

UNIVERSITÄT POTSDAM
INSTITUT FÜR ERNÄHRUNGSWISSENSCHAFT
ABTEILUNG BIOCHEMIE DER ERNÄHRUNG

Makrophagenaktivierung durch Hyperinsulinämie
als Auslöser eines Teufelkreises der Entzündung
im Kontext des metabolischen Syndroms

DISSERTATION
zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin „Biochemie und Pathobiochemie“

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von
Julia Klauer, geborene Manowsky

Ort und Tag der Disputation: Bergholz-Rehbrücke am 20. August 2021

Soweit nicht anders gekennzeichnet, ist dieses Werk unter einem Namensnennung - Nicht-kommerziell - Weitergabe unter gleichen Bedingungen 4.0 International lizenziert.

Dies gilt nicht für Zitate und Werke, die aufgrund einer anderen Erlaubnis genutzt werden. Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.de>

Hauptbetreuer: Prof. Dr. Gerhard Paul Püschel

Mentorin: Prof. Dr. Janin Henkel-Oberländer

Gutachter:innen: Prof. Dr. Michael Blaut
Prof. Dr. Brunhilde Blömeke
Prof. Dr. Gerhard Paul Püschel

Promotionskommission: Prof. Dr. Michael Blaut
Prof. Dr. Susanne Klaus
Prof. Dr. André Kleinridders (Vorsitzender)
Prof. Dr. Gerhard Paul Püschel
Apl.-Prof. Dr. Jens Raila

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
<https://doi.org/10.25932/publishup-52019>
<https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-520199>

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	VI
Abstract	VIII
1 Einleitung	1
1.1 <i>Das metabolische Syndrom</i>	1
1.1.1 Insulinresistenz	1
1.1.2 Adipositas	2
1.2 <i>Makrophagen</i>	2
1.3 <i>Zytokine und Chemokine – Effektorsubstanzen der Makrophagen</i>	3
1.3.1 Tumornekrosefaktor α	4
1.3.2 Interleukin-1 β	5
1.3.3 Interleukin-18	5
1.3.4 Interleukin-6	6
1.3.5 Oncostatin M	7
1.3.6 Interleukin-8	7
1.3.7 C-C-Chemokin-Ligand 2	8
1.4 <i>Prostaglandin E₂</i>	8
1.4.1 Arachidonsäure- und Prostaglandin E ₂ -Synthese	8
1.4.2 Prostaglandin E ₂ -Rezeptoren	10
1.4.3 Prostaglandin E ₂ und Entzündung	10
1.5 <i>Das weiße Fettgewebe</i>	12
1.5.1 Physiologische Funktion des weißen Fettgewebes	12
1.5.2 Entzündung des weißen Fettgewebes	13
1.6 <i>Freie Fettsäuren</i>	14
1.6.1 Struktur und Vorkommen von freien Fettsäuren	14
1.6.2 Molekularer Mechanismus der direkten pro-inflammatorischen Wirkung von freien Fettsäuren	14
1.7 <i>Sphingolipide</i>	16
1.7.1 Synthese von Sphingolipiden	16
1.7.2 Molekularer Mechanismus der pro-inflammatorischen Wirkung von Sphingolipiden	17
1.8 <i>Insulin</i>	18
1.8.1 Physiologische Funktion von Insulin	18
1.8.2 Die Insulinrezeptorsignalkaskade	19
1.8.3 Molekularer Mechanismus der Entstehung einer Insulinresistenz	20
1.9 <i>Arbeitshypothesen</i>	21
1.10 <i>Ziel der Arbeit</i>	23

2	Methodenübersicht	25
Ausführliche Methodenbeschreibungen befinden sich im Anhang unter Punkt 6.2.1 bis Punkt 6.2.16		
2.1	<i>Kultivierung permanenter Zelllinien (Punkt 6.2.1)</i>	25
2.2	<i>Isolierung, Reinigung und Kultivierung von humanen Monozyten und Makrophagen (Punkt 6.2.2)</i>	25
2.3	<i>Isolierung, Reinigung, Transfektion und Kultivierung von Hepatozyten der Ratte (Punkt 6.2.3)</i>	26
2.4	<i>Zellkulturversuche (Punkt 6.2.4)</i>	26
2.4.1	Zellkulturversuche zur Bestimmung der Genregulation in den permanenten Zelllinien U937 und THP-1	26
2.4.2	Zellkulturversuche zur Untersuchung der Genregulation in den primären humanen Makrophagen	27
2.4.3	Zellkulturversuche zur Untersuchung der Genregulation in primären Rattenhepatozyten	27
2.5	<i>RNA-Isolation, cDNA-Synthese und quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR) (Punkte 6.2.5, 6.2.6, 6.2.7 und 6.2.8)</i>	28
2.6	<i>Western Blot-Analyse (Punkte 6.2.10 und 6.2.11)</i>	28
2.7	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Punkte 6.2.12, 6.2.13 und 6.2.14)</i>	29
2.8	<i>Triple-Quadrupol-Massenspektrometer-Analyse (Punkt 6.2.15)</i>	29
2.9	<i>Luciferase-Reportergen-Assay (Punkt 6.2.16)</i>	30
3	Ergebnisse	31
3.1	<i>Insulin-induzierte Steigerung der basalen und Stimulus-abhängigen Expression pro-inflammatorischer Zytokine in Makrophagen</i>	31
3.1.1	Insulin-induzierte Steigerung der basalen Expression pro-inflammatorischer Zytokine in Makrophagen	31
3.1.2	Molekularer Mechanismus der Insulin-induzierten Expression von IL-1 β und anderen pro-inflammatorischen Zytokinen in U937-Makrophagen	38
3.1.3	Insulin-induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid-abhängigen Expression pro-inflammatorischer Zytokine in Makrophagen	41
3.1.4	Molekularer Mechanismus der Insulin-induzierten Verstärkung einer Lipopolysaccharid-abhängigen Expression pro-inflammatorischer Zytokine in Makrophagen	50
3.2	<i>Palmitat-induzierte Steigerung der basalen und Stimulus-abhängigen Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in THP-1-Makrophagen</i>	53
3.3	<i>Einfluss von Insulin oder Palmitat auf die Synthese von Prostaglandin E₂ in Makrophagen</i>	56
3.3.1	Insulin-induzierte Steigerung der basalen Prostaglandin E ₂ -Synthese in Makrophagen	57
3.3.2	Insulin-induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid-abhängigen Prostaglandin E ₂ -Synthese in Makrophagen	62
3.3.3	Palmitat-induzierte Steigerung der basalen Prostaglandin E ₂ -Synthese in THP-1-Makrophagen	68
3.4	<i>Prostaglandin E₂-induzierte Steigerung der Stimulus-abhängigen Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in Makrophagen</i>	70
3.4.1	Prostaglandin E ₂ -induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid-abhängigen Expression pro-inflammatorischer Zytokine in Makrophagen	70
3.4.2	Prostaglandin E ₂ -induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid- und Insulin-abhängigen Expression pro-inflammatorischer Zytokine in Makrophagen	74

3.4.3	Prostaglandin E ₂ -induzierte Steigerung der Palmitat-abhängigen Expression pro-inflammatorischer Zytokine in THP-1-Makrophagen	80
3.4.4	Molekularer Mechanismus der Prostaglandin E ₂ -induzierten Steigerung der Expression pro-inflammatorischer Zytokine in THP-1-Makrophagen	82
3.4.5	Fehlender Einfluss von Prostaglandin E ₂ auf die Palmitat-abhängige Modulation des Sphingolipidmetabolismus	88
3.5	<i>Prostaglandin E₂-induzierte Verstärkung seiner eigenen Stimulus-abhängigen Synthese in Makrophagen</i>	90
3.5.1	Prostaglandin E ₂ -induzierte Verstärkung der Lipopolysaccharid-abhängigen Expression Arachidonsäure- und Prostaglandin E ₂ -synthetisierender Enzyme in Makrophagen	90
3.5.2	Prostaglandin E ₂ -induzierte Verstärkung der Lipopolysaccharid- und Insulin-abhängigen Expression Arachidonsäure- und Prostaglandin E ₂ -synthetisierender Enzyme in Makrophagen	94
3.5.3	Prostaglandin E ₂ -induzierte Verstärkung der Palmitat-abhängigen Expression Arachidonsäure- und Prostaglandin E ₂ -synthetisierender Enzyme in Makrophagen	99
3.6	<i>Einfluss einer Insulin-induzierten Zytokinfreisetzung in U937-Makrophagen auf die Insulinsensitivität in Hepatozyten der Ratte</i>	102
3.6.1	Wirkung der Überstände insulin-behandelter Makrophagen auf die Insulinsensitivität in Hepatozyten der Ratte	102
3.6.2	Molekularer Mechanismus einer durch Überstände Insulin-stimulierter Makrophagen ausgelösten Insulinresistenz in Hepatozyten der Ratte	105
4	Diskussion	111
4.1	<i>Insulin-induzierte Steigerung der basalen und Stimulus-abhängigen Entzündungsantwort in Makrophagen</i>	111
4.1.1	<i>In vitro</i> -Evidenz für die Insulin-induzierte Steigerung der basalen und Stimulus-abhängigen Entzündungsantwort in Makrophagen	111
4.1.2	<i>In vivo</i> -Evidenz für die Insulin-induzierte Steigerung der basalen und Stimulus-abhängigen Entzündungsantwort in Makrophagen	113
4.2	<i>Molekularer Mechanismus der Insulin-induzierten Entzündungsantwort in Makrophagen</i>	115
4.2.1	MAP-Kinase-abhängiger Signalweg bei der Insulin-induzierten Entzündungsantwort in Makrophagen	115
4.2.2	PI3K-Akt-Signalweg bei der Insulin-induzierten Entzündungsantwort in Makrophagen	115
4.2.3	Besonderheit der Synthese und Freisetzung von IL-1 β	118
4.3	<i>Hepatische Insulinresistenz als eine mögliche Folge der Insulin-induzierten Entzündungsantwort in Makrophagen</i>	118
4.4	<i>Molekularer Mechanismus einer Zytokin-vermittelten Insulinresistenz in Hepatozyten</i>	119
4.5	<i>Interaktion der Hyperinsulinämie mit einer Diät-abhängig modifizierten Mikrobiota</i>	121
4.6	<i>Palmitat-induzierte Steigerung der basalen und Stimulus-abhängigen Entzündungsantwort in Makrophagen</i>	123
4.7	<i>Molekulare Mechanismen der Palmitat-induzierten Entzündungsantwort in Makrophagen</i>	124
4.7.1	Rezeptor-abhängige Mechanismen der Palmitat-induzierten Entzündungsantwort in Makrophagen	124
4.7.2	Stoffwechsel-abhängige Mechanismen der Palmitat-induzierten Entzündungsantwort in Makrophagen	126
4.7.3	Besonderheiten von U937-Makrophagen	129

4.8	<i>Modulation der Stimulus-abhängigen Entzündungsantwort in Makrophagen durch Prostaglandin E₂</i>	130
4.8.1	EP-Rezeptorbeteiligung bei der Prostaglandin E ₂ -vermittelten Modulation der Entzündungsantwort in Makrophagen	132
4.8.2	Molekularer Mechanismus der Prostaglandin E ₂ -vermittelten Modulation der Palmitat-induzierten Entzündungsantwort in Makrophagen	133
4.9	<i>Stimulus-abhängige Prostaglandin E₂-Synthese in Makrophagen</i>	136
4.9.1	Einfluss von Insulin, Lipopolysaccharid oder Palmitat auf die Synthese von Arachidonsäure und Prostaglandin E ₂ in Makrophagen	136
4.9.2	Prostaglandin E ₂ -induzierte Verstärkung seiner eigenen Stimulus-abhängigen Synthese in Makrophagen	138
4.10	<i>Schlussfolgerung: Mediatoren des metabolischen Syndroms lösen Teufelkreises einer immer stärker-werdenden Entzündungsantwort in Makrophagen aus</i>	139
5	Literatur	141
6	Anhang zu 2: Methodenübersicht	156
6.1	<i>Material</i>	156
6.1.1	Tiere und Tierhaltung	156
6.1.2	Biochemikalien	156
6.1.3	Verbrauchsmaterialien	158
6.1.4	Geräte und Software	159
6.1.5	Zellkulturmedien	160
6.1.6	Reinigungs- und Nachweissysteme	160
6.1.7	Enzyme	161
6.1.8	Oligonukleotide	161
6.1.9	Plasmide	162
6.1.10	NF-κB-Reportergenkonstrukt	163
6.1.11	Molekulare Längenstandards	163
6.1.12	Antikörper	163
6.2	<i>Methoden</i>	164
6.2.1	Kultivierung permanenter Zelllinien	164
6.2.2	Isolierung, Reinigung und Kultivierung von humanen Monozyten und Makrophagen	165
6.2.3	Isolierung, Reinigung, Transfektion und Kultivierung von Hepatozyten der Ratte	167
6.2.4	Zellkulturversuche	172
6.2.5	Isolierung von Gesamt-RNA aus permanenten Zelllinien und primären Rattenhepatozyten	176
6.2.6	Isolierung von Gesamt-RNA aus primären humanen Makrophagen	177
6.2.7	Synthese komplementärer DNA (<i>complementary DNA</i> , cDNA)	178
6.2.8	Genexpressionsanalyse mittels <i>quantitative real time polymerase chain reaction</i> (qPCR)	179
6.2.9	Agarosegelelektrophorese	182
6.2.10	Aufarbeitung der Zellkulturversuche für die Western Blot-Analyse	183
6.2.11	Immunologischer Nachweis der Proteinexpression durch Western Blot-Analyse	185

6.2.12	Immunologischer Nachweis der IL-8- bzw. IL-1 β -Proteinexpression durch Sandwich-ELISA	188
6.2.13	Immunologischer Nachweis der Prostaglandin E ₂ -Expression durch Kompetitions-ELISA	190
6.2.14	Immunologischer Nachweis der Insulinexpression durch Sandwich-ELISA	191
6.2.15	Bestimmung von Sphingosin und Sphingosin-1-Phosphat mittels Triple-Quadrupol-Massenspektrometer	192
6.2.16	Luciferase-Reporterassay	193
6.2.17	Auswertung der Daten	195
7	Anhang zu 3: Ergebnisse	196
7.1	<i>Interaktionen</i>	196
7.2	<i>Anhang zu 3.1: Insulin-induzierte Steigerung der basalen und Stimulus-abhängigen Expression pro-inflammatorischer Zytokine in Makrophagen</i>	200
7.3	<i>Anhang zu 3.2: Palmitat-induzierte Steigerung der basalen und Stimulus-abhängigen Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in THP-1-Makrophagen</i>	204
7.4	<i>Anhang zu 3.3: Einfluss von Insulin oder Palmitat auf die Synthese von Prostaglandin E₂ in Makrophagen</i>	207
7.5	<i>Anhang zu 3.4: Prostaglandin E₂-induzierte Steigerung der Stimulus-abhängigen Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in Makrophagen</i>	209
7.6	<i>Darstellung repräsentativer Western Blots in ungeschnittener Form</i>	211
8	Abbildungsverzeichnis	218
9	Tabellenverzeichnis	221
10	Abkürzungsverzeichnis	222
	Redaktionelle Änderungen nach Einreichung	225
	Danksagung	226
	Eidesstattliche Erklärung	227

Zusammenfassung

Insulinresistenz ist ein zentraler Bestandteil des metabolischen Syndroms und trägt maßgeblich zur Ausbildung eines Typ-2-Diabetes bei. Eine mögliche Ursache für die Entstehung von Insulinresistenz ist eine chronische unterschwellige Entzündung, welche ihren Ursprung im Fettgewebe übergewichtiger Personen hat. Eingewanderte Makrophagen produzieren vermehrt pro-inflammatorische Mediatoren, wie Zytokine und Prostaglandine, wodurch die Konzentrationen dieser Substanzen sowohl lokal als auch systemisch erhöht sind. Darüber hinaus weisen übergewichtige Personen einen gestörten Fettsäuremetabolismus und eine erhöhte Darmpermeabilität auf. Ein gesteigerter Flux an freien Fettsäuren vom Fettgewebe in andere Organe führt zu einer lokalen Konzentrationssteigerung in diesen Organen. Eine erhöhte Darmpermeabilität erleichtert das Eindringen von Pathogenen und anderer körperfremder Substanzen in den Körper.

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob hohe Konzentrationen von Insulin, des bakteriellen Bestandteils Lipopolysaccharid (LPS) oder der freien Fettsäure Palmitat eine Entzündungsreaktion in Makrophagen auslösen oder verstärken können und ob diese Entzündungsantwort zur Ausbildung einer Insulinresistenz beitragen kann. Weiterhin sollte untersucht werden, ob Metabolite und Signalsubstanzen, deren Konzentrationen beim metabolischen Syndrom erhöht sind, die Produktion des Prostaglandins (PG) E₂ begünstigen können und ob dieses wiederum die Entzündungsreaktion und seine eigene Produktion in Makrophagen regulieren kann. Um den Einfluss dieser Faktoren auf die Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren in Makrophagen zu untersuchen, wurden die Monozytenartigen Zelllinien U937 und THP-1 in Makrophagen differenziert und 24 Stunden mit Insulin, LPS, Palmitat und/ oder PGE₂ inkubiert. Außerdem wurden primäre humane Monozyten aus dem Blut gesunder Probanden isoliert, in Makrophagen differenziert und analog zu den Zelllinien stimuliert. Überdies wurden primäre Hepatozyten der Ratte isoliert und mit Überständen Insulin-stimulierter U937-Makrophagen inkubiert, um zu untersuchen, ob die Entzündungsantwort in Makrophagen an der Ausbildung einer Insulinresistenz in Hepatozyten beteiligt ist.

Insulin induzierte die Expression pro-inflammatorischer Zytokine in Makrophagen-artigen Zelllinien wahrscheinlich vorrangig über den Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-Akt-Signalweg mit anschließender Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*). Die dabei ausgeschütteten Zytokine hemmten in primären Hepatozyten der Ratte die Insulin-induzierte Expression der Glukokinase durch Überstände Insulin-stimulierter Makrophagen. Daran waren zwei Mechanismen beteiligt: (1) Überstände Insulin-stimulierter Makrophagen verstärkten die Phosphorylierung von STAT (*signal transducer and activator of transcription*) 3 und nachgeschaltet die

mRNA (*messenger ribonucleic acid*)-Expression von SOCS (*supressor of cytokine signaling*) 3. Dieser Supressor kann sich an den aktivierten Insulinrezeptor anlagern und so die Bindung des Adaptermoleküls Insulinrezeptorsubstrat (IRS) verhindern. (2) Überstände Insulin-stimulierter Makrophagen aktivierten die Kinasen ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases 1/2*) und IKK (*inhibitor of nuclear factor- κ B kinase*) β . Diese wiederum vermittelten die inaktiverende Serin-Phosphorylierung des IRS.

Auch LPS oder Palmitat, deren lokale Konzentrationen im Zuge des metabolischen Syndroms erhöht sind, waren in der Lage, die Expression pro-inflammatorischer Zytokine in Makrophagen-artigen Zelllinien zu stimulieren. Während LPS seine Wirkung, laut Literatur, unbestritten über eine Aktivierung des Toll-ähnlichen Rezeptors (*toll-like receptor*, TLR) 4 vermittelt, scheint Palmitat jedoch weitestgehend TLR4-unabhängig wirken zu können. Vielmehr schien die *de novo*-Ceramidsynthese eine entscheidene Rolle zu spielen. Darüber hinaus verstärkte Insulin sowohl die LPS- als auch die Palmitat-induzierte Entzündungsantwort in beiden Zelllinien. Die in U937- und THP-1-Makrophagen gewonnenen Ergebnisse wurden größtenteils in primären humanen Makrophagen bestätigt.

Desweiteren induzierten sowohl Insulin als auch LPS oder Palmitat die Produktion von PGE₂ in den untersuchten Makrophagen. Die Daten legen nahe, dass dies nicht auf die gesteigerte Expression Arachidonsäure-synthetisierender Enzyme zurückzuführen ist, sondern vielmehr auf eine gesteigerte Expression PGE₂-synthetisierender Enzyme.

PGE₂ wiederum hemmte auf der einen Seite die Stimulus-abhängige Expression des pro-inflammatorischen Zytokins Tumornekrosefaktor (TNF) α in U937-Makrophagen. Auf der anderen Seite verstärkte es jedoch die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin- (IL-) 1 β und IL-8. Darüber hinaus verstärkte es die Expression von IL-6-Typ-Zytokinen, welche sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch wirken können. Außerdem verstärkte PGE₂ die Expression PGE₂-synthetisierender Enzyme. Es scheint daher in der Lage zu sein, seine eigene Synthese zu verstärken.

Zusammenfassend kann die Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren aus Makrophagen im Zuge einer Hyperinsulinämie die Entstehung einer Insulinresistenz begünstigen. Insulin ist daher in der Lage, einen Teufelskreis der immer stärker werdenden Insulinresistenz in Gang zu setzen.

Auch Metabolite und Signalsubstanzen, deren Konzentrationen beim metabolischen Syndrom erhöht sind (zum Beispiel LPS, freie Fettsäuren und PGE₂), lösten Entzündungsantworten in Makrophagen aus. Das wechselseitige Zusammenspiel von Insulin und diesen Metaboliten und Signalsubstanzen löste eine stärkere Entzündungsantwort in Makrophagen aus als jeder der Einzelkomponenten. Die dadurch freigesetzten Zytokine könnten zur Manifestation einer Insulinresistenz und des metabolischen Syndroms beitragen.

Abstract

Insulin resistance is a central component of the metabolic syndrome and is a major contributor to the development of type 2 diabetes. One possible cause of insulin resistance is chronic low-grade inflammation, which originates in the adipose tissue of obese individuals. Immigrated macrophages produce increased levels of pro-inflammatory mediators such as cytokines and prostaglandins, resulting in increased concentrations of these substances both locally and systemically. In addition, obese individuals exhibit impaired fatty acid metabolism and increased intestinal permeability. Increased flux of free fatty acids from adipose tissue to other organs results in increased local concentrations in these organs. Increased intestinal permeability facilitates the entry of pathogens and other exogenous substances into the body.

The aim of this work was to investigate whether high concentrations of insulin, the bacterial component lipopolysaccharide (LPS), or the free fatty acid palmitate can induce or enhance an inflammatory response in macrophages and whether this inflammatory response can contribute to the development of insulin resistance. Furthermore, to investigate whether metabolites and signaling substances whose concentrations are elevated in the metabolic syndrome can promote the production of prostaglandin (PG) E₂ and whether this in turn can regulate the inflammatory response and its own production in macrophages. To investigate the influence of these factors on the production of pro-inflammatory mediators in macrophages, monocyte-like cell lines U937 and THP-1 were differentiated into macrophages and incubated for 24 h with insulin, LPS, palmitate and/ or PGE₂. In addition, primary human monocytes were isolated from the blood of healthy volunteers, differentiated into macrophages, and stimulated in a manner analogous to the cell lines. In addition, primary rat hepatocytes were isolated and incubated with supernatants of insulin-stimulated U937 macrophages to investigate whether the inflammatory response in macrophages is involved in the development of insulin resistance in hepatocytes.

Insulin induced the expression of pro-inflammatory cytokines in macrophage-like cell lines probably primarily via the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-Akt pathway with subsequent activation of the transcription factor NF- κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells). The cytokines released in this process inhibited insulin-induced expression of glucokinase by supernatants of insulin-stimulated macrophages in primary rat hepatocytes. Two mechanisms were involved:

(1) Supernatants of insulin-stimulated macrophages enhanced phosphorylation of STAT (signal transducer and activator of transcription) 3 and downstream mRNA (messenger ribonucleic acid) expression of SOCS (suppressor of cytokine signaling) 3. This suppressor can

attach to the activated insulin receptor, preventing binding of the adapter molecule insulin receptor substrate (IRS).

(2) Supernatants of insulin-stimulated macrophages activated the kinases ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1/2) and IKK (inhibitor of nuclear factor- κ B kinase) β . These in turn mediated the inactivating serine phosphorylation of IRS.

Also, LPS or palmitate, whose local concentrations are increased in the course of metabolic syndrome, were able to stimulate the expression of pro-inflammatory cytokines in macrophage-like cell lines. While LPS, according to the literature, undisputedly mediates its effect via activation of toll-like receptor (TLR) 4, palmitate, however, appears to be able to act mainly in a TLR4-independent manner. Rather, *de novo* ceramide synthesis appeared to play a crucial role. Moreover, insulin enhanced both LPS- and palmitate-induced inflammatory responses in both cell lines. The results obtained in U937 and THP-1 macrophages were largely confirmed in primary human macrophages.

Furthermore, both insulin and LPS or palmitate induced PGE₂ production in the macrophages studied. The data suggest that this was not due to increased expression of arachidonic acid-synthesizing enzymes but rather to increased expression of PGE₂-synthesizing enzymes.

On the one hand PGE₂ inhibited the stimulus-dependent expression of the pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor (TNF) α in U937 macrophages. However, on the other hand, it enhanced the expression of the pro-inflammatory cytokines interleukin- (IL-) 1 β and IL-8. In addition, it enhanced the expression of IL-6-type cytokines, which can be both pro- and anti-inflammatory. In addition, PGE₂ enhanced the expression of PGE₂-synthesizing enzymes. It therefore appears to be able to enhance its own synthesis.

In conclusion, the release of pro-inflammatory mediators from macrophages in the course of hyperinsulinemia may favor the development of insulin resistance. Thus, the hyperinsulinemia might be augmented in a vicious cycle feed forward loop.

Metabolites and signaling substances whose concentrations are elevated in the metabolic syndrome (for example, LPS, free fatty acids, and PGE₂) also triggered inflammatory responses in macrophages. The synergistic interaction of insulin and these metabolites and signaling substances triggered a stronger inflammatory response in macrophages than any of the individual components. The released cytokines could contribute to the manifestation of insulin resistance and the metabolic syndrome.

1 Einleitung

1.1 Das metabolische Syndrom

Das metabolische Syndrom wurde erstmals im Jahre 1998 durch die WHO (*World Health Organisation*) definiert [1]. Demnach ist das metabolische Syndrom ein Symptomkomplex, der sich aus einer Insulinresistenz und mindestens zwei weiteren Komponenten, wie Bluthochdruck, erhöhte Triglycerid- und/ oder geringe HDL-Cholesterolkonzentrationen im Blutplasma, abdominale Fettleibigkeit und vermehrte Ausscheidung von Albumin (Mikroalbuminuria), zusammensetzt. Patienten mit diesem Syndrom haben ein stark erhöhtes Risiko, Spätfolgen wie Herzinfarkt, Schlaganfall, Durchblutungsstörungen, Funktionsstörungen der Nieren und Veränderungen der Netzhaut zu erleiden. In der deutschen Bevölkerung liegt die Prävalenz des metabolischen Syndroms bei circa 20 bis 30 % – Tendenz steigend [2, 3]. Neben einer genetischen Veranlagung können auch Lebens- und Ernährungsgewohnheiten, wie zum Beispiel eine hyperkalorische, fett- oder kohlenhydratreiche Ernährung und wenig Bewegung, die Entstehung des metabolischen Syndroms, insbesondere der Insulinresistenz, fördern.

1.1.1 Insulinresistenz

Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe sind die wichtigsten Insulin-sensitiven Organe und maßgeblich am Konstanthalten der Blutglukosekonzentration beteiligt [4]. In der Resorptionsphase wird der größte Anteil an Glukose in den Muskel aufgenommen. Ein Teil der Glukose wird jedoch Insulin-abhängig in Hepatozyten, den Parenchymzellen der Leber, in Form von Glykogen eingespeichert. Bei Nahrungskarenz wird Glukose aus den hepatischen Glykogenspeichern freigesetzt oder durch Gluconeogenese aus Aminosäuren, Lactat und Glycerol neu produziert. Die Leber gewährleistet so ein Konstanthalten der Blutglukosekonzentration während der Postresorptionsphase.

Insulin steigert die Verwertung von Glukose in Skelettmuskel, Fettgewebe und Leber bei Überangebot in der Resorptionsphase und hemmt bei adäquater Versorgung die Glukosefreisetzung aus der Leber in der Postresorptionsphase. Im Falle der Insulinresistenz funktioniert diese Insulin-abhängige Regulation der Glukogeneinspeicherung und Glukosefreisetzung in der Leber nicht mehr adäquat [4]. Die pankreatischen β -Zellen produzieren zunächst mehr Insulin zur Kompensation der Resistenz, wodurch eine Hyperinsulinämie entsteht [5]. Die Blutglukosespiegel bleiben, trotz hoher Insulinspiegel, erhöht. Die Folge der Hyperglykämie ist eine sogenannte Glukotoxizität, die unter anderem zur Zerstörung der Insulin-produzierenden β -Zellen beiträgt [6].

1.1.2 Adipositas

Übergewicht und Adipositas sind definiert als exzessive Fettakkumulation, welche mit einem erhöhten Gesundheitsrisiko assoziiert ist. Als Komorbiditäten gelten, neben den bekannten des metabolischen Syndroms, unter anderem verschiedene Krebsarten (zum Beispiel Leukämie, Speiseröhren-, Kolon-, Leber-, Pankreas-, Gallenblasen- sowie postmenopausaler Brustkrebs) [7–13], eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Infektionen [14], eingeschränkte körperliche Beweglichkeit [15, 16], verminderte geistige Fitness, vor allem im zunehmenden Alter, [15, 17, 18], psychische Erkrankungen (zum Beispiel Depressionen) [19] und eine frühe Sterblichkeit [20]. Als Diagnoseparameter für Übergewicht und Adipositas dient der Body-Mass-Index (BMI; Gewicht in Kilogramm dividiert durch Größe in Meter zum Quadrat). Ein BMI von 25 kg/m^2 und mehr kennzeichnet eine übergewichtige Person. Von einer Adipositas spricht man ab einem BMI von über 30 kg/m^2 [1, 21]. Ein weiterer wichtiger Diagnoseparameter ist die Messung des Verhältnisses zwischen Taillen- und Hüftumfang. Frauen gelten mit einem Taille-Hüft-Verhältnis von über 0,85 und Männer mit einem Taille-Hüft-Verhältnis von über 0,90 als adipös [1]. Hintergrund ist, dass viszerales Fettgewebe, welches sich um innere Organe herum anlagert, sich sowohl morphologisch als auch metabolisch stark vom subkutanen Fettgewebe unterscheidet [22]. So ist das viszerale Fettgewebe zum Beispiel stärker von entzündungsfördernden Immunzellen infiltriert, welche pro-inflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF) α und Interleukin (IL-) 6 freisetzen. Über das Pfortadersystem gelangen diese Zytokine direkt vom viszeralen Fettgewebe in die Leber und beeinflussen dort negativ den Glukose- und Lipidstoffwechsel [22, 23].

1.2 Makrophagen

Makrophagen kommen in allen Geweben des Körpers vor. Sie sind Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Ihre Hauptaufgabe ist die Phagozytose, die Aufnahme und Zersetzung von körperfremden Zellen und Zelltrümmern [24]. Durch Antigenpräsentation und Ausschüttung von Zytokinen sind Makrophagen in der Lage, T-Helferzellen, einen Bestandteil der erworbenen Immunabwehr, zu aktivieren.

Klassisch-aktivierte M1-Makrophagen werden unter anderem durch TNF α , Interferon (IFN) γ , den Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF), intrazelluläre Pathogene oder den bakteriellen Bestandteil Lipopolysaccharid (LPS) aktiviert [25–27]. Als Antwort bilden sie pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine, wie zum Beispiel TNF α , IL-1 β und IL-8, sowie reaktive Stickstoff- und Sauerstoffspezies [26–29]. Dies dient vor allem der Bekämpfung von Pathogenen. Alternativ-aktivierte M2-Makrophagen werden unter anderem durch apoptotische Zellen oder im Zuge einer Stimulation mit IL-4, IL-10 und

IL-13 aktiviert [25–27]. Sie bilden anti-inflammatorische Zytokine und Chemokine, wie zum Beispiel C-C-Chemokinligand (CCL) 22, IL-4 und IL-10, und übernehmen regulatorische und wundheilende Funktionen [26, 28].

Je nach Herkunft wird zwischen residenten und eingewanderten Makrophagen unterschieden. Residente Makrophagen sind hochspezialisierte Gewebsmakrophagen und sind im gesunden Körper in der Regel M2-polarisiert [25]. Zu den residenten Makrophagen gehören unter anderem die Kupffer-Zellen der Leber, Osteoklasten des Knochens, Alveolar-makrophagen der Lunge, Mikrogliazellen des Gehirns, Peritonealmakrophagen und Fettgewebs-assoziierte Makrophagen [24, 25]. Ein großer Teil der residenten Makrophagen bildet sich bereits während der Embryonalentwicklung heraus und hat ihren Ursprung im Dottersack und der fetalen Leber [24, 25]. Gewebsmakrophagen sind langlebig und können sich zum Teil durch Proliferation selbst erneuern [24, 25, 27]. Nur in seltenen Fällen werden Monozyten aus dem Blut rekrutiert, um residente Makrophagen zu ersetzen [25, 27]. Eingewanderte Makrophagen werden im Knochenmark aus Vorläuferzellen gebildet, in den Blutkreislauf abgegeben und im Zuge einer Entzündung in die betroffenen Organe rekrutiert [24]. Dort differenzieren sie vor allem in klassisch-aktivierte Makrophagen und sind an der Immunabwehr beteiligt [26].

Makrophagen weisen eine hohe Flexibilität auf und passen ihren Phänotyp auf die jeweilige Situation im Organismus an. *In vivo* existieren daher zahlreiche intermediär-polarisierte Makrophagen, welche sowohl M1- als auch M2-Marker aufweisen [26, 27].

1.3 Zytokine und Chemokine – Effektorsubstanzen der Makrophagen

Zytokine sind Polypeptide, welche vorrangig von Makrophagen und T-Helferzellen, unter anderem nach Aktivierung von PRR (*pattern recognition receptors*), sezerniert werden [28]. PRR, zu denen unter anderem die Toll-ähnlichen Rezeptoren (*toll-like receptors*; TLR) gehören, sind Rezeptoren des angeborenen Immunsystems [30]. Diese detektieren Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (*pathogen-associated molecular patterns*; PAMPs) und molekulare Muster von schädigenden Substanzen (*damage associated molecular patterns*; DAMPs). Die ausgeschütteten Zytokine dienen der Kommunikation und Interaktion zwischen Zellen und sind an der Steuerung von Differenzierung, Wachstum und Immunantwort beteiligt [28].

Chemokine sind Zytokine mit chemotaktischer Funktion [28, 29]. Zu ihnen zählen zum Beispiel IL-8, auch C-X-C-Chemokin-Motiv-Ligand (CXCL) 8 genannt, und CCL2 [29]. Je nach Wirkung während einer Entzündung können pro-inflammatorische Zytokine und anti-inflammatorische Zytokine unterschieden werden. Als pro-inflammatorische Zytokine gelten zum Beispiel TNF α , IL-1 β , IL-8, IL-12, CCL2 und IFN γ [26, 28, 29] und als anti-inflammatorisch zum Beispiel IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 und CCL22 [26, 28]. Einige Zytokine,

wie zum Beispiel IL-6-Typ-Zytokine und IL-18, können sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch wirken – je nach Zielzelle bzw. Wirkkontext [29, 31, 32].

1.3.1 Tumornekrosefaktor α

TNF α wird vor allem in Zellen des Immunsystems wie Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten und Mastzellen gebildet [29, 33, 34]. Die Expression des TNF α -Gens wird durch Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B (*nuclear factor 'kappa light chain enhancer' of activated B-cells*), Aktivatorprotein 1 (AP-1) und dem Nukleären Faktor aktiverter T-Zellen (NF-AT), induziert [33, 35]. Während der anschließenden Synthese wird humanes TNF α als membrangebundenes Protein produziert. TNF α -konvertierende Enzyme überführen das membrangebundene TNF α durch Abspaltung seiner Ankersequenz in lösliches TNF α [29, 33, 34, 36]. Sowohl membrangebundenes als auch lösliches TNF α sind in der Lage, die TNF-Rezeptoren 1 und 2 zu aktivieren, wobei membrangebundenes TNF α vor allem lokal durch Zell-Zell-Kontakt wirkt [34, 36].

Während der TNF-Rezeptor 1 in nahezu allen Zelltypen und Geweben konstitutiv exprimiert wird, ist die Expression des TNF-Rezeptors 2 eng reguliert und ist auf Endothelzellen, mesenchymale Stammzellen, kardiale Myozyten, einige Nervenzellsubtypen, bestimmte Gliazellen des Zentralnervensystems, Mikrogliazellen, Thymozyten und bestimmte T-Zell-Subpopulationen beschränkt [33, 34]. Im Gegensatz zum TNF-Rezeptor 2 zählt der TNF-Rezeptor 1 zu den Todesrezeptoren, da er eine Todesdomäne, eine konservierte 80 Aminosäuren-lange Sequenz, besitzt [34]. Über diesen Todesrezeptor können sowohl Prozesse in Gang gesetzt werden, die Entzündung und das Überleben der Zelle vorantreiben, als auch Prozesse, die den Zelltod einleiten [34]. Die Entscheidung, ob die Bindung von TNF α an den TNF-Rezeptor 1 zum Überleben oder Tod der Zelle führt, hängt von verschiedensten Signalmolekülen ab und wird durch mehrere intrazelluläre Prozesse beeinflusst [34]. Während die pro-apoptotische Signalkette nur präformierte Signalkettenmoleküle benötigt, beinhaltet die anti-apoptotische Signalkette die Neusynthese von anti-apoptotischen Proteinen und setzt daher eine intakte Transkriptions- und Translationsmaschinerie voraus. Daher löst TNF α in Zellen, in denen Transkription und Translation, zum Beispiel durch eine Infektion mit Viren oder durch metabolischen Stress gestört sind, den Zelltod aus.

Wie der TNF-Rezeptor 1 vermittelt auch der TNF-Rezeptor 2 die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 und kann daher die Produktion pro-inflammatorischer Signale, wie zum Beispiel IL-1 β , IL-6 und IL-8, initiieren [33, 34, 37–40]. Während die TNF-Rezeptor 1-vermittelte Entzündungsantwort jedoch schnell entsteht und in der Regel nur über einen relativ kurzen Zeitraum anhält, entwickelt sich die TNF-Rezeptor 2-vermittelte

Entzündungsantwort langsamer und besteht länger als die TNF-Rezeptor 1-vermittelte Entzündungsantwort [34].

Darüber hinaus existieren neben den membrangebundenen TNF-Rezeptoren 1 und 2 noch lösliche TNF-Rezeptoren [41]. Diese sind sogenannte *decoy*-Rezeptoren, da sie durch Ligandenbindung nicht aktivierbar sind, aber mit den aktivierbaren Rezeptoren um den Liganden kompetieren und somit die Wirkung des Liganden verhindern [41].

1.3.2 Interleukin-1 β

Das pro-inflammatorische Zytokin IL-1 β gehört, wie auch IL-1 α , IL-1-Rezeptor-Antagonist und IL-18, zur IL-1 Familie [29, 42]. Diese Familie wird hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen, aber auch von T-Zellen, B-Zellen, Fibroblasten und Adipozyten sezerniert [29, 40, 42]. Die IL-1 β -Expression wird durch Promotor-Bindung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B reguliert [39, 40]. Während der anschließenden Proteinbiosynthese wird zunächst das inaktive Vorläuferprotein Pro-IL-1 β synthetisiert, welches durch Spaltung aktiviert und sezerniert wird [29, 42]. Dieser Prozess setzt in der Regel zwei Signale voraus. Das erste Signal induziert NF- κ B-abhängig die Synthese von NLRP3 (*NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3*) und Pro-IL-1 β , wohingegen das zweite Signal die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms bewirkt [29]. Letzteres führt zur Spaltung der inaktiven Pro-Caspase 1 in aktive Caspase 1, welche unter anderem Pro-IL-1 β spaltet. Neueste Studien deuten jedoch auf weitere alternative Mechanismen zur Aktivierung von IL-1 β hin. Diese Mechanismen werden mitunter ohne zweiten Stimulus ausgelöst und erfolgen unter Beteiligung alternativer Caspasen, wie der Caspasen 4, 5, 8 und 11 [42, 43]. Anschließend erfolgt die Sekretion des zytosolisch aktivierten Proteins [42].

Durch extrazelluläre Bindung und Aktivierung des IL-1-Rezeptor-Typ 1 übernimmt IL-1 β unter anderem Funktionen in der Regulation von B-Zell-Proliferation, T-Zell-Differenzierung, der Adhäsion von Entzündungszellen an Endothelzellen und spielt so vor allem eine entscheidende Rolle in der Bekämpfung entzündungsauslösender Fremdkörper [29, 32]. Außerdem veranlasst IL-1 β durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B die Expression pro-inflammatorischer Mediatoren [32]. Der lösliche IL-1-Rezeptor-Typ 2 fungiert als *decoy*-Rezeptor und verhindert daher die Wirkung von IL-1 β [29, 41].

1.3.3 Interleukin-18

IL-18, ein Mitglied der IL-1-Familie, wird hauptsächlich in Epithelzellen, Endothelzellen, Dendritischen Zellen, Lymphozyten, Neutrophilen, Natürlichen Killerzellen, Monozyten und Makrophagen produziert [32, 44]. IL-18 wird, wie IL-1 β , zunächst als inaktives Vorläuferprotein gebildet, welches erst durch die Protease Caspase-1 in seine aktive Form gespalten werden muss [29, 32, 42]. Im Gegensatz zu Pro-IL-1 β und den meisten anderen Zytokinen

wird Pro-IL-18 jedoch konstitutiv exprimiert [29, 32]. Eine zusätzliche Steigerung der IL-18-Expression wird unter anderem durch Bindung der Transkriptionsfaktoren IFN-Konsensussequenz-bindendes Protein, NF- κ B und AP-1 ausgelöst [44].

Seine Wirkung entfaltet IL-18 durch Bindung an den heterodimeren IL-18-Rezeptor, wohingegen das lösliche IL-18-Bindeprotein die Wirkung von IL-18 abschwächt [32, 44]. Eine entscheidende Funktion von IL-18 ist die Aktivierung zahlreicher Zelltypen, wie zum Beispiel T-Helferzellen, Makrophagen, Neutrophilen, Endothelzellen, Fibroblasten, Chondrozyten und Keratinozyten [44]. Eine Besonderheit ist, dass IL-18 in der Lage ist, T-Helferzellen sowohl dazu zu veranlassen, in, tendenziell pro-inflammatorisch-wirkende, T-Helferzellen 1 als auch in, tendenziell anti-inflammatorisch-wirkende, T-Helferzellen 2 zu polarisieren – je nach dem mit welchen Zytokinen es zusammen wirkt [44].

1.3.4 Interleukin-6

IL-6 ist Namensgeber der Familie der IL-6-Typ Zytokine, zu der unter anderem auch IL-11, IL-27, IL-31, Leukämie-hemmender Faktor (*leukemia inhibitory factor*; LIF), Oncostatin M (OSM), Cardiotrophin-1, Cardiotrophin-ähnliches Zytokin und Neuropoetin zählen [41]. Es wird hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen, aber auch von zahlreichen Zelltypen, wie zum Beispiel Endothelzellen, Fibroblasten, Hepatozyten und Adipozyten, gebildet [29, 37].

Die IL-6-Genexpression wird über Bindung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP-1, zyklisches Adenosinmonophosphat (*cyclic adenosine monophosphate*; cAMP)-responsives Element-Bindeprotein (CREB) und CCAAT/Verstärker-Bindeprotein (*CCAAT/enhancer-binding-protein*; C/EBP) β im Promotor reguliert [38, 45]. Mit Ausnahme von IL-31 entfalten alle Mitglieder der IL-6-Typ-Zytokin-Familie ihre Wirkung über die Aktivierung der Signaltransduktionseinheit Glykoprotein 130 (gp130) [41]. Daher werden diese Zytokine auch gp130-Zytokine genannt. Humanes IL-6 bindet zunächst an den membrangebundenen IL-6-Rezeptor α [41]. Dieser Komplex assoziiert anschließend mit gp130, was eine gp130-Homodimer-Bildung und Signalweiterleitung zur Folge hat. Interessanterweise exprimieren nur wenige Zelltypen, wie zum Beispiel Makrophagen, neutrophile Granulozyten, einige T-Zellen und Hepatozyten, den membrangebunden IL-6-Rezeptor [41]. Anders als andere lösliche Rezeptoren kann jedoch auch der lösliche IL-6-Rezeptor nach Bindung seines Liganden eine Signalweiterleitung vermitteln, da dieser Komplex in der Lage ist, an die extrazelluläre Domäne von gp130 zu binden [41].

Eines der Hauptaufgaben von IL-6 ist die Induktion der Produktion von Akut-Phase-Proteinen, welche in der Leber gebildet werden [29, 46]. Ein wichtiger Vertreter der Akut-Phase-Proteine ist das C-reaktive Protein (CRP). Es ist unter anderem an der schnellen Beseitigung einer Infektion beteiligt, in dem es Phosphocholine, auf der Oberfläche von

Mikroorganismen vorkommende Polysaccharide, bindet und so die Phagozytose der Pathogene einleitet [46].

Darüber hinaus ist IL-6 an der Differenzierung von B-Zellen und der Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen beteiligt [29, 41]. Auf der anderen Seite übt IL-6 auch eine anti-inflammatorische Wirkung aus, wie zum Beispiel durch Hemmung der Synthese von IL-1 β und TNF α und der Induktion der Synthese von IL-1-Rezeptor-Antagonist [29].

1.3.5 Oncostatin M

Oncostatin M (OSM) gehört zur Gruppe der IL-6-Typ-Zytokine und wird hauptsächlich von aktivierten T-Zellen, Neutrophilen, Eosinophilen und Makrophagen, aber auch von Adipozyten, gebildet [31, 47]. Seine Genexpression wird hauptsächlich durch die Faktoren AP-1, C/EBP- β und STAT (*signal transducer and activator of transcription*) 5 reguliert [48]. Wie auch einige andere gp130-Zytokine bindet OSM an einen heterodimeren Rezeptorkomplex aus LIF-Rezeptor und gp130, welcher dadurch aktiviert wird und die Signaltransduktion einleitet [41]. Darüber hinaus existiert auch ein OSM-spezifischer Rezeptorkomplex. Dieser setzt sich aus OSM-Rezeptor β und gp130 zusammen [41, 47, 49].

Im Menschen reguliert OSM das Wachstum von Tumoren, die Entwicklung von Neuronen und von Hepatozyten und die Blutbildung [31, 50]. Weiterhin spielt es eine entscheidende Rolle im Entzündungsprozess, wobei es sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch wirken kann – je nach Zielzelle und Zusammenspiel mit anderen entzündungsmodulierenden Faktoren [31].

1.3.6 Interleukin-8

Das Zytokin IL-8, auch CXCL8 genannt, wird unter anderem von Fibroblasten, Endothelzellen, Monozyten und Makrophagen nach Infektionen oder Gewebsschädigungen gebildet [29]. Die Bindung des Transkriptionsfaktors NF- κ B an den Promotor ist essenziell für die Expression von IL-8 [38, 51]. In einigen Zelltypen spielen darüber hinaus auch die Transkriptionsfaktoren AP-1 und C/EBP eine Rolle bei der Induktion der IL-8-Genexpression [52]. Seine biologische Wirkung vermittelt IL-8 über die beiden G-Proteingekoppelten Rezeptoren C-X-C-Chemokin-Motiv-Rezeptor 1 und C-X-C-Chemokin-Motiv-Rezeptor 2 [51, 53]. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung und Aktivierung von Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten [51, 53].

1.3.7 C-C-Chemokin-Ligand 2

C-C-Chemokin-Ligand 2 (CCL2), auch MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) genannt, ist ein Vertreter der Gruppe der C-C-Chemokine [29]. Die Transkription des CCL2-Gens wird durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B reguliert [54]. Es wird von vielen Zelltypen, zum Beispiel Monozyten und Makrophagen, gebildet und entfaltet seine chemotaktische Wirkung durch Interaktion mit dem C-C-Chemokin-Motiv-Rezeptor Typ 2 [29, 53]. Seine Hauptaufgabe ist die Rekrutierung und Aktivierung von Monozyten und Lymphozyten aus dem Blut und somit die Initiierung und Ausbreitung einer Entzündungsantwort [53, 55].

1.4 Prostaglandin E₂

Der Lipidmediator Prostaglandin (PG) E₂ gehört zur Gruppe der Prostanoiden [56]. Diese Gruppe beinhaltet weiterhin PGF₂ α , PGD₂, PGI₂ und Thromboxan A₂ und ist eine Untergruppe der Eicosanoide [56]. PGE₂ wird unter anderem in Makrophagen, Fibroblasten und Epithelzellen als Antwort auf den Kontakt mit Entzündungsauslösern, wie zum Beispiel Endotoxinen, oder Gewebsschädigungen gebildet [57, 58]. Es übernimmt wichtige regulatorische Funktionen in den Prozessen der Zellproliferation, Apoptose, Angiogenese und Immunantwort [56] und übt aufgrund seiner *in vivo* kurzen Halbwertszeit vor allem parakrine und autokrine Wirkungen aus [58–60].

1.4.1 Arachidonsäure- und Prostaglandin E₂-Synthese

Das Ausgangsubstrat für die Synthese von PGE₂ ist Arachidonsäure [56, 61]. Diese Fettsäure besteht aus einer 20 Kohlenstoffatom-langen Kette, welche vier Doppelbindungen aufweist [61, 62]. Die erste Doppelbindung ist zwischen dem sechsten und siebten Kohlenstoffatom ausgehend vom Methylende lokalisiert, weswegen sie als ω 6-Fettsäure bezeichnet wird [62, 63]. Arachidonsäure wird vom Menschen über Nahrungsmittel, wie zum Beispiel Fisch, Meeresfrüchte, Fleisch, Innereien und Ei, aufgenommen [62]. Sie kann jedoch auch aus der Fettsäure Linolsäure gebildet werden [62]. Da Linolsäure eine essenzielle Fettsäure ist, das heißt vom menschlichen Körper nicht synthetisiert werden kann, muss diese dem Körper vor allem über den Verzehr pflanzlicher Öle zugeführt werden [62]. Die Bildung von Arachidonsäure beginnt mit der Oxidation der Linolsäure durch die Fettsäure-desaturase (*fatty acid desaturase*; FADS) 2 [63]. Diese wird auch als Δ 6-Desaturase bezeichnet, da sie in die Kohlenstoffkette eine Doppelbindung einfügt, welche an der sechsten Stelle, von der Carboxylgruppe aus gerechnet, lokalisiert ist [63]. Anschließend findet die Kettenverlängerung der entstandenen γ -Linolensäure zur Dihomo- γ -Linolensäure statt [62]. Dieser Schritt wird durch das Enzym, welches durch das *ELOVL5* (*elongation of very long chain fatty acids protein 5*)-Gen kodiert wird, katalysiert und ist geschwindigkeitsbe-

stimmend im Prozess der Arachidonsäure-Bildung [63]. Abschließend findet die Oxidation der Dihomo- γ -Linolensäure durch FADS1, welche auch Δ 5-Desaturase genannt wird, statt [63]. Arachidonsäure wird anschließend in der Regel in Phospholipide eingebaut, welche Bestandteil von Zellmembranen sind [62].

Die PGE₂-Synthese wird durch Abspaltung der Arachidonsäure aus Membranlipiden eingeleitet [56, 57, 61]. Dabei gilt die zytosolische Phospholipase A2 als Schlüsselenzym und wird unter anderem durch Zytokine wie IL-1, TNF α und IFN γ verstärkt synthetisiert und aktiviert [59, 60]. Die frei gewordene Arachidonsäure wird anschließend am Endoplasmatischen Retikulum durch Cyclooxygenase-Enzyme (COX-Enzyme), welche sowohl COX- als auch Peroxydase-Reaktionen katalysieren, in PGH₂ umgewandelt [56, 60, 61]. Es existieren zwei COX-Isoformen. Während COX1 konstitutiv aktiv exprimiert ist, wird COX2 in den meisten Zelltypen basal nur in geringem Umfang gebildet und kann durch pro-inflammatorische und mitogene Stimuli induziert [30, 56, 64–68], aber auch durch Insulin reprimiert werden [69]. Die Umwandlung von PGH₂ in PGE₂ kann durch die mikrosomale PGE-Synthase (mPGES) 1, mPGES2 oder die zytosolische PGE-Synthase (*cytosolic PGE synthase*; cPGES) erfolgen [61]. Die Enzyme mPGES2 und cPGES sind funktionell eng verbunden mit COX1 und ebenfalls konstitutiv exprimiert und aktiviert [61]. Wie der COX2-Gehalt ist auch der basale Gehalt von mPGES1 in den meisten Zelltypen sehr gering, kann aber durch verschiedene pro-inflammatorische Stimuli induziert werden [56, 70–73]. Darüber hinaus könnte PGE₂ selbst in der Lage sein, die Expression und Aktivität von COX2 und mPGES1 zu induzieren und somit seine eigene Synthese weiter zu verstärken [74–80]. Im Widerspruch dazu wiesen andere Studien jedoch eine durch PGE₂-Stimulation verminderte COX2-Expression und -aktivität nach, was eher einen negativen Rückkopplungsmechanismus vermuten lässt [81].

Das entstandene PGE₂ kann sowohl passiv durch die Plasmamembran hindurchdiffundieren als auch aktiv mittels Transporter MRP4 (*multidrug resistance protein 4*) aus der Zelle geschleust werden [61]. MRP4 gehört zur Gruppe der Transporter mit Adenosintriphosphatbindender Kassette (*adenosin triphosphate-binding cassette transporter*; ABC-Transporter) [82]. Neben Prostaglandinen kann MRP4 zum Beispiel auch Glucuronide, Steroide, Gallensäuren, zyklische Nukleotide und Folate transportieren [82–84].

1.4.2 Prostaglandin E₂-Rezeptoren

PGE₂ entfacht seine Wirkung durch die Bindung an einen seiner vier Transmembranrezeptoren EP1-EP4 [56–58, 85]. Diese interagieren mit spezifischen G-Proteinen, welche anschließend intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren [56–58, 85].

Der EP1-Rezeptor ist wahrscheinlich G_q-gekoppelt und bewirkt die Aktivierung der Phospholipase C, welche Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂) in die sekundären Botenstoffe Inositol-Trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) umwandelt [61, 85]. Dies führt zur Aktivierung der Proteinkinase C und einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration und als Folge unter anderem zur Aktivierung von NF-κB- oder Mitogenaktiviertes Protein (MAP)-Kinase-Signalwegen [57, 85].

Die Rezeptoren EP2 und EP4 sind an ein G_s-Protein gekoppelt und aktivieren die Adenylatzyklase, welche Adenosintriphosphat (ATP) spaltet [57, 58, 61, 85, 86]. Das produzierte cAMP aktiviert unter anderem die Proteinkinase A, welche Transkriptionsfaktoren wie CREB phosphoryliert und aktiviert [58, 85]. Dem EP4-Rezeptor ist außerdem ein Signalweg nachgeschaltet, welcher den Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-Signalweg aktiviert [85, 86].

Bisher sind acht verschiedene humane Isoformen des EP3-Rezeptors bekannt (EP3-I, EP3-II, EP3-III, EP3-IV, EP3-V, EP3-VI, EP3-e und EP3-f) [87]. Diese entstehen durch alternatives Spleißen der mRNA (*messenger ribonucleic acid*). Die Isoformen weisen eine identische Struktur der Transmembranhelices auf, unterscheiden sich jedoch in der Struktur der C-terminalen Domäne [87]. Es wird vermutet, dass die Strukturunterschiede einen Einfluss auf die Bindung verschiedener G-Proteine, die Agonist-abhängige Desensitierung und die konstitutive Aktivität der Rezeptoren haben [87].

1.4.3 Prostaglandin E₂ und Entzündung

Die Wirkungsweise von PGE₂ kann je nach Zelltyp, den darauf exprimierten EP-Rezeptor-Subtypen und dem metabolischen Kontext stark variieren. So ist zum Beispiel die Bindung von PGE₂ an EP1-Rezeptoren, welche auf sensorischen Neuronen lokalisiert sind, mitverantwortlich an der Ausprägung des Schmerzempfindens während einer akuten Entzündung [61, 88]. Auch an der Ausprägung von Rötung und Schwellung ist PGE₂ beteiligt [61]. Es sorgt für eine Weitstellung der Arterien und einen dadurch gesteigerten Blutfluss [58, 61]. Damit geht auch die Einwanderung von Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten, Dendritischen Zellen, Makrophagen, Mastzellen und anderen immunwirksamen Zellen in entzündetes Gewebe einher [56, 58]. Diese werden von PGE₂ auf unterschiedlichste Weise reguliert. Unreife Dendritische Zellen in peripheren Geweben scheinen EP2- und EP4-Rezeptor-vermittelt aktiviert zu werden [57, 89, 90]. Diese wandern daraufhin in lymphatische Organe und stimulieren dort durch Antigenpräsentation die

Reifung von T-Zellen [89, 90]. PGE₂ selbst induziert in Dendritischen Zellen auch die Expression von Kostimulanzen für die T-Zell-Proliferation [91]. Im Gegensatz dazu bewirkt PGE₂ in den lymphatischen Organen eine Inhibierung der Reifung und Antigenpräsentation Dendritischer Zellen [57]. Außerdem hemmt PGE₂ in Dendritischen Zellen die Produktion von IL-12, CCL2 und CCL19, welche zentrale Rollen bei der Rekrutierung und Ausdifferenzierung von T-Zellen einnehmen [57, 58, 92]. Desweiteren reguliert PGE₂ auch die Ausprägung der reifen T-Zellsubtypen. Es wurde beobachtet, dass PGE₂ die IL-23-vermittelte Ausbreitung von T-Helferzellen 17 verstärkte [56, 58, 61, 93]. Diese bilden vor allem das Zytokin IL-17A [94]. Mitglieder der IL-17-Familie können durch die Aktivierung von NF-κB-, MAP-Kinase- und C/EBP-abhängigen Signalwegen unter anderem pro-inflammatorische Funktionen ausüben [94]. Weiterhin ist bekannt, dass PGE₂ das Verhältnis von T-Helferzellen 1 und T-Helferzellen 2 beeinflusst. Während T-Helferzellen 1 durch die Stimulation der Produktion von IFN γ und TNF α vorrangig pro-inflammatorisch wirken, verstärken T-Helferzellen 2 vor allem die Bildung der anti-inflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-13 [56]. Auf der einen Seite stimuliert PGE₂ EP4-Rezeptor-vermittelt die IL-12-Produktion reifer T-Helferzellen und die daraus folgende Differenzierung in T-Helferzellen 1 [93]. Auf der anderen Seite wurde berichtet, dass PGE₂ die Ausschüttung T-Helferzellen 1-typischer Zytokine hemmt [56–58].

Der Einfluss von PGE₂ auf die Ausschüttung pro- und anti-inflammatorischer Mediatoren in Monozyten und Makrophagen wird kontrovers diskutiert. Einerseits wurde berichtet, dass PGE₂ in der Lage ist, die Sekretion der Chemokine IL-8 [95, 96] und CCL2 [96] aus Makrophagen zu vermindern und die M2-Polarisierung in Makrophagen zu begünstigen [97]. Damit einhergehend wurde die Bildung von IFN γ [98], IFN γ -induziertes Protein 10 [96], IL-12 [99] und pro-inflammatorischen Mitgliedern der IL-1-Familie [96, 100–103] gehemmt. Außerdem wurde in zahlreichen Makrophagen-Zellkulturmodellen die Hemmung der LPS-induzierten TNF α -Synthese durch PGE₂ mittels EP2- und EP4-Rezeptor beschrieben [98–100, 102, 104–111]. Zusätzlich verstärkte PGE₂ die Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 [100, 109, 112, 113]. Andererseits wurde auch eine Verstärkung pro-inflammatorischer Mediatoren in Makrophagen beschrieben. So war PGE₂, im Widerspruch zu den oben genannten Publikationen, in der Lage, die Produktion von IL-1 β [110] und IL-8 [114] in Monozyten und Makrophagen zu steigern.

PGE₂ kann demzufolge auf mehreren Ebenen in das Entzündungsgeschehen eingreifen und dieses kontextabhängig sowohl weiter vorantreiben als auch an dessen Auflösung beteiligt sein.

1.5 Das weiße Fettgewebe

1.5.1 Physiologische Funktion des weißen Fettgewebes

Das weiße Fettgewebe (*white adipose tissue*; WAT) ist ein heterogenes Zellsystem, bestehend unter anderem aus Adipozyten, Präadipozyten, Fibroblasten, Immunzellen und kapillarbildenden Endothelzellen [22, 115]. Adipozyten machen den größten Anteil am Fettgewebe aus [115]. Ihre Hauptaufgabe ist die Energieeinspeicherung nach Nahrungsaufnahme und die Freisetzung der Energie bei Nahrungskarenz [22, 115, 116].

Auf der Oberfläche der Kapillarendothelzellen katalysiert das Enzym Lipoproteinlipase, deren Genexpression durch Insulin induziert wird, den Abbau von Plasma-Lipoproteinen aus der Nahrung in Glycerol und Fettsäuren [117]. Nach Transport in die Adipozyten findet die TAG-Synthese statt. Dafür werden Fettsäuren, durch Kopplung an Coenzym A (CoA), in aktives Acyl-CoA umgewandelt. Durch die Nahrung aufgenommene Glukose reagiert in einem Seitenweg der Glykolyse zu α -Glycerophosphat [116]. Letzteres wird durch das Enzym Glycerolphosphat-Acyltransferase, welches Insulin-abhängig aktiviert wird, in Lysophosphatidsäure umgewandelt [116, 117]. Anschließend reagieren Acyl-CoA und Lysophosphatidsäure Lysophosphatidat-Acyltransferase-vermittelt zu CoA und Phosphatidsäure [116]. Letzteres wird durch Phosphatidphosphorylase zu DAG umgewandelt. DAG und ein weiteres Fettsäure-CoA reagieren nun Diacylglycerol-Acyltransferase-vermittelt zu Triacylglycerid (TAG), welches in den proteinummantelten Lipiddroplets der Adipozyten gespeichert wird [116].

Im Falle eines Energiebedarfs können die gespeicherten TAG schnell gespalten, die daraus resultierenden Fettsäuren zu anderen Organen und Geweben transportiert werden und dort als Energiequelle genutzt werden. Am Abbau von TAG aus dem Fettgewebe sind die Enzyme Adipozyten-Triglycerid-Lipase, Hormon-sensitive Lipase und Monoglycerid-Lipase beteiligt [115]. Das Hormon Adrenalin stimuliert die Lipolyse durch Bindung und Aktivierung eines G_s -Protein-gekoppelten Rezeptors [115]. Der dadurch ausgelöste Konzentrationsanstieg an cAMP löst Prozesse aus, an deren Ende die Hormon-sensitive Lipase aktiviert wird [115]. Insulin wiederum hemmt die Lipolyse durch Aktivierung von Phosphodiesterase und Proteinphosphatasen, welche das Signalmolekül cAMP abbauen und die inaktivierende Dephosphorylierung der Hormon-sensitiven Lipase vermitteln [4, 115]. Bei einer Insulinresistenz ist der Mechanismus der Insulin-vermittelten Hemmung der Lipolyse gestört. Infolgedessen werden vermehrt Fettsäuren freigesetzt.

Neben einer Speicherfunktion erfüllt das WAT durch Ausschüttung von Hormonen, wie Adiponektin, Leptin und Resistin, und Zytokinen auch endokrine Funktionen [22]. Diese Adipokine wirken auf Organe, das Nervensystem und das Gehirn ein und beeinflussen

unter anderem das Hungergefühl und die Energieaufnahme, den Glukose- und Lipidstoffwechsel und das Immunsystem [22, 116].

1.5.2 Entzündung des weißen Fettgewebes

Bei einem langfristigen Überangebot an Energie kommt es zu einer Vergrößerung der Adipozyten (Hyperthrophie) und zur Differenzierung der Präadipozyten in reife Adipozyten, was eine gesteigerte Anzahl reifer Adipozyten zur Folge hat (Hyperplasie) [116]. Als Konsequenz der Hypertrophie ist die Versorgung der vergrößerten Adipozyten über die Kapillare vermindert. In Folge entsteht eine Mangelversorgung mit Sauerstoff (Hypoxie) [118]. Diese führt zur Störung der metabolischen Funktion des WAT, welches daraufhin vermehrt pro-inflammatorische Faktoren wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 ausschüttet [119–121]. Gleichzeitig werden vermehrt chemoattraktive Substanzen wie IL-8 und CCL2 ausgeschüttet, was eine Infiltration des Fettgewebes mit Monozyten und Makrophagen auslöst [120, 122–124]. Diese polarisieren in M1-Makrophagen, lagern sich vermehrt in der Nähe hypertropher Adipozyten an und bilden sogenannte *crown-like structures*, kronenartige Gebilde um die Adipozyten herum [125]. Diese eingewanderten Makrophagen produzieren zusätzlich pro-inflammatorische Mediatoren. Es entsteht der Zustand einer chronischen unterschweligen Entzündung, welche ihren Ursprung im WAT übergewichtiger Personen hat.

Hinzu kommt, dass Adiponektin, dessen Serumkonzentration im Zuge einer Adipositas reduziert ist [120, 126, 127], in Makrophagen die Produktion der anti-inflammatorischen Mediatoren IL-1-Rezeptor-Antagonist und IL-10 stimuliert und die LPS-induzierte Synthese der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, TNF α und IFN γ reprimiert [128–131]. Die verminderte Adiponektin-Ausschüttung im Fettgewebe übergewichtiger Personen fördert daher das pro-inflammatorische Potential der eingewanderten Makrophagen zusätzlich.

Wenn selbst die durch Hypertrophie und Hyperplasie gesteigerte Speicherkapazität des Fettgewebes überschritten ist, gehen die an ihrer Leistungsgrenze arbeitenden Adipozyten in einen pyroptotischen Zelltod [125]. Die abgestorbenen Zellen locken weitere Makrophagen an, wodurch eine Entzündung manifestiert wird [125]. Gleichzeitig lässt die überschüssige Energie die Konzentration der freien Fettsäuren im Plasma ansteigen und ektope Fettablagerungen, zum Beispiel in Leber, (Herz-)Muskel und Pankreas, entstehen [116, 125, 132] Aufgrund der Lipotoxizität werden in den Insulin-sensitiven Organen zahlreiche Funktionen gestört, was unter anderem die Entstehung einer Insulinresistenz begünstigt.

1.6 Freie Fettsäuren

1.6.1 Struktur und Vorkommen von freien Fettsäuren

Aliphatische Monocarbonsäuren, auch als Fettsäuren bezeichnet, werden je nach Struktur in gesättigte, einfach ungesättigte und mehrfach ungesättigte Fettsäuren eingeteilt. Gesättigte Fettsäuren zeichnen sich dadurch aus, dass deren Kohlenstoffatome alle durch Einfachbindungen miteinander verbunden sind. Palmitin- und Stearinsäure, beziehungsweise deren Salze und Ester Palmitat und Stearat, sind die am häufigsten im menschlichen Körper vorkommenden gesättigten Fettsäuren [133]. Diese Fettsäuren können sowohl über, hauptsächlich tierische, Lebensmittel aufgenommen werden, als auch endogen synthetisiert werden. Ungesättigte Fettsäuren enthalten Kohlenstoffatome die teilweise über Doppelbindungen miteinander verknüpft sind. Während einfach ungesättigte Fettsäuren vor allem in Pflanzenölen vorhanden sind, beinhalten Fischöle und einige Pflanzenöle einen hohen Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Alpha-Linolensäure und Linolsäure gehören zu den mehrfach ungesättigten Fettsäuren und gelten als essenzielle Fettsäuren, da sie vom Körper nicht selbst gebildet werden können und demzufolge zwingend über die Nahrung aufgenommen werden müssen.

Im menschlichen Körper kommen Fettsäuren vor allem in veresterter Form, den TAG, vor. Freie Fettsäuren werden in der Regel an Proteine gebunden, da ungebundene Fettsäuren zelltoxisch wirken.

1.6.2 Molekularer Mechanismus der direkten pro-inflammatorischen Wirkung von freien Fettsäuren

Es ist bekannt, dass der Gehalt an freien Fettsäuren im Plasma übergewichtiger Personen erhöht ist [55]. Ein Grund hierfür ist die vermehrte Freisetzung der Fettsäuren aus insulinresistenten Adipozyten, in denen die Insulin-abhängige Lipolyse gestört ist. Gesättigte Fettsäuren im Plasma scheinen an der Ausbildung einer unterschweligen, chronischen Entzündung beteiligt zu sein. In Monozyten- und Makrophagenzellkulturmodellen stimulierten gesättigte Fettsäuren wie Palmitat, im Gegensatz zu ungesättigten Fettsäuren, die mRNA-Expression und Proteinproduktion der pro-inflammatorischen Zytokine TNF α [30, 35, 134–142], IL-1 β [136, 142–145], IL-6 [135, 138–140, 142], IL-8 [136, 137, 139, 146, 147] und CCL2 [142, 146, 147]. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch noch unzureichend erforscht. Es wird vermutet, dass die Aktivierung des TLR4, welcher vor allem für die Bindung des bakteriellen LPS bekannt ist [148, 149], bei der Wirkung von freien Fettsäuren eine entscheidende Rolle spielt [64, 136, 140, 146, 150].

TLR sind Transmembranproteine, welche zum angeborenen Immunsystem gehören und an der Auslösung einer unspezifischen Immunantwort beteiligt sind [148, 151]. Neben den gesättigten Fettsäuren Laurin- und Myristin- ist Palmitinsäure ein essenzieller Bestandteil

des Lipids A, dem Endotoxin-wirksamen Strukturelement im LPS [64]. Es wurde gezeigt, dass die Abtrennung der gesättigten Fettsäuren oder der Austausch der gesättigten Fettsäuren gegen einfach oder mehrfach ungesättigte Fettsäuren die pro-inflammatorische Aktivität des LPS hemmte [64, 148].

LPS bildet zunächst einen Komplex mit LPS-Bindeprotein, bevor es an das Rezeptorprotein CD (*cluster of differentiation*) 14, welches in der Plasmamembran von Immunzellen lokalisiert ist, bindet [152, 153]. Dieses aktiviert den Komplex aus TLR4 und Korezeptor MD-2 (*myeloid differentiation factor 2*), welcher zwei unterschiedliche Signalwege aktivieren kann: den Myd88- (*myeloid differentiation primary response gene 88*)-abhängigen und den *Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor protein inducing interferon β* (TRIF)-abhängigen Signalweg [149, 154].

Im Myd88-abhängigen Signalweg binden nach Rezeptoraktivierung zunächst Toll/IL-1-Rezeptor-Domäne-enthaltende Adapterproteine, wie zum Beispiel Myd88 und TIRAP (*Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor protein*), an den TLR4 [152, 154, 155]. Dies führt zur Rekrutierung von Mitgliedern der IL-1-Rezeptor-assoziierten Kinasen (IRAK) [149, 152, 154, 155]. Nach aktiverender Phosphorylierung binden IRAK den TNF-Rezeptor-assoziierten Faktor 6, welcher mit TAK1 (*transforming growth factor β -activated kinase 1*) und weiteren Adaptermolekülen assoziiert [152, 154, 155]. Aktiviertes TAK1 induziert Signalkaskaden zur Aktivierung der Transkriptionfaktoren NF- κ B, AP-1, Elk1 (*ETS-like protein 1*) und Interferon-regulierender Faktor (IRF) 5 [149, 151, 152, 154]. Daraus resultiert unter anderem die Transkription pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-8 und TNF α [149, 151, 152, 155] und die Transkription des PGE₂-synthetisierenden Enzyms COX2 [151].

Im TRIF-abhängigen Signalweg, auch Myd88-unabhängiger Signalweg genannt, binden die Adapterproteine TRIF und TRIF-verwandtes Adaptermolekül (*TRIF-related adaptor molecule*; TRAM) an den TLR [149, 151, 154, 155]. Anschließend aktivieren sie Kinasen, welche die aktivierende Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors IRF3 katalysiert [149, 154, 155]. Dies resultiert in der Synthese von IFN- β [151, 154, 155]. Auch NF- κ B, AP-1 und das Interferon-sensitive responsive Element (ISRE) kann über den TRIF-abhängigen Signalweg aktiviert werden [149, 151, 154, 155].

1.7 Sphingolipide

1.7.1 Synthese von Sphingolipiden

Sphingolipide sind durch ihren Grundbaustein Sphingosin, einem aus 18 C-Atomen bestehenden Aminoalkohol, gekennzeichnet [156, 157]. Sie sind wichtige Bestandteile biologischer Membranen. Außerdem übernehmen sie unter anderem durch die Isolation von Nervenzellen und der Modulation zellulärer Prozesse wie Zelltod, Autophagie, Entzündung und Insulinsensitivität wichtige Funktionen [133, 156].

Die unzähligen verschiedenen Sphingolipide entstehen durch den Um- bzw. Abbau komplexer Sphingolipide oder der *de novo*-Synthese [132]. Die Synthese der Sphingolipide beginnt in der Regel im Endoplasmatischen Retikulum [156, 157]. Dort wird der initiale Reaktionsschritt, die Bildung von 3-Ketodihydrosphingosin aus in der Regel Serine und Palmitoyl-CoA, durch das Enzym Serin-Palmitoyltransferase katalysiert. Das aktive Enzym scheint dabei ein Heterodimer aus den Isoformen Serin-Palmitoyltransferase 1, 2 und 3 zu sein [156, 158, 159].

Im nächsten Schritt katalysiert das Enzym 3-Ketoreduktase die Bildung von Dihydrosphingosin [156, 157]. Letzteres wiederum kann durch verschiedene Ceramidsynthasen acetyliert werden. Bis dato sind sechs verschiedene Isoformen dieses Enzyms bekannt (Ceramidsynthase 1-Ceramidsynthase 6) [156]. Diese unterscheiden sich unter anderem in ihrer Präferenz für bestimmte Acetylierungsstellen und tragen daher maßgeblich zur Vielfalt der produzierten Sphingolipide bei. Im weiteren Schritt findet das Einfügen einer Doppelbindung durch Desaturasen und die Bildung von Ceramiden statt [156, 157]. Während die Dihydroceramid-Desaturase 1 vor allem in peripheren Geweben zu finden ist, beschränkt sich das Vorkommen der Dihydroceramid-Desaturase 2 vor allem auf die Nieren und den Darm [158].

Die hydrophoben und membrangebundenen Ceramide werden entweder durch vesikulären Transport oder durch das Ceramid-Transferprotein zum Bestimmungsort transportiert [156]. Sie dienen als Ausgangssubstrat für die Bildung aller weiteren Sphingolipide. Die Deacetylierung von Ceramiden wird durch Ceramidasen katalysiert [27, 156–158]. Die so entstandenen Sphingosine werden durch Phosphorylierung in das Signalmolekül Sphingosin-1-Phosphat (S1P) umgewandelt. Neben Ceramiden und S1P zählt auch Ceramid-1-Phosphat (C1P), welches mittels Ceramid-Kinase gebildet wird, zu den einfachen Sphingolipiden. Die komplexen Sphingolipide werden im Golgi-Apparat gebildet und in Sphingomyeline, welche eine Phosphocholin-Gruppe aufweisen, und Glykosphingolipide eingeteilt [157, 158]. Letztere lassen sich, je nach glykosidisch gebundenen Kohlenhydratrest, weiterhin unterteilen, zum Beispiel in Galaktosphingolipide, Glucosphingolipide und Lactosphingolipide.

Die Synthese von einfachen und komplexen Sphingolipiden wird auf mehreren Ebenen reguliert. Palmitat fungiert zum einen als Ausgangssubstrat für die Ceramidsynthese und reguliert somit maßgeblich die Syntheserate [158]. Darüber hinaus legt eine Studie nahe, dass es diesen Prozess auch über TLR4-vermittelte Signalkaskaden, welche in einer gesteigerten Synthese von Serin-Palmitoyltransferase und Ceramidsynthese resultiert, induziert [134]. Ceramide wiederum inhibieren den Prozess der Ceramidsynthese in einer negativen Rückkopplungsschleife [157]. Die Umwandlung der Ceramide in S1P wird durch Sphingosin-Kinasen katalysiert. Die mRNA-Expressionen der Sphingosin-Kinasen werden unter anderem durch Bindung der Transkriptionsfaktoren HIF (*hypoxia-inducible factor*) 1 und HIF2, welche bei Hypoxie aktiviert werden, reguliert. Das Enzym Sphingosin-Kinase wird durch Phosphorylierung aktiviert und durch Dephosphorylierung inaktiviert [157]. S1P wiederum kann Ceramidsynthasen binden, diese inhibieren und somit die Ceramidsynthese hemmen [156].

Desweiteren sind auch pro-inflammatorische Zytokine in der Lage, die *de novo*-Ceramidsynthese und den Um- bzw. Abbau komplexer Sphingolipide zu regulieren. TNF α zum Beispiel verstärkt die *de novo*-Synthese von Ceramiden und die Produktion von Gangliosiden, welche zur Gruppe der Glykosphingolipide gehören [158]. Darüber hinaus aktiviert TNF α Sphingomyelinasen und begünstigt somit den Umbau von Sphingomyelinen in Ceramide [158]. Auch IL-1 β fördert die Bildung von Ceramiden [158].

1.7.2 Molekularer Mechanismus der pro-inflammatorischen Wirkung von Sphingolipiden

Als Signalmoleküle fungieren vor allem die einfachen Sphingolipide, wie Ceramide, C1P und S1P [156, 157]. Ceramide sind an der Stimulation der Genexpression von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF α und IL-1 β beteiligt, in dem sie die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) aktivieren, welche wiederum den Transkriptionsfaktor AP-1 aktivieren [136]. C1P ist an der Aktivierung der zytosolischen Phospholipase A2, dem Schlüsselenzym der PGE₂-Synthese, beteiligt [157].

S1P ist, im Gegensatz zu Ceramiden und C1P, nicht membrangebunden und im Plasma an Lipoproteinen oder Albumin gebunden [27, 156]. ABC-Transporter oder ein spezifischer S1P-Transporter ermöglichen den Transport über biologische Membranen hinweg [27]. Extrazellulär bindet S1P an einen seiner fünf G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (S1PR1-S1PR5) [27, 157]. Jeder von ihnen weist zellart-spezifische Expressionen auf und vermittelt unterschiedliche nachgeschaltete Signalkaskaden. Makrophagen exprimieren alle fünf S1PR. Der G_i-gekoppelte S1PR1 vermittelt nachgeschaltete Signalwege, die zur Aktivierung der Proteinkinase B führen. Im Gegensatz dazu vermittelt der S1PR2, welcher an G_i, G_q oder G_{12/13} gekoppelt sein kann, nachgeschaltete Signalwege, die zur Inhibierung

der Proteinkinase B führen [27]. Für Lymphozyten ist S1PR1 unter anderem für die Migration vom Lymphsystem in den Blutkreislauf relevant [157]. S1P wird von Blut- und endothelialen Zellen ins Plasma abgegeben und fungiert dabei als chemotaktisches Signal für Lymphozyten.

Neben der extrazellulären Bindung an seine Rezeptoren kann S1P auch als intrazelluläres Signalmolekül wirken. So kann es an Histon-Deacetylasen binden, wodurch deren Aktivität inhibiert wird [157]. Die Folge ist eine Öffnung der DNA-Doppelhelixstruktur, wodurch die Bindung von Transkriptionsfaktoren und die Genexpression begünstigt wird. Auch die Hemmung der Ceramidsynthase 2 durch S1P ist in seiner intrazellulären Wirkung begründet [156].

S1P kann extrazellulär durch die Lipidphosphatasen LPP1-3 und intrazellulär durch S1P-spezifische Phosphatasen dephosphoryliert und inhibiert werden [156]. Der endgültige Abbau von S1P in Hexadecenal und Phosphoethanolamin findet am Endoplasmatischen Retikulum statt und wird durch die S1P-Lyase katalysiert.

1.8 Insulin

1.8.1 Physiologische Funktion von Insulin

Insulin ist ein Peptidhormon, das in den pankreatischen β -Zellen zunächst als Prohormon synthetisiert, im Endoplasmatischen Retikulum gespalten und anschließend in Sekretgranula gespeichert wird [5]. Es wird als Antwort auf die Erhöhung der Blutglukosekonzentration in der Resorptionsphase ausgeschüttet [5]. Zusammen mit seinem Gegenspieler Glukagon reguliert Insulin die Glukosehomöostase im Blut [160]. Insulin erhöht die Glukoseaufnahme in Muskel- und Fettgewebe, in dem es die Translokation des Glukosetransporters Glut4 stimuliert [4, 5, 117]. In Hepatozyten, den Parenchymzellen der Leber, wird Glukose Insulin-unabhängig über den Glukosetransporter Glut2 aufgenommen [5]. Insulin steigert in diesen Zellen jedoch die Genexpression des Enzyms Glukokinase, einem wichtigen geschwindigkeitskontrollierenden Enzym der Glykogensynthese, und aktiviert das Enzym Glykogen-Synthase [5, 160]. Es begünstigt somit die Einspeicherung von Kohlenhydraten in Form von Glykogen. Gleichzeitig hemmt es die Glykogenolyse und Gluconeogenese in der Leber [4, 5, 117].

Insulin trägt jedoch nicht nur zur Blutglukosehomöostase bei, sondern begünstigt auch die Einspeicherung von TAG in Adipozyten und wirkt anti-lipolytisch (vgl. 1.5.1). Weiterhin fördert Insulin Zellwachstum und Zelldifferenzierung sowie die Proteinsynthese und hemmt Apoptose und den Proteinabbau [5, 161, 162].

1.8.2 Die Insulinrezeptorsignalkaskade

Der Insulinrezeptor ist ein Heterotetramer, dessen Untereinheiten über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind [5]. Ligandenbindungsdomänen sind in den beiden extrazellulären α -Ketten lokalisiert. Die beiden β -Ketten bestehen aus Extrazellular-, Transmembran- und Intrazellulareinheiten. Letztere beinhalten Tyrosinkinase-Domänen [161]. Die Bindung von Insulin bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch die Hemmung der Kinaseaktivität aufgehoben wird [4]. Daraufhin erfolgt die Autophosphorylierung der Tyrosinreste in der Kinase-regulatorischen Domäne und der Tyrosinkinase-Substratdomäne der β -Untereinheit. Dies ermöglicht die Bindung der Insulinrezeptorsubstrate (IRS), deren Tyrosinreste daraufhin phosphoryliert werden [161, 162]. Die IRS weisen selbst keine katalytische Aktivität auf, dienen jedoch mit ihren zahlreichen Interaktionsdomänen als Multiplikatoren und Integratoren von Signalen [163]. Je nach Bindung von Adapterproteinen an die IRS werden verschiedene intrazelluläre Signalwege aktiviert.

Im MAP-Kinase-abhängigen Signalweg bindet das Adapterprotein Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) an phosphorylierte Tyrosinreste von IRS. Anschließend wird der Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor SOS (*son of sevenless*) rekrutiert, welcher an der Aktivierung des kleinen G-Proteins Ras beteiligt ist. Letzteres rekrutiert Proteine der Familie Raf (*rapidly accelerated fibrosarcoma*), welche die Aktivierung von MAP-Kinasen, wie zum Beispiel ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases 1/2*; auch als p44/p42 MAP-Kinase bezeichnet), auslöst [4]. ERK1/2 wandert in den Zellkern und aktiviert durch Phosphorylierung Transkriptionsfaktoren wie AP-1 [4, 164].

Der PI3K-Akt-Signalweg wird durch Bindung der PI3K an Tyrosin-phosphoryliertes IRS eingeleitet. Diese wird durch Phosphorylierung aktiviert und katalysiert die Phosphorylierung membranständiger Inositol-Phospholipide. Das entstehende Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat fungiert als Signalmolekül zur Translokation und anschließender Aktivierung der Phosphatidylinositol-abhängigen Kinase 1, welche nachfolgend die Proteinkinase B, auch Akt genannt, aktiviert [161, 162]. Die Kinase Akt phosphoryliert nun weitere regulierende Proteine, wie zum Beispiel den IKK (*inhibitor of nuclear factor- κ B kinase*), CREB, mTOR (*mammalian target of rapamycin*), Glykogensynthasekinase 3 β , FoxO (*fork-head box-containing protein, O subfamily*) und 160 kDa-großes Akt-Substrat (AS160) [4, 161, 162, 165]. Über diese Wege werden hauptsächlich metabolische Prozesse reguliert. In Hepatozyten dienen die wichtigsten Akt-nachgeschalteten Signalwege der Induktion der Glukokinase-Expression, der Verstärkung der Glykogensynthese und der Glykolyse sowie der gleichzeitigen Hemmung der Glykogenolyse und Gluconeogenese [4, 162]. Durch diese Prozesse wird die Glukosekonzentration im Blut konstant gehalten.

1.8.3 Molekularer Mechanismus der Entstehung einer Insulinresistenz

Bei einer Insulinresistenz reagieren Insulinzielzellen, vor allem in Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe, nicht mehr adäquat auf eine physiologisch erhöhte Insulinkonzentration im Blut (vgl. 1.1.1). Übergewicht und Adipositas können die Entstehung einer Insulinresistenz begünstigen. Ein möglicher Mechanismus ist, dass freie Fettsäuren, Fettsäuremetabolite und Sphingolipide Signalketten aktivieren, welche die intrazelluläre Insulinrezeptorsignalkaskade unterbrechen. Ceramide sind in der Lage, eine Reihe von Enzymen, wie zum Beispiel Proteinkinase C, bestimmte Serin-/Threonin-spezifische Proteinphosphatasen und Serin/Threonin-spezifische Proteinkinasen, zu aktivieren [136, 157, 166]. Gesättigte Fettsäuren schalten Signalwege zur Aktivierung der Kinasen IKK, MAP-Kinase und JNK an [132] und der Fettsäuremetabolit DAG aktiviert Proteinkinasen, wie zum Beispiel Proteinkinase C [23, 132, 167, 168]. Diese Kinasen und Phosphatasen vermitteln eine inhibitorische Serin- oder Threonin-Phosphorylierung des IRS, woraufhin dieses vermehrt abgebaut wird [162, 169].

Weiterhin hemmen Ceramide die Aktivität der Kinase Akt unabhängig vom IRS und PI3K [23, 132]. Wahrscheinlich aktivieren Ceramide die Proteinphosphatase 2A, welche die inhibierende Dephosphorylierung der Kinase Akt katalysiert [132]. Auch eine Proteinkinase C-vermittelte Inhibierung der Akt-Translokation in den Zellkern wird diskutiert [168].

Das Sphingolipid S1P übernimmt je nach Zelltyp unterschiedlichste Funktionen bei der Regulation des Insulinrezeptorsignals. In Skelettmuskelzellen transaktivierte S1P den Insulinrezeptor und induzierte so Zelldifferenzierung und Glukoseaufnahme [168]. In anderen Zelltypen, wie zum Beispiel Immunzellen und Hepatozyten, inhibierte S1P die Insulin-induzierte Akt-Aktivität und förderte so die Ausbildung einer Insulinresistenz [168].

Übergewicht ist mit einer vermehrten Infiltration des Fettgewebes mit Monozyten und Makrophagen assoziiert (vgl. 1.5.2). Diese sezernieren pro-inflammatorische Mediatoren, welche die intrazelluläre Insulinrezeptorsignalkaskade unterbrechen. IL-6-Typ-Zytokine induzieren die Synthese von SOCS (*supressor of cytokine signaling*), welcher sich an den aktivierten Insulinrezeptor anlagert und so die Bindung der Tyrosin-phosphorylierten IRS verhindert [161, 170]. Außerdem aktivieren IL-6-Typ-Zytokine, TNF α und IL-1 β MAP-Kinasen, wie ERK und JNK, und IKK, welche eine inhibierende Serin-Phosphorylierung des IRS-1 vermitteln und gleichzeitig den proteasomalen Abbau der IRS fördern [23, 161, 162, 169, 171, 172]. Desweiteren wurde gezeigt, dass TNF α und IL-8 die Insulin-induzierte Akt-Phosphorylierung hemmten [123]. Auf Transkriptionsebene induzierten IL-1 β , IL-6 und TNF α Insulinresistenz, indem sie die Expression der IRS und des Insulin-sensitiven Glukose-Transporters Glut4 in Adipozyten hemmten [172–176]. In einer Adipozytenzelllinie hemmte IL-1 β zusätzlich die Expression der Glykogensynthasekinase [173].

Das Fettgewebe übergewichtiger Personen trägt zusätzlich durch eine reduzierte Ausschüttung des Hormons Adiponektin zur Manifestation einer chronischen Entzündung und einhergehenden Insulinresistenz bei, da Adiponektin die Produktion anti-inflammatorischer Mediatoren in Makrophagen verstärkt und die Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren vermindert (vgl. 1.5.2). Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass Adiponektin, unabhängig von Insulin, die Translokation des Glukosetransporters Glut4 in Muskelzellen steigert und so die Aufnahme von Glukose in Muskelzellen fördert [177–180].

1.9 Arbeitshypothesen

Die Arbeitshypothesen 1 bis 3 sind schematisch in Abb. 1 dargestellt.

Hypothese 1: Insulin verstärkt die basale und Stimulus-abhängige Synthese pro-inflammatorischer Zytokine in humanen Makrophagen und trägt so zur Manifestation einer Insulinresistenz bei.

Es ist bekannt, dass Insulin die Expression seines eigenen Rezeptors und der IRS hemmt und viele der IRS-inhibierenden Kinasen, wie MAP-Kinasen und JNK, aktiviert [161, 169, 181]. Es ist somit an der physiologisch sinnvollen Abschaltung seines eigenen Signals, zum Beispiel nach ausreichender Glukose-Einspeicherung, beteiligt.

Eine pathologisch vorherrschende Hyperinsulinämie scheint die Entstehung einer Insulinresistenz jedoch über die genannten Mechanismen hinaus zu begünstigen. Hinweise darauf liefern Tierstudien und Humanstudien mit geringen Probandenzahlen. Pferde, die über längere Zeit sehr kohlenhydratreiches Futter erhielten, waren anfälliger für die Entstehung einer Laminitis, einer aseptische Entzündung der Huflederhaut. Dieses Krankheitsbild gepaart mit einer gesteigerten TNF α - und IL-6-Plasmakonzentration wurde auch durch einen hyperinsulinämischen-euglykämischen Clamp der Tiere ausgelöst [182–184]. In gesunden Probanden steigerte ein hyperinsulinämischer-euglykämischer Clamp die Produktion von IL-6 und anderen pro-inflammatorischen Zytokinen [185–187] und verstärkte deren LPS-induzierte Produktion [185, 188]. Dies deutet darauf hin, dass eine Hyperinsulinämie die Entstehung einer Entzündung begünstigt und auf diesem Wege Insulinresistenz vorantreiben kann.

Zahlreiche Studien wiesen eine gesteigerte IL-6- und CCL2-mRNA-Expression in Insulin-stimulierten Adipozytenzelllinien und primären humanen Adipozyten nach [37, 189, 190]. Die Freisetzung von chemoattraktiven Substanzen aus Adipozyten bewirkte die Rekrutierung und Proliferation von Monozyten und Makrophagen in Insulin-exponiertes subkutanes Fettgewebe [191, 192]. Ob eine Hyperinsulinämie selbst die Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren in Makrophagen induziert, wird jedoch kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite inhibierte Insulin die LPS-stimulierte Apoptose und Kinaseaktivität sowie

Bildung von TNF α , IL-1 β und IL-6 in Makrophagen von Menschen [193], Ratten [194] und diabetischen Mäusen [195]. Auf der anderen Seite induzierte Insulin in einigen Studien die TNF α , IL-1 β und IL-6-Produktion in humanen Makrophagen [196, 197] und in LPS-stimulierten Makrophagen des Knochenmarks diabetischer Mäuse [195]. In der vorliegenden Studie wurde erforscht, ob und über welchen Mechanismus Insulin die Expression proinflammatorischer Zytokine in den Makrophagen-artigen Zelllinien U937 und THP-1 und in primären humanen Makrophagen induzierte. Außerdem wurde untersucht, ob die gebildeten Zytokine eine Manifestation der Insulinresistenz in Rattenhepatozyten begünstigen.

Hypothese 2: Insulin, Lipopolysaccharid und Palmitat induzieren die Bildung von Prostaglandin E₂ in humanen Makrophagen.

Der Lipidmediator PGE₂ kann das Entzündungsgeschehen auf mehreren Ebenen beeinflussen und dieses weiter vorantreiben oder an dessen Auflösung beteiligt sein (siehe Punkt 1.4.3). Er gilt daher als wichtiger Regulator des Entzündungsgeschehens.

Das Ausgangssubstrat der PGE₂-Synthese ist Arachidonsäure, welche über die Nahrung aufgenommen oder aus Linolsäure gebildet wird und anschließend in der Regel in Membranlipide eingebaut wird [56, 61]. Die Freisetzung der Arachidonsäure aus Membranlipiden wird durch das Enzym zytosolische Phospholipase A2 katalysiert und gilt als einleitender Schritt der PGE₂-Synthese [56, 57, 61]. Pro-inflammatorische Mediatoren wie IL-1, TNF α und IFN γ verstärken die Synthese des Enzyms und aktivieren es [59, 60].

COX2 und mPGES1 sind die durch pro-inflammatorische und mitogene Stimuli induzierbaren PGE₂-synthetisierenden Enzyme, welche Arachidonsäure in PGE₂ umwandeln [56, 64–68, 70–73]. Es wurde bereits gezeigt, dass LPS die Bildung von PGE₂ in Makrophagen durch Induktion von COX2 und mPGES1 begünstigt [70–73]. Wenig ist jedoch bekannt über die Wirkung von Insulin und Fettsäuren wie Palmitat auf die Bildung von PGE₂ in Monozyten und Makrophagen. Sollten Insulin und Palmitat die Bildung von PGE₂ beeinflussen, hätten diese Stimulanzen möglicherweise nicht nur einen direkten Einfluss auf das Entzündungsgeschehen (siehe Hypothese 1), sondern würden dieses zusätzlich auf indirektem Wege über die entzündungsregulierende Wirkung von PGE₂ beeinflussen. Daher sollte in der vorliegenden Studie neben einem Einfluss von Insulin auf die Bildung proinflammatorischer Zytokine zusätzlich untersucht werden, ob Insulin oder Palmitat die basale und Stimulus-abhängige Arachidonsäure- und PGE₂-Synthese in den Makrophagen-artigen Zelllinien U937 und THP-1 und in primären humanen Makrophagen stimuliert.

Hypothese 3: Prostaglandin E₂ verstärkt die Stimulus-abhängige Expression pro-inflammatorischer Zytokine und seine eigene Synthese in humanen Makrophagen.

Studien zeigten, dass PGE₂ in der Lage ist, die M2-Polarisierung von Makrophagen zu begünstigen [97], die Bildung von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen zu hemmen [95, 96, 98–103] und gleichzeitig die Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine zu steigern [100, 109, 112, 113]. Außerdem hemmte es die LPS-induzierte TNF α -Expression und -Synthese in Makrophagen verschiedener Gewebe und Spezies [98–100, 102, 104–111]. Auf der anderen Seite sind auch entzündungsfördernde Wirkungen von PGE₂ beobachtet worden. In Monozyten und Makrophagen steigerte PGE₂ die Produktion von IL-1 β und IL-8 [110, 114]. Außerdem zeichneten sich Hochfettdiät-gefütterte Mäuse, denen das PGE₂-synthetisierende Enzym mPGES1 fehlte, im Vergleich zu Hochfettdiät-gefütterten Wildtypen durch eine verminderte Entzündung im Fettgewebe aus [198]. In der vorliegenden Studie sollte daher untersucht werden, welchen Einfluss PGE₂ auf die Stimulus-abhängige Entzündungsantwort in den Makrophagen-artigen Zelllinien U937 und THP-1 hat. Desweiteren sollte untersucht werden, über welchen seiner Rezeptoren PGE₂ seine Wirkung in den verwendeten Makrophagen-artigen Zelllinien vermittelt.

Studien zeigten, dass Prostaglandine ihre eigene Synthese regulieren können und eine Hemmung oder Verstärkung der Synthese über zelltypspezifische Mechanismen reguliert wird [74–80]. Daher sollte zusätzlich untersucht werden, ob PGE₂ die Stimulus-abhängige PGE₂-Synthese in den Makrophagen-artigen Zelllinien U937 und THP-1 reguliert.

1.10 Ziel der Arbeit

Übergewicht und Adipositas sind assoziiert mit einer chronischen unterschweligen Entzündung. Letztere begünstigt die Manifestation einer Insulinresistenz und in Folge die Entstehung einer Hyperinsulinämie. Einige Studien legen nahe, dass eine Hyperinsulinämie selbst an der Ausprägung einer Entzündung und am Voranschreiten einer Insulinresistenz beteiligt ist. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob Insulin allein eine entzündungsfördernde Wirkung auf Makrophagen ausübt oder eine durch Faktoren des metabolischen Syndroms, wie erhöhte LPS- oder freie Fettsäurespiegel, ausgelöste Entzündungsantwort weiter verstärkt. Weiterhin sollte untersucht werden, ob Insulin, LPS oder Palmitat die Synthese des Lipidmediators PGE₂ induzieren. Letzterer ist ein wichtiger Regulator von Entzündungsreaktionen und kann diese sowohl verstärken als auch hemmen. In einem weiteren Schritt sollte daher noch untersucht werden, ob und in welche Richtung PGE₂ die Insulin-, LPS und Fettsäure-induzierte Entzündungsantwort reguliert.

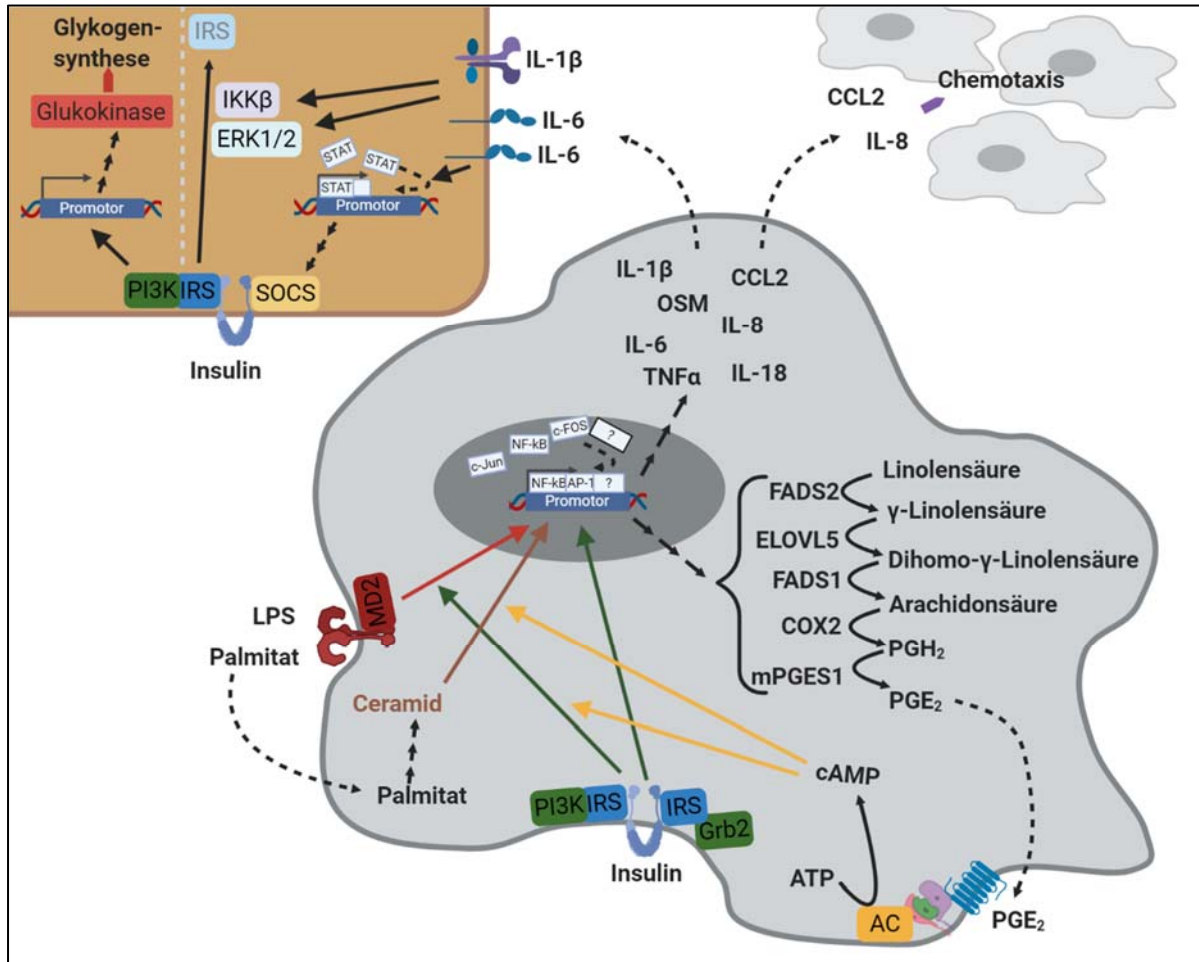


Abb. 1: Schematische Darstellung der Arbeitshypothesen

Insulin, das zur Kompensation einer Insulinresistenz vermehrt aus den pankreatischen β -Zellen ausgeschüttet wird [5], könnte an seinen Rezeptor in Makrophagen binden und über nachgeschaltete Signalwege die basale und Stimulus-abhängige Expression pro-inflammatorischer Zytokine verstärken. Außerdem wird vermutet, dass Insulin, LPS und Palmitat die Expression Arachidonsäure- und PGE_2 -synthetisierender Enzyme induziert. Das synthetisierte und sekretierte PGE_2 könnte nun an seinen G_s -Protein-gekoppelten Rezeptor binden und die Stimulus-abhängige Zytokinfreisetzung und seine eigene Synthese zusätzlich verstärken. Das Zusammenspiel verschiedener Mediatoren des metabolischen Syndroms könnte daher eine stärkere Entzündungsantwort auslösen, als jede der Einzelkomponenten. Im Zuge der Ausschüttung chemotaktischer Zytokine könnten weitere Makrophagen an den Ort der Entzündung gelockt werden und so die Entzündung weiter vorangetrieben werden. Die dabei sekretierten Zytokine könnten an entsprechende Rezeptoren an der Leber binden und Prozesse in Gang setzen, die zur Inhibierung der Insulinrezeptorsignalkaskade und damit zur Inhibierung der Insulin-induzierten Glukokinase-Expression führen. Zum Beispiel könnten IL-6-Typ-Zytokine, wie IL-6 und OSM, die Expression von SOCS induzieren, welcher den Insulinrezeptor bindet und damit unzugänglich für das IRS macht. Weiterhin können IL-6-Typ-Zytokine Erk1/2-vermittelt und IL-1 β IKK β -vermittelt die inhibierende Serin-Phosphorylierung des IRS auslösen. Diese führt zu einem Abbau des IRS. In Folge der Unterbrechung der Insulinrezeptorsignalkaskade könnte eine Insulinresistenz in den Insulinzielzellen entstehen. Beteiligte: Die Darstellung wurde mit Hilfe des Programms BioRender (www.Biorender.com) gezeichnet. Abkürzungen: AC – Adenylatzyklase; ATP – Adenosintri-phosphat, cAMP – cyclic adenosine monophosphate; CCL – C-C-Chemokinligand; COX – Cyclooxygenase; ELOVL5 – elongation of very long chain fatty acids protein 5; ERK1/2 – extracellular signal-regulated kinases 1/2; FADS – fatty acid desaturase; IKK – inhibitor of nuclear factor- κ B kinase; IL – Interleukin; IRS – Insulinrezeptorsubstrat, LPS – Lipopolysaccharid; mPGES1 – mikrosomale PGE_2 -Synthase; MD2 – myeloid differentiation factor 2; NF- κ B – nuclear factor ‘kappa light chain enhancer’ of activated B-cells; OSM – Oncostatin M; PG – Prostaglandin; PI3K – Phosphoinositid-3-Kinase; SOCS – supressor of cytokine signaling; STAT – signal transducer and activator of transcription; TNF – Tumornekrosefaktor

2 Methodenübersicht

Eine Auflistung aller verwendeten Materialien und detaillierte Beschreibungen aller angewendeten Methoden befindet sich im Anhang (Punkte 6.1 und 6.2).

