

Aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Leiter: Univ.-Prof. Dr. Jens W. Fischer

Die Rolle des Protease-aktivierten Rezeptors 4 bei der Reifung von Adipozyten *in vitro*

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Vivien Fischinger
aus Bad Saarow

Mai 2016

Als Inauguraldissertation
gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Dekan: Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Referent: PD Dr. rer. nat. Anke Fender
Koreferent: Prof. Dr. med. Timm J. Filler
Tag der mündlichen Prüfung: 21.09.2016

*"Man kann die Erkenntnisse der Medizin
auf eine knappe Formel bringen:
Wasser, mäßig genossen, ist unschädlich."
(Mark Twain)*

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Adipositas und metabolische Erkrankungen.....	1
1.2 Fettgewebe.....	2
1.2.1 Aufbau / Zusammensetzung.....	2
1.2.2 Adipogenese / Lipogenese / Lipolyse.....	2
1.2.3 Fettgewebe als endokrines Organ.....	4
1.3 Entzündung des Fettgewebes – Ursachen und Folgen.....	5
1.3.1 Inflammation und Insulinresistenz.....	5
1.3.2 Entzündungszellen im Fettgewebe.....	7
1.3.3 Mediatoren aus Entzündungszellen – Zytokine, Proteasen.....	8
1.4 Protease-aktivierte Rezeptoren.....	9
1.4.1 Aktivierung, Subtypen und Effekte.....	9
1.4.2 PAR in Fettgewebe.....	10
1.5 Fragestellung.....	12
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Substanzen.....	13
2.2 Zellkultur.....	13
2.2.1 3T3-L1 Zellen.....	13
2.2.1.1 Kultivierung.....	13
2.2.1.2 Differenzierung.....	14
2.2.1.3 Stimulation.....	15
2.2.2 Murine peritoneale Mastzellen.....	15
2.2.2.1 Isolation.....	15
2.2.2.2 Kultivierung.....	16
2.2.3 Erstellung von Mastzell-konditionierten Medien (MCCM).....	17
2.2.4 Stimulation von 3T3-L1 mit MCCM.....	17
2.2.5 Monozyten-Adhäsions-Assay.....	17
2.3 Lipid-Quantifizierung durch Öl Rot O Färbung.....	18
2.3.1 Histologische Färbung.....	18
2.3.2 Mikroskopische Auswertung.....	18
2.3.3 Optimierung der Methode zur Quantifizierung des Lipidgehaltes via photospektrometrischer Messung.....	19
2.3.4 Optimierung der Methode zur Quantifizierung des Proteingehaltes in PFA-fixierten Zellen.....	19
2.3.5 Fluoreszenzmessung.....	21
2.4 Biochemische Methoden.....	22
2.4.1 Proteinexpressionsanalyse (Western Blot).....	22
2.4.2 HA-Bindeprotein Sandwich ELISA-ähnlicher Assay.....	24
2.4.3 Triglyzerid Assay (Kit).....	25
2.5 Molekularbiologische Techniken.....	25
2.5.1 RNA-Isolation und cDNA-Synthese.....	25
2.5.2 Quantitative Real-Time PCR (qPCR).....	26

2.6	Statistik.....	26
3	Ergebnisse	28
3.1	In vitro Modell der Adipogenese in 3T3-L1 Zellen.....	28
3.2	Regulation der PAR-Expression während der 3T3-L1 Reifung	31
3.3	Einfluss von PAR-Aktivierung während der 3T3-L1 Differenzierung	32
3.4	Proliferation von PAR-stimulierten 3T3-L1	34
3.5	Inflammatorische Effekte in PAR-stimulierten 3T3-L1.....	36
3.5.1	Auswirkungen auf die Genexpression	36
3.5.2	Einfluss auf die Monozytenadhäsion	37
3.6	Veränderungen der HA-Matrix von PAR-4 stimulierten 3T3-L1	38
3.7	Effekte von Cathepsin G auf 3T3-L1 Zellen.....	40
3.8	Einfluss von Mastzell-konditioniertem Medium auf 3T3-L1	43
4	Diskussion.....	45
4.1	Überblick	45
4.2	Adipogenese <i>in vitro</i> und Quantifizierung der Lipidmenge	45
4.3	PAR-Regulation und Einfluss von PAR-Aktivierung während der Adipozytenreifung 46	
4.4	Einfluss der Protease Cathepsin G auf 3T3-L1 Zellen.....	51
4.5	Effekt von Proteasen aus Mastzellen auf 3T3-L1 Zellen	52
4.6	Klinische Relevanz und Ausblick	54
5	Zusammenfassung.....	57
6	Summary	59
7	Literaturverzeichnis	61
8	Danksagung	68
9	Eidesstattliche Erklärung.....	69

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Fettgewebes und der infiltrierenden Immunzellen.....	7
Abbildung 2: : Differenzierungsmodell für 3T3-L1 Zellen.....	14
Abbildung 3: Isolierte Mastzellen in der Primärkultur	16
Abbildung 4: Öl Rot O Intensität in unstimulierten, differenzierten 3T3-L1 Zellen im Optimierungsversuch. A, Intensitäten von Öl Rot O normalisiert zu d0 bei 569 nm, B, korrigiert auf die Proteinmenge gemessen bei 595 nm. n = 3, Mittelwerte ± SEM dargestellt. *, p < 0,05 im Vergleich zu d0.	21
Abbildung 5: Öl Rot O Färbung von 3T3-L1 Zellen unter dem Lichtmikroskop	28
Abbildung 6: Analyse von Öl Rot O-gefärbten 3T3-L1 Zellen mit dem Phosphorimager.....	29
Abbildung 7: Triglyzerid-Gehalt von Präadipozyten und differenzierenden 3T3-L1 Zellen ...	30
Abbildung 8: Genexpression von <i>Leptin</i> und <i>Pparγ</i> in der qPCR in reifenden 3T3-L1 Zellen	30
Abbildung 9: Analyse der PAR-Expression während der 3T3-L1 Reifung auf mRNA- und Proteinebene.....	31
Abbildung 10: Einfluss von PAR-2 Aktivierung auf die Expression von <i>Leptin</i> und <i>Pparγ</i>	32
Abbildung 11: Einfluss von PAR-4 Aktivierung auf die Expression von <i>Leptin</i> und <i>Pparγ</i>	33
Abbildung 12: Quantitative Auswertung der Öl Rot O Färbung mittels Fluoreszenzanalyse im Phosphorimager	33
Abbildung 13: Proliferation von PAR-4-stimulierten Zellen	35
Abbildung 14: Effekt von PAR-4 AP auf die Proteinexpression.....	35
Abbildung 15: Effekt von PAR-4 AP auf die Proteinexpression.....	36
Abbildung 16: Genexpression inflammatorischer Gene bei PAR-4 stimulierten Präadipozyten im 24 Stunden Versuch.....	36
Abbildung 17: Genexpression inflammatorischer Gene unter PAR-4 Stimulation während der Differenzierung.....	37
Abbildung 18: Einfluss von PAR-4 Stimulation auf die Monozytenadhäsion.....	38
Abbildung 19: Hyaluronsäuresekretion in PAR-4 stimulierten Zellen	38
Abbildung 20: Einfluss von PAR-4 Stimulation auf die HA-Matrix.....	39
Abbildung 21: Einfluss von PAR-Aktivierung durch Cathepsin G auf die Expression von <i>Leptin</i> und <i>Pparγ</i> während der 3T3-L1 Differenzierung	40

Abbildung 22: Quantitative Auswertung der Öl Rot O Färbung mittels Fluoreszenzanalyse im Phosphorimager	40
Abbildung 23: Proliferation von Cathepsin G stimulierten Zellen	41
Abbildung 24: Auswirkungen der Stimulation mit Cathepsin G auf die Inflammation	42
Abbildung 25: Quantitative Auswertung der Öl Rot O Färbung mittels Fluoreszenzanalyse im Phosphorimager	43
Abbildung 26: Auswirkung der Stimulierung mit MCCM auf die auf die Expression von <i>Leptin</i> , <i>Pparγ</i> und <i>Ki67</i> während der 3T3-L1 Differenzierung	44
Abbildung 27: Effekte der Stimulation mit MCCM auf die Inflammation	44

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Verwendete Stimulanzen bei den <i>in vitro</i> Versuchen.	13
Tabelle 2.2: Eingesetzte Konzentrationen bei den <i>in vitro</i> Versuchen.	15
Tabelle 2.3: Verwendete Puffer bei der Mastzellisolation	16
Tabelle 2.4: Durchschnittliche Absorptionen bei der Optimierung der Messung des Proteingehalts fixierter Zellen	20
Tabelle 2.5: Verwendete Puffer und Lösungen in der Proteinanalyse	23
Tabelle 2.6: Verwendete Sekundärantikörper bei der Proteinanalyse	23
Tabelle 2.7: Verwendete Primärantikörper bei der Proteinanalyse.	24
Tabelle 2.8: Verwendete Primer in der Genanalyse	26

Abkürzungsverzeichnis

18S	18S ribosomale RNA
Akt	Proteinkinase B
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
AP	Aktivierendes Peptid
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>
BMI	<i>Body Mass Index</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CathG / CG	Cathepsin G
CD / Cd	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA
CEBP	CCAAT/Enhancer binding protein
con	Kontrolle
d	Tag
DIO	<i>diet-induced obesity</i> , ernährungsinduzierte Adipositas
DM	Diabetes mellitus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribunukleinsäure
DNL	<i>de novo</i> Lipogenese
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzymkonjugierter immunvermittelter Assay
ERK1/2	<i>Extrazellular-signal regulated kinase</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fetales Kälberserum
FFA	freie Fettsäuren
FG	Fettgewebe
GLUT	Glucose-Transporter
GSK-3 β	Glykogen Synthase Kinase 3 β
h	Stunden
HA	Hyaluronsäure
HAS / Has	Hyaluronsäuresynthase
HFD	<i>high fat diet</i> (hochkalorische Ernährung)

Hyal / <i>Hyal</i>	Hyaluronidase
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthin
Ig	Immunglobulin
IKK β	<i>inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase β</i>
IL / <i>Il</i>	Interleukin
IRS-1	Insulin-Rezeptor Substrat
JAK	Januskinase
JNK	C-Jun-N-terminale Kinase
LYVE / <i>Lyve</i>	<i>Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor</i>
M	molar
MAPK	Mitogen aktivierte Protein-Kinase
MC	Mastzelle
MCCM	Mastzell konditioniertes Medium
MCE	mitotische klonale Expansion
MCP-1 / <i>Mcp1</i>	<i>Monocyte chemotactic protein 1</i>
Min	Minuten
mRNA	Messenger-RNA
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
P4	PAR-4
PAR / <i>Par</i>	Protease-aktivierter-Rezeptor
PARP	Poly(ADP-ribose)polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEB	Protein Extraction Buffer
PenStrep	Penicillin Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Proteinkinase C
PMC	peritoneale Mastzelle
PPAR γ / <i>Ppary</i>	<i>Proxisome Proliferator-activated rezeptor γ</i>
RBP4	Retinol-bindendes Protein
Rhamm / <i>Rhamm</i>	<i>Receptor for hyaluronan mediated motility</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SVF	stromal vaskuläre Fraktion
T	Tween 20, Polysorbat 20
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TE	Trypsin EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	<i>Tissue factor</i>
TG	Triglyzerid
TLR / <i>Tlr</i>	<i>Toll-like</i> -Rezeptor
TNF α / <i>Tnfa</i>	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WAT	<i>White adipose tissue</i> , weißes Fettgewebe

1 Einleitung

1.1 Adipositas und metabolische Erkrankungen

In den letzten Jahrzehnten hat in der westlichen Welt ein grundlegender Wandel des Lebensstils stattgefunden. Verminderte körperliche Aktivität und ein Überangebot an zucker- und fetthaltigen Nahrungsmitteln prägen unseren Alltag – und führen zu einer stetig steigenden Anzahl an übergewichtigen Personen in unserer Gesellschaft. So ist Adipositas jedoch nicht einfach eine „Lifestyle-Erkrankung“, obschon sich die Menschen bereits an den Anblick übergewichtiger Personen gewöhnt haben. Sie ist eine chronische Erkrankung, welche durch persönliche und sozio-ökonomische Lebensumstände verursacht wird und wegen ihrer schwerwiegenden Konsequenzen therapiebedürftig ist. Ein Großteil der Deutschen ist übergewichtig (*body mass index*, $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$) und etwa jeder fünfte adipös ($BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$) [1]. In den USA wird schon im Kindesalter eine Übergewichts-Prävalenz von ca. 32 % beobachtet; 17 % der Kinder sind bereits adipös [2]. Diese Entwicklung hat weitreichende Konsequenzen. Adipöse Menschen haben eine erhöhte Gesamtmortalität [3]. Das Risiko, eine koronare Herzkrankheit zu entwickeln, ist um 50% erhöht [1]. Vor allem die Zunahme des viszeralen Fettgewebes hat negative Auswirkungen auf den Insulin- und Glukosestoffwechsel und das Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen [4]. So ist bei adipösen Menschen die Inzidenz für Diabetes mellitus Typ 2 (DM) deutlich erhöht; jeder zwanzigste Erwachsene in Europa und den USA leidet bereits an dieser Krankheit [1, 5]. Adipositas, essentielle Hypertonie, Dyslipoproteinämie und eine Glukosetoleranzstörung bis hin zum manifesten Diabetes stellen einen Risikocluster dar, der als metabolisches Syndrom bezeichnet wird [6]. Sowohl einzeln als auch in ihrer Gesamtheit gelten diese Erkrankungen als schwerwiegende Risikofaktoren für kardiovaskuläre Ereignisse wie Myokardinfarkt oder Schlaganfall [7]. Ursächlich beteiligt an der Entwicklung des metabolischen Syndroms ist eine Zunahme des abdominellen Fettgewebes und eine Störung dessen endokriner Funktion [8]. Der westliche Lebensstil spielt eine entscheidende Rolle und stellt daher aktuell den primären therapeutischen Angriffspunkt dar, während die Einzelkomponenten des metabolischen Syndroms darüber hinaus medikamentös behandelt werden können. Die Prävention und Behandlung hat somit einen großen Stellenwert und ist aktuell Gegenstand medizinischer Forschung.

1.2 Fettgewebe

1.2.1 Aufbau / Zusammensetzung

Das Fettgewebe ist ein spezialisiertes Bindegewebe, das im Körper vielfältige Funktionen übernimmt. Es wird zwischen braunem, beigem und weißem Fettgewebe unterschieden. Das plurivakuoläre braune Fettgewebe kommt vornehmlich bei Neugeborenen und Winterschläfern vor und dient der Wärmebildung (sog. „zitterfreie Thermogenese“ [9]). Diese findet durch Fettsäureoxidation in den zahlreichen Mitochondrien statt, welche ihm seine Farbe verleihen.

