Kits 5
2.1.5. Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone 5
2.1.6. Primer 6
2.1.7. Sonstige Materialien und Geräte 6

2.2. Methoden 7

2.2.1. Methoden der Zellkultur 7
2.2.2. Zellbiologische Methoden 9
2.2.3. Nachweis und Quantifizierung von Apoptose 11
2.2.4. Molekularbiologische Methoden 13
2.2.5. Statistische Methoden 19

3. Ergebnisse 20

3.1. Untersuchungen zur Proliferation 20

3.2. Untersuchungen zur adipogenen Differenzierung 23

3.3. Untersuchungen zur Apoptosesensitivität 28

3.4. Untersuchungen zur endokrinen Funktion der Fettzelle 32

4. Diskussion 38

4.1. Größe des Fettgewebes 39

4.1.1. Proliferation 40
4.1.2. Adipogene Differenzierung 41
4.1.3. Apoptosesensitivität 42

4.2. Endokrine Funktion der Fettzelle 44

4.3. Pharmakologische Aspekte 53

5. Zusammenfassung 55

6. Literaturverzeichnis 57

Danksagung 62

Lebenslauf 63

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMP	Adenosin-Monophasphat
AMPK	AMP-activated protein kinase
bp	Basenpaare
ca.	Circa
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
C/EBPa	CCAAT/enhancer-binding Protein
cpm	counts per minute
CRP	C-reaktives Protein
d	day
DDT	Dithiothreitol
D-MEM:F	Zellkulturmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ED 50	mittlere Effektivdosis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
F	forward
0F	serumfreies Zellkulturmedium
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
FOXO1	forkhead transcription factor O1
FSC	forward scatter
FIRKO	fat-specific insulin receptor knock out
G_0/G_1	Generationsphase 0 / Generationsphase 1
H	hour
^3H	Wasserstoff-Isotop
HC	high caloric diet
HCl	Chlorwasserstoff
HCR	high caloric diet + resveratrol
H_2O	Wasser

IBMX	Isobutylmethylxanthin
IL-1beta	Interleukin 1 beta
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
KO	knock out
MC3T3-E1	Osteoblasten-Zelllinie
Med	Medium
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
mRNA	messenger ribonucleic acid
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
ob	obese
OGTT	Oraler Glukose-Toleranztest
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	potentia Hydrogenii
PPARgamma	peroxisome proliferator-activated factor gamma
R	reverse
Res	Resveratrol
RNA	ribonucleic acid
RNAse	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase
SD	standard diet
SGBS	Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom
Sir2	Sirtuin
SIRT1	Sirtuin
Sp1	stimulating protein 1, ubiquitäres Kernprotein
SSC	Side Scatter
STACs	Sirtuin Activating Compounds
T3	Trijodthyronin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Essigsäure + EDTA
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus*
3T3-L1	Adipozyten-Zelllinie
TNFalpha	Tumor-Nekrose-Faktor alpha

UV-Licht	Ultraviolettes Licht

1. Einleitung

Schon in den griechischen und römischen Hochkulturen war bekannt, dass durch eine Reduktion der Nahrungsaufnahme die Gesundheit des Menschen positiv beeinflusst werden kann (20). Die erste wissenschaftliche Studie, die den Zusammenhang zwischen Kalorienrestriktion und Verlängerung der Lebensspanne untersuchte, wurde von McCay 1935 an Ratten durchgeführt. Bei den Ratten, die mit einer karlorienreduzierten Diät gefüttert wurden, zeigte sich eine deutliche Verlängerung der Lebensspanne (66). Heute ist aus verschiedenen Arbeiten bekannt, dass eine Kalorienrestriktion zu einer Verlangsamung des Alterungsprozesses und zu einer Verlängerung der Lebensspanne führt (17, 27, 38, 47, 58, 66, 76). Dieser Effekt konnte bereits in den verschiedensten Organismen wie Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) (30, 40), Würmern (*Caenorhabditis elegans*) (76) und Fliegen (*Drosophila melanogaster*) (76), aber auch bei Säugetieren wie Mäusen und Ratten gezeigt werden (17, 27, 47, 58, 66, 76).

Eine vergleichbare Wirkung wie bei einer Kalorienreduktion konnte in den Modellorganismen durch Gabe bestimmter sekundärer Pflanzenstoffe erzielt werden. Als besonders effektiv hat sich dabei das Polyphenol Resveratrol erwiesen (47). Resveratrol wird von Pflanzen bei ungünstigen Bedingungen wie beispielsweise Infektionen mit pathogenen Keimen als eine Art Pflanzenantibiotikum synthetisiert.

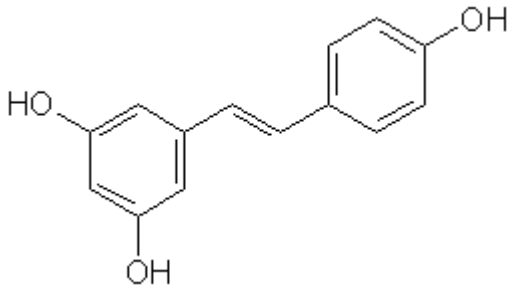


Abb. 1: Strukturformel von Resveratrol (4, S.494).

Bisher wurde Resveratrol in 72 Pflanzenarten gefunden, innerhalb der Nutzpflanzen nur in Erdnüssen, Heidelbeeren und hauptsächlich in Weintrauben. Resveratrol ist somit auch in bemerkenswerten Konzentrationen in Rotwein enthalten (22, 55) und wird deshalb mit dem „Französischen Paradox“ in Verbindung gebracht. In Frankreich findet man trotz

ähnlicher Nahrungszusammensetzung und Lebensweise eine geringere Prävalenz für das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen als in anderen Industrieländern. Dies wird auf den regelmäßigen, aber gemäßigten Konsum von Rotwein zurückgeführt (55, 71).

Tab. 1: Resveratrolkonzentration in verschiedenen aus Weintrauben gewonnenen Produkten (22).

Aus Weintrauben gewonnene Produkte:	**Resveratrolkonzentration:**
Schale frischer Weintrauben	50-100 µg/g
Rotwein	1,5-3 mg/l

In verschiedenen Studien wurde bereits ein anti-atherosklerotischer (21, 57), anti-kanzerogener (12, 24, 55, 57) und anti-inflammatorischer (19) Effekt von Resveratrol nachgewiesen. In den letzten Jahren konnten einige molekulare Mechanismen entschlüsselt werden, die eine Verbindung zwischen einer Kalorienreduktion und dem Alterungsprozess herstellen. Es wurde gezeigt, dass eine Reduktionskost zur Induktion des Enzyms Sirt1 führt. Sirt1 ist eine NAD^+-abhängige Deacetylase und wird in die Proteinfamilie der Sirtuine eingeordnet, die insgesamt sieben Mitglieder umfasst (Sirt1-7) (38). Sirt1 kann auf verschiedenste Signalwege regulatorisch einwirken. Vor allem die Regulation von Zellzyklus, Apoptose und DNA-Reparaturmechanismen kann den Alterungsprozess beeinflussen (17, 27, 38, 47, 49, 58, 62, 66, 76). Wood et al. konnten den oben beschriebenen Pflanzenstoff Resveratrol als Aktivator der Sirt1 Deacetylase identifizieren und somit einen molekularen Mechanismus beschreiben, der den Einfluss des Polyphenols auf die Lebensdauer verschiedener Organismen erklären könnte (76).

Von Blüher et al. konnte an einem Mausmodell gezeigt werden, dass schon allein die Reduktion des weißen Fettgewebes zu einer Lebensverlängerung führt. Die sogenannten FIRKO-Mäuse (fat-specific insulin receptor knockout), die spezifisch im weißen Fettgewebe keinen Insulinrezeptor exprimieren und aus diesem Grund sehr wenig Fettgewebe besitzen, leben deutlich länger als Mäuse vom Wildtyp (6).

Da scheinbar eine Veränderung der Größe und Hormonsekretion des Fettgewebes den Alterungsprozess beeinflusst, soll in der folgenden Arbeit untersucht werden, inwiefern Resveratrol diese Parameter verändert. Um die Wirkung von Resveratrol auf die Biologie humaner Adipozyten und Präadipozyten zu untersuchen, wurde als *in vitro*-Modell die humane Fettzelllinie SGBS (Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom) verwendet. Zwar wurde

in einer Arbeit von Picard et al. bereits in einem *in vitro*-Modell der Einfluss von Resveratrol auf eine murine Adipozytenzelllinie (3T3-L1) gezeigt (58), über die Wirkung auf humane Fettzellen liegen jedoch noch keine Daten vor.

1.1. Fragestellung

In der folgenden Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluss Resveratrol auf die Größe des Fettgewebes hat. Die Größe des Fettgewebes wird zum einen durch die Anzahl der darin enthaltenen Adipozyten beeinflusst. Die Anzahl der Adipozyten im Fettgewebe kann durch die Proliferationsrate von Präadipozyten und die Apoptoserate sowohl von Präadipozyten als auch von Adipozyten verändert werden. Zum anderen ist die Größe des Fettgewebes abhängig vom Differenzierungsgrad und vom Lipidgehalt der einzelnen Adipozyten. In der vorliegenden Arbeit wurde die Proliferation, die Apoptosesensitivität und die Differenzierung von humanen SGBS Präadipozyten und Adipozyten unter dem Einfluss von verschiedenen Resveratrolkonzentrationen untersucht, um zu sehen, ob diese Parameter durch Resveratrol im Sinne einer Reduktion der Fettmasse verändert werden.

Eine weitere Funktion des Fettgewebes ist die Sekretion einer Vielzahl verschiedener Hormone, der sogenannten Adipokine. Bei Adipositas ist das Sekretionsmuster des Fettgewebes verändert. Die veränderten Adipokinspiegel sind in die Entwicklung Adipositas-assoziierter Erkrankungen involviert. Hier wurde daher untersucht, ob Resveratrol die endokrine Funktion von Präadipozyten und Adipozyten und somit die mit der Adipositas einhergehende Veränderung der Adipokinsekretion beeinflussen kann. Die Expression und Sekretion ausgewählter Adipokine (Adiponectin, Leptin, IL-6, IL-8) wurde unter dem Einfluss von verschiedenen Resveratrolkonzentrationen untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Biologisches Material

Für alle Versuche wurde die bereits im Labor verwendete und etablierte Präadipozyten-Zelllinie SGBS (Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom) verwendet (71).

2.1.2 Reagenzien

Aqua ad injectabile	Braun, Melsungen
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Biotin	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Fluka, Neu-Ulm
Coulter Clenz™	Beckmann Coulter, Krefeld
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DDT)	Sigma, Deisenhofen
D-MEM:F 12 (1:1)	
+L-Glutamine	
+15mM Hepes	Gibco Life Tech, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
FACSFlow™	Becton Dickinson, Heidelberg
FACSRinse™	Becton Dickinson, Heidelberg
FACSClean™	Becton Dickinson, Heidelberg
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco Life Tech, Karlsruhe
Glycerol	Fluka, Neu-Ulm
Isopropanol	Fluka, Neu-Ulm
3-Isobutyl-1-Methylxanthin	Sigma, Deisenhofen
dNTPs	Gibco Life Tech, Karlsruhe
Pantothenat	Sigma, Deisenhofen
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen

PBS Puffer	Seromed, Berlin
Penicillin-Streptomycin	Biochrom, Berlin
Propidiumiodid	Sigma, Deisenhofen
Red Oil O	Sigma, Deisenhofen
Resveratrol	Sigma, Deisenhofen
Staurosporin	Sigma, Deisenhofen
Transferrin, ironpoor	Sigma, Deisenhofen
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trizol	Gibco Life Tech, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin

2.1.3 Radiochemikalien

^{3}H-Thymidin (spezifische Aktivität 25 Ci/mmol)	Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK

2.1.4 Enzyme und Kits

Superscript^{TM}II RNase H^{-} Reverse Transcriptase	Gibco Life Tech, Karlsruhe
Taq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden

2.1.5 Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone

Cortisol	Sigma, Deisenhofen
Dexamethason	Sigma, Deisenhofen
Insulin	Novo Nordisk, Gentofte, DK
3, 3´, 5-Trijodo-L-Thyronin	Sigma, Deisenhofen

Rosiglitazon (BRL 49563), ein Thiazolidindion, wurde von der Firma Glaxo Smith Kline (Worthing, England) zur Verfügung gestellt.

2.1.6 Primer

Tab. 2: Verwendete Primer zur Amplifikation der Gene von Leptin, Adiponectin, IL-6, IL-8 und Sp1.

Gen	Länge	Oligonukleotidsequenz	Accessions-Nr.
Leptin	20	F: 5´-GCC CTA TCT TTT CTA TGT CC-3´	U 18915
	19	R: 5´-TCT GTG GAG TAG CCT GAA G-3´	
Adiponectin	19	F: 5´-CTG GGA GCT GTT CTA CTG C-3´	NM_004797
	19	R: 5´-GTC TCC AAT CCC ACA CTG A-3´	
Il-6	20	F: 5´-TAG CCG CCC CAC ACA GAC AG-3´	NM_000600
	20	R: 5´-GGC TGG CAT TTG TGG TTG GG-3´	
Il-8	23	F: 5´-CTG TGT GAA GGT GCA GTT TTG CC-3´	BT 007067
	23	R: 5´-CTT CTC CAC AAC CCT CTG CAC CC-3´	
Sp1	20	F: 5´-CTA CCA GTG GAT CAT CAG GG-3´	NM_138473
	20	R: 5´-CTG ACA ATG GTG CTG CTT GG-3´	

Die verwendeten PCR-Primer (F=forward, R=reverse) wurden von Dr. Pamela Fischer-Posovszky, endokrinologisches Forschungslabor der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Ulm, ermittelt und von der Firma Thermo Electron GmbH, Ulm synthetisiert.

2.1.7. Sonstige Materialien und Geräte

25 cm^2, 75 cm^2, 175 cm^2 Zellkulturflaschen	Becton Dickinson, Heidelberg
12-, 24-Loch-Gewebekulturplatten	Becton Dickinson, Heidelberg
0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
1, 2, 5, 10, 25 ml Polystyrenpipetten	Becton Dickinson, Heidelberg
1,8 ml Cryotubes	Nunc, Wiesbaden
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Coulter Counter	Coulter, Krefeld
Digitalkamera CC-12	Olympus, Hamburg
Durchflußzytometer FACScalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Geldokumentation/UV-Schirm	Hama, Monheim
Gel-Gieß-Schlitten	PeqLab, Erlangen
Gelkammer Typ B2	PeqLab, Erlangen

Gelschlitten 14x14 cm	PeqLab, Erlangen
Mikroskop BX300	Leitz, Wetzlar
Zentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Biofuge PICO	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Varifuge 3. ORS	Heraeus, Hanau

2.2. Methoden

2.2.1. Methoden der Zellkultur

2.2.1.1. Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die Zellen wurden in Zellkulturmedium bei 37°C, 5% CO_2-Konzentration und wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Brutschrank kultiviert. Jeden dritten oder vierten Tag fand ein Medienwechsel statt.

2.2.1.2. Kultivierung von SGBS Zellen

SGBS Zellen stammen ursprünglich aus dem subkutanen Fettgewebe eines Patienten mit Simpson-Golabi-Behmel Syndrom (72). Diese Zellen besitzen die Fähigkeit zur Proliferation und zur adipogenen Differenzierung *in vitro*. Diese Fähigkeit bleibt nur für 80-90 Passagen erhalten, da es sich nicht um eine transformierte und immortalisierte Zelllinie handelt. Mit zunehmender Generationszahl nimmt die Fähigkeit zur adipogenen Differenzierung ab. Aus diesem Grund wurden im Abstand von drei Monaten immer wieder frische Zellen aus einem Zellpool aufgetaut. Die dauerhafte Lagerung des Zellpools erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -192°C.

Die Zellen wurden in dem Zellkulturmedium D-MEM:F 12 der Firma Gibco Life Tech kultiviert, das mit 33µM Biotin, 17µM Pantothenat und 100 U/l Penicillin/Streptomycin versetzt wurde. Dieses Medium wurde zusätzlich mit 10% FCS angereichert, um das Wachstum der Zellen nach dem Auftauen zu ermöglichen. Bei Konfluenz wurden die adhärent wachsenden Zellen trypsiniert (5 min., 37°C, 0,05 % Trypsin / 0,02 % EDTA) und danach mit frischem Medium wieder ausgesät. Für die Versuche wurden die Zellen je nach Versuchsaufbau in Kuturmedium mit oder ohne 10 % FCS kultiviert.

Die folgende Tabelle zeigt im Überblick die verwendeten Gefäße und die Aussaatdichte für die einzelnen Versuche:

Tab. 3: Überblick über Aussaatdichte und verwendete Gefäße (0F: serumfreies Zellkulturmedium; 0F+10 % FCS: Zellkulturmedium mit 10 % fetalem Kälberserum).

Versuch:	**Zelltyp:**	**Medium:**	**Gefäß:**	**Aussaatdichte:**
Morphologische Zellzählung	Präadipozyten	0F+10 % FCS	12-well	1300 Zellen/cm^2
^{3}H-Thymidininkorporation	Präadipozyten	0F+10 % FCS	24-well	2500 Zellen/cm^2
Differenzierung	Adipozyten	0F	12-well	5000 Zellen/cm^2
Apoptose	Präadipozyten	0F	12-well	5000 Zellen/cm^2
	Präadipozyten	0F+10 % FCS	12-well	5000 Zellen/cm^2
	Adipozyten	0F	12-well	5000 Zellen/cm^2

2.2.1.3. Adipogene Differenzierung von SGBS Zellen

Die Differenzierung von Präadipozyten zu differenzierten Adipozyten kann *in vitro* durch Zugabe eines adipogenen Differenzierungsmediums erreicht werden (28). Dieses enthält die auch *in vivo* für die Differenzierung notwendigen Hormone Insulin, Cortisol, Trijodthyronin und Dexamethason. Zusätzlich benötigen die Zellen den für die Stimulation der Adipogenese wichtigen Transkriptionsfaktor PPARgamma, der durch das Thiazolidindion Rosiglitazon (BRL) aktiviert wird. Für den Differenzierungsprozess wird außerdem die Zugabe von Dexamethason und Isobutylmethylxanthin (IBMX) benötigt.

Differenzierungsmedium I:	0,01 mg/ml	Transferrin
	10 nM	Insulin
	100 nM	Cortisol
	0,2 nM	Trijodthyronin (T3)
	25 nM	Dexamethason
	250 µM	IBMX
	2 µM	Rosiglitazone
Differenzierungsmedium II:	0,01 mg/ml	Transferrin
	10 nM	Insulin
	100 nM	Cortisol
	0,2 nM	Trijodthyronin

Die SGBS Präadipozyten wurden in serumhaltigem Zellkulturmedium kultiviert, bis sie 70-80% konfluent waren. Vor Zugabe des adipogenen Differenzierungsmediums wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, um einen negativen Einfluss von Faktoren aus dem Serum auf die Adipogenese gering zu halten. Die Zellen wurden nun von Tag 0 bis 4 mit Differenzerungsmedium I inkubiert, im Anschluß daran weitere 10 Tage mit Differenzierungsmedium II, das nach 5 Tagen gewechselt wurde. Nach 14 Tagen erhielt man differenzierte Adipozyten mit prall gefüllten Fettvakuolen.

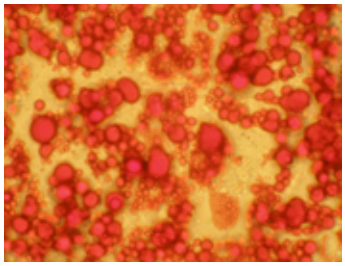


Abb. 2: Differenzierte Adipozyten (Tag 14, Red Oil O-Färbung)

2.2.1.4. Stimulation mit Resveratrol

Zur Herstellung der Resveratrol-Stammlösung wurde Resveratrol in Pulverform in Lösungsmittel (DMSO) in einer Konzentration von 100 mM aufgelöst. Aus der Resveratrol-Stammlösung wurde durch Verdünnung mit Zellkuturmedium je nach Versuchsreihe Resveratrollösung in den Konzentrationen 1 mM, 3 mM, 10 mM, 30 mM, 50 mM, und 100 mM hergestellt. Die Resveratrollösungen wurden daraufhin mit Medium im Verhältnis 1:1000 verdünnt. Somit erhielt man Medium mit den Resveratrolkonzentrationen 1 µM, 3 µM, 10 µM, 30 µM, 50 µM und 100 µM, mit dem die Zellen je nach Versuchsansatz inkubiert wurden. Als Lösungsmittelkontrolle wurde jeweils DMSO entsprechend der DMSO-Konzentration bei 100 µM Resveratrol mitgeführt, um einen Lösungsmittel-abhängigen Effekt auszuschließen.

