

Metabolismus von Makrophagen während Hypoxie oder Adipositas

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe - Universität
in Frankfurt am Main

von
Marcel Boß
aus Frankfurt am Main

Frankfurt 2015
(D 30)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie

der Johann Wolfgang Goethe - Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Michael Karas

Gutachter: Prof. Dr. Bernhard Brüne und Prof. Dr. Klaas Martinus Pos

Datum der Disputation: 13.01.2016

Danksagung

Ich danke...

... Prof. Dr. Bernhard Brüne und PD Dr. Dmitry Namgaladze für das spannende Projekt und ihre Betreuung.

... Prof. Dr. Klaas Martinus Pos für die Betreuung am Fachbereich.

... Dmitry für seine Betreuung, seine zahlreichen Ideen und seinen Ehrgeiz.

... Marina, Ryan, Laura Ann, Isabelle, Kate und Sahil für die angenehme Atmosphäre im Labor und hilfreiche Vorschläge.

... dem Rest des Labors für die Unterstützung bei Fragen und den Spaß, den wir hatten.

... Charlie Beck für seine Hilfe im Radioaktivlabor.

... TRIP und der Else-Kröner-Fresenius-Stiftung für die finanzielle und ideelle Unterstützung meiner Doktorarbeit

... meinen Eltern für ihre Unterstützung, ohne die mein Studium nicht möglich gewesen wäre.

... meiner Schwester Corinna für ihre motivierenden Worte.

... Janina für ihre Hilfe bei der Doktorarbeit und für ihre Geduld und ihr Verständnis.

Inhalt

Danksagung.....	iii
Zusammenfassung.....	vii
Abkürzungsverzeichnis.....	ix
Abkürzungen.....	ix
Einheiten.....	xii
Größenordnungen.....	xii
1 Einleitung.....	1
1.1 Arteriosklerose.....	2
1.1.1 Pathogenese von Arteriosklerose.....	2
1.1.2 Behandlung von Arteriosklerose.....	3
1.2 Peroxisomproliferator aktivierte Rezeptoren (PPARs).....	3
1.3 Rolle der Lipoproteinlipase (LPL) in Arteriosklerose.....	5
1.4 Fettsäuren bindende Proteine (FABPs).....	6
1.5 Polarisierung von Makrophagen.....	9
1.6 Diabetes mellitus Typ 2.....	10
1.6.1 Pathogenese.....	10
1.6.2 Behandlung.....	12
1.7 AMP aktivierte Proteinkinase (AMPK).....	13
1.8 Die Antwort auf ungefaltete Proteine (UPR).....	14
1.9 Fragestellung.....	16
2 Material und Methoden.....	18
2.1 Materialien.....	18
2.1.1 Chemikalien.....	18
2.1.2 Antikörper.....	20
2.1.3 Geräte und Plastikmaterial.....	21
2.1.4 Standardlösungen.....	22
2.1.5 Primer.....	23

2.2	Methoden.....	24
2.2.1	Isolierung von Monozyten aus humanem Blut	24
2.2.2	Isolierung von Präadipozyten aus Fettgewebe und deren Differenzierung zu Adipozyten 25	
2.2.3	Isolierung von Lipoproteinen aus menschlichem Blut	26
2.2.4	Herstellung von konditionierten Medien (MCM).....	26
2.2.5	SDS-PAGE und Western Blot.....	26
2.2.6	Messung von Zytokinen in Zellüberständen	29
2.2.7	Messung von mRNA-Mengen	29
2.2.8	Bestimmung des Triglyceridgehalts von Zellen.....	31
2.2.9	Messung der Aufnahme von oxLDL	31
2.2.10	Messung der Glucoseaufnahme von Adipozyten.....	31
2.2.11	Luciferase-Reporter-Versuch	32
2.2.12	siRNA-vermittelter <i>Knockdown</i> von Proteinen	32
3	Ergebnisse	34
3.1	FABP4 verstärkt die TG-reiche Schaumzellbildung in Makrophagen	34
3.1.1	IL-4 induziert einen Lipide aufnehmenden Phänotyp in Makrophagen	34
3.1.2	Inhibition von FABP4 vermindert PPAR γ -abhängige Luciferaseexpression.....	39
3.1.3	FABP4-Inhibition vermindert die PPAR γ -abhängige Genexpression	40
3.1.4	FABP4-Inhibition während der Differenzierung von THP-1-Zellen reduziert die PPAR γ - abhängige Genexpression	49
3.2	Überstände von Palmitat-behandelten hypoxischen Makrophagen induzieren eine entzündliche Antwort in Adipozyten	51
3.2.1	Differenzierung der Adipozyten.....	51
3.2.2	MCM: H-PA induziert keine Insulinresistenz.....	52
3.2.3	MCM: H-PA erhöht die basale Glucoseaufnahme.....	54
3.2.4	MCM: H-PA induziert eine entzündliche Antwort in Adipozyten	55
3.2.5	Inhibition von JNK, aber nicht von p38 in Makrophagen vermindert die entzündliche Antwort der Adipozyten	56

3.3	AICAR reduziert die ER-Stress-Antwort in primären Makrophagen.....	58
3.3.1	Von verschiedenen AMPK-Aktivatoren hat AICAR den stärksten anti-entzündlichen Effekt in Makrophagen	58
3.3.2	AICAR reduziert die ER-Stress-Antwort in Makrophagen.....	63
3.3.3	AICAR wirkt unabhängig von AMPK	68
3.3.4	Der hemmende Effekt von AICAR auf die ER-Stress-Antwort ist unabhängig von Adenosin-Signalwegen	73
3.3.5	AICAR wird mittels SLC28A3 von Zellen aufgenommen.....	74
4	Diskussion.....	79
4.1	FABP4 aktiviert PPAR γ	79
4.2	Hypoxie und Palmitat behandelte Makrophagen schütten Zytokine aus, die eine Entzündungsantwort in Adipozyten auslösen	83
4.3	AICAR reduziert deutlich Entzündungsreaktionen und ER-Stress in primären humanen Makrophagen	85
4.4	Ausblick	88
	Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:	89
5	Referenzen	90

Zusammenfassung

Starkes Übergewicht und eine damit einhergehende Hypertrophie von Geweben aber auch des Herz-Kreislauf-Systems führen zu einer Reihe von Folgeerkrankungen wie z. B. Diabetes mellitus Typ 2 oder auch Arteriosklerose. Während im Fettgewebe freie Fettsäuren, die von Makrophagen aufgenommen werden, eine entscheidende Rolle spielen, scheint in der Pathogenese von Arteriosklerose die Aufnahme von Fettsäuren aus Lipoproteinpartikeln durch Makrophagen von großer Wichtigkeit zu sein. Ein weiterer Faktor, der durch freie Fettsäuren ausgelöst wird ist ER-Stress.

Makrophagen, die zu Triglycerid (TG) reichen Schaumzellen geworden sind, akkumulieren in arteriosklerotischen Läsionen. Der Lipidmetabolismus von Makrophagen wird transkriptionell u.a. durch den Transkriptionsfaktor PPAR γ (Peroxisomproliferator aktivierter Rezeptor γ) reguliert. Sein Zielgen FABP4 (Fettsäuren bindendes Protein 4) beschleunigt die Entwicklung von Arteriosklerose in Mausmodellen. Da die Expression von PPAR γ und FABP4 in IL-4- (Interleukin-4) polarisierten Makrophagen induziert wird, sollte die Rolle von FABP4 in humanen, mit IL-4 polarisierten Makrophagen untersucht werden.

Hierfür wurden primäre humane Monozyten in Anwesenheit von LPS/IFN γ (Lipopolysaccharid/Interferon γ) bzw. IL-4 zu Makrophagen differenziert. Es zeigte sich, dass in LPS/IFN γ stimulierten Makrophagen PPAR γ und dessen Zielgene nicht exprimiert wurden. Dagegen waren sie bei unstimulierten Makrophagen bei IL-4 stimulierten Makrophagen deutlich erhöht. Dies spiegelte sich auch in einer erhöhten Aufnahme von Triglyceriden aus VLDL-Partikeln (Lipoproteinpartikel sehr niedriger Dichte) wider. IL-4 induzierte also einen Fettsäuren akkumulierenden Phänotyp. Durch einen PPAR-Luciferase-Reporter-Test wurde untersucht, ob FABP4 für die Aktivierung von PPAR γ nötig war. Dies konnte bestätigt werden, da PPAR γ durch seinen Liganden Linolsäure nur in Anwesenheit von FABP4 aktiviert werden konnte. Diese Aktivierung konnte zusätzlich durch den FABP4-Inhibitor HTS01037 verhindert werden.

Nun sollte der Einfluss von FABP4 auf die PPAR γ -abhängige Genexpression untersucht werden. Hierfür wurde FABP4 während der Differenzierung mit den beiden Inhibitoren HTS01037 oder BMS309403 in IL-4 stimulierten Makrophagen inhibiert. Durch die Inhibition von FABP4 sank die Expression von FABP4 und LPL (Lipoproteinlipase), während die von PPAR γ unverändert blieb. Die LPL spielt eine entscheidende Rolle in der Aufnahme von Lipiden aus VLDL-Partikeln und trägt somit zur TG-reichen Schaumzellbildung bei. Die verminderte Expression von LPL spiegelte sich in einer verminderten Lipidaufnahme aus VLDL-Partikeln wider. Gleichzeitig wurde durch die FABP4-Inhibition die Entzündungsantwort der Makrophagen auf VLDL-Partikel abgeschwächt. IL-4 induziert also LPL, indem es PPAR γ aktiviert. FABP4 unterstützt hierbei die Aktivierung von PPAR γ . Durch die Inhibition kann die LPL-Expression vermindert werden, was die TG-reiche Schaumzellbildung und die

Entzündungsreaktion in einem VLDL-reichen Umfeld vermindert und eine neue Therapiemöglichkeit von Arteriosklerose eröffnet.

Im Fettgewebe kommt bei starkem Übergewicht, bedingt durch die erhöhte Konzentration an freien Fettsäuren und Hypoxie, zu einer leichten Entzündungsreaktion. Diese Entzündungsreaktion wurde durch eine Stimulation mit Palmitat unter Hypoxie (1 % O₂) nachgebildet. Überstände von Makrophagen nach dieser Stimulation (MCM) wurden auf primäre humane Adipozyten übertragen. Diese Überstände konnten zwar keine Insulinresistenz in Adipozyten auslösen, induzierten jedoch eine Entzündungsreaktion. Diese zeigte sich in einer erhöhten Expression der proentzündlichen Zytokine CCL2 (CC-Chemokin-Ligand-2) und IL-6. Gleichzeitig wurde die Expression des anti-entzündlichen Zytokins Adiponectin vermindert. Der Transfer von MCM ist also ein Modell für die Entstehung der Insulinresistenz in einem frühen Stadium.

Beim Versuch, die entzündungsfördernde Fähigkeit des MCMs zu verhindern, wurde AMPK mit verschiedenen Aktivatoren stimuliert. Es zeigte sich, dass der AMPK-Aktivator AICAR (5-Aminoimidazol-4-carboxamidribonukleotid) die Entzündungsantwort und den ER-Stress von mit Hypoxie und Palmitat stimulierten Makrophagen deutlich reduzierte. Der starke Effekt auf den ER-Stress konnte auch mit anderen ER-Stress-Auslösern wie Thapsigargin oder Tunicamycin nachvollzogen werden. Da AICAR ein AMPK-Aktivator ist, wurden typische Effekte der AMPK-Aktivierung wie reduzierte Proteinexpression, verstärkte Sirtuin-1-Aktivierung und Steigerung der Fettsäureoxidation mittels Inhibitoren verhindert. Dies hatte keinen Einfluss auf die Wirkung von AICAR. Ebenso wurde untersucht, ob AICAR in die Zelle aufgenommen werden musste und ob es zu seiner phosphorylierten Form ZMP umgewandelt werden musste. Durch den Inhibitor ABT-702 kann die Adenosinkinase inhibiert werden, welche die Phosphorylierung katalysiert. Es zeigte sich, dass die Phosphorylierung von AICAR zu ZMP nicht erforderlich war, damit AICAR die ER-Stress-Antwort hemmen konnte. AICAR und nicht ZMP wirkte gegen den ER-Stress. Da durch das fehlende ZMP die AMPK nicht aktiviert wurde, war das ein weiteres Zeichen, dass AICAR AMPK-unabhängig wirkte. Dies konnte durch einen AMPK-*Knockdown* bestätigt werden. Durch einen *Knockdown* verschiedener Adenosintransporter konnte gezeigt werden, dass SLC28A3 (Soluttransporterfamilie 28 Typ A3) verantwortlich für die Aufnahme von AICAR in primäre humane Makrophagen war.

Es konnte demnach gezeigt werden, dass AICAR den ER-Stress in primären humanen Makrophagen in einem von AMPK unabhängigen Mechanismus vermindert. Dafür wird es mittels SLC28A3 in die Zelle aufgenommen und wirkt als AICAR und nicht als ZMP. Diese Erkenntnisse stellen eine interessante, neue therapeutische Möglichkeit im Feld von Arteriosklerose und Diabetes dar.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

2-DOG	2-Deoxyglucose
ABCA1	ABC-Transporter A1
ABCG1	ABC-Transporter G1
ABC-Transporter	ATP bindende Kasette-Transporter (engl. <i>ATP binding cassette transporter</i>)
ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
ACE	Angiotensin konvertierendes Enzym (engl. <i>Angiotensin converting enzyme</i>)
acLDL	acetyliertes LDL
AICAR	5-Aminoimidazol-4-carboxamidribonukleotid
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ANS	2-Anilino-8-naphthalensulfonat
ApoE	Apolipoprotein E
AS160	Akt-Substrat mit 160 Kda
ATF1	aktivierender Transkriptionsfaktor 1
ATF4	aktivierender Transkriptionsfaktor 4
ATM	Makrophagen des Fettgewebes (engl. <i>adipose tissue macrophage</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
BiP	Immunglobuline bindendes Protein (engl. <i>Binding immunoglobulin protein</i>)
BMI	Body Mass Index
BSA	bovines Serumalbumin
bzw	beziehungsweise
C/EBP	CCAAT-Verstärker bindendes Protein (engl. <i>CCAAT-enhancer-binding protein</i>)
CaMKK	Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinasekinase 1
CCL	CC-Chemokinligand
CD	Unterscheidungsgruppe (engl. <i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	komplementäre DNA (engl. <i>complementary DNA</i>)
CHOP	C/EBP-homologes Protein (engl. <i>C/EBP homologous protein</i>)
CoA	Coenzym A
CREB1	cAMP-responsives Element bindendes Protein 1
DEPC	Diethyldicarbonat
Dil	1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorat
Dip	Dipyridamol
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DPP4	Dipeptidylpeptidase 4
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF2α	eukaryotischer Initiationsfaktor 2 α
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assoziierte Proteindegradation (engl. <i>ER-associated protein degradation</i>)
FABP	Fettsäuren bindendes Protein (engl. <i>fatty acid binding protein</i>)
FACS	Fluoreszenz basiertes Zellsortieren (engl. <i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
FCS	fötales Kälberserum (engl. <i>Fetal calf serum</i>)

GLP-1	Glucagon ähnliches Peptid (engl. <i>glucagon-like peptide</i>)
H	Hypoxie (hier 1 % O ₂)
HA	Hämagglutinin
HBSS	Hanks ausgewogene Salzlösung (engl. <i>Hank's balanced salt solution</i>)
HDL	Lipoprotein mit hoher Dichte (engl. <i>high density lipoprotein</i>)
HETE	15-Hydroxy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenolsäure
HODE	13-Hydroxy-9Z,11E-octadecadienolsäure
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IL	Interleukin
IRE1α	Inositol benötigendes Enzym 1 α (engl. <i>inositol-requiring enzyme 1α</i>)
KCl	Kaliumchlorid
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KRH	Krebs-Ringer-Hänsel-Puffer
LA	Linolsäure
LBD	Ligandenbindedomäne
LDL	Lipoprotein mit niedriger Dichte (engl. <i>low density lipoprotein</i>)
LKB1	Leberkinase B1
LMF1	Lipasenreifungsfaktor (engl. <i>lipase maturation factor</i>)
LPL	Lipoproteinlipase
LPS	Lipopolysaccharid
LXRα	Leber-X-Rezeptor α (engl. <i>Liver X receptor α</i>)
MACS	magnetisch aktivierte Zellsortierung (engl. <i>magnetic-activated cell sorting</i>)
MCM	Makrophagen konditioniertes Medium
MCP-1	Makrophagen anlockendes Protein 1 (engl. <i>macrophage-chemoattractant protein 1</i>)
M-CSF	Makrophagenkolonien stimulierender Faktor (engl. <i>macrophage colony-stimulating factor</i>)
mRNA	Boten-RNA (engl. <i>Messenger RNA</i>)
M-SFM	serumfreies Makrophagenmedium (engl. <i>macrophage - serum free medium</i>)
mTOR	Säugetierziel von Rapamycin (engl. <i>mammalian target of rapamycin</i>)
Na₂HPO₄	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NBTI	S-(4-Nitrobenzyl)-6-thioinosin
NECA	5'-N-Ethylcarboxamidoadenosin
NLS	nukleäre Lokalisationssequenz
P/S	Penicillin und Streptomycin
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (engl. <i>Peripheral blood mononuclear cell</i>)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PERK	Proteinkinase R-ähnliche Kinase (engl. <i>PRKR-like endoplasmic reticulum kinase</i>)
PGC-1α	PPAR γ -Co-Aktivatoren-1 α
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPAR	Peroxisomproliferator aktivierter Rezeptor (engl. <i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)

RNS	reaktive Stickstoffspezies (engl. <i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
S	Serin
S6	ribosomales Protein S6
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfatpolyacrylamidgelelektrophorese (engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis</i>)
siRNA	kleine eingreifende RNA (engl. <i>short interfering RNA</i>)
SLC	Soluttransporter (engl. <i>solute carrier</i>)
SR-A1	engl. <i>Scavenger receptor-A1</i>
SVF	stromale vaskuläre Fraktion
T	Threonin
T3	Triiodthyronin
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung (engl. <i>TRIS buffered saline</i>)
TG	Triglycerid
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TPA	Tetradecanoylphorbolacetat
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TZD	Thiazolidindion
UPR	Antwort auf ungefaltete Proteine (engl. <i>unfolded protein response</i>)
VLDL	Lipoprotein mit sehr niedriger Dichte (engl. <i>very low density lipoprotein</i>)
vs	versus
WZ U	Wünsch-Einheit
XBP-1	XBOX-bindendes Protein-1
ZMP	AICA-Ribosid

Einheiten

°C	Grad Celsius
g	Gramm
h	Stunde
min	Minute
s	Sekunde
l	Liter
M	Molar (Mol/Liter)
Mol	Stoffmenge ($6 \cdot 10^{32}$ Teilchen)
U	Aktivität (Units)
Ci	Curie ($3,7 \times 10^{10}$ Becquerel)
V	Volt
W	Watt
v/v	Volumen pro Volumen (Volumenprozent)
w/v	Masse pro Volumen
g	Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ m/s}^2$)

Größenordnungen

Mio.	Million (10^6)
k	Kilo (10^3)
m	Milli (10^{-3})
μ	Mikro (10^{-6})
n	Nano (10^{-9})
p	Piko (10^{-12})
f	Femto (10^{-15})

1 Einleitung

Übergewicht ist ein globales Problem, das sich vor allem in entwickelten Ländern zeigt. Durch das dort vorhandene Überangebot an Nahrungsmitteln, können die Menschen mehr essen als sie zur Beibehaltung ihres Körpergewichts benötigen. Durch Bewegungsmangel wird diese Situation zusätzlich verschärft. Die Ausmaße dieser Probleme zeigen sich, wenn man bedenkt, dass 2014 weltweit 39 % der Erwachsenen übergewichtig, 13 % krankhaft übergewichtig waren und 9 % unter Diabetes litten (1).

Die Verbindung zwischen starkem Übergewicht, schlechter Gesundheit und dem damit einhergehenden erhöhten Sterberisiko ist bekannt. Zu den Krankheiten, die durch Adipositas begünstigt werden, gehören u. a. Diabetes, Bluthochdruck, koronare Herzerkrankungen, Herzinfarkte und eine verminderte Reproduktionsfähigkeit (1).

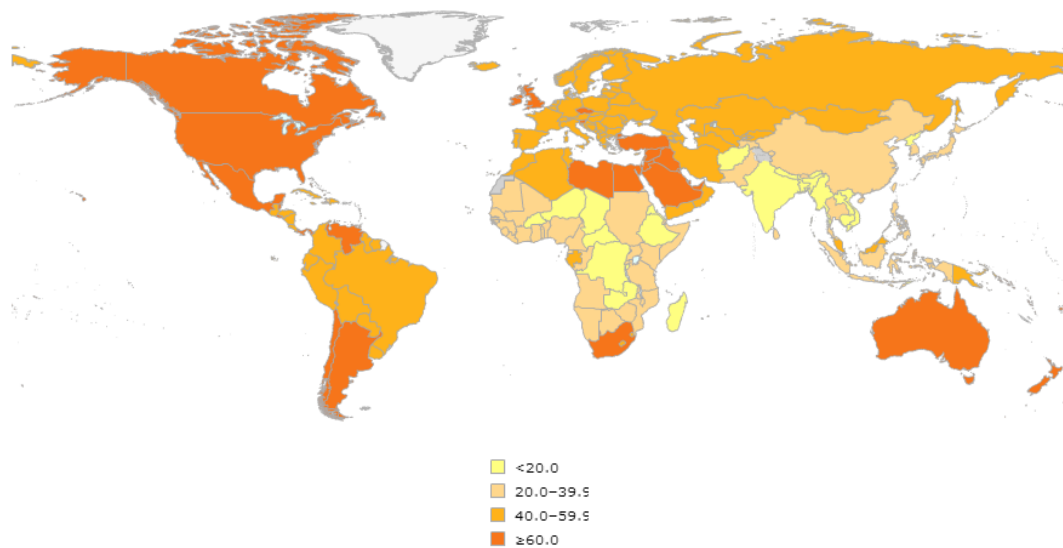


Abbildung 1: Verbreitung von Übergewicht in der Welt. Dargestellt ist der Anteil an übergewichtigen Personen (BMI > 25) in den einzelnen Ländern. Hierbei bedeutet eine gelbe Färbung < 20 %, blassorange 20 % bis 39,5 %, orange 40 % bis 59,5 % und dunkles orange über 60 %. Entnommen aus (1).

Für die Definition von Übergewicht wird häufig der BMI genutzt, der die folgenden Grenzen bestimmt:

Der BMI berechnet sich nach folgender Formel:

$$BMI = \frac{\text{Körpergewicht}}{\text{Körpergröße}^2}$$

Für Männer gilt ein BMI zwischen 20 und 25 kg/m² und für Frauen ein BMI zwischen 19 und 24 kg/m² als normalgewichtig. Ein kleinerer BMI deutet auf Untergewicht hin und ein größerer auf Übergewicht. Hierbei gelten Personen in der Regel ab 25 kg/m² als übergewichtig und ab 30 kg/m² als adipös. Ein hoher BMI bedeutet aber nicht zwangsläufig krankhaftes Übergewicht, sondern muss im Zusammenhang mit weiteren Faktoren wie z.B. dem Körperfettanteil betrachtet werden.

1.1 Arteriosklerose

1.1.1 Pathogenese von Arteriosklerose

Arteriosklerose ist eine Erkrankung des Blutgefäßsystems. Sie zeichnet sich durch die Bildung sogenannter Plaques aus. Diese Plaques führen letztlich zu Verstopfungen oder Rupturen von Arterien mit oftmals schwerwiegenden Auswirkungen bis hin zum Tod (2).

Eine normale, gesunde Arterie besteht aus drei Schichten. Die innerste Schicht wird als *Tunica intima* bezeichnet und besteht aus einem einschichtigen Endothel, das direkt im Kontakt mit dem Blut steht. Die *Tunica media* bezeichnet die mittlere Schicht. Die besteht je nach Lage aus einem größeren Anteil von glatter Muskulatur in der Peripherie oder einem größeren Anteil elastischer Fasern wie Kollagen in Herznähe. Die äußere Schicht bildet die *Tunica externa* oder auch *Tunica adventitia*, die vor allem aus elastischem Bindegewebe besteht und durch ein Gefäßsystem (*Vasa vasorum*), das die Nerven und die Gefäßwand mit Nährstoffen versorgt, durchzogen ist (2).

Bei bestimmten Bedingungen, wie Dyslipidämie, hohem Blutdruck oder einer proentzündlichen Umgebung, bilden die Endothelzellen im Inneren der Adern Adhäsionsmoleküle aus, an die Monozyten binden. Diese Monozyten migrieren dann in die Intima. Dort differenzieren sie zu Makrophagen. Durch die Veränderungen in der Zellwand können auch LDL-Partikel (Lipoproteine niedriger Dichte) in die Arterienwand eindringen. Dort werden sie von Makrophagen aufgenommen und gespeichert, was zur sogenannten Schaumzellbildung führt. Schaumzellen haben ihren Namen der Beobachtung zu verdanken, dass sie im Mikroskop so aussehen, als wären sie mit Schaum gefüllt. Dieser Stimulus, vor allem von biochemisch veränderten Partikeln wie oxidiertem LDL (oxLDL), löst eine entzündliche Reaktion in den Makrophagen aus. Durch die Ausschüttung entzündlicher Zytokine, wie IL-1 β (Interleukin-1 β) oder TNF α (Tumornekrosefaktor α), werden weitere Immunzellen angelockt. Im weiteren Verlauf wandern glatte Muskelzellen in die Intima ein. Dort proliferieren sie und sorgen für die Bildung einer extrazellulären Matrix aus Kollagen und Elastin. So bildet sich eine Art Pfropfen, der den Plaque bedeckt. Im Plaque beginnen Makrophagen, Apoptose zu begehen. Hierbei werden Lipide freigesetzt, die sich extrazellulär akkumulieren. Dies verstärkt die Entzündungsantwort der Makrophagen weiter und sorgt für eine weitere Akkumulation von Makrophagen. Im Laufe dieses Prozesses bildet sich dann ein nekrotischer Kern aus. Die Plaques behindern zum einen den Blutfluss, können aber auch der Ausgangspunkt für eine Thrombose sein und zu einer Embolie führen. Das Blutgefäß selbst ist im Bereich des Plaques destabilisiert und kann deshalb reißen. Das kann je nach Lage der Ruptur tödlich sein (2).

1.1.2 Behandlung von Arteriosklerose

Die Behandlung von Arteriosklerose konzentriert sich darauf, die Risikofaktoren von Arteriosklerose zu reduzieren. Hierfür werden vor allem Medikamente verabreicht, die den Blutdruck senken und die Hyperlipidämie bekämpfen. Ein weiteres Ziel ist das Verhindern von Thromben (3). Als Standardtherapie werden häufig Statine wie Atorvastatin oder Rosuvastatin verschrieben. Diese inhibieren die Cholesterinbiosynthese und senken dadurch effektiv das LDL-Niveau im Blut. Dadurch wird ein Risikofaktor ausgeschlossen und ein entzündungsfördernder Faktor bekämpft (4–6). Eine weitere Behandlungsmöglichkeit ist Niacin. Dieses verhindert den Abbau von Lipiden im Fettgewebe und erhöht gleichzeitig die Blut-HDL-Konzentration (Lipoproteine hoher Dichte). Es wirkt außerdem entzündungshemmend (7, 8). Die Aggregation von Blutplättchen kann durch Antithrombotika gestört werden. Zu diesen gehören z.B. Aspirin, Clopidogrel, Prasugrel oder Ticagrelor (9, 10). Ein weiterer Risikofaktor ist ein hoher Blutdruck. Dieser kann durch Beta-Blocker oder Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Systems wie z.B. ACE-Hemmer (Angiotensin konvertierendes Enzym) gesenkt werden (11, 12).

1.2 Peroxisomproliferator aktivierte Rezeptoren (PPARs)

Die Peroxisomproliferator aktivierten Rezeptoren (PPARs) bilden eine Superfamilie der Kernrezeptoren (13). In Säugetieren sind bisher drei verschiedene beschrieben worden: PPAR α , PPAR β/δ und PPAR γ . Zusammen mit RXR (Retinoid-X-Rezeptor) bilden sie einen Heterodimer, der an ein PPRE (PPAR responsives Element) bindet und dadurch die Transkription verschiedener Gene verstärkt (13–15). Je nach Gewebe, hat dies verschiedene Auswirkung, aber generell werden Gene induziert, die mit Stoffwechselprozessen in Zusammenhang stehen. Zum einen wird die Aufnahme von Lipiden und ihre Oxidation erhöht und gleichzeitig die entzündliche Reaktion gedämpft (16–18).

PPARs binden durch zwei Zinkfinger-Domänen an DNA, während das Erkennen von Liganden in der Ligandenbindetasche in der Ligandenbindedomäne (LBD) erfolgt (19). Die Heterodimerisierung von PPARs und RXRs ist unabhängig von der Ligandenbindung und wird durch Dimerisierungsbindestellen vermittelt (20). Nach Bindung eines Liganden kommt zu einer Strukturveränderung der LBD, wodurch die Bindung von Co-Aktivatoren, aber auch von Co-Repressoren ermöglicht wird (15).

Es wurde eine Vielzahl verschiedener Liganden von PPARs beschrieben. Abbildung 2 zeigt in einer Übersicht die bekannten Liganden der drei verschiedenen PPAR-Isoformen. Bedingt durch die große Ligandenbindetasche verfügen die PPARs über eine bemerkenswerte Vielfalt an Liganden (21, 15).

PPAR α	PPAR β/δ	PPAR γ
<ul style="list-style-type: none"> • Natürliche Liganden: <ul style="list-style-type: none"> • ungesättigte Fettsäuren • Leukotrien B4 • 8-Hydroxyeicosa-tetraenolsäure • Synthetische Liganden: <ul style="list-style-type: none"> • Fenofibrat • Clofibrat • Gemfibrozil 	<ul style="list-style-type: none"> • Natürliche Liganden: <ul style="list-style-type: none"> • ungesättigte Fettsäuren • Carbaprostacyclin • Bestandteile von VLDL-Partikeln • Synthetische Liganden: <ul style="list-style-type: none"> • GW501516 	<ul style="list-style-type: none"> • Natürliche Liganden: <ul style="list-style-type: none"> • ungesättigte Fettsäuren • 15-HETE • 9- und 13-HODE • Prostaglandin PGJ₂ • Synthetische Liganden: <ul style="list-style-type: none"> • Rosiglitazon, Pioglitazon, Troglitazon, Ciglitazon • Farglitazar • S26948 • INT131

Abbildung 2: Natürliche und synthetische Liganden von PPARs. Dargestellt ist eine Übersicht von natürlichen und synthetischen Liganden von PPAR α , PPAR β/δ und PPAR γ . Modifiziert nach (21).

PPAR α spielt vor allem in solchen Gewebe eine Rolle, die Fettsäuren in größerem Ausmaß oxidieren. Hierzu gehören vor allem die Leber, aber auch das Muskelgewebe (21). Die Aktivierung von PPAR α erhöht die Expression von Genen, die mit der Fettsäureoxidation assoziiert sind, was zu einer erhöhten Fettsäureoxidation im jeweiligen Gewebe führt (22, 21). Da zu den Agonisten von PPAR α auch Fettsäuren gehören, erkennt PPAR α eine erhöhte Konzentration von Lipiden in der Zelle und leitet das Programm zu deren Oxidation ein (23). Fehlfunktionen von PPAR α führen demzufolge auch zu einer Fettleber (24).

PPAR β/δ spielt eine zentrale Rolle in der Lipid- und der Cholesterolverarbeitung. Es wird in nahezu allen Zelltypen exprimiert. Zu den Zielgenen gehören Gene, die in Lipidaufnahme und -metabolismus involviert sind. Lipid-Efflux-Gene werden hingegen von PPAR β/δ reprimiert (21). Diese Änderungen im Genexpressionsmuster implizieren eine Funktion, die einer Gewichtszunahme entgegenwirkt und demzufolge auch positiv auf Übergewicht auswirkt (25).

PPAR γ ist von besonderem Interesse, da er sowohl in Adipozyten als auch Makrophagen exprimiert wird (26, 27). Die Aktivierung von PPAR γ im Fettgewebe verstärkt zum einen die Differenzierung zu Adipozyten, verbessert aber auch die Insulinsensitivität (28). In Makrophagen hingegen wird durch die PPAR γ -Aktivierung die Polarisierung in den antientzündlichen M2-Phänotyp induziert und die entzündliche Antwort gehemmt (26). All dies verspricht eine höhere Insulinsensitivität und eine Verbesserung der Arteriosklerose.

PPAR γ wird durch eine Vielzahl verschiedener endogener Lipide aktiviert. Dazu gehört z. B. das Prostaglandin J₂ oder auch die ungesättigte Linolsäure (29). Neben den natürlich vorkommenden Liganden wurden auch einige synthetisch hergestellt. Eine große Gruppe bilden die Thiazolidindione (TZD) bzw. Glitazone mit den beiden bekanntesten Vertretern Rosiglitazon (BRL-49653) und Pioglitazon, die zur Behandlung des Diabetes Typ 2 eingesetzt werden können (30, 31). Die Behandlung Glitazone hat allerdings einige Nebenwirkungen wie Gewichtszunahme und Wassereinlagerungen und wird im Zusammenhang mit Krebserkrankungen gebracht, weshalb sie zurzeit nicht mehr verwendet werden. Zu den Zielgenen von PPAR γ gehören unter anderem FABP4 (Kapitel 1.4), CD36 und LPL (Kapitel 1.3). Diese Gene stehen in Zusammenhang mit intrazellulärem Transport von Fettsäuren und Lipidaufnahme aus oxLDL- oder VLDL-Partikeln (32–34).

1.3 Rolle der Lipoproteinlipase (LPL) in Arteriosklerose

Die Lipoproteinlipase (LPL) ist ein zentrales Enzym des Lipidstoffwechsels. Ihre Aufgabe ist es, Lipide aus TG-reichen (Triglycerid reichen) Chylomikronen oder VLDL-Partikeln zu hydrolysieren. So stehen den Zellen freie Fettsäuren und auch Glycerin zur Verfügung (35). Gleichzeitig unterstützt die LPL auch durch die Förderung der Bindung von VLDL-Partikeln an die Zelloberfläche die Aufnahme von Lipoproteinpartikeln (36). In Skelett- und Herzmuskeln katalysiert die LPL die Freisetzung von Fettsäuren aus Lipoproteinen, die durch diese Zellen zur Energiegewinnung genutzt werden. Auch Adipozyten exprimieren LPL, die hier für die Speicherung von Lipiden in den Adipozyten genutzt wird (35).

LPL wird in der Zelle synthetisiert und dann sekretiert. Sie bindet dann mittels elektrostatischer Wechselwirkungen über Proteoglykane an die Zelloberfläche (37). Zuerst wird LPL im rauen ER synthetisiert und anschließend glykosyliert. Mithilfe des LMF1 (Lipasenmaturationsfaktor 1) bildet sich dann aus dem inaktiven Monomer das katalytische aktive Dimer (35). Es gibt auch einen intrazellulären Pool von falsch gefalteten LPL, die aber degradiert werden (38). Die aktive LPL wird dann weiter in den Golgi-Apparat transportiert, um dort weiter prozessiert zu werden (35). Schließlich wird LPL sekretiert und bindet dann über Proteoglykane an die Zelloberfläche (36). Durch Heparin können diese Wechselwirkungen gestört werden und LPL wird freigesetzt (36).

LPL ist im Kontext von Arteriosklerose interessant, da es von Makrophagen und glatten Muskelzellen exprimiert wird (39). Aber nicht alle Makrophagen in arteriosklerotischen Läsionen exprimieren LPL (39). Während LPL im Blutplasma keinen Effekt auf die Entstehung von Arteriosklerose hat, ist vor allem die Expression in Zellwänden von Arterien pro-arteriosklerotisch (40). Die Lokalisation von LPL ist also entscheidend. Durch ihre Funktion in der Hydrolyse von VLDL-Partikeln trägt sie direkt zur Schaumzellbildung bei (41). VLDL-Partikel können eine Entzündungsreaktion in Monozyten und Makrophagen auslösen(42, 43). Auch hier ist die Aktivität von LPL entscheidend (44). Eine Inhibition von Lipasen verhindert den entzündungsauslösenden Effekt von VLDL in Makrophagen (45).

1.4 Fettsäuren bindende Proteine (FABPs)

Fettsäuren bindende Proteine (FABPs) sind eine Familie von Proteinen, die Fettsäuren und andere hydrophobe Verbindungen binden und transportieren. Bisher wurden neun verschiedene FABPs beschrieben (32). Sie werden in nahezu allen Zelltypen exprimiert und haben eine Größe zwischen 14 und 15 kDa (46, 47). Ihnen wird eine Vielzahl an Funktionen zugeordnet, die in Abbildung 3 dargestellt sind. All diese Funktionen hängen mit Lipiden zusammen, die an verschiedene Orte bzw. Organellen in der Zelle transportiert werden müssen. Hierzu gehört nicht nur die Gewinnung von Energie, sondern auch der Transport von Lipiden in den Zellkern zur Regulation der Transkription.

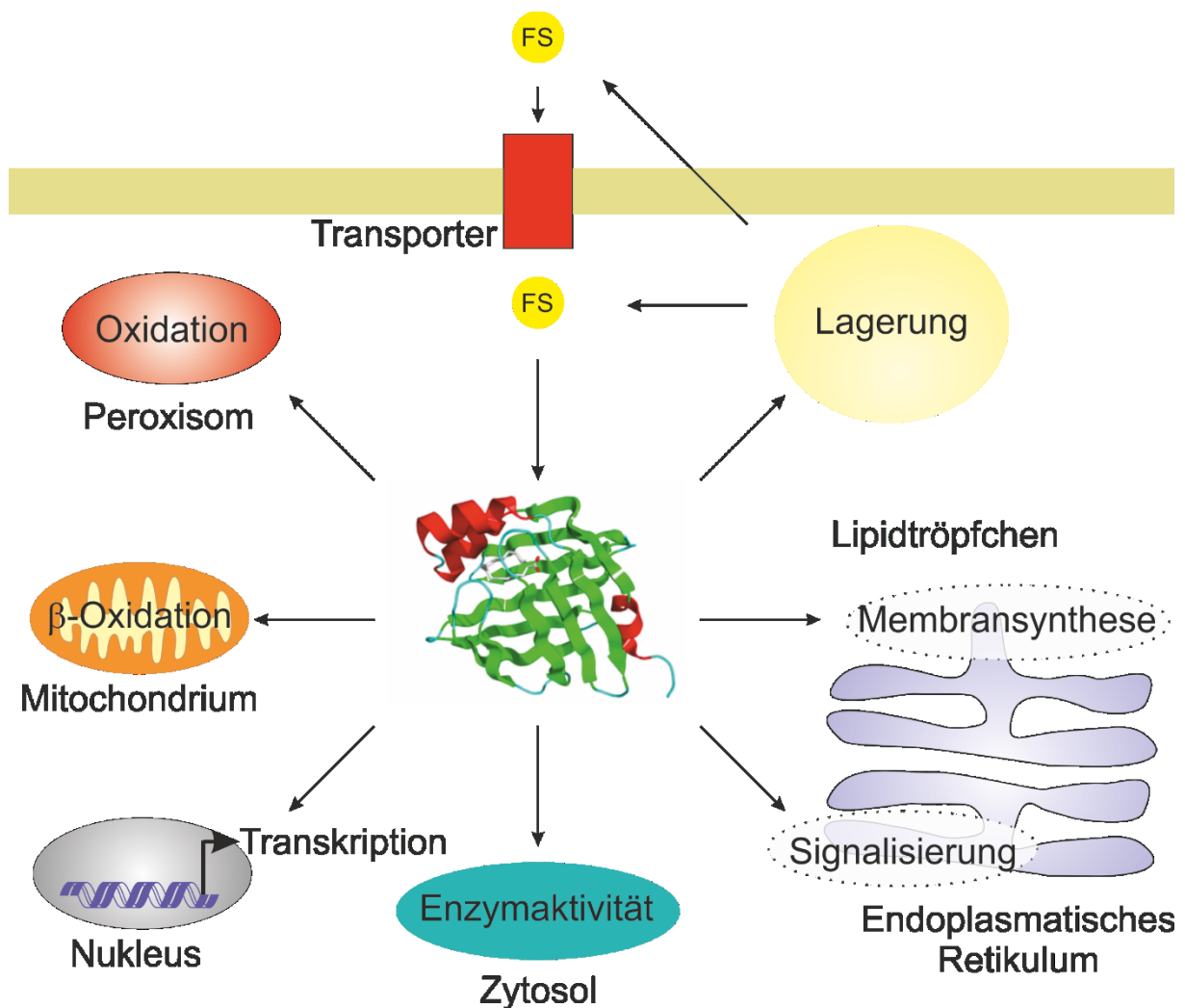


Abbildung 3: Mögliche FABP-Funktionen in der Zelle. Fettsäuren (FS) werden von Zellen aufgenommen und im Zytosol durch FABPs gebunden. Die FABPs vermitteln dann den Transport dieser Fettsäuren in Peroxisomen oder Mitochondrien, wo sie oxidiert werden. Andererseits können sie auch in den Zellkern transportiert werden und dort die Genexpression verändern. Im Zytosol können Enzymaktivitäten moduliert werden. Das ER benötigt Fettsäuren zum einen für die Membransynthese bzw. auch in Signalwegen. Als letzte Alternative bleibt noch die Speicherung von Fettsäuren in Lipidtröpfchen, wo auch hier FABPs eine Rolle für den Transport spielen. Modifiziert nach (32).