2.1 Kultivierung permanenter Zelllinien (Punkt 6.2.1)

U937- und THP-1-Zellen wurden zur Erhaltung in RPMI 1640-Medium, dem 1 % Antibiotika und 10 % FCS (*fetal calf serum*) zugesetzt war, kultiviert und alle 3 bis 4 Tage erfolgte ein Mediumwechsel, die Teilung der Zellen oder die Aussaat auf Zellkulturschalen für einen Zellkulturversuch. Pro 35 mm-Zellkulturschale wurden $1,0 \times 10^6$ Zellen in 1 ml RPMI 1640-Medium, dem 1 % Antibiotika und 10 % FCS zugesetzt war, ausplattiert. Sofort wurde 1 µl/ml Phorbolmyristataacetat (PMA) (Endkonzentration: 100 ng/ml) zu den Zellen gegeben, um die Differenzierung der Monozyten-artigen Zellen in Makrophagen-ähnliche Zellen herbeizuführen. Nach 24 Stunden wurden die nun adhärenen Zellen mit RPMI 1640-Medium gewaschen und für 24 Stunden in RPMI 1640-Medium, dem 1 % Antibiotika und 0,5 % FCS zugesetzt waren, kultiviert. Die Zellkulturversuche fanden 48 Stunden nach dem Ausplattieren statt. Die Kultivierung und Inkubation der Zellen erfolgte in Begasungsbrutschränken in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % (v/v) CO₂ bei 37 °C.

2.2 Isolierung, Reinigung und Kultivierung von humanen Monozyten und Makrophagen (Punkt 6.2.2)

Gesunden männlichen und weiblichen Probanden wurde jeweils 50 ml Vollblut entnommen. Aus diesem wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes mittels niedrigtouriger Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation angereichert. Pro well einer 6 well-Zellkulturplatte (Primaria™ von Corning™) wurden $5,0 \times 10^6$ Zellen in 1,5 ml RPMI 1640-Medium, dem 1 % Antibiotika und 10 % FCS zugesetzt waren, kultiviert. Nach einer Anheftungsphase von 2 Stunden wurden die nicht adherierten mononukleären Zellen durch mehrmaliges Waschen entfernt. Nach 4 Tagen Kulturdauer in 2 ml/well RPMI 1640-Medium, dem 1 % Antibiotika, 10 % FCS und 20 ng/mL GM-CSF (Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) zugesetzt wurde, erfolgte die Zugabe von je 1 ml frischem Medium ohne Mediumwechsel. Ein Mediumwechsel erfolgte nach 7 Tagen Kulturdauer mit RPMI 1640-Medium, dem 1 % Antibiotika und 0,5 % FCS zugesetzt wurde. Die Zellkulturversuche fanden nach einer Gesamtkulturdauer von 8 Tagen statt. Die Inkubation der mononukleären Zellen erfolgte in Begasungsbrutschränken in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre mit 5 % (v/v) CO₂ bei 37 °C.

2.3 Isolierung, Reinigung, Transfektion und Kultivierung von Hepatozyten der Ratte (Punkt 6.2.3)

Die Isolierung von primären Hepatozyten der Ratte erfolgte nach einem Protokoll von Meredith *et al.* [199] und wurde von Mitarbeitern der Abteilung durchgeführt. Dabei wurde zunächst der Zellverband durch *in situ*-Perfusion der Leber mit einem Calcium-freien und Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-haltigen Puffer gelöst und anschließend die Hepatozyten mittels niedrigtouriger Zentrifugation mit einem kontinuierlichen Percoll-Dichtegradienten gereinigt. Die Zellen wurden mit einer Dichte von $1,0 \times 10^6$ Zellen bzw. bei nachfolgender Transfektion $0,7 \times 10^6$ Zellen pro 35 mm-Zellkulturschalen ausgesät und in Medium M199, dem 1 % Antibiotika, Wachstumsfaktoren und 4 % NCS (*newborn calf serum*) zugesetzt wurden, für die ersten 4 bis 5 Stunden kultiviert. Die Transfektion erfolgte nach einer modifizierten Calciumphosphat-Methode [200]. Nach 5 Stunden folgte ein Mediumwechsel mit Medium M199, dem 1 % Antibiotika und Wachstumsfaktoren zugesetzt wurden. Auf allen Zellkulturschalen erfolgte ein Mediumwechsel nach 24 Stunden und unmittelbar vor dem Zellversuch nach 40 Stunden Gesamtkulturdauer. Die Inkubation der primären Hepatozyten erfolgte in Begasungsbrutschränken bei 37 °C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre mit 5 % (v/v) CO₂ bzw. 3 % (v/v) CO₂ während der Transfektion.

2.4 Zellkulturversuche (Punkt 6.2.4)

2.4.1 Zellkulturversuche zur Bestimmung der Genregulation in den permanenten Zelllinien U937 und THP-1

48 Stunden nach Ausplattieren der Zellen wurde das Medium durch frisches RPMI 1640-Medium, dem 1 % Antibiotika und 0,5 % FCS zugesetzt wurden, ausgetauscht. Die Zellen wurden mit 100 nM Insulin, 100 ng/ml LPS, 100 µM Palmitat, 10 µM PGE₂, 1 µM der EP-Rezeptor-Agonisten, 10 ng/ml OSM und/ oder 100 ng/ml IL-6 für 1 Stunde (in der Regel für Western Blot-Analysen) bzw. 24 Stunden behandelt. Gegebenenfalls wurden die Stimulanzen zuvor 90 Minuten mit 10 µg/ml Polymyxin B schüttelnd inkubiert. Neben den Stimulanzen wurde dem Stimulationsmedium gegebenenfalls zusätzlich die Inhibitoren GSK1838705 (Endkonzentration: 1 µM), PD98059 (Endkonzentration: 1 µM) und TPCA-1 (Endkonzentration: 5 µM) zugesetzt. Bei einigen Versuchen wurden die Zellen mit 10 µM eines EP-Rezeptor-Antagonisten oder 2 µg/ml des Inhibitors Tak242 vorinkubiert, wobei die Konzentration des EP-Rezeptor-Antagonisten während der Stimulation weiterhin bei 10 µM lag und die Konzentration des Inhibitors Tak242 während der Stimulation auf 1 µg/ml abgesenkt wurde. Durch Zugabe von Dimethylsulfoxid (DMSO), bovines Serumalbumin (BSA) und/ oder Reinstethanol zu den Schälchen ohne entsprechende Stimulanzen, Inhibitoren oder Antagonisten war die Konzentration der Lösemittel in allen Zellkulturschälchen eines

Versuchs identisch. Die Inkubationszeit für Versuche zur anschließenden Genexpressionsanalyse im Lysat und Proteinquantifizierung im Überstand betrug 24 Stunden. Zellversuche zur Quantifizierung phosphorylierter Proteine im Lysat wurden 1 Stunde inkubiert. Nach Versuchsende wurden die Zellkulturschalen dreimal mit einfach konzentrierter Phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphat-buffered salt solution*; PBS) gewaschen, in flüssigen Stickstoff überführt und bei -70 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Zellkulturüberstände zur Lipid- oder Proteinanalyse oder Stimulation von primären Rattenhepatozyten wurden zentrifugiert, um noch vorhandene Zellen oder Zelltrümmer zu entfernen. Anschließend wurden die Überstände in Reaktionsgefäße aliquotiert, in flüssigen Stickstoff überführt und bei -70 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.4.2 Zellkulturversuche zur Untersuchung der Genregulation in den primären humanen Makrophagen

8 Tage nach Ausplattieren der Zellen wurde das Medium durch frisches RPMI 1640-Medium, dem 1 % Antibiotika und 0,5 % FCS zugesetzt wurden, ausgetauscht. Die Zellen wurden mit 100 nM Insulin, 100 ng/ml LPS oder 10 µM PGE₂ für 24 Stunden behandelt. Die Inkubationszeit für Versuche zur anschließenden Genexpressionsanalyse im Lysat und Proteinquantifizierung im Überstand betrug 24 Stunden. Nach Versuchsende wurden die Zellkulturschalen dreimal mit einfach konzentrierter PBS gewaschen, in flüssigen Stickstoff überführt und bei -70 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Zellkulturüberstände zur Proteinanalyse wurden zentrifugiert, um noch vorhandene Zellen oder Zelltrümmer zu entfernen.

2.4.3 Zellkulturversuche zur Untersuchung der Genregulation in primären Rattenhepatozyten

48 Stunden nach Ausplattieren der Zellen wurde zu den 500 µl M199-Medium, dem 1 % Antibiotika und Wachstumsfaktoren zugesetzt wurden, 500 µl RPMI 1640-Kulturmedium oder U937-Makrophagenüberstand pipettiert. Gegebenenfalls wurde in die Zellkulturschälchen zusätzlich 100 nM Insulin, 1 ng/ml IL-1β, 100 ng/ml IL-6 oder 100 ng/ml LPS gegeben. Die Inkubationszeit für Versuche zur anschließenden Genexpressionsanalyse im Lysat betrug 2 Stunden. Zellversuche zur Quantifizierung phosphorylierter Proteine im Lysat wurden 15 Minuten inkubiert. Nach Versuchsende wurden die Zellen zweimal mit einfach konzentrierter PBS gewaschen, die Zellkulturschalen in flüssigen Stickstoff überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

2.5 RNA-Isolation, cDNA-Synthese und *quantitative real time polymerase chain reaction* (qPCR) (Punkte 6.2.5 bis 6.2.8)

Die Isolation der Gesamt-RNA aus permanenten Zelllinien und primären Hepatozyten erfolgte mit Hilfe des käuflichen *peqGOLD Total RNA Kits* der Firma Peqlab nach Anleitung des Herstellers. Primäre humane Makrophagen wurden zunächst in *peqGOLD TriFast* überführt und mit Chloroform versetzt. Nach einer Zentrifugation wurde der klare, wässrige Überstand, der hauptsächlich RNA enthielt, mit Isopropanol versetzt und die Lösung nach einer weiteren Zentrifugation auf *PerfectBind RNA Column* des *peqGOLD Total RNA Kits* der Firma Peqlab überführt und die Probe weiter nach Herstellerangaben behandelt.

Die gereinigte RNA wurde mit Oligo(dT) und 200 U reverser Transkriptase in die Synthese der cDNA (*complementary DNA*) eingesetzt. Die qPCR wurde in Dreifachbestimmung mit verdünnter cDNA und einem *SYBR Green*/Fluorescein-enthaltenden qPCR Master Mix, welcher die unter 6.2.8 aufgeführten *sense* und *antisense* Oligonukleotid-Primer enthielt, durchgeführt. Berechnet wurde die n-fache Induktion des untersuchten Gens (Zielgen) in der behandelten Probe bezogen auf die Kontrolle. Dazu wurde die $\Delta\Delta Ct$ -Methode angewendet:

$$n - \text{fache Induktion} = \frac{2^{ct \text{ Zielgen (Kontrolle)} - ct \text{ Zielgen (behandelt)}}}{2^{ct \text{ Referenzgen (Kontrolle)} - ct \text{ Referenzgen (behandelt)}}}$$

Als Referenzgene wurden β -Aktin, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und/ oder Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) herangezogen. Für Berechnungen mit mehr als einem Referenzgen wurde das geometrische Mittel der n-fachen Induktionen aller Referenzgene gebildet. Zur absoluten Quantifizierung der EP-Rezeptoren wurden von Anne Schraplau im Rahmen ihrer Doktorarbeit Kalibrierungsgeraden mit entsprechenden Plasmiden (EP1-EP4 und Aktin) erstellt. Zur Normalisierung der Probenwerte wurde der Quotient aus der Kopienzahl der EP-Rezeptoren und der Kopienzahl des Referenzgens gebildet.

2.6 Western Blot-Analyse (Punkte 6.2.10 und 6.2.11)

Zur Proteinisolation wurden die Zellen in Lysispuffer, welcher mit Proteaseinhibitoren und Natriumorthovanadat versetzt war, überführt und durch Ultraschall homogenisiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert, um unlösliches Material zu entfernen. Der Proteingehalt der Zellen wurde nach der Methode von Bradford [201] bestimmt. Identische Volumen der U937-Makrophagenüberstände wurden mit Aceton über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt, getrocknet und anschließend in identischem Volumen Puffer aufgenommen. Gleiche Proteinmengen der Zelllysate oder gleiche Volumen konzentrierter U937-Makrophagenüberstände wurden in die Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*;

SDS)-Polyacrylamidgel-Elektrophorese eingesetzt und die getrennten Proteine durch Western Blot auf Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranen transferiert. Freie Bindungsstellen der Membranen wurden durch Inkubation in Magermilchpulver-haltigem Puffer blockiert. Anschließend wurden die Membranen über Nacht bei 4 °C mit Erstantikörpern inkubiert, gewaschen und für 2 Stunden mit Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpern inkubiert. Die gebildeten Komplexe wurden durch eine Peroxidase-vermittelte Chemolumineszenzreaktion visualisiert. Zur Auswertung wurde der Quotient aus der Bandenintensität des zu untersuchenden Proteins und des Gesamtproteins gebildet oder der Quotient aus den Bandenintensitäten zweier zu untersuchender Proteine.

2.7 *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Punkte 6.2.12 bis 6.2.14)*

Die Quantifizierung von IL-8, Insulin und PGE₂ im Überstand erfolgte mit Hilfe käuflicher Kits nach Anleitung der Hersteller. Für die Bestimmung von IL-8 und Insulin wurde ein Sandwich-ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) durchgeführt. Die Proben wurden dafür mit Puffer verdünnt und in Einfachbestimmung auf mit Antikörper beschichteten 96 well-Platten pipettiert. Nicht gebundene Proteine wurden heruntergewaschen. Anschließend wurde die Platte mit einem Zweitantikörper und ein an den Zweitantikörper bindendes Enzym inkubiert. Die gebildeten Komplexe wurden durch eine Enzym-vermittelte Farbreaktion visualisiert und photometrisch gemessen.

Zur Bestimmung der PGE₂-Konzentration im Überstand wurde ein kompetitiver Immunoassay verwendet. Hierbei wurden verdünnter Zellkulturüberstand und ein Konjugat aus PGE₂ und dem Enzym Acetylcholinesterase auf mit Antikörper beschichteten 96 well-Platten pipettiert. PGE₂ aus der Probe und Enzym-gebundenes PGE₂ konkurrierten um die Bindestelle am Antikörper. Überschüssiges PGE₂ wurde heruntergewaschen. Die anschließende Umsetzung eines Farbsubstrats wurde photometrisch gemessen und korrelierte negativ mit der Menge an PGE₂ im Überstand. Die Konzentration an IL-8, Insulin und PGE₂ in den Proben wurde anhand von Standardgeraden ermittelt.

2.8 Triple-Quadrupol-Massenspektrometer-Analyse (Punkt 6.2.15)

Zur Isolation von Sphingolipiden wurden die Zellen in eisgekühltes Methanol überführt. Die weitere Aufarbeitung und Messung der Proben wurde von der Abteilung Ernährungstoxikologie der Universität Potsdam durchgeführt. Die Proben wurden mit einem in Methanol gelösten internen Standard und Chloroform versetzt und bei 48 °C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurde Kaliumhydroxid zu den Proben gegeben und diese anschließend für 2 Stunden bei 37 °C geschüttelt. Die abgekühlten Proben wurden mit konzentrierter Essigsäure neutralisiert und zentrifugiert. Der klare organische Überstand

wurde in einer SpeedVac eingengt. Am Tag der Messung wurden die Proben in einem Gemisch aus Methanol, Acetonitril, Ameisensäure und H₂O gelöst und in einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer analysiert.

2.9 Luciferase-Reporter-Gen-Assay (Punkt 6.2.16)

Die Zellen wurden in Luciferase-Zelllysis-Puffer überführt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben gevortext und zentrifugiert, um Zelltrümmer zu sedimentieren. Die Proben wurden in Vertiefungen einer 96 well-Platte vorgelegt. Nach automatischer Zugabe des *Firefly*-Luciferase-Substrats im Messgerät erfolgte die Messung der Lumineszenz über einen Zeitraum von 10 Sekunden. Die Lichtemission war proportional zur Luciferasekonzentration. Die Menge der in Zellhomogenaten gemessenen Luciferaseaktivität erlaubte somit Rückschlüsse auf die Aktivierung des zu untersuchenden Promotors.

3 Ergebnisse

Einige der Ergebnisse wurden bereits publiziert [202, 203, 295].

3.1 Insulin-induzierte Steigerung der basalen und Stimulus-abhängigen Expression pro-inflammatorischer Zytokine in Makrophagen

Insulinresistenz ist ein wichtiger Faktor bei der Entstehung des metabolischen Syndroms und Typ-2-Diabetes. Eine Insulinresistenz ist dadurch gekennzeichnet, dass Insulin-sensitive Organe, wie Leber, Muskeln und Fettgewebe, nicht mehr adäquat auf Insulin reagieren. Zur Kompensation dieser Resistenz beginnen die pankreatischen β -Zellen vermehrt Insulin zu produzieren und der Patient entwickelt eine Hyperinsulinämie [5]. Es gibt Hinweise darauf, dass erhöhte Insulinspiegel Entzündungsantworten in Immunzellen auslösen und begünstigen können [135, 196, 197]. Daher sollte zunächst untersucht werden, ob eine Hyperinsulinämie die Synthese pro-inflammatorischer Mediatoren in Makrophagen auslösen kann.

Dazu wurden die Monozyten-artigen Zelllinien U937 und THP-1 durch Inkubation mit PMA in Makrophagen-artige Zellen differenziert. Primäre humane Monozyten wurden aus Vollblut gesunder Probanden isoliert und durch Inkubation mit GM-CSF in Makrophagen differenziert. Alle drei Makrophagen-Typen wurden nach Differenzierung 24 Stunden in Serum-armen Medium inkubiert bevor eine 24-stündige Stimulation mit 100 nM Insulin und/ oder 100 ng/ml LPS erfolgte. Die mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren wurde mittels qPCR bestimmt. Außerdem wurden in U937-Makrophagen Western Blot- und ELISA-Analysen durchgeführt, um die Konzentrationen von IL-1 β und IL-8 im Überstand zu bestimmen.

Um den zugrundeliegenden molekularen Mechanismus aufzuklären, wurden U937-Makrophagen eine Stunde bzw. 24 Stunden mit 100 nM Insulin und/ oder 100 ng/ml LPS stimuliert. Die Phosphorylierung von ERK1/2, Akt, IKK β und I κ B (*inhibitor of nuclear factor- κ B*) wurde mittels Western Blot-Analysen untersucht. Außerdem wurden die Expressionen von c-Jun, c-FOS, RIP140 (*receptor-interacting protein 140*), Insulinrezeptor und TLR4 mittels qPCR quantifiziert.

3.1.1 Insulin-induzierte Steigerung der basalen Expression pro-inflammatorischer Zytokine in Makrophagen

U937-Makrophagen

In Insulin-stimulierten U937-Makrophagen wurde im Vergleich zu U937-Makrophagen, welche ausschließlich in Kontrollmedium kultiviert wurden, die mRNA-Expression von TNF α signifikant auf das 1,3-fache induziert (Abb. 2A). Eine circa 2- bis 3-fach gesteigerte

Expression des Zytokins IL-1 β oder seines Vorläufers Pro-IL-1 β wurde sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene in Zelllysaten und Zellkulturüberständen nachgewiesen (Abb. 2B; Abb. 3A, B, C). Die mRNA-Expressionen der pro-inflammatorischen Mediatoren IL-8, OSM und CCL2 wurden durch Insulin-Stimulation signifikant um das circa 2-fache induziert (Abb. 2D, F, G). Auch auf Proteinebene ließ sich eine gesteigerte IL-8-Synthese nachweisen (Abb. 3D). Die Zytokine IL-6 und IL-18 wurden durch eine 24-stündige Stimulation mit Insulin nicht signifikant induziert (Abb. 2C, E).

THP-1-Makrophagen

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus U937-Makrophagen induzierte Insulin in THP-1-Makrophagen im Vergleich zur Mediumkontrolle signifikant die mRNA-Expressionen von IL-1 β (1,6-fach), IL-8 (2,9-fach), OSM (2,8-fach) und CCL2 (2,7-fach) (Abb. 4B, D, E, F). Wie in U937-Makrophagen wurde die IL-6-mRNA in THP-1-Makrophagen durch Insulin-Stimulation tendenziell, aber nicht signifikant gesteigert (Abb. 4C). Im Gegensatz zu U937-Makrophagen wurde die TNF α -mRNA-Expression nicht signifikant durch eine Stimulation mit Insulin beeinflusst (Abb. 4A).

Primäre humane Makrophagen

Insulin induzierte in primären humanen Makrophagen einiger Probanden die mRNA-Expressionen der Zytokine TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8 und CCL2 (Abb. 5). Auffällig ist, dass die Makrophagen eines Probanden (dargestellt mit ausgefüllten Quadraten) mit einem starken Anstieg aller Zytokinexpressionen, bis auf der Expression von IL-6, reagierten. Makrophagen anderer Probanden reagierten auf eine Stimulation mit Insulin nicht mit einem Anstieg einzelner Zytokine oder sogar mit einer verminderten Expression der Zytokine.

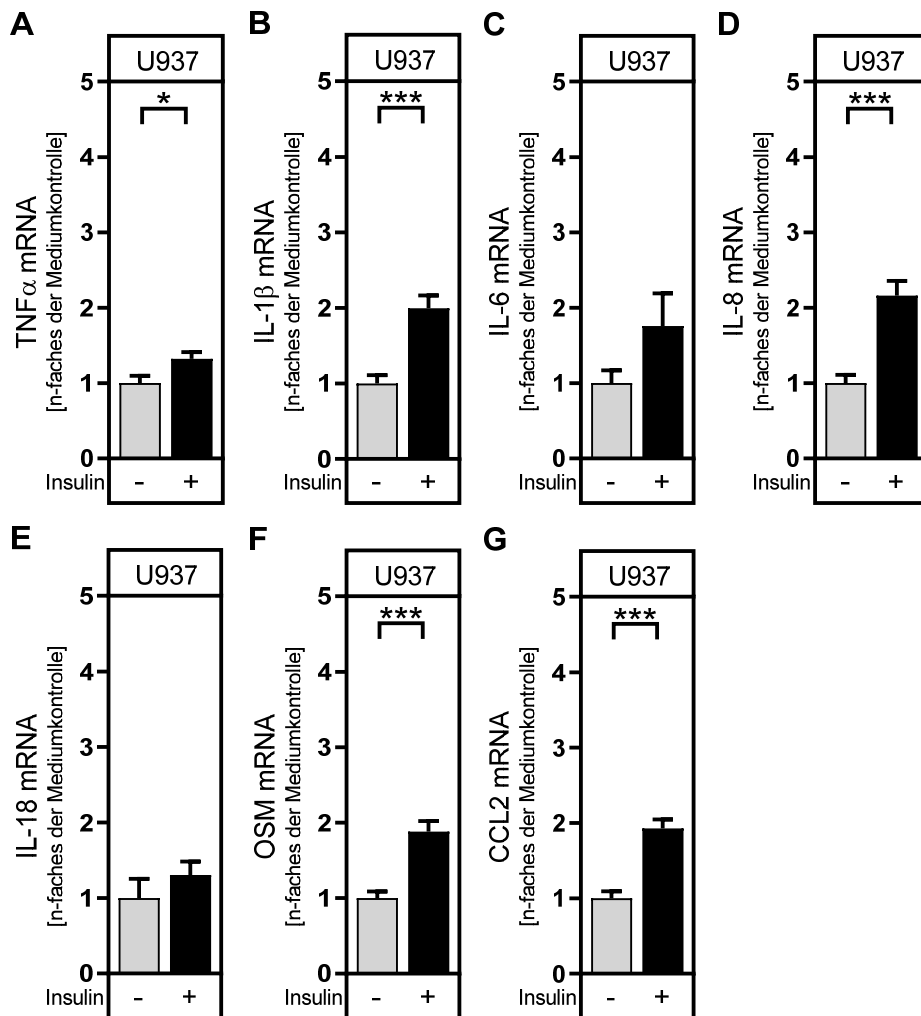


Abb. 2: Insulin-induzierte mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in U937-Makrophagen

Die humane Zelllinie U937 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin für 24 h. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. Auswertung: Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet. Für die Normalisierung wurden in jedem Versuch parallel Zellen mit 100 ng/ml LPS behandelt, analog der Insulin-behandelten Zellen aufgearbeitet und analysiert und die mittlere Induzierbarkeit durch Insulin und LPS innerhalb jedes Versuches bestimmt. Für die Auswertung wurden nur Experimente berücksichtigt, die alle in diesem Versuchssatz mit einbezogenen Stimulanzen (Insulin und LPS) enthielten. Darstellung: Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in der Abbildung nur die Genexpressionen dargestellt, die durch Insulin und durch die entsprechende Mediumkontrolle ausgelöst wurden, nicht jedoch die durch LPS ausgelösten Genexpressionen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 20 (A), 39 (B), 14 (C), 12 (D), 4 (E), 17 (F) oder 13 (G) unabhängigen Experimenten. Statistik: zweiseitiger t -Test für ungepaarte Stichproben; *: $p \leq 0,05$; ***: $p \leq 0,001$. Anmerkung: Alle Zellkulturexperimente flossen auch in die Berechnung der in Abb. 9 dargestellten Daten mit ein. Außerdem flossen 3 (A, B, F) oder 2 (C) Zellkulturexperimente auch in die Berechnung der in Abb. 31 und Abb. 34 dargestellten Daten mit ein. Beteiligte: (A-D, F, G): Einige Zellkulturexperimente (einschließlich RNA-Isolation, cDNA-Synthese und qPCR) wurden von Rodolfo Gonzalez Camargo im Rahmen seiner Doktorarbeit durchgeführt. Ein Teil der Daten wurde bereits, in geteilter Erstautorenschaft, publiziert [202].

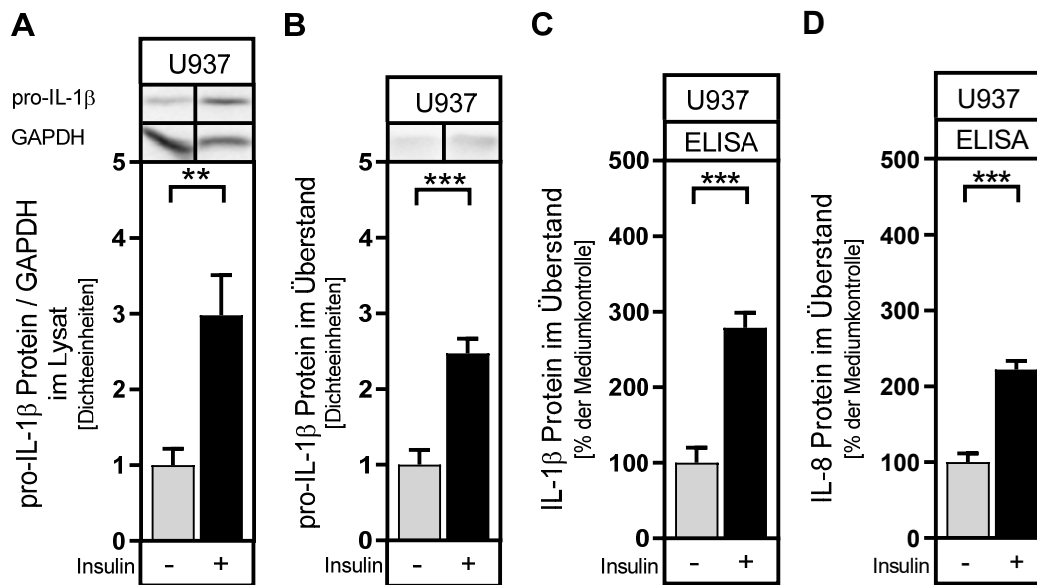


Abb. 3: Insulin-induzierte Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren in U937-Makrophagen

Die humane Zelllinie U937 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin für 24 h. (A): Proteine wurden, wie unter 6.2.10 dargestellt, isoliert und die Expression von GAPDH und Pro-IL-1 β mittels Western Blot (siehe 6.2.11) analysiert und die Bandenintensität quantifiziert. (B): Proteine aus Zellkulturüberständen wurden mittels Acetonfällung (siehe 6.2.10) aufkonzentriert, die Expression von Pro-IL-1 β mittels Western Blot (siehe 6.2.11) analysiert und die Bandenintensität quantifiziert. (C, D): Der IL-8 bzw. IL-1 β -Gehalt in Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA, wie unter 6.2.12 beschrieben, untersucht.

Auswertung: Sowohl Western Blot- als auch ELISA-Daten wurden auf die Summe aller Proteinexpressionen (Mediumkontrolle und Insulin) innerhalb jedes Versuches normalisiert. Darstellung: Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 6 (A, B, D) oder 7 (C) unabhängigen Experimenten und gegebenenfalls jeweils ein repräsentativer Western Blot (vollständige Blots in Abb. 76 im Anhang Punkt 7.6). Statistik: zweiseitiger *t*-Test für ungepaarte Stichproben; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.

Anmerkung: Alle Zellkulturexperimente flossen auch in die Berechnung der in Abb. 10 dargestellten Daten mit ein. (C, D): Außerdem flossen alle Zellkulturexperimente auch in die Berechnung der in Abb. 32 und Abb. 35 dargestellten Daten mit ein. Beteiligte: (C): Die Bestimmung der IL-1 β -Konzentrationen mittels ELISA wurde von Dr. Janin Henkel durchgeführt. (B): Die Daten wurden bereits, in geteilter Erstautorenschaft, publiziert [202].

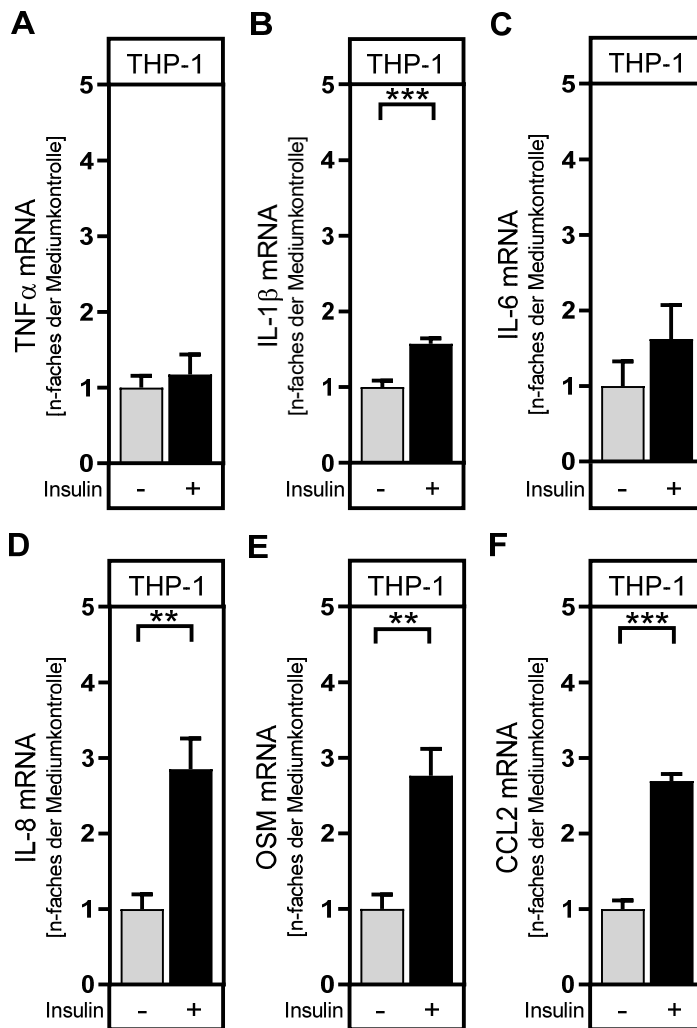


Abb. 4: Insulin-induzierte mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in THP-1-Makrophagen

Die humane Zelllinie THP-1 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin für 24 h. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. **Auswertung:** Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet. (A-D, E): Für die Normalisierung wurden in jedem Versuch parallel Zellen mit 100 ng/ml LPS behandelt, analog der Insulin-behandelten Zellen aufgearbeitet und analysiert und die mittlere Induzierbarkeit durch Insulin und LPS innerhalb jedes Versuches bestimmt. (F): Für die Normalisierung wurden in jedem Versuch parallel Zellen mit 100 μ M Palmitat behandelt, analog der Insulin-behandelten Zellen aufgearbeitet und analysiert und die mittlere Induzierbarkeit durch Insulin und Palmitat innerhalb jedes Versuches bestimmt. Für die Auswertung wurden nur Experimente berücksichtigt, die alle in diesem Versuchssatz mit einbezogenen Stimulanzen [(A-D, E): Insulin und LPS, (F): Insulin und Palmitat] enthielten. **Darstellung:** Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in der Abbildung nur die Genexpressionen dargestellt, die durch Insulin und durch die entsprechende Mediumkontrolle ausgelöst wurden, nicht jedoch die durch LPS (A-D, E) oder Palmitat (F) ausgelösten Genexpressionen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 6 (A, C, D, E), 18 (B), oder 7 (F) unabhängigen Experimenten. **Statistik:** zweiseitiger *t*-Test für ungepaarte Stichproben; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. **Anmerkung:** Alle Zellkulturexperimente flossen auch in die Berechnung der in Abb. 11 dargestellten Daten mit ein. Außerdem flossen alle (A, D, E) oder 6 (B) Zellkulturexperimente auch in die Berechnung der in Abb. 33 und Abb. 36 dargestellten Daten mit ein.

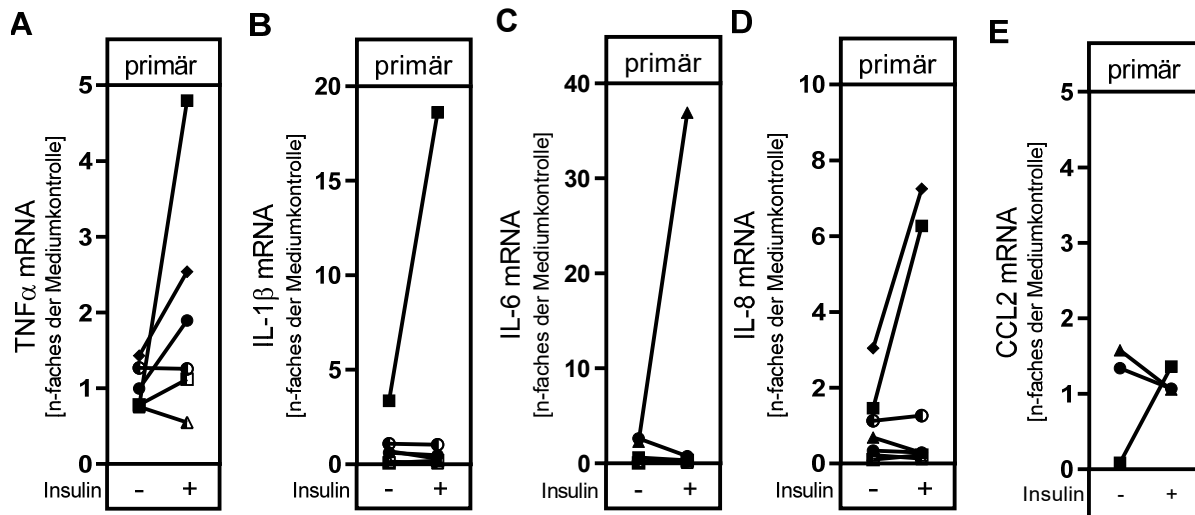


Abb. 5: Insulin-induzierte Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in primären humanen Makrophagen

Primäre humane Monozyten wurden, wie unter 6.2.2 beschrieben, isoliert, kultiviert und für 8 Tage mit GM-CSF differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin für 24 h. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.6 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. **Auswertung:** Als Referenzgene dienten β -Aktin, GAPDH und HPRT. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet. Die Berechnungen wurden mit jedem Referenzgen separat durchgeführt und im Anschluss das geometrische Mittel der berechneten Induktionen gebildet. Für die Normalisierung wurden in jedem Versuch parallel Zellen mit 100 ng/ml LPS behandelt, analog der Insulin-behandelten Zellen aufgearbeitet und analysiert und die mittlere Induzierbarkeit durch Insulin und LPS innerhalb jedes Versuches bestimmt. Für die Auswertung wurden nur Experimente berücksichtigt, die alle in diesem Versuchssatz mit einbezogenen Stimulanzen (Insulin und LPS) enthielten. **Darstellung:** Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in der Abbildung nur die Genexpressionen dargestellt, die durch Insulin und durch die entsprechende Mediumkontrolle ausgelöst wurden, nicht jedoch die durch LPS ausgelösten Genexpressionen. Dargestellt sind die Einzelwerte von 6 (A, B, C), 7 (D) oder 3 (E) unabhängigen Experimenten. Gleiche Symbole zur Darstellung der Einzelwerte kennzeichnen die Zugehörigkeit zu ein und demselben Probanden. **Statistik:** zweiseitiger *t*-Test für gepaarte Stichproben. **Anmerkung:** Alle Zellkulturexperimente flossen auch in die Berechnung der in Abb. 12 dargestellten Daten mit ein. **Beteiligte:** Die Daten wurden bereits, in geteilter Erstautoren-schaft, publiziert [203].

U937-Makrophagen

Es sollte ausgeschlossen werden, dass die Induktion der Expression pro-inflammatorischer Mediatoren durch 100 nM Insulin auf eine Kontamination des Insulins durch LPS, welche die Zellen stimulieren oder im Synergismus mit Insulin wirken, zurückzuführen ist. Aus diesem Grund wurden in einem weiteren Experiment die Stimulanzen mit Polymyxin B behandelt, bevor sie zur Stimulation der U937-Makrophagen eingesetzt wurden. Polymyxin B ist ein Polypeptidantibiotikum, welches LPS bindet und somit inaktiviert. Eine Stimulation mit 100 ng/ml LPS diente im Zellkulturversuch als Positivkontrolle. Obwohl die LPS-induzierte IL-1 β -mRNA-Expression in Anwesenheit von Polymyxin B vollständig gehemmt war, blieb die Insulin-induzierte Expression von einer Polymyxin B-Behandlung vollkommen unbeeinflusst (Abb. 6A). Dies beweist, dass die Insulin-induzierte Expression pro-inflammatorischer Zytokine nicht auf eine Kontamination durch LPS zurückzuführen war.

Um weiterhin die Hypothese zu überprüfen, dass die IL-1 β -Induktion Insulinrezeptor-abhängig ist, wurden Experimente mit dem Insulinrezeptor-Inhibitor GSK1838705 durchgeführt. In Übereinstimmung mit der Hypothese inhibierte GSK1838705 die Insulin-abhängige Induktion der IL-1 β -mRNA-Expression in U937-Makrophagen vollständig (Abb. 6B).

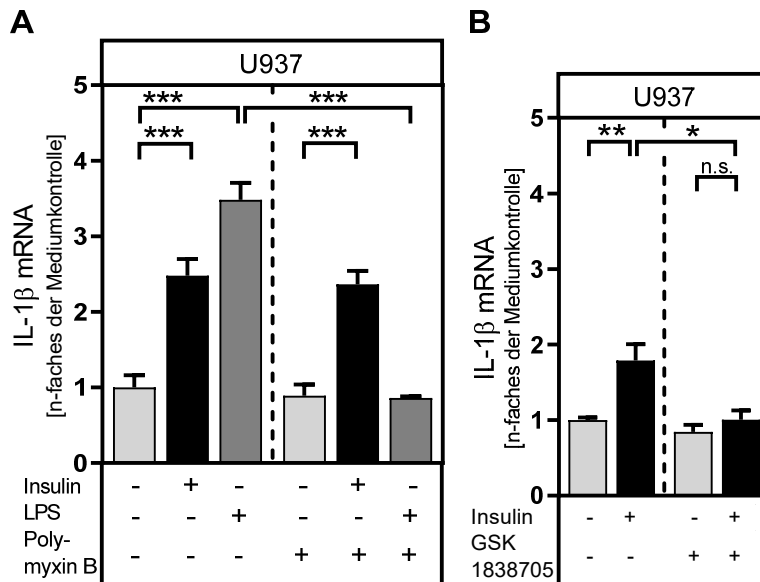


Abb. 6: Nachweis der Spezifität der Insulin-induzierten IL-1 β -mRNA-Expression

Die humane Zelllinie U937 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin oder 100 ng/ml LPS für 24 h. Wenn angegeben wurden die Stimulanzen zuvor 90 min mit 10 μ g/ml Polymyxin B inkubiert (A) oder die Zellen während der Stimulation mit 1 μ M GSK1838705 behandelt (B). Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. **Auswertung:** Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet. (A): Für die Normalisierung wurde die mittlere Induzierbarkeit durch Kontrollinsulin und Kontroll-LPS innerhalb jedes Versuches berechnet. Für die Auswertung wurden nur Experimente berücksichtigt, die alle in diesem Versuchssatz mit einbezogenen Stimulanzen und Stimulanzkombinationen [(A): Insulin, LPS, Polymyxin B, Insulin + Polymyxin B, LPS + Polymyxin B; (B): Insulin, LPS, GSK1838705, Insulin + GSK1838705 und LPS + GSK1838705] enthielten. **Darstellung:** (B): Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in der Abbildung nur die Genexpressionen dargestellt, die durch Insulin, GSK1838705, Insulin + GSK1838705 und durch die entsprechende Mediumkontrolle ausgelöst wurden. (A, B): Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 3 unabhängigen Experimenten. **Statistik:** *Two-way ANOVA* mit *Dunnnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; n.s. – nicht signifikant; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. **Beteiligte:** Die Daten wurden bereits, in geteilter Erstautorenschaft, publiziert [202].

3.1.2 Molekularer Mechanismus der Insulin-induzierten Expression von IL-1 β und anderen pro-inflammatorischen Zytokinen in U937-Makrophagen

Die Promotoren der Gene für TNF α [33], IL-1 β [39, 40], IL-6 [38], IL-8 [38, 51], IL-18 [44], OSM [48] und CCL2 [54] beinhalten Bindedomänen für die Transkriptionsfaktoren AP-1 und/ oder NF- κ B. Beide Elemente spielen eine wichtige Rolle für die Transkription pro-inflammatorischer Mediatoren. Daher wurde getestet, ob Insulin in U937-Makrophagen die diesen Elementen vorgeschalteten Signalwege, den MAP-Kinase-abhängigen Signalweg und den PI3K-Akt-Signalweg, aktiviert.

Die Kinase Akt phosphoryliert die Kinase IKK, welche ein Bestandteil des Multiprotein-komplexes zur Regulierung der Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B ist [165]. IKK phosphoryliert wiederum den an NF- κ B gebundenen Inhibitor I κ B und die p65-Untereinheit von NF- κ B [38, 165]. Dadurch dissoziiert der Komplex und NF- κ B-Dimere können an die NF- κ B-Domäne binden [38]. RIP140 fungiert in Makrophagen als Koaktivator von NF- κ B [204].

Die Inkubation der U937-Makrophagen mit 100 nM Insulin induzierte signifikant die Phosphorylierungen von Akt, IKK β und I κ B auf das jeweils 5,7-, 1,6- bzw. 1,4-fache der Mediumkontrolle (Abb. 7A-C). Die RIP140-mRNA-Expression wurde durch Insulin tendenziell, aber nicht signifikant, induziert (Abb. 7D). Um weiterhin die Hypothese zu überprüfen, dass die Insulin-induzierte Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in Makrophagen über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B vermittelt wird, wurden Experimente mit dem IKK β -Inhibitor TPCA-1 durchgeführt. In Übereinstimmung mit der Hypothese inhibierte TPCA-1 die Insulin-abhängige Induktion der IL-1 β -mRNA-Expression in U937-Makrophagen vollständig (Abb. 7E).

Insulin-stimulierte U937-Makrophagen wiesen im Vergleich zu unstimulierten U937-Makrophagen eine signifikant gesteigerte Phosphorylierung von ERK1/2 auf (3,2-fach) (Abb. 8A). c-Jun und c-FOS sind den MAP-Kinasen nachgeschaltete Transkriptionsfaktoren, welche Bestandteile des Dimers AP-1 sein können. Trotz MAP-Kinase-Aktivierung wurde die mRNA-Expression von c-FOS nicht und von c-Jun nur leicht (1,6-fach) durch Insulin-Stimulation induziert (Abb. 8B, C). Um weiterhin zu überprüfen, ob die Insulin-induzierte Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in Makrophagen über den MAP-Kinase-Signalweg vermittelt wird, wurden Experimente mit dem Inhibitor PD98059 durchgeführt. Dieser bindet vermutlich an die inaktiven nicht-phosphorylierten Formen der MAP/ERK Kinasen 1 und 2, welche ERK1/2 vorgeschaltet sind, und verhindert damit die weitere Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges [205]. PD98059 hatte keinen Einfluss auf die IL-1 β Expression in Insulin-behandelten U937-Makrophagen (Abb. 8D).

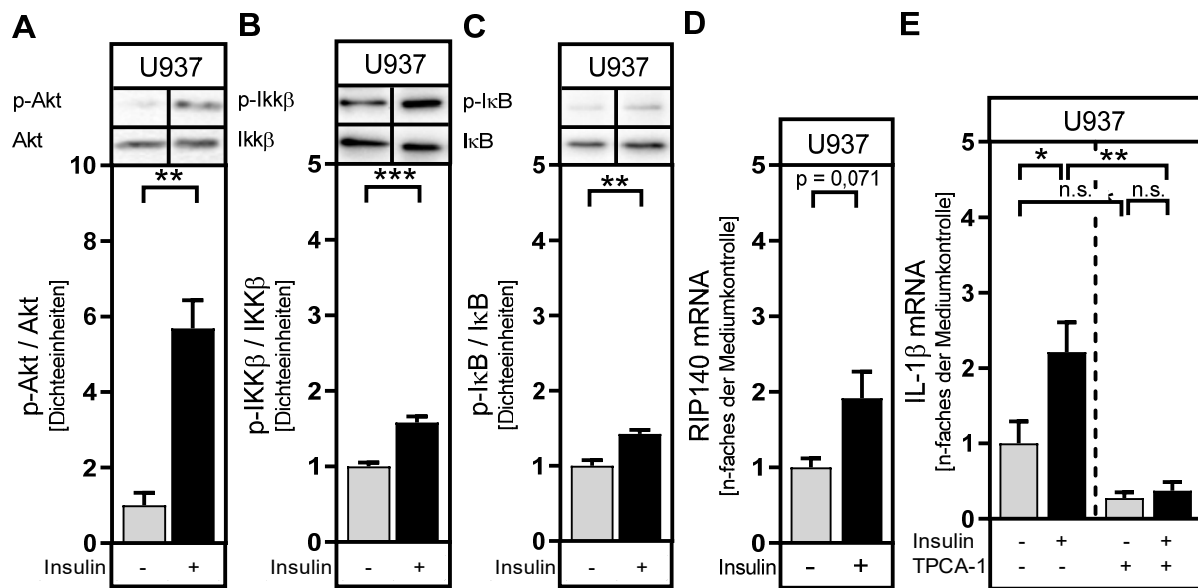


Abb. 7: Insulin-abhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB

Die humane Zelllinie U937 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin für 1 h (A-C) bzw. 24 h (D, E). Wenn angegeben wurden die Zellen zeitgleich mit 5 μ M des IKK β -Inhibitor TPCA-1 inkubiert. (A-C): Proteine wurden, wie unter 6.2.10 dargestellt, isoliert und die Expression von Akt, p-Akt, IKK β , p-IKK β , I κ B oder p-I κ B mittels Western Blot (siehe 6.2.11) analysiert und die Bandenintensität quantifiziert. (D, E): Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. **Auswertung:** (A-C): Die Daten wurden auf die Summe aller Proteinexpressionen (Mediumkontrolle und Insulin) innerhalb jedes Versuches normalisiert. (D, E): Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet. Für die Normalisierung wurden in jedem Versuch parallel Zellen mit 100 ng/ml LPS (D) bzw. 100 ng/ml LPS und 100 ng/ml LPS + 5 μ M TPCA-1 (E) behandelt, analog der Insulin-behandelten Zellen aufgearbeitet und analysiert und die mittlere Induzierbarkeit durch Insulin und LPS (D) bzw. Insulin, LPS und LPS + TPCA-1 (E) innerhalb jedes Versuches bestimmt. Für die Auswertung wurden nur Experimente berücksichtigt, die alle in diesem Versuchssatz mit einbezogenen Stimulanzen und Stimulanzkombinationen [Insulin und LPS (D) bzw. Insulin, TPCA-1, Insulin + TPCA-1, LPS, LPS + TPCA-1 (E)] enthielten. **Darstellung:** Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in der Abbildung nur die Genexpressionen dargestellt, die durch Insulin (D) bzw. durch Insulin, TPCA-1, Insulin + TPCA-1 (E) und durch die entsprechende Mediumkontrolle ausgelöst wurden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 4 (A, C), 7 (B), 3 (D) oder 5 (E) unabhängigen Experimenten und gegebenenfalls jeweils ein repräsentativer Western Blot (vollständige Blots in Abb. 77 und Abb. 78 im Anhang Punkt 7.6). **Statistik:** zweiseitiger *t*-Test für ungepaarte Stichproben (A-D) bzw. *Two-way ANOVA* mit *Dunnnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen (E); n.s. – nicht signifikant; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. **Anmerkung:** Alle (B-D) oder 3 (A) Zellkulturexperimente flossen auch in die Berechnung der in Abb. 14 dargestellten Daten mit ein. **Beteiligte:** (B, C, E): Die Daten wurden bereits, in geteilter Erstautorenschaft, publiziert [202].

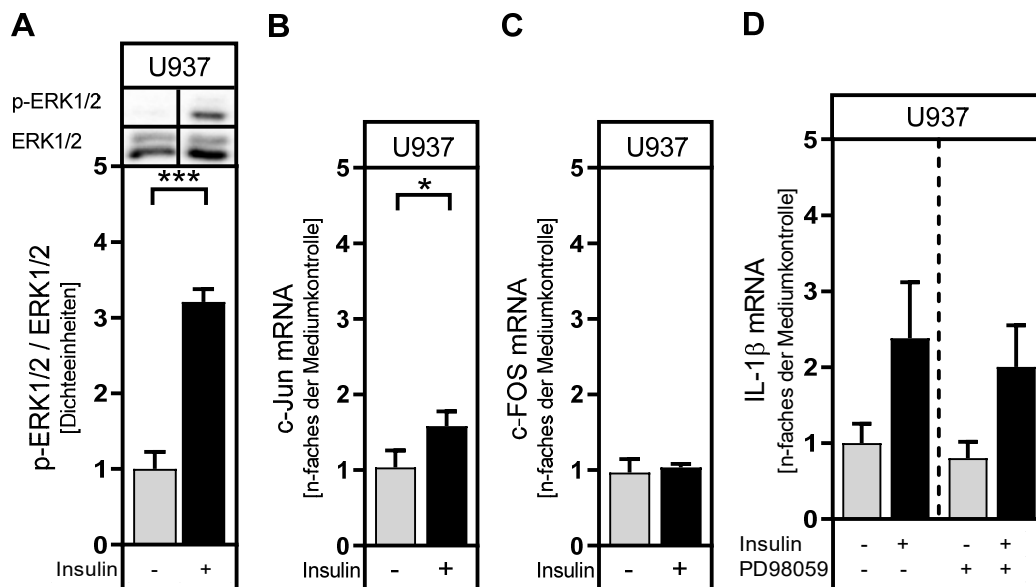


Abb. 8: Insulin-abhängige Aktivierung des MAP-Kinase-abhängigen Signalweges

Die humane Zelllinie U937 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin für 1 h (A) bzw. 24 h (B-D). Wenn angegeben wurden die Zellen zeitgleich mit 1 μ M des ERK1/2-Inhibitors PD98059 inkubiert. (A): Proteine wurden, wie unter 6.2.10 dargestellt, isoliert und die Expression von ERK1/2 oder p-ERK mittels Western Blot (siehe 6.2.11) analysiert und die Bandenintensität quantifiziert. Auswertung: Die Daten wurden auf die Summe aller Proteinexpressionen (Mediumkontrolle und Insulin) innerhalb jedes Versuches normalisiert. (B-D): Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.6 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet. Für die Normalisierung wurden in jedem Versuch parallel Zellen mit 100 ng/ml LPS behandelt, analog der Insulin-behandelten Zellen aufgearbeitet und analysiert und die mittlere Induzierbarkeit durch Insulin und LPS innerhalb jedes Versuches bestimmt. Für die Auswertung wurden nur Experimente berücksichtigt, die alle in diesem Versuchssatz mit einbezogenen Stimulanzien und Stimulanzkombinationen [(B, C): Insulin und LPS, (D): Insulin, LPS, PD98059 und Insulin + PD98059, LPS + PD98059] enthielten. Darstellung: Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in der Abbildung jedoch nur die Genexpressionen dargestellt, die durch Insulin (B, C) bzw. durch Insulin, PD98059, Insulin + PD98059 (D) und durch die entsprechende Mediumkontrolle ausgelöst wurden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 7 (A), 6 (B, C) oder 3 (D) unabhängigen Experimenten und gegebenenfalls jeweils ein repräsentativer Western Blot (vollständige Blots in Abb. 78 im Anhang Punkt 7.6). Statistik: zweiseitiger *t*-Test für ungepaarte Stichproben (A-C) bzw. *Two-way ANOVA* mit *Dunnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tukey's multiple comparisons test*, um Stimulanzien untereinander zu vergleichen (D); *: $p \leq 0,05$; ***: $p \leq 0,001$. Anmerkung: Alle Zellkulturexperimente flossen auch in die Berechnung der in Abb. 15 dargestellten Daten mit ein. Beteiligte: Ein Teil der Daten wurde bereits, in geteilter Erstautorenschaft, publiziert [202].

Zusammenfassend ist es unwahrscheinlich, dass der MAP-Kinase-Signalweg relevant für die Insulin-induzierte Expression von IL-1 β und möglicherweise auch von anderen pro-inflammatorischen Signalen ist. Vielmehr kann vermutet werden, dass die Insulin-induzierte Expression pro-inflammatorischer Mediatoren über den PI3K-Akt-Signalweg mit anschließender Aktivierung von NF- κ B vermittelt wird.

3.1.3 Insulin-induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid-abhängigen Expression pro-inflammatorischer Zytokine in Makrophagen

Es konnte eine Insulin-induzierte Expressionssteigerung zahlreicher pro-inflammatorischer Mediatoren in U937- und THP-1-Makrophagen nachgewiesen werden (vgl. 3.1.1). Übergewichtige Personen weisen häufig erhöhte Insulinspiegel auf und besitzen ein erhöhtes Risiko, an Typ-2-Diabetes zu erkranken [4]. Außerdem weisen übergewichtige Personen in der Regel eine erhöhte Darmpermeabilität auf, welche das Eindringen von Pathogenen und anderer körperfremder Substanzen erleichtert und so die Entstehung einer Entzündung fördert [206, 207]. Zusätzlich ist eine fett- oder fructosereiche Ernährung, selbst in normalgewichtigen Personen, mit einem erhöhten Plasmaspiegel des bakteriellen Bestandteils LPS assoziiert [153, 208, 209]. Es gibt Hinweise darauf, dass eine Hyperinsulinämie die LPS-induzierte Entzündungsantwort beeinflussen kann [188, 194, 195]. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob Insulin die LPS-induzierte Entzündungsantwort in den humanen Makrophagen-artigen Zelllinien U937 und THP-1 und in aus Vollblut isolierten, primären humanen Makrophagen weiter verstärkt.

U937-Makrophagen

In U937-Makrophagen induzierte LPS die TNF α -mRNA-Expression auf das 2,7-fache der Mediumkontrolle (Abb. 9A). Insulin verstärkte die LPS-induzierte TNF α -mRNA-Expression signifikant auf das 3,8-fache der Mediumkontrolle. Die mRNA-Expressionen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und IL-8 waren in LPS-stimulierten U937-Makrophagen jeweils 5,3-, 12,1- bzw. 6,7-fach induziert und wurde durch gleichzeitige Stimulation mit Insulin signifikant auf das 10,0-, 18,8- bzw. 10,0-fache der Mediumkontrolle erhöht (Abb. 9B, C, D). Diese Steigerungen waren mehr als additiv (Insulin allein: 2,1-, 1,8- bzw. 2,2-fach) und laut zweifaktorieller Varianzanalyse (*Two-way ANOVA*) interagierten Insulin und LPS bei allen drei Genen signifikant miteinander (Tabelle 5 in Anhang Punkt 7.1).

Die LPS-induzierte OSM-mRNA-Expression (3,5-fach) wurde durch Insulin annähernd additiv, aber nicht signifikant interagierend (Tabelle 5 in Anhang Punkt 7.1), auf das 5,0-fache der Mediumkontrolle gesteigert (Abb. 9F). Auf Proteinebene steigerte Insulin signifikant den Pro-IL-1 β -Gehalt in Zelllysaten und IL-1 β -Gehalt in Überständen LPS-stimulierter U937-Makrophagen, jedoch nicht den Pro-IL-1 β -Gehalt im Überstand dieser Zellen (Abb. 10A-C). Der verwendete Antikörper wäre, laut Hersteller, auch in der Lage gewesen, prozessiertes IL-1 β zu detektieren. Jedoch konnte dies selbst nach Stimulation der Makrophagen mit LPS weder im Zelllysate noch im Überstand nachgewiesen werden. Die IL-8-Proteinexpression wurde durch LPS auf das 2,9-fache der Mediumkontrolle induziert (Abb. 10D). Durch gleichzeitige Stimulation mit Insulin wurde die IL-8-Proteinexpression mehr als additiv (Insu-

lin allein: 2,2-fach) und signifikant interagierend (Tabelle 5 in Anhang Punkt 7.1) auf das 6,6-fache der Mediumkontrolle erhöht. Im Gegensatz zu den mRNA-Expressionen der anderen gemessenen Zytokine wurde die IL-18-mRNA-Expression weder durch LPS noch durch eine Kombination aus LPS und Insulin induziert (Abb. 9E). LPS-stimulierte U937-Makrophagen wiesen keine Induktion der CCL2-mRNA-Expression auf (Abb. 9G). Eine Kombination aus Insulin und LPS führte im Vergleich zu Insulin-stimulierten Zellen nicht zu einer Expressionsteigerung von CCL2.

Während einer Hyperinsulinämie werden im Blutplasma Konzentrationen von über 100 mU/l Insulin (entspricht circa 0,6 nM) gemessen [210]. Da pankreatische Hormone direkt über das Pfortadersystem zur Leber transportiert werden, kann jedoch davon ausgegangen werden, dass Kupffer-Zellen sehr viel höheren Insulinkonzentrationen, welche im unteren nanomolaren Bereich liegen, ausgesetzt sind. In weiteren Experimenten wurden daher U937-Makrophagen mit den physiologisch relevanten Konzentrationen von 4×10 nM bzw. 4×1 nM Insulin (Zugabe nach 0, 12, 16 und 20 Stunden) stimuliert. Auch diese geringen Konzentrationen an Insulin verstärkten die LPS-induzierten mRNA-Expressionen der pro-inflammatorischen Mediatoren TNF α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 in U937-Makrophagen (Abb. 64 und Abb. 65 in Anhang Punkt 7.2).

Eine erhöhte Darmpermeabilität in übergewichtigen Personen kann das Eindringen von Bakterien und bakteriellen Bestandteilen in den Blutkreislauf begünstigen [206]. Das für diese Arbeit verwendete LPS ist ein Bestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien. Im Weiteren sollte getestet werden, ob auch eine 24-stündige Inkubation der U937-Makrophagen mit Lyophilisaten (0,33 μ g Trockenmasse/ μ l) des gramnegativen Bakteriums *Escherichia coli* die Expressionen pro-inflammatorischer Mediatoren begünstigt. Als Kontrolle wurden U937-Makrophagen mit Lyophilisaten (0,33 μ g Trockenmasse/ μ l) des grampositiven Bakteriums *Clostridium ramosum* inkubiert. Im Gegensatz zu *Clostridium ramosum* induzierte *Escherichia coli* signifikant die TNF α , IL-1 β , IL-6 und OSM-mRNA-Expressionen (Abb. 66 in Anhang Punkt 7.2). Insulin verstärkte die *Escherichia coli*-induzierte TNF α - und IL-6-mRNA-Expressionen signifikant und die *Escherichia coli*-induzierten IL-1 β - und OSM-mRNA-Expression tendenziell.

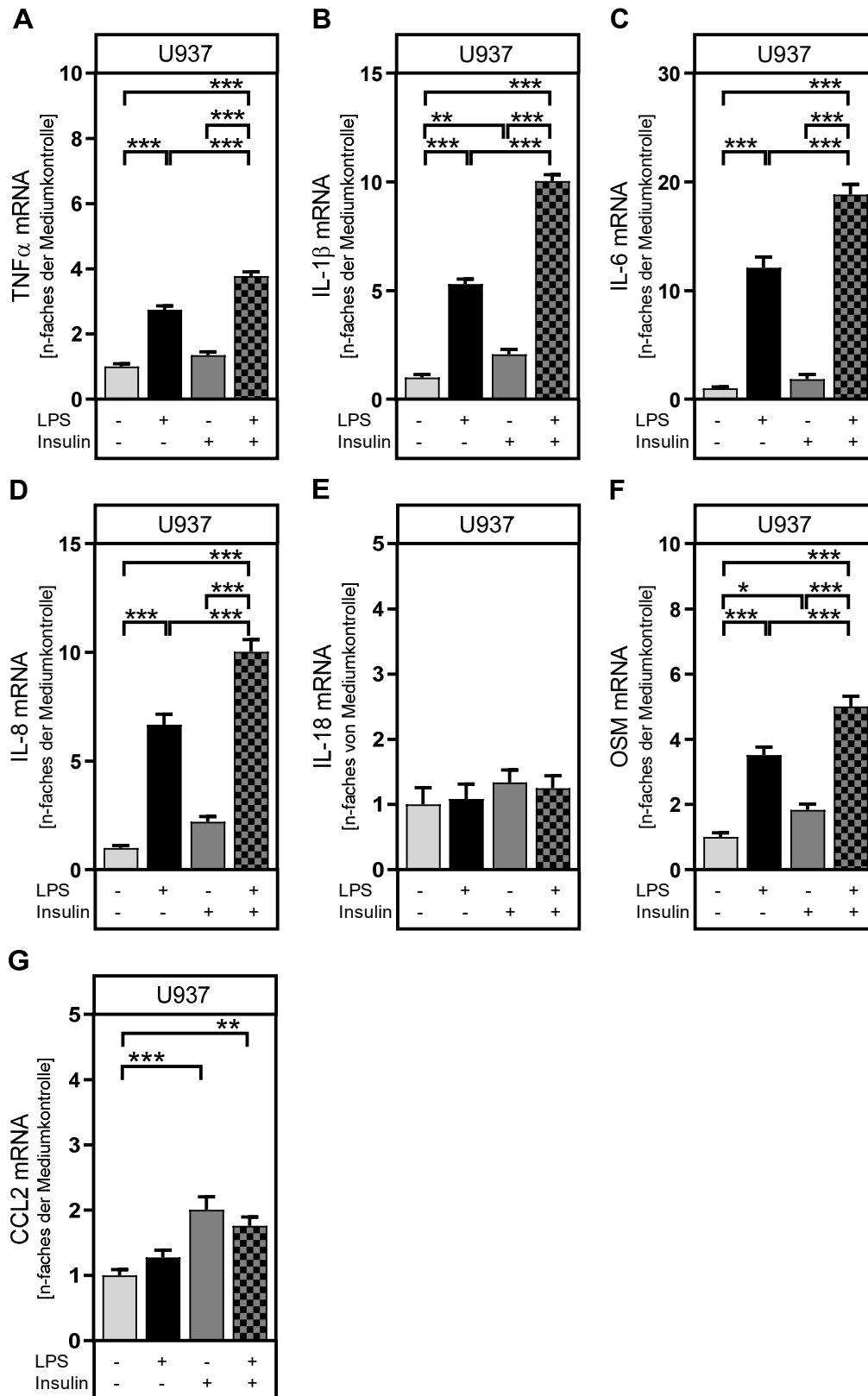


Abb. 9: Insulin-induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid-abhängigen mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in U937-Makrophagen

Die humane Zelllinie U937 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin und/ oder 100 ng/ml LPS für 24 h. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. Auswertung: Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet und für die

mittlere Induzierbarkeit durch Insulin, LPS und LPS + Insulin innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente berücksichtigt, die alle in diesem Versuchsset mit einbezogenen Stimulanzen und Stimulanzkombinationen (Insulin, LPS und Insulin + LPS) enthielten. Darstellung: Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 20 (A), 38 (B), 14 (C), 12 (D), 4 (E), 17 (F) oder 13 (G) unabhängigen Experimenten. Statistik: *Two-way ANOVA* mit *Dunnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; statistische Analyse der Interaktion von Insulin und LPS mittels *Two-way ANOVA* ist in Tab. 5 im Anhang 7.1 dargestellt; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. Anmerkung: Alle Zellkulturexperimente flossen auch in die Berechnung der in Abb. 2 dargestellten Daten mit ein. Außerdem flossen 3 (A, B, F) oder 2 (C) Zellkulturexperimente auch in die Berechnung der in Abb. 31 und Abb. 34 dargestellten Daten mit ein. Beteiligte: (A-D, F, G): Einige Zellkulturexperimente (einschließlich RNA-Isolation, cDNA-Synthese und qPCR) wurden von Rodolfo Gonzalez Camargo im Rahmen seiner Doktorarbeit durchgeführt. (B, D): Ein Teil der Daten wurde bereits, in geteilter Erstautorenschaft, publiziert [203].

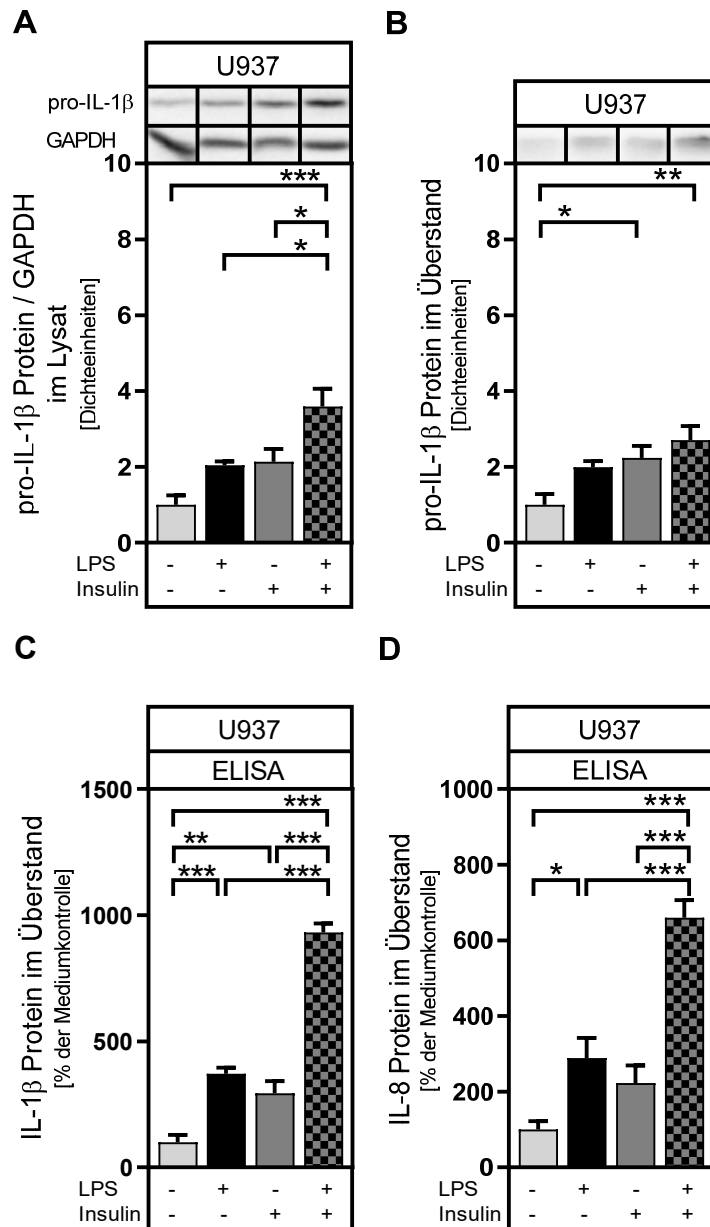


Abb. 10: Insulin-induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid-abhängigen Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren in U937-Makrophagen

Die humane Zelllinie U937 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin und/ oder 100 ng/ml LPS für 24 h. (A): Proteine wurden, wie unter 6.2.10 dargestellt, isoliert und die Expression von GAPDH und Pro-IL-1 β mittels Western Blot (siehe 6.2.11) analysiert und die Bandenintensität quantifiziert. (B): Proteine aus Zellkulturüberständen wurden mittels Acetonfällung (siehe 6.2.10) aufkonzentriert, die Expression von Pro-IL-1 β mittels Western Blot (siehe 6.2.11) analysiert und die Bandenintensität quantifiziert. (C, D): Der IL-8 bzw. IL-1 β -Gehalt in Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA, wie unter 6.2.12 beschrieben, untersucht. **Auswertung:** Sowohl Western Blot- als auch ELISA-Daten wurden auf die Summe aller Proteinexpressionen (Mediumkontrolle, Insulin, LPS, LPS + Insulin) innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchssatz untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen (Insulin, LPS und Insulin + LPS) enthielten. **Darstellung:** Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 6 (A, B, D) oder 7 (C) unabhängigen Experimenten und gegebenenfalls jeweils ein repräsentativer Western Blot (vollständige Blots in Abb. 76 im Anhang Punkt 7.6). **Statistik:** Two-way ANOVA mit *Dunnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; statistische Analyse der Interaktion von Insulin und LPS mittels *Two-way ANOVA* ist in Tab.5 im Anhang Punkt 7.1 dargestellt; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$;

***: $p \leq 0,001$. Anmerkung: Alle Zellkulturexperimente flossen auch in die Berechnung der in Abb. 3 dargestellten Daten mit ein. (C, D): Außerdem flossen alle Zellkulturexperimente auch in die Berechnung der in Abb. 32 und Abb. 35 dargestellten Daten mit ein. Beteiligte: (C): Die Bestimmung der IL-1 β -Konzentrationen mittels ELISA wurde von Dr. Janin Henkel durchgeführt. (C, D): Ein Teil der Daten wurde bereits, in geteilter Erstautorenschaft, publiziert [203].

THP-1-Makrophagen

LPS-stimulierte THP-1-Makrophagen wiesen signifikant erhöhte TNF α - (4,0-fach), IL-1 β - (1,8-fach), IL-6- (3,6-fach) und IL-8-mRNA-Expressionen (6,0-fach) auf (Abb. 11A-D). Die LPS-induzierte TNF α -mRNA-Expression wurde nicht durch eine gleichzeitige Stimulation mit Insulin gesteigert (Abb. 11A). Im Gegensatz dazu steigerte Insulin signifikant die LPS-induzierten mRNA-Expressionen von IL-1 β , IL-6 und IL-8 auf das 2,7-, 8,4- bzw. 9,2-fache der Mediumkontrolle (Abb. 11B-D). Insulin-stimulierte THP-1-Makrophagen wiesen eine signifikant induzierte OSM-mRNA-Expression auf (vgl. 3.1.1; Abb. 11E). LPS induzierte nicht die OSM-mRNA-Expression und steigerte auch nicht die durch Insulin induzierte Expression.

Primäre humane Makrophagen

In LPS-stimulierten primären humanen Makrophagen waren die TNF α -, IL-1 β -, IL-6- und IL-8-mRNA-Expressionen im Vergleich zu unbehandelten Makrophagen signifikant auf das 3,0-, 88,7-, 119,5- bzw. 28,4-fache induziert (Abb. 12A-D). Obwohl Insulin allein in primären humanen Makrophagen nicht die mRNA-Expressionen von IL-1 β und IL-6 induzierte, wurden die LPS-induzierten mRNA-Expressionen von IL-1 β und IL-6 durch Insulin signifikant auf das 134,8- bzw. das 180,8-fache der Mediumkontrolle erhöht (Abb. 12B, C). Auch auf Proteinebene wurde die LPS-induzierte IL-1 β -Expression durch Insulin signifikant vom 31,8-fachen der Mediumkontrolle auf das 57,0-fache der Mediumkontrolle gesteigert (Abb. 13). Eine zusätzliche Stimulation der LPS-behandelten primären humanen Makrophagen mit Insulin verstärkte jedoch nicht die mRNA-Expressionen von TNF α und IL-8 (Abb. 12A, D). Die CCL2-mRNA-Expression wurde weder durch LPS noch durch Insulin noch durch eine Kombination aus Insulin und LPS signifikant induziert (Abb. 12E).

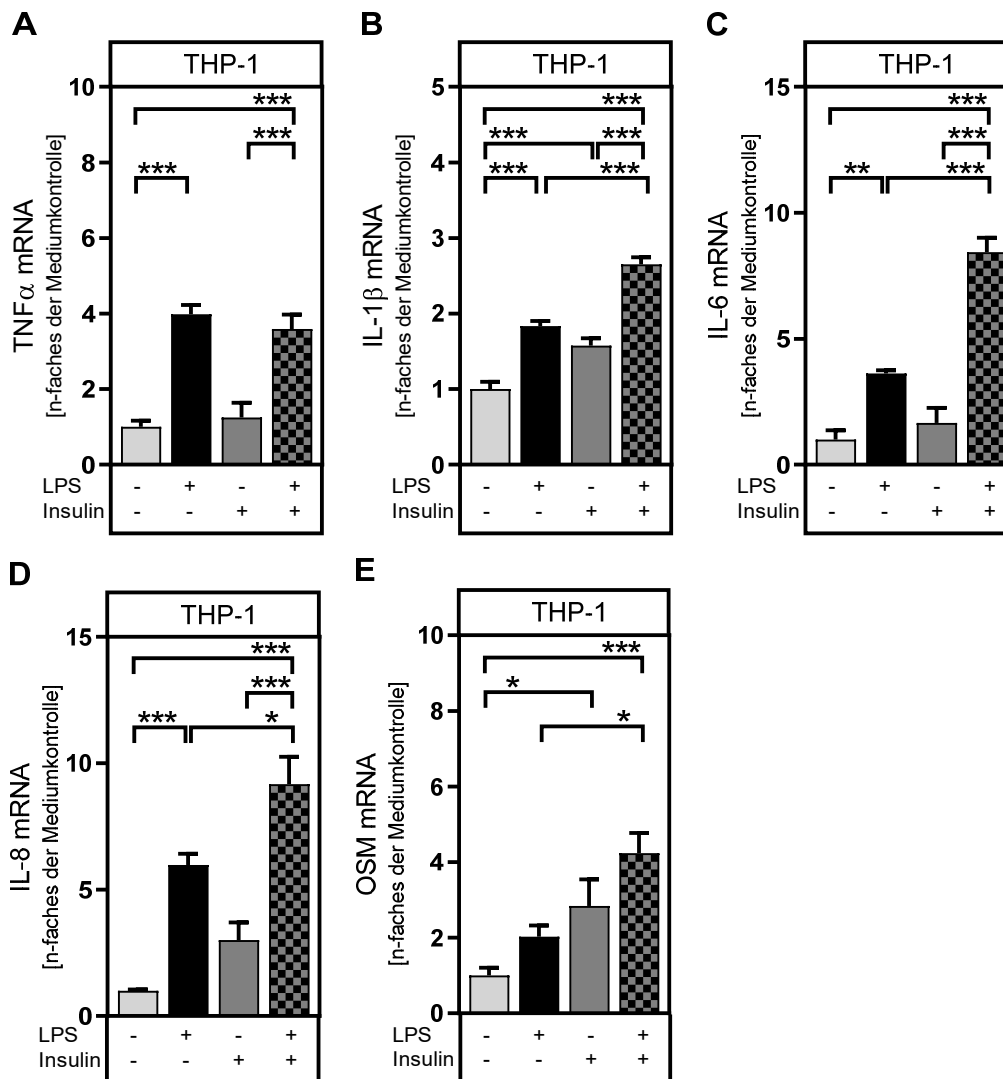


Abb. 11: Insulin-induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid-abhängigen mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in THP-1-Makrophagen

Die humane Zelllinie THP-1 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin und/ oder 100 ng/ml LPS für 24 h. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. Auswertung: Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet und für die mittlere Induzierbarkeit durch Insulin, LPS und LPS + Insulin innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchssset untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen (Insulin, LPS und Insulin + LPS) enthielten. Darstellung: Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 6 (A, C, E), 18 (B) oder 5 (D) unabhängigen Experimenten. Statistik: *Two-way ANOVA* mit *Dunnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; statistische Analyse der Interaktion von Insulin und LPS mittels *Two-way ANOVA* ist in Tab. 5 im Anhang Punkt 7.1 dargestellt; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. Anmerkung: Alle Zellkulturexperimente flossen auch in die Berechnung der in Abb. 4 dargestellten Daten mit ein. Außerdem flossen alle (A, D, E) oder 6 (B) Zellkulturexperimente auch in die Berechnung der in Abb. 33 und Abb. 36 dargestellten Daten mit ein.

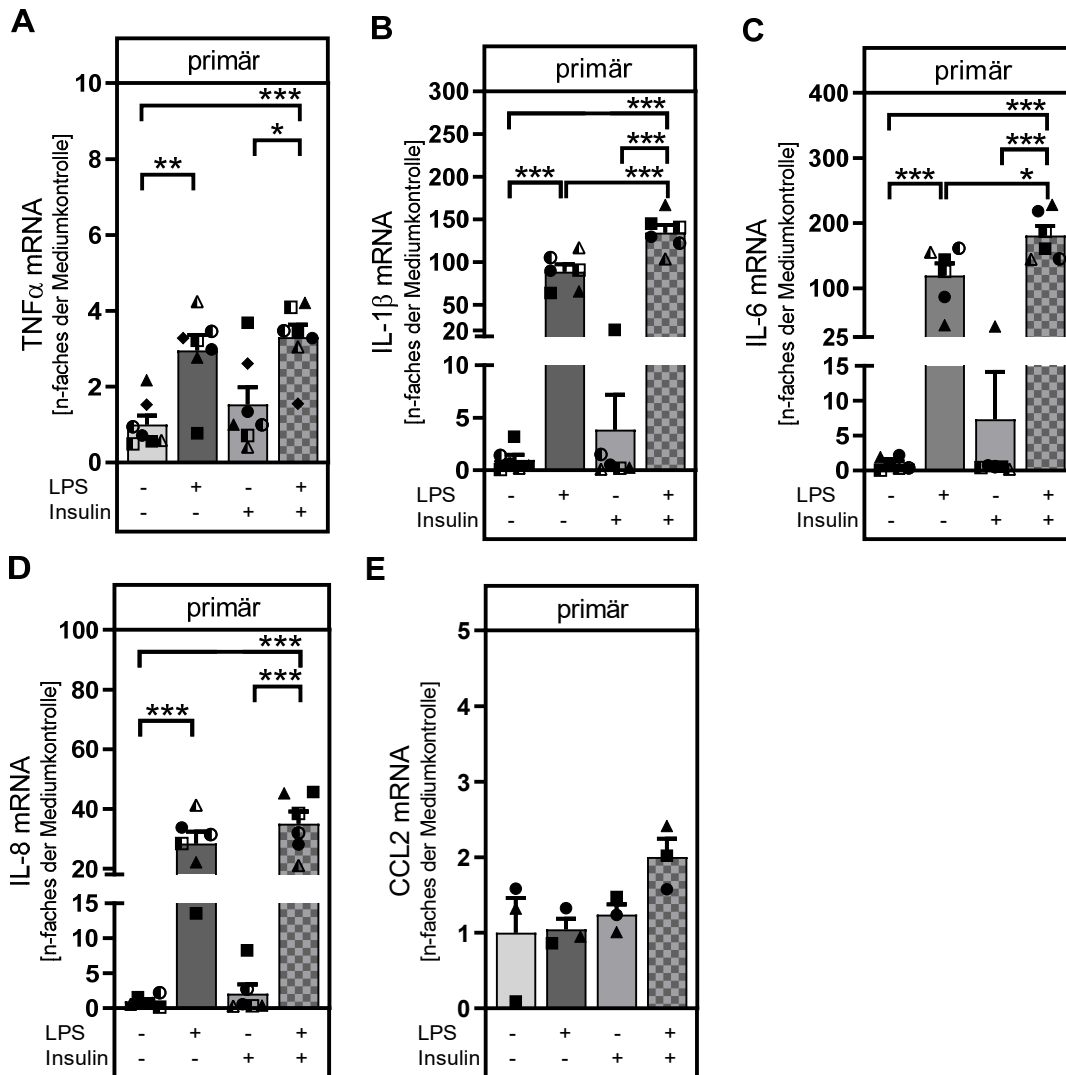


Abb. 12: Insulin-induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid-abhängigen mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in primären humanen Makrophagen

Primäre humane Monozyten wurden, wie unter 6.2.2 beschrieben, isoliert, kultiviert und für 8 Tage mit GM-CSF differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin und/ oder 100 ng/ml LPS für 24 h. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.6 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. Auswertung: Als Referenzgene dienen β -Aktin, GAPDH und HPRT. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet. Die Berechnungen wurden mit jedem Referenzgen separat durchgeführt und im Anschluss das geometrische Mittel der berechneten Induktionen gebildet. Die Daten wurden für die mittlere Induzierbarkeit durch Insulin und LPS innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchssatz untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen (Insulin, LPS und Insulin + LPS) enthielten. Darstellung: Dargestellt sind die Einzelwerte und die Mittelwerte \pm SEM von 7 (A), 6 (B-D) oder 3 (E) unabhängigen Experimenten. Gleiche Symbole zur Darstellung der Einzelwerte kennzeichnen die Zugehörigkeit zu ein und demselben Probanden. Statistik: *Two-way ANOVA* mit *Dunnnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; statistische Analyse der Interaktion von Insulin und LPS mittels *Two-way ANOVA* ist in Tab. 5 im Anhang Punkt 7.1 dargestellt; *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$. Anmerkung: Alle Zellkulturexperimente flossen auch in die Berechnung der in Abb. 5 dargestellten Daten mit ein. Beteiligte: Die Daten wurden bereits, in geteilter Erstautorenschaft, publiziert [203].

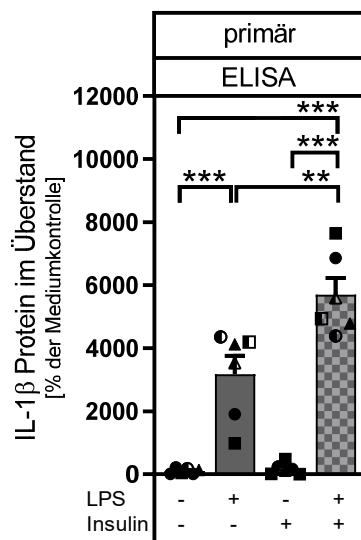


Abb. 13: Insulin-induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid-abhängigen Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren in primären humanen Makrophagen

Primäre humane Monozyten wurden, wie unter 6.2.2 beschrieben, isoliert, kultiviert und für 8 Tage mit GM-CSF differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin und/ oder 100 ng/ml LPS für 24 h. Der IL-1 β -Gehalt in Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA, wie unter 6.2.12 beschrieben, untersucht. **Auswertung:** Die Daten wurden auf die Summe aller Proteinexpressionen (Mediumkontrolle, Insulin, LPS, LPS + Insulin) innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchssatz untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen (Insulin, LPS und Insulin + LPS) enthielten. **Darstellung:** Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 6 unabhängigen Experimenten. **Statistik:** *Two-way ANOVA* mit *Dunnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; statistische Analyse der Interaktion von Insulin und LPS mittels *Two-way ANOVA* ist in Tab. 5 im Anhang Punkt 7.1 dargestellt; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. **Beteiligte:** Die Bestimmung der IL-1 β -Konzentrationen mittels ELISA wurde von Dr. Janin Henkel durchgeführt. Die Daten wurden bereits, in geteilter Erstautorenschaft, publiziert [203].

Zusammenfassung

Zusammenfassend verstärkte Insulin sowohl in den zu Makrophagen differenzierten Zelllinien U937 und THP-1 als auch in primären humanen Makrophagen die LPS-induzierte mRNA-Expression der Zytokine IL-1 β und IL-6. Erhöhte Mengen an Pro-IL-1 β und IL-1 β wurden im Zelllysat und im Überstand LPS-stimulierter U937-Makrophagen nach zusätzlicher Gabe von Insulin nachgewiesen. Die LPS-induzierte IL-8-mRNA-Expression wurde durch Insulin in U937- und THP-1-Makrophagen signifikant und in primären humanen Makrophagen tendenziell gesteigert. Eine durch Insulin verstärkte LPS-induzierte IL-8-Proteinproduktion wurde im Zellkulturüberstand von U937-Makrophagen nachgewiesen. Die LPS-induzierte TNF α -mRNA-Expression wurde in U937-Makrophagen signifikant durch Insulin gesteigert. Im Gegensatz dazu hatte Insulin keinen Einfluss auf die LPS-induzierte TNF α -mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen und primären humanen Makrophagen. Abweichend zu THP-1-Makrophagen wurde in U937-Makrophagen die OSM-mRNA-Expression durch LPS induziert und diese Induktion durch Insulin zusätzlich gesteigert. Es wurde kein synergistischer Effekt zwischen Insulin- und LPS-Stimulation für die IL-18-

mRNA-Expression in U937-Makrophagen und die CCL2-mRNA-Expression in U937-Makrophagen und primären humanen Makrophagen beobachtet.

3.1.4 Molekularer Mechanismus der Insulin-induzierten Verstärkung einer Lipopolysaccharid-abhängigen Expression pro-inflammatorischer Zytokine in Makrophagen

LPS vermittelt die Induktion pro-inflammatorischer Mediatoren hauptsächlich über den TLR4 [148]. Den TLR nachgeschaltet sind Signalkaskaden zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP-1 und Elk-1 [151, 152, 154]. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Insulin-induzierte Expression pro-inflammatorischer Mediatoren über den NF- κ B-Signalweg vermittelt wird (vgl. 3.1.2). Außerdem verstärkte Insulin die LPS-induzierte Expression pro-inflammatorischer Mediatoren (vgl. 3.1.3). Daher sollte zunächst überprüft werden, ob die Verstärkung der LPS-induzierten Expression pro-inflammatorischer Mediatoren durch Insulin auf eine verstärkte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B zurück zu führen ist.

Die Stimulation der U937-Makrophagen mit LPS bewirkte keine signifikante Phosphorylierung der Kinase Akt und hatte auch keinen Einfluss auf die Insulin-induzierte Akt-Phosphorylierung (Abb. 14A). LPS-stimulierte U937-Makrophagen wiesen im Vergleich zu Kontrollmakrophagen jedoch eine signifikant gesteigerte Phosphorylierung der Kinase IKK β (1,7-fach; Abb. 14B) und des an NF- κ B gebundenen Inhibitors I κ B (2,0-fach; Abb. 14C) auf. Obwohl auch Insulin die IKK β -Phosphorylierung induzierte, hatte es keinen Einfluss auf die LPS-induzierte IKK β -Phosphorylierung. Auch die LPS-induzierte Phosphorylierung von I κ B wurde nicht durch gleichzeitige Stimulation mit Insulin moduliert. Die mRNA Expression des NF- κ B-Koaktivators RIP140 wurde tendenziell, aber nicht signifikant durch LPS induziert (Abb. 14D). Obwohl weder Insulin noch LPS allein die mRNA-Expression von RIP140 induzierte, wurde die RIP140-mRNA-Expression durch eine Kombination aus Insulin und LPS signifikant gesteigert.

Obwohl die Insulin-induzierte Expression pro-inflammatorischer Mediatoren wahrscheinlich nicht über den MAP-Kinase-Signalweg vermittelt wird (vgl. 3.1.2), ist es möglich, dass Insulin die LPS-abhängige Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs verstärkt. Diese Hypothese sollte daher im nächsten Schritt überprüft werden. Eine Stimulation der U937-Makrophagen mit LPS hatte keinen Einfluss auf die basale und Insulin-abhängige Phosphorylierung von ERK1/2 (Abb. 15A). Weder Insulin noch LPS noch die Kombination aus beiden induzierte die mRNA-Expressionen von c-Jun und c-FOS (Abb. 15B, C).

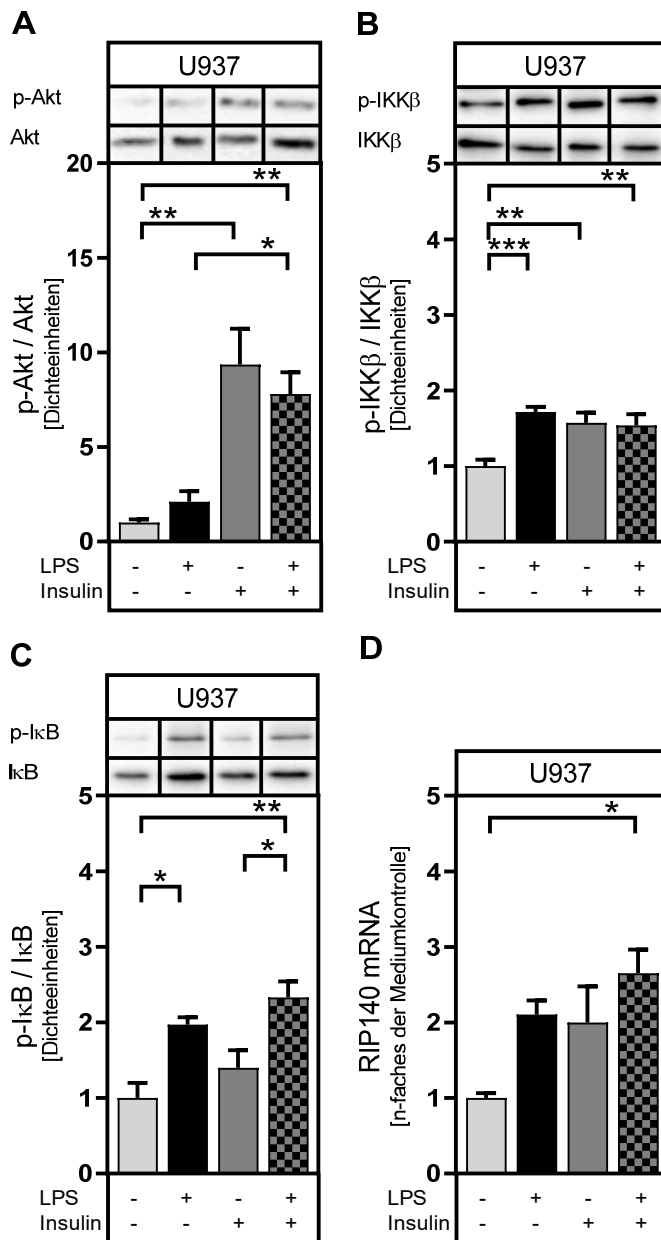


Abb. 14: Insulin-induzierte Verstärkung der Lipopolysaccharid-abhängigen Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB

Die humane Zelllinie U937 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin und/ oder 100 ng/ml LPS für 1 h (A-C) bzw. 24 h (D). (A-C): Proteine wurden, wie unter 6.2.10 dargestellt, isoliert und die Expression von Akt, p-Akt, IKKβ, p-IKKβ, IκB oder p-IκB mittels Western Blot (siehe 6.2.11) analysiert und die Bandenintensität quantifiziert. (D): Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.6 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. **Auswertung:** (A-C) Die Daten wurden auf die Summe aller Proteinexpressionen (Mediumkontrolle, LPS, Insulin und LPS + Insulin) innerhalb jedes Versuches normalisiert. (D): Als Referenzgen diente β-Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet und für die mittlere Induzierbarkeit durch Insulin, LPS und LPS + Insulin innerhalb jedes Versuches normalisiert. (A-D): Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchsset untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen enthielten. **Darstellung:** Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 4 (C), 7 (B) oder 3 (A, D) unabhängigen Experimenten und gegebenenfalls jeweils ein repräsentativer Western Blot (vollständige Blots in Abb. 77 und Abb. 78 im Anhang Punkt 7.6). **Statistik:** *Two-way ANOVA* mit *Dunnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; statistische Analyse der Interaktion von Insulin und LPS mittels *Two-way ANOVA* ist in

Tab. 5 im Anhang Punkt 7.1 dargestellt; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. Anmerkung: Alle Zellkultorexperimente flossen auch in die Berechnung der in Abb. 7 dargestellten Daten mit ein.

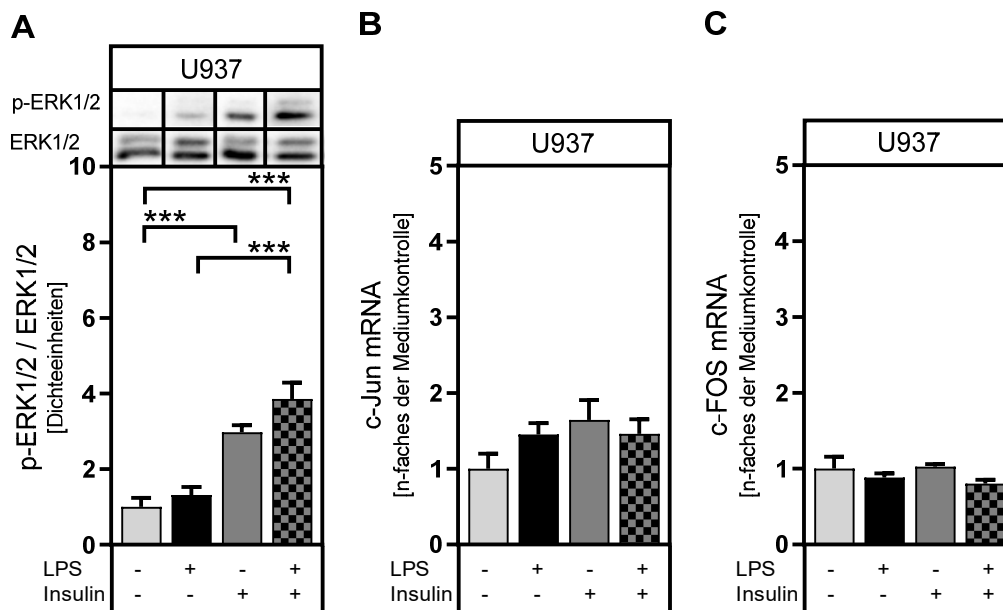


Abb. 15: Insulin-induzierte Verstärkung der Lipopolysaccharid-abhängigen Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges

Die humane Zelllinie U937 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin und/ oder 100 ng/ml LPS für 1 h (A) bzw. 24 h (B, C). (A): Proteine wurden, wie unter 6.2.10 dargestellt, isoliert und die Expression von ERK1/2 oder p-ERK1/2 mittels Western Blot (siehe 6.2.11) analysiert und die Bandenintensität quantifiziert. (B, C): Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. Auswertung: (A): Die Daten wurden auf die Summe aller Proteinexpressionen (Mediumkontrolle, LPS, Insulin und LPS + Insulin) innerhalb jedes Versuches normalisiert. (B, C): Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet und für die mittlere Induzierbarkeit durch Insulin, LPS und LPS + Insulin innerhalb jedes Versuches normalisiert. (A-C): Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchssatz untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen (Insulin, LPS und Insulin + LPS) enthielten. Darstellung: Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 7 (A) oder 6 (B, C) unabhängigen Experimenten und gegebenenfalls jeweils ein repräsentativer Western Blot (vollständige Blots in Abb. 78 im Anhang Punkt 7.6). Statistik: *Two-way ANOVA* mit *Dunnnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; statistische Analyse der Interaktion von Insulin und LPS mittels *Two-way ANOVA* ist in Tab. 5 im Anhang Punkt 7.1 dargestellt; ***: $p \leq 0,001$. Anmerkung: Alle Zellkultorexperimente flossen auch in die Berechnung der in Abb. 8 dargestellten Daten mit ein.

In einem weiteren Schritt sollte überprüft werden, ob Insulin und/ oder LPS die mRNA-Expressionen des Insulinrezeptors oder des LPS-Rezeptors TLR4 in U937-Makrophagen induzieren. Weder LPS allein noch Insulin allein noch eine Kombination aus Insulin und LPS induzierten den Insulinrezeptor oder den TLR4 (Abb. 16).

Abschließend zeigen die vorliegenden Daten nicht eindeutig, über welchen Mechanismus Insulin die LPS-induzierten Expressionen pro-inflammatorischer Mediatoren verstärkt.

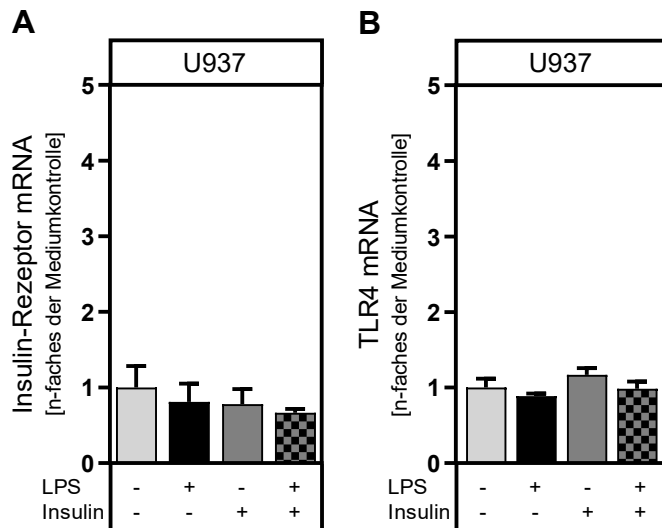


Abb. 16: Insulin-induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid-abhängigen Expression verschiedener Rezeptoren

Die humane Zelllinie U937 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin und/ oder 100 ng/ml LPS für 24 h. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. Auswertung: Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet und für die mittlere Induzierbarkeit durch Insulin, LPS und LPS + Insulin innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchsset untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen (Insulin, LPS und Insulin + LPS) enthielten. Darstellung: Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 3 (A) oder 4 (B) unabhängigen Experimenten. Statistik: *Two-way ANOVA* mit *Dunnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; statistische Analyse der Interaktion von Insulin und LPS mittels *Two-way ANOVA* ist in Tab. 5 im Anhang Punkt 7.1 dargestellt. Beteiligte: Ein Teil der Daten wurde bereits, in geteilter Erstautorenschaft, publiziert [202].

3.2 Palmitat-induzierte Steigerung der basalen und Stimulus-abhängigen Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in THP-1-Makrophagen

Studien weisen auf einen Zusammenhang zwischen erhöhter Sekretion von Fettsäuren aus dem insulinresistenten Fettgewebe übergewichtiger Personen und der Entstehung einer Insulinresistenz in anderen Organen und Geweben hin [23, 132]. Eine der am häufigsten vorkommenden gesättigten Fettsäuren im Blutplasma ist Palmitat [133]. Im Folgenden sollte daher untersucht werden, ob Palmitat über die Aktivierung von Makrophagen eine Entzündungsantwort auslösen kann und ob diese Entzündungsantwort durch eine Hyperinsulinämie gesteigert wird.

Zu Makrophagen ausdifferenzierte THP-1-Zellen wurden 24 Stunden mit 100 μ M Palmitat und/ oder 100 nM Insulin stimuliert und anschließend die mRNA-Expressionen ausgewählter pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine mittels qPCR bestimmt. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der IL-8-Konzentration im Überstand mittels ELISA.

Palmitat wird für die Durchführung von Zellkulturexperimenten in der Regel an Rinder-serumalbumin, welches mit LPS verunreinigt sein kann, gebunden. Diese Verunreinigungen können jedoch zur Aktivierung pro-inflammatorischer Mediatoren beitragen. In einigen Versuchen wurden daher die Stimulanzien mit dem Polypeptidantibiotikum Polymyxin B, welches LPS bindet und somit inaktiviert, behandelt, bevor sie zur Stimulation der Makrophagen eingesetzt wurden. Da in der vorliegenden Arbeit jedoch kein Einfluss der Vorbehandlung mit Polymyxin B auf die Expression pro-inflammatorischer Mediatoren beobachtet werden konnte (Abb. 68 in Anhang Punkt 7.3), wurden die Versuche mit und ohne Polymyxin B-Behandlung für die Auswertung zusammengefasst.

In THP-1-Makrophagen wurden die TNF α -, IL-1 β - und OSM-mRNA-Expressionen weder durch Palmitat induziert noch signifikant durch eine zusätzliche Stimulation mit Insulin beeinflusst (Abb. 17A, B, E). Die CCL2-mRNA-Expression wurde durch Insulin, nicht jedoch durch Palmitat, induziert (Abb. 17F). Eine Kombination aus Palmitat und Insulin induzierte eine stärkere mRNA-Expression als die Einzelstimulanzien. Laut *Two-way ANOVA* war die Interaktion zwischen Insulin und Palmitat signifikant (Tabelle 6 in Anhang Punkt 7.1).

