UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Biochemie und molekulare Zellbiologie

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Andreas Guse

Die Rolle von Serum Amyloid A bei der Entstehung von Insulinresistenz in Adipozyten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Susanne Rieckmann aus Frankfurt a.M.

Hamburg 2014

Meinen Eltern Ute und Christoph Rieckmann

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 24.06.2015

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. J. Heeren

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. A. Niemeier

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD Dr. C. Mühlhausen

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Insulin - Bedeutung für Stoffwechsel, Wachstum und Differenzierung	2
1.2 Insulinsignalwege	3
1.2.1 Vom Rezeptor bis zur Glukoseaufnahme	3
1.2.2 Weitere Signalwege des Insulins	4
1.2.3 Regulationsmechanismen der Insulinsignaltransduktion	5
1.3 Insulinresistenz- Ursachen und Folgen	7
1.4 Entzündung - Bindeglied zwischen Übergewicht und Insulinresistenz	9
1.5 Inflammatorische Signalwege und Insulinresistenz	10
1.5.1 Aktivierung von MAPKinasen	11
1.5.2 Aktivierung des NF-кB-Signalwegs	12
1.5.3 Einfluss von TNF α auf die Genexpression in Fettzellen	13
1.6 Auslöser der Entzündungsreaktion	14
1.7 Serum Amyloid A (SAA)	15
1.8 Ziel der Arbeit	17
2. Material und Methoden	18
2.1 Zellkultur. Stimulation und Gewinnung von Zelllvsaten	18
- · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
2.1.1 Auftauen, Kultivierung und Differenzierung der Zellen	18
2.1.1 Auftauen, Kultivierung und Differenzierung der Zellen2.1.2 Stimulation und Lyse der Zellen	18 19
 2.1.1 Auftauen, Kultivierung und Differenzierung der Zellen 2.1.2 Stimulation und Lyse der Zellen 2.2 Western Blot 	18 19 21
 2.1.1 Auftauen, Kultivierung und Differenzierung der Zellen 2.1.2 Stimulation und Lyse der Zellen 2.2 Western Blot 2.2.1 Allgemein 	18 19 21 21
 2.1.1 Auftauen, Kultivierung und Differenzierung der Zellen 2.1.2 Stimulation und Lyse der Zellen 2.2 Western Blot 2.2.1 Allgemein 2.2.2 Probenvorbereitung 	18 19 21 21 22
 2.1.1 Auftauen, Kultivierung und Differenzierung der Zellen	18 19 21 21 22 22
 2.1.1 Auftauen, Kultivierung und Differenzierung der Zellen	18 19 21 21 22 22 23
 2.1.1 Auftauen, Kultivierung und Differenzierung der Zellen	 18 19 21 21 22 22 23 25
 2.1.1 Auftauen, Kultivierung und Differenzierung der Zellen	 18 19 21 21 22 22 23 25 25
 2.1.1 Auftauen, Kultivierung und Differenzierung der Zellen	 18 19 21 21 22 23 25 25 25
 2.1.1 Auftauen, Kultivierung und Differenzierung der Zellen 2.1.2 Stimulation und Lyse der Zellen 2.2 Western Blot 2.2.1 Allgemein 2.2.2 Probenvorbereitung 2.2.3 Durchführung der Blots 2.2.4 Strippen der Blots 2.3 RNA-Analysen 2.3.1 RNA-Isolation 2.3.2 Schreiben von cDNA 2.3.3 Real-Time-PCR (TaqMan) 	 18 19 21 21 22 23 25 25 25 25

3.1 Aktivierung von MAP-Kinasen durch SAA in 3T3-L1 Adipozyten	. 28
3.1.1 Aktivierung von JNK, ERK und p38-MAPK	. 28
3.1.2 Stimulationen mit SAA1/2, HDL, TNF α und LPS im Vergleich	. 30
3.1.3 Dosisabhängige Aktivierung von JNK und p38-MAPK durch SAA1/2	. 32
3.2 Aktivierung von NF-кB durch SAA in 3T3-L1 Adipozyten	. 33
3.3 Einfluss von SAA auf die Genexpression in 3T3-L1 Adipozyten	. 36
3.3.1 Induktion von Chemokinen durch SAA	. 37
3.3.2 Induktion von IL6 und SOCS3 durch SAA	. 39
3.3.3 Suppression von Lipogenese-Genen durch SAA	. 39
3.4 Effekt von SAA auf die Insulin Signaltransduktion	. 41
4. Diskussion	. 43
4.1 Aktivierung von IRS-Kinasen durch SAA in 3T3-L1 Adipozyten	. 43
4.2 Einfluss von SAA auf die Genexpression in 3T3-L1 Adipozyten	. 45
4.2.1 Induktion inflammatorischer Gene durch SAA	. 45
4.2.2 Suppression Stoffwechsel-relevanter Gene durch SAA	. 47
4.3 TLR4 - ein möglicher Rezeptor von SAA	. 48
4.4 Bedeutung von SAA Isoformen in Maus und Mensch	. 49
4.5 Bedeutung von SAA in anderen Gewebearten	. 50
4.6 Therapiemöglichkeiten	. 51
5. Zusammenfassung	. 53
6. Anhang	. 54
6.1 Abkürzungsverzeichnis	. 54
6.2 Abbildungsverzeichnis	. 57
6.3 Tabellenverzeichnis	. 58
7. Literaturverzeichnis	. 59
8. Danksagung	. 69
9. Lebenslauf	. 70
10. Eidesstattliche Versicherung	. 71

Die enge Assoziation von Übergewicht und Insulinresistenz ist lange bekannt. Beide Faktoren spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Typ-2-Diabetes. Zusätzlich sind sie häufig mit weiteren kardiovaskulären Risikofaktoren wie Dyslipidämie und Hypertonus assoziiert (Reaven, 1995), deren gemeinsames Auftreten in den letzten Jahren unter dem Begriff "metabolisches Syndrom" zusammengefasst wurde (Hajer et al., 2008). Die Anzahl übergewichtiger Menschen hat in den letzten 30 Jahren drastisch zugenommen und Typ-2-Diabetes gehört mittlerweile zu den häufigsten Erkrankungen des 21. Jahrhunderts (Zimmet, 2000). Aufgrund der mikro-vaskulären Komplikationen an Auge, Niere und Nervensystem ist Diabetes die häufigste Ursache für Erblindung, Niereninsuffizienz und Schädigung des peripheren Nervensystems. Zusätzlich haben Diabetiker ein erhöhtes Risiko für makro-vaskuläre Komplikationen wie Herzinfarkt, Schlaganfall und Periphere arterielle Verschlußkrankheit (PAVK) (Brownlee, 2001).

Die Mechanismen für die Entstehung von Insulinresistenz unter Übergewicht sind noch nicht vollständig geklärt. In den letzten Jahren wurde zunehmend deutlich, dass Entzündungsvorgänge im Fettgewebe eine wichtige Rolle spielen (Wellen and Hotamisligil, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass die bei Übergewicht vermehrten und hypertrophierten Fettzellen endokrin aktiv sind und eine Vielzahl an Substanzen sezernieren, die den Energiestoffwechsel und die Insulinsensitivität maßgeblich beeinflussen, sogenannte Adipokine (Mohamed-Ali et al., 1998). Insbesondere der Anstieg an Entzündungsmediatoren wie ,tumor necrosis factor alpha' (TNF α) wird in Zusammenhang mit Insulinresistenz gebracht. Es konnte gezeigt werden, dass inflammatorische Signalwege, die durch TNF α aktiviert werden, den Insulinsignalweg hemmen und zur Induktion weiterer Mediatoren führen, die das entzündliche Geschehen aufrechterhalten (Cawthorn and Sethi, 2008). Adipokine könnten daher das kausale Bindeglied zwischen Übergewicht und Insulinresistenz sein.

Ein Entzündungsmediator, der ebenfalls unter Übergewicht im Blut ansteigt und mit Insulinresistenz korreliert, ist Serum Amyloid A (SAA). Welche Signalwege SAA in Fettzellen aktiviert und wie stark SAA die Entzündungsreaktion im Fettgewebe und darüber die Insulinsensitivität beeinflusst, soll in dieser Arbeit untersucht werden.

1.1 Insulin - Bedeutung für Stoffwechsel, Wachstum und Differenzierung

Insulin ist ein Peptidhormon, das in den B-Zellen der Langerhans-Inseln der Bauchspeicheldrüse synthetisiert wird. Einen Sekretionsreiz stellen die nach Nahrungsaufnahme erhöhten Glukose- und Aminosäurespiegel im Blut dar (Sesti, 2006). Eine der Hauptaufgaben von Insulin ist die Senkung des Blutzuckerspiegels. Neben dem Kohlenhydratstoffwechsel werden aber auch der Lipid- und Eiweißstoffwechsel maßgeblich durch Insulin beeinflusst (s. Abb. 1). Die Senkung des Blutzuckerspiegels erfolgt auf mehreren Wegen. Zum einen bewirkt Insulin eine vermehrte Aufnahme von Glukose vorwiegend in Skelettmuskulatur und Fettgewebe, zum anderen wird die Glukoseproduktion in der Leber durch Insulin vermindert, indem die Glukoneogenese sowie die Glykogenolyse gehemmt werden (Sesti, 2006). Die aufgenommene Glukose wird in Leber und Muskulatur in Form von Glykogen und im Fettgewebe in Form von Lipiden gespeichert (Lee and White, 2004). Im Fettgewebe wird nicht nur die Lipidsynthese stimuliert. Insulin hemmt gleichzeitig die Lipolyse und damit den Abbau von Fett (Sesti, 2006). In der Muskulatur wird die Aufnahme von Aminosäuren und die Proteinsynthese gefördert (Lee and White, 2004).



Abb. 1: Wirkung von Insulin auf Leber, Fettgewebe und Skelettmuskulatur

Insulin bewirkt eine Senkung des Blutzuckerspiegels durch vermehrte Aufnahme von Glukose vorwiegend in Fettgewebe und Muskulatur sowie durch Hemmung der Glykogenolyse und der Glukoneogenese in der Leber. Die aufgenommene Glukose wird in Form von Glykogen und Lipiden gespeichert. Zusätzlich wird im Fettgewebe die Lipolyse gehemmt und in der Skelettmuskulatur die Proteinbiosynthese gefördert (Zeichnungen entnommen aus Taniguchi et al., 2006).

Insulin ist somit ein anaboles Hormon, durch das Energiedepots angelegt werden, die bei Bedarf wieder abgebaut werden können. Ihm gegenüber stehen blutzuckersteigernde Hormone wie Glukagon oder Adrenalin, die dafür sorgen, dass der Blutzuckerspiegel zwischen den Mahlzeiten und durch körperliche Aktivität nicht absinkt und die gespeicherte Energie verfügbar gemacht wird (Pilkis et al., 1988). Insbesondere das Fett- und Lebergewebe sowie die Skelettmuskulatur gehören zu den insulinsensitiven Geweben. Zusätzlich wirkt Insulin jedoch ebenfalls an den meisten anderen Zellen unseres Körpers und dient langfristig dem Wachstum und der Differenzierung vieler Gewebe (Lee and White, 2004).

1.2 Insulinsignalwege

1.2.1 Vom Rezeptor bis zur Glukoseaufnahme

Bindeglied zwischen dem im Blut zirkulierenden Insulin und dessen intrazellulären Effekten ist der Insulinrezeptor (s. Abb. 2). Es handelt sich um einen transmembranösen Tyrosinkinaserezeptor, der aus 4 Untereinheiten besteht, die über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Die beiden α-Untereinheiten liegen extrazellulär und enthalten die Insulin-Bindestelle. Die beiden β-Untereinheiten durchspannen die Membran und besitzen die intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität (Youngren, 2007). Bindet Insulin an den Rezeptor, folgt eine intramolekulare Auto-Transphosphorylierung und Konformationsänderung der β-Untereinheiten, wodurch die Tyrosinkinaseaktivität um das 10 - 20fache zunimmt (White et al., 1988). Intrazelluläre Substrate, die nun an die β-Untereinheit binden, werden ebenfalls an ihren Tyrosinresten phosphoryliert und aktiviert. Hierzu zählen unter anderem die Insulin-Rezeptor-Substrate (IRS-Proteine) (Sesti et al., 2001). Sie verfügen über bis zu 20 potentielle Tyrosin-Bindestellen und sind Ausgangpunkt vieler wichtiger Insulinsignalwege. Von den 6 bekannten IRS-Proteinen sind hauptsächlich IRS-1 und IRS-2 für den Einfluss von Insulin auf Stoffwechsel und Zellwachstum verantwortlich (White, 2003).

Ein Hauptsignalweg ist der Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) Signalweg. Er ist entscheidend für die Glut 4-vermittelte Aufnahme von Glukose ins Zielgewebe. Es handelt sich dabei um Glukosetransporter, die in Muskulatur und Fettgewebe insulinabhängig in die Zellmembran eingebaut werden (Shepherd and Kahn, 1999).

3



Abb. 2: Übersicht der Insulinsignaltransduktion bis zur Glukoseaufnahme in die Zelle

Bindet Insulin an die α-Untereinheit des Insulinrezeptors kommt es zur Autophosphorylierung der β-Untereinheit. IRS-Proteine, die nun an den Rezeptor binden können, leiten das Signal über PI3K, PIP3, PDK1 und AKT weiter. AKT vermittelt schließlich den Einbau von Glut 4 in die Zellmembran, so dass Glukose aufgenommen werden kann.

Die PI3K liegt frei im Zytosol vor und verfügt über zwei Src-Homologie 2 (SH2) Domänen an ihrer 85kDa großen, regulatorischen Untereinheit, über die sie an Tyrosinreste von IRS-1 und -2 bindet (Myers et al., 1992). Auf diese Weise gelangt sie in Nähe der Zellmembran, wo sie die Phosphorylierung von die Inositolphospholipiden an deren 3'OH-Gruppe des Inositolrings katalysiert. Dabei ensteht Phosphatidylinositol 3,4,5-tri-phosphat (PIP3), ein second messenger, an den wiederum Proteine mit einer Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH-Domäne) binden können (Fruman et al., 1998). Hierzu gehören unter anderem die Serinkinasen ,phosphoinositide dependent kinase 1' (PDK1) und AKT (auch Proteinkinase B genannt), die dadurch ebenfalls an die Plasmamembran rekrutiert werden (Lietzke et al., 2000). AKT wird daraufhin von PDK1 phosphoryliert (Lawlor et al., 2002) und bewirkt schließlich, über einen noch nicht vollständig geklärten Mechanismus, den Einbau von Glukosetransportern in die Zellmembran und damit die Glukoseaufnahme in die Zielzelle (Sesti, 2006).

1.2.2 Weitere Signalwege des Insulins

Der PI3K-Signalweg ist für die meisten metabolischen Effekte von Insulin verantwortlich. Hierzu gehört neben der Glukoseaufnahme in die Zelle auch die Aktivierung der Glykogensynthese durch die Glykogensynthase Kinase 3 (GSK3)

sowie die Regulierung der Proteinsynthese über ,mammalian target of rapamycin' (mTOR) (Lee and White, 2004). Ein weiterer (PI3K-unabhängiger) Hauptsignalweg des Insulins ist der ,mitogen activated protein kinases' –Weg (MAPK-Weg). Es handelt sich um eine Signalkaskade von Serin/Threonin Kinasen. Die Substrate der MAPK umfassen viele Transkriptionsfaktoren (Seger and Krebs, 1995, Cobb and Goldsmith, 1995), über die Insulin langfristig auch an der Regulierung von Zellwachstum und Gewebedifferenzierung beteiligt ist (Taniguchi et al., 2006) (s. Abb. 3).



Abb. 3: Übersicht wichtiger Signalwege von Insulin

Ausgangspunkt der Signalwege sind der Insulinrezeptor und die IRS Proteine. Der PI3K Signalweg ist für die metabolischen Effekte von Insulin wie Glukoseaufnahme, Proteinsynthese und Glykogensynthese verantwortlich. Der MAPK-Weg reguliert die Genexpression und kontrolliert damit Zellwachstum und -differenzierung (nach Lee and White, 2004).

1.2.3 Regulationsmechanismen der Insulinsignaltransduktion

Der Insulinrezeptor und die IRS-Proteine sind Ausgangspunkt der wichtigsten Insulinsignalwege und damit entscheidende Stellen um die Signalweiterleitung zu regulieren (s. Abb. 4).

Zum einen können Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPasen) sowohl den Rezeptor als auch die IRS-Proteine dephosphorylieren und damit die Signalweiterleitung unterbrechen (Taniguchi et al., 2006). Zum anderen führt eine lang anhaltende Insulinstimulation dazu, dass IRS-1 vermehrt ubiquitinyliert und im Proteasom abgebaut wird (Sun et al., 1999). Neben Tyrosinresten, die für den Insulinsignalweg

wichtig sind, besitzen IRS-Proteine zahlreiche Serinreste. Phosphorylierungen an dieser Stelle können die Tyrosinphosphorylierung vermindern, einen vermehrten Abbau von IRS bewirken und zur Dissoziation vom Insulinrezeptor führen. Die Insulinsignalweiterleitung wird dadurch ebenfalls gehemmt. Kinasen verschiedener Signalwege sind daran beteiligt (Zick, 2005). Diese Regulationsmechanismen dienen im Glukosestoffwechsel eines Gesunden als negative Rückkopplung, können jedoch unter pathologischen Bedingungen zur Entstehung von Insulinresistenz beitragen.

In der Skelettmuskulatur übergewichtiger Menschen ist sowohl die Aktivierung als auch die Proteinmenge von Insulinrezeptor und IRS-1 vermindert (Goodyear et al., 1995) und auch in Fettzellen von Typ-2-Diabetikern ist eine geringere IRS-1 Proteinmenge vorhanden als bei Gesunden (Rondinone et al., 1997). Experimente an Mäusen zeigen, dass eine Zunahme der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B (PTP1B) mit Insulinresistenz korreliert und durch Gen-Inaktivierung von PTP1B eine verbesserte Insulinsensitivität erzielt werden kann (Elchebly et al., 1999).

Von den zahlreichen Serinresten der IRS-Proteine wird insbesondere die Phosphorylierung von IRS-1 an Ser 307 in der Maus bzw. Ser 312 bei Menschen in Verbindung mit Insulinresistenz gebracht (Aguirre et al., 2002).



Abb. 4: Regulationsmechanismen der Insulinsignaltransduktion:

Der Insulinrezeptor und die IRS-Proteine sind geeignete Stellen um die Insulinsignaltransduktion zu hemmen. Zu den Mechanismen gehören die Dephosphorylierung von Insulinrezeptor und IRS-Proteinen an Tyrosinresten und der vermehrte Abbau oder die verminderte Synthese dieser Proteine. Ein weiterer Mechanismus ist die Serinphosphorylierung von IRS-Proteinen. Diese Regulationsmechanismen dienen als negative Rückkopplung, können aber unter pathologischen Bedingungen zur Entstehung von Insulinresistenz beitragen.

1.3 Insulinresistenz - Ursachen und Folgen

Insulinresistenz ist definiert als eine unzureichende Wirkung normaler Insulinkonzentrationen auf die für den Glukosestoffwechsel relevanten Gewebe, wie Leber, Skelettmuskulatur und Fettgewebe (Kahn and Flier, 2000).