Die verschiedenen FABPs zeigen teilweise große Unterschiede in der Sequenz, haben aber trotzdem eine ähnliche Struktur. Gleichzeitig variieren aber auch die Affinitäten für verschiedene Liganden enorm zwischen allen FABPs (32).

Makrophagen und Adipozyten exprimieren jeweils FABP4 und FABP5 (32). Unter physiologischen Bedingungen ist ihr stöchiometrisches Verhältnis in Makrophagen nahezu 1:1 (48). Von diesen beiden wird besonders FABP4 im Zusammenhang mit Erkrankungen wie Diabetes und Arteriosklerose häufig erwähnt (49–57). Es gibt aber auch eine Publikation, die FABP5 mit Arteriosklerose in Zusammenhang brachte. Die Autoren konnten zeigen, dass ein FABP5-Knockout in Mäusen zu einer Reduktion arteriosklerotischer Läsionen führt (58).

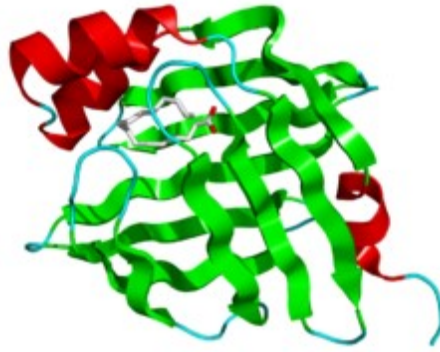


Abbildung 4: Strukturmodell von FABP4. Dargestellt ist ein Bändermodell von FABP4 mit gebundenem Palmitat (Stäbchenmodell). Schleifen sind hellblau, β -Faltblätter grün und α -Helices rot dargestellt. Die Struktur basiert auf Daten von (59).

FABP4 ist ein 15 kDa großes zytosolisches Protein. Seine Struktur ist in Abbildung 4 gezeigt. Es bindet unter anderem Linolsäure, ANS (2-Anilino-8-naphthalensulfonat) oder Troglitazon. Nach Bindung dieser Liganden wird eine NLS (nukleäre Lokalisationssequenz) freigelegt, die dann die Translokation des aktivierten FABP4 in den Zellkern ermöglicht (60). Dort kann FABP4 den Transkriptionsfaktor PPAR γ aktivieren (49). Der genaue Mechanismus ist unbekannt, aber vermutlich bindet FABP4 an PPAR γ und überträgt so den Liganden (61). FABP4 spielt also eine wichtige Rolle in der Regulation der Genexpression von PPAR γ -abhängigen Genen. Während diese Daten auf eine positive Rolle – also eine anti-arteriosklerotische und anti-diabetische Rolle - von FABP4 hindeuten, wurde in vielen Publikationen gezeigt, dass FABP4 Arteriosklerose und Diabetes mellitus Typ 2 verstärkt (62, 50, 63–65).

In Mausmodellen konnte eine Korrelation zwischen der Expression von FABP4 und dem Fortschreiten der Arteriosklerose und Insulinresistenz beobachtet werden (48, 66, 67). Des Weiteren zeigte sich eine Korrelation zwischen der FABP4-Expression und der Verringerung der Stabilität eines arteriosklerotischen Plaques (65). Eine höhere Expression von FABP4 vergrößert das Risiko einer Ruptur. Gleichzeitig wurde beobachtet, dass ein Knockout von FABP4 in Mäusen, die eine Hochfettdiät erhielten, zwar die Gewichtszunahme nicht verhindern konnte, aber die Insulinsensitivität erhöhte (68). Makrophagen von FABP4-Knockout-Mäusen zeigen eine erhöhte Aufnahme von Cholesterin. Dem liegt wahrscheinlich die erhöhte PPAR γ -Aktivität zu Grunde, die infolge des FABP4-Knockouts zu einer erhöhten Expression von CD36 führt (69). Die Inhibition von FABP4 durch den Inhibitor BMS309403 hat einen ähnlichen Effekt. Sie verringert die Expression entzündlicher Zytokine in Mäusen und in humanen Zelllinien (70). Ebenso wurde beobachtet, dass FABP4 die Ubiquitinierung von PPAR γ induzieren konnte und dadurch die Insulinresistenz verstärkte (51).

Die Expression von FABP4 wird insbesondere durch den Transkriptionsfaktor PPAR γ induziert. Liganden von PPAR γ sind unter anderem Fettsäuren oder auch Rosiglitazon bzw. Pioglitazon (siehe auch Kapitel 1.2) (71, 27). Weitere Faktoren, die die Expression von FABP4 in Makrophagen induzieren können, sind LPS (Lipopolysaccharid), TPA (Tetradecanoylphorbolacetat), oxLDL oder fortgeschrittene Glykosylierungsprodukte (50, 63).

1.5 Polarisierung von Makrophagen

Makrophagen können eine Vielzahl verschiedenster Phänotypen annehmen. Früher wurde von klassisch aktivierten Makrophagen oder M1-Makrophagen und alternativ aktivierten Makrophagen oder M2-Makrophagen gesprochen. Die sogenannte M1-Polarisierung kann durch Stimulation mit LPS (Lipopolysaccharid) und Interferon γ und die M2-Polarisierung durch Stimulation mit IL-4 induziert werden. Im Laufe der letzten Jahre wurde das Konzept der Polarisierung weiter entwickelt. Während nun nicht mehr von zwei verschiedenen Makrophagenphänotypen gesprochen wird, wurde anerkannt, dass es eine ganze Vielzahl verschieden aktivierter Makrophagenphänotypen gibt. LPS/Interferon γ -aktivierte Makrophagen und IL-4-aktivierte Makrophagen sind die am besten untersuchten Aktivierungszustände von Makrophagen (72).

Die Stimulation mit LPS und Interferon γ induziert einen proentzündliche Phänotyp. Er zeichnet sich durch eine erhöhte Ausschüttung proentzündlicher Zytokine wie TNF α oder IL-1 β , Produktion von ROS (reaktive Sauerstoffspezies) oder RNS (reaktive Stickstoffspezies) und eine allgemein starke mikrobizide und tumorizide Wirkung aus. Der Metabolismus dieser Makrophagen ist weniger auf Fettsäureoxidation sondern auf Glucoseoxidation ausgerichtet (73). Gleichzeitig ist auch die Aktivität von PPAR γ verringert (18, 74).

Der IL-4-aktivierte Makrophagenphänotyp zeichnet sich durch einen antientzündlichen Phänotyp mit immunregulatorischen Fähigkeiten und einer gesteigerten Phagozytose aus (17, 75, 73). Die erhöhte Phagozytose ergibt sich auch durch die erhöhte Expression von verschiedenen Rezeptoren wie z.B. Mrc1 (Mannoserezeptor-1) oder CD163 (72). IL-4-aktivierte Makrophagen sind außerdem an der Reparatur von Gewebeschäden und Abwehr von Parasiten beteiligt. Des Weiteren scheinen sie eine Tumore unterstützende Funktion zu haben (73). In IL-4-stimulierten Makrophagen ist die PPAR γ -abhängige Genexpression erhöht. CD36, ein Zielgen von PPAR γ (76), ist ein sogenannter Mustererkennungs-Rezeptor, der unter anderem die rezeptorvermittelte Aufnahme von oxLDL-Partikeln in Makrophagen startet (33, 77, 78). Wie bereits erwähnt, gehört auch LPL zu den Zielgenen von PPAR γ und ist dementsprechend in IL-4-polarisierten Makrophagen stärker exprimiert (34, 33, 79). Durch die Inhibition von PPAR γ während der Makrophagendifferenzierung mit AICAR (5-Aminoimidazol-4-carboxamidribonukleotid), kann eine verminderte LPL-Expression beobachtet werden. Dies unterstreicht die Rolle von PPAR γ in der Regulation der LPL-Expression (80). Offen bleibt die Fragestellung, wie die antientzündliche Funktion von IL-4 mit der erhöhten Suszeptibilität für eine VLDL-induzierte Entzündungsreaktion in Einklang gebracht werden kann.

1.6 Diabetes mellitus Typ 2

Diabetes Typ 2 ist eine Folgeerkrankung krankhaften Übergewichts und zeichnet sich durch eine fehlende Reaktion des Körpers auf Insulin gepaart mit einer Fehlfunktion der β -Zellen des Pankreas aus. Der zeitliche Verlauf und auch die Ausprägung beider Symptome sind bei jedem Patienten verschieden. Mittlerweile werden beide Symptome als wichtig für Diabetes mellitus Typ 2 und nicht mehr nur die Insulinresistenz allein als relevant angesehen (81).

1.6.1 Pathogenese

Der menschliche Körper und insbesondere das Fettgewebe können flexibel auf Ernährungs- und Gewichtsveränderungen reagieren. Gewichtszunahme führt zu einer starken Hypertrophie und Hyperplasie des Fettgewebes. Dies hat verschiedenste Folgen: Hypoxie, Zelltod von Adipozyten, eine erhöhte Sekretion von entzündlichen Zytokinen und eine höhere Konzentration freier Fettsäuren (82).

Durch das schnelle Wachstum des Fettgewebes kommt es zu einer Sauerstoffunterversorgung, da die Bildung von Blutgefäßen nicht mit ausreichender Geschwindigkeit erfolgen kann. Es kommt dadurch zu hypoxischen Bedingungen, welche zu einem veränderten Expressionsmuster von Adipokinen führen (83, 84). Durch die Bedingungen im Fettgewebe Fettleibiger werden Apoptose und vor allem Nekrose von Adipozyten induziert (82). Dies lockt Monozyten aus dem Blut an, die im Fettgewebe zu Makrophagen differenzieren. Diese phagozytieren dann die Zellüberreste und freien Lipide (85). Im Gegensatz zu den residenten Makrophagen des Fettgewebes haben die neu eingewanderten Makrophagen einen entzündlichen Phänotyp. So reagieren diese Makrophagen mit einer stärkeren entzündlichen Antwort auf die reichlich vorhandenen freien Fettsäuren. Besonders gesättigte Fettsäuren sind ein entzündlicher Stimulus für Makrophagen (86). Die nun von den Makrophagen freigesetzten Zytokine wie z. B. $\text{TNF}\alpha$ oder $\text{IL-1}\beta$ lösen in den verbliebenen Adipozyten eine entzündliche Antwort aus: Zum einen werden die Insulinsignalwege gestört und zum anderen wird gleichzeitig die Lipolyse von Triglyceriden aus dem Fettspeicher der Adipozyten angeregt. So wird ein Teufelskreis aufgebaut: Die Entzündungsreaktion der Makrophagen induziert eine Insulinresistenz und erhöht die Freisetzung der Fettsäuren durch die Adipozyten. Dies wiederum verstärkt die Entzündungsantwort der Makrophagen, was zu einer sich selbst verstärkenden positiven Rückkopplung führt (87, 88). Dies ist auch in Abbildung 5 zusammengefasst.

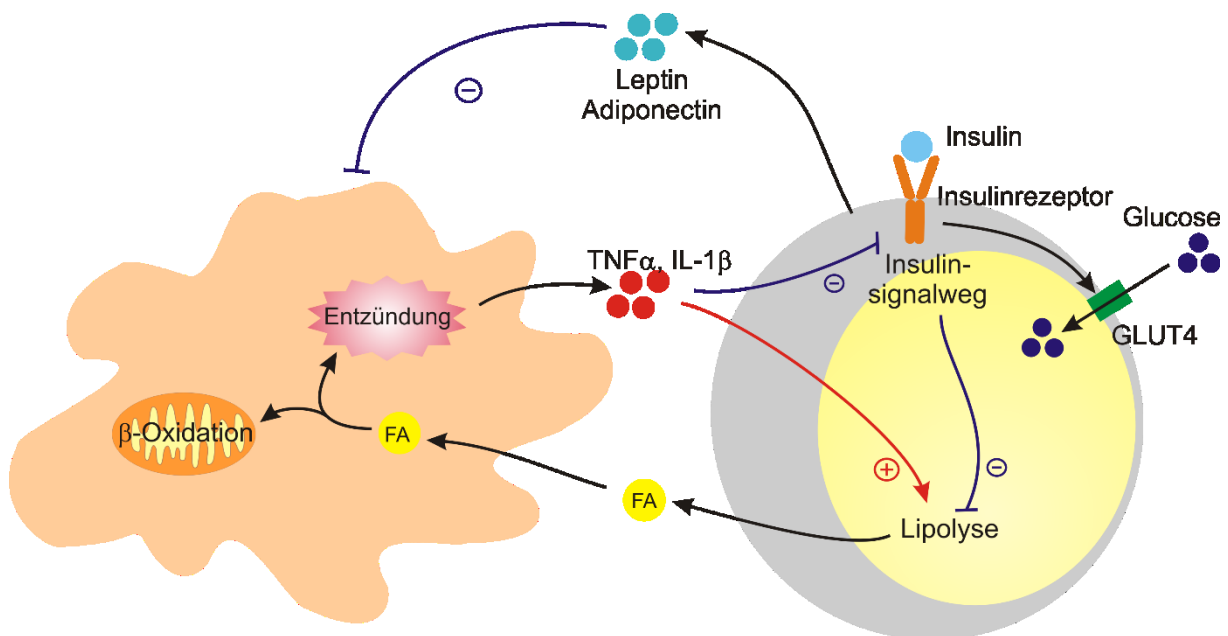


Abbildung 5: Interaktion von Makrophagen und Adipozyten im Fettgewebe. Der Überschuss an freien Fettsäuren (FA) im Fettgewebe fettleibiger Personen löst eine Entzündungsreaktion in eingewanderten Makrophagen aus. Dies führt zur Ausschüttung proentzündlicher Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$ oder $\text{IL-1}\beta$. Diese hemmen die Insulinsignalwege in den Adipozyten, die Expression und Sekretion antientzündlicher Adipokine wie Leptin oder Adiponectin und steigern die Rate der Lipolyse. Die gehemmten Insulinsignalwege haben zur Folge, dass nach Insulinstimulation kein Anstieg der Glucoseaufnahme mehr beobachtet werden kann. Zusammen mit der gesteigerten Lipolyse und der verminderten Expression von Leptin und Adiponectin wird die Entzündungsreaktion im Makrophagen in einem Kreislauf positiver Rückkopplung verstärkt. Falls es gelänge, Fettsäuren der β -Oxidation zuzuführen, könnte dieser Kreislauf unterbrochen werden

Ein weiterer Aspekt von starkem Übergewicht ist der Verlust von β -Zellen im Pankreas. Zu der fehlenden Insulinsensitivität kommt ein Mangel an Insulin. Es wurden verschiedene Mechanismen beschrieben, die zur Zerstörung der β -Zellen führen können: ROS-Produktion, Hyperglykämie, Lipotoxizität und Überlastung durch fortwährende Insulinproduktion und ER-Stress (89).

Die erhöhte Verfügbarkeit von Nährstoffen durch den erhöhten Glucosespiegel sorgt für eine Hypertrophie der β -Zellen. Diese reagieren zunächst mit einer Erhöhung des Stoffwechsels. Die erhöhte Aktivität führt zu einer vermehrten Produktion von ROS, denen β -Zellen relativ schutzlos gegenüber stehen. Die β -Zellen versuchen dem oxidativen Stress zu entgehen, indem sie die Expression des UCP2 (entkoppelndes Protein-2) steigern. Die verminderte ROS-Produktion wird durch eine nun gestörte ATP-Synthese erkauft, wodurch aber auch gleichzeitig die Fähigkeit zur Insulinsekretion verloren geht (90, 89).

Ein weiterer Faktor, der durch die erhöhte Konzentration an Lipiden im Körper bedingt wird, ist die Lipotoxizität. Wichtig hierbei ist, dass Lipotoxizität in β -Zellen im Allgemeinen nur beobachtet werden kann, wenn gleichzeitig auch der Blutzuckerspiegel erhöht ist. Die β -Zellen nehmen die Glucose aus dem Blutkreislauf auf. Da viel Glucose vorhanden ist, wird sie weiter zu Malonyl-CoA (Coenzym A) umgewandelt, die für die Fettsäuresynthese essenziell ist und gleichzeitig die Fettsäureoxidation hemmt. Bei der unter diesen Bedingungen ebenfalls erhöhten Fettsäureaufnahme kommt es zu einer Akkumulation von mit CoA aktivierten Fettsäuren. Vor allem ungesättigte Fettsäuren können nun einen lipotoxischen Effekt auslösen, der sich in einer erhöhten Apoptoserate zeigt (91, 89, 92).

Die dauerhaft erhöhte Glucosekonzentration hat auch noch eine weitere Folge. Die β -Zellen schütten als Antwort auf eine steigende Blutglucosekonzentration Insulin aus. Werden die β -Zellen nun dauerhaft gezwungen, Insulin zu produzieren, wird das ER überlastet und es kommt zu ER-Stress. Eine dauerhafte Aktivierung der ER-Stress-Antwort UPR (Antwort auf ungefaltete Proteine) führt letztlich zur Apoptose der Zellen und somit auch zu einer verminderten Produktion von Insulin (89).

Die Kombination aus verminderter Insulinsensitivität und verminderter Insulinproduktion sind wesentliche Leitsymptome für Diabetes mellitus Typ 2.

1.6.2 Behandlung

Das primäre Ziel der Behandlung von Diabetes Typ 2 ist die Reduktion des Blutzuckerspiegels. Zunächst wird in der Regel versucht, eine Änderung des Lebensstils herbeizuführen. Hierzu wird den Patienten angeraten, ihre Kalorienzufuhr zu verringern und gleichzeitig mehr Sport zu treiben, um eine Gewichtsreduktion zu erzielen. Dies ist aber nicht immer erfolgreich. Das Ziel hierbei ist eine Reduktion des HbA_{1c}-Wertes auf unter 7 %. HbA_{1c} ist ein Glykohämoglobin. An dieses Hämoglobin ist ein Glucose-Molekül gebunden. Diese Reaktion findet ohne enzymatische Katalyse spontan statt und ist ein Maß für die Blutzuckerkonzentrationen der vergangenen 1 bis 3 Monate (93).

In weiteren Stufen der Behandlung von Diabetes erfolgt eine medikamentöse Behandlung. Hierzu wird zunächst Metformin verschrieben. Metformin ist günstig, reduziert den Blutzuckerspiegel zuverlässig ohne eine Unterzuckerung auszulösen und steigert das Körpergewicht nicht. Falls die Reduktion des Blutzuckerspiegels nicht erfolgreich war, wird eine Kombination aus Metformin und Sulfonylharnstoffen, Thiazolidindionen, DPP-4-Inhibitoren (Dipeptidylpeptidase-4), GLP-1-Rezeptor-Antagonisten (Glukagon ähnliches Peptid-1) oder auch Insulin eingesetzt (93).

Metformin gehört zur Klasse der Biguanide. Der Wirkmechanismus ist nicht vollständig bekannt, aber es ist klar, dass Metformin den Blutzuckerspiegel senkt, indem es die Gluconeogenese in der Leber hemmt. Zum einen hemmt es die Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase – ein Komplex der Atmungskette – und zum anderen erhöht es den AMP-Gehalt in den Zellen (94). Dadurch wird ein anderes Enzym aktiviert: die AMP aktivierte Proteinkinase (AMPK) (95, 96).

1.7 AMP aktivierte Proteinkinase (AMPK)

Die AMPK ist ein zentrales Steuerelement im Zellmetabolismus. Die Aktivierung dieser Kinase erfolgt physiologisch durch ein geringes AMP/ATP-Verhältnis. Dies ist ein Zeichen für einen geringen Energiezustand der Zelle. Die Aktivierung von AMPK steigert katabole Prozesse und inhibiert anabole Prozesse, um den Anteil verfügbarer intrazellulärer Energie in Form von ATP zu erhöhen. Eines der wichtigsten Zielproteine ist die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC). Die ACC katalysiert den ersten, irreversiblen Schritt der Fettsäuresynthese (97). AMPK inhibiert durch eine Phosphorylierung von S79 die ACC. Dadurch wird die Konzentration des Produktes Malonyl-CoA gesenkt, wodurch das Edukt der Fettsäuresynthese fehlt. Da Malonyl-CoA auch die Aufnahme von Fettsäuren in die Mitochondrien inhibiert, wird auf diese Weise gleichzeitig auch die Oxidation von Fettsäuren gesteigert. AMPK steigert die mitochondrielle Biogenese, indem sie den Transkriptionsfaktor PGC-1 α (PPAR γ -Co-Aktivator-1 α) aktiviert (98).

AMP aktiviert allosterisch die AMPK. Gleichzeitig erleichtert dies die Phosphorylierung von T172 durch die LKB1 (Leberkinase B1) und erschwert die Dephosphorylierung durch Phosphatasen. Neben der Aktivierung durch einen hohen AMP-Spiegel gibt es verschiedene pharmakologische Aktivatoren der AMPK. Hierbei sind drei verschiedene Wege bekannt: 1. Die Erhöhung des AMP/ATP-Verhältnisses, 2. die Aktivierung der CaMKK β (Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinasekinase), welche die AMPK durch Phosphorylierung aktiviert und 3. die direkte allosterische Aktivierung von AMPK. Der AMP-Spiegel wird durch Metformin, Phenformin oder auch R419 durch eine Inhibition des Komplex I der Atmungskette erhöht (99). Einen ähnlichen Effekt haben auch TZDs (Thiazolidindione). Die CaMKK β kann durch GLP-1-Mimetika oder DPP-4-Inhibitoren aktiviert werden. Direkte allosterische Aktivatoren von AMPK sind u.a. A-769662, Salicylat oder als AMP-Mimetikum auch AICAR. AMPK-Aktivatoren sind für ihre vielfältigen unspezifischen, AMPK-unabhängigen Effekte bekannt. Vor allem die indirekten Aktivatoren üben vielfältige Aktivitäten aus, die nur als Nebeneffekt die AMPK-Aktivierung auslösen (98, 100).

AICAR verfügt ebenfalls über vielfältige Aktivitäten. Neben der AMPK-Aktivierung greift AICAR auch in den Metabolismus ein. Es inhibiert zum Beispiel die Glykolyse (101). Ein weiterer interessanter Nebeneffekt von AICAR ist die Interaktion mit Hsp90. Es inhibiert die Aktivität von Hsp90 und destabilisiert dadurch Zielproteine, die durch dieses Chaperon stabilisiert werden (102). AICAR wird durch Adenosintransporter in die Zelle aufgenommen und dort durch die Adenosinkinase phosphoryliert. Die phosphorylierte Form – ZMP – imitiert AMP und aktiviert dadurch AMPK (103).

1.8 Die Antwort auf ungefaltete Proteine (UPR)

Das endoplasmatische Retikulum ist eine Organelle eukaryotischer Zellen. Zu den wichtigsten Funktionen des ERs gehört neben der Proteinbiosynthese und Qualitätskontrolle auch die Speicherung von Calcium. In und am ER finden Proteinbiosynthesen statt. Die Proteine, die durch das ER modifiziert werden, sind vor allem für die Sekretion bestimmt, aber auch Membranproteine werden durch das ER synthetisiert. Das ER besitzt jedoch nur eine begrenzte Kapazität zur Proteinbiosynthese und -faltung. Falls es mit Proteinen überladen wird, kann es die Proteine nicht mehr in ausreichender Geschwindigkeit falten und prozessieren, sodass sich ungefaltete Proteine im ER ansammeln (97).

Um diesen Zustand zu beheben, hat sich schon frühzeitig in der Evolution der Eukaryoten die Antwort auf ungefaltete Proteine (UPR) entwickelt. Das Ziel der UPR ist zum einen die Vergrößerung der Faltungskapazität, zum anderen aber auch die Verringerung der Proteinlast (104).

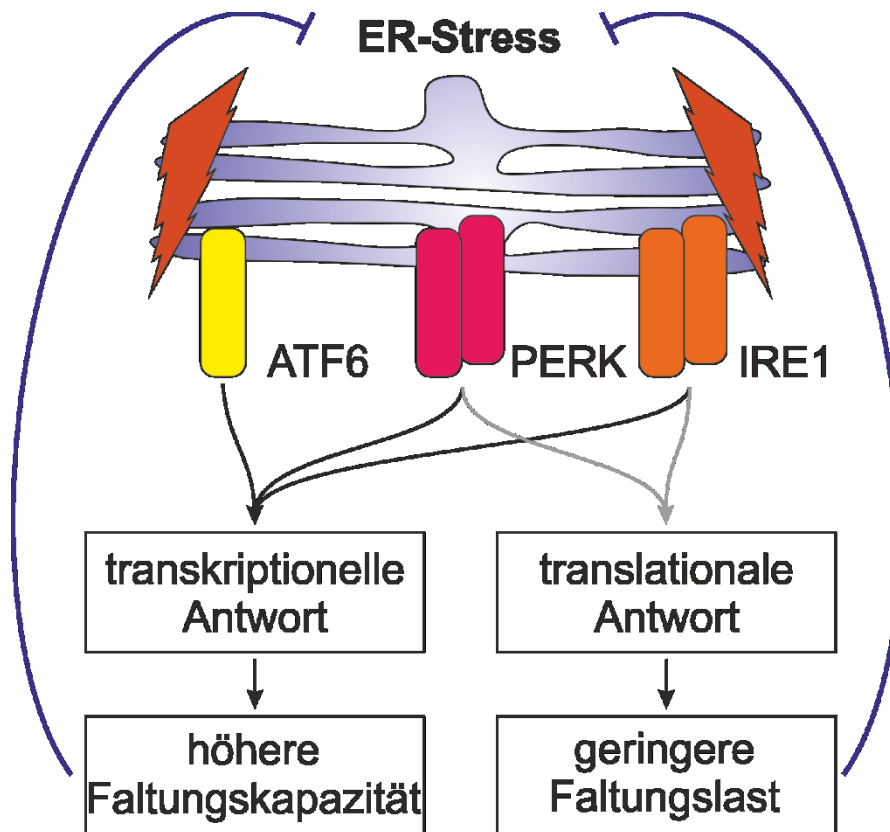


Abbildung 6: Die Kernelemente der UPR. ER-Stress aktiviert die drei ER-Stress-Sensoren ATF, PERK und IRE1. All diese wirken dem ER-Stress durch eine transkriptionelle Antwort entgegen, die die Faltungskapazität des ERs erhöht. PERK und IRE1 reduzieren zusätzlich noch die Arbeitslast des ERs durch eine translationale Kontrolle. Falls die UPR dauerhaft aktiviert wird, führt dies schließlich zur Apoptose der Zelle. Modifiziert nach (104).

Abbildung 6 zeigt eine Übersicht über die UPR. ER-Stress aktiviert die drei Sensoren ATF6 (aktivierender Transkriptionsfaktor-6), PERK (Proteinkinase R-ähnliche Kinase) und IRE1 (Inositol benötigendes Enzym-1). Alle drei erhöhen die Expression von Chaperonen und anderen Proteinen, die die Faltung unterstützen, was die Faltungskapazität des ERs erhöht. PERK und IRE1 kontrollieren die Translation durch eine Induktion von mRNA-Abbau. Hierdurch wird die Last des ERs reduziert. Falls dies nicht erfolgreich ist, wird nach andauernder Aktivierung der UPR die Apoptose induziert (104). Im Folgenden werden nun die drei verschiedenen ER-Stress-Sensoren genauer betrachtet:

ATF6 ist ein Transmembranprotein, das in der ER-Membran sitzt. Während ER-Stress wird es in den Golgi-Apparat transportiert und dort weiter prozessiert. Die 90 kDa-Form wird hier durch die Serinproteasen S1P und S2P geschnitten. Hierdurch wird die zytosolische Domäne freigesetzt. Diese wirkt als ein Transkriptionsfaktor und erhöht die Expression von Genen, die dem ER-Stress entgegen wirken (105, 104).

PERK und IRE1 α sitzen ebenfalls in der ER-Membran. Im Normalzustand liegen die ER-Stress-Sensoren als Monomere vor, die vom Chaperon BiP (Immunglobulin bindendes Protein) an der luminalen Domäne gebunden werden. Falls die Zellen nun unter ER-Stress leiden, dissoziiert BiP von den Monomeren. Anschließend dimerisieren PERK und IRE1 α zu Homodimeren und es kommt zu einer Autophosphorylierung. Nun sind beide Sensoren aktiv. Interessanterweise können die luminalen Domänen von PERK und IRE1 α ausgetauscht werden, ohne dass ein Unterschied in der Funktion beobachtet werden kann (106).

PERK ist eine Kinase und nach Aktivierung phosphoryliert sie den Translationsinitiationsfaktor eIF2 α am Serin 51 (107). Dadurch wird die Translation gehemmt und die Last an zu faltenden Proteinen im ER gesenkt (108, 109). Gleichzeitig gibt es aber Gene, die unter diesen Bedingungen stärker exprimiert werden. Dazu gehört vor allem ATF4 (aktivierender Transkriptionsfaktor-4) (110). ATF4 wiederum ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von proapoptotischen Proteinen wie CHOP (C/EBP-homologes Protein) induziert. Andauernde Aktivierung dieses Weges führt schließlich zur Apoptose (111).

IRE1 α hingegen kann nach Aktivierung mit seiner zytosolischen Domäne die mRNA von XBP1 (Xbox bindendes Protein-1) spleißen (112). Die gespleißte mRNA von XBP1 wird anschließend in einen Transkriptionsfaktor translatiert. XBP1s steigert die Expression von Genen, die für Chaperone, Lipidbiosynthese oder ERAD (ER-assoziierte Proteindegradation) kodieren (104). Die Aktivität von ATF6 scheint aber Voraussetzung dafür zu sein, dass überhaupt genügend XBP1-mRNA vorhanden ist, die gespleißt werden kann (112).

1.9 Fragestellung

Die Pathogenese von Arteriosklerose ist vor allem in humanen System noch nicht vollständig verstanden. Besonders die Rolle der Makrophagen in der Bildung von arteriosklerotischen Läsionen im Humansystem ist noch nicht völlig aufgeklärt. Über FABP4 gibt es widersprüchliche Theorien, die auf der einen Seite eine aktivierende, aber andererseits auch eine inhibierende Rolle auf PPAR γ beschreiben. Da IL-4 als ein anti-entzündliches Zytokin einerseits der Bildung von arteriosklerotischen Läsionen entgegenwirken sollte, aber andererseits auch PPAR γ aktiviert, ist es spannend zu sehen, welcher Effekt von FABP4 in IL-4-aktivierten Makrophagen überwiegt.

Weiterhin soll aufgeklärt werden, wie das Zusammenspiel von Makrophagen und Adipozyten eine Insulinresistenz auslösen kann. Hierfür sollen Makrophagen mit einem entzündlichen Stimulus - Hypoxie + Palmitat – behandelt werden. Hierdurch sollen die Bedingungen im Fettgewebe adipöser Menschen nachempfunden werden. Durch den Transfer von Zellkulturüberständen dieser Makrophagen auf Adipozyten soll eine Entzündungsreaktion bis hin zur Insulinresistenz in Adipozyten induziert werden. In einem weiteren Schritt soll dann durch AMPK-Aktivierung in Makrophagen der entzündungsfördernde Effekt verringert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Folgende Chemikalien und Kits wurden für diese Arbeit verwendet:

Tabelle 1: Tabelle der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Kits und Medien.

CHEMIKALIE	HERSTELLER
2-Deoxyglucose	Sigma-Aldrich
2-Propanol	Sigma-Aldrich
AICAR	Enzo
Amaya Nucleofector Kit	Lonza
Biotin	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Carl Roth
BSA	Carl Roth
BSA, fettsäurefrei	Sigma-Aldrich
CD14 microbeads	Miltenyi-Biotec
Chloroform	Sigma-Aldrich
Collagenase NB 4G Proved Grade	Serva
Cortisol	Sigma-Aldrich
DEPC	Sigma-Aldrich
D-Glucose	Sigma-Aldrich
Dil	Thermo Fisher Scientific
DMEM High Glucose-Medium	Thermo Fisher Scientific
DMEM/Ham's F12 (1:1 Mischung)	Sigma-Aldrich
DTT	Sigma-Aldrich
Ethanol	Sigma-Aldrich
FCS	Capricorn
Glycerin	Sigma-Aldrich
Glycin	Sigma-Aldrich
HBSS	Sigma-Aldrich
HiPerFect	QIAGEN
HTS01037	Cayman Chemicals
Humanserum	Blutspendedienst
Hydrocortison	Sigma-Aldrich
IBMX	Sigma-Aldrich
IL-4	Immunotools
Insulin	Sigma-Aldrich
jetPRIME	Polyplus
Lowry Protein Assay	Bio-Rad
Macrophage-SFM	Life Technologies
Maxima First Strand cDNA synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific
Methanol	Sigma-Aldrich
Na-EDTA	Carl Roth
Na-SDS	Applichem

Natriumfluorid	Carl Roth
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich
NECA	Enzo
Netzteil	Bio-Rad
Nonidet P40	Applichem
Palmitinsäure	Sigma-Aldrich
Pantothensäure	Sigma-Aldrich
PBS	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich
peqGOLD RNAPure	Peqlab
Phloretin	Sigma-Aldrich
PMSF	Applichem
Protease-Inhibitor-Mix	Roche
qPCR Master Mix	Bio-Rad
RPMI 1640	Life Technologies
SDS-Gelelektrophoreseapparatur	Bio-Rad
siRNA AMPKα1 SMART Pool	Dharmacon
siRNA FABP4 SMART Pool	Dharmacon
T3	Sigma-Aldrich
TG Analyse	Roche
Thapsigargin	Sigma-Aldrich
Transferrin	Sigma-Aldrich
TRIS	Applichem
Triton X-100	Applichem

2.1.2 Antikörper

Folgende Antikörper wurden für diese Arbeit verwendet:

Tabelle 2: Tabelle der in dieser Doktorarbeit eingesetzten Antikörper.

ZIEL	HERSTELLER	SPEZIES	BESTELLNUMMER
Aktin	Sigma- Aldrich	Kaninchen	
ATF4 / CREB-2	Santa Cruz	Kaninchen	200
FABP4	Santa Cruz	Ziege	18661
IRE1α	Cell Signaling	Kaninchen	3294
LPL	Santa Cruz	Kaninchen	32885
Nucleolin	Santa Cruz	Kaninchen	13057
PERK	Cell Signaling	Kaninchen	3192
Phospho-ACC (S79)	Cell Signaling	Kaninchen	3661
Phospho-Akt (S473)	Cell Signaling	Kaninchen	4060
Phospho-Akt (T308)	Cell Signaling	Kaninchen	2965
Phospho-AS160 (T642)	Cell Signaling	Kaninchen	4288
Phospho-c-Jun	Cell Signaling	Kaninchen	3270
Phospho-eEF2 (T56)	Cell Signaling	Kaninchen	2331
Phospho-eIF2α	Cell Signaling	Kaninchen	3398
Phospho-IRE1α (S724)	Abcam	Kaninchen	124945
Phospho-S6 (S240/244)	Cell Signaling	Kaninchen	2215
PPARγ	Cell Signaling	Kaninchen	2443
XBP-1s	BioLegend	Kaninchen	619502

Standardmäßig werden die Primärantikörper 1:1000 verdünnt. Als Zweitantikörper zur Entwicklung des Western Blots wird ein fluoreszenzmarkierter Antikörper, der gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichtet ist, verwendet. Hierfür wird entweder IRDye 800CW bzw. IRDye 680LT von Li-Cor in einer 1:10000-Verdünnung verwendet.

2.1.3 Geräte und Plastikmaterial

Tabelle 3 listet die für diese Arbeit verwendeten Geräte und Plastikmaterialien auf.

Tabelle 3: Tabelle der in dieser Arbeit verwendeten Geräte und Plastikmaterialien.

GERÄT	HERSTELLER
Apollo-8 LB 912	Berthold Technologies
Autoklav DX-200	Systemec
autoMACS	Miltenyi-Biotec
BioSpectrometer kinetic	Eppendorf
CasyTT Zellzähler	Schärfe System
HERAcell Inkubator	Heraeus
HERAsafe Sterilbank	Heraeus
Incubator Shaker Innova 44	New Brunswick Scientific
Infrarot-Western Blot-Leser Odyssey	Li-Cor
Magnetrührer MR3000	Heidolph Instrumente
Mithras LB 940	Berthold Technologies
Nanodrop ND-1000 Spektrometer	Peqlab
Optima L-90K Ultrazentrifuge	Beckmann-Coulter
PCR Mastercycler	Eppendorf
pH-Meter CG842	Reiss Laborbedarf
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen	Starlab
Pipettierhilfe Pipet Boy	Hirschmann Laborgeräte
Reaktionsgefäße	Greiner Bio-One
Realtime CFX-System	Bio-Rad
Thermomixer compact 5436	Eppendorf
Titramax 100 Schüttler	Heidolph Instrumente
Trans-Blot SD Blotter	Bio-Rad
Trans-Blot Turbo	Bio-Rad
Waage AE163	Mettler-Toledo
Waage MC1	Sartorius
Wasserbad SW20C	Julabo
Zellkulturflasche	Greiner Bio-One
Zellkulturschale	Greiner Bio-One
Zellkulturschalen für primäre Zellen	Sarstedt
Zellsiebe	Greiner Bio-One
Zentrifuge 5415R	Eppendorf

2.1.4 Standardlösungen

Im Folgenden werden häufig verwendete Pufferlösungen erläutert.

2.1.4.1 PBS

137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
10 mM	Na ₂ HPO ₄
1,8 mM	KH ₂ PO ₄

pH-Wert auf 7,4 einstellen

2.1.4.2 KRH ohne Glucose

100 mg/l	MgCl ₂ x 6 H ₂ O
34 mg/l	KCl
7 g/l	NaCl
126 mg/l	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
20 mg/l	NaH ₂ PO ₄ x 1 H ₂ O
1,26 g/l	NaHCO ₃

pH-Wert auf 7,4 einstellen

2.1.4.3 HBSS

185 mg/l	CaCl ₂ x 2 H ₂ O
98 mg/l	MgSO ₄
400 mg/l	KCl
60 mg/l	KH ₂ PO ₄
350 mg/l	NaHCO ₃
8 g/l	NaCl
48 mg/l	Na ₂ HPO ₄
1 g/l	D-Glucose

pH-Wert auf 7,4 einstellen

2.1.4.4 TBS

10 mM	TRIS
0,9 %	NaCl

pH-Wert auf 7,4 einstellen

2.1.4.5 TBST

Wie TBS mit zusätzlich 0,1 % (v/v) Tween 20

2.1.5 Primer

Für die quantitative PCR wurden folgende Primer verwendet. Die Primer wurden so designt, dass sie jeweils eine Exon-Exon-Schnittstelle überlappen, um nur gespleißte mRNA zu amplifizieren.

Tabelle 4: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Primer für die qPCR

GEN	VORWÄRTS	RÜCKWÄRTS
ABCA1	GCTTTCAATCATCCCCTGAA	TGACAGGCTTCACTCCACTG
ABCG1	GCCTACTGCAGCATCGTGTA	GTCGAAGCTGACGAAGAACC
Adiponectin	GGCCATCTCCTCCTCACTTC	CCGGGCAGAGCTAATAGCAG
Aktin	TCACCCACACTGTGCCATCT	CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG
AMPKα1	GGAGCCTTGATGTGGTAGGA	TTTCATCCAGCCTTCCATTC
ApoE	CAGGCAGGAAGATGAAGGTT	CTCAGTTCCTGGGTGACCTG
BiP	ACTCCTGCGTCGGCGTGTTT	ACGGGTCATTCCACGTGCGG
CD163	ACAGCGGCTTGACGTTTCCTCA	GGCTCAGAATGGCCTCCTTTTCCA
CD206	GGCGGTGACCTCACAAGTAT	ACGAAGCCATTTGGTAAACG
CD36	GGTGTGGTGATGTTTGTGTC	GCAGCTACTGGGATGATGGT
CHOP	TGGAAGCCTGGTATGAGGAC	AGGTGCTTGTGACCTCTGCT
FABP4	CATACTGGGCCAGGAATTTG	GTGGAAGTGACGCCTTTCAT
IL-6	TCCACAAGCGCCTTCGGTCC	TCAGGGCTGAGATGCCGTCG
LPL	GGGCATGTTGACATTTACCC	AGCCCTTCTCAAAGGCTTC
LXRα	CGGGCTTCCACTACAATGTT	TCAGGCGGATCTGTTCTTCT
PPARγ	QuantiTect	
TBP	GGGCCGCCGGCTGTTTAACT	AGCCCTGAGCGTAAGGTGGCA
TNFα	GACAAGCCTGTAGCCCATGT	GAGGTACAGGCCCTCTGATG
βMG	TCCAAAGATTCAGGTTTACTCA	ATATTA AAAAGCAAGCAAGCAG
SLC28A1	CTTTGGGGTGCAGAGCTGAAG	TCACGGCAGCACTGGTAAAT
SLC28A2	TGAGGAGCCAGAGGGAATCA	CACCGACTCCTCCTCTGGTA
SLC28A3	CCAGGTCCCTGTAACAGCAG	TCTTCATTCTGGAAGCCCACG
SLC29A1	CCTGTTGCAGCCTCTCTTCC	GCTTTGTATCTGCCTGAGGCT
SLC29A2	CGTAGATTATGAGAGCACTCCCG	GACCCCTAAAGCTGGAACCC
SLC29A3	GCTGGAGTATGCCAGGTACT	GGACTCGATGTTGGTGCAGA

Die Primer für PPAR γ (QuantiTect) wurden bei QIAGEN bestellt. Alle anderen Primer wurden von MWG Eurofins bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von Monozyten aus humanem Blut

Die peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMC) wurden aus menschlichem Vollblut (Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen, Frankfurt am Main) isoliert. Zunächst wird mithilfe eines Ficoll-Gradienten die PBMCs vom restlichen Blut abgetrennt. 15 ml Ficoll-Lösung werden mit dem Vollblut in Leucosep-Röhrchen überschichtet und mit PBS/EDTA (PBS + 2 mM EDTA) auf 50 ml aufgefüllt und anschließend bei 4 °C und 440 g für 35 min zentrifugiert. Die Schicht, die die PBMCs enthält („*buffy coat*“) wird abgenommen und zwei Mal mit PBS/EDTA gewaschen (4 °C, 300 g, 8 min). Je nach Art der Differenzierung wird die Reinigung nach zwei verschiedenen Methoden fortgesetzt:

2.2.1.1 Differenzierung der PBMCs mit Humanserum

Die Zellen werden in RPMI 1640 +P/S aufgenommen und ausgesät. Ein durchschnittlicher *Buffy Coat* liefert ausreichend Zellen für 12 6 *well*-Platten. Innerhalb von etwa zwei Stunden setzen sich Makrophagen und Monozyten ab und adhären. Jetzt wird das alte Medium mit den nicht adhären Zellen abgenommen und durch RPMI 1640 +P/S +3 % Humanserum für die Differenzierung zu Makrophagen ersetzt. Nach etwa sieben Tag ist die Differenzierung abgeschlossen und die Zellen können für Versuche verwendet werden. Das Medium wird alle 3 bis 4 Tage gewechselt.

