

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

betreut am  
Zentrum der Kinder- und Jugendmedizin  
Klinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin  
Direktor: Prof. Dr. Thomas Klingebiel

**Die Wirkung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren auf die  
COX-2-abhängige Inflammation von A549-Lungenepithelzellen**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Christine Drießler

aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2020

Dekan: Prof. Dr. Stefan Zeuzem  
Referent: Prof. Dr. Ralf Schubert  
Korreferent: Prof. Dr. Harald Burkhardt  
Tag der mündlichen Prüfung: 22.02.2021

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>7</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>9</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>10</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>12</b>
1.1 Entzündliche Lungenerkrankungen - Asthma bronchiale.....	12
1.2 Fette und Fettsäuren.....	13
1.3 Langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren.....	14
1.4 Arachidonsäure.....	16
1.5 Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure .....	17
1.6 Stearidonsäure .....	19
1.7 Gamma-Linolensäure und Dihomogammalinolensäure.....	20
1.8 Entzündung (Inflammation) und Entzündungsauflösung (Resolution) ...	21
1.9 Wirkmechanismen .....	23
1.10 Fettsäuren als Therapeutikum .....	24
1.11 LCPUFA bei Asthma bronchiale .....	26
1.12 Zielsetzung .....	27
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>28</b>
2.1 Material.....	28
2.1.1 Chemikalien .....	28
2.1.2 Verbrauchsmaterial.....	29

2.1.3	Geräte .....	30
2.1.4	Antikörper .....	31
2.2	Methoden.....	31
2.2.1	A549-Zellkultur.....	31
2.2.2	Die Untersuchung der Zellviabilität .....	32
2.2.3	Der Cytometric Bead Array .....	33
2.2.4	Die Inkubation mit Fettsäuren .....	33
2.2.5	Die Durchführung der Gaschromatographischen Messung .....	35
2.2.6	Die Messung der Oberflächenantigene.....	37
2.2.7	Intrazelluläre Cyclooxygenase-2-Messung .....	38
2.2.8	Statistische Auswertung.....	39
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>40</b>
3.1	Die Oberflächencharakterisierung der A549-Zellen mittels Durchflusszytometrie .....	40
3.2	Gaschromatographische Bestimmung des Fettprofils in der Zellmembran.....	41
3.2.1	EPA-Inkubation.....	41
3.2.2	DHA-Inkubation.....	43
3.2.3	GLA-Inkubation .....	44
3.2.4	SDA-Inkubation.....	45
3.2.5	LCPUFA-Mix-Inkubation .....	46
3.2.6	Einfluss der LCPUFA auf die Inflammation.....	47

3.3	Ermittlung des Einflusses der LCPUFA auf die Zellviabilität mittels XTT-Test.....	48
3.3.1	Bestimmung des Einflusses einzelner LCPUFA auf die Zellviabilität .....	48
3.3.2	Bestimmung des Einflusses des LCPUFA-Mixes auf die Zellviabilität .....	50
3.4	Stimulation der A549-Zellen mittels Cytokinmix.....	51
3.4.1	CBA-Messung der Cytokinmix-Dosiskinetik.....	51
3.4.2	Einfluss verschiedener Cytokinmix-Konzentrationen auf die Zellviabilität .....	52
3.5	Beeinflussung der Cytokinmix-Stimulation durch Einzelfettsäuren .....	53
3.5.1	CBA-Messung nach Stimulation und Inkubation mit Einzelfettsäuren.....	53
3.5.2	Einfluss der Einzelfettsäuren und Cytokinmix 1 auf die Zellviabilität .....	55
3.6	Beeinflussung der Cytokinmix-Stimulation durch LCPUFA.....	57
3.6.1	CBA-Messung nach Stimulation und Inkubation mit dem LCPUFA-Mix.....	57
3.6.2	Einfluss von LCPUFA-Mix und Cytokinmix 1 auf die Zellviabilität.....	58
3.7	Cyclooxygenase-2-Expression der A549-Zellen .....	59
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>61</b>
4.1	Verteilung der Oberflächenmarker der A549-Zellen .....	61
4.2	Einfluss der Supplementation mit LCPUFA auf das Fettsäureprofil.....	62
4.3	Einfluss der LCPUFA auf die Zellviabilität.....	64

4.4	Wirkungen von LCPUFA auf die Inflammation der A549-Zellen .....	66
4.5	Wirkungen auf die Cyclooxygenase-2-Expression der A549-Zellen .....	68
4.6	Wirkungen der LCPUFA auf entzündliche Lungenerkrankungen.....	70
4.7	Ausblick .....	71
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>Abstract.....</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>80</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>94</b>
<b>9</b>	<b>Schriftliche Erklärung.....</b>	<b>95</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Allgemeine Strukturformel von Triglyceriden.....	13
Abbildung 2: Allgemeine Strukturformel von n-3- und n-6-Fettsäuren.....	14
Abbildung 3: Strukturformeln von EPA und DHA.....	18
Abbildung 4: Fettsäure-Metabolismus und endogene Biosynthese.....	22
Abbildung 5: A) Größe und Granularitätsmessung der A549 Zellen. B) Expression spezifischer Oberflächenmarker auf den A549-Zellen. C) Expression der Oberflächenmarker.....	40
Abbildung 6: Gaschromatographische Bestimmung nach Inkubation mit EPA	42
Abbildung 7: Gaschromatographische Bestimmung nach Inkubation mit DHA	43
Abbildung 8: Gaschromatographische Bestimmung nach Inkubation mit GLA	44
Abbildung 9: Gaschromatographische Bestimmung nach Inkubation mit SDA	45
Abbildung 10: Gaschromatographische Bestimmung nach Inkubation mit LCPUFA-Mix .....	46
Abbildung 11: Gaschromatographische Bestimmung nach Inkubation mit LCPUFA-Mix und CM1 .....	47
Abbildung 12: Messung der Zellviabilität mittels XTT-Test.....	49
Abbildung 13: XTT-Ergebnisse nach LCPUFA-Mix-Inkubation .....	50
Abbildung 14: IL-6-Bestimmung mittels CBA-Messung nach CM-Stimulation..	51
Abbildung 15: XTT-Ergebnisse nach CM-Stimulation .....	52
Abbildung 16: IL-6- Bestimmung mittels CBA-Messung nach Fettinkubation und CM1-Stimulation.....	54
Abbildung 17: XTT-Ergebnisse nach Fettinkubation und CM1-Stimulation.....	56

Abbildung 18: IL-6- Bestimmung mittels CBA-Messung nach Fettinkubation und CM1-Stimulation.....	57
Abbildung 19: XTT-Ergebnisse nach LCPUFA-Mix-Inkubation und CM1-Stimulation.....	58
Abbildung 20: A) Größe und Granularitätsmessung der A549 Zellen. B) Intrazelluläre Expression der COX-2 in den A549-Zellen. C) COX-2-Expression der A549-Zellen nach Fettinkubation und CM-Stimulation.....	60

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Chemikalien.....	28
Tabelle 2: Verbrauchsmaterial.....	29
Tabelle 3: Geräte.....	30
Tabelle 4: Antikörper .....	31
Tabelle 5: Konzentrationen des LCPUFA-Mixes und der Einzelfettsäuren .....	35
Tabelle 6: Temperaturprogramm des GC-Ofens.....	37

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung		deutscher Begriff
5-LOX	5-Lipoxygenase	
A647	Alexa Fluor® 647	
AA	Arachidonsäure	
ALA	Linolensäure	
APC	Allophycocyanin	
Bcl-2	B-Cell Lymphoma 2	
BSA	Bovine Serum Albumin	
CBA	Cytometric Bead Array	
CD	Cluster of Differentiation	„Unterscheidungsgruppen“, immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen
CF	Cystische Fibrose	
CM	Cytokinmix	
CMKLR1	Chemokine Like Receptor 1	
COX-2	Cyclooxygenase-2	
DGLA	Dihomogammalinolensäure	
DHA	Docosahexaensäure	
DSMZ	Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen	
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	
EPA	Eicosapentaensäure	
ER- $\alpha$	Estrogen Receptor- $\alpha$	
EtOH	Ethanol	
FAME	Fettsäuremethylester	
FCS	Fetal Calf Serum	
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	
FS	Fettsäure	
g	Zentrifugalbeschleunigung als Vielfaches der mittleren Erdschwerebeschleunigung g	
GC	Gaschromatographie	
GLA	Gamma-Linolensäure	
GPCR	G Protein-Coupled Receptor(s)	G-Protein-gekoppelte(r) Rezeptor(en)
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen-DR	humanes Leukozyten Antigen DR
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$	
Ig	Immunglobulin	

IL	Interleukin(e)	
LA	Linolsäure	
LCPUFA	Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids	langkettige mehrfach ungesättigte Omega-(n)-Fettsäuren
LT	Leukotrien(e)	
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MaR	Maresin(e)	
Mean		arithmetischer Mittelwert
MHC	Major Histocompatibility Complex	Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid	Boten-Ribonukleinsäure
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor kappa Light Chain Enhancer of Activated B-Cells	nukleärer Faktor, der an den Promotor leichter Kappa-Ketten von B-Lymphozyten bindet
NK	Negativkontrolle	
PBS/DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	
PD	Protectin(e)	
PE	Phycoerythrin	
PerCP/Cy	Peridinin-Chlorophyll/Cyanin	
PG	Prostaglandin(e)	
PLA2	Phospholipasen A2	
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren	
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acids	mehrfach ungesättigte Omega-(n)-Fettsäuren
rpm	Revolutions Per Minute	Umdrehungen pro Minute
Rv	Resolvin(e)	
SDA	Stearidonsäure	
SEM	Standardfehler	
SPC	Surface Protein C	
SPM	Specialized Pro-Resolving Mediators	spezialisierte Lipidmediatoren
TLR4	Toll-like Receptor 4	Toll-like Rezeptor 4
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$	
TX	Thromboxan(e)	
U	Units	
v/v	Volumenprozent	
XTT	2,3-Bis-[2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl]-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide	

# 1 Einleitung

## 1.1 Entzündliche Lungenerkrankungen - Asthma bronchiale

Im Kindesalter gibt es zwei obstruktive Lungenerkrankungen, die eine besondere Relevanz haben: das Asthma bronchiale und die cystische Fibrose (CF).[1] Asthma bronchiale ist die häufigste chronische Erkrankung und CF ist die am häufigsten tödlich verlaufende Erbkrankheit bei Kaukasiern.[1] Beiden gemein ist, dass es zu einer chronischen Inflammation der Bronchialschleimhaut kommt.[1]

Pathophysiologisch kommt es zu epithelialen/subepithelialen, immunologischen, neuromuskulären und vaskulären Veränderungen.[2] Durch proinflammatorische Cytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren kommt es zur wechselseitigen Beeinflussung der verschiedenen beteiligten Zelltypen.[2] Fibroblasten verändern die Extrazellulärmatrix.[2] Verschiedene Immunzellen infiltrieren vermehrt die Atemwege.[2] Glatte Muskelzellen verursachen durch Hypertrophie und Hyperplasie eine gesteigerte bronchiale Konstriktion.[2] Blutgefäße der Lunge sind vermehrt und durchlässiger für Immunzellen.[2]

Es gibt zwei prinzipiell zu unterscheidende Formen des Asthma bronchiale. Das extrinsische oder allergische Asthma kann unter anderem (u.a.) durch Pollen, Hausstaubmilben, Tierhaare und Lebensmittel ausgelöst werden.[1, 2] Diese Sensibilisierung lässt sich bei einer Allergietestung im Pricktest (ein Allergietest, der an der Haut des Patienten durchgeführt wird) oder durch spezifisches Immunglobulin E (IgE) im Serum nachweisen.[2] Im Gegensatz dazu existiert noch das intrinsische oder nichtallergische Asthma, das häufig von Atemwegsinfektionen ausgelöst wird.[1, 2]

Die Diagnose eines Asthma bronchiale erfolgt anhand der Klinik des Patienten, einer variablen und reversiblen Atemwegsobstruktion, einer chronischen Entzündung der Atemwege und der bronchialen Hyperreagibilität.[2] Kardinalsymptome sind Atemnot, expiratorische Atemnebengeräusche und trockener Husten.[2] Um die Atemwegsobstruktion zu objektivieren und ihren

Verlauf zu dokumentieren, müssen wiederholt Lungenfunktionsmessungen durchgeführt werden.[2]

Für Kinder und Jugendlichen wurde eine Asthma-Stufentherapie etabliert. Dabei werden je nach Stufe Medikamente wie inhalative Kortikosteroide, kurzwirksame  $\beta$ 2-Mimetika, langwirksame  $\beta$ 2-Mimetika sowie Leukotrienrezeptor-Antagonisten bevorzugt eingesetzt.[2]

## 1.2 Fette und Fettsäuren

Fette, auch als Triglyceride bezeichnet, sind Ester des dreiwertigen Alkohols Glycerin mit aliphatischen Monocarbonsäure, den Fettsäuren.[3] Sie setzen sich meist aus einem Gemisch verschiedener Triglyceride zusammen.[3] Ein Triglycerid kann ein bis drei verschiedene Fettsäuren binden.[3]

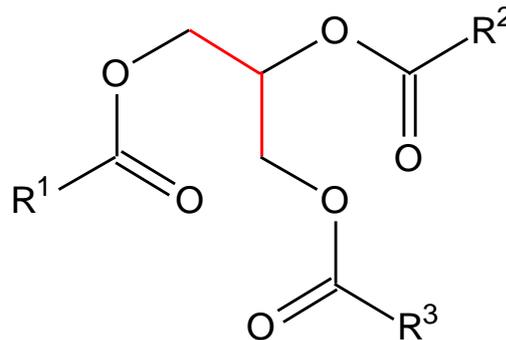


Abbildung 1: Allgemeine Strukturformel von Triglyceriden.  $R^{1-3}$  sind die Fettsäurereste. Rotmarkiert ist das veresterte Glycerin.

Eine Fettsäure wird als ungesättigt bezeichnet, wenn sie mindestens eine Doppelbindung zwischen den Kohlenstoff(C)-Atomen besitzt.[4] Außerdem werden die C-Atome durchnummeriert.[4] Das  $C_1$ -Atom besitzt die höchste Oxidationsstufe.[4] Bei Fettsäuren ist das  $C_1$ -Atom in der Carboxylgruppe.[4] Demgegenüber wird das terminale C-Atom auch als  $\omega$  oder omega oder  $n$  bezeichnet.[4] Hat eine Fettsäure mehrere Doppelbindungen sind diese isoliert.[4] Das heißt, dass sie durch mindestens eine Methylengruppe voneinander getrennt sind.[4] Die Anzahl der Doppelbindungen oder anders ausgedrückt ihr Sättigungsgrad haben Einfluss auf die Eigenschaften der Fettsäure.[4] Je kürzer die Fettsäure ist und je weniger Doppelbindungen sie

besitzt, desto fluider ist die Membran, deren wichtiger Bestandteil sie ist.[4] Außerdem beeinflusst die Kettenlänge der gebundenen Fettsäure sowie die Position der Fettsäure am Glycerin-Molekül die Eigenschaften eines Triglycerids.[3] Eine Fettsäure wird als langkettig bezeichnet, wenn ihr Fettsäurerest länger als 14 C-Atome ist.[3] Um die Position (sn-1 bis sn-3) der Fettsäuren am Glycerin, von denen bis zu drei vorhanden sein können, anzugeben, wird die stereospecific numbering (sn)-Nomenklatur verwendet.[3]

### 1.3 Langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren

Bei langkettigen mehrfach ungesättigten Omega-(n)-Fettsäuren (Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids, LCPUFA) handelt es sich um essentielle Fettsäuren, die vom Menschen nicht eigenständig bzw. nicht im ausreichenden Maß synthetisiert werden können und daher über die Nahrung zugeführt werden müssen.[3, 5] Ein Erwachsener sollte sich täglich über die Nahrung zehn Gramm essentielle Fettsäuren zuführen.[3]

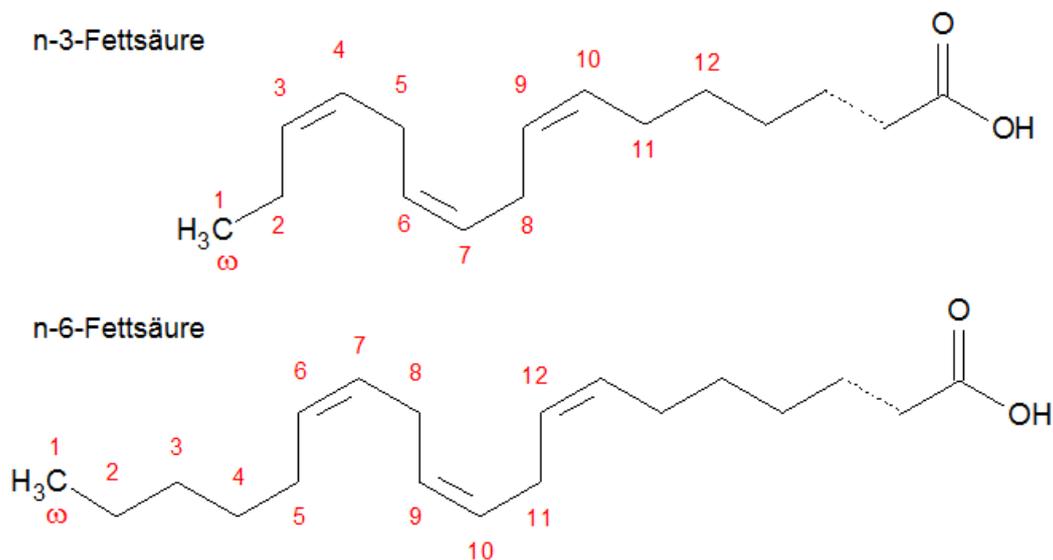


Abbildung 2: Allgemeine Strukturformel von n-3- und n-6-Fettsäuren. Mit ω ist das terminale C-Atom markiert. Von diesem ausgehend sind die C-Atome exemplarisch durchnummeriert, damit die Positionen der Doppelbindungen angegeben werden können.

Sie sind Bestandteile von Zellmembranen und Ausgangspunkt der Synthese von intra- und extrazellulären Signalmolekülen, den Eikosanoiden, die besonders bei inflammatorischen Vorgängen eine wichtige Rolle spielen.[3] Hier kommen den Omega-6-(n-6-) und den Omega-3-(n-3-) Fettsäuren eine besondere Bedeutung zu.[6] Während den n-6-Fettsäuren wie der Arachidonsäure (AA) eine inflammatorische Wirkung zugesprochen wird, wirken die n-3-Fettsäuren wie die Eicosapentaensäure (EPA) oder die Docosahexaensäure (DHA) antiinflammatorisch.[6]

Aus den essentiellen Fettsäuren Linolsäure (LA) und Linolensäure (ALA) kann der menschliche Körper weitere mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie die Arachidonsäure (AA), aus der wiederum die Eikosanoide entstehen, ableiten.[5] Dies geschieht über verschiedene Schritte der Kettenverlängerung und Desaturierung.[5] LA und ALA sind in pflanzlichen Produkten enthalten, tierische Organismen können sie nicht selbst synthetisieren.[5] Dies liegt daran, dass Tiere nur Desaturasen besitzen, die Doppelbindungen bis 9 C-Atome von der Carboxylgruppe entfernt bilden können aber nicht darüber hinaus.[5] Sobald eine essentielle Fettsäure enteral aufgenommen wurde, kann diese zu anderen LCPUFA weiter verstoffwechselt werden.[5]

Es bestehen Unterschiede in der Konversionsrate der essentiellen Fettsäuren LA und ALA. Beide können vom Menschen in aktivere Fettsäuren umgewandelt werden.[7, 8] Sowohl die n-3- als auch die n-6-Fettsäuren werden durch dieselben Enzyme synthetisiert.[7–9] Jedoch können sie nicht ineinander überführt werden.[7–9] Dabei ist die Umsetzung von LA zu AA sehr effizient.[7, 8] Im Gegensatz dazu haben Davis et al. aus der Literatur Werte von 5-10% für die Synthese von EPA aus ALA und sogar nur 2-5% von Docosahexaensäure (DHA) aus ALA gefunden.[7, 8, 10] Die Effizienz dieser Konversion ist im Menschen insbesondere für DHA nur sehr gering.[7, 10] Teilweise konnte sogar gezeigt werden, dass der DHA-Spiegel bei einer ALA-reichen Diät sinkt.[7]

Schaut man sich eine dieser Quellen genauer an, werden mögliche Gründe hierfür beleuchtet.[11] Emken et al. haben in ihrer klinischen Studie an Menschen eine Konversionsrate von 15,3% für LA und 1,6% für ALA ermittelt.[11] Sie sehen die Selektivität der  $\Delta$ -6-Desaturase sowie eine

unterschiedliche Verteilung der essentiellen Fettsäuren als ursächlich an.[11] Zum Beispiel steht ALA, wenn sie in Phosphatidylcholin und Cholesterinester eingebaut ist, der  $\Delta$ -6-Desaturase möglicherweise nicht zur Verfügung.[11] Im Gegensatz dazu haben Messungen in Ratten ergeben, dass mehr ALA als LA durch die  $\Delta$ -6-Desaturase umgesetzt wird, weil diese eine höhere Affinität zu n-3- als zu n-6-Fettsäuren zeigt.[12]

Produkte, die viel ALA enthalten, sind Körner, Nüsse, Hülsenfrüchte und grüne Pflanzenblätter wie Algen.[6, 8] Leinöl besitzt den höchsten bekannten ALA-Anteil. Weitere natürliche Quellen für n-3-Fettsäuren, insbesondere für EPA und DHA, sind Fischöl und Meeresfrüchte.[6, 8] Es gibt auch pflanzliche Produkte, die eher eine n-6-Fettsäure-Quelle darstellen, wie Sonnenblumenkerne oder Walnüsse.[6, 8] Typische AA-Quellen sind jedoch tierische Produkte wie tierische Fette, Leber, Eier und Fisch.[6]

Betrachtet man den Einfluss auf Entzündungen werden n-3-Fettsäuren und n-6-Fettsäuren gegensätzliche Wirkungen zugeschrieben. Ratnayake et al. haben dazu in einem Review verschiedene Studienergebnisse zusammengetragen und konnten so zeigen, dass der Großteil der von AA abgeleiteten Eikosanoide proinflammatorisch wirkt, siehe dazu auch Abbildung (Abb.) 4.[6] Unter diesen gab es auch Ausnahmen wie Prostaglandin (PG) E<sub>2</sub>, das sowohl pro- als auch antiinflammatorisch wirken kann, und PGI<sub>2</sub>, das antiinflammatorisch, antiaggregativ und vasodilatierend wirkt.[6, 13] N-3-Fettsäuren, zu denen EPA, DHA und Stearidonsäure (SDA) zählen, sowie Gamma-Linolensäure (GLA), die eine n-6-Fettsäure darstellt, wurden in dieser Arbeit verwendet und diesen wird eine antiinflammatorische Wirkung zugeschrieben.[6, 14, 15] Generell haben n-6-Fettsäuren einen proinflammatorischen Charakter, jedoch zeigt GLA auch antagonistische Eigenschaften gegenüber AA (siehe 1.5 Gamma-Linolensäure und Dihomogammalinolensäure).[13, 14]

#### **1.4 Arachidonsäure**

Die AA kommt natürlich in tierischen Fetten vor und ist Bestandteil vieler Phosphoglyceride.[3, 5] Die körpereigene Synthese der vierfach ungesättigten AA hat als Ausgangspunkt die essentielle n-6 Fettsäure LA.[3, 5]

Ihre physiologischen Funktionen sind vielseitig.[16] Sie erhält die Fluidität der Zellmembran und interagiert dabei mit spezifischen Membranproteinen, die in der Signalweiterleitung zwischen Zellen involviert sind.[16] Auch bei Apoptose und Nekrose ist sie beteiligt und damit in der Phase der Embryogenese unabdingbar.[16]

Die Derivate der AA bezeichnet man als Eikosanoide.[5] Zunächst wird die AA mittels Phospholipase A<sub>2</sub> aus Membranphospholipiden abgespalten.[5] Entweder wird sie durch die Prostaglandinsynthase, bestehend aus Cyclooxygenase und Peroxidase, zu PGH<sub>2</sub> metabolisiert und kann dann zu weiteren PG (E<sub>2</sub>, F<sub>2</sub>, I<sub>2</sub>) oder TXA<sub>2</sub> umgewandelt werden.[5] Oder es werden alternativ LT durch die 5-Lipoxygenase aus AA gebildet.[3, 5] PG, TX und LT sind als Gewebshormone in der Vermittlung der Entzündung involviert.[5] Aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit entfalten sie Ihre Wirkung mittels spezifischer Membranrezeptoren teilweise nur lokal und locken Leukozyten zum Ort der Entzündung oder führen zu Ödemen durch eine erhöhte Gefäßpermeabilität.[5] Auf die Lunge haben sie einen bronchokonstriktorischen Effekt.[5] Die Metabolisierungswege der AA scheinen an der sogenannten pseudoallergischen Reaktion durch Acetylsalicylsäure beteiligt zu sein.[3] Acetylsalicylsäure hemmt die COX und damit die Synthese protektiver PG.[3] Gleichzeitig werden vermehrt LT gebildet und führen bei überempfindlichen Personen zu einer pseudoallergischen Reaktion.[3]

### **1.5 Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure**

Für den antiinflammatorischen Effekt von DHA (22:6 n-3) und EPA (20:5 n-3) sind die Inhibition der COX bereits auf Genebene und die Reduktion der Synthese der proinflammatorischen Eikosanoide, Cytokine und Adhäsionsmoleküle verantwortlich.[17, 18] Ihre positive Wirkung entfalten die beiden Fettsäuren hauptsächlich durch ihre Umwandlung zu spezialisierten Lipidmediatoren (Specialized Pro-Resolving Mediators, SPM), wie den D- und E-Serie Rv und PD.[18, 19] Zum Beispiel unterdrücken sie dadurch die NF-κB-Transkription, die in der Pathogenese u.a. von Lungentumoren aber auch generell in allen Entzündungsprozessen eine große Rolle spielt.[20–22] In

Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass EPA und DHA die NF- $\kappa$ B-Aktivität durch verminderten Abbau der inhibitorischen Untereinheit von NF- $\kappa$ B direkt blockierten.[18] NF- $\kappa$ B induziert verschiedene Gene, die in den Prozess einer Entzündung eingebunden sind, darunter auch die COX-2.[17] Für AA konnte gezeigt werden, dass sie diesen Signalweg aktiviert und n-3-LCPUFA ihn inhibieren.[17]