2.2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.2.1. Mikroskopische Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl kann mikroskopisch durch morphologische Zellzählung der in Monolayer-Kulturen wachsenden adhärenten Zellen ermittelt werden. Die Zellen wurden in 12-Loch-Platten mit einer Dichte von ca. 1300 Zellen pro cm^2 (5000 Zellen pro Loch) ausgesät und

anschließend an Tag 0, 1, 2 und 3 nach der Stimulation mit Resveratrol ausgezählt. Die Zählungen wurden mit Hilfe eines Netzmikrometers bei 20facher Vergrößerung ausgeführt, wobei pro Konzentration neun zufällig ausgewählte Areale gezählt wurden und der Mittelwert bestimmt wurde.

2.2.2.2. ^{3}H-Thymidininkorporation

Die SGBS Zellen wurden in 24-Loch-Platten mit einer Dichte von 2500 Zellen pro cm^2 (5000 Zellen pro Loch) ausgesät. Am nächsten Tag wurden sie mit frischem Medium versetzt, das die zu untersuchenden Faktoren enthielt. Nach 72 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen für weitere 12 Stunden zusätzlich mit 2,5 µCi ^{3}H-markiertem Thymidin (methyl-^{3}H-Thymidin, spezifische Aktivität 25 Ci/mmol) pro Loch inkubiert. Dann wurden die Zellen trypsiniert und mit einem dafür vorgesehenen Gerät (Cell Harvester, Inotech) auf Filter gesaugt. Die getrockneten Filter wurden mit Szintilatinsflüssigkeit überzogen. An einem Szintillationszähler (NXT^{TM}, Top Count) wurde die Inkorporation von radioaktivem Thymidin in die DNA als „counts per minute (cpm)“ ermittelt. Die cpm korrelieren mit der Teilungsrate der Zellen. Die verschiedenen Resveratrolkonzetrationen und die Lösungsmittlelkontrolle wurden jeweils in Triplikaten angesetzt. Als Kontrolle wurde jeweils die Lösungsmittelkontrolle in einer Konzentration entsprechend 100 µM Resveratrol mit angesetzt, um einen DMSO-vermittelten Effekt auszuschließen.

2.2.2.3. Bestimmung der Differenzierungsrate

Die SGBS Zellen wurden in 12-Loch Platten mit einer Dichte von ca. 5260 Zellen pro cm^2 (20000 Zellen pro Loch) ausgesät. Die Präadipozyten waren nach drei Tagen in serumhaltigem Medium subkonfluent und konnten mit adipogenem Medium inkubiert werden. Nach Kultivierung mit adipogenem Medium konnte die Differenzierungsrate durch mikroskopisches Auszählen der Monolayer-Kulturen ermittelt werden. Zur Bestimmung der Differenzierungsrate wurden jeweils in 3 Löchern je 3 Zählungen durchgeführt. Unter dem Netzmikrometer wurde jeweils die Anzahl der Präadipozyten und der Adipozyten ermittelt. Die Adipozyten mussten mindestens fünf deutlich erkennbare Fettvakuolen enthalten. Um den Einfluss bestimmter Faktoren auf die Differenzierung zu ermitteln, wurden auch jeweils 3 Löcher pro Faktor angesetzt. Als Kontrolle wurde jeweils die Losungsmittelkontrolle in einer Konzentration entsprechend 100 µM Resveratrol mit

angesetzt, um einen DMSO-vermittelten Effekt auszuschließen. Aus den erhaltenen Zellzahlen wurde der Mittelwert gebildet und die Differenzierungsrate berechnet.

2.2.2.4. Red Oil Färbung

Mit der Red Oil Färbung können die intrazellulären Fettvakuolen der reifen Adipozyten dargestellt werden. Hierzu werden die Zellkulturen zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend drei Stunden mit Formalinlösung (10 % Formalin in PBS) bei 4°C fixiert. Nach Entfernung der Formalinlösung werden die Zellen eine Stunde mit einer Red Oil Lösung inkubiert. Zur Herstellung der Red Oil Lösung werden 0,35 g Red Oil O in 100 ml Isopropanol aufgelöst. Dieser Stock wird vor der Färbung mit destilliertem Wasser im Verhältnis 3/2 verdünnt und gefiltert. Nach Entfernung der Färbelösung werden die Zellen mindestens zwei Mal mit destilliertem Wasser gewaschen.

2.2.3. Nachweis und Quantifizierung von Apoptose

2.2.3.1. Stimulation von Apoptose

Für Apoptoseversuche wurden die SGBS Präadipozyten und Adipozyten in 12-Loch-Platten mit einer Dichte von ca. 5260 Zellen pro cm^2 (20 000 Zellen pro Loch) in serumhaltigem Kulturmedium ausgesät. Die Präadipozyten waren nach drei Tagen in serumhaltigem Medium subkonfluent und konnten für Versuche verwendet werden. Die Adipozyten wurden nach drei Tagen in serumhaltigem Kulturmedium dreimal mit PBS gewaschen und dann mit Differenzierungsmedium versetzt. Nach 14 Tagen Kultivierung erhielt man reife, mit Fettvakuolen gefüllte Adipozyten. Die Zellen wurden nur dann für Versuche verwendet, wenn sie bei morphologischer Betrachtung vital erschienen. Adipozyten wurden nur dann verwendet, wenn die Differenzierungsrate mehr als 80% betrug. Für die Apoptoseversuche wurden nun die SGBS Präadipozyten / Adipozyten dreimal mit PBS gewaschen und dann mit 1 ml frischem Medium pro Loch versetzt, das die aufsteigenden Resvertarolkonzentrationen enthielt. Für eine Konzentration wurden jeweils Triplikate angesetzt. Als Positivkontrolle wurde jeweils der Apoptoseinduktor Staurosporin in der Konzentration 2 µM mit angesetzt.

2.2.3.2. Ernte der stimulierten Zellen

Die Ernte der stimulierten Zellen fand nach 24, 48 und 72 Stunden statt. Aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften wurden Präadipozyten und Adipozyten nach unterschiedlichen Protokollen geerntet. Wichtig war bei beiden Protokollen, dass nicht nur die Zellen selbst, sondern auch Medienüberstände und eventuell zum Waschen verwendetes PBS in die FACS-Röhrchen überführt wurden, da nur so auch die nicht mehr adhärenten apoptotischen Zellen detektiert werden konnten. Die Präadipozyten wurden, nachdem das Medium abpipettiert worden war, mit PBS gewaschen, trypsiniert, mit Hilfe von PBS resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Röhrchen wurden zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet, das nun sowohl vitale als auch apoptotische Zellen enthielt, wurde mit 150 µl hypotoner, fluorochrimer Lösung (Nicoletti-Puffer) und Propidiumiodid versetzt und 24 Stunden bei 4°C inkubiert.

Nicoletti-Puffer für Präadipozyten:	0,1%	tri-Natrium-Citrat
(Medium mit 10% FCS)	0,1%	Triton X-100
	50 µg/ml	Propidiumjodid

Nicoletti-Puffer für Präadipozyten:	1%	tri-Natrium-Citrat
(Medium ohne 10% FSC)	0,1%	Triton X-100
	50 µg/ml	Propidiumjodid

Für die Bestimmung der Apoptoserate an *in vitro* differenzierten Adipozyten wurde das oben beschriebene Standardprotokoll modifiziert. Kulturen reifer Adipozyten in 12-Loch-Platten mit 1ml Medium wurden mit demselben Volumen 2-fach konzentrierter Färbelösung (100 µg/ml PI in 0,2 % tri-Natriumcitrat-Dihydrat und 0,2 % Triton X-100) versetzt. Nach 12 bis 24 Stunden Inkubation bei 4°C im Dunkeln wurde der gesamte Inhalt der Schälchen in FACS-Röhrchen überführt. Anschließend folgte die Analyse der Proben am Durchflußzytometer wie oben beschrieben.

Nicoletti-Puffer für Adipozyten:	1%	tri-Natrium-Citrat
	1%	Triton X-100
	50 µg/ml	Propidiumjodid

Anschließend konnten die Proben am Durchflußzytometer (FACScalibur) analysiert werden.

2.2.3.3. Detektion und Quantifizierung apoptotischer Zellen

Beim programmierten Zelltod zeigen sich typische morphologische und biochemische Veränderungen in der Zelle. Die Zellen werden kleiner und nehmen an Granularität zu, es findet eine Kondensation und Fragmentierung des Zellkerns statt. Diese Veränderungen apoptotischer Zellen können im Duchflußzytometer detektiert und quantifiziert werden.
Die Veränderung von Zellform und Dichte kann anhand der Vorwärts-/Seitwärtsstreulicht-Analyse („forward scatter (FSC)/side scatter (SSC)“) ermittelt werden. Durch die geringere Zellgröße apoptotischer Zellen nimmt das Vorwärtsstreulich-Signal ab, durch die zunehmende Granularität steigt das Seitwärtsstreulicht-Signal an. Eine apoptotische Zellpopulation kann also mit Hilfe des FSC/SSC-Profils identifiziert und quantifiziert werden.
Ein weiteres Merkmal von Apoptose ist die Fragmentierung genomischer DNA. Diese Fragmente können nach Einlagerung des fluoreszierenden Farbstoffes Propidiumjodid in die DNA mit dem Durchflußzytometer gemessen werden. Ein diploider DNA-Gehalt spricht für vitale Zellen, ein hypoploider DNA-Gehalt für Apoptose. Außerdem können mit dieser Methode Zellzyklusparameter erfasst werden.
Für die Messung am FACScalibur wurde der FSC bei linearer Skaierung auf Kanal 600, die G_o/G_1 Spitze wurde bei logarithmischer Skalierung auf log3 in FL-2 und bei linearer Skalierung ab Kanal 200 in FL-3 eingestellt. Diese Einstellungen ermöglichten die gleichzeitige Messung der Zellzyklusparameter sowie die Erfassung apoptotischer, hypodiploider Nuklei.

2.2.4. Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1. Isolierung von RNA

Die Isolierung der RNA aus den Zellen erfolgte durch das Reagenz TRIZOL™ der Firma Gibco/BRL. Dieses Reagenz besteht aus Phenol und Guanidinisothiocyanat und basiert auf der RNA-Isolierungsmethode von Chomczynski und Sacchi (15). Die Monolayer-Zellkulturen wurden mit 1 ml TRIZOL pro 10 cm^2 Kulturgefäßfläche lysiert, mehrmals

resuspendiert und in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Das Homogenisat wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform pro 1 ml TRIZOL wurde das Reaktionsgefäß 15 Sekunden geschüttelt, noch einmal 2-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 15 Minuten bei 14000 Umdrehungen pro Minute („rounds per minute (rpm)“) und 4°C zentrifugiert. Dadurch wurde die Emulsion in eine organische und eine wässrige Phase aufgetrennt. Die wässrige, RNA-haltige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 0,5 ml Isopropanol pro 1 ml TRIZOL Ausgangswert 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde noch einmal für 15 Minuten bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen und 5 Minuten bei 10000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet an der Luft getrocknet. Zuletzt wurde das Pellet in 50 µl RNase-freiem Wasser gelöst und 10 Minuten bei 60°C inkubiert. Aus dieser Lösung konnte nun die Konzentration der RNA bestimmt werden.

2.2.4.2. Konzentrationsbestimmung der RNA

Zur Konzentrationsbestimmung wurden 2 µl der RNA-Lösung in 58µl Wasser gegeben. Hieraus wurde mit dem Biophotometer (Eppendorf) photometrisch die Menge an RNA durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm gemessen. Eine OD_{260} von 1.0 entspricht 40 µg/ml RNA und damit ergibt sich die Formel zur Konzentrationsberechnung wie folgt:

$$\text{RNA-Konzentration [µg/ml]} = OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40$$

Zusätzlich wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm (OD_{280}) bestimmt, um die Verunreinigung der Lösung mit Proteinen zu beurteilen. Die Reinheit wurde als Quotient aus OD_{260}nm/OD_{280}nm berechnet. Bei einem Quotienten von 1.8 bis 20 wurde die Nukleinsäurelösung als rein betrachtet und weiterverarbeitet.

2.2.4.3. Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription wird die RNA mit einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase in cDNA (complementary-DNA) umgeschrieben. Für die Transkription wurde die reverse Transkriptase SUPERSKRIPT^{TM} II RNase H^- (Gibco, BRL) verwendet.

Zunächst wurde 0,5 µg RNA mit Wasser auf 11 µl aufgefüllt und mit 1 µl Random Primer 3 Minuten bei 85°C denaturiert, um die Sekundärstruktur der RNA aufzulösen. Die Random Primer sind Zufallshexamere, die mit der RNA an vielen Stellen Hybride bilden und so statistisch jedes RNA-Molekül mit gleicher Frequenz in cDNA umschreiben. Des Weiteren enthielt der Ansatz („Mastermix“) die für die Umschreibung nötigen Nukleotide (dNTPs) und Dithiothreitol (DDT) zur Stabilisierung der gelösten Enzyme.

Mastermix:	5 µl	5x 1st Strand Buffer
	2,5 µl	DDT (0,1 M)
	1 µl	dNTP (10 mM)
	1 µl	Superscript RT (200 U)
	1,5 µl	H_2O

Die denaturierte und mit Primern versetzte RNA wurde mit 11 µl Mastermix versetzt. So ergab sich pro Ansatz das Gesamtvolumen von 23 µl. Die Umschreibung erfolgte im Thermocycler (MJ Research) unter folgenden Bedingungen: 15 Minuten bei 37°C, 30 Minuten bei 45°C, 15 Minuten bei 50°C. Durch eine anschließende Denaturierung bei 95°C für 2 Minuten wurde die Reverse Transkriptase inaktiviert, da diese sonst durch Bindung an die cDNA eine Amplifizierung verhindern würde. Das Reaktionsprodukt wurde mit 177 µl Wasser auf 200 µl aufgefüllt und konnte weiterverwendet werden.

2.2.4.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In dieser Arbeit wurde eine spezielle semi-quantitative RT-PCR-Technik verwendet, die so genannte Multiplex-RT-PCR. Diese Methode erlaubt die Koamplifikation zwei verschiedener cDNA-Produkte in einem Gefäß. Dazu werden zwei Primerpaare gemeinsam in einem Ansatz verwendet, das eine Primerpaar ist spezifisch für ein zu untersuchendes Gen, das andere ist spezifisch für den Transkriptionsfaktor sp1. Dieser wird ubiquitär exprimiert, ist notwendig für die Transkription vieler Housekeeping Gene und kann als interne Kontrolle verwendet werden (32, 34) .
Die Primer waren so gewählt worden, dass für alle PCRs dieselbe Annealingtemperatur galt, die optimale Magnesiumkonzentration war im Vorfeld ermittelt worden. In Vorversuchen war die Zyklenzahl so gewählt worden, dass sich die Amplifikation beider Gene im exponentiellen Bereich befand und somit quantitative Aussagen über die

Expression des untersuchten Gens möglich waren. Um eine eventuelle Kontamination der verwendeten Lösungen auszuschließen, wurde stets ein Ansatz mit H_2O anstelle der cDNA pipettiert. In dieser Negativkontrolle sollten keine Banden auftreten. Um Kontaminationen mit DNA ausschließen zu können, wurde mit jeder cDNA eine PCR mit einem speziellen, Exon-überspannenden Primerpaar durchgeführt. Bei DNA-Kontamination ergab sich ein größeres PCR-Produkt (cDNA plus Exon) als bei einer reinen RNA-Präparation (cDNA ohne Exon).

Mastermix (mit sp1):	5 µl	10x Reaktionspuffer (Mg-frei)
	5 µl	Q-Solution
	0,5 µl	$MgCl_2$ (0,25 mM)
	0,5 µl	dNTP (10 mM)
	0,2 µl	sp1-Primerpaar (je 20 pmol/µl)
	0,5 µl	Primerpaar (je 20 pmol/µl)
	33 µl	H_2O
	0,3 µl	Taq-Polymerase

Mastermix (ohne sp1):	5 µl	10x Reaktionspuffer (Mg-frei)
	5 µl	Q-Solution
	1 µl	$MgCl_2$ (0,5 mM)
	0,5 µl	dNTP (10 mM)
	0,5 µl	Primerpaar (je 20 pmol/µl)
	32,7 µl	H_2O
	0,3 µl	Taq-Polymerase

Zu 5 µl der cDNA-Lösung wurden 45 µl dieses Ansatzes gegeben. Die Umschreibung erfolgte im Thermocycler unter folgenden Konditionen: 1 Minute bei 95°C (Denaturierung), dann x Zyklen mit 1 Minute 94°C, 1 Minute 57°C bzw. 56°C und 1 Minute 72°C, abschließend noch einmal 5 Minuten 72°C. Die Zyklenzahl (x) betrug je nach Gen 29 (Leptin, Adiponectin), 30 (IL-8) oder 34 (IL-6).

2.2.4.5. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die PCR-Produkte wurden auf 2%iges Agarosegel aufgetragen und entsprechend ihres Molekulargewichtes im elektrischen Feld gelelektrophoretisch aufgetrennt.

TAE-Puffer:	40 mM	Tris-HCl
	20 mM	Essigsäure
	1 mM	EDTA
	pH 0,8	

2 g Agarose wurden in 100 ml TAE aufgekocht, nach dem Abkühlen mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in eine Gelkammer (14 x 14 cm) ausgegossen.

DNA-Probenpuffer	30%	Glycerol
	0,25%	Bromphenolblau

Die PCR-Produkte (50 µl) wurden mit 10 µl DNA-Probenpuffer versetzt. Anschließend wurden 30 µl der DNA-Proben auf das Gel aufgetragen. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurden 5 µl Marker (100 bp (Basenpaare)) mit auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 100 Volt für 1 Stunde und 20 Minuten. Danach wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert.

2.2.4.6. Messung von Zytokinen im Medienüberstand

Vor Präparation der RNA wurden die Medienüberstände asserviert. Pro Konzentration und Zeitpunkt wurde jeweils zwei Mal 1 ml Medienüberstand aufbewahrt. Die Sekretion von Adiponectin, Leptin IL-6 und IL-8 in den Medienüberstand wurde mit einem kommerziellen ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) von der Firma Biovendor (Heidelberg) gemessen. ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Bei diesem Verfahren wird die Antigen-Antikörper-Reaktion zum Nachweis eines bestimmten Proteins genutzt. Der zu dem gesuchten Protein passende Antikörper muss bekannt sein und zuvor mit verschiedenen gentechnischen und zellbiologischen Methoden hergestellt werden. Das nachzuweisende Protein ist das zum Antikörper passende Antigen. Der Antikörper wird an eine feste Phase (meist eine

Mikrotiterplatte) gebunden und mit einer Probe mit dem nachzuweisenden Antigen inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationsphase wird die Platte gewaschen. Zurück bleibt nur das an den Antikörper gebundene Antigen. Ein weiterer, an ein Enzym gekoppelter Antikörper wird zugegeben und bindet an das Antigen. Anschließend wird ein Chromogen wie zum Beispiel p-Nitrophenylphosphat hinzugefügt. Das am Antigen gebundene Enzym spaltet das farblose p-Nitrophenylphosphat in das schwach gelbe p-Nitrophenol und einen Phosphatrest. Die Intensität der Farbe kann am Photometer gemessen werden und ist direkt proportional zur Konzentration des Antigens in der Probe.