2.2.1.2 Isolierung von Monozyten mittels magnetischer Separation

Die PBMCs werden mit Laufpuffer (PBS + 0,5 % BSA, 2 mM EDTA) gewaschen und anschließend in 2 ml resuspendiert. Zu den Zellen werden dann je 50 µl der *human CD14 microbeads* (Miltenyi-Biotec) gegeben und anschließend bei 4 °C für 15 min inkubiert. Nach der Inkubation wird mit Laufpuffer auf 10 ml aufgefüllt und die Zellen bei 300 g, 4 °C für 8 min zentrifugiert. Das Pellet wird in 2 ml Laufpuffer resuspendiert und durch einen 40 µm Zellsieb filtriert. Die Selektion der CD14-positiven Zellen erfolgt mittels magnetischer Separation im autoMACS (magnetischer Zellseparator, Miltenyi-Biotec) mit dem Positivselektionsprogramm „*Posse!*“. Selektierte Zellen werden in Macrophage-SFM mit 50 ng/ml M-CSF für 6 Tage zu Makrophagen differenziert. Nach Abschluss der Differenzierung wird das Medium zu RPMI 1640 +P/S +10 % FCS gewechselt.

2.2.2 Isolierung von Präadipozyten aus Fettgewebe und deren Differenzierung zu Adipozyten

2.2.2.1 Isolierung der Stromalen vaskulären Fraktion

Die Isolierung von Präadipozyten erfolgt aus den Überresten von Liposuktionen. Hierzu werden 200 ml des Fettgewebes mit 200 ml Collagenase-Lösung (PBS, 2 % BSA, 0,3 WZ U (Wünsch-Einheiten) Collagenase) versetzt und schüttelnd für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die Mischung durch ein Sieb grob filtriert, auf 50 ml-Gefäße verteilt und für 10 min bei 200 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der Zentrifugation befindet sich das Öl zusammen mit festem Fett aus den geplatzen Fettzellen in der obersten Schicht. Die mittlere Phase besteht aus der Collagenase-Lösung und das Pellet ist die Stromale vaskuläre Fraktion (SVF). Diese wird in insgesamt 50 ml Erythrozytenlysepuffer aufgenommen. Die Zellen werden dann nacheinander durch 100 µm-, 70 µm- und 40 µm-Zellsiebe filtriert und erneut bei 200 g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wird DMEM/Ham's F12-Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen werden dann in 0F + FCS-Medium (DMEM/Ham's F12, 10 % FCS, 33 µM Biotin, 17 µM Pantothenensäure, 1 % P/S) ausgesät. Folgende Zellzahlen werden ausgesät:

- 24 Loch-Platte: 100000 Zellen
- 12 Loch-Platte: 200000 Zellen
- 6 Loch-Platte: 500000 Zellen
- 6 cm-Schale: 1200000 Zellen

Als Richtwert dient: 60000 Zellen/cm².

2.2.2.2 Differenzierung der Präadipozyten zu Adipozyten

Einen Tag nach der Aussaat der Zellen wird die Differenzierung der Präadipozyten zu Adipozyten durch einen Mediumwechsel von 0F + FCS-Medium zu QuickDiff-Medium (DMEM/Ham's F12, 1 % P/S, 33 µM Biotin, 17 µM Pantothenensäure, 10 µg/ml Transferrin, 20 nM Insulin, 100 nM Cortisol, 200 pM T3, 25 nM Dexamethason, 250 µM IBMX, 2 µM Rosiglitazon) eingeleitet. Nach vier Tagen wird das Medium zu 3FC-Medium (DMEM/Ham's F12, 1 % P/S, 33 µM Biotin, 17 µM Pantothenensäure, 10 µg/ml Transferrin, 20 nM Insulin, 100 nM Cortisol, 200 pM T3) gewechselt und die Zellen werden für weitere acht bis zehn Tage differenziert. Alle 3 bis 4 Tage wird das Medium gewechselt. Zum Stoppen der Differenzierung erfolgt ein Mediumwechsel zu 0F-Medium (DMEM/Ham's F12, 1 % P/S, 33 µM Biotin, 17 µM Pantothenensäure).

2.2.3 Isolierung von Lipoproteinen aus menschlichem Blut

Lipoproteine können aus Vollblut von gesunden Spendern (Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen, Frankfurt am Main) durch sequentielle Zentrifugation gewonnen werden (113). Hierzu wird zunächst das Plasma von den restlichen Blutbestandteilen durch Zentrifugation getrennt. Das Plasma wird dann abgenommen und durch sequentielle Ultrazentrifugation in Anwesenheit von 200 μM EDTA in zunächst VLDL und dann LDL aufgetrennt.

2.2.3.1 Herstellung von oxLDL

Oxidiertes LDL (oxLDL) wird durch Oxidation mit Kupfer(II)-sulfat hergestellt. Hierzu wird LDL mit 5 μM Kupfer(II)-sulfat für 24 h bei Raumtemperatur oxidiert. Zum Stoppen der Reaktion wird eine 24-stündige Dialyse gegen PBS mit 100 μM EDTA durchgeführt (114).

2.2.4 Herstellung von konditionierten Medien (MCM)

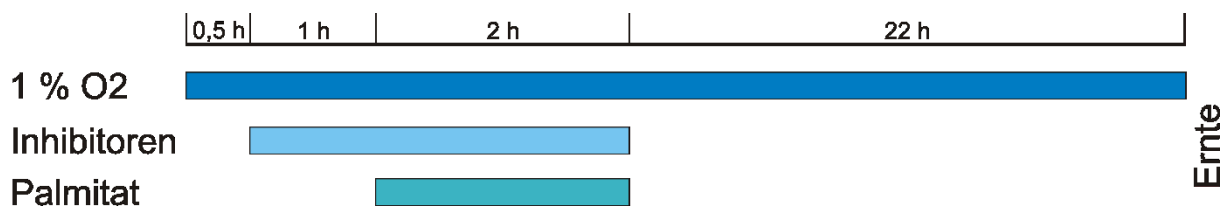


Abbildung 7: Schema der Makrophagenstimulation.

Makrophagen werden zunächst 30 min unter Hypoxie (1 % O₂) vorbehandelt. Falls die Makrophagen mit Inhibitoren behandelt werden sollen, werden diese 1 h vor der Palmitatzugabe hinzugegeben. Die Stimulation mit Palmitat erfolgt dann für 2 h. Anschließend wird das Medium gewechselt und dadurch das Palmitat bzw. auch die Inhibitoren entfernt. Für weitere 22 h können die Makrophagen dann Zytokine ins Medium sekretieren. Der Überstand wird danach abgenommen, 10 min bei 16000 g und 4 °C zentrifugiert. Dieser Überstand wird als konditioniertes Medium (MCM) verwendet. Abbildung 7 zeigt schematisch den Ablauf der MCM-Herstellung.

2.2.5 SDS-PAGE und Western Blot

2.2.5.1 Lyse von Zellen

Nach Abschluss der Stimulationen werden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in 100 μl Western Blot-Lysepuffer (50 mM TRIS, pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM NaF, 1 mM Na₂VO₄, 0,5 % Nonidet P40, 1 mM PMSF, 1 % Protease-Inhibitor-Mix) abgeschabt und lysiert. Die Zellkerne im Lysat werden durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Unlösliche Bestandteile des Lysats werden durch Zentrifugation für 10 min bei 16000 g, 4 °C entfernt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.2.5.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung in Zelllysaten erfolgt mittels eines modifizierten Lowry-Tests (115) von Bio-Rad. Es wird zunächst eine Mischung aus 25 µl Lösung A und 0,5 µl Lösung S pro Probe hergestellt und vorgelegt. Vom Lysat werden dann je 5 µl hinzugefügt. Durch das Hinzufügen von jeweils 200 µl Lösung B wird die Farbreaktion eingeleitet. Nach 15 min Inkubation kann die Absorption bei 750 nm gemessen werden. Zur Quantifizierung der Proteinkonzentration werden die Absorptionen mit einem BSA-Standard verglichen.

2.2.5.3 SDS-PAGE

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe wird eine SDS-PAGE nach (116) durchgeführt. Für das Gießen der Gele werden folgende Ansätze verwendet:

Tabelle 5: Zusammensetzung der Lösungen für Trenngele

Substanzen	6,5 %	8 %	10 %	12 %	15 %
ddH ₂ O	5,665 ml	5,4 ml	4,9 ml	4,4 ml	3,65 ml
1,5 M TRIS HCl (pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
40 % Acrylamid/Bisacrylamid	1,625 ml	2 ml	2,5 ml	3 ml	3,75 ml
10 % SDS	100µl	100 µl	100 µl	100 µl	100µl
10 % APS	100µl	100 µl	100 µl	100 µl	100µl
TEMED	10µl	10 µl	10 µl	10 µl	10µl

Für das Sammelgel wird folgende Mischung verwendet:

Tabelle 6: Zusammensetzung eines Sammelgels

Substanzen	
ddH ₂ O	3,2 ml
0,5 M TRIS HCl (pH 6,8)	1,25 ml
40 % Acrylamid/Bisacrylamid	500 µl
10 % SDS	50 µl
10 % APS	50 µl
TEMED	5 µl

Jeweils gleiche Proteinmengen zwischen 20 und 100 µg pro Probe werden verwendet. Die Proteine werden mit 5x-SDS-Ladepuffer (0,125 M TRIS pH 6,8, 5 % SDS, 25 % Glycerin, 0,5 % Bromphenolblau, 100 mM DTT) versetzt und zur Denaturierung für 5 min auf 95 °C erhitzt. Anschließend werden sie auf das Gel aufgetragen, das vorher schon in die Gelelektrophoreseapparatur eingespannt wurde. Als Laufpuffer für die Gelelektrophorese wird SDS-Laufpuffer (192 mM Glycin, 25 mM TRIS, 3,5 mM SDS) verwendet. Es wird ein konstanter Strom von 0,03 A pro Gel angelegt. Bei diesen Einstellungen benötigt ein Lauf ca. 1:15 h.

2.2.5.4 *Western Blot*

Nach Abschluss der Gelelektrophorese erfolgt das Übertragen der Proteine auf eine Nitrocellulose- bzw. PVDF-Membran. Die Filterpapiere, die Membran und das Gel werden in *Blotting*-Puffer (192 mM Glycin, 25 mM TRIS und 20 % Methanol) vor inkubiert und dann in die Blotting-Kammer gegeben. Zum Übertragen der Proteine wird ein konstanter Strom von 100 mA pro Gel für 90 min angelegt. Nach Abschluss des Transfers wird die Membran zur Verhinderung unspezifischer Bindung mit BSA- bzw. Milchlösung (jeweils 5 % (w/v) in TBST) geblockt. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag wird die Membran drei Mal mit TBST gewaschen und anschließend mit dem zur Spezies des Primärantikörpers passenden Zweitantikörper (Verdünnung 1:10000) für 1 h inkubiert. Nach dieser letzten Inkubation wird die Membran erneut 3 Mal mit TBST gewaschen und ist nun bereit für die Detektion. Die Detektion erfolgt am Odyssey Infrarotfluoreszenz-Scanner (Li-Cor). Die Zweitantikörper sind mit einem fluorsezierenden Farbstoff markiert. Zur Verfügung stehen zwei Varianten: IRDye 680LT oder IRDye 800CW (Li-Cor), die bei unterschiedlichen Wellenlängen detektiert werden. Es können also zwei verschiedene Primärantikörperspezies gleichzeitig gescannt werden. Die beiden Farbstoffe werden in der Software entweder in Rot (680 nm) oder in Grün (800 nm) dargestellt.

2.2.6 Messung von Zytokinen in Zellüberständen

Die Bestimmung von Zytokinen in Zellüberständen erfolgt mit dem *cytometric bead array*-Test (CBA) Flex Set von Becton Dickinson (BD) an einem Durchflusszytometer. Zunächst werden je 0,5 µl der *capture beads* der zu analysierenden Zytokine pro Probe gemischt und dann mit *capture bead*-Puffer auf insgesamt 25 µl pro Probe aufgefüllt. Je 25 µl der verdünnten *capture beads* werden zu je 25 µl der Probe gegeben und die Suspension für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation wird das Detektionsreagenz verdünnt: Auch hier je 0,5 µl des jeweiligen Zweitantikörpers, die dann mit Detektionsreagenzverdünner auf je 25 µl pro Probe aufgefüllt werden. Nach der Inkubation werden je 25 µl des verdünnten Detektionsreagenz zu den Proben gegeben und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zu den Proben werden dann 500 µl Waschpuffer gegeben und die Proben anschließend bei 200 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und verworfen und das Pellet in 300 µl FACS *flow* resuspendiert und am Durchflusszytometer vermessen. Die Fluoreszenz der Probe kann anschließend mit einem Standard verglichen werden und dadurch die Konzentration bestimmt werden. Die Analyse der Daten erfolgt durch den Vergleich der Fluoreszenz mit einem Standard und wird mit Microsoft Excel berechnet.

2.2.7 Messung von mRNA-Mengen

2.2.7.1 Isolierung von RNA aus Zelllysaten

Die Isolierung von RNA aus Zellen erfolgt mittels einer Phenol-/Chloroform-Extraktion nach Chomczynski et al. (117, 118). Zellen aus einer 6 *well*-Platte werden mit 1 ml peqGOLD RNAPure (Pqlab) lysiert. Zur Dissoziation von Proteinen von der RNA wird das Lysat mindestens 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden je 200 µl Chloroform zum Lysat gegeben und die Reaktionsgefäße kräftig durchmischt. Es folgt eine Inkubation von 10 min auf Eis. Die Mischung wird anschließend bei 12000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase, die die RNA enthält, wird vorsichtig abgenommen und mit dem gleichen Volumen (hier 500 µl) an 2-Propanol versetzt, um die RNA zu fällen. Hierzu wird sie für ca. 30 min auf Eis inkubiert. Die ausgefallene RNA wird durch Zentrifugation pelletiert: 12000 g, 10 min, 4 °C. Das Pellet wird anschließend zwei Mal mit 70 % Ethanol/DEPC-Wasser gewaschen. Diethylidcarbonat (DEPC) ist ein RNase-Inhibitor (119). Zum Trocknen der RNA wird das Ethanol vorsichtig entfernt und die RNA bei 70 °C getrocknet. Die RNA wird dann in 20 bis 30 µl DEPC behandeltem Wasser gelöst. Zum Unterstützen des Lösens wird die RNA bei 55 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Die RNA-Konzentration und -Reinheit wird durch eine Absorptionsmessung am Nanodrop, einem Spektrophotometer, (Pqlab) bestimmt. Zur Herstellung von RNase-freiem Wasser wird Wasser mit 0,1 % (v/v) DEPC versetzt und über Nacht gerührt. Zur Entfernung überschüssigen DEPCs wird das Wasser anschließend autoklaviert.

2.2.7.2 Synthese von cDNA

Die Synthese von cDNA aus der vollständigen RNA erfolgt durch reverse Transkription. Hierzu wird ein Kit von Thermo Fisher verwendet: Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR. Hierzu werden pro Probe 1 µl des Enzym-Mixes und 2 µl des Puffer-Mixes mit bis zu 1 µg RNA gemischt und das Volumen – falls notwendig – mit RNase-freiem Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Die Reaktion erfolgt dann nach folgendem Schema: 10 min bei 25 °C, 15 min bei 50 °C und 5 min bei 85 °C. Die cDNA wird dann mit 90 µl Wasser verdünnt.

2.2.7.3 Quantitative PCR

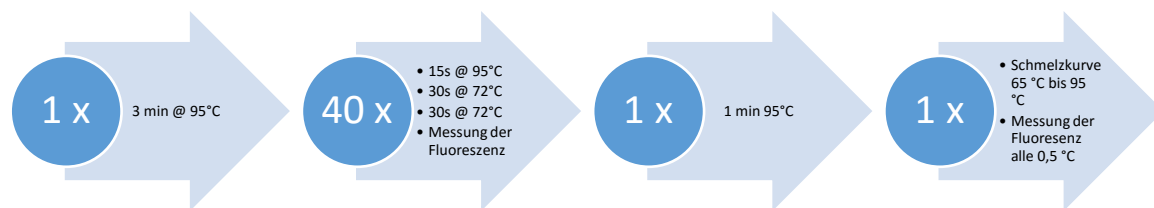
Spezifische RNAs können mithilfe einer quantitativen PCR vervielfältigt und dabei durch Fluoreszenz gemessen werden. Für die Reaktion wird folgender Ansatz verwendet:

Tabelle 7: Zusammensetzung eines Reaktionsmixes für eine qPCR

Menge	Bestandteil
Je 400 fmol	Vorwärts- und Rückwärtsprimer
20 ng	cDNA
5 µl	SYBR Green Master Mix
ad 10 µl	Wasser

Alternativ zu den selbst entwickelten Primern können auch fertig validierte Primer von QIAGEN verwendet werden: QuantiTect. Hierzu wird 1 µl von der Primermischung pro Probe verwendet und dementsprechend weniger Wasser hinzugefügt. In der qPCR-Maschine wird folgendes Programm verwendet:

Tabelle 8: Ablauf der qPCR-Reaktion:



Jede Probe wird mindestens in Duplikaten vermessen. Die Auswertung der Daten erfolgt mit der Software CFX Manager von Bio-Rad.

2.2.8 Bestimmung des Triglyceridgehalts von Zellen

Die Triglyceridbestimmung wird mithilfe einer photometrischen Messung bestimmt. Nach Abschluss der Stimulation werden die Zellen einmal mit 1 ml PBS gewaschen und in PBS mit 1 % Triton X-100 lysiert. Die Proben werden sonifiziert und für 15 min bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln weiter aufgeschlossen. Nach einer Zentrifugation bei 10000 g und 4 °C für 10 min wird der Überstand für die Messung abgenommen. Von den Proben werden 20 µl mit je 100 µl des TG-Reagenz versetzt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Absorption bei 500 nm gemessen. Durch den Vergleich mit einem TG-Standard kann die TG-Konzentration bestimmt werden. Die TG-Konzentration wird auf den Proteingehalt der jeweiligen Probe normiert.

2.2.9 Messung der Aufnahme von oxLDL

Zur Messung der Aufnahme von oxLDL wird oxLDL mit dem Farbstoff Dil (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorat) gefärbt und dann die Fluoreszenz der Makrophagen im Durchflusszytometer gemessen. Hierfür wird zunächst oxLDL mit 10 µM Dil bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wird präzipitiertes Dil durch Filtration durch einen 0,22 µm-Filter entfernt. Die Makrophagen werden für 6 h mit 20 µg/ml Dil-oxLDL stimuliert. Zum Stoppen der Aufnahme werden die Makrophagen mit kaltem PBS gewaschen und die Zellen anschließend abgekratzt. Die Bestimmung der Fluoreszenz erfolgt durch Durchflusszytometrie. Hierfür wird die PE561-Fluoreszenz von mindestens 10000 Ereignissen aufgezeichnet und der Median der Fluoreszenz bestimmt.

2.2.10 Messung der Glucoseaufnahme von Adipozyten

Die Glucoseaufnahme von Adipozyten wird mithilfe radioaktiv markierter 2-Deoxyglucose durchgeführt. Fertig differenzierte Adipozyten in einer 12 well-Platte werden mindestens einen Tag vor der Messung in das insulinfreie 0F-Medium überführt, um die Insulin induzierte Glucoseaufnahme beobachten zu können. Vor Beginn des Versuchs werden die Zellen zweimal mit je 1 ml 1 % BSA/KRH gewaschen und anschließend für 3 h in je 500 µl BSA/KRH vor inkubiert. Der gesamte Versuch findet bei 37 °C statt. Anschließend werden die Adipozyten für 30 min mit 100 nM Insulin stimuliert. Nun wird zunächst D-Glucose zu einer Konzentration von 250 µM hinzugegeben und dann sofort 0,5 µCi ³H-2-Deoxyglucose. Nach 60 min wird die Aufnahme durch die Zugabe von 1 ml eiskalter HBSS mit 200 µM Phloretin gestoppt und die Zellen einmal mit HBSS/Phloretin gewaschen. Zur Lyse werden die Adipozyten für 15 min bei 37 °C mit 0,1 % SDS lysiert und die Aktivität in einem Szintillationszähler bestimmt.

2.2.11 Luciferase-Reporter-Versuch

Die Aktivität von Transkriptionsfaktoren kann mithilfe einer Luciferase-Messung indirekt beobachtet werden. Hierfür wird ein Luciferasegen des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* hinter die zu untersuchende Promotorsequenz kloniert. Die Biolumineszenz ist ein Maß für die Aktivität des Transkriptionsfaktors. Zum Normalisieren der Transfektionseffizienz und der Zellzahl wird ein Luciferasegen aus der Seefeder *Renilla reniformis* konstitutiv exprimiert (120). Hier werden HEK293T-Zellen verwendet, die in DMEM *High Glucose*-Medium mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10 % hitzeinaktiviertem FCS kultiviert werden. Einen Tag vor der Transfektion werden 10000 Zellen/*well* in einer 96 *well*-Platte für die Luciferase-Tests oder 200000 Zellen/*well* in einer 6 *well*-Platte für Proteinanalysen ausgesät. Am nächsten Tag werden die Zellen mit 10 ng PPRE-Luc, 10 ng pcDNA3-hPPAR γ 1 WT (zur Verfügung gestellt von V.K.K. Chatterjee, University of Cambridge, Cambridge, UK), 2 ng pCDH-EF1-MCS-T2A mit FABP4 (kloniert von Marina Kemmerer, (121)) und als Normalisierungskontrolle pRL-CMV *Renilla*-Luciferaseexpressionsplasmid. Für die Transfektion wurden je 0,2 µl des Transfektionsreagenzes jetPRIME (Polyplus) pro *well* verwendet. 5 h nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt und die Zellen am nächsten Tag für 24 h mit Agonisten stimuliert. Die Zellen werden in *Passive lysis buffer* lysiert und die Luciferaseaktivität mittels des *dual luciferase reporter assays* in einem Plattenleser gemessen. Die *Firefly*-Luciferaseaktivität wird für jedes *well* auf die *Renilla*-Luciferase normiert. Die Messungen werden in Triplikaten durchgeführt.

2.2.12 siRNA-vermittelter *Knockdown* von Proteinen

Die Expression verschiedener Proteine kann durch den Einsatz von siRNA reduziert werden. Hierfür wird eine spezifische siRNA gegen die mRNA eines Proteins in die Zelle gebracht, die dann für die Degradation der entsprechenden RNA sorgt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Methoden verwendet, mit denen man siRNA in die Zellen transportieren kann: Transfektion oder Elektroporation. Als Kontrolle wird eine Mischung zufälliger siRNAs verwendet.

2.2.12.1 siRNA-vermittelter *Knockdown* durch Transfektion von Zellen

Für die Transfektion von siRNA wird die siRNA mit dem HiPerFect-Reagenz in die Zellen geschleust. In einem *well* einer 6 *well*-Platte soll am Ende der Transfektion (1,5 ml Volumen) eine Konzentration von 50 nM siRNA erreicht werden. Zunächst werden aber pro *well* 482 µl RPMI mit 1 % P/S und ohne FCS mit 16,8 µl HiPerFect und 3,75 µl siRNA (von einer 20 µM Stammlösung) vermischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Mischung wird dann auf die Zellen getropft. Um ein teilweises Austrocknen der Zellen zu verhindern, werden noch jeweils 100 µl Medium pro *well* hinzugefügt. Nach 6 h werden 900 µl RPMI + FCS hinzugegeben. Am nächsten Morgen wird das Medium erneut gewechselt. Dann können die Zellen für 48 h nach Beginn der Transfektion für Experimente verwendet werden.

2.2.12.2 *siRNA-vermittelter Knockdown durch Elektroporation von Monozyten*

In primäre humane Monozyten kann vor ihrer Differenzierung zu Makrophagen mittels Elektroporation siRNA eingeführt werden. Hierzu wird das Amaxa-System verwendet. Nach Anleitung des Herstellers wird für die Monozyten das *Human Monocyte Nucleofector Kit* (Lonza) verwendet. 3 Millionen CD14-positive Monozyten werden in 100 µl Elektroporationspuffer resuspendiert und 100 nM siRNA (d. h. 10 pmol/Probe) hinzugegeben. Die Zellen werden dann im Nucleofector-Gerät (Lonza) mit dem Programm Y-001 elektroporiert und anschließend, wie unter 2.2.1.2 angegeben, differenziert.

3 Ergebnisse

3.1 FABP4 verstärkt die TG-reiche Schaumzellbildung in Makrophagen

3.1.1 IL-4 induziert einen Lipide aufnehmenden Phänotyp in Makrophagen

Eine erhöhte Expression von Proteinen von PPAR γ -Zielgenen wie CD36, LPL oder FABP4 scheint mit einem schlechteren Verlauf der Arteriosklerose gekoppelt zu sein (78, 39, 122, 48). Da diese Gene in IL-4-polarisierten Makrophagen stärker exprimiert werden, sollte zunächst der Effekt von IL-4 auf Makrophagen untersucht werden (21). Hierzu wurden CD14-positive Monozyten aus menschlichem Blut isoliert und während ihrer Differenzierung mit IL-4 stimuliert. Die Analyse der Zellen erfolgte nach drei Tagen. Als Kontrollen wurden LPS/Interferon γ -stimulierte Makrophagen bzw. unstimulierte Makrophagen verwendet. Abbildung 8 zeigt die mRNA-Expression von PPAR γ .

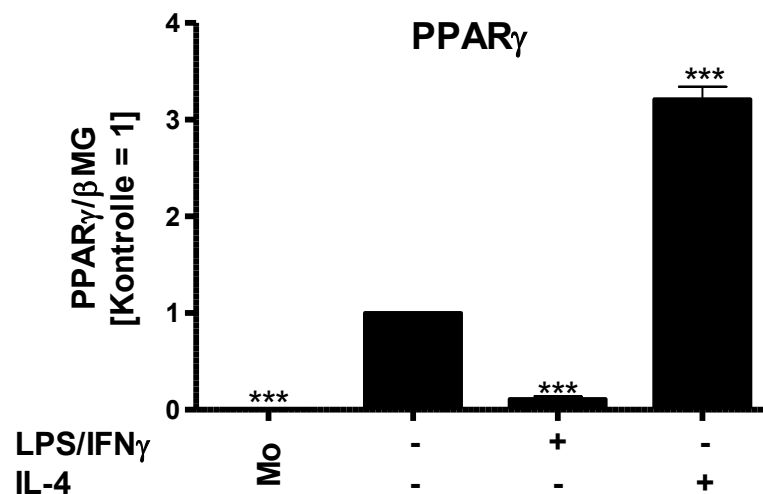


Abbildung 8: IL-4-Stimulation erhöht das Niveau von PPAR γ -mRNA. CD14-positive Monozyten wurden in Anwesenheit von 50 ng/ml M-CSF und 100 ng/ml LPS/100 U/ml Interferon γ oder 20 ng/ml IL-4 für 3 Tage zu Makrophagen differenziert. Zum Vergleich wird auch die mRNA in Monozyten (Mo) gezeigt. Die mRNA-Expression der Gene wurde mittels qPCR bestimmt. ***: $p < 0,001$ vs. nicht polarisierte Makrophagen

Wie in Abbildung 8 zu erkennen ist, exprimierten Monozyten kein PPAR γ . Durch die Differenzierung der Monozyten mit M-CSF (Makrophagenkolonien stimulierender Faktor) zu Makrophagen erhöhte sich das Niveau an PPAR γ -mRNA deutlich. Wurde gleichzeitig mit LPS/Interferon γ stimuliert, konnte eine deutliche Einschränkung der PPAR γ -Expression beobachtet werden. IL-4 hingegen erhöhte die Expression von PPAR γ signifikant um den Faktor $3,2 \pm 0,1$. Eine erhöhte PPAR γ -Expression spricht für eine erhöhte Expression seiner Zielgene. Hier wurden FABP4, LPL und CD36 untersucht, die allesamt eine Rolle im Fettstoffwechsel spielen. Dies ist in Abbildung 9 dargestellt.

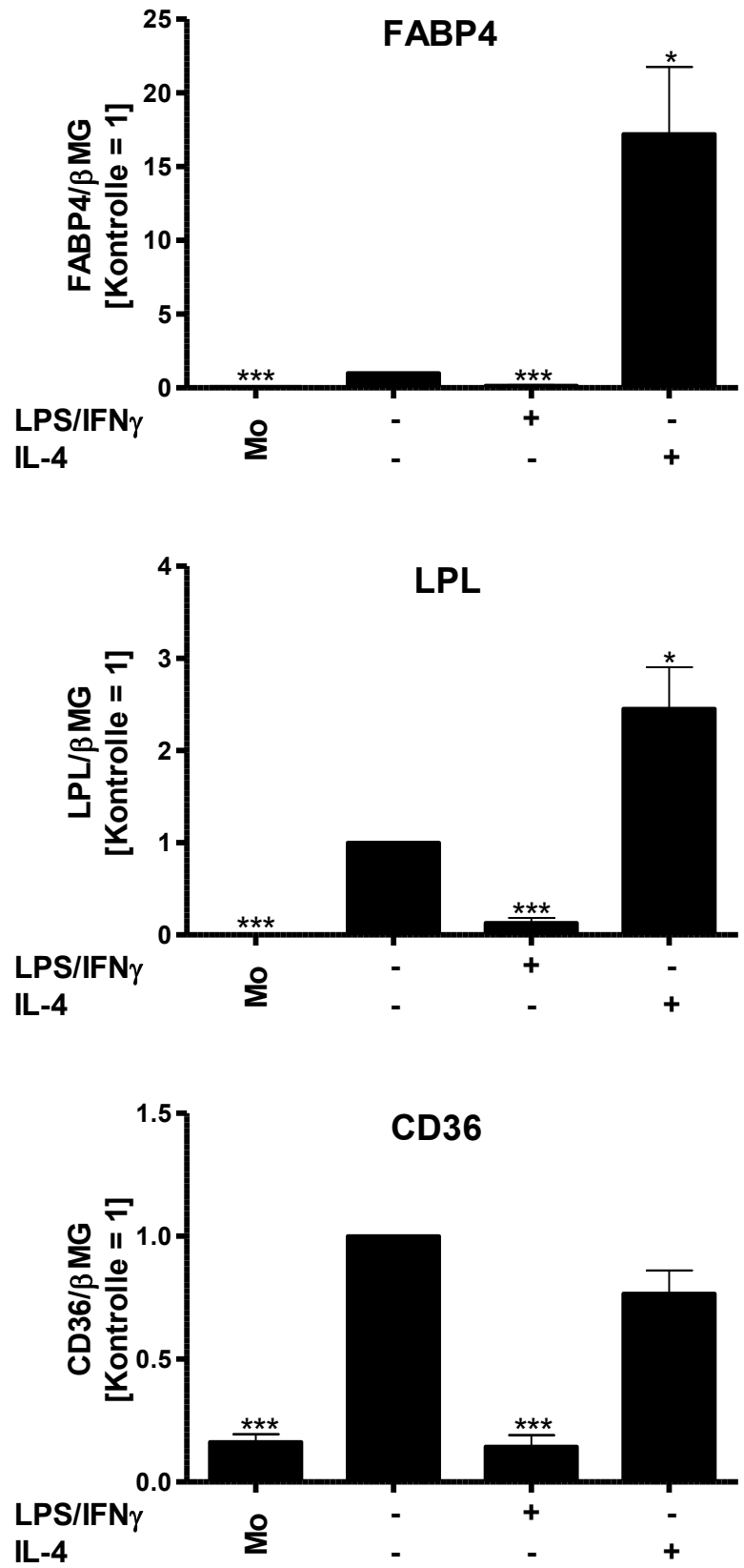


Abbildung 9: Die Expression der mRNA der PPAR γ -Zielgene FABP4 und LPL wird durch IL-4 verstärkt. CD14-positive Monozyten wurden in Anwesenheit von 50 ng/ml M-CSF und 100 ng/ml LPS/100 U/ml Interferon γ oder 20 ng/ml IL-4 für 3 Tage zu Makrophagen differenziert. Zum Vergleich wird auch die mRNA in Monozyten (Mo) gezeigt. Die mRNA-Expression der Gene wurde mittels qPCR bestimmt. *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$ vs. nicht polarisierte Makrophagen

Im Vergleich zu Monozyten zeigten Makrophagen eine höhere mRNA-Expression von FABP4, LPL und CD36. Diese „klassischen“ PPAR γ -Zielgene wurden durch eine Polarisierung der Makrophagen mit LPS und Interferon γ deutlich weniger exprimiert. IL-4 hingegen erhöhte die Expression von FABP4 um den Faktor $17,2 \pm 4,5$ und von LPL um den Faktor $2,5 \pm 0,4$ im Vergleich zu unstimulierten Makrophagen. Die Expression von CD36 wurde nicht verändert. Zum Nachweis dieser Genexpressionsänderungen auf Proteinebene wurde ein Western Blot unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Dieser ist in Abbildung 10 gezeigt.

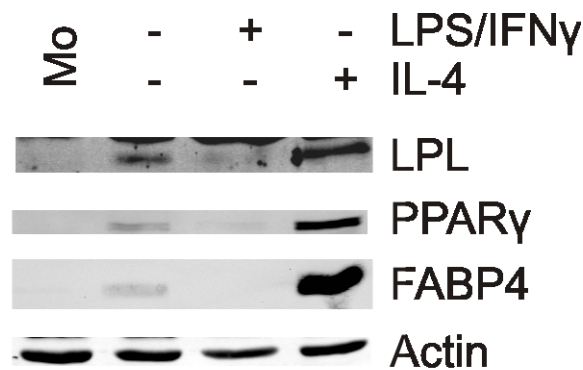


Abbildung 10: Proteinexpressionen von LPL, PPAR γ und FABP4 spiegeln die mRNA-Daten wider. CD14-positive Monozyten wurden in Anwesenheit von 50 ng/ml M-CSF und 100 ng/ml LPS/100 U/ml Interferon γ oder 20 ng/ml IL-4 für 3 Tage zu Makrophagen differenziert und dann die Proteinexpression mittels Western Blot analysiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot. Zum Vergleich werden auch Monozyten (Mo) gezeigt.

In Monozyten waren weder LPL, PPAR γ oder FABP4 nachzuweisen (Abbildung 10). Die Differenzierung mit M-CSF induzierte die Expression in Makrophagen und LPL, PPAR γ und FABP4 konnten nachgewiesen werden. Die Stimulation mit LPS/Interferon γ reduzierte die Expression dieser Proteine auf ein nicht mehr nachweisbares Niveau. Die Stimulation mit IL-4 verstärkte hingegen die Expression dieser Proteine deutlich. Die mRNA-Daten konnten folglich bestätigt werden. Um zu zeigen, dass die Expression von LPL, FABP4 oder CD36 abhängig von PPAR γ ist, wurde während der Differenzierung der Makrophagen PPAR γ durch den Inhibitor GW9662 gehemmt. Dies ist in Abbildung 11 dargestellt.

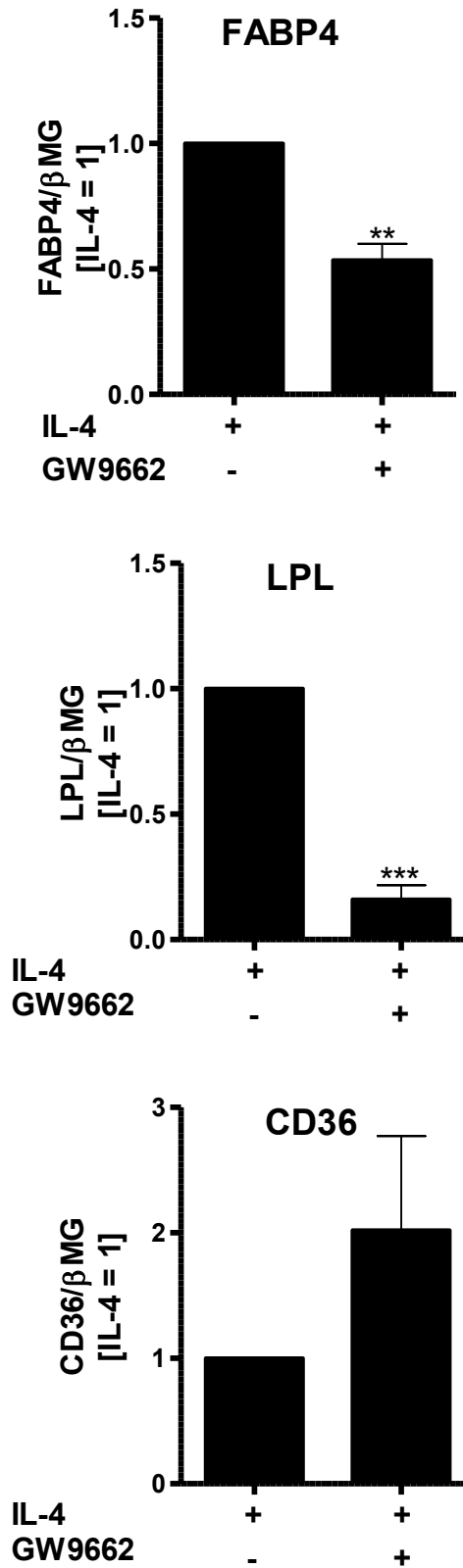


Abbildung 11: Expression von PPAR γ -Zielgenen nach Behandlung mit GW9662. CD14-positive Monozyten wurden in Anwesenheit von 50 ng/ml M-CSF und 20 ng/ml IL-4 für 3 Tage zu Makrophagen differenziert und die Expressionslevel der mRNA dann mit qPCR analysiert. In einer Gruppe wurde zusätzlich PPAR γ mit 10 μ M GW9662 inhibiert. **: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$ vs. IL-4-behandelte Makrophagen

Abbildung 11 zeigt, dass die Inhibition von PPAR γ während der Differenzierung der IL-4-behandelten Makrophagen die mRNA-Expression von FABP4 auf $53,6 \pm 6,5$ % und von LPL auf $16 \pm 5,6$ % im Vergleich zu Makrophagen ohne GW9662 senkte. Bei CD36 hingegen wurde eine leichte, nicht signifikante Erhöhung sichtbar. Während die Abhängigkeit von FABP4 und LPL von PPAR γ bestätigt werden konnte, wurde kein Zusammenhang zwischen PPAR γ und CD36 beobachtet. CD36 ist bekannt als Rezeptor für oxLDL (77). Um den Effekt der reduzierten Expression von CD36 in LPS/Interferon γ stimulierten Makrophagen auf die Aufnahme von oxLDL-Partikeln zu untersuchen, wurden oxLDL-Partikel mit Dil (1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorat) gefärbt. Dil ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in Umgebung von Lipiden stark orange/rot fluoresziert. Die Makrophagen wurden dann mit Dil-oxLDL stimuliert und anschließend die Fluoreszenz im FACS gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 gezeigt.