Viele Faktoren spielen bei der Entstehung von Insulinresistenz eine Rolle (s. Abb. 5). Dazu gehören das Alter, eine genetische Disposition sowie bestimmte Medikamente und Erkrankungen. Vor allem aber spielen Übergewicht und Bewegungsmangel eine Rolle (Kahn et al., 2006, Jonietz, 2012). Dabei scheint nicht allein die Fettmasse, sondern die Fettverteilung entscheidend zu sein. Insbesondere die Zunahme des viszeralen Fettgewebes gilt als unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen (Yusuf et al., 2005, Rexrode et al., 1998) und Typ-2-Diabetes (Ohlson et al., 1985). Es handelt sich um in der Bauchhöhle eingelagertes Fettgewebe, das die inneren Organe umhüllt. Die Zunahme des viszeralen Fettgewebes korreliert stärker mit Insulinresistenz als die Zunahme des subkutanen Fettgewebes (Kissebah and Krakower, 1994) und klinische Studien zeigen eine Verbesserung der Insulinsensitivität durch Reduktion des viszeralen Fettgewebes (Thorne et al., 2002).

Die Folgen von Insulinresistenz sind tiefgreifende Veränderungen sowohl im Kohlenhydrat- als auch im Lipidstoffwechsel sowie an den Gefäßen (s. Abb. 5). Insulin ist das einzige Hormon, das akut den Blutzuckerspiegel senkt. Das verminderte Ansprechen der Zielorgane auf Insulin kann die Bauchspeicheldrüse zunächst durch vermehrte Insulinsekretion kompensieren und den Blutzuckerspiegel Jahren SO im Normbereich halten. Nach vielen unphysiologisch hoher Insulinproduktion kommt es jedoch zu einer allmählichen Erschöpfung der Bauchspeicheldrüse. Dies führt zunächst zu einer gestörten Glukosetoleranz und bei weiterer Steigerung des Blutzuckerspiegels zur Manifestation von Typ-2-Diabetes (Kahn et al., 2006).

Zusätzlich ist Insulin ein Hormon, welches im Fettgewebe die Lipolyse hemmt und die Lipid - Biosynthese fördert. Daher kommt es unter Insulinresistenz auch zu verstärkter Freisetzung freier Fettsäuren ins Blut (Kahn et al., 2006). Die freien Fettsäuren werden in der Leber zur Synthese von Triglyceriden und ,very low density lipoproteins' (VLDL) genutzt, die mit dem Grad der Insulinresistenz ansteigen (Reaven, 1995, Ginsberg, 2000). Das vermehrte VLDL führt zu arteriosklerotischen Veränderungen der Gefäßwände und trägt außerdem dazu bei, dass der Abbau und

die Eliminierung des Gefäß-protektiven ,high density lipoprotein' (HDL) über die Niere beschleunigt stattfindet (Ginsberg, 2000). Das ,low density lipoprotein' (LDL) im Plasma von Diabetikern ist nicht häufiger erhöht als bei Nicht- Diabetikern. Unterschiede bestehen jedoch in der Zusammensetzung dieser Partikel. Bei Diabetikern entstehen durch strukturelle Veränderungen (Glykierung, Anreicherung mit Triglyceriden und Oxidation des Proteinanteils) vermehrt kleine, dichte LDL-Partikel, sogenannte Small-dense-LDL. Diese führen zu Veränderungen an den Gefäßwänden und aktivieren Gerinnungsfaktoren. Dadurch ist das Risiko für Arteriosklerose und Thrombenbildung trotz normaler LDL-Spiegel erhöht (Rajman et al., 1999). Insulinresistenz führt aber auch zu Veränderungen, die den Gefäßtonus betreffen, da Insulin über vermehrte NO-Synthese (nitric oxide) zur Vasodilatation beiträgt. Sowohl Dyslipidämie als auch Hypertonus sind Risikofaktoren für die Entstehung mikro- und makrovaskulärer Komplikationen bei Diabetikern.



Abb. 5: Ursachen und Folgen der Insulinresistenz

Hauptrisikofaktor für die Entstehung von Insulinresistenz sind Übergewicht und Bewegungsmangel. Außerdem spielen Alter, genetische Prädisposition sowie bestimmte Erkrankungen und Medikamente eine Rolle. Die Folgen sind nicht nur die Entstehung von Typ-2-Diabetes. Insulinresistenz ist auch mit der Entstehung von Dyslipidämie, Hypertonie, Endothelschäden und Gerinnungsstörungen verbunden. Diese kardiovaskulären Risikofaktoren sind mitverantwortlich für die Entstehung mikround makrovaskulärer Komplikationen von Diabetikern.

1.4 Entzündung - Bindeglied zwischen Übergewicht und Insulinresistenz

Übergewicht ist Hauptrisikofaktor für Insulinresistenz. Im letzten Jahrzehnt wurde deutlich, dass sowohl bei Übergewicht als auch bei Insulinresistenz und Typ-2-Diabetes eine leichte chronische Entzündungsreaktion im Fettgewebe auftritt (Hotamisligil, 2006).

Entgegen der früheren Annahme, das Fettgewebe sei lediglich passives Energiespeicherorgan, ist heute bekannt, dass es zahlreiche bioaktive Substanzen synthetisiert und sezerniert, sogenannte Adipokine. Diese sind unter Übergewicht vermehrt im Blut nachweisbar und in vielfältige metabolische Prozesse involviert. Es handelt sich um Proteine, die Blutdruck, Lipidmetabolismus, Glukosehomeostase und die Angiogenese regulieren. Außerdem sind viele der Adipokine am Entzündungsgeschehen beteiligt. Hierzu zählen Zytokine wie TNFa, oder ,Interleukin 6' (IL6), Chemokine wie ,monocyte chemotactic protein 1' (MCP1/Ccl2) und Proteine des Komplementsystems (Kopelman, 2000, Mohamed-Ali et al., 1998, Lau et al., 1996). Darüberhinaus wird sowohl bei übergewichtigen Mäusen als auch bei Menschen eine Infiltration des Fettgewebes durch Makrophagen beobachtet (Weisberg et al., 2003, Xu et al., 2003). Möglicherweise werden sie durch die chemotaktischen Signale vergrößerter Adipoyzten angelockt. Interessanterweise ist die Infiltration im viszeralen Fettgewebe stärker ausgeprägt als im subkutanen (Cancello et al., 2006, Harman-Boehm et al., 2007). Das Ausmaß ihrer Bedeutung für den Stoffwechsel ist noch unklar. Eine ihrer Aufgaben könnte die Phagozytose nekrotisierender Adipozyten sein (Cinti et al., 2005). Welcher Anteil der Zytokine von Adipozyten und Makrophagen synthetisiert wird, ist ebenfalls nicht klar (Xu et al., 2003, Weisberg et al., 2003).

Stoffwechsel und Immunsystem sind eng miteinander verbunden. Ihre Zellen sind aus gemeinsamen Strukturen hervorgegangen und überschneiden sich in ihren Fähigkeiten. Neben vermehrter Zytokinproduktion zeigen Präadipozyten und Adipozyten auch immunologische Eigenschaften wie Erregerempfindlichkeit und Phagozytose. Makrophagen wiederum können Lipide aufnehmen und zu Schaumzellen werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die metabolischen und inflammatorischen Signalwege in diesen Zellen sich überschneiden und gemeinsame Schlüsselmoleküle besitzen. Die Unterdrückung anaboler Stoffwechselwege in akuten Stresssituationen ist durchaus sinnvoll, um dem Körper

9

ausreichend Energie zur Verfügung zu stellen. So wie chronische Unterernährung mit erhöhter Infektanfälligkeit einhergeht, scheint jedoch auch Überernährung die Balance dieser mittlerweile hochempfindlichen Systeme aus dem Gleichgewicht zu bringen (Wellen and Hotamisligil, 2005, Hotamisligil, 2006) (s. Abb. 6).



Abb. 6: Die Bedeutung des Gleichgewichts von Stoffwechsel und Immunsystem für die Gesundheit und die Entstehung von Krankheitheiten: Stoffwechsel und Immunsystem sind eng miteinander verbunden. Unterernährung kann das Immunsystem schwächen und ist mit erhöhter Infektanfälligkeit verbunden. Übergewicht führt zu einer Aktivierung des Immunsystems und ist unter anderem mit der Entstehung von Arteriosklerose und und Typ-2-Diabetes verbunden (Wellen and Hotamisligil, 2005).

1.5 Inflammatorische Signalwege und Insulinresistenz

Die erste nachgewiesene Verbindung zwischen Übergewicht, Entzündungsreaktion und Insulinresistenz stellte die Überexpression von TNFα im Fettgewebe übergewichtiger Nagetiere (Hotamisligil et al., 1993) sowie Menschen (Hotamisligil et al., 1995) dar. Während exogene Zufuhr von TNFα in Ratten Insulinresistenz auslöste (Hotamisligil et al., 1993), waren TNFα-knockout-Mäuse vor Übergewicht induzierter Insulinresistenz geschützt (Uysal et al., 1997).

Inzwischen sind inflammatorische Signalwege bekannt, über die TNFα in den Insulinsignalweg eingreift. Im Mittelpunkt der Forschung stehen die Aktivierung von Stresskinasen wie ,c-Jun-N-terminal kinase' (JNK), ,p38 mitogen-activated protein kinase' (p38-MAPK) und ,extracellular signal-regulated kinase' (ERK) sowie die Aktivierung des ,nuclear factor kappa B'- Signalwegs (NF-κB Signalweg). Man spricht von sogenanntem "Stress-Signaling", weil für die Aktivierung dieser Signalwege

zellulärer Stress, hervorgerufen beispielsweise durch Entzündungsmediatoren oder das Überangebot an Lipiden, verantwortlich gemacht wird.

1.5.1 Aktivierung von MAPKinasen

JNK, ERK und p38-MAPK sind Serin/Threoninkinasen, die Schnittstellen metabolischer und inflammatorischer Signalwege darstellen, da sie sowohl durch Insulin (Taniguchi et al., 2006) als auch durch TNFα (Cawthorn and Sethi, 2008) aktiviert werden. Ihre Aktivität ist in Fettzellen übergewichtiger Menschen erhöht (Carlson et al., 2003). Ihr Einfluss auf den Insulinsignalweg und die Bedeutung bei der Entstehung von Insulinresistenz sind unterschiedlich gut verstanden.

JNK besteht aus 3 bekannten Isoformen. JNK 1 und 2 werden durch Insulin aktiviert und in allen Gewebearten exprimiert, während JNK 3 nur in neuronalem Gewebe vorkommt (Taniguchi et al., 2006). JNK-1-knockout-Mäuse sind geschützt vor Übergewicht induzierter Insulinresistenz (Hirosumi et al., 2002) und JNK2 scheint eine Rolle bei der Entstehung von Arteriosklerose zu spielen (Ricci et al., 2004).

Experimente an Hamster-Eizellen und 3T3-L1 Adipozyten haben gezeigt, dass TNFα über die Aktivierung von JNK eine Phosphorylierung von IRS-1 an Serin307 bewirkt (Aguirre et al., 2000, Gao et al., 2003). Diese inhibitorische Serinphosphorylierung ist in den Mittelpunkt aktueller Forschung gerückt, da sie die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 vermindert und den Abbau von IRS-1 verstärkt, wodurch die Insulinsignaltransduktion gehemmt wird.

Die Aktivierung von ERK erfolgt über ,MAPK/ERK kinase 1/2⁴ (MEK1/2) und ist möglicherweise auch an der Inhibierung des Insulinsignalwegs durch TNFα beteiligt. Experimente an 3T3-L1 Adipozyten haben gezeigt, dass durch pharmakologische Inhibierung von MEK1/2 sowohl die TNFα vermittelte Phosphorylierung von IRS-1 an Ser307 als auch die verminderte Tyrosinphosphorylierung teilweise aufgehoben wird (Engelman et al., 2000, Rui et al., 2001).

Die Wirkung der p38-MAPK auf den Insulinsignalweg ist mehrschichtig. Einerseits wird sie durch Insulin aktiviert und trägt zur Translokation von Glut 4 in die Zellmembran und damit zur Aufnahme von Glukose in die Zelle bei (Furtado et al., 2002). Andererseits scheint sie die Genexpression von Glut 4 negativ zu beeinflussen. Die verstärkte Aktivierung von p38-MAPK in Fettzellen übergewichtiger

Menschen korreliert mit einer verminderten Genexpression von Glut 4. Experimente an 3T3L1 Adipozyten zeigen, dass durch Hemmung des p38-MAPK Signalwegs die Genexpression von Glut 4 verbessert werden kann (Carlson et al., 2003).

1.5.2 Aktivierung des NF-kB-Signalwegs

Der NF-kB Signalweg ist ein wichtiger inflammatorischer Signalweg, der durch TNFa (Cawthorn and Sethi, 2008) oder andere inflammatorische Stimuli aktiviert werden kann. Es handelt sich um einen Transkriptionsfaktor, der die Genexpression von Entzündungsmediatoren induziert, die unter anderem das Einwandern von Immunzellen ins Entzündungsgebiet bewirken. Zusätzlich reguliert er Gene, die für die Proliferation und Differenzierung von Entzündungszellen wichtig sind (Baker et al., 2011).

NF-κB ist im Zytosol an ,Inhibitor of κB' (IκB) gebunden, wodurch seine Translokation in den Zellkern verhindert wird (s. Abb. 7). TNFα aktiviert ,inhibitor of NF-κB (IκB) kinase' (IKK), eine Kinase, die aus 3 Untereinheiten besteht (α , β , γ) und IκB phosphoryliert. IκB wird daraufhin ubiquitinyliert und im Proteasom abgebaut, sodass NF-κB frei wird und in den Zellkern wandern kann (Baker et al., Ruan et al., 2002, Baker et al., 2011). Durch anschließende Serinphosphorylierungen der p65 Untereinheit kann die Aktivität von NF-κB noch zusätzlich gesteigert werden (Hayden and Ghosh, 2008).



Abb. 7: Regulation des NF-KB Signalwegs

Inflammatorische Stimuli aktivieren IKK. IKK phosphoryliert IκB und bewirkt dadurch dessen Abbau, sodass die Translokation von NF-κB in den Zellkern möglich wird. Zusätzlich wird die Aktivität von NF-κB über Phosphorylierungen der p65 Untereinheit reguliert (Hayden and Ghosh, 2008)

Die Aktivierung von NF- κ B und insbesondere von IKK β scheint an der Entstehung von Insulinresistenz beteiligt zu sein. Durch Salicylate wie Aspirin, die IKK β (Yin et al., 1998) sowie NF- κ B (Kopp and Ghosh, 1994) hemmen, kann sowohl in

Mäuseversuchen (Yuan et al., 2001) als auch bei Typ 2 Diabetikern (Shoelson et al., 2003) eine Verbesserung der Insulinsensitivität erreicht werden. Außerdem sind Mäuse mit einer Null-Mutation für IKKβ geschützt vor Übergewicht induzierter Insulinresistenz (Yuan et al., 2001). Inzwischen ist bekannt, dass IKKβ, genau wie JNK, zu einer Phosphorylierung von IRS-1 an Serin307 führt (Gao et al., 2002). Zusätzlich bewirkt IKKβ über die Aktivierung von NF-κB die Produktion weiterer Entzündungsmediatoren (Shoelson et al., 2003).

1.5.3 Einfluss von TNFα auf die Genexpression in Fettzellen

Die inhibitorische Serinphosphorylierung ist ein gut untersuchter Mechanismus, über den TNFa die Insulinsensitivität in Fettzellen beeinflusst. Für die volle inhibitorische Wirkung sind jedoch zusätzlich Veränderungen auf Transkriptionsebene verantwortlich.

Über die Aktivierung von NF- κ B bewirkt TNF α die Induktion weiterer Mediatoren, die die Insulinsensitivität negativ beeinflussen und den Effekt von TNFa verstärken. Dazu gehört beispielsweise die Induktion von "suppressor of cytokine signaling 3" (SOCS3) oder Zytokinen wie IL6 (Cawthorn and Sethi, 2008, Baker et al., 2011). SOCS3 bindet an Tyrosinreste des Insulinrezeptors, wodurch die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 und -2 verhindert wird (Ueki et al., 2004). IL6 ist bei übergewichtigen Menschen erhöht und trägt vermutlich ebenfalls zur Entstehung von Insulinresistenz bei (Shoelson et al., 2007). Unter den Mediatoren sind außerdem Chemokine wie MCP1 (Ccl2), die das Einwandern von Makrophagen ins Fettgewebe bewirken (Baker et al., 2011, Kanda et al., 2006).

Der NF-κB-Signalweg ist für viele Effekte von TNFα auf die Genexpression in Fettzellen verantwortlich (Ruan et al., 2002). Ein weiterer Transkriptionsfaktor ist AP-1 (Aktivatorprotein 1), der über JNK und p38-MAPK aktiviert wird und ebenfalls inflammatorische Gene aktiviert (Baud and Karin, 2001).

Experimente an 3T3-L1 Adipozyten zeigen, dass TNF α auch die Genexpression vieler am Stoffwechsel beteiligter Proteine verringert. Dazu gehören sowohl Proteine des Insulinsignalwegs wie IRS-1 und Glut 4, als auch Proteine des Lipidstoffwechsels (Ruan et al., 2002). Möglicherweise erfolgt die Hemmung der Genexpression über PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma), einen Transkriptionsfaktor, der viele Proteine des Glukose- und Lipidstoffwechsels induziert und durch TNF α gehemmt wird (Gayet et al., 2007, Cawthorn and Sethi, 2008).

1.6 Auslöser der Entzündungsreaktion

Die Mechanismen, die unter Übergewicht die Entzündungsreaktion auslösen, sind noch nicht vollständig aufgedeckt. Eine Hypothese besagt, dass Makrophagen durch die vermehrte Anzahl nekrotisierender Adipozyten angelockt werden und daraufhin TNFα und andere Zytokine im Fettgewebe freisetzten. Genauso kann jedoch der Zelltod durch Zytokine induziert und damit die Folge der Entzündungsreaktion sein (Cawthorn and Sethi, 2008).

Diskutiert wird außerdem, dass ein Überangebot an Nahrungsbestandteilen Stressreaktionen in den Mitochondrien und im Endoplasmatischen Retikulum (ER) hervorruft, die zu einer Aktivierung inflammatorischer Signalwege führen (s. Abb.8).

Das ER ist für die Synthese und korrekte Faltung von Proteinen zuständig. Durch Akkumulation ungefalteter Proteine kommt es zur ,unfolded protein response' (UPR-Stressantwort), die eine Aktivierung von IKK und JNK bewirkt (Hotamisligil, 2010). Dieser Prozess wird normalerweise durch virale Proteine ausgelöst und dient der Immunabwehr. In den Mitochondrien führt eine vermehrter Produktion von ,reactive oxygen species' (ROS) zu oxidativem Stress, der ebenfalls inflammatorische Signalwege aktiviert (Wellen and Hotamisligil, 2005).

