

**Aus der Medizinischen Klinik I  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. H. Lehnert**

**Direkte Statin-Wirkungen auf Adipozyten:  
Atorvastatin induziert stadienabhängig Apoptose und  
beeinflusst endokrine und metabolische Fettzellfunktionen**

**Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck**

**- Aus der Medizinischen Fakultät -**

**vorgelegt von  
Wanda Mäuser  
aus Düsseldorf**

**Lübeck 2007**

*Gewidmet meinem Vater.*

- 1. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Johannes Klein**
- 2. Berichtstatter: Prof. Dr. rer. nat. Walter Raasch**

**Tag der mündlichen Prüfung: 04.06.2008**

**Zum Druck genehmigt.**

**Lübeck, den 04.06.2008**

**gez.**

**-Dekan der Medizinischen Fakultät-**

**Aus dieser Dissertation sind folgende Publikationen hervorgegangen:**

*Originalartikel:*

**Mäuser W**, Perwitz N, Meier B, Fasshauer M, Klein J:

Direct adipotropic actions of atorvastatin: differentiation state-dependent induction of apoptosis, modulation of endocrine function, and inhibition of glucose uptake.

*European Journal of Pharmacology* 564(1-3):37-46 (2007).

*Wissenschaftlicher Beitrag auf nationalem Fachkongress:*

**Mäuser W**, Perwitz N, Meier B, Fasshauer M, Klein J:

Direct interaction of atorvastatin with white and brown adipocytes: Induction of apoptosis and modulation of endocrine function. *41. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, Leipzig (2006), Diabetologie und Stoffwechsel*, 2006, Heft S. 1

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Adipositas</b>	<b>1</b>
1.2	<b>Fettgewebe</b>	<b>1</b>
1.2.1	Differenzierung	3
1.2.2	Apoptose	4
1.2.3	Endokrine Funktionen von Adipozyten	5
1.2.4	Metabolische Funktionen von Adipozyten	7
1.3	<b>Statine</b>	<b>9</b>
1.3.1	Pleiotrope Effekte von Statinen	9
1.3.2	Atorvastatin	10
1.4	<b>Fragestellung</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>12</b>
2.1	<b>Material</b>	<b>12</b>
2.1.1	Chemikalien	12
2.1.2	Antikörper	13
2.1.3	Primer	14
2.1.4	Geräte	14
2.1.5	Verbrauchsartikel	15
2.1.6	Selbsthergestellte Medien, Puffer und Lösungen	15
2.2	<b>Methoden</b>	<b>18</b>
2.2.1	Zellkultur	18
2.2.2	Serumdeprivation	19
2.2.3	Oil Red O Färbung	19
2.2.4	Zellen zählen	20
2.2.5	Cell viability assay, MTT-Test	20
2.2.6	Cell death detection ELISA Plus	21
2.2.7	RT-PCR	21
2.2.8	Gelelektrophorese und Immunoblots	23
2.2.9	Assay zur Messung der intrazellulären Glukoseaufnahme	24
2.2.10	Statistische Auswertung	24
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>25</b>
3.1	<b>Atorvastatin hemmt die Lipidakkumulation in weißen, früh differenzierenden Präadipozyten, aber nicht in terminal differenzierten Adipozyten</b>	<b>25</b>

<b>3.2</b>	<b>Atorvastatin hemmt dosisabhängig die Proteinexpression des frühen Differenzierungsmarkers CEBP-<math>\beta</math> in differenzierenden weißen Präadipozyten</b>	<b>25</b>
<b>3.3</b>	<b>Atorvastatin reduziert Zellzahl und Zellebendigkeit in weißen Präadipozyten, aber nicht in terminal differenzierten Adipozyten</b>	<b>27</b>
3.3.1	Atorvastatin reduziert die Zellebendigkeit in proliferierenden und differenzierenden Präadipozyten, aber nicht in terminal differenzierten Adipozyten	27
3.3.2	Atorvastatin reduziert die Zellzahl proliferierender Präadipozyten	28
<b>3.4</b>	<b>Atorvastatin induziert Apoptose in proliferierenden und differenzierenden, weißen Präadipozyten, aber nicht in terminal differenzierten Adipozyten</b>	<b>30</b>
<b>3.5</b>	<b>Atorvastatin hemmt die Aktivierung von AKT in differenzierenden weißen Präadipozyten</b>	<b>32</b>
<b>3.6</b>	<b>Atorvastatin beeinflusst direkt das proinflammatorische, glukoregulatorische Adipokin-Expressionsprofil terminal differenzierter weißer Adipozyten</b>	<b>34</b>
<b>3.7</b>	<b>Differentielle metabolische Effekte von Atorvastatin auf terminal differenzierte weiße und braune Adipozyten</b>	<b>36</b>
3.7.1	Atorvastatin hemmt die insulininduzierte Glukoseaufnahme	36
3.7.2	Atorvastatin hat keinen Effekt auf die Proteinexpression von UCP-1	38
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>39</b>
<b>4.1</b>	<b>Atorvastatin hat stadienabhängige Effekte auf Proliferation, Differenzierung und Apoptose in Adipozyten</b>	<b>39</b>
<b>4.2</b>	<b>Atorvastatin hat direkte Effekte auf die mRNA-Expression von inflammatorischen und glukoregulatorischen Adipokinen</b>	<b>44</b>
<b>4.3</b>	<b>Atorvastatin hemmt dosisabhängig die insulininduzierte Glukoseaufnahme</b>	<b>49</b>
<b>4.4</b>	<b>Gewonnene Erkenntnisse</b>	<b>51</b>
<b>4.5</b>	<b>Ausblick</b>	<b>53</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>64</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>66</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>67</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Adipositas

Ein Vergleich von 25 EU-Ländern hinsichtlich des Anteils an Übergewichtigen in der Bevölkerung ergab, dass in Deutschland 75 % der Männer und 59 % der Frauen zu dick sind (IASO, 2007). Damit liegt Deutschland für beide Geschlechter in der Europäischen Union auf Platz 1 der Übergewichtstabelle. Adipositas, definiert als „Body Mass Index“ (BMI) von mehr als  $25 \text{ kg/m}^2$  (Hamann *et al.*, 2001), ist zu einer weltweiten Pandemie geworden. Aufgrund ihrer vielfältigen Folgeerkrankungen ist Adipositas nicht nur ein kosmetisches, sondern vor allem ein medizinisches Problem (Isomaa, 2003; Grundy *et al.*, 2004). Sechs Prozent der Ausgaben der Gesundheitssysteme in der EU gehen auf Krankheiten zurück, die durch Übergewicht bedingt sind. In Deutschland sind das zwischen 10 und 20 Milliarden Euro (IASO, 2007). Adipositas ist ein Hauptrisikofaktor für die Entwicklung von Insulinresistenz, Diabetes mellitus Typ 2, Hypertonie und Dyslipidämie. Die auffällig häufige Assoziation dieser verschiedenen metabolischen Dysregulationen hat zum Begriff des „metabolischen Syndroms“ geführt (Grundy *et al.*, 2004; Reynolds und He, 2005). Zu typischen Symptomen und Befunden des metabolischen Syndroms und damit zu weiteren Folgeerkrankungen der Adipositas zählen: Hyperurikämie, Gerinnungsstörungen mit erhöhten Plasmaspiegeln von PAI-1 und Fibrinogen, ein chronisch subinflammatorischer Prozess, endotheliale Dysfunktion, Fettleber, polyzystisches Ovarialsyndrom und eine erhöhte sympathische Aktivität (Wajchenberg, 2000; Isomaa, 2003; Grundy *et al.*, 2004). Sämtliche Komponenten des metabolischen Syndroms sind unabhängige kardiovaskuläre Risikofaktoren und gehen mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einher. Die Pathogenese des metabolischen Syndroms und damit die Kausalverknüpfung seiner einzelnen Komponenten ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung. Vieles deutet darauf hin, dass metabolische und endokrine Dysregulationen im Fettgewebe für die vielfältigen Folgeerkrankungen der Adipositas verantwortlich sind (Kopelman, 2000; Matsuzawa, 2006).

## 1.2 Fettgewebe

Lange Zeit wurde die Funktion des Fettgewebes unterschätzt. Man ging davon aus, dass es sich um ein Organ mit einer einzigen Aufgabe, der Energiespeicherung, handelt (Löffler, 1997). Heute weiß man, dass Fettgewebe ein komplexes und hochaktives endokrines Organ mit vielfältigen Funktionen ist. Es hat neben seiner Rolle als Fettspeicherorgan

wichtige Aufgaben in der Regulation der Glukosehomöostase des Organismus und nimmt durch die Sekretion bioaktiver Peptide, so genannter Adipokine (s. Kapitel 1.2.3, S. 5), Einfluss auf das endokrine sowie auf das Immunsystem (Rajala und Scherer, 2003; Kershaw und Flier, 2004; Klein *et al.*, 2006; Klein *et al.*, 2007). Fettgewebe steht durch seine Adipokinsekretion sowohl mit anderen peripheren endokrinen Organen, als auch mit dem zentralen Nervensystem in Verbindung. Neben Adipozyten enthält Fettgewebe Stroma-, Nerven- und Immunzellen. Diese Komponenten wirken als funktionelle Einheit zusammen. Als aktiver Regulator der Energiehomöostase des Gesamtorganismus hat ein gestörter Adipozytenstoffwechsel negativen Einfluss auf andere Systeme (Trayhurn und Wood, 2005; Matsuzawa, 2006). Adipozyten als Fettparenchymzellen besitzen die außergewöhnliche Fähigkeit, um ein Vielfaches ihrer Größe zu expandieren. Dabei verändern sie jedoch auch ihre endokrinen und metabolischen Funktionen. Dies führt bei Adipozytenhypertrophie zu metabolischen und endokrinen Dysregulationen: „*adiposopathy*“ (Bluher *et al.*, 2002; Erol, 2005; Bays und Dujovne, 2006).

Zur differentiellen Betrachtung von Adipozytenfunktionen wird Fettgewebe nach Farbe und Lokalisation unterteilt. Dabei unterscheidet man nach seiner makroskopischen und mikroskopischen Erscheinung einerseits weißes, univakuoläres und andererseits braunes, multivakuoläres Fett. Beide Gewebsarten haben ähnliche biochemische Eigenschaften, beispielsweise die Synthese und Speicherung von Triglyzeriden (Lipogenese), allerdings unterscheiden sie sich durch ihre systemische Funktion: weißes Fett dient im Rahmen des Stoffwechsels vornehmlich der Energiespeicherung und bedarfsgerechter Abgabe in Form von freien Fettsäuren (Lipolyse), während in braunem Fett Energie in Form von Wärme verstoffwechselt wird (Nedergaard *et al.*, 2007). Weißes Fett lässt sich nach seiner Lokalisation weiter unterteilen in abdominelles und subkutanes Fett. Untersuchungen zufolge scheinen morphologisch gleiche Adipozyten abhängig von ihrer Lokalisation im Organismus unterschiedliche endokrine und metabolische Funktionen zu haben (Wajchenberg, 2000). Wachsende Evidenz belegt, dass Adipozytendysfunktion und die damit einhergehende gestörte Sekretion von Adipokinen in einem kausalen Zusammenhang mit der Pathogenese des metabolischen Syndroms steht (Trayhurn und Wood, 2005; Matsuzawa, 2006). Dabei ist vor allem das intraabdominale, weiße Fett aufgrund seines Hormonprofils an der Entwicklung von metabolischen Dysregulationen beteiligt. Dazu gehören beispielsweise Insulinresistenz, Hyperglykämie, Dyslipidämie, Hypertonie sowie prothrombotische und proinflammatorische Prozesse (Rexrode *et al.*, 1998; Grundy *et al.*, 2004; Dagenais *et al.*, 2005). Wichtige



Adipozytenfunktionen, die u.a. für die Pathogenese des metabolischen Syndroms relevant sind, werden im Folgenden erläutert.

### 1.2.1 Differenzierung

Der Begriff Differenzierung bezeichnet die strukturelle bzw. funktionelle Spezialisierung von pluripotenten mesenchymalen Stammzellen. Im Rahmen der Adipogenese entwickeln sich während der Determination pluripotenter Stammzellen zunächst Adipozyten-Vorläuferzellen: die Präadipozyten (Avram *et al.*, 2007). *In vivo* ist der Prozess der terminalen Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten kaum untersucht. *In vitro* teilen sich Präadipozyten während der Proliferationsphase bis eine Hemmung durch Zellkontakte stattfindet, anschließend wird, durch die Zugabe von Induktionsmitteln, die Lipidakkumulation und damit die terminale Differenzierung eingeleitet (Avram *et al.*, 2007). Dadurch wird im Präadipozyten ein „adipogenes Programm“ gestartet, welches die Aktivierung von unterschiedlichen intrazellulären Signaltransduktionswegen beinhaltet. Eine zentrale Rolle spielen dabei die Herabregulation des „*inhibitory preadipocyte factor-1*“ und die Induktion des „*nuclear peroxisome proliferation-activated receptor-gamma*“ sowie die Expression von Transkriptionsfaktoren aus der Familie der Enhancerproteine. Ein frühzeitig im Differenzierungsprozess exprimierter Transkriptionsfaktor ist C/EBP- $\beta$ . Dieser gilt daher als Marker der frühen Differenzierungsphase (Gustafson und Smith, 2006). Im Rahmen der Präadipozytendifferenzierung verändert sich zudem die Morphologie der Zelle. Der Präadipozyt akkumuliert Lipide in intrazellulären Fetttropfen und hat die außergewöhnliche Fähigkeit, um ein Vielfaches an Größe zuzunehmen. Ferner verändert sich das Proteinsekretionsprofil. So werden einige Adipokine, z. B. Adiponektin, erst von terminal differenzierten Adipozyten sezerniert, während Entzündungsmediatoren wie Interleukin-6 (IL-6) schon sehr früh von Präadipozyten sezerniert werden (Wang *et al.*, 2005; Gustafson und Smith, 2006). Die verstärkte Expression und Externalisierung des insulinabhängigen Glukosetransporters GLUT-4 führt zu verbesserter Glukoseaufnahme im differenzierten Adipozyten, während schlecht differenzierte Zellen relativ insulinresistent sind (Gustafson und Smith, 2006). Kommt es aufgrund von Lipidüberschuss zu pathologischer Lipidakkumulation und daraus folgend zur Adipozytenhypertrophie, so führt dies zu Zelldysfunktionen, „*adiposopathy*“ (Bays und Dujovne, 2006).

### 1.2.2 Apoptose

In Organen mit der Fähigkeit zur reversiblen Expansion ist für die Organdifferenzierung und -aufrechterhaltung nicht nur die Zellproliferation, sondern auch deren Elimination von Bedeutung (Löffler, 1997). Elimination einzelner Zellen in einem sonst gesunden Organ läuft nach einem genetisch festgelegten Programm ab, welches als Apoptose bezeichnet wird. Apoptose als physiologische Form des Zelltodes ist abzugrenzen von der pathologischen Form, der Nekrose. Nekrose bezeichnet einen Prozess, der u. a. durch externe chemische oder physikalische Noxen ausgelöst wird und mit einer Entzündungsreaktion einhergeht. Hingegen ist Apoptose ein physiologischer Prozess, bei dem Zellen während Entwicklungsprozessen oder anderer biologischer Prozesse eliminiert werden. Die kardinalen morphologischen Kriterien dabei sind Zellschrumpfung, Chromatinverdichtung sowie die Aufteilung des Zytoplasmas mit Zellkern in Apoptosekörperchen. Diese können, ohne einen Entzündungsprozess auszulösen, von Makrophagen eliminiert werden. Die Induktion von Apoptose kann über unterschiedliche intrazelluläre Signaltransduktionswege erfolgen. Dabei spielen sowohl die Aktivierung von proapoptotischen als auch die Hemmung von antiapoptotischen Kinasen eine Rolle (Wyllie, 2004).

**Antiapoptotische Kinase AKT.** Apoptose als programmierter, physiologischer Zelltod läuft über definierte intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden ab. Ein möglicher molekularer Mechanismus zur Induktion von Apoptose ist die Hemmung der Aktivierung von AKT, einem intrazellulären Signaltransduktionsmolekül. AKT ist eine Schlüsselkinase mehrerer wichtiger Signaltransduktionswege. Sie hat einen zentralen Stellenwert in der Signalvermittlung durch PI-3, die u. a. in der Insulinsignalkaskade eine Rolle spielt. Die Bindung von Insulin an seinen Rezeptor löst durch Phosphorylierung unterschiedlicher intrazellulärer Moleküle eine Signalkaskade aus (Bevan, 2001). Diese wird eingeleitet durch die Autophosphorylierung und damit Aktivierung der rezeptoreigenen Tyrosinkinase. Daraufhin werden Insulinrezeptorsubstrate aktiviert, die selbst Ausgangspunkte unterschiedlicher Signalwege sind und untereinander ein komplexes Netzwerk bilden. Ein wichtiger Signalweg ist die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3-K). AKT gilt als eine Schlüsselkinase dieses Signalweges (Coffer *et al.*, 1998). Der PI-3-K-Signalweg spielt u. a. eine Rolle bei der Regulation von Proteinsynthese, Genexpression, Apoptose, Glykogensynthese und Glukoseaufnahme (Alessi und Downes, 1998).

AKT wird durch Phosphorylierung aktiviert. Es vermittelt u. a. die Expression des Glukosetransporters GLUT-4, wirkt auf die Fettsäure- und Glykogensynthese und besitzt damit eine wichtige Funktion für die Zelldifferenzierung (Alessi und Downes, 1998; Coffey *et al.*, 1998). Ferner wirkt es proliferativ und antiapoptotisch (Alessi und Downes, 1998; Kim und Chung, 2002). AKT ist somit ein wichtiges Signalmolekül für entscheidende Zellfunktionen. In der Fettzelle gehören zu diesen vor allem die Aufnahme, Verarbeitung und Speicherung von Glukose sowie Proliferation, Differenzierung und Apoptose.

### **1.2.3 Endokrine Funktionen von Adipozyten**

Die Identifizierung und Charakterisierung von Leptin (1994) revolutionierte das Verständnis der Fettgewebefunktion. Fettgewebe wurde als endokrines Organ erkannt (Zhang *et al.*, 1994). Seitdem wurden eine Reihe bioaktiver Peptide identifiziert, die von Adipozyten sezerniert werden, sogenannte Adipokine. Adipozyten interagieren durch die Sekretion proinflammatorischer Adipokine wie z. B. TNF- $\alpha$ , Interleukin-6 (IL-6) und MCP-1 mit dem inerten Immunsystem. Sie sind u. a. durch die Bildung von PAI-1 an der Hämostase beteiligt sowie durch die Produktion von Leptin neuroendokrin wirksam. Fettgewebe bildet durch vielfältige, zentrale und periphere Interaktionen mit anderen Organen eine evolutionär alte Verbindung zwischen Energiehomöostase und inertem Immunsystem (Rajala und Scherer, 2003; Kershaw und Flier, 2004; Iwen *et al.*, 2006; Klein *et al.*, 2006). Die herausragende endokrine Funktion von Fettgewebe wird durch die metabolischen Konsequenzen deutlich, die sowohl bei Fettüberschuss als auch bei Fettmangel bzw. falscher Fettverteilung auftreten. So werden metabolische Dysregulationen wie Dyslipidämie und Diabetes mellitus Typ 2 sowie Systemerkrankungen wie Hypertonie und Atherosklerose mit der Sekretion anti- bzw. proinflammatorischer und glukoregulatorischer Adipokine in Verbindung gebracht (Gabriely *et al.*, 2002; Trayhurn und Wood, 2005; Wang *et al.*, 2005; Ahima, 2006; Gable *et al.*, 2006). Adipokine haben autokrine, parakrine und systemische Wirkungen und werden zum Teil spezifisch im Fettgewebe, zum Teil aber auch in anderen Organen produziert. In dieser Arbeit wird die Regulation glukoregulatorischer und proinflammatorischer Schlüsseladipokine untersucht, die eine Rolle in der Pathogenese systemischer Stoffwechselstörungen wie z. B. Insulinresistenz und Atherosklerose zu spielen scheinen. Diese Adipokine sollen im Folgenden näher beschrieben werden.

**Interleukin-6 (IL-6).** IL-6 ist, neben seinen immunologischen Funktionen, mit Übergewicht und Insulinresistenz assoziiert. Ein Drittel des im Blut zirkulierenden IL-6 stammt aus dem Fettgewebe (Fernandez-Real und Ricart, 2003), andere Bildungsorte sind die Leber sowie immunkompetente Zellen. IL-6 wird u. a. von Adipozyten exprimiert und sezerniert, dabei ist die Expression und Sekretion von IL-6 im abdominellen Fettgewebe zwei- bis dreifach höher als im subkutanen (Fain *et al.*, 2004). Die IL-6-Expression im Fettgewebe und der IL-6-Plasmaspiegel korrelieren positiv mit Übergewicht und Insulinresistenz (Fernandez-Real und Ricart, 2003), konsekutiv sinken bei Gewichtsabnahme sowohl Plasmaspiegel als auch die Expression von IL-6 im Fettgewebe. Eine Kausalverknüpfung von hohen IL-6-Plasmaspiegeln mit dem metabolischen Syndrom bzw. Adipositas und Insulinresistenz wird angenommen (Kershaw und Flier, 2004). Entgegen dieser Annahme entwickelten IL-6-*knockout*-Mäuse mit konsekutivem Mangel an IL-6 jedoch einen juvenilen Diabetes, der durch IL-6-Applikation partiell reversibel war (Wallenius *et al.*, 2002). Diese Beobachtung zeigt, dass IL-6 auch einen positiven Effekt auf Insulinresistenz haben kann und die genaue Rolle von IL-6 in der Pathogenese des metabolischen Syndroms nach heutigem Wissenstand noch nicht vollständig geklärt ist.

**Adiponektin.** Adiponektin ist ein Polypeptid, das spezifisch von differenzierten Adipozyten v. a. im viszeralen Fett exprimiert wird und einen relativ hohen Plasmaspiegel aufweist. Adiponektinrezeptoren befinden sich u. a. auf Muskel- und auf Leberzellen. Es wurde eine streng negative Korrelation zwischen Adiponektinplasmaspiegeln und Insulinresistenz sowie systemischen Entzündungsparametern festgestellt. Niedrige Adiponektinspiegel finden sich sowohl bei Adipositas als auch bei Lipodystrophie. Nach Gewichtsreduktion bei Adipositas steigen die Adiponektinspiegel an und korrelieren positiv mit verbesserter Insulinsensitivität. Adiponektin-*knockout*-Mäuse entwickeln Glukoseintoleranz und zeigen eine verstärkte Proliferation glatter Muskelzellen nach Endothelverletzungen. Adiponektin verhindert die Adhäsion von Monozyten an Gefäßwände und wirkt damit antiatherogen (Rajala und Scherer, 2003; Kershaw und Flier, 2004; Gable *et al.*, 2006; Matsuzawa, 2006).