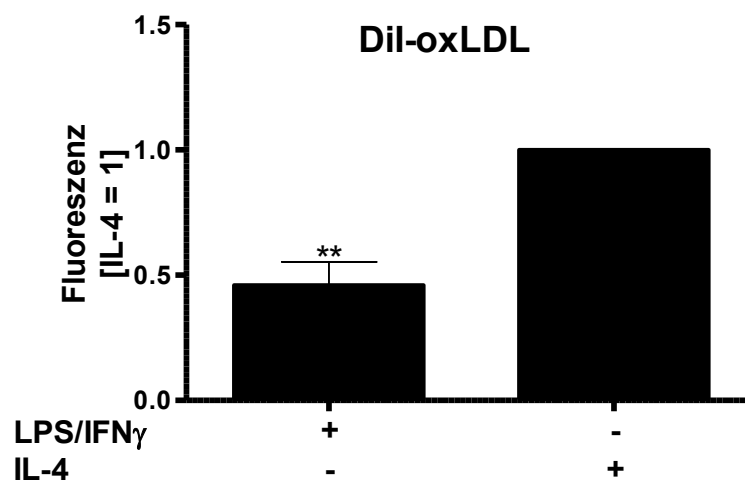


Abbildung 12: oxLDL-Aufnahme ist in LPS/Interferon γ stimulierten Makrophagen geringer als in IL-4 stimulierten Makrophagen. CD14-positive Monozyten wurden in Anwesenheit von 50 ng/ml M-CSF und 100 ng/ml LPS/100 U/ml Interferon γ oder 20 ng/ml IL-4 für 3 Tage zu Makrophagen differenziert. Anschließend wurden die Makrophagen für 6 h mit 20 μ g/ml Dil-oxLDL stimuliert und danach die PE561-Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie bestimmt. . **: $p < 0,01$ vs. IL-4

Die oxLDL-Aufnahme war in LPS/Interferon γ -stimulierten Makrophagen um 54 % geringer als in IL-4-polarisierten Makrophagen (Abbildung 12). Dies unterstreicht die Rolle von CD36 und auch des jeweiligen Phänotyps der Makrophagen in der oxLDL-Aufnahme. Die erhöhte LPL-Expression in IL-4-polarisierten Makrophagen impliziert einen veränderten Umgang mit Lipiden. Deshalb wurden die Makrophagen mit VLDL stimuliert und anschließend ihr Triglyceridgehalt bestimmt (Abbildung 13).

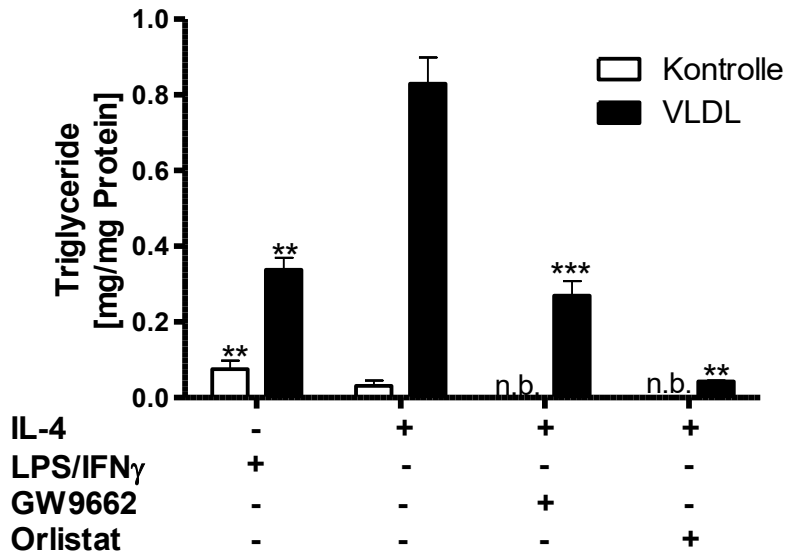


Abbildung 13: IL-4-stimulierte Makrophagen akkumulieren mehr Triglyceride nach VLDL-Stimulation. CD14-positive Monozyten wurden in Anwesenheit von 50 ng/ml M-CSF und 100 ng/ml LPS/100 U/ml Interferon γ oder 20 ng/ml IL-4 für 3 Tage zu Makrophagen differenziert. In einer Gruppe wurde zusätzlich PPAR γ mit 10 μ M GW9662 inhibiert. Nach 3 Tagen wurden die Makrophagen für 24 h mit 20 μ g/ml VLDL (schwarze Balken) oder nicht (weiße Balken) stimuliert. In einer zusätzlichen Gruppe wurden Lipasen mit 10 μ M Orlistat während der VLDL-Stimulation inhibiert. Die Triglyceridgehalte wurde anschließend kolorimetrisch bestimmt. **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ vs. IL-4, n.b.: nicht bestimmt.

Abbildung 13 zeigt die Triglyceridgehalte verschieden stimulierter Makrophagen. LPS/Interferon γ stimulierte Makrophagen akkumulierten nach VLDL-Stimulation $0,34 \pm 0,03$ mg/mg Protein Triglyceride, während IL-4 behandelte Makrophagen mit $0,83 \pm 0,07$ mg/mg Protein mehr als die doppelte Menge TG akkumulierten. Die Inhibition von PPAR γ durch GW9662 während der Differenzierung reduzierte die TG-Akkumulation auf $0,27 \pm 0,04$ mg/mg Protein. Dies deutet darauf hin, dass PPAR γ für die TG-Akkumulation notwendig ist. Die Hemmung von Lipasen mit Orlistat reduzierte die TG-Akkumulation vollständig auf ein Niveau von unbehandelten Makrophagen, was zusätzlich den Bedarf von Lipasen für die TG-Aufnahme unterstrich.

3.1.2 Inhibition von FABP4 vermindert PPAR γ -abhängige Luciferaseexpression

Es konnte bereits gezeigt werden, dass FABP4 die PPAR γ -Aktivität beeinflusst (49, 51). Da die Ergebnisse aber in der Frage, ob FABP4 positiv oder negativ auf die PPAR γ -Aktivität wirkt, widersprüchlich waren, wurde hier ein Luciferase-Reporter-Test durchgeführt. Hierzu wurden HEK293T-Zellen, die weder PPAR γ noch FABP4 exprimieren, mit Überexpressionsplasmiden von HA-FABP4 und PPAR γ 1 transfiziert. Als Reporter diente das Luciferase-Gen eines Leuchtkäfers („Firefly“), das hinter vier PPRE-Elemente kloniert worden ist (121). Um Unterschiede in der Zellzahl und der Transfektionseffizienz auszugleichen, wurde zusätzlich eine konstitutiv exprimierte Luciferase einer Leuchtqualle („Renilla“) transfiziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 zusammengefasst.

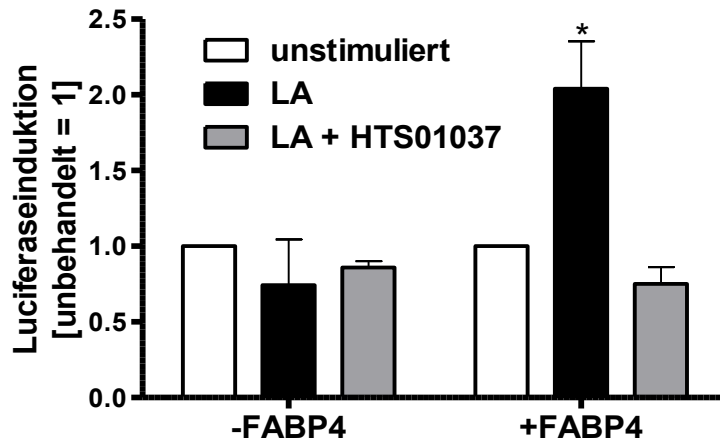


Abbildung 14: FABP4 unterstützt die Aktivierung eines PPRE-Reporters durch Fettsäuren. HEK293T-Zellen wurden mit 10 ng/well PPAR γ -überexprimierendem Plasmid sowie 2 ng/well HA-FABP4-überexprimierendem Plasmid transfiziert, bevor sie für 24 h mit 100 μ M Linolsäure (LA, schwarz) und 25 μ M HTS01037 (grau) stimuliert worden sind. Dargestellt ist die Firefly-Luciferaseaktivität normiert zunächst auf Renilla-Luciferaseaktivität und dann auf unbehandelte Zellen. *: $p < 0,05$ vs. -FABP4

Wie Abbildung 14 zeigt, konnte in Abwesenheit von FABP4 durch die Stimulation mit Linolsäure (LA) – einem bekannten PPAR γ -Liganden (61) - keine Erhöhung der PPAR γ -abhängigen Luciferaseaktivität beobachtet werden. Wurde FABP4 ebenfalls exprimiert, konnte durch Linolsäure eine erhöhte Luciferaseaktivität beobachtet werden. Diese Induktion konnte durch die gleichzeitige Applikation des FABP4-Inhibitors HTS01037 verhindert werden. FABP4 scheint also für die durch Linolsäure induzierte PPAR γ -Aktivität notwendig zu sein.

3.1.3 FABP4-Inhibition vermindert die PPAR γ -abhängige Genexpression

Da IL-4 die PPAR γ -abhängige Genexpression induzierte und FABP4 nötig zur Aktivierung von PPAR γ war, war es interessant zu untersuchen, wie sich die PPAR γ -abhängige Genexpression in IL-4-stimulierten Makrophagen bei FABP4-Inhibition verhält. Hierfür wurden zwei verschiedene FABP4-Inhibitoren verwendet: BMS309403 und HTS01037 (70, 123). Zunächst wurden die mRNA-Niveaus zweier wichtiger PPAR γ -Zielgene nach FABP4-Inhibition mittels qPCR untersucht: FABP4 und LPL. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt.

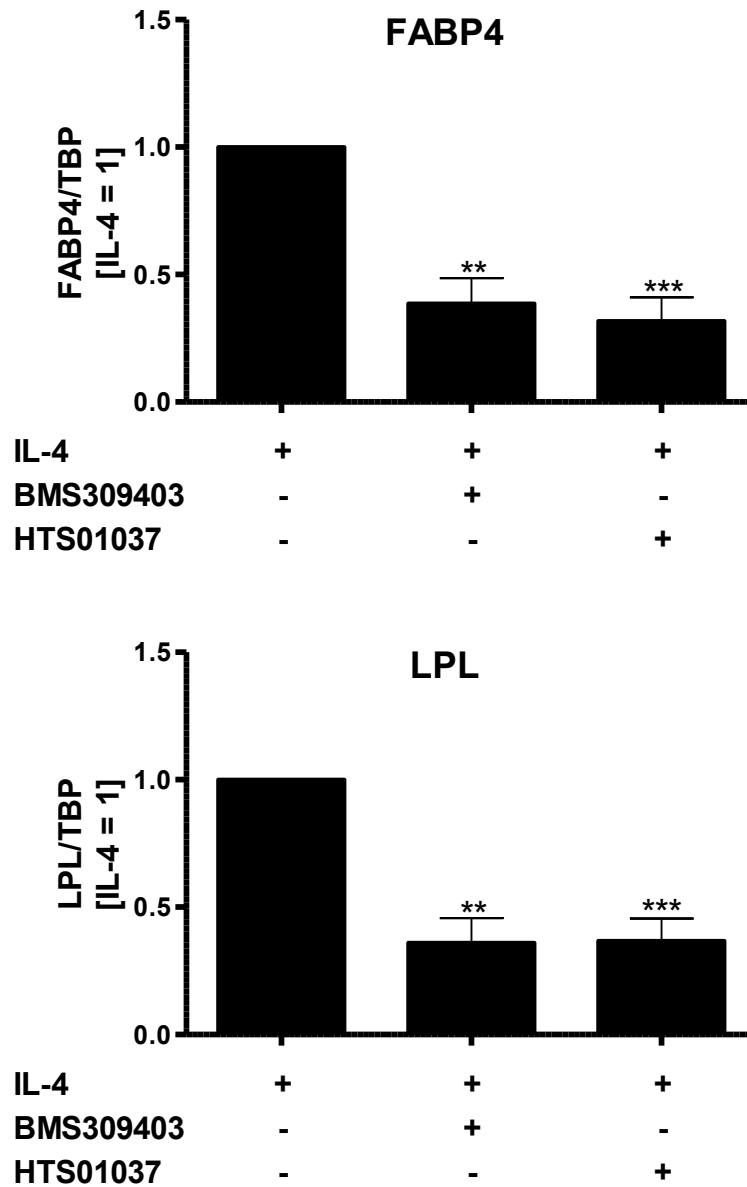


Abbildung 15: FABP4-Inhibition während der Differenzierung reduziert LPL- und FABP4-Expression in mit IL-4 differenzierten Makrophagen. CD14-positive Monozyten wurden für 3 Tage mit 50 ng/ml M-CSF und 20 ng/ml IL-4 differenziert. Zusätzlich wurden folgende FABP4-Inhibitoren ebenfalls appliziert: 50 μ M BMS309403 oder 10 μ M HTS01037. Die mRNA-Expression der Gene wurde mittels qPCR bestimmt. **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ vs. IL-4

Wie in Abbildung 15 zu erkennen, reduzierte die Inhibition von FABP4 mit BMS309403 oder HTS01037 während der Differenzierung von IL-4-stimulierten Makrophagen die Expression von FABP4 und LPL deutlich. Dies bestätigte die vorhergehenden Daten der Luciferase-Messungen. Da die Abhängigkeit von CD36 von PPAR γ nicht gezeigt werden konnte, wurde als nächstes untersucht, ob auch die FABP4-Inhibition die CD36-Expression unbeeinflusst lässt. Hierzu wurde mittels qPCR die Genexpression von CD36 in An- und Abwesenheit der FABP4-Inhibitoren BMS309403 und HTS01037 untersucht (Abbildung 16).

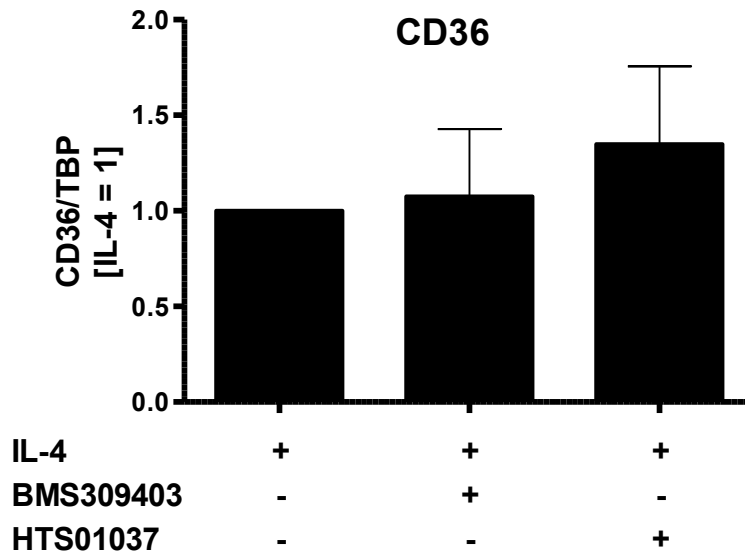


Abbildung 16: CD36-mRNA wird durch FABP4-Inhibition nicht beeinflusst. CD14-positive Monozyten wurden für 3 Tage mit 50 ng/ml M-CSF und 20 ng/ml IL-4 differenziert. Zusätzlich wurden folgende FABP4-Inhibitoren ebenfalls appliziert: 50 μ M BMS309403 oder 10 μ M HTS01037. Die mRNA-Expression der Gene wurde mittels qPCR bestimmt.

Die CD36-Expression (Abbildung 16) wurde durch die FABP4-Inhibition nicht beeinflusst, was den Einfluss von PPAR γ auf die CD36-Expression weiter negierte. Eine weitere Möglichkeit der Reduktion der PPAR γ -abhängigen Genexpression ist die Reduktion des Transkriptionsfaktors selbst. Um dies auszuschließen wurde mittels qPCR untersucht, ob die FABP4-Inhibition die Expression von PPAR γ verändert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 gezeigt.

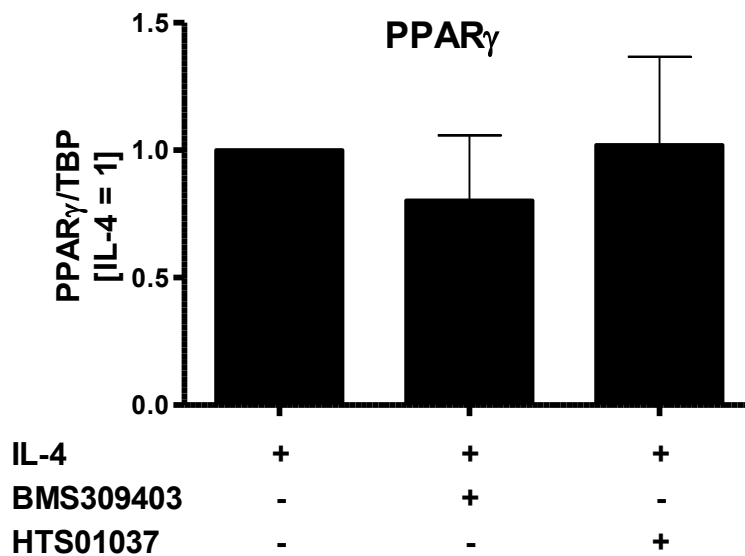


Abbildung 17: PPAR γ -mRNA wird durch FABP4-Inhibition nicht beeinflusst. CD14-positive Monozyten wurden für 3 Tage mit 50 ng/ml M-CSF und 20 ng/ml IL-4 differenziert. Zusätzlich wurden folgende FABP4-Inhibitoren ebenfalls appliziert: 50 μ M BMS309403 oder 10 μ M HTS01037. Die mRNA-Expression der Gene wurde mittels qPCR bestimmt.

Die Ergebnisse der qPCR (Abbildung 17) zeigten, dass die mRNA-Expression von PPAR γ durch die FABP4-Inhibition nicht beeinflusst wurde und die FABP4-Inhibition keinen Einfluss auf die Expression hatte. Zur Bestätigung der Ergebnisse auf Proteinebene, wurde eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot durchgeführt (Abbildung 18).

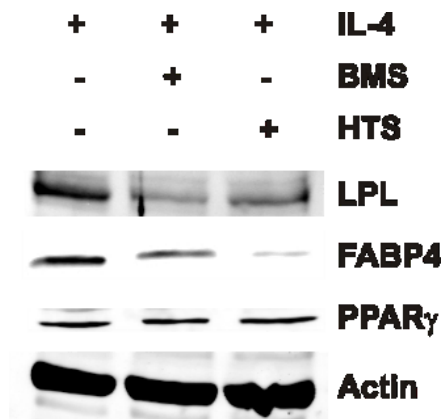
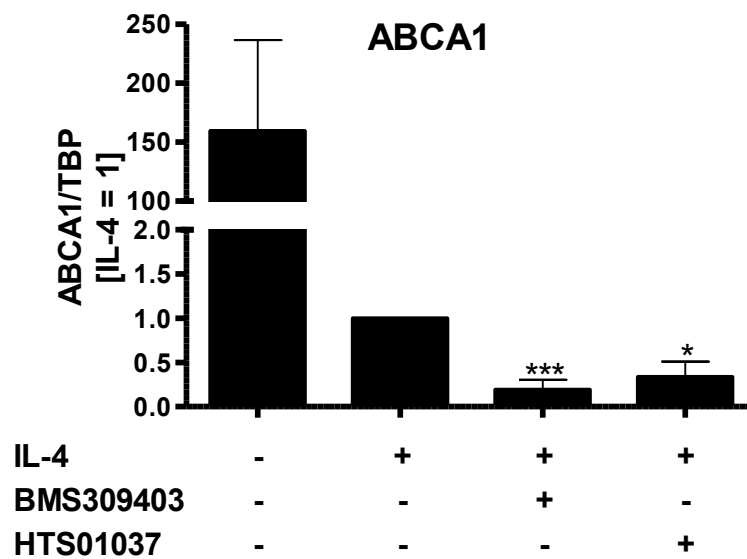
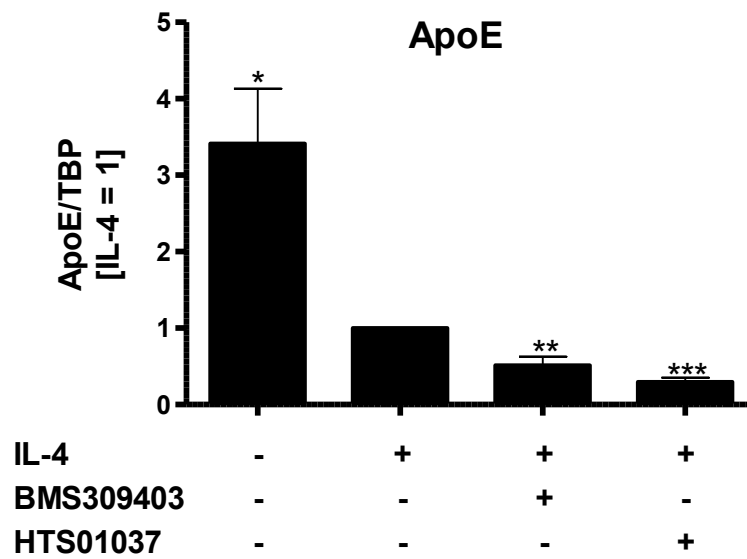
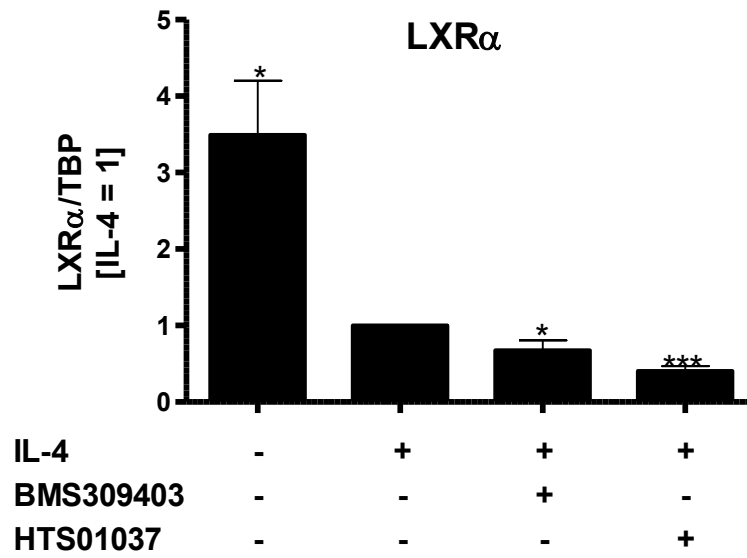


Abbildung 18: Western Blot nach FABP4-Inhibition. CD14-positive Monozyten wurden für 3 Tage mit 50 ng/ml M-CSF und 20 ng/ml IL-4 differenziert. Zusätzlich wurden folgende FABP4-Inhibitoren ebenfalls appliziert: 50 μ M BMS309403 oder 10 μ M HTS01037. Die Proteine wurden mittels eines Western Blots nachgewiesen. Actin diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot.

Das Ergebnis des Western Blots (Abbildung 18) bestätigte die mRNA-Daten aus den Versuchen mit den FABP4-Inhibitoren. Die Proteinmenge von LPL und FABP4 verringerte sich bei FABP4-Inhibition, während das PPAR γ -Niveau unbeeinflusst blieb. Chinetti-Gbaguidi et al. konnten bereits zeigen, dass die Stimulation mit IL-4 die LXR α -abhängige Genexpression vermindert (124). Deshalb sollte nun auch der Einfluss von FABP4-Inhibition auf die Genexpression von LXR α und dessen Zielgenen ApoE und ABCA1 untersucht werden. Die Genexpressionsdaten sind in Abbildung 19 gezeigt.



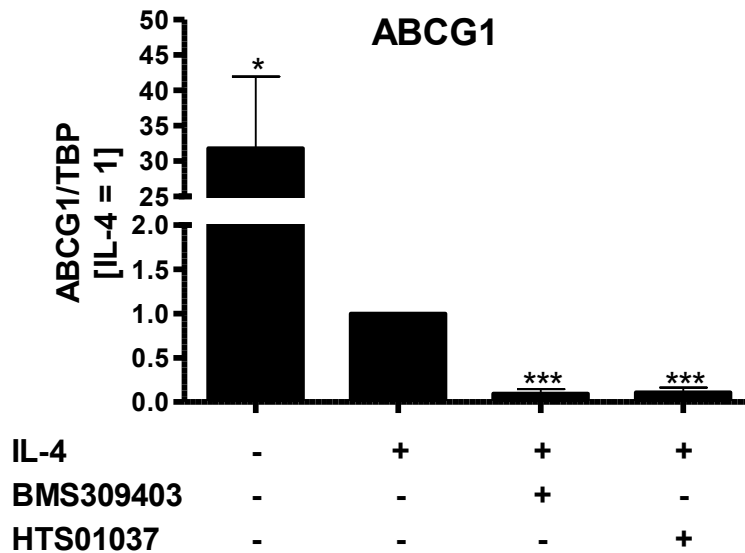


Abbildung 19: Expression von LXR α und LXR α -Zielgenen nach IL-4-Stimulation und FABP4-Inhibition. CD14-positive Monozyten wurden für 3 Tage mit 50 ng/ml M-CSF und 20 ng/ml IL-4 differenziert. Zusätzlich wurden folgende FABP4-Inhibitoren ebenfalls appliziert: 50 μ M BMS309403 oder 10 μ M HTS01037. Die mRNA-Expression der Gene wurde mittels qPCR bestimmt. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ vs. IL-4

Wie aus Abbildung 19 ersichtlich ist, war die Expression von LXR α , ApoE, ABCA1 und ABCG1 nach IL-4-Stimulation im Vergleich zu nur mit M-CSF differenzierten Makrophagen signifikant verringert. Durch die Inhibition von FABP4 mit den beiden FABP4-Inhibitoren während der Differenzierung wurde die Genexpression noch deutlich weiter abgesenkt. Zur weiteren Bestätigung, dass FABP4 einen Einfluss auf die PPAR γ -abhängige Genexpression hat, wurde ein *Knockdown* von FABP4 mittels siRNA durchgeführt und die Expression von LPL auf mRNA-Ebene untersucht (Abbildung 20).

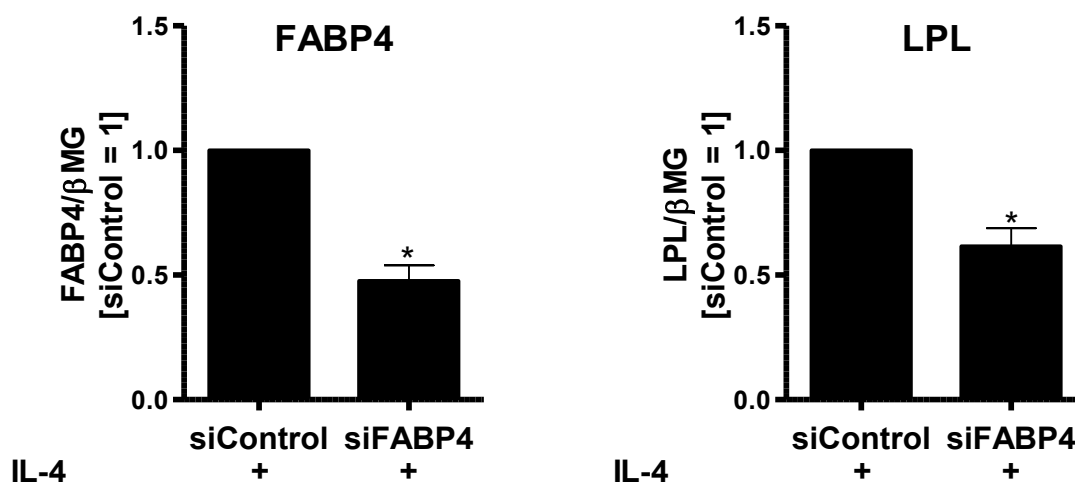


Abbildung 20: FABP4 Knockdown mit siRNA reduziert die LPL-Expression. CD14-positive Monozyten wurden zunächst mit siRNA gegen FABP4 oder Kontroll-siRNA elektroporiert und anschließend für 3 Tage mit 50 ng/ml M-CSF und 20 ng/ml IL-4 differenziert. Die mRNA-Expression von FABP4 und LPL wurde mittels qPCR bestimmt. *: $p < 0,05$ vs. siControl

Bei einer Knockdown-Effizienz von $47,6 \pm 6,3$ % bei FABP4 konnte eine Reduktion der LPL-Expression auf etwa $61,5 \pm 7,2$ % beobachtet werden (Abbildung 20). Auch hier zeigte sich wieder ein Zusammenhang zwischen FABP4 und der PPAR γ -abhängigen Genexpression. Die reduzierte LPL-Expression impliziert eine verminderte Aufnahme von Triglyceriden aus VLDL-Partikeln. Deshalb wurden mit in Anwesenheit von FABP4-Inhibitoren differenzierte Makrophagen mit VLDL stimuliert und anschließend der Triglyceridgehalt bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 gezeigt.

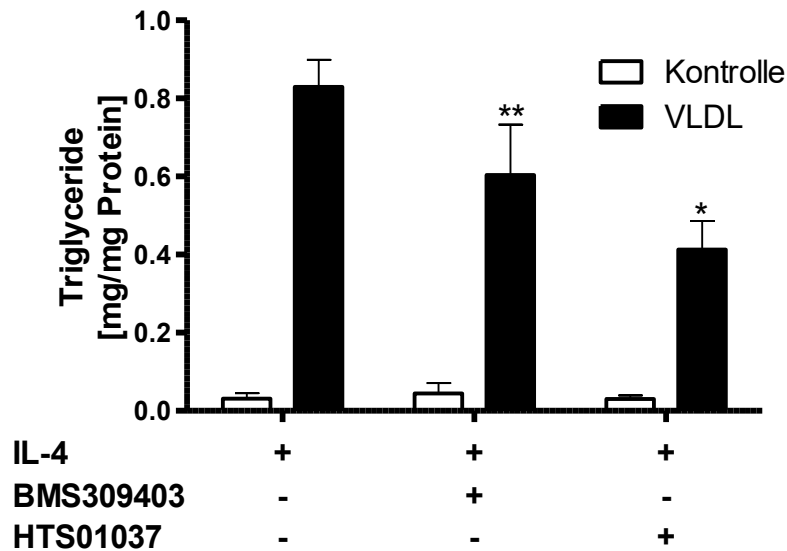


Abbildung 21: Triglyceridgehalt von Makrophagen nach VLDL-Stimulation wurde durch FABP-Inhibition reduziert. CD14-positive Monozyten wurden für 3 Tage mit 50 ng/ml M-CSF und 20 ng/ml IL-4 differenziert. Zusätzlich wurden folgende FABP4-Inhibitoren ebenfalls appliziert: 50 μ M BMS309403 oder 10 μ M HTS01037. Nach 3 Tagen Differenzierung wurden die Makrophagen für 24 h mit 20 μ g/ml VLDL stimuliert und anschließend die Triglyceridgehalte kolorimetrisch bestimmt. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ vs. IL-4

Durch die Inhibition von FABP4 konnte ein deutlich geringer Triglyceridgehalt in Makrophagen nach VLDL-Stimulation beobachtet werden (Abbildung 21). Die Inhibition mit 10 μ M HTS01037 zeigte hier einen größeren Effekt als mit 50 μ M BMS309403. Die verringerte LPL-Expression spiegelte sich also in einer verringerten Triglyceridaufnahme wider.

Zwei typische Marker der M2-Polarisierung sind CD163 und CD206 (125). Um auszuschließen, dass die FABP4-Inhibition die IL-4-induzierte Polarisierung der Makrophagen verändert, wurde die Expression von CD163 und CD206 mittels qPCR analysiert (Abbildung 22).

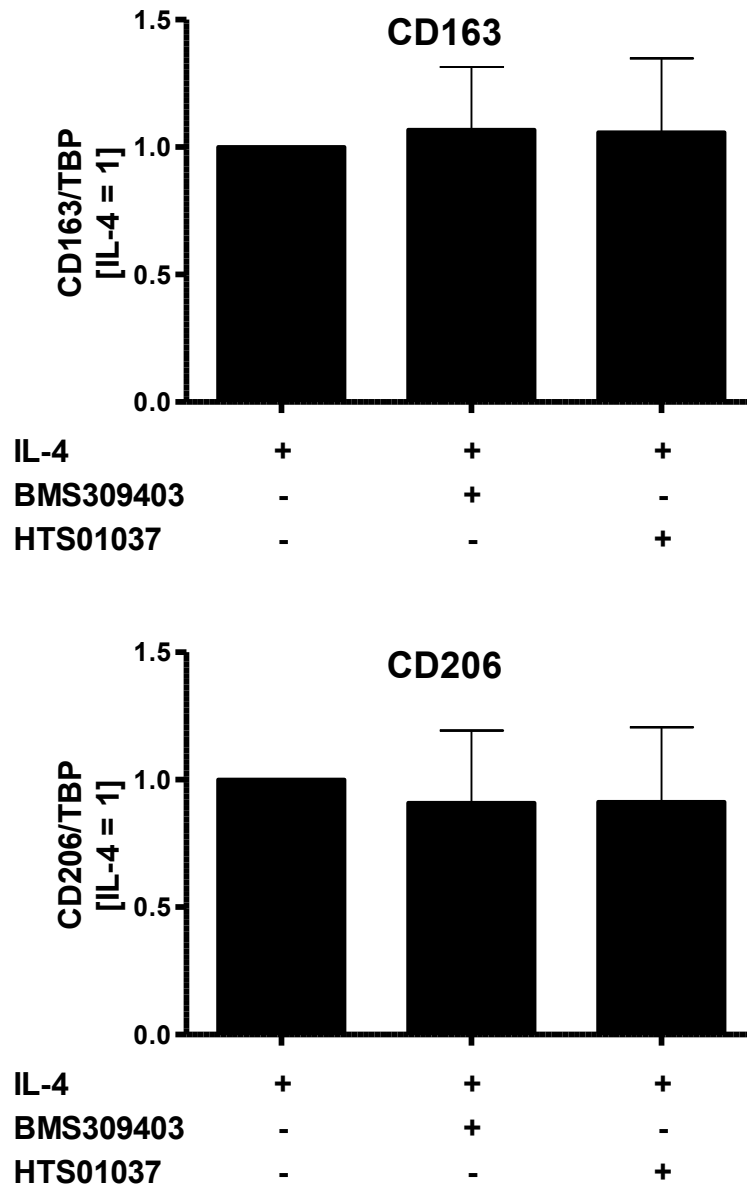


Abbildung 22: M2-Polarisierungsmarker wurden durch FABP4-Inhibition nicht beeinflusst. CD14-positive Monozyten wurden für 3 Tage mit 50 ng/ml M-CSF und 20 ng/ml IL-4 differenziert. Zusätzlich wurden folgende FABP4-Inhibitoren ebenfalls appliziert: 50 μ M BMS309403 oder 10 μ M HTS01037. Die mRNA-Expression der Gene wurde mittels qPCR bestimmt.

Da sich die Expression von CD163 und CD206 nach FABP4-Inhibition nicht änderte (Abbildung 22), ist eine Veränderung der Polarisierung unwahrscheinlich. Auch wenn die Polarisierung nicht beeinflusst wurde, könnte durch die verminderte LPL-Expression die entzündliche Antwort der Makrophagen auf VLDL verändert sein. Um dies zu untersuchen, wurden Makrophagen mit VLDL stimuliert und die Expression der entzündlichen Chemokine IL1 β und CCL2 mittels qPCR gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 dargestellt.

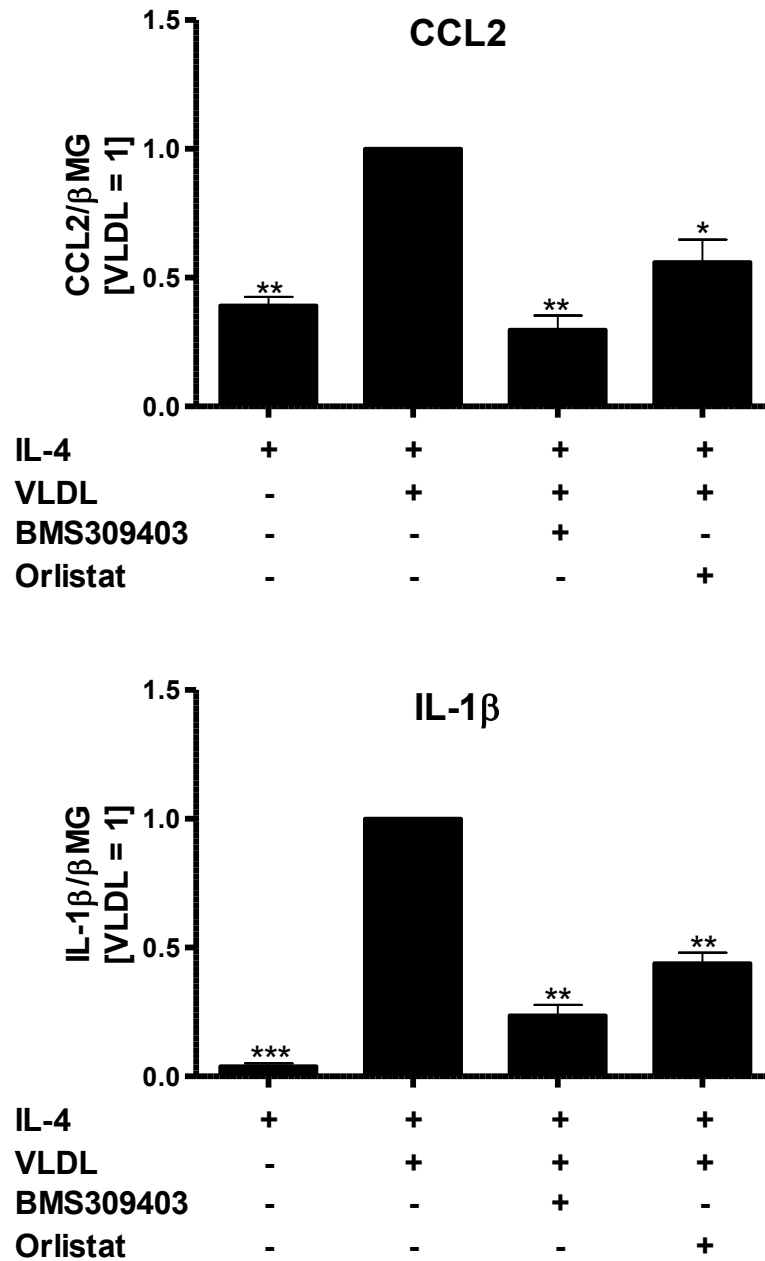


Abbildung 23: FABP4-Inhibition während der Differenzierung hemmt die Entzündungsreaktion in Makrophagen nach VLDL-Stimulation. CD14-positive Monozyten wurden für 3 Tage mit 50 ng/ml M-CSF und 20 ng/ml IL-4 differenziert. Zusätzlich wurden folgende FABP4-Inhibitoren ebenfalls appliziert: 50 µM BMS309403 oder 10 µM HTS01037. Nach 3 Tagen Differenzierung wurden die Makrophagen für 24 h mit 20 µg/ml VLDL und 10 µM Orlistat stimuliert. Die mRNA-Expression von CCL2 und IL-1β wurde mittels qPCR bestimmt. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ vs. VLDL

VLDL induzierte die Expression von CCL2 und IL-1β in IL-4-polarisierten Makrophagen signifikant (Abbildung 23). Diese Induktion war abhängig von Lipasen, wie die verminderte Induktion bei gleichzeitiger Inhibition von Lipasen mit Orlistat zeigte. Die FABP4-Inhibition mittels BMS309403 reduzierte ebenfalls die entzündliche Antwort. LPL hat demnach einen Einfluss auf die entzündliche Antwort der Makrophagen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass IL-4 einen Lipid akkumulierenden Phänotyp in primären humanen Makrophagen induziert. Diese Induktion ist PPAR γ -abhängig und die PPAR γ -Aktivität wird wiederum durch FABP4 positiv reguliert. Durch FABP4-Inhibition konnte die PPAR γ -abhängige Expression von LPL reduziert werden, was sich in einer verminderten Triglycerid-reicher Schaumzellbildung zeigte.

3.1.4 FABP4-Inhibition während der Differenzierung von THP-1-Zellen reduziert die PPAR γ -abhängige Genexpression

Neben den Untersuchungen in primären humanen Makrophagen wurde auch die Genexpression in der Monozyten-Zelllinie THP-1 untersucht. Diese wurden in Anwesenheit des FABP4-Inhibitors BMS309403 mit TPA (Tetradecanoylphorbolacetat) zu Makrophagen differenziert und anschließend die Genexpression mittel qPCR untersucht (Abbildung 24).