Palmitat induzierte signifikant die IL-6-mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen (Abb. 17C). Diese wurde jedoch nicht durch zusätzliche Stimulation mit Insulin gesteigert.

100 μ M Palmitat induzierten, im Gegensatz zu 100 μ M der ungesättigten Fettsäure Oleat (Abb. 69B in Anhang Punkt 7.3), die mRNA-Expression des Zytokins IL-8 (Abb. 17D). Insulin steigerte die Palmitat-induzierte IL-8-mRNA-Expression und den IL-8-Proteingehalt im Überstand signifikant (Abb. 17D, Abb. 18), jedoch nicht signifikant interagierend (Tabelle 6 in Anhang Punkt 7.1).

Zusätzlich wurden U937-Zellen in Makrophagen ausdifferenziert und analog zu den THP-1-Makrophagen 24 Stunden mit 100 μ M Palmitat stimuliert. Palmitat-stimulierte U937-Makrophagen wiesen im Vergleich zu unbehandelten U937-Makrophagen jedoch keine Induktion der TNF α -, IL-1 β -, IL-6- und IL-8-mRNA-Expression auf (Abb. 70 im Anhang Punkt 7.3).

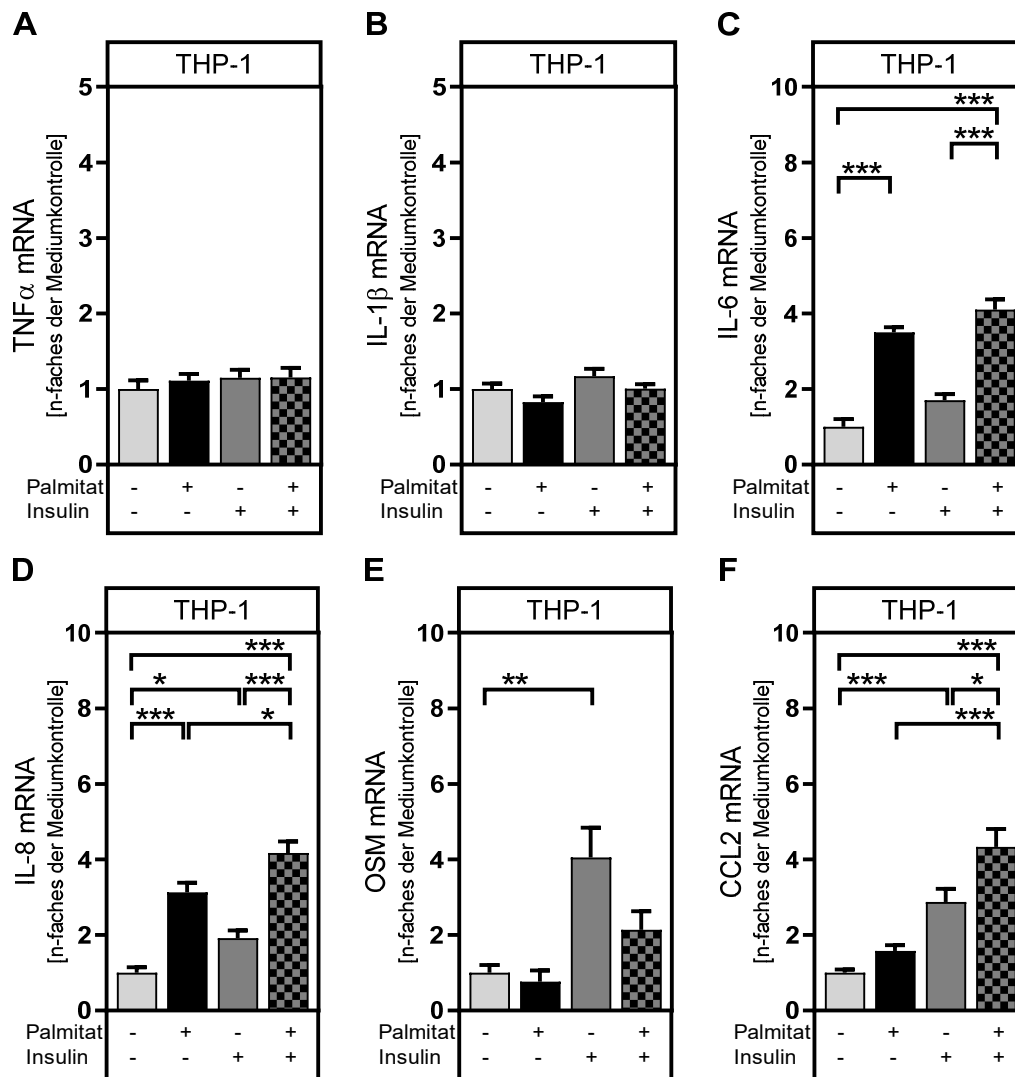


Abb. 17: Insulin-induzierte Steigerung der Palmitat-abhängigen mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in THP-1-Makrophagen

Die humane Zelllinie THP-1 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin und/ oder 100 μ M Palmitat für 24 h. In einigen Versuchen wurden die Stimulanzen 90 min mit 10 μ g/ml Polymyxin B vorinkubiert. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. **Auswertung:** Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet und für die mittlere Induzierbarkeit durch Insulin, Palmitat und Palmitat + Insulin innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchssset untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen (Insulin, Palmitat und Palmitat + Insulin) enthielten. **Darstellung:** Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 8 (A), 14 (B), 6 (C), 16 (D), 3 (E) oder 7 (F) unabhängigen Experimenten. **Statistik:** *Two-way ANOVA* mit *Dunnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; statistische Analyse der Interaktion von Insulin und Palmitat mittels *Two-way ANOVA* ist in Tab. 6 im Anhang Punkt 7.1 dargestellt; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. **Beteiligte:** (D): Die Daten wurde bereits, in geteilter Erstautorenschaft, publiziert [295].

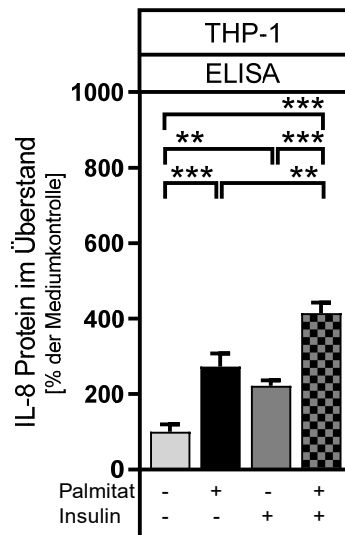


Abb. 18: Insulin-induzierte Steigerung der Palmitat-abhängigen Produktion des pro-inflammatorischen Mediators Interleukin-8 in THP-1-Makrophagen

Die humane Zelllinie THP-1 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 μ M Palmitat und/ oder 100 nM Insulin für 24 h. Die Stimulanzien wurden 90 min mit 10 μ g/ml Polymyxin B vorinkubiert. Der IL-8-Gehalt in Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA, wie unter 6.2.12 beschrieben, untersucht. Auswertung: Die Daten wurden auf die Summe der Proteinexpressionen durch Palmitat, Insulin und Palmitat + Insulin innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchssatz untersuchten Stimulanzien und Stimulanzkombinationen (Insulin, Palmitat und Palmitat + Insulin) enthielten. Darstellung: Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 6 unabhängigen Experimenten. Statistik: *Two-way ANOVA* mit *Dunnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzien untereinander zu vergleichen; statistische Analyse der Interaktion von Insulin und Palmitat mittels *Two-way ANOVA* ist in Tab. 6 im Anhang Punkt 7.1 dargestellt; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. Beteiligte: Die Daten wurde bereits, in geteilter Erstautorenschaft, publiziert [295].

3.3 Einfluss von Insulin oder Palmitat auf die Synthese von Prostaglandin E₂ in Makrophagen

Prostaglandine nehmen eine Schlüsselrolle im Entzündungsprozess ein. Neben Zytokinen werden Prostaglandine von Makrophagen als Antwort auf Endotoxine produziert [57]. Als Ausgangssubstrat für das PGE₂ dient Arachidonsäure. Letzere wird in einem mehrstufigen Prozess aus der essenziellen Fettsäure Linolsäure gebildet [63]. An diesem Prozess sind die Enzyme FADS2, ELOV5 und FADS1 beteiligt [63]. Die Enzyme COX2 und mPGES1 katalysieren die Umwandlung der Arachidonsäure in PGE₂ [56, 60, 61]. Es sollte nun untersucht werden, ob eine Hyperinsulinämie und/ oder erhöhte Spiegel an LPS oder Palmitat die Bildung von PGE₂ in Makrophagen beeinflussen.

Dazu wurden U937- oder THP-1- oder primäre humane Makrophagen 24 Stunden mit 100 nM Insulin und/ oder 100 ng/ml LPS oder 100 μ M Palmitat stimuliert und die mRNA-Expressionen der Arachidonsäure- und PGE₂-synthetisierenden Enzyme mit Hilfe der qPCR ermittelt. PGE₂ im Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA und der Gehalt an COX2 im Lysat mittels Western Blot-Analysen quantifiziert.

3.3.1 Insulin-induzierte Steigerung der basalen Prostaglandin E₂-Synthese in Makrophagen

U937-Makrophagen

Die PGE₂-Konzentration war in Überständen Insulin-stimulierter U937-Makrophagen doppelt so hoch wie in Kontrollmakrophagen (Abb. 19A). Auf Proteinebene war die Produktion des Enzyms COX2 tendenziell, aber nicht signifikant gesteigert (Abb. 19B). Auf mRNA-Ebene wurden die Enzyme der Arachidonsäuresynthese FADS2, ELOV5 und FASDS1 nicht durch Insulin induziert (Abb. 20A-C). Im Gegensatz dazu wurden beide Enzyme, die an der Umwandlung von Arachidonsäure in PGE₂ beteiligt sind, auf mRNA-Ebene induziert – die COX2-Expression 1,6-fach und die mPGES1-Expression 1,7-fach (Abb. 20D, E).

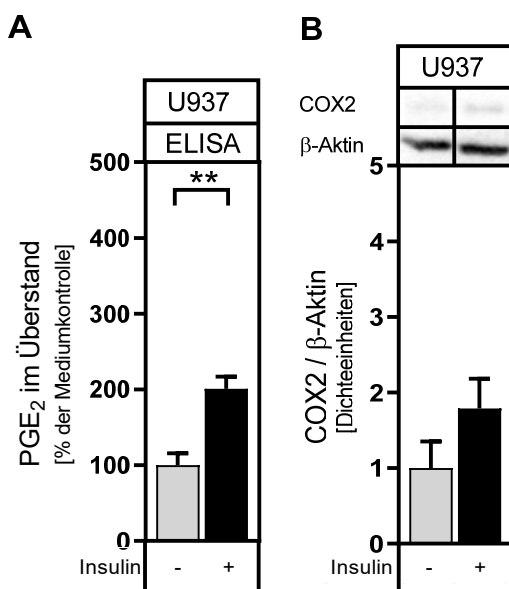


Abb. 19: Insulin-induzierte Produktion von Cyclooxygenase 2 und Prostaglandin E₂ in U937-Makrophagen

Die humane Zelllinie U937 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin für 24 h. (A): Der PGE₂-Gehalt in Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA, wie unter 6.2.13 beschrieben, untersucht. (B): Proteine wurden, wie unter 6.2.10 dargestellt, isoliert und die Expression von β-Aktin oder COX2 mittels Western Blot (siehe 6.2.11) analysiert und die Bandenintensität quantifiziert. Auswertung: Sowohl Western Blot als auch ELISA-Daten wurden auf die Summe aller Expressionen (Mediumkontrolle und Insulin) innerhalb jedes Versuches normalisiert. Darstellung: Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von 4 (A) oder 6 (B) unabhängigen Experimenten und gegebenenfalls ein repräsentativer Western Blot (vollständige Blots Abb. 79 im Anhang Punkt 7.6). Statistik: zweiseitiger *t*-Test für ungepaarte Stichproben; **: *p* ≤ 0,01. Anmerkung: Alle Zellkulturexperimente flossen auch in die Berechnung der in Abb. 24 (A, B) und in Abb. 49 (B) dargestellten Daten mit ein.

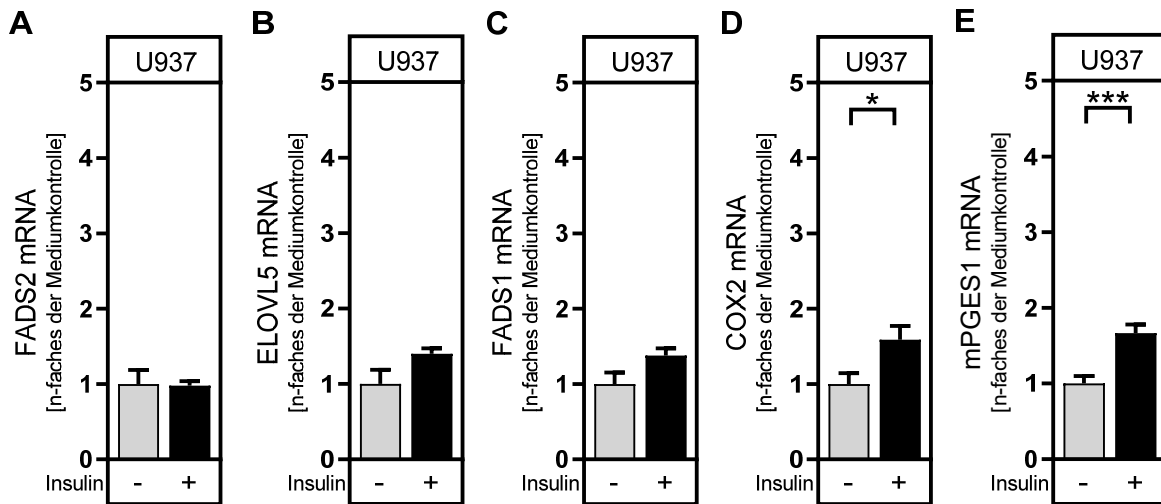


Abb. 20: Insulin-induzierte mRNA-Expression Arachidonsäure- und Prostaglandin E₂-synthetisierender Enzyme in U937-Makrophagen

Die humane Zelllinie U937 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin für 24 h. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. Auswertung: Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet. Für die Normalisierung wurden in jedem Versuch parallel Zellen mit 100 ng/ml LPS behandelt, analog der Insulin-behandelten Zellen aufgearbeitet und analysiert und die mittlere Induzierbarkeit durch Insulin und LPS innerhalb jedes Versuches bestimmt. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchsset untersuchten Stimulanzen (Insulin und LPS) enthielten. Darstellung: Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in der Abbildung nur die Genexpressionen dargestellt, die durch Insulin und durch die entsprechende Mediumkontrolle ausgelöst wurden, nicht jedoch die durch LPS ausgelösten Genexpressionen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 5 (A-C) oder 13 (D, E) unabhängigen Experimenten. Statistik: zweiseitiger t -Test für ungepaarte Stichproben; *: $p \leq 0,05$; ***: $p \leq 0,001$. Anmerkung: Alle (A-C, E) oder 11 (D) Zellkulturexperimente flossen auch in die Berechnung der in Abb. 25 dargestellten Daten mit ein. Außerdem flossen 5 Zellkulturexperimente auch in die Berechnung der in Abb. 45 und Abb. 48 dargestellten Daten mit ein. Beteiligte: (D, E): Ein Teil der Daten wurde bereits, in geteilter Erstautorenschaft, publiziert [202].

THP-1-Makrophagen

Wie in U937-Makrophagen war die PGE₂-Konzentration in Überständen Insulin-stimulierter THP-1-Makrophagen doppelt so hoch wie in den entsprechenden Kontrollmakrophagen (Abb. 21A). Im Gegensatz zu U937-Makrophagen wurde in THP-1-Makrophagen auf mRNA-Ebene neben den PGE₂-synthetisierenden Enzymen COX2 (3,3-fach) und mPGES1 (3,1-fach) auch das Arachidonsäure-synthetisierende Enzym FADS2 (1,4-fach) signifikant induziert (Abb. 22A, D, E). Die ELOVL5- und FADS1-mRNA-Expressionen wurden durch Insulin nicht signifikant beeinflusst (Abb. 22B, C). Übereinstimmend mit den Ergebnissen in U937-Makrophagen wurde der COX2-Proteingehalt in THP-1-Makrophagen tendenziell, aber nicht signifikant ($p=0,057$) durch Stimulation mit Insulin induziert (Abb. 21B).

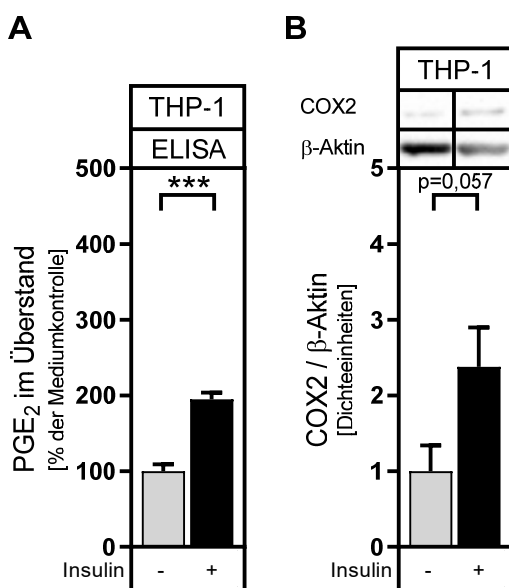


Abb. 21: Insulin-induzierte Produktion von Prostaglandin E₂ und Cyclooxygenase 2 in THP-1-Makrophagen

Die humane Zelllinie THP-1 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin für 24 h. (A): Der PGE₂-Gehalt in Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA, wie unter 6.2.13 beschrieben, untersucht. (B) Proteine wurden, wie unter 6.2.10 dargestellt, isoliert und die Expression von β -Aktin oder COX2 mittels Western Blot (siehe 6.2.11) analysiert und die Bandenintensität quantifiziert. Auswertung: Sowohl Western Blot als auch ELISA-Daten wurden auf die Summe aller Expressionen (Mediumkontrolle und Insulin) innerhalb jedes Versuches normalisiert. Darstellung: Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 13 (A) oder 5 (B) unabhängigen Experimenten und gegebenenfalls ein repräsentativer Western Blot (vollständige Blots in Abb. 80 im Anhang Punkt 7.6). Statistik: zweiseitiger t -Test für ungepaarte Stichproben; ***: $p \leq 0,001$. Anmerkung: (A): 7 Zellkulturexperimente flossen auch in die Berechnung der in Abb. 26 dargestellten Daten mit ein. Beteiligte: (A): Die Bestimmung der PGE₂-Konzentrationen mittels ELISA wurde von Dr. Janin Henkel durchgeführt.

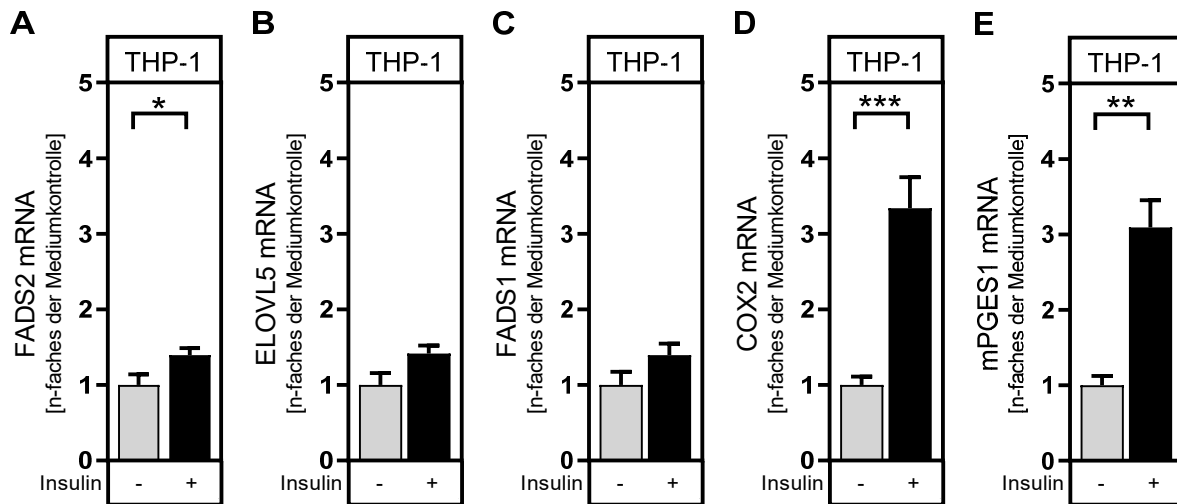


Abb. 22: Insulin-induzierte mRNA-Expression Arachidonsäure- und Prostaglandin E₂-synthetisierender Enzyme in THP-1-Makrophagen

Die humane Zelllinie THP-1 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin für 24 h. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. **Auswertung:** Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet. Für die Normalisierung wurden in jedem Versuch parallel Zellen mit 100 ng/ml LPS behandelt, analog der Insulin-behandelten Zellen aufgearbeitet und analysiert und die mittlere Induzierbarkeit durch Insulin und LPS innerhalb jedes Versuches bestimmt. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchssatz untersuchten Stimulanzen (Insulin und LPS) enthielten. **Darstellung:** Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in der Abbildung nur die Genexpressionen dargestellt, die durch Insulin und durch die entsprechende Mediumkontrolle ausgelöst wurden, nicht jedoch die durch LPS ausgelösten Genexpressionen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 6 (A-C), 5 (D) oder 3 (E) unabhängigen Experimenten. **Statistik:** zweiseitiger *t*-Test für ungepaarte Stichproben; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. **Anmerkung:** Alle Zellkulturexperimente flossen auch in die Berechnung der in Abb. 27, Abb. 47 und Abb. 50 dargestellten Daten mit ein.

Primäre humane Makrophagen

In Insulin-stimulierten primären humanen Makrophagen wurden die mRNA-Expressionen der PGE₂-synthetisierenden Enzyme COX2 und mPGES1 nicht signifikant induziert (Abb. 23). Auffällig ist, dass in Makrophagen eines Probanden (in Abb. 5 und Abb. 23 dargestellt mit ausgefüllten Quadraten) nach Insulin-Stimulation nicht nur die Expression pro-inflammatorischer Zytokine stark anstieg (vgl. 3.1.1), sondern auch die Expression PGE₂-synthetisierender Enzyme.

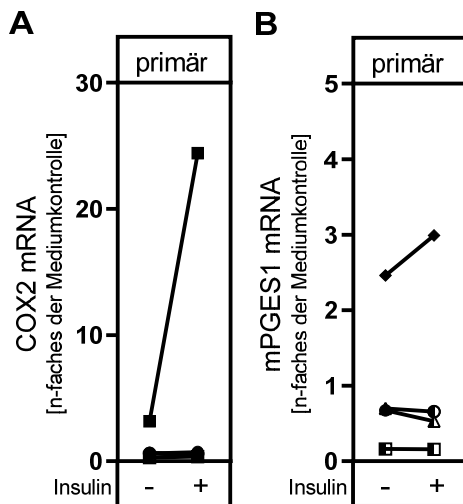


Abb. 23: Insulin-induzierte mRNA-Expression Prostaglandin E₂-synthetisierender Enzyme in primären humanen Makrophagen

Primäre humane Monozyten wurden, wie unter 6.2.2 beschrieben, isoliert, kultiviert und für 8 Tage mit GM-CSF differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin für 24 h. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.6 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. Auswertung: Als Referenzgene dienten β -Aktin, GAPDH und HPRT. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet. Die Berechnungen wurden mit jedem Referenzgen separat durchgeführt und im Anschluss das geometrische Mittel der berechneten Induktionen gebildet. Für die Normalisierung wurden in jedem Versuch parallel Zellen mit 100 ng/ml LPS behandelt, analog der Insulin-behandelten Zellen aufgearbeitet und analysiert und die mittlere Induzierbarkeit durch Insulin und LPS innerhalb jedes Versuches bestimmt. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchssatz untersuchten Stimulanzen (Insulin und LPS) enthielten. Darstellung: Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in der Abbildung nur die Genexpressionen dargestellt, die durch Insulin und durch die entsprechende Mediumkontrolle ausgelöst wurden, nicht jedoch die durch LPS ausgelösten Genexpressionen. Dargestellt sind die Einzelwerte von 6 (A) oder 4 (B) unabhängigen Experimenten. Gleiche Symbole zur Darstellung der Einzelwerte kennzeichnen die Zugehörigkeit zu ein und demselben Probanden. Statistik: zweiseitiger *t*-Test für gepaarte Stichproben. Anmerkung: Alle Zellkulturexperimente flossen auch in die Berechnung der in Abb. 28 dargestellten Daten mit ein.

3.3.2 Insulin-induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid-abhängigen Prostaglandin E₂-Synthese in Makrophagen

LPS ist ein Endotoxin, welches die Bildung von Prostaglandinen in Makrophagen induziert [57]. In dieser Arbeit (vgl. 3.1.3) konnte gezeigt werden, dass die LPS-induzierte Entzündungsantwort durch hohe Insulinspiegel weiter verstärkt wird. Insulin allein induzierte nicht nur die Expression pro-inflammatorischer Zytokine in Makrophagen (vgl. 3.1.1), sondern auch die Bildung von PGE₂ (vgl. 3.3.1). Im Folgenden soll untersucht werden, ob eine Hyperinsulinämie die LPS-induzierte PGE₂-Synthese in Makrophagen weiter verstärkt.

U937-Makrophagen

Die Insulin-induzierte PGE₂-Produktion und COX2-mRNA-Expression in U937-Makrophagen wiesen in der *Two-way ANOVA* keine Signifikanz auf. Insulin steigerte jedoch signifikant die LPS-induzierte PGE₂-Synthese von 360 % auf 680 % der Mediumkontrolle

(Abb. 24A). Diese Steigerung lag weit über dem additiven Wert im Vergleich zur durch die Einzelstimuli ausgelösten PGE₂-Produktion. LPS induzierte in U937-Makrophagen signifikant die mRNA-Expressionen der Enzyme ELOVL5 (1,9-fach), FADS1 (1,7-fach), COX2 (5,3-fach) und mPGES1 (2,3-fach), nicht jedoch die mRNA-Expression von FADS2 (Abb. 25). Die LPS-induzierten mRNA-Expressionen der Desaturasen FADS2 und FADS1 wurden durch eine gleichzeitige Inkubation mit Insulin signifikant reduziert, jeweils vom 1,2-fachen auf das 0,7-fache der Mediumkontrolle bzw. vom 1,7-fachen auf das 1,0-fache der Mediumkontrolle (Abb. 25A, C). Insulin hatte keinen Einfluss auf die LPS-induzierte ELOVL5-mRNA-Expression (Abb. 25B). Im Gegensatz dazu steigerte Insulin signifikant die LPS-induzierten mRNA-Expressionen der Enzyme COX2 und mPGES1, jeweils auf das 8,8-fache bzw. auf das 3,5-fache der Mediumkontrolle (Abb. 25D, E). Die 13,0-fache Steigerung der COX2-Proteinexpression in LPS-stimulierten U937-Makrophagen wurde durch eine gleichzeitige Stimulation mit Insulin signifikant auf das 31,2-fache der COX2-Proteinexpression in unbehandelten U937-Makrophagen gesteigert (Abb. 24B). Selbst geringere Konzentrationen von minimal 1 nM Insulin bewirkten noch eine signifikante Steigerung der LPS-induzierten COX2- und mPGES1-mRNA-Expressionen (Abb. 71 und Abb. 72 in Anhang Punkt 7.4).

THP-1-Makrophagen

Ähnlich wie in U937-Makrophagen war die Insulin-induzierte PGE₂-Produktion in THP-1-Makrophagen im zweiseitigen *t*-Test signifikant (vgl. 3.3.1), nicht jedoch in der *Two-way ANOVA* (Abb. 26). Insulin steigerte jedoch signifikant die PGE₂-Synthese in LPS-stimulierten Makrophagen von 255 % auf 785 % der Mediumkontrolle (Abb. 26). Diese Steigerung lag weit über dem additiven Wert im Vergleich zur durch die Einzelstimuli ausgelösten PGE₂-Produktion (Insulin: 215 %).

Im Gegensatz zu U937-Makrophagen induzierte LPS in THP-1-Makrophagen nicht die mRNA-Expressionen der Arachidonsäure- und PGE₂-synthetisierenden Enzyme (Abb. 27). Die mRNA-Expressionen der Arachidonsäure-synthetisierenden Enzyme FADS2, ELOVL5 und FADS1 wurden in THP-1-Makrophagen nicht durch eine gleichzeitige Stimulation mit LPS und Insulin beeinflusst (Abb. 27A, B, C). Übereinstimmend mit Ergebnissen aus Experimenten mit U937-Makrophagen bewirkte die gleichzeitige Stimulation mit LPS und Insulin im Vergleich zur Mediumkontrolle eine signifikante Steigerung der COX2- (5,9-fach) und der mPGES1-mRNA-Expressionen (7,9-fach) (Abb. 27D, E). Diese war im Falle von COX2 signifikant erhöht im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit LPS und tendenziell erhöht im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Insulin. Die Expressionssteigerung von mPGES1 durch die Kombination aus LPS und Insulin war sowohl zur alleinigen Stimulation mit Insulin als auch zur alleinigen Stimulation mit LPS signifikant.

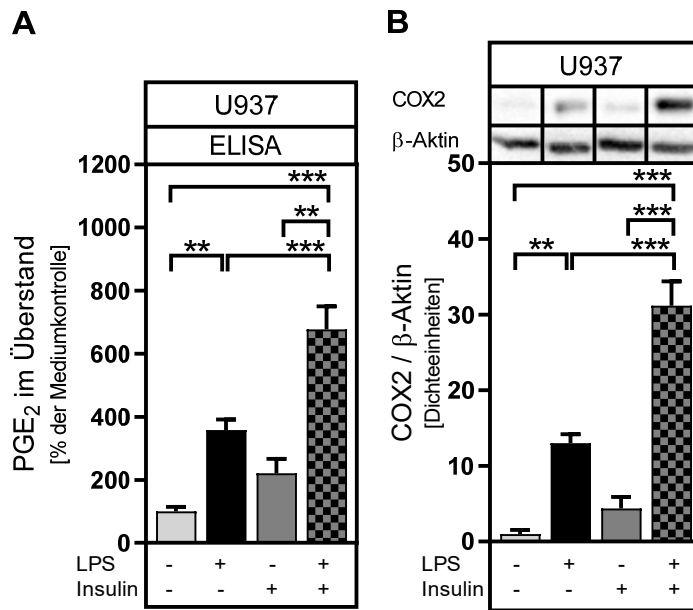


Abb. 24: Insulin-induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid-abhängigen Produktion von Prostaglandin E₂ und Cyclooxygenase 2 in U937-Makrophagen

Die humane Zelllinie U937 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin und/ oder 100 ng/ml LPS für 24 h. (A): Der PGE₂-Gehalt in Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA, wie unter 6.2.12 beschrieben, untersucht. (B): Proteine wurden, wie unter 6.2.10 dargestellt, isoliert und die Expressionen von β-Aktin und COX2 mittels Western Blot (siehe 6.2.11) analysiert und die Bandenintensität quantifiziert. Auswertung: Sowohl Western Blot- als auch ELISA-Daten wurden auf die Summe aller Expressionen (Mediumkontrolle, Insulin, LPS, LPS + Insulin) innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchsset untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen (Insulin, LPS und LPS + Insulin) enthielten. Darstellung: Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von 4 (A) oder 5 (B) unabhängigen Experimenten und gegebenenfalls jeweils ein repräsentativer Western Blot (vollständige Blots in Abb. 79 im Anhang Punkt 7.6). Statistik: *Two-way ANOVA* mit *Dunnnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; statistische Analyse der Interaktion von Insulin und LPS mittels *Two-way ANOVA* ist in Tab. 5 im Anhang Punkt 7.1 dargestellt; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. Beteiligte: Die Daten wurden bereits, in geteilter Erstautorenschaft, publiziert [203]. Anmerkung: Alle Zellkulturexperimente flossen auch in die Berechnung der in Abb. 19, Abb. 46 und Abb. 49 dargestellten Daten mit ein.

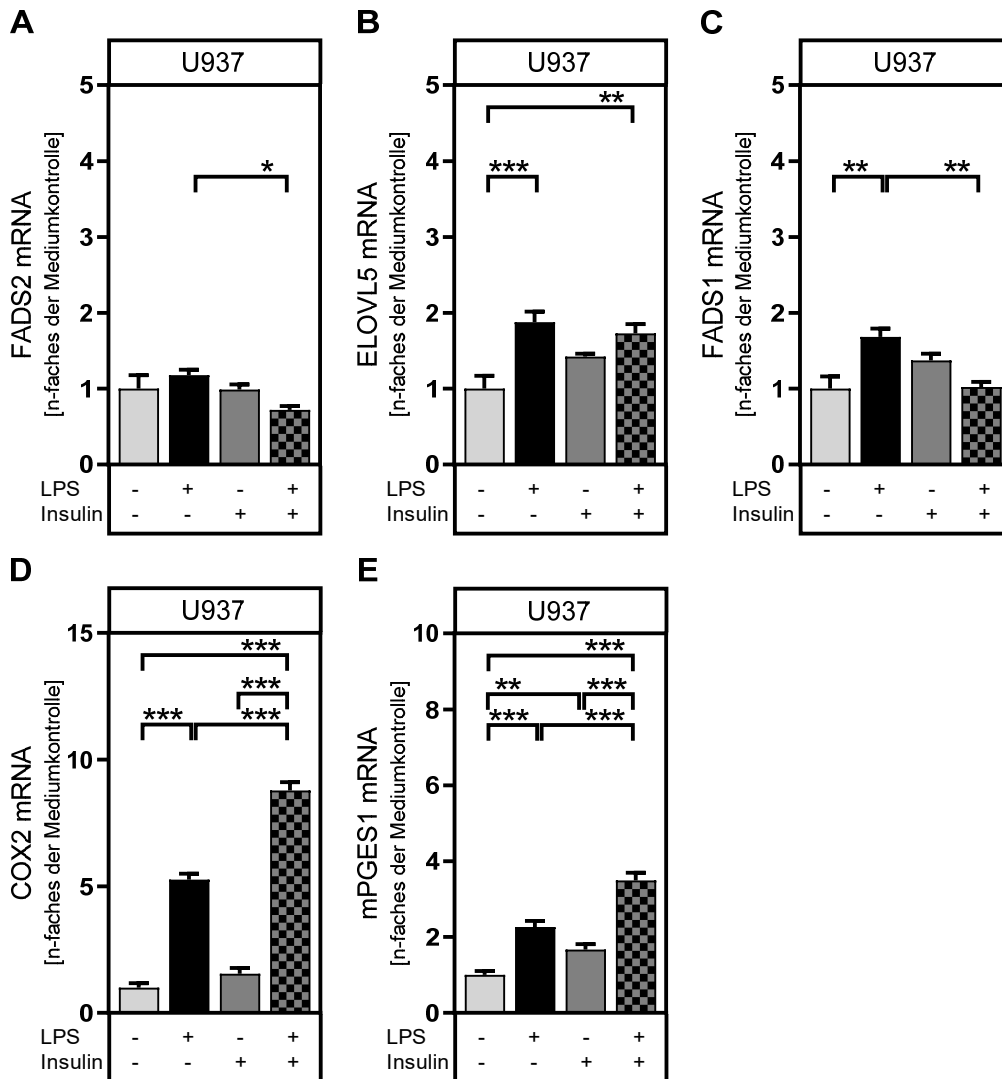


Abb. 25: Insulin-induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid-abhängigen mRNA-Expression Arachidonsäure- und Prostaglandin E₂-synthetisierender Enzyme in U937-Makrophagen

Die humane Zelllinie U937 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin und/ oder 100 ng/ml LPS für 24 h. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. **Auswertung:** Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet und für die mittlere Induzierbarkeit durch Insulin, LPS und LPS + Insulin innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchssatz untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen (Insulin, LPS und LPS + Insulin) enthielten. **Darstellung:** Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 5 (A-C), 11 (D) oder 13 (E) unabhängigen Experimenten. **Statistik:** *Two-way ANOVA* mit *Dunnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; statistische Analyse der Interaktion von Insulin und LPS mittels *Two-way ANOVA* ist in Tab. 5 im Anhang Punkt 7.1 dargestellt; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. **Anmerkung:** Alle Zellkulturerperimente flossen auch in die Berechnung der in Abb. 20 dargestellten Daten mit ein. Außerdem flossen 5 Zellkulturerperimente auch in die Berechnung der in Abb. 45 und Abb. 48 dargestellten Daten mit ein. **Beteiligte:** (D, E): Die Daten wurden bereits, in geteilter Erstautorenschaft, publiziert [203].

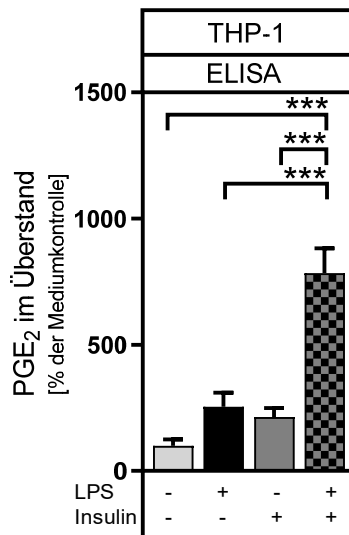


Abb. 26: Insulin-induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid-abhängigen Produktion von Prostaglandin E₂ in THP-1-Makrophagen

Die humane Zelllinie THP-1 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin und/ oder 100 ng/ml LPS für 24 h. Der PGE₂-Gehalt in Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA, wie unter 6.2.12 beschrieben, untersucht. Auswertung: Die Daten wurden auf die Summe aller Expressionen (Mediumkontrolle, Insulin, LPS, LPS + Insulin) innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchsset untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen (Insulin, LPS und LPS + Insulin) enthielten. Darstellung: Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 7 unabhängigen Experimenten. Statistik: *Two-way ANOVA* mit *Dunnnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; statistische Analyse der Interaktion von Insulin und LPS mittels *Two-way ANOVA* ist in Tab. 5 (siehe Anhang Punkt 7.1) dargestellt; ***: $p \leq 0,001$. Anmerkung: Alle Zellkulturexperimente fließen auch in die Berechnung der in Abb. 21 dargestellten Daten mit ein. Beteiligte: Die Bestimmung der PGE₂-Konzentrationen mittels ELISA wurde von Dr. Janin Henkel durchgeführt.

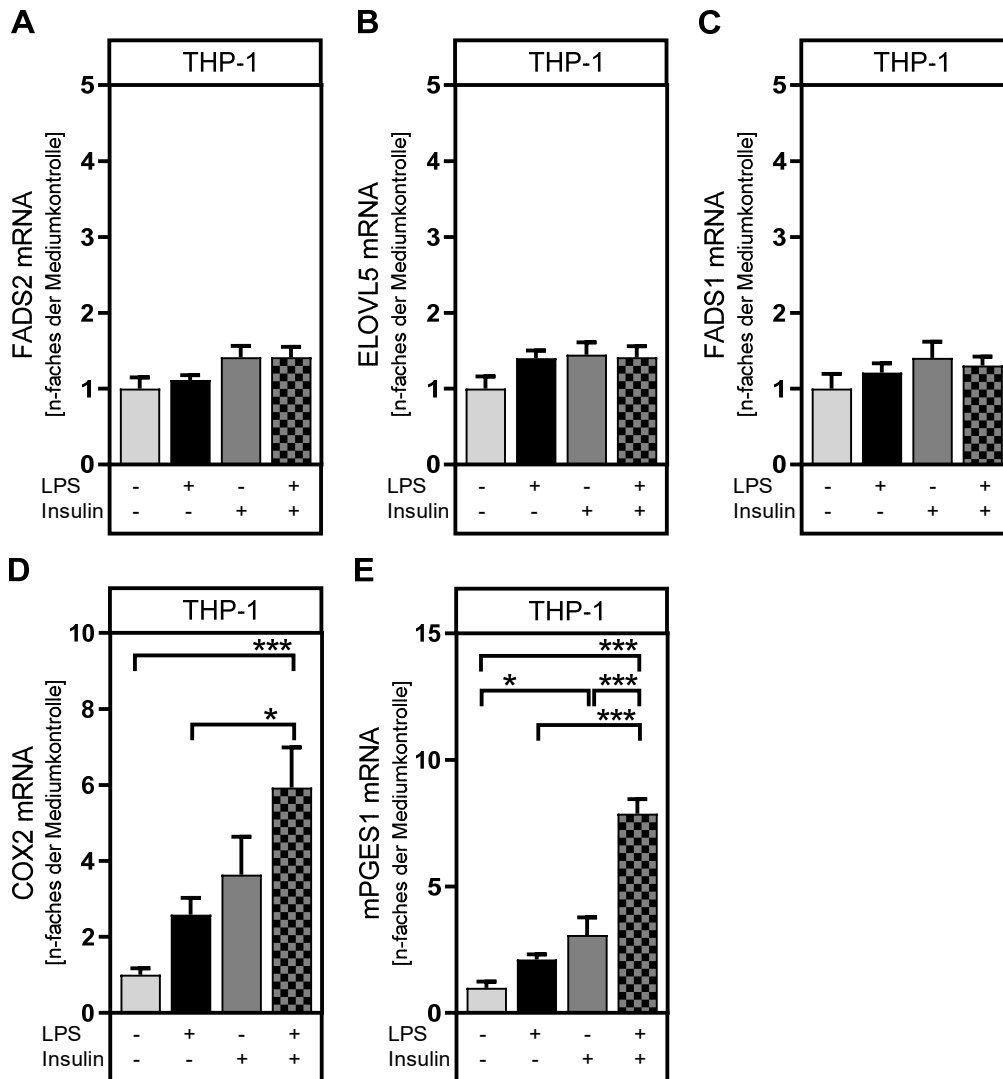


Abb. 27: Insulin-induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid-abhängigen mRNA-Expression Arachidonsäure- und Prostaglandin E₂-synthetisierender Enzyme in THP-1-Makrophagen

Die humane Zelllinie THP-1 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin und/ oder 100 ng/ml LPS für 24 h. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. **Auswertung:** Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet und für die mittlere Induzierbarkeit durch Insulin, LPS und LPS + Insulin innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchssatz untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen (Insulin, LPS und LPS + Insulin) enthielten. **Darstellung:** Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 6 (A-C), 5 (D) oder 3 (E) unabhängigen Experimenten. **Statistik:** *Two-way ANOVA* mit *Dunnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; statistische Analyse der Interaktion von Insulin und LPS mittels *Two-way ANOVA* ist in Tab. 5 im Anhang Punkt 7.1 dargestellt; *: $p \leq 0,05$; ***: $p \leq 0,001$. **Anmerkung:** Alle Zellkulturexperimente flossen auch in die Berechnung der in Abb. 22, Abb. 47 und Abb. 50 dargestellten Daten mit ein.

Primäre humane Makrophagen

LPS induzierte die COX2-mRNA-Expression in primären humanen Makrophagen signifikant auf das 70,2-fache der Mediumkontrolle und die mPGES1-mRNA-Expression auf das 8,8-fache der Mediumkontrolle (Abb. 28). Eine zusätzliche Stimulation mit Insulin hatte keinen signifikanten Einfluss auf die LPS-induzierten mRNA-Expressionen dieser beiden Enzyme.

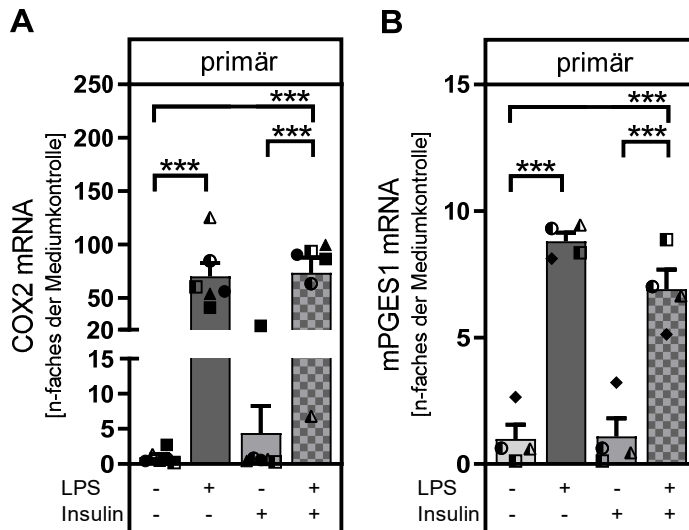


Abb. 28: Insulin-induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid-abhängigen mRNA-Expression Prostaglandin E₂-synthetisierender Enzyme in primären humanen Makrophagen

Primäre humane Monozyten wurden, wie unter 6.2.2 beschrieben, isoliert, kultiviert und für 8 Tage mit GM-CSF differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin und/ oder 100 ng/ml LPS für 24 h. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.6 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. Auswertung: Als Referenzgene dienten β -Aktin, GAPDH und HPRT. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet. Die Berechnungen wurden mit jedem Referenzgen separat durchgeführt und im Anschluss das geometrische Mittel der berechneten Induktionen gebildet. Die Daten wurden für die mittlere Induzierbarkeit durch Insulin und LPS innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchssatz untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen (Insulin, LPS und LPS + Insulin) enthielten. Darstellung: Dargestellt sind die Einzelwerte und die Mittelwerte \pm SEM von 6 (A) oder 4 (B) unabhängigen Experimenten. Gleiche Symbole zur Darstellung der Einzelwerte kennzeichnen die Zugehörigkeit zu ein und demselben Probanden. Statistik: *Two-way ANOVA* mit *Dunnnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; statistische Analyse der Interaktion von Insulin und LPS mittels *Two-way ANOVA* ist in Tab. 5 im Anhang Punkt 7.1 dargestellt; ***: $p \leq 0,001$. Anmerkung: Alle Zellkulturexperimente flossen auch in die Berechnung der in Abb. 23 dargestellten Daten mit ein.

Zusammenfassung

Die Daten deuten darauf hin, dass die Steigerung der LPS-abhängigen PGE₂-Produktion durch Insulin in Makrophagen über die Induktion der PGE₂-synthetisierenden Enzyme COX2 und mPGES1 vermittelt wird. Da die mRNA-Expressionen der Arachidonsäure-synthetisierenden Enzyme FADS2, ELOVL5 und FADS1 nicht durch Insulin allein oder in Kombination mit LPS verstärkt wurden, scheinen diese nicht relevant zu sein.

3.3.3 Palmitat-induzierte Steigerung der basalen Prostaglandin E₂-Synthese in THP-1-Makrophagen

Palmitat induzierte in THP-1-Makrophagen signifikant die PGE₂-Produktion auf das circa 720-fache der Mediumkontrolle (Abb. 29A). Außerdem induzierte Palmitat die mRNA-Expressionen der Arachidonsäure-synthetisierenden Enzyme FADS2 und FADS1 signifikant auf das jeweils 2,1-fache der Mediumkontrolle, nicht jedoch ELOVL5 (Abb. 30A-C). Die mRNA-Expression von mPGES1 wurde durch Palmitat signifikant auf das 3,2-fache der Mediumkontrolle induziert (Abb. 30E). Palmitat-stimulierte THP-1-Makrophagen wiesen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine tendenziell, aber nicht signifikant, erhöhte COX2-Expression auf (Abb. 29B, Abb. 30D).

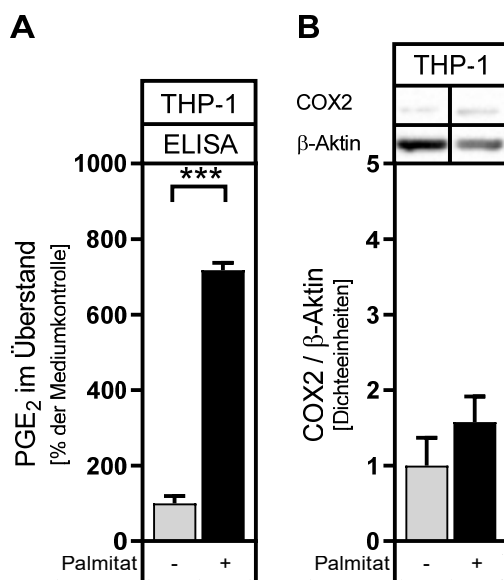


Abb. 29: Palmitat-induzierte Produktion von Prostaglandin E₂ und Cyclooxygenase 2 in THP-1-Makrophagen

Die humane Zelllinie THP-1 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 μ M Palmitat für 24 h. Die Stimulanzen wurden vor Behandlung der Zellen 90 min mit 10 μ g/ml Polymyxin B inkubiert. (A): Der PGE₂-Gehalt in Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA, wie unter 6.2.13 beschrieben, untersucht. (B): Proteine wurden, wie unter 6.2.10 dargestellt, isoliert und die Expressionen von β -Aktin oder COX2 mittels Western Blot (siehe 6.2.11) analysiert und die Bandenintensität quantifiziert. Auswertung: Sowohl Western Blot- als auch ELISA-Daten wurden auf die Summe aller Expressionen (Mediumkontrolle und Palmitat) innerhalb jedes Versuches normalisiert. Darstellung: Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 8 (A) oder 6 (B) unabhängigen Experimenten und gegebenenfalls ein repräsentativer Western Blot (vollständige Blots in Abb. 80 im Anhang Punkt 7.6). Statistik: zweiseitiger *t*-Test für ungepaarte Stichproben; ***: $p \leq 0,001$. Anmerkung: Alle (B) oder 3 (A) Zellkulturexperimente fließen auch in die Berechnung der in Abb. 53 dargestellten Daten mit ein. Beteiligte: (A): Die Daten wurde bereits, in geteilter Erstautorenschaft, publiziert [295].

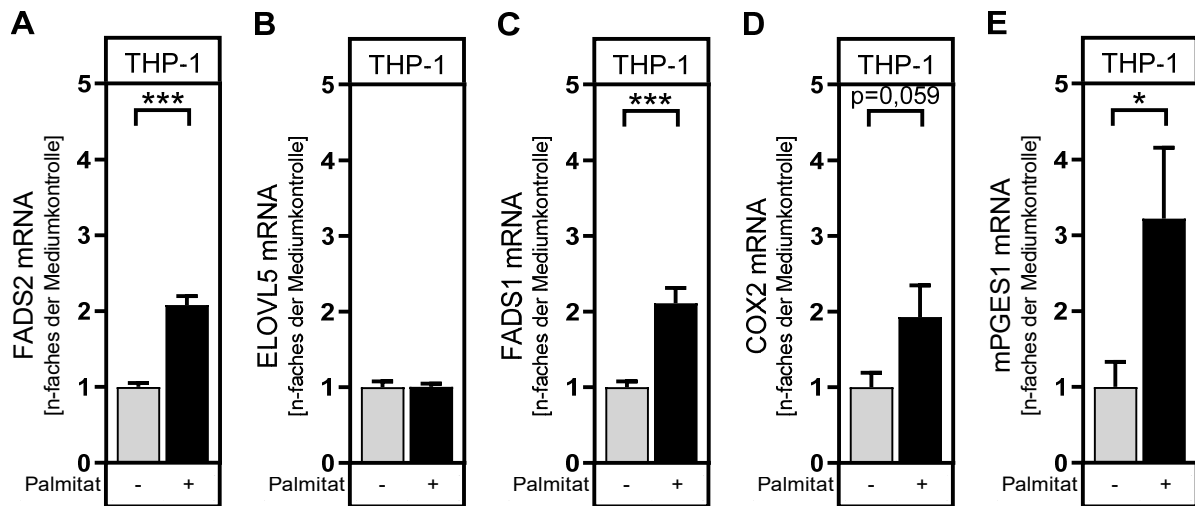


Abb. 30: Palmitat-induzierte mRNA-Expression Arachidonsäure- und Prostaglandin E₂-synthetisierender Enzyme in THP-1-Makrophagen

Die humane Zelllinie THP-1 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 μ M Palmitat für 24 h. Die Stimulanzen wurden vor Behandlung der Zellen 90 min mit 10 μ g/ml Polymyxin B inkubiert. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. Auswertung: Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet. Für die Normalisierung wurden in jedem Versuch parallel Zellen mit 10 μ M PGE₂ behandelt, analog der Palmitat-behandelten Zellen aufgearbeitet und analysiert und die Daten auf die Summe der mRNA-Expressionen durch Palmitat und PGE₂ innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchssatz untersuchten Stimulanzen (Palmitat und PGE₂) enthielten. Darstellung: Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in der Abbildung nur die Genexpressionen dargestellt, die durch Palmitat und durch die entsprechende Mediumkontrolle ausgelöst wurden, nicht jedoch die durch PGE₂ ausgelösten Genexpressionen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 6 (A, C), 5 (B), 10 (D) oder 9 (E) unabhängigen Experimenten. Statistik: zweiseitiger *t*-Test für unpaare Stichproben; *: $p \leq 0,05$; ***: $p \leq 0,001$. Anmerkung: Alle 6 (A-D) oder 7 (E) Zellkultur-experimente flossen auch in die Berechnung der in Abb. 52 dargestellten Daten mit ein. Beteiligte: (C, D): Die Daten wurde bereits, in geteilter Erstautorenschaft, publiziert [295].

3.4 Prostaglandin E₂-induzierte Steigerung der Stimulus-abhängigen Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in Makrophagen

Es gibt Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Bildung von PGE₂ und dem Vorschreiten einer Insulinresistenz [211, 212]. Es ist denkbar, dass die Induktion pro-inflammatorischer Zytokine durch PGE₂ in Makrophagen dabei eine Rolle spielt [75, 100, 213, 214]. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob PGE₂ auch in den humanen Makrophagen-artigen Zellen der Linien U937 und THP-1 und in primären humanen Makrophagen die Bildung von pro-inflammatorischen Mediatoren induzieren bzw. deren Induktion durch Faktoren des metabolischen Syndroms (Hyperinsulinämie, erhöhte Konzentrationen an LPS und Palmitat im Plasma) verstärken kann.

Dazu wurden die Makrophagen 24 Stunden mit 10 μ M PGE₂, 100 μ M Insulin, 100 ng/ml LPS und/ oder 100 μ M Palmitat inkubiert und die mRNA-Expressionen ausgewählter pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine mittels qPCR und der IL-1 β - und IL-8-Proteingehalt im Überstand mittels ELISA quantifiziert.

3.4.1 Prostaglandin E₂-induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid-abhängigen Expression pro-inflammatorischer Zytokine in Makrophagen

U937-Makrophagen

In U937-Makrophagen hemmte PGE₂ signifikant die basale und LPS-induzierte TNF α -Expression (Abb. 31A). Im Gegensatz dazu wurde die LPS-abhängige IL-1 β -mRNA-Expression durch PGE₂ nicht signifikant beeinflusst (Abb. 31B). Dennoch verstärkte PGE₂ den LPS-abhängigen Anstieg der IL-1 β -Proteinmenge im Zellkulturüberstand signifikant von 380 % der Mediumkontrolle auf 530 % der Mediumkontrolle (Abb. 32A). Zudem verstärkte PGE₂ die LPS-abhängige Induktion der IL-6- und IL-8-mRNA-Expression signifikant, ohne die basale Expression zu beeinflussen (Abb. 31C, D). Dies konnte für IL-8 auf Proteinebene bestätigt werden (Abb. 32B). Die OSM-mRNA-Expression wurde weder von LPS noch von PGE₂ signifikant induziert, wohl aber von einer Kombination aus LPS und PGE₂ (Abb. 31E).

THP-1-Makrophagen

Im Widerspruch zu eigenen Ergebnissen mit U937-Makrophagen und der Literatur, nach der PGE₂ hemmend auf die TNF α -Expression wirkt [99–102, 104–106, 214], bewirkte eine Inkubation der THP-1-Makrophagen mit PGE₂ keine signifikante Veränderung der LPS-induzierten TNF α -mRNA-Expression (Abb. 33A). Wurde die Inkubationszeit der Stimulanzien jedoch auf 2 Stunden reduziert, hemmte PGE₂ tendenziell die LPS-induzierte TNF α -mRNA-Expression (Abb. 73 im Anhang Punkt 7.5). Die IL-1 β -, IL-8- und OSM-mRNA-Expressionen waren durch die Kombination aus LPS und PGE₂ signifikant verstärkt im Vergleich zur Induktion nach Stimulation mit den Einzelstimuli (Abb. 33B, C, D). Die Verstärkung der Induktionen von IL-1 β , IL-8 und OSM war mehr als additiv im Vergleich zu den Einzelstimulanzien und betrug jeweils das 9,5-, 21,8- bzw. 52,1-fache der Mediumkontrolle (LPS allein: 2,2-, 7,6-, 2,4-fach; PGE₂ allein: 3,0-, 5,0-, 8,9-fach). Die *Two-way ANOVA* offenbarte eine signifikante Interaktion zwischen LPS und PGE₂ (Tabelle 7 im Anhang Punkt 7.1).

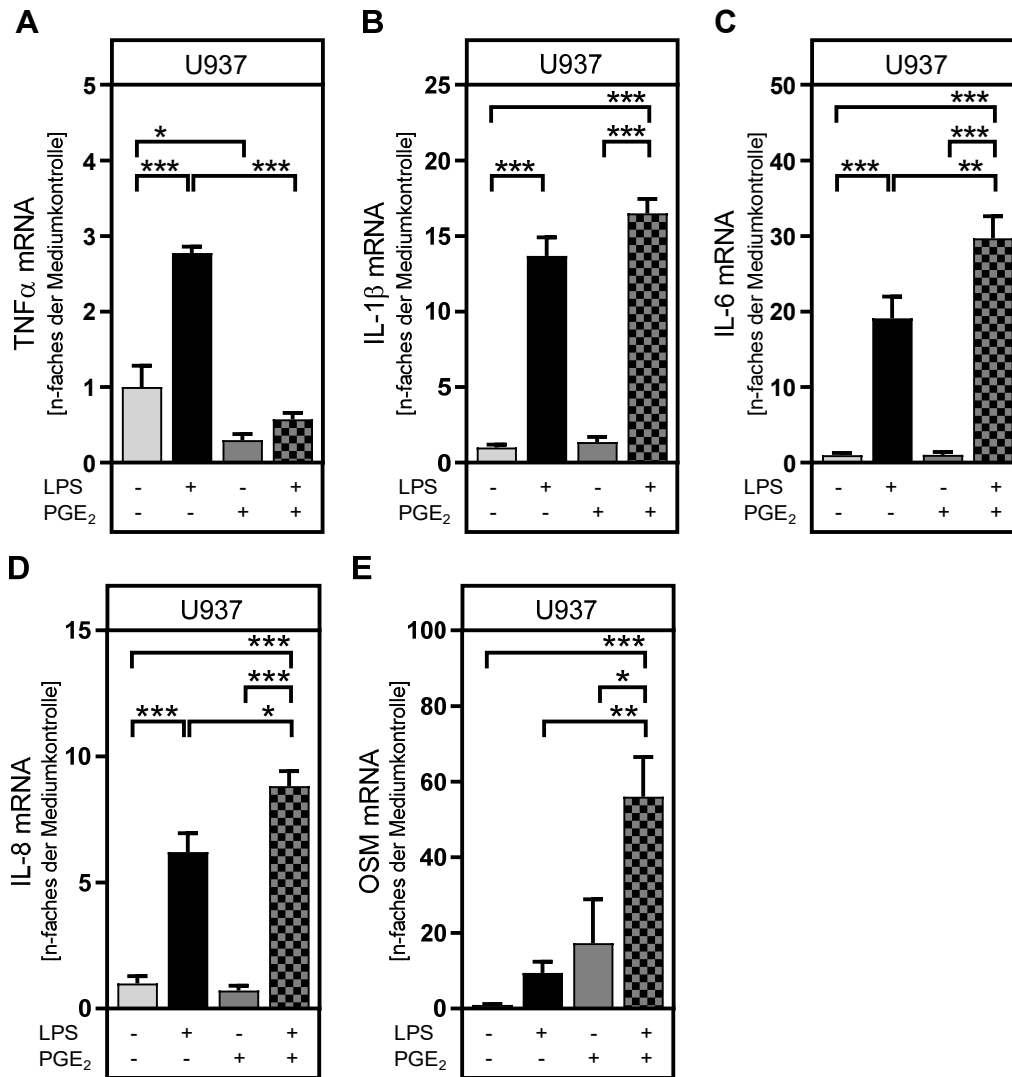


Abb. 31: Prostaglandin E₂-induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid-abhängigen mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in U937-Makrophagen

Die humane Zelllinie U937 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 ng/ml LPS und/ oder 10 μ M PGE₂ für 24 h. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. Auswertung: Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet und für die mittlere Induzierbarkeit durch LPS, PGE₂ und PGE₂ + LPS innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchsset untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen (LPS, PGE₂ und PGE₂ + LPS) enthielten. Darstellung: Das gesamte Versuchsset beinhaltete die Stimulanzkombinationen Insulin, LPS, LPS + Insulin, PGE₂, PGE₂ + Insulin, PGE₂ + LPS und PGE₂ + Insulin + LPS. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in der Abbildung jedoch nur die Genexpressionen dargestellt, die durch LPS, PGE₂ und PGE₂ + LPS und durch die entsprechende Mediumkontrolle ausgelöst wurden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 5 (A, D), 8 (B) oder 6 (C, E) unabhängigen Experimenten. Statistik: *Two-way ANOVA* mit *Dunnnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; statistische Analyse der Interaktion von LPS und PGE₂ mittels *Two-way ANOVA* ist in Tab. 7 im Anhang Punkt 7.1 dargestellt; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. Anmerkung: 3 (A, B, E) oder 2 (C) Zellkulturexperimente flossen auch in die Berechnung der in Abb. 2 und Abb. 9 dargestellten Daten mit ein. Außerdem flossen alle Zellkulturexperimente auch in die Berechnung der in Abb. 34 dargestellten Daten mit ein. Beteiligte: (B, D): Die Daten wurden bereits, in geteilter Erstautorenschaft, publiziert [203].

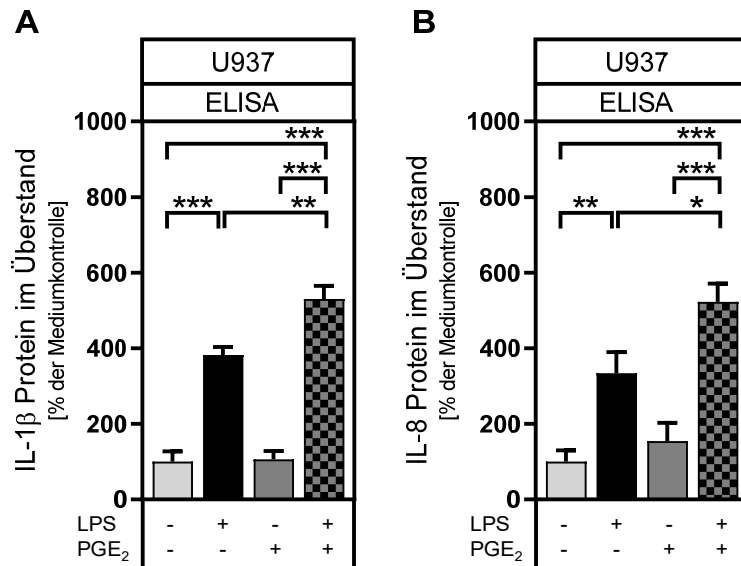


Abb. 32: Prostaglandin E₂-induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid-abhängigen Produktion des pro-inflammatorischen Mediators Interleukin-8 in U937-Makrophagen

Die humane Zelllinie U937 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 ng/ml LPS und/ oder 10 μ M PGE₂ für 24 h. Der IL-8 bzw. IL-1 β -Gehalt in Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA, wie unter 6.2.12 beschrieben, untersucht. Auswertung: Die Daten wurden auf die Summe aller Proteinexpressionen (Mediumkontrolle, LPS, PGE₂ und PGE₂ + LPS) innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchsset untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen (LPS, PGE₂ und PGE₂ + LPS) enthielten. Darstellung: Das gesamte Versuchsset beinhaltete die Stimulanzkombinationen Insulin, LPS, LPS + Insulin, PGE₂, PGE₂ + Insulin, PGE₂ + LPS und PGE₂ + Insulin + LPS. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in der Abbildung jedoch nur die Genexpressionen dargestellt, die durch LPS, PGE₂, und PGE₂ + LPS und durch die entsprechende Mediumkontrolle ausgelöst wurden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 7 (A) oder 5 (B) unabhängigen Experimenten. Statistik: *Two-way ANOVA* mit *Dunnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; statistische Analyse der Interaktion von LPS und PGE₂ mittels *Two-way ANOVA* ist in Tab. 7 im Anhang Punkt 7.1 dargestellt; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. Anmerkung: Alle Zellkulturexperimente flossen auch in die Berechnung der in Abb. 3, Abb. 10 und Abb. 35 dargestellten Daten mit ein. Beteiligte: (A): Die Bestimmung der IL-1 β -Konzentrationen mittels ELISA wurde von Dr. Janin Henkel durchgeführt. Die Daten wurden bereits, in geteilter Erstautorenschaft, publiziert [203].

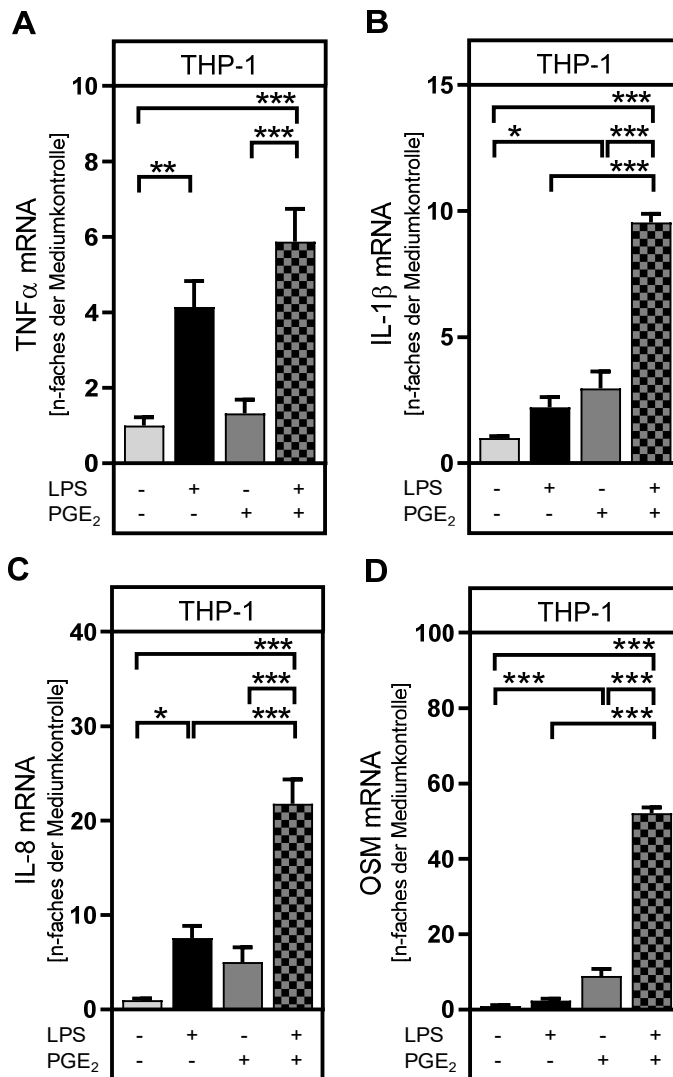


Abb. 33: Prostaglandin E₂-induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid-abhängigen mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in THP-1-Makrophagen

Die humane Zelllinie THP-1 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 ng/ml LPS und/ oder 10 μ M PGE₂ für 24 h. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. Auswertung: Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet und für die mittlere Induzierbarkeit durch LPS, PGE₂ und PGE₂ + LPS innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchssset untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen (LPS, PGE₂ und PGE₂ + LPS) enthielten. Darstellung: Das gesamte Versuchssset beinhaltete die Stimulanzkombinationen Insulin, LPS, LPS + Insulin, PGE₂, PGE₂ + Insulin, PGE₂ + LPS und PGE₂ + Insulin + LPS. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in der Abbildung jedoch nur die Genexpressionen dargestellt, die durch LPS, PGE₂ und PGE₂ + LPS und durch die entsprechende Mediumkontrolle ausgelöst wurden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 6 (A, C) oder 5 (B, D) unabhängigen Experimenten. Statistik: Two-way ANOVA mit *Dunnnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; statistische Analyse der Interaktion von LPS und PGE₂ mittels *Two-way ANOVA* ist in Tab. 7 im Anhang Punkt 7.1 dargestellt; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. Anmerkung: Alle Zellkulturexperimente flossen auch in die Berechnung der in Abb. 4, Abb. 11 und Abb. 36 dargestellten Daten mit ein.

3.4.2 Prostaglandin E₂-induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid- und Insulin-abhängigen Expression pro-inflammatorischer Zytokine in Makrophagen

U937-Makrophagen

Sowohl in U937-Makrophagen als auch in THP-1-Makrophagen verstärkte Insulin signifikant die LPS-induzierte TNF α -mRNA-Expression (vgl. 3.1.3). Im Gegensatz dazu wurde in U937-Makrophagen die LPS-induzierte TNF α -mRNA-Expression durch PGE₂ gehemmt (vgl. 3.4.1). PGE₂ hemmte sogar die durch Insulin verstärkte LPS-induzierte TNF α -mRNA-Expression noch fast vollständig (Abb. 34A).

Eine Kombination aus LPS und Insulin bzw. LPS und PGE₂ induzierte die Expression pro-inflammatorischer Zytokine, wie IL-1 β , IL-6 und IL-8, signifikant stärker als die Einzelstimuli (vgl. 3.1.3 und 3.4.1). Eine Dreifachkombination verstärkte die LPS-abhängige Induktion von IL-1 β - und IL-8-mRNA-Expression und die IL-1 β -Proteinsekretion noch stärker, als die Kombination von LPS mit Insulin oder LPS mit PGE₂ (Abb. 34B, D, Abb. 35A). IL-8-Protein wurde durch gleichzeitige Stimulation mit LPS und Insulin oder LPS und PGE₂ nicht signifikant induziert (Abb. 35B). Eine Kombination aller drei Stimulanzen führte im Vergleich zur Kombination von LPS und PGE₂, nicht jedoch von LPS und Insulin, zu einer gesteigerten IL-8-Proteinexpression in U937-Makrophagen. Die IL-6-mRNA-Expression wurde durch Stimulation mit einer Kombination aus LPS und Insulin und auch LPS und PGE₂ signifikant induziert (Abb. 34C). Eine Kombination der drei Stimulanzen LPS, Insulin und PGE₂ verstärkte diese Expression jedoch nicht. PGE₂ verstärkte signifikant die OSM-mRNA-Expression in mit LPS und Insulin-stimulierten U937-Makrophagen (Abb. 34E).

THP-1-Makrophagen

Insulin hatte keinen Einfluss auf die LPS-induzierte TNF α -mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen. Eine Inkubation der THP-1-Makrophagen mit PGE₂ bewirkte keine signifikante Veränderung der LPS-induzierten TNF α -mRNA-Expression (Abb. 33A). Dies steht im Widerspruch zu eigenen Ergebnissen mit U937-Makrophagen und der Literatur, nach der PGE₂ hemmend auf die TNF α -Expression wirkt [99–102, 104–106, 214]. In der vorliegenden Arbeit steigerte eine gleichzeitige Stimulation von THP-1-Makrophagen mit PGE₂ sogar signifikant die durch eine Kombination aus LPS und Insulin induzierte TNF α -mRNA-Expression vom 4,8-fachen auf das 6,9-fache der Mediumkontrolle (Abb. 36A). PGE₂ steigerte außerdem die durch LPS und Insulin induzierte IL-1 β -mRNA-Expression vom 3,1-fachen auf das 10,3-fache der Mediumkontrolle (Abb. 36B). Ähnlich zu den Ergebnissen mit U937-Makrophagen induzierte eine gleichzeitige Stimulation der Makrophagen mit LPS, Insulin und PGE₂ im Vergleich zur Stimulation mit LPS und Insulin oder LPS und PGE₂ die IL-8-mRNA-Expression signifikant stärker (LPS + Ins: 12,2-faches, LPS

+ PGE₂: 21,0-faches, LPS + Insulin + PGE₂: 36,7-faches der Mediumkontrolle) (Abb. 36C). Die gleichzeitige Stimulation mit LPS und PGE₂ induzierte die OSM-mRNA-Expression signifikant auf das 53,2-fache der Mediumkontrolle (Abb. 36D). Eine Kombination aller drei Stimulanzen bewirkte jedoch keine zusätzliche Steigerung der Expression.

Primäre humane Makrophagen

In primären humanen Makrophagen wurde lediglich die Wirkung von PGE₂ auf die basale mRNA-Expression der Zytokine TNF α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 untersucht. Eine Stimulation mit PGE₂ bewirkte im Vergleich zur Mediumkontrolle in jedem der drei unabhängigen Experimente eine Hemmung der TNF α -mRNA-Expression (Abb. 37A). Die IL-1 β - und IL-8-mRNA-Expressionen wurden in jedem der drei unabhängigen Experimente durch PGE₂-Stimulation induziert (Abb. 37B, D). Auch wenn die Änderungen nicht signifikant waren, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass PGE₂ die TNF α -mRNA-Expression in primären humanen Makrophagen hemmt und die IL-1 β - und IL-8-mRNA-Expressionen induziert. Die IL-6-mRNA-Expression wurde durch PGE₂ in allen drei Einzelexperimenten und insgesamt signifikant induziert (Abb. 37C).

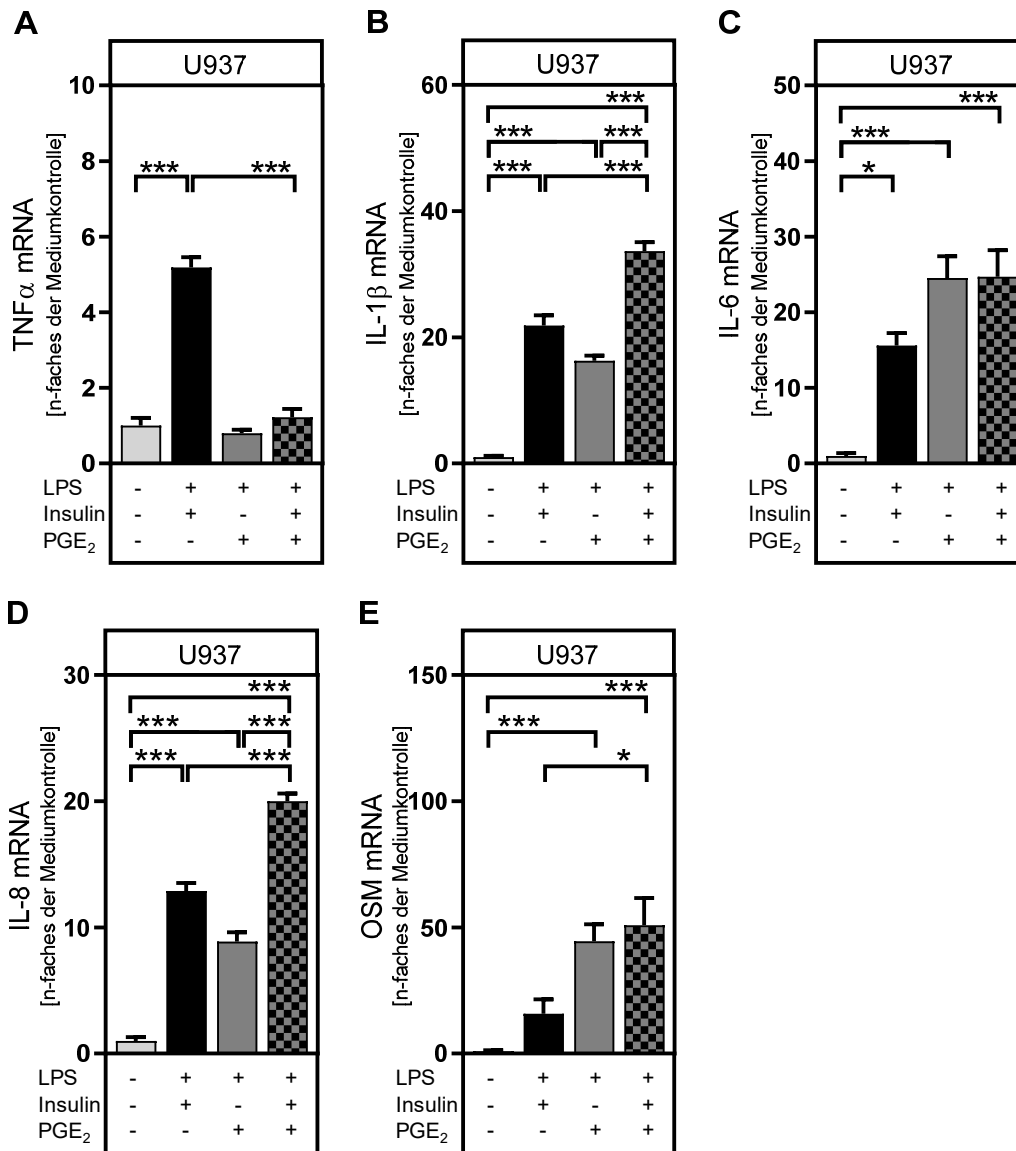


Abb. 34: Einfluss einer Kombination aus Lipopolysaccharid, Insulin und Prostaglandin E₂ auf die mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in U937-Makrophagen

Die humane Zelllinie U937 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin, 100 ng/ml LPS und/ oder 10 μ M PGE₂ für 24 h. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. Auswertung: Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet. Für die Normalisierung wurde die mittlere Induzierbarkeit durch LPS + Insulin, PGE₂ + LPS und PGE₂ + LPS + Insulin innerhalb jedes Versuches bestimmt. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchssset untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen enthielten. Darstellung: Das gesamte Versuchssset beinhaltete die Stimulanzkombinationen Insulin, LPS, LPS + Insulin, PGE₂, PGE₂ + Insulin, PGE₂ + LPS und PGE₂ + Insulin + LPS. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in der Abbildung jedoch nur die Genexpressionen dargestellt, die durch LPS + Insulin, PGE₂ + LPS und PGE₂ + LPS + Insulin ausgelöst wurden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 4 (A), 8 (B), 5 (D) oder 6 (C, E) unabhängigen Experimenten. Statistik: *Two-way ANOVA* mit *Dunnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; statistische Analyse der Interaktion von Insulin, LPS und PGE₂ mittels *Two-way ANOVA* ist in Tab. 8 im Anhang Punkt 7.1 dargestellt; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. Anmerkung: 3 (A, B, E) oder 2 (C) Zellkulturexperimente flossen auch in die Berechnung der in Abb. 2 und Abb. 9 dargestellten Daten mit ein. Außerdem flossen alle Zellkulturexperimente auch in die Berechnung der in Abb. 31 dargestellten Daten mit ein. Beteiligte: (B, D): Die Daten wurden bereits, in geteilter Erstautorenschaft, publiziert [203].

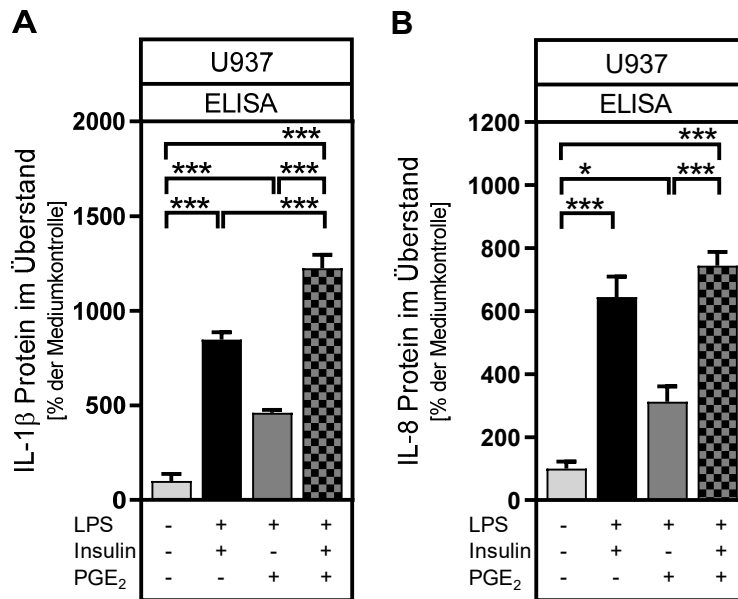


Abb. 35: Einfluss einer Kombination aus Lipopolysaccharid, Insulin und Prostaglandin E₂ auf die Proteinproduktion pro-inflammatorischer Mediatoren in U937-Makrophagen.

Die humane Zelllinie U937 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin, 100 ng/ml LPS und/ oder 10 µM PGE₂ für 24 h. Der IL-8- bzw. IL-1β-Gehalt in Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA, wie unter 6.2.12 beschrieben, untersucht. Auswertung: Die Daten wurden auf die Summe aller Proteinexpressionen (Mediumkontrolle, LPS + Insulin, PGE₂ + LPS und PGE₂ + LPS + Insulin) innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchsset untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen (LPS + Insulin, PGE₂ + LPS und PGE₂ + LPS + Insulin) enthielten. Darstellung: Das gesamte Versuchsset beinhaltete die Stimulanzkombinationen Insulin, LPS, LPS + Insulin, PGE₂, PGE₂ + Insulin, PGE₂ + LPS und PGE₂ + Insulin + LPS. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in der Abbildung nur die Genexpressionen dargestellt, die durch LPS + Insulin, PGE₂ + LPS und PGE₂ + LPS + Insulin und durch die entsprechende Mediumkontrolle ausgelöst wurden. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von 7 (A) oder 6 (B) unabhängigen Experimenten. Statistik: *Two-way ANOVA* mit *Dunnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; statistische Analyse der Interaktion von Insulin, LPS und PGE₂ mittels *Two-way ANOVA* ist in Tab. 8 im Anhang Punkt 7.1 dargestellt; *: $p \leq 0,05$; ***: $p \leq 0,001$. Anmerkung: Alle Zellkulturexperimente fließen auch in die Berechnung der in Abb. 3, Abb. 10 und Abb. 32 dargestellten Daten mit ein. Beteiligte: (A): Die Bestimmung der IL-1β-Konzentrationen mittels ELISA wurde von Dr. Janin Henkel durchgeführt.

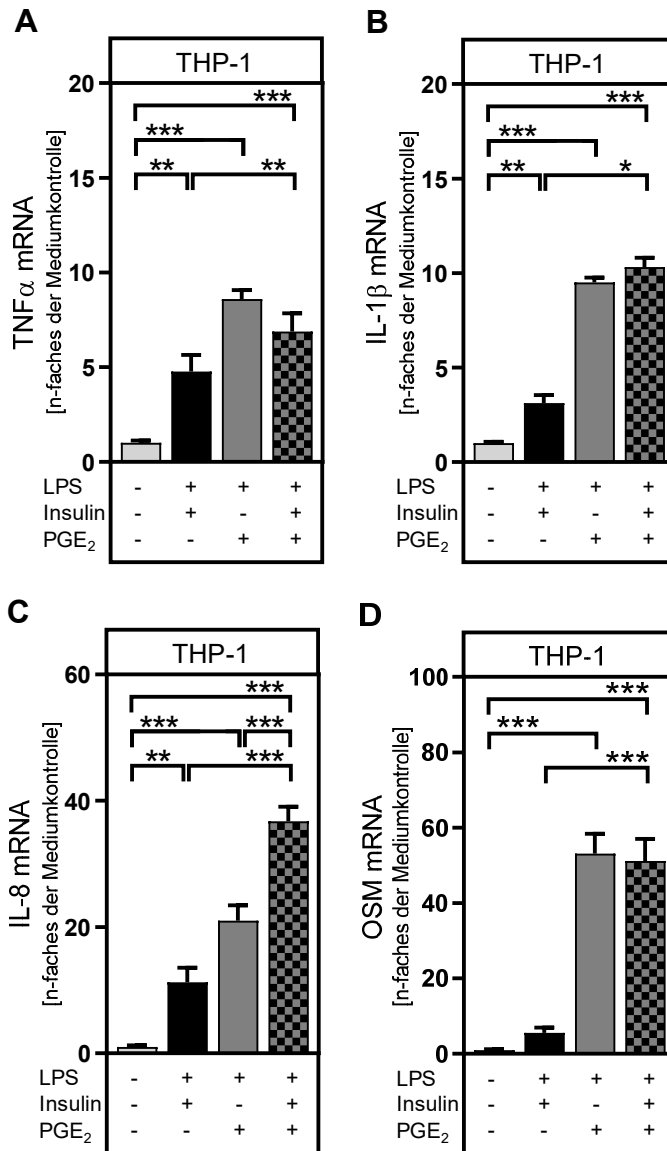


Abb. 36: Einfluss einer Kombination aus Lipopolysaccharid, Insulin und Prostaglandin E₂ auf die mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in THP-1-Makrophagen

Die humane Zelllinie THP-1 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin, 100 ng/ml LPS und/ oder 10 µM PGE₂ für 24 h. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. Auswertung: Als Referenzgen diente β-Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet. Für die Normalisierung wurde die mittlere Induzierbarkeit durch LPS + Insulin, PGE₂ + LPS und PGE₂ + LPS + Insulin innerhalb jedes Versuches bestimmt. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuches untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen (LPS + Insulin, PGE₂ + LPS und PGE₂ + LPS + Insulin) enthielten. Darstellung: Das gesamte Versuches beinhaltet die Stimulanzkombinationen Insulin, LPS, LPS + Insulin, PGE₂, PGE₂ + Insulin, PGE₂ + LPS und PGE₂ + LPS + Insulin. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in der Abbildung jedoch nur die Genexpressionen dargestellt, die durch LPS + Insulin, PGE₂ + LPS und PGE₂ + LPS + Insulin ausgelöst wurden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 5 (A, B, D) oder 6 (C) unabhängigen Experimenten. Statistik: *Two-way ANOVA* mit *Dunnnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; statistische Analyse der Interaktion von Insulin, LPS und PGE₂ mittels *Two-way ANOVA* ist in Tab. 8 im Anhang Punkt 7.1 dargestellt; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. Anmerkung: Alle Zellkulturexperimente flossen auch in die Berechnung der in Abb. 4, Abb. 11 und Abb. 33 dargestellten Daten mit ein.

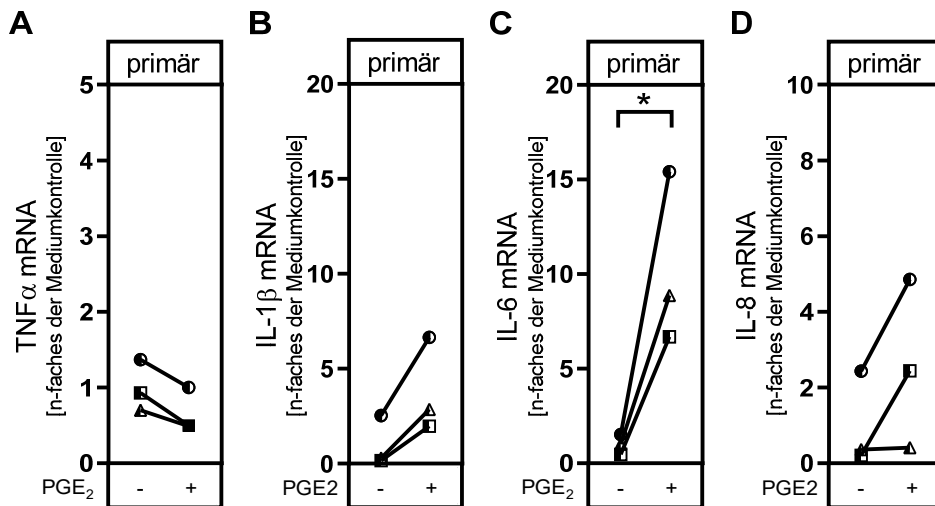


Abb. 37: Prostaglandin E₂-induzierte mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in primären humanen Makrophagen

Primäre humane Monozyten wurden, wie unter 6.2.2 beschrieben, isoliert, kultiviert und für 8 Tage mit GM-CSF differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 10 μ M PGE₂ für 24 h. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.6 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. Auswertung: Als Referenzgene dienten β -Aktin, GAPDH und HPRT. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet. Die Berechnungen wurden mit jedem Referenzgen separat durchgeführt und im Anschluss das geometrische Mittel der berechneten Induktionen gebildet. Für die Normalisierung wurden in jedem Versuch parallel Zellen mit 100 ng/ml LPS behandelt, analog der PGE₂-behandelten Zellen aufgearbeitet und analysiert und die mittlere Induzierbarkeit durch Insulin und PGE₂ innerhalb jedes Versuches bestimmt. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchsset untersuchten Stimulanzen (PGE₂ und LPS) enthielten. Darstellung: Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in der Abbildung nur die Genexpressionen dargestellt, die durch PGE₂ und durch die entsprechende Mediumkontrolle ausgelöst wurden, nicht jedoch die durch Insulin ausgelösten Genexpressionen. Dargestellt sind die Einzelwerte von 3 unabhängigen Experimenten. Gleiche Symbole zur Darstellung der Einzelwerte kennzeichnen die Zugehörigkeit zu ein und demselben Probanden. Statistik: zweiseitiger *t*-Test für gepaarte Stichproben; *: $p \leq 0,05$

3.4.3 Prostaglandin E₂-induzierte Steigerung der Palmitat-abhängigen Expression pro-inflammatorischer Zytokine in THP-1-Makrophagen

Im Folgenden sollte untersucht werden, welchen Einfluss PGE₂ auf die Palmitat-induzierte Entzündungsantwort in Makrophagen hat. Obwohl Palmitat oder PGE₂ allein nicht die TNF α -mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen induzierten (Abb. 17, Abb. 33), bewirkte die gleichzeitige Stimulation mit Palmitat und PGE₂ eine signifikante Steigerung der TNF α -mRNA-Expression auf das 2,5-fache der Mediumkontrolle (Abb. 38A). Das ist überraschend, da in der Literatur von einem hemmenden Effekt einer PGE₂-Stimulation auf die TNF α -Expression berichtet wird [98–100, 102, 104–111].

Zusätzlich bewirkte die Kombination aus Palmitat und PGE₂ eine signifikant verstärkte IL-1 β - und OSM-mRNA-Expression im Vergleich zu den Einzelstimuli (Abb. 38B, D). Außerdem verstärkte PGE₂ in THP-1-Makrophagen die Palmitat-induzierte Expression der IL-8-mRNA signifikant und mehr als additiv (Palmitat allein: 4,0-fach; PGE₂ allein: 5,5-fach) auf das 15,3-fache der Mediumkontrolle und die IL-8-Proteinproduktion signifikant und mehr als additiv (Palmitat allein: 268 %; PGE₂ allein: 496 %) auf 954 % der Mediumkontrolle (Abb. 38C, Abb. 39). Der Einfluss einer Interaktion der Stimulanzen Palmitat und PGE₂ auf die IL-8-mRNA-Expression war laut *Two-way ANOVA* signifikant (Tabelle 9 im Anhang Punkt 7.1). In einem weiteren Experiment konnte gezeigt werden, dass PGE₂ nicht nur in einer Konzentration von 10 μ M die Palmitat-induzierte IL-8-mRNA-Expression induzierte, sondern schon in wesentlich geringeren Konzentrationen (Abb. 74 im Anhang Punkt 7.5). Bereits 100 nM PGE₂ steigerten signifikant die Palmitat-abhängige IL-8-mRNA-Expression, wobei die Stärke der Steigerung mit zunehmender PGE₂-Konzentration zunahm. 10 μ M PGE₂ hatten in THP-1-Makrophagen keinen Einfluss auf die Palmitat-induzierte CCL2-mRNA-Expression (Abb. 38E).

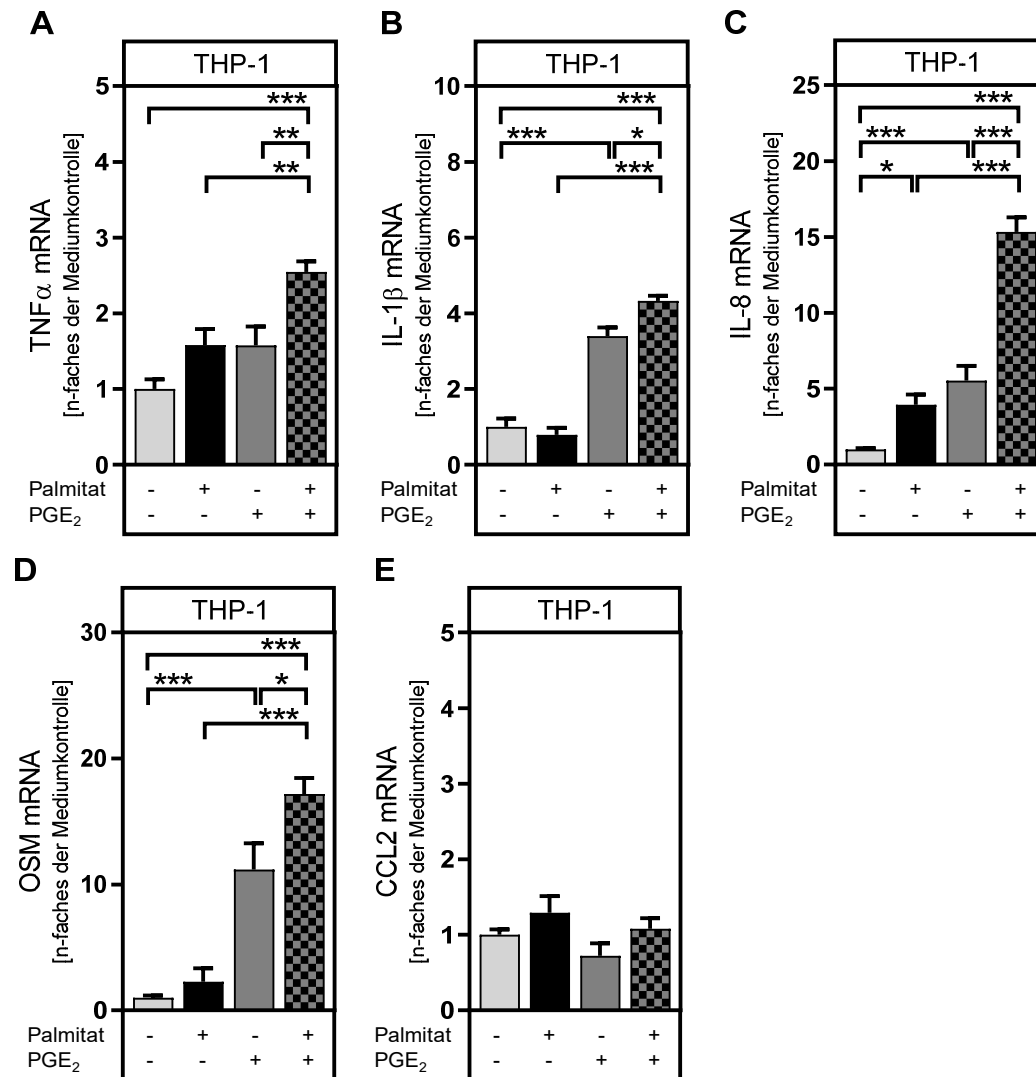


Abb. 38: Prostaglandin E₂-induzierte Steigerung der Palmitat-abhängigen mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in THP-1-Makrophagen

Die humane Zelllinie THP-1 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 μ M Palmitat und/ oder 10 μ M PGE₂ für 24 h. Die Stimulanzen wurden vor Behandlung der Zellen 90 min mit 10 μ g/ml Polymyxin B inkubiert. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. Auswertung: Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet und für die mittlere Induzierbarkeit durch Palmitat, PGE₂ und PGE₂ + Palmitat innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versucheset untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen (Palmitat, PGE₂ und Palmitat + PGE₂) enthielten. Darstellung: Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 9 (A, B, E), 13 (C) oder 7 (D) unabhängigen Experimenten. Statistik: *Two-way ANOVA* mit *Dunnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; statistische Analyse der Interaktion von Palmitat und PGE₂ mittels *Two-way ANOVA* ist in Tab. 9 im Anhang Punkt 7.1 dargestellt; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. Beteiligte: Einige Zellkulturexperimente (einschließlich RNA-Isolation, cDNA-Synthese und qPCR) wurden von Sarah Brunner im Rahmen einer dieser Doktorarbeit begleitenden Bachelorarbeit durchgeführt. (C): Die Daten wurde bereits, in geteilter Erstautorenschaft, publiziert [295].

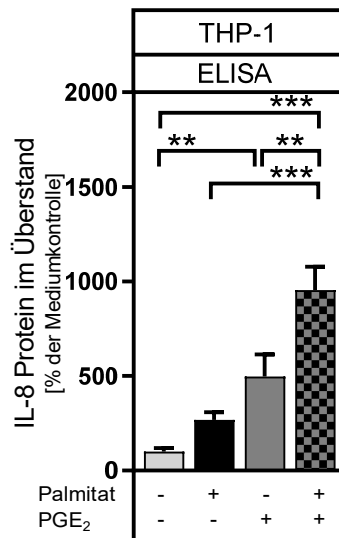


Abb. 39: Prostaglandin E₂-induzierte Steigerung der Palmitat-abhängigen Produktion des pro-inflammatorischen Mediators Interleukin-8 in THP-1-Makrophagen

Die humane Zelllinie THP-1 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 μ M Palmitat und/ oder 10 μ M PGE₂ für 24 h. In einigen Experimenten wurden die Stimulanzien vor Behandlung der Zellen 90 min mit 10 μ g/ml Polymyxin B inkubiert. Der IL-8-Gehalt in Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA, wie unter 6.2.12 beschrieben, untersucht. **Auswertung:** Die Daten wurden auf die Summe aller Proteinexpressionen (Mediumkontrolle, Palmitat, PGE₂ und PGE₂ + Palmitat) innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchsset untersuchten Stimulanzien und Stimulanzkombinationen (Palmitat, PGE₂ und Palmitat + PGE₂) enthielten. **Darstellung:** Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 9 unabhängigen Experimenten. **Statistik:** *Two-way ANOVA* mit *Dunnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzien untereinander zu vergleichen; statistische Analyse der Interaktion von Palmitat und PGE₂ mittels *Two-way ANOVA* ist in Tab. 9 im Anhang Punkt 7.1 dargestellt; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. **Beteiligte:** Einige Zellkulturexperimente wurden von Meike Statz im Rahmen einer dieser Doktorarbeit begleitenden Bachelorarbeit durchgeführt. Die Daten wurde bereits, in geteilter Erstautorenschaft, publiziert [295].

3.4.4 Molekularer Mechanismus der Prostaglandin E₂-induzierten Steigerung der Expression pro-inflammatorischer Zytokine in THP-1-Makrophagen

PGE₂ kann seine Wirkungen über vier verschiedene EP-Rezeptoren vermitteln [56–58, 85]. Um zu erforschen über welchen Rezeptor PGE₂ die Verstärkung der Insulin-, LPS- und/ oder Palmitat-induzierten Expressionen von IL-1 β , IL-6, IL-8 und OSM in Makrophagen vermittelte (vgl. 3.4.2 und 3.4.3), wurden zunächst die Expressionen der Rezeptoren EP1-EP4 mittels qPCR gemessen. Es zeigte sich, dass die Rezeptoren EP2 und EP4 in THP-1-Makrophagen, genau wie in U937-Makrophagen (Abb. 75 im Anhang Punkt 7.5), am stärksten exprimiert wurden (Abb. 40). In einem weiteren Schritt wurden THP-1-Makrophagen 24 Stunden mit drei verschiedenen Agonisten in einer Konzentration, bei der jeweils nur die für den Agonisten spezifischen EP-Rezeptoren aktiviert wurden (jeweils 1 μ M), inkubiert. Der Agonist 17-phenyl trinor Prostaglandin E₂ aktiviert die Rezeptoren EP1 und EP3, der Agonist 19 (R)-HydroxyProstaglandin E₂ den Rezeptor EP2 und der Agonist CAY10598 den Rezeptor EP4. Die Inkubation mit 10 μ M PGE₂ diente als Positivkontrolle. Die IL-8-mRNA-Expression wurde mittels qPCR gemessen, um die Rolle der Aktivierung

der einzelnen Rezeptoren bei der PGE₂-induzierten Expression pro-inflammatorischer Zytokine zu beurteilen. Im Gegensatz zu den EP1/3- und EP2-Rezeptor-Agonisten induzierte der EP4-Rezeptor-Agonist signifikant die IL-8-mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen (Abb. 41A). Diese entsprach in etwa der IL-8-mRNA-Expression in PGE₂-stimulierten Makrophagen. Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurden THP-1-Makrophagen 90 Minuten mit den spezifischen EP2- bzw. EP4-Rezeptor-Antagonisten PF-04418948 bzw. ONO AE3-208 vorinkubiert, 24 Stunden mit PGE₂ stimuliert und anschließend die IL-8-mRNA-Expression mittels qPCR gemessen. Im Gegensatz zum EP2-Rezeptor-Antagonisten hemmte der EP4-Rezeptor-Antagonist die PGE₂-induzierte IL-8-mRNA-Expression nahezu vollständig (Abb. 41B). Darüber hinaus verstärkte der EP4-Rezeptor-Agonist die Palmitat-induzierte IL-8-mRNA-Expression (Abb. 41C). Schlussfolgernd legen die Ergebnisse nahe, dass die PGE₂-induzierte Steigerung der basalen und Palmitat-abhängigen IL-8-Expression in THP-1-Makrophagen vorrangig über den EP4-Rezeptor vermittelt wurde.

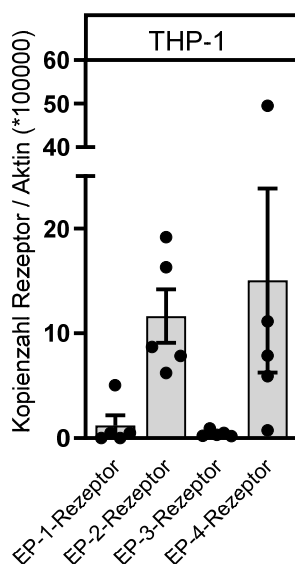


Abb. 40: Expression von EP-Rezeptor-mRNA in THP-1-Makrophagen

Die humane Zelllinie THP-1 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. Auswertung: Als Referenzgen diente β -Aktin. Die Menge der mRNA-Kopien der EP-Rezeptoren und des Referenzgens wurden anhand von Standardgeraden, die mit entsprechender Plasmid-DNA erstellt wurden, quantifiziert. Darstellung: Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 5 unabhängigen Experimenten. Beteiligte: Die für die Quantifizierung der EP-Rezeptoren verwendeten Standardgeraden wurden von Anne Schraplau im Rahmen ihrer Doktorarbeit erstellt. Die Daten wurde bereits, in geteilter Erstautorenschaft, publiziert [295].