**Visfatin.** Visfatin wird vor allem im viszeralen, aber auch im subkutanen Fettgewebe gebildet. Seine Plasmaspiegel korrelieren positiv mit dem BMI (Berndt *et al.*, 2005). Visfatin wirkt insulinmimetisch, indem es an den Insulinrezeptor bindet und dessen hypoglykämischen Effekt durch Verminderung der Glukosefreisetzung aus Hepatozyten verstärkt. Darüber hinaus stimuliert Visfatin die Glukoseaufnahme in peripheren Geweben

(Beltowski, 2006). Deshalb wird Visfatin mit der Pathogenese von Diabetes mellitus Typ 2 in Verbindung gebracht (Sethi und Vidal-Puig, 2005). Neuere Daten sprechen ausserdem dafür, dass Visfatin proinflammatorische Effekte besitzt (Tilg und Moschen, 2006; Moschen *et al.*, 2007). Erhöhte Visfatinplasmaspiegel finden sich bei zahlreichen inflammatorischen Prozessen (Pilz *et al.*, 2007), wie beispielsweise Sepsis (Jia *et al.*, 2004), rheumatoider Arthritis (Otero *et al.*, 2006) und Diabetes mellitus Typ 2 (Sethi und Vidal-Puig, 2005). Ferner wird angenommen, dass Visfatin die Endotheldysfunktion begünstigt und damit zur Pathogenese von Atherosklerose beiträgt (Takebayashi *et al.*, 2007).

**Macrophages and Monocytes Chemoattractant Protein (MCP-1).** Das Chemokin MCP-1 wird u. a. im Fettgewebe und in Endothelzellen gebildet. Es hat sowohl lokale als auch systemische Effekte und lockt durch seine chemokine Wirkung Makrophagen ins Fettgewebe. Übergewicht ist daher mit einer erhöhten Fettgewebsinfiltration von Makrophagen assoziiert. Durch die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF- $\alpha$  durch Makrophagen kommt es zu einem inflammatorischen Prozess. Inkubation von Adipozyten mit MCP-1 bewirkt eine Reduktion der insulininduzierten Glukoseaufnahme. Deshalb wird vermutet, dass MCP-1 an der Entwicklung von Insulinresistenz kausal beteiligt ist. Periphere Applikation von MCP-1 in Mäusen erhöht die Anzahl an zirkulierenden Makrophagen und ihre Akkumulation in Blutgefäßen. Daher wird MCP-1 auch eine Rolle in der Entwicklung von Atherosklerose zugeschrieben (Kershaw und Flier, 2004; Dragomir und Simionescu, 2006).

### 1.2.4 Metabolische Funktionen von Adipozyten

Das Fettgewebe ist der größte Substratspeicher des Organismus. In Adipozyten werden während der Lipogenese überschüssige Fettsäuren und Glukose in Triazylglyzeride umgewandelt und gespeichert. Bei Bedarf werden diese durch Lipolyse in Fettsäuren und Glycerin gespalten und ins Blut sezerniert (Löffler, 1997). Die Lipogenese wird durch Insulin reguliert. Dabei spielt die insulininduzierte Glukoseaufnahme der Adipozyten bei der physiologischen Regulation der Glukosehomöostase des Organismus eine wichtige Rolle (Kadowaki *et al.*, 2003). Adipozytendysfunktion durch schlechte Differenzierung bzw. Zellhypertrophie führt zu lokaler und konsekutiv zu systemischer Insulinresistenz und damit zu Glukoseintoleranz (Kadowaki *et al.*, 2003; Bays und Dujovne, 2006; Gustafson und Smith, 2006).

In braunem Fettgewebe werden Fettsäuren oxidiert und ihre Energie in Form von Wärme abgegeben. Diesen Vorgang bezeichnet man als Thermogenese (Löffler, 1997).

Die in dieser Arbeit untersuchten metabolischen Adipozytenfunktionen und ihre Rolle bei der Genese von Dysregulationen im Rahmen des metabolischen Syndroms werden im Folgenden näher erläutert.

**Glukoseaufnahme.** Insulin hat eine wichtige Funktion für die strenge Regulation des Blutzuckerspiegels. Es induziert die Glukoseaufnahme in Myo- und Adipozyten. Die große Bedeutung des Glukosemetabolismus in Adipozyten für die Entstehung von systemischer Insulinresistenz wird durch Beobachtungen an Mäusen mit isoliertem Insulinrezeptor-*knockout* in Adipozyten deutlich; diese weisen eine verminderte systemische Glukosetoleranz auf und entwickeln konsekutiv einen Diabetes Typ 2 (Minokoshi *et al.*, 2003). Die insulininduzierte Glukoseaufnahme von Adipozyten hat somit eine wesentliche Bedeutung für die Glukosetoleranz des Organismus. Dabei verursacht sowohl Übergewicht als auch Lipodystrophie systemische Insulinresistenz und damit eine Prädisposition zum Diabetes mellitus Typ 2 (Saltiel und Kahn, 2001).

**Thermogenese in braunen Adipozyten.** Braunes Fettgewebe erhält seine Farbe durch seine große Anzahl zytochrom- und mitochondrienreicher Zellen. Es zeichnet sich dadurch aus, dass die durch sympathische Stimulation freiwerdenden Fettsäuren noch im braunen Fett selbst oxidiert werden und ihre Energie als Wärme abgegeben wird. Dieser Vorgang wird als Thermogenese bezeichnet und durch das „*Uncoupling Protein*“ (UCP) vermittelt. UCP ist ein mitochondriales Protein, das spezifisch nur in braunem Fettgewebe vorkommt. Es bewirkt eine regulierbare Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung über die Mitochondrienmembran. Dadurch wird Energie, anstatt in Form von ATP gespeichert zu werden, als Wärme abgegeben (Löffler, 1997). Braunes Fettgewebe dient der Aufrechterhaltung der Körpertemperatur bei sich im Winterschlaf befindenden Nagetieren sowie bei Menschen während der Neugeborenenphase. Lange ging man davon aus, dass es im Erwachsenenalter zum vollständigen Verlust von braunem Fettgewebe kommt bzw. die rudimentären, diffus verstreuten braunen Adipozyten keine Funktion haben. Allerdings gibt es zunehmend Belege dafür, dass die Thermogenese brauner Adipozyten auch für die Energiehomöostase des Erwachsenen eine wichtige Funktion hat und an der Pathogenese von Adipositas beteiligt sein könnte (Oberkofler *et al.*, 1997; Nedergaard *et al.*, 2007). An möglichen Therapieansätzen zur Behandlung von Adipositas durch Stimulation der

Thermogenese in braunen Adipozyten wird derzeit geforscht (Lowell und Flier, 1997; Klein *et al.*, 2002; Klein *et al.*, 2006).

### **1.3 Statine**

Statine sind spezifische, kompetitive Hemmer des Cholesterin-synthetisierenden Enzyms *3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme-A* (HMG-CoA)-Reduktase. Damit bewirken Statine eine Hemmung der Cholesterinsynthese. Um den Cholesterinbedarf zu decken, kommt es nach Hemmung der HMG-CoA-Reduktase zu einer kompensatorischen Zunahme der LDL-Rezeptoren (Schachter, 2005). Durch Statintherapie lässt sich das LDL-Cholesterin um bis zu 40 % senken, während das HDL-Cholesterin um ca. 10 % ansteigt. Zusätzlich werden Triglyceride um bis zu 20 % gesenkt (Karow, 2005). Damit sind Statine derzeit die wichtigsten Medikamente zur Behandlung von Hyperlipidämie und insbesondere von Hypercholesterinämie.

#### **1.3.1 Pleiotrope Effekte von Statinen**

Groß angelegte klinische Studien belegen, dass durch Statine eine Senkung der Mortalität und Morbidität in der Primär- und Sekundärprophylaxe kardiovaskulärer Erkrankungen erreicht werden kann (Maron *et al.*, 2000; Palinski, 2000; Colhoun *et al.*, 2004; Sever *et al.*, 2004). Die Senkung der Mortalität nach kardiovaskulären Ereignissen scheint jedoch nicht nur auf dem lipidsenkenden Effekt der Statine zu beruhen. Diskutiert werden sogenannte pleiotrope Effekte: Studien belegen antiinflammatorische, antiatherogene und antioxidative Eigenschaften von Statinen (Colhoun *et al.*, 2004; Arnaud *et al.*, 2005a; Jain und Ridker, 2005). Statine vermindern die Produktion von freien Radikalen und erhöhen die endotheliale Produktion von Nitritoxid, sie wirken proliferationshemmend und proapoptotisch in glatten und kardialen Muskelzellen (Baetta *et al.*, 1997; Palinski, 2001; Demyanets *et al.*, 2006), sowie in Endothelzellen (Muck *et al.*, 2004a). Es gibt außerdem Belege für eine Verbesserung der Glukosetoleranz unter Statintherapie (Huptas *et al.*, 2006). Somit scheinen Statine auch anderen Symptomen des metabolischen Syndroms entgegenzuwirken, und könnten damit ein Indikationsspektrum unabhängig von Hypercholesterinämie erlangen.

Die exakten gewebs- und zellspezifischen Mechanismen der pleiotropen Statineffekte sind jedoch bislang unbekannt. Da das Fettgewebe mit seinen vielfältigen Funktionen eine wichtige Schlüsselkomponente in der Pathogenese des metabolischen Syndroms darstellt, ist es plausibel anzunehmen, dass pleiotrope Statineffekte durch

direkte Interaktionen mit Adipozyten und Modulation ihrer unterschiedlichen Funktionen bedingt sein könnten.

### 1.3.2 Atorvastatin

Atorvastatin ist derzeit nach Rosuvastatin das wirkungsvollste lipidsenkende Statin (Schachter, 2005). Es wird bevorzugt in *in vitro* Experimenten eingesetzt, da es aufgrund seiner Lipophilie durch Diffusion gut in die Zelle gelangt. Die genaue Konzentration, die Atorvastatin im Fettgewebe erreicht, ist bislang nicht untersucht. Es ist aber aufgrund seiner Lipophilie anzunehmen, dass Atorvastatin im Fettgewebe kumuliert und somit Konzentrationen erreicht, die über denen im Plasma liegen (Schachter, 2005). Pleiotrope Effekte von Atorvastatin werden derzeit kontrovers diskutiert. Es konnten antiinflammatorische Effekte mit einer signifikanten Senkung des Entzündungsmarkers CRP nachgewiesen werden (van de Ree *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003; Zhao und Zhang, 2003; Ascer *et al.*, 2004; Shetty *et al.*, 2004), die sich jedoch nicht beliebig reproduzieren ließen. Vor allem in niedrigen Dosierungen zeigte sich keine signifikante Reduktion der CRP-Werte (Bayes *et al.*, 2005; Huptas *et al.*, 2006). Zudem sind Daten zu Effekten von Atorvastatin auf die Glukosehomöostase in Typ II Diabetikern sehr inkonsistent. Einige Studien berichten über verbesserte glukostatische Parameter wie HbA<sub>1C</sub> und HOMA (Homeostasis Model Assessment Index) (Suzuki *et al.*, 2005; Huptas *et al.*, 2006), doch es mehren sich Belege, die über eine Erhöhung der HbA<sub>1C</sub>-Werte von Patienten unter Atorvastatintherapie berichten (2001; Ishikawa *et al.*, 2006; Takano *et al.*, 2006).

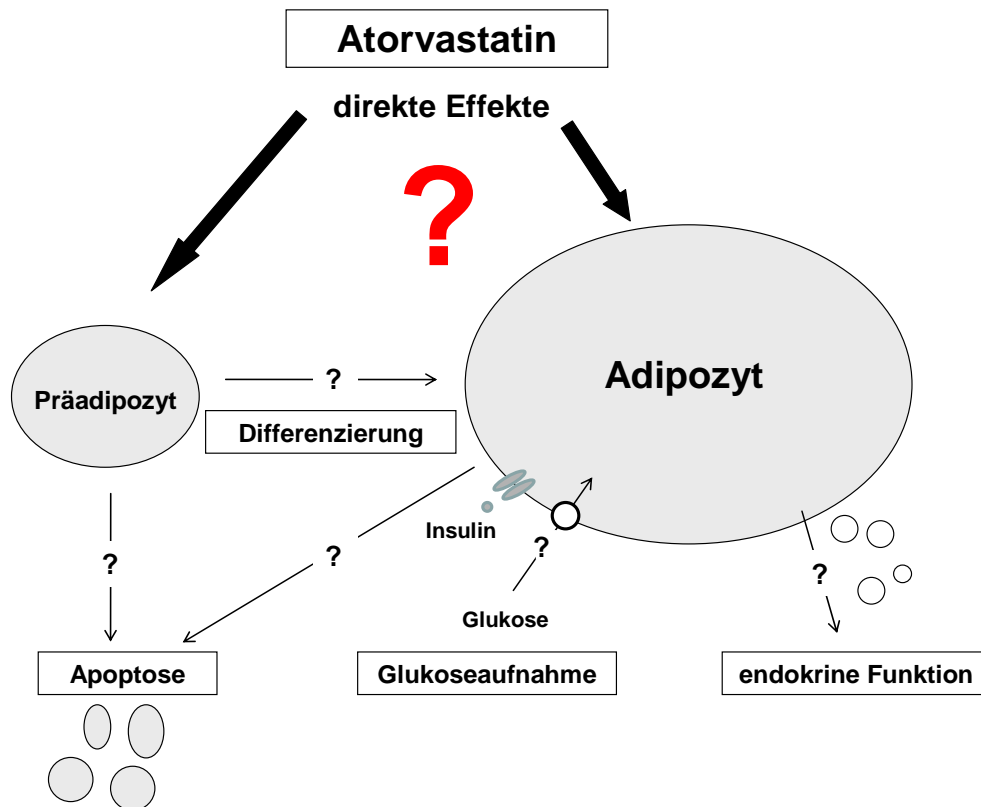
### 1.4 Fragestellung

Wie in den vorherigen Abschnitten dieses Kapitels dargelegt, scheinen Adipozyten und Fettgewebe eine aktive Rolle bei der Ausbildung des metabolischen Syndroms und der damit einhergehenden, erhöhten kardiovaskulären Morbidität zu spielen. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist es daher, direkte Einwirkungen des als besonders potent erachteten Statins Atorvastatin auf proliferative, metabolische und endokrine Fettzellfunktionen zu untersuchen (s. Abb. 1). Dabei stehen insbesondere folgende Fragen im Mittelpunkt:

1. Hat Atorvastatin direkte Effekte auf Präadipozyten und Adipozyten?
2. Sind diese Effekte stadienabhängig?
3. Haben diese Effekte Auswirkungen auf die Proliferation, Differenzierung und Apoptose in Präadipozyten und Adipozyten?



4. Über welchen Mechanismus induziert Atorvastatin Apoptose?
5. Moduliert Atorvastatin die mRNA-Expression proinflammatorischer und glukoregulatorischer Adipokine in weißen, terminal differenzierten Adipozyten?
6. Hat Atorvastatin Effekte auf metabolische Adipozytenfunktionen in terminal differenzierten Adipozyten?



**Abb. 1 Fragestellung:** Hat Atorvastatin direkte Effekte auf differenzierende Prä- und terminal differenzierte Adipozyten und beeinflusst damit wichtige Adipozytenfunktionen wie Differenzierung, Apoptose, endokrine Funktionen und die insulininduzierte Glukoseaufnahme?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Applichem (Darmstadt)
Aprotinin	Fluka Chemie (Neu-Ulm)
APS	Serva (Heidelberg)
Aquasafe 300	ICN Biomedicals (Meckenheim)
Atorvastatin	Pfizer (New York, USA)
BenchMark™ PreStained Protein Ladder	Invitrogen (Karlsruhe)
BM-Cyclin	Roche (Mannheim)
Bovines Serumalbumin	Biomol (Hamburg)
Bradford-Protein-Assay	Roche (Mannheim)
Calciumchlorid	Bio-Rad (München)
Cell Death Detection ELISA Plus Kit	Merck (Darmstadt)
Chemolumineszenz-Kit (Maus-Kaninchen)	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
Cl316,243	Sigma (Deisenhofen)
Chromatographiepapier	Whatman (Maidstone, UK)
2-Deoxy-[ <sup>3</sup> H]Glukose, 5 µCi/ml DEPC (Diethylpyrocarbonat)	NEN Life Sciences Products (Dreieich) Fluka (Steinheim, Schweiz)
Dexamethason	Sigma (Deisenhofen)
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma (Deisenhofen)
DTT (1,4-Dithiothetrol)	Invitrogen (Karlsruhe)
Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium (4,5 g/l Glukose)	Invitrogen (Karlsruhe)
ECL-Filme	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Entwickler: G 153B	Agfa-Gevaert AG (Dübendorf)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Roche (Mannheim)
Ethylendiamin-Tetraessigsäure, Titriplex	Sigma (Deisenhofen)
Fixierer: G354 Schnellfixierer	Agfa-Gevaert AG (Dübendorf)
Formalin	Sigma (Deisenhofen)
Fötales bovines Serumalbumin	Sigma (Deisenhofen)
Glukose	Merck (Darmstadt)
Glycerol	Apotheke der Universität zu Lübeck
Glycin	BioMol (Hamburg)
HCL 25%	Merck (Darmstadt)
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethan-sulfonsäure)	BioMol (Hamburg)
Indometazin	Sigma (Deisenhofen)
Insulin (bovin)	Sigma (Deisenhofen)
Isobutylmethylxanthin	Sigma (Deisenhofen)
Isopropanol	Sigma (Deisenhofen)

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Isoproterenol	Sigma (Deisenhofen)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kaliumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Leupeptin	Sigma (Deisenhofen)
Magermilchpulver	Difco (Detroit, USA)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Methanol	Baker (Deventer, Niederlande)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumdodezylsulfat	Fluka (Buchs, Schweiz)
Natriumorthovanadat	Sigma (Deisenhofen)
Natriumpyrophosphat	Sigma (Deisenhofen)
Nitrozellulosemembranen Protran BA	Schleicher und Schuell (Dassel)
85Oil Red O	Sigma (Deisenhofen)
Penicillin/Streptomycin	BioWhittaker (Vervier, Belgien)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Boehringer Mannheim (Mannheim)
Prestained RNeasy-Kit	Qiagen (Hilden)
2-Propanol	Merck (Darmstadt)
Proteinmarker BenchMark	Invitrogen (Karlsruhe)
SDS	Fluka (Steinheim)
SYBR Green Mix	Qiagen (Hilden)
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Sigma (Deisenhofen)
Trijodthyronin	Sigma (Deisenhofen)
Tris	Biomol (Hamburg)
Tris-HCL	Roth (Karlsruhe)
Trizol	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypsin	Sigma (Deisenhofen)
Tween 20	Sigma (Deisenhofen)

### 2.1.2 Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-CEBP- $\beta$	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, USA)
Anti-Maus-IgG	Cell Signalling Technology Inc. (Beverly, USA)
Anti-Phospho-AKT (473)	Cell Signalling Technology Inc. (Beverly, USA)
Anti-UCP-1	Chemicon International (Temecula, USA)

### 2.1.3 Primer

Primer	Basensequenz
36B4 sense	AAG CGC GTC CTG GA TTG TCT
36B4 antisense	CCG CAG GGG CAG CAG TGG T
Adiponektin sense	CTT AAT CCT GCC CAG TCA TGC
Adiponektin antisense	CCT TCC AAC CTG CAC AAG TTC
Interleukin 6 sense	AGC CAG AGT CCT TCA GA
Interleukin 6 antisense	GGT CCT TAG CCA CTC CT
MCP-1 sense	GCC CCA CTC ACC TGC TGC TAC T
MCP-1 antisense	CCT GCT GCT GGT GAT CCT CTT GT
Visfatin sense	TCG GTT CTG GTG GCG CTT TGC TAC
Visfatin antisense	AAG TTC CCC GCT GGT GTC CTA TGT

*Alle Primer von Biometra (Göttingen)*

### 2.1.4 Geräte

Geräte	Hersteller
Analysenwaage	Sartorius (Göttingen)
β-Zähler 1409	Wallac (Turku, Finnland)
Digitalkamera C5060 Wide Zoom	Olympus (Hamburg)
Elektronische Pipettierhilfe, accu-jet	Brand (Wertheim)
Filmkassette	Hypercassette (Amersham Biotech, UK)
Gelelektrophoresenkammer Mini-Protean 3	Bio-Rad (München)
Gelgießvorrichtung	Bio-Rad (München)
γ-Zähler LKB, 1219	LKB (Freiburg)
Heizblöcke Thermomixer Compact	Eppendorf (Hamburg)
Inkubator Typ B5060, EK CO <sub>2</sub>	Heraeus, Osterode
Mikroskop Olympus CK2	Olympus (Hamburg)
Multistepper, Multipette	Eppendorf (Hamburg)
Netzgeräte für Elektrophorese	Pharmacia BioTech (San Francisco, USA)
Neubauer Zählkammer	Hassa (Lübeck)
pH-Meter	Kinck (Berlin)
Photometer, Biophotometer	Eppendorf (Hamburg)
Rotator	Renner GmbH (Darmstadt)
Scanner	UMAX Vista Scan
Schüttelgerät Vortex-Genie2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Schwenker	Hassa (Lübeck)
Stromversorgung Power Supply 600	Pharmacia BioTech (San Francisco, USA)
RT-PCR Gerät	Eppendorf (Hamburg)
Thermocycler (Taqman)	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Wasserbad Typ 3044	Köttermann (Hänigsen)
Werkbank (steril) Nuair Class2	Zapf Instruments (Sarstedt)
Wippe	Doumax 1030 (Heidolph)
Zentrifuge Biofuge fresco/Rotor 3765	Heraeus (Osterode)
Zentrifuge MiniSpin Plus	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge Multifuge 3S-R	Heraeus (Osterode)

### 2.1.5 Verbrauchsartikel

Verbrauchsartikel	Hersteller
Halbmikroküvetten	Plastibrand (Wertheim)
Falcon-Röhrchen, 50 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Film Hyperfilm	Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK)
Filter Steritop Express Plus 0,22 µM	Millipore Corporation (Billicore, USA)
Mikroküvetten UVette	Eppendorf (Hamburg)
Nitrozellulosemembran Protan BA 85	Schleicher und Schuell (Dassel)
Biosphere Filter Tips (10, 20, 1000 µl)	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen (10, 20, 1000 µl)	Sarstedt (Nümbrecht)
Stabpipetten (5,10,25,50 mL)	Serological Pipette Sarstedt (Nümbrecht)
<b>Reaktionsgefäße</b>	
RNase-freie	Sarstedt (Nümbrecht)
96-well	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Szintillationsröhrchen	Sigma (Deisenhofen)
Zellschaber	Sarstedt (Nümbrecht)
<b>Zellkulturschalen</b>	
Standardkulturschalen (100/150*20 mm)	Sarstedt (Newton, USA)
12-Loch-Platten	Corning Instruments (Corning, USA)
6-Loch-Platten	Nunclon Surface (DK)

### 2.1.6 Selbsthergestellte Medien, Puffer und Lösungen

#### Zellkulturmedien

Substanz	Konzentration
<i>ad Dulbecco's Eagle Modified Medium</i>	
<b>Grundmedium</b>	
Fetales bovines Serum	20 %
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 U/ml
<b>Differenzierungsmedium</b>	
Fetales bovines Serum	20 %
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 U/ml
T3	1 nM
Insulin	20 nM

Substanz	Konzentration
<i>ad Differenzierungsmedium</i>	
<b>Induktionsmedium</b>	
Dexamethason	2 mg/l
Indomethazin	50 µM
IBMX	100 µM

**Herstellung der gebrauchsfertigen Atorvastatinlösung.** Atorvastatin wurde für jeden Versuchtag frisch in 100 % Methanol gelöst. Es wurde jeweils eine 10 mM Stocklösung in benötigten Mengen angesetzt. Diese wurde je nach benötigter Konzentration mit 100 % Methanol weiter verdünnt. Dann wurde Atorvastatin in das Zellmedium pipettiert und dabei 1:1000 verdünnt.