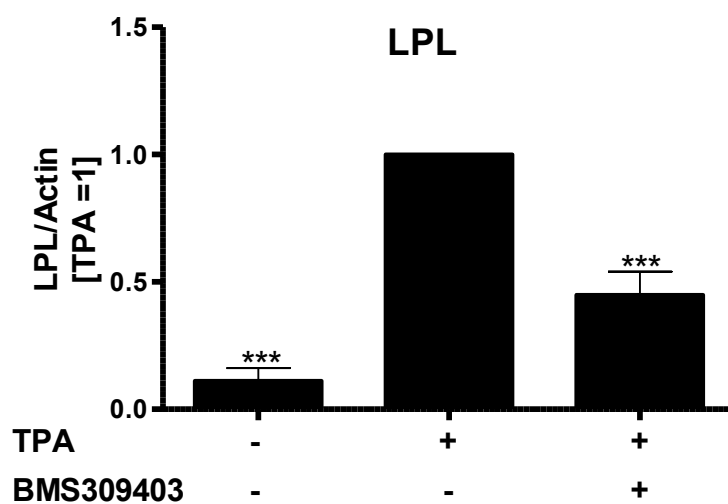
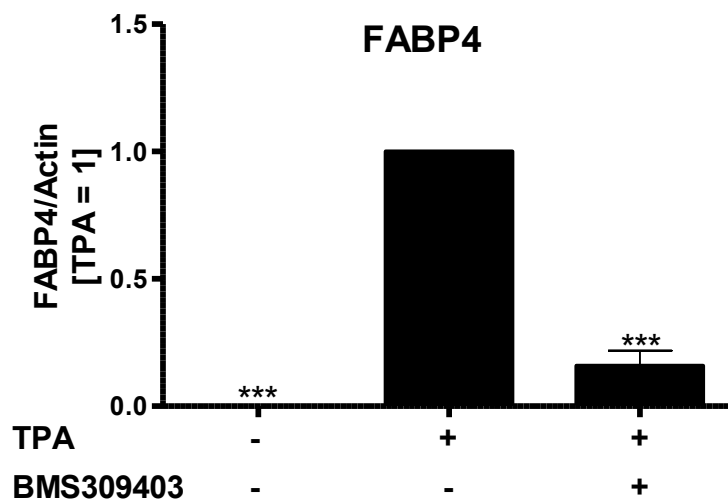
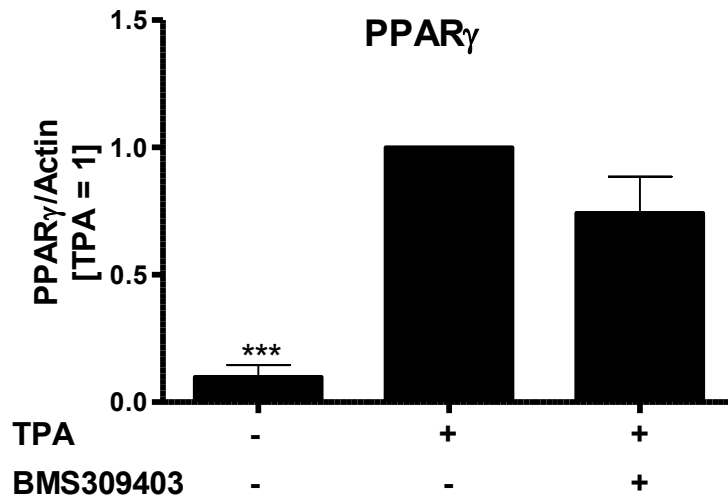


Abbildung 24: PPAR γ -abhängige Genexpression ist reduziert in THP-1-Zellen mit FABP4-Inhibition während der Differenzierung. THP-1-Zellen wurden mit 100 nM TPA für 24 h in Anwesenheit von 25 μ M BMS309403 differenziert. Die mRNA-Expression wurde anschließend mittels qPCR bestimmt. ***: $p < 0,001$ vs. TPA

Auch in THP-1-Zellen konnte durch die Induktion der Differenzierung mit TPA die Expression von PPAR γ deutlich im Vergleich zu nicht differenzierten Monozyten gesteigert werden (Abbildung 24). Die Inhibition von FABP4 hatte keinen Einfluss auf die Expression von PPAR γ . Die PPAR γ -Zielgene FABP4 und LPL wurden ebenfalls durch TPA deutlich induziert. Durch die Inhibition von FABP4 während der Differenzierung wurde die Expression von FABP4 und LPL deutlich verringert. Dies bestätigte die Ergebnisse der primären Makrophagen.

3.2 Überstände von Palmitat-behandelten hypoxischen Makrophagen induzieren eine entzündliche Antwort in Adipozyten

Das Zusammenspiel von Makrophagen und Adipozyten spielt eine wichtige Rolle in der Entstehung der Insulinresistenz. Um die Auswirkungen von Makrophagen auf Adipozyten untersuchen zu können, musste zunächst ein Zellkultursystem für Adipozyten entwickelt werden.

3.2.1 Differenzierung der Adipozyten

Aus Gewebeproben (Abfälle von Fettabsaugungen) wurde die stromale vaskuläre Fraktion (SVF) isoliert. Diese enthält Präadipozyten, die zu Adipozyten differenziert wurden. Die Differenzierung der Adipozyten zeigte sich in einer Ansammlung von Fetttropfchen, die in einem Phasenkontrastmikroskop deutlich sichtbar sind. Dies wurde in Abbildung 25 veranschaulicht.

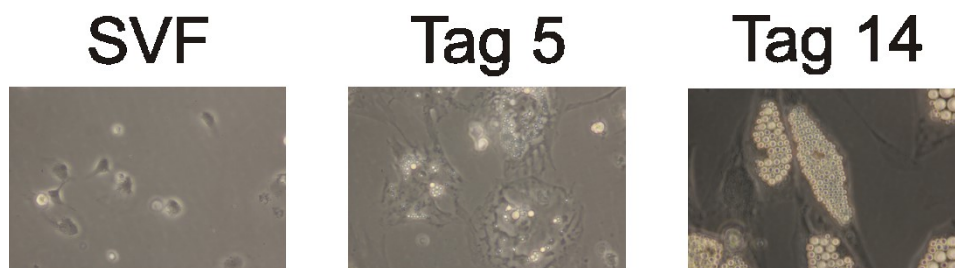


Abbildung 25: Bild von Adipozyten während ihrer Differenzierung. Zellen aus der SVF wurden für 4 Tage mit QuickDiff-Medium und schließlich für weitere 10 Tage mit 3FC-Medium differenziert.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Zellen in der SVF klein und ohne Lipidtröpfchen sind (Abbildung 25). Im Laufe der 14-tägigen Differenzierung ändert sich ihre Morphologie in eine länglichere Form, ihre Größe nimmt deutlich zu und fast das gesamte Zellinnere ist nach 14 Tagen gefüllt mit Lipidtröpfchen, was für eine erfolgreiche Differenzierung zu Adipozyten sprach.

3.2.2 MCM: H-PA induziert keine Insulinresistenz

Durch Arbeiten von Ryan Glenn Snodgrass aus unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die entzündliche Antwort von Makrophagen auf Palmitat durch Hypoxie (1 % O₂) verstärkt wird (126). Da neben einer Hypoxie auch ein erhöhtes Niveau von Fettsäuren im Fettgewebe vorhanden ist (86), unterstützen diese Ergebnisse den Fakt, dass Makrophagen eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Insulinresistenz in Adipozyten haben.

Mit diesen Informationen wurde ein Schema entwickelt, um Makrophagen in einer Weise zu stimulieren, möglichst viele proentzündliche Faktoren auszuschütten. Hierbei musste beachtet werden, dass in Adipozyten durch Palmitat eine Insulinresistenz ausgelöst werden kann (127). Deshalb wurden die Makrophagen für 2 h mit Palmitat stimuliert und anschließend das Palmitat entfernt. Die Makrophagen wurden dann für weitere 22 h in Hypoxie inkubiert, während die Makrophagen weiter Entzündungsmediatoren sekretieren. Der Ablauf der Stimulationen ist in Abbildung 26 dargestellt. Falls weitere Stimulationen gleichzeitig erfolgten, wurden die Verbindungen eine Stunde vor inkubiert und ebenfalls gewegewaschen.

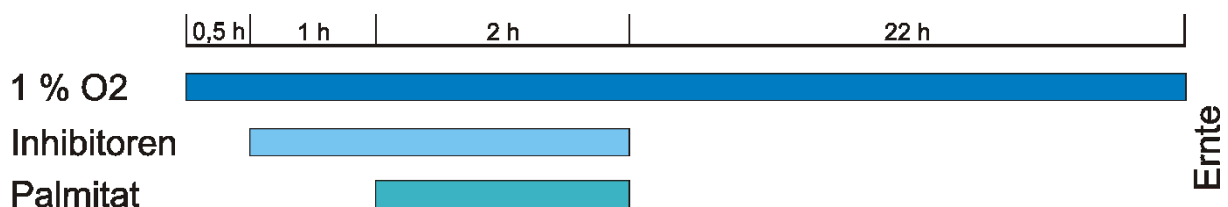


Abbildung 26: Schema der Makrophagenstimulation. Makrophagen wurden zunächst 0,5 h unter Hypoxie (1 % O₂) vorbehandelt. Falls die Makrophagen mit Inhibitoren behandelt werden sollten, wurden diese 1 h vor der Palmitatzugabe hinzugegeben. Die Stimulation mit Palmitat erfolgte dann für 2 h. Anschließend wurde das Medium gewechselt und dadurch das Palmitat bzw. auch die Inhibitoren entfernt. Weitere 22 h konnten die Makrophagen dann Zytokine ins Medium sekretieren. Der Überstand wurde dann abgenommen und als konditioniertes Medium (MCM) verwendet.

Zunächst wurden verschiedene Makrophagen miteinander verglichen: M-CSF differenzierte primäre humane Makrophagen und mit TPA differenzierte Makrophagen der Zelllinie THP-1. Diese wurden entweder nicht stimuliert, mit Palmitat stimuliert oder als Kontrolle mit 100 ng/ml LPS in einem Schema analog zu Palmitat. Die Ergebnisse dieser Versuche werden in Abbildung 27 dargestellt.

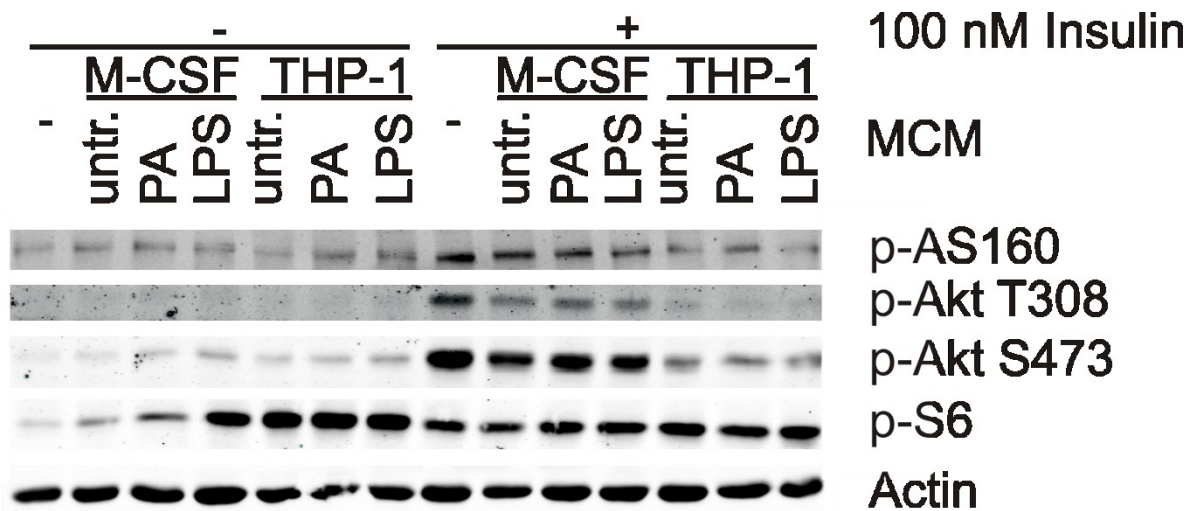


Abbildung 27: Vergleich verschiedener MCM. Primäre humane CD14-positive Zellen wurden mit 50 ng/ml M-CSF zu Makrophagen differenziert bzw. THP-1-Zellen wurden mit 100 nM TPA zu Makrophagen differenziert. Diese Makrophagen wurden anschließend mit 500 µM Palmitat (PA) oder 100 ng/ml LPS nach dem Schema in Abbildung 26 stimuliert. Als Kontrolle wurden auch unbehandelte Makrophagen verwendet (untr.). Primäre Adipozyten wurden mit MCM von dieser Makrophagen für 24 h stimuliert und anschließend mit 100 nM Insulin für 15 min stimuliert. Die Analyse der Proteine und ihrer Phosphorylierungen erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot.

Als Marker für die die Insulinsensitivität wurden die Phosphorylierungen der Proteine AS160, Akt und S6 untersucht. Wie in Abbildung 27 ersichtlich, konnte ohne Insulinstimulation (Spur 1) keine Phosphorylierung beobachtet werden. Durch die Stimulation mit MCM konnten mit Ausnahme von S6 keine Phosphorylierungen induziert werden. Bei M-CSF differenzierten Makrophagen war zu beobachten, dass bei MCM: PA eine leichte Induktion und bei MCM: LPS eine deutliche Induktion der Phosphorylierung von S6 zu beobachten war. MCM von THP-1-Zellen hingegen induzierte auch ohne weitere Stimulation der THP-1-Zellen eine deutliche Phosphorylierung. Nach Insulinstimulation (Spur 8) konnte ein starker Anstieg der Phosphorylierungen aller Proteine beobachtet werden. Diese konnten durch Stimulation mit MCM von M-CSF differenzierten Makrophagen etwas verringert werden. Bei Akt war der Effekt bei T308 stärker als bei S473. Hier zeigten sich aber keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungen der Makrophagen. Die Phosphorylierung von S6 war nur unwesentlich beeinflusst. Das MCM der THP-1-Zellen reduzierte die Phosphorylierungen AS160 und auch Akt fast vollständig – egal wie die THP-1-Zellen stimuliert worden waren. Auch hier war die Phosphorylierung von S6 nur unwesentlich beeinflusst. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass MCM von primären Makrophagen keine vollständige Insulinresistenz induzieren konnte, während sogar schon unbehandelte THP-1-Makrophagen ein MCM generierten, das eine deutliche Insulinresistenz induzierte.

3.2.3 MCM: H-PA erhöht die basale Glucoseaufnahme

Eine weitere Möglichkeit, die Empfindlichkeit von Adipozyten auf Insulin zu untersuchen, besteht in der Messung der insulinabhängigen Glucoseaufnahme. Hierzu wurde ein Test entwickelt, mit dem die Glucoseaufnahme mittels ^3H -markierter 2-Deoxyglucose gemessen werden konnte. Hier wurden Adipozyten mit MCM stimuliert und dann die Glucoseaufnahme gemessen, was in Abbildung 28 gezeigt wird.

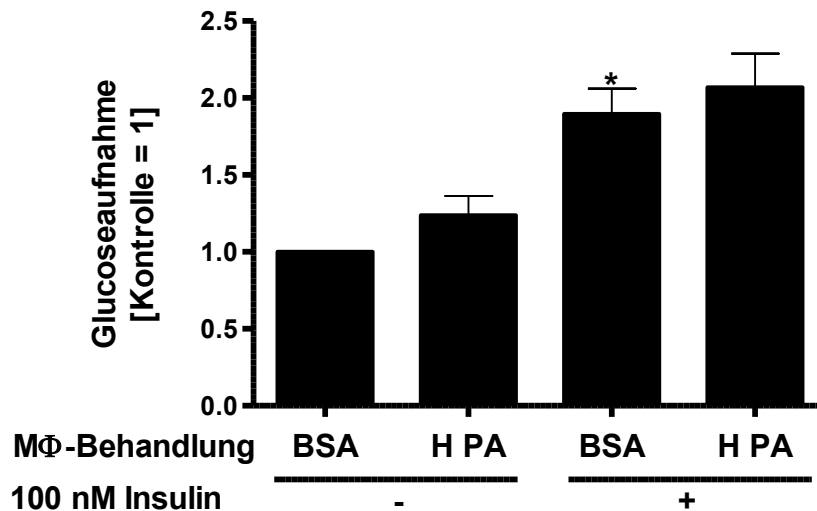


Abbildung 28: Die basale Glucoseaufnahme von Adipozyten ist nach MCM-Behandlung erhöht. Makrophagen wurden mit $500\ \mu\text{M}$ Palmitat unter Hypoxie (H, 1% O_2) oder mit BSA allein nach dem Schema in Abbildung 26 stimuliert. Primäre Adipozyten wurden mit MCM von dieser Makrophagen für 24 h stimuliert. Anschließend wurden sie für 3 h in einem Glucose-freien Puffer inkubiert und dann mit 100 nM Insulin für 30 min stimuliert. Nach der Gabe von $0,5\ \mu\text{Ci}$ ^3H -2-Deoxyglucose für 1 h wurden die Zellen lysiert und die Aktivität in einem Szintillationszähler gemessen. *: $p < 0,05$ vs. ohne Insulin

Wie in Abbildung 28 zu erkennen ist, zeigten Adipozyten, die mit MCM: H-PA stimuliert worden waren, eine im Vergleich zur BSA-Kontrolle leicht erhöhte Glucoseaufnahme auf ein $1,24 \pm 0,12$ -faches Niveau. Nach Stimulation mit Insulin, erhöhte sich die Glucoseaufnahme signifikant auf etwa $1,9 \pm 0,16$ -faches Niveau. Mit MCM: H-PA stimulierte Adipozyten zeigten mit einer $2,07 \pm 0,22$ -fachen Erhöhung ein vergleichbares Niveau.

3.2.4 MCM: H-PA induziert eine entzündliche Antwort in Adipozyten

Adipozyten sind nicht nur Fettspeicherorgane, sondern sekretieren zahlreiche Faktoren, um mit dem Rest des Organismus zu kommunizieren. Hierzu gehören Faktoren wie Adiponectin, das dämpfend auf Immunantworten wirkt, sowie auch CCL2 und IL-6, die proinflammatorisch wirken (128, 129). Um dies zu untersuchen, wurden die Expressionen von CCL2, IL-6 und Adiponectin bestimmt. Hierzu wurden die Adipozyten zuvor mit konditionierten Medien von verschiedenen stimulierten Makrophagen inkubiert und anschließend die Genexpressionen von IL-6 und CCL2 mittels qPCR untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 dargestellt.

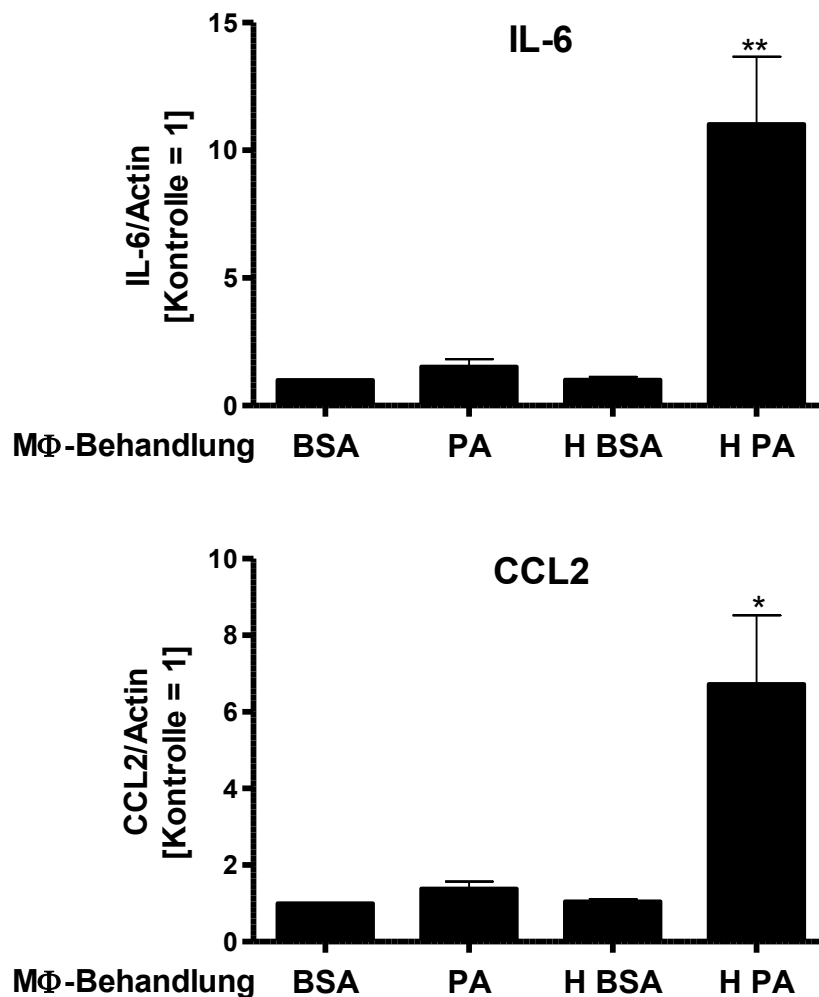


Abbildung 29: Nur MCM: H-PA erhöht die Expression proentzündlicher Zytokine in Adipozyten. Makrophagen wurden mit 500 μ M Palmitat unter Hypoxie (H, 1 % O_2) oder mit BSA allein nach dem Schema in Abbildung 26 stimuliert. Primäre Adipozyten wurden mit MCM dieser Makrophagen für 24 h stimuliert. Die mRNA-Expression wurde dann mittels qPCR bestimmt. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ vs. MCM: BSA

Wie in Abbildung 29 ersichtlich ist, konnte durch Stimulation der Adipozyten mit MCM: BSA, PA oder H-BSA keine erhöhte Expression von IL-6 bzw. CCL2 beobachtet werden. Nur bei Stimulation durch MCM: H-PA wurde die Expression von IL-6 und CCL2 deutlich induziert. Als Marker für die verringerte anti-entzündliche Kapazität der Adipozyten wurde Adiponectin untersucht (Abbildung 30).

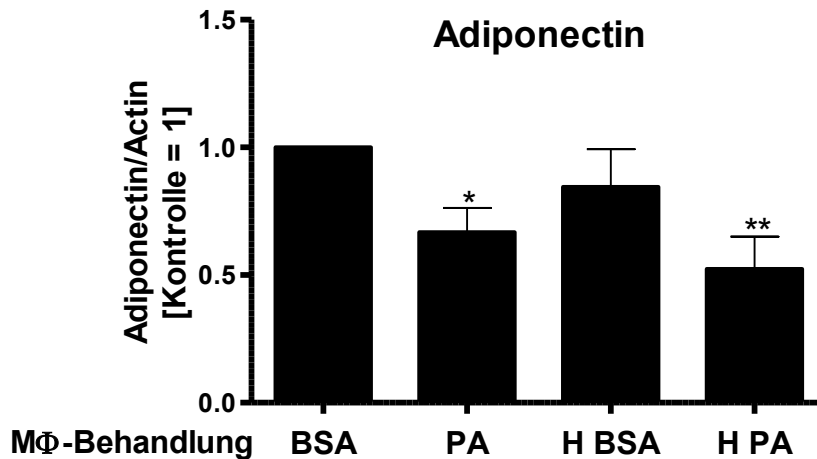


Abbildung 30: Adiponectin-Expression ist reduziert in Adipozyten nach Stimulation mit MCM: PA und MCM: H PA. Makrophagen wurden mit 500 μ M Palmitat unter Hypoxie (H, 1 % O₂) oder mit BSA allein nach dem Schema in Abbildung 26 stimuliert. Primäre Adipozyten wurden mit MCM dieser Makrophagen für 24 h stimuliert. Die mRNA-Expression wurde dann mittels qPCR bestimmt. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ vs. MCM: BSA

Die Adiponectin-Expression (Abbildung 30) zeigte ein entgegengesetztes Bild im Vergleich zu IL-6 und CCL2. Die Expression von Adiponectin wurde durch MCM: BSA bzw. MCM: H-BSA nicht beeinflusst. MCM: PA und MCM: H-PA hingegen reduzierten die Expression von Adiponectin, wobei der Effekt von MCM: H-PA stärker war. Durch MCM kann also eine Entzündungsreaktion in den Adipozyten ausgelöst werden. Nur MCM: H-PA hatte hier einen wirklich starken Effekt während MCM: H überhaupt keinen Effekt hatte.

3.2.5 Inhibition von JNK, aber nicht von p38 in Makrophagen vermindert die entzündliche Antwort der Adipozyten

Ryan Glenn Snodgrass konnte zeigen, dass die entzündliche Antwort von Makrophagen auf Palmitat durch Hypoxie in einer JNK- oder p38-abhängigen Weise funktioniert (126). Um zu untersuchen, ob dies auch auf Effekte in Adipozyten übertragbar ist, wurden diese Kinasen in Makrophagen (und nicht in den Adipozyten) während der Stimulation mit Palmitat inhibiert. Zur Inhibition von JNK wurden 10 μ M SP600125 und von p38-MAPK 10 μ M SB203580 eingesetzt. Das damit gewonnene MCM wurde genutzt, um damit Adipozyten zu stimulieren. Die Expressionen von IL-6 und CCL2 in den Adipozyten wurden dann mittels qPCR gemessen, was in Abbildung 31 dargestellt wird.

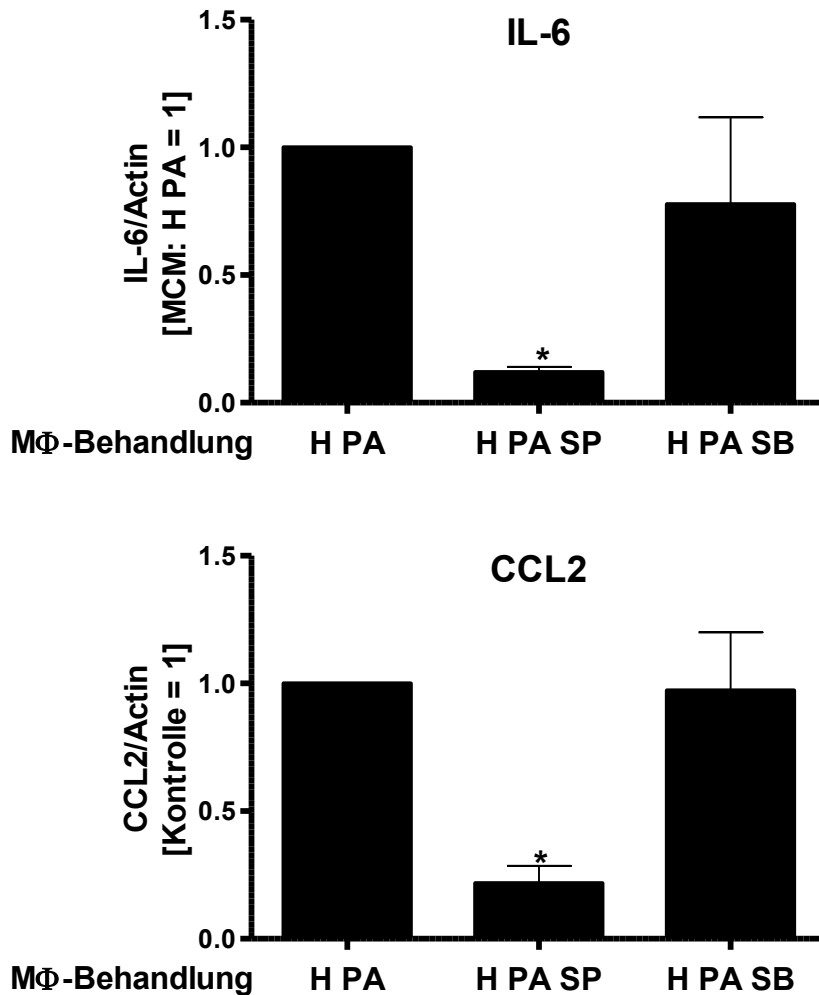


Abbildung 31: JNK- aber nicht p38-Inhibition in Makrophagen reduziert die Expression von IL-6 und CCL2 in Adipozyten. Makrophagen wurden mit 500 μ M Palmitat unter Hypoxie (H, 1 % O₂) und 10 μ M SP600125 oder 10 μ M SB203580 nach dem Schema in Abbildung 26 stimuliert. Primäre Adipozyten wurden mit MCM dieser Makrophagen für 24 h stimuliert. Die mRNA-Expression wurde dann mittels qPCR bestimmt. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ vs. MCM: BSA

Abbildung 31 zeigt, dass nur die Inhibition von JNK in Makrophagen mit SP600125 die Expression der pro-entzündlichen Zytokine IL-6 und CCL2 in Adipozyten signifikant einschränkt. SB203580-Stimulation in Makrophagen zur Inhibition der p38-MAPK hatte hingegen keinen Einfluss auf die Entzündungsantwort der Adipozyten. Die Aktivierung von JNK in Makrophagen schien also wichtig für den proentzündlichen Effekt des MCMs zu sein - die p38-Aktivierung hingegen nicht.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass MCM: H-PA eine leichte Entzündungsreaktion in Adipozyten auslöste, die sich in einer erhöhten basalen Aufnahme von Glucose, erhöhter Expression von IL-6 und CCL2 und verminderter Expression von Adiponectin zeigte.

3.3 AICAR reduziert die ER-Stress-Antwort in primären Makrophagen

Eines der Ziele dieser Arbeit war, den *feed forward*-Kreislauf im Fettgewebe zwischen Makrophagen und Adipozyten zu unterbrechen. Hierzu soll mittels AMPK-Aktivierung die Entzündungsantwort in Makrophagen unterdrückt werden, um ein Entstehen von Diabetes mellitus Typ 2 zu verhindern oder zu verzögern.

3.3.1 Von verschiedenen AMPK-Aktivatoren hat AICAR den stärksten anti-entzündlichen Effekt in Makrophagen

Primäre humane Makrophagen wurden unter Hypoxie mit Palmitat behandelt, um die Bedingungen im Fettgewebe stark übergewichtiger Personen nachzuempfinden. Hierbei wurden sie im Gegensatz zur Generierung des MCM für 24 h mit Palmitat stimuliert. Eine Stunde vor der Zugabe von Palmitat wurden die Makrophagen mit verschiedenen AMPK-Aktivatoren vorstimuliert: AICAR, R419, Salicylat, A769662 oder Phenformin und dann zunächst die Entzündungsantwort der Makrophagen untersucht. Dies ist in Abbildung 32 gezeigt.

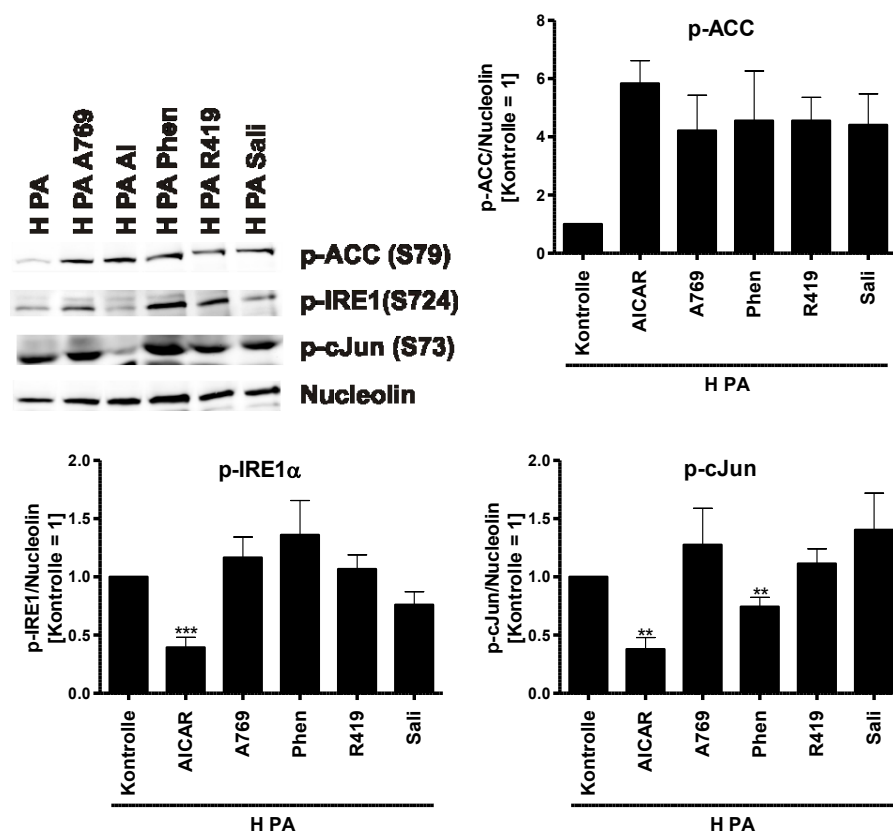
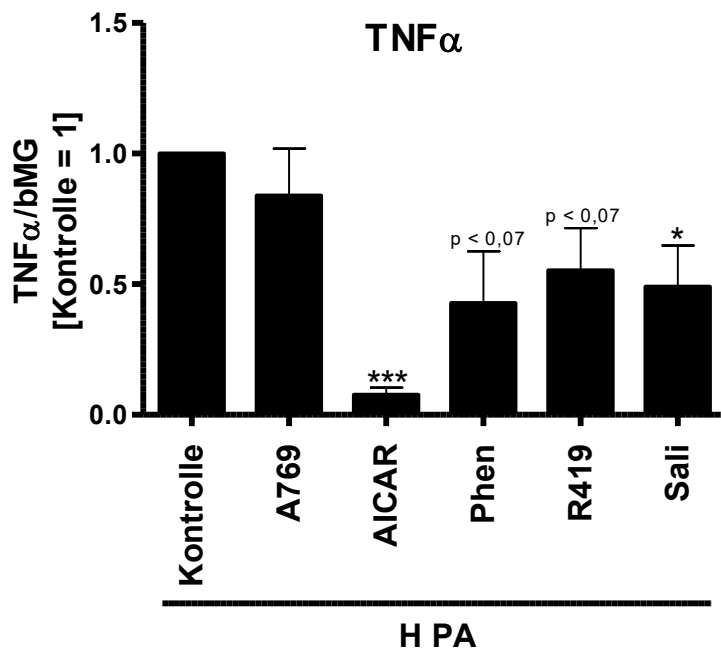
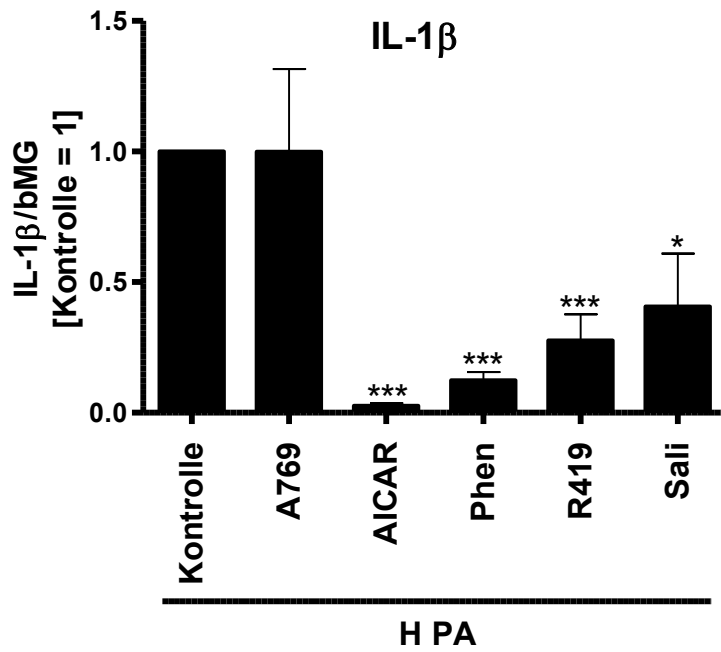


Abbildung 32: Entzündungs- und ER-Stress-Marker in H PA-stimulierten Makrophagen werden durch AICAR reduziert. Primäre Makrophagen wurden zunächst für 30 min in Hypoxie (H, 1 % O₂) inkubiert. Dann wurde zusätzlich für 1 h mit 500 μM AICAR, 250 μM A769662 (A769), 250 μM Phenformin (Phen), 100 nM R419 oder 3 mM Salicylat (Sali) vor inkubiert. Schließlich wurden noch 500 μM Palmitat (PA) für weitere 24 h hinzugegeben. Die Makrophagen wurden lysiert und die Proteine mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. (Oben links) Western Blot des Versuch, (rechts und unten) Quantifizierung der Phosphorylierungen von mehreren unabhängigen Versuchen. **: p < 0,01, ***: p < 0,001 vs. H PA ohne AMPK-Aktivatoren

Abbildung 32 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchungen. Als Marker der AMPK-Aktivität wurde die Phosphorylierung von ACC untersucht. Ohne AMPK-Aktivatoren konnte keine AMPK-Aktivität beobachtet werden. Alle AMPK-Aktivatoren induzierten ACC-Phosphorylierung auf einem ähnlichen Niveau. Die IRE1 α -Phosphorylierung ist ein Marker für ER-Stress. In allen Proben bis auf die H PA AICAR-Spur konnte eine Phosphorylierung nachgewiesen werden, während AICAR die Phosphorylierung deutlich reduzierte. Die Kinase JNK (Janus-Kinase) wird durch eine Phosphorylierung aktiviert und startet eine Entzündungsantwort. Als Marker für JNK Aktivität wurde Phosphorylierung des JNK-Substrats cJun analysiert. Diese Phosphorylierung konnte ebenso bei allen Proben bis auf die H-PA AICAR-Probe beobachtet werden. In der Quantifizierung mehrerer Western Blots konnte auch ein Effekt von Phenformin auf die cJun Phosphorylierung, aber nicht auf IRE1 α Phosphorylierung, beobachtet werden. Unter all den verwendeten AMPK-Aktivatoren ist also ausschließlich AICAR fähig, die ER-Stress- und die Entzündungsantwort in Hypoxie und Palmitat behandelten Makrophagen deutlich zu hemmen. Da ein Effekt von AICAR auf die Entzündungsantwort beobachtet worden ist, sollte dieser Effekt durch die Untersuchung der Expression verschiedener pro-entzündlicher Zytokine untersucht werden (Abbildung 33).



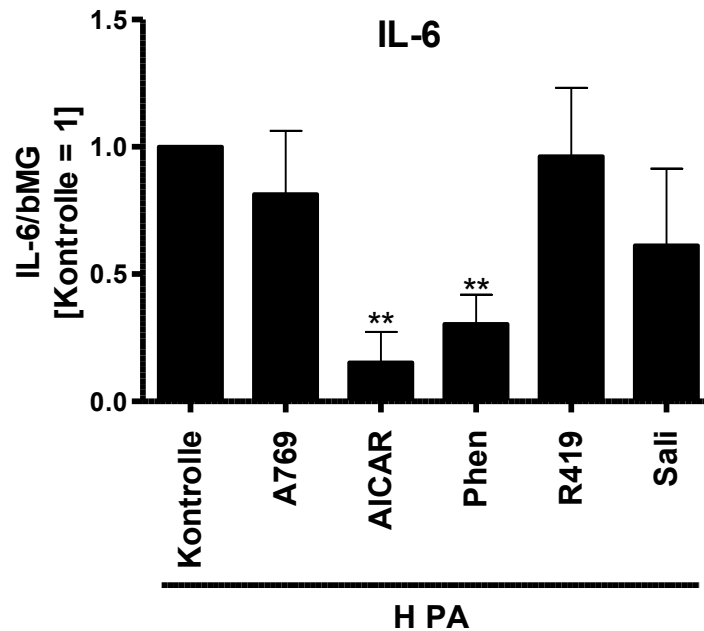


Abbildung 33: mRNA-Expression pro-entzündlicher Zytokine in H PA-behandelten Makrophagen nach AMPK-Aktivierung. Primäre Makrophagen wurden zunächst für 30 min in Hypoxie (H, 1 % O₂) inkubiert. Dann wurde zusätzlich für 1 h mit 500 μ M AICAR, 250 μ M A769662 (A769), 250 μ M Phenformin (Phen), 100 nM R419 oder 3 mM Salicylat (Sali) vor inkubiert. Schließlich wurden noch 500 μ M Palmitat (PA) für weitere 24 h hinzugegeben. Die mRNA-Expression wurde mittels qPCR bestimmt. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ vs. H PA ohne AMPK-Aktivatoren

In Abbildung 33 sind die Expressionsniveaus von IL-1 β , TNF α sowie von IL-6 dargestellt. Im Vergleich zu Hypoxie und Palmitat behandelten Makrophagen war die Expression dieser Zytokine bei zusätzlicher Stimulation mit A769662 nicht beeinflusst. Mit AICAR hingegen war eine deutliche Absenkung der Expression aller drei Zytokine zu beobachten. Bei IL-1 β konnte auch Phenformin, R419 und Salicylat eine verminderte Expression bewirken, die aber schwächer ausgeprägt als bei AICAR war. Bei TNF α waren die entzündungsdämpfenden Effekte von Phenformin und R419 noch zu beobachten, waren aber nicht mehr signifikant. Salicylat reduzierte hier aber die TNF α -mRNA noch signifikant im Vergleich zur Kontrolle ohne AMPK-Aktivierung. Die IL-6-Expression war neben AICAR nur noch mit Phenformin-Stimulation signifikant reduziert im Vergleich zur Kontrolle. R419 und Salicylat hatten hier keinen Effekt auf die durch Hypoxie und Palmitat induzierte IL-6-Expression. Auch hier konnte also wieder beobachtet werden, dass AICAR den stärksten entzündungsdämpfenden Effekt hatte. Die schwächere entzündliche Reaktion sollte durch einen Transfer von MCM auf Adipozyten verifiziert werden. Hierzu wurde MCM analog zu Abbildung 26 generiert und damit primäre Adipozyten stimuliert (Abbildung 34).