Die Messung der Zytoinsekretion in den Medienüberstand wurde durchgeführt, um zu prüfen, ob messbare Spiegel der Zytokine im Medienüberstand nachweisbar sind und inwiefern die Sekretion durch die Zugabe von Resveratrol beeinflusst wird. Da hier nur jeweils zwei Proben pro Konzentration eingeschickt wurden, wurde auf die statistische Auswertung der Daten verzichtet, es wurde lediglich der Mittelwert bestimmt.

Tab. 4: Charakteristika der kommerziellen Messung der Zytokinkonzentration im Medienüberstand mittels ELISA (enzyme linked immunosorbent assay).

Zytokin	**Nummer**	**Sensitivität**	**Inter-/Intra-Assay-Variabilität**	**Firma**
Adiponectin	# RD 191023100	2 ng/ml	< 4,0 % / < 4,1 %	Biovendor Heidelberg, Germany
Leptin	# RD 191001100	2 ng/ml	< 4,0 % / < 4,1 %	Biovendor Heidelberg, Germany
IL-6	# KAC 1261	2 pg/ml	< 8 % / < 6 %	Biosource Nivelles, Belgium
IL-8	# KAC 1301	0,7 pg/ml	< 4,3 % / < 4,9 %	Biosource Nivelles, Belgium

2.2.5. Statistische Methoden

Da die verwendeten Zellen aus der gemeinsamen SGBS Zellinie und somit aus einer Grundgesamtheit stammen, wurde bei der Datenverteilung von einer Normalverteilung ausgegangen. Deshalb wurde der T-Test für abhängige Stichproben durchgeführt. Das Signifikanzniveau betrug $p<0.01$.
Zur Berechnung der statistischen Werte Mittelwert, Standardabweichung und p-Wert wurden die Programme Microsoft Excel und Microsoft WinStat verwendet.

3. Ergebnisse

Die Größe des Fettgewebes wird bestimmt durch die Anzahl und das Volumen der Fettzellen. Die Anzahl der Fettzellen kann sich ändern durch die Proliferation von Vorläuferzellen, die Differenzierung von Vorläuferzellen zu reifen Adipozyten und die Reduktion der Zellzahl durch Apoptose. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Experimente zum Einfluss von Resveratrol auf die Proliferation, die Differenzierungsrate und die Apoptosesensitivität humaner SGBS Präadipozyten und Adipozyten dargestellt.

3.1. Untersuchungen zur Proliferation

Der Einfluss von Resveratrol auf die Proliferation wurde nur bei Präadipozyten untersucht, da nur Präadipozyten, nicht aber Adipozyten die Fähigkeit zur Proliferation besitzen. Dabei wurden zwei verschiedene Methoden angewandt: Die morphologische Zellzählung unter dem Mikroskop und die Inkorporation von radioaktivem ^{3}H-Thymidin in die DNA.

Bei der Zellzählung war die mikroskopisch ermittelte Zellzahl der adhärenten Präadipozyten bei 100 µM Resveratrol an Tag 3 um ca. 45% reduziert im Vergleich zur Kontrolle. Die Zellzahl war im Vergleich zum Ausgangswert nur um das knapp 1,5-fache angestiegen, während sie sich bei der Medienkontrolle fast verdreifacht hatte. Während bei sehr niedrigen Resveratrol-Konzentrationen (1 µM, 3 µM) sowie der Lösungsmittelkontrolle entsprechend 100 µM Resveratrol im Verlauf kein wesentlicher Unterschied zur Kontrolle festzustellen war (Differenz zwischen Medium und Lösungsmittelkontrolle an Tag 3 < 1 %), war die Anzahl der Zellen bei 10 µM bzw. 30 µM Resveratrol an Tag 3 um 22 % bzw. 29 % reduziert (siehe Abb. 3).

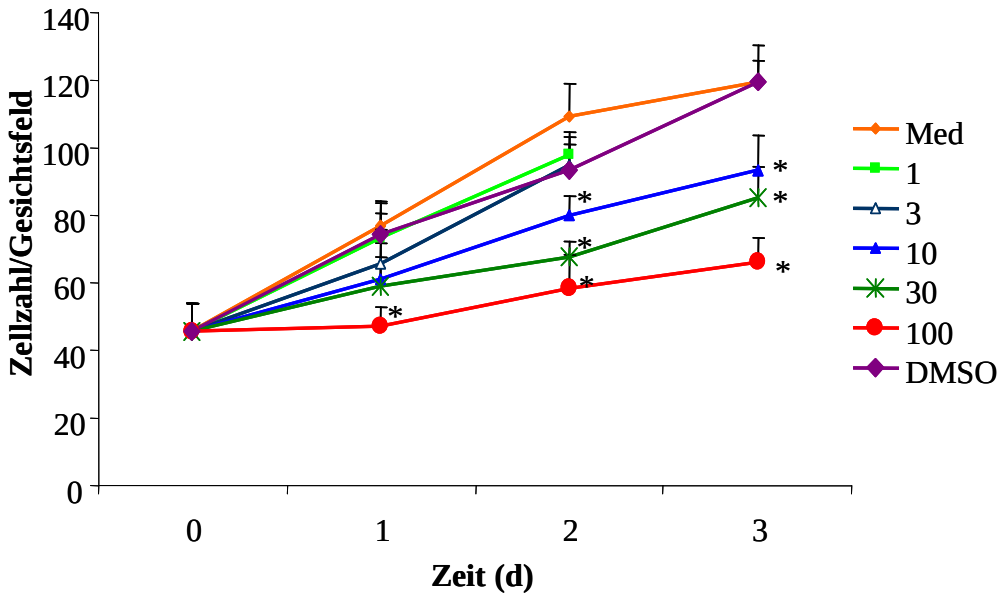


Abb. 3: Einfluss von Resveratrol auf die Proliferation von Präadipozyten.

SGBS (Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom) Präadipozyten wurden in serumhaltigem Kulturmedium (Med: Medium) mit aufsteigenden Konzentrationen von Resveratrol (1 µM, 3 µM, 10 µM, 30 µM, 100 µM) beziehungsweise mit Lösungsmittel (DMSO: Dimethylsulfoxid) inkubiert. 0, 1, 2 und 3 Tage nach der Stimulation mit Resveratrol wurde mikroskopisch die Anzahl von adhärenten Präadipozyten durch mikroskopische Zellzählung ermittelt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung. Dargestellt ist ein repräsentativer von zwei durchgeführten Versuchen.

***** $p < 0.01$ im Vergleich zu Medium mit 10% FCS.

Bei den Untersuchungen zum Einfluss von Resveratrol auf die ^{3}H-Thymidininkorporation in zelluläre DNA zeigte sich bei niedrigen Resveratrol-Konzentrationen (1, 3, 10 µM) zunächst eine leichte Zunahme der Counts Per Minute (cpm) im Vergleich zur Kontrolle. Bei 30 µM Resveratrol dagegen nahmen die cpm bereits um 75 %, bei 100 µM sogar um 99 % ab. Die Löungsmittelkontrolle entsprechend 100 µM Resveratrol zeigte keinen Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abb. 4).

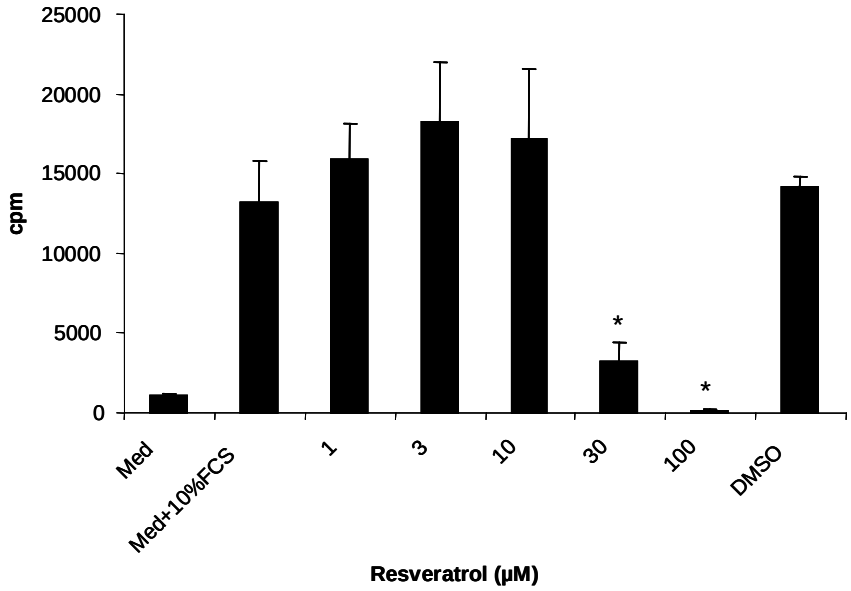


Abb. 4: Einfluss von Resveratrol auf die Proliferation von Präadipozyten.

SGBS (Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom) Präadipozyten wurden in serumhaltigem Kulturmedium mit aufsteigenden Konzentrationen von Resveratrol (1 µM, 3 µM, 10 µM, 30 µM, 100 µM) beziehungsweise mit Lösungsmittel (DMSO: Dimethylsulfoxid) inkubiert. Med: serumfreies Medium; Med+10% FCS: serumhaltiges Medium mit 10 % fetalem Kälberserum. Nach 72 Stunden wurde die ^{3}H-Thymidininkorporation in die DNA als Counts per minute (cpm) innerhalb von 12 Stunden ermittelt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung (n=3 unabhängige Experimente, durchgeführt in Triplikaten).

***** $p < 0.01$ im Vergleich zu Medium mit 10 % FCS.

3.2. Untersuchungen zur adipogenen Differenzierung

Um den Einfluss von Resveratrol auf die adipogene Differenzierung zu untersuchen, wurden SGBS Zellen während des Differenzierungsprozesses mit Resveratrol behandelt. Die Differenzierungsrate wurde ermittelt durch die Zählung der adhärenten differenzierten und undifferenzierten Zellen unter dem Mikroskop. Zusätzlich wurde die Morphologie der Zellen fotografisch dokumentiert.

Das adipogene Medium, das zur Differenzierung der Präadipozyten verwendet wurde, enthielt an Tag 1-4 den PPARgamma-Agonisten BRL (Rosiglitazon). Um zu untersuchen, ob die Anwesenheit von BRL die Wirkung von Resveratrol beeinflusst, wurden die Präadipozyten im ersten Versuchsansatz nur an Tag 1-4 mit Differenzierungsmedium I mit aufsteigenden Resveratrol-Konzentrationen, danach bis Tag 14 mit Differenzierungsmedium II ohne Resveratrol inkubiert. An Tag 8 zeigten die mit Red Oil gefärbten Kulturen, die mit hohen Resveratrol-Konzentrationen (50, 100 µM) versetzt worden waren, morphologisch bereits weniger differenzierte Adipozyten. Auch die in den Zellen enthaltenen Fettvakuolen waren in Anzahl und Größe vermindert im Vergleich zur Kontrolle. Die Lösungsmittelkontrolle und die niedrigen Resveratrol-Konzentrationen (1, 10 µM) zeigten keinen morphologischen Unterschied zur Kontrolle (Abb. nicht gezeigt). An Tag 14 waren die Zellen im Differenzierungsprozess noch weiter fortgeschritten, das heißt die Anzahl und Größe der Fettvakuolen war nochmals gestiegen. Der Konzentrations-abhängige Effekt von Resveratrol war morphologisch aber noch genauso zu erkennen wie an Tag 8 (siehe Abb. 5a).
Durch morphologische Zellzählung unter dem Mikroskop wurde jeweils an Tag 8 und Tag 14 die Zellzahl von Adipozyten und Präadipozyten bestimmt, um daraus die Differenzierungsrate zu ermitteln. An Tag 8 war die Differenzierungsrate bei 50 µM Resveratrol um 16 %, bei 100 µM Resveratrol um 28 % vermindert im Vergleich zur Kontrolle. An Tag 14 war die Differenzierungsrate bei beiden hohen Konzentrationen (50, 100 µM) um ca. 16 % verringert. Die Lösungsmittelkontrolle entsprechend 100 µM Resveratrol und die niedrigen Resveratrol-Konzentrationen (1, 10 µM) zeigten sowohl an Tag 8 als auch an Tag 14 keinen Unterschied zu Medienkotrolle (siehe Abb. 5b).

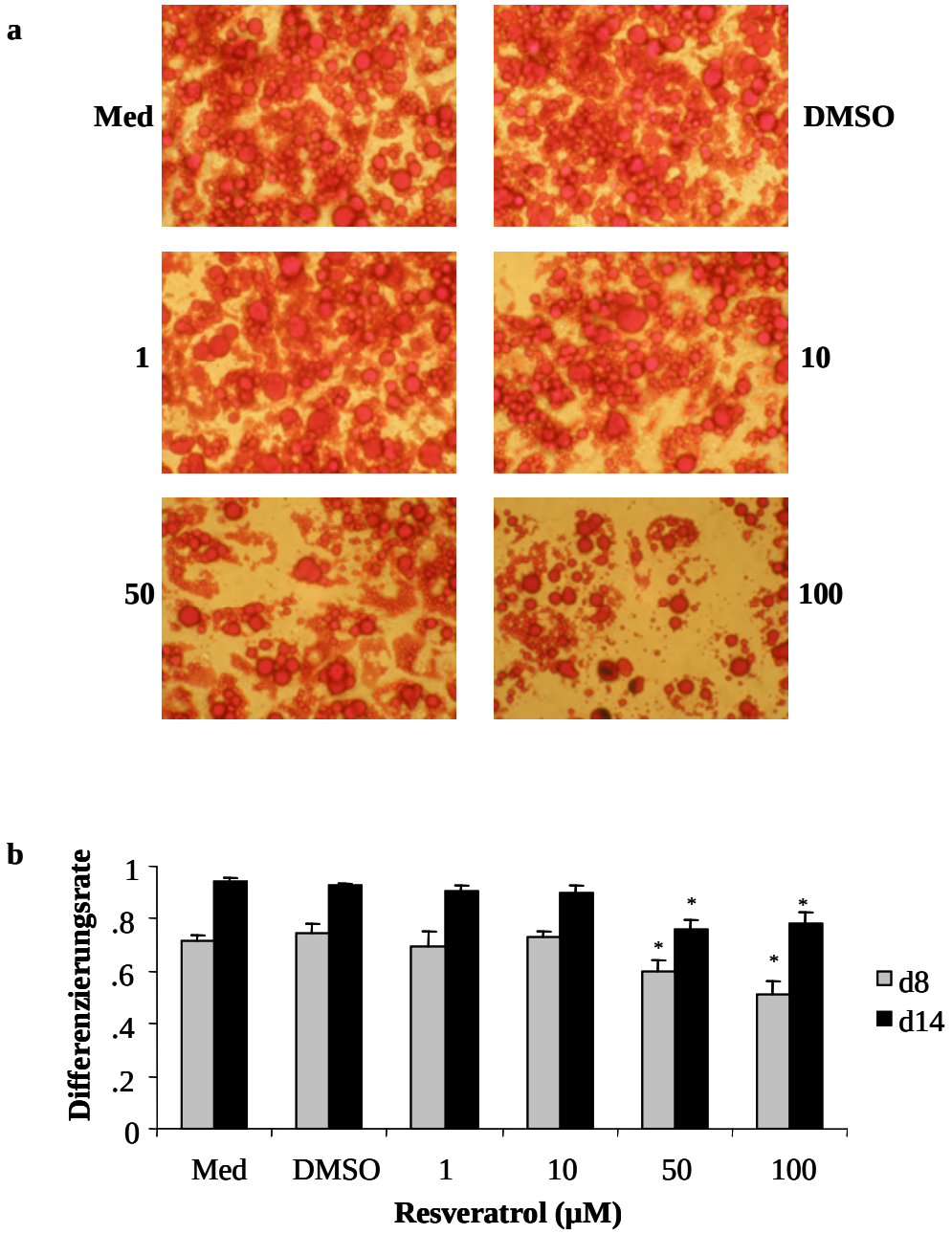


Abb. 5: Einfluss von Resveratrol auf die Differenzierung von Präadipozyten.

SGBS (Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom) Präadipozyten wurden von Tag 1-4 im Differenzierungsmedium I mit aufsteigenden Konzantrationen von Resveratrol (1 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM) beziehungsweise mit Lösungsmittel (DMSO: Dimethylsulfoxid) inkubiert, danach in Differenzierungsmedium II ohne Resveratrol beziehungsweise DMSO. Med: Differenzierungsmedium ohne Resveratrol beziehungsweise DMSO. Abb. 5a zeigt die Photos der Zellkulturen an Tag 14, Red Oil-Färbung. Abb. 5b zeigt die Differenzierungsrate, mikroskopisch ermittelt, an Tag 8 und Tag 14 durch Zählung der adhärenten Präadipozyten und Adipozyten. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung, gezeigt ist ein repräsentativer von zwei durchgeführten Versuchen.

***** $p < 0.01$ im Vergleich zu Differenzierungsmedium.

Im zweiten Versuchsansatz wurden Präadipozyten während der ganzen Dauer der Differenzierung (Tag 1-14) mit aufsteigenden Resveratrol-Konzentrationen und der Lösungsmittelkontrolle entsprechend 100 µM Resveratrol inkubiert. An Tag 8 zeigten die mit Red Oil gefärbten Zellen bereits bei 10 µM Resveratrol morphologisch eine deutlich verminderte Anzahl differenzierter Adipozyten im Vergleich zur Kontrolle. Auch die Anzahl und Größe der Fettvakuolen war bereits bei dieser Konzentration vermindert. Dieser Effekt verstärkte sich bei 50 µM und 100 µM Resveratrol, wobei bei 100 µM bereits nicht mehr adhärente apoptotische Zellen zu sehen waren. Die Behandlung mit der Lösungsmittelkontrolle und mit Resveratrol 1 µM zeigte keinen morphologischen Unterschied zur Kontrolle (Abb. nicht gezeigt). An Tag 14 waren die Zellen im Differenzierungsprozess noch weiter fortgeschritten, sichtbar durch einen Anstieg der Größe und Anzahl der Fettvakuolen. Der Konzentrations-abhängige Effekt von Resveratrol war aber auch hier ab einer Konzentration von 10 µM deutlich zu erkennen. Bei 50 µM Resveratrol konnte keine Vergrößerung und Vermehrung der Fettvakuolen beobachtet werden. Bei 100 µM Resveratrol war bereits ein Großteil der Zellen apoptotisch, differenzierte Adipozyten konnten gar nicht mehr identifiziert werden (siehe Abb. 6a).

Auch hier wurde jeweils an Tag 8 und Tag 14 durch Zellzählung unter dem Mikroskop die Differenzierungsrate bestimmt. An Tag 8 war die Differenzierungsrate bereits bei 10 µM Resveratrol um 37 %, bei 50 µM um 44 % reduziert im Vergleich zur Medienkontrolle. An Tag 14 war die Differenzierungsrate bei 10 µM um 25 %, bei 50 µM um 44% verringert. Für die Resveratrol-Konzentration 100 µM konnte weder an Tag 8 noch an Tag 14 eine Differenzierungsrate bestimmt werden, da keine Adipozyten vorhanden waren. Die höchste Lösungsmittelkonzentration und die niedrigste Resveratrolkonzentration (1 µM) zeigten keinen Unterschied zur Medienkontrolle (siehe Abb. 6b).