Neben diesen intrazellulären Triggerfaktoren können die unter Übergewicht vermehrten freien Fettsäuren auch direkt inflammatorische Signalwege aktivieren. In vitro Experimente zeigen, dass freie Fettsäuren zu einer Aktivierung von IKK und JNK in 3T3-L1 Adipozyten führen (Nguyen et al., 2005). Möglicherweise erfolgt die Aktivierung über sogenannte Toll-like-Rezeptoren (TLR). Es handelt sich um Rezeptoren, an die auch LPS, ein Lipopolysachcharid in der Zellwand gramnegativer Bakterien, bindet (Medzhitov, 2001). Von den 12 bekannten Rezeptoren ist TLR4 am besten untersucht. Sowohl IKK und NF-κB als auch die MAP-Kinasen JNK, p38-MAPK und ERK gehören zu den Signalwegen von TLR4 (Kumar et al., 2009). Die Aktivierung von NF-κB und JNK durch freie Fettsäuren ist in Makrophagen und Fettzellen von TLR4-knockout Mäusen aufgehoben (Shi et al., 2006, Lee et al., 2001). Außerdem sind Mäuse mit Mutationen von TLR4 geschützt vor Übergewicht-induzierter Insulinresistenz (Poggi et al., 2007).



Abb. 8: Interaktion inflammatorischer und metabolischer Signalwege

Die Aktivierung der Insulinsignalwege erfolgt über den Insulinrezeptor und IRS-1. JNK und IKKβ gehören zu inflammatorischen Signalwegen die durch Zytokine, freie Fettsäuren und intrazelluläre Stressreaktionen (ER-Stress und ROS) aktiviert werden. Sie hemmen den Insulinsignalweg durch Serinphosphorylierungen von IRS-1 und führen über die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-κB und AP-1 zur Induktion weiterer Entzündungsmediatoren (Könner and Brüning, 2011).

1.7 Serum Amyloid A (SAA)

Die chronische Entzündungsreaktion unter Übergewicht ist im Fettgewebe am stärksten ausgeprägt (Hotamisligil, 2006). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass bestimmte Plasmaproteine wie Serum Amyloid A (SAA) sensitive Indikatoren für Insulinresistenz und Folgeerkrankungen wie Arteriosklerose sind. SAA ist ein Akut-Phase-Protein, dessen Plasmaspiegel als Reaktion des Körpers auf Gewebeschäden oder Fremdkörper ansteigt. Die physiologische Bedeutung von SAA liegt in der Immunabwehr und Reparatur von Gewebeschäden durch Chemotaxis, Induktion von Zytokinen und Sekretion von Proteasen (Badolato et al., 1994, Patel et al., 1998, O'Hara et al., 2004). Die Synthese erfolgt wie bei anderen Akut-Phase-Proteinen vorwiegend in der Leber als Antwort auf inflammatorische Stimuli wie ,Interleukin 1'(IL1), IL6 oder TNFα (Uhlar and Whitehead, 1999). Es sind vier

SAA Isoformen bekannt. Das ,Akut Phase SAA' (A-SAA) besteht aus den beiden Isoformen SAA1 und SAA2 (Uhlar and Whitehead, 1999). SAA3 wird ebenfalls durch inflammatorische Stimuli induziert, kommt jedoch nur in Mäusen und anderen Säugetieren vor. Beim Menschen ist das SAA3-Gen defekt (Larson et al., 2003). SAA4 wird konstitutiv exprimiert und reagiert nur geringfügig auf inflammatorische Stimuli.

Sowohl bei übergewichtigen Menschen (Yang et al., 2006) als auch bei Mäusen, die hochkalorisch ernährt wurden (Scheja et al., 2008), ist das Akut-Phase SAA im Plasma erhöht. Bei übergewichtigen Menschen korrelieren die Werte mit Insulinresistenz und Body Mass Index (Pickup et al., 1997, Yang et al., 2006) und stellen darüber hinaus einen Risikofaktor für die Entstehung von Arteriosklerose dar (Ridker et al., 2000, Liuzzo et al., 1994, Fyfe et al., 1997). Interessanterweise ist bei übergewichtigen Menschen nicht die Leber sondern das Fettgewebe hauptsächlich für die Synthese und den Anstieg von A-SAA im Plasma verantwortlich (Yang et al., 2006, Poitou et al., 2006, Sjoholm et al., 2005). Bei Mäusen dagegen ist sowohl in der Akut-Phase-Reaktion als auch unter Übergewicht die Leber Syntheseort des A-SAA, während im Fettgewebe zusätzlich SAA3 induziert wird (Scheja et al., 2008). Die Rolle der einzelnen Isoformen bei der Entstehung von Insulinresistenz und Arteriosklerose ist noch nicht klar.

Möglicherweise ist A-SAA nicht nur ein sensitiver Biomarker, sondern auch kausal an der Entstehung metabolischer Störungen beteiligt. Der A-SAA Anstieg im Plasma übergewichtiger Mäuse korreliert mit der Induktion von Entzündungsmarkern im Fettgewebe und mit der verminderten Genexpresssion von Proteinen, die für die Insulinsensitivität entscheidend sind. Darüber hinaus führt die Stimulation von 3T3L1-Adipozyten mit rekombinantem SAA1/2 zu einer dosisabhängigen Induktion von *CCL2* und *SAA3* sowie zu einer signifikant verminderten Genexpression von *IRS-1* und *Glut-4* (Scheja et al., 2008).

Neben Insulinresistenz wird auch eine kausale Beteiligung von SAA an der Entstehung von Arteriosklerose diskutiert (Ahlin et al., 2014). SAA ist ein Apolipoprotein von HDL und beeinflusst seine antiatherogenen Eigenschaften, insbesondere die Aufnahme und Abgabe von Cholesterin (van der Westhuyzen et al., 2005, Cai et al., 2005, Artl et al., 2000). Außerdem bindet es an atherogene Läsionen und kann dadurch das Anhaften von Lipiden und Lipoproteinen begünstigen (O'Brien et al., 2005).

16

1.8 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit wird anhand eines Zellkulturmodells untersucht, wie stark das Akut-Phase-Protein SAA kausal an der Entstehung Übergewicht-induzierter Insulinresistenz in Fettzellen beteiligt ist. Es ist bekannt, dass Übergewicht mit einer leichten chronischen Entzündungsreaktion im Fettgewebe einhergeht und dass metabolischer Stress und Zytokine inflammatorische Signalwege aktivieren, die mit Insulinresistenz und Expression von Entzündungsmarkern zusammenhängen. Insbesondere scheinen hier Kinasen der MAPK Familie sowie NF-κB eine wichtige Rolle zu spielen.

Daher soll zunächst untersucht werden, ob und welche dieser Signalwege in 3T3-L1 Adipozyten durch SAA aktiviert werden. Zusätzlich wird der Einfluss von SAA auf die Genexpression weiterer Entzündungsmediatoren untersucht. Abschließend soll überprüft werden, ob die Effekte von SAA auf Signalwege und Genexpression ausreichen um den Insulinsignalweg zu hemmen.

Für die Untersuchungen werden 3T3-L1 Adipozyten mit rekombinantem humanem SAA1/2 stimuliert und anschließend lysiert. Die Lysate werden für Westernblot-Analysen mit phospho-spezifischen Antikörpern oder für RNA-Analysen (quantitative PCR) verwendet. Zur Charakterisierung der Effekte von SAA1/2 auf Signalwege und Genexpression werden verschiedene SAA1/2-Konzentrationen bzw. Inkubationszeiten getestet und mit bekannten Stimulatoren wie TNFα und LPS (Lipopolisaccharid) verglichen.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur, Stimulation und Gewinnung von Zelllysaten

Für die Experimente wurden murine 3T3-L1-Adipozyten (ATCC) verwendet. Diese Präadipozyten stellen einen Subklon der permanenten Mäusefibroblastenzelllinie 3T3 dar. Mit Hilfe eines Differenzierungscocktails wurden sie innerhalb von 14 Tagen zu Adipozyten entdifferenziert.

2.1.1 Auftauen, Kultivierung und Differenzierung der Zellen

Die Zellen waren bei Passage 4 weggefroren und wurden somit von Passage 5 bis Passage 14 zur Differenzierung genutzt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 175 cm² - Flaschen und 22 ml Growth-Medium bei 37℃ und 5 % CO₂. Bevor Konfluenz erreicht war, wurden sie erneut passagiert oder ausgesät. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit 10 ml ,phosphate buffered saline' (PBS-Puffer) gewaschen und anschließend mit 7 ml Trypsin vom Boden gelöst. Um die Wirkung des Trypsins zu stoppen, wurden die Zellen nach Zugabe von 13 ml Growth Medium bei 1800 rpm und 19℃ 3 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und erneut 15 ml Growth-Medium hinzugefügt. Anschließend wurden sie in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und nach entsprechender Verdünnung in Flaschen (500.000 in 22 ml Growth Medium) und 24-well-Platten (250.000 in 0,5 ml Growth-Medium pro well) ausgesät.

Drei Tage nach der Aussaat in 24-well-Platten (Tag 0) erhielten die Zellen das Differenzierungsmedium. Nach 3 weiteren Tagen (Tag 3) wurde auf FCS-Medium umgestellt, welches bis Tag 14 alle 2 Tage gewechselt wurde.

Am Tag vor der Stimulation (Tag 13) wurden sie zunächst mit PBS-Puffer gewaschen und erhielten anschließend das Starving-Medium. Die Menge an Medium und Puffer betrug hierbei jeweils 0,5 ml/well.

Produkt	Zusammensetzung	Firma/ Katalognr.
Growth-Medium	DMEM high Glucose	Invitrogen, #41966
	10 % CS (calf serum)	Invitrogen, #16170
	10 mM Hepes	Invitrogen, #15630
	1 % P/S (Penicillin/Streptomycin)	Invitrogen, #15140
FCS-Medium	DMEM high Glucose	Invitrogen, #41966
	10 % FCS (fetal calf serum)	Gibco, #10270-106
	10 mM Hepes	Invitrogen, #15630
	1 % P/S (Penicillin/Streptomycin)	Invitrogen, #15140
Differentiation	FCS Medium	S.O.
Medium	1 µg/ml Insulin	Sigma, #I-9278-5ML
	0,5 mM IBMX	Sigma, #I-7018
	0,25 µM Dexamethason	Sigma, #D-1756
Starving-Medium	DMEM low Glucose	Invitrogen, #31885
	0,1 % BSA (bovine serum albumin)	Invitrogen, #15260
	1 % P/S (Penicillin/Streptomycin)	Invitrogen, #1514
PBS-Puffer		Invitogen, #14190
Trypsin-EDTA		Invitrogen, #25300
24-well-plates		Nuncleon deltasurface,
		Nunc, #142475
Zellkulturflaschen		Sarstedt, #660160

Tabelle 1: Zellkulturmedien und Material

2.1.2 Stimulation und Lyse der Zellen

Serum Amyloid A und andere Stimulantien wurden in der jeweiligen Konzentration zu den Zellen gegeben, die über Nacht gehungert hatten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand verworfen und die Zellen mit PBS Puffer (1 ml/well) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit dem entsprechenden Lysepuffer auf Eis lysiert. Bei Zellen, die für den Western Blot vorgesehen waren, wurde RIPA-Puffer (100 µl/well) verwendet, während Zellen, die für RNA-Bestimmungen vorgesehen waren, mit RLT-Puffer (350 µl/well) lysiert wurden.

Material und Methoden

Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurden die Zellen bei -80 ℃ für eine spätere Untersuchung eingefroren oder direkt zu Proben für Western Blots und RNA-Analysen vorbereitet.

Tabelle 2: Stimulantien

Produkt	Konzentration	Firma
Humanes Serum Amyloid A	0,01-2 μM	Peprotech, #300-13
Humaner Tumor Nekrosis Faktor alpha	10 ng/ml	Biomol, #50435
Lipopolysacharid	1 µg/ml	Sigma, #L4516
HDL	20 µg/ml	IBM II
Insulin	1 µg/ml	Sigma# I-9278-5ML

Tabelle 3: Lysepuffer

Produkt	Zusammensetzung		Firma
RIPA-Puffer	Tris-HCL, pH7 (20 mM)	4 ml	MERCK,
(für 200 ml)			#1.08382.2500
	EDTA (5 mM)	2 ml	Sigma,
			#ED2SS500G
	NaCl (50 mM)	2 ml	J.T. Baker, #1764
	Na-Pyrophosphat (10 mM)	0,892 g	Fluka, #71501
	NaF (10 mM)	0,4199 g	Sigma, #S7920
	1% Nonidet P40	2 ml	Fluka, #74385
	aqua dest	200 ml	
	vor Gebrauch hinzufügen:		
	1 Complete Mini Protease Inhibito	or/10 ml	Roche,
			#11836153001
	50 µl 200 mM Na₃VO₄/10 ml		ICN Biomedicals,
			#159664
RLT-Puffer	RLT	5 ml	Quiagen (RNAEasykit)
	Beta-Mercaptoethanol	50 µl	

2.2 Western Blot

2.2.1 Allgemein

Der Western Blot ist ein Nachweisverfahren für Proteine und lässt sich grob in drei Arbeitsschritte untergliedern: Gelelektrophorese, Transfer und Immunoblot.

Mittels Gelelektrophorese werden die Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt. Die zu trennenden Proteine wandern unter Einfluss eines elektrischen Feldes durch ein Gel, welches in einer ionischen Pufferlösung liegt. Je nach Größe der Proteine bewegen sich diese unterschiedlich schnell durch das als Molekularsieb wirkende Gel. Je kleiner die Proteine sind desto schneller bewegen sie sich in Richtung Kathode, so dass am Ende Proteinbanden abnehmender Größe im Gel entstehen.

Anschließend erfolgt der Transfer der Proteinbanden auf eine Filtermembran, wo die Proteine fixiert werden. Dies ist der eigentliche Blot. Hierfür wird ein senkrecht zu Gel und Membran gerichtetes elektrisches Feld angelegt. Dadurch wandern die Proteine aus dem Gel auf die Membran, an deren Oberfläche sie auf Grund hydrophober Wechselwirkungen haften bleiben. Das ursprünglich im Gel entstandene Trennmuster der Proteinmoleküle bleibt nach der Übertragung erhalten, sodass man eine exakte Replik des ursprünglichen Gels erhält.

Für den Nachweis spezieller Proteinbanden sind spezifische Antikörper nötig. Auf den Transfer folgt deshalb ein Immunoblot. Der Primärantikörper richtet sich gegen ein spezifisches Antigen des gesuchten Proteins auf der Membran. An dessen fc-Teil bindet ein Zweitantikörper, an den wiederum ein Enzym gekoppelt ist, die ,horseradish peroxidase' (HRP). Diese katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form. Die dabei entstehende Chemolumineszenz, eine Art optischer Strahlung, kann dann mit einem Lumineszenz-Detektor (Imager) oder mittels Röntgenfilm sichtbar gemacht werden.

Um einen spezifischen Nachweis möglich zu machen, müssen vor dem Immunoblot alle freien Bindungsstellen auf der Membran, an die der Antikörper zusätzlich haften könnte, blockiert werden. Hierfür wird eine Lösung verwendet, deren Proteine von diesem Antikörper nicht erkannt werden können. Auch nach Zugabe des Erst- und Zweitantikörpers wird die Membran zusätzlich mit dieser Lösung einige Male gewaschen, um unspezifisch und schwächer haftende Antikörper zu entfernen.



Abb. 9: Prinzip des Immunoblots

Das an der Membran haftende Antigen wird zunächst durch einen spezifischen Erstantikörper erkannt. Durch Zugabe eines Zweitantikörpers kann dieser dann an den fc-Teil des Erstantikörpers binden. An den Zweitantikörper ist ein Enzym gekoppelt, die HRP. Diese katalysiert die Oxidation von Luminol, wobei eine Art optische Strahlung entsteht, die schließlich mit einem Röntgenfilm oder einem Lumineszenzdetektor (Imager) sichtbar gemacht wird (Abbildung aus www.Applichem.com).

2.2.2 Probenvorbereitung

Die Groblysate wurden mehrfach auf- und abpipettiert und in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt. Um überflüssiges Zellmaterial aus den Lysaten zu entfernen, wurden diese 15 min in der Kühlzentrifuge bei 4 C mit 1300 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden 71,5 µl des Überstandes abpipettiert. Nach Zugabe von 27,5 µl LDS (NuPage LDS Sample buffer 4x, Invitrogen) sowie 11 µl Reducing Agent (Sample Reducing Agent 10x, Invitrogen) und kurzem Schütteln wurden die Proben für 10 min bei 95℃ denaturiert. Um das entstandene Kondenswasser zurückzuführen, musste anschließend noch einmal für 10 Sekunden zentrifugiert werden. Die Proben konnten nun auf das Gel aufgetragen werden. Nicht verwendetes Material wurde bei -20°C gelagert. Vor der nächsten Anwendung war eine erneute 2 minütige Denaturierung der Proben bei 95°C ausreichend.

2.2.3 Durchführung der Blots

Die Western Blots wurden mit dem "NuPage Gel System" von INVITROGEN nach Herstellerangaben durchgeführt. Jeweils 10 µl Probe wurde in eine Kammer des Gels aufgetragen. Die Gelelektrophorese lief 1 h bei 150 V und der Transfer dauerte 1 h bei 30 V. Mittels PanceauS-Färbung wurde der Erfolg des Transfers überprüft und die Proteinmenge in den einzelnen Kammern verglichen.

Für den Immunoblot wurden die freien Bindungsstellen der Membran über Nacht mit 20 ml NET-0,25 % Gelatine geblockt. Die Antikörper wurden ebenfalls in NET-0,25 % Gelatine verdünnt. Nach Inkubation der Erstantikörperlösung für 2 h wurde 3x 20 min mit jeweils 20 ml NET-0,25 % Gelatine gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation des Zweitantikörpers für 1 h und ein erneuter Waschvorgang wie nach Inkubation des Erstantikörpers.

Die Detektion der HRP-gekoppelten Zweitantikörper erfolgte mittels Chemolumineszenzreaktion. Hierzu wurde die Membran 1 min in Substratlösung inkubiert. Abschließend wurde ein Röntgenfilm aufgelegt oder die entstandene Strahlung mit Hilfe eines Lumineszenzdetektors ("Imager") gemessen.

2.2.4 Strippen der Blots

Das "Stripping" ermöglichte die Wiederverwendung von bereits detektierten Membranen durch Abtrennung der Antikörperkomplexe. Die Membranen wurden für 10 min in Stripping-Puffer inkubiert. Danach wurde der Stripping-Puffer verworfen und die Membranen 3 Mal für jeweils 2 min in 20 ml NET-25 % Gelatine gewaschen. Dann erfolgte die erneute Inkubation mit einem Primärantikörper.