**Basalkontrolle.** Als Basalkontrolle für alle Versuche wurde 0,1 % Methanol verwendet.

**Oil Red O Lösungen**

Substanz	Konzentration/Menge
<b>Stocklösung</b>	
Oil Red O	0,5 g
Isopropanol	100 ml
<b>Färbelösung</b>	
Stocklösung	60 %
<i>aqua bidest</i>	40 %

**Puffer für MTT**

Substanz ad <i>DMSO</i>	Konzentration
<b>Lysispuffer für MTT-Test</b>	
SDS	10 %
Eisessig	0,6 %

**Reagenzien für RNA-Nachweis und Isolation**

Substanz	Konzentration
<b>TBE (pH 8,0)</b>	
Tris Base	890 mM
Borsäure	890 mM
EDTA	20 mM

**DEPC-Wasser.** DEPC 1:1000 in *aqua dest.* (lichtgeschützt) 30 min rühren. Über Nacht lagern, dann autoklavieren.

**Agarose-Gel.** 2 % Agarose in TBE aufkochen und kurz abkühlen lassen.

**Reagenzien für cDNA-Synthese**

Substanz ad <i>aqua dest.</i>	Konzentration
<b>Primer-Mix für cDNA-Synthese</b>	
Oligo-dt Primer	4 nM
dUTP	250 µM
dATP	250 µM
dCTP	250 µM

Substanz ad <i>aqua dest.</i>	Konzentration
dGTP	250 µM
<b>Transkriptase-Mix für cDNA-Synthese</b>	
5*-Puffer	50 % vol.
DTT	25 mM
RNase Inhibitor	1,25 U/µl
Super Script II	25 U/µl
<b>Reaktionsmix für RT-PCR</b>	
SYBR Green Mix	55 % vol.
Primer upstream	0,9 mM
Primer downstream.	0,9 mM

**Puffer für Westernblot**

Substanz	Konzentration
<b>Lysis-Puffer (pH 7.4 bei 4°C)</b>	
HEPES	50 mM
NaCL	137 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	10 mM
NaF	10 mM
EDTA	2 mM
Glycerol	10 % vol.
IGEPAL	1 % w/v
Vanadat	2 mM
Leupeptin	10 µg/ml
Aprotinin	10 µg/ml
PMSF	2 mM
<b>Runningbuffer (10*)</b>	
Tris	30,3 g/l
Glycin	142,5 g/l
EDTA	3,35 g/l
SDS	10 g/l
<b>Transferpuffer (10*)</b>	
Methanol	20 % vol.
Tris	30 g/l
Glycin	144 g/l
<b>Rinsingbuffer für Cell Signaling AK</b>	
Tris	10 mM
NaCl	150 mM
Tween (10%)	0,05 % vol
<b>Laemmli-Auftragspuffer (5*)</b>	
Glycerol	50 % vol
SDS	100 g/l
Bromphenol	0,1 g/l
Tris	50 mM
DDT	500 mM
<b>TBS Santa Cruz AK</b>	
Tris-HCL	10 mM
NaCL	150 mM

Tween (20%)	0,05 %
Substanz ad TBS	Konzentration
<b>Blotto A</b>	
Magermilchpulver	5 %

### Gelzusammensetzung für Westernbot

	Trenngele				Sammelgel
	8 %	10 %	12 %	14 %	4,5 %
<i>aqua dest.</i>	7 ml	6 ml	5 ml	3,4 ml	3,4 ml
Tris (1,5mM pH 8,8)	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	625 µl (0,5M pH 6,8)
Acrylamid	4 ml	5 ml	6 ml	7 ml	850 µl
10 % SDS	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl	50 µl
10 %APS	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	5 µl

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

**Zelllinie.** Die Experimente dieser Arbeit wurden durchgeführt mit SV 40 T-Antigen immortalisierten weißen epididymalen und braunen Adipozytenlinien, hergestellt in der AG von Prof. Dr. med. J. Klein (Klein *et al.*, 2002; Klein *et al.*, 2004; Ott *et al.*, 2004; Perwitz *et al.*, 2006).

**Zellproliferation.** Weiße epididymale Präadipozyten wurden auf 15 cm Kulturschalen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in 25 ml Grundmedium kultiviert. Nach Erreichen von 70 % Konfluenz, je nach Wachstumsgeschwindigkeit nach 2-3 Tagen, wurden sie gesplittet. Die Zellen wurden dazu drei Minuten trypsiniert und damit von der Stammplatte gelöst. Mit 30 ml Grundmedium wurde eine Suspension mit konstanter Konzentration an Zellen hergestellt. Je nach Versuchsaufbau wurden die Zellen dann auf unterschiedlich große Kulturschalen in definierten Volumina ausgesät. Einen Tag nach Aussaat wurde die gleichmäßige Verteilung der Zellen auf den Platten lichtmikroskopisch überprüft; dieser Tag wurde als Tag eins der Proliferationsphase definiert. Nach drei Tagen Proliferation waren die Zellen zu 100 % konfluent und wurden mit Dexamethason, Indometazin und IBMX zum Auslösen der terminalen Differenzierungsphase 16-24 h induziert.

**Zelldifferenzierung.** Die Fettzelldifferenzierung ist u. a. durch die Einlagerung von Fett in die Zelle charakterisiert, darüber hinaus verändert die Zelle im Rahmen der



Differenzierung ihre metabolischen Funktionen und exprimiert charakteristische Oberflächenmoleküle. Die Einlagerung von Fett in die Zelle in Form von Fetttropfen lässt sich lichtmikroskopisch überprüfen. Die Fetteinlagerung beginnt, nachdem die Induktion durch Substitution des Induktionsmediums durch Differenzierungsmedium beendet wird. Dieser Tag wurde in der vorliegenden Arbeit als Tag Null definiert. Die Zellen wurden sechs Tage mit Differenzierungsmedium in gutem Ernährungszustand gehalten. Am sechsten Tag nach Ende der Induktion waren mikroskopisch große Fetttropfen erkennbar, dies wurde als Zeichen einer terminalen Differenzierung gewertet.

### 2.2.2 Serumdeprivation

Zur Vorbereitung der Versuchsstimulationen für PCR und Western Blots wurden die Zellen vor Versuchsbeginn 24 h in Minimalmedium serumdepriviert, d. h. sie wurden in reinem DMEM ohne Zusatz von FBS, T3, Insulin oder Antibiotika kultiviert.

### 2.2.3 Oil Red O Färbung

**Färbung und Mikroskopie.** Die Oil Red O Färbung ist eine spezifische Fettfärbung, die zur Objektivierung der Adipozytendifferenzierung benutzt wurde. Hierzu wurden Zellen auf 10 cm Kulturschalen kultiviert und wie im Ergebnisteil beschrieben (s. Kapitel 3.1, S. 25), mit Atorvastatin 1 und 10  $\mu\text{M}$  behandelt. Färbungen wurden an Tag 0, 3 und 6 nach Ende der Induktion durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann für 15 Minuten mit Formalin fixiert. Aus einer Oil Red O Stocklösung wurde die Färbelösung hergestellt, indem 6 ml Stocklösung und 4 ml destilliertes Wasser mit einem Whatmanfilter filtriert wurden. Die 10 cm Kulturschalen wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 5 ml Färbelösung gefärbt und anschließend mehrfach mit Wasser gewaschen, bis sich keine Farbrückstände mehr von der Platte abwaschen ließen. Um die Austrocknung der gefärbten Zellen zu verhindern, wurde ein wenig Wasser auf der Platte belassen. Die gefärbten Platten wurden eingescannt, zusätzlich wurden lichtmikroskopische Bilder bei 40-facher Vergrößerung mittels einer Digitalkamera angefertigt. Als Positivkontrolle wurden terminal differenzierte Adipozyten ohne spezifische Behandlung benutzt, Negativkontrolle waren nicht differenzierte Präadipozyten.

### 2.2.4 Zellen zählen

Um die Proliferation der Zellen zu quantifizieren, wurden diese lichtmikroskopisch in einer Neubauer Zellkammer gezählt. Dazu wurden die Zellen in 6-Loch-Platten ausgesät und jeweils einen Tag nach Aussaat, wie im Ergebnisteil beschrieben (s. Kapitel 3.3.1, S. 27) mit Atorvastatin behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin von der Platte gelöst, in 5 ml Grundmedium suspendiert und in Falconröhrchen überführt. Dann wurden sie mit  $250 \times g$  für 5 Minuten zentrifugiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen abermals zentrifugiert und anschließend in 1 ml PBS resuspendiert. In 96-well Schalen wurde je 90  $\mu$ l Trypanblau mit 10  $\mu$ l Zellsuspension gemischt und daraus genau 10  $\mu$ l in die Neubauerzählkammer pipettiert. Es wurden jeweils vier Kästchen der Neubauerzählkammer ausgezählt. Um zur absoluten Zellzahl zu gelangen, wurde der gezählte Wert mit dem Faktor 45.000 multipliziert. Alle Werte wurden durch die Basalkontrolle geteilt und als Prozent zum Basalwert angegeben.

### 2.2.5 Cell viability assay, MTT-Test

Die Zelllebensfähigkeit wurde mit einem zytotoxischen MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromid) Test nach Mosmann (Mosmann, 1983) bestimmt.

**Testprinzip.** Lebendige Zellen sind metabolisch aktiv und reduzieren Tetrazoliumsalze zu farbigen Formazankristallen. In gelöstem Zustand können diese photometrisch quantifiziert werden.

**Durchführung.** Zellen wurden auf 6-Loch-Platten inkubiert und mit Atorvastatin behandelt, es wurden immer Doppelwerte bestimmt. Nach der Stimulation wurden sie mit in PBS gelöstem MTT für 3 Stunden im Inkubator inkubiert. Die Endkonzentration des MTT betrug 0,5 mg/ml. In dieser Zeit erfolgte die metabolische Umsetzung des MTT Salzes zu Formazan. Danach wurden die gebildeten Kristalle mit 5 ml Lysispuffer für 20 min bei Raumtemperatur lysiert. Nach gründlichem Schwenken wurde je 1 ml der farbigen Lösungen in Küvetten pipettiert und bei 570 nm und 630 nm photometrisch gemessen. Als Positivkontrolle wurden unbehandelte Adipozyten verwendet, Negativkontrolle war MTT in Lysispuffer.

**Auswertung.** Die Doppelwerte wurden gemittelt. Die Extinktionen von 630 nm wurden von den Extinktionen bei 570 nm abgezogen. Alle Werte wurden durch die Basalwerte unbehandelter Zellen geteilt und relativ zu diesem Basalwert in Prozent angegeben.

### 2.2.6 Cell death detection ELISA Plus

Apoptose wurde mittels Cell death detection ELISA<sup>Plus</sup> Kit von Roche bestimmt. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Test erstmalig für die verwendeten Zelllinien etabliert.

**Testprinzip.** Der Assay ist als quantitativer Sandwich-Enzym-Immunoassay aufgebaut. Er weist spezifisch Mono- und Oligonukleosomen in der zytoplasmatischen Fraktion von Zelllysaten nach. Mit Hilfe monoklonaler Mausantikörper werden DNA und Histone gebunden.

**Testdurchführung.** Zur Probenvorbereitung wurden die Zellen wie im Ergebnisteil beschrieben kultiviert, mit Atorvastatin behandelt und lysiert. Nach der Lyse wurden die Proben 10 Minuten mit  $200 \times g$  zentrifugiert, der Überstand wurde dann bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Zur Durchführung des ELISA wurden  $20 \text{ }\mu\text{l}$  der Proben in eine Streptavidin beschichtete 96-well ELISA Platte gegeben. Es wurden jeweils Doppelwerte bestimmt. Die Proben wurden mit einer Mischung aus Anti-Histon-Biotin und Anti-DNA-POD für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit konnte der Anti-Histon-Antikörper die Histonkomponente des Nukleosomen binden, gleichzeitig wurde der Immunkomplex an der Streptavidin beschichteten Platte fixiert. Ferner reagierte der Anti-DNA-POD-Antikörper mit der DNA-Komponente des Nukleosoms. Dann wurde dreimal mit je  $150 \text{ }\mu\text{l}$  Inkubationspuffer gewaschen, um nicht immunreaktives Material zu entfernen. Die Zellen wurden nun mit ABTS- (Peroxidase Substrat) Lösung bis zum erkennbaren Farbumschlag inkubiert (ca. 5-10 min), dann wurde im ELISA-Reader die Extinktion bei einer Wellenlänge von 490 nm photometrisch bestimmt. Die Menge an gebundenem POD-Immunkomplex war nach Umsatz durch die Peroxidaselösung proportional zur Extinktion. Als Positivkontrolle diente eine Probe mit reinem DNA-Histonkomplex, Negativkontrolle war eine Probe mit ABTS-Lösung.

**Auswertung.** Aus den Doppelwerten wurde der Mittelwert gebildet. Dann wurden alle Werte der Versuchsbedingungen durch die Basalwerte unbehandelter Zellen geteilt und relativ zu diesem Basalwert in Prozent angegeben.

### 2.2.7 RT-PCR

**Probenvorbereitung.** Zellen wurden in 10 cm Kulturschalen bis zur vollständigen Differenzierung kultiviert. Dann erfolgte eine 24-stündige Serumdeprivation. Danach wurden die Zellen, wie im Ergebnisteil beschrieben mit Atorvastatin stimuliert. Zum

Stoppen der Stimulation wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in flüssigen Stickstoff getaucht und anschließend bei  $-120\text{ °C}$  für wenige Tage gelagert.

**RNA-Isolation.** Auf die gefrorenen Platten wurde 1 ml Trizol-Reagenz gegeben und durch Schwenken verteilt. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Platte entfernt und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurden sie 1 Minute gevortext, in dieser Zeit kam es zur Zelllyse. Die Zellen wurden 10 Minuten mit  $8500 \times g$  zentrifugiert und der Überstand zwischen Fettfilm und Pellet in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Fällung der Proteine und genomischer DNA wurde mit 250  $\mu\text{l}$  Chloroform durchgeführt. Die Proben wurden abermals für 10 Minuten zentrifugiert. Ab dieser Phase der Isolation wurde streng RNase-frei gearbeitet. Aus der wässrigen Phase der Proben wurden 700  $\mu\text{l}$  in ein neues RNase freies Eppendorfgefäß pipettiert und die RNA wurde mit 700  $\mu\text{l}$  kaltem Isopropanol gefällt. Die Proben wurden geschwenkt und bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation für 10 Minuten. Danach wurden die Proben mit 75 % RNase freiem Ethanol gewaschen, gevortext und zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das verbleibende RNA-Pellet in 20  $\mu\text{l}$  Wasser gelöst. Die Reinheit der RNA wurde mittels einer Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert.

**Herstellung der c-DNA.** Die Menge an gewonnener RNA wurde photometrisch für jede Probe bestimmt und die RNA-Konzentrationen durch Verdünnen mit Wasser aneinander angeglichen. Aus jeder Probe wurden gleiche Mengen in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert. Zu jeder Probe wurde nun Primer-Mix pipettiert und die Probe 5 min bei  $65\text{ °C}$  inkubiert, damit der Primer binden konnte. Anschließend wurde Transkriptase-Mix dazugegeben und die Proben bei  $70\text{ °C}$  innerhalb von 45 Minuten in cDNA umgeschrieben.

**RT-PCR.** In eine 96-well-Platte wurden je 12,5  $\mu\text{l}$  SYBRGreen Mix, 1  $\mu\text{l}$  forward primer, 1  $\mu\text{l}$  reward primer und 8,5  $\mu\text{l}$  *aqua dest.* vorgelegt. Dazu wurden 2  $\mu\text{l}$  1:10 verdünnte cDNA-Probe pipettiert. Es wurden jeweils Doppelwerte bestimmt. Als *housekeeping* Gen wurde 36B4 verwendet. Die Temperaturprofile variierten mit den unterschiedlichen Primern. Es wurden jeweils 40 Zyklen durchlaufen. Für Adiponektin und Visfatin mit folgendem Temperaturprofil:  $95\text{ °C}$ : 10 Minuten (einmalig);  $95\text{ °C}$ : 30 Sekunden;  $56\text{ °C}$ : 30 Sekunden;  $72\text{ °C}$ : 30 Sekunden, für IL-6 und MCP-1 mit diesem Temperaturprofil:  $95\text{ °C}$ : 10 Minuten (einmalig);  $95\text{ °C}$ : 30 Sekunden;  $55\text{ °C}$ : 45 Sekunden;  $72\text{ °C}$ : 1 Minute.

### 2.2.8 Gelelektrophorese und Immunoblots

**Probenvorbereitung.** Weiße und braune Adipozyten wurden, wie im Ergebnisteil beschrieben (s. Kapitel 3.2, 3.5 und 3.7.2, S. 25, S. 32 bzw. S. 38), mit Atorvastatin stimuliert. Um die Stimulation zu beenden wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen, mit 450 µl Lysispuffer versehen und auf Eis gestellt. Danach wurden sie mit einem Zellschaber von der Platte gelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. In einem Rotator wurden sie zehn Minuten rotiert, damit sie vollständig mit dem Lysispuffer reagieren konnten. Anschließend wurden sie 10 Minuten mit mit  $8500 \times g$  bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der auf der Probe schwimmende Fettfilm wurde mit einem Wattestäbchen entfernt und der Überstand vom Zellpellet getrennt. Die so gewonnene Proteinmenge wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm nach Bradford bestimmt und die Proteinkonzentrationen mit Hilfe von Lysispuffer angeglichen. Die Proteinproben wurden mit Laemmli-Auftragspuffer stabilisiert.

**Western Blot.** Western Blots wurden mit Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE) durchgeführt. Die Proteine wurden bei einer Spannung von 100 V für ca. zwei Stunden elektrophoretisch aufgetrennt und danach bei 100 V auf eine Nitrozellulosemembran für eine Stunde transferiert. Für UCP-1 und phospho-AKT erfolgte die Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper nach folgendem Protokoll: Die Membran wurde mit 3 % BSA-Lösung in Rinsingpuffer über Nacht bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  geblockt. Am nächsten Tag wurde sie mit einer 1:1000 Verdünnung eines Primärantikörpers 2 Stunden für UCP-1 bzw. 24 h für phospho-AKT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Rinsingpuffer folgte die einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper, es folgte ein gründlicher Waschschrift. Für CEBP- $\beta$  erfolgte die Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper wie folgt: Die Membranen wurden in Blotto A über Nacht bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  geblockt. Am darauffolgenden Tag wurden sie bei einer Primärantikörperkonzentration von  $2\text{ }\mu\text{g/ml}$  in Blotto A für eine Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS erfolgte die 45-minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Danach erfolgte erneut ein gründlicher Waschschrift.

**Darstellung der Membranen.** Nach Beenden der Waschgänge wurden die Membranen eine Minute mit Detektionslösung behandelt. Die gebundenen Sekundärantikörper setzten nun durch Kopplung an eine Peroxidase das in der Detektionslösung vorhandene Substrat um. Die dadurch entstandene Fluoreszenz führte in der Dunkelkammer zur Schwärzung

auf einem Photofilm. Die Filme wurden eingescannt und die Schwärzung der Banden mit der Software „Quantity One“ quantitativ ausgewertet.

### **2.2.9 Assay zur Messung der intrazellulären Glukoseaufnahme**

Die Assays zur Messung der intrazellulären Glukoseaufnahme wurden wie bereits beschrieben durchgeführt (Klein *et al.*, 1999). Die Zellen wurden bis zur vollen Differenzierung in 12-Loch-Platten herangezogen, für jede Versuchsbedingung wurde ein Triplikat angesetzt. Nach 24-stündigem *Starving* wurden die Zellen zweimal mit 37 °C warmem KRH-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 1 h und 24 h mit Atorvastatin (1 und 10 µM) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> stimuliert. Die Zellen wurden für 30 Minuten mit 100 nM Insulin stimuliert, bevor sie für 4 Minuten mit 2-Deoxy-[<sup>3</sup>H]Glukose inkubiert (0,5 µCi/ml) wurden. Zur Beendigung der Glukoseaufnahme wurden die 12-Loch-Platten dreimal in eiskaltem PBS gewaschen und jeweils 500 µl 0,1% SDS zur Solubilisierung auf die Zellen gegeben (Raumtemperatur). Nach Lyse wurden 400 µl des Lysates abpipettiert und zu 2 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben. Die Zählraten der Proben wurden abschließend in *cpm* für jeweils 1 Minute im β-Szintillationszähler in Triplikaten bestimmt.

### **2.2.10 Statistische Auswertung**

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert (MW) mit Standardfehler (SE) als Prozent der nicht stimulierten Probe bzw. als Prozent vom maximal erreichbaren Insulineffekt angegeben. Der Standardfehler wurde aus der Standardabweichung der Einzelwerte, dividiert durch die Quadratwurzel des Stichprobenumfanges minus eins, berechnet. Um statistische Signifikanz der Ergebnisse der verschiedenen Zellstimulationen nachzuweisen, wurde der Einstichproben-t-Test (Sachs und Hedderich, 2006) mit Bonferroni-Korrektur angewendet. Geprüft wurde dabei, ob sich die Ergebnisse der jeweiligen Stichprobe signifikant von 100 % der nicht stimulierten Proben unterschieden. p-Werte < 0.05 wurden als signifikant angesehen.