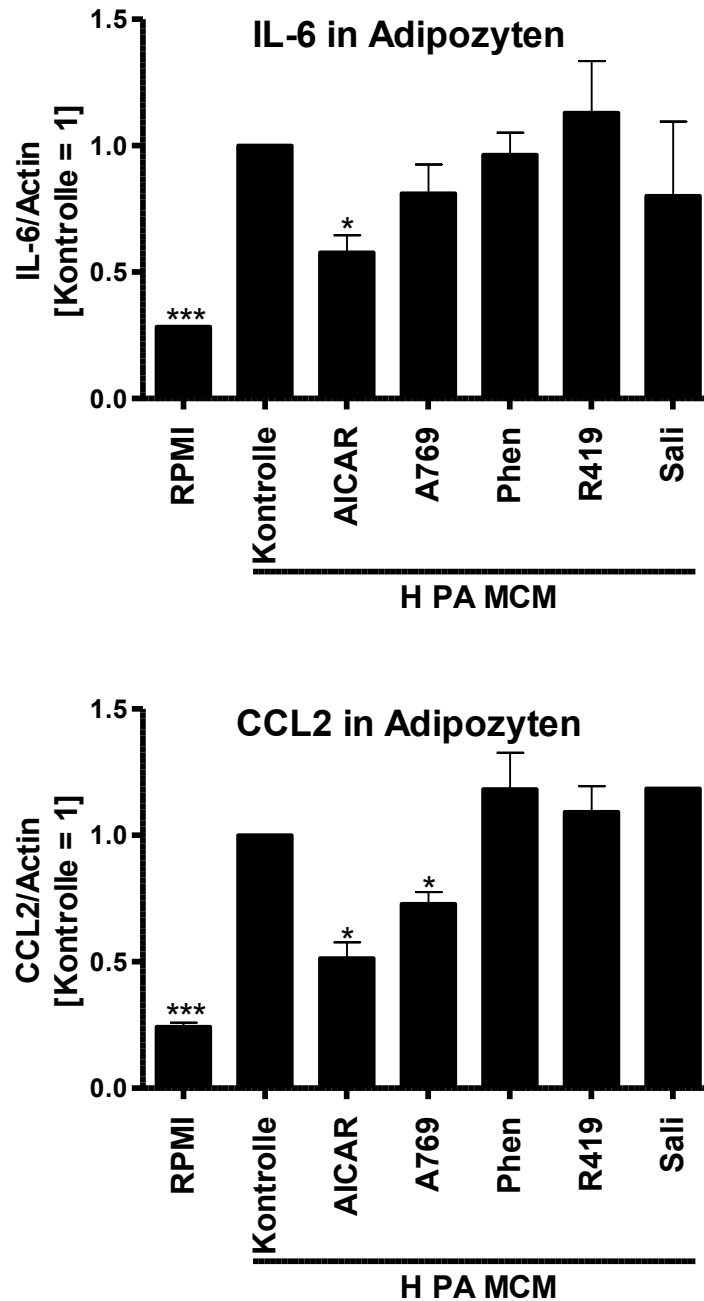


Abbildung 34: Entzündliche Reaktion der Adipozyten auf MCM: H PA ist reduziert bei AICAR-Stimulation der Makrophagen. Primäre Makrophagen wurden zunächst für 30 min in Hypoxie (H, 1 % O₂) inkubiert. Dann wurde zusätzlich für 1 h mit 500 μM AICAR, 250 μM A769662 (A769), 250 μM Phenformin (Phen), 100 nM R419 oder 3 mM Salicylat (Sali) vor inkubiert. Schließlich wurden noch 500 μM Palmitat (PA) für weitere 2 h hinzugegeben. Nach einem Mediumwechsel wurde für weitere 22 h inkubiert und die Überstände dann auf primäre Adipozyten für 24 h gegeben. Die mRNA-Expression in Adipozyten wurde dann mittels qPCR gemessen. *: p < 0,05, ***: p < 0,001 vs. MCM: H PA ohne AMPK-Aktivatoren

Im Vergleich zu RPMI als Kontrolle konnte eine Erhöhung der IL-6 und CCL2 Expression in den Adipozyten nach MCM-Zugabe beobachtet werden (Abbildung 34). Wurden die Makrophagen mit den AMPK-Aktivatoren Phenformin, R419 oder Salicylat vorbehandelt, hatte dies keinen Effekt auf die entzündliche Antwort der Adipozyten nach MCM-Transfer. Die Stimulation der Makrophagen mit A769662 hingegen konnte die CCL2-Expression verringern während es auf IL-6 keinen Einfluss hatte. AICAR hingegen hatte bei IL-6 und CCL2 wieder den stärksten Effekt, was die Ergebnisse in den Makrophagen bestätigte.

3.3.2 AICAR reduziert die ER-Stress-Antwort in Makrophagen

Ein Faktor bei der Entzündungsantwort von Makrophagen ist die Stärke der ER-Stress-Antwort (130). Die Daten in Abbildung 32 deuteten darauf hin, dass AICAR den ER-Stress in durch Hypoxie und Palmitat gestressten Makrophagen reduzierte. Um dies weiter zu unterstreichen, wurden zwei typische ER-Stress-Marker auf RNA-Ebene analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in Abbildung 35 gezeigt.

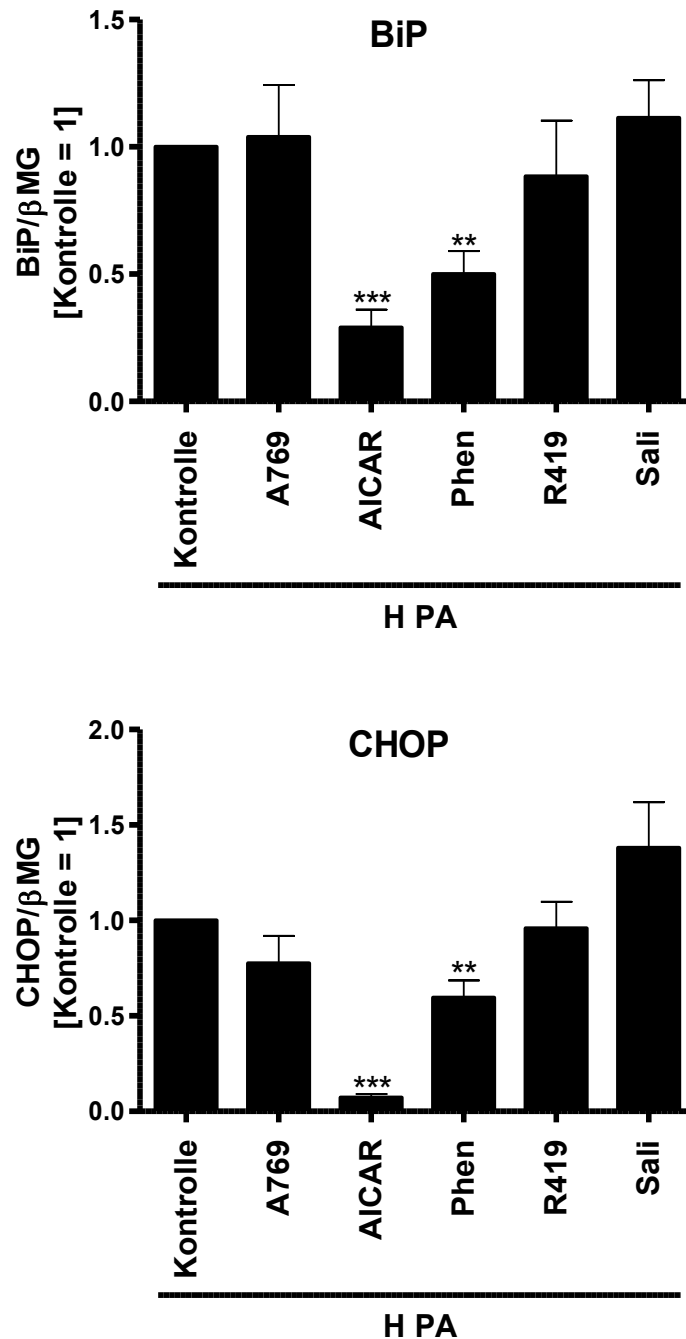


Abbildung 35: ER-Stress-Marker BiP und CHOP werden durch AICAR reduziert. Primäre Makrophagen wurden zunächst für 30 min in Hypoxie (H, 1 % O₂) inkubiert. Dann wurde zusätzlich für 1 h mit 500 μM AICAR, 250 μM A796662 (A769), 250 μM Phenformin (Phen), 100 nM R419 oder 3 mM Salicylat (Sali) vor inkubiert. Schließlich wurden noch 500 μM Palmitat (PA) für weitere 24 h hinzugegeben. Die mRNA-Expression wurde mittels qPCR bestimmt. **: p < 0,01, ***: p < 0,001 vs. H PA ohne AMPK-Aktivatoren

Im Vergleich zur nur mit Hypoxie und Palmitat behandelten Kontrolle zeigten mit AICAR behandelte Makrophagen eine deutlich verringerte Expression von BiP und CHOP (Abbildung 35). Phenformin-Stimulation reduzierte ebenfalls die Expression beider Gene, aber schwächer. Die anderen AMPK-Aktivatoren hatten keinen Effekt auf den ER-Stress. Da ein starker Effekt von AICAR auf den ER-Stress beobachtet wurde, stellte sich die Frage, ob AICAR auch bei anderen ER-Stressauslösern einen Effekt auf die ER-Stressantwort hat. Hierfür wurden die ER-Stress-Auslöser Thapsigargin und Tunicamycin verwendet (131, 132) und die Expression der beiden ER-Stress-Marker mittels qPCR untersucht (Abbildung 36).

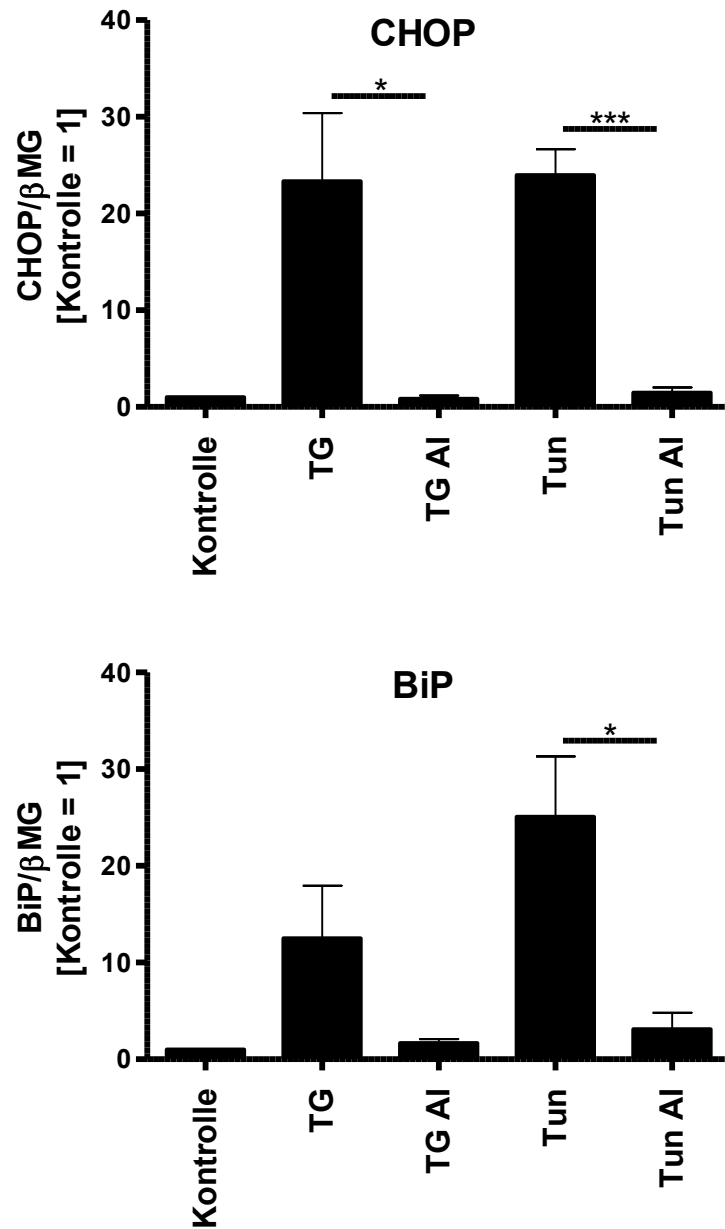


Abbildung 36: Expression von ER-Stress-Markern in Makrophagen nach Stimulation mit Thapsigargin oder Tunicamycin wird durch AICAR reduziert. Primäre Makrophagen wurden 1 h mit 500 μ M AICAR (AI) vor inkubiert und anschließend für 6 h mit 100 nM Thapsigargin (TG) oder 1 μ g/ml Tunicamycin (Tun) stimuliert. Die mRNA-Expressionen wurden mittels qPCR bestimmt. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

Thapsigargin und Tunicamycin induzierten im Vergleich zu unstimulierten Makrophagen CHOP um den Faktor $23,3 \pm 7$ bzw. $24 \pm 2,7$ (Abbildung 36). Die gleichzeitige Stimulation mit AICAR reduzierte die mRNA von CHOP fast vollständig auf das Niveau unstimulierter Zellen. Für BiP lässt sich ein ähnliches Muster beobachten. Thapsigargin induzierte BiP mit dem Faktor $12,5 \pm 4,3$ etwas schwächer als Tunicamycin mit einer $25,1 \pm 6,3$ -fachen Induktion. AICAR hingegen wirkte wieder deutlich und reduzierte die Expression von BiP trotz ER-Stress-Induktion auf ein Niveau ähnlich unstimulierter Makrophagen. AICAR ist also ein potenter ER-Stress-Inhibitor. Dies kann auch durch Western Blots nachgewiesen werden (Abbildung 37).

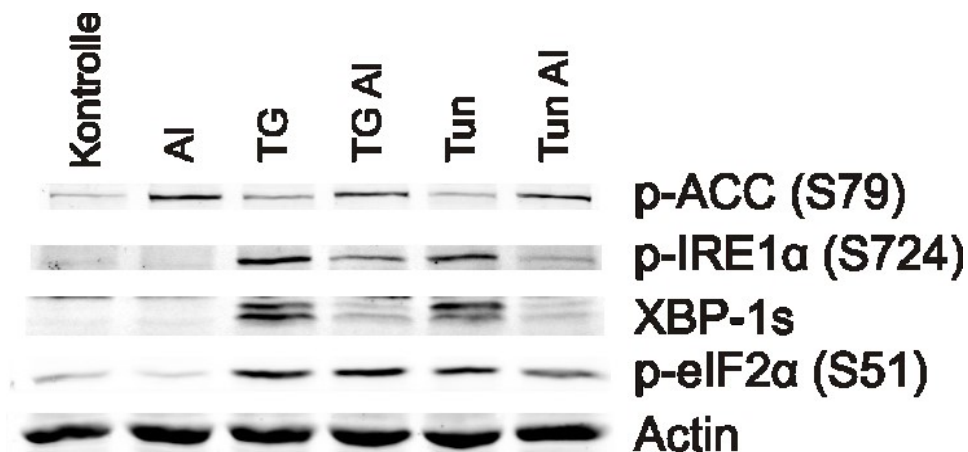


Abbildung 37: AICAR hemmte den durch Thapsigargin oder Tunicamycin induzierten ER-Stress. Primäre Makrophagen wurden 1 h mit $500 \mu\text{M}$ AICAR (AI) vor inkubiert und anschließend für 6 h mit 100 nM Thapsigargin (TG) oder $1 \mu\text{g/ml}$ Tunicamycin (Tun) stimuliert. Der Nachweis von Proteinen oder ihrer Phosphorylierung erfolgte durch SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot.

Wie der Western Blot (Abbildung 37) zeigte, konnte in der Kontrolle weder AMPK-Aktivität (p-ACC), noch ER-Stress (p-IRE1 α , XBP-1s, p-eIF2 α) beobachtet werden. Die alleinige Gabe von AICAR aktivierte AMPK, hatte aber sonst keine Effekte. Thapsigargin induzierte ER-Stress, wie sich in den Phosphorylierungen von IRE1 α und eIF2 α sowie in der Expression von XBP-1s zeigte. Das Gleiche galt auch für Tunicamycin. Wurde gleichzeitig mit Thapsigargin oder Tunicamycin mit AICAR stimuliert, wurde XBP-1s sowie Phospho-IRE1 α fast vollständig reduziert. Der Einfluss von AICAR auf Phospho-eIF2 α war bei Thapsigargin nicht vorhanden und bei Tunicamycin nicht so deutlich. Der Einfluss von AICAR scheint sich also auf den IRE-Signalweg und weniger auf PERK zu konzentrieren.

3.3.3 AICAR wirkt unabhängig von AMPK

Typische Effekte der AMPK-Aktivierung sind eine verminderte Proteinsynthese durch Hemmung des mTOR-Weges, eine erhöhte β -Oxidation sowie eine Aktivierung von Sirtuin-1 (98). Um zu überprüfen, ob die AICAR-Wirkung abhängig von diesen AMPK-Effekten ist, wurden diese mit Inhibitoren gehemmt: Rapamycin inhibiert den mTORC1-Komplex und damit die Proteinsynthese, Etomoxir inhibiert die Fettsäureoxidation und Ex527 die Sirtuin-1-Aktivierung. Dies wurde in mit Hypoxie und Palmitat stimulierten Makrophagen untersucht und wird in Abbildung 38 dargestellt.

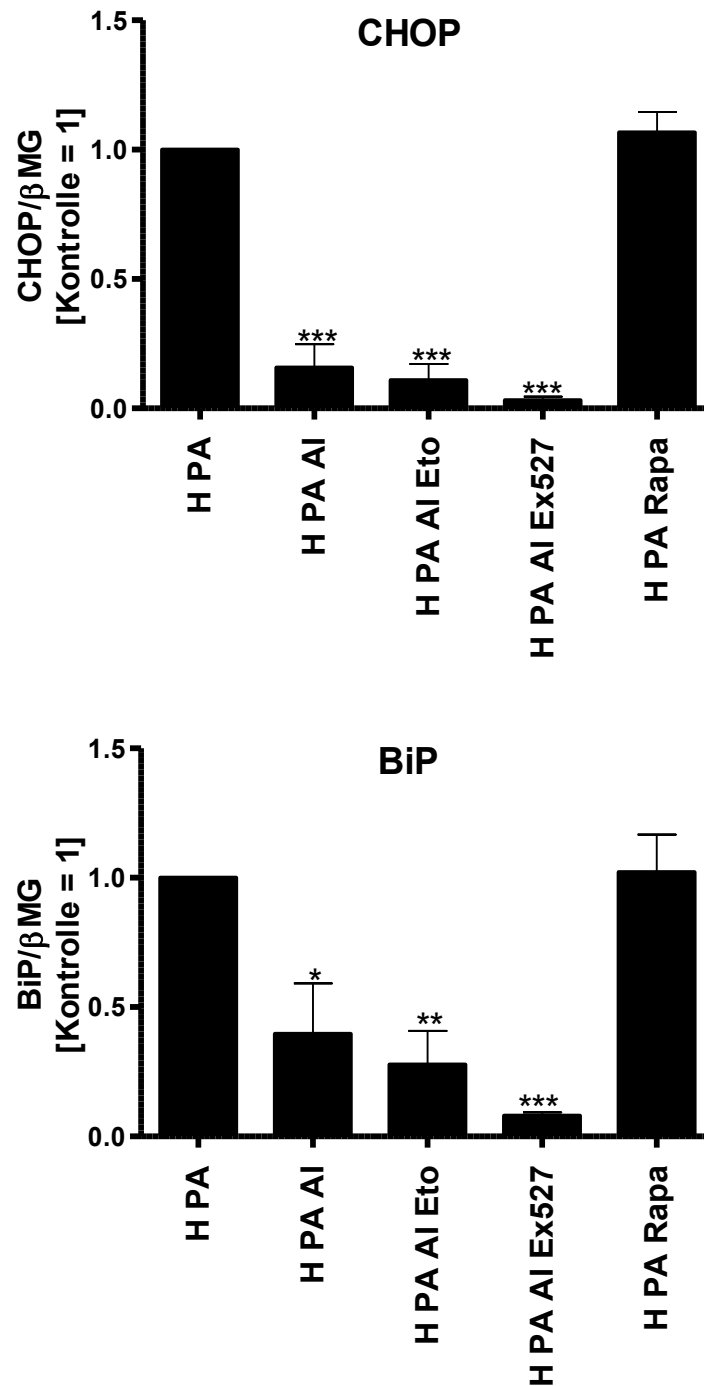


Abbildung 38: Der AICAR-Effekt ist unabhängig von einer reduzierten Proteinexpression, Fettsäureoxidierung oder Sirtuin-1-Aktivierung. Primäre Makrophagen wurden zunächst für 30 min in Hypoxie (H, 1 % O₂) inkubiert, dann 30 min mit 50 μ M Etomoxir (Eto), 10 μ M Ex-527 oder 100 nM Rapamycin (Rapa) – gefolgt von zusätzlich mit 500 μ M AICAR (AI) für 1 h. Schließlich wurden noch 500 μ M Palmitat (PA) für weitere 24 h hinzugegeben. Die Analyse der Genexpression erfolgte mittels qPCR. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ vs. H PA

Die CHOP-mRNA und BiP-mRNA konnte durch die gleichzeitige Stimulation mit AICAR signifikant reduziert werden (Abbildung 38). Etomoxir beeinflusste den ER-Stress reduzierenden Effekt von AICAR nicht. Das Gleiche galt auch für den Sirtuin-1-Inhibitor Ex-527. Durch die Inhibition von mTOR mit Rapamycin sollte die reduzierte Proteinsynthese durch AMPK-Aktivierung simuliert werden. Rapamycin hatte aber nicht den gleichen Effekt wie AICAR. Es scheint, dass der Effekt von AICAR unabhängig von AMPK-abhängigen Mechanismen ist. Um einen weiteren Beweis der AMPK-Unabhängigkeit des AICAR Effekts zu liefern, wurde die Tatsache benutzt, dass der eigentliche Effektor auf AMPK nicht AICAR selbst, sondern seine durch die Adenosinkinase phosphorylierte Form ZMP ist. Durch die Inhibition der Adenosinkinase mit ABT-702 kann diese Reaktion verhindert werden (133). Abbildung 39 zeigt einen Western Blot eines Versuches mit inhibierter Adenosinkinase.

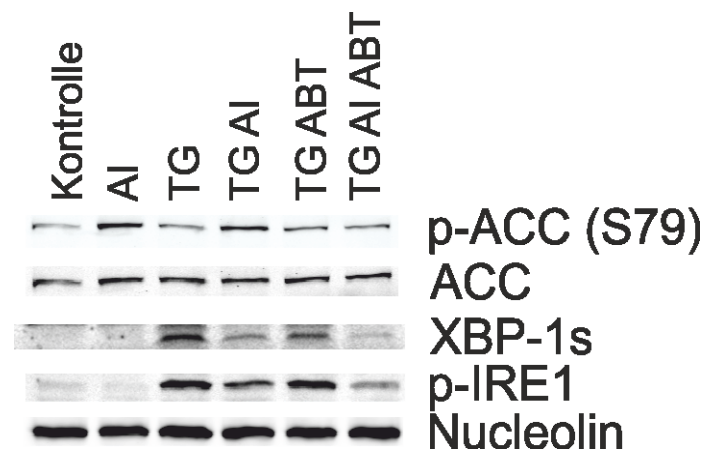


Abbildung 39: Die Inhibition der Adenosinkinase durch ABT-702 verstärkt den Effekt von AICAR auf ER-Stress. Primäre Makrophagen wurden zunächst 0,5 h mit 500 nM ABT-702 (ABT) vorstimuliert, dann 1 h mit 500 μ M AICAR (AI) vor inkubiert und anschließend für 6 h mit 100 nM Thapsigargin (TG) stimuliert. Der Nachweis von Proteinen oder ihrer Phosphorylierungen erfolgte durch SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot.

Abbildung 39 zeigt, dass ABT zwar die Aktivierung von AMPK verhinderte, aber den ER-Stress hemmenden Effekt von AICAR unangetastet ließ. Dieser Effekt war mit ABT-702 teilweise sogar stärker als mit AICAR allein. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass AMPK bei dem AICAR-Effekt keine Rolle spielt und dass AICAR und nicht das phosphorylierte Produkt ZMP den ER-Stress inhibiert. Da sich durch diese Versuche eine Unabhängigkeit von AMPK andeutete, sollte diese durch ein Stummschalten von AMPK mittels siRNA überprüft werden (Abbildung 40).

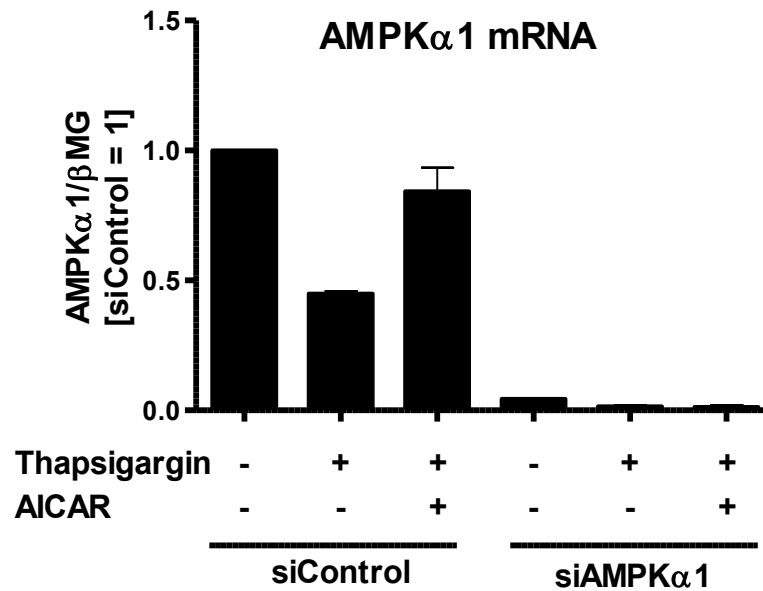


Abbildung 40: AMPK α 1 mRNA-Expression nach Stummschalten mit siRNA. Primäre humane Makrophagen wurden mit 50 nM Kontroll- oder AMPK α 1-siRNA transfiziert und nach zwei Tagen zunächst mit 500 μ M AICAR vorstimuliert und dann für 6 h mit 100 nM Thapsigargin stimuliert. Die Analyse der Genexpression erfolgte mittels qPCR.

Wie in Abbildung 40 ersichtlich ist, war die AMPK-Expression nach Stimulation mit Thapsigargin vermindert. Diese Reduktion konnte durch die gleichzeitige Gabe von AICAR aber ausgeglichen werden. Die Expression von AMPK α 1 war bei Benutzung einer siRNA fast vollständig eingeschränkt. Dies spricht für einen sehr guten *Knockdown*. Dies war die Grundlage, um zu untersuchen, ob AICAR auch ohne AMPK den ER-Stress reduzieren kann. Die Genexpressionen der ER-Stress-Marker BiP und CHOP ist in Abbildung 41 dargestellt.

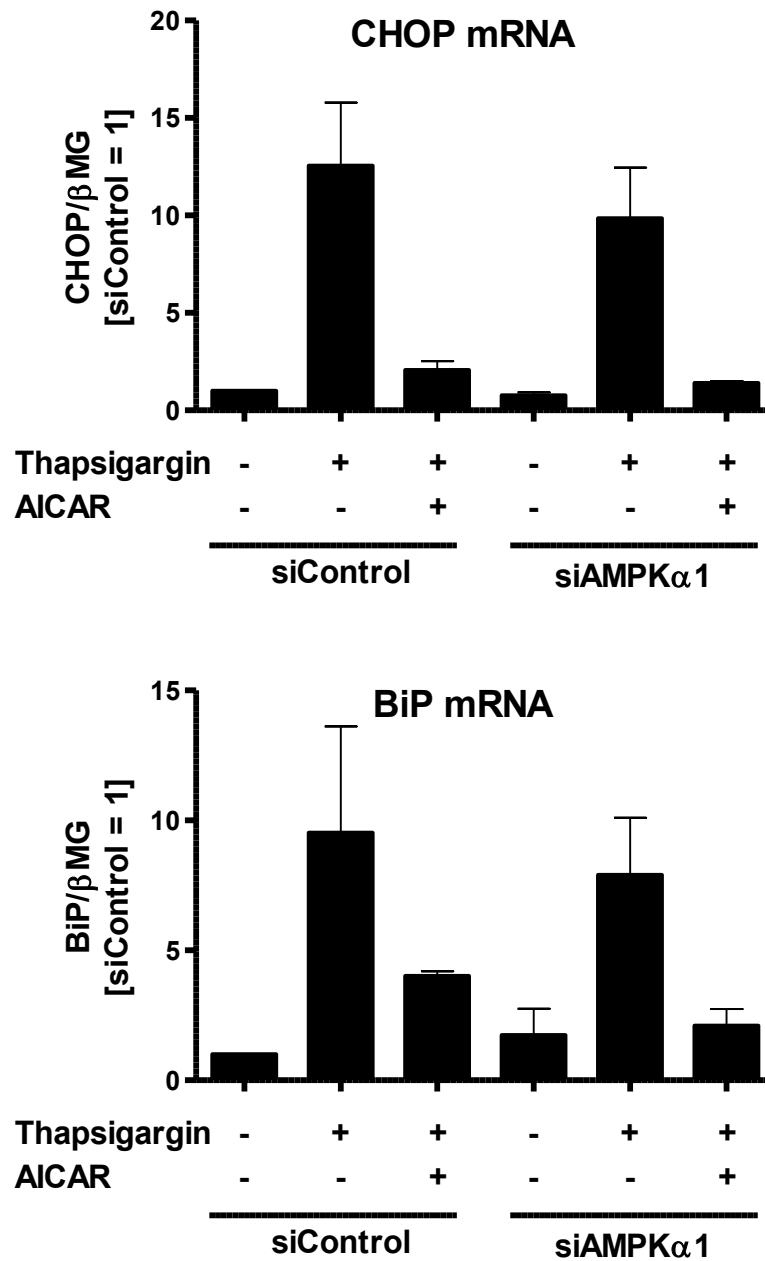


Abbildung 41: Der Knockdown von AMPK hat keinen Einfluss auf den ER-Stress reduzierenden Effekt von AICAR. Primäre humane Makrophagen wurden mit 50 nM Control oder AMPKα1 transfiziert und nach zwei Tagen zunächst mit 500 μM AICAR vorstimuliert und dann für 6 h mit 100 nM Thapsigargin stimuliert. Die Analyse der Genexpression erfolgte mittels qPCR.

Es zeigte sich, dass CHOP und BiP durch Thapsigargin induziert werden und diese Induktion durch AICAR aufgehoben werden konnte (Abbildung 41). Zwischen den mit siControl und mit siAMPKα1 behandelten Makrophagen zeigte sich hierbei kein Unterschied, was zusätzlich klarstellte, dass AICAR unabhängig von AMPK die ER-Stress-Antwort reduziert.

3.3.4 Der hemmende Effekt von AICAR auf die ER-Stress-Antwort ist unabhängig von Adenosin-Signalwegen

AICAR kann zu einer erhöhten Ausschüttung von Adenosin führen. Adenosin wiederum hat einen dämpfenden Effekt auf entzündliche Reaktionen (134). Um zu testen, ob der Wirkmechanismus von AICAR durch eine verstärkte autokrine Sekretion von Adenosin funktioniert, wurden die Makrophagen mit Adenosin stimuliert oder mit Adenosin-Rezeptor-Agonisten bzw. Antagonisten. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigt Abbildung 42.

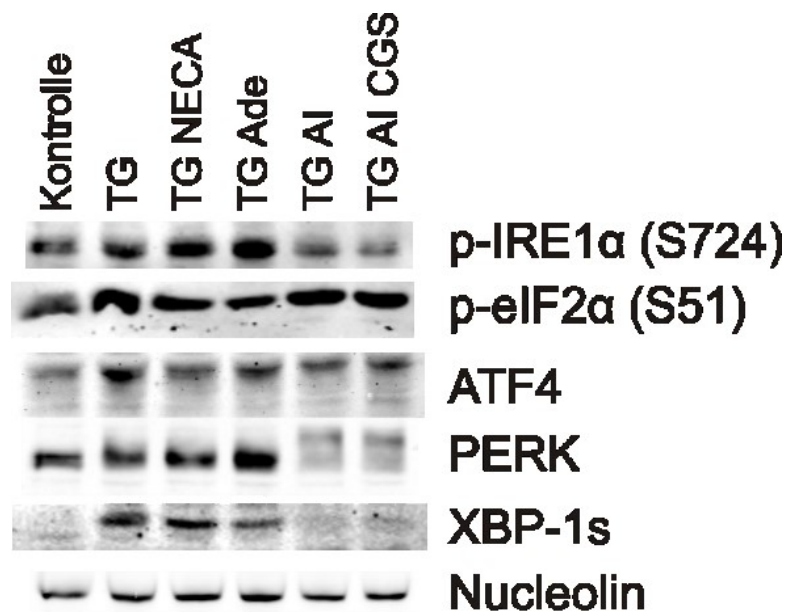


Abbildung 42: Adenosinrezeptoren haben keinen Einfluss auf den Effekt von AICAR. Primäre Makrophagen wurden zunächst mit 1 μ M NECA, 100 μ M Adenosin (Ade) oder 5 μ M CGS15943 (CGS) für 30 min vor inkubiert, gefolgt von 1 h mit 500 μ M AICAR (AI) und schließlich wurde noch für weitere 6 h mit 10 nM Thapsigargin (TG) stimuliert. Die Analyse der Proteine und ihrer Phosphorylierungen erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot.

Wie in der Abbildung 42 zu beobachten ist, waren in der Kontrolle im Vergleich zu der Thapsigargin stimulierten Probe die ER-Stress-Marker Phospho-IRE1 α , Phospho-eIF2 α , ATF4 und XBP-1s reduziert. Die gleichzeitige Behandlung mit dem Adenosinrezeptor-Agonisten NECA oder mit Adenosin hatte keinen Einfluss auf die ER-Stress-Marker. AICAR hingegen reduzierte die durch Thapsigargin erhöhten ER-Stress-Marker deutlich. Der Adenosinrezeptor-Antagonist CGS-15943 konnte den AICAR-Effekt auch nicht beeinflussen. Adenosinsignalwege scheinen also keine Rolle beim AICAR-Effekt zu spielen. Um zu zeigen, dass Adenosin, sowie die Adenosinrezeptor-Agonisten bzw. Antagonisten wirklich funktionsfähig waren, wurde eine typische Antwort auf Adenosinrezeptorstimulation untersucht (Abbildung 43).

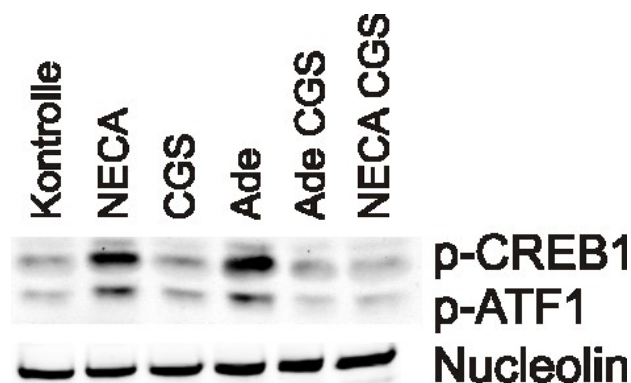


Abbildung 43: Adenosinrezeptor-Signalwege werden durch Agonisten und Antagonisten beeinflusst. Primäre Makrophagen wurden mit 1 μM NECA, 100 μM Adenosin (Ade) oder 5 μM CGS15943 (CGS) für 1 h stimuliert. Die Analyse der Proteine und ihrer Phosphorylierungen erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot.

CREB1 (cAMP-responsives Element bindendes Protein 1) und der eng verwandte ATF1 (aktivierender Transkriptionsfaktor 1) werden nach Stimulation mit Adenosin phosphoryliert (135). Dies konnte in Abbildung 43 nachvollzogen werden. In unbehandelten Makrophagen konnte keine Phosphorylierung von CREB1 bzw. ATF1 beobachtet werden. Durch NECA, dem Adenosinrezeptoragonisten, wurde die Phosphorylierung induziert. Der Antagonist CGS15943 induzierte keine Phosphorylierung. Adenosin wiederum induzierte eine Phosphorylierung. Wurde gleichzeitig mit Adenosin oder NECA der Antagonist CGS15943 appliziert, konnte keine Phosphorylierung beobachtet werden. Adenosin und NECA sind also Agonisten des Adenosin-Signalweges, während CGS ein potenter Antagonist ist.

3.3.5 AICAR wird mittels SLC28A3 von Zellen aufgenommen

Da durch die Versuche mit den Adenosinrezeptoren (siehe 3.3.4) gezeigt worden ist, dass AICAR vermutlich nicht extrazellulär wirkt, ist es wahrscheinlich, dass die Aufnahme von AICAR essenziell für den ER-Stress dämpfenden Effekt ist. Hierzu sollte zunächst versucht werden, Nukleosidtransporter mit Dipyridamol oder NBTI zu hemmen, um dies weiter zu bestätigen. Dies ist in Abbildung 44 dargestellt.

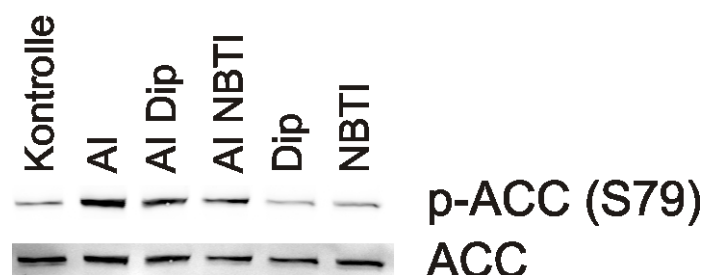


Abbildung 44: NBTI und Dipyridamol können die AMPK-Aktivierung durch AICAR nicht verhindern. Primäre Makrophagen wurden zunächst 0,5 h mit 20 μM NBTI oder 20 μM Dipyridamol (Dip) vorstimuliert und dann 6 h mit 500 μM AICAR (AI) stimuliert. Der Nachweis von Proteinen oder ihrer Phosphorylierungen erfolgte durch SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot.

Wie in Abbildung 44 zu erkennen ist, induzierte AICAR deutlich die Phosphorylierung von ACC, was für eine Aktivierung von AMPK und damit auch für eine Aufnahme von AICAR spricht. Wurde gleichzeitig versucht, die Aufnahme mit Dipyridamol oder NBTI zu inhibieren, konnte eine leichte, aber nicht signifikante Reduktion der ACC-Phosphorylierung beobachtet werden. Dies spricht dafür, dass die beiden Inhibitoren die Aufnahme von AICAR nicht verhindern konnten. In THP-1-Zellen hingegen, konnte gezeigt werden, dass Dipyridamol die Aufnahme von AICAR blockiert (136). Um diesen Widerspruch aufzuklären, wurde die Expression von verschiedenen Nucleosidtransportern der Familien SLC28 und SLC29 (Solut-Transporter-Familie 28 bzw. 29) untersucht. Während die Transporter der SLC28-Familie Nucleoside mittels des Natriumgradienten in die Zelle transportieren, sind die Transporter der Familie SLC29 passive Transporter. Dipyridamol und NBTI wurden nur als Inhibitoren der SLC29-Familie beschrieben. Deshalb wurde nun die Expression von verschiedenen SLCs in primären Makrophagen und in THP-1-Zellen verglichen (Abbildung 45).

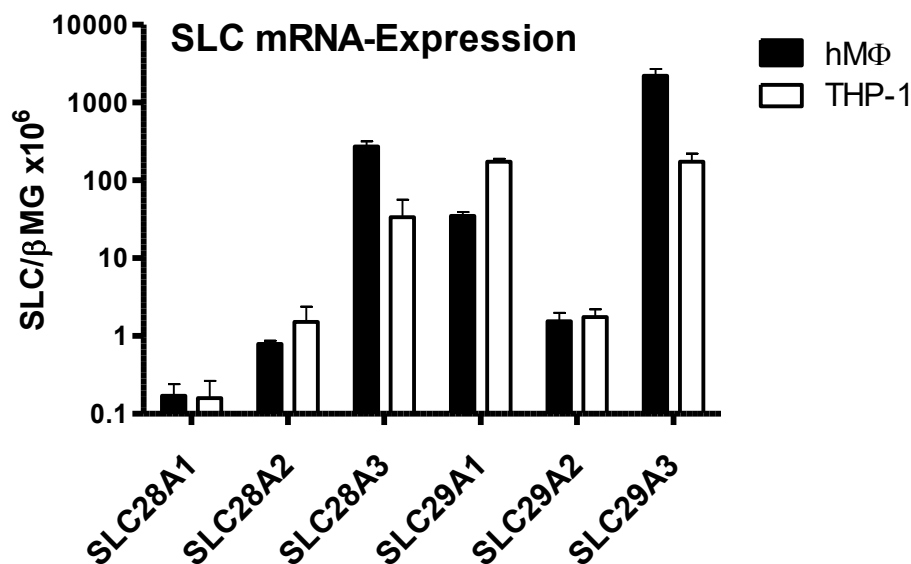


Abbildung 45: Die Expression von verschiedenen SLCs unterscheidet sich deutlich zwischen primären humanen Makrophagen und THP-1-Zellen. Die Expression verschiedener Gene wurde mittels qPCR durchgeführt. Als Probe dienen unbehandelte primäre Makrophagen (hMΦ) oder THP-1-Zellen.

Aus Abbildung 45 ist ersichtlich, dass in primären Makrophagen SLC28A3 und SLC29A3 deutlich stärker als in THP-1-Zellen exprimiert wurden. Die stärkere Expression dieser beiden Transporter könnte eine Erklärung für den stärkeren Effekt von AICAR auf ER-Stress in primären Makrophagen haben, vor allem da SLC28A3 vermutlich nicht durch Dipyridamol und NBTI gehemmt wird. Ein *Knockdown* von SLC28A3 und SLC29A3 sollte zeigen, ob einer der beiden Transporter nötig ist, damit AICAR ER-Stress vermindern kann. Zunächst wurde mittels qPCR die Effizienz des *Knockdowns* bestimmt (Abbildung 46).