	_	
Produkt	Firma	Katalognr.
NuPage 4-12 %Bis-Tris Gels	Invitrogen,	NP0323BOX
NuPage Antioxidant	Invitrogen	NP0005
NuPage MOPS SDS running Buffer	Invitrogen	NP0001
NuPage Transfer Buffer 20x	Invitrogen	NP00061
Zum Gebrauch:		
Transfer Buffer 1x		
10 % Methanol		
PanceauS	Sigma	P7170-1L
Protran Nitroellulose Membran BA85	Schleicher & Schüll	VWR, #10401196
3MM Chromatographiepapier	Whatman	VWR, #514-8013
Super Signal West Pico	Perbio Science	#1856135

Tabelle 4: Material für Gelelektrophorese, Transfer, Immunblot und Strippen

Stable Peroxide Solution		
Super Signal West Pico	Perbio Science	#1856136
Luminol Enhancer Solution		
<u>10x NET</u>		
-0,5 M EDTA pH8 (100 ml)	Sigma	#ED2SS500G
-2 M Tris Hcl pH7,5 (250 ml)	MERCK	#1.08382.2500
-10 %Triton X100 (50 ml)	MERCK	#108603100
-5 M NaCl (300 ml)	J.T. Baker	#1764
-ddH ₂ O (300 ml)		
NET/Gelatine 0,25 %		
-10x NET (100 ml)		
-H20 dd (900 ml)		
-Gelatine (2,5 g)	Sigma	G-8150

Erstantikörper	Verdünnung	Größe in	Firma	Katalognr.
		kD		
P-JNK	1:1000	46/54	Cell signaling	9251
JNK	1:500	46/54	Cell signaling	9252
P-p38	1:1000	43	Cell signaling	9211
p38	1:500	40	Cell signaling	9212
P-Erk (p44/42)	1:500	44/42	Cell signaling	9101
P-lkBα	1:500	40	Cell signaling	2859
lkBα	1:500	39	Cell signaling	9242
Р-NF-кВ	1:1000	65	Cell signaling	3036
P-AKT	1:1000	60	Cell signaling	9271
LRP-1	1:1000	85	IBM II	

Zweitantikörper	Verdünnung	Firma	Katalognr.
Goat anti Rabbit IgG	1:10 000	Dianova	111-035-144
Goat anti Mouse IgG	1:10 000	Dianova	115-035-146
Marker	Verdünnung	Firma	Katalognr.
Kaleidoscope	a	PioPod	161 0224
Raleidoscope	۵	DIURAU	101-0324

2.3 RNA-Analysen

2.3.1 RNA-Isolation

Die in RLT-Puffer lysierten Zellen wurden in 2 mL-Eppendorf-Gefäße überführt. Nach Zugabe von 200 µL Chloroform wurde die Probe für 15 sec mit dem Vortexer gemischt und dann 15 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand mit der Gesamt-RNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µL Ethanol (70 %) durch Invertieren gemischt. Anschließend wurde die Lösung auf die Silica-Membran der Säulen des NucleoSpin-Kits (Macherey-Nagel) gegeben. Die darauf folgenden Arbeitsschritte (Waschen der Membran, Abbau von DNA durch DNase, Waschen der Membran) wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Danach wurde die RNA in 40 µL Nuklease-freiem Wasser eluiert. Die Überprüfung der Reinheit sowie die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgten mit Hilfe des NanoDrop-Geräts.

2.3.2 Schreiben von cDNA

Um die isolierte RNA in cDNA umzuschreiben, wurde 1 µg RNA in einem Volumen von 25 µL mit 25 µL RT-Mastermix (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems) gemischt. Anschließend erfolgte die cDNA-Synthese im Thermocycler nach folgendem Protokoll: Inkubation bei 25 °C für 10 min, bei 37 °C für 120 min, bei 70 °C für 10 min. Die erhaltene cDNA wu rde bei -20 °C gelagert.

2.3.3 Real-Time-PCR (TaqMan)

Um die Expression bestimmter Gene zu quantifizieren, wurde die entsprechende cDNA mit Hilfe der TaqMan real time PCR-Methode amplifiziert.

Bei diesem PCR-Verfahren wird neben dem genspezifischen Primerpaar (Assay on demand) eine spezielle fluorogene Sonde zur Probe hinzugefügt, die sich zwischen dem Primerpaar an den cDNA-Strang anlagert. Diese TaqMan-Sonde ist an einem Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff markiert, dessen Fluoreszenzaktivität jedoch zunächst durch einen Quencher-Fluoreszenzfarbstoff am anderen Ende der Sonde kompensiert wird. Durch die spezifischen Primer wird die gesuchte Sequenz amplifiziert. Bei der Amplifikation wird die Sonde durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase abgebaut und so der inhibitorische Effekt des Quenchers

Material und Methoden

aufgehoben. Die Reporteremission kann nun detektiert werden. Mit zunehmender Zyklenzahl nimmt die Zahl der cDNA-Kopien in der Probe und damit auch das Signal zu.



Abb. 10: 3 Arbeitsschritte der TaqMan PCR

A: Die TaqMan Sonde, die an die Zielsequenz zwischen den beiden genspezifischen PCR-Primern hybridisiert, enthält einen Reporterfarbstoff (R) am 5'-Ende und einen Quencherfarbstoff (Q) am 3'-Ende. Die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs wird bei intakter TaqMan Sonde durch den Quencher unterdrückt. B-D: Während eines PCR-Zyklus wird die Sonde durch die 5'-3' Exonuklease Aktivität der DNA-Polymerase vom 5'-Ende her von der Zielsequenz verdrängt und der Reporter vom Quencher getrennt. Der abgespaltene Reporter ist nun zur Fluoreszenz befähigt. Die Zunahme der Intensität der Fluoreszenz ist proportional zu der Entstehung von PCR-Produkten (Abbildung entnommen aus Gorzelniak, 2002)

Für die Analyse wurden die cDNA-Proben mit nukleasefreiem Wasser 1:5 verdünnt. Anschließend wurden jeweils 5 µl der verdünnten Proben mit 15 µl PCR Mastermix (PCR Mastermix Plus without UNG von Eurogentec), 1,5 µl des entsprechenden Assay on Demand (Applied Biosystems) und 8,5 µl Nuklease-freiem Wasser zusammengeführt. Die Messung der Reporteremission erfolgte durch das ABI Prism 7900 HT-Gerät und die Normierung auf das Housekeeping-Gen TATA box binding protein (TBP) (Normierung auf 10exp(-4) Kopien TBP) ermöglichte die Quantifizierung der Expression.

Assays on demand	Genname	Assay ID
mCcl2 = mMcp1	chemokine (C-C motif) ligand 2	Mm00441242_m1
mCcl5	chemokine (C-C motif) ligand 5	Mm01302428_m1
mCcl7	chemokine (C-C motif) ligand 7	Mm00443113_m1
mCcl8	chemokine (C-C motif) ligand 8	Mm01297183_m1
mIL6	interleukin 6	Mm00446190_m1
mSOCS3	suppressor of cytokine signaling 3;	Mm00545913_s1
	CIS3; Cish3; SSI-3	
mSAA3	serum amyloid A 3	Mm00441203_m1
mSCD1	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	Mm00772290_m1
mFasn	fatty acid synthase	Mm00662319_m1

Tabelle 5: Assays on demand

3. Ergebnisse

3.1 Aktivierung von MAP-Kinasen durch SAA in 3T3-L1 Adipozyten

Wichtige Kinasen, deren Aktivierung im Zusammenhang mit Insulinresistenz steht, sind die MAP-Kinasen JNK, ERK und p38-MAPK. Zunächst wurde daher der Einfluss von SAA auf diese Signalwege untersucht und mit dem von TNFα, LPS und HDL verglichen.

3.1.1 Aktivierung von JNK, ERK und p38-MAPK

Um die Aktivierung von JNK, ERK und p38-MAPK durch SAA in 3T3-L1 Adipozyten zu untersuchen, wurden die Zellen in einer Zeitreihe von 0 min bis 2 h mit 1 μ M rekombinantem, humanem SAA (SAA1/2) stimuliert. Anschließend wurden die Phosphorylierungen der Kinasen im Western Blot dargestellt. Als Positiv-Kontrolle diente eine Stimulation mit TNF α (10 ng/ml) für 15 min.



Abb. 11: Aktivierung von MAP-Kinasen durch SAA1/2 und $\mbox{TNF}\alpha$

Die Stimulation von 3T3-L1 Adipozyten mit SAA1/2 in einer Zeitreihe von 0 min bis 2 h führt zu einer Phosphorylierung von JNK, ERK und p38-MAPK. Die Aktivierung ist bereits nach 15 min zu sehen mit einem Maximum nach 30 min. Die Stimulation mit TNFα zeigt bereits nach 15 min eine, im Vergleich zu SAA1/2, stärkere Aktivierung der Kinasen.

Ergebnisse

Der Western Blot zeigt eine Phosphorylierung von JNK durch SAA1/2 mit einem Maximum nach 30 min. Der Phosphor-JNK Antikörper erkennt die Isoformen JNK1 (46 kD) und JNK2 (54 kD) sowie eine nicht identifizierte JNK-Isoform bei 40 kD. Die Proteinkonzentration beider Isoformen bleibt im zeitlichen Verlauf stabil, wie der Nachweis des Gesamtproteins zeigt. Die Inaktivierung erfolgt durch Dephosphorylierung, so dass nach 2 h kein Signal mehr nachweisbar ist.

Die p38-MAPK zeigt ebenfalls eine deutliche Aktivierung durch SAA1/2, die nach 30 min am stärksten ausgeprägt ist.

Der Phosphor-ERK Antikörper erkennt die beiden Isoformen ERK1 (44 kD) und ERK2 (42 kD). Verglichen mit der relativ starken basalen Phosphorylierung in den unbehandelten Zellen wird ERK nur schwach durch SAA1/2 aktiviert. Die Phosphorylierung der beiden Isoformen ist auch hier nach 30 min am deutlichsten.

In der Kontroll-Stimulation mit TNFα ist nach 15 min eine Phosphorylierung aller 3 Kinasen zu sehen, wobei insbesondere JNK und p38-MAPK nicht nur früher, sondern auch stärker aktiviert werden als nach SAA1/2 Stimulation.

3.1.2 Stimulationen mit SAA1/2, HDL, TNFα und LPS im Vergleich

SAA ist ein Apolipoprotein von HDL und liegt im Blut vorwiegend daran gebunden vor. Im nächsten Versuch sollte überprüft werden, ob auch HDL selbst einen Effekt auf die Signalwege von JNK, ERK und p38-MAPK hat. Gleichzeitig sollte deren Aktivierung durch SAA1/2 verifiziert und mit HDL verglichen werden. Die Stimulationen erfolgten jeweils in einer Zeitreihe von 0 min bis 2 h.



Abb. 12: Aktivierung von MAP-Kinasen durch SAA1/2 und HDL

SAA ist im Plasma überwiegend an das Apolipoprotein HDL gebunden. Die Stimulation von 3T3-L1 Adipozyten mit SAA1/2 und HDL in einer Zeitreihe von 0 min bis 2 h führt in beiden Fällen zu einer Phosphorylierung von p38-MAPK mit einem Maximum nach 30 min (rote Kästen). Eine Aktivierung von ERK und JNK ist lediglich nach Stimulation mit SAA1/2 zu sehen.

Wie im vorangegangenen Versuch werden JNK, ERK und p38-MAPK durch SAA1/2 aktiviert. Die Aktivierung ist bei JNK und p38-MAPK nach 30 min am stärksten. ERK wird nur schwach durch SAA1/2 aktiviert und zeigt nach 15 min und nach 30 min die gleiche Intensität.

HDL führt ebenfalls zu einer Aktivierung der p38-MAPK nach 30 min. Eine Aktivierung von JNK und ERK ist hingegen nicht eindeutig zu erkennen.

Ergebnisse

In der nächsten Versuchsreihe wurde neben SAA1/2 und TNFα auch mit LPS in einer Zeitreihe von 0 min bis 2 h stimuliert. LPS ist Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien und ein bekannter Aktivator inflammatorischer Signalwege. LPS diente einerseits als zweite Positivkontrolle. Zusätzlich sollte der zeitliche Vergleich mit SAA1/2 und TNFα Hinweis auf einen eventuellen gemeinsamen Rezeptor geben.



Abb. 13: Stimulationen mit SAA1/2, LPS und TNFa im Vergleich

LPS und TNFα sind bekannte Aktivatoren von JNK und p38-MAPK. Die Stimulationen mit LPS und SAA1/2 zeigen denselben zeitlichen Verlauf mit einer Aktivierung von JNK und ERK nach 15min und einem Maximum nach 30 min (rote Rahmen). Die Stimulation mit TNFα hingegen hat bereits nach 15 min eine maximale Aktivierung erreicht.

Das Ergebnis ist eine Aktivierung von JNK und p38-MAPK durch alle 3 Stimulantien, die in den beiden Positivkontrollen TNFα und LPS am deutlichsten ist. Das Maximum bei einer SAA1/2 Stimulation ist nach 30 min erreicht. Dieses zeitliche Muster trifft auch für den Western Blot nach LPS Stimulation zu, während TNFα nach 15 min eine maximale Aktivierung aller 3 Kinasen zeigt.
3.1.3 Dosisabhängige Aktivierung von JNK und p38-MAPK durch SAA1/2

Für die bisherigen Western Blots waren 3T3-L1 Adipozyten jeweils mit 1 μ M SAA1/2 stimuliert worden. Um einen Dosis-abhängigen Effekt von SAA auf die Aktivierung von Stresskinasen in 3T3-L1 Adipozyten zu überprüfen, wurden die Zellen in der nächsten Versuchsreihe mit steigenden SAA1/2 Konzentrationen (0,01 μ M bis 2 μ M) stimuliert. Dieser Bereich wurde gewählt, da die Plasma Konzentration von SAA1/2 in Mäusen im Bereich zwischen 0,1 μ M und 5 μ M liegt (Scheja et al., 2008). Die Stimulationen erfolgten jeweils in Doppelbestimmung.



Abb. 14: Dosis-abhängige Aktivierung von MAP-Kinasen durch SAA1/2

Die Plasma Konzentration von SAA1/2 in Mäusen liegt im Bereich zwischen 0,1 μ M und 5 μ M. Die Stimulation mit SAA1/2 für jeweils 30 min in steigender Dosierung (0,01 μ M bis 2 μ M) zeigt, dass bereits 0,01 μ M SAA1/2 ausreichen um JNK maximal zu aktivieren. Eine Dosissteigerung bewirkt keine Verstärkung des Signals. Die Aktivierung von p38-MAPK ist erst bei Stimulation mit 0,1 μ M SAA1/2 zu sehen, nimmt jedoch mit steigender Dosierung zu.

Das Ergebnis ist eine Aktivierung von JNK bereits bei Stimulation mit 0,01 µM SAA1/2. Eine weitere Dosissteigerung führt jedoch zu keiner Verstärkung des Signals. Auffällig ist außerdem, dass ausschließlich die Isoform JNK1 und die

unbekannte Isoform aktiviert werden. Eine Bande für JNK2 bei 54 kD ist nicht zu sehen.

Eine Aktivierung von p38-MAPK ist bereits bei Stimulation mit 0,1 µM SAA1/2 zu sehen und zeigt einen Dosis-abhängigen Effekt.

3.2 Aktivierung von NF-кВ durch SAA in 3T3-L1 Adipozyten

NF-κB ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der an der unter Übergewicht auftretenden Entzündungsreaktion im Fettgewebe beteiligt ist. Die Aktivierung durch LPS oder TNFα erfolgt über den Abbau seines Inhibitors IκBα. Um den Effekt von SAA1/2 auf diesen Signalweg zu prüfen, wurde daher zunächst die Phosphorylierung und der Abbau von IκBα nach Stimulation mit SAA1/2 in einer Zeitreihe von 0 min bis 2 h im Western Blot getestet und mit TNFα verglichen.



Abb. 15: Phosphorylierung und Abbau von I κ Ba durch SAA1/2

IκBα ist ein Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF-κB. Die Phosphorylierung von IKB für zu dessen Abbau und zur Aktivierung von NFkB. Die Stimulation von 3T3-L1 Adipozyten mit SAA1/2 zeigt sowohl eine Phosphorylierung von IκBα nach 15 min, als auch den damit verbundenen, zunehmenden Abbau des Gesamtproteins. Nach 30 min ist IκBα nahezu vollstandig abgebaut. Nach 2h ist das Gesamtprotein wieder aufgebaut. Die Stimulation mit TNFα für 15 min, zeigt ebenfalls eine Phosphorylierung von IκBα, wobei die Menge des Gesamtproteins so gering ist, dass sie sich nicht mehr nachweisen lässt.

Bereits 15 min nach Stimulation mit SAA1/2 ist eine deutliche Phosphorylierung von IκBα zu erkennen. Die Kontrolle der Gesamtproteinmenge zeigt den darauf folgenden Abbau von IκBα. Nach 30 min ist kaum noch Protein nachweisbar, wobei nach 2 h die ursprüngliche Menge IκBα wieder aufgebaut ist.

Die Kontrollstimulation mit TNFα zeigt ebenfalls nach 15 min eine Aktivierung von IκBα. Auch wenn das Signal schwächer ist als nach SAA1/2 Stimulation, scheint die Phosphorylierung durch TNFα stärker zu sein, da kein Gesamtprotein mehr nachgewiesen werden kann. IκBα ist offenbar schon fast vollständig abgebaut.

Die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF-κB wird durch verschiedene Faktoren reguliert: Neben dem Abbau von IκBα verstärken Phosphorylierungen der p65 Untereinheit den Einfluss von NF-κB auf die Genexpression. In den anschließenden Western Blots wurde daher nach Stimulation mit SAA1/2, HDL, TNFα und LPS die Phosphorylierung von p65 an Ser536 überprüft. Die Stimulationen erfolgten wieder in einer Zeitreihe von 0 min bis 2 h.



Abb. 16: Phosphorylierung der p65 Untereinheit von NF-kB durch SAA1/2

Die Phosphorylierung der p65 Untereinheit von NFκB an Ser536 verstärkt den Einfluß von NFκB auf die Genexpression. Die Stimulationen von 3T3-L1 Adipozyten mit SAA1/2 und HDL zeigen keinen Effekt auf die Phoysphorylierung an dieser Stelle. In den Kontrollstimulationen hingegen sieht man eine Phoyphorylierung durch TNFα nach 5 min und durch LPS nach 15 min (rote Rahmen).

In den beiden Positiv-Kontrollen ist eine Phosphorylierung der p65 Untereinheit an Ser536 durch TNF α nach 5 min und durch LPS nach 15 min nachweisbar. Sowohl die Stimulation mit HDL als auch SAA1/2 zeigen jedoch keine Phosphorylierung von NF- κ B an dieser Stelle.

3.3 Einfluss von SAA auf die Genexpression in 3T3-L1 Adipozyten

Die Aktivierung von I κ B α ist ein wichtiger Schritt in der Signalkette von NF- κ B. Ob SAA über diesen Signalweg die Genexpression verschiedener Proteine beeinflusst, sollte im nächsten Versuch überprüft werden. Hierfür wurden erneut 3T3-L1 Adipozyten mit SAA1/2 in steigender Dosierung (0,01 μ M bis 2 μ M) stimuliert. Anschließend wurde der Dosis-abhängige Abbau von I κ B α getestet und mit der Genexpression von verschiedenen Proteinen verglichen. Die Bestimmung von I κ B α erfolgte 30 min nach Stimulation mit SAA1/2 im Western Blot. Die Genexpression der Proteine wurde nach 24 h mittels Real-Time-PCR gemessen. Als Positivkontrolle diente in beiden Fällen eine Stimulation mit 10 ngTNF α für 30 min bzw. 24 h. Als erstes wurde die Induktion von Saa3 in 3T3-L1 Adipozyten nach Stimulation mit SAA1/2 überprüft.



Abb. 17: Abbau von IkBa und Induktion von Saa3 durch SAA1/2

Die Stimulation mit SAA1/2 in steigender Dosierung bewirkt einen zunehmenden Abbau von IκBα und eine zunehmende Induktion von Saa3 in 3T3-L1 Adipozyten. Sowohl der Abbau von IκBα als auch die Induktion von Saa3 fallen schwächer aus als durch Stimulation mit TNFα. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei Stimulationen.