### 3 Ergebnisse

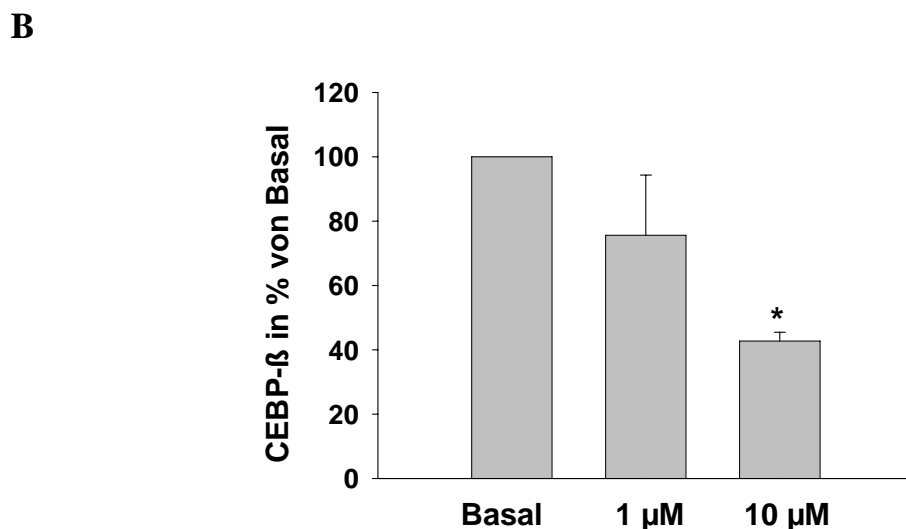
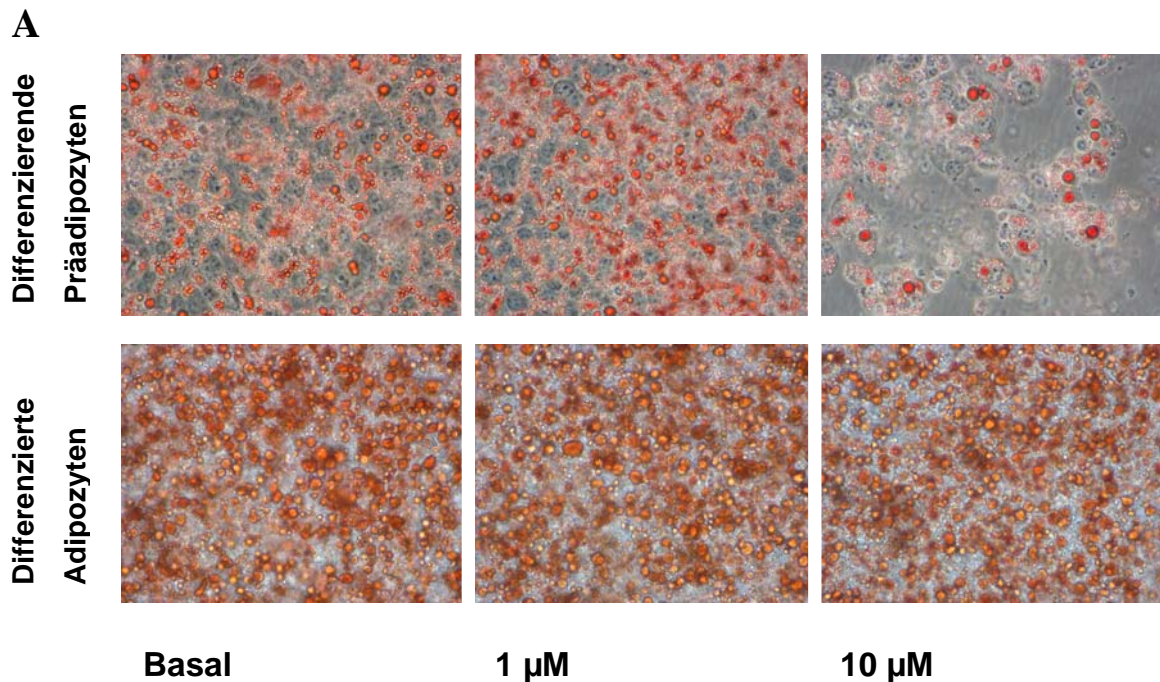
#### 3.1 Atorvastatin hemmt die Lipidakkumulation in weißen, früh differenzierenden Präadipozyten, aber nicht in terminal differenzierten Adipozyten

Weißer differenzierende Präadipozyten und terminal differenzierte Adipozyten wurden dauerhaft von Tag 1-3 bzw. von Tag 4-6 nach dem Ende der Induktion mit Atorvastatin in Konzentrationen von 1 und 10  $\mu\text{M}$  behandelt. Zur Quantifizierung der Lipidakkumulation bzw. Zelldifferenzierung wurde nach drei Tagen eine fettspezifische Oil Red O Färbung durchgeführt. In den behandelten Präadipozyten zeigte sich mikroskopisch nach dreitägiger Stimulation mit 10  $\mu\text{M}$  Atorvastatin eine deutlich geringere Dichte von Fetttropfen, verglichen mit der Fetttropfendichte in unbehandelten Präadipozyten. Die Fetteinlagerung in terminal differenzierten Adipozyten war nach dreitägiger Atorvastatinbehandlung im Vergleich zur Fetteinlagerung unbehandelter Adipozyten unverändert (s. Abb. 2A).

#### 3.2 Atorvastatin hemmt dosisabhängig die Proteinexpression des frühen Differenzierungsmarkers CEBP- $\beta$ in differenzierenden weißen Präadipozyten

Wie in Kapitel 1.2.1, S.3 ausgeführt, kommt es während der Adipozytendifferenzierung zur Veränderung des Expressionsprofils bestimmter Transkriptionsfaktoren. CEBP- $\beta$  ist ein in der frühen Differenzierungsphase exprimierter Transkriptionsfaktor, der als Marker für die frühe Differenzierungsphase gilt (Rosen und MacDougald, 2006).

Differenzierende Präadipozyten wurden nach der Induktion von Tag 1 bis 3 chronisch mit Atorvastatin in Konzentrationen von 1 und 10  $\mu\text{M}$  behandelt. Anschließend wurde die Expression des frühen Differenzierungsmarkers CEBP- $\beta$  quantitativ mittels Western Blot bestimmt. Verglichen mit unbehandelten Präadipozyten war die Proteinexpression von CEBP- $\beta$  in den mit 10  $\mu\text{M}$  Atorvastatin behandelten Präadipozyten statistisch signifikant um 60 % reduziert. Durch die Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  Atorvastatin wurde die CEBP- $\beta$  Proteinexpression allerdings statistisch nicht signifikant, um 25 % reduziert (s. Abb. 2B).



**Abb. 2 A und B: Atorvastatin hemmt die Lipidakkumulation in weißen, differenzierenden, aber nicht in terminal differenzierten Adipozyten.**

Weiß, differenzierende Präadipozyten und terminal differenzierte Adipozyten wurden von Tag 1-3 bzw. Tag 4-6 nach dem Ende der Induktion mit Atorvastatin in Konzentrationen von 1 und 10  $\mu\text{M}$  behandelt, nach drei Tagen wurden die Zellen mit der spezifischen Fettfärbung Oil Red O gefärbt und unter dem Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung fotografiert. Zu sehen sind die mikroskopischen Bilder (A). Außerdem wurde in differenzierenden Präadipozyten die Proteinexpression des frühen Differenzierungsmarkers CEBP- $\beta$  mittels Western Blot nach drei Tagen chronischer Atorvastatinbehandlung (1 und 10  $\mu\text{M}$ ) bestimmt. Dargestellt ist ein Bargraph mit Mittelwert und Standardfehler von drei voneinander unabhängigen Experimenten.  $p \leq 0,05$  wurde als signifikant (\*) angesehen.



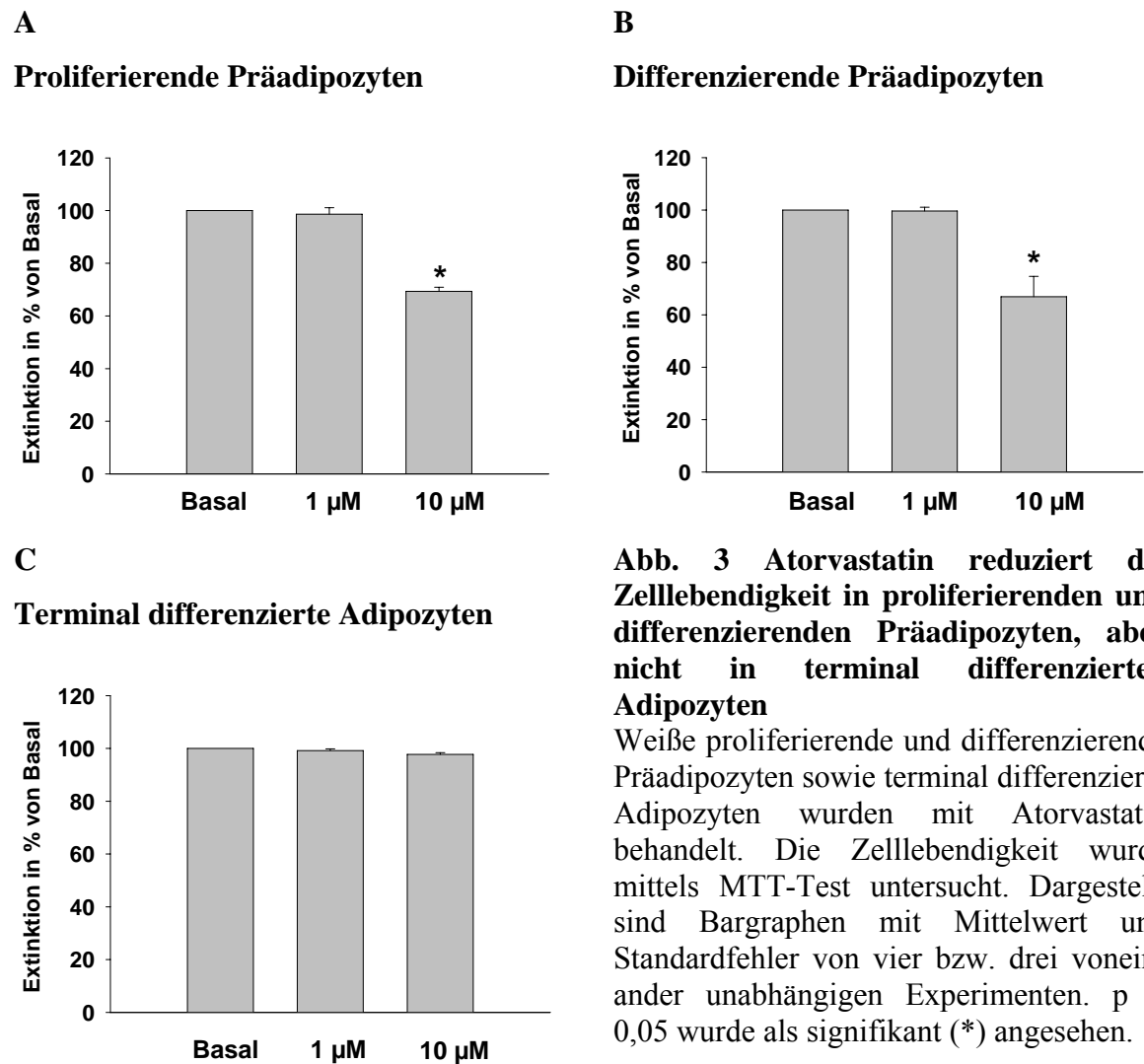
### **3.3 Atorvastatin reduziert Zellzahl und Zellebendigkeit in weißen Präadipozyten, aber nicht in terminal differenzierten Adipozyten**

Die Auswirkungen der Atorvastatinstimulation auf die Fettzellendifferenzierung zeigte eine deutliche Hemmung der Lipidakkumulation. Ferner erschien lichtmikroskopisch auch die Zellzahl unter Atorvastatinbehandlung reduziert. Daraufhin wurde die Wirkung von Atorvastatin auf die Zellebendigkeit in proliferierenden und differenzierenden Präadipozyten sowie in terminal differenzierten Adipozyten mittels eines Zellebendigkeits-ELISA überprüft. Ferner wurden proliferierende Präadipozyten unter Atorvastatinstimulation in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und die so ermittelte Zellzahl wurde mit der Zellzahl unbehandelter Präadipozyten verglichen.

#### **3.3.1 Atorvastatin reduziert die Zellebendigkeit in proliferierenden und differenzierenden Präadipozyten, aber nicht in terminal differenzierten Adipozyten**

Proliferierende, differenzierende Präadipozyten und terminal differenzierte Adipozyten wurden mit Atorvastatin (1 und 10  $\mu\text{M}$ ) behandelt. Die Zellebendigkeit wurde mit Hilfe des MTT-Test nach Moosmann überprüft. Nach 10  $\mu\text{M}$  Atorvastatinexposition zeigte sich nach 48 bzw. 72 h eine Reduktion der Zellebendigkeit um 30 % in proliferierenden und in differenzierenden Präadipozyten, verglichen mit unbehandelten Präadipozyten (Abb. 3A und B). Bei Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  konnten keine signifikanten Unterschiede der Zellebendigkeit festgestellt werden. Atorvastatinexposition in terminal differenzierten Adipozyten führte nicht zu einer Reduktion der Zellebendigkeit (s. Abb. 3C). Die Reduktion der Zellebendigkeit war damit stadienabhängig.

## Zellebendigkeit



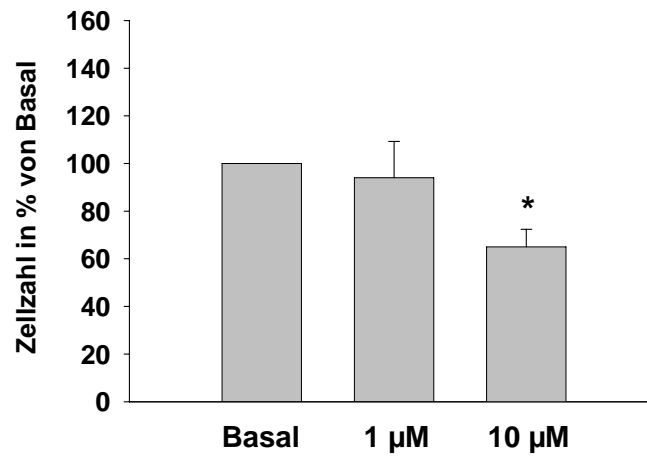
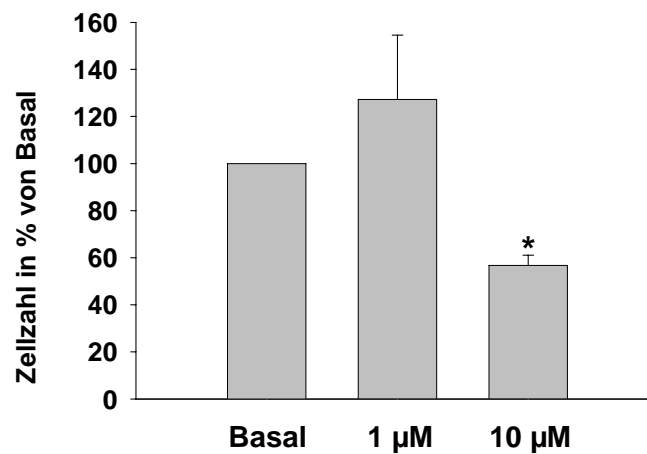
**Abb. 3 Atorvastatin reduziert die Zellebendigkeit in proliferierenden und differenzierenden Präadipozyten, aber nicht in terminal differenzierten Adipozyten**

Weiß proliferierende und differenzierende Präadipozyten sowie terminal differenzierte Adipozyten wurden mit Atorvastatin behandelt. Die Zellebendigkeit wurde mittels MTT-Test untersucht. Dargestellt sind Bargraphen mit Mittelwert und Standardfehler von vier bzw. drei voneinander unabhängigen Experimenten.  $p \leq 0,05$  wurde als signifikant (\*) angesehen.

### 3.3.2 Atorvastatin reduziert die Zellzahl proliferierender Präadipozyten

Proliferierende Präadipozyten wurden für 48 h mit Atorvastatin in Konzentrationen von 1 und 10 µM behandelt. Die Zellen wurden nach 24 h und 48 h in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Nach 24 h waren 35 %, nach 48 h waren 45 % statistisch signifikant weniger Zellen auf den mit 10 µM Atorvastatin behandelten Zellkulturschalen vorhanden, verglichen mit den Schalen unbehandelter Präadipozyten. Durch die Behandlung mit 1 µM Atorvastatin konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der Zellzahl gefunden werden (s. Abb. 4A und B).

### Proliferation

**A****B**

**Abb. 4 Atorvastatin hemmt die Proliferation weißer Präadipozyten**

Weißer Präadipozyten wurden 48 h mit Atorvastatin behandelt. Die Zellen wurden nach 24 h (A) und 48 h (B) Behandlung in einer Neubauer-Zellkammer gezählt. Dargestellt sind Bargraphen von jeweils vier voneinander unabhängigen Experimenten mit Mittelwert und Standardfehler.  $p \leq 0,05$  wurde als signifikant (\*) angesehen.

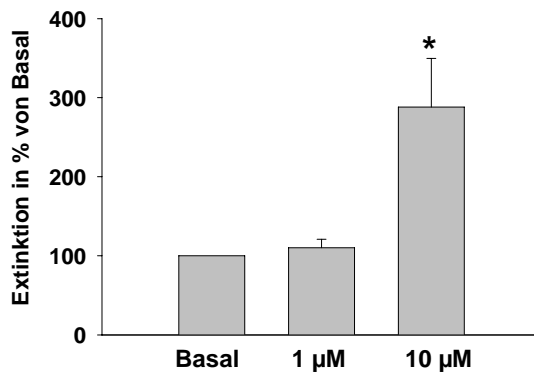
### **3.4 Atorvastatin induziert Apoptose in proliferierenden und differenzierenden, weißen Präadipozyten, aber nicht in terminal differenzierten Adipozyten**

Die Reduktion der Zellebendigkeit unter Atorvastatinbehandlung lässt keine Aussage darüber zu, ob es sich hierbei um einen rein toxischen Effekt von Atorvastatin oder um die Induktion des geordneten programmierten Zelltodes (Apoptose) handelt. Zur Klärung dieser Frage wurde ein Apoptose-ELISA durchgeführt. Um die Stadienabhängigkeit der reduzierten Zellebendigkeit zu bestätigen, wurden wiederum Adipozyten aus drei unterschiedlichen Differenzierungsstadien untersucht. Proliferierende und differenzierende Präadipozyten sowie terminal differenzierte Adipozyten wurden für 24 h mit Atorvastatin (1 und 10  $\mu\text{M}$ ) behandelt. In den mit 10  $\mu\text{M}$  Atorvastatin behandelten proliferierenden und differenzierenden Präadipozyten ließ sich eine Erhöhung der Apoptose-Induktion um 180 % bzw. 70 %, verglichen mit unbehandelten Präadipozyten, nachweisen. Die Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  Atorvastatin führte nicht zur Induktion von Apoptose. Analog zu den Ergebnissen des Zellebendigkeitstest ließ sich in terminal differenzierten Adipozyten keine Induktion von Apoptose durch Atorvastatin nachweisen (s. Abb. 5).

## Apoptose

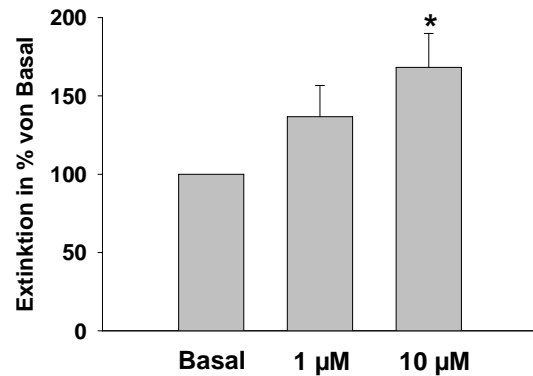
A

**Proliferierende Präadipozyten**



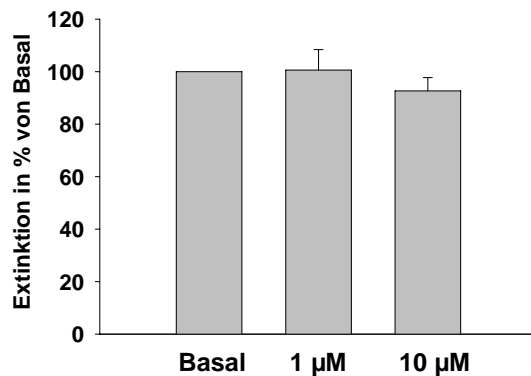
B

**Differenzierende Präadipozyten**



C

**Terminal differenzierte Adipozyten**

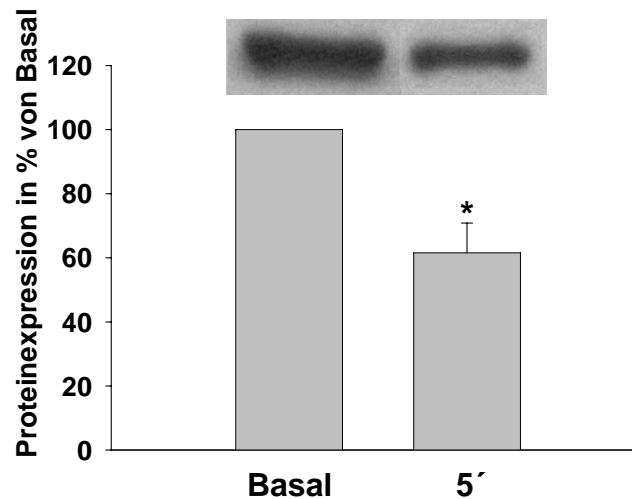
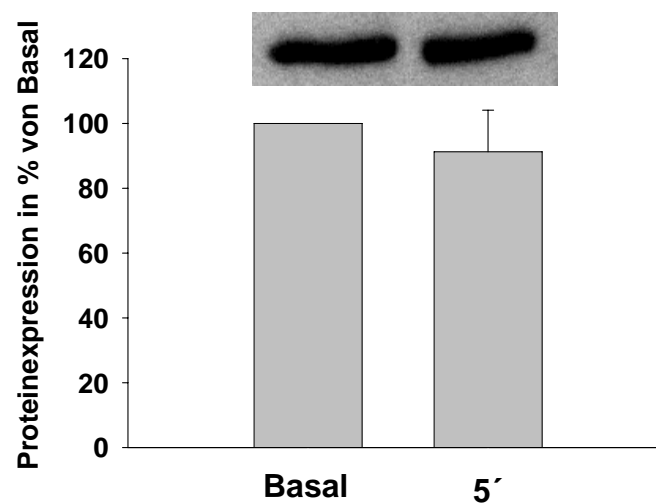


**Abb. 5 Atorvastatin induziert Apoptose in proliferierenden und differenzierenden Präadipozyten, aber nicht in terminal differenzierten Adipozyten**

Weiß proliferierende und differenzierende Präadipozyten sowie terminal differenzierte Adipozyten wurden für 24 h mit Atorvastatin behandelt. Die Induktion von Apoptose wurde mittels Apoptose-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind Bargraphen von sechs (A), zehn (B) und vier (C) voneinander unabhängigen Experimenten mit Mittelwert und Standardfehler.  $p \leq 0,05$  wurde als signifikant (\*) angesehen.

### **3.5 Atorvastatin hemmt die Aktivierung von AKT in differenzierenden weißen Präadipozyten**

Apoptose als programmierter, physiologischer Zelltod läuft über definierte intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden ab. Ein molekularer Mechanismus für die Induktion von Apoptose in Zellen ist die gehemmte Aktivierung von AKT (s. Kapitel 1.2.2, S. 4). Um zu überprüfen, ob die apoptotische Wirkung von Atorvastatin auf differenzierende Präadipozyten über eine gehemmte Aktivierung der antiapoptotisch wirkenden phospho-AKT vermittelt wird, wurde der Effekt von Atorvastatin auf dieses intrazelluläre Signalmolekül untersucht. Weiße differenzierende Präadipozyten und terminal differenzierte Adipozyten wurden sofort bzw. sechs Tage nach dem Ende der Induktion für 5 Minuten mit 10  $\mu\text{M}$  Atorvastatin behandelt. Anschließend wurde die Proteinexpression von phospho-AKT mit Hilfe von Western Blots bestimmt. Nach 5 Minuten Atorvastatinbehandlung war die Expression von phospho-AKT in behandelten differenzierenden Präadipozyten um 40 % reduziert, verglichen mit der phospho-AKT Expression unbehandelter Präadipozyten. In terminal ausdifferenzierten Adipozyten war nach 5 Minuten Stimulation mit 10  $\mu\text{M}$  Atorvastatin keine signifikante Reduktion der phospho-AKT Expression nachweisbar (s. Abb. 6).