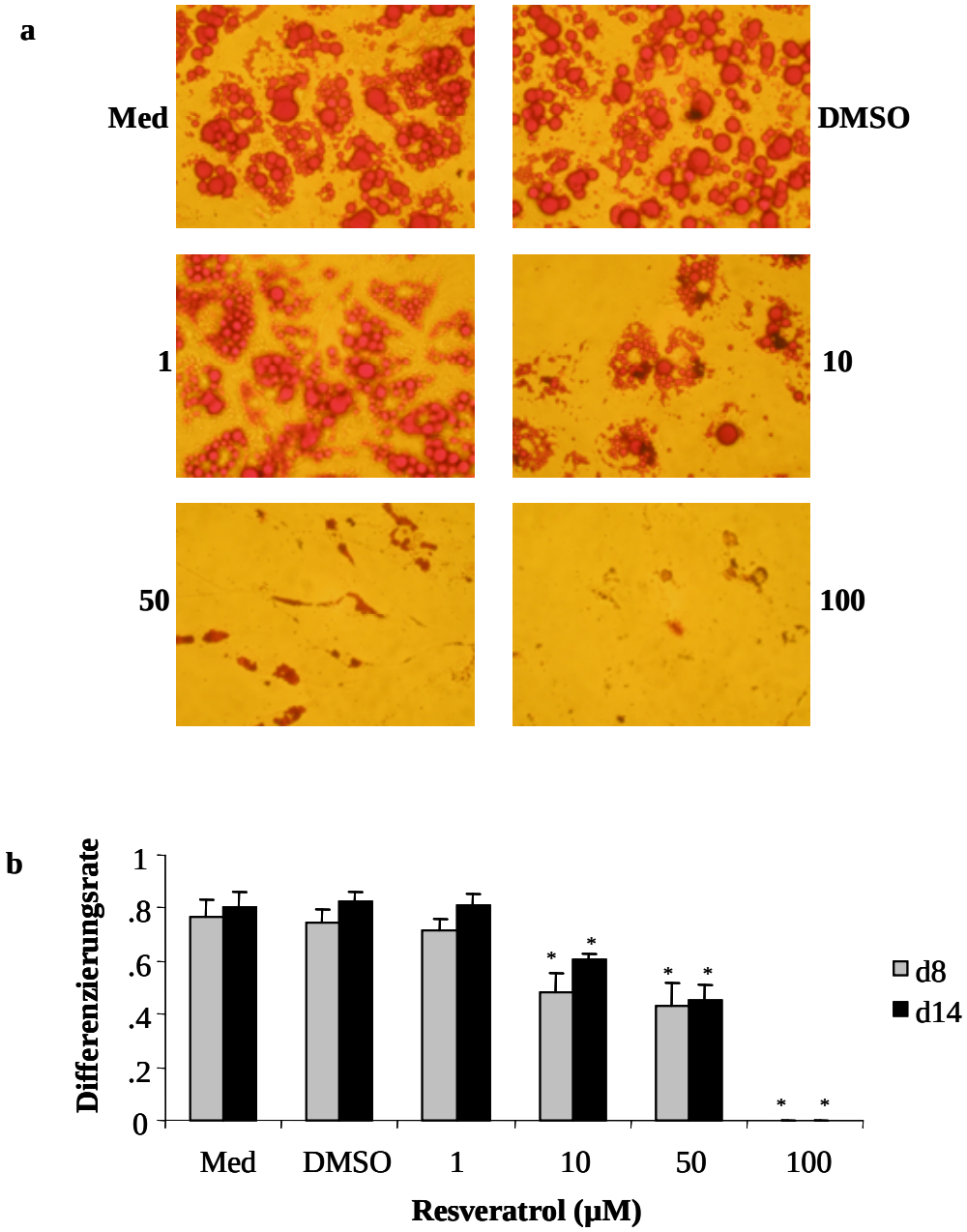


Abb. 6: Einfluss von Resveratrol auf die Differenzierung von Präadipozyten.

SGBS (Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom) Präadipozyten wurden von Tag 1-14 in Differenzierungsmedium mit aufsteigenden Konzentrationen von Resveratrol (1 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM) beziehungsweise mit Lösungsmittel (DMSO: Dimethylsulfoxid) inkubiert. Med: Differenzierungsmedium ohne Resveratrol beziehungsweise DMSO. Abb. 6a zeigt die Kulturen an Tag 14, Red Oil-Färbung. Abb. 6b zeigt die Differenzierungsrate, mikroskopisch ermittelt, an Tag 8 und Tag 14 durch Zählung der adhärenten Präadipozyten und Adipozyten. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung, gezeigt ist ein repräsentativer von zwei durchgeführten Versuchen.

***** $p < 0.01$ im Vergleich zu Differenzierungsmedium.

Beide Versuchsansätze wurden jeweils mit einer Konzantration von 0,2 µM und 2 µM des PPAR-gamma-Agonisten BRL (Rosiglitazon) durchgeführt, um zu untersuchen, ob die

Wirkung von Resveratrol nicht nur durch die Dauer der Inkubation, sondern auch durch unterschiedliche Konzentrationen des für die Differenzierung wichtigen Transkriptionsfaktors PPARgamma beeinflusst wird. Da bei beiden BRL-Konzantrationen die gleichen Ergebnisse erzielt wurden, sind hier nur die Daten der Versuche gezeigt, die mit 2 µM BRL durchgeführt wurden.

3.3. Untersuchungen zur Apoptosesensitivität

Eine Reduktion der Anzahl von Präadipozyten und Adipozyten ist möglich durch den programmierten Zelltod (Apoptose). Deshalb wurde der Einfluss von Resveratrol auf die Apoptosesensitivität von SGBS Zellen untersucht. Anschließend wurde die Apoptoserate gemessen.

Bei den Präadipozyten in serumfreiem Medium konnte im Verlauf eine kontinuierliche Zunahme der spezifischen Apoptoserate beobachtet werden. Während die spezifische Apoptoserate bei der Lösungsmittelkontrolle und der Resveratrolkonzatration 1 µM kleiner als 5 % war, lag sie bei 10 µM Resveratrol bei circa 5 % und stieg bei 20 und 30 µM Resveratrol auf circa 10 % an. Bei 50 µM Resveratrol lag die spezifische Apoptoserate bei circa 15 % und bei 100 µM Resveratrol bei circa 20 %. Nach 72 Stunden lag sie bei 100 µM Resveratrol bei knapp 30 %. Als Positivkontrolle diente der Apoptoseinduktor Staurosporin in einer Konzentration von 2 µM (siehe Abb. 7a, b).

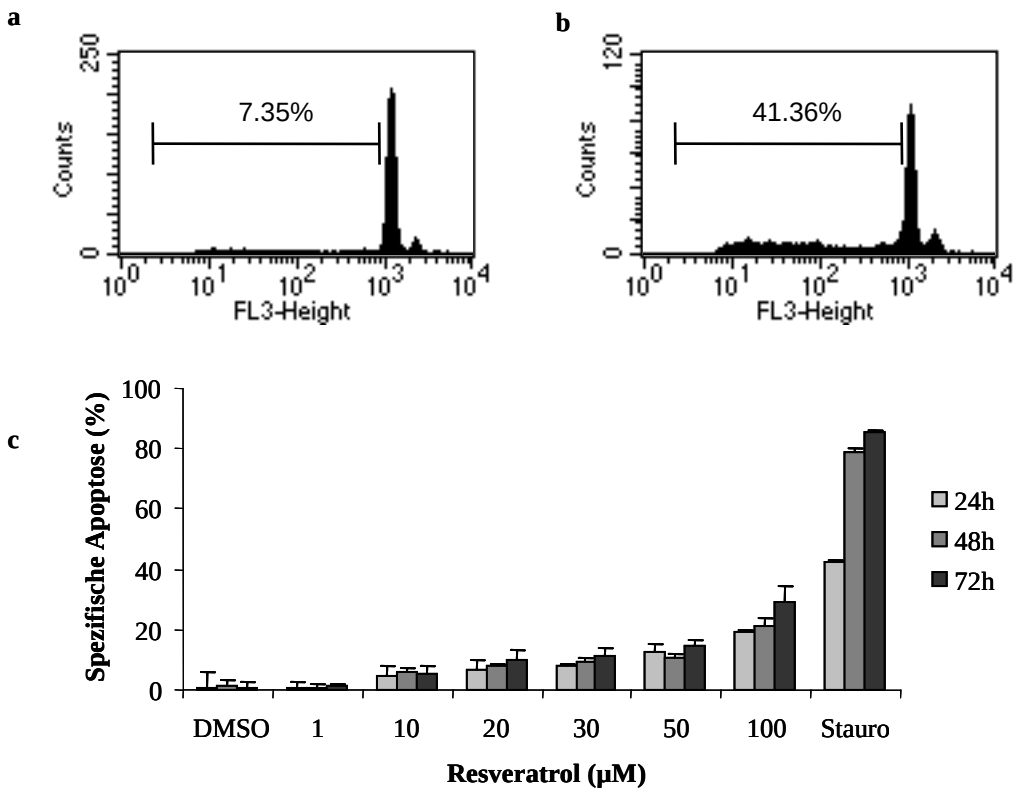


Abb. 7: Stimulation von Apoptose bei Präadipozyten durch Resveratrol in serumfreiem Medium.
SGBS (Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom) Präadipozyten wurden in serumfreiem Zellkulturmedium mit der Lösungsmittelkontrolle (DMSO: Dimethylsulfoxid), aufsteigenden Konzentrationen Resveratrol (1 µM, 10 µM, 20 µM, 30 µM, 50 µM 100 µM) und mit der Positivkontrolle Staurosporin (Stauro, 2 µM) inkubiert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde der Prozentsatz der apoptotischen Zellen mit Hilfe des Durchflußzytometers erfasst. Abb. 7a und 7b zeigen beispielhaft ein vom Durchflußzytometer erstelltes Histogramm, anhand dessen der Prozentsatz der apoptotischen Zellen erfasst werden kann. Abb. 7a zeigt ein Histogramm der Kontrolle, Abb. 7b ein Histogramm von Zellen, die mit 100 µM Resveratrol inkubiert wurden, jeweils nach 72 Stunden. Abb. 7c zeigt die spezifische Apoptoserate. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung, gezeigt ist ein repräsentativer von drei durchgeführten Versuchen.

Bei den Präadipozyten, die in serumhaltigem Medium kultivert wurden, zeigte sich kein konzentrationsabhängiger Anstieg der spezifischen Apoptoserate bei ansteigenden Resveratrolkonzentrationen (siehe Abb. 8). Die spezifische Apoptoserate war auch bei der höchsten Resveratrolkonzentration (100 µM) noch kleiner als 5 % (siehe Abb. 8).

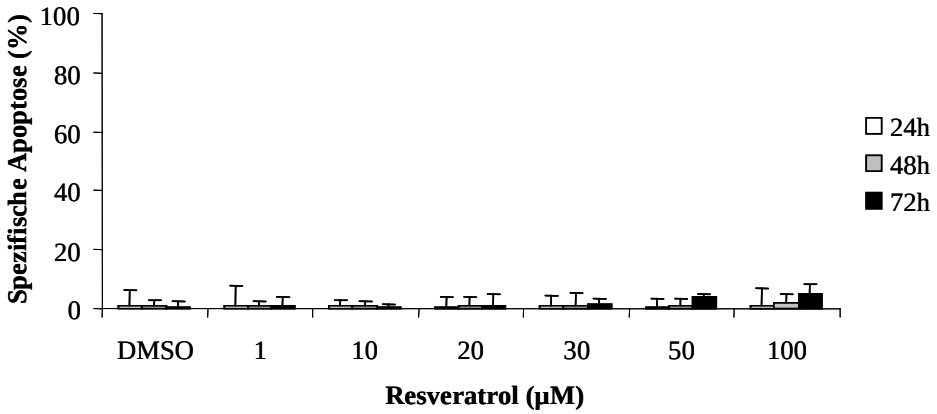


Abb. 8: Stimulation von Apoptose bei Präadippozyten durch Resveratrol in serumhaltigem Medium.
SGBS (Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom) Präadipozyten wurden in serumhaltigem Zellkulturmedium mit der Lösungsmittelkontrolle (DMSO: Dimethylsulfoxid) und aufsteigenden Konzentrationen Resveratrol (1 µM, 10 µM, 20 µM, 30 µM, 50 µM 100 µM) inkubiert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde der Prozentsatz der apoptotischen Zellen mit Hilfe des Durchflußzytometers erfasst. Abb. 8 zeigt die spezifische Apoptoserate. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung, gezeigt ist ein repräsentativer von drei durchgeführten Versuchen.

Bei den Adipozyten zeigte sich ein deutlicher Anstieg der spezifischen Apoptoserate erst bei der höchsten Resveratrolkonzantration. Die spezifische Apoptoserate lag bei 100 µM Resveratrol zwischen 10 und 20 %. Auch hier wurde als Kontrolle der Apoptoseinduktor Staurosporin mit untersucht (siehe Abb. 9).

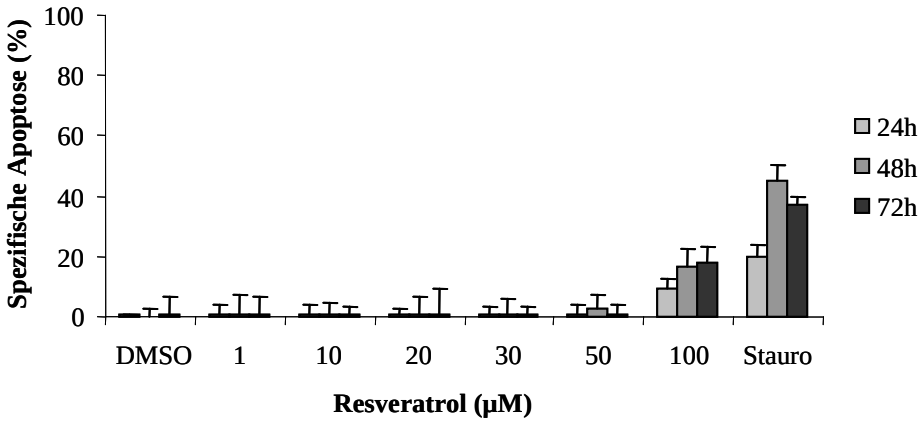


Abb. 9: Stimulation von Apoptose bei Adipozyten durch Resveratrol in serumfreiem Medium.

Reife SGBS (Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom) Adipozyten (Tag 14) wurden in serumfreiem Zellkulturmedium mit der Lösungsmittelkontrolle (DMSO: Dimethylsulfoxid), aufsteigenden Konzentrationen Resveratrol (1 µM, 10 µM, 20 µM, 30 µM, 50 µM 100 µM) und mit der Positivkontrolle Staurosporin (Stauro, 2 µM) inkubiert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde der Prozentsatz der apoptotischen Zellen mit Hilfe des Durchflußzytometers erfasst. Abb. 9 zeigt die spezifische Apoptoserate. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung, gezeigt ist ein repräsentativer von drei durchgeführten Versuchen.

3.4. Untersuchungen zur endokrinen Funktion der Fettzelle

Das Fettgewebe als endokrines Organ sezerniert eine Vielzahl verschiedener Adipokine. In dieser Arbeit wurden folgende Adipokine näher untersucht:

- Adiponectin
- Leptin
- IL-6
- IL-8

Es wurde der Einfluss von Resveratrol auf die mRNA-Expression und Proteinsekretion dieser Adipokine untersucht. In Vorversuchen wurde die mRNA-Expression dieser Adipokine während der adipogenen Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten untersucht (siehe Abb. 10).

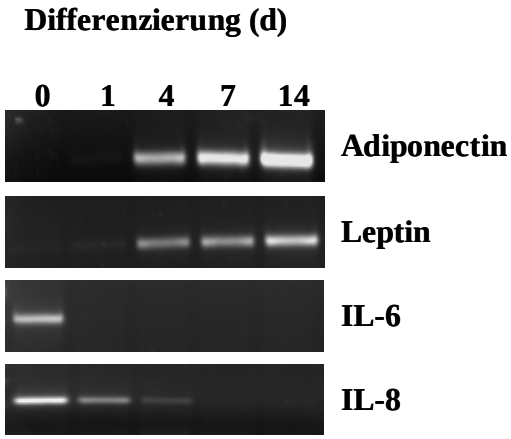


Abb. 10: mRNA-Expression der Adipokine während der adipogenen Differenzierung.
Die Zellen wurden während der adipogenen Differenzierung zu den Zeitpunkten 0 1, 4, 7 und 14 Tage abgeerntet. Aus den Zellen wurde RNA gewonnen und mittels RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) wurde die Expression von Adiponectin, Leptin, IL-6 und IL-8 untersucht.

Die Expression von Adiponectin mRNA wurde während der adipogenen Differenzierung induziert, war an Tag 4 nachweisbar und stieg bis Tag 14 weiter an. Auch die Sekretion von Adiponectin stieg im Laufe der Differenzierung an. Während an Differenzierungstag 0 und 2 noch kein Adiponectin im Medium nachweisbar war, war an Tag 4 eine Konzentration von 1 ng/ml und an Tag 7 eine Konzentration von ca. 40 ng/ml messbar, an Tag 10 stieg diese auf ca. 210 ng/ml an (Abb. nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden

die Untersuchungen zum Einfluss von Resveratrol auf die Adiponectinsekretion und die Adiponectinexpression an „reifen“ Adipozyten (Differenzierungstag 14) durchgeführt. Auch die mRNA-Expression von Leptin wurde während der Differenzierung induziert und erreichte ein Maximum an Tag 14 (siehe Abb. 10). An Tag 0 und 2 konnte noch keine Proteinsekretion von Leptin in den Medienüberstand festgestellt werden. Die messbare Proteinsekretion von Leptin begann an Tag 4 und führte zu einer Konzentration von ca. 10 pg/ml, an Tag 7 von ca. 30 pg/ml und an Tag 10 von ca. 670 pg/ml (Abb. nicht gezeigt), weshalb auch hier die Untersuchungen zu Resveratrol an reifen Adipozyten (Differenzierungstag 14) durchgeführt wurden.

Im Gegensatz dazu konnte die Expression von IL-6- und IL-8-mRNA nur bei Präadipozyten nachgewiesen werden, während bei zunehmender Differenzierung keine mRNA-Expression von IL-6 und IL-8 mehr festzustellen war (siehe Abb.10). In einem Zeitraum von 24 Stunden sezernierten Präadipozyten ca. 600 pg/ml in den Medienüberstand, an Differenzierungstag 7 nur noch ca. 50 pg/ml. Bei IL-8 zeigte sich ebenfalls eine starke Reduktion der Proteinkonzentration im Medienüberstand von 1340 pg/ml an Tag 0 auf 40 pg/ml an Tag 7 (Abb. nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen zum Einfluss von Resveratrol auf die Expression und Sekretion von IL-6 und IL-8 an Präadipozyten durchgeführt.

Adiponectin und Leptin

Nach der Behandlung der Adipozyten mit aufsteigenden Resveratrolkonentrationen (10, 50, 100 µM) und der Lösungsmittelkontrolle (DMSO) wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (6, 12, 24, 48 Stunden) abgeerntet. Es zeigte sich auf RNA-Ebene keine konzentrationsabhängige Veränderung der Adiponectinexpression (siehe Abb. 11a). Auch auf Proteinebene zeigte sich im 24 Stunden-Medienüberstand eine konstante Proteinsekretion (siehe Abb. 11b). Während bei der Lösungsmittelkontrolle und der Resveratrolkonzentration 50 µM die Proteinsekretion geringfügig anstieg (jeweils ca. 10 %), zeigte sich bei der Resveratrolkonzentration 10 µM ein Anstieg um knapp 50 % im Vergleich zur Medienkontrolle. Bei der Resveratrolkonzentration 100 µM war die Proteinsekretion im Vergleich zur Medienkontrolle um ca. 20 % vermindert.