Der Western Blot zeigt, dass durch Stimulation mit steigender Konzentration von SAA1/2 zunehmend I κ B α abgebaut wird. Die Reduktion der Proteinmenge ist bereits bei 0,1 μ M zu sehen und nimmt bis 2 μ M stetig ab.

Darunter ist die Induktion von Saa3 abgebildet. Passend zum Abbau von IκBα steigt die Induktion von Saa3 in 3T3-L1 Adipozyten mit zunehmender Konzentration von SAA1/2. Im Vergleich zu TNFα fällt sowohl der Abbau von IκBα als auch die Induktion von Saa3 jedoch deutlich geringer aus.

3.3.1 Induktion von Chemokinen durch SAA

MCP1 (Ccl2) ist ein Chemokin, das für die Infiltration des Fettgewebes durch Makrophagen verantwortlich ist und durch TNFα induziert wird. Ob und wie stark SAA1/2 in 3T3-L1 Adipozyten die Induktion von Ccl2 und anderen Chemokinen wie Ccl7, Ccl8 oder Osteopontin bewirkt, wurde daher ebenfalls untersucht.



Abb. 18:Induktion von Ccl2 durch SAA1/2

Die Stimulation mit SAA1/2 für 24h in steigender Dosierung (0,01 μ M bis 2 μ M) bewirkt eine dosisabhängige Induktion von Ccl2 in 3T3-L1 Adipozyten. Die Induktion ist jedoch deutlich geringer als bei Stimulation mit TNF α (10 ng/ml). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei Stimulationen.



Abb. 19: Induktion von Ccl7, Ccl8 und Osteopontin durch SAA1/2

Die Stimulation mit SAA1/2 für 24h in steigender Dosierung (0,01 μ M bis 2 μ M) bewirkt eine dosisabhängige Induktion von Ccl7 in 3T3-L1 Adipozyten sowie eine Induktion von Ccl8 und Osteopontin. Die Induktion ist jedoch deutlich geringer als bei Stimulation mit TNF α (10 ng/ml). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei Stimulationen.

Die beiden Abbildungen zeigen, dass alle untersuchten Chemokine sowohl durch TNFα als auch durch SAA1/2 induziert werden. Die Induktion von Ccl2 ist am stärksten. Insgesamt ist der Effekt von SAA1/2 bei allen Chemokinen im Vergleich zu TNFα um ein Vielfaches geringer. Ccl7, Ccl8 und Osteopontin werden nur schwach durch SAA1/2 induziert. Eine Dosis-abhängige Steigerung der Induktion ist nur bei Ccl2 und Ccl7 zu sehen.

3.3.2 Induktion von IL6 und SOCS3 durch SAA

IL6 und SOCS3 sind Mediatoren, die Insulinresistenz auslösen können und über den NF-κB-Signalweg induziert werden. Als nächstes wurde deshalb die Genexpression dieser beiden Proteine nach Stimulation mit SAA1/2 für 24 h untersucht.



Abb. 20: Induktion von IL6 und Socs3 durch SAA1/2

Die Stimulation mit SAA1/2 für 24h in steigender Dosierung (0,01 μ M bis 2 μ M) bewirkt eine dosisabhängige Induktion von IL6 und Socs3 in 3T3-L1 Adipozyten. Die Induktion, insbesondere von IL6, ist jedoch deutlich geringer als bei Stimulation mit TNF α (10 ng/ml). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei Stimulationen.

Sowohl IL6 als auch Socs3 werden Dosis-abhängig durch SAA1/2 induziert. Die Induktion, insbesondere die von IL6, ist jedoch schwächer als durch Stimulation mit TNF α .

3.3.3 Suppression von Lipogenese-Genen durch SAA

Es ist bekannt, dass TNFα die Genexpression von Proteinen des Glukose- und Lipidstoffwechsels hemmt. Ob SAA1/2 ähnliche Effekte in 3T3-L1 Adipozyten zeigt, sollte am Beispiel von ,fatty acid synthase' (FASN) und ,steaoryl-Coenzyme A desaturase 1' (SCD1) überprüft und mit TNFα verglichen werden. Es handelt sich dabei um Proteine, die für die Lipidsynthese wichtig sind.



Abb. 21: Suppression von Lipogenese Genen durch SAA1/2

Die Stimulation mit SAA1/2 für 24h in steigender Dosierung (0,01 μ M bis 2 μ M) bewirkt eine Suppression von Scd1 und Fasn in 3T3-L1 Adipozyten. Die Suppression ist jedoch deutlich geringer als bei Stimulation mit TNF α (10 ng/ml). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei Stimulationen.

Durch Stimulation mit TNFα wird die Genexpression sowohl von Fasn als auch von Scd1 deutlich gehemmt. Der Effekt von SAA1/2 auf die Genexpression dieser beiden Proteine fällt geringer aus und ein Dosis-abhängiger Effekt ist nur bei Scd1 zu sehen.

3.4 Effekt von SAA auf die Insulin - Signaltransduktion

Die bisherigen Versuche haben die Aktivierung von Stresskinasen und NFkB sowie die Induktion von Zytokinen und Chemokinen durch SAA1/2 in 3T3-L1 Adipozyten gezeigt. Im letzten Versuch sollte nun überprüft werden, ob die Wirkung von SAA1/2 ausreicht um die Phosphorylierung von AKT und damit den Insulinsignalweg in 3T3-L1 Adipozyten zu hemmen. Zunächst wurde durch eine Stimulation mit Insulin in steigender Dosierung (0,01 nM bis 100 nM) die Aktivierung von AKT in 3T3-L1 Adipozyten getestet. In der darauf folgenden Versuchsreihe wurde erneut mit 10 nM Insulin stimuliert. Ein Teil der Zellen wurden jedoch zuvor für 2 h bzw. 6 h mit SAA1/2 vorbehandelt. Als Ladekontrolle wurde ,low density lipoprotein receptor-related protein 1' (LRP-1) bestimmt.



Abb. 22: Einfluss von SAA1/2 auf die Aktivierung von AKT durch Insulin

Die Stimulation mit Insulin in steigender Dosierung bewirkt eine zunehmende Phosphorylierung von AKT, einem wichtigen Signalprotein des Insulinsignalwegs (1). Die Phosphorylierung von AKT durch Stimulation mit 10nM Insulin für 15 min wird durch vorausgehende Stimulation mit SAA1/2 für 2h und 6h nicht gehemmt (2). LRP-1, als Ladekontrolle, zeigt eine gleichmäßige Auftragung der Proteinmengen in allen Taschen des Gels.

Der erste Immunblot zeigt, dass Insulin zu einer Phosphorlierung von AKT in 3T3-L1 Adipozyten führt, die mit steigender Konzentration zunimmt. Die Aktivierung von AKT durch Insulin ist auch im zweiten Immunblot zu sehen und wird durch SAA weder nach 2 h noch nach 6 h abgeschwächt.

4.1.Aktivierung von IRS-Kinasen durch SAA in 3T3-L1 Adipozyten

Ein wichtiger molekularer Mechanismus bei der Entstehung von durch Übergewicht induzierter Insulinresistenz ist die Serinphosphorylierung von IRS Proteinen. Sie verhindert die Tyrosinphosphorylierung dieser Proteine und dadurch die Aktivierung nachfolgender Signalmoleküle wie der PI3-Kinase und AKT. Folge ist eine herabgesetzte Stimulation des Glukosetransports und weiterer Insulineffekte. Zu den Serin/Threoninkinasen gehören unter anderem JNK und IKK. Ihre Aktivierung erfolgt durch inflammatorische Stimuli wie TNF α , durch freie Fettsäuren oder intrazelluläre Stressreaktionen und ist unter Übergewicht verstärkt. Durch Geninaktivierung sowohl von JNK als auch von IKK kann in Mäusen die Entstehung von Insulinresistenz bei Übergewicht verhindert werden (Hirosumi et al., 2002, Yuan et al., 2001). SAA ist ein Akut-Phase Protein, dessen Plasmaspiegel unter Übergewicht ansteigt und mit der Entstehung von Insulinresistenz korreliert (Yang et al., 2006, Scheja et al., 2008). In dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob SAA, genau wie TNF α und andere Stressfaktoren, IRS-Kinasen aktiviert und damit kausal zur Entstehung von Insulinresistenz beitragen könnte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Stimulationen mit 1 μ M humanem, rekombinantem SAA1/2 zu einer Aktivierung von JNK in 3T3-L1 Adipozyten führen (s. Abb. 11-13). Die Plasma Konzentration von SAA bei normalgewichtigen und bei übergewichtigen Mäusen liegt zwischen 0,1 μ M und 5 μ M (Scheja et al., 2008). Welche SAA-Konzentration unter Übergewicht im Fettgewebe vorliegt, ist nicht bekannt. Durch Stimulationen mit steigender SAA Konzentration konnte jedoch gezeigt werden, dass bereits 0,01 μ M SAA1/2 ausreichen um JNK zu aktivieren (s. Abb. 14). Es ist also denkbar, dass SAA im Fettgewebe an der verstärkten Aktivierung von JNK unter Übergewicht beteiligt ist.

SAA1/2 führt auch zu einer Aktivierung von IKK in 3T3-L1 Adipozyten. Dies wird in der vorliegenden Arbeit indirekt über die Phosphorylierung und den darauf folgenden Abbau von IκBα gezeigt, da hierfür die Aktivierung von IKK notwendig ist (s. Abb. 15). Der Abbau von IκBα nimmt mit steigender SAA1/2 Konzentration zu (s. Abb. 17). Sowohl die Aktivierung von JNK als auch der Abbau von IκBα sind aber insgesamt schwächer als in den Stimulationen mit TNFα (s. Abb. 11, 13, 15 und 17).

43

Neben JNK und IKK sind noch andere IRS Kinasen an der Inhibierung von IRS-1 beteiligt. Viele sind, wie JNK, Signalmoleküle des Insulins und dienen unter physiologischen Bedingungen sowohl der Insulinsignalweiterleitung als auch der negativen Rückkopplung. Hierzu gehören zum Beispiel m-TOR, ,S6 Kinase 1⁴ (S6K1) oder ERK (Zick, 2005, Taniguchi et al., 2006). ERK wird ebenfalls durch SAA1/2 aktiviert, wie in dieser Arbeit gezeigt wird (s. Abb. 11 und 12). Die Beteiligung an der Entstehung von Insulinresistenz ist noch nicht geklärt. IRS-1 besitzt über 70 Serinreste, deren Phosphorylierung unter Übergewicht verstärkt und an der Inhibierung von IRS-1 beteiligt ist (s. Abb. 23). Am besten untersucht ist die Phosphorylierung an Ser307 im Bereich der ,phosphotyrosine-binding domain⁴ (PTB-Domäne) durch JNK und IKK. Diese Domäne ist genau wie die PH-Domäne für die hohe Affinität von IRS-1 zum Insulinrezeptor verantwortlich.



Abb. 23.: Struktur und Interaktionspartner von IRS-1 (Taniguchi et al., 2006)

IRS-1 verfügt über eine PH-Domäne und eine PTB-Domäne, die die hohe Affinität zum Insulinrezeptor ausmachen. Oben sind Tyrosinreste (Y) dargestellt, die durch den Insulinrezeptor phosphoryliert werden und Signalmoleküle, die daran binden. Unten sind Serinresten (S) dargestellt und Kinasen, die für ihre Phosphorylierung verantwortlich sind. Blaue Kreise stehen für eine positive Regulierung der Signalweiterleitung, rote Kreise für eine Inhibierung. Bei einer Kombination aus beiden Farben kann die Regulation negativ oder positiv ausfallen. Bei weißen Kreisen ist der Effekt noch nicht bekannt.

Diese Arbeit konnte nachweisen, dass eine Aktivierung von JNK, IKK und ERK durch SAA1/2 in 3T3-L1 Adipozyten erfolgt. Zukünftige Untersuchungen könnten die Aktivierung weiterer IRS-Kinasen sowie den inhibitorischen Effekt von SAA auf die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 zum Ziel haben. Es konnte aber gezeigt werden, dass Stimulationen mit SAA1/2 für 2h sowie für 6h nicht ausreichen, um die Phosphorylierung von AKT in 3T3-L1 Adipozyten zu hemmen (s. Abb. 22). Der inhibitorische Effekt von SAA auf IRS-1 ist also möglicherweise nur gering.

4.2 Einfluss von SAA auf die Genexpression in 3T3-L1 Adipozyten

4.2.1 Induktion inflammatorischer Gene durch SAA

Übergewicht und Insulinresistenz sind mit Veränderungen der Genexpression In Fettzellen anderem die assoziiert. ist unter Genexpression von Entzündungsmediatoren wie TNFa, IL6 oder CCL2 erhöht (Scheja et al., 2008). TNFa und IL6 sind bekannte Auslöser für Insulinresistenz. Chemokine wie CCL2 bewirken, dass zusätzlich Makrophagen ins Fettgewebe einwandern, die das entzündliche Geschehen verstärken, indem sie noch mehr Entzündungsmediatoren freisetzen (Weisberg et al., 2003). Der Plasmaanstieg von SAA1 und 2 in übergewichtigen Mäusen korreliert sowohl mit der Induktion von TNFa, IL6 und Ccl2 im Fettgewebe als auch mit Markern, die eine erhöhte Infiltration durch Makrophagen anzeigen (CD11b, CD68, Emr1) (Scheja et al., 2008). Die Frage ist also, ob der Plasma-Anstieg von SAA unter Übergewicht kausal zu den Veränderungen der Genexpression in Fettzellen beiträgt.

In dieser Arbeit wurde daher zunächst der Einfluss von SAA1/2 auf NF-κB, einen wichtigen Transkriptionsfaktor inflammatorischer Gene, untersucht. Die Aktivität von NF-κB wird über die Phosphorylierung und den anschließenden Abbau von IκBα reguliert und kann durch Phosphorylierungen der p65 Untereinheit noch gesteigert werden (Hayden and Ghosh, 2008). Das Ergebnis der Stimulationen von 3T3-L1 Adipozyten mit SAA1/2 ist die Phosphorylierung und ein zunehmender Abbau von IκBα mit steigender SAA1/2-Dosis. Im Vergleich zu TNFα ist der Effekt geringer und eine Phosphorylierung von p65 an Ser536 konnte nicht gezeigt werden (s. Abb. 15-17). Dies spricht dafür, dass auch die Aktivierung von NF-κB durch SAA im Vergleich zu TNFα schwächer ist.

Anschließend wurde die Induktion verschiedener Chemokine durch SAA1/2 in 3T3-L1 Adipozyten überprüft und mit TNFα verglichen. Das Ergebnis ist die Induktion von Saa3, die Dosis-abhängig steigt und mit dem Abbau von IkBa korreliert (s. Abb. 17). SAA3 ist eine Isoform, die nur bei Mäusen und anderen Nagetieren vorkommt und dort unter Übergewicht im Fettgewebe ansteigt. Bei Menschen ist das SAA3-Gen defekt (Larson et al., 2003). SAA3 hat chemotaktische Eigenschaften und spielt möglicherweise in der frühen Phase der Entzündungsreaktion eine Rolle. Dafür sprechen Untersuchungen, in denen der Anstieg von SAA3 im Fettgewebe hochkalorisch ernährter Mäuse zeitgleich mit dem Auftreten von Makrophagen erfolgt

(Han et al., 2007, Scheja et al., 2008). Zusätzlich zeigt diese Arbeit, dass bereits geringe Konzentrationen SAA1/2 (0,01 µM) zu einer deutlichen Induktion von Ccl2 führen (s. Abb. 18). Dabei handelt es sich um ein Chemokin, das entscheidend zur Infiltration des Fettgewebes durch Makrophagen und zur Entstehung von Insulinresistenz unter Übergewicht beiträgt. Dies konnte durch Überexpression und Geninaktivierung von Ccl2 in Mäusen gezeigt werden (Kanda et al., 2006). Die Induktion von Osteopontin wurde ebenfalls untersucht, da es ein Chemokin ist, das unter Übergewicht vermehrt im Fettgewebe exprimiert wird und in knockout-Experimenten an Mäusen ähnliche Effekte zeigt wie Ccl2 (Nomiyama et al., 2007, Chapman et al., 2010) Die Induktion von Osteopontin durch SAA1/2 in dieser Arbeit ist gering (s. Abb. 19). Dazu passen die Ergebnisse von Nomiyama et al., in denen Makrophagen die primäre Quelle von Osteopontin sind und die Genexpression in Fettzellen ebenfalls gering ist. Die Stimulationen mit SAA1/2 zeigen auch eine Induktion von Ccl7 und Ccl8 (s. Abb. 19). Beides sind Chemokine, die im viszeralen Fettgewebe übergewichtiger Menschen vermehrt exprimiert werden. Sie wirken über denselben Rezeptor wie Ccl2 und eine Beteiligung an der Entzündungsreaktion unter Übergewicht wird diskutiert (Weisberg et al., 2006, Huber et al., 2008).

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass der Plasma-Anstieg von SAA1 und 2 über die Induktion von Chemokinen zur Infiltration von Makrophagen ins Fettgewebe unter Übergewicht beiträgt. Die Effekte sind allerdings, genau wie die Aktivierung von NF-κB, deutlich geringer als nach Stimualtion mit TNFα.

Weitere bekannte Zielgene von NF-κB sind IL6 und Socs3. Beide Moleküle sind an der Entstehung von Insulinresistenz beteiligt und werden in dieser Arbeit Dosisabhängig durch SAA1/2 in 3T3-L1 Adipozyten induziert. Die Induktion ist auch hier geringer als durch TNFα (s. Abb. 20). SOCS3 bindet an Tyrosinreste des Insulinrezeptors und hemmt dadurch die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 (Ueki et al., 2004). Dies ist neben der Serinphosphorylierung ein entscheidender Mechanismus der Inhibierung von IRS-1 durch TNFα (Ishizuka et al., 2007). IL6 ist im Fettgewebe übergewichtiger Menschen erhöht (Fried et al., 1998, Mohamed-Ali et al., 1997) und Versuche an 3T3-L1 Adipozyten zeigen, dass IL6 in diesen Zellen Insulinresistenz auslöst (Rotter et al., 2003). Durch die Induktion von IL6 und SOCS3 kann SAA somit indirekt seinen eigenen inhibitorischen Effekt auf den Insulinsignalweg in Fettzellen verstärken. Die Inhibierung des Insulinsignalwegs

durch SAA wurde in dieser Arbeit anhand der Phosphorylierung von AKT überprüft. Die Stimulationen mit SAA1/2 für 2 h und 6 h zeigten dabei jedoch keinen inhibitorischen Effekt (s. Abb. 22). Um die volle inhibitorische Wirkung von SAA1/2 auf den Insulinsignalweg in 3T3-L1 Adipozyten zu beurteilen, sind vermutlich längere Stimulationszeiten oder Stimulationen mit SAA1/2 und IL6 in Kombination notwendig.