**phospho-AKT****Differenzierende Präadipozyten****A****B****Terminal differenzierte Adipozyten****Abb. 6 Atorvastatin hemmt die Aktivierung von AKT in differenzierenden, aber nicht in terminal differenzierten weißen Adipozyten**

Differenzierende (A) und terminal differenzierte (B) weiße Adipozyten wurden mit Atorvastatin für fünf Minuten behandelt. Die Proteinexpression von phospho-AKT wurde mittels Western Blotts bestimmt. Dargestellt sind Bargraphen mit Mittelwert und Standardfehler von fünf bzw. vier voneinander unabhängigen Experimenten.  $p \leq 0,05$  wurde als signifikant (\*) angesehen.

### **3.6 Atorvastatin beeinflusst direkt das proinflammatorische, glukoregulatorische Adipokin-Expressionsprofil terminal differenzierter weißer Adipozyten**

Fettgewebe ist ein endokrines Organ. Adipozyten beeinflussen systemische Inflamationsprozesse und Glukosehomöostase durch die Sekretion von Adipokinen. Atorvastatin zeigte *in vivo* Wirkungen auf Immunfunktionen und Glukosehomöostase (Ascer *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2005). Diese Wirkungen könnten durch direkte Interaktion mit Adipozyten und daraus folgender Modulation der Adipokinsekretion vermittelt sein (s. Kapitel 1.2.3, S.5). Aus diesem Grund wurde die Wirkung von Atorvastatin auf die Genexpression typischer pro- und antiinflammatorischer sowie glukoregulatorischer Adipokine untersucht. Terminal differenzierte weiße Adipozyten wurden 24 h serum-depriviert und anschließend für 24 h mit Atorvastatin (1 und 10  $\mu\text{M}$ ) stimuliert. Anschließend wurde die mRNA-Expression von IL-6, MCP-1, Visfatin und Adiponektin mit Hilfe von RT-PCR quantifiziert.

**Atorvastatin induziert die mRNA-Expression von Interleukin-6.** Die mRNA-Expression des proinflammatorischen Hormons IL-6 wurde durch 10  $\mu\text{M}$  Atorvastatin signifikant um 230 % erhöht. Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  zeigte keinen signifikanten Effekt (Abb. 7A).

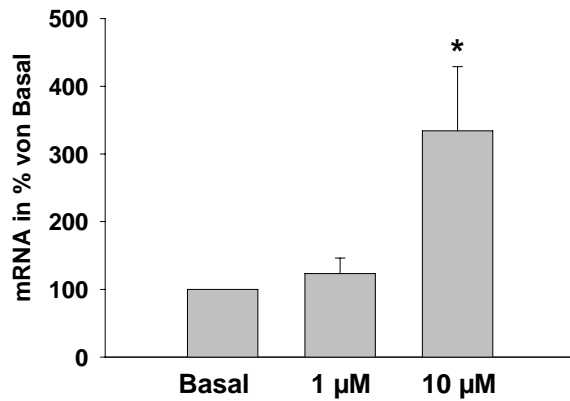
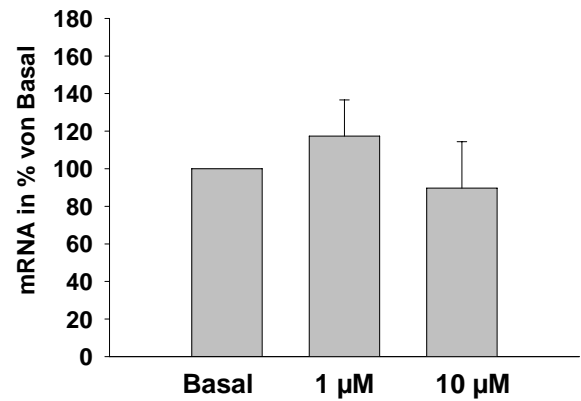
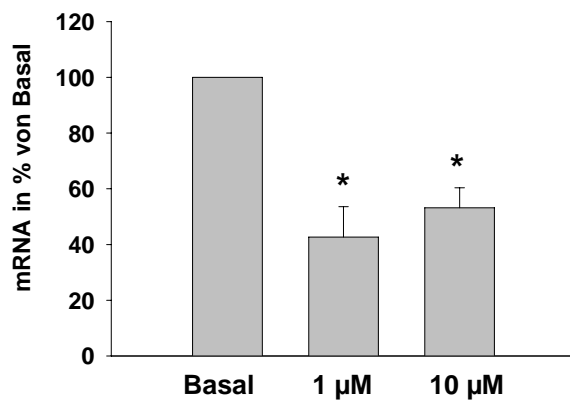
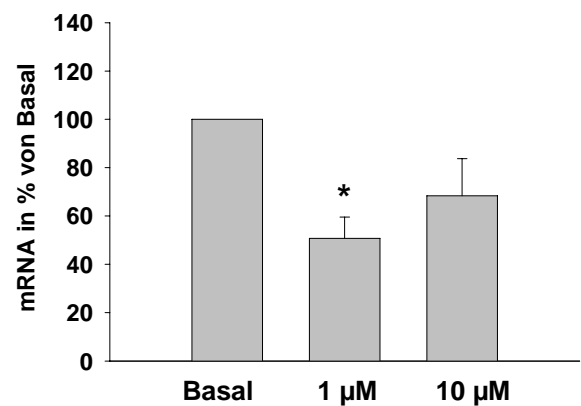
**Atorvastatin hat keine Auswirkung auf die mRNA-Expression von MCP-1.** Weder Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  noch 1  $\mu\text{M}$  Atorvastatin zeigten einen signifikanten Effekt auf die MCP-1-mRNA-Expression (Abb. 7B).

**Atorvastatin hemmt die mRNA-Expression von Adiponektin.** Die mRNA-Expression des antiatherogenen Hormons Adiponektin wurde von 1 und 10  $\mu\text{M}$  Atorvastatin nach 24 h um 60 % bzw. 50 % reduziert (Abb. 7C).

**Atorvastatin hemmt die mRNA-Expression von Visfatin.** 10  $\mu\text{M}$  Atorvastatin reduzierte die mRNA-Expression des insulinmimetischen Hormons Visfatin um 30 %. Unter 1  $\mu\text{M}$  Atorvastatin zeigte sich nach 24 h eine Hemmung der mRNA-Expression von Visfatin um 50 %, verglichen mit der Kontrolle (Abb. 7D).



## Adipokine

**A Interleukin-6****B MCP-1****C Adiponektin****D Visfatin**

**Abb. 7 Atorvastatin beeinflusst die endokrine Aktivität von weißen, terminal differenzierten Adipozyten**

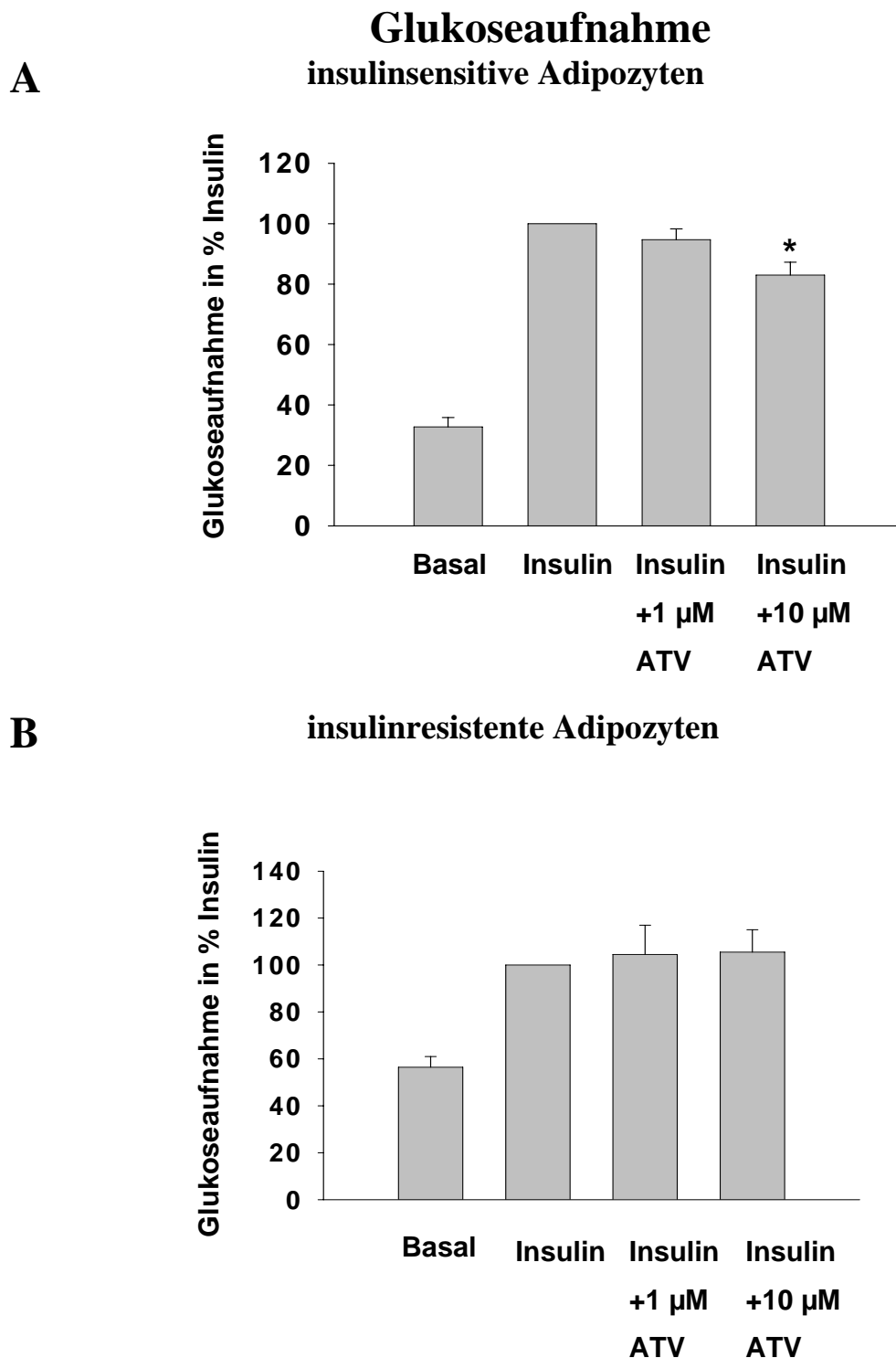
Terminal differenzierte, weiße Adipozyten wurden mit Atorvastatin behandelt. mRNA-Expression von IL-6 (A), MCP-1 (B), Adiponektin (C) und Visfatin (D) wurden mittels RT-PCR bestimmt. Dargestellt sind Bargraphen mit Mittelwert und Standardfehler von vier bis sechs voneinander unabhängigen Experimenten.  $p \leq 0,05$  wurde als signifikant (\*) angesehen.

### **3.7 Differentielle metabolische Effekte von Atorvastatin auf terminal differenzierte weiße und braune Adipozyten**

Endokrine und metabolische Adipozytenfunktionen interagieren miteinander. Metabolische Adipozytenfunktionen wie z. B. zelluläre Glukoseaufnahme spielen bei der Genese des Diabetes mellitus Typ 2 eine Rolle, da die Glukosetoleranz des Fettgewebes Auswirkung auf den gesamten Glukosemetabolismus des Organismus hat (s. Kapitel 1.2.4, S. 7). Eine wichtige metabolische Fettgewebefunktion ist zudem die Thermogenese. Diese wird durch das in braunen Adipozyten gewebspezifisch vorhandene UCP-1 induziert.

#### **3.7.1 Atorvastatin hemmt die insulininduzierte Glukoseaufnahme**

Die Wirkungen von Atorvastatin auf die Glukoseaufnahme wurden an insulinsensitiven sowie an insulinresistenten Adipozyten getestet. Um in den Zellen Insulinresistenz zu erzeugen, wurden sie nach Ende der Induktion chronisch mit hohen Insulindosen vorbehandelt. Weiße, terminal differenzierte, insulinsensitive sowie insulinresistente Adipozyten wurden mit Atorvastatin (1 und 10  $\mu\text{M}$ ) für 1 h vorbehandelt. Es zeigte sich eine Reduktion der insulininduzierten Glukoseaufnahme um maximal 17 % bei einstündiger Vorbehandlung mit 1  $\mu\text{M}$  bzw. 10  $\mu\text{M}$  Atorvastatin in insulinsensitiven Adipozyten (s. Abb. 8A). In insulinresistenten Adipozyten wurde die Glukoseaufnahme hingegen nicht verändert (s. Abb. 8B).

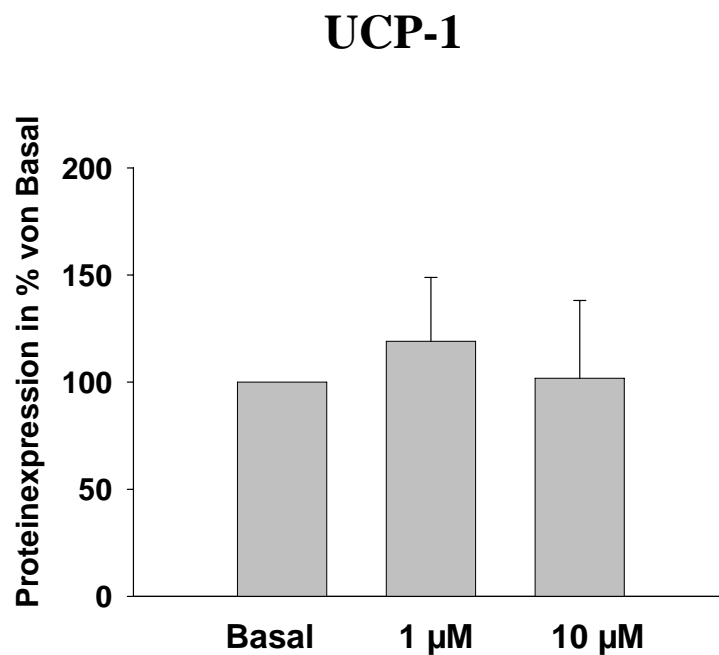


**Abb. 8 Atorvastatin hemmt die insulininduzierte Glukoseaufnahme**

Weiße, terminal differenzierte, insulinsensitive (A) bzw. insulinresistente (B) Adipozyten wurden mit Atorvastatin (ATV) für 1 h vorbehandelt. Dann wurden sie für 0,5 h mit 100 nM Insulin stimuliert und anschließend die insulininduzierte Glukoseaufnahme mit Hilfe von radioaktiv markierter Glukose bestimmt. Dargestellt sind Bargraphen mit Mittelwert und Standardfehler von sieben bzw. vier voneinander unabhängigen Experimenten.  $p \leq 0,05$  wurde als signifikant (\*) angesehen.

### 3.7.2 Atorvastatin hat keinen Effekt auf die Proteinexpression von UCP-1

Braune, terminal differenzierte Adipozyten wurden für 24 h mit Atorvastatin in Konzentrationen von 1 und 10  $\mu\text{M}$  behandelt. Die UCP-1 Proteinexpression wurde mittels Western Blots bestimmt. Es ließ sich kein signifikanter Effekt von Atorvastatin auf die UCP-1 Proteinexpression nachweisen (s. Abb. 9).



**Abb. 9 Atorvastatin hat keinen Einfluss auf die Proteinexpression von UCP-1**

Braune, terminal differenzierte Adipozyten wurden 24 h mit Atorvastatin behandelt. Die UCP-1 Proteinexpression wurde mittels Western Blots bestimmt. Dargestellt ist ein Bargraph mit Mittelwert und Standardfehler aus fünf voneinander unabhängigen Experimenten.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden direkte, vom Zellentwicklungsstadium abhängige Interaktionen von Atorvastatin mit mehreren, an der Kontrolle des Energie- und Glukosestoffwechsels beteiligten Schlüsselfunktionen von Adipozyten untersucht. Im Folgenden werden bisher untersuchte Statininteraktionen mit Fettzellfunktionen erörtert und die hier neu aufgedeckten Effekte auf I) den Zellzyklus, insbesondere die Induktion von Apoptose, II) die direkte Modulation der Genexpression proinflammatorischer und glukoregulatorischer Adipokine und III) die akute Hemmung der zellulären Glukoseaufnahme ausführlich diskutiert und abschließend in einen klinischen Zusammenhang gestellt.

### 4.1 Atorvastatin hat stadienabhängige Effekte auf Proliferation, Differenzierung und Apoptose in Adipozyten

**Atorvastatin hemmt die Differenzierung in weißen Präadipozyten.** In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die frühe Differenzierung von Präadipozyten nach Induktion unter chronischer Atorvastatinstimulation gehemmt wird. Durch spezifische Fettfärbung mit Oil Red O konnte nach drei Tagen Atorvastatinbehandlung eine deutlich verringerte Fetteinlagerung in den behandelten gegenüber unbehandelten Präadipozyten nachgewiesen werden. In terminal differenzierten Zellen war eine Verminderung des Fettgehaltes nach analoger Atorvastatinbehandlung nicht zu erreichen. Da die Lipidakkumulation ein wichtiges Charakteristikum für die Zelldifferenzierung darstellt, spricht dieses Ergebnis für eine Hemmung der Zelldifferenzierung in Präadipozyten. Die Reduktion der Proteinexpression des frühen Differenzierungsmarkers CEBP- $\beta$  unter Atorvastatinstimulation bestätigt diese Differenzierungshemmung. Diese Ergebnisse werden durch andere *in vitro* Studien gestützt, die ebenfalls differenzierungshemmende Effekte von Atorvastatin auf Adipozyten zeigen (Tomiyama *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2003; Nakata *et al.*, 2006).

**Atorvastatin vermindert stadienabhängig die Zellebendigkeit in Präadipozyten.** Die mikroskopischen Bilder der Oil Red O gefärbten Zellen zeigten eine Reduktion der Fetttropfen in den mit Atorvastatin behandelten Zellen, darüber hinaus erschien auch die Zellzahl vermindert. In dem daraufhin durchgeführten Zellebendigkeitssassay konnte gezeigt werden, dass die Zellebendigkeit in proliferierenden und differenzierenden Präadipozyten durch chronische Atorvastatinbehandlung stark reduziert wird. Dieser Effekt

war dosisabhängig und nahm mit zunehmender Differenzierung ab: so war in terminal differenzierten Zellen keine Reduktion der Zelllebensdauer mehr nachweisbar. Das Zählen von proliferierenden Präadipozyten unter Atorvastatinbehandlung bestätigte eine verminderte absolute Zellzahl verglichen mit unbehandelten Präadipozyten. Diese Arbeit zeigt zum ersten Mal eine stadienabhängige Reduktion der Zelllebensdauer in Präadipozyten durch Atorvastatinbehandlung *in vitro*.

**Atorvastatin induziert stadienabhängig Apoptose.** Die Reduktion der Zelllebensdauer ist ein Indiz für Zelltod. Die Induktion von Apoptose durch Atorvastatin in drei unterschiedlichen Differenzierungsstadien wurde mit Hilfe eines Apoptose-Assay genauer untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Atorvastatin differenzierungsabhängig Apoptose induziert: in proliferierenden Präadipozyten war dieser Effekt am stärksten, während in terminal differenzierten Adipozyten keine signifikante Apoptoseinduktion durch Atorvastatin nachweisbar war. Diese Ergebnisse decken sich mit der nachgewiesenen Reduktion der Zelllebensdauer. Der Effekt einer stadienabhängigen, differenziellen Induktion von Apoptose in Adipozyten wurde bereits für den in der HIV-Behandlung eingesetzten Proteaseinhibitor Ritonavir gezeigt (Grigem *et al.*, 2005).

In vielen Geweben induziert Atorvastatin Apoptose, beispielsweise in Lymphozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Hepatozyten und Mammakarzinomzellen (Blanco-Colio *et al.*, 2002; Kubota *et al.*, 2004; Muck *et al.*, 2004b; Yasuda *et al.*, 2005; Connor *et al.*, 2006; Fromigue *et al.*, 2006). Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals eine stadienabhängige, atorvastatininduzierte Apoptose in Präadipozyten.

**Atorvastatin hemmt stadienabhängig die Aktivierung der antiapoptotischen Kinase AKT.** Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine reduzierte Proteinexpression von phospho-AKT unter Atorvastatinbehandlung in früh differenzierenden Präadipozyten nachgewiesen. Dies könnte ein Mechanismus sein, der die gezeigte Apoptoseinduktion durch Atorvastatin in früh differenzierenden Präadipozyten vermittelt. Diese Vermutung wird dadurch untermauert, dass in terminal differenzierten Adipozyten, in denen sich keine Apoptoseinduktion nachweisen ließ, die AKT-Aktivierung durch Atorvastatin nicht beeinträchtigt war. Der genaue Mechanismus der atorvastatininduzierten Apoptose in Adipozyten ist jedoch bislang unbekannt. Generell sind die Mechanismen der apoptotischen, antiproliferativen und differenzierungshemmenden Statinwirkungen noch nicht vollständig aufgeklärt. Um diese zu ergründen, wurden Untersuchungen mit

unterschiedlichen Statinen und Zellarten durchgeführt. So gibt es Belege dafür, dass Lovastatin die frühe Insulinsignalkaskade inhibiert, indem es die insulininduzierte Aktivierung der PI-3-Kinase sowie die Assoziation von PI-3-K mit dem Insulinrezeptorsubstrat in Fibroblasten hemmt (McGuire *et al.*, 1994). Auch für Pravastatin konnte gezeigt werden, dass schon nach kurzer Inkubation von glatten Muskelzellen mit Pravastatin die Aktivierung der PI-3-K sowie die AKT-Aktivierung gehemmt werden (Weiss *et al.*, 1999). Übereinstimmend reduziert Cerivastatin dosisabhängig die AKT-Aktivierung in glatten Muskelzellen (Igarashi *et al.*, 2002). Die Hemmung der PI-3-K und konsekutiv die AKT-Aktivierung durch Statine wird als Mechanismus ihrer apoptotischen, differenzierungshemmenden und antiproliferativen Wirkungen auf unterschiedliche Zellarten, wie z. B. glatte Muskelzellen, Fibroblasten und Nervenzellen, in zahlreichen Studien diskutiert (Weiss *et al.*, 1999; Igarashi *et al.*, 2002; Cerezo-Guisado *et al.*, 2005; Connor *et al.*, 2006; Dai *et al.*, 2007; Kaneko *et al.*, 2007). Die in dieser Arbeit nachgewiesene Hemmung der AKT-Aktivierung lässt, übereinstimmend mit oben genannten Arbeiten, vermuten, dass die apoptotischen Statinwirkungen zum Teil über eine Hemmung der Insulinsignalkaskade vermittelt werden. Vor allem die Hemmung des PI-3-K mit konsekutiver Hemmung der AKT-Phosphorylierung scheint ein Mechanismus der Induktion von Apoptose zu sein.

**Übertragbarkeit der direkten *in vitro* Atorvastatineffekte auf die *in vivo* Situation.** Zur Abschätzung der Bedeutung dieser *in vitro* gefundenen, stadienabhängigen Differenzierungshemmung und Apoptoseinduktion durch Atorvastatin auf die Situation *in vivo*, ist es wichtig, die im Fettgewebe *in vivo* maximal erreichte Atorvastatin-Konzentration zu kennen. Darüber hinaus stellt sich auch die Frage, welche Rolle proliferierende und differenzierende Präadipozyten beim erwachsenen Menschen spielen.