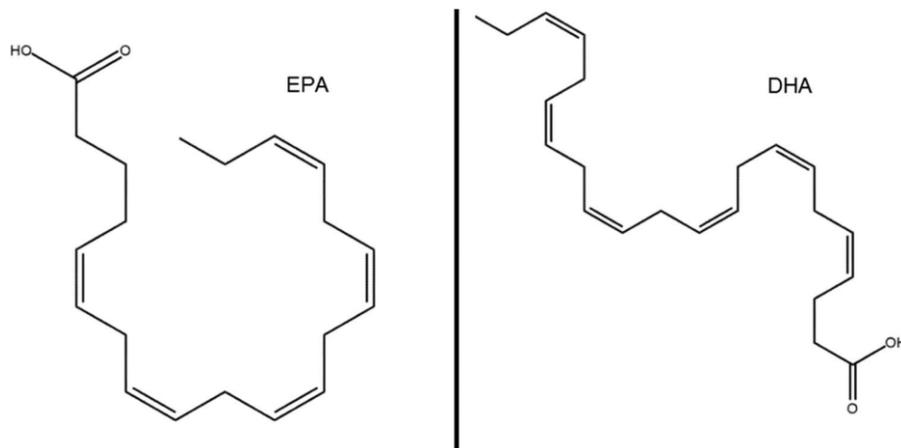


Abbildung 3: Strukturformeln von EPA und DHA aus Zhao et al.[61]

Auf der Ebene ihrer Metaboliten haben EPA und AA antagonistische Wirkungen.[17] Die Synthese der proinflammatorischen von AA abgeleiteten PG-2- und LT-4-Serie wird durch EPA und DHA gehemmt, jedoch die Synthese der PG-3- und LT-5-Serie gefördert.[17] Für die EPA-abhängigen Eikosanoide wurde jedoch eine deutlich geringere proinflammatorische Wirkung gezeigt.[17] Beispielweise blockiert das aus EPA gebildete LTB<sub>5</sub> die Synthese des proinflammatorisch wirkenden LTB<sub>4</sub> aus AA.[23] LTB<sub>4</sub> bewirkt als Lipidmediator eine Steigerung der Gefäßpermeabilität, wirkt viel stärker chemotaktisch und aggregativ auf Leukozyten.[23, 24]

Darüber hinaus hemmt EPA die Desaturierung von DGLA zu AA, weil EPA selbst durch die  $\Delta$ -5-Desaturase verstoffwechselt wird.[25] DGLA entsteht durch einen Elongationsschritt aus GLA und kann in antiinflammatorisches PGE<sub>1</sub> umgewandelt werden.[25–27]

DHA zeigte bei *in-vitro*-Studien eine größere Potenz als EPA, die Expression von Zelladhäsions-Molekülen, die eine Rolle bei der Entstehung von Atherosklerose spielen, durch Cytokin-Stimulation zu verringern.[28] Dies

könnte dadurch erklärt werden, dass die Inhibition der Endothelaktivierung im Zusammenhang mit der Anzahl der Doppelbindungen aber nicht mit der Bildung von Eikosanoiden steht.[28] Im Gegensatz dazu führte DHA, aber nicht EPA, in Mäusen zu einer signifikanten Steigerung von proinflammatorischen Cytokinen und einer gesteigerten Eosinophilenzahl in der bronchoalveoläre Lavage.[29] Diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten den Unterschied zwischen *in-vitro*- und *in-vivo*-Krankheitsmodellen in Bezug auf LCPUFA widerspiegeln.[29] Außerdem ist darauf zu achten, ob die Fettsäuren als Diät oder in Form einer pharmakologischen Therapie zugeführt werden.[29]

Eine anhaltende Entzündung spielt in der Pathogenese zahlreicher Krankheiten, wie chronischer Atemwegsentzündung, pulmonaler Hypertension, Rheumatoider Arthritis, Lungenkrebs, Kolonkrebs, Atherosklerose, Krebs, Asthma und neurologischen Krankheiten, eine zentrale Rolle.[19, 30] Als n-3-Fettsäuren können EPA und DHA über ihre Rolle in der Resolution der Inflammation Einfluss auf diese Krankheiten nehmen.[19, 30]

## **1.6 Stearidonsäure**

Ausgangspunkt für die Metabolisierung aller n-3-Fettsäuren ist ALA.[31] Über die  $\Delta$ -6-Desaturase wird ALA in SDA umgewandelt.[31] Dies stellt auch den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Stoffwechsels dar.[31] SDA ist jedoch ein Zwischenprodukt und wird im Körper nur in geringem Maße durch Elongation und Desaturierung in EPA umgewandelt.[31]

Der Fettsäure-Anteil im Körper ist sogar geschlechtsabhängig. Frauen zeigten in einer Studie von Giltay et al. eine ca. 15% höhere DHA-Konzentration als Männer.[32] Dieser Östrogeneffekt konnte durch die Einnahme mancher Kontrazeptiva sogar noch gesteigert werden.[32] Grund für diesen geschlechterspezifischen Unterschied ist wahrscheinlich die Rolle von DHA in der Schwangerschaft und bei der Organentwicklung.[13, 32, 33]

SDA, das vom Menschen v.a. über Fisch und Meeresfrüchte aufgenommen wird, macht im Gegensatz zu EPA und DHA nur einen kleinen Anteil an den

Gesamt-Fettsäuren aus und wird auch als „pro-EPA“-Fettsäure bezeichnet.[6, 31]

SDA entfaltet seine Wirkung durch die Inhibition von 5-LOX und Epoxide-Hydrolase sowie die kompetitive Hemmung des AA-Metabolismus.[34] Außerdem wirkt SDA über die Inhibition der Mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK) und des nukleären Faktors, der an den Promotor leichter Kappa-Ketten von B-Lymphozyten bindet (NF- $\kappa$ B), antientzündlich.[15]

### **1.7 Gamma-Linolensäure und Dihomogammalinolensäure**

Auch n-6-LCPUFA wie GLA (18:3 n-6) und DGLA (20:3 n-6) besitzen antiinflammatorisches Potential. [35] Die antiinflammatorischen Eigenschaften von GLA könnten von seiner molekularen Strukturähnlichkeit zu seinem Isomer der  $\alpha$ -Linolensäure (ALA) abgeleitet werden, deren hemmender Einfluss auf Entzündungsmediatoren in klinischen Studien untersucht wurde.[10, 36] ALA ist eine essentielle n-3-Fettsäure, die für die Synthese von EPA und DHA genutzt wird.[10] Die für die Metabolisierung von ALA benötigten Enzyme verstoffwechseln ebenfalls LA zu DGLA und AA.[10] Dies erklärt die antiinflammatorische Wirkung von ALA. Sie bindet Enzymkapazität, die ansonsten zur AA-Produktion verwendet werden könnte, und mündet außerdem in die Bildung der entzündungshemmenden Serie-3-Eikosanoide.[10, 37]

GLA ist besonders in Nachtkerzenöl, Borretsch/-öl und schwarzen Johannisbeeren enthalten.[14, 35, 38, 39] Darüber hinaus ist GLA als Spurenelement in grünem Blattgemüse und Nüssen enthalten, kann aber auch durch Desaturierung aus LA gewonnen werden.[14] Im Gegensatz dazu kann DGLA nicht direkt aus der Nahrung aufgenommen werden.[14] Es wird jedoch rasch und durch Elongation aus GLA gebildet.[14]

Aufgrund der schnellen Umwandlung von GLA zu DGLA konkurriert DGLA mit AA um enzymatische Stoffwechselreaktionen, um Eikosanoide zu bilden.[40] DGLA wird über die COX in PGE<sub>1</sub> umgewandelt, welches im Menschen antiinflammatorische Wirkung zeigen konnte.[40] Alternativ metabolisiert 15-

Lipoxygenase DGLA in 15-Hydroxyeicosatriensäure, die der Bildung von LTB<sub>4</sub> aus AA entgegenwirkt.[40]

## **1.8 Entzündung (Inflammation) und Entzündungsauflösung (Resolution)**

LCPUFA spielen bei der Regulation von Entzündungsreaktionen im Körper eine wichtige Rolle (Abb. 4). Der Stoffwechselweg der n-3-Fettsäuren endet in einer Entzündungsauflösung, während der Stoffwechselweg der n-6-Fettsäuren komplexer ist. Eine zentrale Rolle spielt die AA, die durch drei verschiedene Stoffwechselwege umgesetzt werden kann.[17] Ihre enzymatische Umwandlung durch Arachidonat-5-Lipoxygenase (5-Lipoxygenase, 5-LOX) führt zu proinflammatorischen Mediatoren, wie Leukotrien (LT) B<sub>4</sub> und den Cysteinyl-Leukotrienen (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub>), die in den Pathomechanismus von Asthma in Form von Eosinophilen-Rekrutierung und gesteigerter Schleimproduktion sowie der Bronchokonstriktion involviert sind.[17] Die Cyclooxygenase (COX) wandelt AA in Thromboxane (TX; TXA<sub>2</sub>), PG (PGH<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>α) und Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) um.[17, 37] TXA<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> und PGF<sub>2</sub>α können eine Bronchokonstriktion verursachen.[17] PGE<sub>2</sub> ist durch Effekte auf Lymphozyten in allergische Entzündungen involviert und treibt die Synthese von IgE voran.[17] Durch Cytochrom-P450-Enzyme kann AA in Hydroxyeicosatetraensäure und Epoxyeicosatriensäure, die antagonistische Effekte auf die Gefäße und Luftwege in den Lungen haben, umgewandelt werden.[17]

Der Ausgangspunkt der Synthese von Eikosanoiden aus AA ist die Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>).[5] Bei diesen Eikosanoiden handelt es sich um Entzündungsmediatoren wie PG, TX und LT.[5] Die PLA<sub>2</sub> hydrolysiert spezifisch die Bindung zwischen dem Fettsäure-Rest am C2-Atom des Phosphoglycerids der Phospholipide in der Zellmembran.[5] Die dadurch freigesetzte AA wird entweder über die COX-2 zu PG und TX oder über die 5-LOX zu LT metabolisiert.[5] An diesem Schritt greifen n-3-Fettsäuren, wie DHA und EPA, in zweierlei Hinsicht an. Sie verdrängen AA aus der Doppelphospholipidmembran der Zellen und verringern durch Substratmangel die Produktion von

Eikosanoiden, die von der AA abgeleitet werden.[6, 13] Zusätzlich hemmen n-3-Fettsäuren auch direkt die enzymatische Reaktion von COX-2 und 5-LOX.[13]

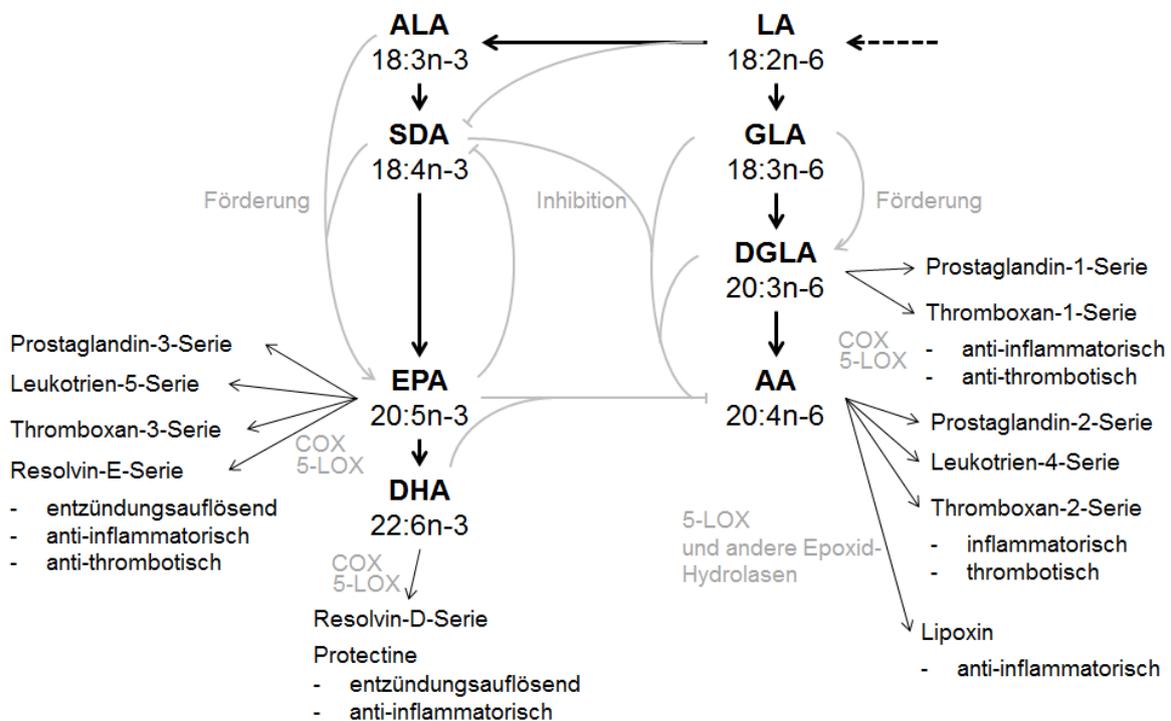


Abbildung 4: Fettsäure-Metabolismus und endogene Biosynthese von proinflammatorischen Prostaglandinen, Leukotrienen, Thromboxanen und antiinflammatorischen und entzündungsauflösenden Resolvinen und Protektinen aus n-3- und n-6-Fettsäuren. Die Abbildung basiert auf einem Artikel von Beermann et al.[34] und Gleissman et al.[37] Sie zeigt, dass n-3- und n-6-Fettsäuren im metabolischen Gleichgewicht stehen.

Beermann et al. schlagen bei Asthma die Supplementation einer Kombination von n-3- und n-6-LCPUFA vor, weil sie erhöhte antiinflammatorische und entzündungsauflösende Wirkungen im Vergleich zu einer alleinigen n-3-LCPUFA-Supplementation erwarten.[34] Durch die Kombination von EPA, DHA, SDA und GLA kommt es zu drei Effekten: Der antiinflammatorische und entzündungsauflösende Pool an Lipidmediatoren, die von EPA, Docosapentaensäure (DPA, 22:5 n-3) und DHA abgeleitet werden, wird erhöht, die Synthese von Dihomogammalinolensäure (DGLA) und damit PGE<sub>1</sub> wird erhöht und die generelle Synthese von AA wird schließlich gehemmt.[34]

SDA und DGLA sind beide Substrate der  $\Delta$ -5-Desaturase und konkurrieren daher um die gleichen Enzyme.[34] Auf diese Weise könnte durch SDA-Supplementation die AA-Synthese reduziert werden.[34] Auch EPA ist in der Lage, die  $\Delta$ -5-Desaturase zu inhibieren.[34] EPA und DHA sind Ausgangspunkt der Synthese von Eikosanoiden wie PG (der Serie 3), TX (der Serie 3), LT (der Serie 5), Resolvine (Rv der E- und D-Serie), Protektine (PD) und Maresine (MaR).[34] Gleichzeitig verringern sie den Anteil an proinflammatorischen Eikosanoiden aus AA durch Wechselwirkungen mit an der Synthese beteiligten Enzymen wie Desaturasen, Elongasen und Oxygenasen.[34] Daneben gibt es jedoch auch verschiedene negative Rückkopplungen.[41] EPA drosselt über Hemmung der  $\Delta$ -5-Desaturase seine eigene Synthese.[41] PGE<sub>2</sub>, welches aus AA entsteht, hemmt wiederum die Umwandlung von LA in GLA durch die  $\Delta$ -6-Desaturase.[41] GLA, selbst eine n-6-Fettsäure, wird wie AA durch PLA<sub>2</sub> aus der Membran gelöst und über die COX verstoffwechselt.[34] Daher stehen beide n-6-Fettsäuren in direkter Konkurrenz zueinander.[34] DGLA andererseits hemmt die Umwandlung von AA in LT.[34]

## 1.9 Wirkmechanismen

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass n-3- und n-6-LCPUFA ihre antiinflammatorische Wirkung auf unterschiedlichen Wegen entfalten.[42]

Zellen exprimieren Rezeptoren wie den Free Fatty Acid Receptor 4 (FFA4 = GPR120), an denen die Fettsäuren direkt angreifen.[42] Lipidmediatoren und LCPUFA sind in der Lage die inflammatorische Reaktion auf Genebene zu modulieren.[23] Durch die Bindung an spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) und Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR) führen n-3-LCPUFA und deren Eikosanoide zur Rezeptoraktivierung.[23] Die Aktivierung von GPCR und PPAR beeinflusst den Lipidhaushalt und inhibiert die Expression proinflammatorischer Gene.[23] N-3-Fettsäuren können NF- $\kappa$ B durch den verminderten Abbau der inhibitorischen Untereinheit I $\kappa$ B direkt inhibieren.[23] Darüber hinaus nehmen sie Einfluss auf zahlreiche Signalwege, die während einer Entzündung angeschaltet sind.[23] Diese Signalwege

resultieren in der Produktion von Cytokinen, Chemokinen und der Induktion der COX-2.[23]

Zusätzlich zeigen die Mediatoren von n-3-Fettsäuren, wie Rv, PD und MaR, sehr potente antiinflammatorische und entzündungsaflösende Wirkungen.[43–45] Mittlerweile ist bekannt, dass eine Inflammation nicht rein passiv zu Ende geht, sondern beispielsweise (bspw.) durch RvE1 und PD1 aktiv beendet wird.[46, 47] EPA und DHA sind direkte Vorläuferstufen von Rv (der E- und D-Serie), PD und MaR, welche SPM sind und eine wichtige Rolle in der Herunterregulation der Inflammation im bronchialen Asthma spielen.[17]

SPM wirken als Agonisten an spezifischen Rezeptoren (ChemR23/CMKLR1 = Chemerin Receptor 23 oder Chemokine Like Receptor 1, BLT1 = Leukotrien B4 Rezeptor 1, ALX/FPR2 = Formyl Peptide Receptor 2 oder Lipoxin A4 Rezeptor, GPR18 oder GPR32) und organisieren die zeitgerechte Resolution einer Inflammation. [21, 48, 49] Diese spezifischen Rezeptoren sind auf Neutrophilen, Makrophagen sowie Lymphozyten vorhanden, und deren Aktivierung verringert die Synthese von proinflammatorischen Cytokinen, Chemokinen und Lipidmediatoren.[48, 50] Ferner inhibieren SPM die Zellmigration von Neutrophilen und erhöhen die Phagozytose apoptotischer Neutrophiler durch Makrophagen.[48, 50]

### **1.10 Fettsäuren als Therapeutikum**

Die Verwendung von ungesättigten Fettsäuren als Therapeutikum ist Gegenstand aktueller Forschung. Sie sind eine therapeutische Option in der Sekundärprävention von Myokardinfarkten und in der Behandlung von Hypertriglyceridämie und können neben der Monotherapie sogar in Kombination mit den etablierten Statinen genutzt werden.[51, 52] Trotz einer heterogenen Studienlage weist vieles darauf hin, dass eine Behandlung mit n-3-Fettsäuren aufgrund antiarrhythmischer Wirkung zu einer signifikanten Reduktion der kardiovaskulären Gesamtmortalität und des Todes durch die Koronare Herzkrankheit führt.[52] Mehrfach ungesättigte Omega-(n)-Fettsäuren (Polyunsaturated Fatty Acids, PUFA) wirken positiv auf den Lipidhaushalt, Gefäße, Endothel, Plättchenaggregation und Plaquestabilität. Dies führt zu

vorteilhaften Effekten im Rahmen kardiovaskulären Krankheiten.[53] N-3-LCPUFA zeigen stärker als die Vorstufe ALA eine Reduktion des kardiovaskulären Risikos.[31] Ursächlich dafür sollen ihre Wirkungen auf die Fibrinolyse, die Senkung des Triacylglycerol-Serumspiegels, die Thrombozytenaktivierung, die Koagulation und die Expression von vaskulären Adhäsionsmolekülen sein.[31]

Der Stellenwert des Fettsäure-Präparates Omacor (Namensänderung in Lovaza) in der Asthmatherapie wird evaluiert.[42, 54] Für Omacor konnte in klinischen Studien nachgewiesen werden, dass es zur Behandlung von Hypertriglyceridämie geeignet ist und sogar in Kombination mit Simvastatin verwendet werden kann.[55, 56] Es gibt bereits einige Studien, die keine Medikamentenwechselwirkung von Lovaza, Epanova und Vascepa mit verschiedenen Statinen, Omeprazol, Warfarin oder einem Glitazone finden konnten.[57] In klinischen Studien und Tierversuchen wurde der positive Einfluss dieses Medikament auf die Lunge untersucht und belegt.[42, 54] Durch die Ergebnisse der groß angelegten VITAL-Studie ist mit einem entscheidenden Erkenntniszuwachs bezüglich des präventiven Nutzens von n-3-Fettsäuren in zahlreichen Krankheiten zu rechnen.[58] Bisher veröffentlichte Teilergebnisse konnten jedoch bedauerlicherweise keine Reduktion von Krebs oder kardiovaskulären Ereignissen durch Vitamin D oder n-3-Fettsäuren zeigen.[59] Ausgenommen ist ein Effekt auf kardiovaskuläre Ereignisse bei Patienten, die sich nur wenig von Fisch ernährten oder bei denen der Herzinfarkt unabhängig von anderen kardiovaskulären Ereignissen aufgetreten war.[59] In der Arbeit von Gold et al., die sich von der VITAL-Studie ableitet, wird die Wirkung auf Pneumonien, Exazerbationen bei COPD oder Asthma untersucht.[54] Es handelt sich um randomisierte klinische Studien, die Omacor zur Supplementierung von EPA und DHA verwenden.[42, 54, 58] Die Subanalysen der Ergebnisse sind noch ausstehend und werden voraussichtlich im November 2020 beendet sein.[54, 60] Der Vollständigkeit halber sind noch weitere Präparate zu nennen, die EPA mit oder ohne DHA als Hauptkomponenten enthalten und ebenfalls bei Hypertriglyceridämie eingesetzt werden: Epanova und Vascepa.[61]

Zu den vorteilhaften Effekten von n-3-LCPUFA gibt es umfangreiche Forschungsergebnisse, auch wenn noch nicht alle spezifischen Wirkungsweisen im Menschen abschließend untersucht worden sind. Festzuhalten ist, dass die positiven Effekte von n-3-LCPUFA dazu beitragen, das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse zu reduzieren und den Reizzustand wegzunehmen, der für Inflammation, Autoimmunerkrankungen und Tumorwachstum verantwortlich ist.[17, 62–64]

### **1.11 LCPUFA bei Asthma bronchiale**

Global betrachtet unterdrücken EPA und DHA die IgE-Produktion und könnten so möglicherweise die Atemwegsentzündung und Bronchokonstriktion bei Asthma reduzieren.[65] Bisher ist die Studienlage jedoch noch nicht eindeutig.[65] In mehreren klinischen Studien konnte durch n-3-reiche Supplementation der Gebrauch von Bronchodilatoren bei Asthmatikern signifikant reduziert werden.[66, 67]

Für EPA und DHA konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass sie die Eosinophileninfiltration reduzieren, die Leukozytenakkumulation in der Lunge verringern und die Lungenfunktion in Bezug auf Hyperreagibilität durch Metacholinprovokation verbessern.[68] Letzteres stand im Zusammenhang mit erhöhten Spiegeln an RvE1 und PD1 in Lungengewebe, das reich an EPA und DHA war.[68] Rv und PD entfalten eine antientzündliche Wirkung im Lungengewebe.[68] SPM-Gaben reduzierten die Hyperreagibilität der Atemwege und die Mukusproduktion in einem Mausmodell. Ihre potentielle Rolle für die Behandlung von Asthma ist daher in Zukunft zu beachten.[46, 48]

Fussbroich et al. haben in einem Mausmodell für Asthma beobachtet, dass der Gehalt an AA und DHA im Blut und in Lungenzellen deutlich erhöht ist.[69] Dies sei ein Hinweis auf eine ständige Freisetzung von LCPUFA bei chronischen Atemwegserkrankungen.[69] Durch Supplementation von EPA, DHA, GLA und SDA wurden Substrate für die Synthese von SPMs, die im Rahmen der Entzündungsauflösung eine wichtige Rolle spielen, zur Verfügung gestellt.[69]

Antiinflammatorische PUFA konnten im Gegensatz zu AA bei jungen, gesunden Probanden nach einer zweiwöchigen Einnahme die Lipopolysacchariden (LPS) induzierte Produktion von Cytokinen und proinflammatorischen Lipidmediatoren positiv beeinflussen.[70] Aber auch bei Asthmatikern mit einer Hausstaubmilbenallergie haben n-3 PUFA einen Einfluss auf die Entzündungsprozesse.[71] Nach fünf Wochen Einnahme war der Stickstoffgehalt in der Ausatemungsluft als Zeichen der bronchialen Entzündung reduziert.[71] Ein Effekt auf die Einsekundenkapazität in der Lungenfunktion konnte nicht gezeigt werden.[71]

### **1.12 Zielsetzung**

Langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren (LCPUFA) und ihre Metabolite spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Inflammation. Einige Studien demonstrieren einen antiinflammatorischen Effekt der LCPUFA auch bei Lungenerkrankungen.[67] Hierbei wird neben der Konzentration der Fettsäuren auch die Kombination von n-3 und n-6-LCPUFA auf ihre antiinflammatorische Wirkung diskutiert.[34]

Deshalb war es Ziel dieser Arbeit, die Wirkung einzelner LCPUFA im Vergleich zu einem LCPUFA-Mix auf die COX-2-abhängige Inflammation von A549-Lungenepithelzellen zu untersuchen und dabei zu berücksichtigen, dass der Stoffwechsel von n-3- und n-6-LCPUFA interagiert. Um dieser Fragenstellung nachzugehen, wurde ein Zellsystem mit humanen A549-Zellen etabliert als Arbeitsgrundlage für nachfolgende Punkte:

1. Die A549-Zellen immunologisch zu charakterisieren.
2. Eine Einbaukinetik der LCPUFA EPA, DHA, GLA und SDA im Vergleich zu einem LCPUFA-Mix durchzuführen.
3. Die Zellviabilität der A549-Zellen unter der LCPUFA-Inkubation zu untersuchen.
4. In einem Inflammationsmodell die antiinflammatorische Wirkung der LCPUFA zu bestätigen.
5. Die Wirkung von EPA als Hauptkomponente der Wirkung des LCPUFA-Mixes auf die COX-2-Aktivität gegenüberzustellen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

*Tabelle 1: Chemikalien*

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Niederlassung</b>
A549-Zellen	Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen	Braunschweig, Deutschland
Accutase™ Cell Detachment Solution	Sigma-Aldrich Chemie (Merck)	Taufkirchen, Deutschland
BD CBA Human Soluble Protein Master Buffer Kit	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
BD FACS Lysing Solution (1x)	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
BD FACSuite™ CS&T Research Beads	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich Chemie (Merck)	Taufkirchen, Deutschland
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie	Taufkirchen, Deutschland
CBA Human IL-6 Flex Set	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Cell Proliferation Kit XTT	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie	Taufkirchen, Deutschland
DHA	Sigma-Aldrich Chemie (Merck)	Taufkirchen, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Thermo Fisher Scientific	Dreieich, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (1X)	Thermo Fisher Scientific	Dreieich, Deutschland
EPA	Sigma-Aldrich Chemie (Merck)	Taufkirchen, Deutschland
Ethanol 100%	Sigma-Aldrich Chemie (Merck)	Taufkirchen, Deutschland
Fetal Calf Serum	Sigma-Aldrich Chemie (Merck)	Taufkirchen, Deutschland
GLA	Sigma-Aldrich Chemie (Merck)	Taufkirchen, Deutschland
Hexan	Sigma-Aldrich Chemie	Taufkirchen, Deutschland
IFN- $\gamma$	PeproTech	Hamburg, Deutschland