4.2.2 Suppression Stoffwechsel-relevanter Gene durch SAA

Die Entstehung von Insulinresistenz beruht nicht nur auf der Induktion inflammatorischer Gene, sondern auch auf Veränderungen der Genexpression von Proteinen, die am Stoffwechsel beteiligt sind. Diskutiert wird zum Beispiel, dass die verstärkte Aktivierung der p38-MAPK unter Übergewicht zu einer verminderten Genexpression von Glut 4 führt (Carlson et al., 2003). Glut 4 ist ein Glukosetransporter, die für die Insulin-vermittelte Aufnahme von Glukose ins Fettgewebe und in die Skelettmuskulatur verantwortlich ist (Kronberg and Rieckmann, 2009). Diese Arbeit zeigt eine Aktivierung der p38-MAPK durch SAA1/2 in 3T3-L1 Adipozyten, die Dosis-abhängig steigt (s. Abb. 11-14). Passend dazu konnte in vorangegangenen Versuchen gezeigt werden, dass SAA1/2 die Genexpression von Glut 4 in 3T3-L1 Adipozyten hemmt. Die Glukoseaufnahme war dabei jedoch uneingeschränkt (Scheja et al., 2008). Dies liegt vermutlich daran, dass zusätzlich zur Genexpression von Glut 4 andere molekulare Mechanismen entscheidender für die verminderte Glukoseaufnahme sind. Zum anderen zeigt diese Arbeit, dass die Aktivierung der p38-MAPK durch SAA1/2 schwächer ist als durch TNFα (s. Abb. 11 und 13).

Übergewicht ist auch mit Veränderungen im Lipidstoffwechsel verbunden. Es ist bekannt, dass beispielsweise die Genexpression von Scd1 und Fasn im viszeralen Fettgewebe übergewichtiger Menschen vermindert ist (Mayas et al., 2010, Garcia-Serrano et al., 2011). SCD1 und FASN sind Enzyme, die an der Lipidsynthese beteiligt sind und deren verminderte Genexpression im Fettgewebe mit der Entstehung von Insulinresistenz korreliert.

SAA ist, im Vergleich zu TNFα, an der verminderten Genexpression dieser beiden Proteine nur geringfügig beteiligt wie in den Stimulationen dieser Arbeit zu sehen ist (s. Abb. 21).

47

4.3 TLR4 - ein möglicher Rezeptor von SAA

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass SAA1/2 inflammatorische Signalwege in 3T3-L1 Adipozyten aktiviert, die an der Entstehung von Insulinresistenz beteiligt sind. Unklar ist, über welche Rezeptoren die Aktivierung erfolgt. Aus diesem Grund wurden vergleichende Stimulationen mit SAA1/2, TNFα und LPS durchgeführt. TNFα ist ein bekannter Aktivator inflammatorischer Signalwege und Auslöser für Insulinresistenz. LPS ist Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien und stimuliert TLR4 Rezeptoren. Diese Rezeptoren sind von besonderem Interesse, da gezeigt wurde, dass auch freie Fettsäuren an sie binden und Insulinresistenz auslösen können (Lee et al., 2001, Shi et al., 2006). JNK, p38-MAPK, ERK und NF-κB sind Signalwege von TLR4 (Kumar et al., 2009).

Diese Arbeit zeigt, dass die Effekte von SAA1/2 auf die Aktivierung von Signalwegen und die Genexpression schwächer sind als in den Stimulationen mit TNFa. Außerdem tritt die maximale Aktivierung erst 15 min später ein (s. Abb. 11 und 13). Dies lässt vermuten, dass der Signalweg des SAA-Rezeptors deutlich anders verläuft als der Signalweg des TNFa-Rezeptors. LPS als zweite Positivkontrolle zeigt mehr Ähnlichkeit zur Aktivierung von JNK und p38-MAPK durch SAA1/2. Dies betrifft sowohl das zeitliche Muster mit einer maximalen Aktivierung nach 30 min als auch die Stärke der Phosphorylierung von p38-MAPK durch SAA1/2 und LPS (s. Abb. 13). Beides sind Hinweise, dass SAA an TLR4 Rezeptoren bindet. Für diese Hypothese sprechen auch publizierte in vitro Experimente an Makrophagen. Durch Geninaktivierung von TLR4 in diesen Zellen wurde die Aktivierung von ERK und p38-MAPK durch SAA1/2 aufgehoben (Sandri et al., 2008). Weitere Untersuchungen zeigen, dass SAA3 in Makrophagen über TLR4 Rezeptoren den NF-kB Signalweg aktiviert (Hiratsuka et al., 2008). Möglich ist auch, dass SAA über verschiedene Rezeptoren inflammatorische Signalwege in Fettzellen aktiviert. Neben TLR4 sind noch weitere Rezeptoren bekannt, mit denen SAA interagiert. Dazu gehören ,formyl-peptide-receptor like 1' (FPRL1), ein Rezeptor, der auf Immunzellen vorkommt und über den SAA die Genexpression von Entzündungsmediatoren wie IL8 und Ccl2 induziert (He et al., 2003, Lee et al., 2008) und Jysosomal integral membrane protein II analogous-1' (CLA1), ein Rezeptor, der auf vielen Zellen vorkommt und auch in Adipozyten stark exprimiert wird (Yvan-Charvet et al., 2007). Experimente an HeLa Zellen zeigen eine Aktivierung von ERK und p38-MAPK durch SAA über CLA1(Baranova et al., 2005).

4.4 Bedeutung von SAA Isoformen in Maus und Mensch

Von den 4 bekannten Isoformen sind hauptsächlich SAA1 und 2 für den Plasmaanstieg in der Akut-Phase Reaktion und unter Übergewicht verantwortlich. Bei Mäusen erfolgt die Synthese von SAA1 und SAA2 in der Leber, während im Fettgewebe vor allem SAA3 gebildet und unter Übergewicht induziert wird (Scheja et al., 2008). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine Aktivierung inflammatorischer Signalwege und die Induktion von Chemokinen durch SAA1/2 in 3T3L-1 Adipozyten (s. Abb. 24). Unklar ist, ob SAA3 auf parakrinem Weg ebenfalls Signalwege in Fettzellen aktiviert und die Genexpression beeinflusst. Dies konnte nicht getestet werden, da rekombinantes SAA3 nicht verfügbar war. Möglicherweise ist der Einfluss von SAA3 auf den Insulinsignalweg in 3T3-L1 Adipozyten sogar größer als durch SAA1 und 2.



Abb. 24.: Mögliche Wirkmechanismen von SAA 1/2 und 3 in Mäusen

Bei Mäusen wird unter Übergewicht in der Leber vermehrt SAA1 und 2 gebildet. Diese Arbeit zeigt, dass SAA1/2 über einen noch nicht bekannten Rezeptor (möglicherweise TLR4) die Aktivierung von JNK und IKK in 3T3-L1 Adipozyten bewirkt. Diese Kinasen können den Insulinsignalweg über IRS-1 hemmen und durch Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-KB und AP-1 inflammatorische Gene aktivieren. Diese Arbeit zeigt, dass SAA1/2 in 3T3-L1 Adipozyten die Genexpression von Chemokinen (Ccl2, Ccl7, Ccl8, Osteopontin und Saa3) induziert. Ob SAA3 auf parakrinem Weg ähnliche oder sogar stärkere Effekte im Fettgewebe von Mäusen zeigt wie SAA1/2, ist nicht bekannt.

Durch Geninaktivierung von Saa3 in Mäusen konnte gezeigt werden, dass hochkalorische Ernährung eine geringere Gewichtszunahme bewirkt als in Wildtyp-Mäusen. Zusätzlich ist die Entzündung im Fettgewebe und die Hyperlipidämie bei weiblichen Saa3-knockout Mäusen vermindert (Hartigh et al., 2014).

Bei Menschen scheint hauptsächlich das Fettgewebe für den Anstieg von SAA1 und 2 im Plasma verantwortlich zu sein, während SAA3 nicht vorkommt (Yang et al., 2006, Larson et al., 2003). Denkbar ist, dass SAA1 und 2 bei Menschen eine ähnliche Rolle spielen wie SAA3 bei Mäusen. In dieser Arbeit wurde mit 3T3-L1-Adipoyzen gearbeitet. Es handelt sich dabei um den Klon einer Mäusefibroblastenlinie. Die Effekte von SAA1/2 in menschlichen Zellen könnten sich daher von unseren Ergebnissen unterscheiden und den Effekten von SAA3 in 3T3-L1 Adipozyten ähneln. Weitere Versuchsreihen sind nötig, um dies zu überprüfen.

4.5 Bedeutung von SAA in anderen Gewebearten

Die vorliegende Arbeit hat sich mit der Wirkung von SAA auf Fettzellen beschäftigt, da die Entzündungsreaktion unter Übergewicht vor allem im Fettgewebe stattfindet (Wellen and Hotamisligil, 2005, Shoelson et al., 2007). Makrophagen, die unter Übergewicht ins Fettgewebe einwandern, tragen jedoch ebenfalls entscheidend zur Entzündungsreaktion bei. Untersuchungen zeigen beispielsweise, dass der Anstieg von TNF α im Fettgewebe vor allem durch Makrophagen verursacht wird (Weisberg et al., 2003). Immunzellen sind reich an TLR4 Rezeptoren und in vitro Experimente zeigen, dass SAA in Makrophagen inflammatorische Signalwege aktiviert und in neutrophilen Granulozyten und Monozyten (Vorläufer der Makrophagen) die Synthese von TNF α induziert (Furlaneto and Campa, 2000, Hatanaka et al., 2004). Denkbar ist, dass SAA in Makrophagen einen stärkeren Einfluss auf Signalwege und Genexpression hat als in unseren Versuchen an 3T3-L1 Adipozyten und dass SAA über die Induktion von TNF α in Makrophagen indirekt die Insulinsensitivität in Fettzellen vermindert.

Eine weitere Frage ist, ob SAA die Insulinsensitivität in Leber und Skelettmuskulatur beeinflusst, da SAA nicht nur im Fettgewebe, sondern auch im Plasma erhöht ist. Die Entzündung, insbesondere die Infiltration durch Makrophagen, ist im Fettgewebe am stärksten ausgeprägt. Das Fettgewebe ist jedoch nicht allein für die Entwicklung von gestörter Glukosetoleranz und Typ-2-Diabetes verantwortlich. Leber und

Skelettmuskulatur gehören ebenfalls zu den insulinsensitiven Geweben und tragen zur Senkung des Blutzuckerspiegels bei. 75 % der über die Nahrung zugeführten Glukose wird in die Muskulatur aufgenommen (Sesti, 2006) und sowohl in der Skelettmuskulatur als auch in der Leber wird unter Übergewicht eine verstärkte Aktivierung inflammatorischer Signalwege beobachtet (Könner and Brüning, 2011). Zusätzlich ist in der Muskulatur von übergewichtigen Menschen und Typ 2 Diabetikern die Genexpression von TLR4 signifikant erhöht (Reyna et al., 2008). Um zu beurteilen, welche Wirkung der Anstieg von SAA im Plasma auf den gesamten Körper und damit die Entstehung von gestörter Glukosetoleranz und Diabetes hat, sind in vivo Untersuchungen, zum Beispiel mit Saa knock-out Mäusen, nötig.

4.6 Therapiemöglichkeiten

Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre haben gezeigt, dass Entzündungsvorgänge für die Entstehung von Insulinresistenz von großer Bedeutung sind und stellen damit gleichzeitig neue Möglichkeiten zur Therapie von gestörter Glukosetoleranz und Dyslipidämie in Aussicht. Entzündungsmediatoren und ihre Signalwege sind mögliche pharmakologische Angriffspunkte, die um Insulinsensitivität zu verbessern.

NF-kB und JNK werden unter Übergewicht verstärkt aktiviert und ihre Blockierung hat sich bereits in mehreren Untersuchungen als effektiv erwiesen. Wie in der Einleitung erwähnt, kann durch Inhibierung des NF-kB Signalwegs mit Aspirin und anderen Salicylaten sowohl in Mäusen als auch bei Menschen eine Verbesserung der Insulinsensitivität erreicht werden (Yuan et al., 2001, Shoelson et al., 2003). Andere Studien zeigen, dass die Inhibierung von JNK in Mäusen die Insulinsensitivität verbessert und die Entstehung arteriosklerotischer Plaques vermindert (Kaneto et al., 2004, Ricci et al., 2004). Ob dieser Effekt bei Menschen erzielt werden kann, ist noch nicht gezeigt worden. Wirkungsvolle orale Antidiabetika sind Glitazone, auch Thiazolidindione (TZD) genannt. Es handelt sich Agonisten des um Transkriptionsfaktors PPARy. Ihre Wirkung beruht unter anderem auf der Induktion von Genen, die die Aufnahme und Speicherung von Lipiden erhöhen, sodass der Anteil freier Fettsäuren im Blut gesenkt wird (Yki-Jarvinen, 2004). Zusätzlich werden auch anti-inflammatorische Effekte von PPARy Agonisten beschrieben (Mohanty et

al., 2004, Jiang et al., 1998), die vermutlich auf einer Hemmung der Transkriptionsfaktoren NF-κB und AP-1 beruhen (Ricote et al., 1998, Aljada et al., 2001, Ghanim et al., 2001).

JNK und NF-KB können unter Übergewicht sowohl durch TNFa als auch durch freie Fettsäuren und Stressreaktionen in Zellorganellen aktiviert werden und die Inhibierung des Insulinsignalwegs beruht wahrscheinlich auf kumulativen Effekten mehrerer Mediatoren. Die Tatsache, dass SAA ebenfalls NF-kB und JNK aktiviert bestärkt die Vermutung, dass es sich hierbei um Schlüsselmoleküle handelt, zeigt aber auch, dass ein Therapieerfolg durch Ausschalten einzelner Mediatoren schwierig ist. Ziel wäre die Unterbindung von Mediatoren, die am Anfang der Signalkaskade stehen und für die Auslösung der Entzündungsreaktion verantwortlich sind, wie zum Beispiel ER-Stress oder oxidativer Stress in den Mitochondrien. In Mäuseversuchen konnte durch Neutralisation erhöhter TNFa-Spiegel eine Verbesserung der Insulinsensitivität erreicht werden (Hotamisligil et al., 1993). Untersuchungen bei Menschen zeigen jedoch unterschiedliche Ergebnisse. Durch kurzzeitige Infusion von Antikörpern gegen TNFa konnte keine Verbesserung der Insulinsensitivität bei Übergewichtigen und Diabetikern erreicht werden (Ofei et al., 1996, Paquot et al., 2000, Di Rocco et al., 2004)). TNFα Antagonisten, die in der Therapie von Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis über einen längeren Zeitraum verabreicht werden, verbessern hingegen sowohl bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen (Kiortsis et al., 2005, Tam et al., 2007, Huvers et al., 2007) als auch bei Übergewichtigen die Insulinsensitivität (Yazdani-Biuki et al., 2004). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Effekte von SAA sowohl auf die Signalwege als auch auf die Genexpression geringer sind als durch TNFa und dass SAA alleine keine Inhibierung des Insulinsignalwegs bewirkt (s. Abb.11). Eine Steigerung der Insulinsensitivität durch Inhibierung von SAA ist daher nicht zu erwarten.

5. Zusammenfassung

Übergewicht ist ein Hauptrisikofaktor für die Entstehung von Insulinresistenz und Typ-2-Diabetes. Die molekularen Mechanismen, die dabei eine Rolle spielen, sind Gegenstand aktueller Forschung. Insbesondere scheinen Entzündungsvorgänge im Fettgewebe von Bedeutung zu sein. Sensitive Plasmamarker für entzündliche Vorgänge sind Akut-Phase-Proteine wie Serum Amyloid A (SAA). Es konnte gezeigt werden, dass SAA bei übergewichtigen Menschen im Plasma und im Fettgewebe ansteigt und dass der Anstieg mit der Entstehung von Insulinresistenz korreliert. Diese Arbeit geht der Frage nach, ob SAA neben seiner Funktion als Biomarker für Insulinresistenz auch kausal zur Entstehung von Insulinresistenz im Fettgewebe beiträgt.

Dazu wurden 3T3-L1 Adipozyten mit humanem, rekombinantem SAA1/2 stimuliert. Die daraus gewonnenen Lysate wurden für Western-Blot- und RNA-Analysen verwendet, um den Einfluss von SAA1/2 auf die Aktivierung inflammatorischer Signalwege und auf die Genexpression zu prüfen. Zum Vergleich wurden Stimulationen mit TNFa, einem bekannten Auslöser für Insulinresistenz, durchgeführt. Die Western-Blot-Analysen zeigen, dass SAA1/2 in 3T3-L1 Adipozyten sowohl den NFkB-Signalweg als auch die MAPKinasen JNK, ERK und p38-MAPK aktiviert. Es handelt sich hierbei um Signalwege, die im Zusammenhang mit Insulinresistenz stehen, da sie den Insulinsignalweg hemmen und zu Veränderungen der Genexpression führen. Die RNA Analysen zeigen, dass SAA1/2 die Genexpression von Chemokinen (Ccl2, Ccl7, Ccl8, Osteopontin, Saa3) induziert. Diese bewirken, dass unter Übergewicht Makrophagen ins Fettgewebe einwandern und die Entzündungsreaktion verstärken. Sie zeigen außerdem, dass SAA1/2 die Genexpression von IL6 und Socs3 induziert. Beide Proteine können in Adipozyten Insulinresistenz auslösen. Neben der Induktion inflammatorischer Gene zeigen die RNA-Analysen, dass SAA1/2 Stoffwechsel-relevante Gene, wie Fasn und Scd1, supprimiert. Die beobachteten Effekte von SAA1/2 in 3T3-L1 Adipozyten fallen geringer aus als in den Stimulationen mit TNFa und eine Hemmung des Insulinsignalwegs durch SAA1/2 alleine konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Induktion von Chemokinen und die Aktivierung inflammatorischer Signalwege durch SAA in 3T3-L1 Adipozyten sind jedoch Hinweise, dass SAA auch in vivo an der Entzündungsreaktion im Fettgewebe bei Übergewicht beteiligt ist.

6. Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Α		
	3T3-L1 Adipozyten	Klon einer Mäusefibriblastenlinie
	AKT	auch PKB (siehe dort)
	AP-1	Aktivatorprotein 1
В		
	BSA	Bovine serum albumin
С		
	Ccl 2	auch MCP-1 (siehe dort)
	CS	calf serum
Е		
	ER	Endoplasmatisches Retikulum
	ERK	extracellular signal-regulated kinase
	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F		
	FASN	fatty acid synthase
	FCS	fetal calf serum
G		
	Glut 4	Glukose Transporter 4
	GSK3	Glykogensynthase Kinase 3
н		
	HeLa	menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
	HDL	high density lipoprotein
	HRP	horseradish peroxidase
I		
	ΙκΒ	inhibitor of κB
	IKK	inhibitor of NF-кВ (ІкВ) kinase
	IL1	Interleukin 1
	IL6	Interleukin 6
	IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat

J

Anhang

	JNK	c-Jun-N-terminal kinase
L		
	LDL	low density lipoprotein
	LPS	Lipopolysaccharid
	LRP-1	low density lipoprotein receptor-related protein 1
М		
	MAPK	mitogen activated protein kinase
	MCP1	monocyte chemotactic protein 1
	MEK1/2	MAPK/ERK kinase 1/2
	mTOR	mammalian target of rapamycin
Ν		
	NFκB	nuclear factor kappa B
	NO	nitric oxide
Ρ		
	PBS	phosphate buffered saline
	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
	PDK1	phosphoinositide dependent kinase 1
	PH-Domäne	Pleckstrin-Homologie-Domäne
	PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5-tri-phosphat
	PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
	ΡΡΑRγ	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
	PTB-Domäne	phosphotyrosine-binding domain
	PTPasen	protein tyrosine phosphatases
	PTP1B	protein tyrosine phosphatase 1B
	р38-МАРК	p38 mitogen-activated protein kinase
R		
	RIPA	radioimmunoprecipitation assay
	RNA	Ribonukleinsäure
	ROS	reactive oxygen species
	rpm	rounds per minute
S		
	S6K1	S6 Kinase 1
	SAA	Serum Amyloid A

Anhang

	SCD1	steaoryl-Coenzyme A desaturase 1
	SH2	Src-Homologie
	SOCS 3	suppressors of cytokine signalling
т		
	TLR4	toll like receptor 4
	ΤΝFα	tumor necrosis factor alpha
	TZD	Thiazolidindione
U		
	UPR	unfolded protein response
V		
	VLDL	very low density lipoproteins

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Wirkung von Insulin auf Leber, Fettgewebe und Skelettmuskulatur	S. 2
Abb. 2:	Übersicht der Insulinsignaltransduktion bis zur Glukoseaufnahme	
	in die Zelle	S. 4
Abb. 3:	Übersicht wichtiger Signalwege von Insulin	S. 5
Abb. 4:	Regulationsmechanismen der Insulinsignaltransduktion	S. 6
Abb. 5:	Ursachen und Folgen der Insulinresistenz	S. 8
Abb. 6:	Die Bedeutung des Gleichgewichts von Stoffwechsel und	
	Immunsystem für die Gesundheit und die Entstehung von	
	Krankheiten	S. 10
Abb. 7:	Regulation des NF-кB Signalwegs	S. 12
Abb. 8:	Interaktion inflammatorischer und metabolischer Signalwege	S. 15
Abb. 9:	Prinzip des Immunoblots	S. 22
Abb. 10:	3 Arbeitsschritte des TaqMan	S. 26
Abb. 11:	Aktivierung von MAP-Kinasen durch SAA1/2 und TNF α	S. 28
Abb. 12:	Aktivierung von MAP-Kinasen durch SAA1/2 und HDL	S. 30
Abb. 13:	Stimulationen mit SAA1/2, LPS und TNF α im Vergleich	S. 31
Abb. 14:	Dosis-abhängige Aktivierung von MAP-Kinasen durch SAA1/2	S. 32
Abb. 15:	Phosphorylierung und Abbau von ΙκΒα durch SAA1/2	S. 33
Abb. 16:	Phosphorylierung der p65 Untereinheit von NFκB durch SAA1/2	S. 34
Abb. 17:	Abbau von IκBα und Induktion von SAA3 durch SAA1/2	S. 36
Abb. 18:	Induktion von Ccl2 durch SAA1/2	S. 37
Abb. 19:	Induktion von Ccl7, Ccl8 und Osteopontin durch SAA1/2	S. 38
Abb. 20:	Induktion von IL6 und SOCS3 durch SAA1/2	S. 39
Abb. 21:	Suppression von Lipogenese Genen durch SAA1/2	S. 40
Abb. 22:	Einfluss von SAA1/2 auf die Aktivierung von AKT durch Insulin	S. 41
Abb. 23:	Struktur und Interaktionspartner von IRS-1	S. 44
Abb. 24:	Mögliche Wirkmechanismen von SAA 1/2 und 3 in Mäusen	S. 49

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zellkulturmedien und Material	S. 19
Tabelle 2:	Stimulantien	S. 20
Tabelle 3:	Lysepuffer	S. 20
Tabelle 4:	Material für Gelelektrophorese, Transfer, Immunblot und	
	Strippen	S. 23
Tabelle 5:	Assays on demand	S. 27

7. Literaturverzeichnis

- AGUIRRE, V., UCHIDA, T., YENUSH, L., DAVIS, R. & WHITE, M. F. (2000) The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *Journal of Biological Chemistry*, 275, 9047-54.
- AGUIRRE, V., WERNER, E. D., GIRAUD, J., LEE, Y. H., SHOELSON, S. E. & WHITE, M. F. (2002) Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *Journal* of Biological Chemistry, 277, 1531-7.
- AHLIN, S., OHLSSON, M., WILHELMSON, A. S., SKALEN, K., BOREN, J., CARLSSON, L. M., SVENSSON P., SJÖHOLM, K. (2014) Adipose tissuederived human serum amyloid A does not affect atherosclerotic lesion area in hSAA+/-ApoE-/- mice. PLoS ONE [Electronic Resource], 9, e95468.
- ALJADA, A., GARG, R., GHANIM, H., MOHANTY, P., HAMOUDA, W., ASSIAN, E. & DANDONA, P. (2001) Nuclear factor-kappaB suppressive and inhibitorkappaB stimulatory effects of troglitazone in obese patients with type 2 diabetes: evidence of an antiinflammatory action. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86, 3250-6.
- ARTL, A., MARSCHE, G., LESTAVEL, S., SATTLER, W. & MALLE, E. (2000) Role of serum amyloid A during metabolism of acute-phase HDL by macrophages. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology,* 20, 763-72.
- BADOLATO, R., WANG, J. M., MURPHY, W. J., LLOYD, A. R., MICHIEL, D. F., BAUSSERMAN, L. L., KELVIN, D. J. & OPPENHEIM, J. J. (1994) Serum amyloid A is a chemoattractant: induction of migration, adhesion, and tissue infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 180, 203-9.
- BAKER, R. G., HAYDEN, M. S. & GHOSH, S. NF-B, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metabolism*, 13, 11-22.
- BAKER, R. G., HAYDEN, M. S. & GHOSH, S. (2011) NF-B, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metabolism,* 13, 11-22.
- BARANOVA, I. N., VISHNYAKOVA, T. G., BOCHAROV, A. V., KURLANDER, R., CHEN, Z., KIMELMAN, M. L., REMALEY, A. T., CSAKO, G., THOMAS, F., EGGERMAN, T. L. & PATTERSON, A. P. (2005) Serum amyloid A binding to CLA-1 (CD36 and LIMPII analogous-1) mediates serum amyloid A proteininduced activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 8031-40.
- BAUD, V. & KARIN, M. (2001) Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends in Cell Biology*, 11, 372-7.
- BROWNLEE, M. (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414, 813-20.
- CAI, L., DE BEER, M. C., DE BEER, F. C. & VAN DER WESTHUYZEN, D. R. (2005) Serum amyloid A is a ligand for scavenger receptor class B type I and inhibits high density lipoprotein binding and selective lipid uptake. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 2954-61.
- CANCELLO, R., TORDJMAN, J., POITOU, C., GUILHEM, G., BOUILLOT, J. L., HUGOL, D., COUSSIEU, C., BASDEVANT, A., BAR HEN, A., BEDOSSA, P., GUERRE-MILLO, M. & CLEMENT, K. (2006) Increased infiltration of

macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes,* 55, 1554-61.

- CARLSON, C. J., KOTERSKI, S., SCIOTTI, R. J., POCCARD, G. B. & RONDINONE, C. M. (2003) Enhanced basal activation of mitogen-activated protein kinases in adipocytes from type 2 diabetes: potential role of p38 in the downregulation of GLUT4 expression. *Diabetes*, 52, 634-41.
- CAWTHORN, W. P. & SETHI, J. K. (2008) TNF-alpha and adipocyte biology. *FEBS Letters*, 582, 117-31.
- CHAPMAN, J., MILES, P. D., OFRECIO, J. M., NEELS, J. G., YU, J. G., RESNIK, J. L., WILKES, J., TALUKDAR, S., THAPAR, D., JOHNSON, K. & SEARS, D. D. (2010) Osteopontin is required for the early onset of high fat diet-induced insulin resistance in mice. *PLoS ONE [Electronic Resource]*, 5, e13959.
- CINTI, S., MITCHELL, G., BARBATELLI, G., MURANO, I., CERESI, E., FALOIA, E., WANG, S., FORTIER, M., GREENBERG, A. S. & OBIN, M. S. (2005) Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *Journal of Lipid Research*, 46, 2347-55.
- COBB, M. H. & GOLDSMITH, E. J. (1995) How MAP kinases are regulated. *Journal* of *Biological Chemistry*, 270, 14843-6.
- DI ROCCO, P., MANCO, M., ROSA, G., GRECO, A. V. & MINGRONE, G. (2004) Lowered tumor necrosis factor receptors, but not increased insulin sensitivity, with infliximab. *Obesity Research*, 12, 734-9.
- DEN HARTIGH, L., J., WANG, S., GOODSPEED, L., DING, Y., AVERILL, M., SUBRAMANIAN, S., WIETECHA, T., O'BRIEN, K. D., CHAIT, A. (2014) Deletion of Serum Amyloid3 improves high fat high sucrose diet-induced adipose tissue inflammation and hyperlipidemia in female mice. *PLoS ONE [Electronic Resource]*, 9, e108564.
- ELCHEBLY, M., PAYETTE, P., MICHALISZYN, E., CROMLISH, W., COLLINS, S., LOY, A. L., NORMANDIN, D., CHENG, A., HIMMS-HAGEN, J., CHAN, C. C., RAMACHANDRAN, C., GRESSER, M. J., TREMBLAY, M. L. & KENNEDY, B.
 P. (1999) Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science*, 283, 1544-8.
- ENGELMAN, J. A., BERG, A. H., LEWIS, R. Y., LISANTI, M. P. & SCHERER, P. E. (2000) Tumor necrosis factor alpha-mediated insulin resistance, but not dedifferentiation, is abrogated by MEK1/2 inhibitors in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular Endocrinology*, 14, 1557-69.
- FRIED, S. K., BUNKIN, D. A. & GREENBERG, A. S. (1998) Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83, 847-50.
- FRUMAN, D. A., MEYERS, R. E. & CANTLEY, L. C. (1998) Phosphoinositide kinases. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 481-507.
- FURLANETO, C. J. & CAMPA, A. (2000) A novel function of serum amyloid A: a potent stimulus for the release of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interleukin-8 by human blood neutrophil. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 268, 405-8.
- FURTADO, L. M., SOMWAR, R., SWEENEY, G., NIU, W. & KLIP, A. (2002) Activation of the glucose transporter GLUT4 by insulin. *Biochemistry & Cell Biology*, 80, 569-78.
- FYFE, A. I., ROTHENBERG, L. S., DEBEER, F. C., CANTOR, R. M., ROTTER, J. I. & LUSIS, A. J. (1997) Association between serum amyloid A proteins and

coronary artery disease: evidence from two distinct arteriosclerotic processes. *Circulation*, 96, 2914-9.

- GAO, Z., HWANG, D., BATAILLE, F., LEFEVRE, M., YORK, D., QUON, M. J. & YE, J. (2002) Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 48115-21.
- GAO, Z., ZUBERI, A., QUON, M. J., DONG, Z. & YE, J. (2003) Aspirin inhibits serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 in tumor necrosis factor-treated cells through targeting multiple serine kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 24944-50.
- GARCIA-SERRANO, S., MORENO-SANTOS, I., GARRIDO-SANCHEZ, L., GUTIERREZ-REPISO, C., GARCIA-ALMEIDA, J. M., GARCIA-ARNES, J., RIVAS-MARIN, J., GALLEGO-PERALES, J. L., GARCIA-ESCOBAR, E., ROJO-MARTINEZ, G., TINAHONES, F., SORIGUER, F., MACIAS-GONZALEZ, M. & GARCIA-FUENTES, E. (2011) Stearoyl-CoA desaturase-1 is associated with insulin resistance in morbidly obese subjects. *Molecular Medicine*, 17, 273-80.
- GAYET, C., LERAY, V., SAITO, M., SILIART, B. & NGUYEN, P. (2007) The effects of obesity-associated insulin resistance on mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma target genes, in dogs. *British Journal of Nutrition*, 98, 497-503.
- GHANIM, H., GARG, R., ALJADA, A., MOHANTY, P., KUMBKARNI, Y., ASSIAN, E., HAMOUDA, W. & DANDONA, P. (2001) Suppression of nuclear factor-kappaB and stimulation of inhibitor kappaB by troglitazone: evidence for an antiinflammatory effect and a potential antiatherosclerotic effect in the obese. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism,* 86, 1306-12.
- GINSBERG, H. N. (2000) Insulin resistance and cardiovascular disease. *Journal of Clinical Investigation*, 106, 453-8.
- GOODYEAR, L. J., GIORGINO, F., SHERMAN, L. A., CAREY, J., SMITH, R. J. & DOHM, G. L. (1995) Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects. *Journal of Clinical Investigation*, 95, 2195-204.
- GORZELNIAK, K. (2002) Untersuchung zur quantitativen Genexpression in Primärkulturen humaner Adipozyten am Beispiel ausgewählter Gene des Renin-Angiotensin-Systems. Theoretische, medizinische Dissertation. Medizinische Fakulät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin.
- HAJER, G. R., VAN HAEFTEN, T. W. & VISSEREN, F. L. J. (2008) Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *European Heart Journal*, 29, 2959-71.
- HAN, C. Y., SUBRAMANIAN, S., CHAN, C. K., OMER, M., CHIBA, T., WIGHT, T. N.
 & CHAIT, A. (2007) Adipocyte-derived serum amyloid A3 and hyaluronan play a role in monocyte recruitment and adhesion. *Diabetes*, 56, 2260-73.
- HARMAN-BOEHM, I., BLUHER, M., REDEL, H., SION-VARDY, N., OVADIA, S., AVINOACH, E., SHAI, I., KLOTING, N., STUMVOLL, M., BASHAN, N. & RUDICH, A. (2007) Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92, 2240-7.
- HATANAKA, E., FURLANETO, C. J., RIBEIRO, F. P., SOUZA, G. M. & CAMPA, A. (2004) Serum amyloid A-induced mRNA expression and release of tumor

necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in human neutrophils. *Immunology Letters*, 91, 33-7.

- HAYDEN, M. S. & GHOSH, S. (2008) Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*, 132, 344-62.
- HE, R., SANG, H. & YE, R. D. (2003) Serum amyloid A induces IL-8 secretion through a G protein-coupled receptor, FPRL1/LXA4R. *Blood*, 101, 1572-81.
- HIRATSUKA, S., WATANABE, A., SAKURAI, Y., AKASHI-TAKAMURA, S., ISHIBASHI, S., MIYAKE, K., SHIBUYA, M., AKIRA, S., ABURATANI, H. & MARU, Y. (2008) The S100A8-serum amyloid A3-TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. *Nature Cell Biology*, 10, 1349-55.
- HIROSUMI, J., TUNCMAN, G., CHANG, L., GORGUN, C. Z., UYSAL, K. T., MAEDA, K., KARIN, M. & HOTAMISLIGIL, G. S. (2002) A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*, 420, 333-6.
- HOTAMISLIGIL, G. S. (2006) Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444, 860-7.
- HOTAMISLIGIL, G. S. (2010) Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*, 140, 900-17.
- HOTAMISLIGIL, G. S., ARNER, P., CARO, J. F., ATKINSON, R. L. & SPIEGELMAN,
 B. M. (1995) Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factoralpha in human obesity and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 95, 2409-15.
- HOTAMISLIGIL, G. S., SHARGILL, N. S. & SPIEGELMAN, B. M. (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259, 87-91.
- HUBER, J., KIEFER, F. W., ZEYDA, M., LUDVIK, B., SILBERHUMER, G. R., PRAGER, G., ZLABINGER, G. J. & STULNIG, T. M. (2008) CC chemokine and CC chemokine receptor profiles in visceral and subcutaneous adipose tissue are altered in human obesity. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93, 3215-21.
- HUVERS, F. C., POPA, C., NETEA, M. G., VAN DEN HOOGEN, F. H. J. & TACK, C. J. (2007) Improved insulin sensitivity by anti-TNFalpha antibody treatment in patients with rheumatic diseases. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 66, 558-9.
- ISHIZUKA, K., USUI, I., KANATANI, Y., BUKHARI, A., HE, J., FUJISAKA, S., YAMAZAKI, Y., SUZUKI, H., HIRATANI, K., ISHIKI, M., IWATA, M., URAKAZE, M., HARUTA, T. & KOBAYASHI, M. (2007) Chronic tumor necrosis factor-alpha treatment causes insulin resistance via insulin receptor substrate-1 serine phosphorylation and suppressor of cytokine signaling-3 induction in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology*, 148, 2994-3003.
- JIANG, C., TING, A. T. & SEED, B. (1998) PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*, 391, 82-6.
- JONIETZ, E. (2012) Cause and effect. Nature, 485, 10-11.
- KAHN, B. B. & FLIER, J. S. (2000) Obesity and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 106, 473-81.
- KAHN, S. E., HULL, R. L. & UTZSCHNEIDER, K. M. (2006) Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 444, 840-6.
- KANDA, H., TATEYA, S., TAMORI, Y., KOTANI, K., HIASA, K.-I., KITAZAWA, R., KITAZAWA, S., MIYACHI, H., MAEDA, S., EGASHIRA, K. & KASUGA, M. (2006) MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *Journal of Clinical Investigation*, 116, 1494-505.

- KANETO, H., NAKATANI, Y., MIYATSUKA, T., KAWAMORI, D., MATSUOKA, T.-A., MATSUHISA, M., KAJIMOTO, Y., ICHIJO, H., YAMASAKI, Y. & HORI, M. (2004) Possible novel therapy for diabetes with cell-permeable JNK-inhibitory peptide. *Nature Medicine*, 10, 1128-32.
- KIORTSIS, D. N., MAVRIDIS, A. K., VASAKOS, S., NIKAS, S. N. & DROSOS, A. A. (2005) Effects of infliximab treatment on insulin resistance in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64, 765-6.
- KISSEBAH, A. H. & KRAKOWER, G. R. (1994) Regional adiposity and morbidity. *Physiological Reviews*, 74, 761-811.
- KÖNNER, A. C. & BRÜNING, J. C. (2011) Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism,* 22, 16-23.
- KOPELMAN, P. G. (2000) Obesity as a medical problem. Nature, 404, 635-43.
- KOPP, E. & GHOSH, S. (1994) Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science*, 265, 956-9.
- KRONBERG, I., RIECKMANN, S. (2009) Hungrig auf ein langes Leben. *BiuZ*, 39, 304-5.
- KUMAR, H., KAWAI, T. & AKIRA, S. (2009) Toll-like receptors and innate immunity. Biochemical & Biophysical Research Communications, 388, 621-5.
- LARSON, M. A., WEI, S. H., WEBER, A., WEBER, A. T. & MCDONALD, T. L. (2003) Induction of human mammary-associated serum amyloid A3 expression by prolactin or lipopolysaccharide. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 301, 1030-7.
- LAU, D. C., SCHILLABEER, G., LI, Z. H., WONG, K. L., VARZANEH, F. E. & TOUGH, S. C. (1996) Paracrine interactions in adipose tissue development and growth. *International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 20 Suppl 3, S16-25.
- LAWLOR, M. A., MORA, A., ASHBY, P. R., WILLIAMS, M. R., MURRAY-TAIT, V., MALONE, L., PRESCOTT, A. R., LUCOCQ, J. M. & ALESSI, D. R. (2002) Essential role of PDK1 in regulating cell size and development in mice. *EMBO Journal*, 21, 3728-38.
- LEE, H. Y., KIM, S. D., SHIM, J. W., LEE, S. Y., LEE, H., CHO, K.-H., YUN, J. & BAE, Y.-S. (2008) Serum amyloid A induces CCL2 production via formyl peptide receptor-like 1-mediated signaling in human monocytes. *Journal of Immunology*, 181, 4332-9.
- LEE, J. Y., SOHN, K. H., RHEE, S. H. & HWANG, D. (2001) Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 16683-9.
- LEE, Y. H. & WHITE, M. F. (2004) Insulin receptor substrate proteins and diabetes. Archives of Pharmacal Research, 27, 361-70.
- LIETZKE, S. E., BOSE, S., CRONIN, T., KLARLUND, J., CHAWLA, A., CZECH, M. P. & LAMBRIGHT, D. G. (2000) Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. *Molecular Cell*, 6, 385-94.
- LIUZZO, G., BIASUCCI, L. M., GALLIMORE, J. R., GRILLO, R. L., REBUZZI, A. G., PEPYS, M. B. & MASERI, A. (1994) The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *New England Journal of Medicine*, 331, 417-24.
- MAYAS, M. D., ORTEGA, F. J., MACIAS-GONZALEZ, M., BERNAL, R., GOMEZ-HUELGAS, R., FERNANDEZ-REAL, J. M. & TINAHONES, F. J. (2010)

Inverse relation between FASN expression in human adipose tissue and the insulin resistance level. *Nutrition & Metabolism*, 7, 3.