Atorvastatin ist sehr lipophil, hat eine hohe Proteinbindung von 98 % und eine Halbwertszeit von 14 h. Medikamenteninteraktionen können den Plasmaspiegel von Atorvastatin anheben und damit toxische Effekte verstärken (Schachter, 2005). Atorvastatin erreicht im Plasma eine Konzentration von ca. 100 nM. Aufgrund der starken Lipophilie und der langen Halbwertszeit ist anzunehmen, dass Atorvastatin im Fettgewebe bedeutend höhere Konzentrationen annehmen kann, was bislang allerdings nicht genauer untersucht wurde. Daher sind die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse mit Vorsicht zu betrachten, auch wenn die in dieser Arbeit verwendeten Atorvastatinkonzentrationen denen in *in vitro* Studien üblicherweise verwendeten entsprechen (Bey *et al.*, 2002; Zhao und

Zhang, 2003, 2004; Zhao und Wu, 2005; Ichida *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2006).

**Bedeutung von Präadipozytenproliferation und –differenzierung *in vivo*.** Inwieweit Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Präadipozyten und Adipozyten bei der Fettgewebsexpansion im Erwachsenen eine Rolle spielen, ist noch nicht abschließend geklärt. Während der menschlichen Entwicklung differenzieren Stammzellen über Präadipozyten zu terminal differenzierten Adipozyten. Erhaltene Zelldifferenzierungsprozesse sind auch im Erwachsenenalter die Voraussetzung für Gewebeplastizität. Fettgewebe zeichnet sich wie kein anderes Gewebe durch seine enorme Fähigkeit zur Expansion aus. Über die genauen Mechanismen der Fettgewebsexpansion herrscht Uneinigkeit. Hausmann *et al.* postulieren im Rahmen ihrer „*critical fat size hypothesis*“, dass bei Individuen mit unausgeglichenem Energiehaushalt, die mehr Energie zu sich nehmen als sie verbrauchen, zunächst die Zellgröße zunimmt (Adipozytenhypertrophie). Ist eine kritische Größe erreicht, beginnen auch noch im Erwachsenenalter vorhandene Präadipozyten (Avram *et al.*, 2007) zu proliferieren und zu differenzieren. Somit steigt die absolute Adipozytenzahl (Hyperplasie) (Hausman *et al.*, 2001; Fischer-Posovszky *et al.*, 2007). Diese Theorie wird belegt durch eine Studie von Harmelen *et al.* Hier wurde das Fettgewebe verschiedener Frauen nach Mammaablatio untersucht, wobei eine positive Korrelation zwischen BMI und sowohl Fettzellgröße als auch Fettzellzahl nachgewiesen wurde. Bei Frauen mit einem BMI zwischen 25 und 29 konnte keine Adipozytenhyperplasie, sondern lediglich Adipozytenhypertrophie nachgewiesen werden. Erst ab einem BMI von über 30 wurde eine Adipozytenhyperplasie gefunden (van Harmelen *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Präadipozytenproliferation und deren frühe Differenzierung, neben sich noch im Wachstum befindenden Individuen, vor allem bei sehr adipösen Individuen eine Rolle spielt.

**Mögliche Konsequenzen der Statineffekte auf das Fettgewebe *in vivo*.** Die stadienabhängige Induktion von Apoptose, welche zwar proliferierende und früh differenzierende Präadipozyten, nicht aber terminal differenzierte Adipozyten betrifft, macht die Zuordnung der *in vitro* Ergebnisse zu *in vivo* Effekten sehr komplex. Eine wesentliche Gewichtsreduktion durch Apoptoseinduktion in menschlichen Adipozyten *in vivo* wurde durch Studien nicht eindeutig belegt. In den meisten *in vivo* Studien ist die Gewichtsentwicklung schwer zu beurteilen, da zusätzlich zur Atorvastatintherapie auch noch diätetische Maßnahmen unternommen wurden. Daten speziell zu Auswirkungen von



Atorvastatin auf das Gewicht sind kaum zu finden. Berichtet wird über konstantes Gewicht (Nakata *et al.*, 2006) oder leichten, nicht signifikanten Gewichtsverlust (Gomez-Dominguez *et al.*, 2006). Nach obigen Ausführungen finden sich proliferierende und differenzierende Zellen vermutlich vor allem während der Entwicklung und in stark adipösen Erwachsenen. Zu Effekten von Atorvastatin auf die embryonale Entwicklung von Lebewesen gibt es einige wenige Belege. In einer Studie zur Teratogenität von Atorvastatin in Ratten und Kaninchen wurde bei den Feten, deren Muttertiere während der Austragungsphase Atorvastatin erhalten hatten, ein geringeres Geburtsgewicht festgestellt. Zudem zeigten die Muttertiere eine reduzierte Gewichtszunahme während der Trächtigkeit (Dostal *et al.*, 1994). Diese Daten ließen sich z. B. durch eine inhibierte Präadipozytenproliferation und Differenzierung durch Atorvastatin erklären und belegen eine Hemmung der Fettgewebsexpansion durch Atorvastatin *in vivo*.

Ließen sich die stadienabhängigen Effekte von Atorvastatin auf die Induktion von Apoptose und die Differenzierung von Adipozyten auf die Situation *in vivo* übertragen, so müsste dies bei erwachsenen Lebewesen zu einer Veränderung der Fettgewebzusammensetzung führen. Im Fettgewebe Erwachsener gibt es, wie oben erläutert, sowohl terminal differenzierte Adipozyten als auch proliferierende Präadipozyten (Avram *et al.*, 2007). Die Induktion von Apoptose speziell in Präadipozyten würde das Verhältnis von Präadipozyten zu terminal differenzierten Adipozyten in proliferierendem Fettgewebe zugunsten der terminal differenzierten Adipozyten verschieben. Proliferierendes Fettgewebe findet sich, wie bereits dargelegt, vermutlich vor allem bei sehr adipösen Menschen, daraus folgt, dass diese relative Verschiebung von Präadipozyten zu Adipozyten vor allem bei sehr adipösen Menschen eine Rolle spielen würde.

Darüber hinaus ist es denkbar, dass die Induktion von Apoptose auch auf die Körperfettverteilung Einfluss nimmt. Die Lokalisation von morphologisch gleichen Adipozyten innerhalb des Organismus scheint starken Einfluss auf die Adipozytenfunktion zu haben. So scheint die Relation von viszeralem zu subkutanem Fett entscheidend für die Entwicklung von Insulinresistenz zu sein: das viszerale Fett gilt, im Gegensatz zum subkutanen Fett, als „schlechtes Fett“, welches Insulinresistenz verursacht (Wajchenberg, 2000; Gabriely *et al.*, 2002; Fain *et al.*, 2004). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die Induktion von Apoptose in epididymalen murinen Präadipozyten, welche ein Zellmodell für viszerales Fett darstellen. Inwieweit sich diese Atorvastatineffekte auch im subkutanen Fett finden lassen, wurde bislang nicht untersucht. Für die insulinsensitivierenden Thiazolidione wird eine Veränderung der Körperfettverteilung beschrieben. Die

verbesserte Relation von viszeralem zu subkutanem Fett wird mitverantwortlich gemacht für den insulinsensitivierenden Effekt von Thiazolidinonen trotz einer BMI-Zunahme unter einer derartigen medikamentösen Therapie (Okuno *et al.*, 1998; Mori *et al.*, 1999). Ähnliche Fettumverteilungsvorgänge sind durch die differentielle Apoptoseinduktion in viszeralen Adipozyten durch Atorvastatin auch denkbar. So könnte die Induktion von Apoptose im viszeralen Fett zu einer Verschiebung der Relation von viszeralem zugunsten des subkutanen Fetts führen und damit die Fettgewebefunktionen erheblich beeinflussen. statininduzierte Veränderungen in der viszeralen Fettgewebsmasse wurden bislang jedoch nicht untersucht. Damit könnten die stadienabhängige, statininduzierte Apoptose sowie die stadienabhängige Hemmung der Zelldifferenzierung in Präadipozyten wesentliche Mechanismen für pleiotrope Statineffekte darstellen.

#### **4.2 Atorvastatin hat direkte Effekte auf die mRNA-Expression von inflammatorischen und glukoregulatorischen Adipokinen**

Die endokrin sehr aktiven viszeralen Adipozyten tragen durch ihre Adipokinsekretion wesentlich zur kardiovaskulären Morbidität und Mortalität bei (Dagenais *et al.*, 2005). Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit direkte, atorvastatininduzierte Veränderungen in der Adipokinexpression terminal differenzierter epididymaler Adipozyten untersucht, die als Modell für viszerales Fettgewebe benutzt wurden (Ott *et al.*, 2004).

Pleiotrope Statinwirkungen werden zurzeit enthusiastisch diskutiert. Einige Studien konnten zeigen, dass Statine unabhängig von ihrem cholesterinsenkenden Effekt auch antiinflammatorische Effekte zeigen. Es wurden signifikant niedrigere CRP-, MCP-1- und IL-6-Plasmaspiegel unter Statin- im Vergleich zu Placebotherapien gemessen (van de Ree *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003; Zhao und Zhang, 2003; Shetty *et al.*, 2004). Überdies wurden antiatherogene Effekte von Atorvastatin mit einer Erhöhung der Plasmaspiegel von Adiponektin in Verbindung gebracht (Nakamura *et al.*, 2007). Der Einfluss von Atorvastatin auf Visfatin wurde bislang weder *in vivo* noch *in vitro* untersucht. In dieser Arbeit wurde die Regulation der mRNA-Expression von IL-6, Adiponektin, Visfatin und MCP-1 in terminal differenzierten weißen Adipozyten durch direkte Interaktion mit Atorvastatin untersucht.

**Atorvastatin induziert ein proinflammatorisches Adipokinprofil.** Aufgrund der *in vivo* beobachteten antiinflammatorischen Wirkungen von Atorvastatin mit beobachteter CRP-Senkung war ein antiinflammatorisches Zytokinprofil mit einer Senkung der als pro-

inflammatorisch geltenden Zytokine IL-6 und MCP-1 erwartet worden. Stattdessen zeigte sich eine Induktion der IL-6-mRNA-Expression, die mRNA-Expression des ebenfalls proinflammatorisch wirkenden MCP-1 blieb dagegen unverändert. Die mRNA-Expression des antiatherogen wirkenden Adiponektin wurde stark reduziert, ebenso wie die mRNA-Expression des insulinmimetisch wirkenden Visfatins.

Diese Arbeit beschreibt zum ersten Mal eine Regulation von Visfatin durch Atorvastatin. Zudem zeigt diese Arbeit zum ersten Mal eine direkte, atorvastatininduzierte Regulation der mRNA-Expression von Adiponektin in terminal differenzierten Adipozyten.

Dieses unerwartete Adipokinprofil stellt einige zurzeit vorherrschende wissenschaftliche Meinungen in Frage. Eine durch Atorvastatin regulierte Induktion der IL-6-mRNA-Expression, mit gleichzeitiger Hemmung der mRNA-Expression von Adiponektin, würde nach derzeitig überwiegender wissenschaftlicher Meinung eher für eine negative Beeinflussung metabolischer Systemfunktionen sprechen. In vielen Arbeiten wird IL-6 als proinflammatorisches Zytokin und als Induktor der CRP-Produktion in der Leber und von Insulinresistenz in Adipozyten angesehen (Fernandez-Real und Ricart, 2003; Rotter *et al.*, 2003). Dagegen werden für Adiponektin antiatherogene Eigenschaften herausgestellt (Gable *et al.*, 2006). Die in dieser Arbeit gezeigte Induktion der IL-6- und Reduktion der Adiponektin-mRNA-Expression lässt an den in anderen Arbeiten gezeigten antiinflammatorischen Statinwirkungen *in vivo* zweifeln. Eine systemische Reduktion der IL-6-Plasmapiegel (Ascer *et al.*, 2004) durch direkte Statineffekte auf Adipozyten lässt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit zur mRNA-Regulation der Adipokine nicht erklären, ebenso wenig wie eine Erhöhung des Adiponektinspiegels *in vivo* (Nakamura *et al.*, 2007).

Tatsächlich zeigen neuere Arbeiten sehr inkonsistente Ergebnisse bezüglich antiinflammatorischer und antidiabetogener Statinwirkungen. Mehrere Studien diskutieren antiinflammatorische Effekte von Statinen vor allem wegen der beobachteten Reduktion wichtiger Entzündungsmarker wie u. a. CRP- und IL-6 (Kinlay *et al.*, 2003; van de Ree *et al.*, 2003). In anderen Arbeiten konnte diese *in vivo* gefundene Reduktion der CRP-Plasmaspiegel durch Atorvastatin allerdings nicht reproduziert werden (Bayes *et al.*, 2005; Huptas *et al.*, 2006). Auch die Adiponektinspiegel zeigten sich zum Teil unbeeinflusst durch eine Atorvastatintherapie (Shetty *et al.*, 2004; Bayes *et al.*, 2005). Huptas *et al.* zeigten, passend zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, nichtsignifikante, leicht erhöhte IL-6-Plasmaspiegel unter Atorvastatintherapie (Huptas *et al.*, 2006).

**Pleiotrope, antiinflammatorische Statineffekte unabhängig vom IL-6-Plasmaspiegel?**

Mehrere Arbeiten belegen eine Senkung der CRP-Spiegel unter Atorvastatintherapie, diese antiinflammatorische Wirkung war jedoch unabhängig von IL-6-Plasmaspiegeln (Chan *et al.*, 2002; Wiklund *et al.*, 2002; Kinlay *et al.*, 2003; van de Ree *et al.*, 2003). Daher ist denkbar, dass pleiotrope, antiinflammatorische Atorvastatineffekte *in vivo* nicht durch IL-6 vermittelt werden. Die Funktion von IL-6 bei der Entstehung von Subinflammation und Insulinresistenz wird kontrovers diskutiert. Es wurde gezeigt, dass IL-6-Plasmaspiegel mit Übergewicht und Insulinresistenz positiv korrelieren (Radwan *et al.*, 2005). Für einen Kausalzusammenhang sprechen Daten, die zeigen, dass IL-6 bei der direkten Interaktion mit Adipozyten *in vitro* Insulinresistenz erzeugt (Fasshauer *et al.*, 2004). Demgegenüber wiesen jedoch Stouthard *et al.* eine verstärkte Glukoseaufnahme in Adipozyten nach IL-6 Behandlung nach (Stouthard *et al.*, 1996). Auch im Skelettmuskel wurde die Insulinsensitivität durch IL-6 verbessert (Weigert *et al.*, 2005; Weigert *et al.*, 2006). Wallenius *et al.* konnten zeigen, dass IL-6-*knockout*-Mäuse mit konsekutivem IL-6-Mangel, eine verminderte Glukosetoleranz aufwiesen. Diese Mäuse hatten ein signifikant höheres Risiko, einen Diabetes mellitus Typ 2 zu entwickeln als Kontrollmäuse ohne IL-6-*knockout*. Durch IL-6-Injektion in das ZNS war die reduzierte Glukosetoleranz zum Teil reversibel (Wallenius *et al.*, 2002). Dieser Gegensatz könnte darauf hinweisen, dass erhöhte IL-6-Plasmaspiegel nicht ursächlich für die beobachteten metabolischen Dysregulationen, sondern lediglich mit diesen korreliert sind. Im Gegenteil könnte IL-6 sogar positive Effekte auf die Insulinresistenz haben, aus denen sich eventuell therapeutische Optionen entwickeln ließen (Wallenius *et al.*, 2002; Jansson *et al.*, 2003; Nawrocki und Scherer, 2004). Unter diesen Gesichtspunkten ist die gezeigte Induktion der mRNA-Expression von IL-6 durch Atorvastatin für den systemischen Metabolismus nicht eindeutig zu interpretieren.

**Mögliche indirekte Statineffekte.** Die systemischen antiinflammatorischen Statineffekte *in vivo* (van de Ree *et al.*, 2003; Ascer *et al.*, 2004) könnten auch über indirekte Effekte beispielsweise über eine Induktion von Apoptose in Lymphoblasten (Cafforio *et al.*, 2005), durch die Hemmung der IL-6-Produktion in der Leber (Arnaud *et al.*, 2005b) oder durch die Reduktion der MCP-1-Plasmaspiegel (Xu *et al.*, 2003; Blanco-Colio *et al.*, 2007) verursacht werden. In der vorliegenden Arbeit konnte zwar keine Regulation der mRNA-Expression von MCP-1 durch Atorvastatin gezeigt werden, doch Okopien *et al.* konnten

eine statininduzierte Hemmung der MCP-1 Sekretion durch Monozyten nachweisen (Okopien *et al.*, 2005).

**Mögliche Folgen der stadienabhängigen Statineffekte auf die Adipokinsekretion.** Die inkonsistenten *in vivo* Daten zur Regulation von Inflammation, IL-6 und Adiponektin durch Statine könnten auch mit den stadienabhängigen Effekten von Atorvastatin auf Apoptose und Differenzierung erklärt werden. Wie in Kapitel 4.1, S. 39 ausgiebig erläutert, ist es plausibel anzunehmen, dass eine stadienabhängige Hemmung der Zelldifferenzierung und Induktion von Apoptose zum einen die Körperfettverteilung beeinflussen und zum anderen die Relation von Präadipozyten zugunsten terminal differenzierten Adipozyten verschieben könnte.

Zelldifferenzierung hat Auswirkungen auf die Adipozytenfunktion. So konnte für schlecht differenzierte Adipozyten gezeigt werden, dass sie insulinresistenter sind als terminal differenzierte Adipozyten (Gustafson und Smith, 2006). Darüber hinaus ist die Sekretion vieler Adipokine differenzierungsabhängig. Wang *et al.* konnten spezifische, differenzierungsabhängige Muster für unterschiedliche Adipokine nachweisen. Beispielsweise wurde das antiatherogen wirkende Adiponektin erst in einem späten Differenzierungsstadium von Adipozyten sezerniert, während PAI-1 und das proinflammatorische TNF- $\alpha$  schon kurz nach Induktion ihr Sekretionsmaximum erreichten. Für IL-6 konnten zwei Sekretionsmaxima, sowohl in der Früh- als auch in der Spätphase, nachgewiesen werden (Wang *et al.*, 2005). Die Differenzierung und damit die Akkumulation von Lipiden in Adipozyten bewirkt eine Zellexpansion. Extreme Adipozytenhypertrophie führt, ebenso wie schlechte Differenzierung, zur Zelldysfunktion. Bays postuliert als Folge einer extremen Zellhypertrophie die „*adiposopathy*“, die er als einen Adipozytenzustand definiert, der durch gestörte Fettspeicherung, einen proinflammatorischen Prozess und daraus folgenden gestörten Wechselwirkungen mit anderen Organen charakterisiert ist (Bays und Dujovne, 2006). Bays postuliert eine zentrale Rolle für die „*adiposopathy*“ in der Pathogenese des metabolischen Syndroms. Die erläuterten differenziellen Effekte auf Zelldifferenzierung und Apoptose könnten die Entwicklung der proinflammatorischen „*adiposopathy*“ hemmen bzw. günstig auf die Körperfettverteilung wirken und damit konsekutiv die Sekretion proinflammatorischer Adipokine positiv beeinflussen.

**Statineffekte möglicherweise BMI-abhängig?** Wie in Kapitel 4.1, S. 39 erläutert sind die apoptotischen und differenzierungshemmenden Effekte von Atorvastatin, abhängig vom Grad der Adipositas, vermutlich unterschiedlich stark ausgeprägt. Das könnte bedeuten, dass Statine BMI-abhängig unterschiedliche Wirkungen *in vivo* erzielen. So würden bei Patienten mit hohem BMI, bei denen sich relativ viele Präadipozyten finden, durch die apoptotische Wirkung eher positive Effekte durch Atorvastatin erreicht werden. Bei Patienten mit niedrigem BMI hingegen, mit vorwiegend terminal differenzierten Adipozyten, könnte die Induktion proinflammatorischer Adipokine zu Insulinresistenz führen. Die unterschiedliche Ausprägung der Adipositas in den Patientenkollektiven wurde in *in vivo* Studien bislang nicht berücksichtigt und könnte eine Erklärung für die oben aufgeführten inkonsistenten Daten liefern.

**Direkte Statineffekte auf Visfatin.** Die Reduktion der mRNA-Expression von Visfatin durch Atorvastatin in terminal differenzierten Adipozyten ist konsistent mit neueren Daten zur Regulation von Visfatin durch Rosuvastatin *in vivo*. In der bisher einzigen Untersuchung zur Regulation von Visfatin durch Statine *in vivo* konnte gezeigt werden, dass Rosuvastatin die Visfatin-Plasmaspiegel reduziert (Kostapanos *et al.*, 2007). Für Visfatin, ein relativ neu entdecktes Adipokin, konnten insulinmimetische Effekte gezeigt werden (Sethi und Vidal-Puig, 2005). Neuere Daten sprechen überdies für eine proinflammatorische Rolle von Visfatin (Moschen *et al.*, 2007). Zudem wurde gezeigt, dass Visfatin negativ mit der Endothelfunktion korreliert ist (Takebayashi *et al.*, 2007). Die in dieser Arbeit gezeigte Hemmung der mRNA-Expression von Visfatin in Adipozyten durch direkte Interaktion mit Atorvastatin könnte damit einen Mechanismus aufzeigen, der pleiotrope, antiinflammatorische und antiatherogene Atorvastatinwirkungen *in vivo* erklärt.

Zusammengefasst könnten sich die bisherigen inkonsistenten Beobachtungen zu pleiotropen Statineffekten *in vivo* bezüglich Inflammation, IL-6 und Adiponektin unter Atorvastatintherapie durch die in dieser Arbeit gezeigten stadienabhängigen direkten Atorvastatineffekte auf Präadipozyten und Adipozyten erklären. Nach neueren Erkenntnissen könnte überdies die Regulation von Visfatin eine Erklärung für pleiotrope Statineffekte bieten.

### 4.3 Atorvastatin hemmt dosisabhängig die insulininduzierte Glukoseaufnahme

**Atorvastatin induziert *in vitro* Insulinresistenz in terminal differenzierten Adipozyten.** Adipokine beeinflussen wichtige Adipozytenfunktionen wie zum Beispiel Glukoseaufnahme und Zelldifferenzierung. So wurde beispielsweise gezeigt, dass IL-6 in Adipozyten Insulinresistenz erzeugt (Fasshauer *et al.*, 2004). Die hier gezeigte direkte Regulation der mRNA-Expression von Adipokinen durch Atorvastatin lässt vermuten, dass Atorvastatin auch auf die Insulinsensitivität von Adipozyten Einfluss haben könnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen u. a. eine Induktion der mRNA-Expression von IL-6- und eine Reduktion der mRNA-Expression von Adiponektin in terminal differenzierten Adipozyten durch Atorvastatin. In Übereinstimmung mit der zurzeit vorherrschenden wissenschaftlichen Meinung könnten diese Ergebnisse zu einer Induktion von Insulinresistenz in Adipozyten führen. Tatsächlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch die direkte Interaktion von Atorvastatin mit terminal differenzierten, primär insulinempfindlichen Adipozyten die insulininduzierte Glukoseaufnahme gehemmt wird. In primär insulinresistenten Adipozyten war die Glukoseaufnahme jedoch nicht beeinträchtigt. Diese Daten sprechen dafür, dass die verminderte Glukoseaufnahme über einen insulinempfindlichvermittelten Mechanismus abläuft. Wie in Kapitel 4.1, S. 39 erläutert, wird in zahlreichen Studien eine Hemmung der Insulinsignalkaskade durch Statine diskutiert. Diese Ergebnisse liefern ein weiteres Indiz für die Interaktion von Statinen mit der Insulinsignaltransduktion.