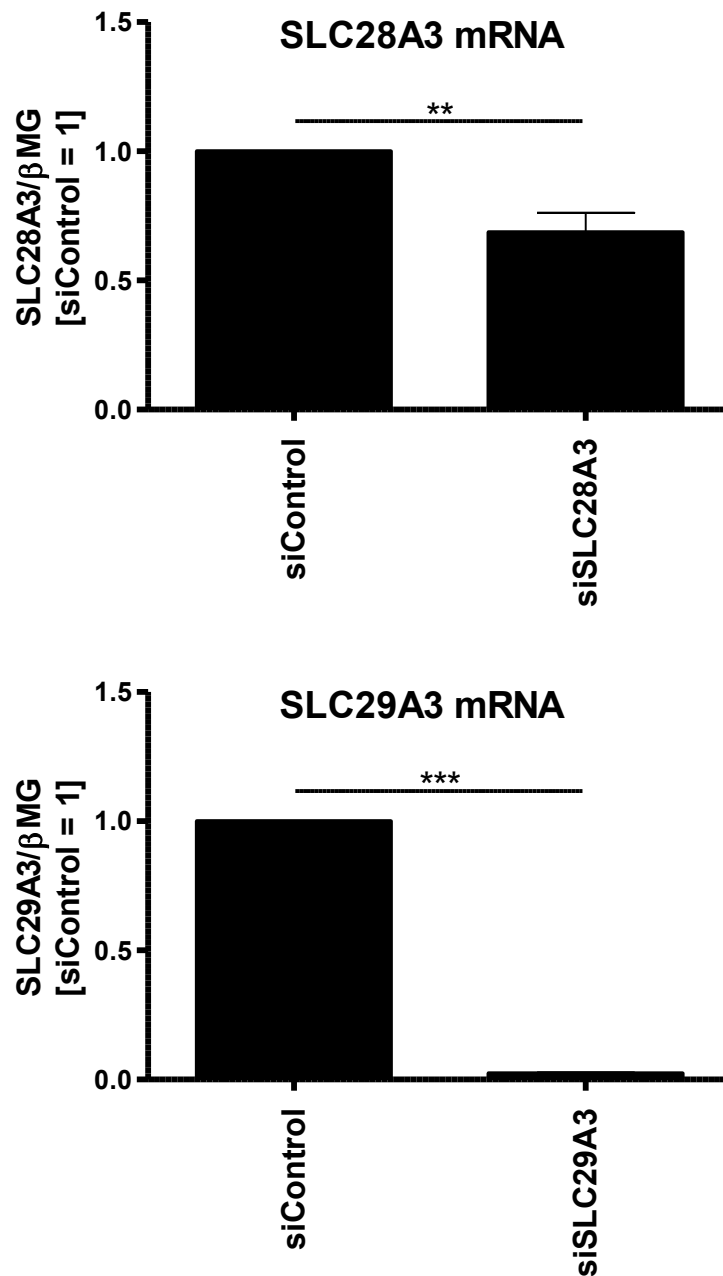


Abbildung 46: Knockdown-Effizienz von SLC28A3 und SLC29A3 nach siRNA-Behandlung. Primäre humane Makrophagen wurden mit 50 nM Kontroll- oder SLC28A3- bzw. SLC29A3-siRNA transfiziert und nach zwei Tagen für 6 h mit 100 nM Thapsigargin stimuliert. Die Analyse der Genexpression erfolgte mittels qPCR. **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

Während bei SLC28A3 ein eher schwacher *Knockdown* auf etwa 70 % erzielt werden konnte, konnte bei SLC29A3 die mRNA auf ein Niveau von ca. 2 % reduziert werden (Abbildung 46). Gleichzeitig wurde untersucht, wie sich der *Knockdown* dieser Transporter auf die Fähigkeit von AICAR, den durch Thapsigargin induzierten ER-Stress zu reduzieren, auswirkte (Abbildung 47).

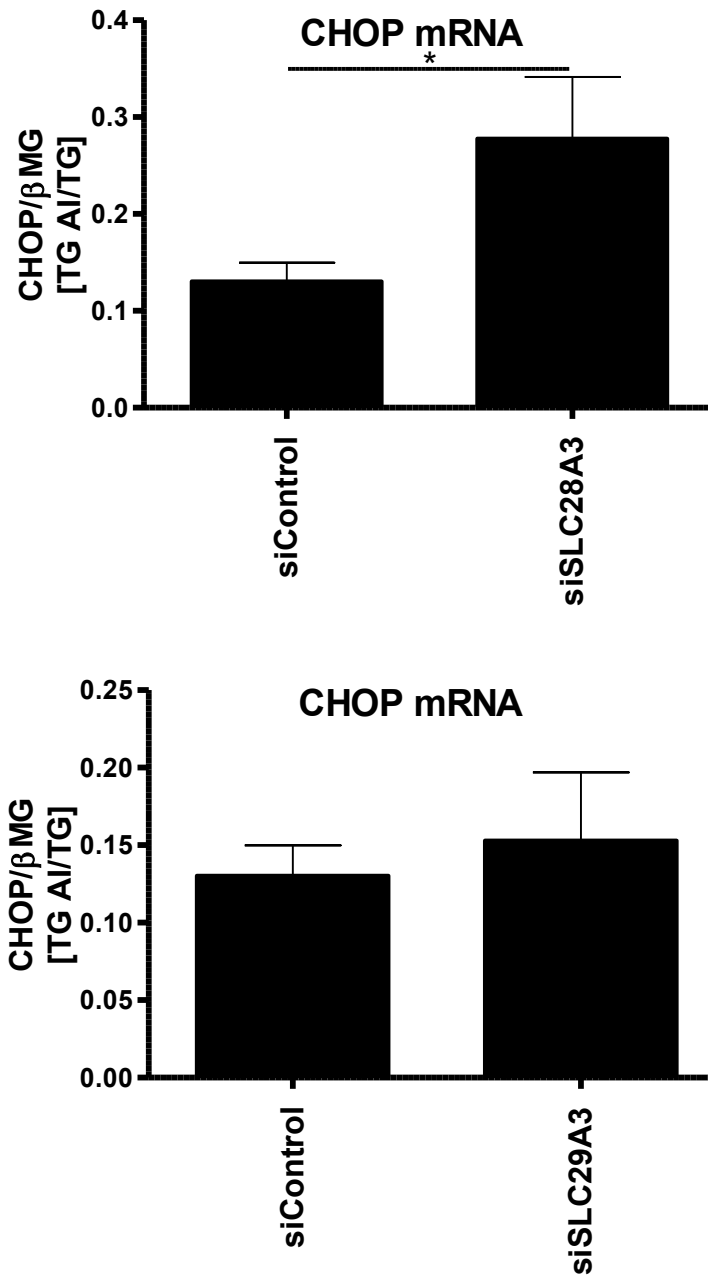


Abbildung 47: Der Knockdown von SLC28A3 verminderte den ER-Stress reduzierenden Effekt von AICAR, während SLC29A3 keinen Einfluss hatte. Primäre humane Makrophagen wurden mit 50 nM Kontroll- oder SLC28A3- bzw. SLC29A3-siRNA transfiziert und nach zwei Tagen zunächst mit 500 μ M AICAR vorstimuliert und dann für 6 h mit 100 nM Thapsigargin stimuliert. Die Analyse der Genexpression erfolgte mittels qPCR. Dargestellt ist der übrig gebliebene Anteil von BiP bzw. CHOP nach Stimulation mit AICAR im Vergleich zur Behandlung mit Thapsigargin allein. *: $p < 0,05$

Abbildung 47 zeigt, welcher Anteil von CHOP mRNA in Thapsigargin stimulierten Makrophagen verblieb, wenn zusätzlich mit AICAR stimuliert wurde. Ein höherer Wert steht also für einen schwächeren Effekt von AICAR. Makrophagen, in denen SLC28A3 reduziert wurde, hatten einen deutlich erhöhten verbleibenden Rest von CHOP mRNA. Im Gegensatz dazu konnte trotz des nahezu vollständigen *Knockdowns* von SLC29A3 kein Effekt auf die Wirkung von AICAR beobachtet werden. SLC28A3 scheint also der Transporter zu sein, der AICAR hauptsächlich aufnimmt, während SLC29A3 nicht benötigt wird.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass AICAR unabhängig von AMPK den ER-Stress in primären Makrophagen reduzieren konnte. AICAR wurde mittels SLC28A3 in die Zelle aufgenommen und wirkte dort als AICAR selbst und nicht in seiner phosphorylierten Form ZMP. Während ein Einfluss auf den PERK-Zweig der ER-Stress-Antwort ausgeschlossen werden konnte, war ein deutlicher Effekt auf den IRE1 α -Zweig zu beobachten. Mangels eines aussagekräftigen Antikörpers gegen ATF6 konnten keine Aussagen über diesen Zweig der ER-Stress-Antwort getroffen werden. Wie genau AICAR auf IRE1 α wirkt, blieb offen und damit Ziel weiterer Untersuchungen.

4 Diskussion

4.1 FABP4 aktiviert PPAR γ

Die Rolle von FABP4 in der Entwicklung des metabolischen Syndroms und Arteriosklerose wurde schon intensiv in Mausmodellen erforscht. Über die Rolle von FABP4 in humanen Makrophagen ist hingegen wesentlich weniger bekannt. Insbesondere gibt es widersprüchliche Daten über den Einfluss von FABP4 auf den Transkriptionsfaktor PPAR γ . Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern FABP4 einen Einfluss auf die Aktivität von PPAR γ in IL-4-polarisierten Makrophagen während der Differenzierung hat. Hierzu wurden pharmakologische Inhibitoren, aber auch siRNA gegen FABP4 genutzt.

In ersten Publikationen über die Interaktion von FABP4 und PPAR γ wurde gezeigt, dass FABP4 die PPAR γ -Aktivität unterstützt. Die Gruppe von Noa Noy beobachtete zuerst einen Zusammenhang zwischen FABP4 und einer gesteigerten PPAR γ -Aktivität (61). Ayers et al. konnten zeigen, dass FABP4 nach Ligandenbindung eine Konformationsänderung vollzieht und mit Ligand in den Zellkern transloziert und so die Transkription durch PPAR γ fördert. Ohne Liganden wurde FABP4 aus dem Zellkern exportiert (49). Die Ergebnisse dieser Arbeit basierend auf einem PPAR-Reporter-System unterstützen diese Beobachtungen (Abbildung 14). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von FABP4 die PPAR γ -Aktivität senkte (Abbildung 14). All diese Daten sprechen dafür, dass FABP4 die Aktivität von PPAR γ unterstützt.

Im Gegensatz zu diesen Publikationen steht die Arbeit der Gruppe von Menachem Rubinstein. Diese beobachteten, dass FABP4 die Degradation von PPAR γ fördert, indem es seine Ubiquitinierung induziert (51). Dadurch erklärten sie die negativen Effekte von FABP4 auf die Insulinresistenz. Die Daten dieser Arbeit implizieren das Gegenteil. Die FABP4-Inhibition reduzierte die PPAR γ -abhängige Genexpression und damit unter anderem auch die Expression von FABP4. Trotzdem hatte diese geringere FABP4-Konzentration keinen Einfluss auf die PPAR γ -Expression in sich ausdifferenzierenden Makrophagen. Dies schließt zwar nicht aus, dass mittels FABP4 die Ubiquitinierung von PPAR γ induziert wird, aber vermutlich induziert FABP4 die Degradation von PPAR γ nur bei sehr hohen Konzentrationen. Zu Beginn der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen mit gleichzeitiger IL-4-Stimulation ist die FABP4-Proteinkonzentration zunächst gering. Bei dieser eher geringen Konzentration steigert FABP4 klar die Aktivität von PPAR γ .

PPAR γ reguliert hauptsächlich Gene, die den Lipidstoffwechsel betreffen (15). Zu den Zielgenen gehören insbesondere CD36 und LPL. Tontonoz et al. zeigten hier im Besonderen, dass CD36 nach PPAR γ -Stimulation stärker exprimiert wird (137). Dieser Zusammenhang konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Die Inhibition von PPAR γ durch den Antagonisten GW9662 hatte keinen Effekt auf die CD36-Expression (Abbildung 11). Möglicherweise ist CD36 zwar ein Zielgen von PPAR γ , wird aber in IL-4-polarisierten Makrophagen hauptsächlich durch andere Mechanismen positiv reguliert. Insofern könnte die Inhibition von PPAR γ nicht ausreichend gewesen sein, um die Expression von CD36 deutlich zu senken. Im Gegensatz dazu war die Expression von LPL, wie auch die von FABP4, eindeutig von PPAR γ abhängig, was die FABP4-Inhibition (Abbildung 15) und der PPAR γ -Antagonismus deutlich zeigten (Abbildung 11).

LPL ist für die VLDL-induzierte Fettsäureaufnahme, TG-Akkumulierung und die dadurch ausgelöste Entzündungsantwort verantwortlich (138). Deshalb waren der TG-Gehalt und auch die Entzündungsantwort der Makrophagen nach VLDL-Stimulation von besonderem Interesse. Es zeigte sich, dass der TG-Gehalt von Makrophagen nach VLDL-Stimulation in IL-4-polarisierten Makrophagen deutlich höher war als in nicht polarisierten oder LPS/IFN γ -polarisierten Makrophagen (Abbildung 13). Interessanterweise konnte durch die Inhibition von PPAR γ während der IL-4-Polarisation mit GW9662 der TG-Gehalt von Makrophagen auf das Niveau von LPS/IFN γ -polarisierten Makrophagen abgesenkt werden. PPAR γ spielt also eine zentrale Rolle in der Ausbildung des Lipide akkumulierenden Phänotyps von IL-4-polarisierten Makrophagen. Gleichzeitig konnte auch die Rolle von LPL in der Bildung von TG-reichen Schaumzellen bestätigt werden, da durch die Inhibition von Lipasen mit Orlistat der TG-Gehalt nach VLDL-Stimulation auf dem Niveau unstimulierten Makrophagen war (Abbildung 13). Ebenso korrelierte die LPL-Expression mit aufgenommenen Menge von Triglyceriden in den Makrophagen. Der Lipide akkumulierende Phänotyp von IL-4-polarisierten Makrophagen ist also nicht nur auf die Expression von Rezeptoren wie SR-A1 (*scavenger receptor-A1*) oder CD36, die für die Aufnahme von Lipiden aus der Zellumgebung verantwortlich sind, zurückzuführen (139), sondern insbesondere auch auf die LPL-Expression.

Interessanterweise induziert IL-4 die PPAR γ -abhängige Genexpression, vermindert aber gleichzeitig die Expression von LXR α (Leber-X-Rezeptor α) und seiner Zielgene ApoE (Apolipoprotein E) oder ABCA1 (ABC-Transporter A1) in IL-4-polarisierten Makrophagen (124). Deshalb wurden auch diese Gene nach FABP4-Inhibition analysiert. Die ursprüngliche Beobachtung, dass IL-4 die LXR α -abhängige Genexpression vermindert, konnte bestätigt werden (Abbildung 19). Entgegen den Erwartungen wurde die Expression dieser Gene durch die FABP4-Inhibition noch deutlich weiter abgesenkt. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für den ABC-Transporter ABCG1 (ABC-Transporter G1) beobachtet (Abbildung 19). Der Zusammenhang zwischen FABP4-Inhibition und der Expression dieser für den Cholesterinstoffwechsel wichtigen Proteine scheint deutlich komplexer zu sein. Es wurde auch postuliert, dass ABCG1 die Aktivität von LPL fördert, indem es den Cholesteringehalt von *lipid rafts* in der Zelloberfläche reguliert (140). Dieser Mechanismus ist in dem Zellkultursystem dieser Arbeit aber vermutlich von geringer Bedeutung, da durch die IL-4-Stimulation das Niveau von ABCG1 bereits sehr niedrig ist (Abbildung 19).

Die niedrigere Expression von LPL nach FABP4-Inhibition korrelierte mit einer verringerten TG-reichen Schaumzellbildung nach VLDL-Stimulation. Vorherige Studien, die den anti-arteriosklerotischen Effekt von FABP4-Inhibitoren zeigten, führten dies auf eine verminderte Ausschüttung von entzündungsfördernden Zytokinen und eine verminderte Ansammlung von Cholesterinestern nach acLDL-Stimulation (acetyliertes LDL) zurück (70). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die FABP4-Inhibition die LXR-Aktivität erhöht. Dies führe zu einem verstärkten Efflux von Cholesterin und dämpfe den durch gesättigte Fettsäuren induzierten ER-Stress (141). Während diese Studien hauptsächlich im Maussystem und in der humanen Zelllinie THP-1 durchgeführt wurden sind, unterstützen die Daten dieser Arbeit die Theorie, dass die Inhibition von FABP4 hauptsächlich die TG-reiche Schaumzellbildung verhindert. Zusätzlich war auch die Entzündungsantwort auf VLDL-Partikel geschwächt (Abbildung 23). Wenn bedacht wird, dass TG-reiche Lipoproteine immer mehr als Risikofaktor für Arteriosklerose angesehen werden und die anti-arteriosklerotische Strategie bisher auf die Verhinderung der Lipidakkumulation aus VLDL-Partikeln durch PPAR δ -Aktivierung zielte, könnte die Verwendung von FABP4-Inhibitoren ein interessantes Ziel für die Behandlung von Arteriosklerose darstellen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die FABP4-Inhibition zumindest in Mäusen auch die Folgen von starkem Übergewicht abmildert (70).

Indes ist unbekannt, ob die Regulation der LPL-Expression durch FABP4 in Makrophagen im Fettgewebe von Relevanz ist. Der *Knockdown* von LPL in Makrophagen des Fettgewebes reduzierte zwar den Lipidgehalt der Makrophagen, erhöhte aber die Menge an zirkulierenden freien Fettsäuren. Gleichzeitig war auch die Glucosetoleranz von Mäusen, die mit einer Hochfettdiät gefüttert worden waren, reduziert (142). Dieser Phänotyp widerspricht dem der FABP4-Inhibition, der mit einer verbesserten Glucosetoleranz einhergeht (70). Interessanterweise wurde durch das Ausschalten von LPL auch die Menge an zirkulierendem FABP4 erhöht, was mit der Regulation der hepatischen Glucoseproduktion in Zusammenhang gebracht wurde (142, 143). Die Inhibition von FABP4 könnte demzufolge den Einfluss der verminderten LPL-Expression im Fettgewebe ausgleichen.

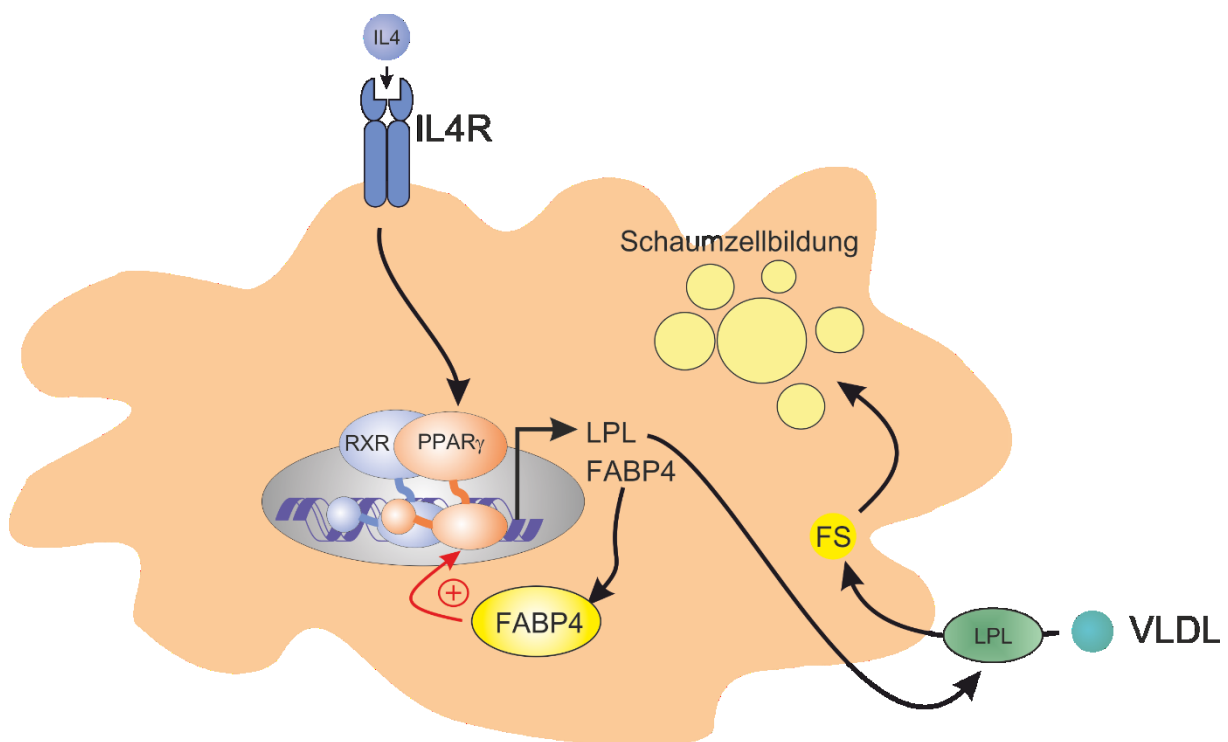


Abbildung 48: Übersicht über die Rolle von FABP4 in der Regulation der LPL-Expression. Nach IL-4-Stimulation wird die Expression von PPAR γ erhöht. Durch die erhöhte Expression steigt auch die Expression der Zielgene LPL und FABP4. LPL wiederum hydrolysiert Fettsäuren (FS) aus VLDL-Partikeln, die von den Makrophagen aufgenommen werden. Diese werden eingelagert und führen zur Schaumzellbildung. FABP4 unterstützt diesen Effekt, indem es die Aktivität von PPAR γ erhöht und dadurch mittels einer positiven Rückkopplung die Expression von sich selbst und LPL induziert.

Abbildung 48 zeigt eine Übersicht über die Zusammenhänge von FABP4, PPAR γ und LPL. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Verständnis der Entstehung und des Fortschreitens von Arteriosklerose im menschlichen System verbessert wurde. Es wurde ein weiterer Mechanismus der Entstehung von TG-reichen Schaumzellen durch IL-4-polarisierte Makrophagen beschrieben und eine Therapiemöglichkeit durch die Inhibition von FABP4 aufgezeigt.

4.2 Hypoxie und Palmitat behandelte Makrophagen schütten Zytokine aus, die eine Entzündungsantwort in Adipozyten auslösen

Ryan Snodgrass konnte zeigen, dass Hypoxie den Entzündungen auslösenden Effekt von Palmitat in Makrophagen verstärkt (126). Hierbei konnte unter anderem beobachtet werden, dass die Ausschüttung von proentzündlichen Zytokinen wie IL-1 β oder IL-6 nach Stimulation mit Palmitat durch Hypoxie verstärkt wird. Diesen Zytokinen wird eine Rolle in der Induktion der Insulinresistenz in Adipozyten zugesprochen (144, 145). Die Expression von TNF α wurde hingegen nicht durch Hypoxie verstärkt. Die Expression von IL-8 wurde nur auf mRNA-Ebene von Hypoxie verstärkt (126).

Adipozyten sind nicht nur Fettspeicherorgane, sondern sekretieren zahlreiche Faktoren, um mit dem Rest des Organismus zu kommunizieren. Hierzu gehören Faktoren wie Adiponectin, das dämpfend auf Immunantworten wirkt, sowie auch CCL2, das proinflammatorisch wirkt (128, 129). CCL2 lockt hierbei nicht nur Monozyten an, sondern verstärkt auch die Proliferation von ATM (Fettgewebsmakrophagen). Dadurch wird auch die lokale Entzündungsreaktion im Fettgewebe, die durch Fettsucht entsteht, verstärkt (146).

Konditionierte Medien von Makrophagen, die mit Palmitat unter Hypoxie stimuliert worden waren, lösten keine Insulinresistenz in den Adipozyten aus (Abbildung 27). Als Kontrolle dienten hier auch Überstände von THP-1-Makrophagen, die mit TPA differenziert worden waren. Überstände von THP-1-Makrophagen waren in der Lage, eine Insulinresistenz in Adipozyten zu induzieren. TPA ist aber ein solch starker proinflammatorischer Stimulus, dass bereits die Differenzierung der Makrophagen mit TPA an sich ausreichend war, eine Insulinresistenz in den Adipozyten durch MCM-Transfer auszulösen. Da TPA notwendig ist, um die Monozyten zu Makrophagen zu differenzieren, wurde die Arbeit mit der THP-1-Zelllinie nicht fortgesetzt. Der starke Effekt von MCM von THP-1-Makrophagen konnte bereits in anderen Studien gezeigt werden (147). Eine mögliche Erklärung für den fehlenden Effekt von MCM: H-PA könnte darin liegen, dass der Stimulus von Hypoxie und Palmitat nicht stark genug war, um eine ausreichende Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine zu induzieren.

Dafür konnte aber abhängig von der Stimulation der Makrophagen eine verminderte Expression von Adiponectin sowie eine höhere Expression von IL-6 und MCP-1 beobachtet werden. Diese Unterschiede sind von Bedeutung, da eine veränderte Produktion von IL-6 und Adiponectin die Insulinsensitivität in der Leber negativ beeinflusst und gleichzeitig auch die Fettsäureoxidation in Leber und der Skelettmuskulatur einschränken kann (148). Durch die verminderte Expression von Adiponectin wird die immunregulatorische Funktion der Adipozyten eingeschränkt während gleichzeitig durch die gesteigerte Expression von CCL2 weitere Monozyten angelockt werden (129, 149). CCL2 kann ebenfalls die Proliferation von Makrophagen im Fettgewebe steigern und die Entzündungsreaktion des Fettgewebes verstärken (146). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Entzündung des Fettgewebes eine entscheidende Rolle in der Entwicklung des Diabetes mellitus Typ 2 spielt (82, 150). Eine Übersicht über dieses Zusammenspiel ist in Abbildung 49 dargestellt.

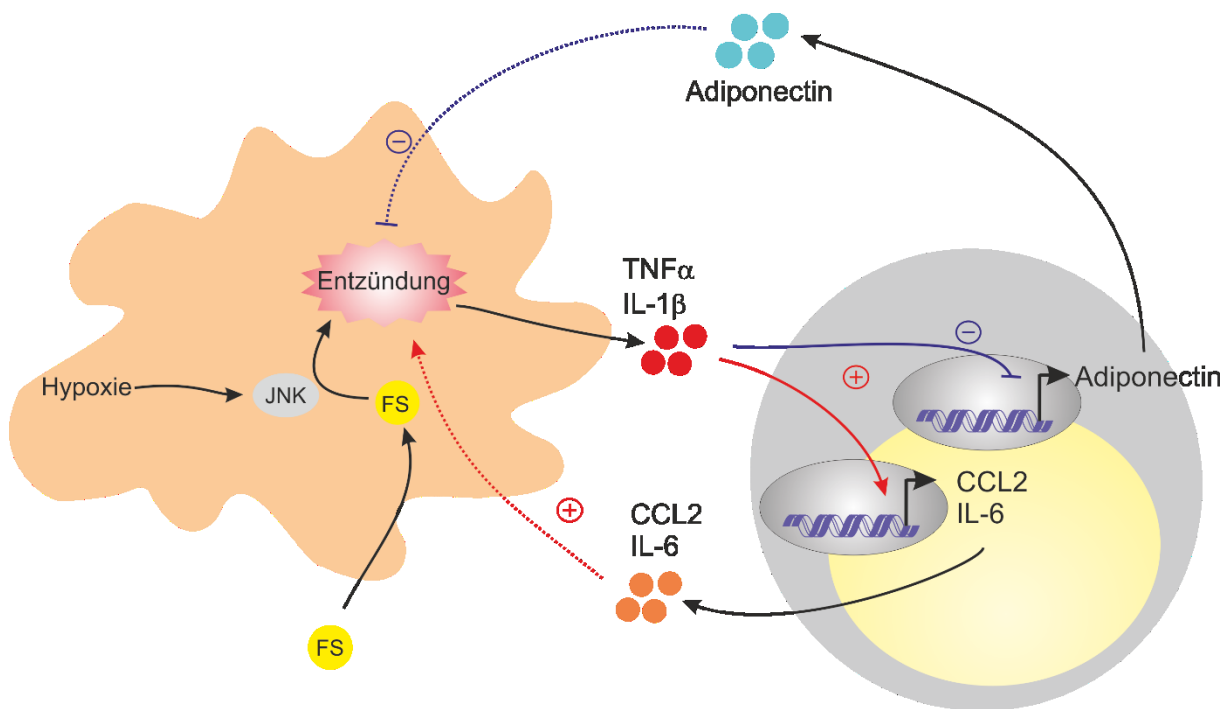


Abbildung 49: Hypoxie und Fettsäuren lösen eine Entzündungsreaktion in Makrophagen aus. Fettsäuren (FS) induzieren eine Entzündungsreaktion im Makrophagen (orange, links). Diese Entzündungsreaktion wird bei Hypoxie mittels eines JNK-abhängigen Mechanismus verstärkt. Dies führt zur Sekretion von Entzündungsmediatoren wie TNF α oder IL-1 β , die im Adipozyten (grau/gelb, rechts) eine leichte Entzündungsreaktion auslösen. Diese äußert sich in einer verminderten Expression des anti-entzündlichen Adipokins Adiponectin und in einer verstärkten Expression der pro-entzündlichen Zytokine CCL2 und IL-6. Dies verstärkt wiederum die Entzündungsreaktion im Makrophagen, wodurch ein sich selbst verstärkender Kreislauf entsteht.

Durch diese Arbeit wurde das Verständnis in der Entstehung dieser Entzündungsreaktion weiter beleuchtet. Es konnte gezeigt werden, dass Hypoxie und gesättigte Fettsäuren, wie sie im Fettgewebe stark übergewichtiger Menschen vorhanden sind, sich gegenseitig potenzieren und eine Entzündungsreaktion im Fettgewebe einleiten. Die Daten, die mit diesem Modell generiert wurden, stellen somit ein System dar, welches es ermöglicht, die Vorgänge im Fettgewebe zu Beginn der Insulinresistenz zu verstehen.

4.3 AICAR reduziert deutlich Entzündungsreaktionen und ER-Stress in primären humanen Makrophagen

AICAR ist hauptsächlich als AMPK-Aktivator bekannt (151). Es wurden auch weitere Effekte beschrieben, wie z. B. insbesondere ein Zusammenhang von AMPK-Aktivierung durch AICAR und eine verminderte ER-Stress-Antwort (152). Interessanterweise wurde aber in dieser Studie von Terai et al. weder ein anderer AMPK-Aktivator noch ein *Knockdown* von AMPK gezeigt. Ein Screen verschiedener AMPK-Aktivatoren in dieser Arbeit (Abbildung 32) offenbarte eine große Varianz zwischen den verschiedenen AMPK-Aktivatoren trotz gleich bleibender AMPK-Aktivierung. Eine Rolle von AMPK für die Hemmung der ER-Stress-Antwort erschien damit unwahrscheinlich. Dies entspricht auch den Ergebnissen einer Studie von Yang et al., die zeigten, dass Phenformin AMPK-abhängig die UPR verstärkt (153). AICAR aktivierte die UPR hingegen nicht (Abbildung 37).

Die ER-Stress-Antwort besteht aus drei Zweigen: ATF6, PERK und IRE1 (104). Ein Einfluss auf ATF6 konnte nicht untersucht werden, da es mangels geeigneter Antikörper nicht gelang, ATF6 in primären humanen Makrophagen nachzuweisen. Aktuell gibt es keine Publikationen, die ATF6 mit AMPK oder AICAR in Verbindung bringen. Dies macht es unwahrscheinlich aber nicht unmöglich, dass AICAR auf ATF6 wirkt bzw. für die Wirkung von AICAR notwendig ist.

AICAR hatte keinen Einfluss auf den PERK-Signalweg. In dieser Arbeit wurde die Phosphorylierungen von eIF2 α und PERK untersucht. AICAR hatte auf beides keinen Einfluss (Abbildung 37). D. h., obwohl AICAR offensichtlich den ER-Stress reduzierte, geschah dies ohne Einfluss auf den PERK-eIF2 α -Signalweg. Versuche bei niedrigeren Konzentrationen von Thapsigargin (10 nM anstatt von 100 nM; Daten nicht gezeigt) erhöhten im Gegenteil sogar die Phosphorylierung von eIF2 α . Dieser Effekt wurde bereits in einer Publikation von Hong et al. beobachtet (154). Diese Daten lassen die Interpretation zu, dass AICAR durch die Aktivierung von eIF2 α die Last des ERs senkt. Da dieser Effekt bei höheren Konzentrationen von Thapsigargin oder bei Tunicamycin nicht zu beobachten war, ist ein Einfluss von AICAR auf die PERK-eIF2 α -Achse unwahrscheinlich.

Übrig blieb nur noch der IRE1 α -Zweig der UPR. Hier zeigte sich der Einfluss von AICAR am deutlichsten. Es konnte eine nahezu komplette Reduktion der IRE1 α -Phosphorylierung an S724 beobachtet werden. Diese Phosphorylierung ist ein Zeichen für die Aktivierung von IRE1 α im Zuge der UPR. Gleichzeitig wurde auch die gespleißte Form von XBP-1 fast nicht mehr exprimiert. XBP-1 wird nur exprimiert, wenn die mRNA, die für XBP-1 kodiert, von IRE1 α gespleißt wird. Hierfür muss IRE1 α einen Homodimer bilden und autophosphoryliert werden (104).

Die Daten dieser Arbeit zeigten, dass AICAR zum einen die Expression der gespleißten Form von XBP-1 sowie seiner Zielgene unterdrückt. Gleichzeitig konnte auch eine Verminderung der Phosphorylierung von IRE1 α beobachtet werden. Dies spricht dafür, dass AICAR entweder auf der Ebene der Autophosphorylierung oder davor wirkt. Zunächst wurde untersucht, ob AICAR extrazellulär wirkt.

Über AICAR wurde berichtet, dass es die Ausschüttung von Adenosin aus Zellen induziert. Dieses ausgeschüttete Adenosin wirkt dann antientzündlich (155). Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde untersucht, ob Adenosin bzw. die Benutzung eines Adenosin-Rezeptor-Agonisten (NECA) den Effekt von AICAR imitieren konnte. Dies war aber nicht der Fall (Abbildung 42). Auch ein Antagonist des Adenosinrezeptors (CGS-15943) konnte den AICAR-Effekt nicht verhindern. So konnte ein Zusammenhang von Adenosinsignalwegen und AICAR auf die ER-Stress-Antwort ausgeschlossen werden.

Der Ausschluss von Adenosinsignalwegen machte es wahrscheinlicher, dass AICAR intrazellulär wirkt. Dazu muss es in die Zelle aufgenommen werden. Außerdem wird es anschließend in der Zelle von der Adenosinkinase zu ZMP phosphoryliert (103). Diese Kinase konnte durch den Inhibitor ABT-702 erfolgreich gehemmt werden, wie sich in der verminderten AMPK-Aktivität zeigte (Abbildung 39). Interessanterweise konnte durch die Inhibition nicht nur gezeigt werden, dass AMPK für den AICAR-Effekt nicht notwendig ist, sondern auch, dass AICAR und nicht ZMP den reduzierenden Effekt auf die UPR auslöst. Der Effekt von AICAR war stärker, wenn die Adenosinkinase inhibiert war (Abbildung 39). In einer Arbeit über Metformin in Nierenzellen wurde ebenfalls gezeigt, dass dieser AMPK-Aktivator die UPR unabhängig von AMPK hemmt. Gleichzeitig berichtete diese Gruppe über große Schwierigkeiten, den Effekt von Metformin in anderen Zelllinien bzw. Zelltypen nachzuvollziehen (156). Ähnliche Schwierigkeiten wurden auch im Rahmen dieser Arbeit beobachtet. In keiner anderen Zelllinie außer primären Makrophagen konnte ein ähnlicher Effekt von AICAR beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Generell war es auch schwierig, mit AICAR AMPK zu aktivieren, was sich in einer fehlenden ACC-Phosphorylierung zeigte (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde exemplarisch die Expression von Nukleosidtransportern zwischen primären Makrophagen und THP-1-Zellen verglichen. Hierbei stellte sich heraus, dass die Nukleosidtransporter SLC28A3 und SLC29A3 in primären Makrophagen deutlich stärker exprimiert waren. Ein *Knockdown* von SLC28A3 zeigte, dass der Effekt von AICAR abhängig von SLC28A3 war (Abbildung 47).

Die bisherigen Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen. AICAR wird mittels SLC28A3 in Makrophagen aufgenommen und wirkt dort direkt und unabhängig von AMPK auf die UPR. Hier scheint AICAR und nicht ZMP mittels eines bisher unbekanntes Mechanismus die Aktivierung von IRE1 α zu verhindern. Ein Effekt auf PERK konnte ausgeschlossen werden, während ATF6 nicht untersucht werden konnte. Als mögliche Mechanismen von AICAR auf IRE1 α kommen folgende Möglichkeiten in Betracht: AICAR könnte die Dimerisierung von IRE1 α verhindern, die Dissoziation von BiP erschweren oder die Autophosphorylierung von IRE1 α erschweren. Dies wird in Abbildung 50 zusammengefasst.

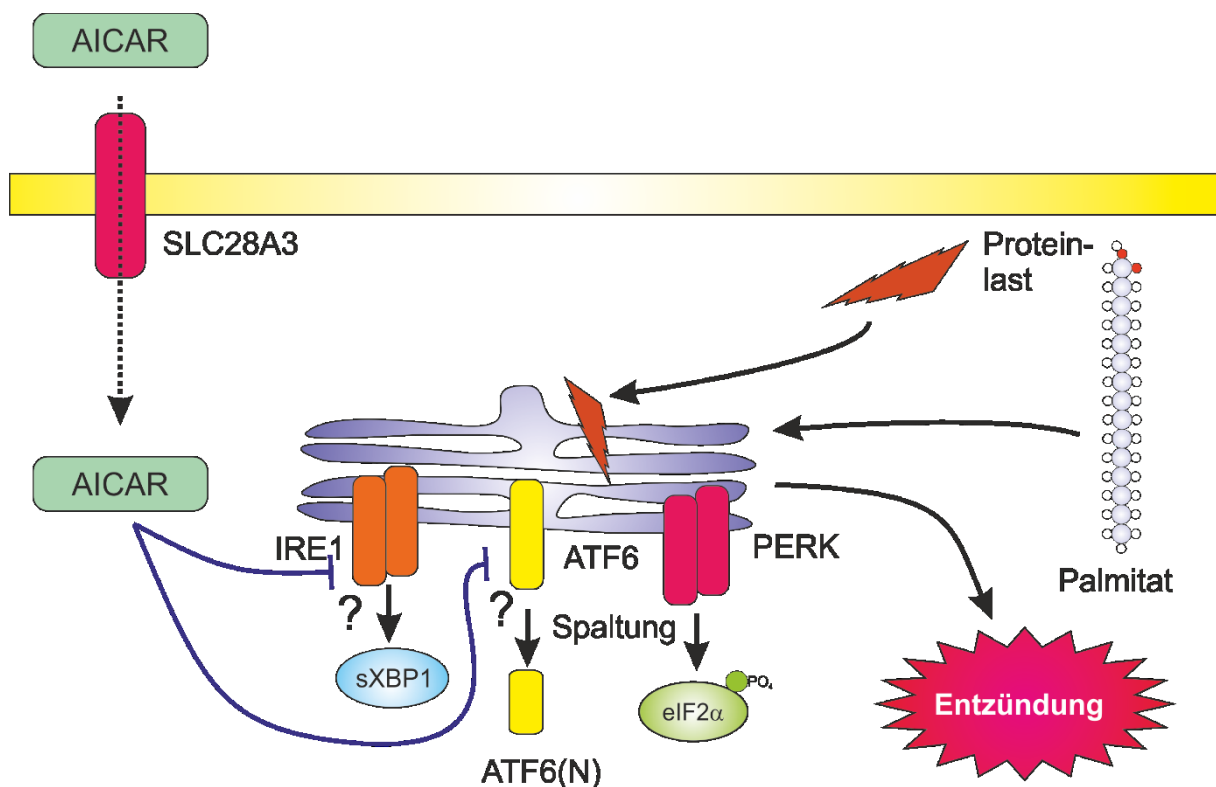


Abbildung 50: Übersicht über die Wirkung von AICAR auf die ER-Stress-Antwort. ER-Stress kann durch eine erhöhte Proteinlast oder auch durch gesättigte Fettsäuren wie z.B. Palmitat ausgelöst werden und induziert bei fortlaufender Aktivierung eine Entzündungsreaktion. AICAR wird in primäre humane Makrophagen durch den Nucleosidtransporter SLC28A3 aufgenommen. Dort inhibiert es IRE1, wodurch die die RNA von XBP-1 nicht mehr gespleißt wird und die ER-Stress-Antwort gedämpft wird. Die Wirkung auf ATF6, das bei ER-Stress gespalten wird, ist unklar, während eine Wirkung auf PERK ausgeschlossen werden konnte.