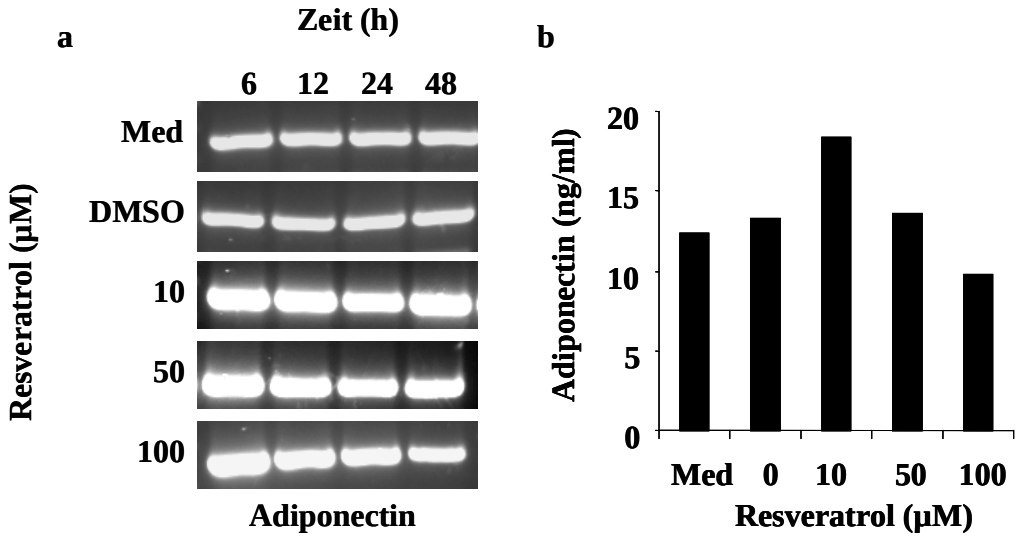


Abb. 11: Expression und Sekretion von Adiponectin unter dem Einfluss von Resveratrol.
SGBS (Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom) Adipozyten wurden in Differenzierungsmedium kultiviert und mit Lösungsmittel (DMSO: Dimethylsulfoxid) und aufsteigenden Resveratrolkonzentrationen (10 µM, 50 µM, 100 µM) behandelt. Med: Differenzierungsmedium. Nach 6, 12, 24 und 48 Stunden wurden die Medienüberstände asserviert und die RNA präpariert. Mittels RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) wurde die Expression von Adiponectin-mRNA untersucht. Abb. 11a zeigt die geleletrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte. Dargestellt ist ein repräsentativer von zwei durchgeführten Versuchen. Abb. 11b zeigt die durch ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) bestimmte Sekretion von Adiponectin in den Medienüberstand nach 24 Stunden. Dargestellt ist der Mittelwert aus zwei bestimmten Werten.

Nach der Behandlung der „reifen“ Adipozyten mit Resveratrol wurde auch deren Leptinexpression untersucht. Bei der Untersuchung der Leptinexpression „reifer“ Adipozyten zeigt sich auf mRNA-Ebene keine Veränderung der Leptinexpression unter dem Einfluss von aufsteigenden Resveratrolkonzentrationen. Die Expression blieb sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig konstant und war selbst bei der höchsten Resveratrolkonzentration nicht verändert (siehe Abb.12a). Diese Ergebnisse spiegelten sich auch auf Proteinebene wieder. Bei der Untersuchung der Proteinsekretion von Leptin in den Medienüberstand blieb die Leptinkonzentration bei allen Resveratrolkonzentrationen gleich und war im Gegesatz zur Medien- und Lösungsmittelkontrolle nur leicht reduziert (15 %). Man kann also auch bei der Proteinsekretion keinen konzentrationsabhängigen Effekt von Resveratol festellen (siehe Abb. 12b).

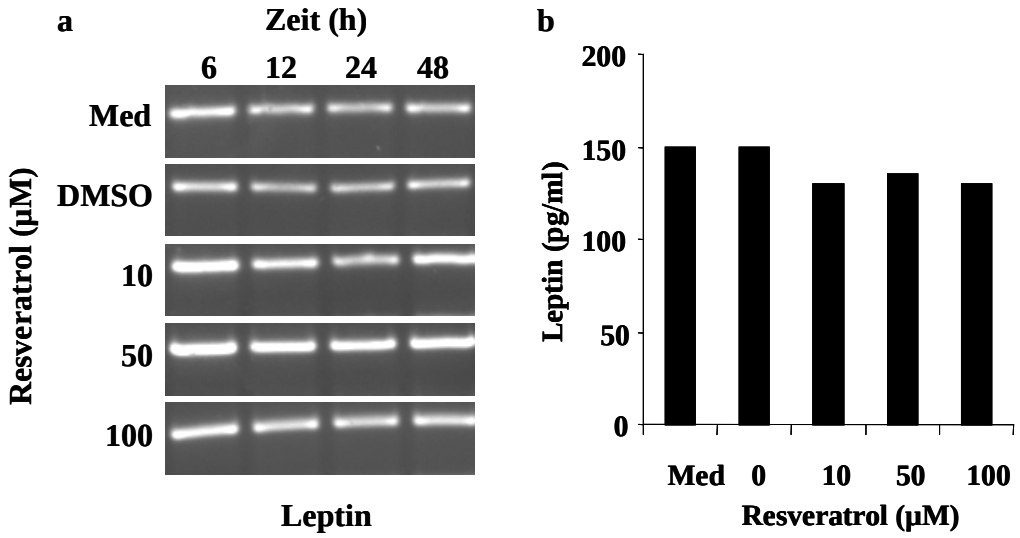


Abb. 12: Expression und Sekretion von Leptin unter dem Einfluss von Resveratrol.
SGBS (Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom) Adipozyten wurden in Differenzierungsmedium kultiviert und mit Lösungsmittel (DMSO: Dimethylsulfoxid) und aufsteigenden Resveratrolkonzentrationen (10 µM, 50 µM, 100 µM) behandelt. Med: Differenzierungsmedium. Nach 6, 12, 24 und 48 Stunden wurden die Medienüberstände asserviert und die RNA präpariert. Mittels RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) wurde die Expression von Leptin-mRNA untersucht. Abb. 12a zeigt die geleletrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte. Dargestellt ist ein repräsentativer von zwei durchgeführten Versuchen. Abb. 12b zeigt die durch ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) bestimmte Sekretion von Leptin in den Medienüberstand nach 24 Stunden. Dargestellt ist der Mittelwert aus zwei bestimmten Werten.

IL-6 und IL-8

Zur Untersuchung des Einflusses von Resveratrol auf die mRNA-Expression und Proteinsekretion von IL-6 und IL-8 wurden Präadipozyten mit aufsteigenden Resveratrolkonzentrationen (10, 50, 100 µM) und der Lösungsmittelkontrolle (DMSO) behandelt und anschließend zu unterschiedlichen Zeitpunkten (6, 12, 24, 48 Stunden) abgeerntet. Die mRNA-Expression von IL-6 nahm in der Medien- und in der Lösungsmittelkontrolle zeitabhängig zu. Diese zeitabhängige Steigerung der IL-6-Expression wurde durch Resveratrol konzentrationsabhängig inhibiert. Bei der höchsten Resveratrolkonzentration (100 µM) war die IL-6-Expression fast vollständig inhibiert (siehe Abb.13a). Dieser konzentrationsabhängige Effekt von Resveratrol zeigte sich auch deutlich bei der IL-6-Proteinbestimmung aus dem 24 Stunden-Medienüberstand (siehe Abb. 13b). Während bei der Lösungsmittelkontrolle nur eine leichte Reduktion im Vergleich zur Medienkontrolle um ca. 10 % zu erkennen war, zeigte sich bei der

Resveratrolkonzentration 10 µM bereits eine Reduktion um mehr als 40 %. Bei der Resveratrolkonzentration 50 µM war die Proteinsekretion um ca. 65 %, bei 100 µM um ca. 75 % im Vergleich zur Medienkontrolle reduziert.

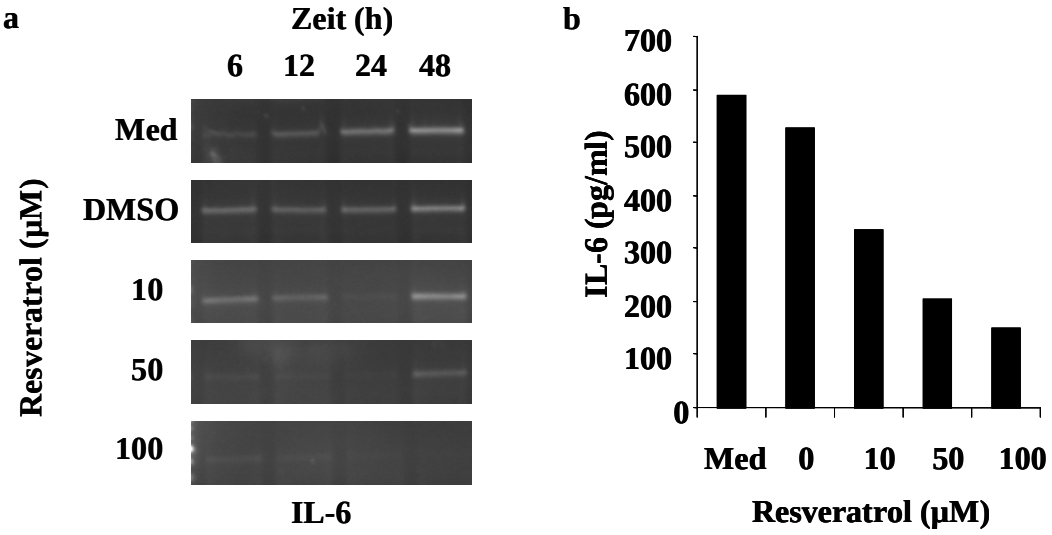


Abb. 13: Expression und Sekretion von IL-6 unter dem Einfluss von Resveratrol.

SGBS (Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom) Präadipozyten wurden in serumhaltigem Medium kultiviert und mit Lösungsmittel (DMSO: Dimethylsulfoxid) und aufsteigenden Resveratrolkonzentrationen (10 µM, 50 µM, 100 µM) behandelt. Med: Differenzierungsmedium. Nach 6, 12, 24 und 48 Stunden wurden die Medienüberstände asserviert und die RNA präpariert. Mittels RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) wurde die Expression von IL-6-mRNA untersucht. Abb. 13a zeigt die geleletrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte. Dargestellt ist ein repräsentativer von zwei durchgeführten Versuchen. Abb. 13b zeigt die durch ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) bestimmte Sekretion von IL-6 in den Medienüberstand nach 24 Stunden. Dargestellt ist der Mittelwert aus zwei bestimmten Werten.

Die mRNA-Expression von IL-8 nahm in der Medien- und in der Lösungsmittelkontrolle zeitabhängig leicht zu. Hier zeigte sich bei aufsteigenden Resveratrolkonzentrationen ebenfalls eine konzentrationsabhängige Inhibition der IL-8-Expression (siehe Abb.14a). Auch die aus dem 24 Stunden-Medienüberstand bestimmte IL-8-Sekretion nahm unter dem Einfluss von Resveratrol konzentrationsabhängig deutlich ab (siehe Abb. 14b). Während die Proteinsekretion bei der Lösungsmittelkontrolle um ca. 25 % im Vergleich zur Medienkontrolle abnahm, war sie bei der Resveratrolkonzentration 10 µM um ca. 40 %, bei 50 µM um ca. 70 % und bei 100 µM um mehr als 80 % reduziert.

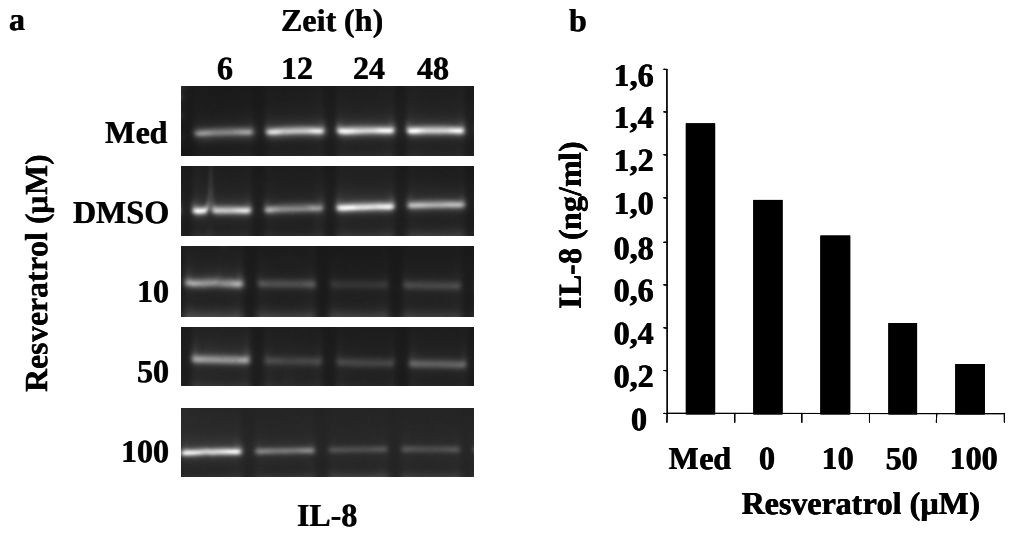


Abb. 14: Expression und Sekretion von IL-8 unter dem Einfluss von Resveratrol.

SGBS (Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom) Präadipozyten wurden in serumhaltigem Medium kultiviert und mit Lösungsmittel (DMSO: Dimethylsulfoxid) und aufsteigenden Resveratrolkonzentrationen (10 µM, 50 µM, 100 µM) behandelt. Med: Differenzierungsmedium. Nach 6, 12, 24 und 48 Stunden wurden die Medienüberstände asserviert und die RNA präpariert. Mittels RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) wurde die Expression von IL-8-mRNA untersucht. Abb. 14a zeigt die geleletrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte. Dargestellt ist ein repräsentativer von zwei durchgeführten Versuchen. Abb. 14b zeigt die durch ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) bestimmte Sekretion von IL-8 in den Medienüberstand nach 24 Stunden. Dargestellt ist der Mittelwert aus zwei bestimmten Werten.

4. Diskussion

Durch einen weltweiten Anstieg der Anzahl übergewichtiger Menschen auf mittlerweile 2.1 Milliarden steigt auch die Morbidität und Mortalität Adipositas-assoziierter Erkrankungen massiv an (39, 52). Nicht nur Atherosklerose und Diabetes Mellitus Typ 2, sondern auch Krebs und chronische Inflammation sind Folgen der Adipositas. Der am besten reproduzierbare Weg zur Verhinderung Adipositas-assoziierter Erkrankungen ist eine Reduktion der Fettmasse durch Kalorienreduktion. Eine Kalorienreduktion führt außerdem – oder vielleicht gerade deswegen – zu einer Verlängerung der Lebensspanne (27, 38, 66).

Bei der Suche nach dem Wirkungsmechanismus, über den eine Kalorienrestriktion zu einer Verlängerung der Lebensspanne führt, wurde bei verschiedenen Organismen, wie zum Beispiel *S. cerevisiae, C. elegans* und *D. melanogaster*, die NAD-abhängige Deacetylase Sir2 aus der Familie der Sirtuine identifiziert. Das Sir2-Homolog bei Säugetieren ist SIRT1 (27, 38, 58, 66). Es konnten verschiedene Pflanzenstoffe identifiziert werden, die zu einer Aktivierung von SIRT1 führen. Bei der Untersuchung dieser Sirtuin-aktivierenden Komponenten (Sirtuin-activating compounds, STACS) wurde die größte Wirkung bei dem sekundären Pflanzenstoff Resveratrol gefunden (76). Bei *S. cerevisiae, C. elegans* und *D. melanogaster* konnte bereits eine Sir2-abhängige Verlängerung der Lebensspanne durch die Gabe von Resveratrol erzielt werden (76). Valenzano et al. konnten zeigen, dass die Lebensspanne des Wirbelfisches *Notobranchius furzeri* durch die Behandlung mit Resveratrol um bis zu 60 % gesteigert werden konnte (70). In einer aktuellen Arbeit von Baur et al. wurde jetzt erstmals die Wirkung von Resveratrol auf die Physiologie von Säugetieren am Mausmodell untersucht. Es wurden Mäuse untersucht, die entweder eine normale (Standard diet, SD), eine hochkalorische (High caloric diet, HC) oder eine hochkalorische Diät mit Resveratrol (High caloric diet+Resveratrol, HCR) erhiehlten. Durch die Zugabe von Resveratrol konnte die Mortalität der HCR-Gruppe im Vergleich zur HC-Gruppe um ca. 30 % gesenkt werden, so dass sie nur noch wenig über der Mortalität der SD-Gruppe lag. Außerdem wurden in der HCR-Gruppe verbesserte motorische Fähigkeiten, niedrigere Level an Glukose und Insulin, spätere Entwicklung eines Diabetes Mellitus Typ 2 und weniger starke Ausprägung einer Steatosis hepatis im Vergleich zur HC-Gruppe festgestellt (3). Die Wirkung von Resveratrol konnte also nicht nur bei vom Menschen evolutionär weit entfernten Arten wie Hefe, Würmern und Fliegen, sondern auch in einem Säugetiermodell nachgewiesen werden.

Da Resveratrol *in vivo* im Mausmodell die Folgeerkankungen der Adipositas positiv beeinflusst, haben wir in dieser Arbeit den Einfluss von Resveratrol speziell auf die Biologie der Fettzelle untersucht. Als Modellsystem wurden humane SGBS Präadipozyten und Adipozyten verwendet. Da SGBS Zellen ursprünglich aus humanem Gewebe stammen, weisen sie physiologische Eigenschaften auf, die menschlichem Primärmaterial sehr ähnlich sind. Aus diesem Grund stellen SGBS Zellen ein besseres Modellsystem dar als beispielsweise murine 3T3-L1-Adipozyten.
In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Resveratrol die Biologie der humanen Fettzellen beeinflusst. Dabei wurde zum einen die Größe des Fettgewebes untersucht, die durch Proliferation der Vorläuferzellen, durch Differenzierung der Vorläuferzellen zu reifen Adipozyten und durch Apoptose von Präadipozyten und Adipozyten beeinflusst werden kann. Durch eine Veränderung der Größe des Fettgewebes würde sich auch das Sekretionsmuster der Adipokine verändern. Die Sekretion von Adipokinen kann aber nicht nur durch eine veränderte Anzahl sezernierender Zellen, sondern auch auf Ebene der Transkription und Translation der Gene beeinflusst werden. Aus diesem Grund wurde auch die Expression und Sekretion bestimmter Adipokine unter dem Einfluss von Resveratrol untersucht, die in die Entwicklung Adipositas-assoziierter Erkrankungen involviert sind.

4.1. Größe des Fettgewebes

Zunächst wurde der Einfluss von Resveratrol auf Vorgänge, die Größe des Fettgewebes beeinflussen, untersucht, die durch die Anzahl und das Volumen der darin enthaltenen Fettzellen bestimmt wird. Die Anzahl der Fettzellen kann sich lebenslang ändern. Eine Zunahme der Zellzahl kann durch die Proliferation von Präadipozyten und deren anschließender Differenzierung zu Adipozyten verursacht werden. Eine Abnahme der Zellzahl kann durch programmierten Zelltod (Apoptose) sowohl von Präadipozyten als auch von Adipozyten verursacht werden. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Resveratrol auf die Proliferation von Präadipozyten, die Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten und die Apoptosesensitivität von Präadipozyten und Adipozyten untersucht. Eine Veränderung dieser Parameter würde nahe legen, dass durch Resveratrol auch die Größenzunahme des Fettgewebes bei Adipositas beeinflusst werden kann.

4.1.1. Proliferation

Die Proliferation der SGBS Präadipozyten in serumhaltigem Medium war unter dem Einfluss von Resveratrol deutlich vermindert. Die morphologische Zellzählung zeigte eine zeit- und dosisabhängige Abnahme der Proliferation. Dieses Ergebnis wurde durch die ^{3}H-Thymidininkorporation bestätigt. Mit der Methode des ^{3}H-Thymidininkorporation in die DNA würde aber einerseits bei einer Abnahme der Replikation, andererseits bei einer Reduktion der Zellzahl durch Apoptose ein vermindertes Signal gemessen werden. Deshalb wurde die Apoptosesensitiviät von Präadipozyten in serumhaltigem Medium untersucht. Es zeigte sich hier bei allen Resveratrolkonzentrationen kein wesentlicher Unterschied der Apoptosesensitivität im Vergleich zur Kontrolle. Eine Apoptose-induzierte Abnahme der ^{3}H-Tymidininkorporation konnte dadurch weitgehend ausgeschlossen werden. Die zeit- und dosisabhängige Reduktion der Proliferation von Präadipozyten unter dem Einfluss von Resveratrol wurde bisher noch nicht bei Präadipozyten *in vitro* oder *in vivo* untersucht.