Die *in vitro* Induktion von Insulinresistenz durch Atorvastatin in Adipozyten wird durch weitere Daten bestätigt, die eine verschlechterte Glukosetoleranz in 3T3-L1-Adipozyten durch Atorvastatin (Nakata *et al.*, 2006) bzw. Lovastatin (Chamberlain, 2001) zeigen.

**Statinwirkungen auf Insulinresistenz *in vivo*.** *In vivo* ist die Datenlage zur Interaktion von Statinen mit dem Glukosemetabolismus inkonsistent. Pleiotrope Statineffekte auf die Glukosetoleranz werden aktuell diskutiert. Es wurde gezeigt, dass eine Pravastatintherapie die Inzidenz von Diabetes mellitus Typ 2 in prädisponierten Patienten senken kann (Freeman *et al.*, 2001). Ferner gibt es Daten, die eine Verbesserung der Glukosetoleranz unter Atorvastatintherapie im Tiermodell nahelegen (Suzuki *et al.*, 2005); dieser Effekt wurde auch *in vivo* gezeigt (Huptas *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu konnte in zahlreichen *in vivo* Studien keine Verbesserung der Glukosetoleranz durch Atorvastatin gezeigt werden (Satoh *et al.*, 2005). Vielmehr zeigte sich, passend zu den Ergebnissen der vorliegenden

Arbeit, unter Atorvastatintherapie eine Verschlechterung der Glukosetoleranz *in vivo* mit signifikant höheren HbA<sub>1C</sub>-Werten, die als Langzeitparameter der Glukosekonzentration im Plasma gelten (2001; Ishikawa *et al.*, 2006; Takano *et al.*, 2006). In einer groß angelegten klinischen, randomisierten, multizentrischen Studie entwickelten prozentual mehr Patienten in der mit Atorvastatin behandelten Gruppe einen Diabetes mellitus Typ 2 als in der unbehandelten Kontrollgruppe (Sever *et al.*, 2004), diese Daten waren allerdings nicht signifikant. Ein interessanter Fallbericht beschreibt, wie nacheinander durch die Therapie mit Atorvastatin und danach mit Pravastatin bei einem 48-jährigen Mann akut ein Diabetes mellitus Typ 2 induziert wurde, der nach Auslassen der Medikamente komplett reversibel war (Ohmura *et al.*, 2005). Einige Arbeiten diskutieren unterschiedliche Effekte für Atorvastatin und Pravastatin. Dabei wurden positive Effekte auf die Glukosetoleranz nur für die Therapie mit Pravastatin gefunden, während die Therapie mit Atorvastatin keine signifikante Verbesserung der Glukosetoleranz oder sogar negative Effekte zeigte, obwohl die lipidsenkenden Effekte von Atorvastatin stärker als die von Pravastatin ausgeprägt waren (Ishikawa *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Mita *et al.*, 2007). Die in dieser Arbeit gezeigte Induktion von Insulinresistenz durch direkte Interaktion von Atorvastatin mit terminal differenzierten Adipozyten liefert eine Erklärung für die *in vivo* beobachteten negativen Effekte von Atorvastatin auf den Glukosemetabolismus prädisponierter Patienten. Die inkonsistente Studienlage zur Wirkung von Statinen auf die Glukosetoleranz könnte sowohl durch diskrepante Effekte unterschiedlicher Statine als auch durch stadienabhängige differentielle Statineffekte verursacht sein.

**Wirkung von Atorvastatin auf die Thermogenese.** Als weitere metabolische Adipozytenfunktion wurde die Wirkung von Atorvastatin auf die Proteinexpression von UCP-1 in braunen Adipozyten untersucht. UCP-1 ist ein spezifisches Protein brauner Adipozyten. UCP-1 bewirkt in braunem Fettgewebe eine regulierbare Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung über die Mitochondrienmembran, wodurch Energie, anstatt in Form von ATP gespeichert zu werden, als Wärme abgegeben wird. Entgegen bisheriger Annahmen, braunes Fett gäbe es nur bei Kindern und Nagetieren, scheint braunes Fett auch bei der Energiehomöostase des Erwachsenen eine Rolle zu spielen (Nedergaard *et al.*, 2007). Die Aktivierung der Thermogenese in braunem Fett wird negativ mit Insulinresistenz und dem BMI korreliert. Potentielle Therapieoptionen der Adipositas durch UCP-1-Aktivierung sind Gegenstand aktueller Forschung. Durch die hohe Energieabgabe kommt es bei UCP-1-Aktivierung zur Gewichtsabnahme. Diese Arbeit



zeigt keine signifikante Regulation der Proteinexpression des thermogenetisch wirksamen UCP-1 durch Atorvastatin, dementsprechend traten unter *in vivo* Bedingungen keine signifikanten Gewichtsveränderungen unter Atorvastatintherapie auf.

#### 4.4 Gewonnene Erkenntnisse

In der vorliegenden Dissertation wurden folgende Erkenntnisse zur direkten Interaktion von Atorvastatin und Adipozyten gewonnen (s. auch Abb. 10):

1. *Hat Atorvastatin direkte Effekte auf Präadipozyten und Adipozyten?*

Atorvastatin hat direkte Effekte auf weiße, epididymale, murine Präadipozyten und Adipozyten.

2. *Sind diese Effekte stadienabhängig?*

Die Effekte von Atorvastatin auf Präadipozyten und Adipozyten sind stadienabhängig.

3. *Hat dies Auswirkungen auf die Proliferation, Differenzierung und Apoptose in Präadipozyten und Adipozyten?*

Atorvastatin hemmt sowohl Proliferation als auch Differenzierung und induziert Apoptose differentiell in weißen Präadipozyten. In terminal differenzierten Adipozyten bleiben Differenzierung und Induktion von Apoptose dagegen unbeeinflusst.

4. *Über welchen Mechanismus induziert Atorvastatin Apoptose?*

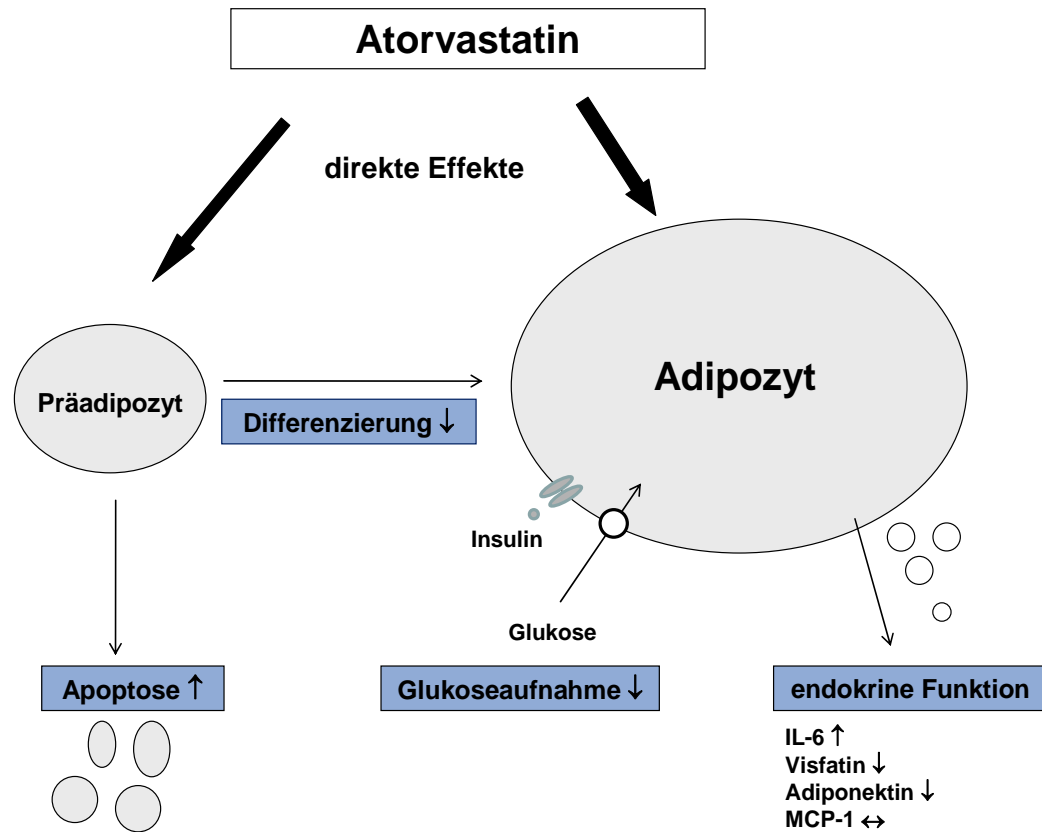
Atorvastatin induziert Apoptose über eine gehemmte Phosphorylierung des intrazellulären Signaltransduktionsmoleküls AKT.

5. *Moduliert Atorvastatin die mRNA-Expression von inflammatorischen und glukoregulatorischer Adipokinen in weißen, terminal differenzierten Adipozyten?*

Atorvastatin erhöht die mRNA-Expression von IL-6; die mRNA-Expression von MCP-1 bleibt hingegen konstant. Atorvastatin reduziert die mRNA-Expression von Adiponektin und Visfatin.

6. *Hat Atorvastatin Effekte auf metabolische Adipozytenfunktionen?*

Atorvastatin hemmt die insulininduzierte Glukoseaufnahme in terminal differenzierten, weißen Adipozyten. Es hat keinen Effekt auf die Proteinexpression des thermogenetischen Proteins UCP-1 in braunen Adipozyten.



**Abb. 10 Direkte Effekte von Atorvastatin auf Adipozyten.** Atorvastatin hat direkte Effekte auf Adipozyten. Es hemmt die Differenzierung und induziert Apoptose in Präadipozyten. Atorvastatin reduziert die mRNA-Expression von Visfatin und Adiponektin, es induziert die mRNA-Expression von IL-6 in terminal differenzierten Adipozyten. Ferner hemmt Atorvastatin die insulininduzierte Glukoseaufnahme in terminal differenzierten Adipozyten.

## 4.5 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen direkte, stadienabhängige Effekte von Atorvastatin auf Adipozyten *in vitro*. Die nachgewiesene Stadienabhängigkeit der Effekte könnte *in vivo* die Körperfettverteilung sowie Fettgewebszusammensetzung günstig beeinflussen. Es ist denkbar, dass Statintherapien abhängig von der Körperfettverteilung und -zusammensetzung der behandelten Patienten unterschiedliche Effekte zeigen und sich dadurch inkonsistente pleiotrope Statineffekte *in vivo* erklären lassen. Die Überprüfung dieser Hypothesen in klinischen Studien könnte neue interessante Therapieansätze für Statine eröffnen.

Diese Arbeit belegt eine direkte Regulation der mRNA-Expression glukoregulatorischer und proinflammatorischer Adipokine durch Atorvastatin. Darüber hinaus induziert Atorvastatin in der direkten Interaktion mit Adipozyten Insulinresistenz. Da Statine im Rahmen der Therapie des metabolischen Syndroms häufig bei prädisponierten Patienten bzw. bei Patienten mit primär schlechter Glukosetoleranz eingesetzt werden und zudem zunehmend auch über negative Statineffekte auf den Glukosemetabolismus *in vivo* berichtet wird, erscheint es notwendig, die Entwicklung des Glukosestoffwechsels unter Statintherapie in klinischen Studien genauer zu untersuchen. Im Hinblick auf die spannenden Therapieoptionen der Statine durch ihre, auch in dieser Arbeit nachgewiesenen, pleiotropen Effekte, sollten systemisch negative Auswirkungen auf den Glukosestoffwechsel sicher ausgeschlossen werden.

## 5 Zusammenfassung

Das metabolische Syndrom führt mit seinen Folgeerkrankungen weltweit die Mortalitätsstatistiken an. Wesentliche Kernkomponenten des metabolischen Syndroms sind Diabetes mellitus Typ 2 und Adipositas, die durch einen subinflammatorischen Prozess charakterisiert sind. Metabolische und endokrine Adipozytendysfunktionen spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese dieser inflammatorischen und metabolischen Dysregulationen.

Atorvastatin ist ein häufig verwendetes, sehr effektives Medikament zur Senkung des Cholesterinplasmaspiegels. In diversen Studien konnten überdies unabhängig vom cholesterinsenkenden Effekt pleiotrope immunmodulatorische und antiatherogene Effekte nachgewiesen werden, deren Mechanismen noch weitgehend unverstanden sind.

Diese Arbeit belegt eine direkte Interaktion von Atorvastatin mit weißen und braunen Mausadipozyten. Die Atorvastatineffekte auf Adipozyten sind komplex und abhängig vom Zellstadium. In Präadipozyten hemmt Atorvastatin die Proliferation sowie die Differenzierung und mindert die Zellebendigkeit durch Induktion von Apoptose. In terminal differenzierten Adipozyten induziert Atorvastatin hingegen keine Apoptose. Atorvastatin hemmt stadienabhängig die Aktivierung der antiapoptotischen Kinase AKT, dies könnte einen Mechanismus der Apoptoseinduktion darstellen. Atorvastatin reguliert direkt die mRNA-Expression proinflammatorischer und glukoregulatorischer Adipokine in terminal differenzierten Adipozyten. Das Adipokinexpressionsprofil wird durch Atorvastatin mit der Induktion der mRNA-Expression von IL-6 und Reduktion der mRNA-Expression von Visfatin und Adiponektin proinflammatorisch und glukostatisch reguliert. Zudem wird die insulininduzierte Glukoseaufnahme in terminal differenzierten Zellen gehemmt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen erstmals eine direkte, stadienabhängige durch Statine induzierte Apoptose in Adipozyten. Ferner zeigen sie erstmals eine direkte statin-regulierte mRNA-Expression von Adiponektin und Visfatin in Adipozyten. Diese direkten Interaktionen von Statinen mit Adipozyten könnten Mechanismen für pleiotrope Statineffekte darstellen und neue Perspektiven zur Verwendung dieser Medikamente eröffnen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. **Ahima RS:** Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 5:242S-249S (2006).
2. **Alessi DR, Downes CP:** The role of PI 3-kinase in insulin action. *Biochim Biophys Acta* 1436:151-164 (1998).
3. **Arnaud C, Braunersreuther V, Mach F:** Toward immunomodulatory and anti-inflammatory properties of statins. *Trends Cardiovasc Med* 15:202-206 (2005a).
4. **Arnaud C, Burger F, Steffens S, Veillard NR, Nguyen TH, Trono D, Mach F:** Statins reduce interleukin-6-induced C-reactive protein in human hepatocytes: new evidence for direct antiinflammatory effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:1231-1236 (2005b).
5. **Ascer E, Bertolami MC, Venturinelli ML, Buccheri V, Souza J, Nicolau JC, Ramires JA, Serrano CV, Jr.:** Atorvastatin reduces proinflammatory markers in hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis* 177:161-166 (2004).
6. **Avram MM, Avram AS, James WD:** Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: from stem cell to fat cell. *J Am Acad Dermatol* 56:472-492 (2007).
7. **Baetta R, Donetti E, Comparato C, Calore M, Rossi A, Teruzzi C, Paoletti R, Fumagalli R, Soma MR:** Proapoptotic effect of atorvastatin on stimulated rabbit smooth muscle cells. *Pharmacol Res* 36:115-121 (1997).
8. **Bayes B, Granada ML, Lauzurica R, Pastor MC, Navarro M, Bonet J, Llopis MA, Romero R:** Effect of Low Doses of Atorvastatin on Adiponectin, Glucose Homeostasis, and Clinical Inflammatory Markers in Kidney Transplant Recipients. *Transplantation Proceedings* 37:3808-3812 (2005).
9. **Bays H, Dujovne CA:** Adiposopathy is a more rational treatment target for metabolic disease than obesity alone. *Curr Atheroscler Rep* 8:144-156 (2006).
10. **Beltowski J:** Apelin and visfatin: Unique "beneficial" adipokines upregulated in obesity? *Med Sci Monit* 12:RA112-119 (2006).
11. **Berndt J, Kloting N, Kralisch S, Kovacs P, Fasshauer M, Schon MR, Stumvoll M, Bluher M:** Plasma visfatin concentrations and fat depot-specific mRNA expression in humans. *Diabetes* 54:2911-2916 (2005).
12. **Bevan P:** Insulin signalling. *J Cell Sci* 114:1429-1430 (2001).
13. **Bey L, Maigret P, Laouenan H, Hamilton MT:** Induction of Lipoprotein Lipase Gene Expression in 3T3-L1 Preadipocytes by Atorvastatin, a Cholesterol- and Triglyceride-Lowering Drug. *Pharmacology* 66:51-56 (2002).
14. **Blanco-Colio LM, Martin-Ventura JL, de Teresa E, Farsang C, Gaw A, Gensini G, Leiter LA, Langer A, Martineau P, Egido J:** Elevated ICAM-1 and MCP-1 plasma levels in subjects at high cardiovascular risk are diminished by atorvastatin treatment. Atorvastatin on Inflammatory Markers study: a substudy of Achieve Cholesterol Targets Fast with Atorvastatin Stratified Titration. *Am Heart J* 153:881-888 (2007).
15. **Blanco-Colio LM, Villa A, Ortego M, Hernandez-Presa MA, Pascual A, Plaza JJ, Egido J:** 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, induce apoptosis of vascular smooth muscle cells by downregulation of Bcl-2 expression and Rho A prenylation. *Atherosclerosis* 161:17-26 (2002).

16. **Bluher M, Michael MD, Peroni OD, Ueki K, Carter N, Kahn BB, Kahn CR:** Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev Cell* 3:25-38 (2002).
17. **Cafforio P, Dammacco F, Gernone A, Silvestris F:** Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells. *Carcinogenesis* 26:883-891 (2005).
18. **Cerezo-Guisado MI, Garcia-Marin LJ, Lorenzo MJ, Bragado MJ:** Lovastatin inhibits the growth and survival pathway of phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B in immortalized rat brain neuroblasts. *J Neurochem* 94:1277-1287 (2005).
19. **Chamberlain LH:** Inhibition of isoprenoid biosynthesis causes insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett* 507:357-361 (2001).
20. **Chan DC, Watts GF, Barrett PH, Beilin LJ, Mori TA:** Effect of atorvastatin and fish oil on plasma high-sensitivity C-reactive protein concentrations in individuals with visceral obesity. *Clin Chem* 48:877-883 (2002).
21. **Chen Y, Ohmori K, Mizukawa M, Yoshida J, Zeng Y, Zhang L, Shinomiya K, Kosaka H, Kohno M:** Differential impact of atorvastatin vs pravastatin on progressive insulin resistance and left ventricular diastolic dysfunction in a rat model of type II diabetes. *Circ J* 71:144-152 (2007).
22. **Coffer PJ, Jin J, Woodgett JR:** Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem J* 335 ( Pt 1):1-13 (1998).
23. **Colhoun HM, Betteridge DJ, Durrington PN, Hitman GA, Neil HA, Livingstone SJ, Thomason MJ, Mackness MI, Charlton-Menys V, Fuller JH:** Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multicentre randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 364:685-696 (2004).
24. **Connor AM, Berger S, Narendran A, Keystone EC:** Inhibition of protein geranylgeranylation induces apoptosis in synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther* 8:R94 (2006).
25. **Dagenais GR, Yi Q, Mann JF, Bosch J, Pogue J, Yusuf S:** Prognostic impact of body weight and abdominal obesity in women and men with cardiovascular disease. *Am Heart J* 149:54-60 (2005).
26. **Dai Y, Khanna P, Chen S, Pei XY, Dent P, Grant S:** Statins synergistically potentiate 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) lethality in human leukemia and myeloma cells by disrupting Ras farnesylation and activation. *Blood* 109:4415-4423 (2007).
27. **DALI:** The effect of aggressive versus standard lipid lowering by atorvastatin on diabetic dyslipidemia: the DALI study: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial in patients with type 2 diabetes and diabetic dyslipidemia. *Diabetes Care* 24:1335-1341 (2001).
28. **Demyanets S, Kaun C, Pfaffenberger S, Hohensinner PJ, Rega G, Pammer J, Maurer G, Huber K, Wojta J:** Hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors induce apoptosis in human cardiac myocytes in vitro. *Biochem Pharmacol* 71:1324-1330 (2006).
29. **Dostal LA, Schardein JL, Anderson JA:** Developmental toxicity of the HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, in rats and rabbits. *Teratology* 50:387-394 (1994).
30. **Dragomir E, Simionescu M:** Monocyte Chemoattractant Protein-1 - a major contributor to the inflammatory process associated with diabetes. *Arch Physiol Biochem* 112:239-244 (2006).

31. **Erol A:** The role of fat tissue in the cholesterol lowering and the pleiotropic effects of statins--statins activate the generation of metabolically more capable adipocytes. *Med Hypotheses* 64:69-73 (2005).
32. **Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW:** Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 145:2273-2282 (2004).
33. **Fasshauer M, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Bluher M, Klein J, Paschke R:** Insulin resistance-inducing cytokines differentially regulate SOCS mRNA expression via growth factor- and Jak/Stat-signaling pathways in 3T3-L1 adipocytes. *J Endocrinol* 181:129-138 (2004).
34. **Fernandez-Real JM, Ricart W:** Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev* 24:278-301 (2003).
35. **Fischer-Posovszky P, Wabitsch M, Hochberg Z:** Endocrinology of adipose tissue - an update. *Horm Metab Res* 39:314-321 (2007).
36. **Freeman DJ, Norrie J, Sattar N, Neely RD, Cobbe SM, Ford I, Isles C, Lorimer AR, Macfarlane PW, McKillop JH, Packard CJ, Shepherd J, Gaw A:** Pravastatin and the development of diabetes mellitus: evidence for a protective treatment effect in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Circulation* 103:357-362 (2001).
37. **Fromiguet O, Hay E, Modrowski D, Bouvet S, Jacquet A, Auburger P, Marie PJ:** RhoA GTPase inactivation by statins induces osteosarcoma cell apoptosis by inhibiting p42/p44-MAPKs-Bcl-2 signaling independently of BMP-2 and cell differentiation. *Cell Death Differ* 13(11):1845-1856 (2006).
38. **Gable DR, Hurel SJ, Humphries SE:** Adiponectin and its gene variants as risk factors for insulin resistance, the metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 188(2):231-244 (2006).
39. **Gabriely I, Ma XH, Yang XM, Atzmon G, Rajala MW, Berg AH, Scherer P, Rossetti L, Barzilai N:** Removal of visceral fat prevents insulin resistance and glucose intolerance of aging: an adipokine-mediated process? *Diabetes* 51:2951-2958 (2002).
40. **Gomez-Dominguez E, Gisbert JP, Moreno-Monteagudo JA, Garcia-Buey L, Moreno-Otero R:** A pilot study of atorvastatin treatment in dyslipemic, non-alcoholic fatty liver patients. *Aliment Pharmacol Ther* 23:1643-1647 (2006).
41. **Grigem S, Fischer-Posovszky P, Debatin KM, Loizon E, Vidal H, Wabitsch M:** The effect of the HIV protease inhibitor ritonavir on proliferation, differentiation, lipogenesis, gene expression and apoptosis of human preadipocytes and adipocytes. *Horm Metab Res* 37:602-609 (2005).
42. **Grundy SM, Brewer HB, Jr., Cleeman JI, Smith SC, Jr., Lenfant C:** Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:e13-18 (2004).
43. **Gustafson B, Smith U:** Cytokines promote Wnt signaling and inflammation and impair the normal differentiation and lipid accumulation in 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem* 281:9507-9516 (2006).
44. **Hamann A, Münzberg H, Tafel J, Ziegler R:** Manche mögens heiß: Bedeutung der Thermogenese für den Energiestoffwechsel und die Therapie der Adipositas. *Dtsch. Med. Wschr.* 241-246 (2001).
45. **Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ:** The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev* 2:239-254 (2001).