IL-1 $\beta$	PeproTech	Hamburg, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie	Taufkirchen, Deutschland
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie (Merck)	Taufkirchen, Deutschland
Natriummethanolat	Sigma-Aldrich Chemie	Taufkirchen, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific	Dreieich, Deutschland
Petroleum-Ether	Sigma-Aldrich Chemie	Taufkirchen, Deutschland
Saponin	Sigma-Aldrich Chemie	Taufkirchen, Deutschland
SDA	Sigma-Aldrich Chemie (Merck)	Taufkirchen, Deutschland
Stickstoff	ALPHAGAZTM 1, Air Liquide Deutschland	Düsseldorf, Deutschland
Supelco 37-Komponenten-FAME-Mix	Sigma-Aldrich Chemie	Taufkirchen, Deutschland
TNF- $\alpha$	ImmunoTools	Friesoythe, Deutschland
Trypanblau	Merck	Darmstadt, Deutschland
Trypsin-EDTA (0.25%), phenol red	Thermo Fisher Scientific	Dreieich, Deutschland

## 2.1.2 Verbrauchsmaterial

*Tabelle 2: Verbrauchsmaterial*

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Niederlassung</b>
6-Well-Platte (TC-Platte 6 Well, Standard, F)	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
96-Well-Platte	Corning	Kaiserslautern, Deutschland
Cyro Vials	Thermo Fisher Scientific	Dreieich, Deutschland
Einwegkulturröhrchen (Soda-Limes 12 x 100 mit Schraubdeckel)	Duran Group	Weinheim/Main, Deutschland
Eppendorf-Gefäße, 1,5mL und 2mL	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Falcon, 15 mL	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Falcon, 50 mL	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Falcon-Röhrchen, 5mL	Corning	Kaiserslautern, Deutschland
Stripetten	Corning	Kaiserslautern, Deutschland
Vials (Flaschen mit Kurzgewinde ND9, 11,6 x 32 mm, 1,5 mL)	VWR International	Darmstadt, Deutschland
Zellkultur-Flasche	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland

### 2.1.3 Geräte

Tabelle 3: Geräte

Gerät	Hersteller	Niederlassung
Autosampler (AS1310)	Thermo Fisher Scientific	Dreieich, Deutschland
Brutschrank	Heraeus Holding	Hanau, Deutschland
Durchflusszytometer (BD FACSVerse™)	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Eppendorf Thermomixer	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Eppendorf-Pipetten (Reference bzw. Reference 2)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Evaporator	Liebisch Labortechnik	Bielefeld, Deutschland
FACS-Daten-Bearbeitungsprogramm (BD FACSuite™ software)	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Gaschromatograph (TRACE 1300)	Thermo Fisher Scientific	Dreieich, Deutschland
Mikroskop (Leica DME)	Leica Microsystems	Wetzlar, Deutschland
Mikroskop (Nikon TMS-F)	Nikon	Düsseldorf, Deutschland
Schüttelwasserbad	Gesellschaft für Labortechnik	Burgwedel, Deutschland
Sterilwerkbank (HERAsafe)	Kendro Laboratory Products (Thermo Fisher Scientific)	Hanau, Deutschland
Tecan (infinite F50)	Tecan Deutschland	Crailsheim, Deutschland
Thermoblock (MKR 13)	HLC BioTech	Bovenden, Deutschland
TRACE 1300 GC SSL-Injektor Modul	Thermo Fisher Scientific	Dreieich, Deutschland
Ultraschallbad (Elma Transsonic T 700/H Ultraschallreiniger)	Elma Schmidbauer	Singen, Deutschland
Zählkammer nach Neubauer	Paul Marienfeld bzw. LO - Laboroptik Ltd	Lauda Königshofen, Deutschland bzw. Lancing, United Kingdom
Zentrifuge (Heraeus Biofuge fresco)	Kendro Laboratory Products (Thermo Fisher Scientific)	Hanau, Deutschland
Zentrifuge (Heraeus Sepatech Varifuge 3)	Heraeus Holding	Hanau, Deutschland
Zentrifuge (Labofuge 400R )	Heraeus Holding	Hanau, Deutschland

## 2.1.4 Antikörper

Tabelle 4: Antikörper

Antikörper	Farbstoff	Hersteller	Niederlassung
Anti-CD40	PerCP/Cy 5,5	BioLegend	Koblenz, Deutschland
Anti-CD54	FITC	BioLegend	Koblenz, Deutschland
Anti-CD58	PE	BioLegend	Koblenz, Deutschland
Anti-CD80	FITC	Immunotech (Beckman Coulter)	Marseille, Frankreich
Anti-CD86	FITC	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Anti-CD326/ EPCAM	APC	BioLegend	Koblenz, Deutschland
Anti-COX-2	PE	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Anti-HLA-DR	PerCP/Cy 5,5	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Anti-SPC (polyklonal)	A647	Bioss	Woburn, Massachusetts, USA
Anti-TLR4	PE	BioLegend	Koblenz, Deutschland

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 A549-Zellkultur

Die humane Lungenzelllinie A549 wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) bezogen. Die A549-Zellen wurden verwendet, weil es sich bei ihnen um ein etabliertes Modell für adhärenente Alveolarepithelzellen handelt. Sie wurden mit Dulbecco's Modified Eagle Medium kultiviert, das 1% Penicillin/Streptomycin (beides: Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) und 10% (v/v) hitzeinaktiviertes (56°C für 30 Minuten (min)) Fetal Calf Serum (FCS) (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland) enthielt. Für das Starving während der Versuche wurde das Kulturmedium auf 0,5% FCS reduziert. Die Zellen inkubierten bei einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen/mL ( $2 \times 10^6$  Zellen + 20 mL Kulturmedium) in Zellkultur-Flaschen (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) im Brutschrank (Heraeus Holding, Hanau, Deutschland) bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub>. Zweimal pro Woche wurden die Zellen gesplittet. Das alte Medium wurde abgenommen und die Zellen mit 20 mL Dulbecco's Phosphate Buffered

Saline (PBS) (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) gewaschen. Abgelöst wurden die Zellen zur Zellpflege mit 3 mL Trypsin-EDTA (0,25%) (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) für 2 min bei 37°C im Brutschrank oder für die Experimente mit 4 mL Accutase™ Cell Detachment Solution (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland) für 15 min bei 37°C im Brutschrank, bevor 16 mL bzw. 17 mL 10% FCS-haltiges Medium zum Abstoppen hinzugegeben wurde. Bei 250 g wurden die Zellen für 5 min zentrifugiert (Heraeus Sepatech Varifuge 3, Heraeus Holding, Hanau, Deutschland) und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert und die Zellzahl durch Anfärben mit 0,2% Trypanblau 1:5 (v/v) (Merck, Darmstadt, Deutschland) in einer Neubauerzählkammer (Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland bzw. LO - Laboroptik Ltd, Lancing, United Kingdom) bestimmt. Für die Versuche wurde Passage drei bis fünf der Zellkultur verwendet.

### **2.2.2 Die Untersuchung der Zellviabilität**

Zur Beurteilung der Zellviabilität wurde ein XTT-Test (2,3-Bis-[2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulphophenyl]-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) mit dem Cell Proliferation Kit XTT (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Dabei wird die wasserlösliche Tetrazolium-Form des XTT-Reagenzes in Abhängigkeit der Reduktionsfähigkeit der Zelle in die ebenfalls wasserlösliche Formazan-Form umgewandelt. Aufgrund unterschiedlicher Absorptionsspektren der Tetrazolium- und Formazan-Form ließ sich die Absorption unmittelbar bei 450 nm mithilfe des Absorptions-Mikroplatten-Readers Tecan infinite F50 (Tecan Deutschland, Crailsheim, Deutschland) detektieren. Dieser Test ermöglicht eine Korrelation zwischen metabolischer Reduktion, die u.a. durch die mitochondriale Dehydrogenase verursacht wird, und der Zellviabilität. Dafür adhärirten  $0,25 \times 10^5$  Zellen 24 Stunden in 96-Well-Platten (Corning, Kaiserslautern, Deutschland). Am zweiten Tag folgte die Inkubation mit EPA, DHA, GLA oder SDA (alle: Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland) bzw. dem LCPUFA-Mix für weitere 24 Stunden. Am dritten Tag wurden die Zellen 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen des Cytokinmixes (CM), bestehend aus Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), IL-1 $\beta$  (beide: PeproTech, Hamburg,

Deutschland) und TNF- $\alpha$  (ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland), stimuliert. Die CM-Konzentrationen setzten sich wie folgt zusammen: CM1 (IFN- $\gamma$ : 1 - 100 U/mL; IL-1 $\beta$ : 0,125 - 12,5 U/mL; TNF- $\alpha$ : 0,05 - 5 ng/mL), CM2 (IFN- $\gamma$ : 10 U/mL; IL-1 $\beta$ : 1,25 U/mL; TNF- $\alpha$ : 0,5 ng/mL) und CM3 (IFN- $\gamma$ : 1 U/mL; IL-1 $\beta$ : 0,125 U/mL; TNF- $\alpha$ : 0,05 ng/mL). Am vierten Versuchstag inkubierten die Zellen mit der XTT-Lösung für 3 Stunden. Anschließend wurde die Zellproliferation über die Quantifizierung des Formazansalzes mithilfe des Plattenlesegeräts bestimmt.

### **2.2.3 Der Cytometric Bead Array**

Der Cytometric Bead Array (CBA) bietet die Möglichkeit, Cytokine, als Ausdruck der inflammatorischen Reaktion der Alveolarepithelzellen, mittels Durchflusszytometrie zu bestimmen. Antikörper-beschichtete Beads (BD FACSuite™ CS&T Research Beads, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland), welche mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, ermöglichen die Quali- und Quantifizierung der Cytokine. Vor der Messung der Proliferation der A549-Zellen, wurden am vierten Versuchstag Überstände für den CBA abgenommen. Zur Messung der IL-6-Konzentration im Überstand der Zellkultur wurden das BD CBA Human Soluble Protein Master Buffer Kit und CBA Human IL-6 Flex Set (beide: BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Die Durchführung erfolgt nach Anleitung des Herstellers.

### **2.2.4 Die Inkubation mit Fettsäuren**

Für die Experimente wurden die A549-Zellen mit Einzelfetten (EPA, DHA, GLA oder SDA) sowie einem LCPUFA-Mix inkubiert, und deren Aufnahme in die Zellen mittels Gaschromatographie (GC) bestimmt. Die Fette wurden den Zellen über das Kulturmedium zur Verfügung gestellt. Es wurden  $5 \times 10^5$  Zellen/mL auf 6-Well-Platten (TC-Platte 6 Well, Standard, F, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) bzw.  $0,25 \times 10^5$  Zellen/mL auf 96-Well-Platten ausgesät. Nach 24 Stunden Adhäsionszeit wurde das Medium von 10% auf 0,5% FCS-haltiges Medium reduziert. In einem Eppendorf Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurde eine Lösung aus Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma-

Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland) und PBS (99 mg/mL, w/v) bei 50°C für 3 min vorbereitet. Danach wurde pro Well entweder 24 µL BSA-PBS-Lösung mit 1 µL Ethanol 100% (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland) oder mit 1 µL der entsprechenden Fette in einem Verhältnis 1:20 (BSA-Moleküle: Fettsäure-Moleküle) hinzugegeben. Von den Einzelfettsäuren EPA/DHA/GLA wurden 2 pmol/Zelle oder SDA 0,2 pmol/Zelle hinzugefügt und jeweils eine 1:10 und 1:100 Verdünnung hergestellt. Alternativ wurde ein LCPUFA-Mix aus EPA 0,116 pmol/Zelle und jeweils DHA/GLA/SDA 0,028 pmol/Zelle verwendet, sodass die Zellen, die mit dem LCPUFA-Mix inkubiert wurden, in der Summe auch mit 0,2 pmol/Zelle an Fettsäuren supplementiert wurden. Dies entspricht der 1:10-Verdünnung der Einzelfettsäuren. Die Inkubation mit den Fetten erfolgte für 24 Stunden. Von allen Proben wurde am dritten Tag der Überstand kollektiert und bei -80°C eingefroren. Unstimulierte Proben wurden mit 500 µL Accutase™ Cell Detachment Solution für 15 min im Brutschrank bei 37°C abgelöst, wobei die Ablösungsreaktion mit 1500 µL Medium abgestoppt wurde. Um ein Zellpellet zu erhalten, wurden die Zellen in Eppendorf-Gefäße (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt und 10 min bei 10000 rpm zentrifugiert (Heraeus Biofuge Fresco, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet ebenfalls bei -80°C eingefroren. Die stimulierten Proben wurden nach der Fettinkubation mit 1 mL PBS gewaschen und für 24 Stunden mit CM1 (IFN-γ: 400 U/mL; IL-1β: 50 U/mL; TNF-α: 20 ng/mL) stimuliert. Am vierten Tag wurden Überstand und Zellpellet, wie oben beschrieben, für die gaschromatographische Messung kollektiert.

Tabelle 5: Konzentrationen des LCPUFA-Mixes und der Einzelfettsäuren

Messungen	LCPUFA-Mix	Einzelfettsäuren (entsprechend EPA/DHA/GLA, für SDA jeweils x 10 <sup>-1</sup> )		
		Hoch (high)	Mittel (mid)	Niedrig (low)
XTT/CBA	25 µmol/L ± 0,2 pmol/Zelle (0,116 pmol/Zelle EPA und jeweils 0,028 pmol/Zelle DHA/GLA/SDA	250 µmol/L ± 2 pmol/Zelle	25 µmol/L ± 0,2 pmol/Zelle	2,5 µmol/L ± 0,02 pmol/Zelle
GC/COX-2	100 µmol/L ± 0,2 pmol/Zelle (0,116 pmol/Zelle EPA und jeweils 0,028 pmol/Zelle DHA/GLA/SDA	1.000 µmol/L ± 2 pmol/Zelle	100 µmol/L ± 0,2 pmol/Zelle	10 µmol/L ± 0,02 pmol/Zelle

### 2.2.5 Die Durchführung der Gaschromatographischen Messung

Die GC-Messung wurde verwendet, um zu überprüfen, ob und in welcher relativen Konzentration die Fette von den A549-Zellen aufgenommen wurden.

Der Überstand (1 mL) oder das in 1 mL PBS resuspendierte Zellpellet (ungefähr 5 x 10<sup>5</sup> Zellen/mL) wurde in ein Reagenzglas pipettiert. Angelehnt an die Probenvorschrift von Bligh und Dyer (1959) wurden alle Proben identisch aufbereitet.[72] Nacheinander wurden 4 mL einer Chloroform-Methanol-Lösung 1:2 (v/v) (beide: Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland), 1,5 mL Chloroform und 1,5 mL deionisiertes Wasser hinzupipettiert. Nach jedem dieser

Schritte erfolgte eine Resuspension mittels Vortexer. Danach wurde für 20 min bei 3000 rpm und 18°C in einer Labofuge 400R (Heraeus Holding, Hanau, Deutschland) zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde verworfen und mit der organischen Phase weitergearbeitet. Es folgte eine Abdampfung der Lösemittel in einem Evaporator (Liebisch Labortechnik, Bielefeld, Deutschland) mittels Stickstoff (ALPHAGAZ™ 1, Air Liquide Deutschland, Düsseldorf, Deutschland).

Die extrahierten Fettsäuren wurden in Anlehnung an Kohn et al. zu Fettsäuremethylestern (FAME) derivatisiert, indem 1 mL Petroleum-Ether (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland) und 50 µL Natriummethylatlösung (2 mol/L NaOCH<sub>3</sub> in Methanol, beides: Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland) zugegeben wurden und anschließend 30 Sekunden (sec) lang mit einem Vortexer in eine Mischphase gebracht wurden. [73] Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden zu jeder Probe 100 mg Calciumchlorid (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland) hinzugegeben und nochmals 30 sec gevortext. Auf diese Inkubation folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 3000 rpm und 18°C mit anschließender Überführung der oberen Phase in ein Einwegkulturröhrchen (Soda-Limes 12 x 100 mit Schraubdeckel, Duran Group, Weinheim/Main, Deutschland).

Das enthaltene Lösemittel wurde erneut im Evaporator mittels Stickstoff abgedampft und die Probe zur Messung in 500 µL Hexan (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland) gelöst. Das Lösen der FAMEs in Hexan wurde gewährleistet, indem die Röhrchen zunächst 15 min bei Raumtemperatur in ein Ultraschallbad (Elma Transsonic T 700/H Ultraschallreiniger, Elma Schmidbauer, Singen, Deutschland) und anschließend für 15 min bei 18°C und 300 rpm in einem Thermoblock (MKR 13, HLC BioTech, Bovenden, Deutschland) gelöst wurden. Die Lösung wurde in Vials (Flaschen mit Kurzgewinde ND9, 11,6 x 32 mm, 1,5 mL, VWR International, Darmstadt, Deutschland) überführt.

Zur gaschromatographischen Untersuchung wurde ein TRACE 1300 Gaschromatograph (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland)

verwendet. Je 1 µL Probenmaterial wurde mit Hilfe des Autosamplers AS1310 (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) mit dem TRACE 1300 GC SSL-Injektor Modul (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) in die GC-Apparatur injiziert. Die Analyse erfolgte mit dem TRACE 1300 GC FID-Detektor Modul (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland). Als Trägergas wurde Helium mit einem konstanten Fluss von 1,5 mL/min eingesetzt. Zur Auftrennung der FAMES wurde eine TRACE TR-FAME GC-Säule (Länge: 60 m, Innendurchmesser: 0,22 mm, Film: 0,25 µm; Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) verwendet. Das Temperaturprogramm des Ofens ist der Tabelle 6 zu entnehmen.

*Tabelle 6: Temperaturprogramm des GC-Ofens*

<b>Phase</b>	<b>Zeit [min]</b>	<b>Rate [°C/min]</b>	<b>Solltemperatur [°C]</b>	<b>Haltezeit [min]</b>
Start	0,0			
1	0,5	0	60	0,5
2	5,5	40	180	2,0
3	23,5	2	210	3,0
4	43,5	3	240	10,0
Ende	44,0			

Zur Auswertung der Chromatogramme wurde die Chromeleon 7.2 Software (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) genutzt. Die FAMES wurden durch Vergleich mit den Retentionszeiten des Supelco 37-Komponenten-FAME-Mixes (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland) den entsprechenden Fettsäuren zugeordnet.

Die GC-Messung erfolgte an der Hochschule Fulda (University of Applied Sciences, Leipziger Straße 123, 36037 Fulda, Germany).

### **2.2.6 Die Messung der Oberflächenantigene**

Die Messung der Oberflächenantigene erfolgte mit dem Durchflusszytometer BD FACSVerse™ (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland), um eine Charakterisierung der Zellkultur vorzunehmen.  $1 \times 10^6$  Zellen/100 µL wurden in

Falcon-Röhrchen (Corning, Kaiserslautern, Deutschland) überführt. Es folgte ein Waschschrift mit 1 mL PBS (250 g für 5 min). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit jeweils 5  $\mu$ L Antikörper für 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Charakterisierung der Zelllinie wurden folgende Antikörper verwendet: anti-CD40-PerCP-Cy 5,5 (BioLegend, Koblenz, Deutschland), Anti-CD54-FITC (BioLegend, Koblenz, Deutschland), Anti-CD58-PE (BioLegend, Koblenz, Deutschland), Anti-CD80-FITC (Immunotech, Marseille, Frankreich), Anti-CD86-FITC (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland), Anti-CD326/epitheliales Zelladhäsionsmolekül-APC (EPCAM) (BioLegend, Koblenz, Deutschland), Anti-humanes Leukozyten Antigen DR-PerCP-Cy 5,5 (HLA-DR) (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland), Anti-Surface Protein C-A647 (SPC) (polyklonal) (Bioss, Woburn, Massachusetts, USA), Anti-Toll-like Rezeptor 4-PE (TLR4) (BioLegend, Koblenz, Deutschland). Die ungebundenen Antikörper wurden durch einen Waschschrift mit 2 mL PBS entfernt. Zur Messung mit dem BD FACSVerse™ wurden die Zellen in 300  $\mu$ L PBS gelöst und gemäß Anleitung von BD gemessen. Es wurden pro Analyse 1 x 10<sup>4</sup> Zellen aufgenommen. Die Daten wurden mithilfe der BD FACSuite™ software (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) analysiert.

### **2.2.7 Intrazelluläre Cyclooxygenase-2-Messung**

Die Inkubation mit den Einzelfetten bzw. dem LCPUFA-Mix erfolgte wie oben beschrieben. Nach den 24 Stunden Inkubation wurden die A549-Zellen mit Ausnahme der Negativkontrolle für 4 Stunden mit CM1 (IFN- $\gamma$ : 400 U/mL, IL-1 $\beta$ : 50 U/mL, TNF- $\alpha$ : 20 ng/mL) stimuliert. Nach der Stimulationszeit wurden sie mit 500  $\mu$ L Accutase™ Cell Detachment Solution für 15 min im Brutschrank bei 37°C abgelöst und mit 1500  $\mu$ L Medium abgestoppt. In Falcon-Röhrchen überführt wurden sie 6 min bei 600 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgten Waschschriffe mit 2 mL PBS und 2,5 mL Stain Buffer (PBS mit 1% FCS) sowie die Inkubation mit 2 mL BD FACS Lysing Solution (1x). Mit der BD FACS Lysing Solution (1x) mit 0,2% Saponin wurden die Zellen für 10 min mit 2 mL bzw. 0,5 mL bei Raumtemperatur im Dunkeln permeabilisiert. Mit 2 mL einer Lösung aus PBS mit 1% FCS und 0,1% Natriumazid wurden die Zellen vor der intrazellulären Färbung versetzt und anschließend gewaschen. Nach einem

Zentrifugationsschritt für 6 min bei 600 g wurde der Überstand verworfen. In einem Restvolumen von ca. 50 µL inkubierten die Zellen mit 5 µL Anti-COX-2-PE (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) für 30 min. Zur Messung der intrazellulären COX-2 wurden die Zellen in 400 µL PBS gelöst und mit dem BD FACSVerser™ gemäß Anleitung gemessen.

### **2.2.8 Statistische Auswertung**

Die gezeigten Daten stellen den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) dar. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit Hilfe von GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, USA). Um zwei unabhängige Stichproben miteinander zu vergleichen, wurde ein zweiseitiger Wilcoxon-Mann-Whitney-Test oder ein Zweistichproben-t-Test auf einen Mittelwertunterschied verwendet. Ab drei zu vergleichenden Stichproben wurde eine einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni Post-hoc-Test angewandt. Nur bei der CBA-Messung nach Stimulation und Inkubation mit Einzelfettsäuren bzw. dem LCPUFA-Mix wurde eine einfaktorielle ANOVA mit Dunnett Post-hoc-Test verwendet, bei der alle Spalten gegen die Kontrollspalte Ethanol mit Cytokinmix 1 (EtOH + CM1) getestet wurden. Bei allen Tests galt ein p-Wert  $< 0,05$  als statistisch signifikant.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Die Oberflächencharakterisierung der A549-Zellen mittels Durchflusszytometrie

Die immunologische Charakterisierung der A549-Zellen erfolgte anhand ihrer Oberflächenantigene mittels Durchflusszytometrie. Die Zellen exprimierten CD40 zu  $97,12\% \pm 1,34$ , CD54 zu  $97,99\% \pm 0,69$ , CD58 zu  $100,00\% \pm 0,00$ , CD80 zu  $99,90\% \pm 0,04$ , CD86 zu  $99,93\% \pm 0,03$ , CD326 zu  $83,48\% \pm 1,36$ , HLA-DR zu  $99,63\% \pm 0,03$ , SPC zu  $97,22\% \pm 0,33$  und TLR4 zu  $41,94\% \pm 1,14$  (Abb. 5).

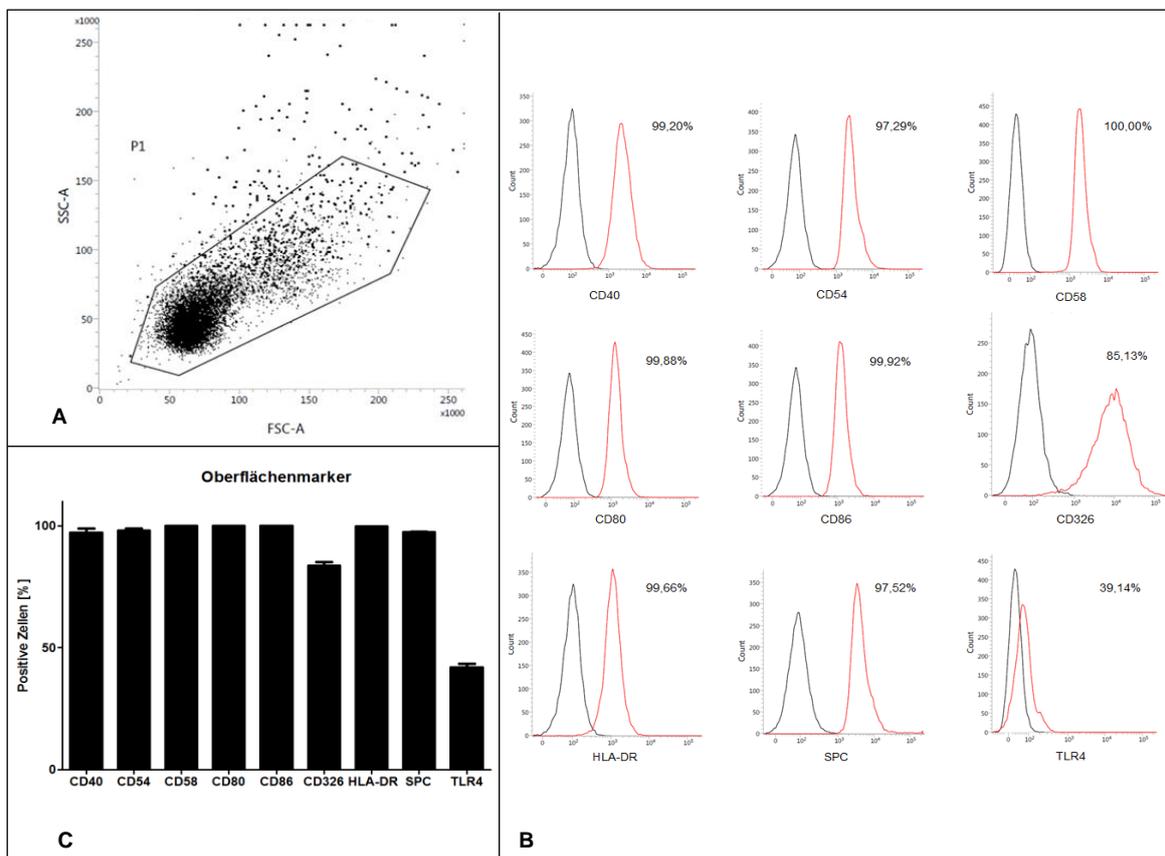


Abbildung 5: A) Größe und Granularitätsmessung der A549 Zellen. B) Expression spezifischer Oberflächenmarker auf den A549-Zellen. Die Histogramme repräsentieren eine aus drei Messungen. C) Expression der Oberflächenmarker,  $n = 3$ .