- MEDZHITOV, R. (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 1, 135-45.
- MOHAMED-ALI, V., GOODRICK, S., RAWESH, A., KATZ, D. R., MILES, J. M., YUDKIN, J. S., KLEIN, S. & COPPACK, S. W. (1997) Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82, 4196-200.
- MOHAMED-ALI, V., PINKNEY, J. H. & COPPACK, S. W. (1998) Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 22, 1145-58.
- MOHANTY, P., ALJADA, A., GHANIM, H., HOFMEYER, D., TRIPATHY, D., SYED, T., AL-HADDAD, W., DHINDSA, S. & DANDONA, P. (2004) Evidence for a potent antiinflammatory effect of rosiglitazone. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism,* 89, 2728-35.
- MYERS, M. G., JR., BACKER, J. M., SUN, X. J., SHOELSON, S., HU, P., SCHLESSINGER, J., YOAKIM, M., SCHAFFHAUSEN, B. & WHITE, M. F. (1992) IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 10350-4.
- NGUYEN, M. T. A., SATOH, H., FAVELYUKIS, S., BABENDURE, J. L., IMAMURA, T., SBODIO, J. I., ZALEVSKY, J., DAHIYAT, B. I., CHI, N.-W. & OLEFSKY, J. M. (2005) JNK and tumor necrosis factor-alpha mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 35361-71.
- NOMIYAMA, T., PEREZ-TILVE, D., OGAWA, D., GIZARD, F., ZHAO, Y., HEYWOOD, E. B., JONES, K. L., KAWAMORI, R., CASSIS, L. A., TSCHOP, M. H. & BRUEMMER, D. (2007) Osteopontin mediates obesity-induced adipose tissue macrophage infiltration and insulin resistance in mice. *Journal* of *Clinical Investigation*, 117, 2877-88.
- O'BRIEN, K. D., MCDONALD, T. O., KUNJATHOOR, V., ENG, K., KNOPP, E. A., LEWIS, K., LOPEZ, R., KIRK, E. A., CHAIT, A., WIGHT, T. N., DEBEER, F. C. & LEBOEUF, R. C. (2005) Serum amyloid A and lipoprotein retention in murine models of atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology,* 25, 785-90.
- O'HARA, R., MURPHY, E. P., WHITEHEAD, A. S., FITZGERALD, O. & BRESNIHAN, B. (2004) Local expression of the serum amyloid A and formyl peptide receptor-like 1 genes in synovial tissue is associated with matrix metalloproteinase production in patients with inflammatory arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 50, 1788-99.
- OFEI, F., HUREL, S., NEWKIRK, J., SOPWITH, M. & TAYLOR, R. (1996) Effects of an engineered human anti-TNF-alpha antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. *Diabetes*, 45, 881-5.
- OHLSON, L. O., LARSSON, B., SVARDSUDD, K., WELIN, L., ERIKSSON, H., WILHELMSEN, L., BJORNTORP, P. & TIBBLIN, G. (1985) The influence of body fat distribution on the incidence of diabetes mellitus. 13.5 years of followup of the participants in the study of men born in 1913. *Diabetes*, 34, 1055-8.
- PAQUOT, N., CASTILLO, M. J., LEFEBVRE, P. J. & SCHEEN, A. J. (2000) No increased insulin sensitivity after a single intravenous administration of a recombinant human tumor necrosis factor receptor: Fc fusion protein in obese

insulin-resistant patients. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85, 1316-9.

- PATEL, H., FELLOWES, R., COADE, S. & WOO, P. (1998) Human serum amyloid A has cytokine-like properties. *Scandinavian Journal of Immunology*, 48, 410-8.
- PICKUP, J. C., MATTOCK, M. B., CHUSNEY, G. D. & BURT, D. (1997) NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia*, 40, 1286-92.
- PILKIS, S. J., EL-MAGHRABI, M. R. & CLAUS, T. H. (1988) Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annual Review of Biochemistry*, 57, 755-83.
- POGGI, M., BASTELICA, D., GUAL, P., IGLESIAS, M. A., GREMEAUX, T., KNAUF, C., PEIRETTI, F., VERDIER, M., JUHAN-VAGUE, I., TANTI, J. F., BURCELIN, R. & ALESSI, M. C. (2007) C3H/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet. *Diabetologia*, 50, 1267-76.
- POITOU, C., COUSSIEU, C., ROUAULT, C., COUPAYE, M., CANCELLO, R., BEDEL, J.-F., GOUILLON, M., BOUILLOT, J.-L., OPPERT, J.-M., BASDEVANT, A. & CLEMENT, K. (2006) Serum amyloid A: a marker of adiposity-induced low-grade inflammation but not of metabolic status. *Obesity*, 14, 309-18.
- RAJMAN, I., EACHO, P. I., CHOWIENCZYK, P. J. & RITTER, J. M. (1999) LDL particle size: an important drug target? *British Journal of Clinical Pharmacology*, 48, 125-33.
- REAVEN, G. M. (1995) Pathophysiology of insulin resistance in human disease. *Physiological Reviews*, 75, 473-86.
- REXRODE, K. M., CAREY, V. J., HENNEKENS, C. H., WALTERS, E. E., COLDITZ, G. A., STAMPFER, M. J., WILLETT, W. C. & MANSON, J. E. (1998) Abdominal adiposity and coronary heart disease in women. *JAMA*, 280, 1843-8.
- REYNA, S. M., GHOSH, S., TANTIWONG, P., MEKA, C. S. R., EAGAN, P., JENKINSON, C. P., CERSOSIMO, E., DEFRONZO, R. A., COLETTA, D. K., SRIWIJITKAMOL, A. & MUSI, N. (2008) Elevated toll-like receptor 4 expression and signaling in muscle from insulin-resistant subjects. *Diabetes*, 57, 2595-602.
- RICCI, R., SUMARA, G., SUMARA, I., ROZENBERG, I., KURRER, M., AKHMEDOV, A., HERSBERGER, M., ERIKSSON, U., EBERLI, F. R., BECHER, B., BOREN, J., CHEN, M., CYBULSKY, M. I., MOORE, K. J., FREEMAN, M. W., WAGNER, E. F., MATTER, C. M. & LUSCHER, T. F. (2004) Requirement of JNK2 for scavenger receptor A-mediated foam cell formation in atherogenesis. *Science*, 306, 1558-61.
- RICOTE, M., LI, A. C., WILLSON, T. M., KELLY, C. J. & GLASS, C. K. (1998) The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*, 391, 79-82.
- RIDKER, P. M., HENNEKENS, C. H., BURING, J. E. & RIFAI, N. (2000) C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *New England Journal of Medicine*, 342, 836-43.
- RONDINONE, C. M., WANG, L. M., LONNROTH, P., WESSLAU, C., PIERCE, J. H. & SMITH, U. (1997) Insulin receptor substrate (IRS) 1 is reduced and IRS-2 is the main docking protein for phosphatidylinositol 3-kinase in adipocytes from

subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 4171-5.

- ROTTER, V., NAGAEV, I. & SMITH, U. (2003) Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factoralpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 45777-84.
- RUAN, H., HACOHEN, N., GOLUB, T. R., VAN PARIJS, L. & LODISH, H. F. (2002) Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory. *Diabetes*, 51, 1319-36.
- RUI, L., AGUIRRE, V., KIM, J. K., SHULMAN, G. I., LEE, A., CORBOULD, A., DUNAIF, A. & WHITE, M. F. (2001) Insulin/IGF-1 and TNF-alpha stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser307 via distinct pathways. *Journal of Clinical Investigation*, 107, 181-9.
- SANDRI, S., RODRIGUEZ, D., GOMES, E., MONTEIRO, H. P., RUSSO, M. & CAMPA, A. (2008) Is serum amyloid A an endogenous TLR4 agonist? *Journal of Leukocyte Biology*, 83, 1174-80.
- SCHEJA, L., HEESE, B., ZITZER, H., MICHAEL, M. D., SIESKY, A. M., POSPISIL, H., BEISIEGEL, U. & SEEDORF, K. (2008) Acute-phase serum amyloid A as a marker of insulin resistance in mice. *Experimental Diabetes Research*, 2008, 230837.
- SEGER, R. & KREBS, E. G. (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB Journal*, 9, 726-35.
- SESTI, G. (2006) Pathophysiology of insulin resistance. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism,* 20, 665-79.
- SESTI, G., FEDERICI, M., HRIBAL, M. L., LAURO, D., SBRACCIA, P. & LAURO, R. (2001) Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *FASEB Journal*, 15, 2099-111.
- SHEPHERD, P. R. & KAHN, B. B. (1999) Glucose transporters and insulin action-implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine*, 341, 248-57.
- SHI, H., KOKOEVA, M. V., INOUYE, K., TZAMELI, I., YIN, H. & FLIER, J. S. (2006) TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *Journal* of *Clinical Investigation*, 116, 3015-25.
- SHOELSON, S. E., HERRERO, L. & NAAZ, A. (2007) Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology*, 132, 2169-80.
- SHOELSON, S. E., LEE, J. & YUAN, M. (2003) Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity, 27 Suppl 3, S49-52.
- SJOHOLM, K., PALMING, J., OLOFSSON, L. E., GUMMESSON, A., SVENSSON, P.-A., LYSTIG, T. C., JENNISCHE, E., BRANDBERG, J., TORGERSON, J. S., CARLSSON, B. & CARLSSON, L. M. S. (2005) A microarray search for genes predominantly expressed in human omental adipocytes: adipose tissue as a major production site of serum amyloid A. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90, 2233-9.
- SUN, X. J., GOLDBERG, J. L., QIAO, L. Y. & MITCHELL, J. J. (1999) Insulin-induced insulin receptor substrate-1 degradation is mediated by the proteasome degradation pathway. *Diabetes*, 48, 1359-64.

- TAM, L.-S., TOMLINSON, B., CHU, T. T., LI, T. K. & LI, E. K. (2007) Impact of TNF inhibition on insulin resistance and lipids levels in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology*, 26, 1495-8.
- TANIGUCHI, C. M., EMANUELLI, B. & KAHN, C. R. (2006) Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7, 85-96.
- THORNE, A., LONNQVIST, F., APELMAN, J., HELLERS, G. & ARNER, P. (2002) A pilot study of long-term effects of a novel obesity treatment: omentectomy in connection with adjustable gastric banding. *International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 26, 193-9.
- UEKI, K., KONDO, T. & KAHN, C. R. (2004) Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms.[Erratum appears in Mol Cell Biol. 2005 Oct;25(19):8762]. *Molecular & Cellular Biology*, 24, 5434-46.
- UHLAR, C. M. & WHITEHEAD, A. S. (1999) Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *European Journal of Biochemistry*, 265, 501-23.
- UYSAL, K. T., WIESBROCK, S. M., MARINO, M. W. & HOTAMISLIGIL, G. S. (1997) Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature*, 389, 610-4.
- VAN DER WESTHUYZEN, D. R., CAI, L., DE BEER, M. C. & DE BEER, F. C. (2005) Serum amyloid A promotes cholesterol efflux mediated by scavenger receptor B-I. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 35890-5.
- WEISBERG, S. P., HUNTER, D., HUBER, R., LEMIEUX, J., SLAYMAKER, S., VADDI, K., CHARO, I., LEIBEL, R. L. & FERRANTE, A. W., JR. (2006) CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding.[Erratum appears in J Clin Invest. 2006 May;116(5):1457]. Journal of Clinical Investigation, 116, 115-24.
- WEISBERG, S. P., MCCANN, D., DESAI, M., ROSENBAUM, M., LEIBEL, R. L. & FERRANTE, A. W., JR. (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*, 112, 1796-808.
- WELLEN, K. E. & HOTAMISLIGIL, G. S. (2005) Inflammation, stress, and diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 115, 1111-9.
- WHITE, M. F. (2003) Insulin signaling in health and disease. Science, 302, 1710-1.
- WHITE, M. F., SHOELSON, S. E., KEUTMANN, H. & KAHN, C. R. (1988) A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 263, 2969-80.
- XU, H., BARNES, G. T., YANG, Q., TAN, G., YANG, D., CHOU, C. J., SOLE, J., NICHOLS, A., ROSS, J. S., TARTAGLIA, L. A. & CHEN, H. (2003) Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 112, 1821-30.
- YANG, R.-Z., LEE, M.-J., HU, H., POLLIN, T. I., RYAN, A. S., NICKLAS, B. J., SNITKER, S., HORENSTEIN, R. B., HULL, K., GOLDBERG, N. H., GOLDBERG, A. P., SHULDINER, A. R., FRIED, S. K. & GONG, D.-W. (2006) Acute-phase serum amyloid A: an inflammatory adipokine and potential link between obesity and its metabolic complications. *PLoS Medicine / Public Library of Science*, 3, e287.
- YAZDANI-BIUKI, B., STELZL, H., BREZINSCHEK, H. P., HERMANN, J., MUELLER, T., KRIPPL, P., GRANINGER, W. & WASCHER, T. C. (2004) Improvement of insulin sensitivity in insulin resistant subjects during prolonged treatment with the anti-TNF-alpha antibody infliximab. *European Journal of Clinical Investigation*, 34, 641-2.
- YIN, M. J., YAMAMOTO, Y. & GAYNOR, R. B. (1998) The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature*, 396, 77-80.
- YKI-JARVINEN, H. (2004) Thiazolidinediones. *New England Journal of Medicine*, 351, 1106-18.
- YOUNGREN, J. F. (2007) Regulation of insulin receptor function. *Cellular & Molecular Life Sciences*, 64, 873-91.
- YUAN, M., KONSTANTOPOULOS, N., LEE, J., HANSEN, L., LI, Z. W., KARIN, M. & SHOELSON, S. E. (2001) Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta.[Erratum appears in Science 2002 Jan 11;295(5553):277]. *Science*, 293, 1673-7.
- YUSUF, S., HAWKEN, S., OUNPUU, S., BAUTISTA, L., FRANZOSI, M. G., COMMERFORD, P., LANG, C. C., RUMBOLDT, Z., ONEN, C. L., LISHENG, L., TANOMSUP, S., WANGAI, P., JR., RAZAK, F., SHARMA, A. M., ANAND, S. S. & INVESTIGATORS, I. S. (2005) Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. *Lancet*, 366, 1640-9.
- YVAN-CHARVET, L., BOBARD, A., BOSSARD, P., MASSIERA, F., ROUSSET, X., AILHAUD, G., TEBOUL, M., FERRE, P., DAGHER, G. & QUIGNARD-BOULANGE, A. (2007) In vivo evidence for a role of adipose tissue SR-BI in the nutritional and hormonal regulation of adiposity and cholesterol homeostasis. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology,* 27, 1340-5.
- ZICK, Y. (2005) Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance. *Science's Stke [Electronic Resource]: Signal Transduction Knowledge Environment,* 2005, pe4.
- ZIMMET, P. (2000) Globalization, coca-colonization and the chronic disease epidemic: can the Doomsday scenario be averted? *Journal of Internal Medicine*, 247, 301-10.

8. Danksagung

Frau Prof. Dr. Ulrike Beisiegel und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jörg Heeren danke ich vielmals für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Biochemie und molekulare Zellbiologie zu verwirklichen, sowie für die hervorragende Betreuung und Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt außerdem meinem Betreuer, Herrn Dr. rer. nat. Ludger Scheja, der während der gesamten Zeit ein zuverlässiger, engagierter und kompetenter Ansprechpartner war. Die angenehme Atmosphäre, die wertvollen wissenschaftlichen Diskussionen und die Unterstützung, sowohl beim praktischen als auch beim schriftlichen Teil meiner Dissertation, waren eine große Hilfe.

Frau Eva-Marie Azizi und Kirsten Warncke möchte ich für die freundliche Einarbeitung und die Hilfe während der praktischen Arbeiten im Labor danken.

Zusätzlich möchte ich allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und molekulare Zellbiologie danken, die mir bei Fragen und Problemen stets zur Seite standen.

Ein besonderer Dank gilt außerdem Inge Kronberg für die schnelle Korrektur und die vielen, sehr hilfreichen Anregungen.

Zuletzt möchte ich von ganzem Herzen meinen Eltern und Geschwistern danken für ihre Liebe und die unglaubliche Unterstützung, Motivation und Geduld. Ohne ihren Rückhalt wäre vieles nicht möglich gewesen.

9. Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name	Susanne Rieckmann	
Geburtsort	Frankfurt a. M.	
Geburtsdatum	19.12.1983	
Nationalität	deutsch	
Familienstand	ledig	
BERUFSTÄTIGK		
Seit 11/2011	Assistenzärztin der Pathologie	
	Vivantes Klinikum Neukölln, Berlin	
	Prof. Dr. Hermann Herbst	

AUSBILDUNG

10.2003 – 11.2010	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
10.2005	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
11.2010	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

PRAKTISCHE AUSBILDUNG

Famulaturen	
08.2006	Innere Medizin, Krankenhaus Alten Eichen (Hamburg)
07.2007	Nephrologie, Groupe Hospitalier Pellegrin (Bordeaux)
09.2007	Gynäkologie, Albertinen Krankenhaus (Hamburg)
05.2009	Sonographie, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
06.2009	Sportmedizin, Institut für Sport- und Bewegungsmedizin (Hamburg)
Auslandsstudium	
09.2006 - 6.2007	Studium an der Université Victor Segalen Bordeaux II
	Im Rahmen des ERASMUS - Programms
Praktisches Jahr 2009	0/2010
1.Tertial	Pathologie, Katholisches Marienkrankenhaus (Hamburg)
2.Tertial	Unfallchirurgie, Katholisches Marienkrankenhaus (Hamburg)
	Allgemein- und Gefäßchirurgie, Groupe Hospitalier Pellegrin
	(Bordeaux)
3.Tertial	Innere Medizin, Schönklinik Eilbek (Hamburg)
SCHULE	
06.2003	Allgemeine Hochschulreife
	Mörike Gymnasium Ludwigsburg

10. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes, kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Berlin, den 1.12.2014