46. **Huptas S, Geiss HC, Otto C, Parhofer KG:** Effect of Atorvastatin (10 mg/day) on Glucose Metabolism in Patients With the Metabolic Syndrome. *Am J Cardiol* 98:66-69 (2006).
47. **IASO:**  
<http://www.ietf.org/database/documents/GlobalPrevalenceofAdultObesity30thOctober07.pdf> (Tag des Zugriffs: 20.11.2007) (2007)
48. **Ichida Y, Hasegawa G, Fukui M, Obayashi H, Ohta M, Fujinami A, Ohta K, Nakano K, Yoshikawa T, Nakamura N:** Effect of atorvastatin on in vitro expression of resistin in adipocytes and monocytes/macrophages and effect of atorvastatin treatment on serum resistin levels in patients with type 2 diabetes. *Pharmacology* 76:34-39 (2006).
49. **Igarashi M, Yamaguchi H, Hirata A, Tsuchiya H, Ohnuma H, Tominaga M, Daimon M, Kato T:** Mechanisms of inhibitory effects of cerivastatin on rat vascular smooth muscle cell growth. *J Cardiovasc Pharmacol* 40:277-287 (2002).
50. **Ishikawa M, Namiki A, Kubota T, Yajima S, Fukazawa M, Moroi M, Sugi K:** Effect of pravastatin and atorvastatin on glucose metabolism in nondiabetic patients with hypercholesterolemia. *Intern Med* 45:51-55 (2006).
51. **Isomaa B:** A major health hazard: the metabolic syndrome. *Life Sci* 73:2395-2411 (2003).
52. **Iwen KA, Perwitz N, Kraus D, Fasshauer M, Klein J:** Putting fat cells onto the road map to novel therapeutic strategies. *Discov Med* 6:75-81 (2006).
53. **Jain MK, Ridker PM:** Anti-inflammatory effects of statins: clinical evidence and basic mechanisms. *Nat Rev Drug Discov* 4:977-987 (2005).
54. **Jansson JO, Wallenius K, Wernstedt I, Ohlsson C, Dickson SL, Wallenius V:** On the site and mechanism of action of the anti-obesity effects of interleukin-6. *Growth Horm IGF Res* 13 Suppl A:S28-32 (2003).
55. **Jia SH, Li Y, Parodo J, Kapus A, Fan L, Rotstein OD, Marshall JC:** Pre-B cell colony-enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical sepsis. *J Clin Invest* 113:1318-1327 (2004).
56. **Kadowaki T, Hara K, Yamauchi T, Terauchi Y, Tobe K, Nagai R:** Molecular mechanism of insulin resistance and obesity. *Exp Biol Med (Maywood)* 228:1111-1117 (2003).
57. **Kaneko R, Tsuji N, Asanuma K, Tanabe H, Kobayashi D, Watanabe N:** Survivin down-regulation plays a crucial role in 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor-induced apoptosis in cancer. *J Biol Chem* 282:19273-19281 (2007).
58. **Karow L-R:** HMG-CoA-Reduktasehemmer. In: *Pharmakologie und Toxikologie*. 13, S. 331-332, Köln (2005).
59. **Kershaw EE, Flier JS:** Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2548-2556 (2004).
60. **Kim D, Chung J:** Akt: versatile mediator of cell survival and beyond. *J Biochem Mol Biol* 35:106-115 (2002).
61. **Kinlay S, Schwartz GG, Olsson AG, Rifai N, Leslie SJ, Sasiela WJ, Szarek M, Libby P, Ganz P:** High-dose atorvastatin enhances the decline in inflammatory markers in patients with acute coronary syndromes in the MIRACL study. *Circulation* 108:1560-1566 (2003).
62. **Klein J, Fasshauer M, Ito M, Lowell BB, Benito M, Kahn CR:** beta(3)-adrenergic stimulation differentially inhibits insulin signaling and decreases insulin-induced glucose uptake in brown adipocytes. *J Biol Chem* 274:34795-34802 (1999).



63. **Klein J, Fasshauer M, Klein HH, Benito M, Kahn CR:** Novel adipocyte lines from brown fat: a model system for the study of differentiation, energy metabolism, and insulin action. *Bioessays* 24:382-388 (2002).
64. **Klein J, Permana PA, Owecki M, Chaldakov GN, Bohm M, Hausman G, Lapiere CM, Atanassova P, Sowinski J, Fasshauer M, Hausman DB, Maquoi E, Tonchev AB, Peneva VN, Vlachanov KP, Fiore M, Aloe L, Slominski A, Reardon CL, Ryan TJ, Pond CM:** What are subcutaneous adipocytes really good for? *Exp Dermatol* 16:45-70 (2007).
65. **Klein J, Perwitz N, Kraus D, Fasshauer M:** Adipose tissue as source and target for novel therapies. *Trends Endocrinol Metab* 17:26-32 (2006).
66. **Klein J, Westphal S, Kraus D, Meier B, Perwitz N, Ott V, Fasshauer M, Klein HH:** Metformin inhibits leptin secretion via a mitogen-activated protein kinase signalling pathway in brown adipocytes. *J Endocrinol* 183:299-307 (2004).
67. **Kopelman PG:** Obesity as a medical problem. *Nature* 404:635-643 (2000).
68. **Kostapanos MS, Derdemezis CS, Filippatos TD, Milionis HJ, Kiortsis DN, Tselepis AD, Elisaf MS:** Effect of rosuvastatin treatment on plasma visfatin levels in patients with primary hyperlipidemia. *Eur J Pharmacol* (2007).
69. **Kubota T, Fujisaki K, Itoh Y, Yano T, Sendo T, Oishi R:** Apoptotic injury in cultured human hepatocytes induced by HMG-CoA reductase inhibitors. *Biochem Pharmacol* 67:2175-2186 (2004).
70. **Li JQ, Zhao SP, Li QZ, Cai YC, Wu LR, Fang Y, Li P:** Atorvastatin reduces plasminogen activator inhibitor-1 expression in adipose tissue of atherosclerotic rabbits. *Clin Chim Acta* 370(1-2):57-62 (2006).
71. **Li X, Cui Q, Kao C, Wang G-J, Balian G:** Lovastatin inhibits adipogenic and stimulates osteogenic differentiation by suppressing PPAR[gamma]2 and increasing Cbfa1/Runx2 expression in bone marrow mesenchymal cell cultures. *Bone* 33:652-659 (2003).
72. **Löffler P:** Stoffwechsel der Lipide. In: Biochemie und Pathobiochemie. 5, S. 425-482, Berlin-Heidelberg (1997).
73. **Lowell BB, Flier JS:** Brown adipose tissue, beta 3-adrenergic receptors, and obesity. *Annu Rev Med* 48:307-316 (1997).
74. **Maron DJ, Fazio S, Linton MF:** Current perspectives on statins. *Circulation* 101:207-213 (2000).
75. **Matsuzawa Y:** Therapy Insight: adipocytokines in metabolic syndrome and related cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 3:35-42 (2006).
76. **McGuire TF, Xu XQ, Corey SJ, Romero GG, Sebti SM:** Lovastatin disrupts early events in insulin signaling: a potential mechanism of lovastatin's anti-mitogenic activity. *Biochem Biophys Res Commun* 204:399-406 (1994).
77. **Minokoshi Y, Kahn CR, Kahn BB:** Tissue-specific Ablation of the GLUT4 Glucose Transporter or the Insulin Receptor Challenges Assumptions about Insulin Action and Glucose Homeostasis. *J Biol Chem* 278:33609-33612 (2003).
78. **Mita T, Watada H, Nakayama S, Abe M, Ogihara T, Shimizu T, Uchino H, Hirose T, Kawamori R:** Preferable effect of pravastatin compared to atorvastatin on beta cell function in Japanese early-state type 2 diabetes with hypercholesterolemia. *Endocr J* 54:441-447 (2007).
79. **Mori Y, Murakawa Y, Okada K, Horikoshi H, Yokoyama J, Tajima N, Ikeda Y:** Effect of troglitazone on body fat distribution in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 22:908-912 (1999).
80. **Moschen AR, Kaser A, Enrich B, Mosheimer B, Theurl M, Niederegger H, Tilg H:** Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties. *J Immunol* 178:1748-1758 (2007).

81. **Mosmann T:** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63 (1983).
82. **Muck AO, Seeger H, Wallwiener D:** Class-specific pro-apoptotic effect of statins on human vascular endothelial cells. *Z Kardiol* 93:398-402 (2004a).
83. **Muck AO, Seeger H, Wallwiener D:** Inhibitory effect of statins on the proliferation of human breast cancer cells. *Int J Clin Pharmacol Ther* 42:695-700 (2004b).
84. **Nakamura T, Kodama Y, Takano H, Umetani K, Fujioka D, Saito Y, Kawabata K, Obata JE, Kitta Y, Kobayashi T, Mende A, Kugiyama K:** Increase in circulating levels of adiponectin after treatment with statin and fibrate in patients with coronary artery disease and hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 193:449-451 (2007).
85. **Nakata M, Nagasaka S, Kusaka I, Matsuoka H, Ishibashi S, Yada T:** Effects of statins on the adipocyte maturation and expression of glucose transporter 4 (SLC2A4): implications in glycaemic control. *Diabetologia* 49(8):1881-1892 (2006).
86. **Nawrocki AR, Scherer PE:** The delicate balance between fat and muscle: adipokines in metabolic disease and musculoskeletal inflammation. *Curr Opin Pharmacol* 4:281-289 (2004).
87. **Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B:** Unexpected Evidence for Active Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293(2):E444-452 (2007).
88. **Oberkofler H, Dallinger G, Liu YM, Hell E, Krempler F, Patsch W:** Uncoupling protein gene: quantification of expression levels in adipose tissues of obese and non-obese humans. *J Lipid Res* 38:2125-2133 (1997).
89. **Ohmura C, Watada H, Hirose T, Tanaka Y, Kawamori R:** Acute onset and worsening of diabetes concurrent with administration of statins. *Endocr J* 52:369-372 (2005).
90. **Okopien B, Krysiak R, Haberka M, Herman ZS:** Effect of monthly atorvastatin and fenofibrate treatment on monocyte chemoattractant protein-1 release in patients with primary mixed dyslipidemia. *J Cardiovasc Pharmacol* 45:314-320 (2005).
91. **Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, Umesono K, Akanuma Y, Fujiwara T, Horikoshi H, Yazaki Y, Kadowaki T:** Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest* 101:1354-1361 (1998).
92. **Otero M, Lago R, Gomez R, Lago F, Dieguez C, Gomez-Reino JJ, Gualillo O:** Changes in plasma levels of fat-derived hormones adiponectin, leptin, resistin and visfatin in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 65:1198-1201 (2006).
93. **Ott V, Fasshauer M, Meier B, Dalski A, Kraus D, Gettys TW, Perwitz N, Klein J:** Ciliary neurotrophic factor influences endocrine adipocyte function: inhibition of leptin via PI 3-kinase. *Mol Cell Endocrinol* 224:21-27 (2004).
94. **Palinski W:** Immunomodulation: a new role for statins? *Nat Med* 6:1311-1312 (2000).
95. **Palinski W:** New evidence for beneficial effects of statins unrelated to lipid lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:3-5 (2001).
96. **Perwitz N, Fasshauer M, Klein J:** Cannabinoid receptor signaling directly inhibits thermogenesis and alters expression of adiponectin and visfatin. *Horm Metab Res* 38:356-358 (2006).
97. **Pilz S, Mangge H, Obermayer-Pietsch B, Marz W:** Visfatin/pre-B-cell colony-enhancing factor: a protein with various suggested functions. *J Endocrinol Invest* 30:138-144 (2007).

98. **Radwan DA, Al-Tahhan MA, Hussein AG, Said H, Kadry YA:** Adiponectin and some inflammatory and endothelial markers in type-2 diabetes with and without cardiovascular disease. *Egypt J Immunol* 12:133-142 (2005).
99. **Rajala MW, Scherer PE:** Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* 144:3765-3773 (2003).
100. **Rexrode KM, Carey VJ, Hennekens CH, Walters EE, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Manson JE:** Abdominal adiposity and coronary heart disease in women. *Jama* 280:1843-1848 (1998).
101. **Reynolds K, He J:** Epidemiology of the metabolic syndrome. *Am J Med Sci* 330:273-279 (2005).
102. **Rosen ED, MacDougald OA:** Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:885-896 (2006).
103. **Rotter V, Nagaev I, Smith U:** Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem* 278:45777-45784 (2003).
104. **Sachs L, Hedderich J:** Einstichproben-t-Test. In: *Angewandte Statistik*. 12, S. 352, Springer-Verlag, Heidelberg (2006).
105. **Saltiel AR, Kahn CR:** Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806 (2001).
106. **Satoh K, Keimatsu N, Kanda M, Kasai T, Takaguri A, Sun F, Ichihara K:** HMG-CoA reductase inhibitors do not improve glucose intolerance in spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats. *Biol Pharm Bull* 28:2092-2095 (2005).
107. **Schachter M:** Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam Clin Pharmacol* 19:117-125 (2005).
108. **Sethi JK, Vidal-Puig A:** Visfatin: the missing link between intra-abdominal obesity and diabetes? *Trends Mol Med* 11:344-347 (2005).
109. **Sever PS, Dahlof B, Poulter NR, Wedel H, Beevers G, Caulfield M, Collins R, Kjeldsen SE, Kristinsson A, McInnes GT, Mehlsen J, Nieminen M, O'Brien E, Ostergren J:** Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial--Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial. *Drugs* 64 Suppl 2:43-60 (2004).
110. **Shetty GK, Economides PA, Horton ES, Mantzoros CS, Veves A:** Circulating adiponectin and resistin levels in relation to metabolic factors, inflammatory markers, and vascular reactivity in diabetic patients and subjects at risk for diabetes. *Diabetes Care* 27:2450-2457 (2004).
111. **Song C, Guo Z, Ma Q, Chen Z, Liu Z, Jia H, Dang G:** Simvastatin induces osteoblastic differentiation and inhibits adipocytic differentiation in mouse bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 308:458-462 (2003).
112. **Stouthard JM, Oude Elferink RP, Sauerwein HP:** Interleukin-6 enhances glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 220:241-245 (1996).
113. **Suzuki M, Kakuta H, Takahashi A, Shimano H, Tada-Iida K, Yokoo T, Kihara R, Yamada N:** Effects of atorvastatin on glucose metabolism and insulin resistance in KK/Ay mice. *J Atheroscler Thromb* 12:77-84 (2005).
114. **Takano T, Yamakawa T, Takahashi M, Kimura M, Okamura A:** Influences of statins on glucose tolerance in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Atheroscler Thromb* 13:95-100 (2006).

115. **Takebayashi K, Suetsugu M, Wakabayashi S, Aso Y, Inukai T:** Association between plasma visfatin and vascular endothelial function in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 56:451-458 (2007).
116. **Tilg H, Moschen AR:** Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 6:772-783 (2006).
117. **Tomiyama K, Nishio E, Watanabe Y:** Both wortmannin and simvastatin inhibit the adipogenesis in 3T3-L1 cells during the late phase of differentiation. *Jpn J Pharmacol* 80:375-378 (1999).
118. **Trayhurn P, Wood IS:** Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. *Biochem Soc Trans* 33:1078-1081 (2005).
119. **van de Ree MA, Huisman MV, Princen HM, Meinders AE, Kluft C:** Strong decrease of high sensitivity C-reactive protein with high-dose atorvastatin in patients with type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 166:129-135 (2003).
120. **van Harmelen V, Skurk T, Rohrig K, Lee YM, Halbleib M, Aprath-Husmann I, Hauner H:** Effect of BMI and age on adipose tissue cellularity and differentiation capacity in women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27:889-895 (2003).
121. **Wajchenberg BL:** Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 21:697-738 (2000).
122. **Wallenius V, Wallenius K, Ahren B, Rudling M, Carlsten H, Dickson SL, Ohlsson C, Jansson JO:** Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med* 8:75-79 (2002).
123. **Wang B, Jenkins JR, Trayhurn P:** Expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture: integrated response to TNF-alpha. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:E731-740 (2005).
124. **Weigert C, Hennige AM, Brodbeck K, Haring HU, Schleicher ED:** Interleukin-6 acts as insulin sensitizer on glycogen synthesis in human skeletal muscle cells by phosphorylation of Ser473 of Akt. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E251-257 (2005).
125. **Weigert C, Hennige AM, Lehmann R, Brodbeck K, Baumgartner F, Schauble M, Haring HU, Schleicher ED:** Direct cross-talk of interleukin-6 and insulin signal transduction via insulin receptor substrate-1 in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 281:7060-7067 (2006).
126. **Weiss RH, Ramirez A, Joo A:** Short-term pravastatin mediates growth inhibition and apoptosis, independently of Ras, via the signaling proteins p27Kip1 and P13 kinase. *J Am Soc Nephrol* 10:1880-1890 (1999).
127. **Wiklund O, Mattsson-Hulten L, Hurt-Camejo E, Oscarsson J:** Effects of simvastatin and atorvastatin on inflammation markers in plasma. *J Intern Med* 251:338-347 (2002).
128. **Wyllie AH:** Cell Death. In: Roche Applied Science; Apoptosis, Cell Death and Cell Proliferation Manual. S. 1-7, Mannheim (2004).
129. **Xu ZM, Zhao SP, Li QZ, Nie S, Zhou HN:** Atorvastatin reduces plasma MCP-1 in patients with acute coronary syndrome. *Clin Chim Acta* 338:17-24 (2003).
130. **Yasuda N, Matzno S, Iwano C, Nishikata M, Matsuyama K:** Evaluation of apoptosis and necrosis induced by statins using fluorescence-enhanced flow cytometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 39:712-717 (2005).
131. **Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM:** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432 (1994).
132. **Zhao SP, Wu ZH:** Atorvastatin reduces serum leptin concentration in hypercholesterolemic rabbits. *Clin Chim Acta* 360:133-140 (2005).

133. **Zhao SP, Wu ZH, Hong SC, Ye HJ, Wu J:** Effect of atorvastatin on SR-BI expression and HDL-induced cholesterol efflux in adipocytes of hypercholesterolemic rabbits. *Clin Chim Acta* 365:119-124 (2006).
134. **Zhao SP, Zhang DQ:** Atorvastatin enhances cellular uptake of oxidized LDL in adipocytes from hypercholesterolemic rabbits. *Clin Chim Acta* 339:189-194 (2004).
135. **Zhao SP, Zhang DQ:** Atorvastatin reduces interleukin-6 plasma concentration and adipocyte secretion of hypercholesterolemic rabbits. *Clin Chim Acta* 336:103-108 (2003).

## 7 Abkürzungsverzeichnis

AKT	Serin-/Threonin-Proteinkinase
APS	Advanced Photo System
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body mass index
BSA	Bovines Serumalbumin
CEBP- $\beta$	CCAAT/enhancer binding protein beta
cpm	counts per minute
CTP	Cytidintriphosphat
CYP 3A4	Cytochrom P 450 3A4
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eaglemedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamine-tetraacetic Acid (Ethylendiamintetraessigsäure)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FBS	Fetales bovines Serum
GLUT	Glukosetransporter
GTP	Guanosintriphosphat
HCl	Hydrochlorid
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthine
Ig	Immunglobulin
IL-6	Interleukin-6
KOH	Kaliumhydroxid
KRH	Krebs-Ringer-HEPES-Puffer
M	mol/l
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP-1	Macrophages Monocytes Chemoattractant Protein
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromid
NaCl	Natriumchlorid
Ci	Curie

OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1
PBS	Phosphat-Buffered-Saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PI 3-Kinase	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PI	Phosphatidylinositol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
RNA	Ribonucleid Acid (Ribonukleinsäure)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat (Natriumdodecylsulfat)
SV40	Simian Virus 40
T <sub>3</sub>	Thyroxin
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	<i>unit</i>
UCP	<i>uncoupling protein</i> , (Entkopplungsprotein)
UTP	Uridintriphosphat

## **8 Danksagung**

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Johannes Klein für die Vergabe dieses spannenden Themas bedanken. Desweiteren danke ich ihm für die Möglichkeit in seinem Team mitarbeiten zu dürfen und für die hilfreiche und zuverlässige Unterstützung beim Bearbeiten, Interpretieren, Publizieren und Korrigieren dieser Arbeit. Mein Dank gilt Prof. Dr. H. Lehnert, dem Direktor der Medizinischen Klinik I, für die Möglichkeit in seiner Klinik forschen zu dürfen. Ich danke der AG-Klein, insbesondere Maren Drenkhan, Britta Meier und Nina Perwitz für die geduldige Einarbeitung, Auswahl und Unterstützung bei den methodischen Laborarbeiten. Ferner danke ich Daniel Kraus und Henning Sievert für die freundliche Einarbeitung in die benötigte Software. Bastian Vogl danke ich für die Durchsicht und Korrektur des Manuskripts. Ich danke vor allem meinen Eltern, die mir mit ihrer ideellen und finanziellen Unterstützung meine Ausbildung und das Erstellen dieser Arbeit ermöglicht haben.



## 9 Lebenslauf

### *Allgemeines*

Name	<b>Wanda Sigrid Mäuser</b>
Staatsangehörigkeit	deutsch
Geburtsort	Düsseldorf
Geburtsdatum	15.07.1980
Familienstand	ledig

### *Schulabschluss*

07.1998 - 06.2000	<b>Abitur am Gymnasium Buckhorn, Hamburg</b>
-------------------	--

### *Studium*

10.2000-10.2007	<b>Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck</b>
-----------------	--

### *Promotion*

11.2004	<b>Beginn der Promotion</b>
05.2006	<b>Beendigung des experimentellen Teils der Promotion</b>
05.2006	<b>Posterpräsentation bei der 41. Jahrestagung der <i>Deutschen Diabetes Gesellschaft</i></b>
02.2007	<b>Annahme des Originalartikels beim <i>European Journal of Pharmacology</i></b>

### *Auslandsaufenthalte*

08.1997 - 05.1998	<b>Austauschschülerin in El Paso (Texas, USA)</b>
09.2003 - 06.2004	<b>Erasmusstudentin an der Université de Caen (Frankreich)</b>
01.2007 -03.2007	<b>PJ-Studentin am St. Georges Hospital in London (England)</b>