### **3.2 Gaschromatographische Bestimmung des Fettprofils in der Zellmembran**

Die Inkubation der A549-Zellen mit Fettsäuren führte zu einem veränderten Fettsäureprofil der Zellen und ist im Folgenden dargestellt. Die gezeigten Daten beziehen sich alle auf das Zellpellet. Nach 24 Stunden waren im Überstand keine Fettsäuren mehr vorhanden, was auf einen vollständigen Einbau der Fettsäuren in die Zellmembran hindeutet.

#### **3.2.1 EPA-Inkubation**

Die Inkubation mit steigenden EPA-Konzentrationen zeigte einen zunehmenden Anstieg des prozentualen EPA- und DPA-Anteils in der Membran der A459-Zellen sowie einen Abfall des AA-Anteils.

Die mittlere EPA-Konzentration (0,2 pmol/Zelle) steigerte den EPA- (von 0,95%  $\pm$  0,37 auf 8,52%  $\pm$  0,11,  $p < 0,001$ ) und den DPA-Anteil (von 0,60%  $\pm$  0,07 auf 6,75%  $\pm$  0,03,  $p < 0,001$ ) der Zellen hoch signifikant im Vergleich zur Negativkontrolle.

Im Verhältnis zur Negativkontrolle führte die höchste EPA-Konzentration (2 pmol/Zelle) jeweils zu einer hoch signifikanten Erhöhung der EPA- (von 0,95%  $\pm$  0,37 auf 16,13%  $\pm$  1,22,  $p < 0,001$ ) und DPA-Anteile (von 0,60%  $\pm$  0,07 auf 12,67%  $\pm$  0,84,  $p < 0,001$ ) in der Zellmembran. Darüber hinaus senkte die höchste EPA-Konzentration (2 pmol/Zelle) auch noch sehr signifikant den AA-Anteil (von 5,72%  $\pm$  0,09 auf 3,46%  $\pm$  0,13,  $p < 0,01$ ) verglichen mit der Negativkontrolle.

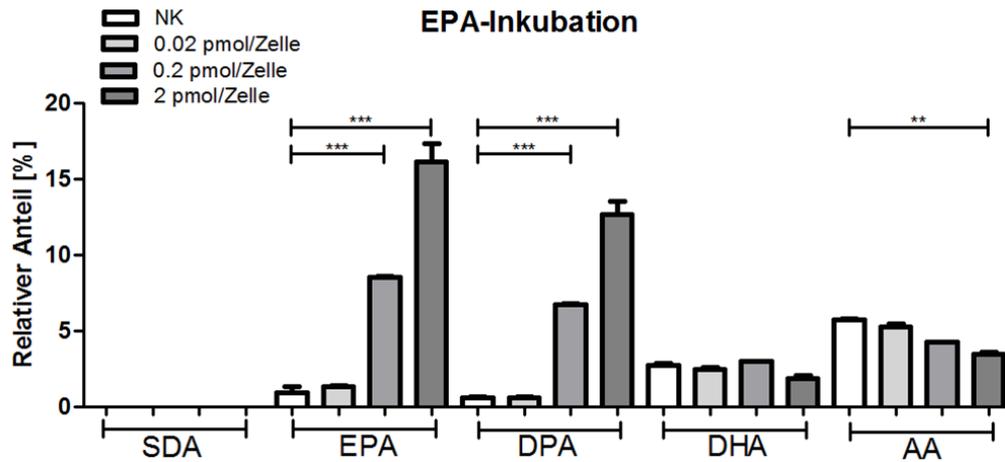


Abbildung 6: Gaschromatographische Bestimmung nach Inkubation mit Eicosapentaensäure (EPA). Die A549-Zellen wurden mit Ethanol und der Einzel-Fettsäure inkubiert: EPA (0,02; 0,2; 2 pmol/Zelle). Negativkontrolle (NK). Ergebnisse sind als Mean  $\pm$  SEM dargestellt;  $n = 3$ . Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als signifikant bestimmt, wenn \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.2.2 DHA-Inkubation

Alle drei DHA-Konzentrationen steigerten den DHA-Anteil in den Zellen signifikant, aber erst die beiden höheren Konzentrationen zeigten auch einen statistisch nachweisbaren Effekt auf die AA in der Zellmembran.

Bei der DHA-Inkubation steigerte bereits die niedrigste DHA-Konzentration (0,02 pmol/Zelle) den DHA-Anteil in der Membran (von 2,75% ± 0,08 auf 7,55% ± 0,49,  $p < 0,001$ ) hoch signifikant im Vergleich zur Negativkontrolle.

Die mittlere DHA-Konzentration (0,2 pmol/Zelle) steigerte den DHA-Anteil (von 2,75% ± 0,08 auf 21,78% ± 0,10,  $p < 0,001$ ) hoch signifikant und senkte den AA-Anteil (von 5,72% ± 0,09 auf 3,65% ± 0,06,  $p < 0,001$ ) der Zellen hoch signifikant im Vergleich zur Negativkontrolle.

Im Verhältnis zur Negativkontrolle führte die höchste DHA-Konzentration (2 pmol/Zelle) zu einer hoch signifikanten Erhöhung des DHA-Anteils (von 2,75% ± 0,08 auf 45,90% ± 0,99,  $p < 0,001$ ) in der Zellmembran. Die höchste DHA-Konzentration (2 pmol/Zelle) erzielte eine hoch signifikante Senkung des AA-Anteils bezogen auf die Negativkontrolle (von 5,72% ± 0,09 auf 2,62% ± 0,13,  $p < 0,001$ ).

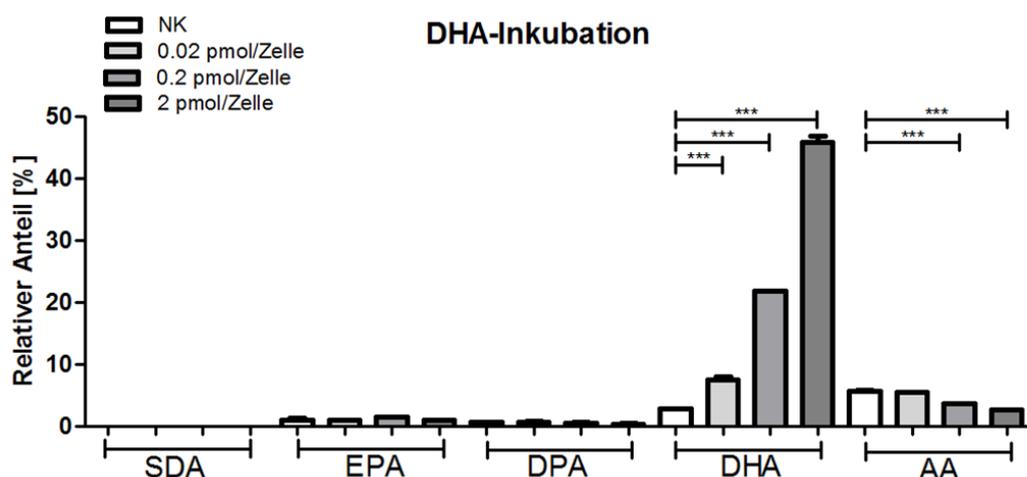


Abbildung 7: Gaschromatographische Bestimmung nach Inkubation mit Docosahexaensäure (DHA). Die A549-Zellen wurden mit Ethanol und der Einzel-Fettsäure inkubiert: DHA (0,02; 0,2; 2 pmol/Zelle). Negativkontrolle (NK).

Ergebnisse sind als Mean ± SEM dargestellt;  $n = 3$ . Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als signifikant bestimmt, wenn  $*** p < 0,001$ .

### 3.2.3 GLA-Inkubation

Lediglich die höchste GLA-Konzentration (2 pmol/Zelle) führte zu einer signifikanten Erhöhung des GLA-Anteils verglichen mit der Negativkontrolle (von 0,41% ± 0,41 auf 26,50% ± 16,17,  $p < 0,05$ ).

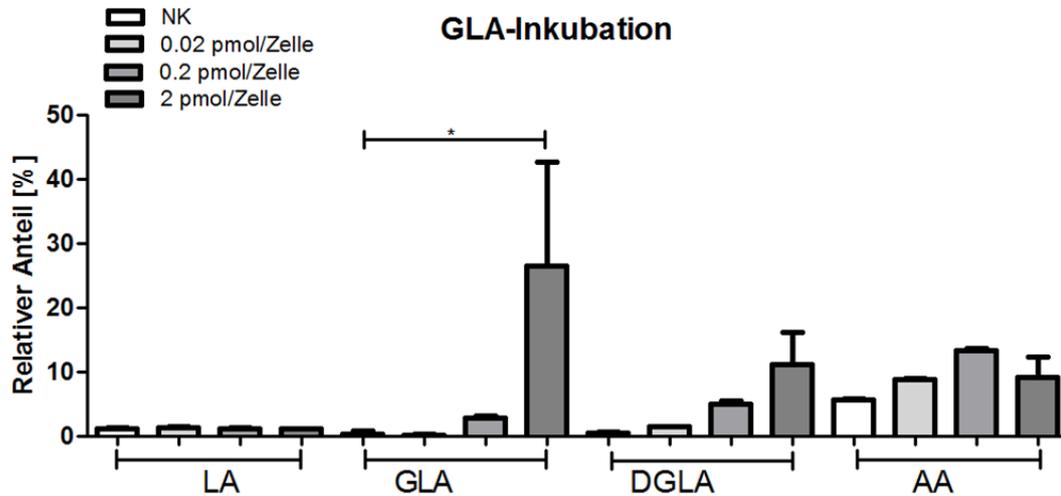


Abbildung 8: Gaschromatographische Bestimmung nach Inkubation mit Gamma-Linolensäure (GLA). Die A549-Zellen wurden mit Ethanol und der Einzel-Fettsäure inkubiert: GLA (0,02; 0,2; 2 pmol/Zelle). Negativkontrolle (NK). Ergebnisse sind als Mean ± SEM dargestellt;  $n = 3$ . Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als signifikant bestimmt, wenn \*  $p < 0,05$ .

### 3.2.4 SDA-Inkubation

Alleine die höchste SDA-Konzentration führte zu einer deutlichen Änderung des Fettsäure-Profiles in den A549-Zellen.

Im Verhältnis zur Negativkontrolle führte die höchste SDA-Konzentration (0,2 pmol/Zelle) zu einer hoch signifikanten Erhöhung des SDA-Anteils in der Zellmembran (von 0,00% ± 0,00 auf 7,25% ± 1,58,  $p < 0,001$ ).

Im Verhältnis zur Negativkontrolle führte die höchste SDA-Konzentration (0,2 pmol/Zelle) zu einer hoch signifikanten Erhöhung des EPA-Anteils in der Zellmembran (von 0,95% ± 0,37 auf 12,57% ± 0,61,  $p < 0,001$ ).

Im Verhältnis zur Negativkontrolle führte die höchste SDA-Konzentration (0,2 pmol/Zelle) zu einer hoch signifikanten Erhöhung des DPA-Anteils in der Zellmembran (von 0,60% ± 0,07 auf 4,95% ± 0,17,  $p < 0,001$ ).

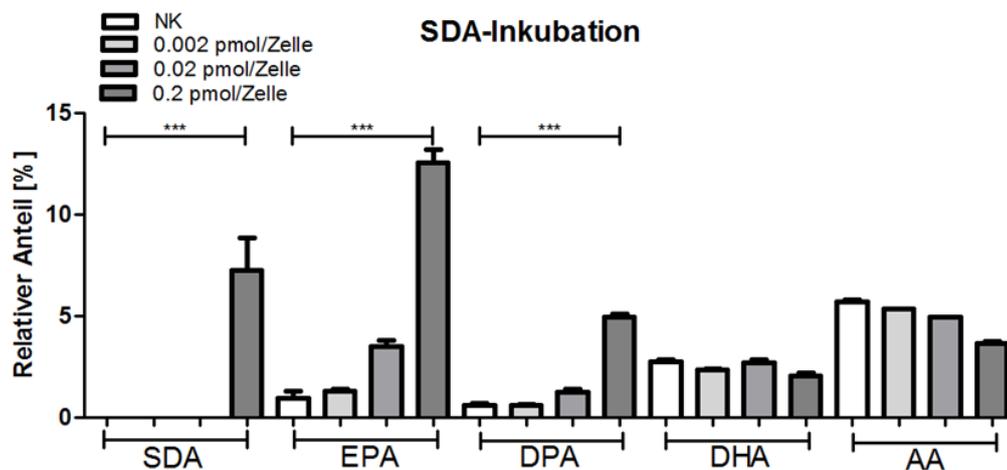


Abbildung 9: Gaschromatographische Bestimmung nach Inkubation mit Stearidonsäure (SDA). Die A549-Zellen wurden mit Ethanol und der Einzel-Fettsäure inkubiert: SDA (0,002; 0,02; 0,2 pmol/Zelle). Negativkontrolle (NK). Ergebnisse sind als Mean ± SEM dargestellt;  $n = 3$ . Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als signifikant bestimmt, wenn \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.2.5 LCPUFA-Mix-Inkubation

Hier wurde der Einfluss des LCPUFA-Mixes (0,2 pmol/Zelle: 0,116 pmol/Zelle EPA und je 0,028 pmol/Zelle DHA; GLA; SDA) auf das Fettsäureprofil betrachtet und dem Fettsäureprofil der unbehandelten A549-Zellen gegenüber gestellt.

Die Inkubation über 24 Stunden mit dem LCPUFA-Mix (0,2 pmol/Zelle: 0,116 pmol/Zelle EPA und je 0,028 pmol/Zelle DHA; GLA; SDA) steigerte den GLA- (von 0,54% ± 0,01 auf 7,06% ± 0,22,  $p < 0,001$ ), DGLA- (von 1,31% ± 0,01 auf 10,75% ± 0,23,  $p < 0,001$ ), SDA- (von 0,00% ± 0,00 auf % 1,47 ± 0,06,  $p < 0,001$ ), EPA- (von 0,43% ± 0,02 auf 13,43% ± 0,27,  $p < 0,001$ ), DPA- (von 0,48% ± 0,01 auf 7,57% ± 0,21,  $p < 0,001$ ) und DHA-Anteil (von 1,26% ± 0,01 auf 3,53% ± 0,06,  $p < 0,001$ ) der Zellmembran hoch signifikant. Der LA-Anteil (von 7,34% ± 0,07 auf 6,50% ± 0,13,  $p < 0,01$ ) konnte sehr signifikanter gesenkt werden. Außerdem konnte der AA-Anteil (von 19,14% ± 0,08 auf 9,26% ± 0,14,  $p < 0,001$ ) der Zellen hoch signifikant reduziert werden.

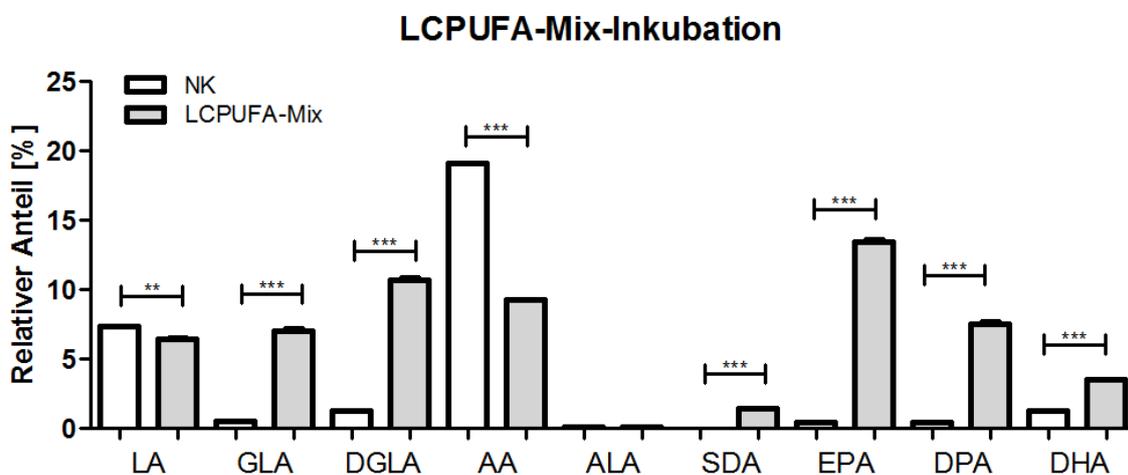


Abbildung 10: Gaschromatographische Bestimmung nach Inkubation mit LCPUFA-Mix. Die A549-Zellen wurden mit Ethanol und LCPUFA-Mix inkubiert: LCPUFA-Mix (0,2 pmol/Zelle: 0,116 pmol/Zelle EPA und je 0,028 pmol/Zelle DHA; GLA; SDA). Negativkontrolle (NK). Ergebnisse sind als Mean ± SEM dargestellt;  $n = 3$ . Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als signifikant bestimmt, wenn \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.2.6 Einfluss der LCPUFA auf die Inflammation

Um die Auswirkungen des LCPUFA-Mixes (0,2 pmol/Zelle: 0,116 pmol/Zelle EPA und je 0,028 pmol/Zelle DHA; GLA; SDA) auf die Inflammation zu untersuchen, wurde CM1 (IFN- $\gamma$ : 400 U/mL; IL-1 $\beta$ : 50 U/mL; TNF- $\alpha$ : 20 ng/mL) zur Stimulation verwendet und die GC-Ergebnisse nebeneinander dargestellt.

Durch die 24-stündige Stimulation mit CM1 (IFN- $\gamma$ : 400 U/mL; IL-1 $\beta$ : 50 U/mL; TNF- $\alpha$ : 20 ng/mL) wurde der LA- (von 6,50%  $\pm$  0,13 auf 0,84%  $\pm$  0,04,  $p < 0,001$ ), GLA- (von 7,06%  $\pm$  0,22 auf 1,11%  $\pm$  0,01,  $p < 0,001$ ), DGLA- (von 10,75%  $\pm$  0,23 auf 1,46%  $\pm$  0,06,  $p < 0,001$ ), AA- (von 9,26%  $\pm$  0,14 auf 3,08%  $\pm$  0,08,  $p < 0,001$ ), SDA- (von 1,48%  $\pm$  0,06 auf 0,33%  $\pm$  0,02,  $p < 0,001$ ), EPA- (von 13,43%  $\pm$  0,27 auf 6,57%  $\pm$  0,07,  $p < 0,001$ ) und DPA-Anteil (von 7,57%  $\pm$  0,21 auf 5,10%  $\pm$  0,05,  $p < 0,001$ ) hoch signifikant reduziert verglichen mit der alleinigen Inkubation mit LCPUFA-Mix (0,2 pmol/Zelle: 0,116 pmol/Zelle EPA und je 0,028 pmol/Zelle DHA; GLA; SDA). Als einzige Ausnahme erhöhte sich der DHA-Anteil (von 3,53%  $\pm$  0,06 auf 5,47%  $\pm$  0,06,  $p < 0,001$ ) hoch signifikant unter Einfluss des CM1 (IFN- $\gamma$ : 400 U/mL; IL-1 $\beta$ : 50 U/mL; TNF- $\alpha$ : 20 ng/mL).

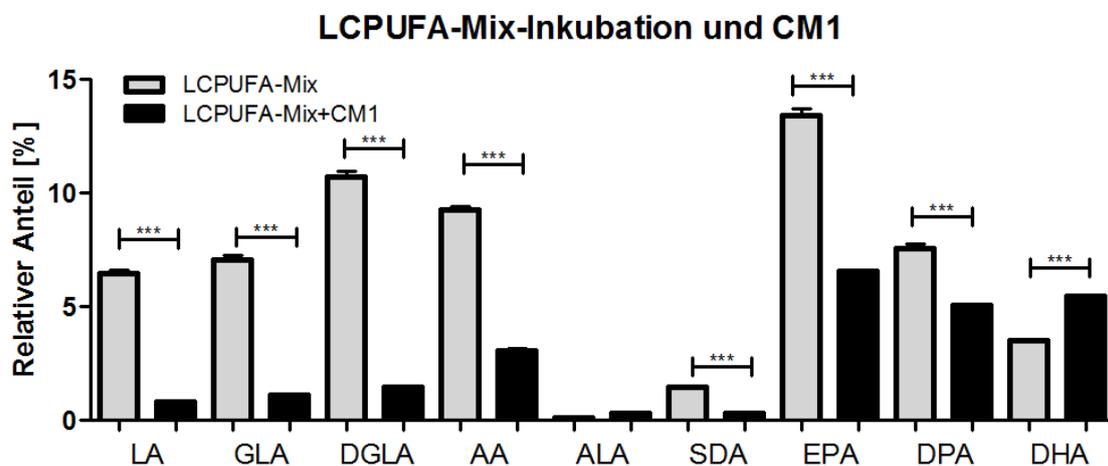


Abbildung 11: Gaschromatographische Bestimmung nach Inkubation mit LCPUFA-Mix und Cytokinmix 1 (CM1). Die A549-Zellen wurden mit Ethanol, LCPUFA-Mix und CM1 inkubiert: LCPUFA-Mix (0,2 pmol/Zelle: 0,116 pmol/Zelle EPA und je 0,028 pmol/Zelle DHA; GLA; SDA) und CM1 (IFN- $\gamma$ : 400 U/mL; IL-1 $\beta$ : 50 U/mL; TNF- $\alpha$ : 20 ng/mL). Ergebnisse sind als Mean  $\pm$  SEM dargestellt;  $n = 3$ . Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als signifikant bestimmt, wenn \*\*\*  $p < 0,001$ .

### **3.3 Ermittlung des Einflusses der LCPUFA auf die Zellviabilität mittels XTT-Test**

#### **3.3.1 Bestimmung des Einflusses einzelner LCPUFA auf die Zellviabilität**

Um den Einfluss einzelner LCPUFA auf die Zellviabilität der A549-Zellen zu untersuchen, wurde ein XTT-Test durchgeführt. Ethanol wurde eingesetzt, um eine Aufnahme der Fettsäuren in die Zellen zu gewährleisten. Deshalb sollte ausgeschlossen werden, dass Ethanol zu einer messbaren Einschränkung der Zellviabilität unabhängig von der LCPUFA-Inkubation führt. Der XTT-Test zeigte, dass nach 24 Stunden bei einer alleinigen Ethanol-Inkubation keine Einschränkung der Zellviabilität festgestellt werden konnte.

Die niedrigen und mittleren eingesetzten Konzentrationen der Fettsäuren (bei EPA, DHA sowie GLA 0,02 pmol/Zelle und 0,2 pmol/Zelle und bei SDA 0,002 pmol/Zelle und 0,02 pmol/Zelle) führten zu keiner signifikanten Änderung der Zellviabilität.

Die höchste EPA-Konzentration (2 pmol/Zelle) führte zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität (von 100,00%  $\pm$  0,00 auf 74,29%  $\pm$  6,82,  $p < 0,01$ ). Die jeweils höchste Konzentration von DHA (von 100,00%  $\pm$  0,00 auf 25,28%  $\pm$  4,30,  $p < 0,001$ ), GLA (von 100,00%  $\pm$  0,00 auf 43,33%  $\pm$  3,45,  $p < 0,001$ ) (jeweils 2 pmol/Zelle) und SDA (von 100,00%  $\pm$  0,00 auf 76,54%  $\pm$  3,71,  $p < 0,001$ ) (0,2 pmol/Zelle) schränkte die Zellviabilität sogar hoch signifikant ein. Die niedrigeren Fettsäure-Konzentrationen von EPA, DHA, GLA (jeweils 0,02 pmol/Zelle und 0,2 pmol/Zelle) und SDA (0,002 pmol/Zelle und 0,02 pmol/Zelle) dagegen zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Zellviabilität im Vergleich zu den unbehandelten A549-Zellen.

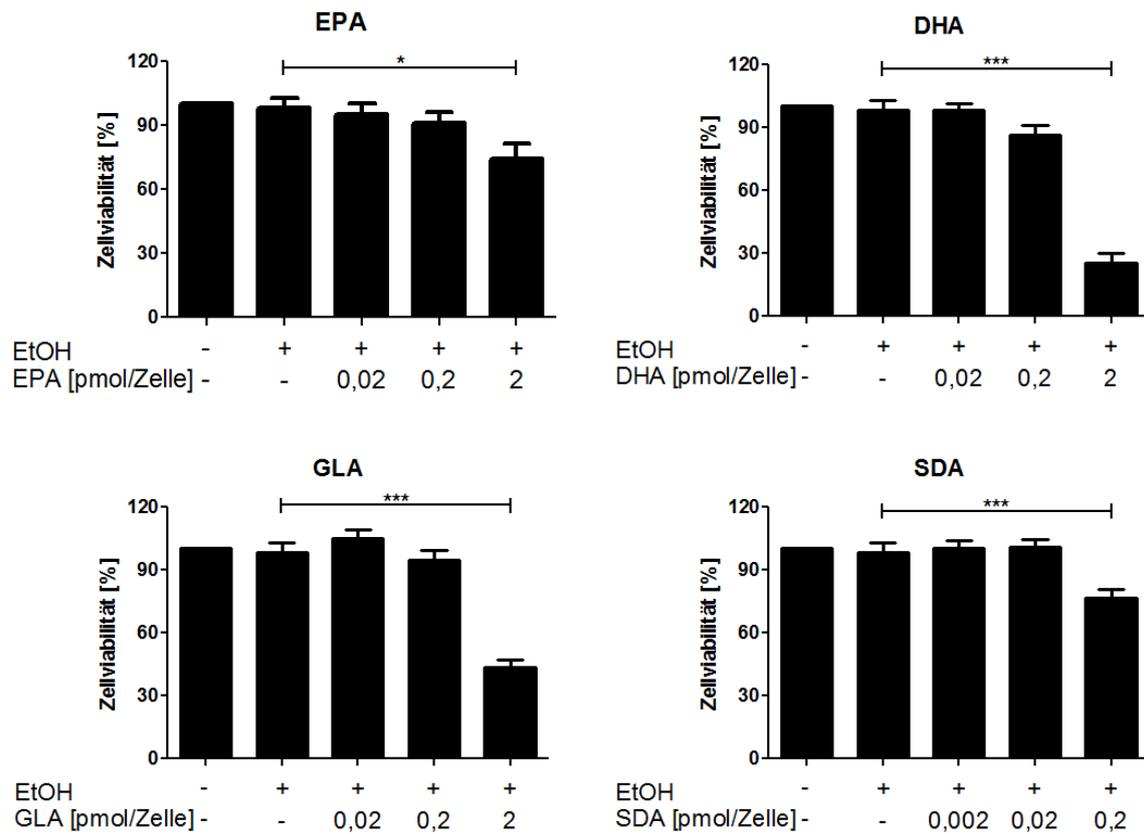


Abbildung 12: Messung der Zellviabilität mittels XTT-Test. Die A549-Zellen wurden mit Ethanol (EtOH) und den Einzel-Fettsäuren inkubiert: EPA/DHA/GLA (0,02; 0,2; 2 pmol/Zelle) und SDA (0,002; 0,02; 0,2 pmol/Zelle). Ergebnisse sind als Mean  $\pm$  SEM dargestellt;  $n = 3$ . Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als signifikant bestimmt, wenn \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.3.2 Bestimmung des Einflusses des LCPUFA-Mixes auf die Zellviabilität

Weder die alleinige Behandlung mit Ethanol noch die Inkubationen mit dem LCPUFA-Mix zusätzlich zu Ethanol zeigten in der Zellviabilität einen signifikanten Unterschied zur Negativkontrolle.