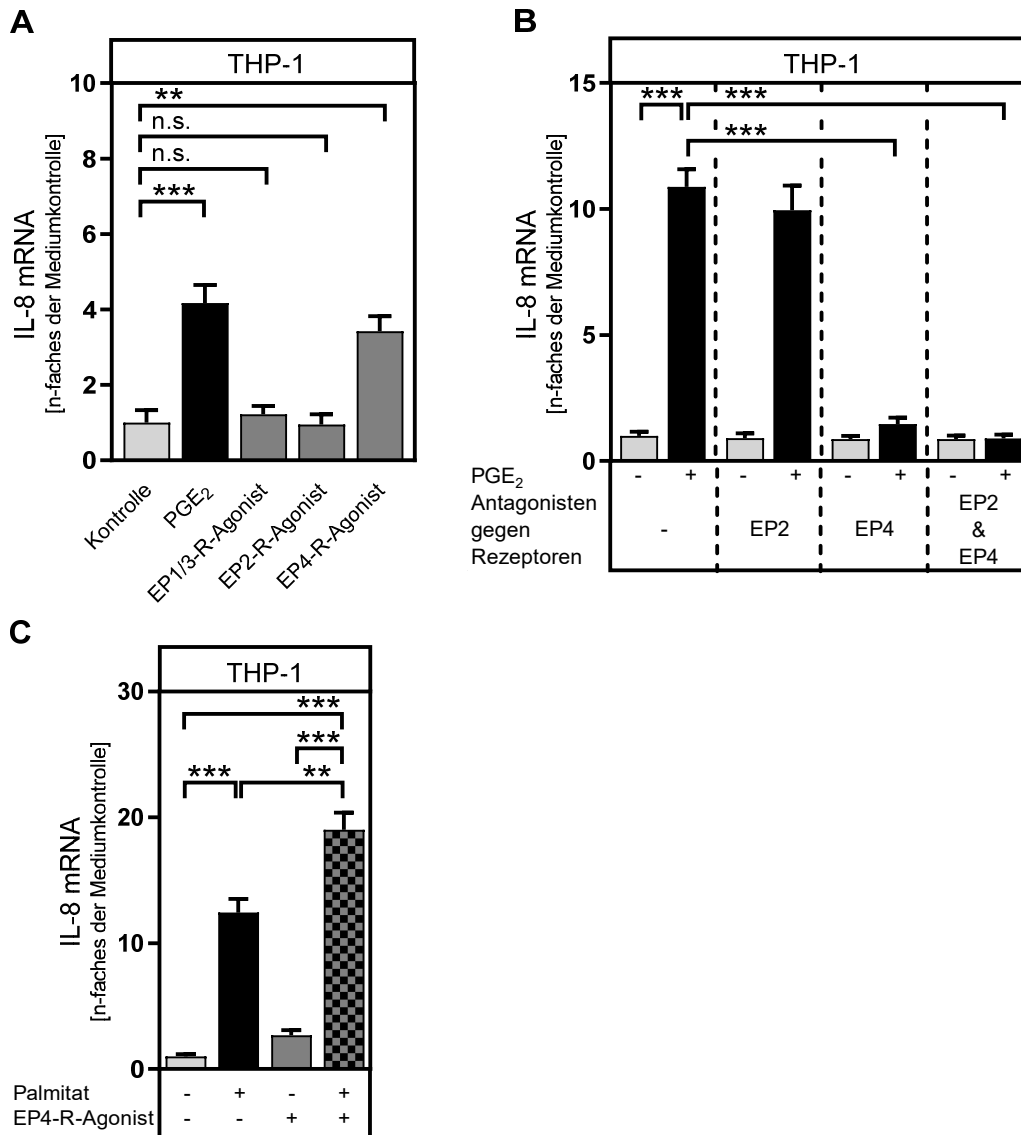


Abb. 41: Bedeutung der einzelnen EP-Rezeptoren bei der Prostaglandin E₂-induzierten Expression pro-inflammatorischen Mediatoren in THP-1-Makrophagen

Die humane Zelllinie THP-1 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert, differenziert und gegebenenfalls stimuliert. Die Stimulation erfolgte mit 10 μ M PGE₂ oder 1 μ M der EP-Rezeptor-Agonisten für 24 h. Falls angegeben wurden die Zellen vor der Stimulation 90 min mit je 10 μ M der EP-Rezeptor-Antagonisten vorbehandelt. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. Auswertung: Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet. (A): Für die Normalisierung wurde die mittlere Induzierbarkeit durch PGE₂ und den EP2- und EP4-Rezeptor-Agonisten berechnet. (B): Für die Normalisierung wurden in jedem Versuch parallel Zellen mit 100 μ M Palmitat behandelt, analog der mit PGE₂-behandelten Zellen aufgearbeitet und analysiert und die mittlere Induzierbarkeit durch PGE₂ und Palmitat innerhalb jedes Versuches bestimmt. (C): Für die Normalisierung wurde die mittlere Induzierbarkeit durch EP4-Rezeptor-Agonist, Palmitat und EP4-Rezeptor-Agonist + Palmitat innerhalb jedes Versuches bestimmt. (A, B): Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchssatz untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen [(B): PGE₂, EP2-Rezeptor-Antagonist, PGE₂ + EP2-Rezeptor-Antagonist, EP4-Rezeptor-Antagonist, PGE₂ + EP4-Rezeptor-Antagonist, EP2-Rezeptor-Antagonist + EP4-Rezeptor-Antagonist und PGE₂ + EP2-Rezeptor-Antagonist + EP4-Rezeptor-Antagonist; (C): Palmitat, EP4-Rezeptor-Agonist und Palmitat + EP4-Rezeptor-Agonist] enthielten. Darstellung: Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 3 bis 5 (A), 3 (B) oder 4 (C) unabhängigen Experimenten. Statistik: zweiseitiger *t*-Test für ungepaarte Stichproben (A) bzw. *Two-way ANOVA* mit *Dunnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu

vergleichen (B, C); statistische Analyse der Interaktion von Palmitat und EP4-Rezeptor-Agonist mittels *Two-way ANOVA* ist in Tab. 9 im Anhang Punkt 7.1 dargestellt; n.s. – nicht signifikant; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. Beteiligte: (A): Einige Zellkulturexperimente (einschließlich RNA-Isolation, cDNA-Synthese und qPCR) wurden von Meike Statz im Rahmen einer dieser Doktorarbeit begleitenden Bachelorarbeit durchgeführt. Die Daten wurde bereits, in geteilter Erstautorenschaft, publiziert [295].

Es gibt Hinweise darauf, dass PGE_2 die Expression des TLR4 modulieren kann. In Alveolar-makrophagen konnte gezeigt werden, dass PGE_2 die Translation, jedoch nicht die Transkription, des TLR4 inhibierte und so die LPS-induzierte Expression von $\text{TNF}\alpha$ reduzierte [107]. Daher sollte überprüft werden, ob PGE_2 auch in THP-1-Makrophagen einen Einfluss auf die Funktion des TLR4 hat und so die Verstärkung der Palmitat-induzierten Expression pro-inflammatorischer Zytokine beeinflusst. THP-1-Makrophagen wurden 24 Stunden mit $100 \mu\text{M}$ Palmitat und/ oder $10 \mu\text{M}$ PGE_2 stimuliert und anschließend die TLR4-mRNA-Expression gemessen. PGE_2 hatte auf mRNA-Ebene, entsprechend der Literatur [107], weder allein noch in Kombination mit Palmitat einen Einfluss auf die TLR4-mRNA-Expression (Abb. 42A). In einem zweiten Schritt wurden THP-1-Makrophagen zusätzlich mit dem TLR4-spezifischen Inhibitor Tak242 inkubiert. Dieser inhibiert die TLR4-vermittelte Signalkaskade, indem er an eine spezifische intrazelluläre Domäne des TLR4 bindet und somit die Interaktion mit den Adaptermolekülen TIRAP und TRAM verhindert [154, 215–217]. Nach 24-stündiger Stimulation wurde die IL-8-mRNA-Expression mittels qPCR und die IL-8-Proteinexpression im Überstand der Zellen mittels ELISA quantifiziert. Eine Stimulation mit 100 ng/ml LPS diente als Positivkontrolle. Die LPS-induzierte IL-8-Expression wurde auf mRNA-Ebene signifikant durch Zugabe von Tak242 inhibiert (Abb. 42B). Auch auf Proteinebene war dieser Effekt zu beobachten, eine statistische Auswertung aufgrund zu weniger Experimente jedoch nicht möglich (Abb. 43). Obwohl die Palmitat-induzierte IL-8-Expression durch die Inkubation mit dem TLR4-Inhibitor nicht gehemmt wurde, bewirkte der Inhibitor sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene eine signifikante Hemmung der durch PGE_2 verstärkten Palmitat-induzierten IL-8-Expression. Eine modulatorische Wirkung von PGE_2 auf den TLR4 in THP-1-Makrophagen kann daher weder sicher nachgewiesen noch ausgeschlossen werden.

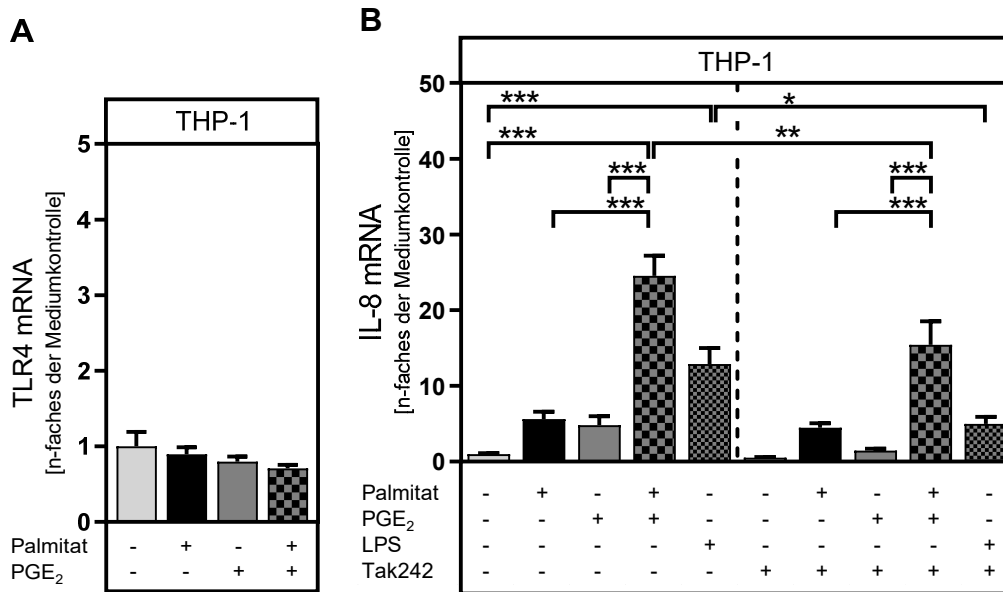


Abb. 42: Bedeutung des TLR4 bei der Prostaglandin E₂-induzierten Verstärkung der Palmitat-abhängigen Interleukin-8-mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen

Die humane Zelllinie THP-1 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Falls angegeben wurden die Zellen vor der Simulation 90 min mit 2 µg/ml des TLR4-spezifischen Inhibitors Tak242 vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µM Palmitat und/ oder 10 µM PGE₂ oder 100 ng/ml LPS für 24 h. Die Stimulanzen (bis auf LPS) wurden zuvor 90 min mit 10 µg/ml (A) bzw. 20 µg/ml (B) Polymyxin B vorinkubiert. Durch Zugabe der Stimulanzen zu den Zellen reduzierte sich die Konzentration des Inhibitors Tak242 auf 1 µg/ml und die Konzentration von Polymyxin B auf 10 µg/ml (B). Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. **Auswertung:** Als Referenzgen diente β-Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der ΔΔCt-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet. Für die Normalisierung wurde die mittlere Induzierbarkeit durch Palmitat, PGE₂ und Palmitat + PGE₂ (A) bzw. Palmitat, PGE₂, Palmitat + PGE₂ und LPS (jeweils ohne Tak242) (B) berechnet. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchssset untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen [(A): Palmitat, PGE₂ und Palmitat + PGE₂, (B): Palmitat, PGE₂, Palmitat + PGE₂, LPS, Tak242, Palmitat + Tak242, PGE₂ + Tak242, Palmitat + PGE₂ + Tak242 und LPS + Tak242] enthielten. **Darstellung:** Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von 5 (A) oder 9 (B) unabhängigen Experimenten. **Statistik:** Two-way ANOVA mit *Dunnnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen, statistische Analyse der Interaktion von Palmitat und PGE₂ mittels *Two-way ANOVA* ist in Tab. 9 im Anhang Punkt 7.1 dargestellt; *: p ≤ 0,05; **: p ≤ 0,01; ***: p ≤ 0,001. **Beteiligte:** Einige Zellkulturexperimente (einschließlich RNA-Isolation, cDNA-Synthese und qPCR) wurden von Meike Statz im Rahmen einer dieser Doktorarbeit begleitenden Bachelorarbeit durchgeführt.

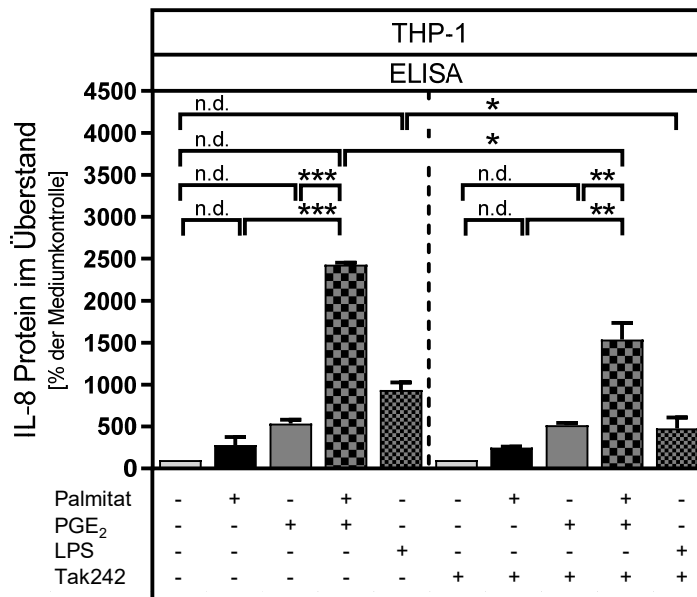


Abb. 43: Bedeutung des TLR4 bei der Prostaglandin E₂-induzierten Verstärkung der Palmitat-abhängigen Interleukin-8-Proteinexpression in THP-1-Makrophagen

Die humane Zelllinie THP-1 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Falls angegeben wurden die Zellen vor der Simulation 90 min mit 2 µg/ml des TLR4-spezifischen Inhibitors Tak242 vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µM Palmitat und/ oder 10 µM PGE₂ oder 100 ng/ml LPS für 24 h. Die Stimulanzen (bis auf LPS) wurden zuvor 90 min mit 20 µg/ml Polymyxin B vorinkubiert. Durch Zugabe der Stimulanzen zu den Zellen reduzierte sich die Konzentration des Inhibitors Tak242 auf 1 µg/ml und die Konzentration von Polymyxin B auf 10 µg/ml. Der IL-8-Gehalt in Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA, wie unter 6.2.12 beschrieben, untersucht. Auswertung: Die Daten wurden auf die Summe der Proteinexpressionen durch Palmitat, PGE₂, PGE₂ + Palmitat und LPS (jeweils ohne Tak242) innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchset untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen (Palmitat, PGE₂, Palmitat + PGE₂, LPS, Tak242, Palmitat + Tak242, PGE₂ + Tak242, Palmitat + PGE₂ + Tak242 und LPS + Tak242) enthielten. Darstellung: Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von 1 bis 3 unabhängigen Experimenten. Statistik: zweiseitiger *t*-Test für ungepaarte Stichproben; n.d. – nicht definierbar; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. Beteiligte: Einige Zellkulturexperimente (einschließlich RNA-Isolation, cDNA-Synthese und qPCR) wurden von Meike Statz im Rahmen einer dieser Doktorarbeit begleitenden Bachelorarbeit durchgeführt.

3.4.5 Fehlender Einfluss von Prostaglandin E₂ auf die Palmitat-abhängige Modulation des Sphingolipidmetabolismus

S1P wird aus Ceramiden gebildet und gilt als wichtiger Entzündungsmediator [133]. Als Ausgangssubstrat für die Ceramidsynthese dient Palmitat. Es gibt Hinweise darauf, dass eine Fettsäure-induzierte Entzündungsantwort über die gesteigerte Bildung von Ceramiden vermittelt wird [136, 166]. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass LPS die Palmitat-induzierte Entzündungsantwort verstärkt und dass dies auf eine synergistische Ceramidsynthese zurückzuführen ist [218]. Es sollte nun die Hypothese überprüft werden, dass auch PGE₂ die Palmitat-induzierte Ceramidsynthese und auf diesem Weg die Palmitat-induzierte Entzündungsantwort in THP-1-Makrophagen verstärkt. Tatsächlich steigerte die Inkubation der THP-1-Makrophagen mit Palmitat die Produktion von S1P sowie dessen Vorläufer Sphingosin (Abb. 44C, D). Die Palmitat-induzierte Bildung von Sphingosin wurde durch PGE₂ jedoch signifikant von 138 % auf 103 % der Mediumkontrolle reduziert (Abb. 44C). Im Widerspruch zur Hypothese hatte PGE₂ keinen Einfluss auf die basale oder Palmitat-induzierte S1P-Synthese (Abb. 44D).

Palmitat und PGE₂ induzierten weder einzeln noch in Kombination die mRNA-Expressionen der Enzyme Serin-Palmitoyltransferase 1 und 2, welche den initialen Schritt der Sphingolipidsynthese aus Palmitat katalysieren (Abb. 44A, B). Die gesteigerte Produktion von S1P und Sphingosin nach Inkubation der Makrophagen mit Palmitat war daher wahrscheinlich ausschließlich auf das gesteigerte Substratangebot zurückzuführen.

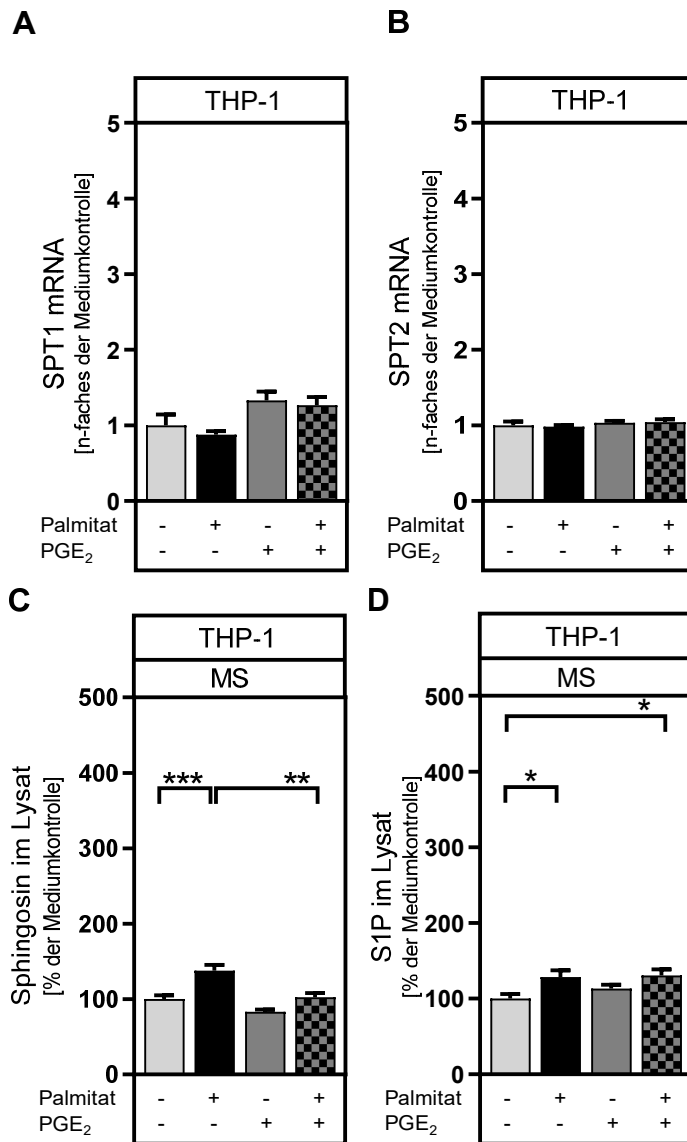


Abb. 44: Bedeutung der Sphingosin-1-Phosphat-Bildung bei der Prostaglandin E₂-induzierten Verstärkung der Palmitat-abhängigen Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in THP-1-Makrophagen

Die humane Zelllinie THP-1 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 μ M Palmitat und/ oder 10 μ M PGE₂ für 24 h. Die Stimulanzen wurden vor Behandlung der Zellen 90 min mit 10 μ g/ml Polymyxin B inkubiert. (A, B): Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. (C, D): Lipide wurden, wie unter 6.2.15 beschrieben, aus Zelllysaten isoliert und mittels Massenspektrometrie (MS) quantifiziert. Auswertung: (A, B): Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression der Serin-Palmitoyltransferasen (SPT) wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet und für die mittlere Induzierbarkeit durch Palmitat, PGE₂ und Palmitat + PGE₂ innerhalb jedes Versuches normalisiert. (C, D): Die Daten wurden auf die Summe aller Lipidexpressionen (Mediumkontrolle, Palmitat, PGE₂ und Palmitat + PGE₂) innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchssatz untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen enthielten. Darstellung: Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 7 (A), 3 (B) oder 6 (C, D) unabhängigen Experimenten. Statistik: Two-way ANOVA mit *Dunnnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; statistische Analyse der Interaktion von Palmitat und PGE₂ mittels *Two-way ANOVA* ist in Tab. 9 im Anhang Punkt 7.1 dargestellt; *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. Beteiligte: (A, B): Einige qPCR-Messungen wurden von Meike Satz im Rahmen einer dieser Doktorarbeit begleitenden Bachelorarbeit durchgeführt. (C, D): Die MS wurde von der Abteilung Ernährungstoxikologie der Universität Potsdam durchgeführt.

3.5 Prostaglandin E₂-induzierte Verstärkung seiner eigenen Stimulus-abhängigen Synthese in Makrophagen

Es konnte gezeigt werden, dass Insulin, LPS und Palmitat die Bildung von PGE₂ in Makrophagen induzierte (vgl. 3.3). Außerdem verstärkte PGE₂ die durch Palmitat, Insulin und/oder LPS induzierende Zytokinexpression (vgl. 3.4). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob PGE₂ selbst seine Synthese verstärkt und so den Teufelskreis der Entzündung weiter beschleunigt.

Dazu wurden U937-, THP-1- oder primäre humane Makrophagen 24 Stunden mit 100 nM Insulin, 100 ng/ml LPS, 100 µM Palmitat, 10 µM PGE₂ und/oder 1 µM EP4-Agonist stimuliert und die mRNA-Expressionen der Arachidonsäure- und PGE₂-synthetisierenden Enzyme FADS2, ELOVL5, FADS1, COX2 und mPGES1 mittels qPCR, die Produktion von COX2 mittels Western Blot-Analyse und die Produktion von PGE₂ mittels ELISA bestimmt.

3.5.1 Prostaglandin E₂-induzierte Verstärkung der Lipopolysaccharid-abhängigen Expression Arachidonsäure- und Prostaglandin E₂-synthetisierender Enzyme in Makrophagen

U937-Makrophagen

Die Expression der FADS2-mRNA wurde weder durch Stimulation mit den Einzelstimulanzen noch durch eine zeitgleiche Stimulation der U937-Makrophagen mit LPS und PGE₂ induziert (Abb. 45A). PGE₂ reduzierte signifikant die LPS-induzierten ELOVL5- und FADS1-mRNA-Expressionen auf die basalen Expressionen der Enzyme in Kontrollmakrophagen (Abb. 45B, C). Die LPS-induzierte COX2-Expression wurde weder auf mRNA- noch auf Proteinebene signifikant durch zusätzliche Stimulation mit PGE₂ beeinflusst (Abb. 45D, Abb. 46). Lediglich die LPS-induzierte mPGES1-mRNA-Expression wurde durch PGE₂ signifikant und mehr als additiv (LPS allein: 4,6-fach; PGE₂ allein: 6,5-fach) auf das 31,3-fache der Mediumkontrolle gesteigert (Abb. 45E).

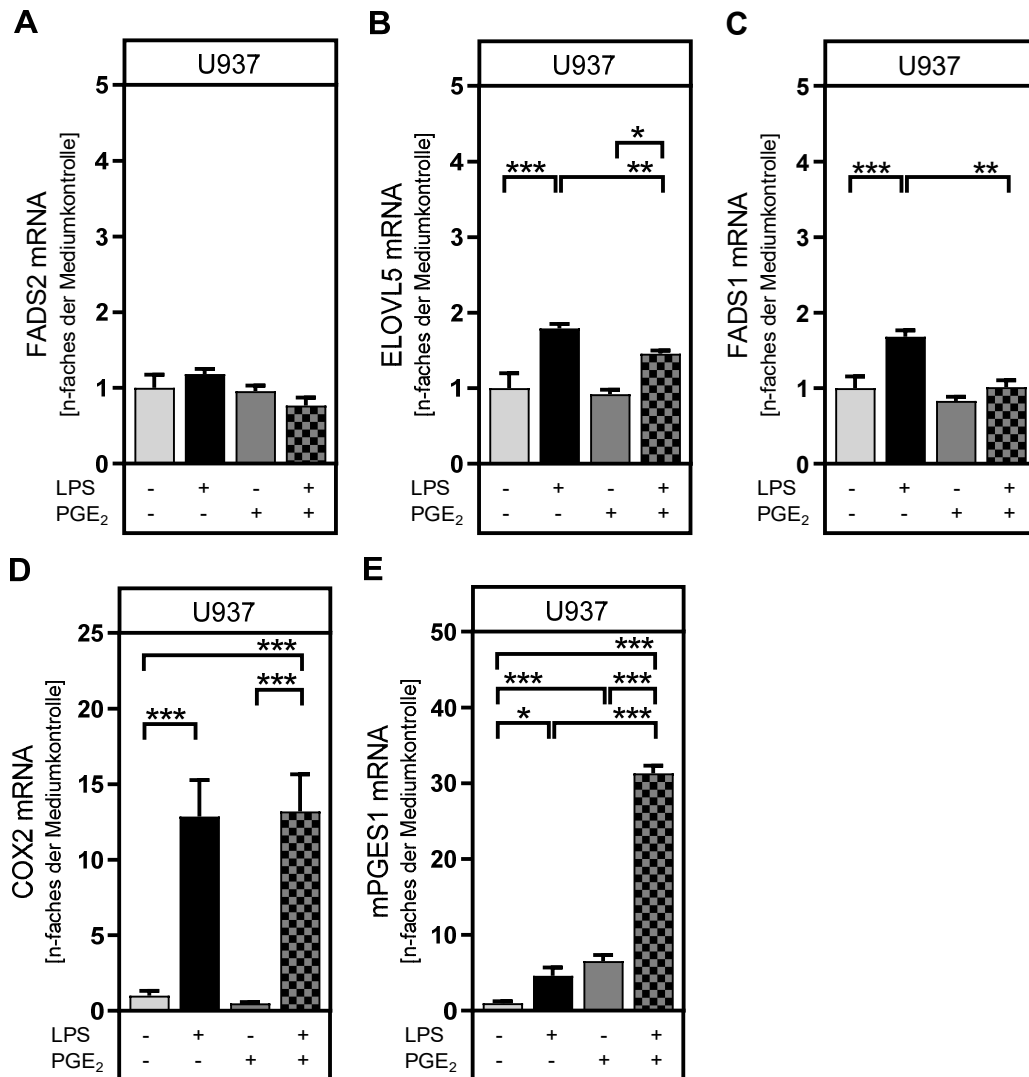


Abb. 45: Prostaglandin E₂-induzierte Verstärkung der Lipopolysaccharid-abhängigen mRNA-Expression Arachidonsäure- und Prostaglandin E₂-synthetisierender Enzyme in U937-Makrophagen

Die humane Zelllinie U937 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 ng/ml LPS und/ oder 10 μ M PGE₂ für 24 h. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. Auswertung: Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet und für die mittlere Induzierbarkeit durch LPS, PGE₂ und PGE₂ + LPS innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versucheset untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen (LPS, PGE₂ und PGE₂ + LPS) enthielten. Darstellung: Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 5 unabhängigen Experimenten. Statistik: *Two-way ANOVA* mit *Dunnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. Anmerkung: Alle Zellkulturexperimente flossen auch in die Berechnung der in Abb. 20, Abb. 25 und Abb. 48 dargestellten Daten mit ein.

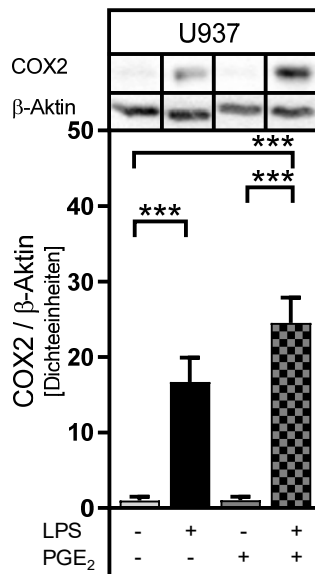


Abb. 46: Einfluss von Prostaglandin E₂ auf die Lipopolysaccharid-abhängige Produktion von Cyclooxygenase 2 in U937-Makrophagen

Die humane Zelllinie U937 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 ng/ml LPS und/ oder 10 μ M PGE₂ für 24 h. Proteine wurden, wie unter 6.2.10 dargestellt, isoliert und die Expression von β -Aktin und COX2 mittels Western Blot (siehe 6.2.11) analysiert und die Bandenintensität quantifiziert. Auswertung: Die Daten wurden auf die Summe aller Proteinexpressionen (Mediumkontrolle, LPS, PGE₂ und PGE₂ + LPS) innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchsset untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen (LPS, PGE₂ und PGE₂ + LPS) enthielten. Darstellung: Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 5 unabhängigen Experimenten und jeweils ein repräsentativer Western Blot (vollständige Blots in Abb. 79 im Anhang Punkt 7.6). Statistik: Two-way ANOVA mit *Dunnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; Analyse der Interaktionen von LPS und PGE₂ in Tab. 7 im Anhang 7.1 dargestellt; ***: $p \leq 0,001$. Anmerkung: Alle Zellkulturexperimente flossen auch in die Berechnung der in Abb. 19, Abb. 24 und Abb. 49 dargestellten Daten mit ein.

THP-1-Makrophagen

Wie in U937-Makrophagen wurde die Expression der FADS2-mRNA weder durch LPS allein noch durch PGE₂ allein noch durch eine zeitgleiche Stimulation der THP-1-Makrophagen mit LPS und PGE₂ induziert (Abb. 47A). Im Gegensatz zu Ergebnissen aus U937-Makrophagen wurden die ELOVL5- und FADS1-mRNA-Expressionen durch eine zeitgleiche Stimulation mit LPS und PGE₂ signifikant induziert, jeweils auf das 2,5- bzw. 2,3-fache der Mediumkontrolle (Abb. 47B, C). PGE₂ verstärkte, abweichend von den Ergebnissen aus U937-Makrophagen, die COX2-mRNA-Expression und, übereinstimmend mit den Ergebnissen aus U937-Makrophagen, die mPGES1-mRNA-Expression in LPS-stimulierten THP-1-Makrophagen signifikant und mehr als additiv (LPS allein: 2,8- bzw. 2,1-fach; PGE₂ allein: 5,7- bzw. 11,8-fach) auf das jeweils 23,9- bzw. 64,3-fache der Mediumkontrolle (Abb. 47D, E). Leider war es nicht möglich den COX2-Proteingehalt in Überständen von THP-1-Makrophagen zu quantifizieren, da die im Western Blot detektierten Banden zu

schwach ausgebildet waren (Daten nicht gezeigt). Auch die Modifikation des Western Blot-Protokolls führte zu keiner Verbesserung der Resultate.

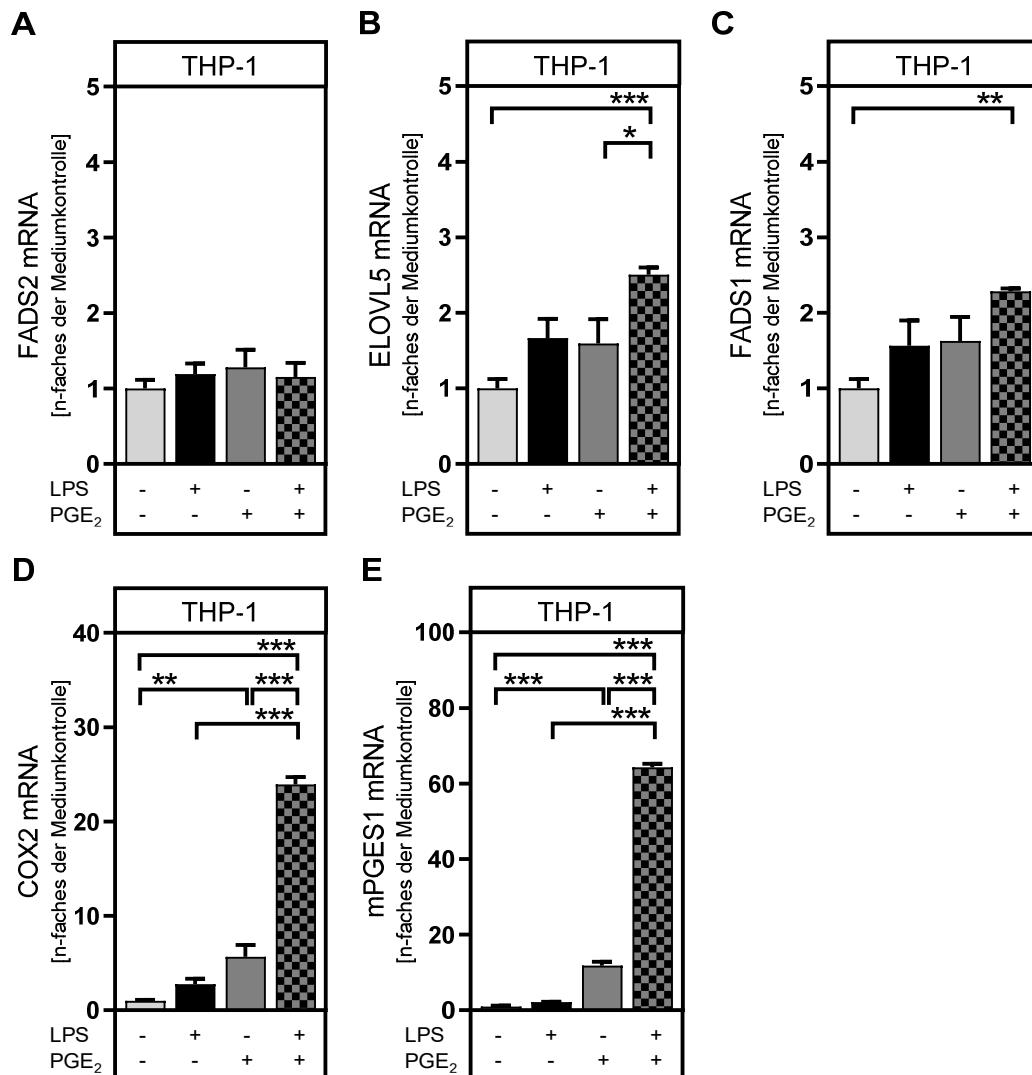


Abb. 47: Prostaglandin E₂-induzierte Verstärkung der Lipopolysaccharid-abhängigen mRNA-Expression Arachidonsäure- und Prostaglandin E₂-synthetisierender Enzyme in THP-1-Makrophagen

Die humane Zelllinie THP-1 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 ng/ml LPS und/ oder 10 μ M PGE₂ für 24 h. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. **Auswertung:** Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet und für die mittlere Induzierbarkeit durch LPS, PGE₂ und PGE₂ + LPS innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchset untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen (LPS, PGE₂ und PGE₂ + LPS) enthielten. **Darstellung:** Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 6 (A), 5 (B-D) oder 3 (E) unabhängigen Experimenten. **Statistik:** *Two-way ANOVA* mit *Dunnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; statistische Analyse der Interaktion von LPS und PGE₂ mittels *Two-way ANOVA* ist in Tab. 7 im Anhang Punkt 7.1 dargestellt; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. **Anmerkung:** Alle Zellkulturexperimente flossen auch in die Berechnung der in Abb. 22, Abb. 27 und Abb. 50 dargestellten Daten mit ein.

3.5.2 Prostaglandin E₂-induzierte Verstärkung der Lipopolysaccharid- und Insulin-abhängigen Expression Arachidonsäure- und Prostaglandin E₂-synthetisierender Enzyme in Makrophagen

U937-Makrophagen

Weder die Stimulation mit einer Kombination aus LPS und Insulin oder LPS und PGE₂ noch die Stimulation mit einer Kombination aller drei Stimulanzen hatte einen Einfluss auf die mRNA-Expressionen von FADS2 bzw. FADS1 (Abb. 48A, C). Sowohl LPS und Insulin als auch LPS und PGE₂ induzierten signifikant die ELOVL5-mRNA-Expression, jeweils auf das 1,7- bzw. 1,6-fache der Mediumkontrolle (Abb. 48B). Es wurde jedoch keine weitere Steigerung dieser Expression durch Stimulation mit einer Kombination aus LPS, Insulin und PGE₂ beobachtet. Die COX2-mRNA- und -Proteinexpression wurde sowohl durch LPS und Insulin als auch durch LPS und PGE₂ induziert (Abb. 48D, Abb. 49). Die mPGES1-mRNA-Expression wurde durch eine Stimulation der U937-Makrophagen mit LPS und PGE₂ induziert (Abb. 48E). Im Gegensatz zu Abb. 25 wurde jedoch die mPGES1-mRNA-Expression in U937-Makrophagen im Vergleich zur Mediumkontrolle nicht durch eine Stimulation mit LPS und Insulin induziert. Die signifikant stärkste COX2-mRNA-Expression, COX2-Proteinproduktion und mPGES1-mRNA-Expression wurde jedoch in U937-Makrophagen, die gleichzeitig mit einer Kombination aus Insulin und LPS stimuliert wurden, gemessen und betrug jeweils das 33,3-fache, 50,3-fache bzw. 43,0-fache der Mediumkontrolle.

THP-1-Makrophagen

Wie in U937-Makrophagen induzierte weder eine Stimulation mit den Zweifach-Kombinationen aus LPS und Insulin oder LPS und PGE₂ noch eine Stimulation mit der Dreifachkombination aus LPS, Insulin und PGE₂ in THP-1-Makrophagen die FADS2-mRNA-Expression (Abb. 50A). PGE₂ verstärkte signifikant die LPS- und Insulin-induzierte ELOVL5-mRNA-Expression vom 1,7-fachen auf das 3,0-fache der Mediumkontrolle (Abb. 50B). Eine Stimulation mit LPS, Insulin und PGE₂ erhöhte jedoch im Vergleich zur Stimulation mit LPS und PGE₂ nicht die ELOVL5-mRNA-Expression. Die FADS1-mRNA-Expression wurde durch eine Kombination aus LPS und PGE₂ signifikant auf das 2,3-fache der Mediumkontrolle erhöht (Abb. 50C). Eine gleichzeitige Inkubation der THP-1-Makrophagen mit Insulin, LPS und PGE₂ bewirkte jedoch keine weitere Steigerung der FADS1-mRNA-Expression. Die Kombination aus LPS und PGE₂ induzierte die COX2- und mPGES1-mRNA-Expressionen (Abb. 50D, E). Wie in U937-Makrophagen wurde die stärkste COX2- und mPGES1-mRNA-Expressionssteigerung in THP-1-Makrophagen, welche gleichzeitig mit LPS, Insulin und PGE₂ stimuliert wurden, beobachtet. Diese waren im Vergleich zur Mediumkontrolle um das 48,3- bzw. 100,8-fache gesteigert.

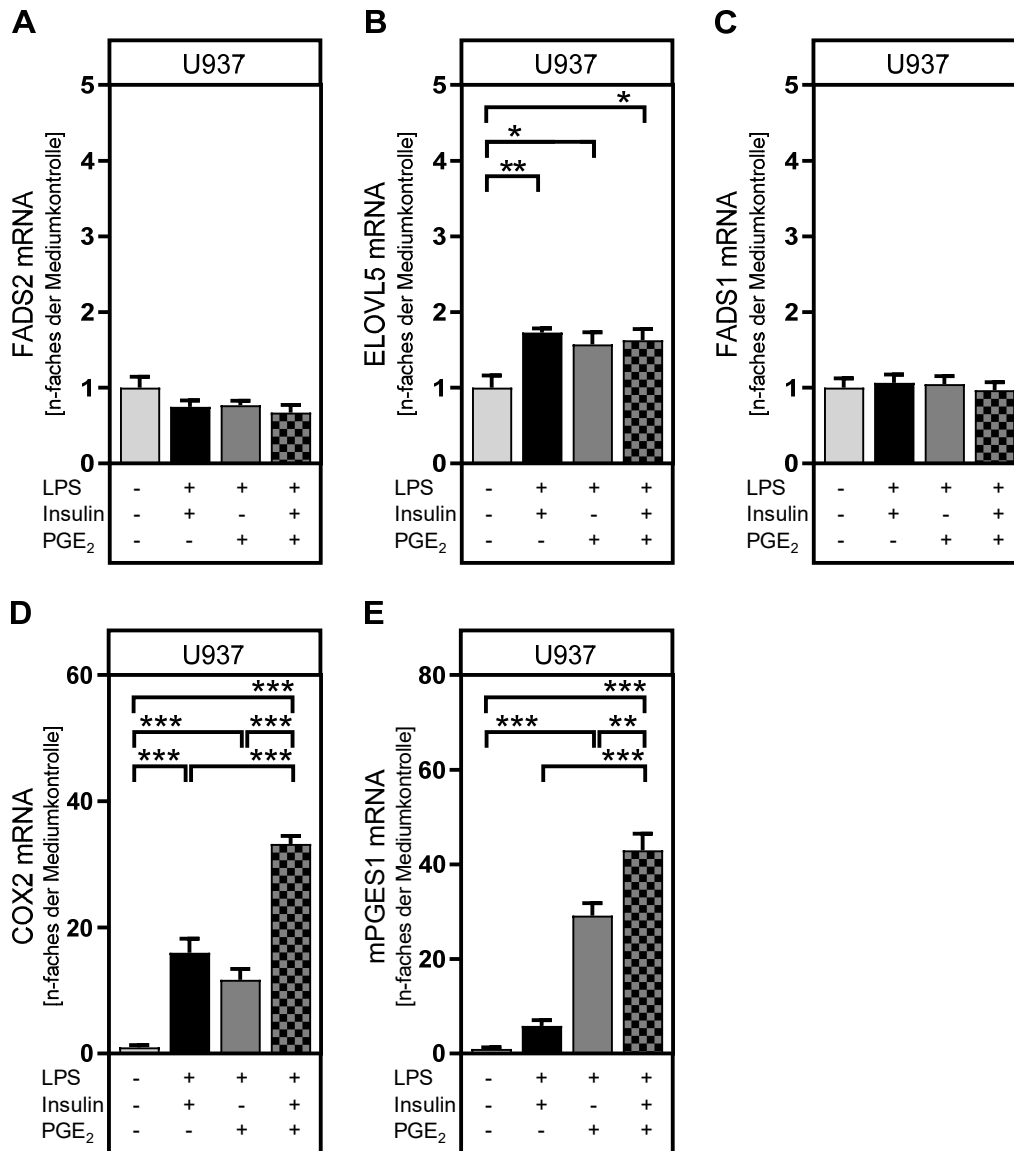


Abb. 48: Einfluss einer Kombination aus Lipopolysaccharid, Insulin und Prostaglandin E₂ auf die mRNA-Expression Arachidonsäure- und Prostaglandin E₂-synthetisierender Enzyme in U937-Makrophagen

Die humane Zelllinie U937 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin, 100 ng/ml LPS und/ oder 10 μ M PGE₂ für 24 h. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. Auswertung: Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet. Für die Normalisierung wurde die mittlere Induzierbarkeit durch LPS + Insulin, PGE₂ + LPS und PGE₂ + LPS + Insulin innerhalb jedes Versuches bestimmt. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchssatz untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen (LPS + Insulin, PGE₂ + LPS und PGE₂ + LPS + Insulin) enthielten. Darstellung: Das gesamte Versuchssatz beinhaltete die Stimulanzkombinationen Insulin, LPS, LPS + Insulin, PGE₂, PGE₂ + Insulin, PGE₂ + LPS und PGE₂ + Insulin + LPS. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in der Abbildung jedoch nur die Genexpressionen dargestellt, die durch LPS + Insulin, PGE₂ + LPS, PGE₂ + LPS + Insulin und durch die entsprechende Mediumkontrolle ausgelöst wurden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 5 unabhängigen Experimenten. Statistik: *Two-way ANOVA* mit *Dunnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; statistische Analyse der Interaktion von Insulin, LPS und PGE₂ mittels *Two-way ANOVA* ist in Tab. 8 im Anhang Punkt 7.1 dargestellt; *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. Anmerkung: Alle Zellkulturexperimente flossen auch in die Berechnung der in Abb. 20, Abb. 25 und Abb. 45 dargestellten Daten mit ein.

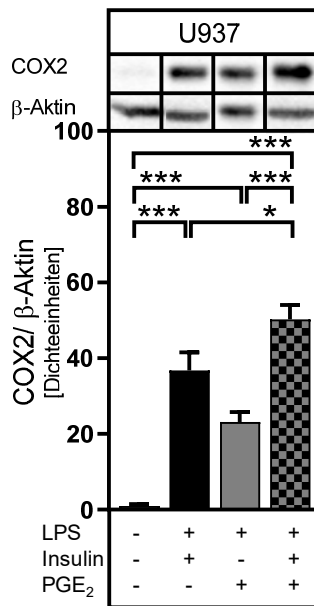


Abb. 49: Einfluss einer Kombination aus Lipopolysaccharid, Insulin und Prostaglandin E₂ auf die Produktion von Cyclooxygenase 2 in U937-Makrophagen

Die humane Zelllinie U937 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin, 100 ng/ml LPS und/ oder 10 µM PGE₂ für 24 h. Proteine wurden, wie unter 6.2.10 dargestellt, isoliert und die Expressionen von β-Aktin und COX2 mittels Western Blot (siehe 6.2.11) analysiert und die Bandenintensität quantifiziert. **Auswertung:** Für die Normalisierung wurde die Summe aller Proteinexpressionen (Mediumkontrolle, LPS + Insulin, PGE₂ + LPS und PGE₂ + LPS + Insulin) innerhalb jedes Versuches bestimmt. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuches untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen (LPS + Insulin, PGE₂ + LPS und PGE₂ + LPS + Insulin) enthielten. **Darstellung:** Das gesamte Versucheset beinhaltet die Stimulanzkombinationen Insulin, LPS, LPS + Insulin, PGE₂, PGE₂ + Insulin, PGE₂ + LPS und PGE₂ + Insulin + LPS. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in der Abbildung jedoch nur die Genexpressionen dargestellt, die durch LPS + Insulin, PGE₂ + LPS, PGE₂ + LPS + Insulin und durch die entsprechende Mediumkontrolle ausgelöst wurden. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von 5 unabhängigen Experimenten und jeweils ein repräsentativer Western Blot (vollständige Blots in Abb. 79 im Anhang Punkt 7.6). **Statistik:** *Two-way ANOVA* mit *Dunnnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; statistische Analyse der Interaktion von Insulin, LPS und PGE₂ mittels *Two-way ANOVA* ist in Tab. 8 im Anhang Punkt 7.1 dargestellt; *: $p \leq 0,05$, ***: $p \leq 0,001$. **Anmerkung:** Alle Zellkulturexperimente fließen auch in die Berechnung der in Abb. 19, Abb. 24 und Abb. 46 dargestellten Daten mit ein.

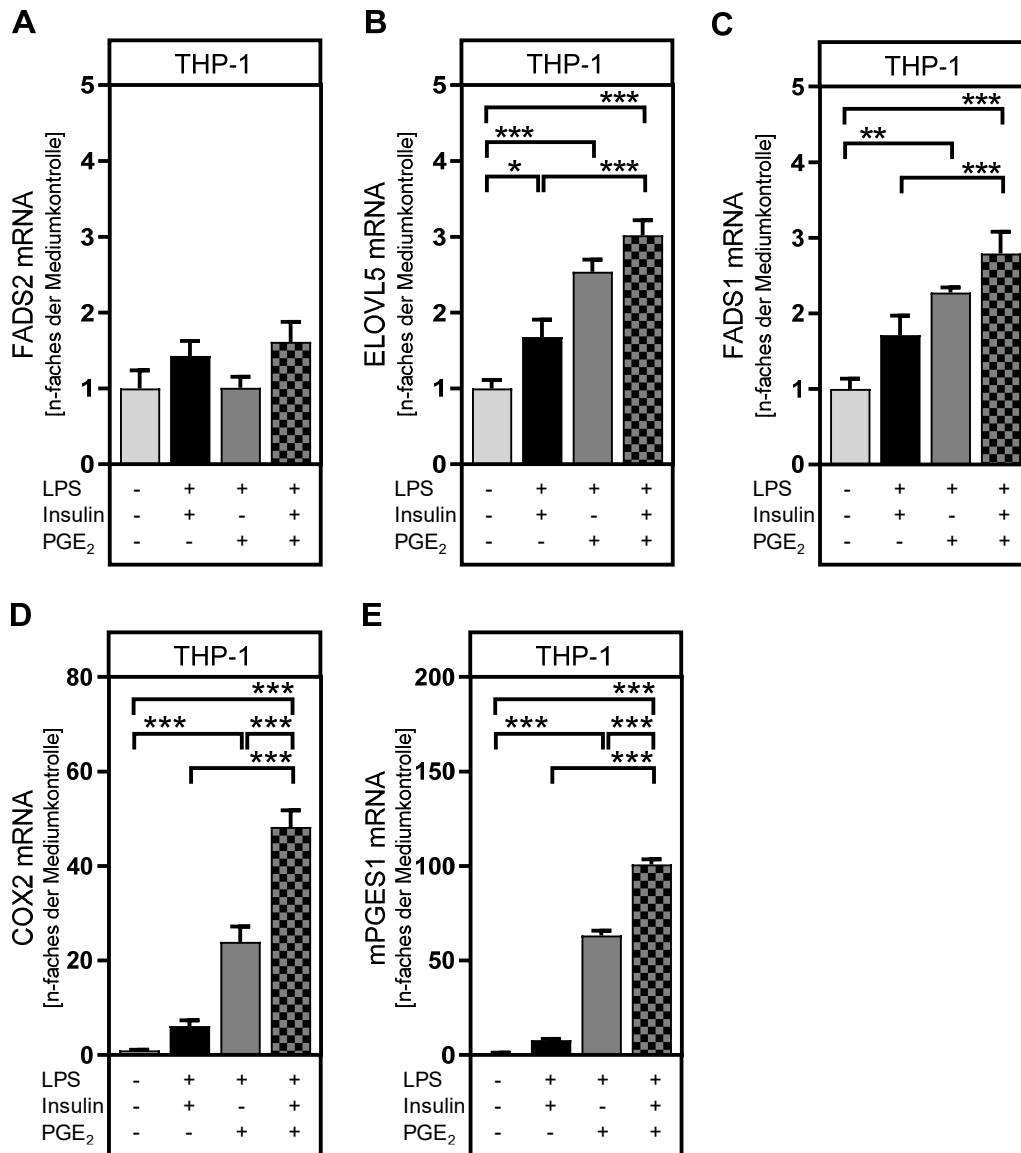


Abb. 50: Einfluss einer Kombination aus Lipopolysaccharid, Insulin und Prostaglandin E₂ auf die mRNA-Expression Arachidonsäure- und Prostaglandin E₂-synthetisierender Enzyme in THP-1-Makrophagen

Die humane Zelllinie THP-1 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin, 100 ng/ml LPS und/ oder 10 µM PGE₂ für 24 h. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. Auswertung: Als Referenzen diente β-Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der ΔΔCt-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet. Für die Normalisierung wurde die mittlere Induzierbarkeit durch LPS + Insulin, PGE₂ + LPS und PGE₂ + LPS + Insulin innerhalb jedes Versuches bestimmt. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchssatz untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen (LPS + Insulin, PGE₂ + LPS und PGE₂ + LPS + Insulin) enthielten. Darstellung: Das gesamte Versuchssatz beinhaltet die Stimulanzkombinationen Insulin, LPS, LPS + Insulin, PGE₂, PGE₂ + Insulin, PGE₂ + LPS und PGE₂ + Insulin + LPS. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in der Abbildung jedoch nur die Genexpressionen dargestellt, die durch LPS + Insulin, PGE₂ + LPS, PGE₂ + LPS + Insulin und durch die entsprechende Mediumkontrolle ausgelöst wurden. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von 6 (A), 5 (B-D) oder 3 (E) unabhängigen Experimenten. Statistik: Two-way ANOVA mit *Dunnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; statistische Analyse der Interaktion von Insulin, LPS und PGE₂ mittels *Two-way ANOVA* ist in Tab. 8 im Anhang Punkt 7.1) dargestellt; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. Anmerkung: Alle Zellkulturexperimente fließen auch in die Berechnung der in Abb. 22, Abb. 27 und Abb. 47 dargestellten Daten mit ein.

Primäre humane Makrophagen

In primären humanen Makrophagen wurde lediglich die Wirkung von PGE₂ auf die basale mRNA-Expression der PGE₂-synthetisierenden Enzyme untersucht. PGE₂-stimulierte Makrophagen zweier Probanden wiesen eine tendenziell erhöhte COX2-mRNA-Expression auf, wohingegen PGE₂-stimulierte Makrophagen des dritten Probanden keine gesteigerte COX2-mRNA-Expression aufwiesen (Abb. 51A). Die mPGES1-mRNA-Expression wurde durch PGE₂ in allen drei Probanden und insgesamt signifikant induziert (Abb. 51B).

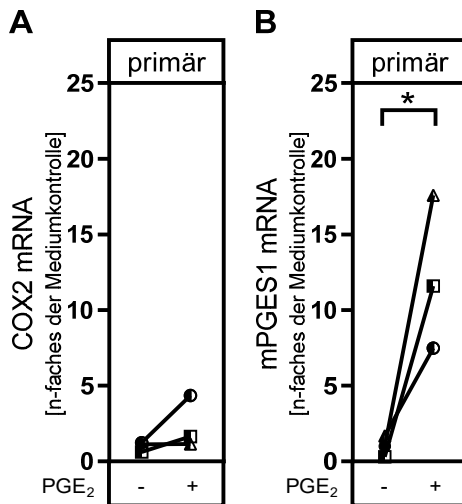


Abb. 51: Prostaglandin E₂-induzierte mRNA-Expression Prostaglandin E₂-synthetisierender Enzyme in primären humanen Makrophagen

Primäre humane Monozyten wurden, wie unter 6.2.2 beschrieben, isoliert, kultiviert und für 8 Tage mit GM-CSF differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 10 μ M PGE₂ für 24 h. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.6 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. Auswertung: Als Referenzgene dienten β -Aktin, GAPDH und HPRT. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet. Die Berechnungen wurden mit jedem Referenzgen separat durchgeführt und im Anschluss das geometrische Mittel der berechneten Induktionen gebildet. Für die Normalisierung wurden in jedem Versuche parallel Zellen mit 100 ng/ml LPS behandelt, analog der PGE₂-behandelten Zellen aufgearbeitet und analysiert und die mittlere Induzierbarkeit durch LPS und PGE₂ innerhalb jedes Versuches bestimmt. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchsset untersuchten Stimulanzen (PGE₂ und LPS) enthielten. Darstellung: Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in der Abbildung nur die Genexpressionen dargestellt, die durch PGE₂ und durch die entsprechende Mediumkontrolle ausgelöst wurden, nicht jedoch die durch LPS ausgelösten Genexpressionen. Dargestellt sind die Einzelwerte von 3 unabhängigen Experimenten. Gleiche Symbole zur Darstellung der Einzelwerte kennzeichnen die Zugehörigkeit zu ein und demselben Probanden. Statistik: zweiseitiger *t*-Test für gepaarte Stichproben; *: $p \leq 0,05$.

3.5.3 Prostaglandin E₂-induzierte Verstärkung der Palmitat-abhängigen Expression Arachidonsäure- und Prostaglandin E₂-synthetisierender Enzyme in Makrophagen

Palmitat induzierte in THP-1-Makrophagen signifikant die mRNA-Expressionen der Arachidonsäure-synthetisierenden Enzyme FADS2 und FADS1 und des an der PGE₂-Synthese beteiligten Enzyms mPGES1 (vgl. 3.3.3). Nun sollte überprüft werden, ob PGE₂ die Palmitat-induzierte Expression Arachidonsäure- und PGE₂-synthetisierender Enzyme weiter verstärkt.

PGE₂ hatte keinen Einfluss auf die Palmitat-induzierten FADS2- und FADS1-mRNA-Expressionen (Abb. 52A, C). THP-1-Makrophagen, die gleichzeitig mit Palmitat und PGE₂ stimuliert wurden, wiesen eine ähnliche ELOVL5-mRNA-Expression auf wie THP-1-Makrophagen, die mit PGE₂ allein stimuliert wurden (Abb. 52B). Jedoch steigerte PGE₂ die COX2- und mPGES1-mRNA-Expressionen in mit Palmitat stimulierten THP-1-Makrophagen signifikant und mehr als additiv (Palmitat allein: 1,7- bzw. 3,8-fach; PGE₂ allein: 5,0- bzw. 12,1-fach) auf das 9,0- bzw. 21,7-fache der Mediumkontrolle (Abb. 52D, E). Weder Palmitat noch PGE₂ induzierten die COX2-Proteinexpression signifikant. Im Gegensatz dazu führte die zeitgleiche Stimulation der THP-1-Makrophagen mit einer Kombination aus Palmitat und PGE₂ zu einer signifikanten 3,1-fachen Induktion des Enzyms (Abb. 53B).

Nun sollte überprüft werden, ob PGE₂ seine Produktion in Palmitat-behandelten THP-1-Makrophagen verstärkt. Da extern zum Medium zugegebenes PGE₂ und von der Zelle produziert PGE₂ im ELISA jedoch nicht unterschieden werden können, musste auf einen EP-Rezeptor-Agonisten zurückgegriffen werden. Eigene Untersuchungen legen nahe, dass PGE₂ seine Wirkung in THP-1-Makrophagen vor allem über den EP4-Rezeptor vermittelt (vgl. 3.4.4). Der verwendete EP4-Rezeptor-Agonist löste in der verwendeten Konzentration von 1 µM keine falsch positiven Ergebnisse im ELISA-Verfahren aus (Daten nicht gezeigt). Der EP4-Rezeptor-Agonist hatte jedoch auch keinen signifikanten Einfluss auf den PGE₂-Gehalt im Überstand Palmitat-behandelter THP-1-Makrophagen (Abb. 53A). Daher konnte die gesteigerte Synthese PGE₂-synthetisierender Enzyme nicht funktionell bestätigt werden.

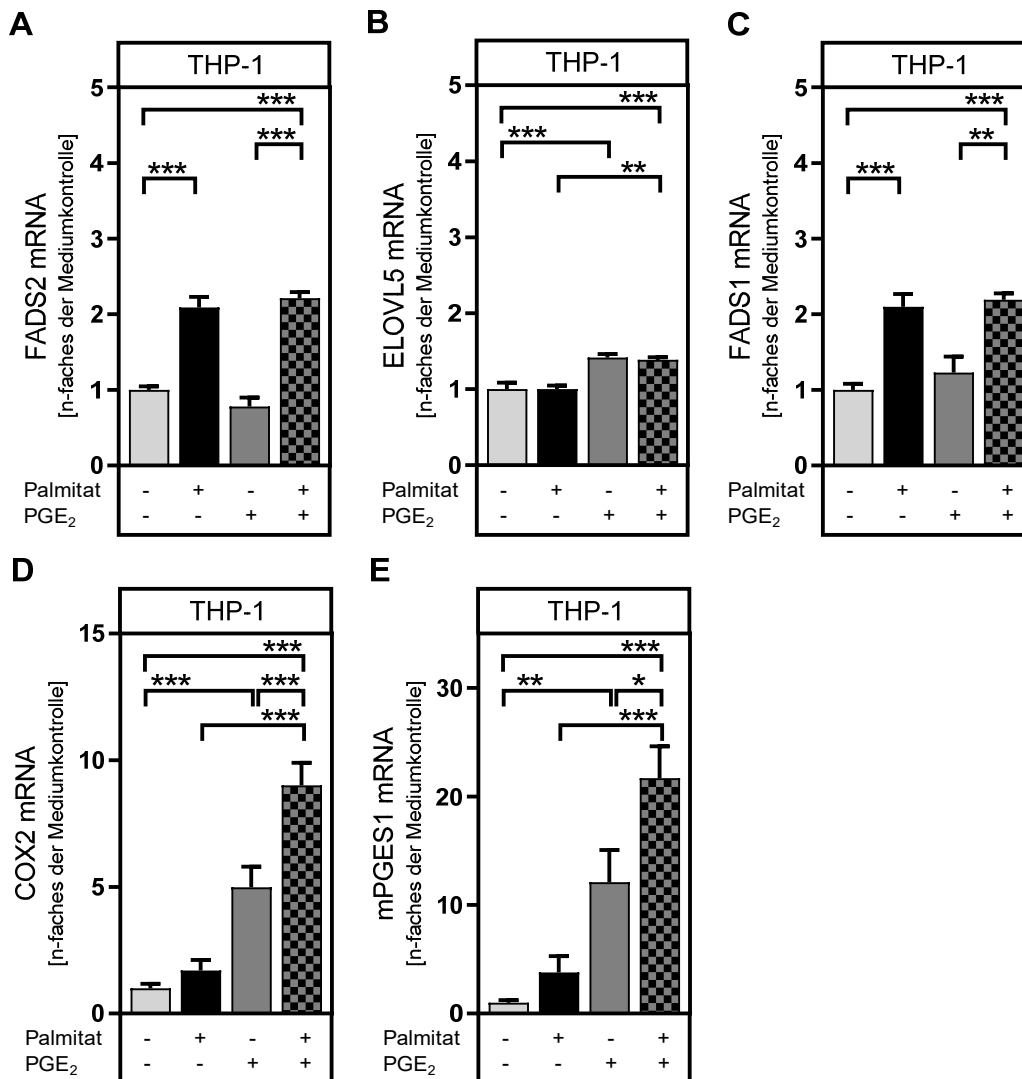


Abb. 52: Prostaglandin E₂-induzierte Steigerung der Palmitat-abhängigen mRNA-Expression Arachidonsäure- und Prostaglandin E₂-synthetisierender Enzyme in THP-1-Makrophagen

Die humane Zelllinie THP-1 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 μ M Palmitat und/ oder 10 μ M PGE₂ für 24 h. Die Stimulanzen wurden vor Behandlung der Zellen 90 min mit 10 μ g/ml Polymyxin B inkubiert. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. Auswertung: Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet und für die mittlere Induzierbarkeit durch Palmitat, PGE₂ und PGE₂ + Palmitat innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchssatz untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen (Palmitat, PGE₂ und Palmitat + PGE₂) enthielten. Darstellung: Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 6 (A, C), 5 (B), 10 (D) oder 7 (E) unabhängigen Experimenten. Statistik: *Two-way ANOVA* mit *Dunnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; statistische Analyse der Interaktion von Palmitat und PGE₂ mittels *Two-way ANOVA* ist in Tab. 9 im Anhang Punkt 7.1 dargestellt; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. Anmerkung: Alle Zellkulturexperimente flossen auch in die Berechnung der in Abb. 30 dargestellten Daten mit ein. Beteiligte: Einige Zellkulturexperimente (einschließlich RNA-Isolation und cDNA-Synthese) wurden von Sarah Brunner im Rahmen einer dieser Doktorarbeit begleitenden Bachelorarbeit durchgeführt.

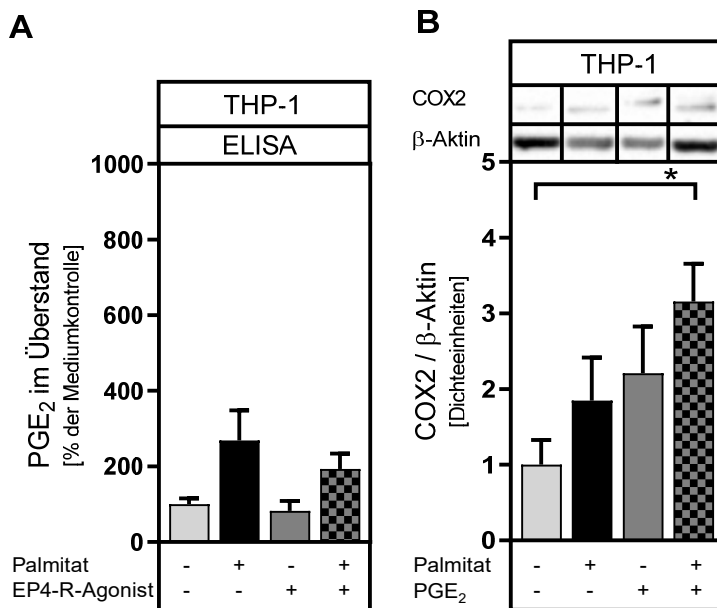


Abb. 53: Prostaglandin E₂-induzierte Steigerung der Palmitat-abhängigen Produktion von Prostaglandin E₂ und Cyclooxygenase 2 in THP-1-Makrophagen

Die humane Zelllinie THP-1 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 μ M Palmitat, 10 μ M PGE₂ und/ oder 1 μ M EP4-Agonist CAY10598 für 24 h. Die Stimulanzen wurden vor Behandlung der Zellen 90 min mit 10 μ g/ml Polymyxin B inkubiert. (A): Der PGE₂-Gehalt in Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA, wie unter 6.2.13 beschrieben, untersucht. (B): Proteine wurden, wie unter 6.2.10 dargestellt, isoliert und die Expression von β -Aktin und COX2 mittels Western Blot (siehe 6.2.11) analysiert und die Bandenintensität quantifiziert. **Auswertung:** Sowohl Western Blot- als auch ELISA-Daten wurden auf die Summe aller Expressionen (Palmitat, PGE₂ bzw. EP4-Rezeptor-Agonist und Palmitat bzw. EP4-Rezeptor-Agonist + PGE₂) innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versucheset untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen [(A): Palmitat, EP4-Agonist und Palmitat + EP4-Agonist, (B): Palmitat, PGE₂ und PGE₂ + Palmitat] enthielten. **Darstellung:** Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 3 (A) oder 6 (B) unabhängigen Experimenten und gegebenenfalls ein repräsentativer Western Blot (vollständige Blots in Abb. 80 im Anhang Punkt 7.6). **Statistik:** *Two-way ANOVA* mit *Dunnnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; statistische Analyse der Interaktion von Palmitat und PGE₂ mittels *Two-way ANOVA* ist in Tab. 9 im Anhang Punkt 7.1 dargestellt; *: $p \leq 0,05$. **Anmerkung:** Alle Zellkulturexperimente flossen auch in die Berechnung der in Abb. 29 dargestellten Daten mit ein.

3.6 Einfluss einer Insulin-induzierten Zytokinfreisetzung in U937-Makrophagen auf die Insulinsensitivität in Hepatozyten der Ratte

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Hyperinsulinämie nicht nur die LPS-induzierte Entzündungsantwort verstärken kann (vgl. 3.1.3), sondern auch selbst die Expression pro-inflammatorischer Mediatoren wie $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-8 , OSM und CCL2 und die Bildung von PGE_2 in Makrophagen induzieren kann (vgl. 3.1.1 und 3.3.1). PGE_2 wiederum verstärkte die Stimulus-abhängige Entzündungsantwort in Makrophagen und seine eigene Synthese (vgl. 3.4 und 3.5), wodurch ein Teufelskreis der Entzündung etabliert werden könnte. Ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren des metabolischen Syndroms (Hyperinsulinämie, erhöhte LPS-, Palmitat- und PGE_2 -Plasmaspiegel) könnte demnach die Expression zahlreicher pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine wie $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-8 und OSM und die Bildung von PGE_2 sogar noch potenzieren. Es gibt Hinweise darauf, dass eine chronische Entzündung, wie sie in Patienten mit metabolischen Syndrom häufig auftritt, eng mit der Entstehung einer Insulinresistenz verknüpft ist [122, 182]. In einem weiteren Schritt sollte daher untersucht werden, ob eine durch Hyperinsulinämie induzierte Entzündungsantwort in Makrophagen die Manifestation einer Insulinresistenz in Hepatozyten weiter vorantreibt. Dazu wurden primäre Hepatozyten der Ratte isoliert und mit 100 nM Insulin oder mit konditionierten Überständen von Kontroll- und Insulin-stimulierten U937-Makrophagen inkubiert. Die Stimulation der Hepatozyten erfolgte für 2 Stunden, um mRNA-Expressionen mittels qPCR zu messen, und 15 Minuten, um Proteinphosphorylierungen mittels Western Blot zu detektieren. Um eine Aktivierung des NF- κ B-Promotors zu messen, wurden die primären Rattenhepatozyten vor 8-stündiger Insulin-Stimulation mit einem Reporterplasmid, in dem die Luciferaseaktivität unter Kontrolle eines NF- κ B-responsiven Elements stand, transfiziert.

Zusätzlich wurde getestet, ob Hepatozyten nach einer Stimulation mit 100 nM Insulin selbst schon die pro-inflammatorischen Zytokine $\text{IL-1}\beta$, IL-6 und OSM exprimieren. Die mRNA-Expressionen dieser Zytokine lagen jedoch unterhalb der Nachweisgrenze und können daher als vernachlässigbar gering eingeschätzt werden (Daten nicht gezeigt).

3.6.1 Wirkung der Überstände insulin-behandelter Makrophagen auf die Insulinsensitivität in Hepatozyten der Ratte

Die Glukokinase ist ein Schlüsselenzym der Glykolyse und seine Expression wird in der Leber Insulin-abhängig reguliert [160]. Es stellt daher einen geeigneten Indikator zur Beurteilung der Insulinsensitivität von Hepatozyten dar. Insulin induzierte signifikant die Glukokinase-mRNA-Expression in Hepatozyten, die mit Kontrollmedium kultiviert wurden (Abb. 54A, B). Wenn Rattenhepatozyten mit Medium, das zu 50 % aus Überständen von Kontroll-U937-Makrophagen bestand, inkubiert wurden, entsprachen die Glukokinase-

mRNA-Expressionen in etwa denen von Kontrollhepatozyten (Abb. 54A). Die Zugabe von 100 nM Insulin zu diesem Medium bewirkte eine Induktion der Glukokinase, welche in etwa der Insulin-induzierten Glukokinase-Expression in Hepatozyten mit Kontrollmedium entsprach. Wenn Rattenhepatozyten mit Medium, das zu 50 % aus Überständen Insulin-stimulierter U937-Makrophagen bestand, inkubiert wurden, betrug die Glukokinase-Expression das 5,4-fache verglichen mit Kontrollhepatozyten. Diese signifikante Induktion wurde auf das restliche Insulin, das sich im Überstand Insulin-stimulierter U937-Makrophagen befand, zurückgeführt. Dieses wurde von Dr. Janin Henkel in Zusammenarbeit mit der Abteilung Fettzellentwicklung und Ernährung des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung gemessen und betrug 57.68 ± 7.59 nM. Die Glukokinase-Expression in Hepatozyten, welche durch Überstände Insulin-stimulierter Makrophagen induziert wurde, konnte durch Zugabe von 100 nM Insulin nicht weiter gesteigert werden. Sie blieb signifikant geringer als die Insulin-induzierte Glukokinase-mRNA-Expression in Hepatozyten, die mit Überständen von Kontroll-U937-Zellen inkubiert wurden. Das bedeutet, dass die Überstände Insulin-stimulierter U937-Makrophagen die Insulin-induzierte Glukokinase-Expression hemmen. Um zu ergründen, welche Zytokine für die Inhibition der Insulin-induzierten Glukokinase-Expression verantwortlich waren, wurden Rattenhepatozyten mit 100 nM Insulin inkubiert und die Glukokinase-mRNA-Expression mit und ohne Zugabe von 1 ng/ml IL-1 β , 100 ng/ml IL-6 oder 100 ng/ml LPS analysiert. In dieser Versuchsreihe induzierte Insulin die Glukokinase-Expression auf das 54,6-fache der Mediumkontrolle (Abb. 54B). IL-6 reduzierte die Insulin-induzierte Glukokinase-Expression signifikant auf das 16,9-fache der Mediumkontrolle. Eine nahezu vollständige Inhibition der Insulin-induzierten Glukokinase-Expression wurde durch die Inkubation mit IL-1 β erreicht. Die Negativkontrolle LPS hatte keinen Einfluss auf die Insulin-induzierte Glukokinase-mRNA-Expression in Hepatozyten.

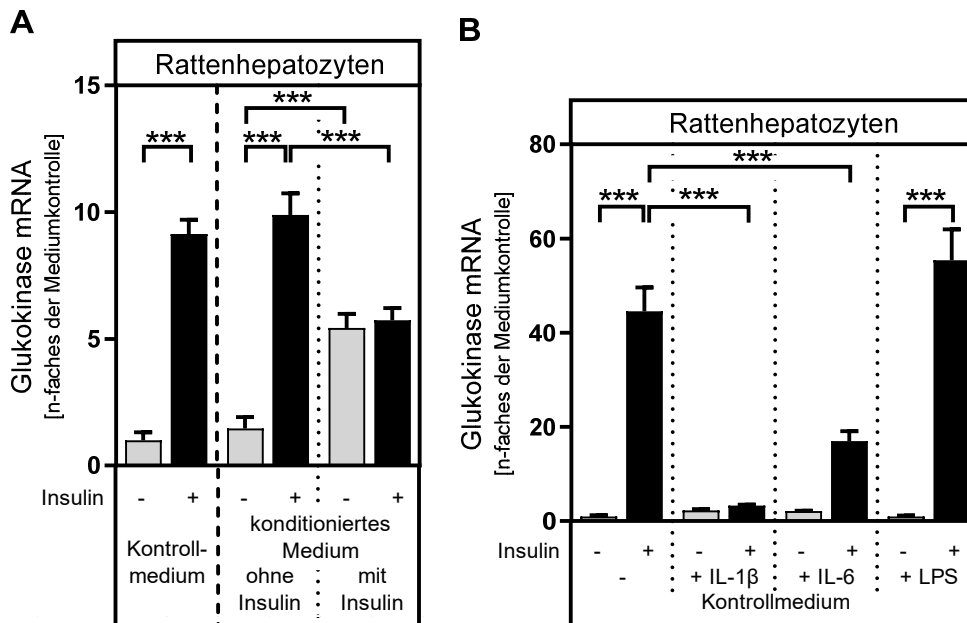


Abb. 54: Inhibition der Insulin-induzierten Glukokinase-Induktion in Hepatozyten der Ratte durch Überstände Insulin-behandelter U937-Makrophagen

Primäre Hepatozyten der Ratte wurden, wie unter 6.2.3 beschrieben, isoliert und kultiviert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin, 1 ng/ml IL-1 β , 100 ng/ml IL-6 oder 100 ng/ml LPS für 2 h in Medium, welches sich aus 50 % M199-Kulturmedium III und 50 % RPMI 1640-Kulturmedium II zusammensetzte. Falls angegeben wurde das RPMI 1640-Kulturmedium II durch konditionierte Überstände von U937-Makrophagen, welche von Kontroll- oder Insulin-stimulierten U937-Makrophagen stammten, ersetzt (A). Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. Auswertung: Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet und für die mittlere Induzierbarkeit durch Kontrollinsulin und konditionierten Überständen mit und ohne zusätzlichem Insulin (A) bzw. durch Insulin, IL-1 β , IL-1 β + Insulin, IL-6, IL-6 + Insulin, LPS und LPS + Insulin (B) innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchssatz untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen [(A): Insulin, konditioniertes Medium ohne Insulin, konditioniertes Medium ohne Insulin + Insulin, konditioniertes Medium mit Insulin und konditioniertes Medium mit Insulin + Insulin, (B): Insulin, IL-1 β , IL-1 β + Insulin, IL-6, IL-6 + Insulin, LPS und LPS + Insulin] enthielten. Darstellung: Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 6 (A) oder 3 (B) unabhängigen Experimenten. Statistik: Two-way ANOVA mit *Dunnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; ***: $p \leq 0,001$. Beteiligte: Einige Zellkultur-experimente (einschließlich RNA-Isolation, cDNA-Synthese und qPCR) wurden von Rodolfo Gonzalez Camargo im Rahmen seiner Doktorarbeit durchgeführt. Die Daten wurden bereits, in geteilter Erstautorenschaft, publiziert [202].

3.6.2 Molekularer Mechanismus einer durch Überstände Insulin-stimulierter Makrophagen ausgelösten Insulinresistenz in Hepatozyten der Ratte

Es sollte untersucht werden, über welchen Mechanismus die Überstände Insulin-stimulierter U937-Makrophagen eine Insulinresistenz in Hepatozyten auslösen können. Dafür sind folgende Mechanismen denkbar: 1) IL-6-Typ-Zytokine wie OSM oder IL-6 könnten den Januskinase (JAK)-STAT-Signalweg aktivieren und so die Expression von SOCS3 induzieren, 2) IL-6-Typ-Zytokine könnten MAP-Kinasen aktivieren, welche eine inhibierende Serin-Phosphorylierung der IRS katalysieren und 3) IL-1 β könnte die Kinase IKK β aktivieren, welche ebenfalls eine inhibierende Serin-Phosphorylierung der IRS katalysieren kann.

Zunächst sollte die Hypothese der Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges überprüft werden. Im Gegensatz zu Überständen von Kontrollmakrophagen induzierten die Überstände Insulin-stimulierter U937-Makrophagen die Phosphorylierung von STAT3 in Hepatozyten auf das 11,9-fache im Vergleich zu Hepatozyten, die in Kontrollmedium kultiviert wurden (Abb. 55A). Obwohl Überstände von Kontrollmakrophagen die Phosphorylierung von STAT3 nicht signifikant steigerten, induzierten sie signifikant die SOCS3-mRNA-Expression in Rattenhepatozyten (Abb. 55B). Diese war 4,5-fach induziert im Vergleich zu Kontrollhepatozyten. Dies lässt vermuten, dass schon eine geringe basale IL-6-Typ-Zytokin-Produktion, wie sie in Kontroll-U937-Makrophagen vorherrschte, ausreichte, um die IL-6-Typ-Zytokin-Rezeptorsignalkaskade zu aktivieren. Eine weitaus stärkere Induktion der SOCS3-mRNA-Expression (8,8-fach) war jedoch nach Inkubation der Rattenhepatozyten mit Überständen Insulin-stimulierter U937-Makrophagen zu beobachten. Eine Zugabe von Insulin verstärkte weder die STAT3-Phosphorylierung noch die SOCS3-mRNA-Expression, welche durch Überstände von Kontroll- oder Insulin-stimulierten Makrophagen ausgelöst wurden.

Als nächstes wurde die Hypothese der Aktivierung von MAP-Kinasen überprüft. Eine alleinige Stimulation der Rattenhepatozyten mit Insulin bewirkte keine signifikant verstärkte Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK1/2 (Abb. 56). Rattenhepatozyten, die mit Überständen von Kontroll-U937-Makrophagen inkubiert wurden, wiesen eine 7,6-fach verstärkte Phosphorylierung der Kinase ERK1/2 im Vergleich zu Kontrollhepatozyten auf. Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass schon eine geringe basale IL-6-Typ-Zytokin-Produktion, wie sie in Kontroll-U937-Makrophagen vorherrschte, ausreichte, um die IL-6-Typ-Zytokin-Rezeptorsignalkaskade zu aktivieren. Eine signifikant stärkere ERK1/2-Phosphorylierung wurde jedoch in Rattenhepatozyten, die mit Überständen Insulin-stimulierter Makrophagen inkubiert wurden, gemessen. Sie betrug das 15,9-fache im Vergleich zu Kontrollhepatozyten. Eine Zugabe von Insulin verstärkte tendenziell, aber nicht signifikant, die ERK1/2-Phosphorylierung in Rattenhepatozyten, welche mit Überständen von Kontroll- oder Insulin-stimulierten Makrophagen inkubiert wurden.

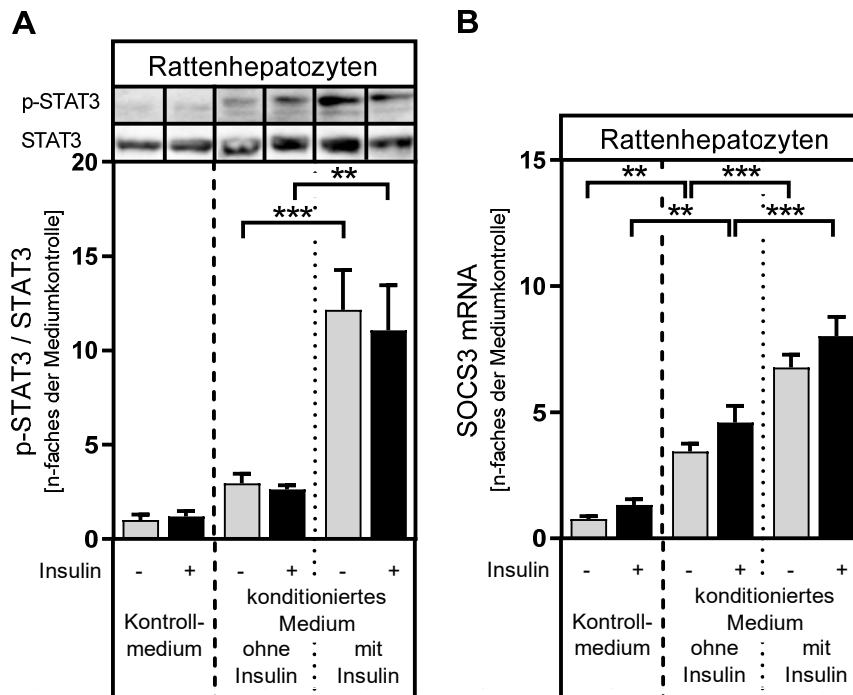


Abb. 55: Aktivierung des STAT3-SOCS3-abhängigen Signalwegs in Hepatozyten der Ratte durch Überstände Insulin-behandelter U937-Makrophagen

Primäre Hepatozyten der Ratte wurden, wie unter 6.2.3 beschrieben, isoliert und kultiviert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin für 15 min (A) oder 2 h (B) in Medium, welches sich aus 50 % M199-Kulturmedium III und 50 % RPMI 1640-Kulturmedium II zusammensetzte. Falls angegeben wurde das RPMI 1640-Kulturmedium II durch konditionierte Überstände von U937-Makrophagen, welche von Kontroll- oder Insulin-stimulierten U937-Makrophagen stammten, ersetzt. (A): Proteine wurden, wie unter 6.2.10 dargestellt, isoliert und die Expression von STAT3 oder p-STAT3 mittels Western Blot (siehe 6.2.11) analysiert und die Bandenintensität quantifiziert. (B): Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. Auswertung: (A): Die Daten wurden auf die Summe aller Proteinexpressionen (Kontrollmedium, Kontrollmedium + Insulin, konditioniertes Medium ohne Insulin, konditioniertes Medium ohne Insulin + Insulin, konditioniertes Medium mit Insulin und konditioniertes Medium mit Insulin + Insulin) innerhalb jedes Versuches normalisiert. (B): Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet und für die mittlere Induzierbarkeit durch Kontrollinsulin und konditionierten Überständen mit und ohne zusätzlichem Insulin innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchssatz untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen enthielten. Darstellung: Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 7 (A) oder 5 (B) unabhängigen Experimenten und gegebenenfalls jeweils ein repräsentativer Western Blot (vollständige Blots in Abb. 81 im Anhang Punkt 7.6). Statistik: *Two-way ANOVA* mit *Dunnnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. Beteiligte: Einige Zellkulturexperimente (einschließlich Proteinisolation und Western Blot bzw. RNA-Isolation, cDNA-Synthese und qPCR) wurden von Rodolfo Gonzalez Camargo im Rahmen seiner Doktorarbeit durchgeführt. Die Daten wurden bereits, in geteilter Erstautorenschaft, publiziert [202].

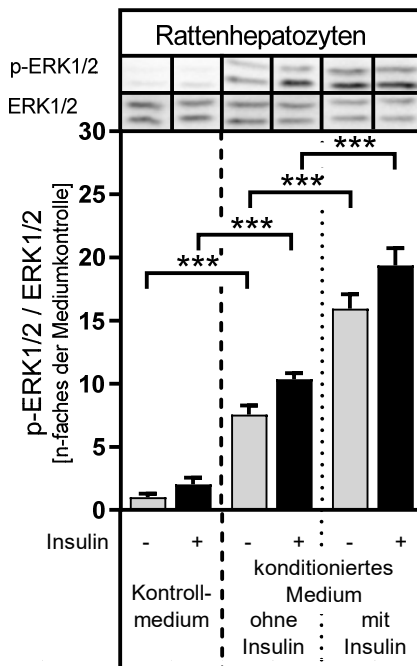


Abb. 56: Aktivierung von ERK1/2 in Hepatozyten der Ratte durch Überstände Insulin-behandelter U937-Makrophagen

Primäre Hepatozyten der Ratte wurden, wie unter 6.2.3 beschrieben, isoliert und kultiviert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin für 15 min in Medium, welches sich aus 50 % M199-Kulturmedium III und 50 % RPMI 1640-Kulturmedium II zusammensetzte. Falls angegeben wurde das RPMI 1640-Kulturmedium II durch konditionierte Überstände von U937-Makrophagen, welche von Kontroll- oder Insulin-stimulierten U937-Makrophagen stammten, ersetzt. Proteine wurden, wie unter 6.2.10 dargestellt, isoliert und die Expression von ERK1/2 oder p-ERK1/2 mittels Western Blot (siehe 6.2.11) analysiert und die Bandenintensität quantifiziert. **Auswertung:** Die Daten wurden auf die Summe aller Proteinexpressionen (Kontrollmedium, Kontrollmedium + Insulin, konditioniertes Medium ohne Insulin, konditioniertes Medium ohne Insulin + Insulin, konditioniertes Medium mit Insulin und konditioniertes Medium mit Insulin + Insulin) innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchssatz untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen enthielten. **Darstellung:** Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 10 unabhängigen Experimenten und jeweils ein repräsentativer Western Blot (vollständige Blots in Abb. 82 im Anhang Punkt 7.6). **Statistik:** *Two-way ANOVA* mit *Dunnnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; ***: $p \leq 0,001$. **Beteiligte:** Einige Zellkulturerperimente (einschließlich Proteinisolierung und Western Blot) wurden von Rodolfo Gonzalez Camargo im Rahmen seiner Doktorarbeit durchgeführt. Die Daten wurden bereits, in geteilter Erstautorenschaft, publiziert [202].

Auch die Hypothese einer Induktion der Kinase IKK β sollte überprüft werden. Weder 100 nM Insulin noch die Überstände von Kontroll- oder Insulin-stimulierter U937-Makrophagen hatten einen signifikanten Einfluss auf die Phosphorylierung der IKK β (Abb. 57A). Zusätzlich zur Phosphorylierung der IKK β wurde die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B gemessen. Dieser ist der Aktivierung der IKK β nachgeschaltet. Eine Stimulation der Rattenhepatozyten mit 100 nM Insulin aktivierte den NF- κ B-Promotor nicht (Abb. 57B). Dies galt auch für Rattenhepatozyten, die mit Überständen von Kontrollmakrophagen inkubiert wurden. Im Gegensatz dazu bewirkte die zusätzliche Insulin-Stimulation der Rattenhepatozyten, die mit Überständen von Kontrollmakrophagen inkubiert wurden, eine signifikante Aktivitätssteigerung des NF- κ B-Reporters. Diese war im Vergleich zu Kontrollhepatozyten 2,3-fach induziert. Eine Stimulation der Rattenhepatozyten mit Überständen Insulin-stimulierter Makrophagen bewirkte eine signifikante Steigerung der Reporteraktivität im Vergleich zu Rattenhepatozyten, die mit Überständen von Kontrollmakrophagen stimuliert wurden. Diese wurde im Vergleich zu Kontrollhepatozyten durch eine zusätzliche Stimulation mit Insulin signifikant von einer 2,0-fachen auf eine 3,3-fache Aktivität gesteigert.

Sowohl MAP-Kinasen als auch IKK β können eine inaktivierende Serin-Phosphorylierung der IRS katalysieren. Insulin induzierte die inaktivierende Serin-Phosphorylierung der IRS im Vergleich zu Hepatozyten, die in Kontrollmedium inkubiert wurden, signifikant auf das 2,5-fache (Abb. 58). In Hepatozyten, die mit Überständen von Kontrollmakrophagen inkubiert wurden, war die Serin-Phosphorylierung der IRS in etwa vergleichbar mit der Phosphorylierung, die in Hepatozyten mit Kontrollmedium und zusätzlicher Gabe von Insulin gemessen wurde. Diese Phosphorylierung konnte jedoch nicht durch zusätzliche Stimulation mit 100 nM Insulin gesteigert werden. Die stärkste IRS-Serin-Phosphorylierung wurde durch Überstände Insulin-stimulierter Makrophagen ausgelöst. Sie betrug das 3,7-fache der Phosphorylierung verglichen mit Kontrollhepatozyten. Auch diese Phosphorylierung konnte nicht durch zusätzliche Stimulation mit 100 nM Insulin gesteigert werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Überstände von Kontroll-U937-Makrophagen bereits die Kinasen ERK1/2 und IKK β aktivieren und nachgeschaltet die IRS inhibieren. Die Aktivierung der Kinasen und Inaktivierung der IRS war jedoch wesentlich ausgeprägter durch Überstände Insulin-stimulierter Makrophagen.

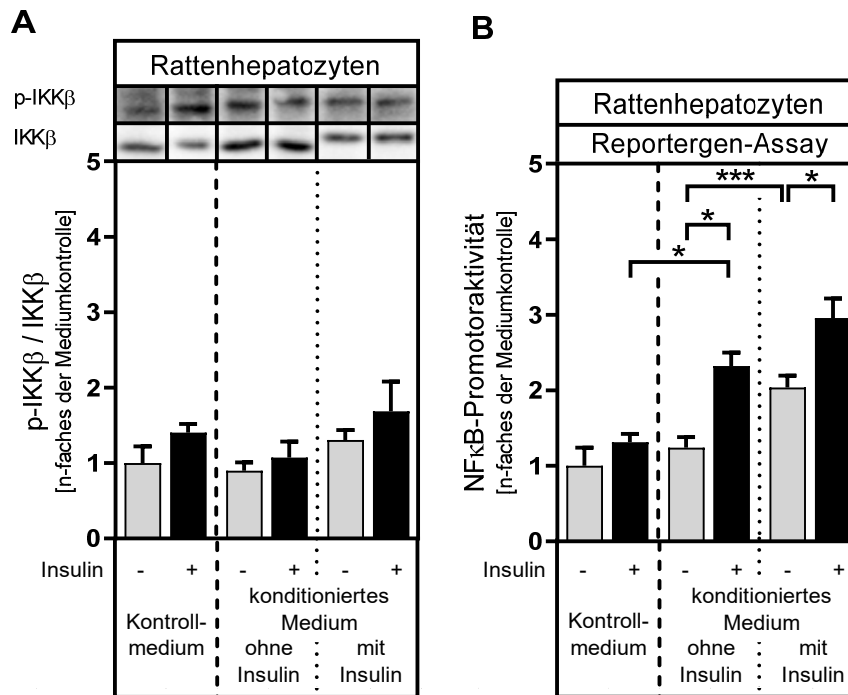


Abb. 57: Aktivierung der Kinase IKK β und seines nachgeschalteten Transkriptionsfaktors NF- κ B in Hepatozyten der Ratte durch Überstände Insulin-behandelter U937-Makrophagen

Primäre Hepatozyten der Ratte wurden, wie unter 6.2.3 beschrieben, isoliert, kultiviert und falls angegeben transfiziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin für 15 min (A) oder 8 h (B) in Medium, welches sich aus 50 % M199-Kulturmedium III und 50 % RPMI 1640-Kulturmedium II zusammensetzte. Falls angegeben wurde das RPMI 1640-Kulturmedium II durch konditionierte Überstände von U937-Makrophagen, welche von Kontroll- oder Insulin-stimulierten U937-Makrophagen stammten, ersetzt. (A): Proteine wurden, wie unter 6.2.10 dargestellt, isoliert und die Expression von IKK β oder p-IKK β mittels Western Blot (siehe 6.2.11) analysiert und die Bandenintensität quantifiziert. (B): Hepatozyten wurden mit einem Reportergenkonstrukt, welches die Firefly-Luciferase unter der Kontrolle des NF- κ B-Promotors exprimiert, transfiziert. Die Luciferaseaktivität wurde quantifiziert. **Auswertung:** Die Daten wurden auf die Summe aller Proteinexpressionen (A) oder Luciferaseaktivitäten (B) innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchssatz untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen (Insulin, konditioniertes Medium ohne Insulin, konditioniertes Medium ohne Insulin + Insulin, konditioniertes Medium mit Insulin und konditioniertes Medium mit Insulin + Insulin) enthielten. **Darstellung:** Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 4 (A) oder 3 (B) unabhängigen Experimenten und gegebenenfalls jeweils ein repräsentativer Western Blot (vollständige Blots in Abb. 83 im Anhang Punkt 7.6). **Statistik:** *Two-way ANOVA* mit *Dunnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; *: $p \leq 0,05$; ***: $p \leq 0,001$. **Beteiligte:** Die Daten wurden bereits, in geteilter Erstautorenschaft, publiziert [202].

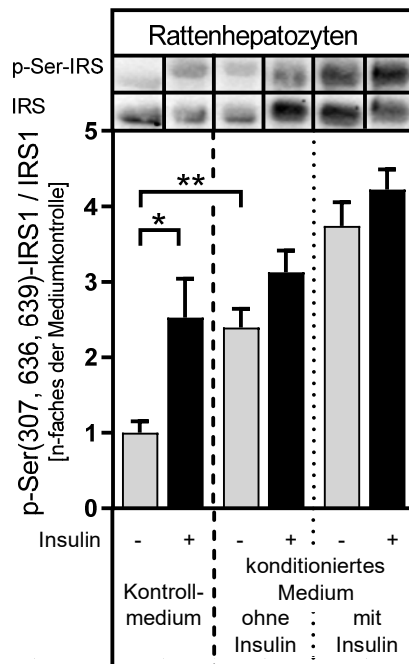


Abb. 58: Inhibierende Serin-Phosphorylierung des IRS1 in Hepatozyten der Ratte durch Überstände Insulin-behandelter U937-Makrophagen

Primäre Hepatozyten der Ratte wurden, wie unter 6.2.3 beschrieben, isoliert und kultiviert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin für 15 min in Medium, welches sich aus 50 % M199-Kulturmedium III und 50 % RPMI 1640-Kulturmedium II zusammensetzte. Falls angegeben wurde das RPMI 1640-Kulturmedium II durch konditionierte Überstände von U937-Makrophagen, welche von Kontroll- oder Insulin-stimulierten U937-Makrophagen stammten, ersetzt. Proteine wurden, wie unter 6.2.10 dargestellt, isoliert und die Expression von p-Ser(307, 636, 639)-IRS oder IRS mittels Western Blot (siehe 6.2.11) analysiert und die Bandenintensität quantifiziert. Auswertung: Die Daten wurden auf die Summe aller Proteinexpressionen (Kontrollmedium, Kontrollmedium + Insulin, konditioniertes Medium ohne Insulin, konditioniertes Medium ohne Insulin + Insulin, konditioniertes Medium mit Insulin und konditioniertes Medium mit Insulin + Insulin) innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchssatz untersuchten Stimulanzen und Stimulanzkombinationen enthielten. Darstellung: Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 7 unabhängigen Experimenten und jeweils ein repräsentativer Western Blot (vollständige Blots in Abb. 83 im Anhang Punkt 7.6). Statistik: *Two-way ANOVA* mit *Dunnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$. Beteiligte: Einige Zellkulturexperimente (einschließlich Proteinisolation und Western Blot) wurden von Rodolfo Gonzalez Camargo im Rahmen seiner Doktorarbeit durchgeführt. Die Daten wurden bereits, in geteilter Erstautorenschaft, publiziert [202].

4 Diskussion

Übergewicht, ein Symptom des metabolischen Syndroms, geht oft mit Insulinresistenz und Hyperinsulinämie einher. Das übermäßig expandierte Fettgewebe schüttet als Folge der gestörten metabolischen Funktion vermehrt pro-inflammatorische Faktoren wie TNF α , IL-1 β und IL-6 aus [119–121]. Gleichzeitig werden vermehrt chemoattraktive Substanzen wie IL-8 und CCL2 ausgeschüttet, was eine Infiltration des Fettgewebes mit Monozyten und Makrophagen auslöst [120, 122–124]. Diese polarisieren in M1-Makrophagen und lagern sich vermehrt in der Nähe hypertropher Adipozyten an [125]. Diese Makrophagen produzieren zusätzlich pro-inflammatorische Mediatoren, wie Zytokine und Prostaglandine. Es entsteht der Zustand einer chronischen unterschweligen Entzündung, welche ihren Ursprung im weißen Fettgewebe (*white adipose tissue*; WAT) übergewichtiger Personen hat.

Fettsäuren, welche aufgrund des Energieüberschusses nicht mehr im WAT stark übergewichtiger Personen eingelagert werden können, und pro-inflammatorische Mediatoren verursachen ektope Fettablagerungen und Insulinresistenz in anderen Organen, wie zum Beispiel in Leber, (Herz-)Muskel und Pankreas [125, 132]. Im Versuch der Insulinresistenz entgegen zu wirken, produzieren pankreatische β -Zellen vermehrt Insulin, wodurch eine Hyperinsulinämie entsteht. Es gibt Hinweise darauf, dass erhöhte Insulinspiegel Entzündungsantworten in Makrophagen auslösen und begünstigen können [135, 195–197].

In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, ob und über welche Mechanismen die Faktoren des metabolischen Syndroms (Hyperinsulinämie, erhöhte Plasmaspiegel an freien Fettsäuren und LPS sowie Freisetzung von Prostaglandinen) einzeln und in Kombination die Entzündungsantwort in Makrophagen auslösen und somit die Entstehung oder Manifestation einer Insulinresistenz begünstigen können.

4.1 Insulin-induzierte Steigerung der basalen und Stimulus-abhängigen Entzündungsantwort in Makrophagen

4.1.1 *In vitro*-Evidenz für die Insulin-induzierte Steigerung der basalen und Stimulus-abhängigen Entzündungsantwort in Makrophagen

Es gibt Hinweise darauf, dass Insulin direkt die Funktion von Immunzellen beeinflussen kann. So wurde beschrieben, dass Insulin in Peritonealmakrophagen der Ratte unter anderem die H₂O₂-Produktion und phagozytotische Aktivität steigerte und so für eine optimale Anpassung der Makrophagen während einer Immunantwort sorgte [219]. Außerdem wurde gezeigt, dass insulinresistente Makrophagen vermehrt den Scavengerrezeptor CD36 exprimierten [220]. Dies begünstigte die vermehrte Aufnahme von Lipoproteinen in Makrophagen und deren Umwandlung in sogenannte Schaumzellen [221, 222]. Kontrovers diskutiert wird jedoch, ob und in welche Richtung Insulin die Zytokinproduktion in Makro-

phagen beeinflusst. In der Literatur finden sich bisher nur sehr wenige *in vitro*-Studien zu diesem Thema.

Während Insulin allein in Alveolarmakrophagen und Peritonealmakrophagen diabetischer Mäuse [195] und in THP-1-Monozyten [135] keine Induktion der TNF α - und IL-6-mRNA-Expression und -Proteinproduktion auslöste, zeigte eine andere Studien im Bereich von 1 nM bis 100 nM Insulin eine dosisabhängige TNF α -mRNA-Expression und -Proteinproduktion in THP-1-Makrophagen [197]. In der vorliegenden Studie wurde die TNF α -mRNA-Expression in U937-Makrophagen, jedoch nicht in THP-1-Makrophagen, durch eine Stimulation mit 100 nM Insulin induziert (Abb. 2A, Abb. 4A). Außerdem wurde gezeigt, dass in beiden Makrophagen-artigen Zelllinien zusätzlich die Expressionen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-8, OSM und CCL2 induziert wurden (Abb. 2, Abb. 3, Abb. 4).

Tsiotra *et al.* zeigten, dass 138,9 nM Insulin in primären humanen Monozyten die Proteinproduktion von TNF α und IL-6, nicht jedoch von IL-1 β , auslöste [196]. Es wurden jedoch keine signifikanten Insulin-induzierten Steigerungen der TNF α -, IL-6- und IL-1 β -mRNA-Expressionen nachgewiesen. Auch in der vorliegenden Studie induzierte Insulin in primären humanen Makrophagen die mRNA-Expressionen von TNF α -, IL-1 β -, IL-6- und IL-8 tendenziell, aber nicht signifikant (Abb. 5). Aufgrund der erhöhten Insulin-induzierten TNF α - und IL-6-Proteinproduktion, die Tsiotra *et al.* in Monozyten nachgewiesen haben, lässt sich vermuten, dass möglicherweise die Probandenanzahlen (n=10 bzw. n=6) zu gering waren, um einen Effekt auf mRNA-Ebene in primären Makrophagen zuverlässig nachzuweisen. Andererseits wäre es denkbar, dass sich je nach Differenzierungsgrad und -richtung die Antwort auf Insulin unterscheidet.