Das weiße Fettgewebe hingegen fungiert zum einen als Baufett, welches die Organe im Körper stützt und polstert, und andererseits als Depotfett, welches Aufgaben als Energiespeicher und Isolator hat [10]. Es enthält neben lipidgefüllten Adipozyten auch einen geringen Anteil undifferenzierter Präadipozyten, Fibroblasten, vaskuläre Zellen und eingewanderte Entzündungszellen, welche als stromal-vaskuläre Fraktion (SVF) zusammengefasst werden (siehe auch Abbildung 1).

Im Laufe der Adipositas-Entwicklung kommt es zu einem Umbau des Fettgewebes, um bei exzessiver Kalorienzufuhr dem größeren Bedarf an Fettspeicherung nachzukommen. Hierbei spielen folgende Prozesse eine wichtige Rolle: die Hypertrophie bereits existierender Adipozyten durch Lipogenese, die Hyperplasie und Differenzierung einzelner Fettzellen aus Präadipozyten, Angiogenese, dynamische Veränderungen in der Zusammensetzung und Funktion der extrazellulären Matrix und die Sekretion von inflammatorischen Mediatoren [11-14]. Bei adipösen Patienten kann das weiße Fettgewebe mehr als die Hälfte des Körpergewichtes ausmachen. Dabei ist die Fettleibigkeit abhängig von Größe und Anzahl der Adipozyten und wird reguliert durch die Adipogenese, denn reife Adipozyten sind terminal differenzierte Zellen und daher nicht im Stande, sich erneut zu teilen [13].

1.2.2 Adipogenese / Lipogenese / Lipolyse

Wie ein undifferenzierter, fibroblastenähnlicher Präadipozyt zu einer runden Fettzelle maturiert, ist in der Wissenschaft schon seit Jahrzehnten von großem Interesse. Ein besseres Verständnis lieferten diverse präadipozytäre Zelllinien, so auch die 3T3-L1 Zelllinie. Beim Menschen stammen die Adipozyten von einer mesenchymalen Stammzelle ab, welche sich unter anderen Bedingungen auch in Chondrozyten, Osteoblasten oder Myozyten entwickeln kann [15]. Die Expansion des weißen Fettgewebes beginnt mit der Geburt und erfolgt sowohl durch Hypertrophie als auch durch Hyperplasie. Mit Zunahme der Fettspeicherung wächst der Adipozyt. Wird eine kritische Größe erreicht, werden

Prädipozyten aus einem Pool von Stammzellen rekrutiert und starten die Differenzierung in Adipozyten.

In der Zellkultur beginnt die Adipogenese durch Konfluenz der Zellen mit einem Zellzyklusarrest, welcher unentbehrlich ist für die bevorstehende Reifung [16]. Durch Hinzugabe differenzierungsinduzierender Substanzen schließt sich die sog. mitotische klonale Expansion (MCE) in Form von zwei mitotischen Teilungen an, ausgelöst durch Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors C/EBP- β durch mitogene Kinasen wie der ERK1/2 MAP-Kinase [17]. Diesen Zeitpunkt bezeichnet man als Determination [18]. Hier rutschen die Zellen in die von Scott *et al.* postulierte G_0 -Phase des Zellzyklus (eine spezielle Phase in G_1), was zu einer synchronen Induktion der Differenzierung führt. Verzögert kommt es nun durch C/EBP- β zu einer Aktivierung von C/EBP- α und nach zwei Tagen, mit einem Maximum an Tag 3-4, von *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ* (PPAR γ) [19]. Letztere wirken antimitotisch und beenden die MCE durch Hemmung weiterer postkonfluenter Zellteilungen [20]. Fettsäuren und ihre Metaboliten stellen Liganden für den intrazellulären Rezeptor PPAR γ dar. Seine Expression definiert den Beginn der terminalen Differenzierung [21]. Er initiiert die Transkription von Genen für wichtige Proteine des Fettstoffwechsels und der Insulinsensitivität [22, 23]. Mit der Zeit beginnen die Zellen nun, kleine Lipidtröpfchen zu akkumulieren und rundlichere Formen anzunehmen. Die Expression von Genen von Markern der terminalen Differenzierung, wie Leptin und Adiponektin, steigt [15, 24]. Sie beginnen, freie Fettsäuren (FFA) zu sezernieren [25-29]. Nach fünf bis sieben Tagen findet man ausgereifte Adipozyten.

In Fettzellen akkumulierte Triglyzeride (TG) stammen entweder aus Fettsäuren der Nahrung (größter Teil), aus peripherer Lipolyse oder von der *de novo* Lipogenese (DNL), bei welcher Fettsäuren aus Kohlenhydraten synthetisiert werden. Fettsäuren beeinflussen das Milieu im Fettgewebe, so beispielsweise die gesättigte Fettsäure Palmitinsäure, welche ein Produkt der Lipogenese darstellt und im Gegensatz zu ungesättigten Fettsäuren entzündliche Effekte hat [30]. Sie aktiviert die *Toll-like*-Rezeptoren TLR2 und TLR4 und triggert so über Aktivierung des NF- κ B Signalweges die Expression von inflammatorischen Genen in Prädipozyten und eingewanderten Entzündungszellen wie Makrophagen [31, 32]. Dieser Mechanismus dient unter physiologischen Bedingungen im Rahmen der Immunantwort einer Abwehr von Pathogenen, da er durch Komponenten der gram-negativen Zellwand von Bakterien aktiviert wird [33]. Im Zusammenhang mit Fettgewebsinflammation wird dies in der Literatur als Lipotoxizität bezeichnet. Sie spielt eine große Rolle bei der Entstehung der Insulinresistenz.

Lipotoxizität steht auch im Zusammenhang mit der Lipolyse. Bei der Lipolyse werden Triglyzeride aus Fettzellen zu Glycerol und FFA hydrolysiert [34]. Die Lipolyse wird durch

einen niedrigen Insulinspiegel gefördert; sie unterliegt aber auch der Steuerung durch andere Hormone, um im Körper bei Bedarf Energiemetabolite freizusetzen. Lipolytische Fettzellen sind bei der Adipositas zu beobachten, da es hier zu einem Ungleichgewicht von TG Synthese und Hydrolyse kommt. Stark erhöhte Fettsäurespiegel können zu einer unvollständigen β -Oxidation in den Mitochondrien der Adipozyten führen. Dies verursacht neben endoplasmatischem Stress eine Ansammlung von Acylcarnitinen, welche über NF- κ B Transkription einen inflammatorischen Phänotyp von Makrophagen induziert und somit zur Entstehung einer Insulinresistenz beiträgt [31, 35]. Darüber hinaus kann es durch eine Re-Veresterung von in die Blutbahn freigesetzten FFA zu Triglyzeriden zu einer ektopen Lipidspeicherung im Muskel und zu einer Steatose der Leber kommen, was in einem Funktionsverlust des Gewebes münden kann [36].

1.2.3 Fettgewebe als endokrines Organ

Schon vor drei Jahrzehnten wurde ein Zusammenhang des Stoffwechsels von Geschlechtshormonen und dem Fettgewebe identifiziert [37]. Vor allem mit der Entdeckung des adipozytenspezifischen Hormons Leptin wurde deutlich, dass das Fettgewebe ein komplexes endokrines Organ ist, das biologisch aktive Substanzen sezerniert und weitreichende metabolische und immunologische Funktionen ausübt [25, 38]. Diese können sowohl lokal (parakrin) als auch systemisch (endokrin) wirken. Darüber hinaus agiert das Fettgewebe auch als afferentes Organ, da es über diverse Rezeptoren des Hormonsystems verfügt [39]. Fettgewebe produziert und sezerniert Adipokine, darunter pro- und anti-inflammatorische Faktoren wie Leptin, Adiponektin, Resistin, Visfatin, Retinol-bindendes Protein (RBP4), als auch Zytokine und Chemokine wie Tumornekrosefaktor α (TNF α), Interleukin 6 (IL6) und *Monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1), welche auch bei anderen systemischen Entzündungen vermehrt gebildet werden [30, 40]. Eine Hypertrophie von Adipozyten ist u.a. positiv korreliert mit einer Produktion von Leptin und negativ mit der von Adiponektin [41]. Leptin reguliert die Nahrungsaufnahme und den Energieumsatz im Hypothalamus [42]. Wenn der Organismus niedrige Energiereserven hat, fällt demnach der Leptinspiegel. Dies triggert u.a. die Fettsäureoxidation und die Glukosebereitstellung und hemmt die Thermogenese [43]. Ein Leptinmangel geht ferner mit einer reduzierten T-Zell-Antwort einher und führt somit zu einer beeinträchtigten Immunantwort [40]. Hohe Leptinspiegel sind folglich ein Zeichen suffizienter Energieversorgung des Organismus und bewirken eine Appetitminderung. Allerdings liegt bei Adipositas oft eine Leptinresistenz vor, was zu einer Störung dieses Regelkreises führt [39]. Die Leptin-Expression wird nicht nur beeinflusst von der Zellgröße des Adipozyten, sondern auch durch systemisch und lokal

sezernierte Hormone und Zytokine [39]. Adiponektin ist der funktionelle Gegenspieler des Leptins und führt zu einer verminderten Glukoneogenese in der Leber und einer erhöhten Oxidation von Fettsäuren im Muskel [41]; jedoch erhöhen sowohl Leptin als auch Adiponektin die Insulinsensitivität, während Resistin und RBP4 diese verschlechtern [30]. Ein in der Literatur beschriebener Effekt des Chemokins MCP-1 ist die Chemotaxis von Monozyten, die sich im Fettgewebe zu gewebständigen Makrophagen entwickeln können und eine wichtige Rolle bei der chronischen Entzündung im Fettgewebe spielen.

1.3 Entzündung des Fettgewebes – Ursachen und Folgen

1.3.1 Inflammation und Insulinresistenz

Im adipösen Fettgewebe ist eine erhöhte Sekretion von pro-inflammatorischen Substanzen Faktoren wie TNF α , IL6, CRP, und MCP-1 beschrieben, welche direkte Auswirkungen auf den zellulären Stoffwechsel haben und zu einer chronischen subklinischen Inflammation im Fettgewebe führen. Eine gestörte Freisetzung und Signalaktivierung solcher Mediatoren bei Adipositas fördert die Anreicherung von Entzündungszellen im Fettgewebe, die ihrerseits wieder pro-inflammatorische Zytokine mit systemischer Wirkung abgeben und zu der Entstehung einer Adipositas-induzierten Insulinresistenz beitragen [31, 44, 45]. Eine Insulinresistenz manifestiert sich in einer verminderten Blutglukoseaufnahme durch Fettgewebe und Muskulatur, einer ungehemmten Glukoseproduktion in der Leber und im Adipozyten in einer Lipolyse von Triglyzeriden und einer Sekretion von freien Fettsäuren [46].

Ein Hauptmerkmal, welches metabolische Erkrankungen gemein haben, ist diese gestörte Insulinsensitivität [5], also eine zunehmende „Resistenz“ des Organismus gegen die Wirkung des Insulins. Insulin ist ein Hormon, das bei steigenden Blutglukosespiegeln aus den Betazellen der Langerhans-Inseln des Pankreas in die Blutbahn sezerniert wird. Durch Einbau von GLUT4 (*glucose transporter 4*) in insulinsensitive Zellen wie Fett-, Skelett- und Herzmuskelzellen vermittelt es die Energieversorgung dieser Gewebe [47]. Darüber hinaus fördert Insulin die Speicherung von Glukose in Form von Glykogen, vor allem in der Leber und in der Muskulatur. Dadurch ist es in der Lage, den Blutzuckerspiegel rasch auf physiologische Werte (< 100 mg/dl bzw. < 5,6 mmol/l) zu senken [48]. Eine weitere wichtige Funktion von Insulin ist die Förderung der Lipogenese und eine Hemmung der Lipolyse. Gleichzeitig hemmt es die hepatische Glukoneogenese.

Eine zu hohe FFA-Konzentration im Blut ist ursächlich an der Entwicklung einer Insulinresistenz beteiligt. Dieser Überschuss kann alimentär bedingt sein, durch

unzureichende körperliche Bewegung, genetische Disposition, medikamentös oder durch ein Dysbalance im TG-Metabolismus, wie bei der Adipositas. Über eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) sowie des JNK- oder IKK β -Signalweges kommt es zu einer Phosphorylierung des Insulinrezeptor-Substrats (IRS-1) im Adipozyten, was zu einer gestörten Übertragung des Insulin-Signals führt. Dies verursacht einen verminderten Transport von GLUT4 aus den intrazellulären Vesikeln in die Zellmembran, wodurch die Glukoseaufnahme ins Muskel- und Fettgewebe gestört wird [49]. Kompensatorisch wird die Insulinproduktion im Pankreas auf unphysiologische Werte erhöht [50]. Es entsteht ein *Circulus vitiosus*, denn der Wegfall des lipolysehemmenden Insulins verursacht eine weiter ansteigende Konzentration von FFA, die wiederum zu einer weiteren Verringerung der GLUT4-Rezeptoren führt [51]. Diesen kompensierten Zustand kann der Körper nicht dauerhaft aufrechterhalten, und so kommt es, meist erst nach vielen Jahren, zu einer gestörten Glukosetoleranz. Diese äußert sich in erhöhten nüchtern- und postprandialen Glukosespiegeln im Blut. Besteht dereinst z.B. ein Nüchternblutzucker von über 126 mg/dl (> 7,0 mmol/l), so spricht man von einem manifesten Diabetes mellitus (DM) [48]. Im Laufe der Zeit kommt es nun zu einer Erschöpfung der Inselzellen des Pankreas und allmählich zu einem Versiegen der Insulinproduktion [52]. Im Gegensatz zum hier beschriebenen DM Typ 2 steht der DM Typ 1, der auf einer Zerstörung der Inselzellen durch Autoantikörper beruht, letztlich zu einem absoluten Insulinmangel führt und meist bereits in der Jugend auftritt [53].

Außerdem ist beschrieben, dass die Genexpression für Proteine der extrazellulären Matrix (EZM), abhängig von der Ernährung, Veränderungen unterliegen kann. Wird eine anders zusammengesetzte, steifere EZM sezerniert, können sich die Adipozyten wenig ausdehnen [54, 55]. Letztlich führt Überernährung und damit verbundene Hypertrophie der Fettzellen zu adipozytärem „Stress“, was durch erhöhte Serumkonzentrationen von FFA und Lipopolysacchariden einen gehäuften Anfall von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Aktivierung von *Toll-like* Rezeptoren (TLR) auslöst [55]. Dadurch werden vermehrt Zytokine und Chemokine wie MCP-1 von den Adipozyten sezerniert, was wiederum Entzündungszellen rekrutiert und die Inflammation weiter fördert [56].