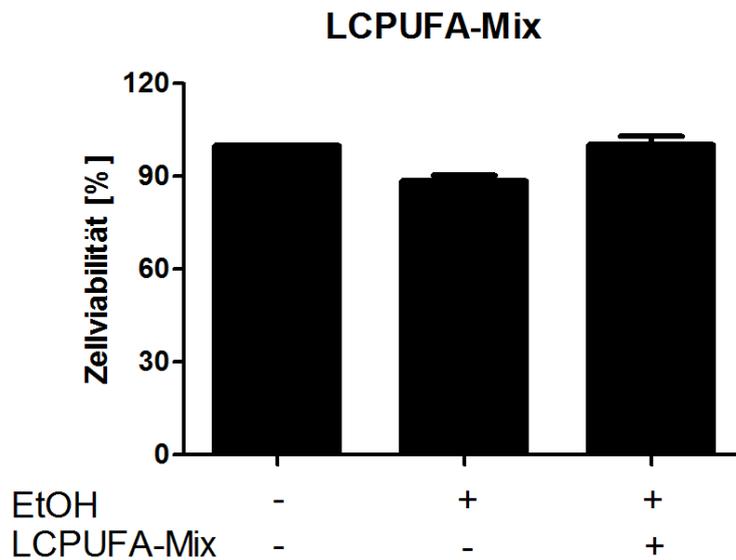


Abbildung 13: XTT-Ergebnisse nach LCPUFA-Mix-Inkubation. Die A549-Zellen wurden mit Ethanol (EtOH) und LCPUFA-Mix inkubiert: LCPUFA-Mix (0,2 pmol/Zelle: 0,116 pmol/Zelle EPA und je 0,028 pmol/Zelle DHA; GLA; SDA). Ergebnisse sind als Mean  $\pm$  SEM dargestellt; n = 3.

### 3.4 Stimulation der A549-Zellen mittels Cytokinmix

#### 3.4.1 CBA-Messung der Cytokinmix-Dosiskinetik

Die nachfolgende Abbildung der CBA-Dosiskinetik für CM1-3 zeigt die IL-6-Produktion der A549-Zellen aus dem Überstand am vierten Versuchstag nach 24 Stunden Stimulation. Hierbei handelt es sich um eine Einfachbestimmung zur Bestimmung der idealen CM-Konzentration.

Die IL-6-Produktion betrug nach Stimulation mit CM1 (IFN- $\gamma$ : 100 U/mL; IL-1 $\beta$ : 12,5 U/mL; TNF- $\alpha$ : 5 ng/mL) 3516,09 pg/mL, mit CM2 (IFN- $\gamma$ : 10 U/mL; IL-1 $\beta$ : 1,25 U/mL; TNF- $\alpha$ : 0,5 ng/mL) 541,19 pg/mL und mit CM3 (IFN- $\gamma$ : 1 U/mL; IL-1 $\beta$ : 0,125 U/mL; TNF- $\alpha$ : 0,05 ng/mL) 16,83 pg/mL. Für die weiteren Versuche wurde CM1 verwendet. Wurden die Zellen bei der Negativkontrolle nur mit Medium kultiviert, war kein IL-6 zu messen.

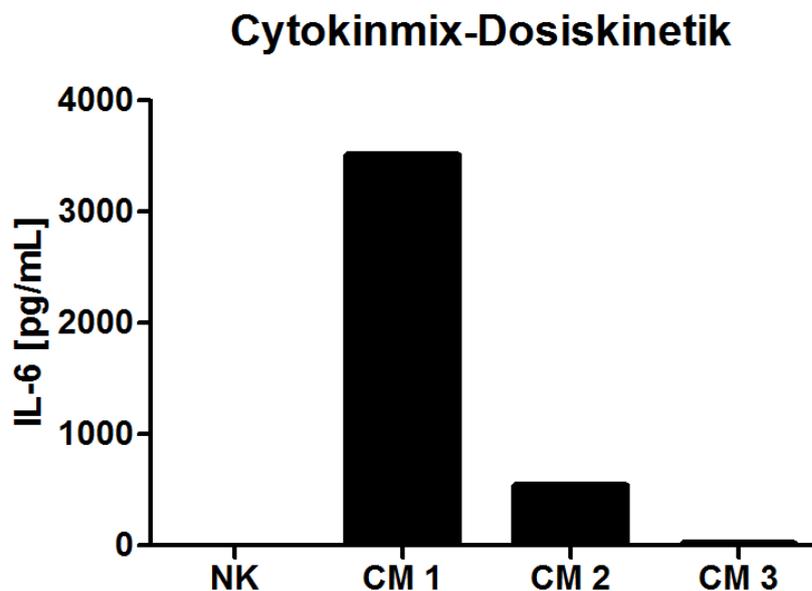


Abbildung 14: IL-6-Bestimmung mittels Cytometric Bead Array (CBA)-Messung nach Cytokinmix (CM)-Stimulation. Die A549-Zellen wurden mit Ethanol und CM1-3 inkubiert: CM1 (IFN- $\gamma$ : 100 U/mL; IL-1 $\beta$ : 12,5 U/mL; TNF- $\alpha$ : 5 ng/mL), CM2 (IFN- $\gamma$ : 10 U/mL; IL-1 $\beta$ : 1,25 U/mL; TNF- $\alpha$ : 0,5 ng/mL) und CM3 (IFN- $\gamma$ : 1 U/mL; IL-1 $\beta$ : 0,125 U/mL; TNF- $\alpha$ : 0,05 ng/mL). Negativkontrolle mit Medium (NK). Es handelt sich um eine Einfachbestimmung;  $n = 1$ .

### 3.4.2 Einfluss verschiedener Cytokinmix-Konzentrationen auf die Zellviabilität

Die Stimulation der Lungenepithelzellen erfolgte am dritten Versuchstag über 24 Stunden. Hierbei wurde der Einfluss verschiedener CM-Konzentrationen auf die Zellviabilität der A549-Zellen unabhängig von den Fettsäuren untersucht.

Der CM1 setzte sich aus IFN- $\gamma$ : 100 U/mL, IL-1 $\beta$ : 12,5 U/mL und TNF- $\alpha$ : 5 ng/mL zusammen und zeigte gegenüber der Negativkontrolle keine signifikante Reduktion der Zellviabilität. Auch die mittlere CM-Konzentration CM2 (IFN- $\gamma$ : 10 U/mL; IL-1 $\beta$ : 1,25 U/mL; TNF- $\alpha$ : 0,5 ng/mL) und die niedrigste CM-Konzentration CM3 (IFN- $\gamma$ : 1 U/mL; IL-1 $\beta$ : 0,125 U/mL; TNF- $\alpha$ : 0,05 ng/mL) führten zu keiner signifikanten Veränderung der Zellviabilität. Da der CM1 in der CBA-Messung die stärkste Il-6-Antwort hervorgerufen hat, wurde für die weiteren Experimente mit dem CM1 weitergearbeitet.

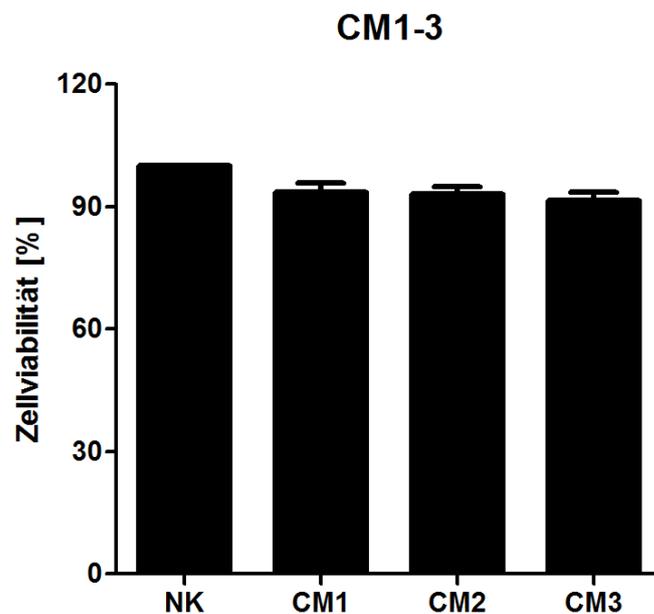


Abbildung 15: XTT-Ergebnisse nach Cytokinmix (CM)-Stimulation. Die A549-Zellen wurden mit Ethanol und CM1-3 inkubiert: CM1 (IFN- $\gamma$ : 100 U/mL; IL-1 $\beta$ : 12,5 U/mL; TNF- $\alpha$ : 5 ng/mL), CM2 (IFN- $\gamma$ : 10 U/mL; IL-1 $\beta$ : 1,25 U/mL; TNF- $\alpha$ : 0,5 ng/mL) und CM3 (IFN- $\gamma$ : 1 U/mL; IL-1 $\beta$ : 0,125 U/mL; TNF- $\alpha$ : 0,05 ng/mL). Negativkontrolle mit Medium (NK). Ergebnisse sind als Mean  $\pm$  SEM dargestellt;  $n = 3$ .

### **3.5 Beeinflussung der Cytokinmix-Stimulation durch Einzelfettsäuren**

#### **3.5.1 CBA-Messung nach Stimulation und Inkubation mit Einzelfettsäuren**

Diese CBA-Messung stellt den Einfluss der Inkubation mit den einzelnen Fettsäuren im Vergleich zum LCPUFA-Mix auf die IL-6-Produktion nach Stimulation mit CM1 dar. Weder eine der einzelnen Fettsäuren EPA, DHA, GLA oder SDA noch der LCPUFA-Mix konnten die durch den CM1 hervorgerufene IL-6-Produktion beeinflussen.

Bei den Proben, die ausschließlich mit Ethanol inkubiert wurden, konnte fast gar kein IL-6 gemessen werden ( $3,25 \text{ pg/mL} \pm 0,65$ ). Die IL-6-Produktion wurde durch die Stimulation mit CM1 hoch signifikant im Vergleich zur Behandlung nur mit Ethanol gesteigert (von  $3,25 \text{ pg/mL} \pm 0,65$  auf  $9041,57 \text{ pg/mL} \pm 1542,50$ ,  $p < 0,001$ ).

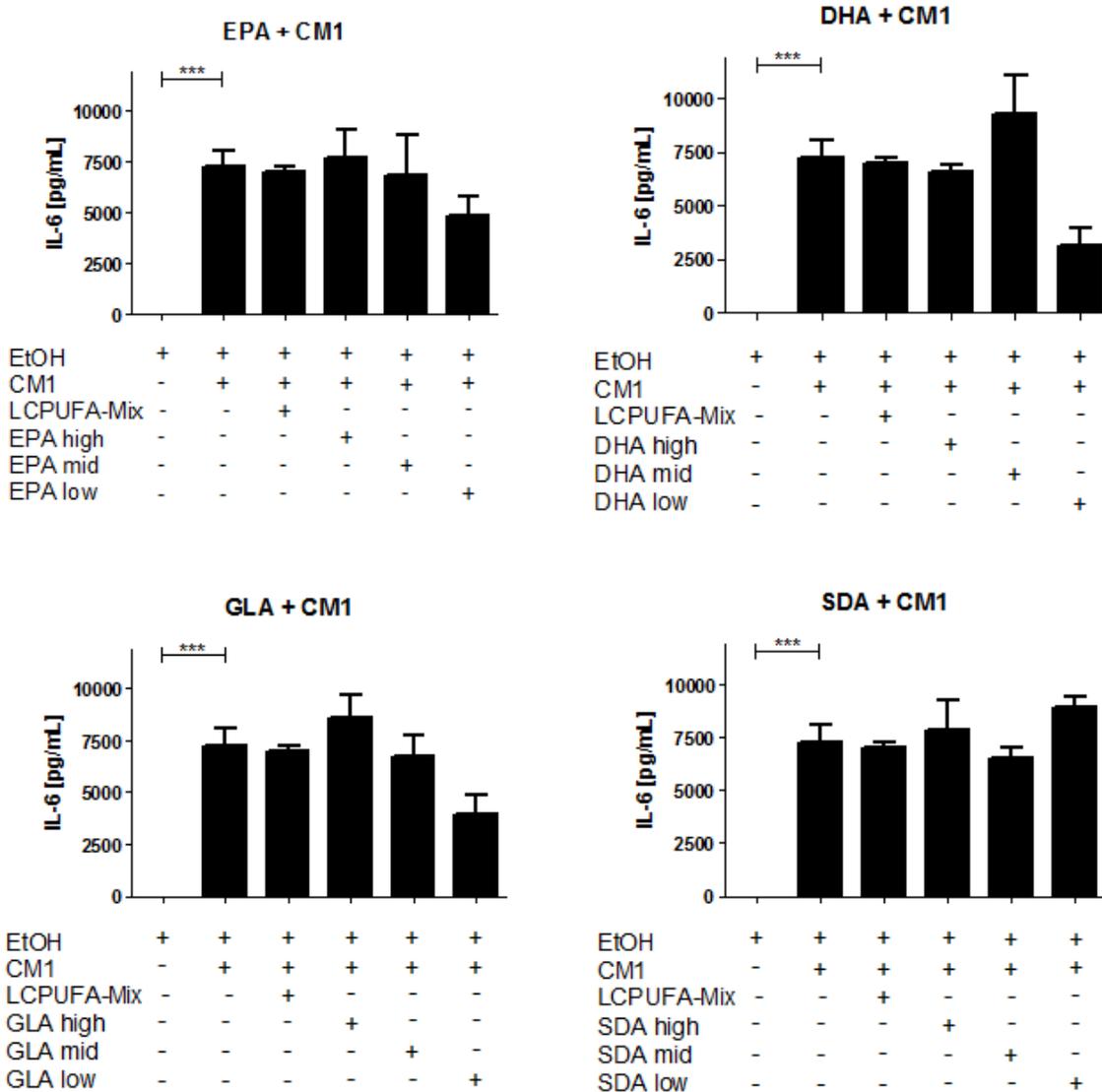


Abbildung 16: IL-6- Bestimmung mittels Cytometric Bead Array (CBA)-Messung nach Fettinkubation und Cytokinmix 1 (CM1)-Stimulation. Die A549-Zellen wurden mit Ethanol (EtOH), Einzelfettsäuren, LCPUFA-Mix und CM1 inkubiert: EPA/DHA/GLA (low: 0,02 pmol/Zelle, mid: 0,2 pmol/Zelle, high: 2 pmol/Zelle), SDA (low: 0,002 pmol/Zelle, 0,02 pmol/Zelle, high: 0,2 pmol/Zelle), LCPUFA-Mix (0,2 pmol/Zelle: 0,116 pmol/Zelle EPA und je 0,028 pmol/Zelle DHA; GLA; SDA) und CM1 (IFN- $\gamma$ : 100 U/mL; IL-1 $\beta$ : 12,5 U/mL; TNF- $\alpha$ : 5 ng/mL). Ergebnisse sind als Mean  $\pm$  SEM dargestellt; n = 3. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als signifikant bestimmt, wenn \*\*\* p < 0,001.

### **3.5.2 Einfluss der Einzelfettsäuren und Cytokinmix 1 auf die Zellviabilität**

Die folgenden Daten zeigen den additiven Effekt von einzelnen Fettsäuren und dem CM1 auf die Zellviabilität.

Die jeweils höchste Konzentration von EPA, DHA und GLA (2 pmol/Zelle) führten in der Kombination mit CM1 zu einer hoch signifikanten Einschränkung der Zellviabilität im Vergleich zur Inkubation der Zellen mit CM1 und Ethanol ohne Fettsäuren.

Ausschließlich SDA zeigte auch in seiner höchsten Konzentration (0,2 pmol/Zelle) zusammen mit dem CM1 keinen Einfluss auf die Zellviabilität der A549-Zellen.

Auf Grund dieser Beobachtung wurde die Konzentration des LCPUFA-Mixes (0,2 pmol/Zelle: 0,116 pmol/Zelle EPA und je 0,028 pmol/Zelle DHA; GLA; SDA) so gewählt, dass sie den jeweils mittleren Konzentrationen von EPA, DHA und GLA (0,2 pmol/Zelle) entspricht, die in Kombination mit CM1 keine Reduktion der Zellviabilität verursacht haben.

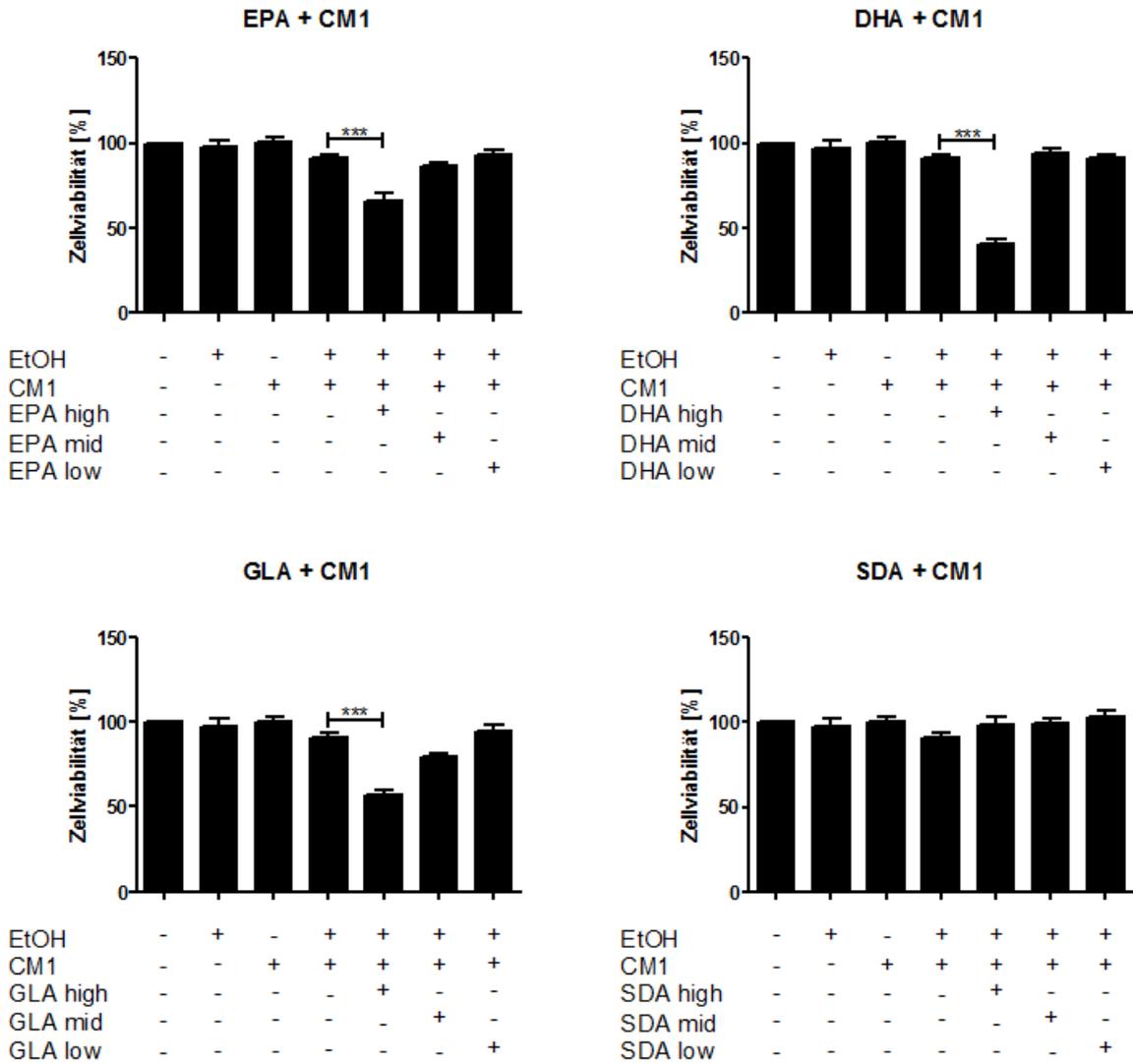


Abbildung 17: XTT-Ergebnisse nach Fettinkubation und Cytokinmix 1 (CM1)-Stimulation. Die A549-Zellen wurden mit Ethanol (EtOH), Einzelfettsäuren und CM1 inkubiert: EPA/DHA/GLA (low: 0,02 pmol/Zelle, mid: 0,2 pmol/Zelle, high: 2 pmol/Zelle), SDA (low: 0,002 pmol/Zelle, 0,02 pmol/Zelle, high: 0,2 pmol/Zelle) und CM1 (IFN- $\gamma$ : 100 U/mL; IL-1 $\beta$ : 12,5 U/mL; TNF- $\alpha$ : 5 ng/mL). Ergebnisse sind als Mean  $\pm$  SEM dargestellt; n = 3. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als signifikant bestimmt, wenn \*\*\* p < 0,001.

### 3.6 Beeinflussung der Cytokinmix-Stimulation durch LCPUFA

#### 3.6.1 CBA-Messung nach Stimulation und Inkubation mit dem LCPUFA-Mix

Diese CBA-Messung zeigt den Einfluss vom LCPUFA-Mix auf die IL-6-Produktion nach Stimulation mit CM1. Betrachtet man den Effekt des LCPUFA-Mixes (0,2 pmol/Zelle: 0,116 pmol/Zelle EPA und je 0,028 pmol/Zelle DHA; GLA; SDA), ist festzuhalten, dass dieser die CM1-abhängige IL-6-Produktion der A549-Zellen nicht signifikant senken konnte (6994,43 pg/mL  $\pm$  240,15).

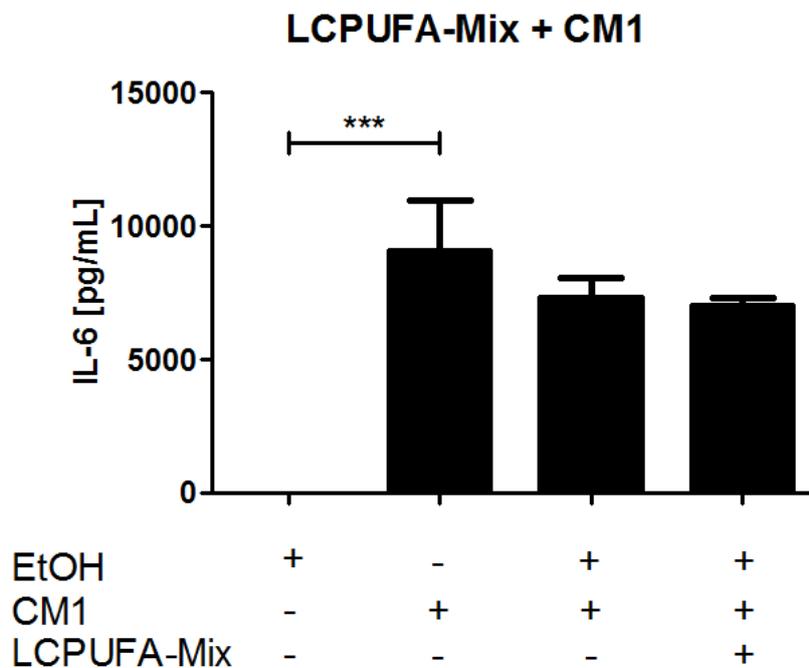


Abbildung 18: IL-6- Bestimmung mittels Cytometric Bead Array (CBA)-Messung nach Fettinkubation und Cytokinmix 1 (CM1)-Stimulation. Die A549-Zellen wurden mit Ethanol (EtOH), LCPUFA-Mix und CM1 inkubiert: LCPUFA-Mix (0,2 pmol/Zelle: 0,116 pmol/Zelle EPA und je 0,028 pmol/Zelle DHA; GLA; SDA) und CM1 (IFN- $\gamma$ : 100 U/mL; IL-1 $\beta$ : 12,5 U/mL; TNF- $\alpha$ : 5 ng/mL). Ergebnisse sind als Mean  $\pm$  SEM dargestellt; n = 3. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als signifikant bestimmt, wenn \*\*\* p < 0,001.

### 3.6.2 Einfluss von LCPUFA-Mix und Cytokinmix 1 auf die Zellviabilität

Im Folgenden wurde der Einfluss der Kombination aus LCPUFA-Mix und CM1 auf die Zellviabilität betrachtet.

Weder der CM1 noch der LCPUFA-Mix alleine und die Kombination beider haben zu einer signifikanten Änderung der Zellviabilität geführt.