Weiterhin wurde ein modulierender Effekt durch Insulin auf die LPS-induzierte Zytokinproduktion beschrieben. In primären humanen Makrophagen verstärkte Insulin die LPS-induzierte Expression der pro-inflammatorischen Mediatoren IL-1 β und IL-6 (Abb. 13). In U937- und THP-1-Makrophagen verstärkte Insulin zusätzlich die LPS-induzierte Expression von IL-8 (Abb. 9, Abb. 10, Abb. 11, Abb. 12). In U937-Makrophagen wurden außerdem zusätzlich die LPS-induzierten TNF α - und OSM-Expressionen signifikant verstärkt (Abb. 9A, F). Damit übereinstimmend verstärkte Insulin die LPS-induzierte TNF α und IL-6-Sekretion in Makrophagen des Knochenmarks diabetischer Mäuse [195]. Im Widerspruch dazu beschreiben Studien, dass Insulin die LPS-induzierte Apoptose sowie die Bildung von TNF α , IL-1 β und IL-6 in THP-1-Makrophagen [193] und in Alveolarmakrophagen und Peritonealmakrophagen von Ratten und diabetischen Mäusen hemmte [194, 195]. Die letzteren Studien wurden jedoch mit sehr hohen LPS- (1 bis 100 μ g/ml) und Insulinkonzentrationen (10 bis 100 μ M) durchgeführt. Diese liegen weit über dem physiologisch relevanten Bereich und sind 100- bis 1.000-fach höher als die in der vorliegenden Studie standardmäßig ver-

wendeten Konzentrationen. Zusätzlich konnte in der vorliegenden Studie sogar gezeigt werden, dass selbst noch niedrigere, physiologisch relevantere Konzentrationen von 10 nM in der Lage waren, die LPS-induzierte Expression pro-inflammatorischer Zytokine zu steigern (Abb. 64 und Abb. 65 im Anhang Punkt 7.2).

Auch die Herkunft, Differenzierung und Voraktivierung der Makrophagen scheint einen Einfluss darauf zu haben, wie Makrophagen auf eine Hyperinsulinämie reagieren. Residente Makrophagen, wie zum Beispiel Alveolarmakrophagen und Peritonealmakrophagen, sind sehr langlebige und hochspezialisierte Gewebsmakrophagen [24, 25]. Sie übernehmen im gesunden Körper vor allem regulatorische und wundheilende Funktionen [24, 25]. Im Gegensatz zu eingewanderten Makrophagen sind residente Makrophagen in der Lage, sich durch Proliferation zu erneuern [24, 25]. Zur Bildung der, vor allem klassisch-aktivierten, eingewanderten Makrophagen werden hingegen Monozyten des Blutes in die betroffenen Organe rekrutiert, um dort an der Bekämpfung von Pathogenen mitzuwirken [26].

Die Zelllinien U937 und THP-1 stammen aus Blut bzw. dem Lymphom eines Leukämie-Patienten [223, 224] und primäre humane Monozyten wurden aus dem Blut gesunder Probanden isoliert. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellkulturmodelle spiegeln daher eher eingewanderte Makrophagen wieder. Tessaro *et al.* beschrieben, dass Insulin die LPS-induzierte Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine in Alveolarmakrophagen und Peritonealmakrophagen diabetischer Mäuse hemmte, wohingegen diese in aus dem Knochenmark gewonnenen Makrophagen diabetischer Mäuse verstärkt wurde [195]. Die Vermutung liegt also nahe, dass Insulin in residenten Makrophagen eher hemmend auf die LPS-induzierte Entzündungsantwort wirkt, wohingegen eingewanderte Makrophagen auf eine Hyperinsulinämie eher mit einer gesteigerten Entzündungsantwort reagieren.

Zusätzlich scheint auch der metabolische Status der Zellen einen Einfluss zu haben. Tessaro *et al.* behandelten eine Gruppe von Mäusen mit Alloxan, welches zytotoxisch auf pankreatische β -Zellen wirkt [195]. Im Zuge der gestörten Insulinfreisetzung bildeten die Mäuse eine Hyperglykämie aus. In Makrophagen des Knochenmarks dieser diabetischen Mäuse steigerte Insulin die LPS-abhängige Sekretion von TNF α und IL-6. Eine zweite Gruppe von Mäusen wurde nicht mit Alloxan behandelt und entwickelte somit keine Hyperglykämie. In den Knochenmarksmakrophagen dieser nicht-diabetischen Mäuse hatte Insulin keinen Effekt auf die LPS-induzierte Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren.

4.1.2 *In vivo*-Evidenz für die Insulin-induzierte Steigerung der basalen und Stimulus-abhängigen Entzündungsantwort in Makrophagen

Widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich des Einflusses von Insulin auf das Entzündungsgeschehen wurden auch in *in vivo*-Studien beobachtet. Die Behandlung von Ratten, denen zuvor LPS injiziert wurde, mit Insulin hatte eine Steigerung der Serumkonzentrationen an

anti-inflammatorischen Mediatoren und reduzierte Serumkonzentrationen an pro-inflammatorischen Mediatoren zur Folge [225]. Außerdem war in gesunden übergewichtigen Probanden nach einem hyperinsulinämischen-euglykämischen Clamp der CCL2-Plasmagehalt und die nukleäre NF- κ B-Konzentration in mononukleären Zellen reduziert [226].

Im Gegensatz dazu und im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit wiesen gesunde Probanden, welche sich einem hyperinsulinämischen-euglykämischen Clamp unterzogen, erhöhte IL-6-, IL-8- und CCL2-Serumkonzentrationen auf [185–187]. Zusätzlich verzeichneten Ruge *et al.* in gesunden jungen Probanden einen Anstieg der TNF α -Serumkonzentration [185]. Im Gegensatz zur IL-6-Serumkonzentration induzierte ein euglykämischer-hyperinsulinämischer Clamp nicht die TNF α -Serumkonzentration in älteren Probanden mit und ohne Typ-2-Diabetes. Jedoch war in diesen älteren Probanden im Vergleich zu den gesunden, jungen Probanden schon die basale TNF α -Serumkonzentration tendenziell erhöht. Im Widerspruch zur Studie von Ruge *et al.* konnte eine andere Studie keine erhöhte TNF α -Konzentration im Serum gesunder, junger Probanden nach vierstündiger Hyperinsulinämie nachweisen [187]. Soop *et al.* untersuchten an gesunden Probanden die Auswirkungen eines hyperinsulinämischen-euglykämischen Clamps mit und ohne gleichzeitiger Infusion geringer Mengen LPS. Insulin allein induzierte nicht die Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren. Es verstärkte jedoch, im Gegensatz zur LPS-induzierten TNF α -Produktion, die LPS-induzierte IL-6-Produktion [188]. In Pferden steigerte ein hyperinsulinämischer-euglykämischer Clamp die TNF α - und IL-6-Plasmakonzentrationen und löste die Entstehung einer Laminitis, einer aseptischen Entzündung der Huflederhaut, aus [182–184]. Zudem steigerte eine Hyperinsulinämie die CCL2- und IL-1 β -mRNA-Expressionen im subkutanen Fettgewebe dünner Mäuse [190]. Außerdem verhinderte die selektive Inaktivierung des Insulinrezeptorgens in myeloiden Zellen von Mäusen die durch LPS ausgelöste IL-6- und IL-1 β -mRNA-Expression in Makrophagen, wohingegen gleichzeitig die TNF α - und CCL2-Expression kaum beeinflusst wurde [227].

Zusammenfassend zeigen *in vitro*- und *in vivo*-Studien gleichermaßen, dass Insulin in Abhängigkeit von der Stoffwechsellage und dem Aktivierungszustand der Makrophagen die LPS-abhängige Zytokinfreisetzung sowohl steigern als auch hemmen kann. Dabei scheint eine diabetische Stoffwechsellage die pro-inflammatorische Wirkung und eine bestehende M1-Aktivierung eher die anti-inflammatorische Wirkung von Insulin zu begünstigen. Die in dieser Arbeit verwendeten hoch-physiologischen Insulinkonzentrationen scheinen vorwiegend pro-inflammatorisch zu wirken. Eine abschließende Bewertung ist jedoch aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse in der Literatur derzeit nicht möglich.

4.2 Molekularer Mechanismus der Insulin-induzierten Entzündungsantwort in Makrophagen

In gesunden Personen vermittelt Insulin seine Wirkung durch Bindung an den Insulinrezeptor. Die Konformationsänderung des Insulinrezeptors nach extrazellulärer Bindung seines Liganden bewirkt eine Autophosphorylierung, wodurch intrazellulär IRS binden können und an Tyrosinresten aktivierend phosphoryliert werden [161, 162]. Je nach Bindung von Adapterproteinen an die IRS werden unter anderem der MAP-Kinase-abhängige Signalweg oder der PI3K-Akt-Signalweg aktiviert.

4.2.1 MAP-Kinase-abhängiger Signalweg bei der Insulin-induzierten Entzündungsantwort in Makrophagen

Der MAP-Kinase-abhängige Signalweg aktiviert die Kinase ERK1/2 und mündet in der Bindung des Transkriptionsfaktorkomplexes AP-1 an die Promotorregion der zu transkribierenden DNA [4, 164]. AP-1 ist ein Heterodimer und kann unter anderem aus c-Jun und c-FOS bestehen [4, 164]. Die Promotoren der Gene für TNF α [35], IL-1 β [40], IL-6 [45], IL-8 [52], IL-18 [44] und OSM [48] beinhalten AP-1-Bindestellen und können daher über den MAP-Kinase-abhängigen Signalweg induziert werden.

Es wurde bereits gezeigt, dass Insulin die Phosphorylierung von ERK1/2 in LPS-stimulierten Makrophagen des Knochenmarks diabetischer Mäuse und in LPS-stimulierten Alveolarmakrophagen von Ratten und Mäusen modulierte [194, 195] und dass der ERK1/2-Inhibitor PD98059 die Insulin-induzierte mRNA-Expression von TNF α in THP-1-Makrophagen hemmte [197]. In U937-Makrophagen induzierte Insulin allein zwar die Phosphorylierung von ERK1/2 und die c-Jun-mRNA-Expression (Abb. 8A, B), jedoch hatte die Inhibierung des MAP-Kinase-Signalweges keinen Einfluss auf die Insulin-induzierte IL-1 β -mRNA-Expression (Abb. 8D). In LPS-stimulierten U937-Makrophagen verstärkte Insulin die ERK1/2-Phosphorylierung, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Expression der Transkriptionsfaktoren c-Jun und c-FOS (Abb. 15). Die Daten legen daher nahe, dass dieser Signalweg in U937-Makrophagen eine untergeordnete Rolle bei der Insulin-abhängigen Expression von IL-1 β und möglicherweise anderen Zytokinen spielt.

4.2.2 PI3K-Akt-Signalweg bei der Insulin-induzierten Entzündungsantwort in Makrophagen

Der PI3K-Akt-Signalweg wird durch Bindung der PI3K an Tyrosin-phosphoryliertes IRS eingeleitet (Abb. 59). In Folge wird die Proteinkinase B, auch Akt genannt, aktiviert [161, 162]. Die Kinase Akt phosphoryliert nun weitere regulierende Proteine, wie zum Beispiel die Glykogensynthasekinase 3 und IKK [161, 162, 165]. IKK wird durch die Phosphorylierung aktiviert und phosphoryliert nun wiederum den an NF- κ B gebundenen Inhibitor I κ B. Der

Inhibitor wird ubiquitiniert und abgebaut, was die Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Zellkern und die Bindung an seine Promotorbindestelle ermöglicht [38]. Bindestellen für NF- κ B weisen die Promotoren der Gene für TNF α [33], IL-1 β [39, 40], IL-6 [38], IL-8 [38, 51], IL-18 [44] und CCL2 [54] auf. Glykogensynthasekinase 3 wird durch Phosphorylierung inhibiert. Da die Glykogensynthasekinase 3 den Transkriptionsfaktor Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 (HIF-1) phosphoryliert und destabilisiert, könnte die Transkription HIF-1-induzierbarer Gene Insulin-abhängig begünstigt werden. Zu den HIF-1-induzierbaren Genen zählt unter anderem das Gen für IL-1 β [228–230].

Der PI3K-Inhibitor Wortmannin hatte keinen Einfluss auf die TNF α -mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen [197]. Im Gegensatz dazu hemmte der IKK-Inhibitor TPCA-1 in unbehandelten U937-Makrophagen (Abb. 7E) sowie Wortmannin in LPS-stimulierten aus dem Knochenmark diabetischer Mäuse gewonnener Makrophagen [195] die Insulin-induzierten mRNA-Expressionen der pro-inflammatorischen Zytokine TNF α und IL-1 β . Außerdem induzierte Insulin signifikant die Phosphorylierung von Akt, IKK β und I κ B und tendenziell die Expression des Kofaktors RIP140 – sowohl in unbehandelten als auch in mit LPS-stimulierten U937-Makrophagen (Abb. 7, Abb. 14). Jedoch bewirkte eine Stimulation mit LPS und Insulin im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Insulin keine gesteigerte Phosphorylierung von Akt, IKK β und I κ B oder gesteigerte RIP140-mRNA-Expression (Abb. 14). Die Aktivierung von NF- κ B scheint demnach essenziell für die Insulin-induzierte Expression pro-inflammatorischer Signale in Makrophagen zu sein, jedoch nicht für die Verstärkung der LPS-induzierten Expression pro-inflammatorischer Mediatoren durch Insulin. Im Hinblick auf die vollständige Inhibierung der Insulin-induzierten IL-1 β -Expression durch TPCA-1 scheint eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 von untergeordneter Relevanz.

In U937-Makrophagen wurde die basale und LPS-induzierte Expression des Zytokins OSM nach Insulinstimulation induziert bzw. verstärkt (Abb. 2F, Abb. 9F), obwohl der Promotor des Gens für OSM keine NF- κ B-Bindedomäne aufweist. Stattdessen wurden C/EBP, STAT5 und AP-1 mit seinen möglichen Bestandteilen c-Jun und c-FOS als Regulatoren von OSM identifiziert [48]. Die c-Jun- und c-FOS-mRNA-Expressionen waren in U937-Makrophagen nicht nach Stimulation mit Insulin induziert (Abb. 8B, C, Abb. 15B, C). Jedoch könnten andere Transkriptionsfaktoren, die an der vermehrten Expression von OSM beteiligt sind, wie z.B. C/EBP und STAT5, durch autokrine Wirkung Insulin-induzierter pro-inflammatorischer Mediatoren aktiviert werden.

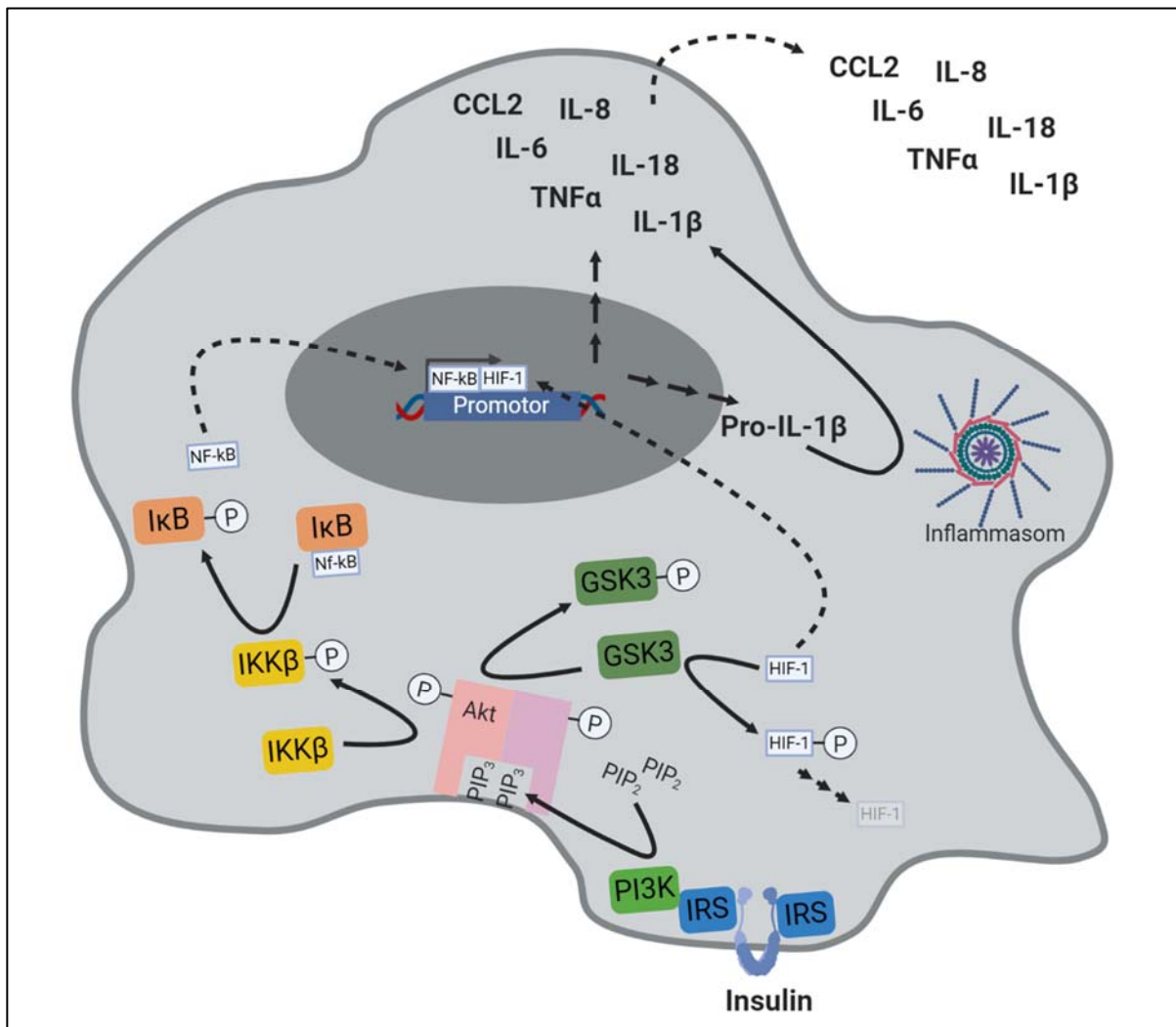


Abb. 59: Molekularer Mechanismus der Insulin-induzierten Zytokinfreisetzung in eingewanderten humanen Makrophagen

In eingewanderten humanen Makrophagen bindet Insulin an seinen Rezeptor, wodurch intrazellulär Insulinrezeptorsubstrate binden und PI3K aktiviert wurde. Die durch PI3K-vermittelte Phosphorylierung aktivierte Kinase Akt phosphorylierte wiederum IKKβ und möglicherweise die Glykogensynthasekinase 3. IKKβ phosphorylierte den Komplex aus IκB und NF-κB, wodurch dieser dissoziierte und wahrscheinlich NF-κB im Zellkern an die Promotorregion pro-inflammatorischer Zytokine, wie TNFα, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-18 und CCL2, band. Während der in Folge ausgelösten Proteinbiosynthese wurden die entsprechenden Zytokine produziert und anschließend freigesetzt. Im Gegensatz zu den meisten Zytokinen wird IL-1β zunächst Stimulus-abhängig als Vorläuferprotein gebildet. In Makrophagen der meisten Spezies ist ein zusätzlicher zweiter Stimulus zur Freisetzung von IL-1β nötig. Dieser Stimulus aktiviert das NLRP3-Inflammasom und das Enzym Caspase-1, welches Pro-IL-1β durch Spaltung in IL-1β umwandelt. Glukogensynthasekinase 3 wird durch Akt-abhängige Phosphorylierung gehemmt. Als Folge wird der Transkriptionsfaktor HIF-1 nicht weiter inhibitorisch phosphoryliert und in den Zellkern transportiert. Dort unterstützte er möglicherweise die vorrangig NF-κB-abhängige Insulin-induzierte Zytokinproduktion. **Beteiligte:** Die Darstellung wurde mit Hilfe des Programms BioRender (www.Biorender.com) gezeichnet. **Abkürzungen:** CCL – C-C-Chemokinligand; GSK-3 – Glykogensynthasekinase 3; HIF-1 – Hypoxie-induzierbarer Faktor; IκB – *inhibitor of nuclear factor-κB*; IKK – *inhibitor of nuclear factor-κB kinase*; IL – Interleukin; IRS – Insulinrezeptorsubstrat, NF-κB – *nuclear factor 'kappa light chain enhancer' of activated B-cells*; PDK1 – *phosphoinositide-dependent kinase 1*; PI3K – Phosphoinositid-3-Kinase; PIP₂ – Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphat; PIP₃ – Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat; TNF – Tumornekrosefaktor

4.2.3 Besonderheit der Synthese und Freisetzung von IL-1 β

Die Freisetzung des Proteins IL-1 β setzt in der Regel zwei Signale voraus. Das erste Signal induziert NF- κ B-abhängig die Synthese von NLRP3 und vom inaktiven zytosolischen Vorläuferprotein Pro-IL-1 β . Das zweite Signal bewirkt die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und die Spaltung von Pro-IL-1 β durch das Enzym Caspase-1 [29, 42]. Studien zeigten jedoch auch, dass humane Makrophagen, im Gegensatz zu murinen Makrophagen, in der Lage gewesen sein könnten, IL-1 β bereits nach dem ersten Signal freizusetzen [42]. Diese Freisetzung war jedoch weitaus schwächer und langsamer in seiner Kinetik als nach dem zweiten Signal.

Im Kontext des metabolischen Syndroms könnte die beobachtete Insulin-abhängige Induktion der IL-1 β -mRNA-Expression daher zu einer geringen Ausschüttung von IL-1 β -Protein geführt haben. Gleichzeitig könnten die Makrophagen auf eine verstärkte Freisetzung von IL-1 β nach einem weiteren Stimulus vorbereitet worden sein. Im Einklang mit dieser Hypothese war die Konzentration des IL-1 β -Vorläuferproteins in Zelllysaten Insulin-stimulierter U937-Makrophagen erhöht (Abb. 3A). Gesättigte Fettsäuren, Cholesterin oder Urat könnten nun, als zweiter Stimulus, die Aktivierung des Inflammasoms in Makrophagen auslösen und somit die Freisetzung von IL-1 β im Zuge einer Insulinresistenz weiter verstärken [231].

4.3 Hepatische Insulinresistenz als eine mögliche Folge der Insulin-induzierten Entzündungsantwort in Makrophagen

Sowohl *in vitro*- als auch *in vivo*-Studien legen einen Einfluss einer Hyperinsulinämie auf die Entstehung einer Entzündung nahe (vgl. 4.1). Außerdem gibt es Hinweise, dass Insulin über diesen Weg die Manifestation einer Insulinresistenz begünstigen kann. So zeigte eine Studie, dass Mäuse mit Insulinrezeptor-defizienten myeloiden Zellen vor einer Hochfettdiät-induzierten Insulinresistenz geschützt waren und dass dies wahrscheinlich auf die verminderte systemische Entzündung und verminderte Einwanderung von Monozyten und Makrophagen in das WAT zurückzuführen war [232]. Außerdem wurde bereits gezeigt, dass eine Hyperinsulinämie den Glukosemetabolismus in gesunden Männern hemmen konnte [233].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen die Hypothese, dass Insulin selbst die Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren in Makrophagen induzieren und somit eine Insulinresistenz in anderen Zelltypen auslösen kann. Insulin induzierte die Expression pro-inflammatorischer Zytokine in Makrophagen (vgl. 4.1) und der Überstand Insulin-stimulierter U937-Makrophagen inhibierte die Insulin-induzierte Glukokinase-mRNA-Expression in primären Rattenhepatozyten (Abb. 54A). Dies lässt sich höchstwahrscheinlich auf die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine zurückführen, da auch IL-6 und vor allem IL-1 β

die Insulinsensitivität in primären Rattenhepatozyten herabsetzte (Abb. 54B). Bereits in früheren Veröffentlichungen wurde gezeigt, dass sowohl IL-6 als auch IL-1 β eine Insulinresistenz in Hepatozyten auslösen konnten [212, 234, 235]. Diese Zytokine werden möglicherweise von Kupffer-Zellen oder eingewanderter Zellen als Antwort auf eine Hyperinsulinämie gebildet und wirken lokal auf Hepatozyten. Da pankreatische Hormone über die Portalvene in den Blutkreislauf gelangen, herrschen in der Leber dann zeitweise sehr hohe Konzentrationen an Insulin vor. Aber auch die Metabolite des viszeralen Fettgewebes gelangen über die Portalvene direkt zur Leber [22]. Daher ist es wahrscheinlich, dass auch die Infiltration des WAT übergewichtiger Personen mit Makrophagen zur Manifestation einer hepatischen Insulinresistenz beiträgt. Eine Studie zeigte, dass die Insulin-abhängige Induktion von CCL2 die Infiltration entzündungsfördernder Zellen in das Fettgewebe übergewichtiger Mäuse weiter vorantrieb und dass dies an der Ausbildung einer systemischen Insulinresistenz beteiligt war [190]. Die Daten deuten daher darauf hin, dass pro-inflammatorische Zytokine, deren Freisetzung aus Makrophagen durch eine Hyperinsulinämie stimuliert wird, die Sensitivität in Insulinzielzellen herabsetzen.

4.4 Molekularer Mechanismus einer Zytokin-vermittelten Insulinresistenz in Hepatozyten

Zytokine können die Insulinrezeptorsignalkaskade auf mehreren Ebenen hemmen (Abb. 60). Ein möglicher Mechanismus ist die Aktivierung von Kinasen, welche eine inhibierende Serin-Phosphorylierung der IRS katalysieren können [23, 161, 162, 169, 171]. Es ist bekannt, dass TNF α , IL-1 β und IL-6-Typ-Zytokine in der Lage sind, MAP-Kinasen, wie ERK und JNK, zu aktivieren [23, 161, 171, 172]. IKK wird hingegen von TNF α und IL-1 β aktiviert [23, 162]. In der vorliegenden Arbeit steigerten bereits Überstände von Kontroll-U937-Makrophagen die inhibierende Phosphorylierung der IRS1 und die Kinase ERK1/2 wurde durch Kontrollüberstände aktiviert (Abb. 56, Abb. 58). Die Inaktivierung der IRS1 und Aktivierung der Kinase ERK1/2 war jedoch wesentlich ausgeprägter durch Überstände Insulin-stimulierter Makrophagen. Eine aktivierende Phosphorylierung der IKK β in Hepatozyten wurde weder durch Überstände unbehandelter noch durch Insulin-stimulierte Makrophagen ausgelöst (Abb. 57A). Dennoch wurde der Transkriptionsfaktor NF- κ B, welcher der IKK nachgeschaltetet ist, durch Überstände Insulin-stimulierter Makrophagen aktiviert, nicht jedoch durch Überstände unbehandelter Makrophagen (Abb. 57B). Es kann daher nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass eine IKK-vermittelte inaktiverende Serin-Phosphorylierung des IRS an der durch Insulin-stimulierte Makrophagen ausgelösten Insulinresistenz in Hepatozyten beteiligt war.

Außerdem kann Insulinresistenz auf zellulärer Ebene durch IL-6-Typ-Zytokine, wie IL-6 und OSM, ausgelöst werden. Diese Zytokine können den JAK-STAT-Signalweg anschalten und

so die Synthese von SOCS induzieren [161, 170]. Der Suppressor SOCS lagert sich an den aktivierten Insulinrezeptor an und verhindert so die Bindung der IRS [161, 170]. Da Insulin die Expression von OSM in U937-Makrophagen induzierte (Abb. 2F, Abb. 9F) und der Überstand Insulin-stimulierter Makrophagen die Phosphorylierung von STAT3 und die mRNA-Expression von SOCS3 verstärkte (Abb. 55), ist es denkbar, dass dieser Mechanismus an der durch Insulin-stimulierte Makrophagen ausgelösten Insulinresistenz in Hepatozyten beteiligt war.

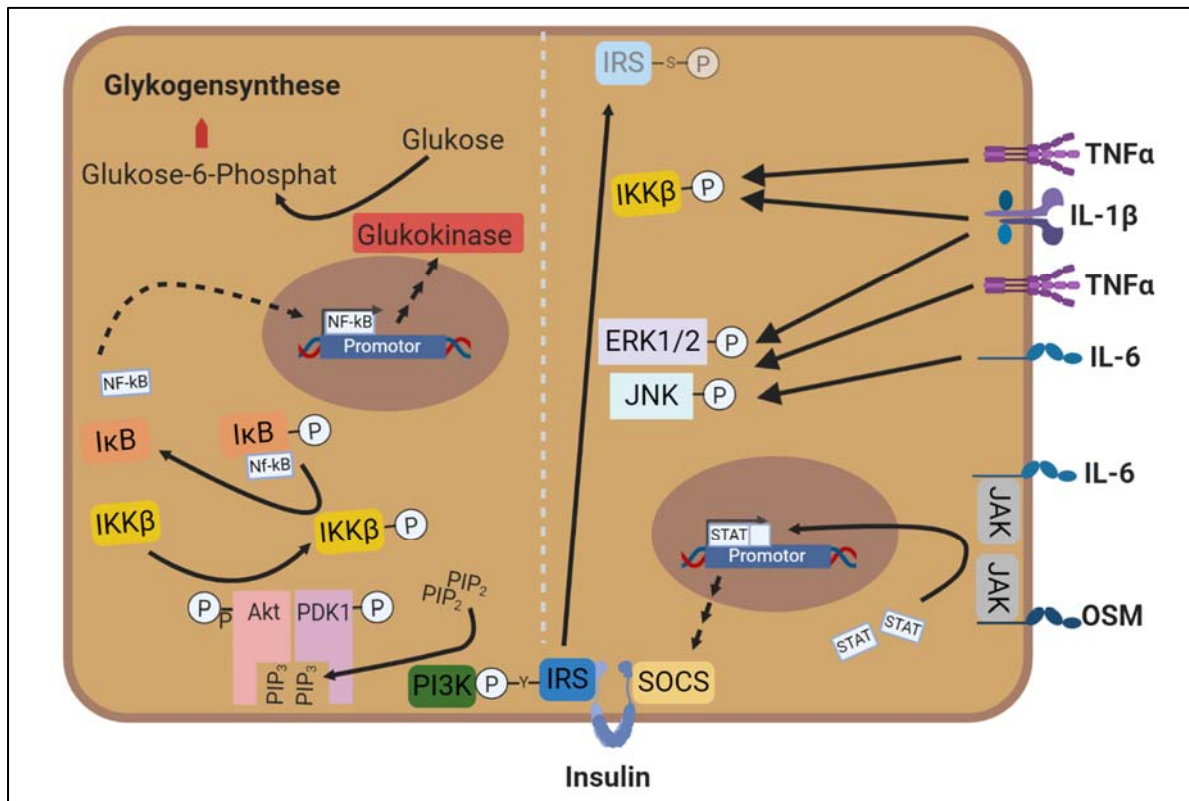


Abb. 60: Molekularer Mechanismus einer Zytokin-vermittelten Insulinresistenz in Hepatozyten

In Hepatozyten aktivierte Insulin durch Bindung an seinen Rezeptor den PI3K-Akt-Signalweg. Über diesen wurde die Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Zellkern ermöglicht. Dort band NF- κ B an die Promotorregion des Glukokinase-kodierenden Gens. Dadurch wurde die Synthese des Enzyms Glukokinase ausgelöst. Glukokinase katalysiert die Umwandlung von Glukose in Glukose-6-Phosphat, einem entscheidenden Schritt der Glykogensynthese. Pro-inflammatorische Zytokine, welche Insulin-abhängig in Makrophagen gebildet werden können, sind in der Lage, diese Insulinrezeptorsignalkaskade auf mehreren Ebenen zu hemmen. So können TNF α , IL-1 β und IL-6 Signalwege auslösen, welche zur aktivierenden Phosphorylierung von MAP-Kinasen, wie ERK1/2 und JNK, führen. TNF α und IL-1 β können zusätzlich die aktivierende Phosphorylierung von IKK β auslösen. Die Kinasen sind in der Lage, IRS inhibierend zu phosphorylieren. In Folge wird das IRS vermehrt abgebaut und die Insulinrezeptorsignalkaskade gehemmt. IL-6-Typ-Zytokine, wie IL-6 und OSM, können außerdem über einen JAK-STAT-Signalweg die Bildung von SOCS verstärken. Der Suppressor SOCS lagert sich intrazellulär an den aktivierten Insulinrezeptor an und verhindert so die Bindung vom IRS. Als Folge der Unterbrechung der Insulinrezeptorsignalkaskade wird weniger Glukose Insulin-abhängig eingespeichert. **Beteiligte:** Die Darstellung wurde mit Hilfe des Programms BioRender (www.Biorender.com) gezeichnet. **Abkürzungen:** ERK1/2 – *extracellular signal-regulated kinases 1/2*; I κ B – *inhibitor of nuclear factor- κ B*; IKK – *inhibitor of nuclear factor- κ B kinase*; IL – Interleukin; IRS – Insulinrezeptorsubstrat, JAK – Januskinase; JNK – c-Jun N-terminale Kinasen; NF- κ B – *nuclear factor 'kappa light chain enhancer' of activated B-cells*; PI3K – Phosphoinositid-3-Kinase; PIP₂ – Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphat; PIP₃ – Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat; SOCS – *suppressor of cytokine signaling*; STAT – *signal transducers and activators of transcription*; TNF – Tumornekrosefaktor

4.5 Interaktion der Hyperinsulinämie mit einer Diät-abhängig modifizierten Mikrobiota

Der Verdauungstrakt von Menschen und Tieren ist mit einer Vielzahl von Mikroorganismen, wie zum Beispiel Bakterien, besiedelt. Zahlreiche Human- und Tierstudien zeigten, dass die Art der aufgenommenen Nahrung maßgeblich die Zusammensetzung der Darmmikrobiota beeinflusste [206, 236]. So ist eine Ernährung, welche reich an gesättigten Fettsäuren ist und einen hohen Zuckergehalt aufweist, mit einer reduzierten Diversität der Mikrobiota assoziiert [236]. Außerdem zeigten Studien, dass eine fettreiche Diät mit dem Anstieg der Spezies der Gruppen *Firmicutes* und *Proteobacteria* und einer Reduktion von *Bacteroidetes* verbunden waren [237].

Die Zusammensetzung der Darmmikrobiota hat wiederum einen entscheidenden Einfluss auf die Gesundheit des Wirtes. So ist eine geringe Diversität der Darmmikrobiota mit Entzündung und Insulinresistenz assoziiert [206]. Für zahlreiche Bakteriengenera, wie zum Beispiel *Bifidobacteria*, *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Akkermansia* und *Roseburia*, wurde gezeigt, dass sie negativ mit der Entstehung von Typ-2-Diabetes assoziiert waren, während *Fusobacterium* und *Blautia* positiv mit Typ-2-Diabetes assoziiert waren [238].

Die Darmmikrobiota beeinflusst die Gesundheit des Wirtes zum Beispiel durch Produktion von kurzkettigen Fettsäuren, wie Acetat, Propionat und Butyrat. So haben kurzkettige Fettsäuren einen direkten Einfluss auf die Regulation des Sättigungsgefühls und auf den Lipid- und Glukosemetabolismus [208]. Butyrat, welches unter anderem von vielen Vertretern der *Firmicutes* produziert wird, dient außerdem als wichtige Energiequelle für Darmzellen und ist an der Aufrechterhaltung der gastrointestinalen Barriere beteiligt [206, 207].

Weiterhin wurde nachgewiesen, dass *Akkermansia muciniphila*, *Faecalibacterium prausnitzii* und einige Spezies der *Bacteroides* die Expression von *tight junctions*, welche Nachbarzellen miteinander verbinden und so eine parazelluläre Barriere bilden, steigerten [238]. Eine intakte gastrointestinale Barriere, wie sie in gesunden Personen vorkommt, verhindert das Eindringen der Bakterien in den menschlichen Organismus [206].

Neben der Modulation der Darmpermeabilität hat die Darmmikrobiota auch einen direkten Einfluss auf das Entzündungsgeschehen im Wirt. So wurde für einige Spezies gezeigt, dass sie die Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen induzierten und die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen hemmten. *Roseburia intestinalis*, *Bacteroides fragilis* und *Akkermansia muciniphila* induzierten die Expression von IL-10 in Mäusen [238]. Außerdem wurde für mehrere *Lactobacillus*-Spezies gezeigt, dass sie die IL-10-Expression induzierten und die Expression von IL-1 β , IL-8 und CCL2 hemmten [238].

Auf der anderen Seite weisen sowohl gram-positive als auch gram-negative Bakterien potenziell entzündungsauslösende Moleküle, wie zum Beispiel LPS, Lipoteichonsäure, Flagellin und verschiedene Glykolipide, auf ihren Oberflächen auf. Bei Schwächung der

gastrointestinalen Barriere kommen Immunzellen, wie zum Beispiel Makrophagen, verstärkt mit Bakterien und bakteriellen Bestandteilen in Kontakt. Die gram-negative Bakterienart *Escherichia coli* ist ein weit verbreitetes Pathogen, welches unter anderem an der Entstehung schwerwiegender Begleiterscheinungen in Diabetes-Patienten beteiligt ist [239]. In der vorliegenden Arbeit, induzierte das Lyophilisat von *Escherichia coli* die mRNA-Expression der pro-inflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β , IL-6 und OSM in U937-Makrophagen (Abb. 66 in Anhang Punkt 7.2). TNF α wiederum war in der Lage, NF- κ B-abhängig den Zellzusammenhalt der epithelialen Zelllinie Caco-2 zu verringern und so die Permeabilität der Darmbarriere weiter zu erhöhen [240]. So entsteht ein sich selbst verstärkender Teufelskreis der Entzündung.

Die durch die initiale Entzündung ausgelöste Insulinresistenz mit nachfolgender Hyperinsulinämie könnte diesen Teufelskreis noch verstärken. In der vorliegenden Arbeit wurde bereits diskutiert, dass ein hoher Insulinspiegel in der Lage ist, die LPS-induzierte Entzündungsreaktion in Makrophagen weiter zu verstärken (vgl. 4.1). Damit übereinstimmend verstärkte Insulin ebenfalls die *Escherichia coli*-Lyophilisat-induzierten TNF α und IL-6-mRNA-Expressionen in U937-Makrophagen (Abb. 66A, C in Anhang Punkt 7.2). Weitere Studien zeigten, dass Insulin außerdem auch das Wachstum und die Fähigkeit zur Biofilmbildung von *Escherichia coli* stimulierte und somit auch auf diesem Wege die Manifestation einer Entzündung weiter voran treiben kann [239, 241, 242].

Eine Hochfett-diät förderte im Vergleich zur Diät mit einem geringen Fettgehalt das Vorkommen von *Clostridium ramosum* in Mäusen, welche eine definierte Mikrobiota aufwiesen [243]. Dieser Vertreter der gram-positiven Bakterien, welcher zur Gruppe der *Firmicutes* gehört, begünstigte in diesem Modell außerdem die Hochfett-diät-induzierte Entstehung von Übergewicht [243]. Es gibt Hinweise darauf, dass dieser Effekt unter anderem darauf zurückzuführen ist, dass *Clostridium ramosum* die Sekretion von 5-Hydroxytryptamin, einem wichtigen Signalmolekül, aus speziellen Zellen des Darmes fördert [244]. Dieses wiederum könnte die Bildung von Proteinen begünstigen, die die Aufnahme von Fettsäuren aus dem Darm erhöhen, und somit zur Entstehung von Übergewicht beitragen [244]. *Clostridium ramosum* hatte in diesem Mausmodell jedoch keinen Einfluss auf die Darmpermeabilität und die Plasma-LPS-Level und verstärkte auch nicht die chronische unterschwellige Entzündung [243]. Damit übereinstimmend induzierte in der vorliegenden Studie weder das Lyophilisat von *Clostridium ramosum* allein die Expression von TNF α , IL-1 β , IL-6 und OSM in U937-Makrophagen, noch modulierte es die Expression der Zytokine in Insulin-stimulierten U937-Makrophagen (Abb. 66 in Anhang Punkt 7.2).

4.6 Palmitat-induzierte Steigerung der basalen und Stimulus-abhängigen Entzündungsantwort in Makrophagen

Es wurde gezeigt, dass übergewichtige Mäuse und Menschen gesteigerte Plasmakonzentrationen an Fettsäuremetaboliten aufwiesen [125, 132]. Außerdem traten auch ektope Fettablagerungen, zum Beispiel in der Leber, auf [125, 132]. Dabei schienen gesättigte Fettsäuren, wie Palmitat und Stearat, an der Ausbildung einer unterschweligen, chronischen Entzündung beteiligt zu sein [132, 133]. Es wurde gezeigt, dass Palmitat die Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in diversen Zelltypen, wie zum Beispiel Muskelzellen [245] und Adipozyten [153, 246, 247], induzierte. In Monozyten- und Makrophagenmodellssystemen variierten die erhobenen Ergebnisse jedoch stark. Palmitat allein induzierte die Expression und Sekretion der Zytokine IL-6, IL-8 und CCL2 in RAW 264.7-Makrophagen [138, 142, 248] und Monozyten und Makrophagen der Zelllinie THP-1 [135–137, 147, 247] sowie in primären humanen Makrophagen des Blutes [136, 139], murinen Kupffer-Zellen [142], murinen Peritonealmakrophagen [140, 248, 249] und aus dem Knochenmark gewonnener Makrophagen der Maus [248]. In der vorliegenden Studie induzierte Palmitat allein in THP-1-Makrophagen die IL-6-mRNA-Expression und die IL-8-mRNA-Expression und -Proteinsekretion, jedoch nicht die CCL2-mRNA-Expression (Abb. 17C, D, F, Abb. 18, Abb. 38C, E). Die TNF α - und IL-1 β -Expressionen wurden in einigen Studien, die mit THP-1-Monozyten und -Makrophagen [135–137, 143, 250, 251], murinen Zelllinien [35, 138, 141, 142, 145] und mit primären Makrophagen von Mensch und Maus [135, 138–140, 142, 144, 249] durchgeführt wurden, Palmitat-abhängig induziert. In anderen Studien, wie auch der vorliegenden, induzierte Palmitat jedoch nicht die Expression der Zytokine TNF α und IL-1 β in THP-1-Makrophagen (Abb. 17A, B, Abb. 38A, B), RAW 264.7-Makrophagen [66, 252] und J774-Makrophagen [253].

Neben Unterschieden in den Zellkulturmodellen selbst spielt möglicherweise auch eine unerwünschte Vor- oder zeitgleiche Koaktivierung der Zellen eine Rolle. Da Palmitat *in vivo* vor allem in proteingebundener Form vorliegt, wird es in Zellkulturexperimenten in der Regel an BSA gekoppelt. BSA kann jedoch Verunreinigungen von LPS aufweisen, welche eine Studie als Auslöser der Aktivierung pro-inflammatorischer Mediatoren nach Stimulation mit Palmitat-BSA-Komplexen identifizierte [254]. In der vorliegenden Studie wurden die Stimulanzen daher 90 Minuten mit Polymyxin B, welches LPS bindet und so die Aktivierung seines Rezeptors verhindert, vorbehandelt. Eine Koaktivierung der Zellen mit LPS kann in der vorliegenden Studie daher ausgeschlossen werden.

Doch auch der Gehalt an Glukose im Zellkulturmedium könnte einen entscheidenden Einfluss auf die Palmitat-abhängige Zytokinexpression haben. Kürzlich wurde gezeigt, dass murine Peritonealmakrophagen, welche in RPMI 1640-Medium mit 11,1 mM Glukose kultiviert wurden, signifikant stärkere Palmitat-induzierte TNF α -, IL-1 β - und IL-6-mRNA-

Expressionen aufwiesen als murine Peritonealmakrophagen, welche in RPMI 1640-Medium mit 5,6 mM Glukose kultiviert wurden [249]. In der vorliegenden Studie wurden sowohl die Zelllinien U937- und THP-1 als auch primäre humane Makrophagen in RPMI 1640-Medium mit 11,1 mM Glukose kultiviert.

Zusammenfassend ist die Datenlage zur Wirkung von Palmitat auf die basale Zytokin-freisetzung widersprüchlich. Möglicherweise reagieren Makrophagen auch *in vivo* je nach Herkunft und Voraktivierung unterschiedlich auf eine erhöhte Palmitatkonzentration.

Relativ unstrittig ist jedoch, dass Palmitat eine bestehende Entzündungsantwort weiter verstärken kann. Palmitat verstärkte die LPS-induzierte Sekretion von IL-6 und IL-8 in THP-1-Monozyten [166] und von TNF α , IL-1 α , IL-1 β und CCL2 in THP-1-Makrophagen [136], RAW 264.7-Makrophagen [66, 248], J774-Makrophagen [253] und murinen Makrophagen, welche aus dem Knochenmark entnommen wurden [248, 255]. In Insulin-stimulierten THP-1-Monozyten und mononukleären Zellen des peripheren Blutes steigerte die Palmitat die IL-6-mRNA-Expression [135]. In der vorliegenden Studie waren die IL-8- und CCL2-mRNA-Expressionen in THP-1-Makrophagen durch eine zeitgleiche Stimulation mit Palmitat und Insulin im Vergleich zu den Einzelstimulanzen erhöht (Abb. 17C, Abb 18). Aufgrund des langfristigen Überangebots an Energie sind die Adipozyten von übergewichtigen Personen vergrößert. Als Konsequenz ist die Versorgung der vergrößerten Adipozyten über die Kapillare vermindert. In Folge entsteht eine Mangelversorgung mit Sauerstoff (Hypoxie) [118]. Bemerkenswert ist, dass in primären humanen Makrophagen weder Palmitat noch eine Hypoxie die IL-1 β -Sekretion induzierte, die Kombination aus beiden jedoch eine starke Ausschüttung von IL-1 β auslöste [139]. Weiterhin wurde gezeigt, dass die durch eine Hypoxie ausgelöste IL-6-Sekretion in diesen Zellen durch Palmitat verstärkt wurde.

Studien legen demnach nahe, dass Palmitat eine chronische unterschwellige Entzündung, welche in übergewichtigen Personen vorherrscht, weiter vorantreiben kann. Auch die durch eine Hyperinsulinämie verursachte Entzündungsantwort in Makrophagen wurde durch Palmitat verstärkt.

4.7 Molekulare Mechanismen der Palmitat-induzierten Entzündungsantwort in Makrophagen

4.7.1 Rezeptor-abhängige Mechanismen der Palmitat-induzierten Entzündungsantwort in Makrophagen

Palmitinsäure ist ein essenzieller Bestandteil des Lipids A und spielt eine entscheidende Rolle bei der TLR4-vermittelten Induktion pro-inflammatorischer Signale durch LPS [64]. Es liegt daher nahe, dass auch die Palmitat-induzierte Entzündungsantwort in Monozyten und Makrophagen über den TLR4 vermittelt wird. Zahlreiche *in vitro*-Studien bestätigen diese Vermutung [64, 66, 136, 140, 146]. Eine andere Studie identifizierte jedoch mit LPS verun-

reinigtes BSA als Auslöser der TLR4-Aktivierung nach Stimulation mit Palmitat-BSA-Komplexen [254]. In der vorliegenden Studie wurden die Stimulanzen daher 90 Minuten mit dem Polypeptidantibiotikum Polymyxin B vorbehandelt. Dieses bindet LPS und verhindert so die Aktivierung seines Rezeptors. Das so vorbehandelte Palmitat induzierte die mRNA-Expression und Sekretion von IL-8 in THP-1-Makrophagen (Abb. 17D, Abb. 18, Abb. 38C). Die Verhinderung der intrazellulären Adapterbindung an den TLR4 durch den Inhibitor Tak242 beeinflusste die Palmitat-induzierte IL-8-mRNA-Expression jedoch nicht (Abb. 42B). In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung verhinderte TAK242 in murinen Knochenmarksmakrophagen und primären humanen Makrophagen nicht die Palmitat-induzierte JNK-Phosphorylierung [150]. CLI095, ein weiterer TLR4-Inhibitor, hatte keinen Einfluss auf die IL-6- und TNF α -Sekretion in Palmitat-behandelten RAW264.7-Makrophagen [256] und reduzierte die Palmitat-induzierte CCL2-mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen tendenziell, aber nicht signifikant [247].

Damit übereinstimmend zeigte eine Studie, dass Palmitat in der computergestützten Simulation der Molekulardynamik nicht direkt mit dem Dimer aus TLR4 und Korezeptor MD-2 interagieren konnte [150]. Vielmehr scheint Fetuin A, welches Palmitat und andere FFA bindet, eine Vermittlerrolle zwischen Palmitat und TLR4 einzunehmen. Fetuin A wies zum einen eine hohe Bindungsaffinität zu TLR4 auf und war zum anderen in der Lage, Signalkaskaden zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B zu aktivieren [256]. Außerdem steigerte in RAW264.7-Makrophagen die Kombination aus Fetuin A und Palmitat die IL-6- und TNF α -Sekretion stärker als die Einzelstimuli [256].

Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass Palmitat die Expression von TLR4 induziert und so eine durch Fetuin A oder LPS ausgelöste Entzündungsantwort verstärkt. Palmitat induzierte die TLR4-mRNA-Expression in RAW 264.7-Makrophagen [248] und J774-Makrophagen [253]. Obwohl Palmitat in der vorliegenden Studie nicht die TLR4-mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen induzierte (Abb. 42A), zeigte eine andere Studie, dass diese und höhere Konzentrationen an Palmitat die TLR4-mRNA-Expression und -Proteinproduktion in THP-1-Makrophagen steigerte [251].

Zusammenfassend lassen neueste Erkenntnisse an einer direkten Bindung und Aktivierung des TLR4 durch Palmitat zweifeln. Wahrscheinlicher ist, dass Palmitat zum einen die TLR4-Expression induziert und zum anderen an Fetuin A bindet und so die Fetuin A-induzierte und TLR4-vermittelte Entzündungsantwort verstärkt.

4.7.2 Stoffwechsel-abhängige Mechanismen der Palmitat-induzierten Entzündungsantwort in Makrophagen

Es gibt Hinweise darauf, dass der Metabolismus von Palmitat Voraussetzung für seine pro-inflammatorische Wirkung ist. So induzierten die nicht zu metabolisierenden Palmitat-analoga Methylpalmitat und 2-Bromopalmitinsäure, im Gegensatz zu Palmitat, nicht die IL-6- und TNF α -mRNA-Expressionen in THP-1-Monozyten [137]. Außerdem verhinderte Triacsin C, welches die Aufnahme von Fettsäuren in die Zelle und deren Aktivierung mit CoA hemmte, die Palmitat-induzierte aktivierende c-Jun-Phosphorylierung in THP-1-Makrophagen [137]. Weiterhin hemmte Triacsin C die Palmitat-induzierten IL-6- und TNF α -mRNA-Expressionen und die Verstärkung der LPS-abhängigen IL-1 β - und IL-8-mRNA-Expressionen in THP-1-Monozyten [135, 136, 166].

Für die weitere intrazelluläre Verstoffwechselung von Fettsäuren stehen unter anderem folgende mögliche Prozesse zur Verfügung: β -Oxidation, TAG-Synthese und Ceramidsynthese. Unter β -Oxidation versteht man den zyklischen Abbau von Fettsäuren zu Acetyl-CoA im Mitochondrium. Sie scheint, laut Literatur, jedoch nicht essenziell für die Palmitat-induzierte Bildung pro-inflammatorischer Zytokine zu sein. Im Gegenteil, Etoximir, welches die Aufnahme der Fettsäuren in Mitochondrien verhinderte, steigerte die Palmitat-induzierte aktivierende c-Jun-Phosphorylierung in THP-1-Makrophagen [137] und die Palmitat-induzierte IL-6-mRNA-Expression in THP-1-Monozyten [135]. Die Palmitat-induzierte TNF α -mRNA-Expression wurde durch Behandlung der THP-1-Monozyten mit Etoximir nicht beeinflusst [135].

Jedoch könnte Palmitat selbst die nachgeschalteten Prozesse der β -Oxidation zur Energiegewinnung hemmen (Abb. 61). In Mitochondrien, die aus Rattenleber isoliert wurden, hemmte Palmitoyl-CoA die Aktivität der ATP/ADP-Translokase [257]. Dieses Enzym vermittelt den Transport von ATP aus dem Mitochondrium heraus und von Adenosindiphosphat (ADP) in das Mitochondrium hinein. Im Falle einer Hemmung der ATP/ADP-Translokase durch Palmitoyl-CoA kommt es zu einer Akkumulation von ATP im Mitochondrium und als Folge zur verstärkten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies [257]. Reaktive Sauerstoffspezies wiederum können unter anderem die Aktivität von NF- κ B auf verschiedenen Ebenen beeinflussen und die Transkription der NF- κ B-regulierten Gene sowohl begünstigen als auch hemmen [258].

Während der TAG-Synthese, die unter anderem der Einspeicherung von Fettsäuren aus der Nahrung in Lipiddroplets von Adipozyten dient, entstehen die pro-inflammatorisch wirksamen Zwischenprodukte Phosphatidsäure und DAG. Es wurde gezeigt, dass RAW 264.7-Makrophagen, die mit Palmitat inkubiert wurden, erhöhte Konzentrationen an TAG und DAG im Zellinneren aufwiesen [134]. DAG setzt Signalwege in Gang, welche die Aktivierung von NF- κ B- oder MAP-Kinase-Signalwegen bewirkten [57, 85].

Die *de novo*-Ceramidsynthese bzw. deren Umwandlung in andere Sphingolipide scheint, laut einigen Studien, essenziell für die Palmitat-induzierte Bildung pro-inflammatorischer Zytokine zu sein. So verhinderte die Ausschaltung des Enzyms Serin-Palmitoyltransferase, das als Schlüsselenzym der *de novo*-Ceramidsynthese gilt, in THP-1-Makrophagen die Palmitat-induzierte IL-1 β - und TNF α -mRNA-Expression [136]. Außerdem verhinderte die Inhibition der Enzyme Serin-Palmitoyltransferase oder Ceramidsynthase eine Verstärkung der LPS-abhängigen IL-6- und IL-8-mRNA-Expression durch Palmitat [166]. In einer anderen Studie konnte jedoch kein Effekt einer Inhibierung von Serin-Palmitoyltransferase 1 auf die Palmitat-induzierte IL-6- und TNF α -mRNA-Expression in primären humanen Makrophagen [135] festgestellt werden. Passend dazu wurde gezeigt, dass in aus dem Knochenmark von Mäusen gewonnenen Makrophagen [150, 259] sowie THP-1-Monozyten [222] und RAW 264.7-Makrophagen [66] der Ceramidgehalt durch Inkubation mit Palmitat erhöht wurde. Außerdem steigerte Palmitat die Ceramidsynthese in RAW 264.7-Makrophagen synergistisch mit LPS [66]. Die Konzentrationen der Sphingolipide Sphingosin und S1P waren in Palmitat-stimulierten THP-1-Makrophagen signifikant erhöht (Abb. 44C, D). In RAW 264.7-Makrophagen wurde gezeigt, dass Palmitat die Bildung von S1P steigerte und die Verstärkung der LPS-induzierten S1P-Synthese durch Palmitat die IL-6-Produktion erhöhte [252].

Es gibt Hinweise darauf, dass Palmitat nicht nur als Ausgangssubstrat für die *de novo*-Synthese von Ceramiden dient, sondern auch die Expression und die Aktivität der an der Ceramidsynthese und -umwandlung beteiligten Enzyme reguliert. In murinen Makrophagen wurde eine Palmitat-induzierte Steigerung der Serin-Palmitoyltransferase-mRNA-Expression bzw. Enzymaktivität nachgewiesen [66, 218]. In der vorliegenden Studie hatte Palmitat jedoch keinen Einfluss auf die mRNA-Expressionen von Serin-Palmitoyltransferase 1 und Serin-Palmitoyltransferase 2 in THP-1-Makrophagen (Abb. 44A, B). Weiterhin wurde berichtet, dass Palmitat die basale Aktivität der Sphingomyelinase in RAW 264.7-Makrophagen induzierte und deren LPS-abhängige Aktivität zusätzlich steigerte [66]. Außerdem wurde der verstärkende Effekt einer Palmitat-Stimulation auf die LPS-induzierte IL-6-mRNA-Expression durch den Einsatz von Sphingosinkinase-Inhibitoren gehemmt [252].

Zusammenfassend scheint die *de novo*-Ceramidsynthese sehr bedeutsam für die Induktion der Expression pro-inflammatorischer Signale durch Palmitat zu sein. Möglicherweise interagiert Palmitat, vermittelt durch Ceramide und DAG, mit der TLR4-Signaltransduktionskette. Eine Studie fand sogar Hinweise darauf, dass eine Aktivierung der Makrophagen über TLR und ein damit einhergehender veränderter Lipidmetabolismus eine Voraussetzung für die Sensitivität gegenüber Palmitat ist [150].

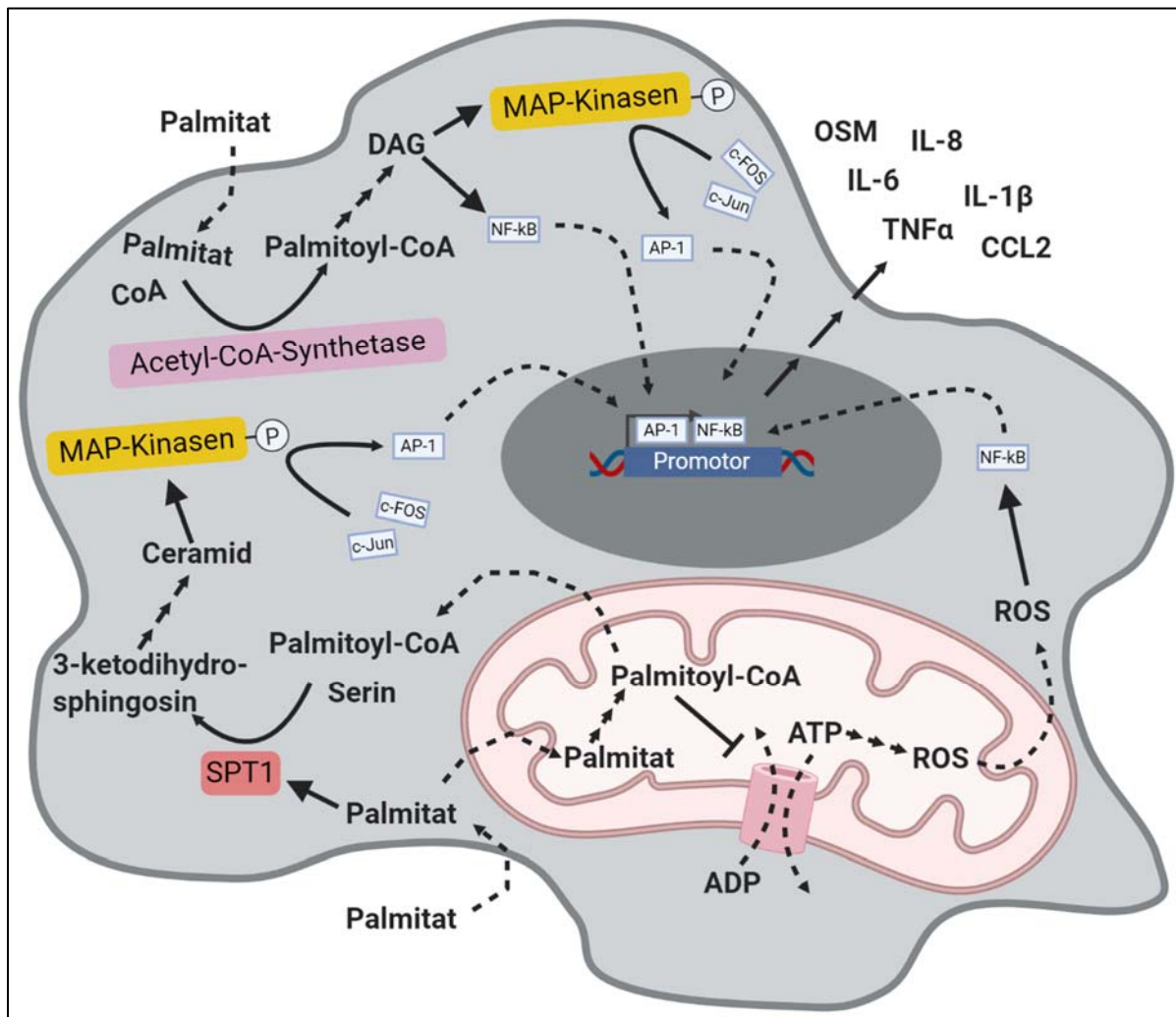


Abb. 61: Mögliche Stoffwechsel-abhängige Mechanismen einer Palmitat-induzierten Entzündungsantwort in Makrophagen

Die Fettsäure Palmitat könnte auf mehreren Ebenen die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine begünstigen. Im Mitochondrium könnte Palmitoyl-CoA, welches im Zuge der β -Oxidation entsteht, die Aktivität der ADP/ATP-Translokase hemmen. Die Akkumulation von ATP im Mitochondrium begünstigt die Entstehung von ROS, welche wiederum den Transkriptionsfaktors NF- κ B sowohl aktivieren als auch hemmen können. Außerhalb des Mitochondriums könnte Palmitoyl-CoA als Ausgangssubstrat für die *de novo*-Ceramidsynthese verwendet werden. Ceramide können MAP-Kinasen aktivieren, welche die Bildung des Transkriptionsfaktors AP-1 vermitteln. Palmitat dient der *de novo*-Ceramidsynthese nicht nur als Ausgangssubstrat, sondern kann unter anderem die Aktivität des Schlüsselenzyms Serin-Palmitoyltransferase 1 steigern. Extern aufgenommenes Palmitat könnte jedoch auch in die TAG-Synthese einfließen. Das dabei entstehende DAG kann Signalwege in Gang setzen, welche sowohl die Freisetzung von NF- κ B als auch die Bildung von AP-1 induzieren. Als Folge der beschriebenen Prozesse könnten die Transkriptionsfaktoren in den Zellkern gelangen und durch Bindung an Promotoren die Bildung pro-inflammatorischer Zytokine begünstigen. **Beteiligte:** Die Darstellung wurde mit Hilfe des Programms BioRender (www.Biorender.com) gezeichnet. **Abkürzungen:** ADP – Adenosindiphosphat; AP-1 – Aktivatorprotein 1; ATP – Adenosintriphosphat; CoA – Coenzym A; DAG – Diacylglycerol; IL – Interleukin; MAP – Mitogen-aktiviertes Protein; NF- κ B – nuclear factor 'kappa light chain enhancer' of activated B-cells; ROS – reactive oxygen species; SPT1 – Serin-Palmitoyltransferase 1; TNF – Tumornekrosefaktor

4.7.3 Besonderheiten von U937-Makrophagen

Über eine mögliche pro-inflammatorische Wirkung von Palmitat auf U937-Monozyten und -Makrophagen ist in der Literatur nur sehr wenig bekannt. In einer Studie wurde von einer Palmitat-induzierten Expression der Chemokine IL-8 und CCL-2 in U937-Makrophagen berichtet [146]. Leider wurden in der Studie keine genauen Angaben zur eingesetzten Palmitatkonzentration und zur Stimulationsdauer publiziert. Eine weitere Studie zeigte, dass eine 24-stündige Stimulation mit 50 μM bis 200 μM Palmitat die Sekretion von IL-1 β in U937-Monozyten konzentrationsabhängig steigerte [144]. Allerdings wurde Palmitat in dieser Studie an BSA gebunden. Da der Komplex zur Stimulation der U937-Makrophagen nicht mit Polymyxin B oder einer anderen LPS-komplexierenden Substanz vorbehandelt wurde [144], kann nicht ausgeschlossen werden, dass die gesteigerte IL-1 β -Sekretion in U937-Monozyten nach Inkubation mit Palmitat-BSA-Komplexen auf eine geringe Verunreinigung mit LPS zurückzuführen war.

In der vorliegenden Studie wurden die Stimulanzen zuvor mit Polymyxin B, welches LPS bindet und inaktiviert, vorbehandelt. Eine 24-stündige Stimulation mit 100 μM Palmitat induzierte keines der untersuchten pro-inflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 in U937-Makrophagen (Abb. 70 in Anhang Punkt 7.3). Im Einklang mit den vorliegenden Daten erwähnte eine Studie, dass Palmitat in U937-Monozyten, im Gegensatz zu RAW 264.7-Makrophagen, nicht die LPS-induzierte Entzündungsantwort verstärkte [66].

Alles in allem spricht die mangelhafte Datenlage dafür, dass Palmitat in U937-Zellen, im Gegensatz zu den meisten anderen Monozyten- bzw. Makrophagen-Zellkulturmodellen [135, 137, 150, 166, 247], keine Entzündungsantwort auslöst. Unklar ist, worauf dies zurückzuführen ist. Palmitat wurde in U937-Monozyten genauso effizient aufgenommen wie in THP-1-Monozyten [222]. Die maximale Aufnahme war nach einer 24-stündigen Inkubation mit Palmitat erreicht. Gleichzeitig war die Bildung von Sphingomyelin und C16-Ceramiden erhöht [222]. Es wurde auch berichtet, dass S1P den Transkriptionsfaktor NF- κB in U937-Monozyten aktivierte [260]. Unklar ist, ob S1P nach Inkubation mit Palmitat endogen gebildet wird und ob die durch S1P ausgelöste Aktivierung des Transkriptionsfaktor NF- κB zu einer verstärkten Bildung von pro-inflammatorischen Zytokinen führt.

4.8 Modulation der Stimulus-abhängigen Entzündungsantwort in Makrophagen durch Prostaglandin E₂

Der Einfluss von PGE₂ auf das Voranschreiten einer Entzündung wird kontrovers diskutiert. PGE₂ war in der Lage, die M2-Polarisierung von Makrophagen zu begünstigen [97] und die Bildung von IFN γ [98], CXCL10 [96], IL-8 [95, 96], IL-12 [99] und pro-inflammatorischen Mitgliedern der IL-1-Familie [96, 100–103] zu reduzieren. Außerdem hemmte PGE₂ die LPS-induzierte CCL2-Sekretion in primären humanen Makrophagen, welche aus dem Blut gesunder Probanden isoliert wurden [96]. PGE₂ hatte jedoch keinen Einfluss auf die CCL2-Expression in Palmitat-behandelten THP-1-Makrophagen (Abb. 38E). Zusätzlich steigerte PGE₂ die Sekretion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 in Makrophagen [100, 109, 112, 113].

Durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B übernimmt TNF α eine Schlüsselrolle bei der Induktion pro-inflammatorischer Signale [33, 37–40]. Eine *in vivo*-Studie deutete darauf hin, dass die PGE₂-abhängige Hemmung der TNF α -Synthese der physiologisch dominierende Effekt in der Entwicklung der nicht-alkoholischen Steatohepatitis (*non-alcoholic steatohepatitis*, NASH) ist [261]. In Übereinstimmung mit der Hypothese, dass PGE₂ an der Resolution des Entzündungsgeschehens beteiligt ist, inhibierte es in zahlreichen Studien die LPS-induzierte Expression und Sekretion von TNF α in Makrophagen aus verschiedenen Geweben von Ratte, Maus und Mensch [98–100, 102, 104–111] und induzierte die Sekretion von löslichen TNF α -*decoy*-Rezeptoren in THP-1-Monozyten [262]. In U937- und primären humanen Makrophagen hemmte PGE₂ tendenziell die basale TNF α -Expression (Abb. 31A, Abb. 37A). Zusätzlich wurde in U937-Makrophagen die LPS- und/ oder Insulin-induzierte TNF α -Expression gehemmt (Abb. 31A, Abb. 34A). Überraschenderweise hatte eine 24-stündige Stimulation mit PGE₂ in der vorliegenden Studie keinen Einfluss auf die LPS-induzierte TNF α -mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen (Abb. 33A). Eine 24-stündige Stimulation mit PGE₂ verstärkte sogar die TNF α -mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen, die zeitgleich mit Palmitat oder einer Kombination aus LPS und Insulin stimuliert wurden (Abb. 36A, Abb. 38A). Interessanterweise bewirkte eine verkürzte Inkubationszeit eine Hemmung der LPS-induzierten TNF α -mRNA-Expression in diesen Zellen (Abb. 73 im Anhang Punkt 7.5). Eine mögliche Erklärung ist, dass PGE₂ zunächst die TNF α -mRNA-Expression in Makrophagen hemmte und gleichzeitig die Bildung von Mediatoren, die in einem nachgeschalteten Schritt die TNF α -mRNA-Expression verstärkten, induzierte. So wurde bereits gezeigt, dass OSM die TNF α -Sekretion in primären murinen Mikrogliazellen und in der murinen Mikrogliazelllinie BV2 induzierte [263]. Tatsächlich wurde die Stimulus-abhängige OSM-mRNA-Expression in THP-1- und U937-Makrophagen durch PGE₂ verstärkt (Abb. 31E, Abb. 33D, Abb. 34E, Abb. 36D, Abb. 38D).

Das Zytokin IL-6 kann, wie auch OSM, je nach Kontext sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch wirken [29, 31, 46]. Während einige Studien eine Hemmung der IL-6-Produktion durch PGE₂ nachwiesen [101, 102, 109, 264, 265], zeigten andere Studien eine PGE₂-induzierte Verstärkung der IL-6- und OSM-Produktion in Makrophagen [75, 100, 108, 110, 113, 213, 214, 266, 267]. In jedem der drei unabhängigen Experimente mit primären humanen Makrophagen wurde eine PGE₂-induzierte IL-6-mRNA-Expression beobachtet (Abb. 37C). In U937-Makrophagen verstärkte PGE₂ die durch LPS oder eine Kombination aus LPS und Insulin induzierte IL-6-mRNA-Expression (Abb. 31C, Abb. 34C).

Seine pro-inflammatorische Wirkung entfaltete PGE₂ unter anderem durch Steigerung der IL-1 β - [110] und IL-8- [114] Produktion in Monozyten und Makrophagen. In U937- und THP-1-Makrophagen, welche mit einer Kombination aus LPS und Insulin stimuliert wurden, verstärkte PGE₂ die IL-1 β - und IL-8-Expression und -Proteinproduktion (Abb. 34B, D, Abb. 35, Abb. 36B, C). Sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene war die IL-8-Expression in THP-1-Makrophagen, die mit einer Kombination aus Palmitat und PGE₂ inkubiert wurden, stärker als in THP-1-Makrophagen, die lediglich mit Einzelstimuli inkubiert wurden (Abb. 38C, Abb. 39). PGE₂ verstärkte dabei konzentrationsabhängig bereits ab einer Konzentration von 100 nM die Palmitat-induzierte IL-8-mRNA-Expression (Abb. 74 in Anhang Punkt 7.5.). Außerdem induzierte eine Kombination aus PGE₂ und Palmitat die IL-1 β -mRNA-Expression stärker als die Einzelstimuli (Abb. 38B). In allen drei unabhängigen Experimenten mit primären humanen Makrophagen steigerte PGE₂ die basale IL-1 β -mRNA-Expression (Abb. 37B). Gleichzeitig wurde in zwei von drei Experimenten die IL-8-mRNA PGE₂-abhängig gesteigert (Abb. 37D). In Übereinstimmung mit der Hypothese, dass PGE₂ an der Entstehung des Entzündungsgeschehens beteiligt ist, bewirkte eine selektive Neutralisierung von PGE₂ mittels eines therapeutischen PGE₂-Antikörpers in Ratten die Reduktion des durch Carrageen ausgelösten Entzündungsgeschehens [268]. Außerdem zeichneten sich Hochfett-diät-gefütterte Mäuse, denen das PGE₂-synthetisierende Enzym mPGES1 fehlte, im Vergleich zu Hochfett-diät-gefütterte Wildtypen durch reduzierte Adipositas und eine verminderte Entzündung im Fettgewebe aus [198].

Zusammenfassend übte PGE₂ in der vorliegenden Studie durch die Hemmung von TNF α in U937-Makrophagen eine anti-inflammatorische Wirkung aus, verstärkte aber die Bildung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-8 sowohl in U937- und THP-1-Makrophagen als auch in primären humanen Makrophagen. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit THP-1-Monozyten, in denen PGE₂ die Bildung von TNF α hemmte und gleichzeitig in der Lage war, die TNF α -induzierte IL-8-Expression zu verstärken [114]. Außerdem verstärkte PGE₂ in der vorliegenden Studie die Bildung von IL-6 und OSM, welche sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Funktionen ausüben können.

Demzufolge scheint PGE₂ kontextabhängig die Entzündung sowohl weiter vorantreiben zu können als auch an dessen Auflösung beteiligt sein.

4.8.1 EP-Rezeptorbeteiligung bei der Prostaglandin E₂-vermittelten Modulation der Entzündungsantwort in Makrophagen

U937- und THP-1-Makrophagen exprimierten vor allem die G_s-gekoppelten Prostaglandinrezeptoren EP2 und EP4 (Abb. 40A, Abb. 75 im Anhang Punkt 7.5). Dies ist im Einklang mit der Literatur, welche in Monozyten und Makrophagen verschiedener Spezies eine starke Expression der Rezeptoren EP2 und EP4 und nur in geringem Umfang die Expression der Rezeptoren EP1 und EP3 beschrieb [96, 98, 100, 114, 214, 269–271].

Die Interaktion von PGE₂ mit den G_s-gekoppelten Rezeptoren EP2 und EP4 erhöht durch Aktivierung der Adenylatzyklase vorübergehend die intrazelluläre cAMP-Konzentration [57, 58, 61, 85, 86]. cAMP wiederum aktiviert unter anderem die Proteinkinase A, welche Transkriptionsfaktoren wie das CREB phosphoryliert und aktiviert [58, 85]. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass Adenylatzyklase-Aktivatoren und cAMP-Analoga auf die Zytokinexpression in Monozyten und Makrophagen dieselbe Wirkung hatten wie PGE₂ [96, 98, 108, 109, 114, 272] und dass Proteinkinase A-Inhibitoren diese hemmten [266].

Der EP4-Rezeptor-Agonist, nicht jedoch der EP2-Rezeptor-Agonist, hemmte nahezu vollständig die LPS-induzierte TNF α -Expression in J774-Makrophagen [98]. In THP-1-Monozyten [114] und -Makrophagen (Abb. 41A) induzierte der EP4-Rezeptor-Agonist, ebenso wie PGE₂, die IL-8-mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen. Agonisten für EP1, EP2 oder EP3 hatten jedoch keine Wirkung auf THP-1-Makrophagen (Abb. 41A). Außerdem hemmte der EP4-Rezeptor-Antagonist, im Gegensatz zum EP2-Rezeptor-Antagonisten, die PGE₂-induzierte IL-8-mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen (Abb. 41B). Die Ausschaltung des Gens für den EP4-Rezeptor in murinen Makrophagen verhinderte die PGE₂-vermittelte Hemmung der basalen oder LPS-induzierten TNF α -Expression [110, 273, 274]. Zusammenfassend legen die Studien nahe, dass vor allem der EP4-Rezeptor für die Modulation der Zytokinexpression in Makrophagen relevant ist. Nichtsdestotrotz kann eine Beteiligung des EP2-Rezeptors unter bestimmten Bedingungen nicht ausgeschlossen werden. Da der EP4-Rezeptor, im Gegensatz zum EP2-Rezeptor, Agonist-abhängig phosphoryliert und desensitiert wird [86], ist es möglich, dass als Erstes EP4-Rezeptoren die Erhöhung der PGE₂-Konzentrationen registrieren, wohingegen die EP2-Rezeptoren unter chronischer PGE₂-Exposition an Relevanz gewinnen. Außerdem weist der EP4-Rezeptor eine höhere Affinität gegenüber PGE₂ auf als der EP2-Rezeptor [269]. Das spricht zusätzlich dafür, dass die noch geringen PGE₂-Konzentrationen zu Beginn einer Entzündung über die Bindung an den EP4-Rezeptor registriert werden, wohin-

gegen PGE₂ im Verlauf einer Entzündung in wesentlich höheren Konzentrationen auch an den EP2-Rezeptor binden kann.

Hinzu kommt, dass auch der Aktivierungsstatus der Makrophagen eine Rolle für die EP-Rezeptorausstattung spielt. In einigen Studien wurde gezeigt, dass die Expression des EP2-Rezeptors in Makrophagen nach LPS-Stimulation hochreguliert wurde und gleichzeitig die Expression des EP4-Rezeptors sank [99, 269, 271]. Eine andere Studie zeigte jedoch, dass LPS die Expression des EP4-Rezeptors in RAW 264.7-Makrophagen induzierte [270]. Außerdem wiesen Insulin-behandelte murine Makrophagen-artige P388D1-Zellen eine größere Anzahl an PGE₂-Rezeptoren auf als unbehandelte Zellen [275] und die EP4-mRNA-Konzentrationen in Makrophagen diabetischer Mäuse waren im Vergleich zu Makrophagen nicht-diabetischer Mäuse erhöht, wohingegen die EP1- und EP3-Konzentrationen erniedrigt waren [110]. Die Studien deuten darauf hin, dass zum Beispiel Patienten mit metabolischen Syndrom eine andere EP-Rezeptor-Ausstattung aufweisen könnten als gesunde Personen und dass dadurch möglicherweise die Wirkung von PGE₂ beeinflusst wird. Dafür spricht auch, dass autoimmune Entzündungsreaktionen die EP-Rezeptorexpression in murinen Peritonealmakrophagen stark erhöhten [214].

4.8.2 Molekularer Mechanismus der Prostaglandin E₂-vermittelten Modulation der Palmitat-induzierten Entzündungsantwort in Makrophagen

In der vorliegenden Studie wurde zum ersten Mal gezeigt, dass PGE₂ die Palmitat-induzierte Zytokinexpression modulieren kann. Da der Lipidmetabolismus wahrscheinlich eine entscheidende Rolle bei der Palmitat-induzierten IL-8-Expression in THP-1-Makrophagen spielt und dieser möglicherweise TLR4-abhängig reguliert wird (vgl. 4.7), sollte der Einfluss von PGE₂ auf die Expression und Aktivität des TLR4 und auf die Bildung der Ceramidmetabolite Sphingosin und S1P untersucht werden. Mögliche Mechanismen über die PGE₂ eine Palmitat-induzierte Entzündungsantwort modulieren könnte, sind in Abb. 62 dargestellt.

Der TLR4-Antagonist Tak242 hemmte signifikant die IL-8-Expression und Sekretion in THP-1-Makrophagen, die mit einer Kombination aus Palmitat und PGE₂ behandelt wurden (Abb. 42B). Auch die PGE₂-induzierte Expression und Sekretion von IL-8 in THP-1-Makrophagen wurde durch den TLR4-Antagonisten tendenziell gehemmt. Vor allem Letzteres war äußerst überraschend, da der Antagonist Tak242 spezifisch die intrazelluläre Adapterbindung an den TLR4 hemmt und keinen direkten Einfluss auf die EP-Rezeptor-vermittelte Entzündungsantwort haben sollte. Nicht auszuschließen sind indirekte Effekte. So wurden bereits wechselseitige Modulationen der Rezeptorsignalkaskaden durch PGE₂ und LPS beschrieben. Es ist hinlänglich bekannt, dass LPS die COX2- und mPGES1-Expression und die Sekretion von PGE₂ in verschiedenen Zellkulturmodellen steigert [30,

66, 276, 277]. Auch in der vorliegenden Arbeit induzierte LPS signifikant den PGE₂-Gehalt im Überstand und die mRNA-Expression PGE₂-synthetisierender Enzyme in U937-Makrophagen (Abb. 24, Abb. 25D, E) und primären humanen Makrophagen (Abb. 28) und tendenziell in THP-1-Makrophagen (Abb. 26, Abb. 27D, E). Interessant ist, dass LPS in der Leberzellkarzinomzelllinie H7402 auch die mRNA-Expressionen der Rezeptoren EP2, EP3 und EP4 steigerte [277]. So könnte die Hemmung des TLR4 eine verminderte Expression der EP-Rezeptoren zur Folge haben, wodurch auch die PGE₂-vermittelte Zytokinexpression in den Zellen vermindert wäre. Auf der anderen Seite reduzierte PGE₂ die TLR4-Proteinspiegel in Alveolarmakrophagen der Ratte [107]. In THP-1-Makrophagen hatte jedoch weder PGE₂ noch Palmitat, einen Einfluss auf die mRNA-Expression des TLR4 (Abb. 42A). Eine indirekte Beteiligung von TLR4 bei der Verstärkung der Palmitat-induzierten Entzündungsantwort durch PGE₂ kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

PGE₂ hatte weder einen Einfluss auf die Expression der Ceramid-synthetisierenden Enzyme Serin-Palmitoyltransferase 1 und 2 noch auf die Produktion von S1P in unbehandelten und mit Palmitat stimulierten THP-1-Makrophagen (Abb. 44A, B, D). Es reprimierte sogar die Palmitat-induzierte Sphingosin-Produktion in THP-1-Makrophagen (Abb. 44C). Der Mechanismus über den PGE₂ die Palmitat-induzierte Expression von Zytokinen beeinflusst, bleibt daher unbekannt.

Denkbar ist jedoch auch ein ähnlicher Mechanismus über den PGE₂ die Expression der TNF α -abhängigen IL-8-Expressionen beeinflusste [114]. Demnach aktivierte TNF α in Monozyten TNF-Rezeptor 2-abhängig den Transkriptionsfaktor NF- κ B und induzierte, vermutlich CREB-abhängig, die Expression des Transkriptionsfaktors C/EBP β . Als Folge wurde die IL-8-mRNA-Expression induziert. PGE₂ verstärkte die TNF α -induzierte IL-8-Expression, in dem es EP4-abhängig die NF- κ B-Aktivität steigerte und die Phosphorylierung von CREB PKA-vermittelt verstärkte. Letzteres wiederum hatte eine gesteigerte C/EBP β -Expression zur Folge. Die Interaktionen von PGE₂ und TNF α waren demnach nicht auf eine wechselseitige Beeinflussung der Signalketten, sondern auf eine unabhängige Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zurückzuführen. Möglicherweise beruht auch die PGE₂-abhängige Verstärkung der Palmitat-induzierten Entzündungsreaktion unter anderem auf eine voneinander unabhängige Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren durch Palmitat und PGE₂.

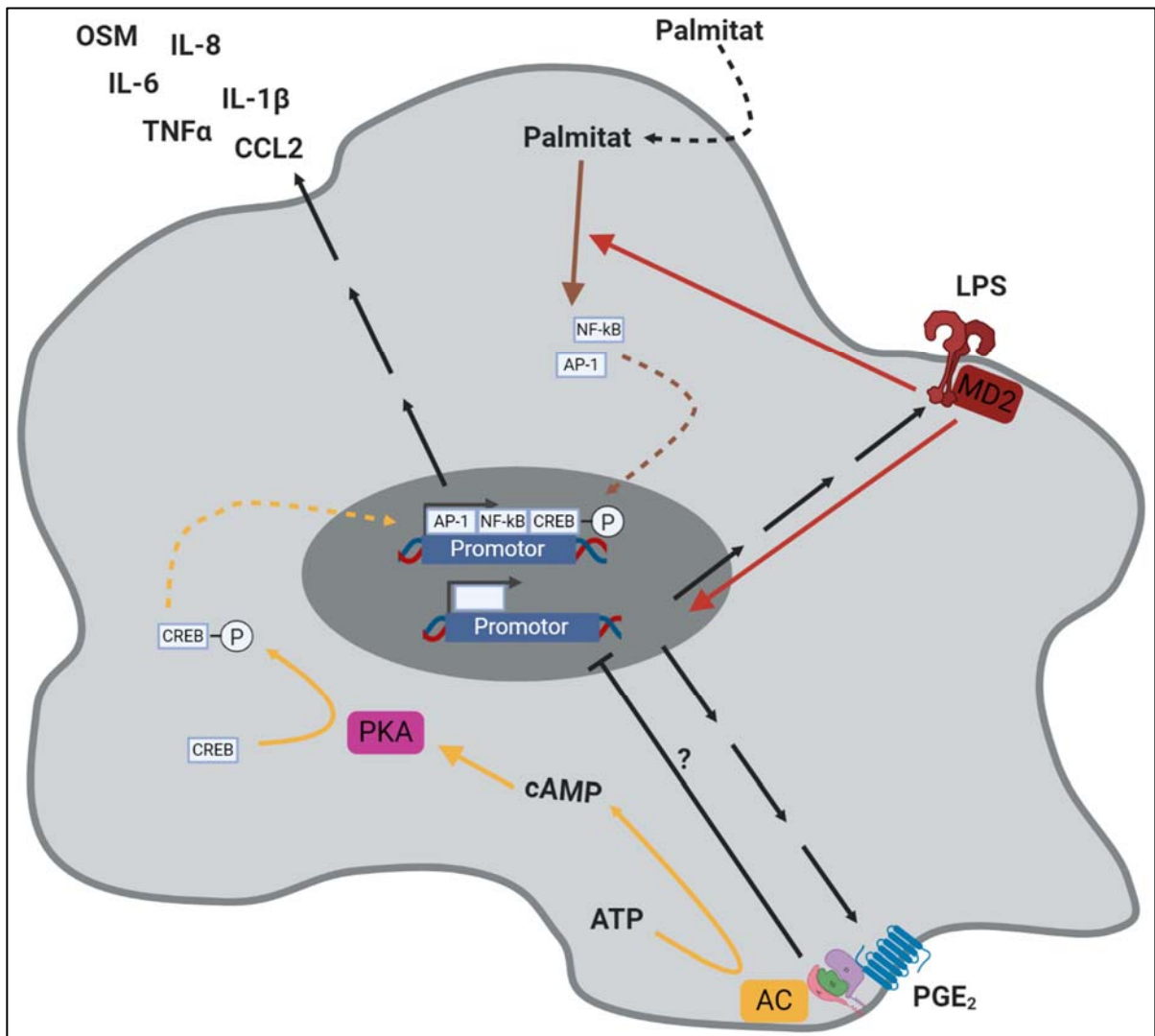


Abb. 62: Mögliche Mechanismen über die PGE₂ eine Palmitat-induzierte Entzündungsantwort modulieren könnte

PGE₂ modulierte die Palmitat-induzierte Expression pro-inflammatorischer Zytokine in THP-1-Makrophagen. Möglicherweise ist daran die EP4-Rezeptor-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB beteiligt. Dieser könnte, zusätzlich zu den Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF-κB, an Promotoren pro-inflammatorischer Zytokine binden und so die Expression dieser Zytokine verstärken. Nicht auszuschließen ist auch eine Beteiligung TLR4-vermittelter Signalwege. Es wurde gezeigt, dass LPS in der Lage ist, die Expression der EP-Rezeptoren zu steigern [277]. So könnte die PGE₂-vermittelte Zytokinexpression TLR4-abhängig reguliert werden. Außerdem gibt es Hinweise, dass PGE₂ möglicherweise die Expression des TLR4 reprimiert [107] und somit an der Entzündungsresolution beteiligt sein könnte. Beteiligte: Die Darstellung wurde mit Hilfe des Programms BioRender (www.Biorender.com) gezeichnet. Abkürzungen: AC – Adenylatzyklase; AP-1 – Aktivatorprotein 1; ATP – Adenosintriphosphat, cAMP – *cyclic adenosine monophosphate*; ADP – Adenosindiphosphat; CREB – cAMP-responsives Element-Bindeprotein; IL – Interleukin; LPS – Lipopolysaccharid; MD2 – *myeloid differentiation factor 2*; NF-κB – *nuclear factor 'kappa light chain enhancer' of activated B-cells*; PGE₂ – Prostaglandin E₂; PKA – Proteinkinase A; TNF – Tumornekrosefaktor

4.9 Stimulus-abhängige Prostaglandin E₂-Synthese in Makrophagen

4.9.1 Einfluss von Insulin, Lipopolysaccharid oder Palmitat auf die Synthese von Arachidonsäure und Prostaglandin E₂ in Makrophagen

PGE₂ wird unter anderem in Makrophagen gebildet [57, 58]. Es gilt als Regulator von Entzündungsreaktionen und kann diese sowohl weiter vorantreiben als auch an deren Auflösung beteiligt sein (vgl. 1.4.3). Adipositas ist mit einer chronischen Entzündung assoziiert und die Entstehung einer Insulinresistenz kann durch pro-inflammatorische Mediatoren wie TNF α , IL-1 β und IL-6-Typ-Zytokine und Chemokine begünstigt werden [55, 122]. Es sollte daher untersucht werden, ob Faktoren des metabolischen Syndroms, wie eine Hyperinsulinämie und erhöhte Spiegel an freien Fettsäuren, die Bildung von PGE₂ in Makrophagen auslösen.

LPS steigerte den PGE₂-Gehalt in Überständen von U937-Makrophagen signifikant (Abb. 24A) und in Überständen von THP-1-Makrophagen tendenziell (Abb. 26). Insulin steigerte die basale und LPS-abhängige PGE₂-Konzentration in Überständen von U937- und THP-1-Makrophagen (Abb. 19A, Abb. 21A, Abb. 24A, Abb. 26). Außerdem steigerte Palmitat den PGE₂-Gehalt in Überständen von THP-1-Makrophagen (Abb. 29A). Im nächsten Schritt sollte daher untersucht werden, ob die gesteigerte Bildung von PGE₂ durch Insulin, LPS bzw. Palmitat auf eine erhöhte Expression der Arachidonsäure-synthetisierenden Enzyme FADS2, ELOVL5 und FADS1 und der PGE₂-synthetisierenden Enzyme COX2 und mPGES1 zurückzuführen war.

Es wurden bereits positive Korrelationen zwischen Insulinresistenz, Typ-2-Diabetes und Übergewicht einerseits und einer gesteigerten FADS2-Aktivität andererseits beobachtet [278–282]. Gleichzeitig korrelierten Insulinresistenz, Typ-2-Diabetes und ein erhöhter BMI mit einer verringerten FADS1-Aktivität [278–282]. In der vorliegenden Arbeit induzierte LPS möglicherweise die Arachidonsäuresynthese durch Induktion der ELOVL5- und FADS1-mRNA-Expressionen in U937-Makrophagen (Abb. 25B, C), nicht jedoch in THP-1-Makrophagen (Abb. 27D, C). Darüber hinaus und in Einklang mit der vorliegenden Studie (Abb. 24B, Abb. 25D, E, Abb. 27D, E, Abb. 28) begünstigte LPS die Bildung von PGE₂ in Makrophagen verschiedener Spezies und verschiedenen Gewebeursprungs durch Induktion der COX2 und der mPGES1 [70–73]. Es konnte gezeigt werden, dass LPS diese Induktion über den Myd88-abhängigen Signalweg vermittelte [71].

Entgegen der Literatur [283] hatte Insulin weder in U937- noch in THP-1-Makrophagen einen wesentlichen Einfluss auf die mRNA-Expressionen Arachidonsäure-synthetisierender Enzyme (Abb. 20A, B, C, Abb. 22A, B, C, Abb. 25A, B, C, Abb. 27A, B, C). Insulin verstärkte jedoch teilweise die basale und LPS-induzierten COX2- und mPGES1-Expressionen in U937- und THP-1-Makrophagen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene (Abb. 19B, Abb. 20D, E, Abb. 21B, Abb. 22D, E, Abb. 24B, Abb. 25D, E, Abb. 27D, E). In primären

humanen Makrophagen hatte Insulin keinen signifikanten Einfluss auf die basale und LPS-induzierte COX2- und mPGES1-mRNA-Expressionen (Abb. 23, Abb. 28). Im Einklang mit den vorliegenden Daten wiesen Monozyten, die aus dem Blut diabetischer Personen isoliert wurden, einen höheren COX2-mRNA-Gehalt auf als Monozyten gesunder Probanden [284]. Die Ergebnisse stehen jedoch im Widerspruch zu Untersuchungen in Alveolarmakrophagen, in denen die LPS-induzierte COX2-Proteinproduktion durch Insulin inhibiert wurde [69]. Palmitat induzierte in THP-1-Makrophagen die mRNA-Expression der Desaturasen, nicht jedoch ELOVL5 (Abb. 30A, B, C). Außerdem induzierte Palmitat die COX2-mRNA- und -Proteinexpression tendenziell, aber nicht signifikant (Abb. 29B, Abb. 30D). Eine durch gesättigte Fettsäuren induzierte COX2-Promotoraktivität und -Proteinproduktion wurde in RAW 264.7-Makrophagen beschrieben [30, 64, 65]. Außerdem verstärkte Palmitat die LPS-induzierte COX2-Expression in diesem Zellkulturmodell [66]. Im Widerspruch dazu wurde in anderen Studien berichtet, dass Palmitat weder in unbehandelten noch in LPS-stimulierten THP-1-Monozyten und -Makrophagen die COX2-Expression beeinflusste [136, 166]. In der vorliegenden Studie wurde die mPGES1-mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen, entgegen einer Studie mit RAW 264.7-Makrophagen [65], durch Palmitat leicht induziert (Abb. 30E).

Zusammenfassend deuten die vorliegenden Daten darauf hin, dass keine der Komponenten des metabolischen Syndroms in der Lage ist, die mRNA-Expression Arachidonsäuresynthetisierender Enzyme in Makrophagen zu beeinflussen. Nicht auszuschließen ist, dass die Arachidonsäuresynthese über andere Mechanismen als der Transkription von Enzymen beeinflusst wird. So wurde bereits publiziert, dass die ELOVL5-Aktivität über posttranslationale Modifikation reguliert wurde [285]. LPS, Insulin und Palmitat verstärkten die Expression PGE₂-synthetisierender Enzyme und die daraus resultierende Bildung von PGE₂. PGE₂ wiederum ist in der Lage, die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen kontextabhängig zu verstärken oder zu hemmen (vgl. 1.4.3). Die hier untersuchten Faktoren des metabolischen Syndroms könnten demzufolge nicht nur direkt die Zytokinproduktion in Makrophagen beeinflussen (vgl. 4.1 und 4.6), sondern auch indirekt durch Stimulierung der autokrinen PGE₂-abhängigen Regulation.

4.9.2 Prostaglandin E₂-induzierte Verstärkung seiner eigenen Stimulus-abhängigen Synthese in Makrophagen

Mehrere Studien zeigten, dass Prostaglandine in der Lage sind, ihre eigene Synthese zu regulieren. Während in Mesangiumzellen [76], Keratinozyten [77], Fibroblasten [75] und Osteoblasten [78–80] eine Verstärkung PGE₂-synthetisierender Enzyme und deren Endprodukt beschrieben wurde, zeigte eine Studien in Muskelzellen [286] eine Hemmung der COX2-Expression durch PGE₂. Eine zellspezifische Regulierung der PGE₂-Expression über verschiedene Mechanismen wurde daher vermutet [74].

PGE₂ verstärkte, mit Ausnahme der ELOVL5- und FADS1-mRNA-Expression in mit LPS und Insulin behandelten THP-1-Makrophagen, nicht die Stimulus-abhängigen FADS2-, ELOVL5- und FADS1-mRNA-Expressionen in U937- und THP-1-Makrophagen (Abb. 48A-C, Abb. 50A-C, Abb. 52A-C). PGE₂ verstärkte jedoch die LPS-abhängige mPGES1-mRNA-Expression in U937-Makrophagen (Abb. 45E) und die LPS- bzw. Palmitat-abhängige COX2- und mPGES1-mRNA-Expressionen in THP-1-Makrophagen (Abb. 47D, E, Abb. 52D, E). Weiterhin verstärkte PGE₂ zusätzlich die COX2- und mPGES1-Expressionen in U937- und THP-1-Makrophagen, welche mit einer Kombination aus LPS und Insulin stimuliert wurden (Abb. 48D, E, Abb. 50D, E). In primären humanen Makrophagen induzierte PGE₂ signifikant die basale mPGES1-Expression, nicht jedoch die basale COX2-mRNA-Expression (Abb. 51). Die Ergebnisse stehen im Einklang mit einer Verstärkung der LPS-induzierten COX2-mRNA-Expression durch PGE₂ in RAW 264.7-Makrophagen [74], jedoch im Widerspruch mit einer Hemmung der LPS-induzierten COX2-Aktivität durch PGE₂ in murinen J774-Makrophagen [81].

PGE₂ beeinflusste demzufolge nicht nur die Bildung von Zytokinen im Kontext einer Entzündungsreaktion (vgl. 4.8), sondern scheint auch seine eigene Synthese zu verstärken. Bemerkenswerterweise verstärkten auch pro-inflammatorische Zytokine, wie zum Beispiel TNF α und IL-1 β , die Bildung von PGE₂ in Monozyten und Makrophagen [67, 68] und anderen Zelltypen [73, 287]. PGE₂ kann seine eigene Synthese demnach auch indirekt über eine autokrine Wirkung der PGE₂-abhängig gebildeten Zytokine steigern. Eine PGE₂-abhängige Aktivierung der Makrophagen in Patienten mit metabolischen Syndrom kann daher möglicherweise den Teufelskreis aus PGE₂-Synthese und Entzündung weiter verstärken.

4.10 Schlussfolgerung: Mediatoren des metabolischen Syndroms lösen Teufelskreis einer immer stärker-werdenden Entzündungsantwort in Makrophagen aus

Insulin, das zur Kompensation einer Insulinresistenz vermehrt aus den pankreatischen β -Zellen ausgeschüttet wird [5], verstärkte die basale und Stimulus-abhängige Expression der pro-inflammatorischen Mediatoren $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-8 , OSM und CCL2 in verschiedenen Makrophagenzellsystemen (vgl. 4.1). Diese Mediatoren lösten eine Insulinresistenz in primären Hepatozyten der Ratte aus (vgl. 4.3). Insulin ist daher in der Lage, einen Teufelskreis der immer stärker werdenden Insulinresistenz in Gang zu setzen (Abb. 63). Weiterhin induzierten sowohl Insulin als auch das Endotoxin LPS und die Fettsäure Palmitat, deren lokale Konzentrationen im Zuge des metabolischen Syndroms stark erhöht sind, eine vermehrte PGE_2 -Synthese (vgl. 4.9.1). PGE_2 wiederum war in der Lage, die $\text{TNF}\alpha$ -mRNA-Expression in Makrophagen herab zu setzen, induzierte aber die Stimulus-abhängige Expression der pro-inflammatorischen Zytokine wie $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-8 und OSM (vgl. 4.8). Außerdem induzierte PGE_2 die Expression PGE_2 -synthetisierender Enzyme und kann somit möglicherweise seine eigene Synthese verstärken (vgl. 4.9.2). $\text{TNF}\alpha$ induzierte die IL-8 -Synthese in verschiedenen Monozytenzellsystemen und diese Synthese wurde interessanterweise durch PGE_2 gesteigert [114]. Außerdem verstärkte $\text{TNF}\alpha$ synergistisch mit Palmitat die CCL2 -mRNA-Expression und -Proteinproduktion in THP-1-Monozyten und in primären humanen Monozyten, welche aus dem Vollblut gesunder Probanden isoliert wurden [288]. IL-6 wiederum verstärkte die $\text{IL-1}\beta$ -mRNA-Expressionen in Insulin-behandelten U937-Makrophagen (Abb. 67B im Anhang Punkt 7.2).

Zusammenfassend kann die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen in Makrophagen durch wechselseitiges Zusammenspiel verschiedener Mediatoren des metabolischen Syndroms verstärkt werden und so mutmaßlich eine stärkere Entzündungsantwort auslösen als jede der Einzelkomponenten. Die dadurch freigesetzten Zytokine können die Insulinrezeptorsignalkaskade hemmen und so zur Entstehung und Verstärkung einer Insulinresistenz beitragen.