1.3.2 Entzündungszellen im Fettgewebe

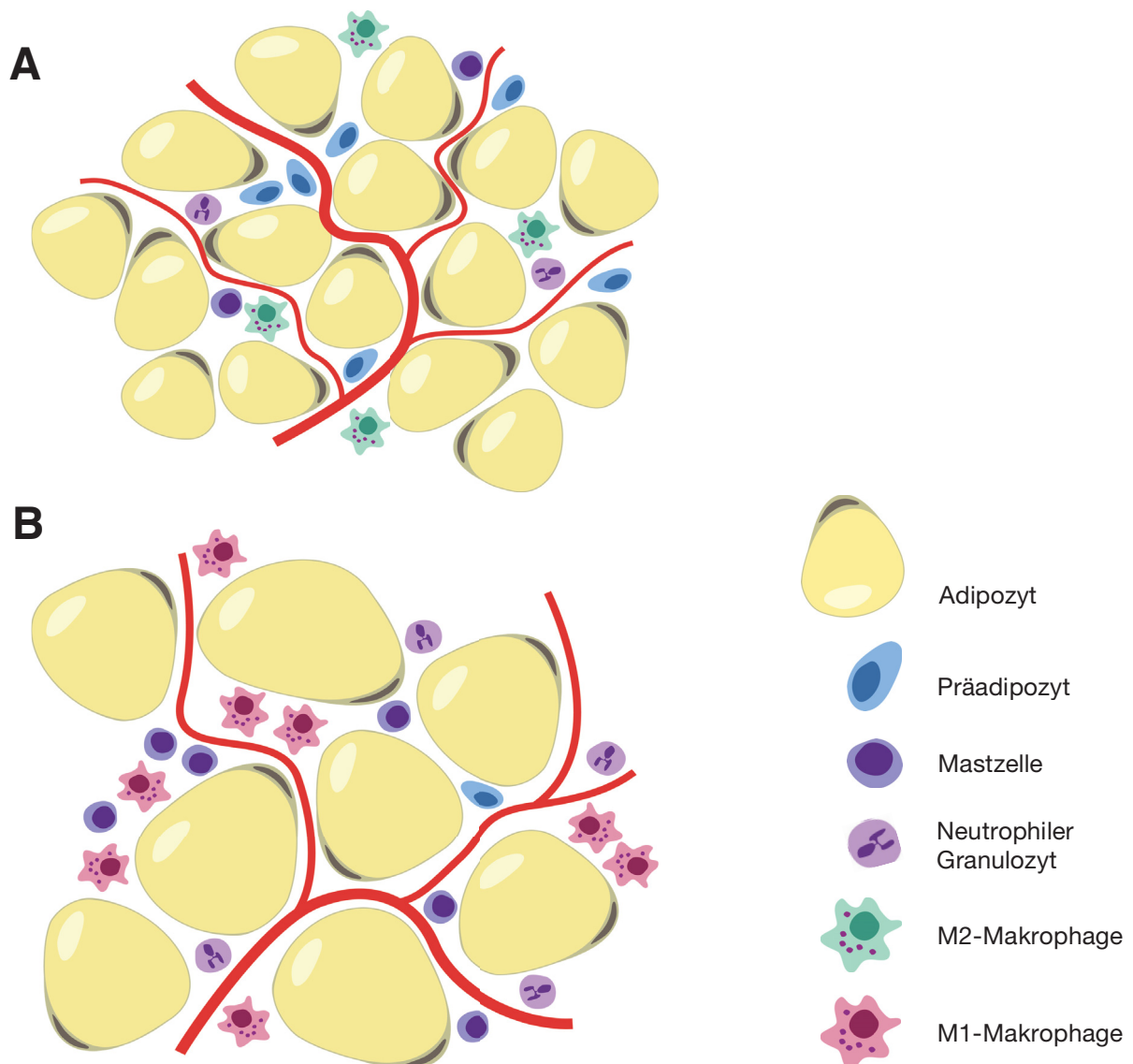


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Fettgewebes und der infiltrierenden Immunzellen. A, schlankes Fettgewebe mit kleinen Adipozyten und B, adipöses Fettgewebe, beide mit Zellen der stromal vaskulären Fraktion (Präadipozyten, vaskuläre Zellen) und eingewanderte Entzündungszellen, darunter neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen. Im adipösen FG finden sich vornehmlich M1-Makrophagen, welche die Entzündung im Fettgewebe fördern.

Im Fettgewebe machen die Adipozyten zwar 90% des Volumens aus, jedoch nur 20-40 % der Zellen. Der restliche Teil umfasst Zellen der stromalvaskulären Fraktion (SVF), welche bei adipösen Patienten zu mehr als der Hälfte aus Leukozyten besteht [57]. Vor allem Makrophagen sind in diesem Fettgewebe reichlich zu finden und sezernieren dort pro-

inflammatorische Substanzen wie TNF α , wodurch sie weitere Immunzellen rekrutieren und in insulinempfindlichen Zellen u.a. über NF- κ B inflammatorische Signalkaskaden initialisieren [30]. Makrophagen sind mononukleäre Phagozyten, welche in jeglichen Geweben des Körpers anzutreffen sind und dort gewebspezifische Morphologien annehmen. So stellen sie die Vorläuferzellen von Kupffer-Zellen in der Leber, Osteoklasten im Knochen, Mikroglia des ZNS und des Mesangiums in den Glomeruli der Nieren dar [41, 58]. Im adipösen Fettgewebe gruppieren sie sich um untergehende hypoxische Adipozyten, was als sog. *Crown-like Structures* bezeichnet wird, und nehmen einen pro-inflammatorischen Zustand an. Dieser entzündliche Phänotyp wird als M1-Makrophage bezeichnet und sezerniert pro-inflammatorische Zytokine wie IL1, TNF α und IL6 [30]. Im gesunden, schlanken Fettgewebe finden sich dagegen vornehmlich M2-Makrophagen, welche anti-inflammatorische Zytokine sezernieren [59, 60]. Die erstgenannten entzündlichen Makrophagen tragen zur Entstehung einer Insulinresistenz bei [56]. Eine wichtige Rolle hierbei nehmen auch andere Immunzellen wie neutrophile Granulozyten und Mastzellen ein, die im Fettgewebe zwar in einer deutlich geringeren Anzahl vorkommen als Makrophagen [61], aber vermutlich eine hohe Relevanz haben. Mastzellen sind besonders bei Allergien von Bedeutung; sie sind beteiligt an IgE-vermittelten Hypersensitivitätsreaktionen in den Atemwegen, der Haut und dem Gastrointestinaltrakt [62]. Die Zahl an Mastzellen im Fettgewebe adipöser Patienten ist auf das Vierfache im Vergleich zum schlanken Menschen erhöht, die von Makrophagen auf das Doppelte [62]. Mastzellen und Neutrophile infiltrieren das prädiabetische Fettgewebe sogar noch vor den Makrophagen [61, 63-66]. So könnten diese eingewanderten Entzündungszellen über die Freisetzung von Proteasen die lokale Funktion des Fettgewebes beeinflussen.

1.3.3 Mediatoren aus Entzündungszellen – Zytokine, Proteasen

Es ist beschrieben, dass die Mediatoren, welche im Fettgewebe gefunden wurden, nicht nur von Adipozyten selbst, sondern zu einem großen Teil auch von den eingewanderten Immunzellen sezerniert werden, darunter Zytokine und Chemokine wie IL1, IL6, TNF α und MCP-1, deren Spiegel bei Patienten mit Insulinresistenz oder Diabetes erhöht sind [29, 41, 67-70]. So haben diese nicht nur einen parakrinen Effekt, sondern sind auch systemisch in größeren Mengen nachweisbar [30, 71-73]. Sie werden unter anderem von inflammatorischen M1-Makrophagen sezerniert, welche im adipösen Fettgewebe vermehrt vorkommen. Bei schlanken Patienten sind vornehmlich M2-Makrophagen im Fettgewebe zu finden, welche anti-inflammatorische Substanzen wie IL-10, IL-1-Rezeptorantagonisten und Arginase-1 produzieren und zu einer verbesserten Insulinempfindlichkeit beitragen [31].

Noch weitgehend unbekannt bei der Entstehung der Insulinresistenz im Fettgewebe ist die Rolle von Proteasen aus dem Gerinnungssystem und aus Entzündungs- und Immunzellen. So weisen adipöse Patienten erhöhte Spiegel von Cathepsin G und Trypsin in ihrem Blut auf [65, 74]. Als potentielle Quelle kommen Mastzellen und neutrophile Granulozyten in Frage [75]. Vor allem erstere werden bereits in direkte Verbindung mit Gewichtszunahme und Störungen des Glukosehaushaltes und der Energieumwandlung im Fettgewebe gebracht. Eine Behandlung von Mäusen mit dem H1-Antihistaminikum Ketotifen oder Cromoglicinsäure, einem Mastzellstabilisator, verhinderte in Studien die Entwicklung eines ernährungsbedingten Diabetes [65]. So liegen für den Menschen längst Patente für die Anwendung von Mastzell-Stabilisatoren als mögliche neue Therapien metabolischer Erkrankungen vor [76].

1.4 Protease-aktivierte Rezeptoren

1.4.1 Aktivierung, Subtypen und Effekte

Der erste erforschte Protease-aktivierte Rezeptor war PAR-1. Er wurde gefunden, als man auf der Suche nach dem zellulären Wirkmechanismus von Thrombin auf die Plättchenaggregation war [77]. PARs gehören zu der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen [78]. Bisher sind sowohl bei Menschen als auch Mäusen vier PARs bekannt und diese werden auf diversen Zellen im Organismus exprimiert [79]. Beim Menschen werden PAR-1, PAR-3 und PAR-4 durch Thrombin aktiviert [80-82]. PAR-2 hingegen wird nicht durch Thrombin, sondern u.a. durch die Serinproteasen Trypsin, Trypsin aus Mastzellen, *Tissue Factor* und durch die Koagulationsfaktoren Faktor VIIa und Xa aktiviert [83]. Zu den weiteren Aktivatoren von PAR-4 gehören auch Trypsin, Cathepsin G und Faktor Xa [84, 85].

Die Aktivierung der PARs erfolgt durch proteolytische N-terminale Spaltung der Exodomäne, so dass ein neuer Rezeptor-N-Terminus entsteht, welcher als intrinsischer Ligand (sog. *Tethered Ligand*) fungiert und durch Bindung an die transmembranäre, intrazelluläre Domäne das G-Protein aktiviert [83]. PAR-1 und -2 aktivieren G-Proteine vom Typ $G_{12/13}$, G_q und $G_{i/z}$, während PAR-3 nur G_q - und PAR-4 nur G_q - und $G_{12/13}$ -Proteine aktiviert [86]. Synthetische Liganden, wie SLIGRL-NH₂ als PAR-2 aktivierendes Peptid (AP) und AYPGKF-NH₂ als PAR-4 AP, aktivieren den Rezeptor direkt und ohne die proteolytische Spaltung, da sie die Sequenzen der jeweiligen intrinsischen Liganden imitieren [87, 88]. Die Entwicklung solcher PAR-selektiver APs hat es ermöglicht, die physiologischen Funktionen der PARs besser zu verstehen.

So haben die PARs in jeglichen Organsystemen im Organismus vielfältige Funktionen, welche in den letzten Jahren Gegenstand wissenschaftlicher Forschung waren. Ein großes Augenmerk wurde wegen der hohen physiologischen und pathologischen Relevanz bisher auf die Interaktion von PAR-1 mit Thrombin gelegt. PAR-1 hat aber neben seiner Aufgabe bei der Hämostase auch weitere Funktionen. So ist er ein Mediator bei Heilung in Gefäßen und Knochen oder bei akuten Verletzungen der Lunge und dem *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS), nicht zuletzt, weil seine Stimulation durch Thrombin hier zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität führt [89-92]. PAR-2 kommt im Intestinaltrakt eine große Bedeutung zu, da er in Darm und Pankreas bei der Nahrungsverwertung von dem Verdauungsenzym Trypsin aktiviert wird [79]. Coughlin *et al.* postulierten bereits 2003, dass PAR-2 Aktivierung *in vivo* bei entzündlichen Prozessen von Bedeutung ist [83]. Für PAR-1 und PAR-2 wurde auch im Zusammenhang mit *Tissue Factor* (TF) eine Beteiligung bei Sepsis beobachtet [93]. PAR-2 steht u.a. im Kontext mit Myokardinfarkt und Alzheimer, so wurde aber vorwiegend eine Beteiligung an pro- und anti-inflammatorischen Prozessen beobachtet, z.B. bei Arthritis und allergischer Dermatitis [94-97]. *Par3-Knockout* Mäuse entwickelten gegenüber dem Wildtyp weniger chemisch induzierte Thrombosen [98]. PAR-4 spielt eine wichtige Rolle als Rezeptor bei der Hämostase und bei akuter Entzündung [78, 96, 99].

1.4.2 PAR in Fettgewebe

Über die Rolle von PARs bei metabolischen Störungen ist bisher wenig bekannt. Badeanlou *et al.* beschrieben 2011, dass die genetische Deletion der TF-PAR-2-Signalkaskade in Mäusen zu einer verminderten Inflammation, und damit zu einer besseren Insulinsensitivität und Gewichtsabnahme führt [100, 101]. Andere Studien zeigten, dass die Entwicklung einer Insulinresistenz durch den direkten Thrombininhibitor Argatroban verhindert wird [102]. Auf zellulärer Ebene induziert Thrombin ein mitogenes Signaling [103]. Strande *et al.* berichteten 2009 von PAR-1 und PAR-4 im Fettgewebe. Tatsächlich wird abdominelle Adipositas mit prothrombotischen und entzündlichen Zuständen assoziiert [104]. Die *in vitro* Stimulation von humanen Adipozyten mit Thrombin führt zu einer Sekretion von Wachstumshormonen und entzündlichen Zytokinen. Hierbei kommt vor allem PAR-4 als möglicher Vermittler der Thrombinwirkung in Frage, da dieser Rezeptor auf Präadipozyten und reifen Adipozyten exprimiert wird, während der klassische Thrombinrezeptor PAR-1 in der SVF zu finden ist. Dieser Rezeptor wird neben Thrombin ebenfalls von Cathepsin G aus Immunzellen aktiviert und könnte so einen möglichen Mediator zwischen einer systemischen subklinischen Entzündung und einer Dysfunktion des Fettgewebes darstellen [85].

Vor allem PAR-2 wurde in den letzten Jahren als wichtiger Faktor bei der Entwicklung einer Diät-induzierten Adipositas (DIO) identifiziert [101, 105]. Im Jahr 2013 publizierten Lim *et al.*, dass bei Mäusen oral verabreichte PAR-2 Antagonisten u.a. eine nahrungsmittelabhängige Adipositas, die metabolische Dysfunktion, die Insulinresistenz und die Glukoseintoleranz verringerten [105]. Darüber hinaus beobachteten sie durch Antagonisierung von PAR-2 eine verminderte Entzündung im Fettgewebe. Allerdings begründeten sie diese Beobachtungen vor allem mit der verminderten Infiltration von Makrophagen und anderen Entzündungszellen ins Fettgewebe, und so untersuchten sie nicht die PAR Expression in den Adipozyten selbst [105]. Sie beobachteten einen Phänotyp, der auf ein vermindertes Vorkommen von pro-inflammatorischen M1-Makrophagen hinwies.