Die Reduktion von ER-Stress bzw. der UPR/ER-Stress-Antwort ist therapeutisch von größtem Interesse. Die Aktivierung der UPR kann nicht nur Apoptose auslösen, sondern auch eine Entzündungsreaktion starten (130). Diese Entzündungsreaktionen spielen eine wesentliche Rolle in der Bildung der Insulinresistenz und auch der Arteriosklerose (141, 130). Im Rahmen dieser Arbeit konnte also ein neuer möglicher Ansatz, um ER-Stress in humanen Makrophagen zu verringern, gefunden werden. Dies ist besonders interessant im Hinblick auf Arteriosklerose, wo Makrophagen in den arteriosklerotischen Plaques unter ER-Stress leiden und eine Entzündungsreaktion auslösen.

4.4 Ausblick

Während die Auswirkungen der FABP4-Inhibition auf die PPAR γ -abhängige Genexpression weitgehend geklärt werden konnten, ist weiterhin unklar, wie FABP4 PPAR γ aktivieren kann. Eine Vermutung ist, dass FABP4 Liganden für PPAR γ transportiert. Je mehr FABP4 vorhanden ist, desto leichter und schneller könnten Liganden PPAR γ zur Verfügung gestellt werden. Interessant wäre herauszufinden, welche Liganden genau von FABP4 zu PPAR γ transportiert werden.

Der Effekt von AICAR auf die UPR wurde ausgiebig untersucht und es konnte überzeugend gezeigt werden, dass AICAR die UPR unabhängig von AMPK hemmt. Ungeklärt ist aber weiterhin, wie genau AICAR auf IRE1 α wirkt. Zur Untersuchung der Dimerisierung könnten Quervernetzungsexperimente durchgeführt werden. Die Dissoziation von BiP von IRE1 α könnte mittels Co-IP-Versuchen untersucht werden. Ebenso sollte getestet werden, ob AICAR die Spleißfunktion von IRE1 α inhibiert. Weiterhin unklar ist auch, ob AICAR einen Effekt auf ATF6 hat. Hier könnten weitere Antikörper ausprobiert werden.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Boß, Marcel; Kemmerer, Marina; Brüne, Bernhard; Namgaladze, Dmitry (2015): FABP4 inhibition suppresses PPAR γ activity and VLDL-induced foam cell formation in IL-4-polarized human macrophages. *Atherosclerosis* 240 (2), S. 424–430.

Snodgrass, Ryan Glenn; Boß, Marcel; Brüne, Bernhard; Namgaladze, Dmitry: Hypoxia Potentiates Palmitate-Induced Pro-inflammatory Activation of Primary Human Macrophages. *J Biol Chem* in revision: JBC/2015/640243.

5 Referenzen

1. (2014) *Global status report on noncommunicable diseases 2014*, Genf, Schweiz
2. Libby, P., Ridker, P. M., and Hansson, G. K. (2011) Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* **473**, 317–325
3. Weber, C., and Noels, H. (2011) Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nature medicine* **17**, 1410–1422
4. Ray, K. K., and Cannon, C. P. (2005) The potential relevance of the multiple lipid-independent (pleiotropic) effects of statins in the management of acute coronary syndromes. *J. Am. Coll. Cardiol.* **46**, 1425–1433
5. Nissen, S. E. (2005) Effect of intensive lipid lowering on progression of coronary atherosclerosis: evidence for an early benefit from the Reversal of Atherosclerosis with Aggressive Lipid Lowering (REVERSAL) trial. *Am. J. Cardiol.* **96**, 61F-68F
6. Ridker, P. M., Danielson, E., Fonseca, F. A. H., Genest, J., Gotto, A. M., Kastelein, J. J. P., Koenig, W., Libby, P., Lorenzatti, A. J., MacFadyen, J. G., Nordestgaard, B. G., Shepherd, J., Willerson, J. T., and Glynn, R. J. (2009) Reduction in C-reactive protein and LDL cholesterol and cardiovascular event rates after initiation of rosuvastatin: A prospective study of the JUPITER trial. *The Lancet* **373**, 1175–1182
7. Taylor, A. J., Villines, T. C., Stanek, E. J., Devine, P. J., Griffen, L., Miller, M., Weissman, N. J., and Turco, M. (2009) Extended-release niacin or ezetimibe and carotid intima-media thickness. *N. Engl. J. Med.* **361**, 2113–2122
8. Lukasova, M., Malaval, C., Gille, A., Kero, J., and Offermanns, S. (2011) Nicotinic acid inhibits progression of atherosclerosis in mice through its receptor GPR109A expressed by immune cells. *J. Clin. Invest.* **121**, 1163–1173
9. Wallentin, L., Becker, R. C., Budaj, A., Cannon, C. P., Emanuelsson, H., Held, C., Horrow, J., Husted, S., James, S., Katus, H., Mahaffey, K. W., Scirica, B. M., Skene, A., Steg, P. G., Storey, R. F., Harrington, R. A., Freij, A., and Thorsén, M. (2009) Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N. Engl. J. Med.* **361**, 1045–1057
10. Hundelshausen, P. von, and Weber, C. (2007) Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res* **100**, 27–40
11. Sipahi, I., Tuzcu, E. M., Wolski, K. E., Nicholls, S. J., Schoenhagen, P., Hu, B., Balog, C., Shishehbor, M., Magyar, W. A., Crowe, T. D., Kapadia, S., and Nissen, S. E. (2007) Beta-blockers and progression of coronary atherosclerosis: pooled analysis of 4 intravascular ultrasonography trials. *Ann Intern Med* **147**, 10–18

12. Yusuf, S., Teo, K. K., Pogue, J., Dyal, L., Copland, I., Schumacher, H., Dagenais, G., Sleight, P., and Anderson, C. (2008) Telmisartan, ramipril, or both in patients at high risk for vascular events. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1547–1559
13. Ahmadian, M., Suh, J. M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A. R., Downes, M., and Evans, R. M. (2013) PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nature medicine* **19**, 557–566
14. Schulman, I. G., Shao, G., and Heyman, R. A. (1998) Transactivation by retinoid X receptor- peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimers: intermolecular synergy requires only the PPARgamma hormone-dependent activation function. *Molecular and cellular biology* **18**, 3483–3494
15. Poulsen, Lars la Cour, Siersbæk, M., and Mandrup, S. (2012) PPARs: fatty acid sensors controlling metabolism. *Seminars in cell & developmental biology* **23**, 631–639
16. Li, A. C., Binder, C. J., Gutierrez, A., Brown, K. K., Plotkin, C. R., Pattison, J. W., Valledor, A. F., Davis, R. A., Willson, T. M., Witztum, J. L., Palinski, W., and Glass, C. K. (2004) Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPARalpha, beta/delta, and gamma. *The Journal of clinical investigation* **114**, 1564–1576
17. Bouhrel, M. A., Derudas, B., Rigamonti, E., Dievart, R., Brozek, J., Haulon, S., Zawadzki, C., Jude, B., Torpier, G., Marx, N., Staels, B., and Chinetti-Gbaguidi, G. (2007) PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell metabolism* **6**, 137–143
18. Von Knethen, A. A., and Brune, B. (2001) Delayed activation of PPARgamma by LPS and IFN-gamma attenuates the oxidative burst in macrophages. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **15**, 535–544
19. Chandra, V., Huang, P., Hamuro, Y., Raghuram, S., Wang, Y., Burris, T. P., and Rastinejad, F. (2008) Structure of the intact PPAR-gamma-RXR- nuclear receptor complex on DNA. *Nature* **456**, 350–356
20. Rochel, N., Ciesielski, F., Godet, J., Moman, E., Roessle, M., Peluso-Iltis, C., Moulin, M., Haertlein, M., Callow, P., Mély, Y., Svergun, D. I., and Moras, D. (2011) Common architecture of nuclear receptor heterodimers on DNA direct repeat elements with different spacings. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 564–570
21. Grygiel-Górniak, B. (2014) Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review. *Nutr J* **13**, 17
22. Rao, M. S., Papreddy, K., Musunuri, S., and Okonkwo, A. (2002) Prevention/reversal of choline deficiency-induced steatohepatitis by a peroxisome proliferator-activated receptor alpha ligand in rats. *In Vivo* **16**, 145–152

23. Sethi, S., Ziouzenkova, O., Ni, H., Wagner, D. D., Plutzky, J., and Mayadas, T. N. (2002) Oxidized omega-3 fatty acids in fish oil inhibit leukocyte-endothelial interactions through activation of PPAR alpha. *Blood* **100**, 1340–1346
24. Nakajima, T., Kamijo, Y., Tanaka, N., Sugiyama, E., Tanaka, E., Kiyosawa, K., Fukushima, Y., Peters, J. M., Gonzalez, F. J., and Aoyama, T. (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha protects against alcohol-induced liver damage. *Hepatology* **40**, 972–980
25. Wang, Y.-X., Lee, C.-H., Tiep, S., Yu, R. T., Ham, J., Kang, H., and Evans, R. M. (2003) Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor δ Activates Fat Metabolism to Prevent Obesity. *Cell* **113**, 159–170
26. Odegaard, J. I., Ricardo-Gonzalez, R. R., Goforth, M. H., Morel, C. R., Subramanian, V., Mukundan, L., Red Eagle, A., Vats, D., Brombacher, F., Ferrante, A. W., and Chawla, A. (2007) Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* **447**, 1116–1120
27. Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R. A., Budavari, A. I., and Spiegelman, B. M. (1994) mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes & development* **8**, 1224–1234
28. Iwashita, M., Sakoda, H., Kushiyama, A., Fujishiro, M., Ohno, H., Nakatsu, Y., Fukushima, T., Kumamoto, S., Tsuchiya, Y., Kikuchi, T., Kurihara, H., Akazawa, H., Komuro, I., Kamata, H., Nishimura, F., and Asano, T. (2012) Valsartan, independently of AT1 receptor or PPARgamma, suppresses LPS-induced macrophage activation and improves insulin resistance in cocultured adipocytes. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **302**, E286-96
29. Krey, G., Braissant, O., L'Horsset, F., Kalkhoven, E., Perroud, M., Parker, M. G., and Wahli, W. (1997) Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* **11**, 779–791
30. Harmon, G. S., Lam, M. T., and Glass, C. K. (2011) PPARs and lipid ligands in inflammation and metabolism. *Chemical reviews* **111**, 6321–6340
31. Spiegelman, B. M., Hu, E., Kim, J. B., and Brun, R. (1997) PPAR gamma and the control of adipogenesis. *Biochimie* **79**, 111–112
32. Furuhashi, M., and Hotamisligil, G. S. (2008) Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nature reviews. Drug discovery* **7**, 489–503
33. Feng, J., Han, J., Pearce, S. F., Silverstein, R. L., Gotto, A. M., Jr., Hajjar, D. P., and Nicholson, A. C. (2000) Induction of CD36 expression by oxidized LDL and IL-4 by a common signaling pathway dependent on protein kinase C and PPAR-gamma. *Journal of lipid research* **41**, 688–696

34. Laplante, M., Sell, H., MacNaul, K. L., Richard, D., Berger, J. P., and Deshaies, Y. (2003) PPAR-gamma activation mediates adipose depot-specific effects on gene expression and lipoprotein lipase activity: mechanisms for modulation of postprandial lipemia and differential adipose accretion. *Diabetes* **52**, 291–299
35. Li, Y., He, P. P., Zhang, D. W., Zheng, X. L., Cayabyab, F. S., Yin, W. D., and Tang, C. K. (2014) Lipoprotein lipase: From gene to atherosclerosis. *Atherosclerosis* **237**, 597–608
36. Eisenberg, S., Sehayek, E., Olivecrona, T., and Vlodaysky, I. (1992) Lipoprotein lipase enhances binding of lipoproteins to heparan sulfate on cell surfaces and extracellular matrix. *The Journal of clinical investigation* **90**, 2013–2021
37. Cheng, C. F., Oosta, G. M., Bensadoun, A., and Rosenberg, R. D. (1981) Binding of lipoprotein lipase to endothelial cells in culture. *The Journal of biological chemistry* **256**, 12893–12898
38. Ben-Zeev, O., Mao, H. Z., and Doolittle, M. H. (2002) Maturation of lipoprotein lipase in the endoplasmic reticulum. Concurrent formation of functional dimers and inactive aggregates. *J. Biol. Chem.* **277**, 10727–10738
39. Ylä-Herttuala, S., Lipton, B. A., Rosenfeld, M. E., Goldberg, I. J., Steinberg, D., and Witztum, J. L. (1991) Macrophages and smooth muscle cells express lipoprotein lipase in human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 10143–10147
40. Clee, S. M., Bissada, N., Miao, F., Miao, L., Marais, A. D., Henderson, H. E., Steures, P., McManus, J., McManus, B., LeBoeuf, R. C., Kastelein, J. J., and Hayden, M. R. (2000) Plasma and vessel wall lipoprotein lipase have different roles in atherosclerosis. *Journal of lipid research* **41**, 521–531
41. Tabas, I., Li, Y., Brocia, R. W., Xu, S. W., Swenson, T. L., and Williams, K. J. (1993) Lipoprotein lipase and sphingomyelinase synergistically enhance the association of atherogenic lipoproteins with smooth muscle cells and extracellular matrix. A possible mechanism for low density lipoprotein and lipoprotein(a) retention and macrophage foam cell formation. *The Journal of biological chemistry* **268**, 20419–20432
42. Stollenwerk, M. M., Lindholm, M. W., Pörn-Ares, M. I., Larsson, A., Nilsson, J., and Ares, M. P. S. (2005) Very low-density lipoprotein induces interleukin-1beta expression in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **335**, 603–608
43. Stollenwerk, M. M., Schiopu, A., Fredrikson, G. N., Dichtl, W., Nilsson, J., and Ares, M. P. S. (2005) Very low density lipoprotein potentiates tumor necrosis factor-alpha expression in macrophages. *Atherosclerosis* **179**, 247–254
44. den Hartigh, L. J., Connolly-Rohrbach, J. E., Fore, S., Huser, T. R., and Rutledge, J. C. (2010) Fatty acids from very low-density lipoprotein lipolysis products induce lipid droplet accumulation in human monocytes. *Journal of immunology* **184**, 3927–3936

45. Saraswathi, V., and Hasty, A. H. (2006) The role of lipolysis in mediating the proinflammatory effects of very low density lipoproteins in mouse peritoneal macrophages. *Journal of lipid research* **47**, 1406–1415
46. Coe, N. R., and Bernlohr, D. A. (1998) Physiological properties and functions of intracellular fatty acid-binding proteins. *Biochimica et biophysica acta* **1391**, 287–306
47. Zimmerman, A. W., and Veerkamp, J. H. (2002) New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **59**, 1096–1116
48. Makowski, L., Boord, J. B., Maeda, K., Babaev, V. R., Uysal, K. T., Morgan, M. A., Parker, R. A., Suttles, J., Fazio, S., Hotamisligil, G. S., and Linton, M. F. (2001) Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nature medicine* **7**, 699–705
49. Ayers, S. D., Nedrow, K. L., Gillilan, R. E., and Noy, N. (2007) Continuous nucleocytoplasmic shuttling underlies transcriptional activation of PPARgamma by FABP4. *Biochemistry* **46**, 6744–6752
50. Furuhashi, M., Saitoh, S., Shimamoto, K., and Miura, T. (2014) Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4): Pathophysiological Insights and Potent Clinical Biomarker of Metabolic and Cardiovascular Diseases. *Clin Med Insights Cardiol* **8**, 23–33
51. Garin-Shkolnik, T., Rudich, A., Hotamisligil, G. S., and Rubinstein, M. (2013) FABP4 Attenuates PPARgamma and Adipogenesis, and is Inversely Correlated With PPARgamma in Adipose Tissues. *Diabetes*
52. Lan, H., Cheng, C. C., Kowalski, T. J., Pang, L., Shan, L., Chuang, C. C., Jackson, J., Rojas-Triana, A., Bober, L., Liu, L., Voigt, J., Orth, P., Yang, X., Shipps, G. W., Jr., and Hedrick, J. A. (2011) Small-molecule inhibitors of FABP4/5 ameliorate dyslipidemia but not insulin resistance in mice with diet-induced obesity. *Journal of lipid research* **52**, 646–656
53. Liu, R. Z., Graham, K., Glubrecht, D. D., Germain, D. R., Mackey, J. R., and Godbout, R. (2011) Association of FABP5 expression with poor survival in triple-negative breast cancer: implication for retinoic acid therapy. *Am J Pathol* **178**, 997–1008
54. Newberry, E. P., Kennedy, S. M., Xie, Y., Luo, J., Crooke, R. M., Graham, M. J., Fu, J., Piomelli, D., and Davidson, N. O. (2012) Decreased body weight and hepatic steatosis with altered fatty acid ethanolamide metabolism in aged L-Fabp $-/-$ mice. *Journal of lipid research* **53**, 744–754
55. Terra, X., Quintero, Y., Auguet, T., Porrás, J. A., Hernandez, M., Sabench, F., Aguilar, C., Luna, A. M., Del Castillo, D., and Richart, C. (2011) FABP 4 is associated with inflammatory markers and metabolic syndrome in morbidly obese women. *Eur J Endocrinol* **164**, 539–547

56. Wang, X. Q., Yang, K., He, Y. S., Lu, L., and Shen, W. F. (2011) Receptor mediated elevation in FABP4 levels by advanced glycation end products induces cholesterol and triacylglycerol accumulation in THP-1 macrophages. *Lipids* **46**, 479–486
57. Yang, R., Castriota, G., Chen, Y., Cleary, M. A., Ellsworth, K., Shin, M. K., Tran, J. L., Vogt, T. F., Wu, M., Xu, S., Yang, X., Zhang, B. B., Berger, J. P., and Qureshi, S. A. (2011) RNAi-mediated germline knockdown of FABP4 increases body weight but does not improve the deranged nutrient metabolism of diet-induced obese mice. *International journal of obesity* **35**, 217–225
58. Babaev, V. R., Runner, R. P., Fan, D., Ding, L., Zhang, Y., Tao, H., Erbay, E., Gorgun, C. Z., Fazio, S., Hotamisligil, G. S., and Linton, M. F. (2011) Macrophage Mal1 deficiency suppresses atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-null mice by activating peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-regulated genes. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **31**, 1283–1290
59. Marr, E., Tardie, M., Carty, M., Brown Phillips, T., Wang, I. K., Soeller, W., Qiu, X., and Karam, G. (2006) Expression, purification, crystallization and structure of human adipocyte lipid-binding protein (aP2). *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications* **62**, 1058–1060
60. Gillilan, R. E., Ayers, S. D., and Noy, N. (2007) Structural basis for activation of fatty acid-binding protein 4. *Journal of molecular biology* **372**, 1246–1260
61. Tan, N. S., Shaw, N. S., Vinckenbosch, N., Liu, P., Yasmin, R., Desvergne, B., Wahli, W., and Noy, N. (2002) Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating transcription. *Molecular and cellular biology* **22**, 5114–5127
62. Furuhashi, M., Ishimura, S., Ota, H., Hayashi, M., Nishitani, T., Tanaka, M., Yoshida, H., Shimamoto, K., Hotamisligil, G. S., and Miura, T. (2011) Serum Fatty Acid-binding protein 4 is a predictor of cardiovascular events in end-stage renal disease. *PloS one* **6**, e27356
63. Harjes, U., Bridges, E., McIntyre, A., Fielding, B. A., and Harris, A. L. (2014) Fatty Acid-binding Protein 4, a Point of Convergence for Angiogenic and Metabolic Signaling Pathways in Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* **289**, 23168–23176
64. Holm, S., Ueland, T., Dahl, T. B., Michelsen, A. E., Skjelland, M., Russell, D., Nymo, S. H., Krohg-Sorensen, K., Clausen, O. P., Atar, D., Januzzi, J. L., Aukrust, P., Jensen, J. K., and Halvorsen, B. (2011) Fatty Acid binding protein 4 is associated with carotid atherosclerosis and outcome in patients with acute ischemic stroke. *PloS one* **6**, e28785
65. Lee, K., Santibanez-Koref, M., Polvikoski, T., Birchall, D., Mendelow, A. D., and Keavney, B. (2013) Increased expression of fatty acid binding protein 4 and leptin in resident macrophages characterises atherosclerotic plaque rupture. *Atherosclerosis* **226**, 74–81

66. Scheja, L., Makowski, L., Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M., Shimshek, D. R., Meyers, D. S., Morgan, M., Parker, R. A., and Hotamisligil, G. S. (1999) Altered insulin secretion associated with reduced lipolytic efficiency in aP2^{-/-} mice. *Diabetes* **48**, 1987–1994
67. Uysal, K. T., Scheja, L., Wiesbrock, S. M., Bonner-Weir, S., and Hotamisligil, G. S. (2000) Improved glucose and lipid metabolism in genetically obese mice lacking aP2. *Endocrinology* **141**, 3388–3396
68. Hotamisligil, G. S., Johnson, R. S., Distel, R. J., Ellis, R., Papaioannou, V. E., and Spiegelman, B. M. (1996) Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science* **274**, 1377–1379
69. Makowski, L., Brittingham, K. C., Reynolds, J. M., Suttles, J., and Hotamisligil, G. S. (2005) The fatty acid-binding protein, aP2, coordinates macrophage cholesterol trafficking and inflammatory activity. Macrophage expression of aP2 impacts peroxisome proliferator-activated receptor gamma and IκB kinase activities. *The Journal of biological chemistry* **280**, 12888–12895
70. Furuhashi, M., Tuncman, G., Gorgun, C. Z., Makowski, L., Atsumi, G., Vaillancourt, E., Kono, K., Babaev, V. R., Fazio, S., Linton, M. F., Sulsky, R., Robl, J. A., Parker, R. A., and Hotamisligil, G. S. (2007) Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature* **447**, 959–965
71. Pelton, P. D., Zhou, L., Demarest, K. T., and Burris, T. P. (1999) PPARgamma activation induces the expression of the adipocyte fatty acid binding protein gene in human monocytes. *Biochemical and biophysical research communications* **261**, 456–458
72. Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, J. A., Ivashkiv, L. B., Lawrence, T., Locati, M., Mantovani, A., Martinez, F. O., Mege, J.-L., Mosser, D. M., Natoli, G., Saeij, J. P., Schultze, J. L., Shirey, K. A., Sica, A., Suttles, J., Udalova, I., van Ginderachter, J. A., Vogel, S. N., and Wynn, T. A. (2014) Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* **41**, 14–20
73. Biswas, S. K., and Mantovani, A. (2012) Orchestration of metabolism by macrophages. *Cell metabolism* **15**, 432–437
74. Jennewein, C., Knethen, A. von, Schmid, T., and Brune, B. (2010) MicroRNA-27b contributes to lipopolysaccharide-mediated peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) mRNA destabilization. *The Journal of biological chemistry* **285**, 11846–11853
75. Szanto, A., Balint, B. L., Nagy, Z. S., Barta, E., Dezso, B., Pap, A., Szeles, L., Poliska, S., Oros, M., Evans, R. M., Barak, Y., Schwabe, J., and Nagy, L. (2010) STAT6 transcription factor is a facilitator of the nuclear receptor PPARgamma-regulated gene expression in macrophages and dendritic cells. *Immunity* **33**, 699–712

76. Zhou, J., Febbraio, M., Wada, T., Zhai, Y., Kuruba, R., He, J., Lee, J. H., Khadem, S., Ren, S., Li, S., Silverstein, R. L., and Xie, W. (2008) Hepatic fatty acid transporter Cd36 is a common target of LXR, PXR, and PPARgamma in promoting steatosis. *Gastroenterology* **134**, 556–567
77. Nozaki, S., Kashiwagi, H., Yamashita, S., Nakagawa, T., Kostner, B., Tomiyama, Y., Nakata, A., Ishigami, M., Miyagawa, J., Kameda-Takemura, K., and et al. (1995) Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects. *The Journal of clinical investigation* **96**, 1859–1865
78. Park, Y. M. (2014) CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. *Experimental & molecular medicine* **46**, e99
79. Czimmerer, Z., Varga, T., Poliska, S., Nemet, I., Szanto, A., and Nagy, L. (2012) Identification of novel markers of alternative activation and potential endogenous PPARgamma ligand production mechanisms in human IL-4 stimulated differentiating macrophages. *Immunobiology* **217**, 1301–1314
80. Namgaladze, D., Werbizki, M., and Brüne, B. (2012) PPARg-dependent changes of lipid metabolism during macrophage differentiation are modulated by AICAR
81. Halban, P. A., Polonsky, K. S., Bowden, D. W., Hawkins, M. A., Ling, C., Mather, K. J., Powers, A. C., Rhodes, C. J., Sussel, L., and Weir, G. C. (2014) β -cell failure in type 2 diabetes: postulated mechanisms and prospects for prevention and treatment. *Diabetes Care* **37**, 1751–1758
82. Sun, K., Kusminski, C. M., and Scherer, P. E. (2011) Adipose tissue remodeling and obesity. *The Journal of clinical investigation* **121**, 2094–2101
83. Kabon, B., Nagele, A., Reddy, D., Eagon, C., Fleshman, J. W., Sessler, D. I., and Kurz, A. (2004) Obesity decreases perioperative tissue oxygenation. *Anesthesiology* **100**, 274–280
84. Hosogai, N., Fukuhara, A., Oshima, K., Miyata, Y., Tanaka, S., Segawa, K., Furukawa, S., Tochino, Y., Komuro, R., Matsuda, M., and Shimomura, I. (2007) Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* **56**, 901–911
85. Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., Wang, S., Fortier, M., Greenberg, A. S., and Obin, M. S. (2005) Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *Journal of lipid research* **46**, 2347–2355
86. Boden, G. (2008) Obesity and free fatty acids. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **37**, 635-46, viii-ix
87. Suganami, T., Nishida, J., and Ogawa, Y. (2005) A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **25**, 2062–2068

88. Nguyen, M T Audrey, Satoh, H., Favellyukis, S., Babendure, J. L., Imamura, T., Sbodio, J. I., Zalevsky, J., Dahiyat, B. I., Chi, N.-W., and Olefsky, J. M. (2005) JNK and tumor necrosis factor- α mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of biological chemistry* **280**, 35361–35371
89. Prentki, M., and Nolan, C. J. (2006) Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.* **116**, 1802–1812
90. Krauss, S., Zhang, C.-Y., Scorrano, L., Dalgaard, L. T., St-Pierre, J., Grey, S. T., and Lowell, B. B. (2003) Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic beta cell dysfunction. *J. Clin. Invest.* **112**, 1831–1842
91. El-Assaad, W., Buteau, J., Peyot, M.-L., Nolan, C., Roduit, R., Hardy, S., Joly, E., Dbaiibo, G., Rosenberg, L., and Prentki, M. (2003) Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death. *Endocrinology* **144**, 4154–4163
92. Ruderman, N., and Prentki, M. (2004) AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 340–351
93. American Diabetes Association (2014) Standards of medical care in diabetes--2014. *Diabetes care* **37 Suppl 1**, S14-80
94. Madiraju, A. K., Erion, D. M., Rahimi, Y., Zhang, X.-M., Braddock, D. T., Albright, R. A., Prigaro, B. J., Wood, J. L., Bhanot, S., MacDonald, M. J., Jurczak, M. J., Camporez, J.-P., Lee, H.-Y., Cline, G. W., Samuel, V. T., Kibbey, R. G., and Shulman, G. I. (2014) Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature* **510**, 542–546
95. Musi, N., Hirshman, M. F., Nygren, J., Svanfeldt, M., Bavenholm, P., Rooyackers, O., Zhou, G., Williamson, J. M., Ljunqvist, O., Efendic, S., Moller, D. E., Thorell, A., and Goodyear, L. J. (2002) Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* **51**, 2074–2081
96. Owen, M. R., Doran, E., and Halestrap, A. P. (2000) Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem. J.* **348 Pt 3**, 607–614
97. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., Wilson, J., and Hunt, T. (2008) *Molecular biology of the cell*, 5th Ed., Garland Science, New York, NY, USA
98. Grahame Hardie, D. (2014) AMP-activated protein kinase: a key regulator of energy balance with many roles in human disease. *Journal of internal medicine* **276**, 543–559

99. Jenkins, Y., Sun, T.-Q., Markovtsov, V., Foretz, M., Li, W., Nguyen, H., Li, Y., Pan, A., Uy, G., Gross, L., Baltgalvis, K., Yung, S. L., Gururaja, T., Kinoshita, T., Owyang, A., Smith, I. J., McCaughey, K., White, K., Godinez, G., Alcantara, R., Choy, C., Ren, H., Basile, R., Sweeny, D. J., Xu, X., Issakani, S. D., Carroll, D. C., Goff, D. A., Shaw, S. J., Singh, R., Boros, L. G., Laplante, M.-A., Marcotte, B., Kohen, R., Viollet, B., Marette, A., Payan, D. G., Kinsella, T. M., and Hitoshi, Y. (2013) AMPK activation through mitochondrial regulation results in increased substrate oxidation and improved metabolic parameters in models of diabetes. *PLoS one* **8**, e81870
100. Hardie, D. G., Ross, F. A., and Hawley, S. A. (2012) AMP-activated protein kinase: a target for drugs both ancient and modern. *Chem. Biol.* **19**, 1222–1236
101. Vincent, M. F., Bontemps, F., and van den Berghe, G. (1992) Inhibition of glycolysis by 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside in isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* **281 (Pt 1)**, 267–272
102. Meli, M., Pennati, M., Curto, M., Daidone, M. G., Plescia, J., Toba, S., Altieri, D. C., Zaffaroni, N., and Colombo, G. (2006) Small-molecule targeting of heat shock protein 90 chaperone function: rational identification of a new anticancer lead. *J. Med. Chem.* **49**, 7721–7730
103. Corton, J. M., Gillespie, J. G., Hawley, S. A., and Hardie, D. G. (1995) 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur. J. Biochem.* **229**, 558–565
104. Walter, P., and Ron, D. (2011) The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* **334**, 1081–1086
105. Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1999) Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell* **10**, 3787–3799
106. Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P., and Ron, D. (2000) Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature cell biology* **2**, 326–332
107. Marciniak, S. J., Garcia-Bonilla, L., Hu, J., Harding, H. P., and Ron, D. (2006) Activation-dependent substrate recruitment by the eukaryotic translation initiation factor 2 kinase PERK. *The Journal of cell biology* **172**, 201–209
108. Harding, H. P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H., and Ron, D. (2000) Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol. Cell* **5**, 897–904
109. Harding, H. P., Zhang, Y., and Ron, D. (1999) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* **397**, 271–274

110. Harding, H. P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., and Ron, D. (2000) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell* **6**, 1099–1108
111. Scull, C. M., and Tabas, I. (2011) Mechanisms of ER stress-induced apoptosis in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 2792–2797
112. Lee, K., Tirasophon, W., Shen, X., Michalak, M., Prywes, R., Okada, T., Yoshida, H., Mori, K., and Kaufman, R. J. (2002) IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev.* **16**, 452–466
113. Namgaladze, D., Morbitzer, D., Knethen, A. von, and Brune, B. (2010) Phospholipase A2-modified low-density lipoprotein activates macrophage peroxisome proliferator-activated receptors. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **30**, 313–320
114. Namgaladze, D., Jennewein, C., Preiss, S., Knethen, A. von, and Brune, B. (2009) Attenuated suppression of the oxidative burst by cells dying in the presence of oxidized low density lipoprotein. *Journal of lipid research* **50**, 2173–2181
115. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., and RANDALL, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* **193**, 265–275
116. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685
117. Ambrosini, G., Nath, A. K., Sierra-Honigmann, M. R., and Flores-Riveros, J. (2002) Transcriptional activation of the human leptin gene in response to hypoxia. Involvement of hypoxia-inducible factor 1. *The Journal of biological chemistry* **277**, 34601–34609
118. Chomczynski, P., and Sacchi, N. (2006) The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* **1**, 581–585
119. Summers, W. C. (1970) A simple method for extraction of RNA from *E. coli* utilizing diethyl pyrocarbonate. *Anal. Biochem.* **33**, 459–463
120. Sherf, B. A., Navarro, S. L., Hannah, R. R., and Wood, K. V. (1996) Dual-Luciferase™ Reporter Assay: An Advanced Co-Reporter Technology Integrating Firefly and Renilla Luciferase Assays. *Promega Notes Magazine* **57**, 2–9
121. Boß, M., Kemmerer, M., Brüne, B., and Namgaladze, D. (2015) FABP4 inhibition suppresses PPAR γ activity and VLDL-induced foam cell formation in IL-4-polarized human macrophages. *Atherosclerosis* **240**, 424–430

122. Furuhashi, M., Fucho, R., Gorgun, C. Z., Tuncman, G., Cao, H., and Hotamisligil, G. S. (2008) Adipocyte/macrophage fatty acid-binding proteins contribute to metabolic deterioration through actions in both macrophages and adipocytes in mice. *The Journal of clinical investigation* **118**, 2640–2650
123. Hertzfel, A. V., Hellberg, K., Reynolds, J. M., Kruse, A. C., Juhlmann, B. E., Smith, A. J., Sanders, M. A., Ohlendorf, D. H., Suttles, J., and Bernlohr, D. A. (2009) Identification and characterization of a small molecule inhibitor of Fatty Acid binding proteins. *Journal of medicinal chemistry* **52**, 6024–6031
124. Chinetti-Gbaguidi, G., Baron, M., Bouhlef, M. A., Vanhoutte, J., Copin, C., Sebti, Y., Derudas, B., Mayi, T., Bories, G., Tailleux, A., Haulon, S., Zawadzki, C., Jude, B., and Staels, B. (2011) Human atherosclerotic plaque alternative macrophages display low cholesterol handling but high phagocytosis because of distinct activities of the PPARgamma and LXRalpha pathways. *Circulation research* **108**, 985–995
125. Jaguin, M., Houlbert, N., Fardel, O., and Lecureur, V. (2013) Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell. Immunol.* **281**, 51–61
126. Snodgrass, R. G., Boß, M., Brüne, B., and Namgaladze, D. Hypoxia Potentiates Palmitate-Induced Pro-inflammatory Activation of Primary Human Macrophages. *J Biol Chem* **in revision: JBC/2015/640243**
127. van Epps-Fung, M., Williford, J., Wells, A., and Hardy, R. W. (1997) Fatty acid-induced insulin resistance in adipocytes. *Endocrinology* **138**, 4338–4345
128. Yokota, T., Oritani, K., Takahashi, I., Ishikawa, J., Matsuyama, A., Ouchi, N., Kihara, S., Funahashi, T., Tenner, A. J., Tomiyama, Y., and 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**, 1723–1732
129. Kamei, N., Tobe, K., Suzuki, R., Ohsugi, M., Watanabe, T., Kubota, N., Ohtsuka-Kawatari, N., Kumagai, K., Sakamoto, K., Kobayashi, M., Yamauchi, T., Ueki, K., Oishi, Y., Nishimura, S., Manabe, I., Hashimoto, H., Ohnishi, Y., Ogata, H., Tokuyama, K., Tsunoda, M., Ide, T., Murakami, K., Nagai, R., and Kadowaki, T. (2006) Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *The Journal of biological chemistry* **281**, 26602–26614
130. Hotamisligil, G. S. (2010) Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* **140**, 900–917

131. Thastrup, O., Cullen, P. J., Drøbak, B. K., Hanley, M. R., and Dawson, A. P. (1990) Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 2466–2470
132. Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A., and Yuan, J. (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* **403**, 98–103
133. Jarvis, M. F., Yu, H., Kohlhaas, K., Alexander, K., Lee, C. H., Jiang, M., Bhagwat, S. S., Williams, M., and Kowaluk, E. A. (2000) ABT-702 (4-amino-5-(3-bromophenyl)-7-(6-morpholinopyridin-3-yl)pyrido[2, 3-d]pyrimidine), a novel orally effective adenosine kinase inhibitor with analgesic and anti-inflammatory properties: I. In vitro characterization and acute antinociceptive effects in the mouse. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **295**, 1156–1164
134. Cronstein, B. N., Eberle, M. A., Gruber, H. E., and Levin, R. I. (1991) Methotrexate inhibits neutrophil function by stimulating adenosine release from connective tissue cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 2441–2445
135. Németh, Z. H., Leibovich, S., Deitch, E. A., Sperlágh, B., Virág, L., Vizi, E., Szabó, C., and Haskó, G. (2003) Adenosine stimulates CREB activation in macrophages via a p38 MAPK-mediated mechanism. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **312**, 883–888
136. Namgaladze, D., Kemmerer, M., Knethen, A. von, and Brune, B. (2013) AICAR inhibits PPARgamma during monocyte differentiation to attenuate inflammatory responses to atherogenic lipids. *Cardiovascular research* **98**, 479–487
137. Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J. G., Thomazy, V. A., and Evans, R. M. (1998) PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* **93**, 241–252
138. Mead, J. R., Irvine, S. A., and Ramji, D. P. (2002) Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *Journal of molecular medicine* **80**, 753–769
139. Oh, J., Riek, A. E., Weng, S., Petty, M., Kim, D., Colonna, M., Cella, M., and Bernal-Mizrachi, C. (2012) Endoplasmic reticulum stress controls m2 macrophage differentiation and foam cell formation. *The Journal of biological chemistry* **287**, 11629–11641
140. Olivier, M., Tanck, M. W., Out, R., Villard, E. F., Lammers, B., Bouchareychas, L., Frisdal, E., Superville, A., van Berkel, T., Kastelein, J. J., Eck, M. V., Jukema, J. W., Chapman, M. J., Dalling-Thie, G. M., Guerin, M., and Le Goff, W. (2012) Human ATP-binding cassette G1 controls macrophage lipoprotein lipase bioavailability and promotes foam cell formation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **32**, 2223–2231

141. Erbay, E., Babaev, V. R., Mayers, J. R., Makowski, L., Charles, K. N., Snitow, M. E., Fazio, S., Wiest, M. M., Watkins, S. M., Linton, M. F., and Hotamisligil, G. S. (2009) Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis. *Nature medicine* **15**, 1383–1391
142. Aouadi, M., Vangala, P., Yawe, J. C., Tencerova, M., Nicoloso, S. M., Cohen, J. L., Shen, Y., and Czech, M. P. (2014) Lipid storage by adipose tissue macrophages regulates systemic glucose tolerance. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **307**, E374-83
143. Cao, H., Sekiya, M., Ertunc, M. E., Burak, M. F., Mayers, J. R., White, A., Inouye, K., Rickey, L. M., Ercal, B. C., Furuhashi, M., Tuncman, G., and Hotamisligil, G. S. (2013) Adipocyte lipid chaperone AP2 is a secreted adipokine regulating hepatic glucose production. *Cell metabolism* **17**, 768–778
144. Gao, D., Madi, M., Ding, C., Fok, M., Steele, T., Ford, C., Hunter, L., and Bing, C. (2014) Interleukin-1beta mediates macrophage-induced impairment of insulin signaling in human primary adipocytes. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **307**, E289-304
145. Jager, J., Gremeaux, T., Cormont, M., Le Marchand-Brustel, Y., and Tanti, J. F. (2007) Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology* **148**, 241–251
146. Amano, S. U., Cohen, J. L., Vangala, P., Tencerova, M., Nicoloso, S. M., Yawe, J. C., Shen, Y., Czech, M. P., and Aouadi, M. (2014) Local Proliferation of Macrophages Contributes to Obesity-Associated Adipose Tissue Inflammation. *Cell Metabolism* **19**, 162–171
147. Keuper, M., Bluher, M., Schon, M. R., Moller, P., Dzykanchuk, A., Amrein, K., Debatin, K. M., Wabitsch, M., and Fischer-Posovszky, P. (2011) An inflammatory micro-environment promotes human adipocyte apoptosis. *Molecular and cellular endocrinology* **339**, 105–113
148. Harwood, H. J., Jr. (2012) The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis. *Neuropharmacology* **63**, 57–75
149. Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K.-i., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Miyachi, H., Maeda, S., Egashira, K., and Kasuga, M. (2006) MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest.* **116**, 1494–1505
150. Morris, D. L., Singer, K., and Lumeng, C. N. (2011) Adipose tissue macrophages: phenotypic plasticity and diversity in lean and obese states. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **14**, 341–346
151. Lihn, A. S., Pedersen, S. B., Lund, S., and Richelsen, B. (2008) The anti-diabetic AMPK activator AICAR reduces IL-6 and IL-8 in human adipose tissue and skeletal muscle cells. *Molecular and cellular endocrinology* **292**, 36–41

152. Terai, K., Hiramoto, Y., Masaki, M., Sugiyama, S., Kuroda, T., Hori, M., Kawase, I., and Hirota, H. (2005) AMP-activated protein kinase protects cardiomyocytes against hypoxic injury through attenuation of endoplasmic reticulum stress. *Molecular and cellular biology* **25**, 9554–9575
153. Yang, L., Sha, H., Davisson, R. L., and Qi, L. (2013) Phenformin activates the unfolded protein response in an AMP-activated protein kinase (AMPK)-dependent manner. *The Journal of biological chemistry* **288**, 13631–13638
154. Hong, S. W., Lee, J., Park, S. E., Rhee, E. J., Park, C. Y., Oh, K. W., Park, S. W., and Lee, W. Y. (2014) Activation of AMP-Activated Protein Kinase Attenuates Tumor Necrosis Factor- α -Induced Lipolysis via Protection of Perilipin in 3T3-L1 Adipocytes. *Endocrinol Metab (Seoul)* **29**, 553–560
155. Gruber, H. E., Hoffer, M. E., McAllister, D. R., Laikind, P. K., Lane, T. A., Schmid-Schoenbein, G. W., and Engler, R. L. (1989) Increased adenosine concentration in blood from ischemic myocardium by AICA riboside. Effects on flow, granulocytes, and injury. *Circulation* **80**, 1400–1411