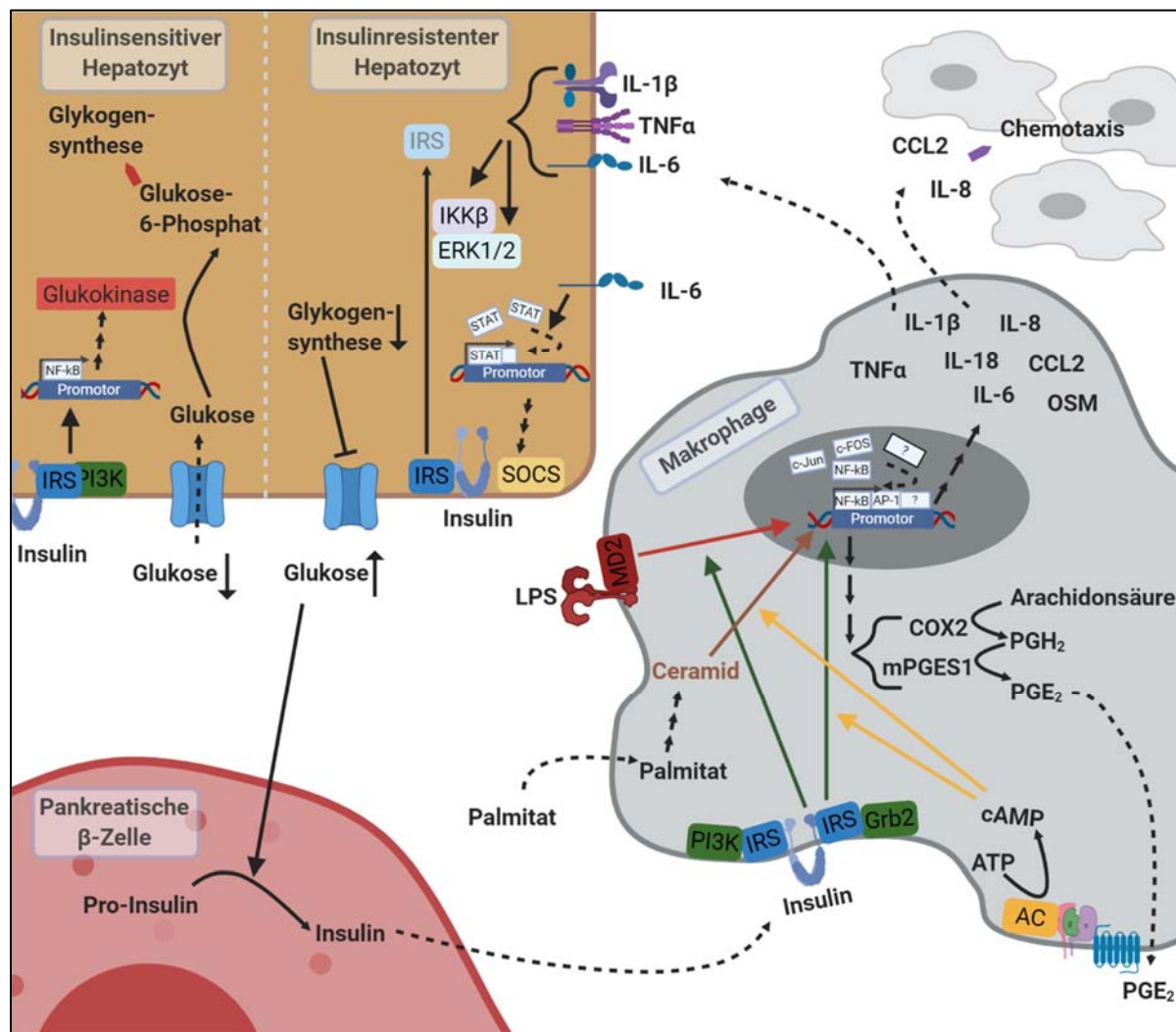


Abb. 63: Schematische Darstellung der Schlussfolgerungen

Eine Folge der Insulinresistenz ist eine vermehrte Ausschüttung von Insulin aus den pankreatischen β -Zellen. Dies soll der Kompensation einer verminderten Insulinsensitivität dienen. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch gezeigt, dass hohe Insulinkonzentrationen die basale und Stimulus-abhängige Expression pro-inflammatorischer Zytokine über den PI3K-Akt-Signal-Weg verstärkten. Außerdem wurde nachgewiesen, dass Insulin, LPS und Palmitat die Expressionen PGE₂-synthetisierender Enzyme induzierten. Das synthetisierte und sekretierte PGE₂ verstärkte vor allem EP4-Rezeptor-vermittelt zusätzlich die Stimulus-abhängige Zytokinfreisetzung und seine eigene Synthese. So löste das Zusammenspiel verschiedener Mediatoren des metabolischen Syndroms in Makrophagen eine stärkere Entzündungsantwort aus als jede der Einzelkomponenten. Im Zuge der Ausschüttung chemotaktischer Zytokine könnten weitere Makrophagen an den Ort der Entzündung gelockt werden und so die Entzündung weiter vorangetrieben werden. Außerdem wurde gezeigt, dass vor allem das ausgeschüttete IL-1 β die Insulinrezeptorsignalkaskade in Hepatozyten hemmte. Vorrangig beteiligt war dabei eine IKK β -vermittelte, inhibierende Serin-Phosphorylierung des IRS. Dies führt zu einem Abbau des IRS und in Folge zur Unterbrechung der Insulinrezeptorsignalkaskade. Zusätzlich verstärkt werden könnte die inhibierende Serin-Phosphorylierung auch durch Aktivierung der Kinasen ERK1/2 und JNK, welche sowohl IL-1 β als auch IL-6-Typ-Zytokine und TNF α auslösen können. **Beteiligte:** Die Darstellung wurde mit Hilfe des Programms BioRender (www.biorender.com) gezeichnet. **Abkürzungen:** AC – Adenylatzyklase; AP-1 – Aktivatorprotein 1; ATP – Adenosintriphosphat, cAMP – *cyclic adenosine monophosphate*; CCL – C-C-Chemokinligand; COX – Cyclooxygenase; ERK1/2 – *extracellular signal-regulated kinases 1/2*; FADS – *fatty acid desaturase*; IKK – *inhibitor of nuclear factor- κ B kinase*; IL – Interleukin; IRS – Insulinrezeptorsubstrat, LPS – Lipopolysaccharid; mPGES1 – mikrosomale PGE-Synthase; MD2 – *myeloid differentiation factor 2*; NF- κ B – *nuclear factor 'kappa light chain enhancer' of activated B-cells*; OSM – Oncostatin M; PG – Prostaglandin; PI3K – Phosphoinositid-3-Kinase; SOCS – *suppressor of cytokine signaling*; STAT – *signal transducer and activator of transcription*; TNF – Tumornekrosefaktor

5 Literatur

- [1] **Alberti K. G., Zimmet P. Z.** (1998): *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1 - Diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation.* Diabetic Medicine 15 (7): 539-53.
- [2] **Moebus S., Hanisch J., Bramlage P., Lösch C., Hauner H., Wasem J., Jöckel K.-H.** (2008): *Regional differences in the prevalence of the metabolic syndrome in primary care practices in Germany.* Deutsches Ärzteblatt International 105 (12): 207-13.
- [3] **Schopf S., Alte D., Völzke H., Friedrich N., Haring R., Lohmann T., Rathmann W., Nauck M., Felix S., Hoffmann W., John U., Wallaschofski H.** (2010): *Prävalenz des Metabolischen Syndroms in Deutschland - Ergebnisse der Study of Health in Pomerania (SHIP).* Diabetologie und Stoffwechsel 5 (03): 161-68.
- [4] **Saltiel A. R., Kahn C. R.** (2001): *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism.* Nature 414 (6865): 799-806.
- [5] **Wilcox G.** (2005): *Insulin and Insulin Resistance.* Clinical Biochemist Reviews 26 (2): 19-39.
- [6] **Robertson R. P., Harmon J., Tran P. O., Tanaka Y., Takahashi H.** (2003): *Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection.* Diabetes 52 (3): 581-87.
- [7] **Bianchini F., Kaaks R., Vainio H.** (2002): *Weight control and physical activity in cancer prevention.* Obesity Reviews 3 (1): 5-8.
- [8] **Castillo J. J., Reagan J. L., Ingham R. R., Furman M., Dalia S., Merhi B., Nemr S., Zarrabi A., Mitri J.** (2012): *Obesity but not overweight increases the incidence and mortality of leukemia in adults - A meta-analysis of prospective cohort studies.* Leukemia Research 36 (7): 868-75.
- [9] **Discacciati A., Orsini N., Wolk A.** (2012): *Body mass index and incidence of localized and advanced prostate cancer--a dose-response meta-analysis of prospective studies.* Annals of Oncology 23 (7): 1665-71.
- [10] **Larsson S. C., Wolk A.** (2007): *Overweight, obesity and risk of liver cancer - A meta-analysis of cohort studies.* British Journal of Cancer 97 (7): 1005-08.
- [11] **Larsson S. C., Wolk A.** (2008): *Overweight and obesity and incidence of leukemia - A meta-analysis of cohort studies.* International Journal of Cancer 122 (6): 1418-21.
- [12] **Liu H., Zhang Y., Ai M., Wang J., Jin B., Teng Z., Wang Y., Li L.** (2016): *Body Mass Index Can Increase the Risk of Gallbladder Cancer - A Meta-Analysis of 14 Cohort Studies.* Medical Science Monitor Basic Research 22: 146-55.
- [13] **Tanaka K., Tsuji I., Tamakoshi A., Matsuo K., Ito H., Wakai K., Nagata C., Mizoue T., Sasazuki S., Inoue M., Tsugane S.** (2012): *Obesity and liver cancer risk - An evaluation based on a systematic review of epidemiologic evidence among the Japanese population.* Japanese Journal of Clinical Oncology 42 (3): 212-21.
- [14] **Huttunen R., Syrjänen J.** (2013): *Obesity and the risk and outcome of infection.* International Journal of Obesity 37 (3): 333-40.
- [15] **Al-Agha A. E., Al-Ghamdi R. A., Halabi S. A.** (2016): *Correlation between obesity and emotional, social, and behavioral problems associated with physical limitation among children and adolescents in Western Saudi Arabia.* Saudi Medical Journal 37 (2): 161-65.
- [16] **Wearing S. C., Hennig E. M., Byrne N. M., Steele J. R., Hills A. P.** (2006): *The biomechanics of restricted movement in adult obesity.* Obesity Reviews 7 (1): 13-24.
- [17] **Whitmer R. A., Gunderson E. P., Quesenberry C. P., Zhou J., Yaffe K.** (2007): *Body mass index in midlife and risk of Alzheimer disease and vascular dementia.* Current Alzheimer Research 4 (2): 103-09.
- [18] **Anstey K. J., Cherbuin N., Budge M., Young J.** (2011): *Body mass index in midlife and late-life as a risk factor for dementia - A meta-analysis of prospective studies.* Obesity Reviews 12 (5): e426-37.
- [19] **Sarwer D. B., Wadden T. A., Fabricatore A. N.** (2005): *Psychosocial and behavioral aspects of bariatric surgery.* Obesity Research 13 (4): 639-48.
- [20] **Whitlock G., Lewington S., Sherliker P., Clarke R., Emberson J., Halsey J., Qizilbash N., Collins R., Peto R.** (2009): *Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults - Collaborative analyses of 57 prospective studies.* The Lancet 373 (9669): 1083-96.
- [21] **World Health Organisation** (2000): *Obesity - Preventing and managing the global epidemic; Report of a WHO Consultation (Geneva, 1999)*
- [22] **Ibrahim M. M.** (2010): *Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences.* Obesity Reviews 11 (1): 11-18.

- [23] **Samuel V. T., Shulman G. I.** (2012): *Integrating Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links*. *Cell* 148 (5): 852-71.
- [24] **Varol C., Mildner A., Jung S.** (2015): *Macrophages - Development and tissue specialization*. *Annual Review of Immunology* (33): 643-75.
- [25] **Dey A., Allen J., Hankey-Giblin P. A.** (2014): *Ontogeny and polarization of macrophages in inflammation: blood monocytes versus tissue macrophages*. *Frontiers in Immunology* 5: 683.
- [26] **Mosser D. M., Edwards J.P.** (2008): *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. *Nature Reviews* (8): 959-69.
- [27] **Weigert A., Olesch C., Brüne B.** (2019): *Sphingosine-1-Phosphate and Macrophage Biology-How the Sphinx Tames the Big Eater*. *Frontiers in Immunology* 10: 1706.
- [28] **Zhang J.-M., An J.** (2007): *Cytokines, inflammation, and pain*. *International Anesthesiology Clinics* 45 (2): 27-37.
- [29] **Borish L. C., Steinke J. W.** (2003): *2. Cytokines and chemokines*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111 (Suppl. 2): S460-75.
- [30] **Huang S., Rutkowsky J. M., Snodgrass R. G., Ono-Moore K. D., Schneider D. A., Newman J. W., Adams S. H., Hwang D. H.** (2012): *Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways*. *Journal of Lipid Research* 53 (9): 2002-13.
- [31] **Komori T., Morikawa Y.** (2018): *Oncostatin M in the development of metabolic syndrome and its potential as a novel therapeutic target*. *Anatomical Science International* 93 (2): 169-76.
- [32] **Dinarello C. A., Novick D., Kim S., Kaplanski G.** (2013): *Interleukin-18 and IL-18 binding protein*. *Frontiers in Immunology* 4: 289.
- [33] **Parameswaran N., Patial S.** (2010): *Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages*. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 20 (2): 87-103.
- [34] **Dostert C., Grusdat M., Letellier E., Brenner D.** (2019): *The TNF Family of Ligands and Receptors: Communication Modules in the Immune System and Beyond*. *Physiological Reviews* 99 (1): 115-60.
- [35] **de Lima-Salgado T. M., Alba-Loureiro T. C., do Nascimento C. S., Nunes M. T., Curi R.** (2011): *Molecular mechanisms by which saturated fatty acids modulate TNF- α expression in mouse macrophage lineage*. *Cell Biochemistry and Biophysics* 59 (2): 89-97.
- [36] **Horiuchi T., Mitoma H., Harashima S.-i., Tsukamoto H., Shimoda T.** (2010): *Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents*. *Rheumatology* 49 (7): 1215-28.
- [37] **Fasshauer M., Klein J., Lossner U., Paschke R.** (2003): *Interleukin (IL)-6 mRNA expression is stimulated by insulin, isoproterenol, tumour necrosis factor alpha, growth hormone, and IL-6 in 3T3-L1 adipocytes*. *Hormone and Metabolic Research* 35 (3): 147-52.
- [38] **Lowe J. M., Menendez D., Bushel P. R., Shatz M., Kirk E. L., Troester M. A., Garantziotis S., Fessler M. B., Resnick M. A.** (2014): *p53 and NF- κ B coregulate proinflammatory gene responses in human macrophages*. *Cancer Research* 74 (8): 2182-92.
- [39] **Perez R. L., Ritzenthaler J. D., Roman J.** (1999): *Transcriptional regulation of the interleukin-1 β promoter via fibrinogen engagement of the CD18 integrin receptor*. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 20 (5): 1059-66.
- [40] **Hiscott J., Marois J., Garoufalos J., D'Addario M., Roulston A., Kwan I., Pepin N., Lacoste J., Nguyen H., Bensi G.** (1993): *Characterization of a functional NF- κ B site in the human interleukin 1 beta promoter - Evidence for a positive autoregulatory loop*. *Molecular and Cellular Biology* 13 (10): 6231-40.
- [41] **Scheller J., Chalaris A., Schmidt-Arras D., Rose-John S.** (2011): *The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1813 (5): 878-88.
- [42] **Sitia R., Rubartelli A.** (2018): *The unconventional secretion of IL-1 β : Handling a dangerous weapon to optimize inflammatory responses*. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 83: 12-21.
- [43] **Yang Y., Wang H., Kouadir M., Song H., Shi F.** (2019): *Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors*. *Cell Death & Disease* 10 (2): 128.
- [44] **Reddy P.** (2004): *Interleukin-18: recent advances*. *Current Opinion in Hematology* 11 (6): 405-10.
- [45] **Grassl C., Luckow B., Schlöndorff D., Dendorfer U.** (1999): *Transcriptional regulation of the interleukin-6 gene in mesangial cells*. *Journal of the American Society of Nephrology* 10 (7): 1466-77.
- [46] **Sproston N. R., Ashworth J. J.** (2018): *Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection*. *Frontiers in Immunology* 9: 754.

- [47] **Sanchez-Infantes D., White U. A., Elks C. M., Morrison R. F., Gimble J. M., Considine R. V., Ferrante A. W., Ravussin E., Stephens J. M.** (2014): *Oncostatin M is produced in adipose tissue and is regulated in conditions of obesity and type 2 diabetes*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 99 (2): E217-25.
- [48] **Ma Y., Streiff R. J., Liu J., Spence M. J., Vestal R. E.** (1999): *Cloning and characterization of human oncostatin M promoter*. *Nucleic Acids Research* 27 (23): 4649-57.
- [49] **Kastl S. P., Speidl W. S., Katsaros K. M., Kaun C., Rega G., Assadian A., Hagmueller G. W., Hoeth M., de Martin R., Ma Y., Maurer G., Huber K., Wojta J.** (2009): *Thrombin induces the expression of oncostatin M via AP-1 activation in human macrophages: a link between coagulation and inflammation*. *Blood* 114 (13): 2812-18.
- [50] **Miyajima A., Kinoshita T., Tanaka M., Kamiya A., Mukoyama Y., Hara T.** (2000): *Role of Oncostatin M in hematopoiesis and liver development*. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 11 (3): 177-83.
- [51] **Neuschäfer-Rube F., Pathe-Neuschäfer-Rube A., Hippenstiel S., Kracht M., Püschel G. P.** (2013): *NF- κ B-dependent IL-8 induction by prostaglandin E(2) receptors EP(1) and EP(4)*. *British Journal of Pharmacology* 168 (3): 704-17.
- [52] **Hoffmann E., Dittrich-Breiholz O., Holtmann H., Kracht M.** (2002): *Multiple control of interleukin-8 gene expression*. *Journal of Leukocyte Biology* 72 (5): 847-55.
- [53] **Mukaida N., Harada A., Matsushima K.** (1998): *Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions*. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 9 (1): 9-23.
- [54] **Wilkinson R. D. A., Magorrian S. M., Williams R., Young A., Small D. M., Scott C. J., Burden R. E.** (2015): *CCL2 is transcriptionally controlled by the lysosomal protease cathepsin S in a CD74-dependent manner*. *Oncotarget* 6 (30): 29725-39.
- [55] **Boden G.** (2011): *Obesity, insulin resistance and free fatty acids*. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity* 18 (2): 139-43.
- [56] **Nakanishi M., Rosenberg D. W.** (2013): *Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and cancer*. *Seminars in Immunopathology* 35 (2): 123-37.
- [57] **Harris S. G., Padilla J., Koumas L., Ray D., Phipps R. P.** (2002): *Prostaglandins as modulators of immunity*. *Trends in Immunology* 23 (3): 144-50.
- [58] **Kalinski P.** (2012): *Regulation of immune responses by prostaglandin E2*. *Journal of Immunology* 188 (1): 21-28.
- [59] **Funk C. D.** (2001): *Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology*. *Science* 294 (5548): 1871-75.
- [60] **Breinig M., Rieker R., Eiteneuer E., Wertenbruch T., Haugg A. M., Helmke B. M., Schirmacher P., Kern M. A.** (2008): *Differential expression of E-prostanoid receptors in human hepatocellular carcinoma*. *International Journal of Cancer* 122 (3): 547-57.
- [61] **Ricciotti E., FitzGerald G. A.** (2011): *Prostaglandins and inflammation*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31 (5): 986-1000.
- [62] **Tallima H., El Ridi R.** (2018): *Arachidonic acid: Physiological roles and potential health benefits - A review*. *Journal of Advanced Research* 11: 33-41.
- [63] **Guillou H., Zadavec D., Martin P. G. P., Jacobsson A.** (2010): *The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice*. *Progress in Lipid Research* 49 (2): 186-99.
- [64] **Lee J. Y., Sohn K. H., Rhee S. H., Hwang D.** (2001): *Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4*. *Journal of Biological Chemistry* 276 (20): 16683-89.
- [65] **Hellmann J., Zhang M. J., Tang Y., Rane M., Bhatnagar A., Spite M.** (2013): *Increased saturated fatty acids in obesity alter resolution of inflammation in part by stimulating prostaglandin production*. *Journal of Immunology* 191 (3): 1383-92.
- [66] **Jin J., Zhang X., Lu Z., Perry D. M., Li Y., Russo S. B., Cowart L. A., Hannun Y. A., Huang Y.** (2013): *Acid sphingomyelinase plays a key role in palmitic acid-amplified inflammatory signaling triggered by lipopolysaccharide at low concentrations in macrophages*. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 305 (7): E853-67.
- [67] **O'Banion M. K., Winn V. D., Young D. A.** (1992): *cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (11): 4888-92.
- [68] **Fournier T., Fadok V., Henson P. M.** (1997): *Tumor necrosis factor-alpha inversely regulates prostaglandin D2 and prostaglandin E2 production in murine macrophages. Synergistic action of cyclic AMP on cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 synthesis*. *Journal of Biological Chemistry* 272 (49): 31065-72.

- [69] **Martins J. O., Ferracini M., Ravanelli N., Landgraf R. G., Jancar S.** (2008): *Insulin suppresses LPS-induced iNOS and COX-2 expression and NF-kappaB activation in alveolar macrophages.* Cellular Physiology and Biochemistry 22 (1-4): 279-86.
- [70] **Herschman H. R.** (1996): *Prostaglandin synthase 2.* Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism 1299 (1): 125-40.
- [71] **Uematsu S., Matsumoto M., Takeda K., Akira S.** (2002): *Lipopolysaccharide-Dependent Prostaglandin E2 Production Is Regulated by the Glutathione-Dependent Prostaglandin E2 Synthase Gene Induced by the Toll-Like Receptor 4/MyD88/NF-IL6 Pathway.* Journal of Immunology 168 (11): 5811-16.
- [72] **Xiao L., Ornatowska M., Zhao G., Cao H., Yu R., Deng J., Li Y., Zhao Q., Sadikot R. T., Christman J. W.** (2012): *Lipopolysaccharide-induced expression of microsomal prostaglandin E synthase-1 mediates late-phase PGE2 production in bone marrow derived macrophages.* PLOS ONE 7 (11): e50244.
- [73] **Murakami M., Naraba H., Tanioka T., Semmyo N., Nakatani Y., Kojima F., Ikeda T., Fueki M., Ueno A., Oh S., Kudo I.** (2000): *Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2.* Journal of Biological Chemistry 275 (42): 32783-92.
- [74] **Hinz B., Brune K., Pahl A.** (2000): *Prostaglandin E(2) upregulates cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages.* Biochemical and Biophysical Research Communications 272 (3): 744-48.
- [75] **Bagga D., Wang L., Farias-Eisner R., Glaspy J. A., Reddy S. T.** (2003): *Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100 (4): 1751-56.
- [76] **Nüsing R. M., Klein T., Pfeilschifter J., Ullrich V.** (1996): *Effect of cyclic AMP and prostaglandin E2 on the induction of nitric oxide- and prostanoid-forming pathways in cultured rat mesangial cells.* The Biochemical Journal 313 (2): 617-23.
- [77] **Maldve R. E., Kim Y., Muga S. J., Fischer S. M.** (2000): *Prostaglandin E(2) regulation of cyclooxygenase expression in keratinocytes is mediated via cyclic nucleotide-linked prostaglandin receptors.* Journal of Lipid Research 41 (6): 873-81.
- [78] **Murakami M., Kuwata H., Amakasu Y., Shimbara S., Nakatani Y., Atsumi G., Kudo I.** (1997): *Prostaglandin E2 amplifies cytosolic phospholipase A2- and cyclooxygenase-2-dependent delayed prostaglandin E2 generation in mouse osteoblastic cells. Enhancement by secretory phospholipase A2.* Journal of Biological Chemistry 272 (32): 19891-97.
- [79] **Pilbeam C. C., Raisz L. G., Voznesensky O., Alander C. B., Delman B. N., Kawaguchi H.** (1995): *Autoregulation of inducible prostaglandin G/H synthase in osteoblastic cells by prostaglandins.* Journal of Bone and Mineral Research 10 (3): 406-14.
- [80] **Takahashi Y., Taketani Y., Endo T., Yamamoto S., Kumegawa M.** (1994): *Studies on the induction of cyclooxygenase isozymes by various prostaglandins in mouse osteoblastic cell line with reference to signal transduction pathways.* Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism 1212 (2): 217-24.
- [81] **Pang L., Hoult J. R.** (1997): *Repression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by prostaglandin E2 and other cyclic AMP stimulants in J774 macrophages.* Biochemical Pharmacology 53 (4): 493-500.
- [82] **Chen Z.-S., Lee K., Walther S., Raftogianis R. B., Kuwano M., Zeng H., Kruh G. D.** (2002): *Analysis of methotrexate and folate transport by multidrug resistance protein 4 (ABCC4): MRP4 is a component of the methotrexate efflux system.* Cancer Research 62 (11): 3144-50.
- [83] **Reid G., Wielinga P., Zelcer N., van der Heijden I., Kuil A., Haas M. de, Wijnholds J., Borst P.** (2003): *The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100 (16): 9244-49.
- [84] **Zelcer N., Reid G., Wielinga P., Kuil A., van der Heijden I., Schuetz J. D., Borst P.** (2003): *Steroid and bile acid conjugates are substrates of human multidrug-resistance protein (MRP) 4 (ATP-binding cassette C4).* The Biochemical Journal 371 (2): 361-67.
- [85] **Woodward D. F., Jones R. L., Narumiya S.** (2011): *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIII: classification of prostanoid receptors, updating 15 years of progress.* Pharmacological Reviews 63 (3): 471-538.
- [86] **Sugimoto Y., Narumiya S.** (2007): *Prostaglandin E receptors.* Journal of Biological Chemistry 282 (16): 11613-17.
- [87] **Bilson H. A., Mitchell D. L., Ashby B.** (2004): *Human prostaglandin EP3 receptor isoforms show different agonist-induced internalization patterns.* FEBS Letters 572 (1-3): 271-75.

- [88] **Moriyama T., Higashi T., Togashi K., Iida T., Segi E., Sugimoto Y., Tominaga T., Narumiya S., Tominaga M.** (2005): *Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins*. *Molecular Pain* 1: 3.
- [89] **Legler D. F., Krause P., Scandella E., Singer E., Groettrup M.** (2006): *Prostaglandin E2 is generally required for human dendritic cell migration and exerts its effect via EP2 and EP4 receptors*. *Journal of Immunology* 176 (2): 966-73.
- [90] **Kabashima K., Sakata D., Nagamachi M., Miyachi Y., Inaba K., Narumiya S.** (2003): *Prostaglandin E2-EP4 signaling initiates skin immune responses by promoting migration and maturation of Langerhans cells*. *Nature Medicine* 9 (6): 744-49.
- [91] **Krause P., Bruckner M., Uermösi C., Singer E., Groettrup M., Legler D. F.** (2009): *Prostaglandin E(2) enhances T-cell proliferation by inducing the costimulatory molecules OX40L, CD70, and 4-1BBL on dendritic cells*. *Blood* 113 (11): 2451-60.
- [92] **Bruckner M., Dickel D., Singer E., Legler D. F.** (2012): *Distinct modulation of chemokine expression patterns in human monocyte-derived dendritic cells by prostaglandin E(2)*. *Cellular Immunology* 276 (1-2): 52-58.
- [93] **Yao C., Sakata D., Esaki Y., Li Y., Matsuoka T., Kuroiwa K., Sugimoto Y., Narumiya S.** (2009): *Prostaglandin E2-EP4 signaling promotes immune inflammation through Th1 cell differentiation and Th17 cell expansion*. *Nature Medicine* 15 (6): 633-40.
- [94] **Gu C., Wu L., Li X.** (2013): *IL-17 family: cytokines, receptors and signaling*. *Cytokine* 64 (2): 477-85.
- [95] **Standiford T. J., Kunkel S. L., Rolfe M. W., Evanoff H. L., Allen R. M., Strieter R. M.** (1992): *Regulation of human alveolar macrophage- and blood monocyte-derived interleukin-8 by prostaglandin E2 and dexamethasone*. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 6 (1): 75-81.
- [96] **Takayama K., García-Cardena G., Sukhova G. K., Comander J., Gimbrone M. A., Libby P.** (2002): *Prostaglandin E2 suppresses chemokine production in human macrophages through the EP4 receptor*. *Journal of Biological Chemistry* 277 (46): 44147-54.
- [97] **Luan B., Yoon Y.-S., Le Lay J., Kaestner K. H., Hedrick S., Montminy M.** (2015): *CREB pathway links PGE2 signaling with macrophage polarization*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (51): 15642-47.
- [98] **Xu X. J., Reichner J. S., Mastrofrancesco B., Henry W. L., Albina J. E.** (2008): *Prostaglandin E2 suppresses lipopolysaccharide-stimulated IFN-beta production*. *Journal of Immunology* 180 (4): 2125-31.
- [99] **Ikegami R., Sugimoto Y., Segi E., Katsuyama M., Karahashi H., Amano F., Maruyama T., Yamane H., Tsuchiya S., Ichikawa A.** (2001): *The Expression of Prostaglandin E Receptors EP2 and EP4 and Their Different Regulation by Lipopolysaccharide in C3H/HeN Peritoneal Macrophages*. *Journal of Immunology* 166 (7): 4689-96.
- [100] **Treffkorn L., Scheibe R., Maruyama T., Dieter P.** (2004): *PGE2 exerts its effect on the LPS-induced release of TNF-alpha, ET-1, IL-1alpha, IL-6 and IL-10 via the EP2 and EP4 receptor in rat liver macrophages*. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 74 (1-4): 113-23.
- [101] **Roland C. R., Goss J. A., Mangino M. J., Hafenrichter D., Flye M. W.** (1994): *Autoregulation by eicosanoids of human Kupffer cell secretory products. A study of interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, and nitric oxide*. *Annals of Surgery* 219 (4): 389-99.
- [102] **Zhong W. W., Burke P. A., Drotar M. E., Chavali S. R., Forse R. A.** (1995): *Effects of prostaglandin E2, cholera toxin and 8-bromo-cyclic AMP on lipopolysaccharide-induced gene expression of cytokines in human macrophages*. *Immunology* 84 (3): 446-52.
- [103] **Knudsen P. J., Dinarello C. A., Strom T. B.** (1986): *Prostaglandins posttranscriptionally inhibit monocyte expression of interleukin 1 activity by increasing intracellular cyclic adenosine monophosphate*. *Journal of Immunology* 137 (10): 3189-94.
- [104] **Peters T., Karck U., Decker K.** (1990): *Interdependence of tumor necrosis factor, prostaglandin E2, and protein synthesis in lipopolysaccharide-exposed rat Kupffer cells*. *European Journal of Biochemistry* 191 (3): 583-89.
- [105] **Fennekohl A., Sugimoto Y., Segi E., Maruyama T., Ichikawa A., Püschel G. P.** (2002): *Contribution of the two Gs-coupled PGE2-receptors EP2-receptor and EP4-receptor to the inhibition by PGE2 of the LPS-induced TNFalpha-formation in Kupffer cells from EP2-or EP4-receptor-deficient mice. Pivotal role for the EP4-receptor in wild type Kupffer cells*. *Journal of Hepatology* 36 (3): 328-34.
- [106] **Kunkel S. L., Wiggins R. C., Chensue S. W., Larrick J.** (1986): *Regulation of macrophage tumor necrosis factor production by prostaglandin E2*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 137 (1): 404-10.

- [107] **Degraaf A. J., Zaslona Z., Bourdonnay E., Peters-Golden M.** (2014): *Prostaglandin E2 reduces Toll-like receptor 4 expression in alveolar macrophages by inhibition of translation.* American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 51 (2): 242-50.
- [108] **Bailly S., Ferrua B., Fay M., Gougerot-Pocidallo M. A.** (1990): *Differential regulation of IL 6, IL 1 A, IL 1 beta and TNF alpha production in LPS-stimulated human monocytes: role of cyclic AMP.* Cytokine 2 (3): 205-10.
- [109] **Strassmann G., Patil-Koota V., Finkelman F., Fong M., Kambayashi T.** (1994): *Evidence for the involvement of interleukin 10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E2.* Journal of Experimental Medicine 180 (6): 2365-70.
- [110] **Vallerie S. N., Kramer F., Barnhart S., Kanter J. E., Breyer R. M., Andreasson K. I., Bornfeldt K. E.** (2016): *Myeloid Cell Prostaglandin E2 Receptor EP4 Modulates Cytokine Production but Not Atherogenesis in a Mouse Model of Type 1 Diabetes.* PLOS ONE 11 (6): e0158316.
- [111] **Pruimboom W. M., van Dijk J. A., Tak C. J., Garrelds I., Bonta I. L., Wilson P. J., Zijlstra F. J.** (1994): *Interactions between cytokines and eicosanoids: a study using human peritoneal macrophages.* Immunology Letters 41 (2-3): 255-60.
- [112] **Shinomiya S., Naraba H., Ueno A., Utsunomiya I., Maruyama T., Ohuchida S., Ushikubi F., Yuki K., Narumiya S., Sugimoto Y., Ichikawa A., Oh-ishi S.** (2001): *Regulation of TNF α and interleukin-10 production by prostaglandins I2 and E2: studies with prostaglandin receptor-deficient mice and prostaglandin E-receptor subtype-selective synthetic agonists.* Biochemical Pharmacology 61 (9): 1153-60.
- [113] **Williams J. A., Shacter E.** (1997): *Regulation of macrophage cytokine production by prostaglandin E2. Distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2.* Journal of Biological Chemistry 272 (41): 25693-99.
- [114] **Neuschäfer-Rube F., Pathe-Neuschäfer-Rube A., Hippenstiel S., Püschel G. P.** (2019): *PGE2 enhanced TNF α -mediated IL-8 induction in monocytic cell lines and PBMC.* Cytokine 113: 105-16.
- [115] **Morigny P., Houssier M., Mouisel E., Langin D.** (2016): *Adipocyte lipolysis and insulin resistance.* Biochimie 125: 259-66.
- [116] **Ahmadian M., Duncan R. E., Jaworski K., Sarkadi-Nagy E., Sul H. S.** (2007): *Triacylglycerol metabolism in adipose tissue.* Future Lipidology 2 (2): 229-37.
- [117] **Dimitriadis G., Mitrou P., Lambadiari V., Maratou E., Raptis S. A.** (2011): *Insulin effects in muscle and adipose tissue.* Diabetes Research and Clinical Practice 93: S52-9.
- [118] **Wood I. S., de Heredia F. P., Wang B., Trayhurn P.** (2009): *Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity.* The Proceedings of the Nutrition Society 68 (4): 370-77.
- [119] **Fujisaka S., Usui I., Ikutani M., Aminuddin A., Takikawa A., Tsuneyama K., Mahmood A., Goda N., Nagai Y., Takatsu K., Tobe K.** (2013): *Adipose tissue hypoxia induces inflammatory M1 polarity of macrophages in an HIF-1 α -dependent and HIF-1 α -independent manner in obese mice.* Diabetologia 56 (6): 1403-12.
- [120] **Ye J., Gao Z., Yin J., He Q.** (2007): *Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice.* American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism 293 (4): E1118-28.
- [121] **Hosogai N., Fukuhara A., Oshima K., Miyata Y., Tanaka S., Segawa K., Furukawa S., Tochino Y., Komuro R., Matsuda M., Shimomura I.** (2007): *Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation.* Diabetes 56 (4): 901-11.
- [122] **Xu H., Barnes G. T., Yang Q., Tan G., Yang D., Chou C. J., Sole J., Nichols A., Ross J. S., Tartaglia L. A., Chen H.** (2003): *Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance.* Journal of Clinical Investigation 112 (12): 1821-30.
- [123] **Kobashi C., Asamizu S., Ishiki M., Iwata M., Usui I., Yamazaki K., Tobe K., Kobayashi M., Urakaze M.** (2009): *Inhibitory effect of IL-8 on insulin action in human adipocytes via MAP kinase pathway.* Journal of Inflammation 6: 25.
- [124] **Rouault C., Pellegrinelli V., Schilch R., Cotillard A., Poitou C., Tordjman J., Sell H., Clément K., Lacasa D.** (2013): *Roles of chemokine ligand-2 (CXCL2) and neutrophils in influencing endothelial cell function and inflammation of human adipose tissue.* Endocrinology 154 (3): 1069-79.
- [125] **Giordano A., Murano I., Mondini E., Perugini J., Smorlesi A., Severi I., Barazzoni R., Scherer P. E., Cinti S.** (2013): *Obese adipocytes show ultrastructural features of stressed cells and die of pyroptosis.* Journal of Lipid Research 54 (9): 2423-36.

- [126] **Daniele A., Cammarata R., Masullo M., Nerone G., Finamore F., D'Andrea M., Pilla F., Oriani G.** (2008): *Analysis of adiponectin gene and comparison of its expression in two different pig breeds.* *Obesity* 16 (8): 1869-74.
- [127] **de Rosa A., Monaco M. L., Capasso M., Forestieri P., Pilone V., Nardelli C., Buono P., Daniele A.** (2013): *Adiponectin oligomers as potential indicators of adipose tissue improvement in obese subjects.* *European Journal of Endocrinology* 169 (1): 37-43.
- [128] **Kumada M., Kihara S., Ouchi N., Kobayashi H., Okamoto Y., Ohashi K., Maeda K., Nagaretani H., Kishida K., Maeda N., Nagasawa A., Funahashi T., Matsuzawa Y.** (2004): *Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages.* *Circulation* 109 (17): 2046-49.
- [129] **Wulster-Radcliffe M. C., Ajuwon K. M., Wang J., Christian J. A., Spurlock M. E.** (2004): *Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages.* *Biochemical and Biophysical Research Communications* 316 (3): 924-29.
- [130] **Yokota T., Oritani K., Takahashi I., Ishikawa J., Matsuyama A., Ouchi N., Kihara S., Funahashi T., Tenner A. J., Tomiyama Y., Matsuzawa Y.** (2000): *Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages.* *Blood* 96 (5): 1723-32.
- [131] **Wolf A. M., Wolf D., Rumpold H., Enrich B., Tilg H.** (2004): *Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes.* *Biochemical and Biophysical Research Communications* 323 (2): 630-35.
- [132] **Ritter O., Jelenik T., Roden M.** (2015): *Lipid-mediated muscle insulin resistance: different fat, different pathways?* *Journal of Molecular Medicine* 93 (8): 831-43.
- [133] **Ruiz-Núñez B., Dijck-Brouwer D. A. J., Muskiet F. A. J.** (2016): *The relation of saturated fatty acids with low-grade inflammation and cardiovascular disease.* *Journal of Nutritional Biochemistry* 36: 1-20.
- [134] **Holland W. L., Bikman B. T., Wang L.-P., Yuguang G., Sargent K. M., Bulchand S., Knotts T. A., Shui G., Clegg D. J., Wenk M. R., Pagliassotti M. J., Scherer P. E., Summers S. A.** (2011): *Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice.* *Journal of Clinical Investigation* 121 (5): 1858-70.
- [135] **Bunn R. C., Cockrell G. E., Ou Y., Thrailkill K. M., Lumpkin C. K., Fowlkes J. L.** (2010): *Palmitate and insulin synergistically induce IL-6 expression in human monocytes.* *Cardiovascular Diabetology* 9: 73.
- [136] **Håversen L., Danielsson K. N., Fogelstrand L., Wiklund O.** (2009): *Induction of proinflammatory cytokines by long-chain saturated fatty acids in human macrophages.* *Atherosclerosis* 202 (2): 382-93.
- [137] **Namgaladze D., Lips S., Leiker T. J., Murphy R. C., Ekroos K., Ferreiros N., Geisslinger G., Brüne B.** (2014): *Inhibition of macrophage fatty acid β -oxidation exacerbates palmitate-induced inflammatory and endoplasmic reticulum stress responses.* *Diabetologia* 57 (5): 1067-77.
- [138] **Samokhvalov V., Bilan P. J., Schertzer J. D., Antonescu C. N., Klip A.** (2009): *Palmitate- and lipopolysaccharide-activated macrophages evoke contrasting insulin responses in muscle cells.* *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 296 (1): E37-46.
- [139] **Snodgrass R. G., Boß M., Zezina E., Weigert A., Dehne N., Fleming I., Brüne B., Namgaladze D.** (2016): *Hypoxia Potentiates Palmitate-induced Pro-inflammatory Activation of Primary Human Macrophages.* *Journal of Biological Chemistry* 291 (1): 413-24.
- [140] **Shi H., Kokoeva M. V., Inouye K., Tzamelis I., Yin H., Flier J. S.** (2006): *TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance.* *Journal of Clinical Investigation* 116 (11): 3015-25.
- [141] **Suganami T., Tanimoto-Koyama K., Nishida J., Itoh M., Yuan X., Mizuarai S., Kotani H., Yamaoka S., Miyake K., Aoe S., Kamei Y., Ogawa Y.** (2007): *Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages.* *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27 (1): 84-91.
- [142] **Pardo V., González-Rodríguez Á., Guijas C., Balsinde J., Valverde Á. M.** (2015): *Opposite cross-talk by oleate and palmitate on insulin signaling in hepatocytes through macrophage activation.* *Journal of Biological Chemistry* 290 (18): 11666-77.
- [143] **Shikama Y., Aki N., Hata A., Nishimura M., Oyadomari S., Funaki M.** (2015): *Palmitate-stimulated monocytes induce adhesion molecule expression in endothelial cells via IL-1 signaling pathway.* *Journal of Cellular Physiology* 230 (3): 732-42.

- [144] **Kim S., Joe Y., Jeong S. O., Zheng M., Back S. H., Park S. W., Ryter S. W., Chung H. T.** (2014): *Endoplasmic reticulum stress is sufficient for the induction of IL-1 β production via activation of the NF- κ B and inflammasome pathways.* *Innate Immunity* 20 (8): 799-815.
- [145] **Su D., Coudriet G. M., Hyun Kim D., Lu Y., Perdomo G., Qu S., Slusher S., Tse H. M., Piganelli J., Giannoukakis N., Zhang J., Dong H. H.** (2009): *FoxO1 links insulin resistance to proinflammatory cytokine IL-1 β production in macrophages.* *Diabetes* 58 (11): 2624-33.
- [146] **Laine P. S., Schwartz E. A., Wang Y., Zhang W.-Y., Karnik S. K., Musi N., Reaven P. D.** (2007): *Palmitic acid induces IP-10 expression in human macrophages via NF- κ B activation.* *Biochemical and Biophysical Research Communications* 358 (1): 150-55.
- [147] **Little J. P., Madeira J. M., Klegeris A.** (2012): *The saturated fatty acid palmitate induces human monocytic cell toxicity toward neuronal cells: exploring a possible link between obesity-related metabolic impairments and neuroinflammation.* *Journal of Alzheimer's Disease* 3 (Suppl. 2): S179-83.
- [148] **Fritsche K. L.** (2015): *The science of fatty acids and inflammation.* *Advances in Nutrition* 6 (3): 293S-301S.
- [149] **Lu Y.-C., Yeh W.-C., Ohashi P. S.** (2008): *LPS/TLR4 signal transduction pathway.* *Cytokine* 42 (2): 145-51.
- [150] **Lancaster G. I., Langley K. G., Berglund N. A., Kammoun H. L., Reibe S., Estevez E., Weir J., Mellett N. A., Pernes G., Conway J. R. W., Lee M. K. S., Timpson P., Murphy A. J., Masters S. L., Gerondakis S., Bartonicek N., Kaczorowski D. C., Dinger M. E., Meikle P. J., Bond P. J., Febbraio M. A.** (2018): *Evidence that TLR4 Is Not a Receptor for Saturated Fatty Acids but Mediates Lipid-Induced Inflammation by Reprogramming Macrophage Metabolism.* *Cell Metabolism* 27 (5): 1096-110.e5.
- [151] **Broad A., Kirby J. A., Jones D. E. J.** (2007): *Toll-like receptor interactions: tolerance of MyD88-dependent cytokines but enhancement of MyD88-independent interferon- β production.* *Immunology* 120 (1): 103-11.
- [152] **Guha M., Mackman N.** (2001): *LPS induction of gene expression in human monocytes.* *Cellular Signalling* 13 (2): 85-94.
- [153] **Moreira A. P. B., Texeira T. F. S., Ferreira A. B., Peluzio M. d. C. G., Alfenas R. d. C. G.** (2012): *Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia.* *The British Journal of Nutrition* 108 (5): 801-09.
- [154] **Matsunaga N., Tsuchimori N., Matsumoto T., Ii M.** (2011): *TAK-242 (resatorvid), a small-molecule inhibitor of Toll-like receptor (TLR) 4 signaling, binds selectively to TLR4 and interferes with interactions between TLR4 and its adaptor molecules.* *Molecular Pharmacology* 79 (1): 34-41.
- [155] **Takeda K., Akira S.** (2004): *TLR signaling pathways.* *Seminars in Immunology* 16 (1): 3-9.
- [156] **Gault C. R., Obeid L. M., Hannun Y. A.** (2010): *An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown.* *Advances in Experimental Medicine and Biology* 688: 1-23.
- [157] **Hannun Y. A., Obeid L. M.** (2018): *Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease.* *Nature Reviews - Molecular Cell Biology* 19 (3): 175-91.
- [158] **Holland W. L., Summers S. A.** (2008): *Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: new insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism.* *Endocrine Reviews* 29 (4): 381-402.
- [159] **Han G., Gupta S. D., Gable K., Niranjanakumari S., Moitra P., Eichler F., Brown R. H., Harmon J. M., Dunn T. M.** (2009): *Identification of small subunits of mammalian serine palmitoyltransferase that confer distinct acyl-CoA substrate specificities.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (20): 8186-91.
- [160] **Matschinsky F. M., Wilson D. F.** (2019): *The Central Role of Glucokinase in Glucose Homeostasis: A Perspective 50 Years After Demonstrating the Presence of the Enzyme in Islets of Langerhans.* *Frontiers in Physiology* 10: 148.
- [161] **de Meyts P., Feingold K. R., Anawalt B., Boyce A., Chrousos G., Dungan K., Grossman A., Hershman J. M., Kaltsas G., Koch C., Kopp P., Korbonits M., McLachlan R., Morley J. E., New M., Perreault L., Purnell J., Rebar R., Singer F., Trencle D. L., Vinik A., Wilson D. P.** (2000): *The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network.* *Endotext* [Internet]
- [162] **Schultze S. M., Hemmings B. A., Niessen M., Tschopp O.** (2012): *PI3K/AKT, MAPK and AMPK signalling: protein kinases in glucose homeostasis.* *Expert Reviews in Molecular Medicine* 14: e1.
- [163] **Thirone A. C. P., Huang C., Klip A.** (2006): *Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport.* *Trends in Endocrinology and Metabolism* 17 (2): 72-78.
- [164] **Karin M., Liu Z. g., Zandi E.** (1997): *AP-1 function and regulation.* *Current Opinion in Cell Biology* 9 (2): 240-46.

- [165] **Bai D., Ueno L., Vogt P. K.** (2009): *Akt-mediated regulation of NFkappaB and the essentialness of NFkappaB for the oncogenicity of PI3K and Akt.* International Journal of Cancer 125 (12): 2863-70.
- [166] **Schwartz E. A., Zhang W.-Y., Karnik S. K., Borwege S., Anand V. R., Laine P. S., Su Y., Reaven P. D.** (2010): *Nutrient modification of the innate immune response: a novel mechanism by which saturated fatty acids greatly amplify monocyte inflammation.* Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 30 (4): 802-08.
- [167] **Birkenfeld A. L., Shulman G. I.** (2014): *Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 diabetes.* Hepatology 59 (2): 713-23.
- [168] **Fayyaz S., Henkel J., Japtok L., Krämer S., Damm G., Seehofer D., Püschel G. P., Kleuser B.** (2014): *Involvement of sphingosine 1-phosphate in palmitate-induced insulin resistance of hepatocytes via the S1P2 receptor subtype.* Diabetologia 57 (2): 373-82.
- [169] **Le Roith D., Zick Y.** (2001): *Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance.* Diabetes Care 24 (3): 588-97.
- [170] **Senn J. J., Klover P. J., Nowak I. A., Zimmers T. A., Koniaris L. G., Furlanetto R. W., Mooney R. A.** (2003): *Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes.* Journal of Biological Chemistry 278 (16): 13740-46.
- [171] **Aguirre V., Uchida T., Yenush L., Davis R., White M. F.** (2000): *The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307).* Journal of Biological Chemistry 275 (12): 9047-54.
- [172] **Jager J., Grémeaux T., Cormont M., Le Marchand-Brustel Y., Tanti J.-F.** (2007): *Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression.* Endocrinology 148 (1): 241-51.
- [173] **Gao D., Madi M., Ding C., Fok M., Steele T., Ford C., Hunter L., Bing C.** (2014): *Interleukin-1β mediates macrophage-induced impairment of insulin signaling in human primary adipocytes.* American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism 307 (3): E289-304.
- [174] **Hauner H., Petruschke T., Russ M., Röhrig K., Eckel J.** (1995): *Effects of tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) on glucose transport and lipid metabolism of newly-differentiated human fat cells in cell culture.* Diabetologia 38 (7): 764-71.
- [175] **Rotter V., Nagaev I., Smith U.** (2003): *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.* Journal of Biological Chemistry 278 (46): 45777-84.
- [176] **Stephens J. M., Lee J., Pilch P. F.** (1997): *Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction.* Journal of Biological Chemistry 272 (2): 971-76.
- [177] **Ceddia R. B., Somwar R., Maida A., Fang X., Bikopoulos G., Sweeney G.** (2005): *Globular adiponectin increases GLUT4 translocation and glucose uptake but reduces glycogen synthesis in rat skeletal muscle cells.* Diabetologia 48 (1): 132-39.
- [178] **Yamauchi T., Kamon J., Ito Y., Tsuchida A., Yokomizo T., Kita S., Sugiyama T., Miyagishi M., Hara K., Tsunoda M., Murakami K., Ohteki T., Uchida S., Takekawa S., Waki H., Tsuno N. H., Shibata Y., Terauchi Y., Froguel P., Tobe K., Koyasu S., Taira K., Kitamura T., Shimizu T., Nagai R., Kadowaki T.** (2003): *Cloning of adiponectin receptors that mediate anti-diabetic metabolic effects.* Nature 423 (6941): 762-69.
- [179] **Tomas E., Tsao T.-S., Saha A. K., Murrey H. E., Zhang Cc C. c., Itani S. I., Lodish H. F., Ruderman N. B.** (2002): *Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain - Acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99 (25): 16309-13.
- [180] **Maeda N., Shimomura I., Kishida K., Nishizawa H., Matsuda M., Nagaretani H., Furuyama N., Kondo H., Takahashi M., Arita Y., Komuro R., Ouchi N., Kihara S., Tochino Y., Okutomi K., Horie M., Takeda S., Aoyama T., Funahashi T., Matsuzawa Y.** (2002): *Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30.* Nature Medicine 8 (7): 731-37.
- [181] **Shanik M. H., Xu Y., Skrha J., Dankner R., Zick Y., Roth J.** (2008): *Insulin resistance and hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse?* Diabetes Care 31 (Suppl 2): S262-68.
- [182] **Laat M. A. de, McGowan C. M., Sillence M. N., Pollitt C. C.** (2010): *Equine laminitis: induced by 48 h hyperinsulinaemia in Standardbred horses.* Equine Veterinary Journal 42 (2): 129-35.

- [183] **Suagee J. K., Corl B. A., Crisman M. V., Hulver M. W., McCutcheon L. J., Geor R. J.** (2011): *Effects of acute hyperinsulinemia on inflammatory proteins in horses*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 142 (3-4): 141-46.
- [184] **Asplin K. E., Sillence M. N., Pollitt C. C., McGowan C. M.** (2007): *Induction of laminitis by prolonged hyperinsulinaemia in clinically normal ponies*. *Veterinary Journal* 174 (3): 530-35.
- [185] **Ruge T., Lockton J. A., Renstrom F., Lystig T., Sukonina V., Svensson M. K., Eriksson J. W.** (2009): *Acute hyperinsulinemia raises plasma interleukin-6 in both nondiabetic and type 2 diabetes mellitus subjects, and this effect is inversely associated with body mass index*. *Metabolism: Clinical and Experimental* 58 (6): 860-66.
- [186] **Siklova-Vitkova M., Polak J., Klimcakova E., Vrzalova J., Hejnova J., Kovacikova M., Kovacova Z., Bajzova M., Rossmeislova L., Hnevkovska Z., Langin D., Stich V.** (2009): *Effect of hyperinsulinemia and very-low-calorie diet on interstitial cytokine levels in subcutaneous adipose tissue of obese women*. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 297 (5): E1154-61.
- [187] **Krogh-Madsen R., Plomgaard P., Keller P., Keller C., Pedersen B. K.** (2004): *Insulin stimulates interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha gene expression in human subcutaneous adipose tissue*. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 286 (2): E234-38.
- [188] **Soop M., Duxbury H., Agwunobi A. O., Gibson J. M., Hopkins S. J., Childs C., Cooper R. G., Maycock P., Little R. A., Carlson G. L.** (2002): *Euglycemic hyperinsulinemia augments the cytokine and endocrine responses to endotoxin in humans*. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 282 (6): E1276-85.
- [189] **Vicennati V., Vottero A., Friedman C., Papanicolaou D. A.** (2002): *Hormonal regulation of interleukin-6 production in human adipocytes*. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 26 (7): 905-11.
- [190] **Pedersen D. J., Guilherme A., Danai L. V., Heyda L., Matevossian A., Cohen J., Nicoloso S. M., Straubhaar J., Noh H. L., Jung D., Kim J. K., Czech M. P.** (2015): *A major role of insulin in promoting obesity-associated adipose tissue inflammation*. *Molecular Metabolism* 4 (7): 507-18.
- [191] **Jansen H. J., Stienstra R., van Diepen J. A., Hijmans A., van der Laak J. A., Vervoort G. M. M., Tack C. J.** (2013): *Start of insulin therapy in patients with type 2 diabetes mellitus promotes the influx of macrophages into subcutaneous adipose tissue*. *Diabetologia* 56 (12): 2573-81.
- [192] **Amano S. U., Cohen J. L., Vangala P., Tencerova M., Nicoloso S. M., Yawe J. C., Shen Y., Czech M. P., Aouadi M.** (2014): *Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation*. *Cell Metabolism* 19 (1): 162-71.
- [193] **Leffler M., Hrach T., Stuerzl M., Horch R. E., Herndon D. N., Jeschke M. G.** (2007): *Insulin attenuates apoptosis and exerts anti-inflammatory effects in endotoxemic human macrophages*. *Journal of Surgical Research* 143 (2): 398-406.
- [194] **Martins J. O., Ferracini M., Ravanelli N., Landgraf R. G., Jancar S.** (2008): *Insulin inhibits LPS-induced signaling pathways in alveolar macrophages*. *Cellular Physiology and Biochemistry* 21 (4): 297-304.
- [195] **Tessaro F. H. G., Ayala T. S., Nolasco E. L., Bella L. M., Martins J. O.** (2017): *Insulin Influences LPS-Induced TNF- α and IL-6 Release Through Distinct Pathways in Mouse Macrophages from Different Compartments*. *Cellular Physiology and Biochemistry* 42 (5): 2093-104.
- [196] **Tsiotra P. C., Boutati E., Dimitriadis G., Raptis S. A.** (2013): *High insulin and leptin increase resistin and inflammatory cytokine production from human mononuclear cells*. *BioMed Research International* 2013: 487081.
- [197] **Iida K. T., Shimano H., Kawakami Y., Sone H., Toyoshima H., Suzuki S., Asano T., Okuda Y., Yamada N.** (2001): *Insulin up-regulates tumor necrosis factor-alpha production in macrophages through an extracellular-regulated kinase-dependent pathway*. *Journal of Biological Chemistry* 276 (35): 32531-37.
- [198] **Pierre C., Guillebaud F., Airault C., Baril N., Barbouche R., Save E., Gaigé S., Bariohay B., Dallaporta M., Troadec J.-D.** (2018): *Invalidation of Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 (mPGES-1) Reduces Diet-Induced Low-Grade Inflammation and Adiposity*. *Frontiers in Physiology* 9: 1358.
- [199] **Meredith M. J.** (1988): *Rat hepatocytes prepared without collagenase: prolonged retention of differentiated characteristics in culture*. *Cell Biology and Toxicology* 4 (4): 405-25.
- [200] **Gaunitz F., Papke M., Gebhardt R.** (1996): *Transient transfection of primary cultured hepatocytes using CaPO₄/DNA precipitation*. *Biotechniques* 20 (5): 826-30, 832.

- [201] **Bradford M. M.** (1976): *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry 72: 248-54.
- [202] **Manowsky J., Camargo R. G., Kipp A. P., Henkel J., Püschel G. P.** (2016): *Insulin-induced cytokine production in macrophages causes insulin resistance in hepatocytes*. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism 310 (11): E938-46.
- [203] **Klauder J., Henkel J., Vahrenbrink M., Wohlenberg A.-S., Camargo R. G., Püschel G. P.** (2020): *Direct and indirect modulation of LPS-induced cytokine production by insulin in human macrophages*. Cytokine 136: 155241.
- [204] **Rosell M., Jones M. C., Parker M. G.** (2011): *Role of nuclear receptor corepressor RIP140 in metabolic syndrome*. Biochimica et Biophysica Acta 1812 (8): 919-28.
- [205] **Dudley D. T., Pang L., Decker S. J., Bridges A. J., Saltiel A. R.** (1995): *A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92 (17): 7686-89.
- [206] **Cheru L., Saylor C. F., Lo J.** (2019): *Gastrointestinal Barrier Breakdown and Adipose Tissue Inflammation*. Current Obesity Reports 8 (2): 165-74.
- [207] **Tremaroli V., Bäckhed F.** (2012): *Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism*. Nature 489 (7415): 242-49.
- [208] **Lambertz J., Weiskirchen S., Landert S., Weiskirchen R.** (2017): *Fructose: A Dietary Sugar in Crosstalk with Microbiota Contributing to the Development and Progression of Non-Alcoholic Liver Disease*. Frontiers in Immunology 8: 1159.
- [209] **Pendyala S., Walker J. M., Holt P. R.** (2012): *A high-fat diet is associated with endotoxemia that originates from the gut*. Gastroenterology 142 (5): 1100-1101.e2.
- [210] **Hien P., Böhm B.** (2007): *Diabetes-Handbuch - Eine Anleitung für Praxis und Klinik*, 3. Aufl. Dordrecht, Springer. ISBN: 978-3-540-48551-3.
- [211] **Neuman J. C., Kimple M. E.** (2013): *The EP3 Receptor: Exploring a New Target for Type 2 Diabetes Therapeutics*. Journal of Endocrinology, Diabetes & Obesity 1 (1): 1002.
- [212] **Henkel J., Neuschäfer-Rube F., Pathe-Neuschäfer-Rube A., Püschel G. P.** (2009): *Aggravation by prostaglandin E2 of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes*. Hepatology 50 (3): 781-90.
- [213] **Henkel J., Gärtner D., Dorn C., Hellerbrand C., Schanze N., Elz S. R., Püschel G. P.** (2011): *Oncostatin M produced in Kupffer cells in response to PGE2: possible contributor to hepatic insulin resistance and steatosis*. Laboratory Investigation 91 (7): 1107-17.
- [214] **Akaogi J., Yamada H., Kuroda Y., Nacionales D. C., Reeves W. H., Satoh M.** (2004): *Prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4 are up-regulated in peritoneal macrophages and joints of pristane-treated mice and modulate TNF-alpha and IL-6 production*. Journal of Leukocyte Biology 76 (1): 227-36.
- [215] **Takashima K., Matsunaga N., Yoshimatsu M., Hazeki K., Kaisho T., Uekata M., Hazeki O., Akira S., Iizawa Y., Ii M.** (2009): *Analysis of binding site for the novel small-molecule TLR4 signal transduction inhibitor TAK-242 and its therapeutic effect on mouse sepsis model*. British Journal of Pharmacology 157 (7): 1250-62.
- [216] **Ii M., Matsunaga N., Hazeki K., Nakamura K., Takashima K., Seya T., Hazeki O., Kitazaki T., Iizawa Y.** (2005): *A Novel Cyclohexene Derivative, Ethyl (6R)-6-[N-(2-Chloro-4-fluorophenyl)sulfamoyl]cyclohex-1-ene-1-carboxylate (TAK-242), Selectively Inhibits Toll-Like Receptor 4-Mediated Cytokine Production through Suppression of Intracellular Signaling*. Molecular Pharmacology 69 (4): 1288-95.
- [217] **Kawamoto T., Ii M., Kitazaki T., Iizawa Y., Kimura H.** (2008): *TAK-242 selectively suppresses Toll-like receptor 4-signaling mediated by the intracellular domain*. European Journal of Pharmacology 584 (1): 40-48.
- [218] **Schilling J. D., Machkovech H. M., He L., Sidhu R., Fujiwara H., Weber K., Ory D. S., Schaffer J. E.** (2013): *Palmitate and lipopolysaccharide trigger synergistic ceramide production in primary macrophages*. Journal of Biological Chemistry 288 (5): 2923-32.
- [219] **Costa Rosa L. F., Safi D. A., Cury Y., Curi R.** (1996): *The effect of insulin on macrophage metabolism and function*. Cell Biochemistry and Function 14 (1): 33-42.
- [220] **Liang C.-P., Han S., Okamoto H., Carnemolla R., Tabas I., Accili D., Tall A. R.** (2004): *Increased CD36 protein as a response to defective insulin signaling in macrophages*. Journal of Clinical Investigation 113 (5): 764-73.
- [221] **Lindgaard B., Matthews V. B., Brandt C., Hojman P., Allen T. L., Estevez E., Watt M. J., Bruce C. R., Mortensen O. H., Syberg S., Rudnicka C., Abildgaard J., Pilegaard H., Hidalgo J., Ditlevsen S., Alsted T. J., Madsen A. N., Pedersen B. K., Febbraio M. A.** (2013): *Interleukin-18 activates skeletal muscle AMPK and reduces weight gain and insulin resistance in mice*. Diabetes 62 (9): 3064-74.

- [222] **Gao D., Pararasa C., Dunston C. R., Bailey C. J., Griffiths H. R.** (2012): *Palmitate promotes monocyte atherogenicity via de novo ceramide synthesis*. *Free Radical Biology & Medicine* 53 (4): 796-806.
- [223] **Sundström C., Nilsson K.** (1976): *Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937)*. *International Journal of Cancer* 17 (5): 565-77.
- [224] **Tsuchiya S., Yamabe M., Yamaguchi Y., Kobayashi Y., Konno T., Tada K.** (1980): *Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)*. *International Journal of Cancer* 26 (2): 171-76.
- [225] **Jeschke M. G., Klein D., Bolder U., Einspanier R.** (2004): *Insulin attenuates the systemic inflammatory response in endotoxemic rats*. *Endocrinology* 145 (9): 4084-93.
- [226] **Dandona P.** (2001): *Insulin inhibits intranuclear Nuclear Factor B and stimulates IκB in mononuclear cells in obese subjects: evidence for an anti-inflammatory effect?* *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86 (7): 3257-65.
- [227] **Baumgartl J., Baudler S., Scherner M., Babaev V., Makowski L., Suttles J., McDuffie M., Tobe K., Kadowaki T., Fazio S., Kahn C. R., Hotamisligil G. S., Krone W., Linton M., Brüning J. C.** (2006): *Myeloid lineage cell-restricted insulin resistance protects apolipoprotein E-deficient mice against atherosclerosis*. *Cell Metabolism* 3 (4): 247-56.
- [228] **Ouyang X., Ghani A., Malik A., Wilder T., Colegio O. R., Flavell R. A., Cronstein B. N., Mehal W. Z.** (2013): *Adenosine is required for sustained inflammasome activation via the A_{2A} receptor and the HIF-1α pathway*. *Nature Communications* 4: 2909.
- [229] **Zhang W., Petrovic J. M., Callaghan D., Jones A., Cui H., Howlett C., Stanimirovic D.** (2006): *Evidence that hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) mediates transcriptional activation of interleukin-1β (IL-1β) in astrocyte cultures*. *Journal of Neuroimmunology* 174 (1-2): 63-73.
- [230] **Talreja J., Talwar H., Bauerfeld C., Grossman L. I., Zhang K., Tranchida P., Samavati L.** (2019): *HIF-1α regulates IL-1β and IL-17 in sarcoidosis*. *eLife* 8: e44519.
- [231] **Mehal W. Z.** (2014): *The inflammasome in liver injury and non-alcoholic fatty liver disease*. *Digestive Diseases* 32 (5): 507-15.
- [232] **Mauer J., Chaurasia B., Plum L., Quast T., Hampel B., Blüher M., Kolanus W., Kahn C. R., Brüning J. C.** (2010): *Myeloid cell-restricted insulin receptor deficiency protects against obesity-induced inflammation and systemic insulin resistance*. *PLoS Genetics* 6 (5): e1000938.
- [233] **Rizza R. A., Mandarino L. J., Genest J., Baker B. A., Gerich J. E.** (1985): *Production of insulin resistance by hyperinsulinaemia in man*. *Diabetologia* 28 (2): 70-75.
- [234] **Nov O., Kohl A., Lewis E. C., Bashan N., Dvir I., Ben-Shlomo S., Fishman S., Wueest S., Konrad D., Rudich A.** (2010): *Interleukin-1β may mediate insulin resistance in liver-derived cells in response to adipocyte inflammation*. *Endocrinology* 151 (9): 4247-56.
- [235] **Wen H., Gris D., Lei Y., Jha S., Zhang L., Huang M. T.-H., Brickey W. J., Ting J. P.-Y.** (2011): *Fatty acid-induced NLRP3-PYCARD inflammasome activation interferes with insulin signaling*. *Nature Immunology* 12 (5): 408-15.
- [236] **Kolodziejczyk A. A., Zheng D., Elinav E.** (2019): *Diet-microbiota interactions and personalized nutrition*. *Nature Reviews Microbiology* 17 (12): 742-53.
- [237] **Wan Y., Wang F., Yuan J., Li J., Jiang D., Zhang J., Li H., Wang R., Tang J., Huang T., Zheng J., Sinclair A. J., Mann J., Li D.** (2019): *Effects of dietary fat on gut microbiota and faecal metabolites, and their relationship with cardiometabolic risk factors: a 6-month randomised controlled-feeding trial*. *Gut* 68 (8): 1417-29.
- [238] **Gurung M., Li Z., You H., Rodrigues R., Jump D. B., Morgun A., Shulzhenko N.** (2020): *Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology*. *EBioMedicine* 51: 102590.
- [239] **Madacki-Todorović K., Eminović I., Ibrišimović Mehmedinović N., Ibrišimović, M.** (2018): *Insulin Acts as Stimulatory Agent in Diabetes-Related Escherichia Coli Pathogenesis*, *International Journal of Diabetes and Clinical Research* 5 (4): 5:098.
- [240] **Al-Sadi R., Guo S., Ye D., Rawat M., Ma T. Y.** (2016): *TNF-α Modulation of Intestinal Tight Junction Permeability Is Mediated by NIK/IKK-α Axis Activation of the Canonical NF-κB Pathway*. *The American Journal of Pathology* 186 (5): 1151-65.
- [241] **Klosowska K., Plotkin B. J.** (2006): *Human Insulin Modulation of Escherichia coli Adherence and Chemotaxis*. *American Journal of Infectious Diseases* 2 (4): 197-200.
- [242] **Plotkin B. J., Wu Z., Ward K., Nadella S., Green J. M., Rumnani B.** (2014): *Effect of Human Insulin on the Formation of Catheter-Associated E. coli Biofilms*. *Open Journal of Urology* 04 (05): 49-56.
- [243] **Woting A., Pfeiffer N., Loh G., Klaus S., Blaut M.** (2014): *Clostridium ramosum promotes high-fat diet-induced obesity in gnotobiotic mouse models*. *mBio* 5 (5): e01530-14.

- [244] Mandić A. D., Woting A., Jaenicke T., Sander A., Sabrowski W., Rolle-Kampczyk U., von Bergen M., Blaut M. (2019): *Clostridium ramosum* regulates enterochromaffin cell development and serotonin release. *Scientific Reports* 9 (1): 1177.
- [245] Weigert C., Brodbeck K., Staiger H., Kausch C., Machicao F., Häring H. U., Schleicher E. D. (2004): Palmitate, but not unsaturated fatty acids, induces the expression of interleukin-6 in human myotubes through proteasome-dependent activation of nuclear factor-kappaB. *Journal of Biological Chemistry* 279 (23): 23942-52.
- [246] Ajuwon K. M., Spurlock M. E. (2005): Palmitate activates the NF-kappaB transcription factor and induces IL-6 and TNFalpha expression in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Nutrition* 135 (8): 1841-46.
- [247] Cullberg K. B., Larsen J. Ø., Pedersen S. B., Richelsen B. (2014): Effects of LPS and dietary free fatty acids on MCP-1 in 3T3-L1 adipocytes and macrophages in vitro. *Nutrition & Diabetes* 4: e113.
- [248] Tashiro H., Takahashi K., Sadamatsu H., Kato G., Kurata K., Kimura S., Sueoka-Aragane N. (2017): Saturated Fatty Acid Increases Lung Macrophages and Augments House Dust Mite-Induced Airway Inflammation in Mice Fed with High-Fat Diet. *Inflammation* 40 (3): 1072-86.
- [249] Inoue H., Shirakawa J., Togashi Y., Tajima K., Okuyama T., Kyohara M., Tanaka Y., Orime K., Saisho Y., Yamada T., Shibue K., Kulkarni R. N., Terauchi Y. (2018): Signaling between pancreatic β cells and macrophages via S100 calcium-binding protein A8 exacerbates β -cell apoptosis and islet inflammation. *Journal of Biological Chemistry* 293 (16): 5934-46.
- [250] Snodgrass R. G., Huang S., Choi I.-W., Rutledge J. C., Hwang D. H. (2013): Inflammation-mediated secretion of IL-1 β in human monocytes through TLR2 activation; modulation by dietary fatty acids. *Journal of Immunology* 191 (8): 4337-47.
- [251] Liu S. P., Li X. Y., Li Z., He L. N., Xiao Y., Yan K., Zhou Z. G. (2012): Octanoylated Ghrelin Inhibits the Activation of the Palmitic Acid-Induced TLR4/NF- κ B Signaling Pathway in THP-1 Macrophages. *ISRN Endocrinology* 2012: 237613.
- [252] Jin J., Lu Z., Li Y., Ru J. H., Lopes-Virella M. F., Huang Y. (2018): LPS and palmitate synergistically stimulate sphingosine kinase 1 and increase sphingosine 1 phosphate in RAW264.7 macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* 104 (4): 843-53.
- [253] Ann S.-J., Kim K.-K., Cheon E. J., Noh H.-M., Hwang I., Yu J.-W., Park S., Kang S.-M., Manabe I., Miller Y. I., Kim S., Lee S.-H. (2018): Palmitate and minimally-modified low-density lipoprotein cooperatively promote inflammatory responses in macrophages. *PLOS ONE* 13 (3): e0193649.
- [254] Erridge C., Samani N. J. (2009): Saturated fatty acids do not directly stimulate Toll-like receptor signaling. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29 (11): 1944-49.
- [255] Robblee M. M., Kim C. C., Porter Abate J., Valdearcos M., Sandlund K. L. M., Shenoy M. K., Volmer R., Iwawaki T., Koliwad S. K. (2016): Saturated Fatty Acids Engage an IRE1 α -Dependent Pathway to Activate the NLRP3 Inflammasome in Myeloid Cells. *Cell Reports* 14 (11): 2611-23.
- [256] Pal D., Dasgupta S., Kundu R., Maitra S., Das G., Mukhopadhyay S., Ray S., Majumdar S. S., Bhattacharya S. (2012): Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nature Medicine* 18 (8): 1279-85.
- [257] Ciapaite J., Bakker S. J. L., Diamant M., van Eikenhorst G., Heine R. J., Westerhoff H. V., Krab K. (2006): Metabolic control of mitochondrial properties by adenine nucleotide translocator determines palmitoyl-CoA effects. Implications for a mechanism linking obesity and type 2 diabetes. *The FEBS Journal* 273 (23): 5288-302.
- [258] Morgan M. J., Liu Z.-g. (2010): Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Research* 21 (1): 103-15.
- [259] Huynh K., Pernes G., Mellett N. A., Meikle P. J., Murphy A. J., Lancaster G. I. (2018): Lipidomic Profiling of Murine Macrophages Treated with Fatty Acids of Varying Chain Length and Saturation Status. *Metabolites* 8 (2): 29.
- [260] Shatrov V. A., Lehmann V., Chouaib S. (1997): Sphingosine-1-phosphate mobilizes intracellular calcium and activates transcription factor NF-kappa B in U937 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 234 (1): 121-24.
- [261] Henkel J., Coleman C. D., Schraplau A., Jöhrens K., Weiss T. S., Jonas W., Schürmann A., Püschel G. P. (2018): Augmented liver inflammation in a microsomal prostaglandin E synthase 1 (mPGES-1)-deficient diet-induced mouse NASH model. *Scientific Reports* 8 (1): 16127.

- [262] **Choi S. S., Gatanaga M., Granger G. A., Gatanaga T.** (1996): *Prostaglandin-E2 regulation of tumor necrosis factor receptor release in human monocytic THP-1 cells.* Cellular Immunology 170 (2): 178-84.
- [263] **Baker B. J., Park K. W., Qin H., Ma X., Benveniste E. N.** (2010): *IL-27 inhibits OSM-mediated TNF-alpha and iNOS gene expression in microglia.* GLIA 58 (9): 1082-93.
- [264] **Goss J. A., Mangino M. J., Callery M. P., Flye M. W.** (1993): *Prostaglandin E2 downregulates Kupffer cell production of IL-1 and IL-6 during hepatic regeneration.* The American Journal of Physiology 264 (4 Pt 1): G601-08.
- [265] **Callery M. P., Mangino M. J., Kamei T., Flye M. W.** (1990): *Interleukin-6 production by endotoxin-stimulated Kupffer cells is regulated by prostaglandin E2.* Journal of Surgical Research 48 (6): 523-27.
- [266] **Repovic P., Benveniste E. N.** (2002): *Prostaglandin E 2 Is a Novel Inducer of Oncostatin-M Expression in Macrophages and Microglia.* Journal of Neuroscience 22 (13): 5334-43.
- [267] **Hinson R. M., Williams J. A., Shacter E.** (1996): *Elevated interleukin 6 is induced by prostaglandin E2 in a murine model of inflammation: possible role of cyclooxygenase-2.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93 (10): 4885-90.
- [268] **Portanova J. P., Zhang Y., Anderson G. D., Hauser S. D., Masferrer J. L., Seibert K., Gregory S. A., Isakson P. C.** (1996): *Selective neutralization of prostaglandin E2 blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo.* Journal of Experimental Medicine 184 (3): 883-91.
- [269] **Fenekohl A., Lucas M., Püschel G. P.** (2000): *Induction by interleukin 6 of G(s)-coupled prostaglandin E(2) receptors in rat hepatocytes mediating a prostaglandin E(2)-dependent inhibition of the hepatocyte's acute phase response.* Hepatology 31 (5): 1128-34.
- [270] **Arakawa T., Laneuville O., Miller C. A., Lakkides K. M., Wingerd B. A., DeWitt D. L., Smith W. L.** (1996): *Prostanoid receptors of murine NIH 3T3 and RAW 264.7 cells. Structure and expression of the murine prostaglandin EP4 receptor gene.* Journal of Biological Chemistry 271 (47): 29569-75.
- [271] **Hubbard N. E., Lee S., Lim D., Erickson K. L.** (2001): *Differential mRNA expression of prostaglandin receptor subtypes in macrophage activation.* Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids 65 (5-6): 287-94.
- [272] **Hurme M.** (1990): *Modulation of interleukin-1 beta production by cyclic AMP in human monocytes.* FEBS Letters 263 (1): 35-37.
- [273] **Yasui M., Tamura Y., Minami M., Higuchi S., Fujikawa R., Ikedo T., Nagata M., Arai H., Murayama T., Yokode M.** (2015): *The Prostaglandin E2 Receptor EP4 Regulates Obesity-Related Inflammation and Insulin Sensitivity.* PLOS ONE 10 (8): e0136304.
- [274] **Nataraj C., Thomas D. W., Tilley S. L., Nguyen M. T., Mannon R., Koller B. H., Coffman T. M.** (2001): *Receptors for prostaglandin E(2) that regulate cellular immune responses in the mouse.* Journal of Clinical Investigation 108 (8): 1229-35.
- [275] **Rae M. G., Rotondo D., Dutta-Roy A. K.** (1992): *Regulation of prostaglandin E2 binding to a murine macrophage cell line, P388D1, by insulin.* Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research 1135 (3): 343-48.
- [276] **Hwang D.** (2001): *Modulation of the expression of cyclooxygenase-2 by fatty acids mediated through toll-like receptor 4-derived signaling pathways.* FASEB Journal 15 (14): 2556-64.
- [277] **Lin A., Wang G., Zhao H., Zhang Y., Han Q., Zhang C., Tian Z., Zhang J.** (2015): *TLR4 signaling promotes a COX-2/PGE2/STAT3 positive feedback loop in hepatocellular carcinoma (HCC) cells.* Oncoimmunology 5 (2): e1074376.
- [278] **Steffen L. M., Vessby B., Jacobs D. R., Steinberger J., Moran A., Hong C.-P., Sinaiko A. R.** (2008): *Serum phospholipid and cholesteryl ester fatty acids and estimated desaturase activities are related to overweight and cardiovascular risk factors in adolescents.* International Journal of Obesity 32 (8): 1297-304.
- [279] **Warensjö E., Rosell M., Hellenius M.-L., Vessby B., Faire U. de, Risérus U.** (2009): *Associations between estimated fatty acid desaturase activities in serum lipids and adipose tissue in humans: links to obesity and insulin resistance.* Lipids in Health and Disease 8: 37.
- [280] **Saito E., Okada T., Abe Y., Odaka M., Kuromori Y., Iwata F., Hara M., Mugishima H., Kitamura Y.** (2013): *Abdominal adiposity is associated with fatty acid desaturase activity in boys: implications for C-reactive protein and insulin resistance.* Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids 88 (4): 307-11.
- [281] **Kröger J., Zietemann V., Enzenbach C., Weikert C., Jansen E. H., Döring F., Joost H.-G., Boeing H., Schulze M. B.** (2011): *Erythrocyte membrane phospholipid fatty acids, desaturase activity, and dietary fatty acids in relation to risk of type 2 diabetes in the European Prospective*

- Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study*. The American Journal of Clinical Nutrition 93 (1): 127-42.
- [282] **Warensjö E., Ohrvall M., Vessby B.** (2006): *Fatty acid composition and estimated desaturase activities are associated with obesity and lifestyle variables in men and women*. Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases 16 (2): 128-36.
- [283] **Arbo I., Halle C., Malik D., Brattbakk H.-R., Johansen B.** (2011): *Insulin induces fatty acid desaturase expression in human monocytes*. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation 71 (4): 330-39.
- [284] **Shanmugam N., Gaw Gonzalo I. T., Natarajan R.** (2004): *Molecular mechanisms of high glucose-induced cyclooxygenase-2 expression in monocytes*. Diabetes 53 (3): 795-802.
- [285] **Li X., Jiang P., Yu H., Yang Y., Xia L., Yang R., Fang X., Zhao Z.** (2019): *miR-21-3p Targets Elov15 and Regulates Triglyceride Production in Mammary Epithelial Cells of Cow*. DNA and Cell Biology 38 (4): 352-57.
- [286] **Karim S., Berrou E., Lévy-Toledano S., Bryckaert M., MacLouf J.** (1997): *Regulatory role of prostaglandin E2 in induction of cyclo-oxygenase-2 by a thromboxane A2 analogue (U46619) and basic fibroblast growth factor in porcine aortic smooth-muscle cells*. The Biochemical Journal 326 (Pt 2): 593-99.
- [287] **Vlahos R., Stewart A. G.** (1999): *Interleukin-1alpha and tumour necrosis factor-alpha modulate airway smooth muscle DNA synthesis by induction of cyclo-oxygenase-2: inhibition by dexamethasone and fluticasone propionate*. British Journal of Pharmacology 126 (6): 1315-24.
- [288] **Ahmad R., Al-Roub A., Kochumon S., Akther N., Thomas R., Kumari M., Koshy M. S., Tiss A., Hannun Y. A., Tuomilehto J., Sindhu S., Rosen E. D.** (2018): *The Synergy between Palmitate and TNF- α for CCL2 Production Is Dependent on the TRIF/IRF3 Pathway: Implications for Metabolic Inflammation*. Journal of Immunology 200 (10): 3599-611.
- [289] **Henkel J.** (2010): *Modulation der Insulin-abhängigen Regulation des hepatischen Glucose- und Lipidmetabolismus durch Prostaglandin E2*. Dissertation, Universität Potsdam.
- [290] **Lieske S.** (2015): *Regulation des mIndy-Gens durch Interleukin-6, Oncostatin M und Glucagon und die physiologischen Konsequenzen im Lipidstoffwechsel primärer Hepatozyten*. Dissertation, Universität Potsdam.
- [291] **Schraplau A.** (2017): *Regulation der Expression von Xenobiotika-metabolisierenden Enzymen und Deiodasen durch die Xenobiotika-abhängige wechselseitige Induktion von Xenosensor-Transkriptionsfaktoren und Prostaglandin E2 - Auswirkung auf die Aktivierung und Inaktivierung von Schilddrüsenhormonen*. Dissertation, Universität Potsdam.
- [292] **Maschirow L.** (2013): *Makrophagenaktivierung durch Zellwandbestandteile unterschiedlicher Spezies intestinaler Bakterien*. Bachelorarbeit, Universität Potsdam.
- [293] **Pfaffl M. W.** (2004): *Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung*. BIOSpektrum (1/04): 92-95.
- [294] **Tichopad A., Dilger M., Schwarz G., Pfaffl M. W.** (2003): *Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up*. Nucleic Acids Research 31 (20): 122e.
- [295] **Henkel J., Klauder J., Statz M., Wohlenberg A.-S., Kuipers S., Vahrenbrink M., Püschel P.** (2021): *Enhanced Palmitate-Induced Interleukin-8 Formation in Human Macrophages by Insulin or Prostaglandin E2*. Biomedicine 9 (5): 449.

6 Anhang zu 2: Methodenübersicht

Einige Abschnitte der Material- und Methodenbeschreibung wurden, in Teilen wörtlich, den Dissertationen von Janin Henkel [289], Stefanie Lieske [290] und Anne Schraplau [291] entnommen.

6.1 Material

6.1.1 Tiere und Tierhaltung

Für die Isolierung primärer Hepatozyten wurden 250–300 g schwere männliche Ratten des Stammes Wistar-Unilever aus der Zucht von Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) verwendet. Haltung und Pflege der Ratten erfolgte im Max-Rubner-Laboratorium des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung (DIfE), Potsdam-Rehbrücke. Die Tiere wurden unter kontrollierten Bedingungen in einem 12-stündigen Hell-/Dunkel-Rhythmus (6-18 Uhr Hellphase), bei einer Raumtemperatur von 22 ± 1 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 % gehalten. Sie erhielten freien Zugang zu Wasser und wurden mit dem Alleinfuttermittel für die Haltung von Ratten und Mäusen „ssniff® R/M-H“ der Firma ssniff Spezialdiäten GmbH *ad libitum* ernährt.

6.1.2 Biochemikalien

17-phenyl trinor Prostaglandin E ₂ (EP-1/3-Rezeptor-Agonist)	Cayman Chemical	Ann Arbor, Michigan, USA
19(R)-HydroxyProstaglandin E ₂ (EP2-Rezeptor-Agonist)	Cayman Chemical	Ann Arbor, Michigan, USA
25-Hydroxycholesterol	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
6 x Orange Loading Dye	Thermo Scientific	Darmstadt
Aceton	Roth	Karlsruhe
Acrylamid (Rotiphorese® Gel 30)	Roth	Karlsruhe
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth	Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Enzo Life Science GmbH	Lörrach
ATP	Roth	Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth	Karlsruhe
Bromphenolblau-Natriumsalz	Roth	Karlsruhe
Calciumchlorid-2-hydrat	Merck	Darmstadt
Carbogen [95 % O ₂ , 5 % CO ₂]	Air Liquide / PraxAir	Berlin
CAY10598 (EP4-Rezeptor-Agonist)	Cayman Chemical	Ann Arbor, Michigan, USA
Chloroform	Roth	Karlsruhe
D(+)-Glukose Monohydrat	Roth	Karlsruhe
Dexamethason-21-Acetat	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth	Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Dithiotreitol (DTT)	Roth	Karlsruhe
D-Luciferin-Natrium-Salz	PJK GmbH	Kleinblittersdorf
dNTP-Set	Thermo Scientific	Darmstadt
Essigsäure (100 %, p.a.)	Roth	Karlsruhe
Ethanol (reinst oder vergällt)	Roth	Karlsruhe
Ethidiumbromid-Lösung	Roth	Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth	Karlsruhe
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Roth	Karlsruhe
Fettfreies bovines Serumalbumin (Fettfreies BSA)	Roth	Karlsruhe

Ficoll-Paque Plus (Dichte: 1,077 g/mL)	GE Healthcare	Chicago, Illinois, USA
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom AG	Berlin
Glycerol	Roth	Karlsruhe
Glycin	Roth	Karlsruhe
Glycylglycin	Roth	Karlsruhe
Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) GSK1838705	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Hydroxyethylpiperazinylethansulfonat (HEPES)	Roth	Karlsruhe
Insulin	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Interleukin-1 β (IL-1 β)	GBF	Braunschweig
Interleukin-6 (IL-6)	R&D Systems	Wiesbaden
Isopropanol (2-Propanol)	Roth	Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth	Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	Darmstadt
L-Analyt-L-Glutamin	Biochrom AG	Berlin
Leupeptin	Enzo Life Science GmbH	Lörrach
LPS von <i>Escherichia coli</i> Serotype 0127:B8	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Magermilchpulver	Sucofin	Zeven
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Roth	Karlsruhe
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Roth	Karlsruhe
Methanol	Roth	Karlsruhe
Narcoren (Wirkstoff Pentobarbital-Natrium, 16,0 g in 100 ml)	Merial GmbH	Hallbergmoos
Natriumacetat	Fluka / Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Natriumchlorid	Roth	Karlsruhe
Natriumcitrat-Dihydrat	Fisher Scientific	Schwerte
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth	Karlsruhe
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Natriumhydrogencarbonat	Roth	Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth	Karlsruhe
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Neonatales Kälberserum (NCS)	Biochrom AG	Berlin
Oncostatin M	Miltenyi Biotec Inc.	Bergisch-Gladbach
ONO AE3-208 (EP4-Rezeptor-Antagonist)	Cayman Chemical	Ann Arbor, Michigan, USA
o-Phosphorsäure (85 % (v/v))	Roth	Karlsruhe
Palmitinsäure	Roth	Karlsruhe
PD98059 (2'-Amino-3'-Methoxy-Flavon)	Enzo Life Science GmbH	Lörrach
Pefablock	Enzo Life Science GmbH	Lörrach
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG	Berlin
PF-04418948 (EP2-Rezeptor-Antagonist)	Cayman Chemical	Ann Arbor, Michigan, USA
Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Ponceau S	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Primer poly d(T)12-18	Roth	Karlsruhe
Prostaglandin E2 (PGE ₂)	Enzo Life Science GmbH	Lörrach
RiboLock™ RNAse Inhibitor	MBI Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
Salzsäure (37 % (v/v))	Roth	Karlsruhe

Serva Blue G (Nr.35050)	Serva	Heidelberg
Stickstoff, flüssig	Air Liquide	Berlin
Stickstoff, flüssig	PraxAir	Berlin
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth	Karlsruhe
TPCA-1	Selleck Chemicals	München
Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris)	Roth	Karlsruhe
Triton® X-100	Roth	Karlsruhe
Trypsin-Inhibitor	Enzo Life Science GmbH	Lörrach
Tween® 20	Roth	Karlsruhe
VLE (<i>very low endotoxin</i>) fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG	Berlin
β-Mercaptoethanol	Roth	Karlsruhe

6.1.3 Verbrauchsmaterialien

75 cm ² -Zellkulturflaschen	Sarstedt / Greiner Bio-One	Nümbrecht / Nürtlingen
Vasofix® Safety G 18 (1,3 x 45 mM), (Sicherheitsvenenverweilkanüle)	Braun	Melsungen
Combitips plus, 50 ml	Eppendorf	Hamburg
Deckgläschen (12 mm)	Roth	Karlsruhe
Einmal-Injektions-Kanülen (Sterican®), (24G, 0,55 x 5 mM)	Braun	Melsungen
Einmal-Nitril-Untersuchungshandschuhe	Microflex	Reno, USA
Einmal-Spritzen: 1 ml, 5 ml bzw. 10 ml	Braun	Melsungen
Einmal-Spritzenfilter (CA-Membran, 0,2 µm bzw. 0,45 µm)	Heinemann Labortechnik	Duderstadt
Gel Blotting-Papiere	Roth	Karlsruhe
Kryoröhrchen	Sarstedt	Nümbrecht
Mikrotiterplatten (96 well, Polystyrol, Flachboden): transparent, schwarz bzw. weiß	Greiner Bio-One	Nürtlingen
Multiplate® PCR Plates™ (Low 96 well clear)	Bio-Rad	München
Parafilm®	American National Can™	Menasha, USA
Pasteurpipetten	Roth	Karlsruhe
PCR Sealers™ Microseal® ,B' Film	Bio-Rad	München
Petrischale, 94 x 16 mM	Greiner-Bio-One	Nürtlingen
Pipettenspitzen: 10 µl bzw. 1.000 µl	Roth	Karlsruhe
Pipettenspitzen (200 µl)	Sarstedt	Nümbrecht
Polypropylenröhrchen, steril: 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One	Nürtlingen
Polysterolröhrchen, steril: 15 ml)	Greiner Bio-One	Nürtlingen
Reaktionsgefäß: 0,2 ml, 0,5 ml, bzw. 1,5 ml	Sarstedt	Nümbrecht
Reaktionsgefäß (2 ml)	Roth	Karlsruhe
Roti®-PVDF (Polyvenylidendifluorid)- Membran	Roth	Karlsruhe
Serologische Pipette (10 ml, 25 ml)	Sarstedt	Nümbrecht
Zell- und Gewebekulturschalen, 35x10 mM	Greiner Bio-One	Nürtlingen
Zell- und Gewebekulturschalen, 35x10 mM	Sarstedt	Nümbrecht
Zell- und Gewebekulturschalen, 35x10 mM	Nunc™	Roskilde, Dänemark
Zellschaber 25 cm	Sarstedt	Nümbrecht
Primaria™ Zellkulturplatten, 6 well	Corning	Corning, New York, USA

Vacutainer-Röhrchen mit 17 IU/ml Heparin BD Heidelberg

6.1.4 Geräte und Software

Automatische Pipettierhilfe Gilson Pipetman: Typ P10, P20, P200 bzw. P1000	Gilson	Middleton, USA
Automatische Pipettierhilfe Pipet Aid XP	Drummond	Broomall, USA
Automatische Pipettierhilfe, Finnpipette®	ThermoLabsystems	Frankfurt am Main
Begasungsbrutschrank Innova-Co-14	New Brunswick Scientific	Edison, USA
Begasungsbrutschrank NuAire IR Autoflow	Zapf Instruments	Sarstedt
Brutschrank	Memmert	Schwabach
Casy®1	innovatis AG	Reutlingen
CFX96TM Real-Time System	Bio-Rad	München
C1000TM Thermal Cycler		
CFX-Manager (Software)		
ChemiDocTM MP Imaging System	Bio-Rad	München
Dampfsterilisator Varioklav	H+P Labortechnik GmbH	Oberschleißheim
Eismaschine	Ziegra	Isernhagen
Elektrophorese-System Mini-Protean® Tetra	Bio-Rad	München
Flachbett-Elektrophoresekammer	Biometra	Göttingen
FLUOstar Omega	BMGLabtec	Ortenberg
Fluostar Optima + Software	BMG	Offenburg
GelDoc EZ Gel Documentation System	Bio-Rad	München
GraphPad Prism Version 8 für Windows	GraphPad Software	La Jolla California, USA
Heraeus Biofuge Pico	Heraeus	Osterode
Heraeus Multifuge X1R	Heraeus	Osterode
Heraeus Rotor 7591	Heraeus	Osterode
Hettich-Rotor 1717	Hettich	Tuttlingen
Hettich-Zentrifuge Rotina 35	Hettich	Tuttlingen
Image Lab (Software)	Bio-Rad	München
Laborbrenner Gasprofi 1	Wartewig-Labortechnik	Göttingen
Laborwaage Sartorius	Sartorius	Göttingen
Lauda-Thermostat Typ K2	Lauda	Königshofen
Magnetrührer mit Heizblock MR 3001	Heidolph	Göttingen
Microplate Reader MRX II	Dynex Technologies	Sullyfield, USA
Mikroskop Wilovert A	Hund	Wetzlar
Mikroskop Wilovert S	Hund	Wetzlar
Mikrospritze (100 µl)	Roth	Karlsruhe
Mikrowelle ‚Microstar‘	Quelle	Fürth
Multipipette RepeatOne® Dispenser	Starlab	Hamburg
NEUBAUER-Zählkammer	Roth	Karlsruhe
Oxygenator	Universität Göttingen	Göttingen
pH-Meter inoLab pH Level	WTW	Weilheim
Roller mixer SRT 2	Stuart	Staffordshire, UK
Schlauchpumpe SP04L/4	Otto Huber GmbH	Böttingen
Schüttelapparat Typ 3006	GFL	Burgwedel
Schüttelinkubator 3031	GFL	Burgwedel
Sicherheitswerkbank NuAire Class II	Zapf Instruments	Sarstedt
SIGMA Rotor 1215/4-H	SIGMA	Osterode

SIGMA Zentrifuge 3K30	SIGMA	Osterode
SORVALL® RC 5B PLUS-Zentrifuge	Thermo Electron Corporation	Langenselbold
SORVALL® SLA-1500-Rotor	Thermo Electron Corporation	Langenselbold
SORVALL® SS-34-Rotor	Thermo Electron Corporation	Langenselbold
Spectro-Photometer Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences	Uppsala, Schweden
Thermocycler T3000	Biometra	Göttingen
Thermoschüttler TM 130-6	HLC BioTech	Bovenden
Thermoschüttler Schultron TS-W	Heap Labor Consult	Bovenden
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad	München
Trockensterilisateur Typ SUT 6120	Heraeus	Osterode
Ultraschallstab Bandelin UW 2070	Bandelin	Berlin
Steuereinheit Bandelin HD 2070		
Gehäuse Bandelin LS 5		
UV-Leuchtkasten	Schütt	Göttingen
Vakuum-Konzentratorzentrifuge	Uni Equip	Martinsried
UNIVAPO 100 ECH		
Kältebad Unijet II mit Aspirator		
Vortex Genie 1 bzw. 2	Scientific Industries	Bohemia, USA
Wasseraufbereitungssystem Genpure Typ 08.2204	TKA	Niederelbert
Wasserbad ecoline O11 mit Einhängethermostat A100	Lauda	Lauda- Königshofen
Zentrifuge Biofuge Primo	Heraeus	Osterode

6.1.5 Zellkulturmedien

M199-Pulvermedium mit Earle's Salzen mit L-Glutamin ohne NaHCO ₃	Biochrom AG	Berlin
RPMI 1640-Pulvermedium mit L-Glutamin ohne NaHCO ₃	GIBCO	Eggenstein
VLE (<i>very low endotoxin</i>) RPMI 1640-Medium ohne L-Glutamin mit 2 g/l NaHCO ₃	Biochrom AG	Berlin

6.1.6 Reinigungs- und Nachweissysteme

Clarity™ Western ECL Blotting Substrate	Bio-Rad	München
peqGOLD Total RNA Kit	peqlab / vwr	Darmstadt
Human IL-8 ELISA Ready-SET-Go!™ Kit	Life Technologies	Darmstadt
Prostaglandin E ₂ ELISA Kit	Cayman Chemical	Ann Arbor, Michigan, USA
Rat Insulin ELISA-Kit	Chrystal Chem	Zaandam, Nieder- lande

6.1.7 Enzyme

DNase I (1 U/μl)	peqlab / vwr	Darmstadt
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2 x)	Thermo Scientific	Darmstadt
RevertAid™ Reverse Transkriptase (200 U/μl)	Thermo Scientific	Darmstadt
RevertAid™ H Minus M-MUL V (200 U/μl)	Thermo Scientific	Darmstadt

6.1.8 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden in Hochleistungsflüssigchromatografie (*high performance liquid chromatography*; HPLC)-gereinigter und lyophilisierter Form von MWG Biotech AG (Ebersberg) sowie von Biolegio (Nijmegen, Niederlande) bezogen. Sie wurden in sterilem Nuklease-freien Wasser in der Konzentration 100 μM gelöst und 1:10 verdünnt in die qPCR eingesetzt. Die Oligonukleotidsequenzen wurden auf der Basis folgender Sequenzen, wenn möglich Intron-überspannend, erstellt:

Tabelle 1: Oligonukleotide; Teil 1

Matrize (Spezies)	Genbank Accession-Nr.	Name des Oligonukleotids Oligonukleotidsequenz (5' - 3') (F: forward, R: reverse)	Produktgröße
β-Aktin (Ratte)	NM_031144	LC-r-ss-Actin-F / LC-r-ss-Actin-R F: ccctaaggccaaccgtgaaaagatg R: aggtcccggccagccaggtccag	222 bp
β-Aktin (Mensch)	NM_001101	LC-h-ss-Actin-F2 / LC-r-ss-Actin-R F: ccccaaggccaaccgagagaagatg R: aggtcccggccagccaggtccag	222 bp
CCL2 (Mensch)	NM_002982.3	CCL2-F5 / hCCL2-R6 F: tcagccagatgcaatcaatg R: agcttctttgggacactg	121 bp
c-FOS (Mensch)	NM_005252.3	hFOS-F3 / hFOS-R4 F: tactaccactcaccgcgaga R: tcatggcttcacaacgcca	262 bp
c-Jun (Mensch)	NM_002228.3	hJun-F3 / hJun-R4 F: gaactgcacagccagaacac R: tcctgggactccatgtcgat	395 bp
COX2 (Mensch)	NM_000963.3	hCOX2-F / hCOX2-R F: tgtgctgatgattgccgactcc R: tgtgtgttcccgcagccagattg	470 bp
ELOVL5 (Mensch)	NM_021814.4	hELOVL5-F1 / hELOVL5-R2 F: tgtagggcctcgagatact R: agcagtgtgagtccaaggtt	181 bp
EP1-Rezeptor (Mensch)	NM_000955	pshEP1-F / pshEP1-2R F: tcgcttcggcctccaccttcttg R: cggtggcctctggtgtgcttag	424 bp
EP2-Rezeptor (Mensch)	NM_000956	pshEP2-F / pshEP2-2R F: cgagacgcgacagtggctcc R: cgagacgcggcgctgtaga	409 bp
EP3-Rezeptor (Mensch)	NM_198712	pshEP3-F / pshEP3-2R F: cggggctacggaggggatgc R: atggcgctggcgatgaacaacgag	440 bp
EP4-Rezeptor (Mensch)	NM_000958.2	pshEP4-F / pshEP4-2R F: tcgcgcaaggagcagaaggagacg R: ggacggtggcgagaatgaggaagg	469 bp
FADS1 (Mensch)	NM_013402.4	hFADS1-F1 / hFADS1-R2 F: tgtggagcttgggaaacaga R: aatcatccaggccaagtcca	163 bp
FADS2 (Mensch)	NM_004265.3	hFADS2-F1 / hFADS2-R2 F: cgctgctcatcccatgtat R: cggggcgatctgtgtaagt	389 bp

Tabelle 1: Oligonukleotide; Teil 2

Matrize (Spezies)	Genbank Accession-Nr.	Name des Oligonukleotids Oligonucleotid-Sequenz (5'- II -3') (F: forward, R: reverse)	Produktgröße
GAPDH (Mensch)	NM_002046.3	hGAPDH-F / hGAPDH-R F : t _g atgacatcaagaagggtg R : ttactccttgaggccatgt	244 bp
Glukokinase (Ratte)	NM_012565	rGK-F / rGK-R F: gccgtgcctgtgaaagcgtgtc R: ccaggggtagcagcagaataggct	400 bp
HPRT (Mensch)	NM_000194	hHPRT-3F / hHPRT-4R F: tgacactggcaaaacaatgca R: ggtcctttcaccagcaagct	94 bp
IL-18 (Mensch)	NM_001562.3	hIL18-F1 / hIL18-R2 F: gcttgaatctaaattatcagtc R: gaagattcaaattgcacttat	342 bp
IL-1 β (Mensch)	NM_000576.2	hIL-1beta-1F / hIL-1beta-2R F: ccagctacgaatctccgacc R: agaacaccactgttgctcca	332 bp
IL-6 (Mensch)	NM_000600.3	hIL6-F3 / hIL6-R4 F: catcctcgacggcatctcag R: tcaccaggcaagtctctca	164 bp
IL-8 = CXCL8 (Mensch)	NM_000584.2	hIL8-F / hIL8-R F: cagtttggccaaggagtgctaa R: aacttctccacaaccctctgc	208 bp
Insulinrezeptor (Mensch)	NM_000208.2	hIR-ns2_F14 / hIR-ns_R8 F: catctcggaacgcagggtcc R: ggctgccacactgcaccgtt	245 bp
mPGES1 (Mensch)	NM_004878.4	PGES1-F3 / PGES1-4R F: gaagaaggccttggaaacc R: gtgcatccaggcgacaaaag	187 bp
OSM (Mensch)	NM_020530.3	hOSM-9F / hOSM-10R F: caccagcatgggggtact R: gcacgcggtactcttctgag	120 bp
SOCS3 (Mensch)	NM_053565	hSOCS3-1F / rSOCS3-2R: F: gacctcagctccaagagcgagta R: cgccccagaatagatgtagtaagc	440 bp
TLR 4 (Mensch)	NM_138554.4	hTLR4-F1 / hTLR4-R2 F: ggtgcctccattcagctct R: actgccaggctgagcaatc	179 bp
TNF α (Mensch)	NM_138554.4	hTNF- α 7F / hTNF- α 8R F: ggtgcctccattcagctct R: actgccaggctgagcaatc	414 bp

6.1.9 Plasmide

Die verwendeten Plasmide wurden von Janin Henkel im Rahmen ihrer Doktorarbeit hergestellt [289].

Tabelle 2: Plasmide

Matrize (Spezies)	Genbank Accession-Nr.	Multiple Cloning Site	Vektor	Position
EP1-Rezeptor (Mensch)	NM000955	XbaI / XbaI	pcDNA3	122-1327
EP2-Rezeptor (Mensch)	XM007322	EcoRI / XbaI	pcDNA3	160-1233
EP3-Rezeptor (Mensch)	X83857	EcoRI / XbaI	pcDNA3	53-1518
EP4-Rezeptor (Mensch)	L28175	Hind III / XbaI	pcDNA3	478-1854

6.1.10 NF- κ B-Reportergergenkonstrukt

Das NF- κ B-Reportergergenkonstrukt (Genbank Accession-Nr.: AF053315.1) enthält mehrere Kopien der NF- κ B-Konsensussequenz mit einem TATA-ähnlichen Promotor. Außerdem beinhaltet das Reportergergenkonstrukt ein Luciferasegen, welches aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* stammt und unter Kontrolle des Promotors steht. Nach Bindung von endogenem NF- κ B an den Promotor, wird die Transkription der Luciferase induziert.