Bislang wurden PAR-2 auf murinen und PAR-4 auf humanen Adipozyten beschrieben [101, 104]. PAR-1 hingegen konnte auf humanen Adipozyten nicht detektiert werden [104]. PAR-4 kann auch von anderen Proteasen als Thrombin stimuliert werden [85]. Vor dem Hintergrund, dass das prädiabetische Fettgewebe bereits in frühen Stadien von Immunzellen infiltriert wird [38], stellt sich nun die Frage, ob PAR-4 auf Adipozyten ein möglicher Regulator der frühen metabolischen und entzündlichen Veränderungen im Fettgewebe ist.

1.5 Fragestellung

Die Anreicherung inflammatorischer Zellen und die damit einhergehende Entzündung sind frühe Merkmale des adipösen Fettgewebes und fördern langfristig den Verlust der systemischen Insulinsensitivität [38]. Welche genaue Rolle PAR-4 hierbei spielt, wurde bisher nicht ausreichend untersucht. Allerdings ist eine relevante Funktion von PAR-4 bei der Interaktion von Immunzellen mit Adipozyten naheliegend, denn er wird auf Adipozyten exprimiert und durch Thrombin aktiviert, welches bei Adipositas und Diabetes vermehrt gebildet wird [102, 104, 106, 107]. Darüber hinaus ist bekannt, dass PAR-4 in vaskulären Zellen dynamisch unter hyperglykämischen und inflammatorischen Einflüssen reguliert wird [108-111]. Interessant ist, dass der Rezeptor auch von anderen Proteasen als Thrombin stimuliert wird, so zum Beispiel durch Cathepsin G [75, 85]. Adipöse Patienten weisen im Blut erhöhte Cathepsin G Spiegel auf, das möglicherweise aus Mastzellen oder neutrophilen Granulozyten freigesetzt wird [74, 75]. Mastzellen werden in direkte Verbindung mit Störungen des Glukosehaushaltes und der Energieumwandlung im Fettgewebe gebracht [65].

Das Ziel dieser Arbeit besteht in der Untersuchung des Einflusses von Protease-aktivierten Rezeptoren auf die Reifung von Adipozyten *in vitro*, insbesondere im Zusammenspiel mit von Mastzellen freigesetzten Proteasen. Folgende übergeordnete Fragestellungen sollen hierbei untersucht werden:

1. PAR-Regulation während der Adipozytenreifung
2. Einfluss selektiver PAR-Aktivierung während der Differenzierung
3. Einfluss von Mastzell-konditioniertem Medium auf die Adipogenese
4. Bedeutung von PAR-4 vermittelten Effekten in der Interaktion von Mastzellen und Adipozyten

2 Material und Methoden

2.1 Substanzen

Alle nicht explizit genannten Substanzen wurden von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Peqlab (Erlangen, Deutschland) oder Sigma-Aldrich (München, Deutschland) bezogen.

Tabelle 2.1: Verwendete Stimulanzen bei den in vitro Versuchen.

Bezeichnung	Produkt	Hersteller
PAR-2 AP	SLIGRL-NH ₂	BMFZ, Uniklinik Düsseldorf
PAR-4 AP	AYPGKF-NH ₂	BMFZ, Uniklinik Düsseldorf
PAR-4 Inhibitor	tcY-NH ₂ , CAS 327177-34-4	Tocris, Wiesbaden
Cathepsin G	CG aus humanen Leukozyten	BioCentrum, Krakau, Polen
Cathepsin G Inhibitor	CH Inhibitor I, CAS 429676-93-7, #1982-1	BioVision, CA, USA

2.2 Zellkultur

2.2.1 3T3-L1 Zellen

2.2.1.1 Kultivierung

Adipogene Veränderungen während der Differenzierung von Präadipozyten wurden in 3T3-L1 Zellen (3T3-L1 Präadipozyten, #86052701, ECACC, Sigma-Aldrich) untersucht. Diese Zelllinie stammt aus murinen Embryonen und ist dadurch charakterisiert, dass sie sich unter speziellen Kultivierungsbedingungen vom fibroblastenähnlichen Zelltyp zu Adipozyten differenziert [112].

Um ein ausreichendes Differenzierungspotential beizubehalten und eine Kontaktinhibition, die zu einem Zellzyklusarrest führt, zu vermeiden, wurden erstens nur Zellen der Passagen 8 - 11 eingesetzt und zweitens wurden die Zellen bei einer Dichte von 70 - 80 % passagiert.

Zur Kultivierung wurden die Zellen zunächst aufgetaut und in eine Erhaltungsflasche mit Kulturmedium gegeben, bestehend aus DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), *high glucose* (4,5 g/l), 10 % fetales Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco, Darmstadt). Nach 24 h wurde das Medium erneut gewechselt und bei einer Konfluenz von ca. 70 % wurden die Zellen mit einer Dichte von 20.000 - 40.000 Zellen / cm² in Erhaltungsflaschen und Lochplatten (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) passagiert. Hierzu wurden die Zellen mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und anschließend für drei Minuten bei Raumtemperatur mithilfe von 0,5 %iger Trypsin/EDTA-Lösung (Gibco, Carlsbad) abgelöst. Das Trypsin wurde anschließend mit Vollmedium abgestoppt. Die weitere Kultivierung erfolgte in dem Kulturmedium bei angefeuchteter Luft mit 5 % CO₂ bei 37 °C; zur längerfristigen Aufbewahrung wurden die Zellen mit einem Zusatz von 7 % Dimethylsulfoxid (DMSO) im Stickstofftank eingefroren.

2.2.1.2 Differenzierung

Für die Induktion der Differenzierung wurde das Kulturmedium zwei Tage nach Erreichen der Konfluenz mit folgenden Substanzen versetzt: 0,5 mM 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX), 0,25 µM Dexamethason und 1 µg/ml Insulin (Insulin aus bovinem Pankreas, gelöst in H₂O mit Eisessig auf pH 2 eingestellt). In diesem Differenzierungsmedium wurden die Zellen für zwei Tage kultiviert. An Tag 0 erfolgte ein Mediumwechsel, bei welchem dem Kultivierungsmedium für zwei weitere Tage 1 µg/ml Insulin zugesetzt war. Die so behandelten Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten stimuliert und analysiert.

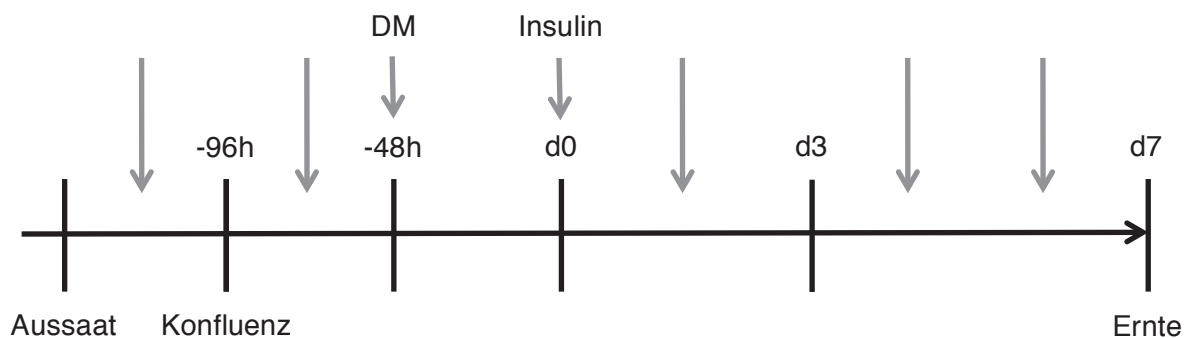


Abbildung 2: Differenzierungsmodell für 3T3-L1 Zellen. Konfluenz bei 100% Dichte. DM, Differenzierungsmedium, bestehend aus DMEM mit IBMX, Dexamethason und Insulin. Grauer Pfeil: Mediumswechsel, Zugabe von Stimulantien oder Inhibitoren.

2.2.1.3 Stimulation

Präadipozyten oder reife Adipozyten wurden entweder kurzfristig oder über den Differenzierungszeitraum hinweg mit PAR-Aktivatoren stimuliert. Dafür wurden sowohl die synthetischen PAR-aktivierenden Peptide SLIGRL-NH₂ (PAR-2 AP) und AYPGKF-NH₂ (PAR-4 AP), als auch der proteolytische Aktivator Cathepsin G (PAR-4 aktivierend) benutzt. In einer weiteren Versuchsreihe wurden die 3T3-L1 Zellen mit Mastzell-konditioniertem Medium behandelt. Im Anschluss an die Stimulation wurden die Zellen für unterschiedliche Untersuchungsmethoden aufbereitet: 1. in Laemmli-Puffer zur Bestimmung der Proteinexpression, 2. in Trizol zur RNA-Extraktion oder 3. in PFA fixiert zur histologischen Färbung.

Tabelle 2.2: Eingesetzte Konzentrationen bei den *in vitro* Versuchen.

Stimulanzen	eingesetzte Konzentration
PAR-2 AP	100 µM
PAR-4 AP	100 µM
Cathepsin G	0,01 U / ml

2.2.2 Murine peritoneale Mastzellen

2.2.2.1 Isolation

Zur Isolation peritonealer Mastzellen wurden C57BL/6J Mäuse als Spender benutzt. Die Organentnahme erfolgte durch Frau Fender (Projektnummer O4/02). Die Mäuse wurden durch CO₂-Inhalation eingeschläfert und ihnen wurde eine PBS-Luft-Mischung (3 ml PBS + 1 ml Luft) in die Peritonealhöhle gespritzt. Durch darauffolgendes Massieren der Mäuse wurde eine Mobilisierung und Anreicherung peritonealer Zellen in der peritonealen Flüssigkeit begünstigt. Anschließend wurde die Peritonealflüssigkeit entnommen und in ein Falcon-Gefäß überführt. Dann wurde die Suspension zentrifugiert (10 Min, 300 rpm, 4 °C) und die Pellets in Erythrozyten-Lyse-Puffer resuspendiert. Nach fünf Minuten Kühlung wurden die Zellen erneut zentrifugiert und in PBS (2 ml) resuspendiert. Anschließend wurden 1x10⁷ Zellen in 80 µl PEB (*Protein Extraction Buffer*) aufgenommen und 20 µl CD117 MACS *Microbeads* (#130-091-224, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) hinzugefügt. Nach Inkubation (20 Min bei 4 °C) wurden die Zellen gewaschen. Dafür wurden sie in 1 ml PEB resuspendiert und erneut zentrifugiert (10 Min, 5000 rpm, 4 °C). Nach Aufnahme in PEB (1 ml) wurden die Zellen entlang der Isolierungssäule pipettiert, drei Mal mit PBS (1 ml)

gewaschen, zentrifugiert (10 Min, 300 rpm, 4 °C) und in 5 ml PMC Kulturmedium in eine 12,5 ml Flasche gegeben.

Tabelle 2.3: Verwendete Puffer bei der Mastzellisolation

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
Erythrozyten-Lyse-Puffer (1x)	0,15 M NH_4Cl (8,29 g) 1 mM KHCO_3 (1 g) 0,1 mM Na_2EDTA ad 1l H_2O (pH 7,2 - 7,4)



Abbildung 3: Isolierte Mastzellen in der Primärkultur. Der Maßstabbalken entspricht 15 µm. Repräsentative Abbildung.

2.2.2.2 Kultivierung

Die isolierten Mastzellen wurden in einem speziellen PMC Medium kultiviert: RPMI (Gibco), 10 % FCS, 1 % PenStrep und 0,5 µl alpha-Thioglycerol, versetzt mit den Wachstumsfaktoren IL-3 (1:20.000) und *Stem Cell Factor* (SCF) (beides Merck, Darmstadt). Die Zellen wurden alle sieben Tage passagiert. Ablösung erfolgte mit 2 ml StemPro Accutase (Gibco). Nach Zentrifugation wurden die Zellen in PEB resuspendiert, erneut mit *Microbeads* versetzt und nach Protokoll (s.o.) aufgereinigt. Anschließend wurden sie mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro T25-Flasche ausgesät. So halten sich die Zellen für bis zu vier Wochen und können wiederholt degranuliert werden.

2.2.3 Erstellung von Mastzell-konditionierten Medien (MCCM)

Die Degranulation der Mastzellen wurde mit dem Mastzell-*Degranulant Compound 48/80* (Sigma-Aldrich) (50 mg/ml) ausgelöst. Für die Herstellung einer Stammlösung wurde 1 mg 48/80 mit 20 µl PBS versetzt. Diese Lösung ist bei 4 °C vier Wochen lang haltbar. Die arbeitsfertige Lösung wurde 1:100 in PBS verdünnt und in einer Konzentration von 1 µl/ml in FCS-freiem (Hunger-) Medium (*high glucose* DMEM) benutzt. Pro Mastzell-Kulturflasche wurden 5 ml dieser Lösung verwendet und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, wobei stets auch eine zellfreie Flasche ebenso behandelt wurde (zellfreies Kontrollmedium mit Compound 48/80). Anschließend wurde das MCCM abgenommen und sofort bei -80 °C gelagert. Daraufhin wurden die Zellen mit PBS gewaschen und erneut mit PMC Medium versetzt.

2.2.4 Stimulation von 3T3-L1 mit MCCM

MCCM und Kontrollmedien wurden auf 37 °C erwärmt und mit 10% FCS und ggf. spezifischen Inhibitoren gegen Cathepsin G (Calbiochem, Merck Chemicals, Nottingham, UK) oder PAR-4 (tcY-NH₂, Tocris, Wiesbaden) versetzt. Hiermit wurden die 3T3-L1 ab dem Zeitpunkt der Differenzierung und bei jedem Mediumwechsels inkubiert. Die so behandelten Zellen wurden nach sieben Tagen geerntet und analysiert. Dabei wurde zur Kontrolle stets auch eine Kulturflasche mit dem Medium inkubiert, welches zuvor aus der zellfreien Flasche gewonnen wurde (Kontrollmedium).

2.2.5 Monozyten-Adhäsions-Assay

Für die Untersuchung der Monozyten-Adhäsion wurden zum einen Präadipozyten als auch reife Adipozyten an Tag 3 untersucht. Dafür wurden die Zellen mit einer Dichte von 5000 Zellen pro Mulde einer 96-Loch-Platte ausgesät und 24 h vor Experimentbeginn mit PAR-4 AP stimuliert.