Bei anderen Zelltypen wurde aber bereits eine Inhibition der Proliferation durch Resveratrol beobachtet. Ein positiver Effekt auf das kardiovaskuläre System konnte von Poussier et al. *in vitro* in bovinen glatten Gefäßmuskelzellen festgestellt werden. Die Proliferation wurde durch Blockierung des Zellzyklus durch Resveratrol dosisabhängig inhibiert (59). Olson et al. zeigten *in vitro* eine verminderte Proliferation von kardialen Fibroblasten und somit eine Inhibition des kardialen Remodelling. Durch die Inhibition des Enzyms extracellular signal-kinase wird ein von Angiotensin II induzierter Signalweg blockiert und somit das Angiotensin II-abhängige Wachstum der Fibroblasten inhibiert (53). Diese Ergebnisse zeigen, dass Resveratrol sich positiv auf das kardiovaskuläre System auswirkt.

Durch eine Hemmug der Proliferation von Krebszellen konnte außerdem eine anti-kanzerogene Wirkung von Resveratrol sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden. *In vitro* konnte die Proliferation von Zellen der myeloische Leukämie (1), von Rhabdomyosarkom-Zellen (16), von Melanom-Zellen (31) und von Colonkarzinom-Zellen (75) durch Resveratrol reduziert werden. *In vivo* konnte im Tiermodell eine Inhibition der Proliferation von Mammakarzinom-Zellen (74) und Kolonkarzinom-Zellen (64) gezeigt werden. Der Mechanismus der antikanzerogenen Wirkung ist in vielen Fällen noch unklar. Mögliche Mechanismen sind die Blockierung des Zellzyklus (16, 31) oder eine Induktion des Tumorsuppressorgens p53 (31).

Im Gegensatz dazu konnte von Mizutani et al. *in vitro* bei Osteoblasten (MC3T3-E1) eine Stimulation der Proliferation durch eine gesteigerte DNA-Synthese und eine erhöhte Aktivität der Alkalischen Phosphatase festgestellt werden (45).
Die Inhibition der Proliferation durch Resveratrol verhindert eine Zunahme der Anzahl von Präadipozyten. Wenn weniger Präadipozyten vorhanden sind, ist auch die Anzahl der daraus entstehenden Adipozyten vermindert. Somit könnte durch eine Inhibition der Proliferation von Präadipozyten eine Größenzunahme des Fettgewebes verhindert und der Adipositas entgegengewirkt werden.

4.1.2. Adipogene Differenzierung

Die Differenzierung der von SGBS Präadipozyten zu Adipozyten war unter dem Einfluss von Resveratrol inhibiert. Die anhand von morphologischen Kriterien bestimmte Differenzierungsrate nahm Dosis-abhängig ab. Bei steigenden Resveratrolkonzentrationen konnte man eine Verminderung der Anzahl und Größe der Lipidtröpfchen der einzelnen Adipozyten feststellen.
Der Transkriptionsfaktor PPARgamma ist an der adipogenen Differenzierung beteiligt (58). Um *in vitro* eine Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten zu erreichen, muss deshalb für die ersten 4 Tage der Differenzierung der PPARgamma-Agonist BRL (Rosiglitazon) hinzugegeben werden. Das Enzym SIRT1, das durch Resveratrol aktiviert wird, inhibiert den Transkriptionsfaktor PPARgamma. In 3T3-L1-Adipozyten konnte bei einer Hochregulation von SIRT1 eine Inhibition der Adipogenese und im Gegenzug bei einer verminderten Expression von SIRT1 eine Induktion der Adipogenese festgestellt werden (58). Da Resveratrol das Enzym SIRT1 aktiviert ist auch ein Einfluss von Resveratrol auf den Transkriptionsfaktor PPARgamma vorstellbar. Auf der anderen Seite könnte auch der Effekt von Resveratrol durch die Konzentration von PPARgamma beeinflusst werden. Aus diesem Grund wurden die Versuche zur Differenzierung sowohl mit unterschiedlichen BRL-Konzantrationen als auch mit einer unterschiedlichen Dauer der Resveratrolinkubation durchgeführt. Die BRL-Konzantration schien nicht ausschlaggebend zu sein, da die Inhibition der Differenzierung durch Resveratrol bei beiden BRL-Konzentrationen gleich war.
Bei den Zellen, die nur an Differenzierungstag 1-4 mit Resveratrol behandelt wurden, nahm die Differenzierung nicht so stark ab wie bei den Zellen, die für die gesamte Dauer der Differenzierung mit Resveratrol behandelt wurden. Dies legt nahe, dass Resveratrol die

Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten nicht nur über eine initiale Inhibition von PPARgamma, sondern auch noch über andere Wirkungsmechanismen inhibiert.
Eine Inhibition der Differenzierung verhindert eine Größenzunahme des weißen Fettgewebes, da die Größe des Fettgewebes unter anderem durch die Anzahl der sich zu Adipozyten differenzierenden Präadipozyten und durch den Lipidgehalt der reifen Adipozyten bestimmt wird. Eine Inhibition der Differenzierung durch Resveratrol konnte bereits von Picard et al. *in vitro* gezeigt werden. In murinen 3T3-L1-Adipozyten konnte durch die Zugabe des SIRT1-Aktivators Resveratrol die Differenzierung inhibiert werden. SIRT1 stellt ein wichtiges Schlüsselenzym bei der Inhibition der adipogenen Differenzierung dar. Bei Zellen, die kein SIRT1 exprimieren konnten, zeigte sich kein Effekt von Resveratrol. Im Gegenzug dazu konnte bei Zellen mit einer Hochregulation von SIRT1 eine Abnahme der adipogenen Differenzierung festgestellt werden (58). Diese Arbeit unterstützt sowohl die hier erzielten Ergebnisse zu einer Inhibition der Differenzierung unter dem Einfluss von Resveratrol, zum anderen zeigt sie einen mögliches Zielmolekül des molekularen Wirkungsmechanismus von Resveratrol auf, nämlich die NAD^+-abhängige Deacetylase SIRT1.
Die Differenzierung unter dem Einfluss von Resveratrol wurde bisher vor allem bei Krebszellen untersucht. Meist zeigte sich im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit eine Stimulation der Differenzierung. Da ein Tumor aber mit zunehmender Differenzierung an Malignität verliert, ist dieser Effekt als positiv zu werten. So konnte eine Induktion der Differenzierung durch Resveratrol zum Beispiel in Zellen des Multiplen Myeloms (7, 79) und in myeloischen Leukämie-Zellen (1, 13) beobachtet werden.

4.1.3. Apoptosesensitivität

Unter dem Einfluss von Resveratrol zeigte sich bei SGBS Präadipozyten in serum*freiem* Medium eine Dosis- und Zeit-abhängige Steigerung der Apoptosesensitivität. Dieser Effekt konnte auch bei SGBS Adipozyten gezeigt werden, allerdings war hier eine gesteigerte Apoptosesensitivität erst ab der höchsten Resveratrolkonzentration (100 µM) zu erkennen. Dies kann im Sinne einer Reduktion der Zellzahl im Fettgewebe – sowohl der Vorläuferzellen als auch der reifen Zellen – und der damit verbundenen Reduzierung der Größe des Fettgewebes als positiv gewertet werden. Allerdings zeigte sich bei SGBS Präadipozyten, die mit serum*haltigem* Medium und aufsteigenden Resveratrolkonzentrationen inkubiert wurden, kein Anstieg der Apoptosesensitivität. Dies

stellt eine Übertragung dieses *in vitro*-Modells auf einen lebenden Organismus in Frage, da dort meist Bedingungen im Sinne eines serum*haltigen* Mediums vorherrschen.
Eine Steigerung der Apoptosesensitivität durch Resveratrol konnte bisher noch nicht *in vitro* oder *in vivo* bei Präadipozyten oder Adipozyten festgestellt werden. Bei anderen Zelltypen wurde aber auch dieser Effekt von Resveratrol bereits beobachtet. Durch die Induktion von Apoptose bei vielen Arten von Krebszellen konnte vor allem eine antikanzerrogene Wirkung von Resveratrol bestätigt werden. In vivo konnte von Chen et al. bei Mäusen mit Neuroblastom eine Induktion von Apoptose der Tumorzellen durch Resveratrol erreicht werden (14). Whitsett et al. konnten bei Ratten eine vermehrte Apoptose on Brustkrebs-Zellen feststellen (74). *In vitro* konnte eine Steigerung der Apoptosesensitivität bei Brustkrebs-Zellen (60), Gliom-Zellen (33), myeloischen Leukämie-Zellen (1, 13), monozytären Leukämie-Zellen (69), und Kolonkarzinom-Zellen (43) gezeigt werden.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen legen nahe, dass Resveratrol die Größe des Fettgewebes verringert, indem es die Proliferation von Präadipozyten inhibiert, die Differenzierungsrate senkt und die Apoptosesensitivität sowohl von Präadipozyten als auch von Adipozyten verstärkt. Diese Beobachtungen *in vitro* sind nicht vereinbar mit den von Baur et al. erzielten Ergebnissen im Mausmodell. Bei den Mäusen, die zusätzlich zu einer hochkalorischen Diät mit Resveratrol gefüttert wurden, konnten zwar verschiedene positive Effekte auf den Metabolismus und die Lebensspanne der Mäuse beobachtet werden, nicht aber ein signifikanter Unterschied der Fettmasse im Vergleich zu den Mäusen, die mit einer hochkalorischen Diät ohne Resveratrol gefüttert wurden (3).
Die Übertragung der hier in *vitro* erzielten Ergebnisse auf *in vivo*-Bedingungen muss kritisch betrachtet werden. Eine Verminderung des weißen Fettgewebes durch Inhibition von Proliferation und Differenzierung und eine Induktion von Apoptose könnte auch metabolisch ungünstige Wirkungen haben durch zum Beispiel erhöhte zirkulierende Spiegel von freien Fettsäuren im Blut.
Der positive Effekt von Resveratrol, der *in vivo* beobachtet wurde, ist unter Umständen weniger durch eine Veränderung der Größe des Fettgewebes, sondern eher durch ein verändertes Sekretionsmuster der Adipokine verursacht.

4.2. Endokrine Funktion der Fettzelle

Eine Kalorienreduktion ist der am besten reproduzierbare Weg zu einer Verlängerung der Lebensspanne (27, 38, 66). In verschiedenen Organismen – angefangen bei Hefe (76) bis hin zu Mäusen (3) – konnte eine Verlängerung der Lebensspanne auch durch Behandlung mit dem sekundären Planzenstoff Resveratrol erzielt werden (76). Resveratrol, das in bemerkenswerten Konzentrationen in Rotwein enthalten ist, wird auch als mögliche Ursache für das „Französische Paradoxon“ angesehen. Das „Französische Paradoxon“ führt die geringere Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen bei Franzosen im Vergleich zu anderen Europäern auf ihren gemäßigten Konsum von Rotwein zurück (55, 71).

Auch das Fettgewebe kann das kardiovaskuläre System beeinflussen. Durch die stetige Zunahme der Adipositas steigt auch die Prävalenz für das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen (39, 52). Für die Entstehung dieser Adipositas-assoziierten Erkrankungen wie Atherosklerose und auch Diabetes mellitus spielt die Veränderung der Sekretionsprodukte des Fettgewebes, der sogenannten Adipokine eine wichtige Rolle (35, 73).

Da Resveratrol *in vivo* möglicherweise die Entstehung Adipositas-assoziiierter Erkrankungen beeinflussen kann, haben wir in dieser Arbeit *in vitro* untersucht, inwiefern Resveratrol die Adipokinsekretion des Fettgewebes beeinflusst.

Mittlerweile sind beinahe 100 verschiedene Sekretionsprodukte des Fettgewebes bekannt. In dieser Arbeit wurde speziell die Adipokine Adiponectin, Leptin, IL-6 und IL-8 untersucht. Adiponectin und Leptin wirken sich protektiv auf den Metabolismus eines Organismus aus. Die bei Adipositas häufig gestörte Homöostase dieser Adipokine ist in die Entstehung von Adipositas-assoziierten Erkrankungen involviert. Die proinflammatorischen Adipokine IL-6 und IL-8, die bei Adipositas häufig erhöht sind, verursachen chronische Inflammation und Atherosklerose.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich das Sekretionsmuster der oben genannten Adipokine unter dem Einfluss von Resveratrol verändert und ob dadurch einige der positiven Effekte von Resveratrol erklärt werden können.

Adiponectin

Obwohl Adiponectin etwa gleichzeitig wie Leptin vor etwa zehn Jahren entdeckt wurde, wurde die Rolle dieses Adipokins bei der Entstehung Adipositas-assoziierter Erkrankungen

erst einige Jahre später entdeckt. Heute gilt Adiponectin als das vielversprechendste Adipokin bei der Suche nach neuen Ansatzpunkten der Adipositastherapie, da es eine antiatherogene, antidiabetische und antiinflammatorische Wirkung aufweist (8, 35, 42, 56, 61, 63, 80).

Strukturell kann Adiponectin als niedrigmolekulare Form mit bis zu 180 kDa Gewicht oder als hochmolekulare Form mit 400-600 kDa Gewicht vorliegen. Im humanen Serum ist die hochmolekulare Form vorherrschend (35). Adiponectin liegt im humanen Serum in einer Konzentration von circa 10 µg/ml vor und macht mit ca. 0,02 % einen relativ hohen Anteil am totalen Serumprotein aus (35, 63). Adiponectin unterliegt einem Geschlechtsdimorphismus. Mit Beginn der Pubertät fällt bei Jungen der Adiponectinspiegel indirekt proportional zum Testosteronspiegel ab, während er bei Mädchen relativ konstant bleibt (8).

Die Expression und Sekretion von Adiponectin nimmt im Laufe der adipogenen Differenzierung zu und erreicht ein Maximum bei reifen Adipozyten (siehe 3.4., (8, 35, 63).

In dieser Arbeit wurde das Sekretionsmuster von Adiponectin unter dem Einfluss von Resveratrol nicht verändert. Die mRNA-Expression von Adiponectin blieb zeit- und dosisabhängig konstant. Auch die Adiponectinsekretion wurde durch die Behandlung mit Resveratrol nicht beeinflusst. Die empfindliche Homöostase dieses Adipokins wird also unter dem Einfluss von Resveratrol nicht gestört.

Wie wichtig das Gleichgewicht von Adiponectin für den Metabolismus ist, zeigt sich an den Folgen des veränderten Adiponectinspiegels bei Adipositas. Obwohl Adiponectin ausschließlich von reifen Adipozyten exprimiert und sezerniert wird, entsteht bei Adipositas eine Hypoadiponectinämie (18, 35, 61, 63, 80). Der Adiponectinspiegel im Blut korreliert negativ mit dem BMI, wobei vor allem die Menge des viszeralen Fettgewebes ausschlaggebend zu sein scheint (44). Dass dieses relative Adiponectin-Defizit bei Adipositas unter anderem für die Entstehung Adipositas-assoziierter Erkrankungen veranwortlich sein könnte, wird durch die Forschungsergebnisse verschiedener Gruppen bestätigt. In einer italienischen Studie konnte gezeigt werden, dass Patienten mit Niereninsuffizienz, die hohe Adiponectinspiegel im Plasma aufweisen, später eine koronare Herzkrankheit entwickeln als Patienten mit niedrigem Adiponectinspiegel (80). In einer japanischen Fall-Kontroll-Studie wiesen Patienten mit einer Hypoadiponectinämie ein höheres Risiko für die Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit auf als Patienten mit normalen Adiponectinspiegeln (36). Ouchi et al. zeigten eine direkte Korrelation des

Adiponectinspiegels mit der endothelabhängigen Vasodilatation. Adiponectin-KO-Mäuse entwickelten aufgrund der ungenügenden Vasodilatation eine arterielle Hypertonie. Diese Gruppe sieht in Adiponectin einen möglichen Marker für endotheliale Dysfunktion (56). In einem weiteren Mausmodell konnten Okamoto et al. zeigen, dass ApoE-defiziente Mäuse, die sehr anfällig für Atherosklerose sind, durch eine Behandlung mit Adiponectin 30 % weniger Läsionen in der Aorta entwickeln als Mäuse ohne Adiponectinbehandlung (51).

Die oben genannten Arbeiten zeigen, dass die mit der Adipositas assoziierte Hypoadiponectinämie eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Atherosklerose spielt. Durch Resveratrol wurde die Adiponectinsekretion aus Adipozyten nicht beeinflusst. Eine mögliche Erklärung für die anti-atherosklerotische Wirkung von Resveratrol könnte also eine stabile Expression von Adiponectin bei gleichzeitiger Inhibition der IL-6- und IL-8-Sekretion sein.

Adiponectin ist aber nicht nur in die Entwicklung von Atherosklerose, sondern auch in die Entstehung von Insulinresistenz und chronischer Inflammation involviert. Maeda et al. konnten zeigen, dass Adiponectin-KO-Mäuse bei einer Fett- und Glukose-reichen Diät eine gestörte Glukosetoleranz und Insulinresistenz entwickeln, die durch die Supplementation von Adiponectin deutlich verbessert werden kann (42). Adiponectin senkt den TNFalpha-Spiegel im Blut und wirkt somit antidiabetisch und antiinflammatorisch. Bei einer Hypoadiponectinämie steigt der TNFalpha-Spiegel im Plasma an. Dies führt zu Insulinresistenz und Hypertriglycerinämie durch einen Anstieg der freien Fettsäuren im Serum (63). Ein anderer möglicher Ansatzpunkt der antidiabetischen Wirkung von Adiponectin ist die Aktivierung der AMPK (AMP-activated Protein Kinase). Dieses Enzym wird auch durch körperliches Training und einige antidiabetische Medikamente wie zum Beispiel die Thiazolodindione aktiviert und führt zu einer gesteigerten Fettsäureoxidation und Glukoseaufnahme in den Muskel (26). Die antidiabetische Wirkung von Adiponectin konnte von Yamauchi et al. in einem Mausmodell bestätigt werden: Bei der Behandlung insulinresistenter Mäuse mit physiologischen Adiponectinkonzetrationen konnte eine deutliche Verbesserung der Insulinresistenz beobachtet werden (78).

Die oben genannten Arbeiten verdeutlichen, dass Adiponectin eine wichtige Rolle in der metabolischen Homöostase eines Organismus spielt und dass die Verminderung des Adiponectinspiegels bei Adipositas eine der Ursachen für die Entwicklung Adipositas-assoziierter Erkrankungen ist. Durch die Zugabe von Resveratrol wird der Adiponectinspiegel konstant gehalten und die anti-diabetische, anti-atherosklerotische und anti-inflammatorische Wirkung von Adiponectin bleibt erhalten.

Bei der Suche nach der Ursache für die verminderte Adiponectinexpression bei Adipositas konnte von Qiau und Shao jüngst ein möglicher Mechanismus identifiziert werden: Der Transkriptionsfaktor FOXO1 (forkhead transcription factor O1) bindet zusammen mit dem Coaktivator C/EBPalpha (CCAAT/enhancer-binding protein alpha) an den Promotor des Adiponectingens. In 3T3-L1-Adipozyten, einem murinen *in vitro*-Modell, führte eine FOXO1-Überexpression zu einer vermehrten Adiponectintranskription. Bei Adipozyten mit verminderter FOXO1-Expression war die Adiponectintranskription vermindert. Ein Aktivator für die Komplexbildung und Promotorbindung von FOXO1 und C/EBPalpha und somit auch für die Adiponectintranskription ist die NAD-abhängige Deacetylase SIRT1 (61). SIRT1 gilt als ein wichtiges Schlüsselenzym bei der lebensverlängernden Wirkung einer Kalorienrestriktion (27, 38, 58, 62). Bei 3T3-L1-Adipozyten mit einer Überexpression von SIRT1 kam es zu einem Anstieg der Adiponectinexpression, bei Zellen mit einer verminderten SIRT1-Expresion zu einer Reduktion der Adiponectinexpression. Durch die Zugabe des Sirt1-Aktivators Resveratrol konnte in 3T3-L1-Adipozytenein Anstieg des Adiponectin- Protein-Levels erzielt werden. Bei Zugabe des SIRT1-Inhibitors Nicotinamid kam es zu einer Reduktion des Adiponectin-Protein-Levels (61).