6.1.11 Molekulare Längenstandards

GeneRuler DNA Ladder: 100 bp bzw. 1 kb	Thermo Scientific	Darmstadt
MassRuler DNA Ladder, Mix	Thermo Scientific	Darmstadt
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific	Darmstadt

6.1.12 Antikörper

Erstantikörper

Kaninchen-anti- <u>β-Aktin</u> (C4) (unter anderem Maus, Mensch, Ratte), monoklonal	Santa Cruz Biotechnology Katalog-Nr.: sc-47778	Heidelberg
Kaninchen-anti- <u>Akt</u> (unter anderem Maus, Mensch, Ratte), polyklonal	Cell Signaling Technology Katalog-Nr.: 9272	Frankfurt/Main
Kaninchen-anti- <u>GAPDH</u> (FL-335) (Maus, Mensch, Ratte), polyklonal	Santa Cruz Biotechnology Katalog-Nr.: sc-25778	Heidelberg
Kaninchen-anti- <u>IκBα</u> (unter anderem Maus, Mensch, Ratte), polyklonal	Cell Signaling Technology Katalog-Nr.: 9242	Frankfurt/Main
Kaninchen-anti- <u>IκKα</u> (unter anderem Maus, Mensch, Ratte), polyklonal	Cell Signaling Technology Katalog-Nr.: 2682	Frankfurt/Main
Kaninchen-anti- <u>IκK-beta</u> (L570) (unter anderem Maus, Mensch, Ratte), polyklonal	Cell Signaling Technology Katalog-Nr.: 2678	Frankfurt/Main
Kaninchen-anti- <u>IRS-1</u> (Maus, Mensch, Ratte), polyklonal	Cell Signaling Technology Katalog-Nr.: 2382	Frankfurt/Main
Kaninchen-anti- <u>phospho-Akt (Ser473)</u> (D9E) (unter anderem Maus, Mensch, Ratte), monoklonal	Cell Signaling Technology Katalog-Nr.: 4060	Frankfurt/Main
Kaninchen-anti- <u>p44/42 MAP-Kinase</u> (unter anderem Maus, Mensch, Ratte), polyklonal	Cell Signaling Technology Katalog-Nr.: 9102	Frankfurt/Main
Kaninchen-anti- <u>phospho-IκK-alpha/beta</u> (S176/180) (unter anderem Maus, Mensch, Ratte), polyklonal	Cell Signaling Technology Katalog-Nr.: 2694	Frankfurt/Main
Kaninchen-anti- <u>phospho-IRS-1</u> (Ser636/639) (Maus, Mensch, Ratte), polyklonal	Cell Signaling Technology Katalog-Nr.: 2388	Frankfurt/Main
Kaninchen-anti- <u>phospho-IRS-1</u> (Ser307) (Maus, Mensch, Ratte), polyklonal	Cell Signaling Technology Katalog-Nr.: 2381	Frankfurt/Main
Kaninchen-anti- <u>phospho-Stat3 (Tyr705)</u> (unter anderem Maus, Mensch, Ratte), polyklonal	Cell Signaling Technology Katalog-Nr.: 9131	Frankfurt/Main
Ziege-anti- <u>Cyclooxygenase</u> (Maus, Mensch, Ratte), polyklonal	Santa Cruz Biotechnology Katalog-Nr.: sc-1745	Heidelberg
Maus-anti- <u>Interleukin-1 beta</u> (3A6) (Maus, Mensch), monoklonal	Cell Signaling Technology Katalog-Nr.: 12242	Frankfurt/Main
Maus-anti- <u>STAT3</u> (124H6)	Cell Signaling Technology	Frankfurt/Main

(unter anderem Maus, Mensch, Ratte), monoklonal Maus-anti-phospho-IkBa (Ser32/36) (5A5)	Katalog-Nr.: 9139 Cell Signaling Technology	Frankfurt/Main
(unter anderem Maus, Mensch, Ratte), monoklonal Maus-anti-phospho-p44/42 MAP-Kinase (Thr202/Tyr204) (E10)	Katalog-Nr.: 9246 Cell Signaling Technology	Frankfurt/Main
(unter anderem Maus, Mensch, Ratte), monoklonal Zweitantikörper Ziege-anti-Maus-Immunglobulin G (IgG)- Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i> ; HRP) -Konjugat	Katalog-Nr.: 9106 Bio-Rad Katalog-Nr.: 170-6516	München
Ziege-anti-Kaninchen-IgG-HRP-Konjugat	Bio-Rad Katalog-Nr.: 170-6515	München
Ziege-anti-Kaninchen-IgG-HRP-Konjugat	Cell Signaling Technology Katalog-Nr.: 7074	Frankfurt/Main
Pferd-anti-Maus-IgG-HRP-Konjugat	Cell Signaling Technology Katalog-Nr.: 7076	Frankfurt/Main
Esel-anti-Ziege-IgG-HRP-Konjugat	Santa Cruz Biotechnology Katalog-Nr.: sc-2020	Heidelberg

6.2 Methoden

6.2.1 Kultivierung permanenter Zelllinien

6.2.1.1 Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders aufgeführt, mit autoklaviertem Reinstwasser angesetzt, sterilfiltriert (Filterporengröße 0,2 µm) und in autoklavierten Glasflaschen bei 4 °C gelagert.

Puffer und Lösungen für die Kultivierung permanenter Zelllinien

Casyton

NaCl	0,9 % (w/v)	18,00 g
EDTA	0,1 mM	0,06 g
H ₂ O		ad 2.000 ml

Penicillin/Streptomycin (100x)

Das bereits fertige, sterile Gemisch aus 10.000 U/ml Penicillin und 10.000 µg/ml Streptomycin wurde in Aliquots bei -20 °C gelagert.

FCS und VLE (*very low endotoxin*) FCS, hitzeinaktiviert

FCS und VLE FCS wurden im Wasserbad für 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert und in Aliquots bei -20 °C gelagert.

Medium RPMI 1640

RPMI 1640-Pulvermedium		10,42 g
D-Glukose x H ₂ O	10,1 mM	2,00 g
HEPES	30 mM	7,15 g
NaHCO ₃	23,8 mM	2,00 g
H ₂ O		ad 1.000 ml

RPMI 1640-Kulturmedium I

FCS, hitzeinaktiviert	10 % (v/v)	50 ml
Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)	5 ml
Medium RPMI 1640		ad 500 ml

Das Medium wurde vor Verwendung auf 37 °C temperiert.

RPMI 1640-Kulturmedium II

VLE FCS, hitzeinaktiviert	0,5 % (v/v)	250 µl
Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)	500 µl
VLE RPMI 1640		ad 50 ml

Das Medium wurde in 50 ml-Falcons gelagert und vor Verwendung auf 37 °C temperiert.

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-Stammlösung

PMA	100 µg/ml	1 mg
Ethanol (99,95 %)		ad 10 ml

Die Lösung wurde in 10 ml-Aliquots bei -20 °C gelagert.

6.2.1.2 Kultivierung und Differenzierung von U937- und THP-1-Zellen

Sowohl U937- als auch THP-1-Zellen gehören zu den humanen Monozyten-artigen Zelllinien. U937-Zellen stammen aus einem Lymphom eines Leukämie-Patienten [223]. THP-1-Zellen wurden ursprünglich aus dem Blut eines Leukämie-Patienten isoliert [224]. Beide Zelllinien wurden zur Erhaltung in 75 cm²-Kulturflaschen in RPMI 1640-Kulturmedium I kultiviert. Nach 3 bis 4 Tagen erfolgte ein Mediumwechsel, die Teilung der Zellen oder die Aussaat auf Zellkulturschalen für einen Zellkulturversuch. Die Zellzahl wurde mithilfe der NEUBAUER-Zählkammer (0,0025 mm²/Kästchen, Tiefe: 0,1 mm) bestimmt. Dazu wurde eine 1:10-Verdünnung durch Mischen von 90 µl RPMI 1640-Medium und 10 µl Zellsuspension hergestellt und die Lösung in die mit einem Deckglas verschlossene Zählkammer gefüllt. Die Zellen wurden unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung ausgezählt. Alternativ wurden 20 µl der Zellsuspension mit 10 ml Casyton gemischt und die Konzentration der Zellen mit dem Zählgerät CASY®1 (innovatis AG) bestimmt. Für Zellversuche wurden die Zellen auf 35 mm-Zellkulturschalen (Greiner oder Sarstedt) kultiviert. Dazu wurde die Zellsuspension 5 min bei 110 x g zentrifugiert (Hettich-Zentrifuge Rotina 35) und 1,0 x 10⁶ Zellen in 1 ml RPMI 1640-Kulturmedium I ausplattiert. Sofort wurde 1 µl/ml PMA (Endkonzentration: 100 ng/ml) zu den Zellen gegeben, um die Differenzierung der Monozyten-artigen Zellen in Makrophagen-ähnliche Zellen herbeizuführen. Nach 24 h wurden die nun adhären Zellen mit RPMI 1640-Medium gewaschen und für 24 h in RPMI 1640-Kulturmedium II kultiviert. Die Zellkulturversuche fanden 48 h nach Ausplattieren statt. Die Kultivierung und Inkubation der Zellen erfolgte in Begasungsbrutschränken in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre mit 5 % (v/v) CO₂ bei 37 °C.

6.2.2 Isolierung, Reinigung und Kultivierung von humanen Monozyten und Makrophagen

Gesunden Probanden wurde durch geschultes Personal der Abteilung Klinische Ernährung des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung (DIfE), Potsdam-Rehbrücke, Vollblut entnommen (Ethikantrag: 43/2016 der Universität Potsdam). Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes wurden mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation angereichert und ausplattiert. Nach einer zweistündigen Inkubation, in denen sich Monozyten an die Zellkulturplatte anlagern konnten, wurden alle nicht adhären Zellen entfernt. Die Monozyten wurden anschließend mit GM-CSF in Makrophagen differenziert. Der Zellversuch fand 8 Tage nach Isolation der Zellen statt.

6.2.2.1 Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders aufgeführt, mit Reinstwasser angesetzt, sterilfiltriert (Filterporengröße 0,2 µm) und in autoklavierten Glasflaschen bei Raumtemperatur gelagert. Weitere verwendete Puffer und Lösungen wurden unter 6.2.1.1 aufgeführt.

Puffer und Lösungen für die Isolierung und Reinigung von humanen MonozytenNaCl-Stammlösung

NaCl	0,14 M	8,19 g	
H ₂ O		ad 1.000 ml	

10 x Waschpuffer-Stammlösung

D(+)-Glukose Monohydrat	5,50 mM	1,1 g	
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,05 mM	7,40 mg	
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,98 mM	199 mg	
KCl	5,40 mM	403 mg	
Tris	5,40 mM	17,57 g	
H ₂ O		ad 1.000 ml	

Der pH-Wert wurde auf pH 7,6 eingestellt.

1 x Waschpuffer

Waschpuffer	1x	100 ml	10 x
NaCl-Stammlösung	1,26 mM	900 ml	1,4 mM-Stlsg.

130 mM Na-Citrat-Lösung

Na-Citrat-Dihydrat	130 mM	3,8 g	
H ₂ O		ad 100 ml	

Vollblut-Arbeitslösung

Waschpuffer		22,5 ml	1 x
3,3 % Na-Citrat-Lösung	13 mM	2,5 ml	130 mM-Stlsg.
Vollblut		25 ml	

Die Lösung wurde in einem Falcon hergestellt.

Puffer und Lösungen für die Kultivierung von humanen Monozyten und Makrophagen1 % BSA-Stammlösung

BSA	1 % (w/v)	100 mg	
H ₂ O		ad 10 ml	

0,1 % BSA-Stammlösung

BSA	0,1 % (w/v)	100 µl	1 % (w/v)-Stlsg.
H ₂ O		900 µl	

GM-CSF-Stammlösung

GM-CSF	40 µg/ml	20 µg	
BSA		500 µl	0,1 % (w/v)-Stlsg.

RPMI 1640-Kulturmedium III

FCS	10 % (v/v)	10 ml	
Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)	1 ml	
GM-CSF	20 ng/ml	50 µl	40 µg/ml
Medium RPMI 1640		ad 100 ml	

Das Medium wurde vor Verwendung auf 37 °C temperiert.

RPMI 1640-Kulturmedium IV

VLE FCS	0,5 % (v/v)	250 µl	
Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)	500 µl	
L-Analyl-L-Glutamin	2 mM	500 µl	200 mM
VLE RPMI 1640		ad 50 ml	

Das Medium wurde in 50 ml-Falcons gelagert und vor Verwendung auf 37 °C temperiert.

6.2.2.2 Isolierung und Reinigung der humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Gesunden männlichen und weiblichen Probanden wurde 50 ml Blut aus einer peripheren Vene entnommen und in 10 ml BD Vacutainer Heparinröhrchen (17 IU/ml) aufgefangen. Die Vollblut-Arbeitslösung wurde hergestellt und je 25 ml dieser Lösung vorsichtig über 15 ml Ficoll (Dichte: 1,077 g/ml) geschichtet. Die Dichtegradientenzentrifugation erfolgte bei Raumtemperatur für 40 min bei 400 x *g* und ohne Bremskraft (Heraeus-Biofuge Primo), um mononukleäre Zellen von Granulozyten, Erythrozyten und Blutplasma abzutrennen. Mit einer Einmal-Pasteurpipette wurden die mononukleäre Zellen, welche eine trübe Schicht zwischen Ficoll und Plasma bildeten, in 40 ml Waschpuffer überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 4 °C für 10 min bei 400 x *g* zentrifugiert (Heraeus-Biofuge Primo). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellsediment in auf 4 °C temperierten Waschpuffer resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt und anschließend das Zellsediment in 10 ml RPMI 1640-Kulturmedium I resuspendiert.

6.2.2.3 Mikroskopische Zellzählung

Die Zellzahl der isolierten mononukleären Zellen wurde durch Zählung mithilfe der NEUBAUER-Zählkammer (0,0025 mm²/Kästchen, Tiefe: 0,1 mm) bestimmt. Dazu wurde eine 1:20-Verdünnung durch Mischen von 95 µl Kulturmedium I und 5 µl Zellsuspension hergestellt und die Lösung in die mit einem Deckglas verschlossene Zählkammer gefüllt. Die Zellen wurden unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung ausgezählt. Während der Zellzahlbestimmung wurde die Zellsuspension mit Eis gekühlt.

6.2.2.4 Kultivierung der humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes wurden auf 6 well-Zellkulturplatten mit einer speziellen hydrophilen Oberflächenbeschichtung (Primaria™ von Corning™) kultiviert. Dazu wurden 5,0 x 10⁶ Zellen in 1,5 ml RPMI 1640-Kulturmedium I ausplattiert. Nach einer Anheftungsphase von 2 h wurden die adhärenenten Monozyten drei Mal mit je 1 ml auf 37 °C temperierten RPMI 1640-Kulturmedium I gewaschen, um die nicht bzw. langsam adhärenenten mononukleären Zellen zu entfernen. Nach 4 Tagen Kulturdauer in 2 ml RPMI 1640 Kulturmedium III pro well erfolgte die Zugabe von je 1 ml frischem RPMI 1640-Kulturmedium III ohne Mediumwechsel. Ein Mediumwechsel erfolgte mit RPMI 1640-Kulturmedium IV nach 7 Tagen Kulturdauer. Die Zellkulturversuche fanden nach einer Gesamtkulturdauer von 8 Tagen statt. Die Inkubation der mononukleären Zellen erfolgte in Begasungsbrutschränken in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre mit 5 % (v/v) CO₂ bei 37 °C.

6.2.3 Isolierung, Reinigung, Transfektion und Kultivierung von Hepatozyten der Ratte

Die Isolierung von primären Hepatozyten der Ratte erfolgte nach einem Protokoll von Meredith *et al.* [199] und wurde von Mitarbeiter*innen der Universität Potsdam, Abteilung Biochemie der Ernährung, durchgeführt. Dabei wurde zunächst der Zellverband durch *in situ*-Perfusion der Leber mit einem Calcium-freien und EDTA-haltigen Puffer gelöst. Anschließend wurden die Hepatozyten mittels niedrigtouriger Zentrifugation mit einem kontinuierlichen Percoll-Dichtegradienten von den Nichtparenchymzellen und Zelltrümmern getrennt und gereinigt. Die Hepatozyten wurden auf Zellkulturschalen, die eine spezielle hydrophile Oberflächenbeschichtung hatten, kultiviert.

6.2.3.1 Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders aufgeführt, mit autoklaviertem Reinstwasser angesetzt, durch einen 0,2 µm-Filter steriltfiltriert und in autoklavierten Glasflaschen bei 4 °C gelagert. Weitere verwendete Puffer und Lösungen wurden unter 6.2.1.1 aufgeführt.

Puffer und Lösungen für die Isolierung und Reinigung von Hepatozyten

Perfusionspuffer-Stammlösung (10x)

NaCl	1,4 M	81,82 g
KCl	50 mM	3,73 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	8 mM	1,63 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	16 mM	2,85 g
KH ₂ PO ₄	4 mM	0,54 g
H ₂ O		ad 1.000 ml

Der pH-Wert der Lösung wurde auf pH 7,4 eingestellt.

NaHCO₃-Stammlösung (1 M)

NaHCO ₃	1 M	84,01 g
H ₂ O		ad 1.000 ml

Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Glukose-Stammlösung (2 M)

D(+)-Glukose x H ₂ O	2 M	39,63 g
H ₂ O		ad 100 ml

EDTA-Stammlösung (0,5 M)

EDTA	0,5 M	14,61 g
H ₂ O		ad 100 ml

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt.

Laktat-Stammlösung (0,5 M)

Laktat (60 % (w/w) Sirup, Natriumsalz)	0,5 M	7 ml
H ₂ O		ad 100 ml

Pyruvat-Stammlösung (0,2 M)

Pyruvat	0,2 M	2,20 g
H ₂ O		ad 100 ml

Calciumchlorid-Stammlösung (2 M)

CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2 M	29,40 g
H ₂ O		ad 100 ml

1 x Perfusionspuffer

Perfusionspuffer	1 x	200 ml	10 x-Stlsg.
NaHCO ₃	25 mM	50 ml	1 M-Stlsg.
Glukose	15 mM	15 ml	2 M-Stlsg.
EDTA	2 mM	8 ml	0,5 M-Stlsg.
Laktat	2 mM	8 ml	0,5 M-Stlsg.
Pyruvat	0,2 mM	2 ml	0,2 M-Stlsg.
H ₂ O		ad 2.000 ml	

Der Puffer wurde bei 37 °C für 45 min mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begast. Danach wurde der pH-Wert auf pH 7,4 eingestellt.

Waschpuffer

Perfusionspuffer	1 x	50 ml	10 x-Stlsg.
CaCl ₂	1 mM	250 µl	2 M-Stlsg.
H ₂ O		ad 500 ml	

Der Puffer wurde für 45 min bei 37 °C temperiert und der pH-Wert auf pH 7,4 eingestellt.

Percoll-Dichtegradient

Perfusionspuffer	1 x	4,2 ml	10 x-Stlsg.
Percoll		27,8 ml	
Zellsuspension		16 ml	

Die Perfusionspuffer-Stammlösung und Percoll wurden gemischt und die Lösung wurde auf 37 °C temperiert. Nach Hinzufügen der Zellsuspension wurde die Lösung vorsichtig durch Invertieren gemischt. Die Endkonzentration von Percoll betrug 58 % (v/v).

Puffer und Lösungen für die Kultivierung von HepatozytenPhysiologische Natriumchlorid-Lösung

NaCl	0,9 % (w/v)	9 g
H ₂ O		ad 1.000 ml

Insulin-Stammlösung (10 µM)

Insulin	10 µM	2,9 mg
BSA	0,1 % (w/v)	50,0 mg
0,9 % (w/v) NaCl-Lösung		ad 50 ml

BSA wurde in 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung gelöst, der pH 3,0 eingestellt und Insulin gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert auf pH 7,4 eingestellt und die Lösung in Aliquots bei -20 °C gelagert.

Insulin-Stammlösung (100 µM)

Insulin	100 µM	28 mg
BSA	0,1 % (w/v)	50 mg
0,9 % (w/v) NaCl-Lösung		ad 50 ml

BSA wurde in 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung gelöst, der pH 3,0 eingestellt und Insulin gelöst. Anschließend wurde der pH 7,4 eingestellt und die Lösung in Aliquots bei -20 °C gelagert.

Dexamethason-Stammlösung (100 µM)

Dexamethason-21-Acetat	100 µM	2 mg
Ethanol	0,3 % (w/v)	150 µl
0,9 % (w/v) NaCl-Lösung		ad 50 ml

Die Lösung wurde in Aliquots bei -20 °C gelagert.

M199-Ansatzmedium

M199-Pulvermedium mit Earle's Salzen und L-Glutamin, ohne NaHCO ₃		9,77 g	
D(+)-Glukose x H ₂ O	5,5 mM	1,10 g	
HEPES	15 mM	3,57 g	
NaHCO ₃	18 mM	1,51 g	
BSA	0,2 % (w/v)	2,00 g	
H ₂ O		ad 1.000 ml	

M199-Anheftungsmedium

NCS	4 % (v/v)	4 ml	
Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)	1 ml	
Dexamethason	100 nM	100 µl	100 µM-Stlsg.
Insulin	0,5 nM	5 µl	10 µM-Stlsg.
M199-Ansatzmedium		ad 100 ml	
Das Medium wurde auf 37 °C erwärmt.			

M199-Kulturmedium I

Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)	1 ml	
Dexamethason	100 nM	100 µl	100 µM-Stlsg.
Insulin	0,5 nM	5 µl	10 µM-Stlsg.
M199-Ansatzmedium		ad 100 ml	
Das Medium wurde auf 37 °C erwärmt.			

M199-Kulturmedium II

Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)	1 ml	
Dexamethason	100 nM	100 µl	100 µM-Stlsg.
Insulin	5 nM	50 µl	10 µM-Stlsg.
M199-Ansatzmedium		ad 100 ml	
Das Medium wurde auf 37 °C erwärmt.			

M199-Kulturmedium III

Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)	1 ml	
Dexamethason	100 nM	100 µl	100 µM-Stlsg.
M199-Ansatzmedium		ad 100 ml	
Das Medium wurde auf 37 °C erwärmt.			

Puffer und Lösungen für die Transfektion von HepatozytenNa₂HPO₄-Stammlösung (150 mM)

Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	150 mM	2,67 g	
H ₂ O		ad 100 ml	

HEPES-Stammlösung (2x)

HEPES	50 mM	1,19 g	
NaCl	250 mM	1,46 g	
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	1,5 mM	1 ml	150 mM-Stlsg
H ₂ O		ad 100 ml	

25-Hydroxycholesterol-Stammlösung (1.000 x)

25-Hydroxycholesterol	0,25 % (w/v)	25 mg
Ethanol		10 ml

Die Lösung wurde sterilfiltriert und in Aliquots bei -20 °C gelagert.

Transfektionscocktail (Ansatz für eine 35 mm-Zellkulturschale)

Plasmid-DNA		X µg	
H ₂ O		ad 67,5 µl	
CaCl ₂	100 mM	7,5 µl	2 M-Stlsg.
HEPES	1 x	75 µl	2 x-Stlsg.

Um die Bindung der DNA an die Calciumphosphatpräzipitate zu gewährleisten, erfolgte die Zugabe der einzelnen Komponenten strikt nach Reihenfolge der obigen Auflistung. Die Lösung wurde in Polystyrolröhrchen angesetzt, durch Invertieren gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die einsetzende Trübung der Lösung deutete auf die Bildung der Calciumphosphat-DNA-Präzipitate hin.

Transfektionsmedium

NCS	4 % (v/v)	4 ml	
Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)	1 ml	
Dexamethason	100 nM	100 µl	100 µM-Stlsg.
Insulin	0,5 nM	5 µl	10 µM-Stlsg.
25-Hydroxycholesterol	1 x	100 µl	1.000 x-Stlsg.
M199-Ansatzmedium		ad 100 ml	

6.2.3.2 Isolierung der Hepatozyten durch nicht-rezirkulierende *in situ*-Perfusion der Rattenleber

Das Perfusionssystem bestand aus Wasserbad, Pumpe und Oxygenator, in dem der Perfusionspuffer während der Perfusion auf 37 °C temperiert und mit Carbogen begast wurde. Eine männliche Wistar-Ratte wurde durch intraperitoneale Injektion von 100 µl Narcoren pro 100 g Körpergewicht narkotisiert. Anschließend wurde das Tier auf dem Präparationstisch fixiert und das Abdomen mit 70 % (v/v) Ethanol desinfiziert. Die Bauchhaut wurde entfernt und der Bauchraum durch Längsinzision entlang der *Linea alba* bis zum *Processus xyphoideus* eröffnet. Durch Verlagerung des Darmkonvoluts wurde die Leber freigelegt und anschließend die *Vena portae* mit einer Ligatur locker umschlungen. Danach wurde die Pfortader mit einer Braunüle punktiert und die *Vena cava inferior* eröffnet. Die Braunüle in der Pfortader wurde in der korrekten Position mit der Ligatur fixiert. Mit einer Flussgeschwindigkeit von 40 ml/min wurde die Rattenleber nun mit dem Perfusionspuffer (2 l) für 45-60 min nicht-rezirkulierend perfundiert.

6.2.3.3 Präparation und Reinigung primärer Rattenhepatozyten

Nach dem Ende der Perfusion wurde die Leber aus dem Bauchraum präpariert und unmittelbar in eine Glasschale, welche mit 37 °C warmen Waschpuffer gefüllt war, überführt. Mit Hilfe einer Pinzette und einer Kanüle wurde die Leberkapsel zerrissen und möglichst vollständig vom Leberhilus abgezogen, wodurch sich die Zellen aus den Leberlappen lösten. Zur Entfernung von Resten des Bindegewebes und größerer Zellverbände wurde die Zellsuspension durch ein mit Waschpuffer befeuchtetes Nylon-Sieb (Porengröße 80 – 100 µm) filtriert. Anschließend wurde die Zellsuspension bei Raumtemperatur für 2 min bei 20 x g und ohne Bremskraft zentrifugiert (Heraeus-Biofuge Primo), um intakte Hepatozyten zu sedimentieren und gleichzeitig Nichtparenchymzellen, tote Zelle und Zelltrümmer abzutrennen. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellsediment in Waschpuffer resuspendiert. Dieser Waschschritt wurde zweimal wiederholt und anschließend das Zellsediment in 16 ml Waschpuffer resuspendiert. Der kontinuierliche Percoll-Dichtegradient wurde hergestellt und bei Raumtemperatur für 5 min bei 800 x g und ohne Bremskraft zentrifugiert (Hettich Zentrifuge Rotina 35). Nichtparenchymzellen, tote Zellen und Zelltrümmer befanden sich nach der Zentrifugation auf der Oberfläche des Gradienten und konnten mit der Percoll-Lösung abgesaugt werden. Die gereinigten pelletierten Hepatozyten wurden in M199-Medium resuspendiert.

6.2.3.4 Mikroskopische Zellzählung

Die Zellzahl der isolierten Hepatozyten wurde durch Zählung mithilfe der NEUBAUER-Zählkammer (0,0025 mm²/Kästchen, Tiefe: 0,1 mm) bestimmt. Dazu wurde eine 1:25-Verdünnung durch Mischen von 96 µl M199-Medium und 4 µl Zellsuspension hergestellt und die Lösung in die mit einem Deckglas verschlossene Zählkammer gefüllt. Die Zellen wurden unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung ausgezählt. Während der Zellzahlbestimmung wurde die Hepatozytensuspension im Wasserbad bei 37 °C aufbewahrt.

6.2.3.5 Kultivierung primärer Hepatozyten der Ratte

Die Hepatozytensuspension wurde sofort nach ihrer Herstellung in M199-Anheftungsmedium bzw. Transfektionsmedium (bei Transfektionen, siehe 6.2.3.6) überführt. Dieses enthielt 4 % neonatales Kälberserum (NCS), das eine bessere Anheftung der Hepatozyten an den Boden der Zellkulturschalen ermöglichen sollte, sowie 1 % Penicillin/Streptomycin, 100 nM Dexamethason und 0,5 nM Insulin als permissiven Wachstumsfaktor. Die Hepatozyten wurden auf 35 mm-Zellkulturschalen mit einer speziellen hydrophilen Oberflächenbeschichtung (Nuncclon von Nunc™) kultiviert. Dazu wurden 1,0 x 10⁶ Hepatozyten in 1,5 ml bzw. bei nachfolgender Transfektion 0,7 x 10⁶ Hepatozyten in 1,5 ml M199-Anheftungsmedium ausplattiert. Nach einer Anheftungsphase von 4 h bzw. 5 h (bei Transfektionen, siehe 6.2.3.6) folgte ein Mediumwechsel mit 1,5 ml M199-Kulturmedium I, bzw. die Transfektion der Hepatozyten mit dem NF-κB-Luc-Plasmid. Weitere Mediumwechsel erfolgten nach 24 h Kulturdauer mit 1,5 ml M199-Kulturmedium II und nach 44 h Kulturdauer mit 500 µl M199-Kulturmedium III. Die Zellkulturversuche fanden nach einer Gesamtkulturdauer von 48 h statt. Die Inkubation der Hepatozyten erfolgte in Begasungsbrutschränken in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre mit 3 % (v/v) CO₂ (bei Transfektionen, siehe 6.2.3.6) bzw. 5 % (v/v) CO₂ bei 37 °C.

6.2.3.6 Transfektion primärer Hepatozyten nach der Calciumphosphat-Methode

Die Transfektion primärer Rattenhepatozyten erfolgte nach einer modifizierten Calciumphosphat-Methode [200]. Nach Ansetzen des Transfektionscocktails wurde das Gemisch für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Transfektionsmedium enthielt unter anderem 25-Hydroxycholesterol, um die endozytotische Aufnahme der Calciumphosphat-DNA-Präzipitate zu fördern. Unmittelbar nach Ausplattieren der Hepatozyten wurden 150 µl des Transfektionscocktails auf die Zellsuspension in der Schale getropft. Die Zellen wurden während der Adhäsions- und Transfektionszeit im Begasungsbrutschrank bei 37 °C in einer mit Wasserdampf gesättigten 3 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Der CO₂-Gehalt wurde derart niedrig gehalten, um das pH-Optimum des Mediums zur verbesserten Transfektionseffizienz zu erreichen. Nach einer Anheftungsphase von 5 h folgte ein Mediumwechsel mit 1,5 ml M199-Kulturmedium I und die weitere Kultivierung in einer mit Wasserdampf gesättigten 5 % CO₂-Atmosphäre.

6.2.4 Zellkulturversuche

6.2.4.1 Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders aufgeführt, mit autoklaviertem Reinstwasser angesetzt, sterilfiltriert (Filterporengröße 0,2 µm) und in Aliquots bei -20 °C gelagert. Weitere verwendete Puffer und Lösungen wurden unter 6.2.3.1 aufgeführt.

Stimulanzen

10 x PBS-Stammlösung

NaCl	1,37 M	80,06 g
KCl	27 mM	2,015 g
KH ₂ PO ₄	15 mM	2,041 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	80 mM	14,239 g
H ₂ O		ad 1.000 ml

Der pH-Wert wurde auf pH 7,3 eingestellt und die Lösung bei Raumtemperatur gelagert.

1 x PBS-Stammlösung

PBS	1 x	100 ml	10 x-Stlsg.
H ₂ O		ad 1.000 ml	

10 % BSA-Stammlösung

Fettfreies BSA	10 % (w/v)	1 g	
H ₂ O		ad 10 ml	

0,1 M NaOH

NaOH	0,1 M	40 mg	
H ₂ O		ad 10 ml	

Insulin-Stammlösung (100 µM)

Die Stammlösung wurde gemäß 6.2.3.1 hergestellt und vor Behandlung der Zellen auf eine Konzentration von 100 nM mit Medium verdünnt.

Lipopolysaccharid (LPS)-Stammlösung (5 mg/ml)

Die LPS-Stammlösung wurde durch Lösen des LPS in autoklaviertem Reinstwasser hergestellt und bei -4 °C gelagert. Die Konzentration der Stammlösung betrug 5 mg/ml. Vor der Behandlung der Zellen wurde die Lösung mit Medium auf eine Konzentration von 100 ng/ml verdünnt.

Palmitat-Stammlösung (10 mM)

Palmitat wurde durch die Verseifung von 13 mg Palmitinsäure in 500 µl 0,1 M NaOH bei 70 °C hergestellt. Anschließend wurde die Lösung unter stetigem Rühren sehr langsam in 4,5 ml einer auf 50 °C temperierten 10 % (w/v) BSA-Stammlösung getropft. Der pH-Wert wurde auf pH 7,4 eingestellt und die Lösung bei 55 °C für 15 min schüttelnd inkubiert. Die Konzentration der Stammlösung betrug 10 mM Palmitat in 9 % (w/v) BSA und wurde in Aliquots bei -70 °C gelagert. Vor der Behandlung der Zellen wurde die Lösung mit Medium auf eine Konzentration von 100 µM in 0,09 % BSA verdünnt.

Prostaglandin E₂ (PGE₂)-Stammlösung (10 mM)

Die PGE₂-Stammlösung wurde durch Lösen des PGE₂ in 70 % Ethanol hergestellt und in Aliquots bei -20 °C gelagert. Die Konzentration der Stammlösung betrug 10 mM. Vor der Behandlung der Zellen wurde das Lösungsmittel in der Vakuumzentrifuge abgedampft und anschließend PGE₂ in einer Konzentration von 10 µM in Medium aufgenommen.

TPCA-1-Stammlösung (20 mM)

Der IKK2-Inhibitor TPCA-1 wurde in einer Konzentration von 20 mM in DMSO gelöst und in Aliquots bei -20 °C gelagert. Vor der Behandlung der Zellen wurde die Lösung mit Medium auf eine Konzentration von 5 µM verdünnt.

PD98059-Stammlösung (100 mM)

Der ERK1/2-Inhibitor PD98059 wurde in einer Konzentration von 100 mM in DMSO gelöst und in Aliquots bei -20 °C gelagert. Vor der Behandlung der Zellen wurde die Lösung mit Medium auf eine Konzentration von 1 µM verdünnt.

GSK1838705-Stammlösung (5 mM)

Der Inhibitor des IGF- und Insulinrezeptors GSK1838705 wurde in einer Konzentration von 5 mM in DMSO gelöst und in Aliquots bei -20 °C gelagert. Vor der Behandlung der Zellen wurde die Lösung mit Medium auf eine Konzentration von 1 µM verdünnt.

Polymyxin B-Stammlösung (1 mg/ml)

Das Polypeptidantibiotikum Polymyxin B wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in autoklaviertem Reinstwasser gelöst und in Aliquots bei -20 °C gelagert. Vor der Behandlung der Zellen wurde die Lösung mit Medium auf 10 µg/ml verdünnt.

Tak242-Stammlösung

Der TLR4-Inhibitor Tak242 wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in DMSO gelöst und in Aliquots bei -20 °C gelagert. Vor der Behandlung der Zellen wurde die Konzentration der Lösung auf 1 µg/ml mit Medium verdünnt.

PF-04418948-Stammlösung (10 mM)

Der EP2-Rezeptor-Antagonist PF-04418948 wurde in einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst und bei -20 °C gelagert. Vor der Behandlung der Zellen wurde die Lösung mit Medium auf eine Konzentration von 10 µM verdünnt.

ONO AE3-208-Stammlösung (10 mM)

Der EP4-Rezeptor-Antagonist ONO AE3-208 wurde in einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst und bei -20 °C gelagert. Vor der Behandlung der Zellen wurde die Lösung mit Medium auf eine Konzentration von 10 µM verdünnt.

17-phenyl trinor Prostaglandin E₂ -Stammlösung (12,95 mM)

Der EP-1/3-Rezeptor-Agonist 17-phenyl trinor Prostaglandin E₂ wurde in einer Konzentration von 12,95 mM in Reinstethanol gelöst und bei 4 °C gelagert. Vor der Behandlung der Zellen wurde die Lösung mit Medium auf eine Konzentration von 1 µM verdünnt.

19 (R)-Hydroxyprostaglandin E₂-Stammlösung (1,36 mM)

Der EP2-Rezeptor-Agonist 19 (R)-Hydroxyprostaglandin E₂ wurde in einer Konzentration von 1,36 mM in Reinstethanol gelöst und bei 4 °C gelagert. Vor der Behandlung der Zellen wurde die Lösung mit Medium auf eine Konzentration von 1 µM verdünnt.

CAY10598-Stammlösung (13,05 mM)

Der EP4-Rezeptor-Agonist CAY10598 wurde in einer Konzentration von 13,05 mM in Reinstethanol gelöst und bei 4 °C gelagert. Vor der Behandlung der Zellen wurde die Lösung mit Medium auf eine Konzentration von 1 µM verdünnt.

Interleukin-1β (IL-1β)-Stammlösung (460 µg/ml)

Die IL-1β-Stammlösung wurde durch Lösen des IL-1β in autoklaviertem Reinstwasser hergestellt und in Aliquots bei -20 °C gelagert. Die Konzentration der Stammlösung betrug 460 µg/ml. Vor der Behandlung der Zellen wurde die Lösung mit Medium auf eine Konzentration von 1 ng/ml verdünnt.

Interleukin-6 (IL-6)-Stammlösung (50 ng/µl)

Die IL-6-Stammlösung wurde durch Lösen des IL-6 in autoklaviertem Reinstwasser hergestellt und in Aliquots bei -20 °C gelagert. Die Konzentration der Stammlösung betrug 50 ng/µl. Vor der Behandlung der Zellen wurde die Lösung mit Medium auf eine Konzentration von 100 ng/ml verdünnt.

Oncostatin M (OSM)-Stammlösung (100 ng/µl)

Die OSM-Stammlösung wurde durch Lösen des OSM in autoklaviertem Reinstwasser hergestellt und in Aliquots bei -20 °C gelagert. Die Konzentration der Stammlösung betrug 100 ng/µl. Vor der Behandlung der Zellen wurde die Lösung mit Medium auf eine Konzentration von 10 ng/ml verdünnt.

Bakterien-Stammlösung (3,33 µg Trockenmasse/µl)

Die Bakterien-Stammlösungen wurden von Laura Maschirow im Rahmen ihrer Bachelorarbeit hergestellt [292]. *Escherichia coli*- und *Clostridium ramosum*-Kulturen wurden in ihrer exponentiellen Wachstumsphase in Falcons überführt und bei 4 °C bei 8.000 x g für 3 min zentrifugiert (Heraeus-Multifuge 1S-R, Thermo Scientific). Die Zellpellets wurden zweimal mit reduziertem PBS (pH 7)

gewaschen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Diese Schritte erfolgten bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen (10 % H₂, 10 % N₂, 80 % CO₂) in einer Anaerobierbox (MAKS MG500, Meintrup dws.). Die Pellets wurden gefriergetrocknet, durch Bestrahlung (65 mWS/cm²) (UV Stratalinker® 2400, Stratagene) inaktiviert und in einer Konzentration von 3,33 µg Trockenmasse/µl in PBS aufgenommen. Die Bakterien-Stammlösungen wurden bei -20 °C gelagert. Vor der Behandlung der Zellen wurden die Konzentrationen der Lösungen auf 0,33 µg Trockenmasse/µl mit Medium verdünnt.

Stimulationsmedien

Die Medien zur Behandlung der Zellen mit Stimulanzen wurden vor Gebrauch frisch angesetzt und auf 37 °C erwärmt.

RPMI 1640-Stimulationsmedium I

siehe RPMI 1640-Kulturmedium II (6.2.1.1)

RPMI 1640-Stimulationsmedium II

siehe RPMI 1640-Kulturmedium IV (6.2.2.1)

6.2.4.2 Zellkulturversuche zur Untersuchung der Genregulation in den permanenten humanen Zelllinien U937 und THP-1

Allgemeines Behandlungsschema

Für die Untersuchung der Regulation der Genexpression wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt bzw. wenn anschließend RNA isoliert werden sollte, wurden teilweise auch nur zwei 35 mm-Zellkulturschalen gleich behandelt. Die Zellen wurden wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und in Makrophagen differenziert. Nach weiteren 48 h Kulturdauer erfolgte die Behandlung der Zellen. Das Medium wurde abgesaugt und 1 ml RPMI 1640-Stimulationsmedium I auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden mit 100 nM Insulin, 100 ng/ml LPS, 100 µM Palmitat, 10 µM PGE₂, 1 µM der EP-Rezeptor-Agonisten, 10 ng/ml OSM und/ oder 100 ng/ml IL-6 für 1 h (in der Regel für Western Blot-Analysen) bzw. 24 h behandelt. In Zellkulturversuchen mit Palmitat wurden parallel alle anderen Zellkulturschalen mit BSA in einer Endkonzentration von 0,09 % behandelt und in Zellkulturversuchen mit EP-Rezeptor-Agonisten mit Reinstethanol in einer Endkonzentration von 0,09 %. Gegebenenfalls wurden die Stimulanzen zuvor 90 min mit 10 µg/ml Polymyxin B schüttelnd inkubiert. Nach Versuchsende wurden die Zellkulturschalen dreimal mit einfach konzentrierter PBS gewaschen, in flüssigen Stickstoff überführt und bei -70 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Zellkulturüberstände zur Lipid- oder Proteinanalyse oder Stimulation von primären Rattenhepatozyten wurden 5 min bei 110 x g zentrifugiert, um noch vorhandene Zellen oder Zelltrümmer zu entfernen. Anschließend wurden die Überstände in Reaktionsgefäße aliquotiert, in flüssigen Stickstoff überführt und bei -70 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zellkulturversuche mit den Inhibitoren GSK1838705, PD98059 und TPCA-1

Permanente Zelllinien wurden wie unter „allgemeines Behandlungsschema“ beschrieben, behandelt. Neben den Stimulanzen wurde dem RPMI 1640-Stimulationsmedium I zur Stimulation der Zellen zusätzlich Inhibitoren zugesetzt und 1 ml der entsprechenden Medien auf die Zellkulturschalen gegeben. Die Endkonzentrationen der Inhibitoren betragen 1 µM GSK1838705, 1 µM PD98059 oder 5 µM TPCA-1. In allen Versuchen wurden parallel auch Zellen zur Kontrolle ohne Inhibitoren behandelt. Durch Zugabe von DMSO zu den Schälchen ohne Inhibitor war die DMSO-Konzentration in allen Zellkulturschälchen identisch.

Zellkulturversuche mit dem Inhibitor Tak242

Permanente Zelllinien wurden wie unter „allgemeines Behandlungsschema“ beschrieben, behandelt. Am Stimulationstag wurden die Zellen zunächst 90 min mit 2 µg/ml des Inhibitors Tak242 vorinkubiert. Die Menge des RPMI 1640-Stimulationsmediums betrug dabei 500 µl. Zeitgleich wurden die Stimulanzen in RPMI 1640-Stimulationsmedium I angesetzt, wobei deren Konzentration doppelt so hoch war wie die Endkonzentration zur Stimulation der Zellen. Nach Zugabe von 20 µg/ml Polymyxin B wurden die Stimulanzen 90 min schüttelnd inkubiert. Nach der Vorinkubation wurden 500 µl des Stimulationsansatzes zu den 500 µl des bereits auf den Zellen vorhandenen Mediums mit Inhibitor gegeben. Dadurch halbierten sich sowohl die Konzentrationen der Stimulanzen als auch der Inhibitoren. In allen Versuchen wurden parallel auch Zellen zur Kontrolle ohne Inhibitoren behandelt. Durch Zugabe von DMSO zu den Schälchen ohne Inhibitor war die DMSO-Konzentration in allen Zellkulturschälchen identisch.

Zellkulturversuche mit EP-Rezeptor-Antagonisten

Permanente Zelllinien wurden wie unter „allgemeines Behandlungsschema“ beschrieben, behandelt. Auf die Zellkulturschalen wurde jeweils 1 ml des RPMI 1640-Stimulationsmedium I gegeben und dieses mit 10 μM des jeweiligen EP-Rezeptor-Antagonisten versetzt. Die Zeit der Vorinkubation betrug 90 min. Anschließend erfolgte die Zugabe der Stimulanzen. In allen Versuchen wurden parallel auch Zellen zur Kontrolle ohne Inhibitoren behandelt. Durch Zugabe von DMSO zu den Schälchen ohne Inhibitor war die DMSO-Konzentration in allen Zellkulturschälchen identisch.

6.2.4.3 Zellkulturversuche zur Untersuchung der Genregulation in den primären humanen Makrophagen

Für die Untersuchung der Regulation der Genexpression wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Zellen wurden wie unter 6.2.2 beschrieben kultiviert und in Makrophagen differenziert. Nach 8 Tagen Kulturdauer wurde das Kulturmedium abgesaugt und durch 1,5 ml RPMI 1640-Stimulationsmedium II ersetzt. Die Zellen wurden mit 100 nM Insulin, 100 ng/ml LPS und/ oder 10 μM PGE₂ für 24 h behandelt. Nach Versuchsende wurden die Zellkulturschalen dreimal mit einfach konzentrierter PBS gewaschen, in flüssigen Stickstoff überführt und bei -70 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

6.2.4.4 Zellkulturversuche zur Untersuchung der Promotoraktivität und Genregulation in primären Rattenhepatozyten

Die Untersuchung der Regulation der Genexpression erfolgte in Zweifachbestimmung. Rattenhepatozyten wurden wie unter 6.2.3 beschrieben kultiviert und gegebenenfalls transfiziert. Nach 48 h Kulturdauer wurden zu den 500 μl M199-Kulturmedium III, welches sich in den Zellkulturschälchen befand, 500 μl RPMI 1640-Stimulationsmedium I oder 500 μl U937-Makrophagenüberstand gegeben. Den Medien und Überständen wurden zuvor 100 nM Insulin, 1 ng/ml IL-1 β , 100 ng/ml IL-6 oder 100 ng/ml LPS zugesetzt. Nach einer zweistündigen (für die Untersuchung der Genregulation) bzw. einer achtstündigen (für die Untersuchung der Promotoraktivität) Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit einfach konzentrierter PBS gewaschen, die Zellkulturschalen in flüssigen Stickstoff überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

6.2.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus permanenten Zelllinien und primären Rattenhepatozyten

6.2.5.1 Puffer und Lösungen

peqGOLD Total RNA Kit

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mit dem *peqGOLD Total RNA Kit* der Firma Peqlab. Es wurden die im Kit enthaltenen gebrauchsfertigen Puffer *RNA Lysis Buffer T*, *RNA Wash Buffer I* sowie das RNase-freie Wasser und die Zentrifugationssäulen *DNA Removing Columns* und *Perfect-Bind RNA Columns* (in 2 ml-Auffanggefäßen) verwendet. Dem *RNA Wash Buffer II* wurden vor Gebrauch 80 ml 96 % Ethanol zugesetzt. Über die Zusammensetzung der Puffer machte der Hersteller keine Angaben. Die Materialien wurden bei Raumtemperatur gelagert.

DEPC-H₂O

DEPC	0,1 % (v/v)	1 ml
H ₂ O		ad 1.000 ml

Um RNasen zu inaktivieren wurde das mit DEPC versetzte Wasser für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Durch anschließendes Autoklavieren wurde verbliebenes DEPC zersetzt. Die Lösungen für die RNA-Isolierung wurden mit DEPC-H₂O angesetzt, um den Abbau von RNA durch exogene RNasen zu verhindern.

70 % Ethanol

Ethanol	70 % (v/v)	35 ml
H ₂ O		ad 50 ml

6.2.5.2 Isolierung der Gesamt-RNA mit dem *peqGOLD Total RNA Kit* der Firma Peqlab

Die Zellkulturversuche mit permanenten Zelllinien und primären Hepatozyten wurden wie unter 6.2.4 beschrieben durchgeführt. Die Zellkulturschalen wurden auf mit Eis gekühlte Metallplatten überführt und jeweils zwei oder drei gleich behandelte Zellkulturschalen mit insgesamt 400 µl *RNA Lysis Buffer T* versetzt. Die lysierten Zellen wurden abgeschabt und auf die *DNA Removing Column* gegeben. Es folgte eine einminütige Zentrifugation bei 12.000 x g, um DNA zu entfernen. Dieser und alle weiteren Zentrifugationsschritte erfolgten in einer Zentrifuge (Heraeus Biofuge Pico) bei Raumtemperatur. Die Säule wurde verworfen und das Filtrat, das die RNA enthielt, mit 400 µl 70 % Ethanol versetzt, durchmischt und vollständig auf eine *PerfectBind RNA Column* überführt. Während der sich anschließenden Zentrifugation für 1 min bei 10.000 x g wurde die RNA an die Säulenmatrix gebunden. Das Filtrat wurde verworfen und 500 µl des *RNA Wash Buffer I* auf die Säule pipettiert und für 1 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und es folgten zwei Waschschrte mit je 600 µl *RNA Wash Buffer II* (jeweils 30 sec, 10.000 x g). Anschließend wurde die Säulenmatrix durch zweiminütige Zentrifugation bei 10.000 x g vollständig getrocknet. Die Säule wurde in ein autoklaviertes 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesteckt und 50 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Säulenmatrix pipettiert. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die RNA durch Zentrifugation für 1 min bei 5.000 x g von der Säule eluiert. Der Durchfluss enthielt die isolierte Gesamt-RNA, die bei -70 °C gelagert wurde.

6.2.6 Isolierung von Gesamt-RNA aus primären humanen Makrophagen

6.2.6.1 Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders aufgeführt, bei -20 °C gelagert. Weitere verwendete Puffer und Lösungen wurden unter 6.2.3.1 aufgeführt.

peqGOLD TriFast

Das bereits gebrauchsfertige Trizol, bestehend aus Phenol und Guanidinisothiocyanat, wurde bei 4 °C gelagert.

DNase I-Arbeitslösung

<i>RNase-free DNase I</i>	1,5 µl
<i>DNase I Digestion Buffer</i>	ad 75 µl

Die DNase-Arbeitslösung wurde kurz vor Gebrauch aus den Bestandteilen des *peqGOLD DNase I Digest Kits* hergestellt. Ein 75 µl-Ansatz beinhaltetete 30 Kunitzeinheiten.

6.2.6.2 Isolierung der Gesamt-RNA mit *peqGOLD TriFast* und dem *peqGOLD Total RNA Kit* der Firma Peqlab

Die Zellkulturversuche mit primären humanen Makrophagen wurden wie unter 6.2.4 beschrieben durchgeführt. Die 6 well-Zellkulturplatten wurden auf mit Eis gekühlte Metallplatten überführt, jeweils zwei gleich behandelte wells mit je 250 µl *peqGOLD TriFast* versetzt und die lysierten Zellen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vereinigt. 100 µl Chloroform wurden dazu gegeben und 15 sec kräftig geschüttelt. Nach einer dreiminütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 13.000 rpm (Heraeus Biofuge fresco). Der klare, wässrige Überstand, der hauptsächlich RNA enthielt, wurde abgenommen, mit je 250 µl Isopropanol versetzt und die Lösung für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 4 °C und 13.000 rpm wurde die Lösung auf *PerfectBind RNA Column* des *peqGOLD Total RNA Kit* der Firma Peqlab überführt. Während der sich anschließenden Zentrifugation für 1 min bei 10.000 x g wurde die RNA an die Säulenmatrix gebunden. Dieser und alle weiteren Zentrifugationsschritte erfolgten in einer Zentrifuge (Heraeus Biofuge pico) bei Raumtemperatur. Das Filtrat wurde verworfen und je Säule 75 µl der DNase I-Arbeitslösung direkt auf die Säulenmatrix pipettiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur, während der die restliche DNA verdaut wurde, erfolgte eine Zugabe von 400 µl *RNA Wash Buffer I*. Während der anschließenden Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur wurde der DNase-Verdau gestoppt. Es folgte die Zentrifugation für 30 sec bei 10.000 x g. Das Filtrat wurde verworfen und es folgten zwei Waschschrte mit je 600 µl *RNA Wash Buffer II* (jeweils 30 sec, 10.000 x g). Anschließend wurde die Säulenmatrix durch zweiminütige Zentrifugation bei 10.000 x g vollständig getrocknet. Die Säule wurde in ein autoklaviertes 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesteckt und 40 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Säulenmatrix pipettiert. Nach einer fünf-

minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die RNA durch Zentrifugation für 1 min bei 5.000 x g von der Säule eluiert. Der Durchfluss enthielt die isolierte Gesamt-RNA, die bei -70 °C gelagert wurde.

6.2.7 Synthese komplementärer DNA (*complementary DNA*, cDNA)

Die Synthese komplementärer DNA wird durch das Enzym Reverse Transkriptase katalysiert. Von einem Primer ausgehend, der an der einzelsträngigen RNA bindet, synthetisiert das Enzym zunächst einen RNA-DNA-Hybridstrang. Im Folgenden wird die RNA durch die RNase-Aktivität des Enzyms abgebaut und der DNA-Doppelstrang aufgrund der DNA-abhängigen DNA-Polymeraseaktivität der Reversen Transkriptase vervollständigt. Als Primer werden Poly-dT-Nukleotide verwendet, deren Sequenz komplementär zum Poly-A-Schwanz der mRNA ist.

6.2.7.1 Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders aufgeführt, bei -20 °C gelagert. H₂O bezeichnet Nuklease-freies Reinstwasser.

Primer poly d(T)₁₂₋₁₈

Die Primer wurden in einer Konzentration von 500 ng/μl in DEPC-H₂O gelöst.

RiboLock™ RNase Inhibitor

Die RNase-Inhibitor-Lösung wurde in einer Konzentration von 40 U/μl bereits gebrauchsfertig gekauft.

RevertAid™ M-MUL V Reverse Trankriptase und RevertAid™ (H Minus) M-MUL V Reverse Trankriptase

Die Transkriptasen wurde in einer Konzentration von 20 U/μl bezogen. Die H Minus Transkriptase ist eine genetisch modifizierte M-MUL V Reverse Transkriptase, der die RNase H-Aktivität fehlt. Das Entfernen der RNase H-Aktivität erhöht die Effizienz der reversen Transkription.

5 x Reaktionspuffer für M-MUL V und (H Minus) M-MUL V RT

Die Lösung wurde bereits fertig vom Hersteller bezogen.

Tris-HCl	250 mM
KCl	250 mM
MgCl ₂	20 mM
DTT	50 mM

Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs) (10 mM)

Die dATP-, dCTP-, dGTP- und dTTP-Lösungen wurden in einer Konzentration von 100 mM vom Hersteller bezogen. Für den Mix wurden je 10 μl der Basen mit 60 μl H₂O verdünnt.

Reverse Transkriptase-Mastermix

5 x Reaktionspuffer für M-MUL V oder (H Minus) M-MUL V RT	1x	4 μl	5 x
dNTPs	2,9 mM	2 μl	10 mM
M-MUL V oder (H Minus) M-MUL V RT	200 U	1 μl	200 U/μl

6.2.7.2 Synthese komplementärer DNA (*complementary DNA*, cDNA)

Da zur Synthese komplementärer DNA für alle Proben eines Versuchs immer eine einheitliche Menge an RNA eingesetzt wurde, erfolgte zunächst die photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration. Dazu wurde ein Aliquot der Probe mit DEPC-H₂O 1:100 verdünnt und die Extinktion (E) bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum Purin- und Pyrimidinringe) im Photometer (Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences) gemessen. Die RNA-Konzentration wurde wie folgt berechnet:

$$RNA \left[\frac{ng}{\mu l} \right] = E_{260\text{ nm}} \times \text{Verdünnung} \times 40 \frac{ng}{\mu l}$$

Alternativ wurde die RNA unverdünnt mittels Nanodrop (NanoVue Plus, GE Healthcare) gemessen. Von beiden Geräten wurde zusätzlich photometrisch der Proteinanteil bei 280 nm (Absorptionsmaximum aromatischer Aminosäurereste) gemessen. Der Quotient aus den Extinktionen bei 260 nm und bei 280 nm ist ein Maß für die Reinheit der RNA und sollte bei einer kontaminationsfreien Probe zwischen 1,6 und 2,0 liegen.

Für die cDNA-Synthese wurden maximal 2 µg RNA eingesetzt und 1 µl Poly (dT) Primer zur Lösung pipettiert. Bei RNA-Mengen unter 1 µg wurde zusätzlich 1 µl RiboLock™ RNase Inhibitor dazu gegeben. Anschließend wurde die Lösung mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 13 µl aufgefüllt und im Thermocycler T3000 (Biometra) für 5 min bei 70 °C zur Denaturierung von Sekundärstrukturen innerhalb der RNA inkubiert. Die Wiederausbildung von Sekundärstrukturen wurde durch eine anschließende fünfminütige Kühlung bei 4 °C verhindert. Im Anschluss wurden 7 µl des Reverse Transkriptase-Mastermixes in jeden Ansatz pipettiert. Dann wurden die Ansätze 10 min bei 25 °C, 90 min bei 42 °C sowie abschließend 10 min bei 70 °C inkubiert. Während dieser Inkubation erfolgte die reverse Transkription, wobei Oligo (dT)-Primer als Startermolekül fungierten. Das Erhitzen der Ansätze auf 70 °C als letzten Schritt des Programms diente dem Beenden der Reaktion durch Denaturierung des Enzyms. Die erhaltene cDNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

6.2.8 Genexpressionsanalyse mittels *quantitative real time polymerase chain reaction* (qPCR)

Das Verfahren der qPCR (*quantitative real time polymerase chain reaction*) ermöglicht die exponentielle Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte mithilfe einer DNA-Polymerase und die anschließende Quantifizierung der amplifizierten DNA. Hierfür wird der asymmetrische Cyaninfarbstoff *SYBR Green I* genutzt, der mit doppelsträngiger DNA interkaliert und fluoresziert. Die während des Durchlaufens der qPCR-Zyklen synthetisierten doppelsträngigen qPCR-Produkte können daher anhand der Zunahme der Stärke des Fluoreszenzsignals erfasst werden. Unter der Annahme einer Effizienz von 100 % verdoppelt sich in jedem qPCR-Zyklus die Menge der amplifizierten Produkte und die Stärke des Fluoreszenzsignals steigt in gleichem Maße. Der Schwellenwertzyklus (*Cycle threshold*, Ct) bezeichnet den qPCR-Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal erstmals die Hintergrundfluoreszenz übersteigt und die exponentielle Phase beginnt. In der exponentiellen Phase der qPCR besteht ein direkter proportionaler Zusammenhang zwischen der Ausgangsmenge des DNA-Abschnitts und der amplifizierten Produktmenge. Daher kann anhand des Ct-Werts eine quantitative Aussage über die Ausgangsmenge der Zielsequenz des zu untersuchenden Gens getroffen werden.

Der qPCR schloss sich eine Schmelzkurvenanalyse an, um die Reinheit und Spezifität der amplifizierten qPCR-Produkte zu beurteilen. Der Fluoreszenzfarbstoff lagert sich in alle entstandenen doppelsträngigen DNA-Fragmente ein, das heißt sowohl in die korrekten Produkte als auch in unspezifische Artefakte. Durch kontinuierliche Temperaturerhöhung von 65 °C auf 95 °C wurde die DNA langsam aufgeschmolzen. Bei der spezifischen Schmelztemperatur des entstandenen Fragments entstehen zwei Einzelstränge und der Farbstoff wurde freigesetzt, sodass eine Abnahme des Signals erfasst werden kann. qPCR-Produkte haben eine höhere Schmelztemperatur als beispielsweise kurze Primer-Dimere, sodass eine Unterscheidung zu unspezifischen Fragmenten möglich wird.

6.2.8.1 Puffer und Lösungen

Wasser bezeichnet im Folgenden immer Nuklease-freies Reinstwasser.

Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2 x)

Der Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2 x) von Thermo Scientific beinhaltet eine Hitze-aktivierte Taq-DNA-Polymerase, dNTPs, den Farbstoff SYBR® Green I und einen Mg²⁺-haltigen qPCR-Puffer, über dessen Zusammensetzung der Hersteller keine Angaben machte.

Oligonukleotide

Die Sequenzen der Oligonukleotide und ihre entsprechenden Annealingtemperaturen wurden unter 6.1.8 aufgeführt.

6.2.8.2 Genexpressionsanalyse mittels *quantitative real time polymerase chain reaction* (qPCR)

Die qPCR wurde in einer 96 well-Platte durchgeführt. Zunächst wurde die zuvor synthetisierte cDNA 1:15 mit Wasser verdünnt. Es wurden 4,5 µl dieser cDNA-Verdünnung pro well in eine 96 well-Platte vorgelegt. Für einen qPCR-Ansatz wurden 5 µl Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2 x) und je 0,25 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer (Stammlösung 10 µM; Endkonzentration 0,25 µM) gemischt und 5,5 µl dieses qPCR-Mixes in jedes well zu der cDNA-Verdünnung pipettiert. Für jede Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die qPCR wurde im C1000™ Thermal Cycler mit dem CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad) unter den Bedingungen, die in Tabelle 3 zusammengefasst sind, durchgeführt. Einzige Ausnahme stellt die Analyse des Gens für das humane IL-18 dar: 10 min initiale Denaturierung bei 95 °C, 20 sec Denaturierung bei 95 °C, 20 sec Annealing bei 48 °C, 30 sec Elongation bei 72 °C, 10 sec Termination bei 95 °C, wobei Denaturierung, Annealing und Elongation zyklisch 40 x wiederholt wurden. Anschließend erfolgte die Schmelzkurvenanalyse, wie in Tabelle 3 aufgeführt.

6.2.8.3 Auswertung

Für die Quantifizierung der qPCR stehen zwei generelle Strategien zur Verfügung: die absolute und die relative Quantifizierung [293, 294].

Für die relative Quantifizierung der Genexpression wurde die Expression des Zielgens auf ein Referenzgen (β-Aktin für Zellversuche mit permanenten Zelllinien und primären Hepatozyten der Ratten) oder mehrere Referenzgene (β-Aktin, HPRT und GAPDH für Zellversuche mit primären humanen Makrophagen) bezogen. Die Normalisierung mittels Referenzgen, dessen Expression durch die gewählten Versuchsbedingungen nicht verändert wird, dient der Korrektur von Unterschieden in der Effizienz der RNA-Reinigung und cDNA-Synthese.

Die Berechnung des Vielfachen der Expression des untersuchten Gens im Verhältnis zur Genexpression in einer unbehandelten Kontrollprobe erfolgt nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode:

$$n - \text{fache Induktion} = \frac{2^{ct \text{ Zielgen (Kontrolle)} - ct \text{ Zielgen (behandelt)}}}{2^{ct \text{ Referenzgen (Kontrolle)} - ct \text{ Referenzgen (behandelt)}}$$

Die absolute Quantifizierung der EP-Rezeptoren in permanenten Zelllinien erfolgte anhand von Kalibrierungsgeraden. Dazu wurden Verdünnungsreihen von Plasmiden, die die kodierende Sequenz der verschiedenen EP-Rezeptoren sowie des Referenzgens β-Aktin tragen, hergestellt. Anhand der DNA-Konzentration und der bekannten Größe der Plasmide konnte die Kopienzahl pro µl berechnet und 10¹-10⁶ Kopien für die EP-Rezeptoren bzw. 10³-10⁸ Kopien für β-Aktin in die qPCR eingesetzt werden. Mithilfe der Standardgeraden, welche von Anne Schraplau im Rahmen ihrer Doktorarbeit hergestellt wurden [291], erfolgte die Berechnung der Kopienzahl der EP-Rezeptoren sowie die Kopienzahl von β-Aktin in den Zellen. Die Bildung des Quotienten diente der Normalisierung. Zur besseren Darstellung wurde mit dem Faktor 100.000 multipliziert.

Tabelle 3: Bedingungen der Genexpressionsanalyse mittels quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR)

Gene		Aktin (Mensch) Aktin (Ratte)	COX2 (Mensch)	Glukokinase (Ratte) IL-1 β (Mensch) IL-6 (Mensch) Insulinrezeptor (Mensch) mPGES1 (Mensch) OSM (Mensch) SOCS3 (Ratte)	Aktin (Mensch) EP1-Rezeptor (Mensch) EP2-Rezeptor (Mensch) EP3-Rezeptor (Mensch) EP4-Rezeptor (Mensch)	FADS2 (Mensch)	ELOVL5 (Mensch) FADS1 (Mensch)	c-FOS (Mensch) c-Jun (Mensch)	CCL2 (Mensch) IL-8 (Mensch) Serin-Palmitoyl- transferase 1 (Mensch) Serin-Palmitoyl- transferase 2 (Mensch) TLR4 (Mensch) TNF α (Mensch)	RIP140 (Mensch)
T_{Annealing}		60 °C	60 °C	60 °C	60 °C	60 °C	59 °C	58 °C	57 °C	55 °C
Reaktions- schritte	Temperatur	Dauer	Dauer	Dauer	Dauer	Dauer	Dauer	Dauer	Dauer	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min
2. Denaturierung	95 °C	20 sec	20 sec	20 sec	20 sec	20 sec	20 sec	20 sec	20 sec	20 sec
3. Annealing	siehe T _{Annealing}	20 sec	25 sec	25 sec	25 sec	25 sec	30 sec	30 sec	20 sec	30 sec
4. Elongation	72 °C	30 sec	30 sec	30 sec	30 sec	30 sec	20 sec	20 sec	20 sec	20 sec
5. Termination	95 °C	10 sec	10 sec	10 sec	10 sec	10 sec	10 sec	10 sec	10 sec	10 sec
6. Schmelz- kurvenanalyse	(65 °C bis 95 °C; in 0,5 °C-Schritten für je 5 sec)									

50 x

6.2.9 Agarosegelelektrophorese

6.2.9.1 Puffer und Lösungen

Wasser bezeichnet im Folgenden immer autoklaviertes Reinstwasser.

10 x TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer

Tris	0,5 M	16,56 g
Natriumacetat	0,2 M	16,40 g
EDTA	0,02 M	7,44 g
H ₂ O		ad 1.000 ml

Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf pH 8,0 eingestellt. Der Puffer wurde autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

1 x TAE-Puffer

10 x TAE-Puffer	1 x	100 ml	10 x-Stlsg.
H ₂ O		ad 1.000 ml	

2 % Agarose in TAE-Puffer

Agarose	2 %	3 g
1 x TAE-Puffer		150 ml

Ethidiumbromid-Färbebad

Ethidiumbromid-Lösung	2,5 µg/ml	100 µl	10 mg/ml.
1 x TAE-Puffer		400 ml	

6 x Orange Loading Dye

Die Lösung wurde bereits fertig gekauft.

Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder und Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder

Die Lösungen wurde bereits fertig gekauft und dienen der Bestimmung der DNA-Fragmentlänge durch Vergleich mit einem DNA-Längenstandard.

Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese

DNA-Moleküle unterschiedlicher Größe können mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt werden. Das Agarosegel ist ein komplexes Netzwerk an polymeren Molekülen, dessen Porengröße von der Agarosekonzentration abhängt und das die Diffusion von DNA-Molekülen herabsetzt. Die negativ geladenen DNA-Moleküle wandern in einem elektrischen Feld durch die Gelmatrix. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt von der Größe der DNA-Moleküle ab. Sie ist umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer relativen Molekülmasse. Durch Vergleich mit einem DNA-Längenstandard war eine Größenbestimmung der zu analysierenden DNA-Fragmente möglich.

Dazu wurden zunächst 2 % Agarose in TAE-Puffer in einem Mikrowellengerät aufgeköcht und entgast. Die Lösung wurde auf circa 60 °C abgekühlt und in eine Flachbettkammer mit senkrecht eingesteckten Kämmen gegossen. Die Kämmen wurden nach dem Erkalten und Erstarren des Gels entfernt und das Gel in eine Laufkammer gelegt. Diese wurde mit 1 x TAE-Puffer gefüllt bis das Gel mit einer Pufferschicht bedeckt war. Zur Bestimmung der Fragmentlänge wurde eine Geltasche mit einem Längenstandard beladen. Die 10 µl qPCR-Ansätze wurden mit je 2 µl Probenpuffer 6 x *Orange Loading Dye* versetzt und je 10 µl dieses Gemischs in die Geltaschen gefüllt. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei 80 V für circa 1,5 h bis der Farbstoff des Standards die anodische Gelkante erreicht hatte. Anschließend wurde das Gel für 15–20 min in ein Ethidiumbromid-Färbebad gelegt. Ethidiumbromid ist ein aromatischer Farbstoff, der mit den Basen der DNA interkaliert. Unter UV-Licht wird Ethidiumbromid zu oranger Fluoreszenz angeregt, deren Intensität durch Interkalation mit DNA intensiviert wird. Dadurch wurden die DNA-Fragmente sichtbar gemacht und mit Hilfe des *Gel Doc EZ Gel Documentation Systems* (Bio-Rad) dokumentiert.

6.2.10 Aufarbeitung der Zellkulturversuche für die Western Blot-Analyse

6.2.10.1 Puffer und Lösungen

Protease-Inhibitoren (1.000 x)

Pefablock	200 mM	47,9 mg
Leupeptin	1 % (w/v)	10 mg
Trypsin-Inhibitor	1 % (w/v)	10 mg

Die Protease-Inhibitoren wurden jeweils in 1 ml H₂O gelöst und getrennt aliquotiert. Sie wurden bei -20 °C gelagert.

Natriumorthovanadat (Tyrosinphosphatase-Inhibitor)

Na ₃ VO ₄	200 mM	36,8 mg
H ₂ O		ad 1 ml

Der pH-Wert der Lösung wurde mit NaOH auf pH 10,0 eingestellt. Zur Aktivierung wurde die Lösung so lange auf Siedetemperatur erhitzt und wieder abgekühlt, bis ihre Farbe von gelblich nach farblos umschlug. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Lysispuffer für Western Blot

Tris/HCl (pH 7,5)	20 mM	4 ml	1 M Stlsg.
NaCl	150 mM	1,752 g	
EDTA	1 mM	400 µl	0,5 M Stlsg.
EGTA	1 mM	76 mg	
Triton X-100	1 % (v/v)	2 ml	
Natriumpyrophosphat	2,5 mM	233 mg	
β-Glycerolphosphat	1 mM	43 mg	
NaF	50 mM	420 mg	
H ₂ O		ad 200 ml	

Der pH-Wert der Lösung wurde mit 1 N HCl oder 1 M NaOH auf pH 7,5 eingestellt. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

Vor Gebrauch wurden dem Lysispuffer pro ml frisch zugesetzt:

Pefablock	200 µM	1 µl	200 mM Stlsg.
Leupeptin	10 µg/ml	1 µl	10 mg/ml Stlsg.
Trypsin-Inhibitor	10 µg/ml	1 µl	10 mg/ml Stlsg.
Na ₃ VO ₄	1 mM	5 µl	200 mM Stlsg.

Bradford-Reagenz

Serva Blue (Nr.35050)	0,01 % (w/v)	100 mg
Ethanol (95 %)	4,75 % (v/v)	50 ml
Phosphorsäure (85 %)	8,5 % (v/v)	100 ml
H ₂ O		ad 1.000 ml

Die Lösung wurde durch einen Faltenfilter filtriert und bei Raumtemperatur gelagert.

BSA-Standardlösung (1 mg/ml)

BSA	1 mg/ml	10 mg
H ₂ O		ad 10 ml

Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

5 x SDS-Probenpuffer

Tris	400 mM	4,85 g
SDS	10 % (w/v)	10,0 g
Glycerol (> 98 %)	25 % (v/v)	25,5 ml
Bromphenolblau	0,0125 % (w/v)	125 mg
H ₂ O		ad 100 ml

Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert.

4 x Probenpuffer

5 x SDS-Probenpuffer	4x	800 µl	5 x-Stlsg.
β-Mercaptoethanol	20 % (v/v)	200 µl	

Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert.

6.2.10.2 Herstellung der Zellysate

Die Zellkulturversuche mit permanenten Zelllinien und primären Hepatozyten wurden wie unter 6.2.4 beschrieben durchgeführt. Die Zellkulturschalen wurden auf mit Eis gekühlte Metallplatten überführt und jeweils zwei gleich behandelte Zellkulturschalen mit insgesamt 200 µl Lysispuffer versetzt. Die lysierten Zellen wurden abgeschabt und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, wobei die Lysate von gleich behandelten Zellkulturschalen vereinigt wurden. Zum besseren Zellaufschluss wurde die Zellsuspension für circa 10 sec mit Ultraschall homogenisiert (Ultraschallstab Bandelin UW 2070, Power 55 %, Cycle 5). Dann wurden die Zellhomogenate für 15 min bei 10.000 x g zentrifugiert (SIGMA 3K30 Zentrifuge, Rotor SIGMA 1215/4-H) und der Überstand in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Diese Zellysate wurden bei -20 °C gelagert.

6.2.10.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte nach der Methode nach Bradford [201]. Hierbei bildet der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 unter sauren Bedingungen Komplexe mit Seitenketten von Proteinen, wodurch das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 470 nm auf 595 nm verschoben wird. Der Anstieg der Absorption ist proportional zum gebundenen Farbstoff und somit zum Proteingehalt in der Probe. Für die Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford wurden die Proben 1:10 (bei permanenten Zelllinien) oder 1:100 (bei primären Hepatozyten der Ratte) in Reinstwasser verdünnt. Es wurde eine BSA-Standardreihe der Konzentrationen 0 µg/µl, 0,01 µg/µl, 0,02 µg/µl, 0,04 µg/µl, 0,06 µg/µl, 0,08 µg/µl, 0,1 µg/µl, 0,2 µg/µl in Reinstwasser hergestellt. Jeweils 20 µl der Standardreihe oder der verdünnten Proben wurden in Dreifachbestimmung in Vertiefungen einer 96 well-Mikrotiterplatte vorgelegt, mit 180 µl Bradford-Reagenz versetzt und für 10 min inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte im Plattenphotometer MRX II bei einer Wellenlänge von 570 nm. Die Proteinkonzentration der Proben wurde anhand der BSA-Standardgeraden ermittelt.

6.2.10.4 Vorbereitung der Lysat-Proben für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Lysate wurden auf einen identischen Proteingehalt mit dem Lysispuffer für Western Blot in einem Volumen von maximal 50 µl verdünnt. Es wurde 1/3 Volumen 4 x Probenpuffer zugesetzt, die Proben für 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend bei 13.000 rpm (Heraeus Biofuge pico) für 5 min zentrifugiert.

6.2.10.5 Acetonfällung

Die Überstände von permanenten Zelllinien wurden wie unter 6.2.4 beschrieben gewonnen. Um Proteine zu präzipitieren, wurden je 5 ml kaltes Aceton vorgelegt und je 1 ml des Überstandes hinzu pipettiert. Nach Inkubation der Proben bei -20 °C über Nacht erfolgte eine Zentrifugation bei 13.000 rpm (Heraeus Biofuge pico) für 5 min bei 4 °C. Anschließend wurden die Überstände verworfen und die Pellets bei Raumtemperatur getrocknet bis der Acetongeruch nicht mehr wahrzunehmen war. Die Pellets wurden in 55 µl 4 x Probenpuffer gelöst, für 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend bei 13.000 rpm (Heraeus Biofuge pico) für 5 min zentrifugiert.

6.2.11 Immunologischer Nachweis der Proteinexpression durch Western Blot-Analyse

6.2.11.1 Puffer und Lösungen

30 % Acrylamid-Stammlösung

Die Lösung wurde gebrauchsfertig bezogen und bei 4 °C gelagert.

20 % SDS-Stammlösung

Die Lösung wurde gebrauchsfertig bezogen und bei Raumtemperatur gelagert.

Trenngelpuffer

Tris	1,5 M	18,17 g	
SDS	0,4 % (w/v)	2 ml	20 %-Stlsg.
H ₂ O		ad 100 ml	

Der pH-Wert wurde auf pH 8,8 eingestellt und die Lösung bei 4 °C gelagert.

Sammelgelpuffer

Tris	0,5 M	6,1 g	
SDS	0,4 % (w/v)	2 ml	20 %-Stlsg.
H ₂ O		ad 100 ml	

Der pH-Wert wurde auf pH 6,8 eingestellt und die Lösung bei 4 °C gelagert.

10 % Ammoniumpersulfat

Ammoniumpersulfat	10 % (w/v)	1 g
H ₂ O		ad 10 ml

Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

Trenn- und Sammelgel

Trenn- und Sammelgel wurden entsprechend nachfolgender Auflistung gegossen (Ansatz pro Gel):

Trenngel			Sammelgel	
Polyacrylamid % (w/v)	10 %	12,5 %	Polyacrylamid % (w/v)	4,2 %
30 % Polyacrylamid	3 ml	3,75 ml	30 % Polyacrylamid	490 µl
Trenngelpuffer	2,25 ml	2,25 ml	Sammelgelpuffer	875 µl
H ₂ O	3,75 ml	3 ml	H ₂ O	2,1 ml
10 % Ammoniumpersulfat	75 µl	75 µl	10 % Ammoniumpersulfat	25 µl
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	9 µl	9 µl	Tetramethylethylendiamin (TEMED)	5 µl

10 x SDS-Elektrophoresepuffer

Tris	250 mM	30,3 g	
Glycin	1,91 M	144,1 g	
SDS	1 % (w/v)	50 ml	20 %-Stlsg.
H ₂ O		ad 1.000 ml	

1 x SDS-Elektrophoresepuffer

10 x SDS-Elektrophoresepuffer	1 x	200 ml	10 x-Stlsg.
H ₂ O		ad 2.000 ml	

TBS (*tris-buffered saline*)-Stammlösung (10 x)

Tris	0,2 mM	24,2 g	
NaCl	1,36 M	80,0 g	
H ₂ O		ad 1.000 ml	

Der pH-Wert wurde auf pH 7,6 eingestellt.

20 % Tween-Stammlösung

Tween® 20	20 % (v/v)	20 ml	
H ₂ O		ad 100 ml	

TBS/Tween-Puffer

TBS	1x	200 ml	10 x-Stlsg.
Tween	0,1 % (v/v)	10 ml	20 %-Stlsg.
H ₂ O		ad 2.000 ml	

2 M Glycin

Glycin	2 M	15,014 g	
H ₂ O		ad 100 ml	

Blottransferpuffer

Tris	48 mM	5,815 g	
Methanol	20 % (v/v)	200 ml	
SDS	1,3 mM	1,875 ml	20 %-Stlsg.
H ₂ O		ad 1.000 ml	

Der pH-Wert wurde mit 2 M Glycin auf pH 9,2 eingestellt.

Ponceau S-Färbelösung

Ponceau S	0,25 %	2,5 g	
Methanol	40 % (v/v)	400 ml	
Essigsäure	15 % (v/v)	150 ml	
H ₂ O		ad 1.000 ml	

Die Lösung wurde durch einen Faltenfilter filtriert.

5 % Magermilchpulver in TBS/Tween

Magermilchpulver	5 % (w/v)	5 g	
TBS/Tween-Puffer		ad 100 ml	

Die Lösung wurde vor Gebrauch frisch angesetzt und bei 4 °C gelagert.

5 % BSA in TBS/Tween

BSA	5 % (w/v)	5 g	
TBS/Tween-Puffer		ad 100 ml	

Die Lösung wurde bei -20 °C gelagert.

PageRuler Prestained Protein Ladder

Die Lösung wurde gebrauchsfertig bezogen und bei -20 °C gelagert.

6.2.11.2 Vorbereitung der Polyacrylamidgele und Durchführung der SDS-Polyacrylamidgелеlektrophorese

Die diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese dient der analytischen Trennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts. Es wurde das Elektrophoresesystem Mini Protein Tetra der Firma Bio-Rad verwendet. Die Gele hatten eine Größe von 8,5 x 5,5 cm und eine Stärke von 1 mm. Die Glasplatten wurden mit Aceton gereinigt und das System entsprechend den Herstellerangaben zusammengesetzt. Die Trenngel-Lösung wurde bis zu einer Höhe von 5,5 cm zwischen die Glasplatten gefüllt und mit Wasser-gesättigtem Isopropanol zur Glättung der Oberfläche überschichtet. Nach 20-minütiger Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt, die Gelkante mit Wasser gespült und Flüssigkeitsrückstände mit Filterpapier vollständig entfernt. Anschließend wurde die Sammelgel-Lösung bis zur oberen Kante der Glasplatten auf das Trenngel gegossen und zügig der Probenkamm luftblasenfrei eingesetzt. Nach Polymerisation wurde das Gel in die Elektrophoresekammer gesetzt, diese mit 1 x Elektrophoresepuffer gefüllt und der Probenkamm aus dem Gel gezogen. Die Geltaschen wurden nun mit den vorbereiteten Proben oder 5 µl des Proteinlängensstandards *PageRuler Prestained Protein Ladder* beladen. Die Elektrophorese wurde mit 80 V im Sammelgel bzw. 100 V im Trenngel durchgeführt und beendet als die Bromphenolblau-Lauffront aus dem unteren Teil des Gels ausgetreten war.

6.2.11.3 Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran durch Western Blot

Das Gel wurde aus der Elektrophoresekammer genommen und das Sammelgel abgetrennt. Die zugeschnittene PVDF-Membran wurde mit Methanol benetzt und ebenso wie das Trenngel für 15 min schwenkend im Blottransferpuffer äquilibriert. Der Transfer der aufgetrennten Proteine auf die Membran erfolgte mithilfe des *Semi-Dry-Blotsystems Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell* der Firma Bio-Rad. Der Blotaufbau erfolgte auf der Anodenplatte. Es wurden vier zugeschnittene Filterpapiere in Blottransferpuffer angefeuchtet und luftblasenfrei übereinandergeschichtet. Danach wurden die PVDF-Membran und anschließend das Gel vorsichtig aufgelegt. Abschließend wurden vier in Blottransferpuffer angefeuchtete Filterpapiere übereinander auf das Gel geschichtet. Überschüssige Flüssigkeit oder verbliebene Luftblasen wurden entfernt, indem mit einem Glasröhrchen unter leichtem Druck über das oberste Filterpapier gerollt wurde, sodass die Blotschichten komprimiert wurden. Mit Zellstoff wurde überschüssiger Puffer entfernt und die Kathodenplatte aufgelegt. Der Proteintransfer erfolgte in der Regel bei konstanter Stromstärke von 1,2 mA/cm² Gelfläche (56 mA/Gel) über einen Zeitraum von 45 min. Die einzige Ausnahme stellte der Proteintransfer von kB und phospho-kB dar, welcher lediglich über einen Zeitraum von 30 min durchgeführt wurde.

6.2.11.4 Nachweis der Proteine durch Ponceau-S-Färbung

Um einen erfolgreichen Transfer der Proteine auf die Membran zu überprüfen, wurde diese nach Ende des Blotvorgangs kurz in Ponceau-S-Färbelösung geschwenkt und durch reversible Bindung des Azofarbstoffs an Aminogruppen die Proteinbanden angefärbt. Die Hintergrundfärbung wurde durch mehrmaliges Spülen mit Wasser verringert. Eine vollständige Entfärbung erfolgte durch Waschen in TBS/Tween-Puffer.

6.2.11.5 Immunologischer Nachweis der Proteine durch Peroxidase-vermittelte Chemilumineszenzreaktion

Die Membran wurde für 60 min bei Raumtemperatur in 5 % Magermilchpulver in TBS/Tween geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min in TBS/Tween-Puffer gewaschen und über Nacht bei 4 °C mit dem Erstantikörper inkubiert (Tabelle 4). Am darauffolgenden Tag wurde die Membran dreimal 10 min in TBS/Tween-Puffer gewaschen und für 2 h bei Raumtemperatur mit dem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert (Tabelle 4). Ziege-anti-Maus-IgG-HRP-Konjugat und Ziege-anti-Kaninchen-IgG-HRP-Konjugat von Bio-Rad wurden 1:1.000 in 5 % Magermilchpulver in TBS/Tween verdünnt. Pferd-anti-Maus-IgG-HRP-Konjugat und Ziege-anti-Kaninchen-IgG-HRP-Konjugat von Cell Signaling wurden 1:1.000 in 5 % BSA in TBS/Tween verdünnt. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS/Tween-Puffer gewaschen. Es folgte der Nachweis der spezifischen Proteinbanden durch Chemilumineszenzreaktion. Das Chemilumineszenzsubstrat *Clarity™ Western ECL Blotting Substrate* oder *Clarity™ Max Western ECL Blotting Substrate* von Bio-Rad wurde vor Gebrauch frisch ange-setzt. Dazu wurden Lösung 1 und Lösung 2 zu gleichen Teilen gemischt (Endvolumen 2 ml pro 93,5 cm² Membran), das Gemisch gleichmäßig auf der Membran verteilt und diese schwenkend für 5 min inkubiert. Überschüssiges Substrat wurde abgenommen und die Membran in Folie eingeschlagen. Die Chemilumineszenz wurde anschließend mit dem *ChemiDoc™*-System der Firma Bio-Rad

detektiert. Die Auswertung erfolgte anhand von Bildern, auf denen die Proteinbanden deutlich sichtbar, jedoch das Signal noch nicht gesättigt war. Mithilfe der Software *ImageLab* (Bio-Rad) wurde die Bandenintensität ermittelt (in Int/cm²) und die Hintergrundfärbung der Membran abgezogen. Die Bandenintensität des Zielproteins wurde anhand der Bandenintensität des Referenzproteins normalisiert.

Tabelle 4: Erst- und Zweitantikörper für die Western Blot-Analyse

Erstantikörper	Verdünnung in 5 % BSA in TBS/Tween	Zweitantikörper	Polyacrylamid % (w/v) im Trenngel
β-Aktin	1:2.000	Ziege-anti-Kaninchen	10
Akt	1:1.000	Ziege-anti-Kaninchen	10
COX2	1:1.000	Esel-anti-Ziege	10
GAPDH	1:1.000	Ziege-anti-Kaninchen	10
IκBα	1:1.000	Ziege-anti-Kaninchen	12,5
IKKα	1:1.000	Ziege-anti-Kaninchen	10
IKKβ	1:1.000	Ziege-anti-Kaninchen	10
IL-1β	1:1.000	Pferd-anti-Maus	10
IRS-1	1:1.000	Ziege-anti-Kaninchen	10
phospho-Akt (Ser473)	1:1.000	Ziege-anti-Kaninchen	10
phospho-IκBα (Ser32/36)	1:1.000	Pferd-anti-Maus	12,5
phospho-IKKα/β (S176/180)	1:1.000	Ziege-anti-Kaninchen	10
phospho-IRS-1 (Ser636/639)	1:1.000	Ziege-anti-Kaninchen	10
phospho-IRS-1 (Ser307)	1:1.000	Ziege-anti-Kaninchen	10
phospho-p44/42 MAP-Kinase (Thr202/Tyr204)	1:1.000	Pferd-anti-Maus	10
p44/42 MAP-Kinase	1:1.000	Ziege-anti-Kaninchen	10
phospho-STAT3 (Tyr705)	1:1.000	Ziege-anti-Kaninchen	10
STAT3	1:1.000	Pferd-anti-Maus	10

6.2.12 Immunologischer Nachweis der IL-8- bzw. IL-1β-Proteinexpression durch Sandwich-ELISA

6.2.12.1 Prinzip

Die Zytokine IL-8 und IL-1β wurden in Zellkulturüberständen von U937- und THP-1-Makrophagen mittels Sandwich-ELISA nachgewiesen. In diesem Verfahren binden die zu detektierenden Zielantigene an Antikörper, die an eine Mikrotiterplatte gebunden sind. Anschließend bindet ein zweiter Enzym-konjugierter Antikörper an das Zielantigen. Die Substratumsetzung, die durch das Enzym katalysiert wird, dient dem Nachweis des Antigen-Antikörper-Komplexes.

6.2.12.2 Puffer und Lösungen

Wasser bezeichnet im Folgenden immer autoklaviertes Reinstwasser.

Human IL-8 ELISA Ready-SET-Go!TM Kit bzw. Human IL-1β ELISA Ready-SET-Go!TM Kit

Der Nachweis der Proteine IL-8 und IL-1β erfolgte mit dem *Human IL-8 ELISA Ready-SET-Go!TM Kit* bzw. *Human IL-1β ELISA Ready-SET-Go!TM Kit* der Firma Life Technologies. Es wurden die im Kit enthaltenen 96 well-Platten (Corning Costar 9018) sowie die gebrauchsfertige Tetramethylbenzidine-Substratlösung verwendet. Die im Kit enthaltenen konzentrierten Stammlösungen von *Coating Buffer* (10x), *ELISA/ELISASPOT Diluent* (5x), *Capture Antibody* (10x), *Detection Antibody* (250x), und *Enzyme* (250x) wurden direkt vor Gebrauch verdünnt. Der Standard rekombinantes humanes IL-8 bzw. rekombinantes humanes IL-1β war lyophilisiert und wurde direkt vor Gebrauch gelöst. Das Kit wurde bei 4 °C gelagert.

Coating Buffer (1x)

Coating Buffer	1x	1 ml	10 x-Stlsg.
H ₂ O		ad 10 ml	

ELISA/ELISASPOT Diluent (1x)

ELISA/ELISASPOT Diluent	1x	20 ml	5 x-Stlsg.
H ₂ O		ad 100 ml	

Capture Antibody (1x)

Capture Antibody	1x	40 µl	250 x-Stlsg.
Coating Buffer		10 ml	1 x

Detection Antibody (1x)

Detection Antibody	1x	40 µl	250 x-Stlsg.
ELISA/ELISASPOT Diluent		10 ml	1 x

Avidin-HRP-Enzyme (1x)

Avidin-HRP	1x	40 µl	250 x-Stlsg.
ELISA/ELISASPOT Diluent		10 ml	1 x

Rekombinates humanes IL-8 (250 pg/ml)

Rekombinantes humanes IL-8 diente als Standard. Es wurden 1 ml autoklaviertes Reinstwasser zum Lyophilisat gegeben und 15 min inkubiert. Nach kurzem Vortexen wurden 10 µl Standard zu 590 µl einfach konzentriertem *ELISA/ELISASPOT Diluent* pipettiert, um eine Konzentration von 250 pg/ml zu erhalten.

Rekombinates humanes IL-1β (150 pg/ml)

Rekombinantes humanes IL-1β diente als Standard. Es wurden 700 µl autoklaviertes Reinstwasser zum Lyophilisat gegeben und 15 min inkubiert. Nach kurzem Vortexen wurden 2 µl Standard zu 198 µl einfach konzentriertem *ELISA/ELISASPOT Diluent* pipettiert, um eine Konzentration von 150 pg/ml zu erhalten.

PBS-Stammlösung (1x)

Die Stammlösung wurde gemäß 6.2.4.1 hergestellt.

Tween 20-Stammlösung (20 %)

Die Stammlösung wurde gemäß 6.2.11.1 hergestellt.

Waschpuffer

Tween 20	0,05 %	2,5 ml	20 %-Stlsg.
PBS		Ad 1.000 ml	1 x

Stopplösung

H ₃ PO ₄	1 M	678 µl	85 %-Stlsg.
H ₂ O		ad 10 ml	

6.2.12.3 Bestimmung von IL-8 mit dem *Human IL-8 ELISA Ready-SET-Go!*TM Kit bzw. IL-1 β mit dem *Human IL-1 β ELISA Ready-SET-Go!*TM Kit

Die Zellkulturüberstände von permanenten Zelllinien wurden wie unter 6.2.4 beschrieben gewonnen. Die im Kit enthaltenen 96 well-Platten wurden über Nacht bei 4 °C mit je 100 μ l/well *Capture Antibody* inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte dreimal mit je 1 min Einwirkzeit des Waschpuffer gewaschen, um nicht an der Platte gebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation mit je 200 μ l/well *ELISA/ELISASPOT Diluent* bei Raumtemperatur und danach ein einmaliges Waschen mit Waschpuffer. Für die Bestimmung des Proteingehalts wurden die Proben unverdünnt (für IL-1 β -Bestimmung in primären humanen Makrophagen und teilweise in U937-Makrophagen), 1:5 (teilweise für IL-1 β -Bestimmung in U937-Makrophagen) und 1:500 (für IL-8-Bestimmung) in *ELISA/ELISASPOT Diluent* verdünnt. Es wurden eine IL-8-Standardreihe der Konzentrationen 0 pg/ml, 2 pg/ml, 3,9 pg/ml, 7,8 pg/ml, 15,6 pg/ml, 31,25 pg/ml, 62,5 pg/ml, 125 pg/ml und 250 pg/ml und eine IL-1 β -Standardreihe der Konzentrationen 0 pg/ml, 2,3 pg/ml, 4,7 pg/ml, 9,4 pg/ml, 18,8 pg/ml, 37,5 pg/ml, 75 pg/ml und 150 pg/ml in *ELISA/ELISASPOT Diluent* hergestellt. Jeweils 100 μ l/well der Standardreihe oder der verdünnten Proben wurden in Einfachbestimmung auf die 96 well-Platte pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit je 1 min Einwirkzeit des Waschpuffers wurden jeweils 100 μ l/well *Detection Antibody* in die 96 well-Platte pipettiert und diese eine Stunde inkubiert. Dieser sowie alle weiteren Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Platte erneut fünfmal gewaschen, wobei der Waschpuffer zwischendurch je 1 min einwirkte. Nach 30-minütiger Inkubation mit 100 μ l/well *Enzyme* erfolgte siebenmaliges Waschen mit je 1,5-minütiger Einwirkzeit des Waschpuffers. 100 μ l/well Tetramethylbenzidine-Substratlösung wurden auf die Platte pipettiert und diese 15 min inkubiert bevor die Nachweisreaktion mit 50 μ l/well Stopplösung beendet wurde. Die Messung der Absorption erfolgte im Plattenphotometer FLUOstar Omega (BMGlabtech, Ortenberg) bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden anhand der Standardgeraden ermittelt. Für die Datenauswertung erfolgte eine Korrektur mit der Absorption bei einer Wellenlänge von 570 nm. Die IL-8-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen wurden anhand der 5-Parameter-Regression und die IL-1 β -Konzentrationen anhand der Regression log-transformierter Daten mit den bekannten Konzentrationen der Standardreihen berechnet.

6.2.13 Immunologischer Nachweis der Prostaglandin E₂-Expression durch Kompetitions-ELISA

6.2.13.1 Prinzip

PGE₂ wurden in Zellkulturüberständen von U937- und THP-1-Makrophagen mittels Kompetitions-ELISA nachgewiesen. In diesem Verfahren konkurrieren das nicht markierte Zielantigen aus der zu untersuchenden Probe mit einem Enzym-konjugierten Zielantigen. Je höher die Konzentration des Zielantigens in der Probe ist, desto weniger markierte Zielantigene können an Antikörper auf der Mikrotiterplatte binden. In der anschließenden Nachweisreaktion ist die Menge an umgesetzten Substrat daher indirekt proportional zur Konzentration des Zielantigens in der zu untersuchenden Probe.

6.2.13.2 Puffer und Lösungen

Wasser bezeichnet im Folgenden immer autoklaviertes Reinstwasser.

Prostaglandin E₂ ELISA Kit

Der Nachweis des Lipidmediators Prostaglandin (PG) E₂ erfolgte mit dem Prostaglandin E₂ ELISA Kit der Firma Cayman Chemical. Es wurden die im Kit enthaltenen Ziege-anti-Maus IgG-beschichteten 96 well-Platten sowie die gebrauchsfertigen Lösungen Polysorbat 20, *ELISA Tracer Dye* und *ELISA Antiserum Dye* verwendet. Die im Kit enthaltenen konzentrierten Stammlösungen von ELISA-Puffer (10x) und Waschpuffer (400x) wurden direkt vor Gebrauch verdünnt. Der PGE₂ ELISA-Standard, *PGE₂ AchE Tracer*, PGE₂ monoklonaler Antikörper und Ellman's Reagenz waren lyophilisiert und wurden direkt vor Gebrauch gelöst. Das Kit wurde bei 4 °C gelagert.

Prostaglandin E₂ AchE Tracer

Es wurden 6 ml ELISA Puffer zum *Prostaglandin E₂ AchE Tracer*-Lyophilisat (100 dnt) gegeben. Nach kurzem Vortexen wurden 60 μ l *Tracer Dye* dazu pipettiert.

Detection Antibody

Es wurden 6 ml ELISA-Puffer zum Lyophilisat des Prostaglandin E₂ monoklonalen Antikörpers (100 dnt) gegeben. Nach kurzem Vortexen wurden 60 µl *Antiserum Dye* dazu pipettiert.

ELISA-Puffer (1x)

ELISA Puffer	1x	1 ml	10 x-Stlsg.
H ₂ O		ad 10 ml	

Waschpuffer (1x)

Waschpuffer	1x	250 µl	400 x-Stlsg.
Polysorbate 20		50 µl	
H ₂ O		ad 100 ml	

Prostaglandin E₂ ELISA-Standard (1 ng/ml)

Prostaglandin E₂ diente als Standard und war in lyophilisierter Form im Kit enthalten. Es wurden 1 ml ELISA-Puffer zum Lyophilisat gegeben und 15 min inkubiert. Nach kurzem Vortexen wurden 50 µl Standard zu 450 µl einfach konzentriertem ELISA-Puffer pipettiert, um eine Konzentration von 1 ng/ml zu erhalten.

Ellman's Reagenz

Es wurden 1 ml ELISA-Puffer zum Ellman's Reagenz-Lyophilisat gegeben und gevortext.

6.2.13.3 Bestimmung von PGE₂ mit dem Prostaglandin E₂ ELISA Kit

Die Zellkulturüberstände von permanenten Zelllinien wurden wie unter 6.2.4 beschrieben gewonnen. Für die Bestimmung des PGE₂-Gehalts wurden die Proben 1:20 in ELISA-Puffer verdünnt. Es wurde eine PGE₂-Standardreihe der Konzentrationen 0 pg/ml, 7,8 pg/ml, 15,6 pg/ml, 31,3 pg/ml, 62,5 pg/ml, 125 pg/ml, 250 pg/ml, 500 pg/ml und 1.000 pg/ml in ELISA-Puffer hergestellt. Die im Kit enthaltenen Ziege-anti-Maus IgG-beschichteten 96 well-Platten wurden über Nacht bei 4 °C mit je 50 µl/well der Standardreihe oder verdünnten Proben in Einfachbestimmung, 50 µl/well *Prostaglandin E₂ AchE Tracer* und 50 µl/well *Detection Antibody* inkubiert. Um die unspezifische Bindung zu charakterisieren, wurden wells mit 100 µl ELISA-Puffer und 50 µl/well *Prostaglandin E₂ AchE Tracer* inkubiert. Das Blank-well und das well zur Bestimmung der totalen Aktivität blieben zunächst leer. Am nächsten Tag wurde die Platte fünfmal mit Waschpuffer gewaschen und 200 µl/well Ellman's Reagenz pipettiert. Um die totale Aktivität zu bestimmen, wurde in ein well zusätzlich 5 µl Prostaglandin E₂ AchE Tracer pipettiert. Anschließend erfolgte eine 60- bis 90-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, wobei die Platte kontinuierlich geschwenkt wurde. Die Messung der Absorption erfolgte im Plattenphotometer FLUOstar Omega (BMGlabtech, Ortenberg) bei einer Wellenlänge von 412 nm.

6.2.14 Immunologischer Nachweis der Insulinexpression durch Sandwich-ELISA**6.2.14.1 Puffer und Lösungen**

Wasser bezeichnet im Folgenden immer autoklaviertes Reinstwasser.

Rat Insulin ELISA Kit

Der Nachweis des Insulins erfolgte mit dem *Rat Insulin ELISA Kit* der Firma Chrystal Chem. Es wurden die im Kit enthaltenen Antikörper-beschichteten 96 well-Platten sowie die gebrauchsfertigen Lösungen des Enzymsubstrats Tetramethylbenzidine, der *Enzyme Reaction Stop Solution* und des *Sample Diluent* verwendet. Die im Kit enthaltene konzentrierte Stammlösung vom Waschpuffer (20x) wurde direkt vor Gebrauch verdünnt. Der Insulin-ELISA-Standard, *Guinea Pig Anti-Insulin* und *Anti-Guinea Pig Antibody Enzyme Conjugate* waren lyophilisiert und wurden direkt vor Gebrauch gelöst. Das Kit wurde bei 4 °C gelagert.

Insulin-ELISA-Standard

Es wurden 200 μ l *Sample Diluent* zum Insulin-ELISA-Standard-Lyophilisat gegeben, wodurch eine Endkonzentration von 10 ng/ml entstand.

Guinea Pig Anti-Insulin

Es wurden 6 ml *Sample Diluent* zum *Guinea Pig Anti-Insulin*-Lyophilisat gegeben. Über die Endkonzentration machte der Hersteller keine Angaben.

Anti-Guinea Pig Antibody Enzyme Conjugate

Es wurden 6 ml *Sample Diluent* zum *Anti-Guinea Pig Antibody Enzyme Conjugate*-Lyophilisat gegeben. Über die Endkonzentration machte der Hersteller keine Angaben.

Waschpuffer (1x)

Waschpuffer	1x	5 ml	20 x-Stlsg.
H ₂ O		ad 100 ml	

6.2.14.2 Bestimmung von Insulin mit dem Rat Insulin ELISA Kit

Die Zellkulturüberstände der permanenten Zelllinie U937 wurden wie unter 6.2.4 beschrieben gewonnen. Die Messung der Proben wurde von Dr. Janin Henkel in Zusammenarbeit mit der Abteilung Fettzellentwicklung und Ernährung des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung (DifE) durchgeführt. Für die Bestimmung des Insulingehalts wurden die Proben in *Sample Diluent* verdünnt. Es wurde eine Insulinstandardreihe der Konzentrationen 0 ng/ml, 0,156 ng/ml, 0,313 ng/ml, 0,625 ng/ml, 1,25 ng/ml, 2,5 ng/ml, 5 ng/ml und 10 ng/ml in *Sample Diluent* hergestellt. Die im Kit enthaltenen Antikörper-beschichteten 96 well-Platten wurden über Nacht bei 4 °C mit je 5 μ l/well der Standardreihe oder verdünnten Proben in Einfachbestimmung und 95 μ l/well *Guinea Pig Anti-Insulin* inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte dreimal gründlich mit Waschpuffer gewaschen und 100 μ l/well *Anti-Guinea Pig Antibody Enzyme Conjugate* pipettiert. Nach einstündiger Inkubation wurde die Platte fünfmal gründlich gewaschen und 30 min im Dunkeln mit 100 μ l/well des Enzym-Substrats Tetramethylbenzidine inkubiert. Anschließend wurden 100 μ l/well *Enzyme Reaction Stop Solution* hinzu pipettiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm im Plattenphotometer FLUOstar Omega (BMGLabtech, Ortenberg) gemessen. Für die Datenauswertung erfolgte eine Korrektur mit der Absorption bei einer Wellenlänge von 630 nm und die Absorption wurde gegen die log-transformierten Konzentrationen aufgetragen. Die Insulinkonzentrationen in den Zellkulturüberständen wurden anhand der bekannten Insulinkonzentrationen der Standardreihe berechnet.

6.2.15 Bestimmung von Sphingosin und Sphingosin-1-Phosphat mittels Triple-Quadrupol-Massenspektrometer**6.2.15.1 Prinzip**

Sphingosin und S1P wurden in Zellkulturlysaten von THP-1-Makrophagen mittels Triple-Quadrupol-Massenspektrometer nachgewiesen. Dieses Verfahren besteht aus einer Trennung der zu untersuchenden Verbindungen mittels HPLC und einer anschließenden massenspektrometrischen Analyse. Dafür wird die Lösung chromatografisch aufgetrennter Substanzen durch positive Elektrospray-Ionisation (ESI⁺) versprüht und ionisiert. Nach Selektion und Fragmentation der Vorläuferionen werden diese mittels *time-of-flight*-Analysator identifiziert und die zu untersuchenden Verbindungen charakterisiert und quantifiziert.

6.2.15.2 Vorbereitung und Messung der Proben

Die Zellkulturversuche mit THP-1-Makrophagen wurden wie unter 6.2.4 beschrieben durchgeführt. Die Zellkulturschalen wurden auf mit Eis gekühlte Metallplatten überführt und jeweils zwei gleich behandelte Zellkulturschalen mit insgesamt 500 μ l eisgekühltem Methanol versetzt. Die Zellen wurden abgeschabt und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, wobei die Lysate von gleich behandelten Zellkulturschalen vereinigt wurden. Die Lysate wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20 °C gelagert.

Die weitere Aufarbeitung und Messung der Proben wurde von der Abteilung Ernährungstoxikologie der Universität Potsdam durchgeführt. Die Proben wurden mit einem in Methanol gelösten internen

Standard und Chloroform versetzt und bei 48 °C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurde Kaliumhydroxid zu den Proben gegeben und diese anschließend für 2 h bei 37 °C geschüttelt. Die abgekühlten Proben wurden mit konzentrierter Essigsäure neutralisiert, gevortext und anschließend zentrifugiert. Der klare organische Überstand wurde zweimal in der SpeedVac eingeeengt und zwischendurch auf -20 °C heruntergekühlt. Am Tag der Messung wurden die Proben in einem Gemisch aus Methanol, Acetonitril, Ameisensäure und H₂O gelöst. Nach der anschließenden Zentrifugation wurden die klaren Überstände in Glasvials überführt und in einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer analysiert.