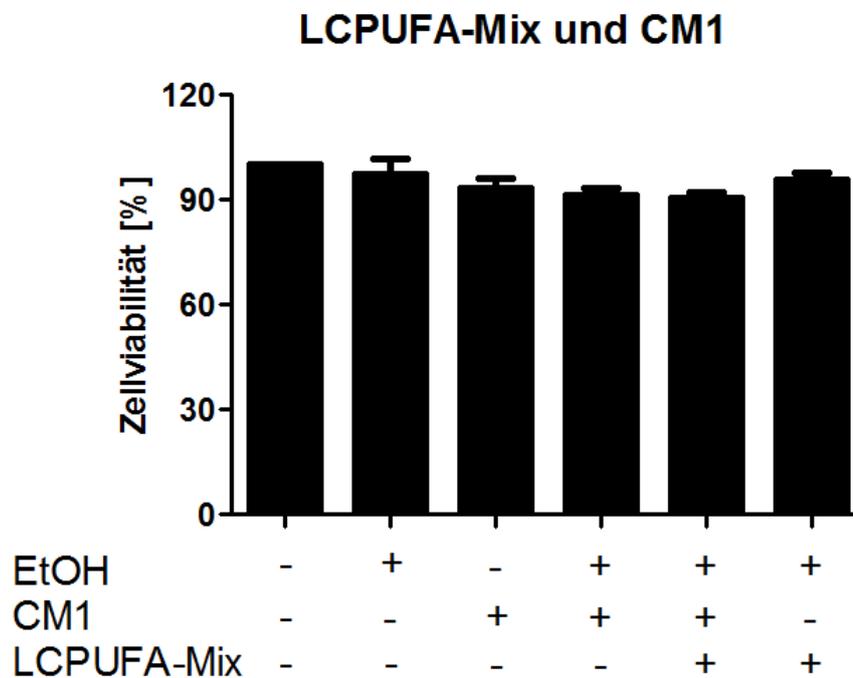


Abbildung 19: XTT-Ergebnisse nach LCPUFA-Mix-Inkubation und Cytokinmix 1 (CM1)-Stimulation. Die A549-Zellen wurden mit Ethanol (EtOH), LCPUFA-Mix und CM1 inkubiert: LCPUFA-Mix (0,2 pmol/Zelle: 0,116 pmol/Zelle EPA und je 0,028 pmol/Zelle DHA; GLA; SDA) und CM1 (IFN- $\gamma$ : 100 U/mL; IL-1 $\beta$ : 12,5 U/mL; TNF- $\alpha$ : 5 ng/mL). Ergebnisse sind als Mean  $\pm$  SEM dargestellt;  $n = 3$ .

### **3.7 Cyclooxygenase-2-Expression der A549-Zellen**

Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der COX-2-Expression festgestellt, wenn die Zellen mit Medium, Ethanol, EPA oder dem LCPUFA-Mix behandelt wurden. Die Stimulation mit CM1 für 4 Stunden zeigte eine hoch signifikante Steigerung der COX-2-Expression (von  $3,23\% \pm 0,49$  auf  $26,81\% \pm 2,78$ ,  $p < 0,001$ ). Wurden die Zellen vor der CM1-Stimulation mit LCPUFA-Mix inkubiert, war die COX-2-Expression immer noch hoch signifikant gesteigert (von  $3,23\% \pm 0,49$  auf  $21,22\% \pm 0,87$ ,  $p < 0,001$ ). Bei der Inkubation mit EPA vor der CM1-Stimulation war die Steigerung der COX-2-Expression nur noch sehr signifikant (von  $3,23\% \pm 0,49$  auf  $16,43\% \pm 1,45$ ,  $p < 0,01$ ). Es zeigte sich außerdem eine sehr signifikante Reduktion der COX-2-Expression, wenn man die alleinige CM1-Stimulation mit der Probe mit CM1-Stimulation und der vorherigen EPA-Inkubation (von  $26,81\% \pm 2,78$  auf  $16,43\% \pm 1,45$ ,  $p < 0,01$ ) vergleicht.

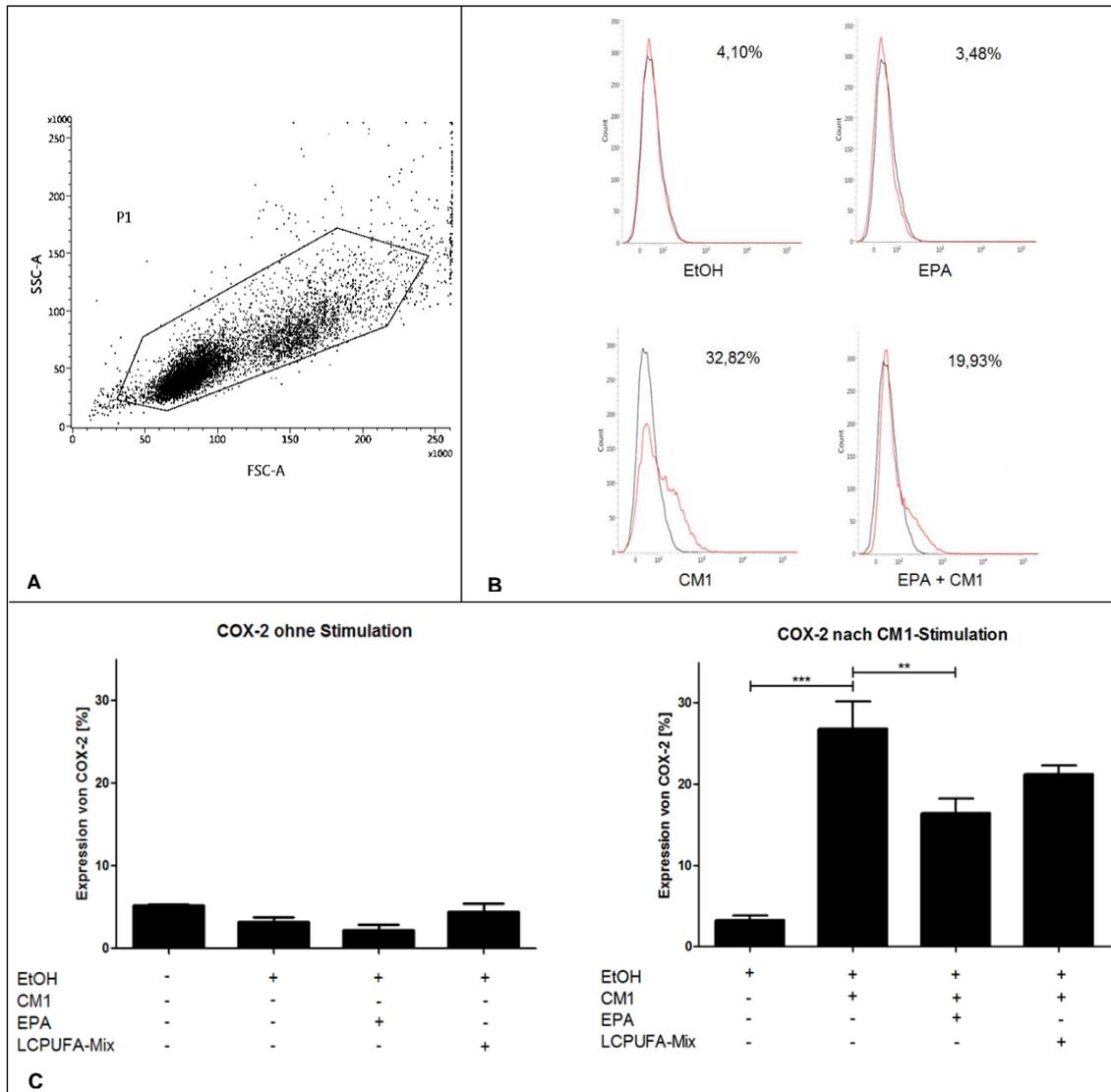


Abbildung 20: A) Größe und Granularitätsmessung der A549 Zellen. B) Intrazelluläre Expression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) in den A549-Zellen. Die Histogramme repräsentieren eine aus drei Messungen. C) COX-2-Expression der A549-Zellen nach Fettinkubation und Cytokinmix (CM)-Stimulation. Die A549-Zellen wurden mit Ethanol (EtOH), EPA, LCPUFA-Mix und CM1 inkubiert: EPA (0,02 pmol/Zelle), LCPUFA-Mix (0,02 pmol/Zelle: 0,0116 pmol/Zelle EPA und je 0,0028 pmol/Zelle DHA; GLA; SDA) und CM1 (IFN- $\gamma$ : 400 U/mL; IL-1 $\beta$ : 50 U/mL; TNF- $\alpha$ : 20 ng/mL). Ergebnisse sind als Mean  $\pm$  SEM dargestellt; n = 3. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als signifikant bestimmt, wenn \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

## 4 Diskussion

Der Einfluss einzelner LCPUFA sowie auch die Kombination verschiedener LCPUFA auf die Inflammation und die Entzündungsauflösung wird bereits seit längerem diskutiert.[34, 74] In dieser Funktion können LCPUFA auch eine Rolle bei der Behandlung chronischer Entzündungen in der Lunge spielen.[75] Hierbei sind sowohl die Kombination als auch die Konzentration der LCPUFA entscheidend.[34]

Deshalb war es Ziel dieser Arbeit, die Wirkung einzelner LCPUFA im Vergleich zu einem LCPUFA-Mix auf die Inflammation von A549-Lungenepithelzellen zu untersuchen. Welche immunologischen Charakteristika A549-Zellen haben und inwiefern sie sich im Gegensatz zu anderen Lungenzelllinien für Fettsäureinkubation eignen, wird im Folgenden erläutert. Das hier verwendete Entzündungsmodell mit einem Cytokinmix und der Messung von IL-6 und COX-2 als Ausdruck der Inflammation wird mit der bereits vorhandenen Literatur verglichen.

### 4.1 Verteilung der Oberflächenmarker der A549-Zellen

Zunächst wurde die A549-Zelllinie anhand verschiedener Oberflächenmarker phänotypisch charakterisiert. Der Vergleich zu der Arbeit von Corbière et al., der ebenfalls die phänotypischen Merkmale bei A549 Zellen untersucht hat, zeigt, dass diese zur Antigenpräsentation gegenüber T-Lymphozyten geeignet sind und die Adhäsionsmoleküle CD54 (ICAM-1 = Intercellular Adhesion Molecule 1) und CD58 (LFA-3 = Lymphocyte function-associated antigen 3), von denen bekannt ist, dass sie an B7-unabhängigen co-stimulierenden Signalen beteiligt sind, gut exprimiert werden.[76] Im Vergleich zu Corbière et al. zeigten unsere Messungen sogar höhere Expressionsraten für CD40, CD54, CD58, CD80, CD86 und HLA-DR auf A549-Zellen.[76] Als Unterschied im experimentellen Ablauf fällt jedoch auf, dass Corbière et al. die Zellen in Passage fünf bis dreizehn verwendet haben.[76] Für unsere Experimente haben wir mit Passage drei bis fünf bewusst frühe Passagen gewählt, weil höhere Passagen eine Veränderung in der Expressionsrate der Oberflächenmoleküle zur Folge hatten. Corbière et al. stellten fest, dass frisch

isolierte Alveolarepithelzellen im Vergleich zu A549 einen signifikant höheren Anteil an CD54 und HLA-DR exprimierten, dafür einen signifikant niedrigeren Anteil an CD58.[76] Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass das Alter der Zellen einen Einfluss auf den Phänotyp zu haben scheint und dass sich eher frühere als spätere für unser Zellkultursystem eignen.

## **4.2 Einfluss der Supplementation mit LCPUFA auf das Fettsäureprofil**

Das Fettsäureprofil von unbehandelten A549-Zellen besteht zum Großteil aus gesättigten Fettsäuren wie bspw. Palmitinsäure (C16:0, PA) und Stearinsäure (C18:0) sowie einfach ungesättigten Fettsäuren wie der Ölsäure (C18:1n9c, OA).[77] N-6-Fettsäuren machen  $7,20 \pm 0,10\%$  der Fettsäuren in der Membran aus und n-3-Fettsäuren  $4,16 \pm 0,04\%$ .[77] Damit haben A549-Zellen ein n-6-/n-3-Verhältnis von ca. 1,7:1.[77] Die Dauer der Kultivierung von A549-Zellen hat signifikanten Einfluss auf die relativen Anteile der Fettsäuren, die die Zellmembran bilden.[77] Der AA-Anteil nimmt stark zu, während der Anteil gesättigter Fettsäuren fast unverändert bleibt.[77] Da der n-3-Fettsäure-Anteil sinkt, verschiebt sich das n-6-/n-3-Verhältnis ungünstig.[77] Dies zeigt, dass frühe Zellpassagen eine wichtige Voraussetzung für Experimente mit ungesättigten Fettsäuren sind und nur ähnliche Passagen verglichen werden können.

Eine Beobachtung unserer Experimente war, dass der AA- und LA-Anteil mit der Dauer der Zellkultivierung ansteigt. Dies kann durchaus einen Einfluss auf die zu messenden Ergebnisse haben. Es wurden ausschließlich Passagen drei bis fünf verwendet. Es ist wahrscheinlich, dass der Einfluss der Fettsäure-Inkubation mit LCPUFA geringer ist, wenn die Zellmembran von vorneherein mehr n-6-Fettsäuren enthält.

Durch die Inkubation mit den Einzelfettsäuren ließ sich der Anteil der jeweiligen Fettsäuren in der Zellmembran erhöhen. Mindestens die höchste Fettsäure-Konzentration zeigte signifikant höhere Anteile der jeweiligen Fettsäure in der gaschromatographischen Messung. DHA zeigte dabei das größte Potential. Darüber hinaus senken EPA und DHA den AA-Anteil der Zellen. EPA führte zu einer signifikanten Steigerung des DPA-Anteils. DPA ist eine Fettsäure, die von

EPA abgeleitet wird.[34] SDA steigerte sowohl den EPA- als auch den DPA-Anteil.

Die Art und Weise der Fettinkubation hat Einfluss auf den Einbau der LCPUFA in die Zellmembran. Shaikh et al. stellen relevante Unterschiede in der Behandlung von Zellkulturen mit Fetten dar.[78] Die Konzentration an Fetten, mit denen man Zellen inkubieren kann, hängt davon ab, ob diese von BSA-Molekülen komplexiert sind oder frei vorliegen.[78] Zusätzlich muss unterschieden werden, ob das BSA frei von Fetten ist oder wie bei Fraktion V BSA zusätzlich Fette enthält.[78] Für unsere Experimente wurde BSA, das frei von Fettsäuren ist, verwendet, um die genaue Konzentration an hinzugegebenen Fettsäuren kontrollieren zu können. Das Verhältnis zwischen Fettsäure und BSA ist so zu wählen, dass es entweder den physiologischen Bedingungen entspricht oder den zu simulierenden Bedingungen je nach Versuchsaufbau.[78] Mit diesen Versuchen sollte herausgefunden werden, mit welcher Größenordnung an Fettsäuren bzw. LCPUFA-Mix die A549-Zellen inkubiert werden müssen, damit ein signifikanter Einfluss beobachtet werden kann. Auch ist es entscheidend, ob die Kultur serumfrei gehalten wird oder Serum vorhanden ist.[78] Dies wirkt sich darauf aus, wie lange die Zellen mit den Fetten inkubiert werden können.[78]

Bei chronischen Entzündungen und Krebserkrankungen liegt ein veränderter Fettsäure-Metabolismus bzw. ein verändertes Fettsäureprofil vor.[69, 79] He et al. haben daher das Fettsäureprofil von sechs verschiedenen menschlichen Lungenkrebszelllinien analysiert und miteinander verglichen, darunter auch die A549-Zelllinie.[79] A549-Zellen zeigen einen hohen Gehalt an Phospholipiden (außer Phosphatidsäure), C20:5 (EPA) und C22:6 (DHA) und einen niedrigen Gehalt an C18:1 (Ölsäure), C20:1 (Eicosensäure) und C20:2 (Eicosadiensäure).[79] Jedoch wurden nur die Tumorzelllinien miteinander verglichen, und es gab keine Vergleichswerte von gesundem Lungengewebe.[79] Eine klinische Studie konnte zeigen, dass der Serumspiegel von sechs Fettsäuren (Palmitoleinsäure, Linolensäure, Linolsäure, Ölsäure, Arachidonsäure und Docosahexaensäure) bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkrebs signifikant geringer ist als bei einer

gesunden Kontrollgruppe und auch im Vergleich zu Patienten mit gutartigen Lungenkrankheiten.[80] Verglichen mit anderen Lungenkrebszelllinien haben A549-Zellen also einen höheren Anteil an LCPUFA.

Wie auch bei dieser Arbeit haben Allam-Ndoul et al. nicht nur den Einfluss von Einzelfettsäuren untersucht, sondern auch die Kombination aus EPA und DHA auf die Expression inflammatorischer Gene.[81] In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen ist die Stärke des Effektes von Fettsäuren abhängig von ihrer Konzentration und Kombination.[81] So konnten sie zeigen, dass die Expression des Gens für das Monozyten-chemotaktische Protein-1 (MCP1), welches für ein proinflammatorisches Chemokin codiert, bereits durch 10  $\mu\text{M}$  EPA oder 10  $\mu\text{M}$  DHA reduziert wurde, aber erst durch 50  $\mu\text{M}$  einer Fettsäure-Kombination aus 25  $\mu\text{M}$  EPA und 25  $\mu\text{M}$  DHA.[81] EPA schien eine potentere Wirkung als DHA oder die Kombination aus beiden entfalten zu können.[81] Ähnliches konnte auch für NF- $\kappa\text{B}$  festgestellt werden.[81]

#### **4.3 Einfluss der LCPUFA auf die Zellviabilität**

Bei der Untersuchung der Zellviabilität war es essentiell, einen zytotoxischen Einfluss der Inkubationsbedingungen auf die Zellen auszuschließen. Um den Einbau der Fettsäuren in die Zellmembran zu ermöglichen, mussten diese in Ethanol gelöst zur Zellkultur gegeben werden. Es konnte gezeigt werden, dass Ethanol alleine zu keiner signifikanten Änderung der Zellviabilität führte. Durch diesen Ausschluss konnten alle gemessenen Änderungen der Zellviabilität auf die Wirkung der LCPUFA zurückgeführt werden. Da die jeweils höchste Einzelfettsäure-Konzentration zu einer signifikanten Einschränkung der Zellviabilität gegenüber den unbehandelten A549-Zellen geführt hat, wurde diese Fettsäure-Konzentration für weitere Experimente ausgeschlossen.

In anderen Studien wurde darauf geachtet, bei den Experimenten eine maximale Ethanol-Konzentration von 0,1% bzw. 0,12%, v/v nicht zu übersteigen.[82–84] Bei unseren Experimenten war die maximale Ethanol-Konzentration 0,4% (v/v) Die Ethanolkontrolle zeigte jedoch bei den XTT-Ergebnissen keine Veränderung der Zellviabilität.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Stimulation mit dem Cytokinmix (CM1-3) keinen signifikanten Einfluss auf die Lebensfähigkeit der A549-Zellen hatten. Aufgrund der Zellviabilitätsergebnisse als auch der CBA-Messung wurde CM1 für die weiteren Experimente verwendet. Hierbei wurde eine ausreichende Stimulation erreicht, ohne die Zellviabilität einzuschränken.

Die Konzentration des LCPUFA-Mixes wurde so gewählt, dass die Gesamtkonzentration der einzelnen enthaltenen Fettsäuren (0,2 pmol/Zelle) der mittleren Konzentration der Einzelfettsäuren (0,2 pmol/Zelle) entsprach. Die Untersuchungen zur Zellviabilität zeigten, dass höhere Konzentrationen an Fettsäuren mit einer höheren Zellmortalität einhergehen.

Da eine Fettsäure-Supplementation zur Aufnahme von LCPUFA in die Zellmembran führt, kommt es zu einem signifikanten Umbau des Membran-Lipidoms.[85] Der erhöhte Einbau von DHA führt zu einer Stabilisierung der Zellmembrandomänen.[85] Durch einen größeren Unterschied in der Ordnung zwischen Lipid Rafts und Nonraft-Domänen, aufgrund des unterschiedlichen Gehalts an DHA, wird die Stabilität von geordneten Raft-Domänen verstärkt.[85] Je mehr ungesättigte Fettsäuren in einer Domäne vorhanden sind, desto stabiler ist diese.[85] Der Zusammenhang zwischen dem Unterschied im Ordnungsgrad der Interdomänen und der Stabilität der Phasentrennung führt zu Interaktionen, wie einem veränderten Cholesteringehalt und einer hohen Konzentration an exogenen amphiphilen Stoffen.[85] Dies lässt den Schluss zu, dass LCPUFA die Zusammensetzung und Organisation biologischer Membranen verändern.[85] Für T-Zellen konnte gezeigt werden, dass Struktur und Funktion der Raft-Domänen durch n-3-LCPUFA beeinflusst werden.[86] Sie können sogar die Expression und Aktivität von Membranrezeptoren oder die Genexpression über NF- $\kappa$ B und PPAR- $\alpha$  aktivieren.[86]

Trombetta et al. zeigten, dass das Zellwachstum der A549-Zelllinie sowohl durch DHA als auch durch AA dosisabhängig eingeschränkt wurde.[82] Bei einer Konzentration von 100  $\mu$ mol/L führten DHA und AA nach 48 Stunden zu einer signifikanten Steigerung der Apoptose und Nekrose sowie einer entsprechenden Senkung der Viabilität.[82] Vermutlich ist eine vermehrte

Lipidperoxidation durch die zugeführten LCPUFA dafür ursächlich.[82] Das eingeschränkte Zellwachstum der A549-Zellen korrelierte mit einer verminderten Activator Protein 1-Bindungsaktivität.[82] 4-Hydroxynonenal (HNE), der aktivste Metabolit der Lipidoxidation, reduzierte die Proliferation der A549-Zellen dosisabhängig und wirkt modulierend auf Activator Protein 1 und NF-κB.[82]

Grundsätzlich, wie Trombetta et al. beschrieben haben, sind A549-Zellen jedoch gut für eine LCPUFA-Supplementation geeignet, weil sie selbst nur geringe Mengen LCPUFA enthalten und der Gehalt durch die Supplementation deutlich gesteigert werden konnte.[82] Diese Versuche spiegeln auch die Daten von Fussbroich et al. wieder.[69, 87] Fussbroich et al. supplementierten Asthma-Mäuse ebenfalls mit einem LCPUFA-Mix aus EPA, DHA, GLA und SDA und untersuchten anschließend den Einfluss der LCPUFA auf den Fettsäure-Anteil von LA, DGLA, AA, EPA, DPA und DHA im Lungengewebe der Mäuse.[69, 87] Die Ergebnisse entsprachen zum Großteil den Ergebnissen der Versuche dieser Arbeit mit der A549-Zellkultur.[69, 87] Durch den LCPUFA-Mix konnte der EPA-, DPA-, DHA- und DGLA-Anteil in Lungenzellen der Asthma-Mäuse erhöht und der AA-Anteil gesenkt werden.[69] Ebenso wurde das Fettsäureprofil der A549-Zellen beeinflusst. Zwar wurde die COX-2 nicht selbst gemessen, jedoch konnte eine Reduktion der Eikosanoide, die von der COX-2 aus AA synthetisiert wurden, durch EPA alleine und durch den LCPUFA-Mix festgestellt werden.[87] Mit dem LCPUFA-Mix ließ sich in den Asthma-Mäusen sogar die IL-6-Produktion reduzieren.[87] Dies konnte für die A549-Zellen nicht gezeigt werden. Dieser Effekt könnte durch weitere Zellen vermittelt werden oder ist auf die unterschiedlichen Stimulationen zurückzuführen.

#### **4.4 Wirkungen von LCPUFA auf die Inflammation der A549-Zellen**

Im ersten Schritt wurde die optimale Cytokinmix-Konzentration ausgelotet. Eine Stimulation mit CM1 führte zu einer deutlichen und signifikanten IL-6-Produktion und wurde daher zur Stimulation verwendet. Renja et al. verwendeten zur Stimulation der IL-6-Freisetzung von A549-Zellen 10 ng/mL IL-1β, welches eine der drei Komponenten des CM1 ist.[88] Die IL-6-Freisetzung durch 1 ng/mL IL-

1 $\beta$  konnte durch einstündige Inkubation mit 85 mM oder 170 mM Ethanol sogar signifikant gesenkt werden.[88] Eine längere Einwirkzeit mit Ethanol konnte diesen Effekt nicht zeigen.[88] Turpeinen et al. haben einen Cytokinmix aus jeweils 10 ng/mL IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  und TNF verwendet, um die inhibitorische Wirkung von Mitogen-aktivierter Protein-Kinase-Phosphatase 1 (MKP-1) auf die Cytokin-induzierte Expression von IL-6 und COX-2 in A549-Zellen zu zeigen.[89] Eine Kombination derselben Cytokine zur Stimulation der COX-2 in A549-Zellen wurde auch in dieser Arbeit verwendet.[89] Die IL-6-Produktion durch den CM1 ließ sich weder durch EPA, DHA, GLA, SDA noch den LCPUFA-Mix signifikant beeinflussen. Dabei ist zu bedenken, dass der größte Anteil des LCPUFA-Mixes (0,2 pmol/Zelle: 0,116 pmol/Zelle EPA und je 0,028 pmol/Zelle DHA; GLA; SDA) EPA ist. Eine andere Zusammensetzung des LCPUFA-Mixes könnte den einzelnen Fettsäuren überlegen sein.