Bei den in dieser Arbeit verwendeten humanen SGBS Adipozyten blieb sowohl die mRNA-Expression als auch die Proteinsekretion von Adiponectin unter dem Einfluss des SIRT1-Aktivators Resveratrol konstant. Die Ergebnisse von Qiao und Shao und die aus dieser Arbeit resultierenden Ergebnisse sprechen dafür, dass die Adiponectinexpression und –sekretion unter dem Einfluss von Resveratrol nicht abnehmen. Sie bleiben konstant oder sind sogar gesteigert. Diese *in vitro*-Versuche legen nahe, dass Resveratrol der mit der Adipositas verbundenen Hypoadiponectinämie und den daraus resultierenden negativen Folgeerscheinungen wie Insulinresistenz, gestörte Glukosetoleranz, Diabetes Mellitus Typ 2, Atherosklerose und chronische Inflammation entgegenwirken könnte.

Diese These wird unterstützt durch die von Baur et al. durchgeführten *in vivo*-Versuche mit Resveratrol. Diese Gruppe konnte nachweisen, dass Mäuse, die mit einer hochkalorischen Diät gefüttert wurden, eine um 30 % reduzierte Mortalität aufwiesen, wenn die Nahrung mit höheren Dosen Resveratrol supplementiert wurde. Auch die motorischen Fähigkeiten, die Insulinsensitivität und die Glukosetoleranz waren bei der Zugabe von Resveratrol deutlich verbessert und unterschieden sich nur noch wenig von den Werten der Mäuse, de mit normaler Diät gefüttert wurden. Die im Blut gemessenen Adiponectinspiegel wurden durch die Supplementation von Resveratrol nicht verändert (3).

Die Zugabe von Resveratrol ist also ein denkbarer Ansatz zur Behandlung der Adipositas-assoziierten Hypoadiponectinämie. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Adiponectinspiegel unter dem Einfluss von Resveratrol konstant bleibt. Dieses Ergebnis bedarf aber der weiteren Prüfung und Bestätigung in *in vivo*-Versuchen.

Leptin

Leptin wurde vor etwa zehn Jahren als erstes Sekretionsprodukt des Fettgewebes entdeckt und führte zu einer Neubewertung des Fettgewebes als endokrines Organ. Leptin besteht aus 167 Aminosäuren und weist strukturelle Ähnlichkeiten mit der Zytokinfamilie auf (5, 25, 35). Obwohl Leptin hauptsächlich von „reifen" Adipozyten synthetisiert wird, kommt es außerdem in anderen Organen vor wie beispielsweise Plazenta, Ovarien, Skelettmuskel, Gehirn und Leber (25, 35, 48). Auch bei Leptin zeigt sich ein Geschlechtsdimorphismus. Frauen haben bezogen auf die Fettmasse deutlich höhere Leptinlevel im Plasma als Männer (29).

In dieser Arbeit blieb die mRNA-Expression von Leptin unter dem Einfluss von Resveratrol zeit- und dosisabhängig konstant. Auch die Proteinsekretion war unter dem Einfluss von Resveratrol unverändert. Dieses Ergebnis ist als positiv zu werten, da sich die physiologische Wirkung von Leptin in einem engen Spielraum bewegt und sich größere Abweichungen vom normalen Serumspiegel negativ auf dem Metabolismus auswirken.

Leptin wirkt neuroendokrin am Hypothalamus als „Sättigungshormon". Während des Fastens ist der Leptin-Spiegel im Plasma erniedrigt, bei Nahrungsaufnahme steigt er an. Bei Adipositas ist der Leptin-Spiegel im Plasma direkt proportional zur Körperfettmasse erhöht. Dieser erhöhte Leptin-Spiegel im Plasma führt aber nicht zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme. Es entwickelt sich stattdessen eine Leptin-Resistenz (35). Resveratrol hingegen hält den Leptinspiegel konstant und wirkt somit der Entwicklung einer Leptinresistenz entgegen.

Auf der anderen Seite führte die Gabe von Leptin bei der ob/ob-Maus, die kein funktionelles Leptin produzieren kann und deshalb morbide Adipositas entwickelt, zu einer Verminderung der Adipositas (48, 63). Obwohl die Behandlung von adipösen Kindern mit kongenitaler Leptindefizienz mit rekombinantem Leptin zu einer starken Reduktion der Adipositas führte (23, 46), konnten bei der Behandlung übergewichtiger Menschen mit Leptin im Allgemeinen nur geringe Erfolge erzielt werden, da fast alle adipösen Individuen eine Hyperleptinämie mit Leptinresistenz aufweisen (5, 26, 35). Leptin-resistente oder –defiziente Nager entwickeln eine extreme Insulinresistenz und morbide Adipositas (63).

Mäuse mit kongenitaler Lipodystrophie, die fast kein weißes Fettgewebe besitzen, entwickeln eine Insulinresistenz, Hyperinsulinämie, Hyperglykämie und eine Fettleber. Diese negativen Effekte konnten durch eine Leptintherapie verbessert werden (65). Bei Menschen mit Lipodystrophie, die an Diabetes mellitus, extrem hohen Plasmatriglyceriden und einer Fettleber leiden, führt die Behandlung mit Leptin zu einer Reduktion der Plasmatriglyceride, zu einer Verminderung der Fettleber und zu einer Reduktion der antidiabetischen Therapie (54). Ebenso wie Adiponectin führt auch Leptin zu einer Aktivierung der AMPK und somit zu einer vermehrten Fettsäureoxidation und Glukoseaufnahme in den Muskel (26). Diese Arbeiten zeigen, dass auch ein verringerter Leptinspiegel den Stoffwechsel negativ beeinflusst und verdeutlichen somit, dass ein konstanter Leptinspiegel, wie er unter dem Einfluss von Resveratrol beobachtet wird, wichtig ist für eine physiologische Wirkung von Leptin.
Für eine physiologische Wirkung von Leptin ist es also wichtig, dass der Leptinspiegel weder nach oben noch nach unten abweicht. In dieser Arbeit blieb sowohl die mRNA-Expression als auch die Proteinsekretion von Leptin unter dem Einfluss von Resveratrol konstant.

IL-6

Bei Adipositas kommt es durch eine Vermehrung des weißen Fettgewebes zu einer vermehrten Produktion proinflammatorischer Zytokine (2, 73). Ein wichtiger proinflammatorischer Marker ist das Zytokin IL-6.
In dieser Arbeit wurden die IL-6-Expression und die -Sekretion von Präadipozyten unter dem Einfluss von Resveratrol untersucht. Die mRNA-Expression und die Proteinsekretion von IL-6 nahmen unter dem Einfluss von Resveratrol zeit- und dosisabhängig stark ab. Somit kann durch Resveratrol die vermehrte Zytokinproduktion des Fettgewebes verhindert werden. IL-6 wird jedoch nicht nur von Präadipozyten synthetisiert. Durch das Fettgewebe werden circa 30 % des Gesamtanteils von IL-6 ins Serum sezerniert (2, 26, 63). Allerdings werden nur 10 % des vom Fettgewebe sezernierten IL-6 von „reifen“ Adipozyten produziert. Der Hauptanteil stammt von Präadipozyten und den das Fettgewebe infiltrierenden Makrophagen (2, 26). Der Plasmaspiegel von IL-6 korreliert mit der Körperfettmasse (63). Er ist bei Adipositas im Vergleich zu Normalgewichtigen um das zehnfache erhöht (26). Diese chronische Entzündung scheint eine Verbindung zwischen Adipositas und ihren Begleiterkrankungen herzustellen. Xu et al. konnten

beispielsweise zeigen, dass es eine Verbindung zwischen chronischer Entzündung und Insulinresistenz gibt. In einem Mausmodell waren bei Übergewicht die entzündungsspezifischen Gene hochreguliert. Durch eine Gabe des antidiabetischen Medikaments Rosiglitazon aus der Gruppe der Thiazolidindione konnte die Genexpression der proinflammatorischen Zytokine vermindert werden (77). Durch die Interaktion mit dem Insulinrezeptor und die Veränderung des Insulinsignalweges führt IL-6 zur Entwicklung von Insulinresistenz und Diabetes Mellitus Typ 2 (2, 63). Durch erhöhte IL-6-Produktion des weißen Fettgewebes bei Adipositas kommt es zu einer vermehrten hepatischen Produktion von CRP (C-Reaktives Protein). CRP ist wiederum ein Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse (2, 37). Dies könnte eine Verbindung zwischen der chronischen Inflammation und der Adipositas-assoziierten Atherosklerose erklären. Nunez et al. konnten in einem Mausmodell zeigen, dass die chronische Inflammation, die auch durch Adipositas und ihre Folgeerkrankungen entsteht, die Ursache für ein erhöhtes Tumorrisiko sein könnte. Mäuse mit Diabetes Mellitus Typ 2 zeigten eine erhöhte Tumorinzidenz, ein schnelleres Tumorwachstum und eine geringere Tumorlatenz als der Wildtyp. Dieser Effekt zeigte sich sowohl bei chemisch induziertem Hautkrebs als auch bei genetisch determiniertem Brustkrebs (50).

Durch Resveratrol konnte sowohl die mRNA-Expression als auch die Proteinsekretion von IL-6 durch humane Präadipozyten *in vitro* deutlich vermindert werden. Eine mögliche Ursache für die positiven Effekte von Resveratrol *in vivo* könnte also eine Inhibition proinflammatorischer Zytokine sein. Durch eine Reduktion der chronischen Inflammation durch Resveratrol könnte den oben genannten Folgeerkrankungen der Adipositas wie Atherosklerose, Diabetes mellitus und Krebs eingewirkt werden. Lin et al. konnten bereits die antiinflammatorische Wirkung eines anderen Flavanoids feststellen. Quercetin, ebenfalls ein sekundärer Pflanzenstoff, konnte die IL-6-Sekretion von humanen Neutrophilen vermindern und wirkte somit antiinflammatorisch (41). Da Il-6 im weißen Fettgewebe aber nicht nur von Präadipozyten, sondern auch von den das Fettgewebe infiltrierenden Makrophagen sezerniert wird, sollte auch der Effekt von Resveratrol auf die Zytokinsekretion von Makrophagen untersucht werden.

IL-8

Ein weiteres vom Fettgewebe produziertes und sezerniertes Zytokin ist Interleukin 8 (IL-8). Wir untersuchten in dieser Arbeit die IL-8-Expression und –Sekretion humaner Präadipozyten unter dem Einfluss von Resveratrol. Es zeigte sich eine deutliche zeit- und dosisabhängige Reduktion der mRNA-Expression und der Proteinsekretion von IL-8. Da auch IL-8 zu dem proinflammatorischen Zytokinen gehört, ist dies ein weiterer Hinweis dafür, dass Resveratrol durch eine gezielte Regulation der Adipokine auf die Folgeerkrankungen der Adipositas einwirken kann.

Es wurde bereits von anderen Gruppen gezeigt, dass das Fettgewebe kontrolliert Zytokine sezerniert. Bruun et al. konnten *in vitro* zeigen, dass sowohl kultiviertes Fettgewebe als auch isolierte Adipozyten reguliert IL-8 produzieren und sezernieren. Durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1beta und TNFalpha konnte die IL-8-Sekretion gesteigert, durch das antiinflammatorische Glucokortikoid Dexamethason konnte die IL-8-Sekretion inhibiert werden. Diese Effekte zeigten sich sowohl in kultiviertem Fettgewebe, als auch in isolierten Adipozyten (10). IL-8 gehört zur Chemokin-Superfamilie. Chemokine sind kleine Moleküle mit 70-80 Aminosäuren (10).

IL-8 ist ebenso wie IL-6 in die Entwicklung von Atherosklerose involviert. Es fördert die endotheliale Monozytenadhäsion, die Zellmigration von glatten Muskelzellen, die Schaumzellbildung aus Makrophagen und die Instabilität atheroskerotischer Plaques (68). Ein erhöhter IL-8-Spiegel ist somit verbunden mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen. Durch die Inhibition der IL-8-Sekretion lässt sich also die unter Resveratrol beobachtete antiatherosklerotische Wirkung erklären.

Bei adipösen Individuen ist der IL-8-Plasmaspiegel im Vergleich zu Normalgewichtigen erhöht (11, 68). Diese erhöhten Plasmaspiegel von IL-8 bei Adipositas zeigen eine mögliche Ursache der Assoziation zwischen Adipositas und der Entwicklung von Atherosklerose.

Straczkowski et al. untersuchten den Einfluss von Adipositas auf den IL-8-Plasmaspiegel in verschiedenen *in vivo*-Studien. Zunächst konnten sie einen signifikanten Anstieg von IL-8 bei Adipösen mit normaler Glucosetoleranz im Vergleich zu Normalgewichtigen feststellen. Der Plasmaspiegel von IL-8 korrelierte direkt mit dem BMI und der Körperfettmasse. Bei einer Glukosebelastung durch einen oralen Glukose-Toleranz-Test (OGTT) konnte sowohl bei den Adipösen als auch bei den Normalgewichtigen ein starker Anstieg von IL-8 beobachtet werden (67). In einer weiteren *in vivo*-Studie konnte diese

Gruppe bei Adipösen mit gestörter Glukosetoleranz einen höheren Anstieg des Plasmaspiegels von IL-8 feststellen, als bei Individuen mit dem gleichen Gewicht, aber einer normalen Glukosetoleranz (68). Dies bietet eine mögliche Erklärung für die schnellere Entwicklung von Atherosklerose in einem prädiabetischen Stadium mit gestörter Glukosetoeranz.

Da die Hauptquelle der IL-8-Produktion eigentlich inflammatorische Zellen wie Makrophagen und Monozyten, aber auch Endothelzellen sind (67, 68), untersuchten Bruun et al. nicht nur die IL-8-Sekretion in der kompletten Fettgewebskultur, sondern auch in den einzelnen Komponenten des Fettgewebes, das nicht nur aus reifen Adipozyten, sondern auch aus Präadipozyten und einer stroma-vaskulären Zellfraktion besteht. Die Gruppe konnte zeigen, dass der mit dem BMI korrelierende Anstieg des IL-8-Plasmaspiegels bei Adipositas nicht durch die IL-8-Sekretion der isolierten Adipozyten, sondern vor allem durch die IL-8-Sekretion anderer im Fettgewebe enthaltener Zellen verursacht wird. Es konnte auch gezeigt werden, dass die IL-8-Sekretion von Präadipozyten im Laufe der Differenzierung stark abnimmt (9). Aus diesem Grund wurden auch in dieser Arbeit die Untersuchungen zu IL-8 an Präadipozyten und nicht an reifen Adipozyten durchgeführt.

Bei der getrennten Untersuchung der IL-8-Sekretion des viszeralen und des peripheren Fettgewebes konnte sowohl bei normalgewichtigen als auch bei adipösen Individuen eine 3-4 mal höhere IL-8 Sekretion im viszeralen im Vergleich zum peripheren Fettgewebe festgestellt werden (9). Dies erklärt, warum der Taillenumfang, der klinisch als Maßstab für die Menge des viszeralen Fettgewebes verwendet wird, einen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen darstellt.

In unseren Versuchen konnten wir zeigen, dass die mRNA-Expression und die Proteinsekretion von IL-8 unter dem Einfluss von aufsteigenden Resveratrolkonzentrationen deutlich abnehmen. Dies zeigt einen möglichen therapeutischen Ansatz, um die bei Adipositas erhöhten IL-8-Spiegel zu senken und somit das mit Adipositas assoziierte Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen zu verringern. Da aber IL-8 nicht nur von Prädipozyten, sondern auch von stroma-vaskulären Zellen wie beispielsweise Makrophagen sezerniert wird, ist es notwendig, in weiteren Versuchen den Einfluss von Resveratrol auf diese Zellen zu untersuchen.

Die von uns durchgeführeten Untersuchungen zu Adipokinsekretion des Fettgewebes unter dem Einfluss von Resveratrol zeigen, dass Resveratrol das Sekretionsmuster des Fettgewebes differenziell beeinflussen kann. Während Adiponectin und Leptin, deren

Gleichgewicht für eine physiologische Stoffwechsellage essentiell ist, durch Resveratrol nicht verändert werden, wird die Sekretion proinflammatorischer Adipokine wie IL-6 und IL-8 durch Resveratrol inhibiert. Diese differenzielle Beeinflussung der Adipokinsekretion des Fettgewebes durch Resveratrol bietet eine mögliche Erklärung der unter Resveratrol im Tierversuch, aber auch bei Menschen empirisch beobachteten Effekte wie beispielsweise das „Französische Paradoxon“.

4.3. Pharmakologische Aspekte

Von anderen Arbeitsgruppen wurden *in vitro* üblicherweise Konzentrationen von 1 µM bis 100 µM Resveratrol eingesetzt (4). Bei unseren *in vitro*-Versuchen lag die ED 50 je nach Versuch zwischen 10 µM und 50 µM. Um im Tierversuch einen Effekt zu erzielen, waren Dosierungen zwischen 100 ng und 1500 mg pro Kilogramm Körpergewicht erforderlich (4).

Ein Problem der Anwendung von Resveratrol *in vivo* stellt sich durch die rasche Metabolisierung und die relativ kurze Halbwertszeit von Resveratrol (ca. 8 bis 14 Minuten) (4). Da Resveratrol aber trotz der ungünstigen pharmakokinetischen Eigenschaften in zahlreichen *in vitro*- und *in vivo*-Studien deutliche Effekte gezeigt hat, könnten auch die Metabolite von Resveratrol für einen Teil seiner Wirkung verantwortlich sein (4).

Resveratrol liegt in Rotwein in einer Konzentration von durchschnittlich 1,5 –3 mg/l vor (22). Andere Quellen nennen eine maximale Konzentration von bis zu 14,3 mg/l (4). Baur et al. konnten im Mausmodell zeigen, dass bei einer Konzentration von circa 23 mg/kg Körpergewicht pro Tag die negativen Auswirkungen einer hochkalorischen Ernährung verhindert werden konnten (3). Würde beispielsweise eine Person täglich 0,25 l eines Weines mit einer Resveratrolkonzentration von 3 mg/l trinken, so würde sie bei einem Körpergewicht von 70 kg täglich eine Menge von circa 10 µg pro Kilogramm Körpergewicht zu sich nehmen. Bei oraler Aufnahme von Resveratrolkonzentrationen dieser Größenordnung konnte beim Menschen keine messbare Plasmakonzentration von Resveratrol erreicht werden (4). Bei einer oralen Dosierung von 25 mg pro Kilogramm Körpergewicht konnte beim Menschen eine Plasmakonzentration von circa 37 nM erreicht werden (4).

Es ist offensichtlich, dass Resveratrolkonzentrationen dieser Größenordnung nicht durch den Konsum von Rotwein erreicht werden können. In Internet-Apotheken wird Resveratrol jedoch bereits in so hochdosierter Form als Nahrungsergänzung angeboten, dass eine

tägliche orale Aufnahme hoher Resveratrolkonzentrationen möglich ist. In Bezug auf die oben genannte Arbeit von Baur et al. wird beispielsweise die Einnahme von 500 mg Kapseln (Resveratrolgehalt 495 mg/Kapsel) vier Mal täglich empfohlen, um bei einem Körpergewicht von etwa 70 – 80 kg die im Mausmodell wirksame Konzentration zu erreichen.

Angesichts der noch unzureichenden Kenntnisse über die pharmakologischen Eigenschaften und mögliche Nebenwirkungen von Resveratrol bleibt der Nutzen einer derartigen Nahrungsergänzung bisher noch fraglich.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Effekt von Resveratrol auf die Biologie der humanen Fettzelle untersucht.

Resveratrol führte *in vitro* zu einer konzentrations- und zeitabhängigen Hemmung der Proliferation von Präadipozyten und zu einer Induktion der Apoptose von Präadipozyten und Adipozyten. Dadurch wurde die Anzahl der Fettzellen verringert.

Des Weiteren führte Resveratrol zu einer Inhibition der Differenzierung von Präadipozyten. Zudem war der Lipidgehalt der einzelnen Fettzelle unter der Behandlung mit Resveratrol vermindert. *In vitro* kann also durch Resveratrol den zellulären Mechanismen, die für eine Größenzunahme des Fettgewebes verantwortlich sind, entgegengewirkt werden.