Humane U937 Monozyten (CLS Cell Line Service, Eppelheim) wurden in einer Dichte von 10⁷ Zellen in 1 ml RPMI 1640 Medium (Gibco) mit Glutamax und 1 % Penicillin/Streptomycin gegeben und für 30 Min mit 10 µg/ml Calcein-AM (Calbiochem, Merck, Darmstadt) markiert. Daraufhin wurden die Zellen drei Mal mit 1 ml RPMI gewaschen und anschließend 3x10⁶ Zellen/ml in RPMI mit Glutamax und 10 % FCS resuspendiert. Davon wurden 100 µl (3x10⁵ Zellen) in die 96-Loch-Platte mit den Präadipozyten / Adipozyten gegeben und für die Adhäsion für 90 Min bei 4 °C inkubiert. Abschließend wurden die Zellen drei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen und nun 100 µl RPMI/Glutamax/FCS hinzugegeben. Die Fluoreszenzmessung wurde mit dem Infinite 200 (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz)

bei einer Exzitation von 485 nm und einer Emission von 535 nm durchgeführt, um die Anzahl der anhaftenden Monozyten zu quantifizieren. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt.

2.3 Lipid-Quantifizierung durch Öl Rot O Färbung

2.3.1 Histologische Färbung

Die Öl Rot O Färbung wurde für drei Analyseverfahren durchgeführt: erstens für die optische Darstellung der akkumulierten Lipidtröpfchen in den reifenden Adipozyten. Zweitens für die photospektrometrische Quantifizierung der Lipidmenge nach Auslösen der Pigmente und drittens für die Auswertung der Fluoreszenz der Färbung mit Hilfe des Typhoon Phosphorimagers (GE Healthcare, Uppsala, Schweden).

Für die Herstellung einer Öl Rot O Stammlösung wurden 300 mg Öl Rot O Pulver (*Oil Red O*, #O9755, Sigma-Aldrich) mit 100 ml Isopropanol gemischt, bei 60 °C gelöst und anschließend durch einen 0,22 µm Sterilfilter gegeben. Die so hergestellte Lösung war bei 4 °C für ein Jahr haltbar. Die arbeitsfertige Öl Rot O Lösung wurde stets frisch hergestellt; hierfür mischte man 9 ml der Stammlösung mit 6 ml destilliertem Wasser.

Für die Färbung wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und für 20 Min bei RT in PFA fixiert. Anschließend wurden die Zellen erst erneut mit PBS, dann mit destilliertem Wasser gewaschen und sehr vorsichtig kurz mit 60%iger Isopropanol-Lösung umspült. Dann wurde die Zellkulturplatte für 20 Min bei 37 °C vollständig getrocknet. Darauf wurden die Zellen für 10 Min bei RT gefärbt und die Färbelösung vorsichtig abgekippt. Für die Erstellung von Fotos mit dem Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss, Oberkochen) wurden die Zellen nun zwei Mal mit 60%igem Isopropanol gewaschen, dann mit destilliertem Wasser aufgefüllt und fotografiert.

2.3.2 Mikroskopische Auswertung

Für die mikroskopische Darstellung von 3T3-L1 Zellen benutzte ich ausdifferenzierte Adipozyten, die an den Tagen 0, 3, 7 und 10 geerntet und wie in 2.3.1 beschrieben gefärbt wurden. Mit einem AxioObserver.Z1 mit ApoTome.2 Modul (Carl Zeiss, Oberkochen) wurden Schnittbildaufnahmen der unterschiedlichen Proben erstellt. Die Quantifizierung des Lipidgehalts war mit dieser Methode nicht möglich, da dafür immer nur kleine festgelegte Bereiche fotografiert und analysiert werden konnten. Tatsächlich war die Verteilung von ausdifferenzierten Adipozyten jedoch nicht gleichmäßig. Werden nur Teile der Probe und nicht die gesamte Kulturschale ausgewertet, führt dies zu einem systematischen Fehler.

2.3.3 Optimierung der Methode zur Quantifizierung des Lipidgehaltes via photospektrometrischer Messung

Nach der histologischen Färbung sollten die Löcher der Zellkulturplatte nach dem Waschen mit Isopropanol mit destilliertem Wasser gefüllt werden, um die gefärbten Zellen mikroskopisch auswerten zu können. Allerdings verblieb durch diesen Vorgang stets ein großer Anteil Pigment an der Platte selbst haften, sodass erstens störende Flocken zu sehen waren und zweitens bei der Quantifizierung so viel überschüssiges Pigment gelöst wurde, dass – trotz optisch beachtlich erhöhter Menge Lipid – der relative Unterschied zwischen den Proben und der Kontrolle sehr gering ausfiel. Ziel der Optimierung war es, die Menge an unspezifisch haftendem Pigment auf ein Minimum zu reduzieren und den Wert der Leerprobe für die photospektrometrische Messung zu reduzieren.

Dies wurde durch die Verwendung von Propylenglykol erreicht. Es hat hydrophile und lipophobe Eigenschaften und lässt sich daher gut mit Wasser mischen, ohne die Pigmente aus den Vakuolen auszuschwemmen. So wurde nach der Färbung die überschüssige Öl Rot O Lösung verworfen, die Proben mit 60%igem Isopropanol umspült und die Mulden der Lochplatte mit Propylenglykol aufgefüllt. Durch Schwenken der Platte und Verwenden einer Verdünnungsreihe mit Wasser zum Waschen war es möglich, die Pigmente von der Oberfläche der Kulturplatte adäquat abzulösen, ohne die Pigmente in den Fettvakuolen herauszulösen. Die anschließenden Fotos am Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss, Oberkochen) konnten in Wasser gemacht werden.

Für die photospektrometrische Messung im *Typhoon Plate Reader* (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) wurde das Wasser abgenommen und die Platten bei 37 °C für 20 Minuten im Inkubatorschüttler (Gerhardt, Königswinter) getrocknet. Anschließend wurde das Pigment mit 100 % Isopropanol herausgelöst (500 µl pro Probe bei einer 6-Loch-Platte). Von dieser Lösung wurden 50 µl ad 200 µl Wasser in eine 96-Loch-Platte pipettiert und anschließend bei 569 nm im *ELISA Plate Reader* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) gemessen. Um Schwankungen in der Zellzahl auszugleichen, wurde auf die Proteinmenge normalisiert (siehe 2.3.4).

2.3.4 Optimierung der Methode zur Quantifizierung des Proteingehaltes in PFA-fixierten Zellen

Das Standardprotokoll für die Proteinbestimmung von Proben beruhte auf der Methode nach Bradford [113]: Dafür werden die Zellen zunächst durch Zugabe einer 0,1 N NaOH lysiert. Anschließend werden 10 µl dieser Probe zu 200 µl Bradford-Reagenz (Bio-Rad Laboratories, München, 1:5 verdünnt) in eine 96-Loch-Platte gegeben. Als Standard wurde

eine Standard-Konzentrations-Reihe mit festgelegten Proteinmengen (BSA) in Wasser verwendet. Die photospektrometrische Auswertung erfolgt bei 595 nm im *ELISA Plate Reader*.

Diese Methode erwies sich für uns als unbrauchbar, da die Zellen in PFA fixiert waren und sich Proteinpräzipitate bildeten. Dadurch war die Probe nicht auswertbar. Eine Versuchsreihe mit vorangehendem Lysieren der fixierten Zellen in 0,1% Triton X-100 war erfolglos, da diese Lösung eine zu hohe Eigenabsorption im *Plate Reader* zeigte.

In einem neuen Ansatz wurde versucht, durch Hitzeeinwirkung die durch Formaldehyd entstandenen Vernetzungen zwischen den Zellen aufzubrechen. Als Detergenz wurden anfänglich verschiedene Substanzen getestet: 1. PBS, 2. Tris (50 mM), 3. NaOH (0,1 N). Diese Substanzen (1,5 ml) wurden in einem Versuch auf fixierte Zellen gegeben, aus denen das Fett vorher herausgelöst wurde. Als Kontrolle dienten unfixierte Zellen. Die Platten wurden anschließend mit Parafilm abgedichtet und für vier Stunden auf 65 °C erhitzt. Gegebenenfalls entwichene Flüssigkeit wurde durch Auffüllen mit der jeweiligen Lösung wieder ad 500 µl aufgefüllt. Nach dem Hinzufügen von jeweils 500 µl Wasser pro Loch wurden die Zellen vom Grund der Kulturplatte abgekratzt und in neue Versuchsgefäße überführt, um anschließend im Wasserbad (Bandelin, Berlin) für fünf Minuten durch Ultraschall zerschert und danach zentrifugiert zu werden (3000 rpm, 2 Min). Als Kontrolle dienten hier nicht ultraschallbehandelte Proben. Anschließend wurden von jedem Versuchsansatz (unfixiert / kein Ultraschall, fixiert / kein Ultraschall, unfixiert / Ultraschall, fixiert / Ultraschall) jeweils 50, 100 und 150 µl des Proteinlysats in der jeweiligen Substanz in eine 96-Loch-Platte pipettiert und der Proteingehalt mit Hilfe der Methode nach Bradford bestimmt. Die photospektrometrische Auswertung erfolgte bei 595 nm im *ELISA Plate Reader*.

Tabelle 2.4: Durchschnittliche Absorptionen bei der Optimierung der Messung des Proteingehalts fixierter Zellen (n = 3).

		unfixiert	fixiert			unfixiert	fixiert
50 µl	kein Ultra- schall	1,002	0,562	Ultra- schall	1,055	1,057	
100 µl		1,238	0,865		1,257	1,269	
150 µl		1,363	1,061		1,418	1,408	

In folgenden Experimenten konnte mit Hilfe einer Standardreihe mit BSA gezeigt werden, dass sogar geringere Proteinmengen ausgewertet werden konnten. So wurden fortan 500 µl

NaOH pro Probe zum Lysieren benutzt und nur 10 μ l (ad 200 μ l Wasser) davon für die Proteinbestimmung nach Bradford verwendet.

Mit der Kombination der optimierten Protokolle für die Lipidquantifizierung und Proteinbestimmung wurde im optimierten 21-tägigen Versuch mit Adipozyten eine starke Erhöhung des Öl Rot O Gehaltes festgestellt. Relativiert auf den Proteingehalt konnten wir repräsentative Ergebnisse feststellen (Abbildung 4). Allerdings stellte sich diese Methode als sehr aufwändig dar, weshalb langfristig auf die Fluoreszenzmessung mit Hilfe des Phosphorimagers zurückgegriffen wurde (siehe 2.3.5), nachdem die Fluoreszenz von Öl Rot O mit dem Modul ApoTome.2 (Carl Zeiss, Oberkochen) festgestellt war. Diese Methode wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit in unserem Labor etabliert und wird von der Arbeitsgruppe fortan als Standardmethode bei der Analyse des Lipidgehalts mittels Öl Rot O Färbung benutzt.

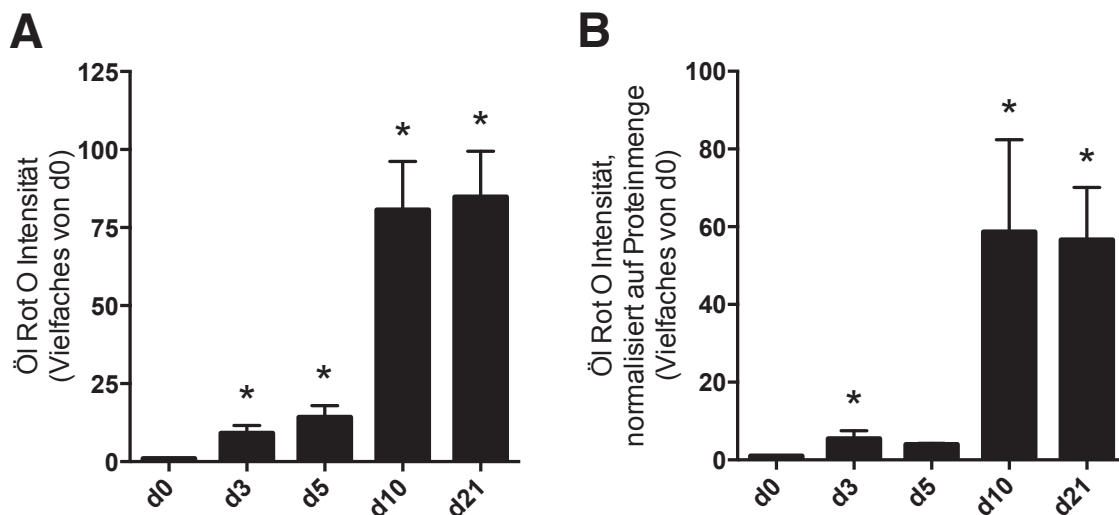


Abbildung 4: Öl Rot O Intensität in unstimulierten, differenzierten 3T3-L1 Zellen im Optimierungsversuch. A, Intensitäten von Öl Rot O normalisiert zu d0 bei 569 nm, B, korrigiert auf die Proteinmenge gemessen bei 595 nm. n = 3, Mittelwerte \pm SEM dargestellt. *, $p < 0,05$ im Vergleich zu d0.

2.3.5 Fluoreszenzmessung

Um die akkumulierte Lipidmenge zu quantifizieren, wurden die Lochplatten wie in 2.3.1 gefärbt, gewaschen und in 1 ml destilliertem Wasser pro Loch mit Hilfe des Phosphorimagers gescannt. Die Eigenfluoreszenz des Öl Rot O Farbstoffs wurde bei hoher Intensität mit dem roten Laser bei einer Exzitation von 633 nm und einer Emission von 670 nm gemessen mit dem Typhoon Phosphorimager (GE Healthcare, Uppsala, Schweden).

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Proteinexpressionsanalyse (Western Blot)

Um die Proteinexpression von Zielproteinen in 3T3-L1 Zellen zu analysieren, wurde eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot durchgeführt. Die Zellen wurden dafür mit PBS gewaschen und in Laemmli-Puffer lysiert [114]. Dieser wurde dazu stets frisch zubereitet, indem man die Stammlösung mit Wasser verdünnt und mit DTT versetzt. Danach wurden die Proben mit der Ultraschalltauchsonde (Sonifier B-12, Branson Sonic Power Company, Danbury, CT, USA) behandelt und anschließend zentrifugiert (5 Min bei 13000 rpm). Zur Denaturierung der Proteine wurden sie nun für fünf Minuten bei 96 °C inkubiert. Anschließend wurden 20 µl Probe pro Tasche eines Polyacrylamid-Gels (5%iges Sammelgel, 10%iges Trenngel) aufgeladen. Es wurde stets ein Molekulargewichtsmarker (*Prestained Protein Ladder*, Fermentas, St. Leon-Roth) pro Gel mit aufgetragen.