Die Wirkung der mittleren DHA-Konzentration (0,2 pmol/Zelle) und der niedrigsten SDA-Konzentration (0,002 pmol/Zelle) zeigte eine komplementäre Wirkung im Vergleich zu den restlichen Effekten auf die IL-6-Produktion. Bei EPA und GLA ließ sich die IL-6-Produktion umso stärker reduzieren, je geringer die Fettsäure-Konzentration war. Kjær et al. haben untersucht, inwiefern die Regulierung von Genen in Hepatozyten von der Konzentration der hinzugegebenen Fettsäuren abhängig ist.[90] Dabei konnten sie zeigen, dass DHA und EPA im Bereich zwischen 5  $\mu$ M und 500  $\mu$ M unterschiedlich starke oder gegensinnige Effekte auf Gene, die für Enzyme zur Metabolisierung der n-3-Fettsäuren kodieren, ausüben.[90] Außerdem zeigte sich, dass die Wirkung auf die Genexpression durch die Fettsäuren ab einem gewissen Punkt durch eine höhere Konzentration nicht weiter gesteigert werden konnte.[90] Für die schlussendliche Wirkung der Fettsäuren ist ihre Konzentration relevant.[90] Außerdem könnte eine weitere Steigerung der Fettsäure-Konzentration potentiell einen gegenteiligen Effekt haben und die endogene Konversion der Fettsäuren hemmen.[90]

Bei einer Konzentration von 100  $\mu$ mol/L SDA oder EPA zeigen Versuche von Cranmer-Byng et al. mit Adipozyten sogar eine leichte Steigerung der IL-6-

Sekretion nach Stimulation mit LPS für 24 Stunden im Vergleich zur Kontrolle.[91]

#### **4.5 Wirkungen auf die Cyclooxygenase-2-Expression der A549-Zellen**

Die intrazelluläre Messung der induzierbaren COX-2 zeigte, dass eine Stimulation mit CM1 zu einer signifikant gesteigerten COX-2-Expression führt. Im Vergleich zu dem LCPUFA-Mix konnte EPA die Expression der COX-2 sehr signifikant reduzieren. Der LCPUFA-Mix, der neben EPA noch DHA, GLA und SDA enthält, führte nur tendenziell zu einer geringeren COX-2-Expression der Zellen. Es lässt sich daher postulieren, dass durch eine der anderen drei Fettsäuren der hemmende Effekt des EPAs auf die COX-2 gemindert wurde oder aber eine Interaktion der verschiedenen Fettsäuren zu einer geringeren Hemmung geführt hat. Eine Zellkulturstudie von Kelavkar et al. konnte keine Hemmung der COX durch die Inkubation mit EPA oder SDA zeigen.[92] Die Aktivität der COX wurde daran bemessen, wie hoch der Anteil an gebildeten Prostaglandine war.[92] Dies lässt keine Differenzierung der beiden Subtypen der COX zu und stellt damit eine ungenauere Messmethode dar.[92] Unterschiede im Versuchsaufbau bestehen in der Inkubationszeit, die mit 15 min bei Kelavkar et al. doch sehr kurz bemessen scheint.[92] Auch in einer Zellreihe von Keratinozyten wurde die COX-2 durch LCPUFA, in diesem Fall EPA und GLA, induziert.[93] Dies konnte nicht für AA gezeigt werden.[93] In diesen Zellen scheint die Induktion der COX-2 mit protektiven und antiinflammatorischen Prozessen assoziiert zu sein.[93] Chêne et al. schlussfolgerten, dass EPA und GLA ihre Effekte eher auf der Ebene der Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) und über PPAR $\gamma$  ausüben.[93] Die intrazelluläre Wirkung der LCPUFA scheint sich je nach Gewebe zu unterscheiden.[93] Jedoch ist der endgültige Effekt in beiden Fällen entzündungshemmend.[93]

In der Arbeit von Gdula-Agarsinska et al. wurde u.a. die COX-2-Expression nach Stimulation mit LPS und Inkubation mit AA, EPA oder DHA mittels Western Blot bestimmt.[84] Die höchste COX-2-Expression war nach alleiniger LPS-Stimulation oder mit zusätzlicher AA-Inkubation zu messen.[84] Die

durchflusszytometrischen Ergebnisse, die in dieser Arbeit mittels intrazellulärer COX-2-Färbung ermittelt wurden, zeigen ebenfalls ein Maximum bei der alleinigen CM1-Stimulation. Ebenfalls übereinstimmend mit Gdula-Agarinska et al. ist, dass die COX-2-Expression der unstimulierten Proben - ausgenommen AA - auf demselben niedrigen Niveau liegt wie die jeweilige Negativkontrolle.[84] Bei der Negativkontrolle wurden die Zellen nur mit Medium inkubiert, und es gab eine separate Probe, die nur mit Ethanol inkubiert wurde. Bei Gdula-Agarinska et al. erhielten die Zellen der Negativkontrolle die gleichen Konzentrationen an Ethanol und PBS wie die stimulierten und mit Fetten inkubierten Zellen.[84]

In Tumorgeweben ließen sich sowohl erhöhte Spiegel an AA und COX-2 sowie ein geringerer Anteil an EPA und DHA feststellen.[37] Für die A549-Zellen zeigten sich in der gaschromatographischen Messung ebenfalls im Vergleich zum AA-Anteil ( $5,72\% \pm 0,09$ ) ein geringerer EPA- ( $0,95\% \pm 0,37$ ) und DHA-Anteil ( $0,60\% \pm 0,07$ ). Die vermehrte Expression der COX-2 ist in den Prozess der Onkogenese involviert, u.a. in der Neoangiogenese der Tumoren.[94] So lässt sich in Tumorgefäßen im Unterschied zu normalen Gefäßen die COX-2 nachweisen.[94] Im Umkehrschluss konnten bei COX-2-Inhibitoren antineoplastische Eigenschaften nachgewiesen werden (Hemmung des Tumorwachstums und der Metastasierung).[94]

Yao et al. beschreiben neben der Hemmung der Proliferation von A549-Zellen durch DHA und EPA zusätzlich eine Induktion der Apoptose und Autophagie.[95] Besonders die Möglichkeit zum programmierten Zelltod ist bei einer Krebszelllinie eine relevante Entdeckung.[95] Dies konnte neben A549-Zellen auch für andere Tumoren gezeigt werden.[95]

Für DHA konnte gezeigt werden, dass sie dosisabhängig Einfluss auf die Expression der Proteine der Bcl-2-Familie in Leukämiezelllinien nimmt und das Gleichgewicht in Richtung Apoptose verschiebt.[96] EPA und DHA führen auch zur Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien und können so ebenfalls die Apoptose in Leukämiezellen einleiten.[97] PUFA wird insgesamt ein antikanzeregener Effekt zugeschrieben.[95, 98] Auch bei unseren Versuchen führte jeweils die höchste Fettsäure-Konzentration zu einer signifikanten

Abnahme der Zellviabilität. Da es sich bei A549-Zellen um eine Krebszelllinie handelt, könnte dies neben einer Destabilisierung der Membran ein weiterer Grund sein, warum LCPUFA höherer Konzentrationen auf diese Zelllinie toxisch wirken. Aus den genannten Gründen wurden deshalb für die COX-2-Experimente die niedrigsten Konzentrationen von EPA (0,02 pmol/Zelle) und dem LCPUFA-Mix (0,02 pmol/Zelle) verwendet.

#### **4.6 Wirkungen der LCPUFA auf entzündliche Lungenerkrankungen**

In einer Literaturrecherche von de Boer et al. wurden die bisherigen Studienergebnisse zum positiven Effekt von n-3-Fettsäuren auf die Therapie von entzündlichen Lungenerkrankungen zusammengefasst.[75] Danach sind die aus LCPUFA entstehenden Eikosanoide entweder weniger proinflammatorisch oder sogar antiinflammatorisch wirksam.[75] Alternativ können aus n-3 LCPUFA SPM wie Resolvine oder Protektine gebildet werden.[75] Durch die Zugabe von n-3-Fettsäuren als Nahrungsergänzungsmittel konnte die antiinflammatorische Medikation reduziert und so Medikamentennebenwirkungen und der Entstehung einer Therapieresistenz vorgebeugt werden.[75] Die Verbesserung der Lungenfunktion durch Reduktion der Inflammation wird teilweise auch der Konkurrenz von n-3- und n-6-Fettsäuren um die Verstoffwechslung durch spezifische Enzyme wie bspw. die Cyclooxygenase zugeschrieben.[75]

Die Pathogenese von Lungenerkrankungen wie Asthma und CF beruht auf einer unkontrollierbaren chronischen Entzündung und lässt sich durch SPM beeinflussen.[30] Für Rv, PD und Lipoxine konnte gezeigt werden, dass sie die Schwere der Asthmasymptome verringern können, die Hyperreagibilität der Lunge reduzieren, bronchodilatatorisch wirken und die Entzündung selbst hemmen.[86, 99] Ein wichtiges Beispiel hierfür sind die von EPA abgeleiteten E-Serie Rv.[30] Ein Schritt dieser Konversion wird durch die COX-2 katalysiert.[30] RvE wirkt auf verschiedenen Ebenen der Resolution beim Asthma mit.[86] Es verhindert die Migration polymorphkerniger Leukozyten zum Ort der Entzündung, unterdrückt deren Cytokin-vermittelte Aktivierung und löst die Phagozytose durch Makrophagen aus.[86] RvE1 unterdrückt die Produktion von

IL-1, IL-2, IL-6 und TNF- $\alpha$  und reguliert LXA4 herauf.[86, 100] Auch unsere Versuche zeigen, dass EPA alleine zwar die Expression der CM1-induzierten COX-2 signifikant reduzieren kann, aber keinen Einfluss auf die CM1-induzierte IL-6-Produktion hat. Damit bestätigen sich einerseits die antiinflammatorischen Eigenschaften von EPA. Andererseits zeigt sich, dass der Effekt auf die Synthese von IL-6 nicht ausreicht. Durch eine Kombination mit anderen antiinflammatorischen Wirkstoffen könnte sich dieser jedoch potenzieren.[100]

Eine besondere Rolle bei Asthma spielt jedoch LXA4.[100] Dieses ist bei schweren Formen des Asthmas erniedrigt.[100] Grund hierfür ist eine mangelhafte Umwandlung aus AA, die auch durch eine zu geringe Genexpression der beteiligten Enzyme verursacht wird.[100] Unsere Supplementation mit n-3-LCPUFA führte zu einem erniedrigten Anteil an AA in der Zellmembran. Es stellt sich die Frage, ob A549-Zellen das Potential haben, AA zur Resolution nutzen zu können oder nicht. Weitere Experimente könnten sich mit der Messung von SPM beschäftigen, um die Syntheseleistung der A549-Zellen zu eruieren. Falls A549-Zellen AA nicht in antiinflammatorischen Metaboliten umwandeln können, ist es umso wichtiger, den AA-Anteil der Zellmembran durch Supplementation effektiv zu senken.

Bei CF zeigt sich ein gestörter Fettsäurestoffwechsel mit erniedrigten Spiegeln an LA, DHA und Lipoxinen.[100] In beiden Lungenerkrankungen zeigt sich ein Überwiegen an pro-inflammatorischen Fettsäuren und deren Metaboliten. Nicht nur das Vorhandensein einer LCPUFA ist entscheidend für die Integrität eines Gewebes, sondern auch die Fähigkeit antiinflammatorische und entzündungsauflösende Metabolite zu synthetisieren. SPM sind ein Ausdruck dafür, dass die Lungenzellen in der Lage sind, adäquat auf den Entzündungsreiz zu reagieren. Dieses Gleichgewicht ist in chronischen Lungenerkrankungen verloren gegangen.

#### **4.7 Ausblick**

Diese Arbeit hat in einem *in-vitro*-Experiment den Einfluss mehrfach ungesättigter Fettsäuren auf die Expression der COX-2 in A549-Zellen untersucht. Es war das Ziel herauszufinden, inwiefern die Konzentration und die

Kombination der LCPUFA relevant für die Stärke des Effekts auf die COX-2 sind. Da die COX-2 bekanntermaßen in inflammatorische und neoplastische Prozesse involviert ist, hat die optimierte Supplementierung mit LCPUFA das Potential in zahlreichen Krankheiten unterstützend zu wirken. Hier wurde das Hauptaugenmerk auf eine Lungenkrebszelllinie gelegt. Inflammation in der Lunge ist Teil der Pathogenese in Asthma, Pneumonien und der Entstehung von Krebs. Aufgrund des *in-vitro*-Versuchsaufbaus ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse der LCPUFA-Wirkung auf die COX-2-abhängige Entzündung im Menschen nur sehr eingeschränkt möglich. Da die Experimente mit einer Krebszelllinie gemacht wurden, kann nicht ohne weiteres eine Aussage über gesunde Lungenzellen, die ein anderes Fettsäureprofil besitzen, getroffen werden. Es stehen weitere *in-vitro*-Studien an, den LCPUFA-Mix zu optimieren und in einem weiteren Schritt in klinischen Studien die Wirksamkeit im Organismus zu verifizieren.

Diese Ergebnisse zeigen nur einen Teil des immunmodulativen Potentials von LCPUFA auf. Das gesamte Potential von LCPUFA kann jedoch aktuell noch nicht komplett überblickt werden. Shaikh et al. fasst in seinem Review die Daten zahlreicher Studien zum Einfluss von PUFA auf die Organisation der Membran zusammen.[78] Bei antigenpräsentierenden Zellen zeigen PUFA einen immunsuppressiven Effekt.[78] Dieser ist zur Hemmung von Entzündungen, die bei chronischen Krankheiten wie bspw. Asthma eine Rolle spielen, erwünscht.[99] Ein Mechanismus ist, dass die Menge an Molekülen der Klasse II des Haupthistokompatibilitätskomplexes (major histocompatibility complex, MHC) auf der Zelloberfläche durch PUFA gesenkt wird.[78] Dadurch können antigenpräsentierende Zellen Antigene schlechter gegenüber T-Zellen präsentieren.[78] DHA modifiziert die Antigenpräsentation über MHC-I-Glykoproteine durch eine erhöhte Expression und veränderte Konformation.[78] So konnte gezeigt werden, dass die T-Zell-Aktivierung und -Proliferation durch PUFA geschwächt wurde.[78, 101] Nach Aufnahme in die Zellmembran werden PUFA an das C2-Atom des Glycerins von Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin verestert.[102] Dies kann die Membranzusammensetzung durch sterische Effekte und herabgesetzte Van-der-Waals-Kräfte drastisch verändern.[103] Die Zunahme an Doppelbindungen

in der Acylkette geht einher mit einer gesteigerten Fluidität, Membranpermeabilität und Anreicherung von Proteinen in diesen Bereichen.[103] Auf diese Weise nehmen LCPUFA Einfluss auf die Wechselwirkungen zwischen Lipiden und Proteinen sowie die laterale Diffusion.[103]. Die Acylketten der LCPUFA verändern, je nachdem ob es sich um n-3- oder n-6-Acyl-Ketten handelt, den Ordnungsgrad und die Flexibilität der Doppellipidmembran unterschiedlich stark.[104] Dabei ist eine Phospholipiddoppelschicht, die reich an AA ist, besser verformbar und ungeordneter als bei einem hohen Anteil an DHA.[104] Sterische Effekte führen dazu, dass PUFA und Cholesterin inkompatibel sind, wodurch es zu einer Umverteilung von Proteinen zwischen geordneten Bereichen und ungeordneten Bereichen in der Membran kommt, die reich an PUFA sind.[78, 105] Auch gibt es direkte Wechselwirkungen zwischen den Acylketten der PUFA und Oberflächenproteinen.[78, 103] Ein Beispiel stellen DHA und Rhodopsin dar.[103, 106] Die hier erwähnten Einflüsse von LCPUFA müssen in weiteren Experimenten für die verschiedenen Supplementationen noch untersucht werden.

Im Unterschied zu vielen Arbeiten bezüglich des Einflusses von EPA und DHA auf die Entzündung haben wir nicht nur den Einfluss dieser beiden oder von Einzelfettsäuren betrachtet, sondern auch ein Augenmerk auf die Wirkung einer Kombination von LCPUFA gelegt.[15, 18, 35] In weiteren Experimenten wäre es daher sinnvoll zu untersuchen, wie die Zusammensetzung eines LCPUFA-Mixes weiter optimiert werden kann, um noch effizienter zu wirken. Außerdem ist es möglich, dass durch das Erfassen der wechselseitigen Beeinflussung der LCPUFA ihr Potential auf die Resolution gesteigert werden kann. Hierzu sollte die Lipidmediatorsynthese nach entsprechender Fettsäureinkubation genauer analysiert werden.

LCPUFA spielen außerdem eine Rolle bei der Karzinogenese: Nicht allein die n-3-Fettsäuren, die in dieser Arbeit untersucht wurden, scheinen relevant für den antikanzerogenen Effekt zu sein, sondern auch das Verhältnis von n-6- zu n-3-Fettsäuren. Xia et al. zeigten an A549-Zellen, die mit dem fat-1-Gen transfiziert wurden, das für die n-3-Desaturase codiert, dass ein verringertes n-

6/n-3-Verhältnis das invasive Potential von A549-Zellen reduziert.[98] Signifikant weniger transfizierte Zellen durchwanderten einen Filter, der als Basalmembran fungierte, bei einem besseren n-6/n-3-Verhältnis im Vergleich zur Kontrollgruppe.[98] Auf diese Weise wird die invasive Migration dieser Tumorzelllinie verringert.[98] Ursächlich ist wahrscheinlich das Herunterregulieren von Genen, die für Adhäsion und Invasion verantwortlich sind, durch ein verändertes Fettsäure-Gleichgewicht.[98] Eine über Viren in die Zellen eingebrachte n-3-Desaturase, die menschlichen Zellen fehlt, erhöhte den n-3-Gehalt der A549-Zellen ohne zusätzliche Supplementation von Fettsäuren.[98] Dadurch konnte die Adhäsion, Zellmigration und Proliferation signifikant reduziert werden.[98] Dafür wurden Gene (MMP-1 = Matrix Metalloproteinase-1, ITG- $\alpha$ 2 = Integrin  $\alpha$ 2 und NM23-H4 = Mitochondrial Nucleoside Diphosphate Kinase/NDPK-D) herunterreguliert, die bei der Adhäsion bzw. Metastasierung von Tumorzellen eine Rolle spielen.[98] Weiter konnte in einem *in-vivo*-Mausmodell die Prävalenz eines induzierten Lungentumors durch Fischölsupplementation, mit einem niedrigen n-6/n-3-Verhältnis und einem hohen Anteil an EPA und DHA, signifikant reduziert werden.[107] Hierdurch wird erneut die Relevanz des Verhältnisses aus n-6- und n-3-Fettsäuren hervorgehoben.[107] Die mRNA-Spiegel v.a. von LOX-15 und auch LOX-12 wurden signifikant erhöht.[107] Es wurden jedoch keine Änderungen der mRNA-Expression für COX-2 festgestellt.[107] Es wäre interessant, in separaten Studien mehr Erkenntnisse über die Relevanz des n-6/n-3-Verhältnis im Gegensatz zu den absoluten Mengen an n-3- oder n-6-Fettsäuren zu gewinnen.

Die weitere Forschung an LCPUFA ist hinsichtlich ihrer Rolle in der Therapie chronischer Entzündungszustände wie bspw. im Asthma bronchiale im klinischen Alltag vielversprechend. Gerade bei dem lebenslangen Verlauf des Asthmas werden weiterhin Therapiemöglichkeiten gesucht, die zu einer Verbesserung der Lebensqualität führen und die Häufigkeit der Exazerbationen reduzieren können, ohne bei langjähriger Medikamenteneinnahme viele Nebenwirkungen zu haben. Möglicherweise werden LCPUFA einen großen Stellenwert in der Therapie von Fettstoffwechselstörungen, wie der Hypertriglyceridämie, begleitend zu etablierten Medikamenten, wie den

Statinen, einnehmen. Sie müssen diese nicht zwangsläufig verdrängen, aber vielleicht lässt sich durch die Kombination eine Reduktion der restlichen Medikation erreichen. Im Fokus aktueller Forschung steht jedoch auch die Ernährung, die ein relevanter Einflussfaktor auf Krankheiten und die Erhaltung der Gesundheit zu sein scheint. Deshalb ist in Zukunft aufgrund wachsender Erkenntnisse in diesem Bereich mit neuen Therapieansätzen zu rechnen.

## 5 Zusammenfassung

Hintergrund: Die LCPUFA der Zellmembran sind Ausgangspunkt für die Synthese von Lipidmediatoren und können je nach freigesetzter Fettsäure von der Zelle in pro- oder anti-entzündliche Mediatoren verstoffwechselt werden. LCPUFA können das Reaktionsprofil von Zellen beeinflussen, indem sie selbst oder die aus ihnen entstandenen Lipidmediatorderivate an Rezeptoren binden oder auf Genebene ihre Wirkung entfalten. Sowohl das anti-entzündliche Potenzial der Einzelfettsäuren EPA, DHA, GLA und SDA als auch die Wirkung des n-6/n-3-Verhältnisses wurden bereits in zahlreichen Studien gezeigt. Jedoch wurde noch nicht ausführlich auf den Einfluss einer Kombination verschiedener LCPUFA eingegangen, die sich im Hinblick auf die Verstoffwechslung von n-3- und n-6-Fettsäuren durch gleiche Enzyme wechselseitig beeinflussen können.

Zielsetzung: Ziel dieser Arbeit war es deshalb, den Einfluss von mehrfach ungesättigten Fettsäuren allein und in Kombination auf die COX-2-abhängige Inflammation in A549-Lungenepithelzellen zu untersuchen. Die Inkubation der Zellen mit den Einzelfettsäuren EPA, DHA, GLA und SDA wurde einem LCPUFA-Mix aus diesen vier Fettsäuren gegenübergestellt. Es wurde die IL-6-Produktion und die COX-2-Expression in CM1-stimulierten A549-Zellen als Marker einer Entzündung mittels CBA bzw. Durchflusszytometrie gemessen.

Ergebnisse: Durch die Oberflächencharakterisierung der A549-Zellen mittels Durchflusszytometrie konnte ihre Funktion im Immunsystem hervorgehoben werden. Die Inkubation mit den LCPUFA führte zur Aufnahme in die Zellmembran und zur weiteren Verstoffwechslung der Fettsäuren, wie sich gaschromatographisch nachweisen ließ. Der LCPUFA-Mix (0,02 pmol/Zelle) konnte die CM1 induzierte COX-2-Expression nur tendenziell erniedrigen. Im Gegensatz dazu ließ sich die COX-2-Expression durch eine gleiche Menge an EPA (0,02 pmol/Zelle) sehr signifikant (von  $26,81\% \pm 2,78$  auf  $16,43\% \pm 1,45$ ,  $p < 0,01$ ) reduzieren. Die CM1-induzierte IL-6-Produktion wurde weder durch eine Einzelfettsäure EPA, DHA, GLA oder SDA noch den LCPUFA-Mix signifikant gesenkt.

Diskussion: In Übereinstimmung mit Corbière et al. wurden phänotypische Oberflächenmarker auf den A549-Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen, die sie zur Antigenpräsentation gegenüber T-Lymphozyten befähigen und zeigen, dass sie Teil des Immunsystems sind.[76] Im Gegensatz zum LCPUFA-Mix inhibierte EPA die COX-2-Expression. Zwar ist EPA die Hauptkomponente des LCPUFA-Mixes, dieser enthält aber zusätzlich DHA, GLA und SDA. Eine der vorgenannten drei Fettsäuren könnte den hemmenden Effekt des EPAs auf die COX-2 gemindert haben. Es ist aber auch denkbar, dass eine Interaktion der verschiedenen Fettsäuren zu einer geringeren Hemmung geführt hat. Auch andere Forschungsergebnisse bestätigen, dass die Stärke des Effektes von Fettsäuren abhängig von ihrer Kombination und Konzentration ist. Es stellt sich ein Wirkmaximum auf die Genexpression ein, das durch weitere Erhöhung der Fettsäuren nicht gesteigert werden kann und eventuell sogar ins Gegenteil umschlagen könnte. Gleissman et al. stellten erhöhte Spiegel an AA und COX-2 sowie einen geringeren Anteil an EPA und DHA in Tumorgewebe fest.[37] Für die A549-Zellen zeigten sich in der gaschromatographischen Messung ebenfalls im Vergleich zum AA-Anteil ( $5,72\% \pm 0,09$ ) ein geringerer EPA- ( $0,95\% \pm 0,37$ ) und DHA-Anteil ( $0,60\% \pm 0,07$ ). Für COX-2-Inhibitoren konnten bereits antineoplastische Eigenschaften nachgewiesen werden.[94] Dies könnte ein Grund für die eingeschränkte Zellviabilität im XTT-Test bei höheren Fettsäure-Konzentrationen sein.

Fazit: Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass im Gegensatz zu DHA, GLA, SDA und dem LCPUFA-Mix nur EPA eine signifikante antiinflammatorische Wirkung auf die COX-2 ausübte. Jedoch konnte kein signifikanter antiinflammatorischer Effekt hinsichtlich der Produktion des proinflammatorischen Cytokins IL-6 festgestellt werden. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass weder einer alleinigen Fettsäure noch dem LCPUFA-Mix eine überlegene antiinflammatorische Wirkung auf alle hier untersuchten Parameter zugeordnet werden konnte.

## 6 Abstract

Background: LCPUFA of the cellular membrane are substrates for the endogenous biosynthesis of lipid mediators exhibiting either pro- or anti-inflammatory potential depending on the released fatty acid. LCPUFA are capable of affecting the reaction profile of the cell by binding themselves or their derivatives to receptors or take effect on the genetic level. Numerous studies have demonstrated an anti-inflammatory potential of the single fatty acids EPA, DHA, GLA and SDA as well as the effect of the n-6/n-3-ratio. Though effects of a combination of different LCPUFA have not yet been determined in detail. However, it is conceivable, that n-3 and n-6 fatty acids interact, because they are metabolised by the same enzymes.

Objectives: It was therefore the objective of this study to investigate the impact of polyunsaturated fatty acids themselves and their combination on the COX-2-dependent inflammation in A549 lung epithelial cells. Thus, the incubation of the cells with the single fatty acids EPA, DHA, GLA and SDA was compared to the incubation with a fatty acid mixture of the four fatty acids. The IL-6-production and the COX-2-expression in cytokine mixture 1 stimulated A549-cells were measured as a marker for inflammation by the means of CBA and flow cytometry.

Results: The surface characterization of A549-cells emphasized their function in the immune system using flow cytometry. The incubation with LCPUFA led to an uptake of LCPUFA into the cell membrane and further metabolisation of the fatty acids measured using gas chromatography. The fatty acid mix (0.02 pmol/cell) had only a tendency to reduce the cytokine mixture 1-induced COX-2-expression. In contrast to that, the same amount of EPA (0.02 pmol/cell) led to a very significant reduction of the COX-2-expression (from 26.81%  $\pm$  2.78 to 16.43%  $\pm$  1.45,  $p < 0.01$ ). The cytokine mixture 1-induced IL-6-production has not been significantly reduced by a single fatty acids EPA, DHA, GLA or SDA nor the fatty acid mix.

Discussion: In accordance with Corbière et al. phenotypic surface markers of the A549-cells were measured by means of flow cytometry which enable them for antigen presentation to T lymphocytes.[76] This shows that they are part of the immune system. In contrast to the fatty acid mixture, EPA inhibited the COX-2-expression. Indeed, EPA is the main component of the fatty acid mixture, but it also contains DHA, GLA and SDA. One of the three above mentioned fatty acids could have reduced the inhibiting effect of EPA on the COX-2-expression. It is equally conceivable that an interaction of different fatty acids led to a lower inhibition. Other research results also confirm that the strength of fatty acid effects is dependent on their combination and concentration. A maximum effect on the gene expression is reached which cannot be enhanced by further increasing fatty acids or probably leads to opposite effects. Gleissman et al. found increased levels of AA and COX-2 as well as decreased shares of EPA and DHA in cancerous tissue.[37] The gas chromatography showed in comparison with the proportion of AA ( $5.72\% \pm 0.09$ ) a lower proportion of EPA ( $0.95\% \pm 0.37$ ) and DHA ( $0.60\% \pm 0.07$ ) in A549-cells. Antineoplastic properties were proven for COX-2-inhibitors.[94] This could be a reason for restricted cell viability in the XTT-test with higher fatty acid concentrations.

Conclusion: This study shows that - in contrast to DHA, GLA, SDA and the fatty acid mixture - only EPA had a significant anti-inflammatory effect on COX-2. However, no significant anti-inflammatory effects could be determined on the production of the pro-inflammatory cytokine IL-6. In sum, neither a single fatty acid nor the fatty acid mix showed a superior anti-inflammatory effect on every examined parameter.