Bei der Untersuchung des Einflusses von Resveratrol auf die endokrine Funktion der Fettzelle konnte ein differenzieller Effekt des Polyphenols gezeigt werden: Die Adipokine Adiponectin und Leptin wurden durch die Zugabe von aufsteigenden Resveratrol-konzentrationen nicht beeinflusst. Adiponectin, das bei Adipositas häufig erniedrigt ist, schützt vor Folgeerkrankungen der Adipositas wie Diabetes mellitus Typ 2 und Atherosklerose. Leptin ist bei Adipositas meist erhöht. Allerdings entsteht bei Adipositas eine verminderte Leptinsensitivität.

Die Expression und Sekretion der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-6 und Interleukin-8 wurden in den Experimenten hingegen unter dem Einfluss von Resveratrol konzentrations- und zeitabhängig inhibiert. Diese Befunde legen nahe, dass durch Resveratrol die mit der Adipositas assoziierte chronische Inflammation, die in die Pathogenese vieler Adipositas-assoziierter Erkrankungen involviert ist, beeinflusst werden kann.

Das Polyphenol Resveratrol könnte also unter Umständen einen möglichen Ansatzpunkt zur Therapie der Adipositas und ihrer Folgeerkrankungen bieten. Ob Resveratrol auch beim Menschen der Schlüssel zu einem längeren Leben ist, bleibt abzuwarten.

Trotz der Beobachtung des „Französischen Paradoxons“ und der zugrundegelegten Hypothese ist es eher unwahrscheinlich, dass durch den Konsum von Rotwein wirksame Konzentrationen von Resveratrol auf zellulärer Ebene erreicht werden.

Resveratrol wird bereits in Internet-Apotheken in höher dosierter Form zur Nahrungs-ergänzung angeboten. Vor einem medizinisch indizierten Einsatz von Resveratrol müssen jedoch noch weitere *in vivo*- und *in vitro*-Studien durchgeführt werden, um sowohl die

pharmakokinetischen Eigenschaften als auch mögliche Nebenwirkungen dieses Pflanzenstoffes näher zu untersuchen.

6. Literaturverzeichnis

1. **Asou H, Koshizuka K, Kyo T, Takata N, Kamada N, Koeffier HP:** Resveratrol, a natural product derived from grapes, is a new inducer of differentiation in human myeloid leukemias. Int J Hematol **75:**528-533 (2002).
2. **Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J, Feve B:** Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. Eur Cytokine Netw **17:**4-12 (2006).
3. **Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, R. G. Spencer RG, Lakatta EG, D. Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA:** Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. Nature **16**;444:337-342 (2006).
4. **Baur JA, Sinclair DA:** Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. Nat Rev Drug Discov **5:**493-506 (2006).
5. **Bjorbaek C, Kahn BB:** Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. Recent Prog Horm Res **59:**305-331 (2004).
6. **Bluher M, Kahn BB, Kahn CR:** Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. Science **299:**572-574 (2003).
7. **Boissy P, Andersen TL, Abdallah BM, Kassem M, Plesner T, Delaisse JM:** Resveratrol inhibits myeloma cell growth, prevents osteoclast formation, and promotes osteoblast differentiation. Cancer Res **65:**9943-9952 (2005).
8. **Bottner A, Kratzsch J, Muller G, Kapellen TM, Bluher S, Keller E, Bluher M, Kiess W:** Gender differences of adiponectin levels develop during the progression of puberty and are related to serum androgen levels. J Clin Endocrinol Metab **89:**4053-4061 (2004).
9. **Bruun JM, Lihn AS, Madan AK, Pedersen SB, Schiott KM, Fain JN, Richelsen B:** Higher production of IL-8 in visceral vs. subcutaneous adipose tissue. Implication of nonadipose cells in adipose tissue. Am J Physiol Endocrinol Metab **286:**E8-13 (2004).
10. **Bruun JM, Pedersen SB, Richelsen B:** Regulation of interleukin 8 production and gene expression in human adipose tissue in vitro. J Clin Endocrinol Metab **86:**1267-1273 (2001).
11. **Bruun JM, Verdich C, Toubro S, Astrup A, Richelsen B:** Association between measures of insulin sensitivity and circulating levels of interleukin-8, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha. Effect of weight loss in obese men. Eur J Endocrinol **148:**535-542 (2003).
12. **Cal C, Garban H, Jazirehi A, Yeh C, Mizutani Y, Bonavida B:** Resveratrol and cancer: chemoprevention, apoptosis, and chemo-immunosensitizing activities. Curr Med Chem Anticancer Agents **3:**77-93 (2003).
13. **Cao Y, Wang F, Liu HY, Fu ZD, R. Han R:** Resveratrol induces apoptosis and differentiation in acute promyelocytic leukemia (NB4) cells. J Asian Nat Prod Res **7:**633-641 (2005).
14. **Chen Y, Tseng SH, Lai HS, Chen WJ:** Resveratrol-induced cellular apoptosis and cell cycle arrest in neuroblastoma cells and antitumor effects on neuroblastoma in mice. Surgery **136:**57-66 (2004).
15. **Chomczynski P, Sacchi N:** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem **162:**156-159 (1987).

16. **Chow AW, Murillo G, Yu C, van Breemen RB, Boddie AW, Pezzuto JM, Das Gupta TK, Mehta RG:** Resveratrol inhibits rhabdomyosarcoma cell proliferation. Eur J Cancer Prev **14:**351-356 (2005).
17. **Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, Howitz KT, Gorospe M, de Cabo R, Sinclair DA:** Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. Science **305:**390-392 (2004).
18. **Cust AE, Kaaks R, Friedenreich C, Bonnet F, M. Laville M, Lukanova A, Rinaldi S, Dossus L, Slimani N, Lundin E, Tjonneland A, Olsen A, Overvad K, Clavel-Chapelon F, Mesrine S, Joulin V, Linseisen J, Rohrmann S, Pischon T, Boeing H, Trichopoulos D, Trichopoulou A, Benetou V, Palli D, Berrino F, Tumino R, Sacerdote C, Mattiello A, Quiros JR, Mendez MA, Sanchez MJ, Larranaga N, Tormo MJ, Ardanaz E, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, van Gils CH, Khaw KT, Bingham S, Allen N, Key T, Jenab M, Riboli E:** Plasma adiponectin levels and endometrial cancer risk in pre- and postmenopausal women. J Clin Endocrinol Metab **92:**255-263 (2007).
19. **de la Lastra CA, Villegas I:** Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: mechanisms and clinical implications. Mol Nutr Food Res **49:**405-430 (2005).
20. **Dehmelt H:** Re-adaptation hypothesis: explaining health benefits of caloric restriction. Med Hypotheses **62:**620-624 (2004).
21. **Delmas D, Jannin B, Latruffe N:** Resveratrol: preventing properties against vascular alterations and ageing. Mol Nutr Food Res **49:**377-395 (2005).
22. **Dong Z:** Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. Mutat Res **523-524:**145-150 (2003).
23. **Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, Sanna V, Jebb SA, Perna F, Fontana S, Lechler RI, DePaoli AM, O'Rahilly S:** Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. J Clin Invest **110:**1093-1103 (2002).
24. **Gescher AJ, Steward WP:** Relationship between mechanisms, bioavailibility, and preclinical chemopreventive efficacy of resveratrol: a conundrum. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **12:**953-957 (2003).
25. **Glasow A, Kiess W, Anderegg U, Berthold A, Bottner A, Kratzsch J:** Expression of leptin (Ob) and leptin receptor (Ob-R) in human fibroblasts: regulation of leptin secretion by insulin. J Clin Endocrinol Metab **86:**4472-4479 (2001).
26. **Greenberg AS, Obin MS:** Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. Am J Clin Nutr **83:**461S-465S (2006).
27. **Guarente L, Picard F:** Calorie restriction--the SIR2 connection. Cell **120:**473-482 (2005).
28. **Hauner H, Skurk T, Wabitsch M:** Cultures of human adipose precursor cells. Methods Mol Biol **155:**239-247 (2001).
29. **Havel PJ, Kasim-Karakas S, Dubuc GR, Mueller W, Phinney SD:** Gender differences in plasma leptin concentrations. Nat Med **2:**949-950 (1996).
30. **Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA:** Small molecule activators of sirtuins extend Saccharomyces cerevisiae lifespan. Nature **425:**191-196 (2003).
31. **Hsieh TC, Wang Z, Hamby CV, Wu JM:** Inhibition of melanoma cell proliferation by resveratrol is correlated with upregulation of quinone reductase 2 and p53. Biochem Biophys Res Commun **334:**223-230 (2005).

32. **Jensen J, Serup P, Karlsen C, Nielsen TF, Madsen OD:** mRNA profiling of rat islet tumors reveals nkx 6.1 as a beta-cell-specific homeodomain transcription factor. J Biol Chem **271:**18749-18758 (1996).
33. **Jiang H, Zhang L, Kuo J, Kuo K, Gautam SC, Groc L, Rodriguez AI, Koubi D, Hunter TJ, Corcoran GB, Seidman MD, Levine RA:** Resveratrol-induced apoptotic death in human U251 glioma cells. Mol Cancer Ther **4:**554-561 (2005).
34. **Kadonaga JT, Carner KR, Masiarz FR, Tjian R:** Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. Cell **51:**1079-1090 (1987).
35. **Koerner A, Kratzsch J, Kiess W:** Adipocytokines: leptin--the classical, resistin--the controversical, adiponectin--the promising, and more to come. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **19:**525-546 (2005).
36. **Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, Kawamoto T, Matsumoto S, Ouchi N, Arita Y, Okamoto Y, Shimomura I, Hiraoka H, Nakamura T, Funahashi T, Matsuzawa Y:** Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. Arterioscler Thromb Vasc Biol **23:**85-89 (2003).
37. **Langenberg C, Bergstrom J, Scheidt-Nave C, Pfeilschifter J, Barrett-Connor E:** Cardiovascular death and the metabolic syndrome: role of adiposity-signaling hormones and inflammatory markers. Diabetes Care **29:**1363-1369 (2006).
38. **Leibiger IB, Berggren PO:** Sirt1: a metabolic master switch that modulates lifespan. Nat Med **12:**34-36; discussion 36 (2006).
39. **Li Z, Bowerman S, Heber D:** Health ramifications of the obesity epidemic. Surg Clin North Am **85:**681-701, v (2005).
40. **Lin SJ, Defossez PA, Guarente L:** Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in Saccharomyces cerevisiae. Science **289:**2126-2128 (2000).
41. **Lin YL, Shen CC, Huang YJ, Chang YY:** Homoflavonoids from Ophioglossum petiolatum. J Nat Prod **68:**381-384 (2005).
42. **Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Tochino Y, Okutomi K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T, Matsuzawa Y:** Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. Nat Med **8:**731-737 (2002).
43. **Mahyar-Roemer M, Katsen A, Mestres P, Roemer K:** Resveratrol induces colon tumor cell apoptosis independently of p53 and precede by epithelial differentiation, mitochondrial proliferation and membrane potential collapse. Int J Cancer **94:**615-622 (2001).
44. **Matsuzawa Y:** Therapy Insight: adipocytokines in metabolic syndrome and related cardiovascular disease. Nat Clin Pract Cardiovasc Med **3:**35-42 (2006).
45. **Mizutani K, Ikeda K, Kawai Y, Yamori Y:** Resveratrol stimulates the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. Biochem Biophys Res Commun **253:**859-863 (1998).
46. **Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S:** Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. Nature **387:**903-908 (1997).
47. **Morris BJ:** A forkhead in the road to longevity: the molecular basis of lifespan becomes clearer. J Hypertens **23:**1285-1309 (2005).
48. **Muoio DM, Lynis Dohm G:** Peripheral metabolic actions of leptin. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **16:**653-666 (2002).

49. **Nemoto S, Fergusson MM, Finkel T:** Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway. Science **306:**2105-2108 (2004).
50. **Nunez NP, Oh WJ, Rozenberg J, Perella C, Anver M, Barrett JC, Perkins SN, Berrigan D, Moitra J, Varticovski L, Hursting SD, Vinson C:** Accelerated tumor formation in a fatless mouse with type 2 diabetes and inflammation. Cancer Res **66:**5469-5476 (2006).
51. **Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Arita Y, Kumada M, Ohashi K, Sakai N, Shimomura I, Kobayashi H, Terasaka N, Inaba T, Funahashi T, Matsuzawa Y:** Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. Circulation **106:**2767-2770 (2002).
52. **Olshansky SJ:** Projecting the future of U.S. health and longevity. Health Aff (Millwood) **24 Suppl 2:**W5R86-89 (2005).
53. **Olson ER, Naugle JE, Zhang X, Bomser JA, Meszaros JG:** Inhibition of cardiac fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation by resveratrol. Am J Physiol Heart Circ Physiol **288:**H1131-1138 (2005).
54. **Oral EA, Ruiz E, Andewelt A, Sebring N, Wagner AJ, Depaoli AM, Gorden P:** Effect of leptin replacement on pituitary hormone regulation in patients with severe lipodystrophy. J Clin Endocrinol Metab **87:**3110-3117 (2002).
55. **Orallo F:** Comparative studies of the antioxidant effects of cis- and trans-resveratrol. Curr Med Chem **13:**87-98 (2006).
56. **Ouchi N, Shibata R, Walsh K:** Targeting adiponectin for cardioprotection. Expert Opin Ther Targets **10:**573-581 (2006).
57. **Pervaiz S:** Resveratrol--from the bottle to the bedside? Leuk Lymphoma **40:**491-498 (2001).
58. **Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, Leid M, McBurney MW, Guarente L:** Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. Nature **429:**771-776 (2004).
59. **Poussier B, Cordova AC, Becquemin JP, Sumpio BE:** Resveratrol inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and induces apoptosis. J Vasc Surg **42:**1190-1197 (2005).
60. **Pozo-Guisado E, Merino JM, Mulero-Navarro S, Lorenzo-Benayas MJ, Centeno F, Alvarez-Barrientos A, Fernandez-Salguero PM:** Resveratrol-induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells involves a caspase-independent mechanism with downregulation of Bcl-2 and NF-kappaB. Int J Cancer **115:**74-84 (2005).
61. **Qiao L, Shao J:** SIRT1 regulates adiponectin gene expression through Foxo1-C/EBPalpha transcriptional complex. J Biol Chem **29**;281(52):39915-39924 (2006).
62. **Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P:** Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. Nature **434:**113-118 (2005).
63. **Rondinone CM:** Adipocyte-derived hormones, cytokines, and mediators. Endocrine **29:**81-90 (2006).
64. **Sengottuvelan M, Viswanathan P, Nalini N:** Chemopreventive effect of trans-resveratrol--a phytoalexin against colonic aberrant crypt foci and cell proliferation in 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis. Carcinogenesis **27:**1038-1046 (2006).
65. **Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S, Brown MS, Goldstein JL:** Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. Nature **401:**73-76 (1999).
66. **Sinclair DA:** Toward a unified theory of caloric restriction and longevity regulation. Mech Ageing Dev **126:**987-1002 (2005).

67. **Straczkowski M, Dzienis-Straczkowska S, Stepien A, Kowalska I, Szelachowska M, Kinalska I:** Plasma interleukin-8 concentrations are increased in obese subjects and related to fat mass and tumor necrosis factor-alpha system. J Clin Endocrinol Metab **87:**4602-4606 (2002).
68. **Straczkowski M, Kowalska I, Nikolajuk A, Dzienis-Straczkowska S, Szelachowska M, I. Kinalska:** Plasma interleukin 8 concentrations in obese subjects with impaired glucose tolerance. Cardiovasc Diabetol **2:**5 (2003).
69. **Tsan MF, White JE, Maheshwari JG, Bremner TA, Sacco J:** Resveratrol induces Fas signalling-independent apoptosis in THP-1 human monocytic leukaemia cells. Br J Haematol **109:**405-412 (2000).
70. **Valenzano DR, Terzibasi E, Genade T, Cattaneo A, Domenici L, Cellerino A:** Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. Curr Biol **16:**296-300 (2006).
71. **Wabitsch M:** The acquisition of obesity: insights from cellular and genetic research. Proc Nutr Soc **59:**325-330 (2000).
72. **Wabitsch M, Brenner RE, Melzner I, Braun M, Moller P, Heinze E, Debatin KM, Hauner H:** Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. Int J Obes Relat Metab Disord **25:**8-15 (2001).
73. **Wang B, Trayhurn P:** Acute and prolonged effects of TNF-alpha on the expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture. Pflugers Arch **452:**418-427 (2006).
74. **Whitsett T, Carpenter M, Lamartiniere CA:** Resveratrol, but not EGCG, in the diet suppresses DMBA-induced mammary cancer in rats. J Carcinog **5:**15 (2006).
75. **Wolter F, Stein J:** Resveratrol enhances the differentiation induced by butyrate in caco-2 colon cancer cells. J Nutr **132:**2082-2086 (2002).
76. **Wood JG, Rogina B, Lavu S, Howitz K, Helfand SL, Tatar M, Sinclair D:** Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. Nature **430:**686-689 (2004).
77. **Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H:** Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. J Clin Invest **112:**1821-1830 (2003).
78. **Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T:** The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. Nat Med **7:**941-946 (2001).
79. **Yang S, Meyskens FL Jr:** Alterations in activating protein 1 composition correlate with phenotypic differentiation changes induced by resveratrol in human melanoma. Mol Pharmacol **67:**298-308 (2005).
80. **Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G, Benedetto FA, Cutrupi S, Parlongo S, Malatino LS, Bonanno G, Seminara G, Rapisarda F, Fatuzzo P, Buemi M, Nicocia G, Tanaka S, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y:** Adiponectin, metabolic risk factors, and cardiovascular events among patients with end-stage renal disease. J Am Soc Nephrol **13:**134-141 (2002).

Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Martin Wabitsch dafür bedanken, dass er mir ermöglichte, im endokrinologischen Forschungslabor der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Ulm meine experimentelle Doktorarbeit zu absolvieren.

Ein besonders großer Dank gilt auch meiner Betreuerin Dr. rer. nat. Pamela Fischer-Posovszky, die mich fachlich und moralisch bei meiner Doktorarbeit unterstützte und immer mit viel Geduld meine Fragen beantwortete.

Ein Dankeschön auch an Alexandra Killian, die mir die Grundsätze der Laborarbeit beibrachte und mir bei labortechnischen Problemen zur Seite stand.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Nikolaus Marx bedanken, der sich als Berichterstatter zur Verfügung gestellt hat.

Vor allem möchte ich aber meinen Eltern Gabriele und Klaus Kukulus dafür danken, dass sie mich immer in meinem Tun unterstützt haben.

Vera Kukulus

Lebenslauf

Name	Vera Kukulus
Geburtsdatum	22.09.1981
Geburtsort	Ichenhausen
Anschrift	Olgastraße 124 89073 Ulm
Familienstand	Ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Schulische Ausbildung	1989-1993 Grundschule der Volksschule Schwenningen 1993-2001 St. Bonaventura-Gymnasium Dillingen 2001 Allgemeine Hochschulreife
Studium	2001-2008 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm
Veröffentlichungen	Fischer-Posovszky P, Kukulus V, Zulet M, Debatin KM, Wabitsch M: Conjugated linoleic acid promotes human fat cell apoptosis. Horm Metab Res. 2007 Mar;39(3):186-191. Fischer-Posovszky P, Kukulus V, Wabitsch M: Konjugierte Linolsäuren (CLA) und ihre Bedeutung für die Reduktion des Körperfettes. MMW Fortschr Med. In press.
Kongressbeiträge	Fischer-Posovszky P, Kukulus V, Tornqvist H, Wabitsch M: Effect of resveratrol on human adipocyte biology. Keystone Meting “Adipogenesis, Obesity and Inflammation”. Vancouver, 2006 (Poster).

Kukulus V, Fischer-Posovszky P, Killian A, Wabitsch M: Einfluss von Resveratrol auf die endokrine Funktion der Fettzelle. 22. Jahrestagung der Deutschen Adipositas-Gesellschaft. Köln, 2006 (Vortrag).