Die Auftrennung erfolgte in der Elektrophoresekammer 60 - 90 Min bei 120 - 160 Volt. Nach dem Durchlaufen wurden die Gele abgelöst und mit Hilfe einer *Semi-Dry*-Apparatur bei 15 Volt für eine Stunde auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Die Membranen wurden anschließend entweder für vier Stunden bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit TBS/T plus 5% Milch geblockt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.

Nach dem Waschen in TBS/T plus 0,05 % Natriumazid wurden die Membranen für eine Stunde mit dem Primärantikörper mit einer Konzentration von 1:200 - 1:500 inkubiert und die ungebundenen Antikörper danach drei Mal für fünf Minuten mit PBS abgewaschen. Die Sekundärantikörper, gekoppelt mit Infrarotfarbstoffen, wurden darauf in einer Konzentration von 1:4000 eingesetzt und die Membranen ebenfalls für eine Stunde inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Membranen in TBS/T + Azid bei 4 °C aufbewahrt und mit Hilfe des Odyssey Infrared Imaging Systems (application software version 3.0, Li-Cor, Bad Homburg) gescannt und ausgewertet. Die gemessenen Intensitäten wurden dabei auf ein nicht-reguliertes *Housekeeping*-Protein (β -Tubulin oder β -Actin) korrigiert, um auf die geladene Proteinmenge zu normalisieren.

Um ein zweites Signal auf gleicher Laufhöhe detektieren zu können, wurden die Antikörper durch 15-minütige Inkubation mit 0,1 N NaOH von den Membranen abgelöst, erneut in Milch blockiert und wie oben beschrieben nochmals mit Primär- und Sekundärantikörper inkubiert.

Tabelle 2.5: Verwendete Puffer und Lösungen in der Proteinanalyse

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
10x Laufpuffer	250 mM Tris 1,9 mM Glycin 1% SDS
2x Auftragspuffer	125 mM tris pH 6,8 4% SDS 10% Glyzerol 0,006% Bromophenol Blau 100 mM DTT
Laemmli-Puffer (4x)	125 mM Tris / HCl pH 6,8 (12,5 ml) 4% SDS (4g) 150 mM DTT (5ml Lösung, 4 ml Aqua dest., 1 ml DTT) 35% Glyzerol (15g) 0,02% Bromophenolblau ad 50ml bidest. H ₂ O
Sammelgel (5%)	0,5 M Tris / HCl pH 6,8 (0,625 ml) 10% SDS (50 µl) H ₂ O (3,895 ml) 40% Acrylamid / Bis-acrylamid 37,5:1 (375 µl) TEMED (5 µl) APS 10% - 0,1g/ml (50 µl)
Trenngel (10%)	3 M Tris / HCl pH 8,7 (0,975 ml) 10 % SDS (75 µl) dH ₂ O (4,545 ml) 40% Acrylamid / Bis-acrylamid 37,5:1 (1,875 ml) TEMED (5 µl) APS 10% - 0,1g/ml (25 µl)
1x Transferpuffer	1x Laufpuffer 20% Methanol 0,01% SDS
10x TBS	100 mM Tris / HCl 1,5 mM NaCl pH 7,4
1x TBS/T	1x TBS 0,1% Tween 20
Blockierlösung	1x TBS/T 5% Milchpulver

Tabelle 2.6: Verwendete Sekundärantikörper bei der Proteinanalyse

Antikörper	Katalog-nummer	Hersteller	Eingesetzte Konzentration
goat anti-mouse rot, IRDye 680 LT	926-68020	LI-COR, Lincoln, NE, USA	1:4000
goat anti-mouse grün, IRDye 800 CW	926-32210	LI-COR	1:4000
goat anti-rabbit rot, IRDy 680 RD	926-68071	LI-COR	1:4000
goat anti-rabbit grün IRDye 800 CW	926-32211	LI-COR	1:4000

Tabelle 2.7: Verwendete Primärantikörper bei der Proteinanalyse.

Antikörper	Katalognummer	Hersteller	Eingesetzte Konzentration
PAR-1	sc-8204	Santa Cruz, Heidelberg	1:500
PAR-2	sc-13504	Santa Cruz	1:500
PAR-4	sc-1666	Santa Cruz	1:500
mouse anti-phospho-Akt	4051S	Cell Signaling Danvers, MA, USA	1:100
mouse-anti Akt	5239S	Cell Signaling	1:100
rabbit anti-Akt	9272S	Cell Signaling	1:100
rabbit anti-phospho-ERK1/2	9101L	Cell Signaling	1:100
rabbit anti-ERK1/2	9102	Cell Signaling	1:100
rabbit anti-phospho-p38	9211S	Cell Signaling	1:100
rabbit anti-p38	9212S	Cell Signaling	1:100
rabbit anti-phospho-AMPK	2531S	Cell Signaling	1:100
rabbit anti-AMPK	2532S	Cell Signaling	1:100
rabbit anti-PARP	9542	Cell Signaling	1:100
huhn anti-FUCHS	0815	Düsseldorf Inc.	1:100
mouse anti- β -Tubulin Typ I	T7816	Sigma-Aldrich	1:10.000
mouse anti- β -Actin	A5316	Sigma-Aldrich	1:10.000

2.4.2 HA-Bindeprotein Sandwich ELISA-ähnlicher Assay

Die Aussaat der Zellen erfolgte bei einer Dichte von 20.000 Zellen pro Kammer einer 6-Loch Kulturplatte. Nach einer 24-stündigen Wachstumszeit wurde der Zellüberstand abgenommen, um die Menge an sezernierter Hyaluronsäure zu messen. Das Medium wurde mittels HA-Assay gemäß der Herstelleranweisung (*Hyaluronic Acid Test Kit*, Corgenix, Broomfield, CO, USA) analysiert. Dafür wurde auf der 96-Lochplatte zunächst eine Eichreihe mit verschiedenen Hyaluronsäurekonzentrationen erstellt: 0, 50, 100, 200, 500, 800 ng/ml. Für die Messung wurden die Zellüberstände im Verhältnis 1:50 mit destilliertem Wasser verdünnt und die jeweiligen Absorptionen bei 450 nm im *ELISA Plate Reader* gemessen. Die gemessene Hyaluronsäure-Menge wurde auf die Proteinmenge in Mikrogramm korreliert. Die Proteinmessung erfolgte nach Bradford (siehe 2.3.4).

2.4.3 Triglyzerid Assay (Kit)

Zur Feststellung der angereicherten Fettmenge wurden die Präadipozyten (20.000 Zellen / Kammer bei einer 6-Loch-Platte) ausgesät, mit dem Differenzierungsmedium behandelt und zu festgelegten Zeitpunkten geerntet. Anschließend wurden die Zellen nach Herstellerangaben (*Triglyceride Quantification Kit*, #K622-100, BioVision, CA, USA) aufbereitet. Für die Erstellung einer Standardkurve wurde eine Eichreihe von 0, 2, 4, 6, 8 und 10 nmol TG / Kammer einer 96-Loch-Platte erstellt. Gemessen wurde die Absorption bei 569 nm im *Microplate Reader* (Multiscan FC, Thermo Fisher Scientific).

2.5 Molekularbiologische Techniken

2.5.1 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Um Veränderungen in der Genexpression der Zellen zu analysieren, musste zunächst die RNA isoliert werden. Dafür wurden die Zellen in Trizol (PeqGOLD Trifast™, Peqlab Biotechnologie, Erlangen) aufgenommen, für 15 Min lysiert, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert. Für die Weiterverarbeitung wurde nach dem Auftauen 200 µl Chloroform pro Gefäß hinzugefügt, geschüttelt und zur Fällung für 10 Min bei RT inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (4 °C, 30 Min, 13000 rpm) wurde die wässrige Oberphase abgenommen und zu gleichen Teilen in Isopropanol überführt und zur Fällung bei 4 °C bis zu 24 h inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren (4° C, 30 Min, 13000 rpm) wurde der Überstand abgekippt, die Proben mit 75%igem Ethanol gewaschen und nochmals zentrifugiert (4° C, 15 Min, 13000 rpm). Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet getrocknet und anschließend in 20 µl RNase-freiem Reinstwasser (Milli,Q, Merck Millipore, Darmstadt) resuspendiert. Um das Pellet zu lösen, wurden die Proben für 10 Min bei 65 °C geschüttelt. Die Lagerung erfolgte bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C.

Für die Messung der RNA-Konzentration wurde das NanoDrop 1000 Spektrophotometer (Thermo Scientific, Waltham) verwendet. Es wurde nur solche RNA weiterverarbeitet, deren 260/280 nm Absorptionsverhältnis (Maß für die RNA-Reinheit) zwischen 1,8 - 2 und 260/230 nm Absorptionsverhältnis (Maß für Proteinverunreinigungen) ca. 2 betrug. Pro Probe wurden 1500 ng RNA mit 14 µl Reinstwasser aufgefüllt und mit 6 µl Mastermix (Reverse Transkriptase Set, Qiagen, Hilden) vermischt. Die cDNA-Synthese erfolgte nach Protokoll des Herstellers (10 Min 25 °C, 120 Min 37 °C, 5 Min 85 °C, Lagerung bei 4 °C).

2.5.2 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Die Quantifizierung mittels qPCR beruht auf emittierten Fluoreszenzsignalen, deren Intensität proportional zur der Menge der Doppelstränge im Ansatz sind. Sie erfolgte mit Hilfe des QuantiTect SYBR Green PCR Kits (Qiagen, Hilden) am Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Fostercity, CA, USA). Die Primer wurden alle von Qiagen bezogen. Es wurden stets Duplikate gemessen. Um eine relative Quantifizierung zu ermöglichen, diente als endogene Kontrolle 18S ribosomale RNA (18S). Am Ende der PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Spezifität des Primers zu testen. Die Auswertung erfolgte mittels der $\Delta\Delta CT$ -Methode [115]. Als Software diente dabei die 7300 Real-Time PCR System RQ Study Software Version 1.4 und Microsoft Excel 2011.

Tabelle 2.8: Verwendete Primer in der Genanalyse

Gen	Katalognummer	Gen	Katalognummer
<i>Leptin</i>	QT00164360	<i>Ppary</i>	QT00100296
<i>Par1</i>	QT00119812	<i>18S</i>	QT02448075
<i>Par2</i>	QT02255330	<i>Par4</i>	QT00252168
<i>Mcp1</i>	QT00157864	<i>Cd44</i>	QT00173404
<i>Ki67</i>	QT00247667	<i>Birc3</i>	QT00091609
<i>Il6</i>	QT00098875	<i>Tnfa</i>	QT00104006
<i>Tlr2</i>	QT00129752	<i>Tlr4</i>	QT00259042
<i>Hyal1</i>	QT00171094	<i>Hyal2</i>	QT00112105
<i>Has1</i>	QT00156254	<i>Has2</i>	QT00108934
<i>Has3</i>	QT00127769	<i>Rhamm</i>	QT00127505
<i>Lyve</i>	QT001558907		

2.6 Statistik

Die Daten dieser Arbeit sind aufgeführt als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus n unabhängigen Einzelexperimenten. In den in dieser Arbeit durchgeführten Zellkultur-Versuchen wurden die Werte als Vielfaches einer Kontrolle mit konstantem Wert dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde das Programm GraphPad Prism Version 6.02 (La Jolla, CA, USA) genutzt. Zwei parametrische Datensätze wurden mit dem

ungepaarten *Student's t-test* verglichen, bei dem Vergleich mit einer normalisierten Kontrolle mit dem *Mann-Whitney-Test* für nicht-parametrische Datensätze. Bei mehr als zwei Bedingungen wurden die Daten mittels nicht-parametrischen *Kruskal-Wallis One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) mit anschließendem *Dunnet's multiple comparison post-hoc test* analysiert. Ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 In vitro Modell der Adipogenese in 3T3-L1 Zellen

Um die Veränderung während der frühen Phasen der Adipogenese in 3T3-L1 Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen wie beschrieben ausdifferenziert. Unter dem Lichtmikroskop konnte man nach erfolgter Öl Rot O Färbung eine Pigmentakkumulation in den entstandenen Fettvakuolen sehen (Abbildung 5). An Tag 0 befinden sich nur undifferenzierte, fibroblastenartige Präadipozyten in der Zellkulturschale, allerdings sieht man dort am Boden haftende Pigmente. Diese verursachten in fortführenden Experimenten eine hohe Hintergrundaktivität, weshalb ich für eine korrekte Auswertung eine neue Methode entwickelte (siehe Optimierung der Methode zur Quantifizierung des Lipidgehaltes und Fluoreszenzmessung). Außerdem nahm die Intensität der Färbung bis Tag 7 zu. Danach befanden sich aber weniger zu färbende Adipozyten auf der Platte, was wir auch auf Proteinebene feststellen konnten (siehe Optimierung der Methode zur Quantifizierung des Proteingehaltes in PFA-fixierten Zellen). Die Zellen lösten sich durch die rundliche Hypertrophie vom Boden der Schale ab und schwammen an die Oberfläche. Beim Mediumwechsel gingen somit stets gut ausgereifte Adipozyten verloren. Folglich wurde ein Großteil der Untersuchungen an den Zellen nur bis Tag 7 durchgeführt.

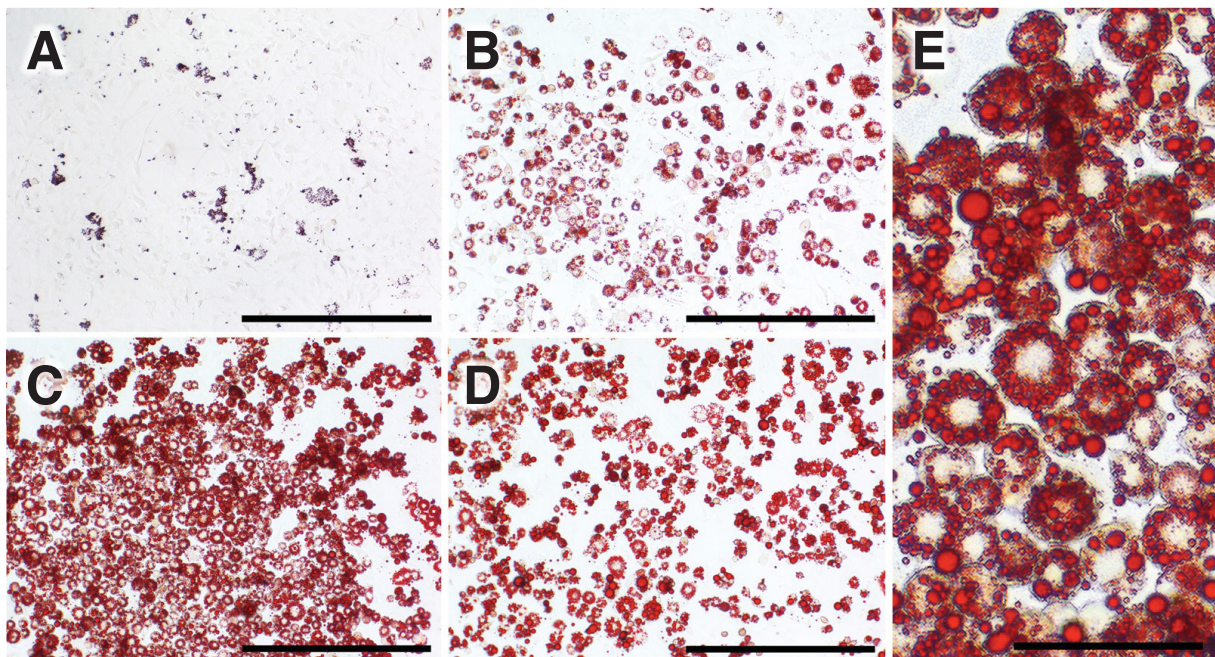


Abbildung 5: Öl Rot O Färbung von 3T3-L1 Zellen unter dem Lichtmikroskop. 3T3-L1 Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Induktion der Differenzierung in PFA fixiert und mit Öl Rot O Lösung histologisch gefärbt. A, d0. B, d3. C, d7. D, d10. Maßstabbalken in A, B, C, D entsprechen 400 μm , in E (d7 vergrößert) entspricht der Maßstabbalken 76 μm .