## 7 Literaturverzeichnis

- 1 Sommerburg O, Schenk JP, Mall MA. Lungenerkrankungen im Kindesalter. *Der Radiologe* 2015;**55**(7):545–553. <https://doi.org/10.1007/s00117-014-2774-8>.
- 2 internetagentur bonn köln sunzinet typo3 und redden programmierung. AWMF: Detail. Available at: <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/020-009.html> Accessed January 21, 2020.
- 3 Matissek R, Baltes W. *Lebensmittelchemie*, 8th edn. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum 2016.
- 4 Müller-Esterl W. *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler - Unter Mitarbeit von Ulrich Brandt, Oliver Anderka, Stefan Kerscher, Stefan Kieß und Katrin Ridinger*, 3rd edn. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum 2018.
- 5 Löffler G, Heinrich PC, Petrides PE, eds. *Biochemie und Pathobiochemie*, 8th edn. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg 2007.
- 6 Ratnayake WMN, Galli C. Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: A background review paper. *Annals of nutrition & metabolism* 2009;**55**(1-3):8–43. doi:10.1159/000228994.
- 7 Burdge GC, Calder PC. Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reproduction, nutrition, development* 2005;**45**(5):581–597. doi:10.1051/rnd:2005047.
- 8 Davis BC, Kris-Etherton PM. Achieving optimal essential fatty acid status in vegetarians: Current knowledge and practical implications. *The American journal of clinical nutrition* 2003;**78**(3 Suppl):640S-646S. doi:10.1093/ajcn/78.3.640S.
- 9 Gibson RA, Muhlhauser B, Makrides M. Conversion of linoleic acid and alpha-linolenic acid to long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs),

- with a focus on pregnancy, lactation and the first 2 years of life. *Maternal & child nutrition* 2011;**7 Suppl 2**:17–26. doi:10.1111/j.1740-8709.2011.00299.x.
- 10 Kim K-B, Nam YA, Kim HS, et al.  $\alpha$ -Linolenic acid: Nutraceutical, pharmacological and toxicological evaluation. *Food and chemical toxicology an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 2014;**70**:163–178. doi:10.1016/j.fct.2014.05.009.
- 11 Emken EA, Adlof RO, Gulley RM. Dietary linoleic acid influences desaturation and acylation of deuterium-labeled linoleic and linolenic acids in young adult males. *Biochimica et biophysica acta* 1994;**1213**(3):277–288.
- 12 Hrelia S, Lopez Jimenez JA, Bordoni A, et al. Essential fatty acid metabolism in cultured rat cardiomyocytes in response to either N-6 or N-3 fatty acid supplementation. *Biochemical and biophysical research communications* 1995;**216**(1):11–19.
- 13 Galli C, Calder PC. Effects of fat and fatty acid intake on inflammatory and immune responses: A critical review. *Annals of nutrition & metabolism* 2009;**55**(1-3):123–139. doi:10.1159/000228999.
- 14 Kapoor R, Huang Y-S. Gamma linolenic acid: An antiinflammatory omega-6 fatty acid. *Current pharmaceutical biotechnology* 2006;**7**(6):531–534.
- 15 Sung J, Jeon H, Kim I-H, et al. Anti-Inflammatory Effects of Stearidonic Acid Mediated by Suppression of NF- $\kappa$ B and MAP-Kinase Pathways in Macrophages. *Lipids* 2017;**52**(9):781–787. doi:10.1007/s11745-017-4278-6.
- 16 Tallima H, El Ridi R. Arachidonic acid: Physiological roles and potential health benefits – A review. *Journal of Advanced Research* 2017;**11**:33–41. doi:10.1016/j.jare.2017.11.004.
- 17 Giudetti AM, Cagnazzo R. Beneficial effects of n-3 PUFA on chronic airway inflammatory diseases. *Prostaglandins & other lipid mediators* 2012;**99**(3-4):57–67. doi:10.1016/j.prostaglandins.2012.09.006.

- 18 Yates CM, Calder PC, Ed Rainger G. Pharmacology and therapeutics of omega-3 polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory disease. *Pharmacology & therapeutics* 2014;**141**(3):272–282. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.10.010.
- 19 Khaddaj-Mallat R, Morin C, Rousseau É. Novel n-3 PUFA monoacylglycerides of pharmacological and medicinal interest: Anti-inflammatory and anti-proliferative effects. *European journal of pharmacology* 2016;**792**:70–77. doi:10.1016/j.ejphar.2016.10.038.
- 20 Hiram R, Rizcallah E, Marouan S, et al. Resolvin E1 normalizes contractility, Ca<sup>2+</sup> sensitivity and smooth muscle cell migration rate in TNF- $\alpha$ - and IL-6-pretreated human pulmonary arteries. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2015;**309**(8):L776-88. doi:10.1152/ajplung.00177.2015.
- 21 Arita M, Bianchini F, Aliberti J, et al. Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. *The Journal of experimental medicine* 2005;**201**(5):713–722. doi:10.1084/jem.20042031.
- 22 Xia Y, Shen S, Verma IM. NF- $\kappa$ B, an active player in human cancers. *Cancer immunology research* 2014;**2**(9):823–830. doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0112.
- 23 Schmitz G, Ecker J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Progress in lipid research* 2008;**47**(2):147–155. doi:10.1016/j.plipres.2007.12.004.
- 24 Lee TH, Menica-Huerta JM, Shih C, et al. Characterization and biologic properties of 5,12-dihydroxy derivatives of eicosapentaenoic acid, including leukotriene B5 and the double lipoxygenase product. *The Journal of biological chemistry* 1984;**259**(4):2383–2389.
- 25 Barham JB, Edens MB, Fonteh AN, et al. Addition of eicosapentaenoic acid to gamma-linolenic acid-supplemented diets prevents serum arachidonic

- acid accumulation in humans. *The Journal of nutrition* 2000;**130**(8):1925–1931. doi:10.1093/jn/130.8.1925.
- 26 Levin G, Duffin KL, Obukowicz MG, et al. Differential metabolism of dihomo-gamma-linolenic acid and arachidonic acid by cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2: implications for cellular synthesis of prostaglandin E1 and prostaglandin E2. *Biochemical Journal* 2002;**365**(Pt 2):489–496. doi:10.1042/BJ20011798.
- 27 Arm JP, Boyce JA, Wang L, et al. Impact of botanical oils on polyunsaturated fatty acid metabolism and leukotriene generation in mild asthmatics. *Lipids in health and disease* 2013;**12**:141. doi:10.1186/1476-511X-12-141.
- 28 Caterina R de, Liao JK, Libby P. Fatty acid modulation of endothelial activation. *The American journal of clinical nutrition* 2000;**71**(1 Suppl):213S-23S. doi:10.1093/ajcn/71.1.213S.
- 29 Schuster GU, Bratt JM, Jiang X, et al. Dietary long-chain omega-3 fatty acids do not diminish eosinophilic pulmonary inflammation in mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2014;**50**(3):626–636. doi:10.1165/rcmb.2013-0136OC.
- 30 Serhan CN, Chiang N, van Dyke TE. Resolving inflammation: Dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature reviews. Immunology* 2008;**8**(5):349–361. doi:10.1038/nri2294.
- 31 Whelan J. Dietary stearidonic acid is a long chain (n-3) polyunsaturated fatty acid with potential health benefits. *The Journal of nutrition* 2009;**139**(1):5–10. doi:10.3945/jn.108.094268.
- 32 Giltay EJ, Gooren LJJ, Toorians AWFT, et al. Docosahexaenoic acid concentrations are higher in women than in men because of estrogenic effects. *The American journal of clinical nutrition* 2004;**80**(5):1167–1174. doi:10.1093/ajcn/80.5.1167.

- 33 Innis SM. Essential fatty acids in growth and development. *Progress in lipid research* 1991;**30**(1):39–103.
- 34 Beermann C, Neumann S, Fußbroich D, et al. Combinations of distinct long-chain polyunsaturated fatty acid species for improved dietary treatment against allergic bronchial asthma. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 2016;**32**(11-12):1165–1170. doi:10.1016/j.nut.2016.04.004.
- 35 Sergeant S, Rahbar E, Chilton FH. Gamma-linolenic acid, Dihommo-gamma linolenic, Eicosanoids and Inflammatory Processes. *European journal of pharmacology* 2016;**785**:77–86. doi:10.1016/j.ejphar.2016.04.020.
- 36 Akbari M, Ostadmohammadi V, Tabrizi R, et al. The effects of alpha-lipoic acid supplementation on inflammatory markers among patients with metabolic syndrome and related disorders: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition & metabolism* 2018;**15**:39. doi:10.1186/s12986-018-0274-y.
- 37 Gleissman H, Johnsen JI, Kogner P. Omega-3 fatty acids in cancer, the protectors of good and the killers of evil? *Experimental cell research* 2010;**316**(8):1365–1373. doi:10.1016/j.yexcr.2010.02.039.
- 38 Johnson MM, Swan DD, Surette ME, et al. Dietary supplementation with gamma-linolenic acid alters fatty acid content and eicosanoid production in healthy humans. *The Journal of nutrition* 1997;**127**(8):1435–1444. doi:10.1093/jn/127.8.1435.
- 39 Lovell CR, Burton JL, Horrobin DF. Treatment of atopic eczema with evening primrose oil. *Lancet (London, England)* 1981;**1**(8214):278.
- 40 Arm JP, Boyce JA, Wang L, et al. Impact of botanical oils on polyunsaturated fatty acid metabolism and leukotriene generation in mild asthmatics. *Lipids in health and disease* 2013;**12**:141. doi:10.1186/1476-511X-12-141.
- 41 Mozaffarian D, Ascherio A, Hu FB, et al. Interplay Between Different Polyunsaturated Fatty Acids and Risk of Coronary Heart Disease in Men.

- Circulation 2005;**111**(2):157–164.  
doi:10.1161/01.CIR.0000152099.87287.83.
- 42 Lee K-P, Park S-J, Kang S, et al.  $\omega$ -3 Polyunsaturated fatty acids accelerate airway repair by activating FFA4 in club cells. American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology 2017;**312**(6):L835-L844.  
doi:10.1152/ajplung.00350.2016.
- 43 Serhan CN, Petasis NA. Resolvins and protectins in inflammation resolution. Chemical reviews 2011;**111**(10):5922–5943. doi:10.1021/cr100396c.
- 44 Serhan CN, Yang R, Martinod K, et al. Maresins: Novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions. The Journal of experimental medicine 2009;**206**(1):15–23.  
doi:10.1084/jem.20081880.
- 45 Serhan CN, Hong S, Gronert K, et al. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. The Journal of experimental medicine 2002;**196**(8):1025–1037.
- 46 Levy BD, Kohli P, Gotlinger K, et al. Protectin D1 is generated in asthma and dampens airway inflammation and hyperresponsiveness. Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950) 2007;**178**(1):496–502.
- 47 Schwab JM, Chiang N, Arita M, et al. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. Nature 2007;**447**(7146):869–874.  
doi:10.1038/nature05877.
- 48 Duvall MG, Levy BD. DHA- and EPA-derived resolvins, protectins, and maresins in airway inflammation. European journal of pharmacology 2016;**785**:144–155. doi:10.1016/j.ejphar.2015.11.001.
- 49 Uddin M, Levy BD. Resolvins: Natural agonists for resolution of pulmonary inflammation. Progress in lipid research 2011;**50**(1):75–88.  
doi:10.1016/j.plipres.2010.09.002.

- 50 Basil MC, Levy BD. Specialized pro-resolving mediators: Endogenous regulators of infection and inflammation. *Nature reviews. Immunology* 2016;**16**(1):51–67. doi:10.1038/nri.2015.4.
- 51 Hoy SM, Keating GM. Omega-3 ethylester concentrate: A review of its use in secondary prevention post-myocardial infarction and the treatment of hypertriglyceridaemia. *Drugs* 2009;**69**(8):1077–1105. doi:10.2165/00003495-200969080-00008.
- 52 Jacobson TA. Secondary prevention of coronary artery disease with omega-3 fatty acids. *The American journal of cardiology* 2006;**98**(4A):61i-70i. doi:10.1016/j.amjcard.2005.12.028.
- 53 Kar S. Omacor and omega-3 fatty acids for treatment of coronary artery disease and the pleiotropic effects. *American journal of therapeutics* 2014;**21**(1):56–66. doi:10.1097/MJT.0b013e31822b5603.
- 54 Gold DR, Litonjua AA, Carey VJ, et al. Lung VITAL: Rationale, design, and baseline characteristics of an ancillary study evaluating the effects of vitamin D and/or marine omega-3 fatty acid supplements on acute exacerbations of chronic respiratory disease, asthma control, pneumonia and lung function in adults. *Contemporary clinical trials* 2016;**47**:185–195. doi:10.1016/j.cct.2016.01.003.
- 55 Bays H. Clinical overview of Omacor: a concentrated formulation of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *The American journal of cardiology* 2006;**98**(4A):71i-76i. doi:10.1016/j.amjcard.2005.12.029.
- 56 Durrington P, Bhatnagar D, Mackness M, et al. An omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrate administered for one year decreased triglycerides in simvastatin treated patients with coronary heart disease and persisting hypertriglyceridaemia. *Heart* 2001;**85**(5):544–548. doi:10.1136/heart.85.5.544.
- 57 Ito MK. A Comparative Overview of Prescription Omega-3 Fatty Acid Products. *Pharmacy and Therapeutics* 2015;**40**(12):826–857.

- 58 Manson JE, Bassuk SS, Lee I-M, et al. The VITamin D and OmegA-3 Trial (VITAL): rationale and design of a large randomized controlled trial of vitamin D and marine omega-3 fatty acid supplements for the primary prevention of cancer and cardiovascular disease. *Contemporary clinical trials* 2012;**33**(1):159–171. doi:10.1016/j.cct.2011.09.009.
- 59 Findings about the Vital Study 2018. Available at: <https://www.vitalstudy.org/findings.html> Accessed February 03, 2019.
- 60 Vitamin D and Omega-3 Trial (VITAL) - No Study Results Posted - ClinicalTrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT01169259> Accessed February 03, 2019.
- 61 Zhao A, Lam S. Omega-3-carboxylic acid (Epanova) for hypertriglyceridemia. *Cardiology in review* 2015;**23**(3):148–152. doi:10.1097/CRD.000000000000051.
- 62 Manerba A, Vizzardì E, Metra M, et al. n-3 PUFAs and cardiovascular disease prevention. *Future cardiology* 2010;**6**(3):343–350. doi:10.2217/fca.10.19.
- 63 Simopoulos AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 2002;**56**(8):365–379.
- 64 Larsson SC, Kumlin M, Ingelman-Sundberg M, et al. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: A review of potential mechanisms. *The American journal of clinical nutrition* 2004;**79**(6):935–945. doi:10.1093/ajcn/79.6.935.
- 65 Barros R, Moreira A, Fonseca J, et al. Dietary intake of  $\alpha$ -linolenic acid and low ratio of n-6:n-3 PUFA are associated with decreased exhaled NO and improved asthma control. *The British journal of nutrition* 2011;**106**(3):441–450. doi:10.1017/S0007114511000328.

- 66 Mickleborough TD, Lindley MR, Ionescu AA, et al. Protective effect of fish oil supplementation on exercise-induced bronchoconstriction in asthma. *Chest* 2006;**129**(1):39–49. doi:10.1378/chest.129.1.39.
- 67 Mickleborough TD, Vaughn CL, Shei R-J, et al. Marine lipid fraction PCSO-524 (lyprinol/omega XL) of the New Zealand green lipped mussel attenuates hyperpnea-induced bronchoconstriction in asthma. *Respiratory medicine* 2013;**107**(8):1152–1163. doi:10.1016/j.rmed.2013.04.010.
- 68 Bilal S, Haworth O, Wu L, et al. Fat-1 transgenic mice with elevated omega-3 fatty acids are protected from allergic airway responses. *Biochimica et biophysica acta* 2011;**1812**(9):1164–1169. doi:10.1016/j.bbadis.2011.05.002.
- 69 Fussbroich D, Zimmermann K, Göpel A, et al. A specific combined long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation reverses fatty acid profile alterations in a mouse model of chronic asthma. *Lipids in health and disease* 2019;**18**(1):16. doi:10.1186/s12944-018-0947-6.
- 70 Schubert R, Kitz R, Beermann C, et al. Influence of low-dose polyunsaturated fatty acids supplementation on the inflammatory response of healthy adults. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 2007;**23**(10):724–730. doi:10.1016/j.nut.2007.06.012.
- 71 Schubert R, Kitz R, Beermann C, et al. Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids in asthma after low-dose allergen challenge. *International archives of allergy and immunology* 2009;**148**(4):321–329. doi:10.1159/000170386.
- 72 BLIGH EG, DYER WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology* 1959;**37**(8):911–917. doi:10.1139/o59-099.
- 73 Kohn G, Ploeg P, Möbius M, et al. Influence of the derivatization procedure on the results of the gaschromatographic fatty acid analysis of human milk and infant formulae. *Z Ernährungswiss* 1996;**35**(3):226–234. doi:10.1007/BF01625685.

- 74 Arita M. Mediator lipidomics in acute inflammation and resolution. *Journal of biochemistry* 2012;**152**(4):313–319. doi:10.1093/jb/mvs092.
- 75 Boer A de, van de Worp WRP, Hageman GJ, et al. The effect of dietary components on inflammatory lung diseases - a literature review. *International journal of food sciences and nutrition* 2017;**68**(7):771–787. doi:10.1080/09637486.2017.1288199.
- 76 Corbière V, Dirix V, Norrenberg S, et al. Phenotypic characteristics of human type II alveolar epithelial cells suitable for antigen presentation to T lymphocytes. *Respiratory research* 2011;**12**:15. doi:10.1186/1465-9921-12-15.
- 77 Pia Ascher. Einfluss einer EPA, DHA, GLA und SDA-Gabe auf das Fettsäureprofil von karzinogenen Lungenepithelzellen unter Inflammation. Bachelor-Thesis. Fulda 2018.
- 78 Shaikh SR, Edidin M. Polyunsaturated fatty acids and membrane organization: Elucidating mechanisms to balance immunotherapy and susceptibility to infection. *Chemistry and physics of lipids* 2008;**153**(1):24–33. doi:10.1016/j.chemphyslip.2008.02.008.
- 79 He M, Guo S, Ren J, et al. In Situ Characterizing Membrane Lipid Phenotype of Human Lung Cancer Cell Lines Using Mass Spectrometry Profiling. *Journal of Cancer* 2016;**7**(7):810–816. doi:10.7150/jca.14310.
- 80 Zhang Y, He C, Qiu L, et al. Serum unsaturated free Fatty acids: potential biomarkers for early detection and disease progression monitoring of non-small cell lung cancer. *Journal of Cancer* 2014;**5**(8):706–714. doi:10.7150/jca.9787.
- 81 Allam-Ndoul B, Guénard F, Barbier O, et al. Effect of n-3 fatty acids on the expression of inflammatory genes in THP-1 macrophages. *Lipids in health and disease* 2016;**15**:69. doi:10.1186/s12944-016-0241-4.
- 82 Trombetta A, Maggiora M, Martinasso G, et al. Arachidonic and docosahexaenoic acids reduce the growth of A549 human lung-tumor cells

- increasing lipid peroxidation and PPARs. *Chemico-biological interactions* 2007;**165**(3):239–250. doi:10.1016/j.cbi.2006.12.014.
- 83 Yin Y, Sui C, Meng F, et al. The omega-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid inhibits proliferation and progression of non-small cell lung cancer cells through the reactive oxygen species-mediated inactivation of the PI3K /Akt pathway. *Lipids in health and disease* 2017;**16**(1):87. doi:10.1186/s12944-017-0474-x.
- 84 Gdula-Argasińska J, Czepiel J, Woźniakiewicz A, et al. n-3 Fatty acids as resolvents of inflammation in the A549 cells. *Pharmacological reports PR* 2015;**67**(3):610–615. doi:10.1016/j.pharep.2015.01.001.
- 85 Levental KR, Lorent JH, Lin X, et al. Polyunsaturated Lipids Regulate Membrane Domain Stability by Tuning Membrane Order. *Biophysical journal* 2016;**110**(8):1800–1810. doi:10.1016/j.bpj.2016.03.012.
- 86 Kumar A, Mastana SS, Lindley MR. n-3 Fatty acids and asthma. *Nutrition research reviews* 2016;**29**(1):1–16. doi:10.1017/S0954422415000116.
- 87 Fussbroich D, Colas RA, Eickmeier O, et al. A combination of LCPUFA ameliorates airway inflammation in asthmatic mice by promoting pro-resolving effects and reducing adverse effects of EPA 2020. doi:10.1038/s41385-019-0245-2.
- 88 Relja B, Omid N, Konradowitz K, et al. Decreased inflammatory responses of human lung epithelial cells after ethanol exposure are mimicked by ethyl pyruvate. *Mediators of inflammation* 2014;**2014**:781519. doi:10.1155/2014/781519.
- 89 Turpeinen T, Nieminen R, Moilanen E, et al. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 negatively regulates the expression of interleukin-6, interleukin-8, and cyclooxygenase-2 in A549 human lung epithelial cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2010;**333**(1):310–318. doi:10.1124/jpet.109.157438.

- 90 Kjær MA, Ruyter B, Berge GM, et al. Regulation of the Omega-3 Fatty Acid Biosynthetic Pathway in Atlantic Salmon Hepatocytes. *PloS one* 2016;**11**(12):e0168230. doi:10.1371/journal.pone.0168230.
- 91 Cranmer-Byng MM, Liddle DM, Boer AA de, et al. Proinflammatory effects of arachidonic acid in a lipopolysaccharide-induced inflammatory microenvironment in 3T3-L1 adipocytes in vitro. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme* 2015;**40**(2):142–154. doi:10.1139/apnm-2014-0022.
- 92 Kelavkar UP, Hutzley J, Dhir R, et al. Prostate tumor growth and recurrence can be modulated by the omega-6: Omega-3 ratio in diet: athymic mouse xenograft model simulating radical prostatectomy. *Neoplasia (New York, N.Y.)* 2006;**8**(2):112–124. doi:10.1593/neo.05637.
- 93 Chêne G, Dubourdeau M, Balard P, et al. n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids induce the expression of COX-2 via PPARgamma activation in human keratinocyte HaCaT cells. *Biochimica et biophysica acta* 2007;**1771**(5):576–589. doi:10.1016/j.bbalip.2007.02.014.
- 94 Koki, Leahy, Masferrer. Potential utility of COX-2 inhibitors in chemoprevention and chemotherapy. *Expert opinion on investigational drugs* 1999;**8**(10):1623–1638. doi:10.1517/13543784.8.10.1623.
- 95 Yao Q-H, Zhang X-C, Fu T, et al.  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids inhibit the proliferation of the lung adenocarcinoma cell line A549 in vitro. *Molecular medicine reports* 2014;**9**(2):401–406. doi:10.3892/mmr.2013.1829.
- 96 Yamagami T, Porada CD, Pardini RS, et al. Docosahexaenoic acid induces dose dependent cell death in an early undifferentiated subtype of acute myeloid leukemia cell line. *Cancer biology & therapy* 2009;**8**(4):331–337.
- 97 Arita K, Kobuchi H, Utsumi T, et al. Mechanism of apoptosis in HL-60 cells induced by n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Biochemical pharmacology* 2001;**62**(7):821–828.

- 98 Xia S-H, Wang J, Kang JX. Decreased n-6/n-3 fatty acid ratio reduces the invasive potential of human lung cancer cells by downregulation of cell adhesion/invasion-related genes. *Carcinogenesis* 2005;**26**(4):779–784. doi:10.1093/carcin/bgi019.
- 99 Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *The American journal of clinical nutrition* 2006;**83**(6 Suppl):1505S-1519S.
- 100 Eickmeier O, Hilberath JN, Zielen S, et al. Die Rolle neuer "pro-resolving" Lipidmediatoren bei entzündlichen Lungenerkrankungen. *Pneumologie (Stuttgart, Germany)* 2011;**65**(3):149–158. doi:10.1055/s-0030-1255913.
- 101 Switzer KC, McMurray DN, Chapkin RS. Effects of dietary n–3 polyunsaturated fatty acids on T-Cell membrane composition and function. *Lipids* 2004;**39**(12):1163–1170. doi:10.1007/s11745-004-1343-y.
- 102 Stubbs CD, Smith AD. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochimica et biophysica acta* 1984;**779**(1):89–137.
- 103 Stillwell W, Wassall SR. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chemistry and physics of lipids* 2003;**126**(1):1–27.
- 104 Rajamoorthi K, Petrache HI, McIntosh TJ, et al. Packing and viscoelasticity of polyunsaturated omega-3 and omega-6 lipid bilayers as seen by (2)H NMR and X-ray diffraction. *Journal of the American Chemical Society* 2005;**127**(5):1576–1588. doi:10.1021/ja046453b.
- 105 Shaikh SR, Cherezov V, Caffrey M, et al. Molecular organization of cholesterol in unsaturated phosphatidylethanolamines: X-ray diffraction and solid state 2H NMR reveal differences with phosphatidylcholines. *Journal of the American Chemical Society* 2006;**128**(16):5375–5383. doi:10.1021/ja057949b.
- 106 Grossfield A, Feller SE, Pitman MC. A role for direct interactions in the modulation of rhodopsin by omega-3 polyunsaturated lipids. *Proceedings of*

the National Academy of Sciences of the United States of America  
2006;**103**(13):4888–4893. doi:10.1073/pnas.0508352103.

107 Mernitz H, Lian F, Smith DE, et al. Fish oil supplementation inhibits NNK-induced lung carcinogenesis in the A/J mouse. *Nutrition and cancer* 2009;**61**(5):663–669. doi:10.1080/01635580902825589.

## 8 Danksagung

Einen besonderen Dank möchte ich meiner Mutter aussprechen. Sie hat immer eine prägende Rolle in meinem Leben gespielt und meine Fähigkeiten und Interessen wahrgenommen, gefördert und unterstützt. Ohne sie wäre ich nicht so weit gekommen, wie ich es bis heute bin.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Ralf Schubert, der mir eine spannende experimentelle Doktorarbeit ermöglicht hat und mich zu selbständigem Arbeiten im Labor ermutigt hat. Dadurch hat er nicht zuletzt meine Freude an Forschung geweckt.

Ich bedanke mich bei Frau Dr. Daniela Fußbroich, die mir mit Ihrer wissenschaftlichen Erfahrung bei Fragen jederzeit zur Seite stand.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeiterinnen des Pneumologisch-Immunologischen Labors der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universitätsklinik Frankfurt für die freundliche Arbeitsatmosphäre sowie für die nette Kooperation mit dem Mikrobiologischen Labor im Fachbereich Lebensmitteltechnologie der Hochschule Fulda unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Christopher Beermann, die meine Arbeit bereichert hat.

## 9 Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Die Wirkung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren auf die COX-2-abhängige Inflammation von A549-Lungenepithelzellen

in dem Pneumologisch-Immunologischen Labor der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universitätsklinik Frankfurt unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Ralf Schubert mit Unterstützung von Frau Dr. Daniela Fußbroich ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden (oder werden) in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Fussbroich D, Kohnle C, Schwenger T, Driessler C, Dücker RP, Eickmeier O, Gottwald G, Jerkic SP, Zielen S, Kreyenberg H, Beermann C, Chiocchetti AG, Schubert R. A combination of LCPUFAs regulates the expression of miRNA-146a-5p in a murine asthma model and human alveolar cells. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2019 Nov 4;147:106378.

Frankfurt, 22.02.2021

(Ort, Datum)



(Unterschrift)