6.2.16 Luciferase-Reporterassay

Die Transfektion der primären Hepatozyten der Ratte fand wie unter 6.2.3 beschrieben statt. Die verwendeten Plasmide enthielten ein Promotorfragment, welches die Expression des Luciferasegens kontrollierte. Das Enzym Luciferase setzt in einem zweistufigen Schritt das Substrat D-Luciferin in Licht emittierendes Oxyluciferin um. Die Lichtemission ist proportional zur Luciferasekonzentration. Die Menge der in Zellhomogenaten gemessenen Luciferaseaktivität erlaubt somit Rückschlüsse auf die Aktivierung des zu untersuchenden Promotors.

6.2.16.1 Puffer und Lösungen

EDTA-Stammlösung (0,5 M) siehe 6.2.3.1

Tris-Stammlösung (1 M)

Tris	1 M	12,1 g
H ₂ O		ad 100 ml

Der pH-Wert wurde mit H₃PO₄ auf pH 7,8 eingestellt.

Tris-Stammlösung (50 mM)

Tris	50 mM	606 g
H ₂ O		ad 100 ml

Der pH-Wert wurde auf pH 7,0 eingestellt.

Luciferase-Zelllysispuffer (5x)

Tris	125 mM	12,5 ml	1 M-Stlsg.
EDTA	10 mM	2 ml	0,5 M-Stlsg.
DTT	10 mM	154,3 mg	
Glycerol	50 % (v/v)	50 ml	
Triton-X 100	5 % (v/v)	5 ml	
H ₂ O		ad 100 ml	

Die Lösung wurde bei -20 °C gelagert und unmittelbar vor Gebrauch 1:5 mit Reinstwasser verdünnt.

Glycylglycin-Stammlösung (250 mM)

Glycylglycin	250 mM	3,303 g
H ₂ O		ad 100 ml

Der pH-Wert wurde auf pH 7,8 eingestellt.

KH₂PO₄-Stammlösung (1 M)

KH ₂ PO ₄	1 M	13,609 g
H ₂ O		ad 100 ml

Der pH-Wert wurde mit KOH auf 7,8 eingestellt.

EGTA-Stammlösung (100 mM)

EGTA	100 mM	3,8 g	
H ₂ O			ad 100 ml

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt.

Luciferase-Assaypuffer

Glycylglycin	25 mM	25 ml	250 mM-Stlsg.
KH ₂ PO ₄	15 mM	3,75 ml	1 M-Stlsg.
EGTA	4 mM	10 ml	100 mM-Stlsg.
H ₂ O			ad 250 ml

Der pH-Wert wurde auf pH 7,8 eingestellt und die Lösung bei 4 °C gelagert.

MgSO₄-Stammlösung (1 M)

MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1 M	2,465 g	
H ₂ O			ad 10 ml

Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

ATP-Stammlösung (100 mM)

ATP	100 mM	605 mg	
Tris		ad 10 ml	50 mM

Die Lösung wurde in Aliquots bei -20 °C gelagert.

DTT-Stammlösung (1 M)

DTT	1 M	1,542 g	
H ₂ O			ad 10 ml

Die Lösung wurde in Aliquots bei -20 °C gelagert.

D-Luciferin-Stammlösung (100 mM)

D-Luciferin	100 mM	31,8 mg	
DTT	10 mM	10 µl	1 M-Stlsg.
Luciferase-Assaypuffer		ad 1 ml	

Die Lösung wurde in Aliquots bei -20 °C gelagert.

Firefly-Luciferase-Substrat

MgSO ₄	15 mM	75 µl	1 M-Stlsg.
ATP	1 mM	50 µl	100 mM-Stlsg.
DTT	10 mM	50 µl	1 M-Stlsg.
D-Luciferin	1 mM	50 µl	100 mM-Stlsg.
Luciferase-Assaypuffer		ad 5 ml	

Die Lösung wurde unmittelbar vor Gebrauch hergestellt.

6.2.16.2 Durchführung des Luciferase-Reporterassays

Die Zellversuche mit primären Hepatozyten der Ratte wurden wie unter 6.2.4 beschrieben durchgeführt. Die Zellkulturschalen wurden auf mit Eis gekühlte Metallplatten überführt und jeweils zwei gleich behandelte Zellkulturschalen mit insgesamt 400 µl des einfach konzentrierten Luciferase-Zelllysispuffers versetzt. Die Zellen wurden abgeschabt und das Homogenat gleicher Stimuli in 1,5 ml-Reaktionsgefäße vereinigt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Proben gevortext und für 1 min bei 13.000 rpm (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert, um Zelltrümmer zu sedimentieren. Anschließend wurden 25 µl des Überstandes in Vertiefungen einer weißen 96 well-Mikrotiterplatte vorgelegt. Die Messung der Lumineszenz erfolgte nach automatischer Zugabe von

25 µl *Firefly*-Luciferase-Substrat im Messgerät Fluostar Optima (BMG) über einen Zeitraum von 10 sec.

6.2.17 Auswertung der Daten

6.2.17.1 Auswahl der Experimente eines Versuchssets

Für die Auswertung der Versuchssets wurden, falls nicht anders angegeben, nur die Experimente berücksichtigt, die alle in einem Versuchsset untersuchten und für die Normalisierung verwendeten Stimulanzen enthielten. Alle Versuchssets, bis auf Abb. 73 in Anhang 7.5, enthalten mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

6.2.17.2 Statistik

Für die Normalisierung der Analyse der Genexpression bzw. Promotoraktivität wurde die mittlere Induzierbarkeit durch die verwendeten Stimulanzen innerhalb jedes Versuches bestimmt. Dabei wurde bei der Genexpressionsanalyse für jedes Referenzgen einzeln der Mittelwert aus den Expressionswerten (n -faches der Mediumkontrolle) aller Stimulanzen eines Versuches bestimmt und anschließend die einzelnen Expressionswerte durch den Mittelwert dividiert. Bei mehr als einem Referenzgen wurde anschließend das geometrische Mittel für jede Stimulanz gebildet. Für die Normalisierung des immunologischen Nachweises von Proteinen und Lipiden wurde die Summe aller gemessenen Dichteeinheiten bzw. berechneten Konzentrationen gebildet und anschließend die einzelnen Werte durch die Summe dividiert.

Für die so normalisierten Werte der Kontrollen wurde ein Ausreißertest nach Scrubbs durchgeführt. Versuche, deren Kontrollen als Ausreißer identifiziert wurden, wurden für die weitere Statistik nicht berücksichtigt. Anschließend wurden die Mittelwerte aller Experimente sowie Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean*, SEM) berechnet und durch den Mittelwert der Kontrolle dividiert, um einen einheitlichen Bezug auf Kontrolle=1 herzustellen.

Um signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten zweier Proben zu berechnen, wurde der zweiseitige t -Test für ungepaarte oder gepaarte Stichproben angewendet. Die zweiseitige Varianzanalyse (*Analysis of variance*, *Two-way ANOVA*) wurde durchgeführt, um signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten von vier oder mehr Stimulanzen oder Stimulanzkombinationen zu berechnen. Dabei wurde der *Dunnett's multiple comparisons test* durchgeführt, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und der *Tuckey's multiple comparisons test*, um die Proben untereinander zu vergleichen. Die Signifikanzniveaus waren *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$ und ***: $p \leq 0,001$. Die Signifikanztests wurden mit GraphPad Prism (Version 8) durchgeführt.

7 Anhang zu 3: Ergebnisse

7.1 Interaktionen

Tabelle 5: Statistische Analyse der Interaktion von Lipopolysaccharid und Insulin mittels *Two-way ANOVA*

Die humanen Zelllinien U937, THP-1 und primäre humane Makrophagen wurden mit 100 nM Insulin und/ oder 100 ng/ml LPS für 24 h behandelt. Zur Analyse einer möglichen Interaktion zwischen beiden Stimulanzen wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (*Two-way ANOVA*) durchgeführt. Die der Analyse zugrunde liegenden Daten sind in den angegebenen Abbildungen dargestellt. ns: nicht signifikant

	Interaktion LPS <> Insulin		Interaktion LPS <> Insulin		Interaktion LPS <> Insulin	
	U937	siehe	THP-1	siehe	primär	siehe
Gen						
TNF α	$p < 0,01$	Abb. 9A	ns	Abb. 11A	ns	Abb. 12A
IL-1 β	$p < 0,001$	Abb. 9B	ns	Abb. 11B	$p < 0,01$	Abb. 12B
IL-6	$p < 0,001$	Abb. 9C	$p < 0,001$	Abb. 11C	$p < 0,05$	Abb. 12C
IL-8	$p < 0,01$	Abb. 9D	ns	Abb. 11D	ns	Abb. 12D
IL-18	ns	Abb. 9E	-	-	-	-
OSM	ns	Abb. 9F	ns	Abb. 11E	-	-
CCL2	ns	Abb. 9G	-	-	ns	Abb. 12E
RIP140	ns	Abb. 14D	-	-	-	-
c-Jun	ns	Abb. 15B	-	-	-	-
c-FOS	ns	Abb. 15C	-	-	-	-
Insulinrezeptor	ns	Abb. 16A	-	-	-	-
TLR4	ns	Abb. 16B	-	-	-	-
FADS2	$p < 0,05$	Abb. 25A	ns	Abb. 27A	-	-
ELOVL5	$p < 0,05$	Abb. 25B	ns	Abb. 27B	-	-
FADS1	$p < 0,001$	Abb. 25C	ns	Abb. 27C	-	-
COX2	$p < 0,001$	Abb. 25D	ns	Abb. 27D	ns	Abb. 28A
mPGES1	ns	Abb. 25E	$p < 0,01$	Abb. 27E	ns	Abb. 28B
Protein						
Pro-IL-1 β (im Lysat)	ns	Abb. 10A	-	-	-	-
Pro-IL-1 β (im Überstand)	ns	Abb. 10B	-	-	-	-
IL-1 β (im Überstand)	$p < 0,001$	Abb. 10C	-	-	$p < 0,01$	Abb. 13
IL-8 (im Überstand)	$p < 0,05$	Abb. 10D	-	-	-	-
p-Akt/Akt (im Lysat)	ns	Abb. 14A	-	-	-	-
p-IKK β /IKK β (im Lysat)	$p < 0,01$	Abb. 14B	-	-	-	-
p-I κ B/I κ B (im Lysat)	ns	Abb. 14C	-	-	-	-
p-Erk/Erk (im Lysat)	ns	Abb. 15A	-	-	-	-
COX2/ β -Aktin (im Lysat)	$p < 0,01$	Abb. 24B	-	-	-	-
Lipidmediator						
PGE ₂ (im Überstand)	ns	Abb. 24A	$p < 0,01$	Abb. 26	-	-

Tabelle 6: Statistische Analyse der Interaktion von Palmitat und Insulin mittels *Two-way ANOVA*

Die humane Zelllinie THP-1 wurde mit 100 nM Insulin und/ oder 100 µM Palmitat für 24 h behandelt. Zur Analyse einer möglichen Interaktion zwischen beiden Stimulanzen wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (*Two-way ANOVA*) durchgeführt. Die der Analyse zugrunde liegenden Daten sind in den angegebenen Abbildungen dargestellt. ns: nicht signifikant

	Interaktion Palmitat <> Insulin	
	THP-1	siehe
Gen		
TNFα	ns	Abb. 17A
IL-1β	ns	Abb. 17B
IL-6	ns	Abb. 17C
IL-8	ns	Abb. 17D
OSM	ns	Abb. 17E
CCL2	ns	Abb. 17F
Protein		
IL-8 (im Überstand)	ns	Abb. 18

Tabelle 7: Statistische Analyse der Interaktion von Prostaglandin E₂ und Lipopolysaccharid mittels *Two-way ANOVA*

Die humanen Zelllinien U937 und THP-1 wurden mit 10 µM PGE₂ und/ oder 100 ng/ml LPS für 24 h behandelt. Zur Analyse einer möglichen Interaktion zwischen beiden Stimulanzen wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (*Two-way ANOVA*) durchgeführt. Die der Analyse zugrunde liegenden Daten sind in den angegebenen Abbildungen dargestellt. ns: nicht signifikant

	Interaktion LPS <> PGE ₂		Interaktion LPS <> PGE ₂	
	U937	siehe	THP-1	siehe
Gen				
TNFα	p < 0,001	Abb. 31A	ns	Abb. 33A
IL-1β	ns	Abb. 31B	p < 0,001	Abb. 33B
IL-6	p < 0,05	Abb. 31C	-	-
IL-8	p < 0,05	Abb. 31D	p < 0,01	Abb. 33C
OSM	ns	Abb. 31E	p < 0,001	Abb. 33D
FADS2	ns	Abb. 45A	ns	Abb. 47A
ELOVL5	ns	Abb. 45B	ns	Abb. 47B
FADS1	p < 0,05	Abb. 45C	ns	Abb. 47C
COX2	ns	Abb. 45D	p < 0,001	Abb. 47D
mPGES1	p < 0,001	Abb. 45E	p < 0,001	Abb. 47E
Protein				
IL-1β (im Überstand)	ns	Abb. 32A		
IL-8 (im Überstand)	ns	Abb. 32B	-	-
COX2/β-Aktin	ns	Abb. 46	-	-

Tabelle 8: Statistische Analyse der Interaktion von Lipopolysaccharid, Insulin und Prostaglandin E₂ mittels *Two-way ANOVA*

Die humanen Zelllinien U937 und THP-1 wurden mit 100 nM Insulin, 100 ng/ml LPS und/ oder 10 µM PGE₂ für 24 h behandelt. Zur Analyse einer möglichen Interaktion zwischen den drei Stimulanzen wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (*Two-way ANOVA*) durchgeführt. Die der Analyse zugrunde liegenden Daten sind in den angegebenen Abbildungen dargestellt. ns: nicht signifikant

	Interaktion Ins <> LPS <> PGE ₂		Interaktion Ins <> LPS <> PGE ₂	
	U937	siehe	THP-1	siehe
Gen				
TNFα	p < 0,001	Abb. 34A	p < 0,05	Abb. 36A
IL-1β	ns	Abb. 34B	ns	Abb. 36B
IL-6	p < 0,01	Abb. 34C	-	-
IL-8	ns	Abb. 34D	ns	Abb. 36C
OSM	ns	Abb. 34E	ns	Abb. 36D
FADS2	ns	Abb. 48A	ns	Abb. 50A
ELOVL5	p < 0,05	Abb. 48B	p < 0,01	Abb. 50B
FADS1	ns	Abb. 48C	p < 0,01	Abb. 50C
COX2	ns	Abb. 48D	ns	Abb. 50D
mPGES1	ns	Abb. 48E	ns	Abb. 50E
Protein				
IL-1β (im Überstand)	ns	Abb. 35A		
IL-8 (im Überstand)	ns	Abb. 35B	-	-
COX2/β-Aktin	ns	Abb. 49	-	-

Tabelle 9: Statistische Analyse der Interaktion von Palmitat und Prostaglandin E₂ bzw. EP4-Rezeptor-Agonisten mittels *Two-way ANOVA*

Die humane Zelllinie THP-1 wurde mit 100 µM Palmitat und/ oder 10 µM PGE₂ bzw. 1 µM EP4-Rezeptor-Agonist für 24 h behandelt. Zur Analyse einer möglichen Interaktion zwischen beiden Stimulanzen wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (*Two-way ANOVA*) durchgeführt. Die der Analyse zugrunde liegenden Daten sind in den angegebenen Abbildungen dargestellt. ns: nicht signifikant

	Interaktion Palmitat <> PGE ₂ / EP4-Rezeptor-Agonist	
	THP-1	siehe
Gen		
TNFα	ns	Abb. 38A
IL-1β	p < 0,01	Abb. 38B
IL-8	p < 0,001	Abb. 38C
IL-8	p < 0,05	Abb. 41C
OSM	ns	Abb. 38D
CCL2	ns	Abb. 38E
TLR4	ns	Abb. 42A
Serin-Palmitoyl- transferase 1	ns	Abb. 44A
Serin-Palmitoyl- transferase 2	ns	Abb. 44B
FADS2	ns	Abb. 52A
ELOVL5	ns	Abb. 52B
FADS1	ns	Abb. 52C
COX2	p < 0,05	Abb. 52D
mPGES1	ns	Abb. 52E
Protein		
IL-8 (im Überstand)	ns	Abb. 39
COX2/β-Aktin	ns	Abb. 53B
Lipidmediator		
Sphingosin	ns	Abb. 44C
S1P	ns	Abb. 44D
PGE ₂	ns	Abb. 53A

7.2 Anhang zu 3.1: Insulin-induzierte Steigerung der basalen und Stimulus-abhängigen Expression pro-inflammatorischer Zytokine in Makrophagen

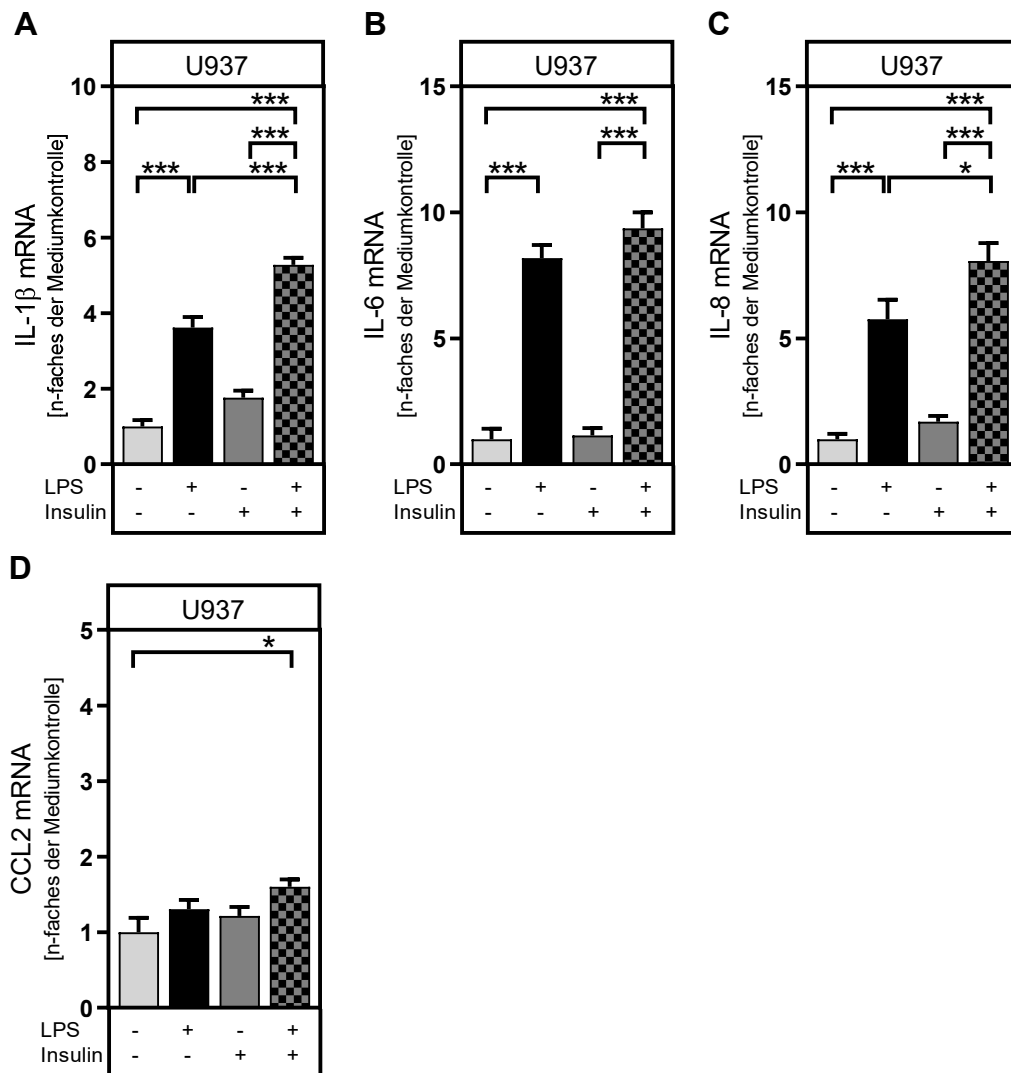


Abb. 64: Einfluss von 10 nM Insulin auf die Lipopolysaccharid-abhängige mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in U937-Makrophagen

Die humane Zelllinie U937 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 10 nM Insulin und/ oder 100 ng/ml LPS für 24 h. Zusätzlich erfolgte die Zugabe von 10 nM Insulin zu den Zeitpunkten 12 h, 16 h und 20 h nach Stimulationsbeginn. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. Auswertung: Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet und für die mittlere Induzierbarkeit durch Insulin, LPS und LPS + Insulin innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente berücksichtigt, die alle in diesem Versuchssatz mit einbezogenen Stimulanzen und Stimulanzkombinationen (Insulin, LPS und Insulin + LPS) enthielten. Darstellung: Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 5 unabhängigen Experimenten. Statistik: Two-way ANOVA mit *Dunnnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; *: $p \leq 0,05$; ***: $p \leq 0,001$.

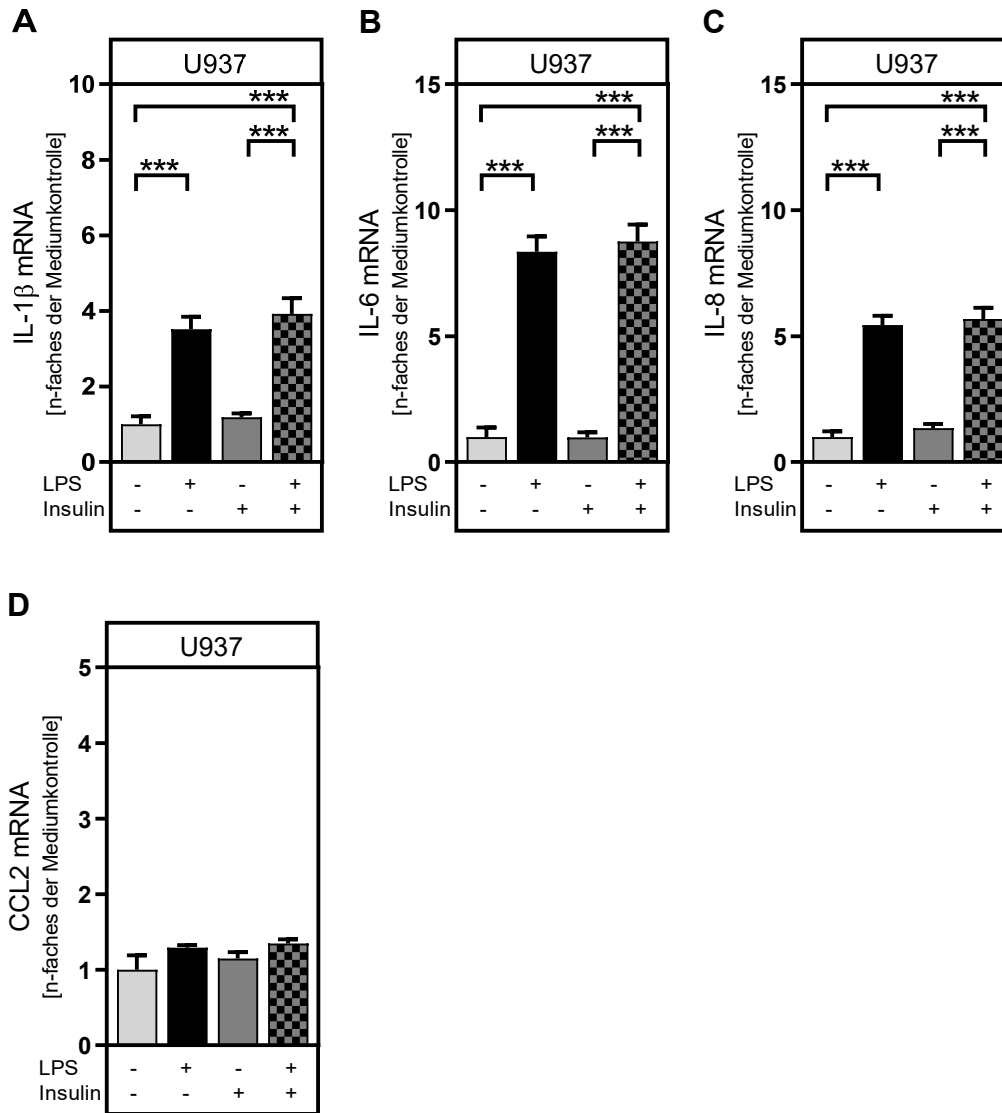


Abb. 65: Einfluss von 1 nM Insulin auf die Lipopolysaccharid-abhängige mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in U937-Makrophagen

Die humane Zelllinie U937 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 1 nM Insulin und/ oder 100 ng/ml LPS für 24 h. Zusätzlich erfolgte die Zugabe von 1 nM Insulin zu den Zeitpunkten 12 h, 16 h und 20 h nach Stimulationsbeginn. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. Auswertung: Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet und für die mittlere Induzierbarkeit durch Insulin, LPS und LPS + Insulin innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente berücksichtigt, die alle in diesem Versuchssatz mit einbezogenen Stimulanzen und Stimulanzkombinationen (Insulin, LPS und Insulin + LPS) enthielten. Darstellung: Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 5 unabhängigen Experimenten. Statistik: *Two-way ANOVA* mit *Dunnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; ***: $p \leq 0,001$.

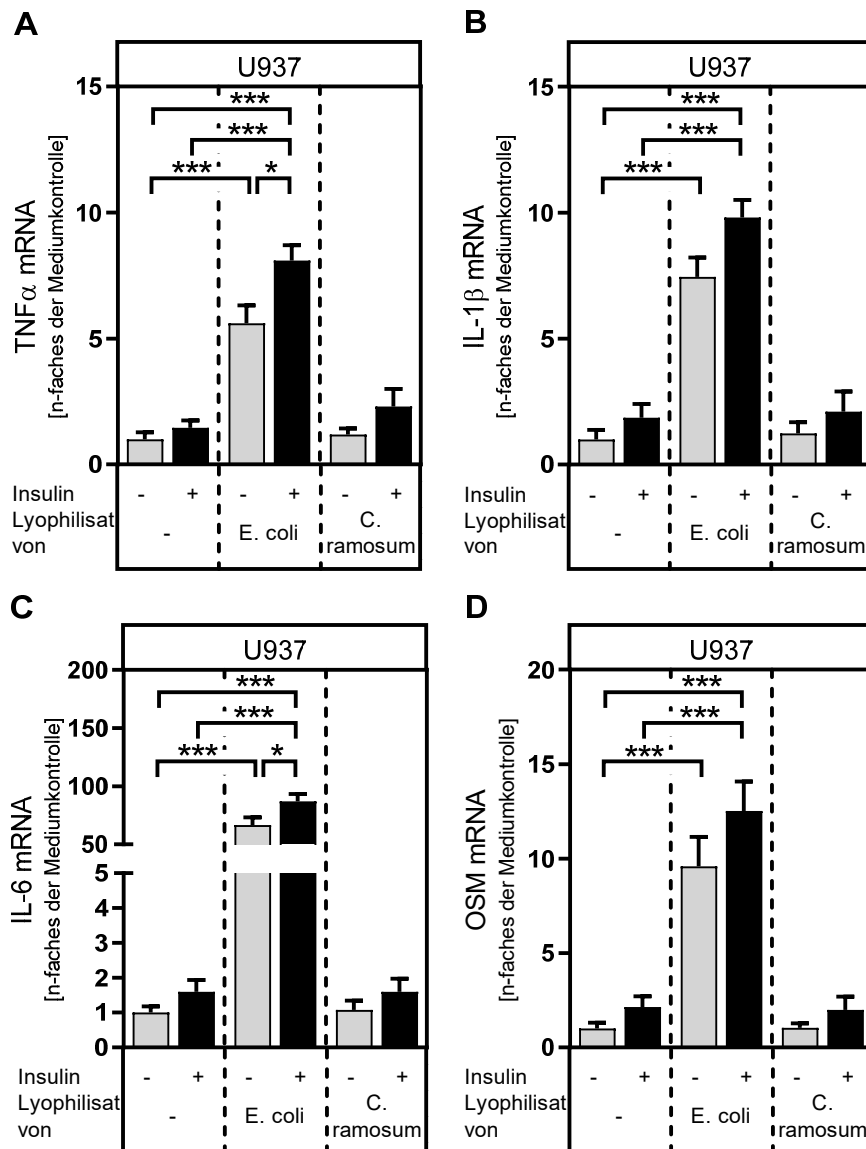


Abb. 66: Einfluss von 100 nM Insulin auf die Bakterien-abhängige mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in U937-Makrophagen

Die humane Zelllinie U937 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin und/ oder 0,33 μ g Trockenmasse/ μ l der gramnegativen Bakterien *Escherichia coli* oder der grampositiven Bakterien *Clostridium ramosum* für 24 h. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. **Auswertung:** Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet und für die mittlere Induzierbarkeit durch Insulin, *Escherichia coli* und *Escherichia coli* + Insulin innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente berücksichtigt, die alle in diesem Versuchssatz mit einbezogenen Stimulanzen und Stimulanzkombinationen (Insulin, *Escherichia coli* und *Escherichia coli* + Insulin, *Clostridium ramosum*, *Clostridium ramosum* + Insulin) enthielten. **Darstellung:** Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 6 (A), 4 (B, C) oder 5 (D) unabhängigen Experimenten. **Statistik:** Two-way ANOVA mit *Dunnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. **Beteiligte:** Die Bakterien-Stammlösungen wurden von Laura Maschirov im Rahmen ihrer Bachelorarbeit hergestellt.

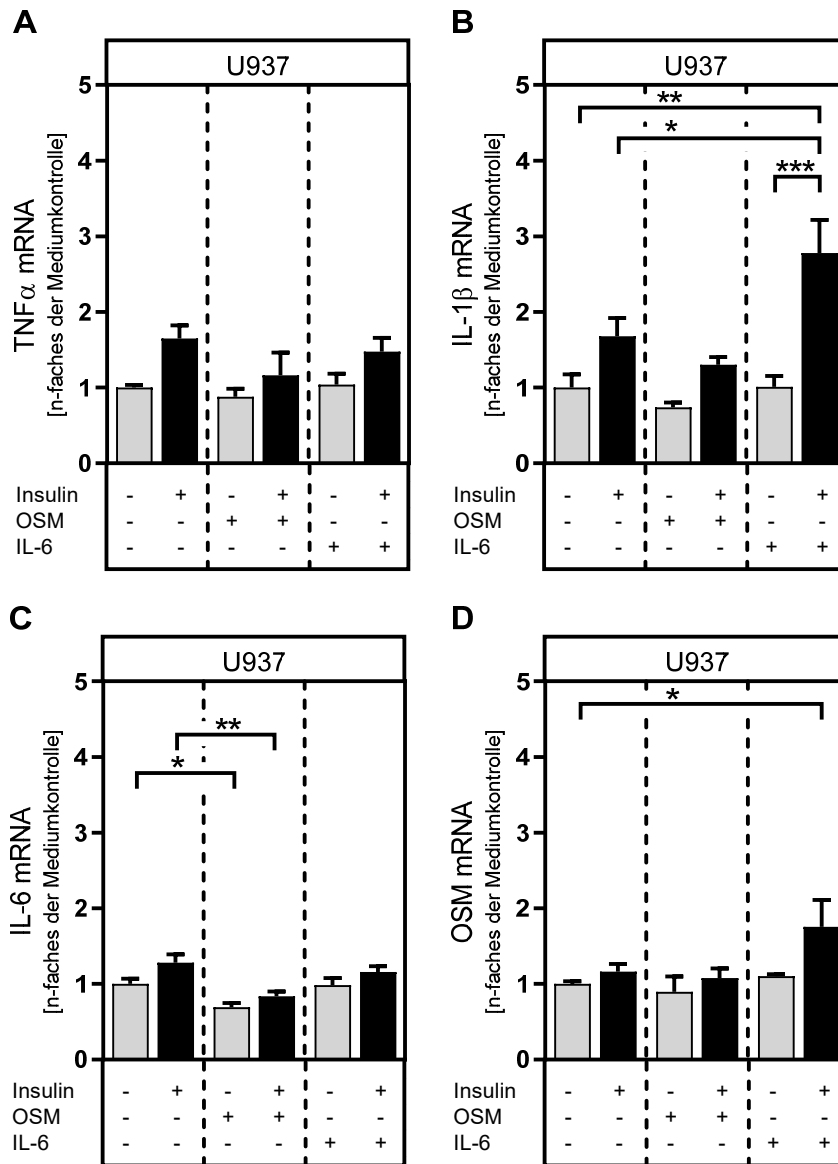


Abb. 67: Einfluss von Oncostatin M und Interleukin-6 auf die Insulin-induzierte mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in U937-Makrophagen

Die humane Zelllinie U937 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin, 10 ng/ml OSM und/ oder 100 ng/ml IL-6 für 24 h. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. Auswertung: Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet und für die mittlere Induzierbarkeit durch Insulin, OSM, OSM + Insulin, IL-6 und IL-6 + Insulin innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente berücksichtigt, die alle in diesem Versuchsset mit einbezogenen Stimulanzen und Stimulanzkombinationen (Insulin, OSM, OSM + Insulin, IL-6 und IL-6 + Insulin) enthielten. Darstellung: Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 4 (A, C), oder 5 (B, D) unabhängigen Experimenten. Statistik: Two-way ANOVA mit *Dunnnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. Beteiligte: Einige Zellkulturexperimente (einschließlich RNA-Isolation, cDNA-Synthese und qPCR) wurden von Rodolfo Gonzalez Camargo im Rahmen seiner Doktorarbeit durchgeführt.

7.3 Anhang zu 3.2: Palmitat-induzierte Steigerung der basalen und Stimulus-abhängigen Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in THP-1-Makrophagen

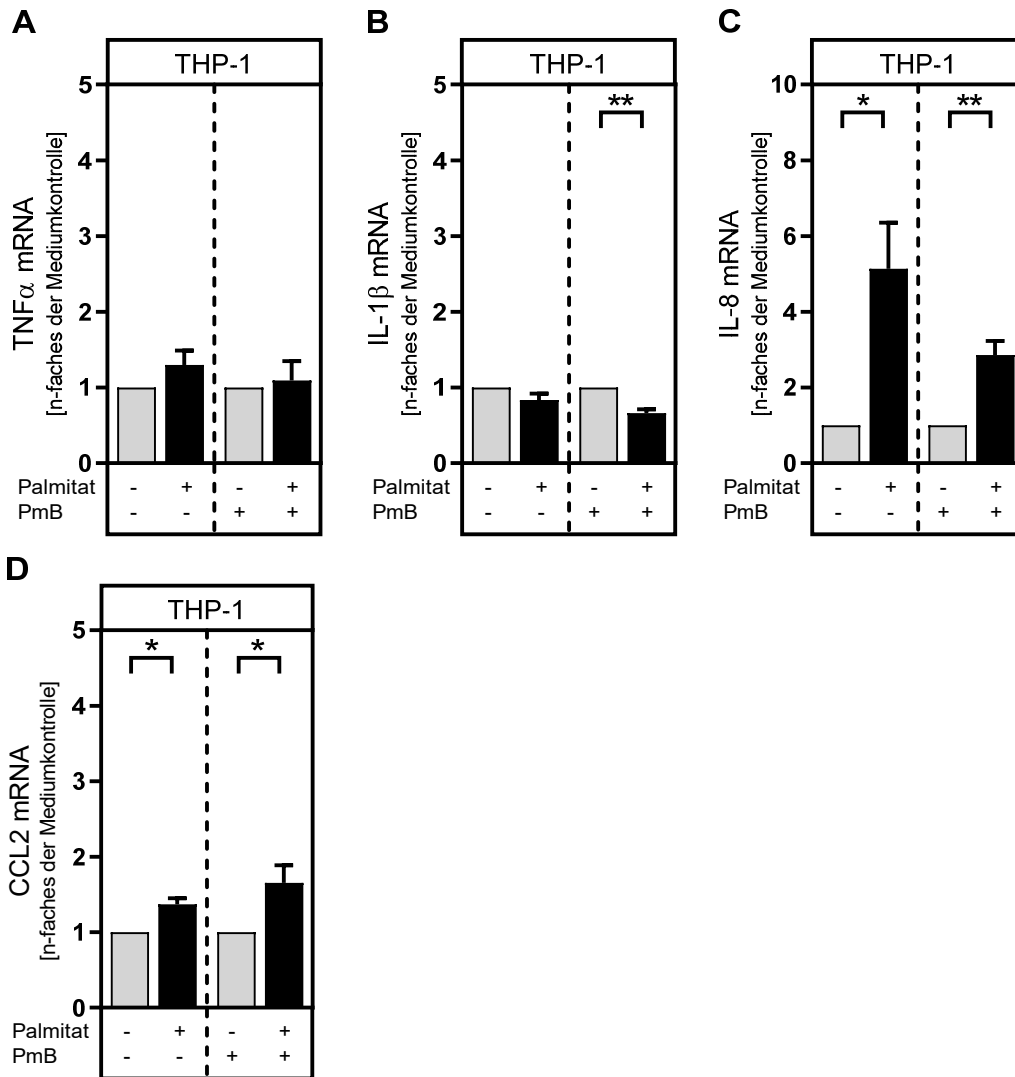


Abb. 68: Vergleich der Induktion pro-inflammatorischer Mediatoren durch Palmitat mit und ohne Polymyxin B in THP-1-Makrophagen

Die humane Zelllinie THP-1 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 μ M Palmitat für 24 h. Falls angegeben wurden die Stimulanzen zuvor 90 min mit 10 μ g/ml Polymyxin B inkubiert. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. Auswertung: Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet. Darstellung: Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 4 (A), 9 (B; - Polymyxin B), 5 (B, D; + Polymyxin B), 10 (C; - Polymyxin B), 6 (C; + Polymyxin B) oder 3 (D; - Polymyxin B) unabhängigen Experimenten. Statistik: zweiseitiger *t*-Test für gepaarte Stichproben; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$.

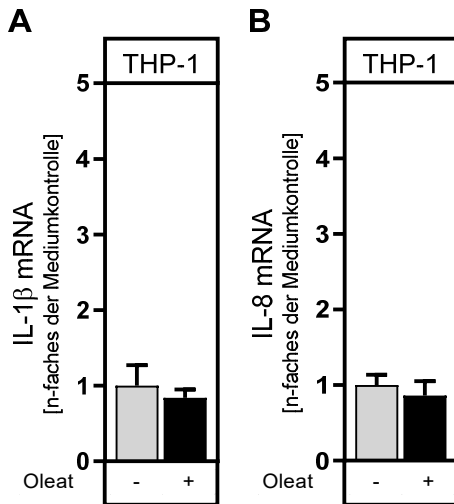


Abb. 69: Induktion pro-inflammatorischer Mediatoren durch Oleat in THP-1-Makrophagen

Die humane Zelllinie THP-1 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 μ M Oleat für 24 h. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. Auswertung: Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet. Für die Normalisierung wurden in jedem Versuch parallel Zellen mit 100 nM Insulin behandelt, analog der Palmitat-behandelten Zellen aufgearbeitet und analysiert und die mittlere Induzierbarkeit durch Oleat und Insulin innerhalb jedes Versuches bestimmt. Für die Auswertung wurden nur Experimente berücksichtigt, die alle in diesem Versuchssatz mit einbezogenen Stimulanzen und Stimulanzkombinationen (Oleat und Insulin) enthielten. Darstellung: Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 3 unabhängigen Experimenten. Statistik: zweiseitiger *t*-Test für ungepaarte Stichproben.

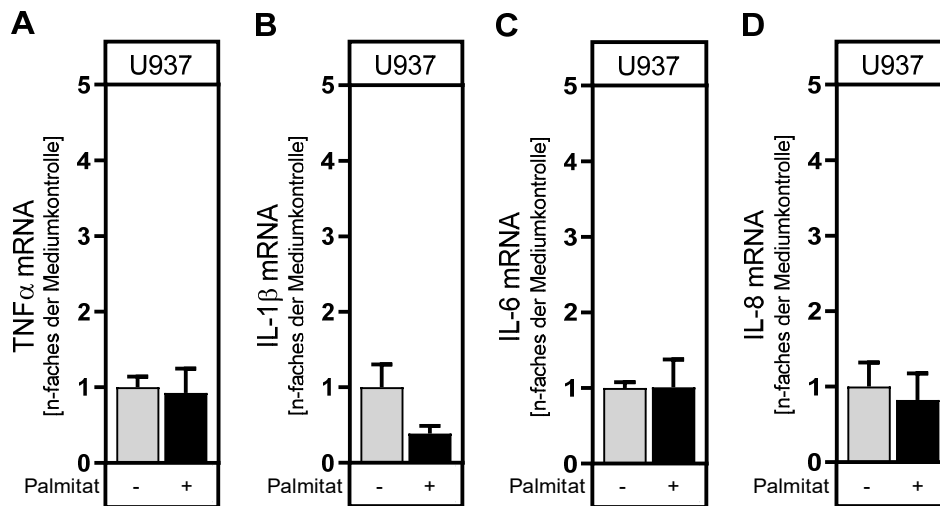


Abb. 70: Palmitat-induzierte Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in U937-Makrophagen

Die humane Zelllinie U937 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 μ M Palmitat für 24 h. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. **Auswertung:** Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet. Für die Normalisierung wurden in jedem Versuch parallel Zellen mit 100 ng/ml LPS behandelt, analog der Palmitat-behandelten Zellen aufgearbeitet und analysiert und die mittlere Induzierbarkeit durch Palmitat und LPS innerhalb jedes Versuches bestimmt. Für die Auswertung wurden nur Experimente mit einbezogen, die alle in diesem Versuchssatz untersuchten Stimulanzen (Palmitat und LPS) enthielten. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in der Abbildung jedoch nur die Genexpressionen dargestellt, die durch Palmitat und durch die entsprechende Mediumkontrolle ausgelöst wurden, nicht jedoch die durch LPS ausgelösten Genexpressionen. **Darstellung:** Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 5 (A, D), 7 (B) oder 2 (C) unabhängigen Experimenten. **Statistik:** zweiseitiger *t*-Test für ungepaarte Stichproben. **Beteiligte:** Einige Zellkulturexperimente (einschließlich RNA-Isolation, cDNA-Synthese und qPCR) wurden von Charline Zunder im Rahmen einer dieser Doktorarbeit begleitenden Bachelorarbeit und von Katrin Radloff im Rahmen ihrer Doktorarbeit durchgeführt.

7.4 Anhang zu 3.3: Einfluss von Insulin oder Palmitat auf die Synthese von Prostaglandin E₂ in Makrophagen

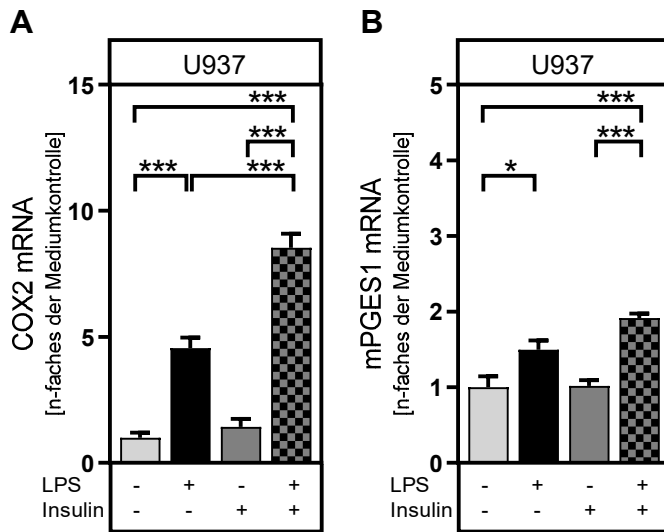


Abb. 71: Einfluss von 10 nM Insulin auf die Lipopolysaccharid-abhängige mRNA-Expression Prostaglandin E₂-synthetisierender Enzyme in U937-Makrophagen

Die humane Zelllinie U937 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 10 nM Insulin und/ oder 100 ng/ml LPS für 24 h. Zusätzlich erfolgte die Zugabe von 10 nM Insulin zu den Zeitpunkten 12 h, 16 h und 20 h nach Stimulationsbeginn. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. Auswertung: Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet und für die mittlere Induzierbarkeit durch Insulin, LPS und LPS + Insulin innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente berücksichtigt, die alle in diesem Versuchssatz mit einbezogenen Stimulanzen und Stimulanzkombinationen (Insulin, LPS und Insulin + LPS) enthielten. Darstellung: Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 5 unabhängigen Experimenten. Statistik: *Two-way ANOVA* mit *Dunnnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; *: $p \leq 0,05$; ***: $p \leq 0,001$.

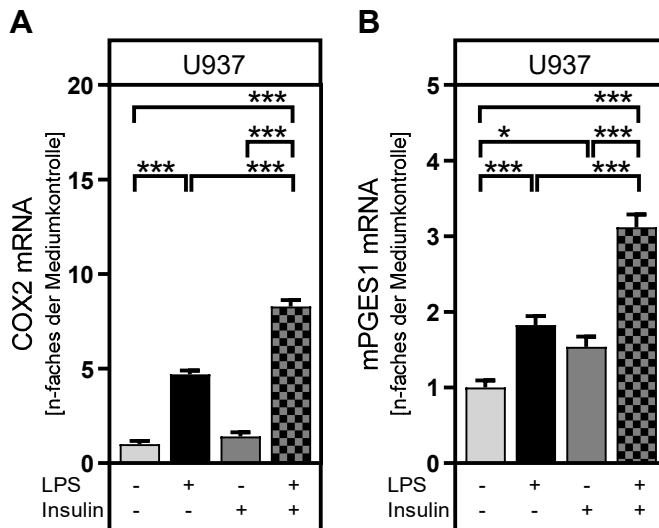


Abb. 72: Einfluss von 1 nM Insulin auf die Lipopolysaccharid-abhängige mRNA-Expression Prostaglandin E₂-synthetisierender Enzyme in U937-Makrophagen

Die humane Zelllinie U937 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 1 nM Insulin und/ oder 100 ng/ml LPS für 24 h. Zusätzlich erfolgte die Zugabe von 1 nM Insulin zu den Zeitpunkten 12 h, 16 h und 20 h nach Stimulationsbeginn. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. Auswertung: Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet und für die mittlere Induzierbarkeit durch Insulin, LPS und LPS + Insulin innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente berücksichtigt, die alle in diesem Versuchssatz mit einbezogenen Stimulanzen und Stimulanzkombinationen (Insulin, LPS und Insulin + LPS) enthielten. Darstellung: Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 9 unabhängigen Experimenten. Statistik: *Two-way ANOVA* mit *Dunnnett's multiple comparisons test*, um Unterschiede zur Kontrolle zu berechnen, und *Tuckey's multiple comparisons test*, um Stimulanzen untereinander zu vergleichen; *: $p \leq 0,05$; ***: $p \leq 0,001$.

7.5 Anhang zu 3.4: Prostaglandin E₂-induzierte Steigerung der Stimulus-abhängigen Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in Makrophagen

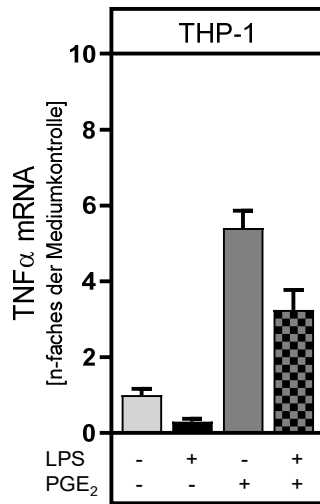


Abb. 73: Einfluss von Prostaglandin E₂ auf die Lipopolysaccharid-abhängige TNF α -mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen

Die humane Zelllinie THP-1 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 ng/ml LPS und/ oder 10 μ M PGE₂ für 2 h. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus synthetisierte cDNA in die qPCR eingesetzt. Auswertung: Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet und für die mittlere Induzierbarkeit durch LPS, PGE₂ und PGE₂ + LPS innerhalb jedes Versuches normalisiert. Für die Auswertung wurden nur Experimente berücksichtigt, die alle in diesem Versuchset mit einbezogenen Stimulanzen und Stimulanzkombinationen enthielten. Darstellung: Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 2 unabhängigen Experimenten.

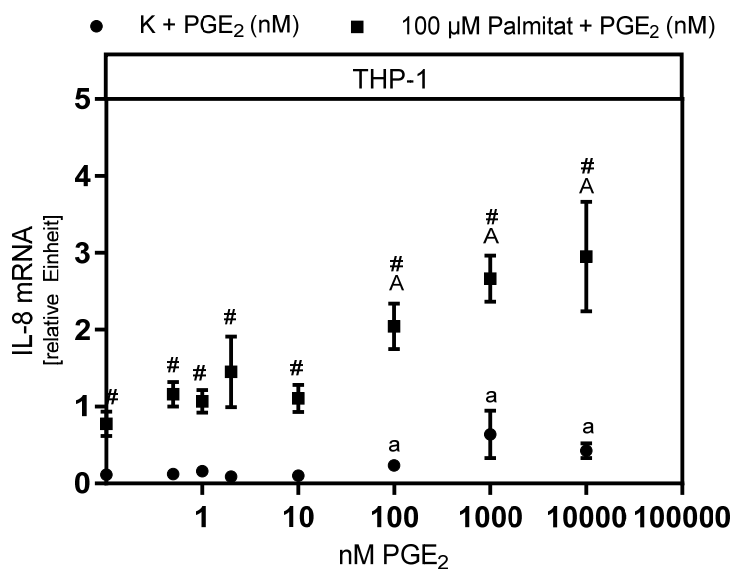


Abb. 74: Konzentrationsabhängige Steigerung der Palmitat-abhängigen Interleukin-8-mRNA-Expression durch Prostaglandin E₂

Die humane Zelllinie THP-1 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 μ M Palmitat und/ oder verschiedenen Konzentrationen an PGE₂ für 24 h. Die Gesamt-RNA wurde, wie unter 6.2.5 dargestellt, isoliert und die daraus syntheti-

sierte cDNA in die qPCR eingesetzt. **Auswertung:** Als Referenzgen diente β -Aktin. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode als Vielfaches der Induktion zu der jeweiligen Mediumkontrolle berechnet und für die mittlere Induzierbarkeit durch Palmitat, 0,5 nM PGE₂, Palmitat + 0,5 nM PGE₂, 1 nM PGE₂, Palmitat + 1 nM PGE₂, 2 nM PGE₂, Palmitat + 2 nM PGE₂, 10 nM PGE₂, Palmitat + 10 nM PGE₂, 100 nM PGE₂, Palmitat + 100 nM PGE₂, 1 μM PGE₂, Palmitat + 1 μM PGE₂, 10 μM PGE₂ und Palmitat + 10 μM PGE₂ innerhalb jedes Versuches normalisiert. **Darstellung:** Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 8 unabhängigen Experimenten. **Statistik:** zweiseitiger *t*-Test für ungepaarte Stichproben; a: $p \leq 0,05$ versus K + 0 nM PGE₂; A: $p \leq 0,05$ versus Palmitat + 0 nM PGE₂; #: $p \leq 0,05$ versus entsprechende Probe ohne PGE₂. **Beteiligte:** Die Zellkulturexperimente (einschließlich RNA-Isolation, cDNA-Synthese und qPCR) wurden von Dr. Janin Henkel durchgeführt.

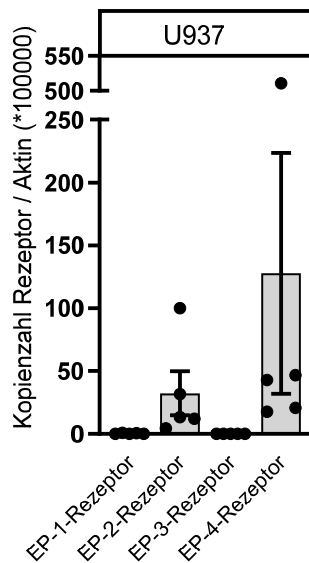


Abb. 75: Quantifizierung der EP-Rezeptoren in U937-Makrophagen

Die humane Zelllinie U937 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Die mRNA-Kopienzahl der EP-Rezeptoren und des Referenzgens wurden anhand von Standardgeraden, die mit entsprechenden Plasmid-DNAs erstellt wurden, quantifiziert. **Darstellung:** Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 5 unabhängigen Experimenten. **Beteiligte:** Die für die Quantifizierung der EP-Rezeptoren verwendeten Standardgeraden wurden von Anne Schraplau im Rahmen ihrer Doktorarbeit erstellt. Die Daten wurden bereits, in geteilter Erstautorenschaft, publiziert [203].

7.6 Darstellung repräsentativer Western Blots in ungeschnittener Form

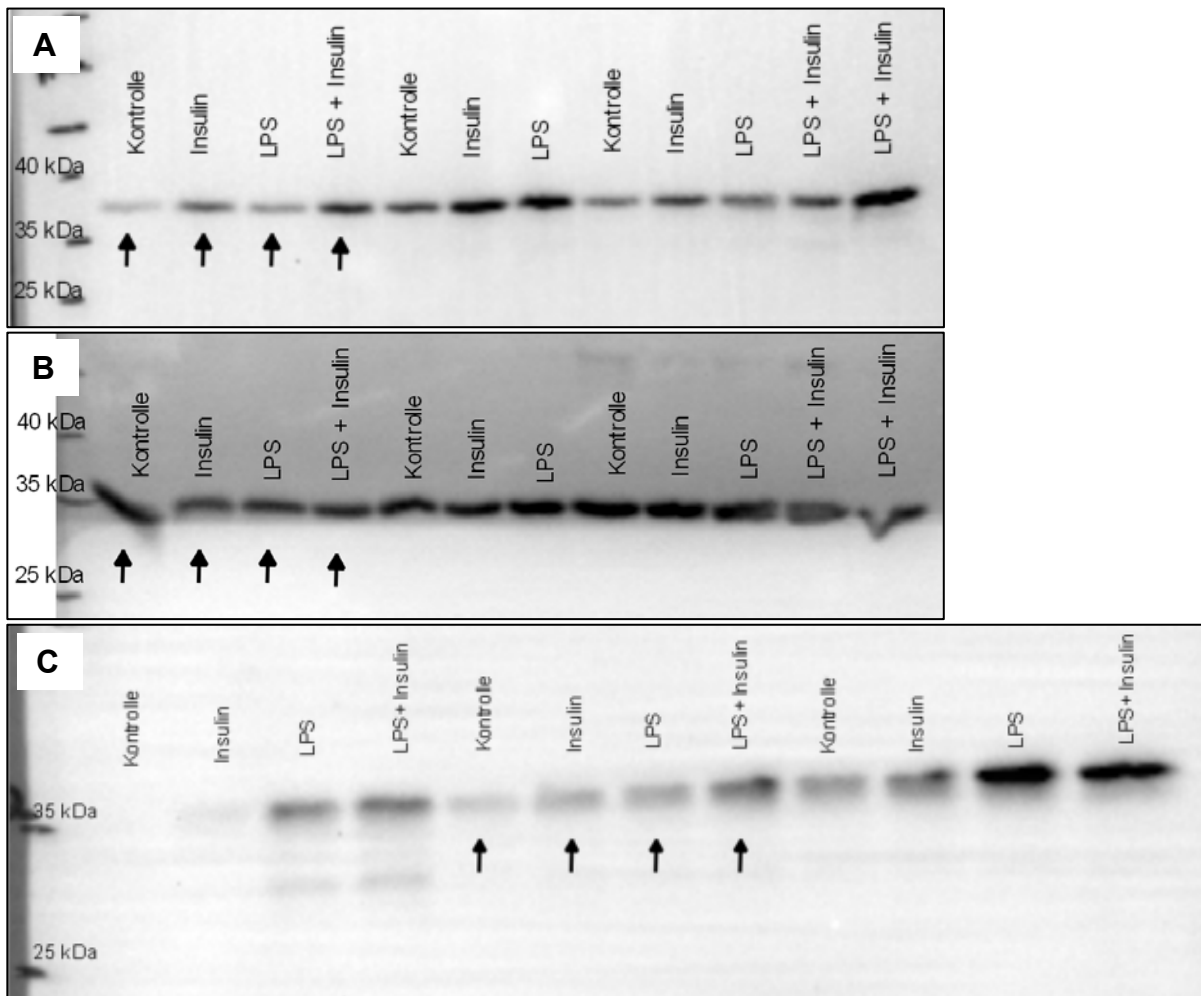


Abb. 76: Komplette Darstellung repräsentativer Western Blots zur Detektion von pro-Interleukin-1 β und GAPDH in U937-Zelllysaten und im U937-Zellkulturüberstand

Die humane Zelllinie U937 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin und/ oder 100 ng/ml LPS für 24 h. Proteine aus Zelllysaten wurden, wie unter 6.2.10 dargestellt, isoliert und die Expression von Pro-IL-1 β (A) und GAPDH (B) mittels Western Blot (siehe 6.2.11) analysiert. (C): Proteine aus Zellkulturüberständen wurden mittels Acetonfällung (siehe 6.2.10) aufkonzentriert und die Expression von Pro-IL-1 β mittels Western Blot (siehe 6.2.11) analysiert. Darstellung: Dargestellt sind die übereinandergelegten Bilder der Photographie des Standards und der Chemilumineszenzmessung. Pfeile: Banden dieses repräsentativen Experiments sind in Abb. 3 und Abb. 10 dargestellt.

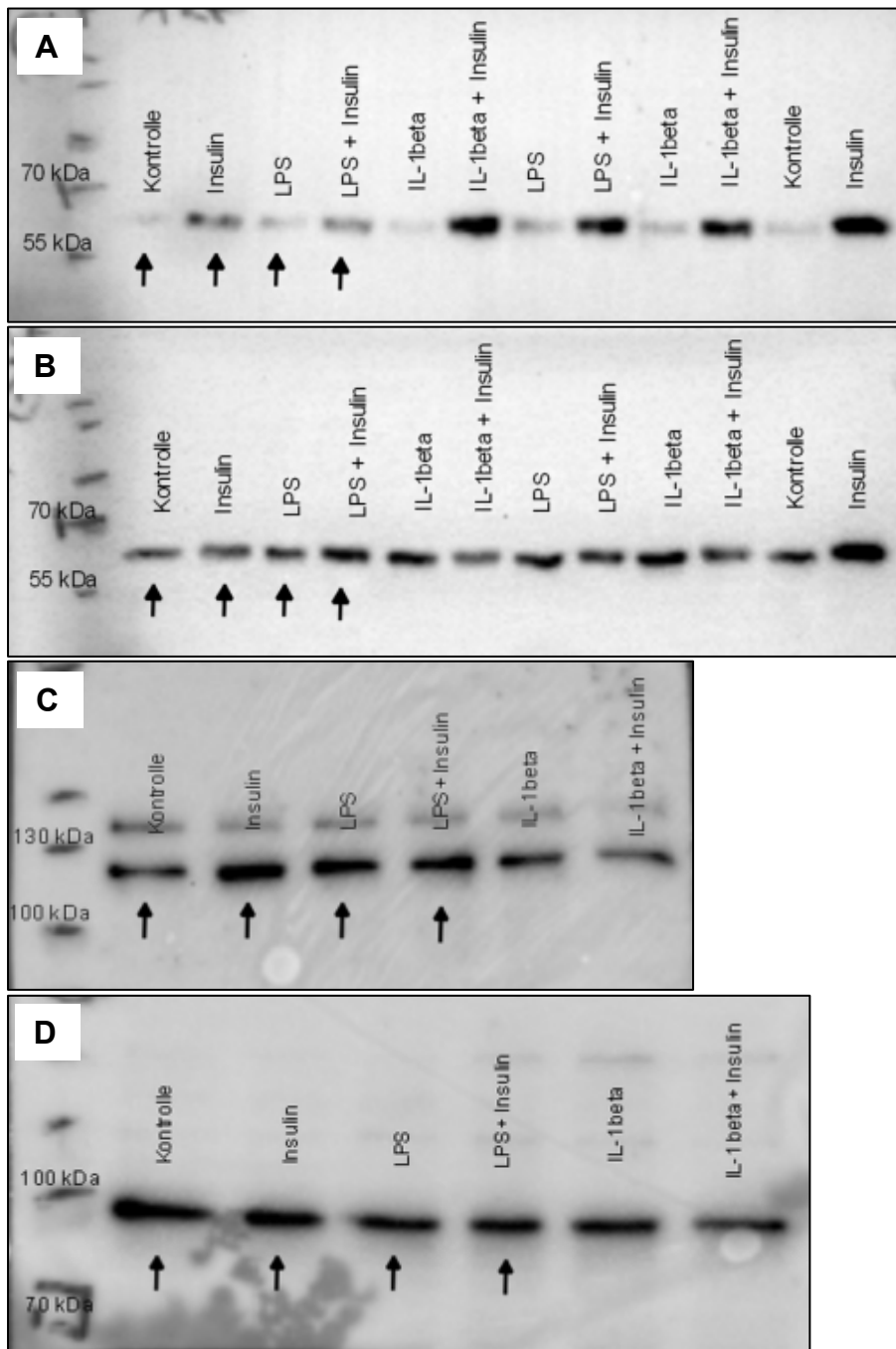


Abb. 77: Komplexe Darstellung repräsentativer Western Blots zur Detektion von Akt, phospho-Akt, IKK β und phospho-IKK β in U937-Zelllysaten

Die humane Zelllinie U937 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin, 100 ng/ml LPS und/ oder 100 ng/ml IL-1 β für 24 h. Proteine wurden, wie unter 6.2.10 dargestellt, isoliert und die Expression von phospho-Akt (A), Akt (B), phospho-IKK β (C) oder IKK β (D) mittels Western Blot (siehe 6.2.11) analysiert. Darstellung: Dargestellt sind die übereinandergelegten Bilder der Photographie des Standards und der Chemilumineszenzmessung. Pfeile: Banden dieses repräsentativen Experiments sind in Abb. 7 und Abb. 14 dargestellt.

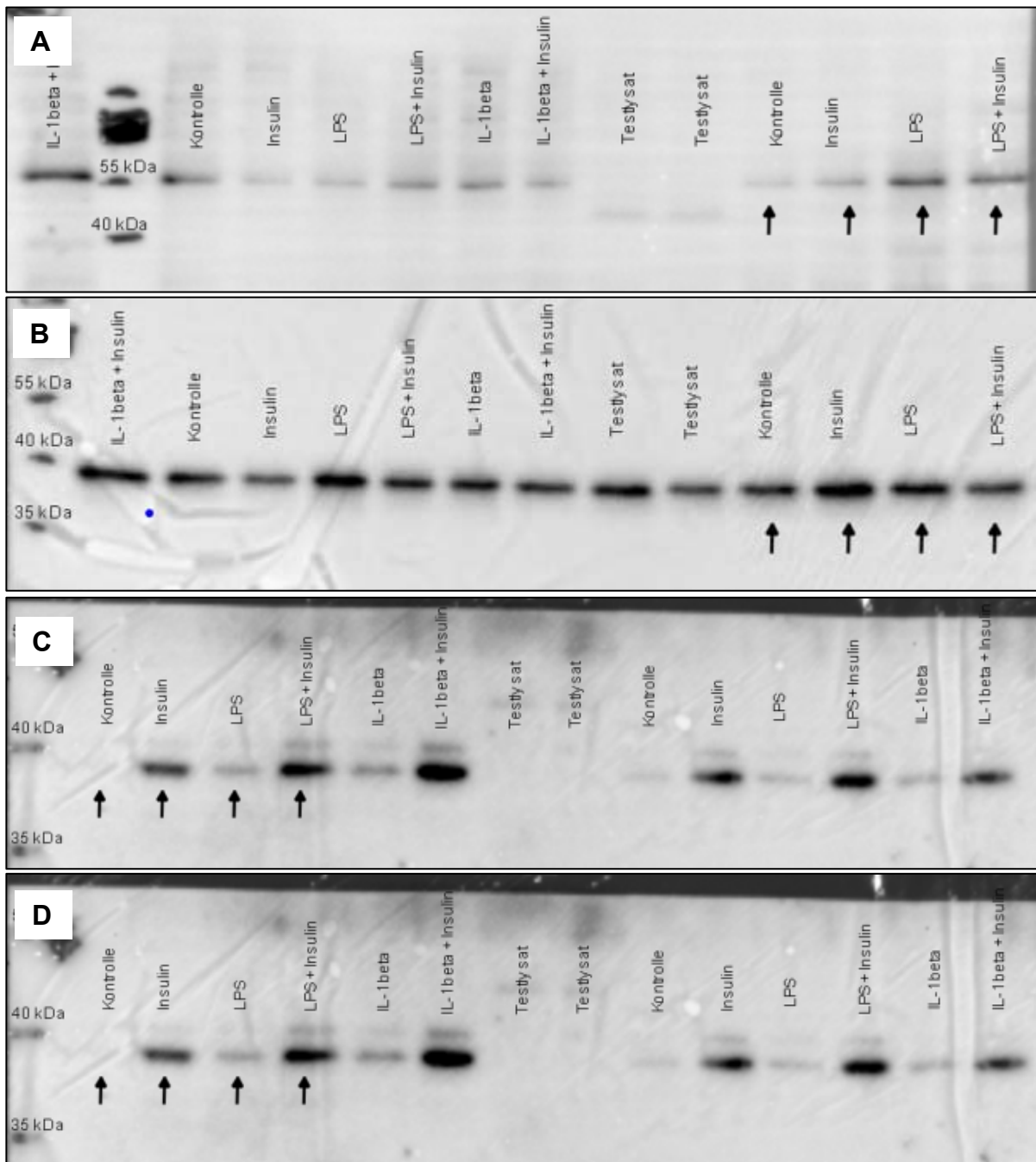


Abb. 78: Komplett Darstellung repräsentativer Western Blots zur Detektion von IκB, phospho-IκB, ERK1/2 und phospho-ERK1/2 in U937-Zelllysaten

Die humane Zelllinie U937 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin, 100 ng/ml LPS und/ oder 100 ng/ml IL-1β für 24 h. Proteine wurden, wie unter 6.2.10 dargestellt, isoliert und die Expression von phospho-IκB (A), IκB (B), phospho-ERK1/2 (C) oder ERK1/2 (D) mittels Western Blot (siehe 6.2.11) analysiert. Darstellung: Dargestellt sind die übereinandergelegten Bilder der Photographie des Standards und der Chemilumineszenzmessung. Pfeile: Banden dieses repräsentativen Experiments sind in Abb. 7 und Abb. 14 (A, B) bzw. Abb. 8 und Abb. 15 (C, D) dargestellt.

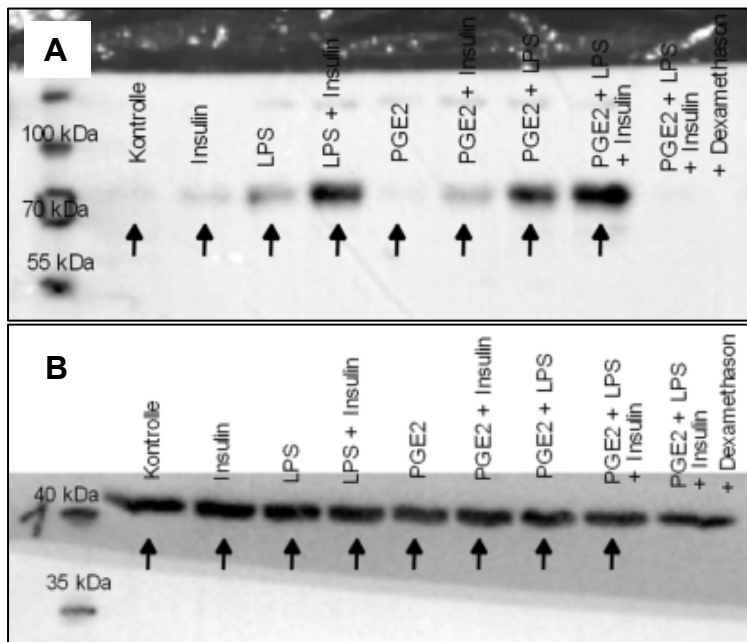


Abb. 79: Komplett Darstellung repräsentativer Western Blots zur Detektion von Cyclooxygenase 2 und β -Aktin in U937-Zelllysaten

Die humane Zelllinie U937 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin, 100 ng/ml LPS und/ oder 10 μ M PGE₂ für 24 h. Proteine wurden, wie unter 6.2.10 dargestellt, isoliert und die Expression von COX2 (A) und β -Aktin (B) mittels Western Blot (siehe 6.2.11) analysiert. Darstellung: Dargestellt sind die übereinandergelegten Bilder der Photographie des Standards und der Chemilumineszenzmessung. Pfeile: Banden dieses repräsentativen Experiments sind in Abb. 19, Abb. 24, Abb. 46 und Abb. 49 dargestellt.

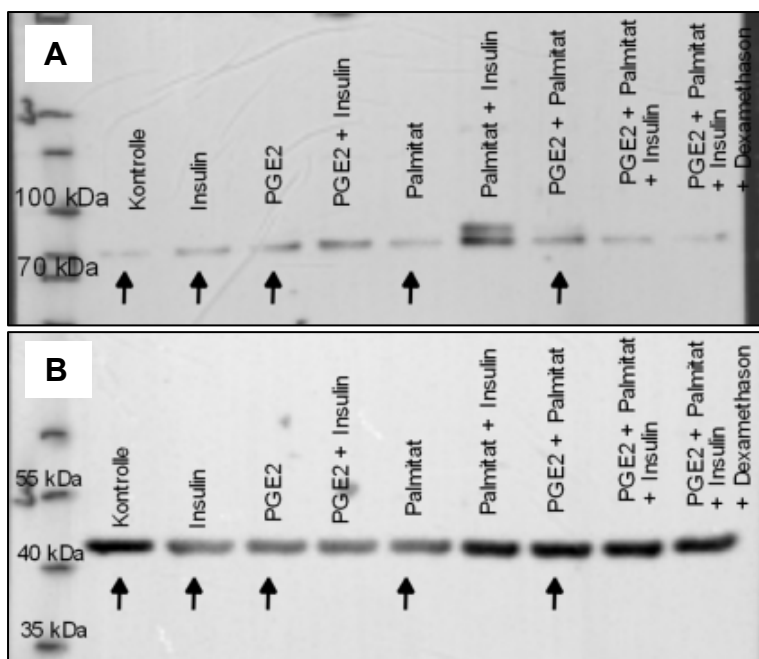


Abb. 80: Komplett Darstellung repräsentativer Western Blots zur Detektion von Cyclooxygenase 2 und β -Aktin in THP-1-Zelllysaten

Die humane Zelllinie THP-1 wurde, wie unter 6.2.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin, 100 μ M Palmitat und/ oder 10 μ M PGE₂ für 24 h. Proteine wurden, wie unter 6.2.10 dargestellt, isoliert und die Expression von COX2 (A) und β -Aktin

(B) mittels Western Blot (siehe 6.2.11) analysiert. Darstellung: Dargestellt sind die übereinandergelegten Bilder der Photographie des Standards und der Chemilumineszenzmessung. Pfeile: Banden dieses repräsentativen Experiments sind in Abb. 21, Abb. 29 und Abb. 53 dargestellt.

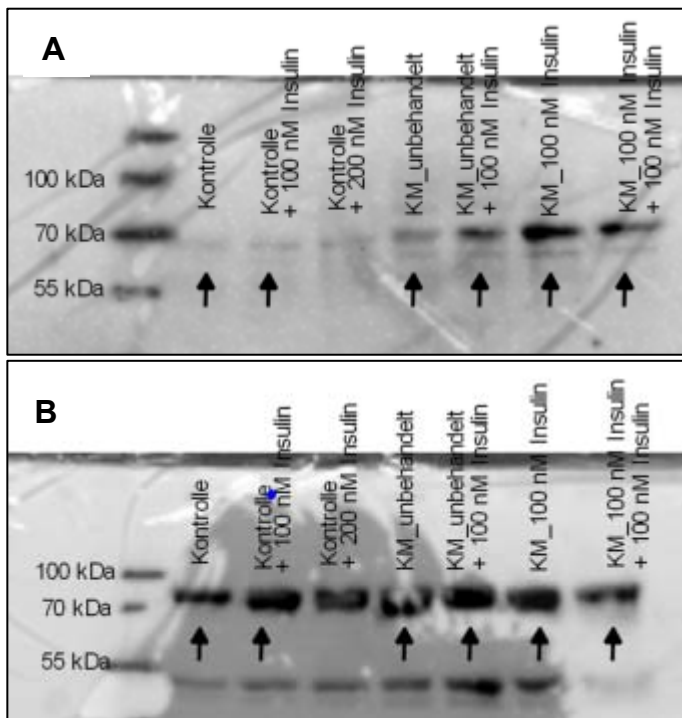


Abb. 81: Komplette Darstellung repräsentativer Western Blots zur Detektion von STAT3 und phospho-STAT3 in Zelllysaten primärer Hepatozyten der Ratte

Primäre Hepatozyten der Ratte wurden, wie unter 6.2.3 beschrieben, isoliert und kultiviert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin für 15 min in Medium, welches sich aus 50 % M199-Kulturmedium III und 50 % RPMI 1640-Kulturmedium I zusammensetzte. Falls angegeben wurde das RPMI 1640-Kulturmedium durch konditionierte Überstände von U937-Makrophagen, welche von unbehandelten oder Insulin-stimulierten U937-Makrophagen stammten, ersetzt. Proteine wurden, wie unter 6.2.10 dargestellt, isoliert und die Expression von phospho-STAT3 (A) oder STAT3 (B) mittels Western Blot (siehe 6.2.11) analysiert. Darstellung: Dargestellt sind die übereinandergelegten Bilder der Photographie des Standards und der Chemilumineszenzmessung. Pfeile: Banden dieses repräsentativen Experiments sind in Abb. 55 dargestellt.

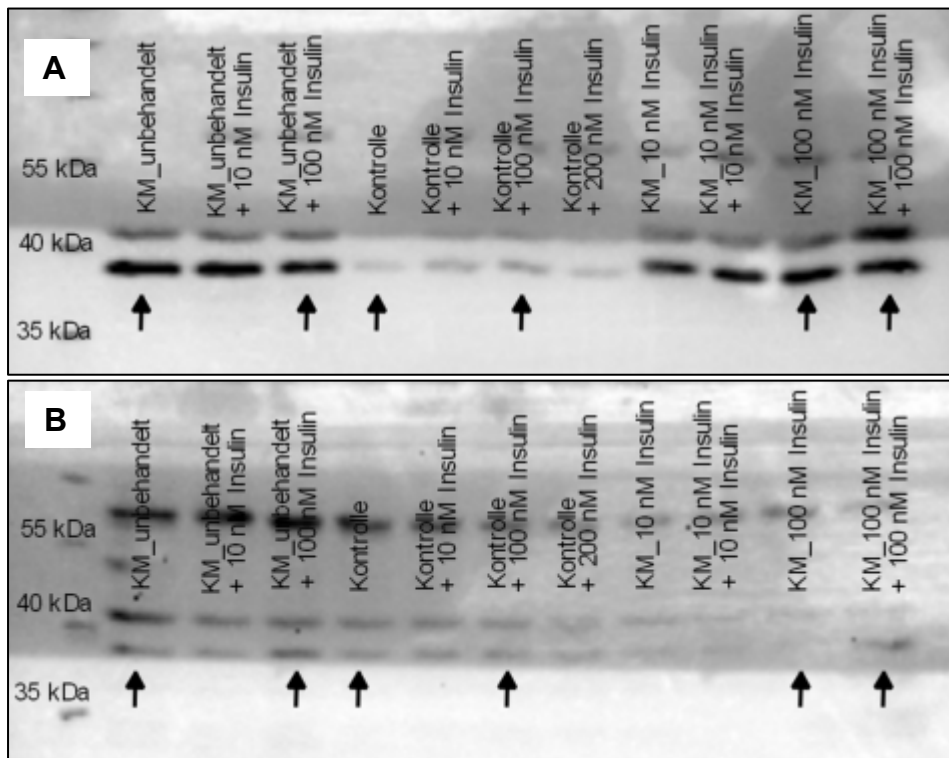


Abb. 82: Komplexe Darstellung repräsentativer Western Blots zur Detektion von ERK1/2 und phospho-ERK1/2 in Zelllysaten primärer Hepatozyten der Ratte

Primäre Hepatozyten der Ratte wurden, wie unter 6.2.3 beschrieben, isoliert und kultiviert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin für 15 min in Medium, welches sich aus 50 % M199-Kulturmedium III und 50 % RPMI 1640-Kulturmedium I zusammensetzte. Falls angegeben wurde das RPMI 1640-Kulturmedium durch konditionierte Überstände von U937-Makrophagen, welche von Kontroll- oder Insulin-stimulierten U937-Makrophagen stammten, ersetzt. Proteine wurden, wie unter 6.2.10 dargestellt, isoliert und die Expression von phospho-ERK1/2 (A) oder ERK1/2 (B) mittels Western Blot (siehe 6.2.11) analysiert. Darstellung: Dargestellt sind die übereinandergelegten Bilder der Photographie des Standards und der Chemilumineszenzmessung. Pfeile: Banden dieses repräsentativen Experiments sind in Abb. 56 dargestellt.

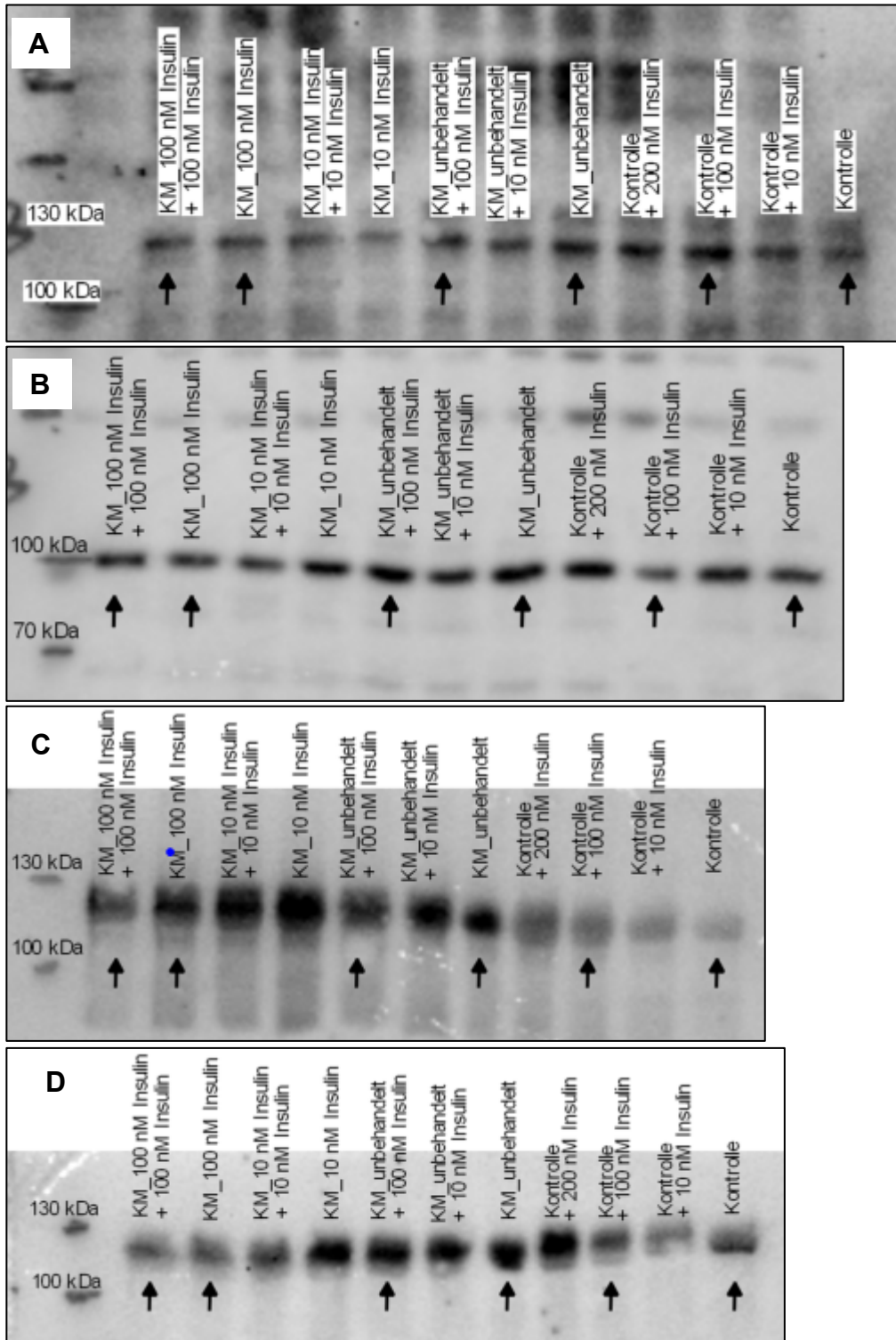


Abb. 83: Komplett Darstellung repräsentativer Western Blots zur Detektion von IKK β , phospho-IKK β , IRS oder phospho-IRS in Zelllysaten primärer Hepatozyten der Ratte

Primäre Hepatozyten der Ratte wurden, wie unter 6.2.3 beschrieben, isoliert und kultiviert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 100 nM Insulin für 15 min in Medium, welches sich aus 50 % M199-Kulturmedium III und 50 % RPMI 1640-Kulturmedium I zusammensetzte. Falls angegeben wurde das RPMI 1640-Kulturmedium durch konditionierte Überstände, welches von Kontroll- oder Insulin-stimulierten U937-Makrophagen stammten, ersetzt. Proteine wurden, wie unter 6.2.10 dargestellt, isoliert und die Expression von phospho-IKK β (A), IKK β (B), phospho-IRS (C) oder IRS (D) mittels Western Blot (siehe 6.2.11) analysiert. Darstellung: Dargestellt sind die übereinandergelegten Bilder der Photographie des Standards und der Chemilumineszenzmessung. Pfeile: Banden dieses repräsentativen Experiments sind in Abb. 57 & Abb. 58 dargestellt.

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Darstellung der Arbeitshypothesen	24
Abb. 2:	Insulin-induzierte mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in U937-Makrophagen	33
Abb. 3:	Insulin-induzierte Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren in U937-Makrophagen	34
Abb. 4:	Insulin-induzierte mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in THP-1-Makrophagen	35
Abb. 5:	Insulin-induzierte Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in primären humanen Makrophagen	36
Abb. 6:	Nachweis der Spezifität der Insulin-induzierten IL-1 β -mRNA-Expression	37
Abb. 7:	Insulin-abhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B	39
Abb. 8:	Insulin-abhängige Aktivierung des MAP-Kinase-abhängigen Signalweges	40
Abb. 9:	Insulin-induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid-abhängigen mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in U937-Makrophagen	43
Abb. 10:	Insulin-induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid-abhängigen Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren in U937-Makrophagen	45
Abb. 11:	Insulin-induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid-abhängigen mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in THP-1-Makrophagen	47
Abb. 12:	Insulin-induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid-abhängigen mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in primären humanen Makrophagen	48
Abb. 13:	Insulin-induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid-abhängigen Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren in primären humanen Makrophagen	49
Abb. 14:	Insulin-induzierte Verstärkung der Lipopolysaccharid-abhängigen Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B	51
Abb. 15:	Insulin-induzierte Verstärkung der Lipopolysaccharid-abhängigen Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges	52
Abb. 16:	Insulin-induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid-abhängigen Expression verschiedener Rezeptoren	53
Abb. 17:	Insulin-induzierte Steigerung der Palmitat-abhängigen mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in THP-1-Makrophagen	55
Abb. 18:	Insulin-induzierte Steigerung der Palmitat-abhängigen Produktion des pro-inflammatorischen Mediators Interleukin-8 in THP-1-Makrophagen	56
Abb. 19:	Insulin-induzierte Produktion von Cyclooxygenase 2 und Prostaglandin E ₂ in U937-Makrophagen	57
Abb. 20:	Insulin-induzierte mRNA-Expression Arachidonsäure- und Prostaglandin E ₂ -synthetisierender Enzyme in U937-Makrophagen	58
Abb. 21:	Insulin-induzierte Produktion von Prostaglandin E ₂ und Cyclooxygenase 2 in THP-1-Makrophagen	59
Abb. 22:	Insulin-induzierte mRNA-Expression Arachidonsäure- und Prostaglandin E ₂ -synthetisierender Enzyme in THP-1-Makrophagen	60
Abb. 23:	Insulin-induzierte mRNA-Expression Prostaglandin E ₂ -synthetisierender Enzyme in primären humanen Makrophagen	61
Abb. 24:	Insulin-induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid-abhängigen Produktion von Prostaglandin E ₂ und Cyclooxygenase 2 in U937-Makrophagen	63
Abb. 25:	Insulin-induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid-abhängigen mRNA-Expression Arachidonsäure- und Prostaglandin E ₂ -synthetisierender Enzyme in U937-Makrophagen	64
Abb. 26:	Insulin-induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid-abhängigen Produktion von Prostaglandin E ₂ in THP-1-Makrophagen	65
Abb. 27:	Insulin-induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid-abhängigen mRNA-Expression Arachidonsäure- und Prostaglandin E ₂ -synthetisierender Enzyme in THP-1-Makrophagen	66
Abb. 28:	Insulin-induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid-abhängigen mRNA-Expression Prostaglandin E ₂ -synthetisierender Enzyme in primären humanen Makrophagen	67
Abb. 29:	Palmitat-induzierte Produktion von Prostaglandin E ₂ und Cyclooxygenase 2 in THP-1-Makrophagen	68
Abb. 30:	Palmitat-induzierte mRNA-Expression Arachidonsäure- und Prostaglandin E ₂ -synthetisierender Enzyme in THP-1-Makrophagen	69

Abb. 31: Prostaglandin E ₂ -induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid-abhängigen mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in U937-Makrophagen	71
Abb. 32: Prostaglandin E ₂ -induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid-abhängigen Produktion des pro-inflammatorischen Mediators Interleukin-8 in U937-Makrophagen	72
Abb. 33: Prostaglandin E ₂ -induzierte Steigerung der Lipopolysaccharid-abhängigen mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in THP-1-Makrophagen	73
Abb. 34: Einfluss einer Kombination aus Lipopolysaccharid, Insulin und Prostaglandin E ₂ auf die mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in U937-Makrophagen	76
Abb. 35: Einfluss einer Kombination aus Lipopolysaccharid, Insulin und Prostaglandin E ₂ auf die Proteinproduktion pro-inflammatorischer Mediatoren in U937-Makrophagen.	77
Abb. 36: Einfluss einer Kombination aus Lipopolysaccharid, Insulin und Prostaglandin E ₂ auf die mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in THP-1-Makrophagen	78
Abb. 37: Prostaglandin E ₂ -induzierte mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in primären humanen Makrophagen	79
Abb. 38: Prostaglandin E ₂ -induzierte Steigerung der Palmitat-abhängigen mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in THP-1-Makrophagen	81
Abb. 39: Prostaglandin E ₂ -induzierte Steigerung der Palmitat-abhängigen Produktion des pro-inflammatorischen Mediators Interleukin-8 in THP-1-Makrophagen	82
Abb. 40: Expression von EP-Rezeptor-mRNA in THP-1-Makrophagen	83
Abb. 41: Bedeutung der einzelnen EP-Rezeptoren bei der Prostaglandin E ₂ -induzierten Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in THP-1-Makrophagen	84
Abb. 42: Bedeutung des TLR4 bei der Prostaglandin E ₂ -induzierten Verstärkung der Palmitat-abhängigen IL-8-mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen	86
Abb. 43: Bedeutung des TLR4 bei der Prostaglandin E ₂ -induzierten Verstärkung der Palmitat-abhängigen IL-8-Proteinexpression in THP-1-Makrophagen	87
Abb. 44: Bedeutung der Sphingosin-1-Phosphat-Bildung bei der Prostaglandin E ₂ -induzierten Verstärkung der Palmitat-abhängigen Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in THP-1-Makrophagen	89
Abb. 45: Prostaglandin E ₂ -induzierte Verstärkung der Lipopolysaccharid-abhängigen mRNA-Expression Arachidonsäure- und Prostaglandin E ₂ -synthetisierender Enzyme in U937-Makrophagen	91
Abb. 46: Einfluss von Prostaglandin E ₂ auf die Lipopolysaccharid-abhängige Produktion von Cyclooxygenase 2 in U937-Makrophagen	92
Abb. 47: Prostaglandin E ₂ -induzierte Verstärkung der Lipopolysaccharid-abhängigen mRNA-Expression Arachidonsäure- und Prostaglandin E ₂ -synthetisierender Enzyme in THP-1-Makrophagen	93
Abb. 48: Einfluss einer Kombination aus Lipopolysaccharid, Insulin und Prostaglandin E ₂ auf mRNA-Expression Arachidonsäure- und Prostaglandin E ₂ -synthetisierender Enzyme in U937-Makrophagen	95
Abb. 49: Einfluss einer Kombination aus Lipopolysaccharid, Insulin und Prostaglandin E ₂ auf die Produktion von Cyclooxygenase 2 in U937-Makrophagen	96
Abb. 50: Einfluss einer Kombination aus Lipopolysaccharid, Insulin und Prostaglandin E ₂ auf die mRNA-Expression Arachidonsäure- und Prostaglandin E ₂ -synthetisierender Enzyme in THP-1-Makrophagen	97
Abb. 51: Prostaglandin E ₂ -induzierte mRNA-Expression Prostaglandin E ₂ -synthetisierender Enzyme in primären humanen Makrophagen	98
Abb. 52: Prostaglandin E ₂ -induzierte Steigerung der Palmitat-abhängigen mRNA-Expression Arachidonsäure- und Prostaglandin E ₂ -synthetisierender Enzyme in THP-1-Makrophagen	100
Abb. 53: Prostaglandin E ₂ -induzierte Steigerung der Palmitat-abhängigen Produktion von Prostaglandin E ₂ und Cyclooxygenase 2 in THP-1-Makrophagen	101
Abb. 54: Inhibierung der Insulin-induzierten Glukokinase-Induktion in Hepatozyten der Ratte durch Überstände Insulin-behandelter U937-Makrophagen	104
Abb. 55: Aktivierung des STAT3-SOCS3-abhängigen Signalwegs in Hepatozyten der Ratte durch Überstände Insulin-behandelter U937-Makrophagen	106
Abb. 56: Aktivierung von ERK1/2 in Hepatozyten der Ratte durch Überstände Insulin-behandelter U937-Makrophagen	107
Abb. 57: Aktivierung der Kinase IKK β und seines nachgeschalteten Transkriptionsfaktors NF- κ B in Hepatozyten der Ratte durch Überstände Insulin-behandelter U937-Makrophagen	109
Abb. 58: Inhibierende Serin-Phosphorylierung des IRS1 in Hepatozyten der Ratte durch Überstände Insulin-behandelter U937-Makrophagen	110

Abb. 59: Molekularer Mechanismus der Insulin-induzierten Zytokinfreisetzung in eingewanderten humanen Makrophagen	117
Abb. 60: Molekularer Mechanismus einer Zytokin-vermittelten Insulinresistenz in Hepatozyten	120
Abb. 61: Mögliche Stoffwechsel-abhängige Mechanismen einer Palmitat-induzierten Entzündungsantwort in Makrophagen	128
Abb. 62: Mögliche Mechanismen über die PGE ₂ eine Palmitat-induzierte Entzündungsantwort modulieren könnte	135
Abb. 63: Schematische Darstellung der Schlussfolgerungen	140
Abb. 64: Einfluss von 10 nM Insulin auf die Lipopolysaccharid-abhängige mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in U937-Makrophagen	200
Abb. 65: Einfluss von 1 nM Insulin auf die Lipopolysaccharid-abhängige mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in U937-Makrophagen	201
Abb. 66: Einfluss von 100 nM Insulin auf die Bakterien-abhängige mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in U937-Makrophagen	202
Abb. 67: Einfluss von Oncostatin M und Interleukin-6 auf die Insulin-induzierte mRNA-Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in U937-Makrophagen	203
Abb. 68: Vergleich der Induktion pro-inflammatorischer Mediatoren durch Palmitat mit und ohne Polymyxin B in THP-1-Makrophagen	204
Abb. 69: Induktion pro-inflammatorischer Mediatoren durch Oleat in THP-1-Makrophagen	205
Abb. 70: Palmitat-induzierte Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in U937-Makrophagen	206
Abb. 71: Einfluss von 10 nM Insulin auf die Lipopolysaccharid-abhängige mRNA-Expression Prostaglandin E ₂ -synthetisierender Enzyme in U937-Makrophagen	207
Abb. 72: Einfluss von 1 nM Insulin auf die Lipopolysaccharid-abhängige mRNA-Expression Prostaglandin E ₂ -synthetisierender Enzyme in U937-Makrophagen	208
Abb. 73: Einfluss von Prostaglandin E ₂ auf die Lipopolysaccharid-abhängige TNF α -mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen	209
Abb. 74: Konzentrationsabhängige Steigerung der Palmitat-abhängigen Interleukin-8-mRNA-Expression durch Prostaglandin E ₂	209
Abb. 75: Quantifizierung der EP-Rezeptoren in U937-Makrophagen	210
Abb. 76: Komplette Darstellung repräsentativer Western Blots zur Detektion von pro-Interleukin-1 β und GAPDH in U937-Zelllysaten und im U937-Zellkulturüberstand	211
Abb. 77: Komplette Darstellung repräsentativer Western Blots zur Detektion von Akt, phospho-Akt, IKK β und phospho-IKK β in U937-Zelllysaten	212
Abb. 78: Komplette Darstellung repräsentativer Western Blots zur Detektion von I κ B, phospho-I κ B, ERK1/2 oder phospho-ERK1/2 in U937-Zelllysaten	213
Abb. 79: Komplette Darstellung repräsentativer Western Blots zur Detektion von Cyclooxygenase 2 und β -Aktin in U937-Zelllysaten	214
Abb. 80: Komplette Darstellung repräsentativer Western Blots zur Detektion von Cyclooxygenase 2 und β -Aktin in THP-1-Zelllysaten	214
Abb. 81: Komplette Darstellung repräsentativer Western Blots zur Detektion von STAT3 oder phospho-STAT3 in Zelllysaten primärer Hepatozyten der Ratte	215
Abb. 82: Komplette Darstellung repräsentativer Western Blots zur Detektion von ERK1/2 oder phospho-ERK1/2 in Zelllysaten primärer Hepatozyten der Ratte	216
Abb. 83: Komplette Darstellung repräsentativer Western Blots zur Detektion von IKK β , phospho-IKK β , IRS oder phospho-IRS in Zelllysaten primärer Hepatozyten der Ratte	217

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Oligonukleotide	161
Tabelle 2:	Plasmide	162
Tabelle 3:	Bedingungen der Genexpressionsanalyse mittels <i>quantitative real time polymerase chain reaction</i> (qPCR)	181
Tabelle 4:	Erst- und Zweitantikörper für die Western Blot-Analyse	188
Tabelle 5:	Statistische Analyse der Interaktion von Lipopolysaccharid und Insulin mittels <i>Two-way ANOVA</i>	196
Tabelle 6:	Statistische Analyse der Interaktion von Palmitat und Insulin mittels <i>Two-way ANOVA</i>	197
Tabelle 7:	Statistische Analyse der Interaktion von Prostaglandin E ₂ und Lipopolysaccharid mittels <i>Two-way ANOVA</i>	197
Tabelle 8:	Statistische Analyse der Interaktion von Lipopolysaccharid, Insulin und Prostaglandin E ₂ mittels <i>Two-way ANOVA</i>	198
Tabelle 9:	Statistische Analyse der Interaktion von Palmitat und Prostaglandin E ₂ bzw. EP4-Rezeptor-Agonisten mittels <i>Two-way ANOVA</i>	199

10 Abkürzungsverzeichnis

ABC-Transporter	<i>adenosin triphosphate-binding cassette transporter</i>
ADP	Adenosindiphosphat;
AP-1	Aktivatorprotein 1
AS160	160 kDa-großes Akt-Substrat
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body-Mass-Index
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer-binding-protein</i>
C1P	Ceramid-1-Phosphat
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>
CCL	C-C-Chemokinligand
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CoA	Coenzym A
COX	Cyclooxygenase
cPGES	<i>cytosolic Prostaglandin E synthase</i>
CREB	<i>cyclic adenosine monophosphate responsive element binding protein</i>
CRP	C-reaktives Protein
CXCL	C-X-C-Chemokin-Motiv-Ligand
DAG	Diacylglycerol
DAMPs	<i>damage associated molecular patterns</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EIk-1	<i>ETS-like protein 1</i>
ELOVL5	<i>elongation of very long chain fatty acids protein 5</i>
ERK1/2	<i>extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>
FADS	<i>fatty acid desaturase</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FoxO	<i>forkhead box-containing protein, O subfamily</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Glut	Glukosetransporter
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
gp130	Glykoprotein 130
Grb2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
HEPES	Hydroxyethylpiperazinylethansulfonat
HIF	<i>hypoxia-inducible factor</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G

IKK	<i>inhibitor of nuclear factor-κB kinase</i>
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol-Trisphosphat
IRAK	Interleukin-1-Rezeptor-assozierte Kinasen
IRF	Interferon-regulierender Faktor
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
ISRE	Interferon-sensitives responsives Element
I κ B	<i>inhibitor of nuclear factor-κB</i>
Jak	Januskinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MD-2	<i>myeloid differentiation factor 2</i>
mPGES	mikrosomale Prostaglandin E-Synthase
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MRP4	<i>multidrug resistance protein 4</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
Myd88	<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NCS	<i>newborn calf serum</i>
NF-AT	nukleärer Faktor aktiverter T-Zellen
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa light chain enhancer' of activated B-cells</i>
NLRP3	<i>NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3</i>
OSM	Oncostatin M
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	<i>phosphate-buffered salt solution</i>
PG	Prostaglandin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositolbisphosphat
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	<i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RIP140	<i>receptor-interacting protein 140</i>
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1PR	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
SOS	<i>son of sevenless</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TAG	Triacylglycerid
TAK1	<i>transforming growth factor β-activated kinase 1</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TIRAP	<i>toll/interleukin-1 receptor domain-containing adaptor protein</i>
TLR	<i>toll-like receptors</i>

TNF	Tumornekrosefaktor
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>toll/interleukin-1 receptor domain-containing adaptor protein inducing interferon β</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
WAT	<i>white adipose tissue</i>
WHO	<i>World Health Organisaton</i>

Redaktionelle Änderungen nach Einreichung

Im Folgenden sind Änderungen aufgeführt, die nach Eröffnung des Promotionsverfahrens und der Disputation erfolgt sind.

Titelblätter	Ergänzende Informationen zu Ort und Tag der Disputation sowie Hauptbetreuer, Mentorin, Gutachter:innen und Promotionskommission wurden hinzugefügt.
VIII	Englischsprachige Zusammenfassung (Abstract) wurde hinzugefügt
Literatur- und Ergebnisteil	Eigene Publikation [295], welche erst nach Einreichen der Dissertation akzeptiert und veröffentlicht wurde, wurde hinzugefügt
S. 68	Die Überschrift „U937“ in Abb. 29A wurde in „THP-1“ korrigiert.
S. 129; 2. Absatz; 2 Satz	In der ursprünglichen Version wurde eine Palmitatkonzentration von 500 μM angegeben, statt den korrekten 100 μM Palmitat.
S. 200-201	Fehlerhafte Datensätze in Abb. 64 und 65 (Anhang 7.2) wurden korrigiert bzw. gelöscht. Daraus folgend: <ul style="list-style-type: none">- Anzahl der Experimente wurde auf 5 korrigiert.- Folgender Abschnitt wurde gelöscht: „<u>Beteiligte</u>: Einige Zellkulturexperimente (einschließlich RNA-Isolation, cDNA-Synthese und qPCR) wurden von Rodolfo Gonzalez Camargo im Rahmen seiner Doktorarbeit durchgeführt.“- „1 nM und“ auf S. 113 wurde gestrichen.

Danksagung

Gut Ding will Weile haben. Während der langen Zeit der Promotionsphase stand mir Herr Prof. Püschel als Betreuer und Doktorvater stets unterstützend und motivierend zur Seite. Ich bedanke mich daher bei ihm für die Ausarbeitung und Überlassung dieses spannenden Projekts und für das in mich gesetzte Vertrauen. Außerdem bedanke ich mich bei ihm für die wissenschaftliche Betreuung, für das hohe Interesse an dem Projekt und die vielen inspirierenden Ideen und Gedanken zu neuen Ergebnissen und Problemen meiner Forschungsarbeit.

Ich danke allen Gutachtern für ihre Bereitschaft zur Übernahme der Gutachtertätigkeit.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei allen ehemaligen Kolleginnen und Kollegen der Abteilung Biochemie der Ernährung für die angenehme und motivierende Arbeitsatmosphäre, die vielen kleineren und größeren Hilfestellungen und die unzähligen Gespräche – sei es über wissenschaftliche oder private Themen. Ich bin jeden Tag gern ins Labor gekommen und das lag vor allem an euch! Ein ganz besonderer Dank gilt dabei Janin Henkel, welche mich zunächst in den Laboralltag eingearbeitet hat und mir während der gesamten Promotionsphase als Mentorin zur Seite stand. Ich bedanke mich bei meinen Bachelorstudentinnen Charline Zunder, Sarah Brunner und Meike Statz, deren Ergebnisse zum Teil in diese Arbeit eingeflossen sind. Ich hoffe, ihr habt mindestens genauso viel von mir gelernt, wie ich von euch!

Relika, Nils und Ben danke ich für die Unterstützung als Erfolgsteam und für die Motivation. Ich freue mich darauf, noch lange in Kontakt mit euch zu bleiben und bin gespannt, wie sich unsere (Karriere-)Wege weiterentwickeln. Ich danke dem Team der Potsdam Graduate School für die Organisation vieler spannender Veranstaltungen und Workshops, welche mich bei der Findung meines beruflichen Weges sehr unterstützt haben.

Mein größter Dank gilt meiner Familie. Bei meiner Schwester, meinen Eltern und Großeltern möchte ich mich besonders dafür bedanken, dass ihr mich bedingungslos liebt und, egal was ich mir vornehme, immer hinter mir steht. Ich danke Denny dafür, dass er mich während meiner gesamten Promotionszeit mit viel Verständnis und Geduld begleitet hat und vor allem dafür, dass er den Weg mit mir gemeinsam gegangen ist und weiterhin geht. Danke dafür und für noch so viel mehr!

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig, ohne unzulässige fremde Hilfe und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Arbeit wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form an einer anderen Universität als der Universität Potsdam eingereicht.

Finowfurt, den

Julia Klauder