Für die Quantifizierung der akkumulierten Lipidmenge wurden die Zellen zunächst histologisch mit Öl Rot O gefärbt und anschließend mit einem Phosphorimager eingescannt (Abbildung 6A). In der quantitativen Analyse der Fluoreszenz-Intensität ergab sich ein Verlauf, der sich mit der optisch histologischen Auswertung deckte: Eine hohe Intensität war an Tag 7 nach Beginn der Differenzierung festzustellen (Abbildung 6B). Es gab mit dem steigenden Reifungsgrad der Adipozyten zwar einen Anstieg, doch variierte das Differenzierungspotenzial und das Ablöseverhalten vom Boden der Kulturschale zwischen den einzelnen Passagen sehr. Daher wurden in weiteren Experimenten die Zellen nur bis zum Tag 7 der Differenzierung analysiert.

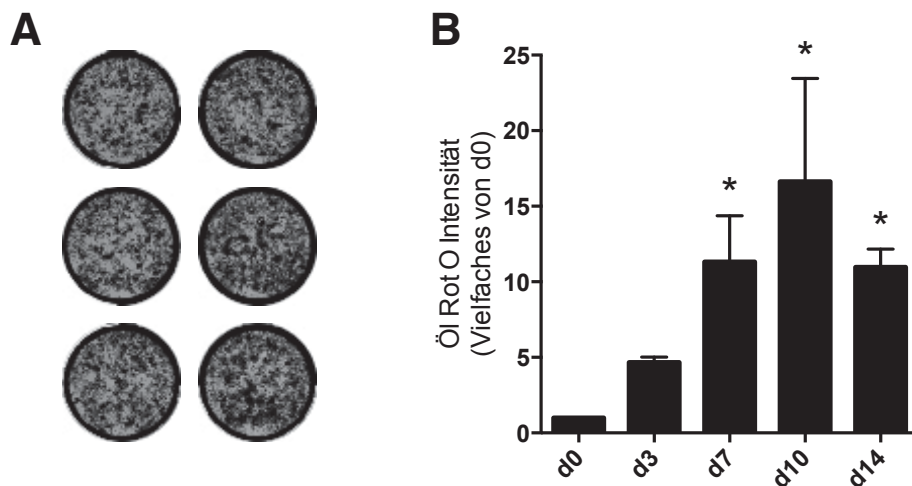


Abbildung 6: Analyse von Öl Rot O-gefärbten 3T3-L1 Zellen mit dem Phosphorimager. 3T3-L1 Zellen wurden 14 Tage nach Induktion der Differenzierung in PFA fixiert, mit Öl Rot O gefärbt und mit dem Phosphorimager gescannt. A, repräsentatives Abbild der Proben eines Scans an Tag 14. B, quantitative Auswertung, n = 3-11. Mittelwerte \pm SEM dargestellt. *, $p < 0,05$ im Vergleich zu d0.

Die Quantifizierung des Lipidgehalts mittels Triglyzerid-Assay ergab im Zeitverlauf zwischen Tag 0 und Tag 7 der Differenzierung ebenfalls eine kontinuierlich zunehmende Lipidmenge (Abbildung 7). So konnte beobachtet werden, dass der Fettgehalt 10 Tage nach Differenzierung (0,74 mM) etwa doppelt so hoch war wie in unbehandelten Präadipozyten (0,32 mM).

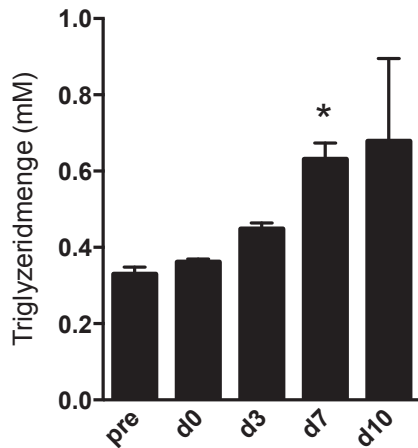


Abbildung 7: Triglycerid-Gehalt von Präadipozyten und differenzierenden 3T3-L1 Zellen. Die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor bzw. nach Induktion der Differenzierung für den Triglycerid-Assay aufbereitet und die Absorption bei 569 nm gemessen, $n = 3-7$. Mittelwerte \pm SEM dargestellt. *, $p < 0,05$ im Vergleich zu Präadipozyten (pre).

Um die Adipogenese der Präadipozyten in dem Differenzierungsmodell auch auf mRNA-Ebene zu verifizieren, wurde die Expression der Gene *Leptin* und *Ppar γ* untersucht (Abbildung 8). Die *Leptin*-Expression nahm innerhalb von 14 Tagen stark zu, die Menge an exprimiertem *Ppar γ* zeigte ein Maximum an Tag 7.

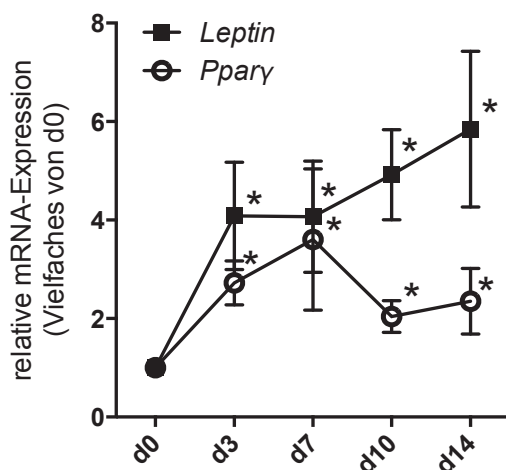


Abbildung 8: Genexpression von *Leptin* und *Ppar γ* in der qPCR in reifenden 3T3-L1 Zellen. Die Zellen wurden 0, 3, 7, 10 bzw 14 Tage nach Induktion der Differenzierung für eine Genanalyse mittels qPCR aufbereitet, $n = 5$. Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

3.2 Regulation der PAR-Expression während der 3T3-L1 Reifung

Die Expression der PARs in 3T3-L1 Zellen während der Adipogenese wurde durch Realtime-PCR und Western Blot analysiert. Bislang wurde *Par2* in murinen und PAR-4 in humanen Adipozyten beschrieben [101, 104]. PAR-1 hingegen konnte auf humanen Adipozyten nicht detektiert werden [116]. Die Expression der PARs auf murinen 3T3-L1 wurde nun erstmals untersucht.

Dafür wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten für eine mRNA-Analyse aufbereitet und alle drei Rezeptor-Subtypen untersucht. Dabei beobachtete ich, dass im fortschreitenden Reifungsprozess die Gene *Par2* und *Par4* vermehrt exprimiert wurden (Abbildung 9A). *Par1* blieb während der Reifung weitgehend unbeeinflusst. Diese Beobachtung konnte auf Proteinebene mittels Western Blot verifiziert werden (Abbildung 9B-D).

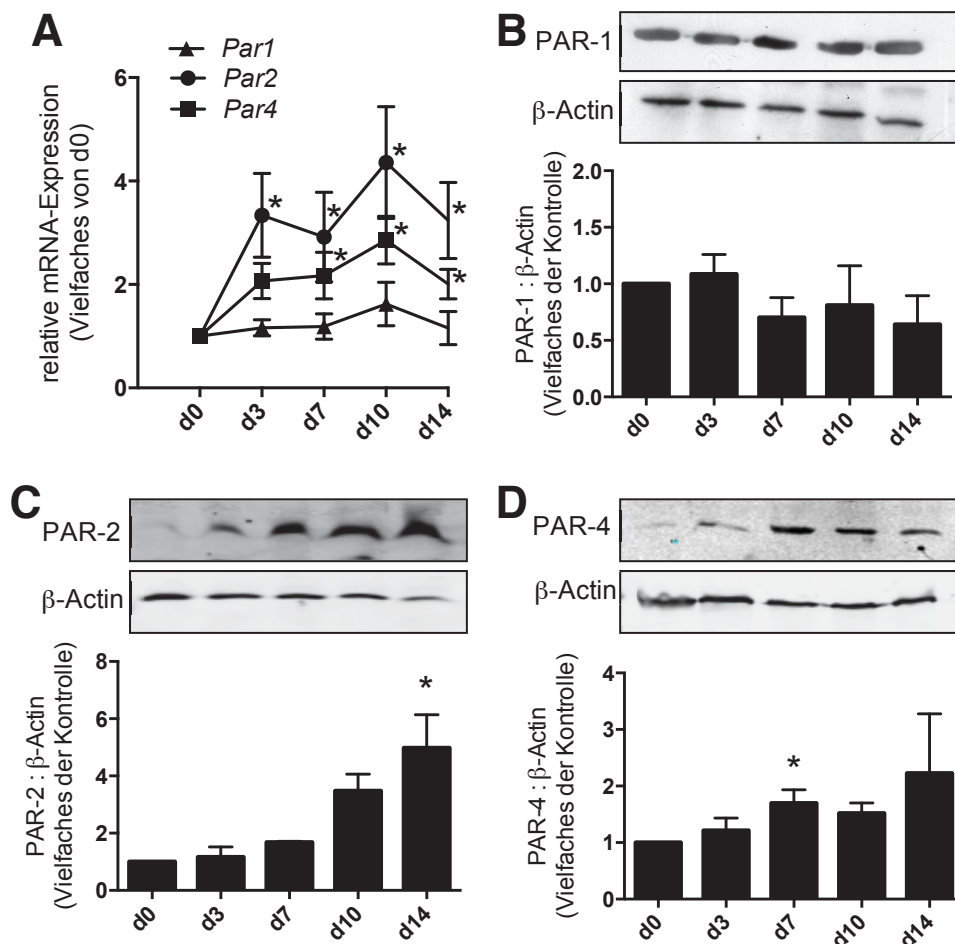


Abbildung 9: Analyse der PAR-Expression während der 3T3-L1 Reifung auf mRNA- und Proteinebene. Die Zellen wurden 0, 3, 7, 10 bzw. 14 Tage nach Induktion der Differenzierung aufgearbeitet und A, eine Genanalyse mittels qPCR durchgeführt (n = 7-8) wie B-D, Western Blots durchgeführt (B, C, n = 3. D, n = 6). Mittelwerte ± SEM dargestellt. *, p < 0,05 im Vergleich zu d0.

3.3 Einfluss von PAR-Aktivierung während der 3T3-L1 Differenzierung

Die Auswirkungen einer direkten PAR-2 Aktivierung während der Adipozytenreifung wurden bislang noch nicht beschrieben. Zuerst wurde der Einfluss einer PAR-Aktivierung in Präadipozyten untersucht. Stimulation mit PAR-2 AP führte hier zu einer gesteigerten Expression von *Leptin* und *Pparγ* (Abbildung 10A).

Das Ansprechen der sich im Reifungsprozess befindlichen 3T3-L1 auf eine selektive Aktivierung von PAR-2 wurde untersucht, indem sich differenzierende Zellen an Tag 7 aufbereitet wurden. In mit PAR-2 AP-behandelten Zellen konnte ich eine weitere Steigerung der durch die Differenzierung induzierten Expression der Adipozytenreifungsmarker gegenüber unstimulierten Kontrollzellen demonstrieren (Abbildung 10B). Dieser Nachweis der adipogenen Wirkung von PAR-2 Aktivierung deckt sich mit der in der Literatur beschriebenen Rolle des Rezeptors bei DIO [101], konnte hier aber erstmalig *in vitro* demonstriert werden.

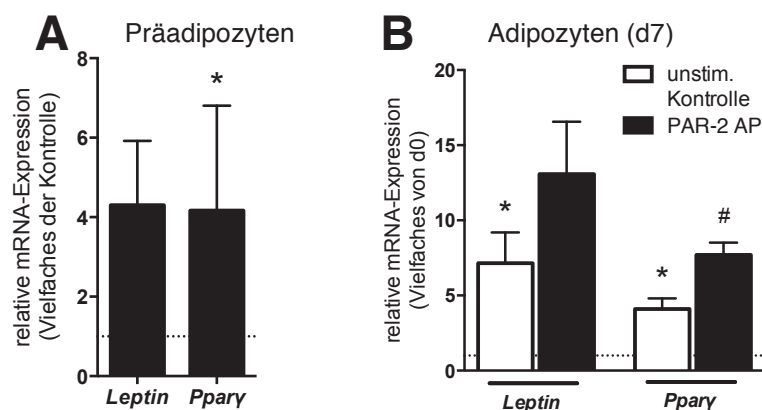


Abbildung 10: Einfluss von PAR-2 Aktivierung auf die Expression von *Leptin* und *Pparγ*. A, Genexpression in Präadipozyten nach Stimulation von PAR-2 (n = 5). B, Genexpression in Adipozyten (d7) nach Stimulation mit PAR-2 AP (n = 7-8). Mittelwerte \pm SEM dargestellt. *, p < 0,05 im Vgl. zu A, unstimulierter Kontrolle und B, d0, #, p < 0,05 im Vergleich zur unstimulierten gepaarten Kontrolle an d7.

Im Kontrast zu diesen Beobachtungen stand der Effekt der PAR-4 Stimulation. In Präadipozyten wurde die Expression von *Leptin* durch eine 24 h-Stimulation mit PAR-4 AP stark reduziert. *Pparγ* blieb weitgehend unbeeinflusst (Abbildung 11A). In reifen Adipozyten war die *Leptin*-Expression nach Stimulation mit PAR-4 AP signifikant gesenkt. Auch *Pparγ* wurde reduziert (Abbildung 11B). Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass eine Stimulation von PAR-4 eine andere Wirkung auf die Zellen ausübt als die des Adipogenese fördernden Rezeptors PAR-2. Dies galt es weiter zu untersuchen mit der Fragestellung, welchen Einfluss die PAR-4 Stimulation auf die Adipogenese hat.

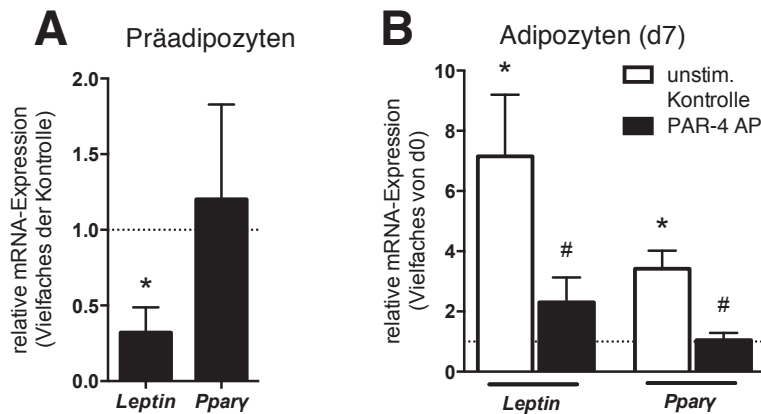


Abbildung 11: Einfluss von PAR-4 Aktivierung auf die Expression von *Leptin* und *Pparg*. A, Genexpression in Präadipozyten nach Stimulation von PAR-4 (n = 4-5). B, Genexpression in Adipozyten (d7) nach dauerhafter Stimulation mit PAR-4 AP (n = 6-8). Mittelwerte \pm SEM dargestellt. *, p < 0,05 im Vgl. zu A, unstimulierter Kontrolle und B, d0, #, p < 0,05 im Vergleich zur unstimulierten gepaarten Kontrolle an d7.

Für die Analyse der Lipidakkumulation wurden Präadipozyten ausdifferenziert, an Tag 3 und 7 mit der Öl Rot O Färbung gefärbt und die Intensität der Fluoreszenz ausgewertet. Die PAR-4 AP stimulierten Zellen zeigten eine gehemmte Fettakkumulation gegenüber der unstimulierten, gepaarten Kontrolle (Abbildung 12). In der Studie von Badeanlou *et al.* wurde die Beteiligung von PAR-2 bei der Entwicklung von Adipositas und den begleitenden metabolischen Erkrankungen beschrieben [101]. Der Befund, dass PAR-4 die Fettzellreifung zu unterdrücken scheint, ist hingegen neu. So legten wir den Fokus für weitere Experimente auf die mögliche Ursache für diese reduzierte Adipogenese und die Auswirkung dessen auf Signalkaskaden bei der Proteinbiosynthese und den Veränderungen in der Genexpression.

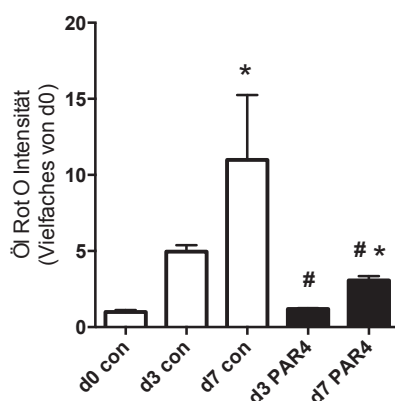


Abbildung 12: Quantitative Auswertung der Öl Rot O Färbung mittels Fluoreszenzanalyse im Phosphorimager. 3T3-L1 Zellen wurden 3 und 7 Tage nach Induktion der Differenzierung in PFA fixiert, mit Öl Rot O gefärbt und im Phosphorimager gescannt (d3, n = 3. d7, n = 7). Mittelwerte \pm SEM dargestellt. *, p < 0,05 im Vergleich zu d0, #, p < 0,05 zur gepaarten, unstimulierten Kontrolle.

3.4 Proliferation von PAR-stimulierten 3T3-L1

Da die Proliferation bis zum Wachstumsarrest vor Beginn der Ausreifung ein wichtiger Schritt ist, untersuchte ich den Effekt von PAR-Aktivierung auf die Proliferation der kultivierten Präadipozyten. Während der Adipogenese vermehren sich zunächst die vorhandenen Präadipozyten und gehen dann in einen Wachstumsarrest über, der für die nachfolgende Differenzierung notwendig ist. Infolgedessen beginnen sie, Lipide zu akkumulieren und Adipokine und freie Fettsäuren zu sezernieren [25-29].

Im Western Blot war infolge der Stimulierung mit PAR-4 AP ein 4,7-facher Anstieg der Phosphorylierung der mitogenen ERK1/2-Kinase zu beobachten, welcher jedoch nicht signifikant war (Abbildung 13A). Einen Hinweis auf einen proliferativen Effekt von PAR-4 AP sah ich bei der Analyse des Zellwachstums nach zwei bzw. drei Tagen; die normale Vermehrungsrate nach dem Aussähen wurde in Gegenwart des PAR-4 APs noch weiter verstärkt (Abbildung 13B). Diese Ergebnisse deckten sich auch mit den Resultaten einer mRNA Analyse. So zeigten reife Adipozyten sieben Tage nach Induktion der Adipogenese eine anhaltende Transkription der Proliferationsmarkers *Ki67* und des anti-apoptotischen *Birc3* (Abbildung 13C). Insgesamt scheint PAR-4 also die proliferativen Eigenschaften der Zellen aufrecht zu erhalten, was möglicherweise den Wachstums-Arrest und somit die Differenzierung verhindert. Dies könnte die verringerte Reifung von PAR-4 behandelten Zellen erklären.

Für die Analyse der intrazellulären Signaltransduktion wurden weitere für die Adipogenese und Insulinsensitivität bedeutsame Kinasen nach PAR-4 Stimulation untersucht. So zeigte die Akt-Kinase, deren erhöhte Phosphorylierung im Rahmen der Adipozytenreifung ein Hinweis auf eine Zunahme der Insulinsensitivität sein könnte [101], keine Veränderungen im Phosphorylierungs-Status (Abbildung 14A, Abbildung 15). Die Phosphorylierung der für die Lipogenese wichtigen Kinasen, Mitogen-aktivierte Proteinkinase p38 und der AMP-aktivierten Kinase (AMPK), änderte sich nicht signifikant (Abbildung 14B-C, Abbildung 15). Auch die ERK-Aktivierung blieb in Langzeitversuchen unbeeinflusst (Abbildung 15). Dies ist allerdings bei einer Kinase, die in sehr frühen Phasen der Adipogenese aktiviert ist [117], zu erwarten. Auf die Spaltung von PARP, ein Maß für die Zellapoptose, hatte die Stimulation ebenfalls keinen Einfluss (Daten nicht gezeigt).

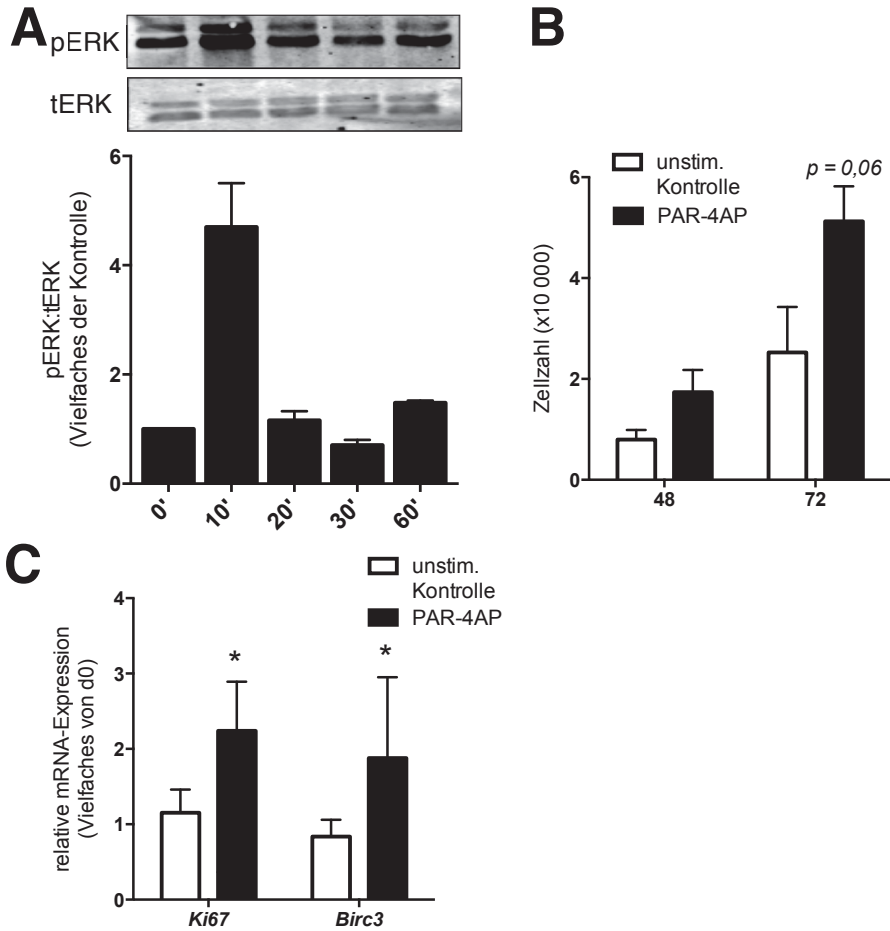


Abbildung 13: Proliferation von PAR-4-stimulierten Zellen. A, Proteinanalyse mittels Western Blot in Präadipozyten, die 10, 20, 30 bzw. 60 Minuten zuvor mit PAR-4 AP stimuliert wurden ($n = 3$). B, stimulierte Zellen wurden 48 h bzw. 72 h nach Aussaat gezählt ($n = 4$). C, die Zellen wurden an Tag 7 der Differenzierung geerntet und eine Genanalyse mittels qPCR durchgeführt ($n = 4-5$). Mittelwerte \pm SEM dargestellt. *, $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.

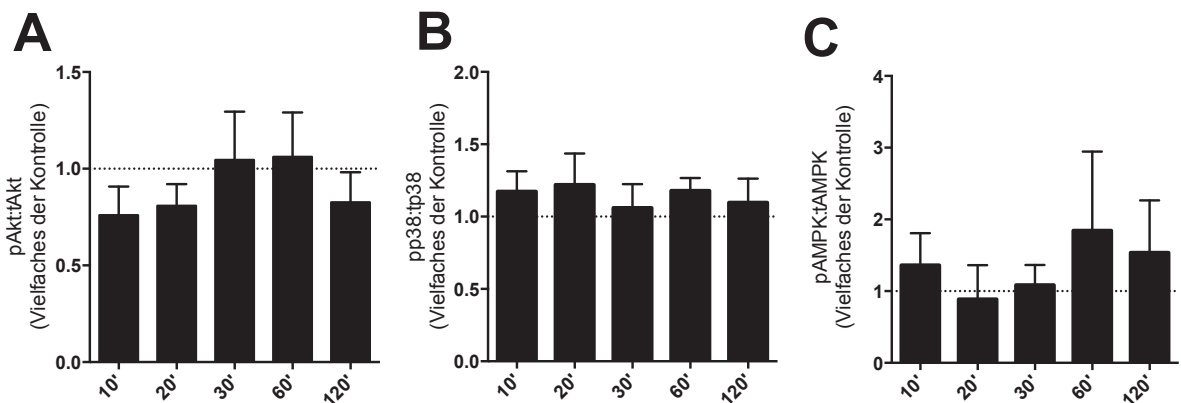


Abbildung 14: Effekt von PAR-4 AP auf die Proteinexpression. Proteinanalyse mittels Western Blot in Präadipozyten, die 10, 20, 30, 60 bzw. 120 Minuten zuvor mit PAR-4 AP stimuliert wurden (A, $n = 8$. B, $n = 9$. C, $n = 4$). Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

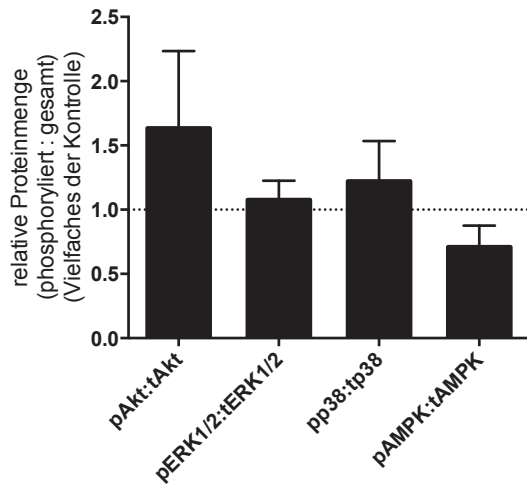


Abbildung 15: Effekt von PAR-4 AP auf die Proteinexpression. Proteinanalyse mittels Western Blot in Präadipozyten, die 24h zuvor mit PAR-4 AP stimuliert wurden (n = 4-5). Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

3.5 Inflammatorische Effekte in PAR-stimulierten 3T3-L1

3.5.1 Auswirkungen auf die Genexpression

Nun setzte ich die Präadipozyten einer 24-stündigen PAR-4 Stimulation aus und analysierte den Effekt auf die Expression von an Inflammation beteiligter Gene wie *Il6*, *Tnfa*, *Tlr2* und *Tlr4*. Diese Stimulation erhöhte signifikant die Transkription von *Tnfa*, das bei Präadipozyten in der Literatur in Zusammenhang mit einer zunehmenden Insulinresistenz steht (Abbildung 16) [118].

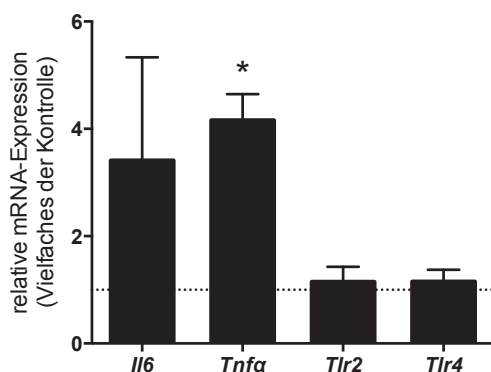


Abbildung 16: Genexpression inflammatorischer Gene bei PAR-4 stimulierten Präadipozyten im 24 Stunden Versuch. 3T3-L1 wurden über 24 Stunden hinweg vor der Analyse mittels qPCR mit PAR-4-AP stimuliert (n = 3). Mittelwerte \pm SEM dargestellt. *, $p < 0,05$ im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

Anschließend wurde der Einfluss der Adipogenese auf die inflammatorische Genexpression in unstimulierten und PAR-4 stimulierten 3T3-L1 untersucht. Die Translation von *Tlr4*, welcher u.a. durch freie Fettsäuren aktiviert wird [119], war an Tag 7 unter Kontrollbedingungen signifikant erhöht; die PAR-AP stimulierte Kontrolle zeigte im Vergleich eine signifikante Suppression von *Tlr4* (Abbildung 17).

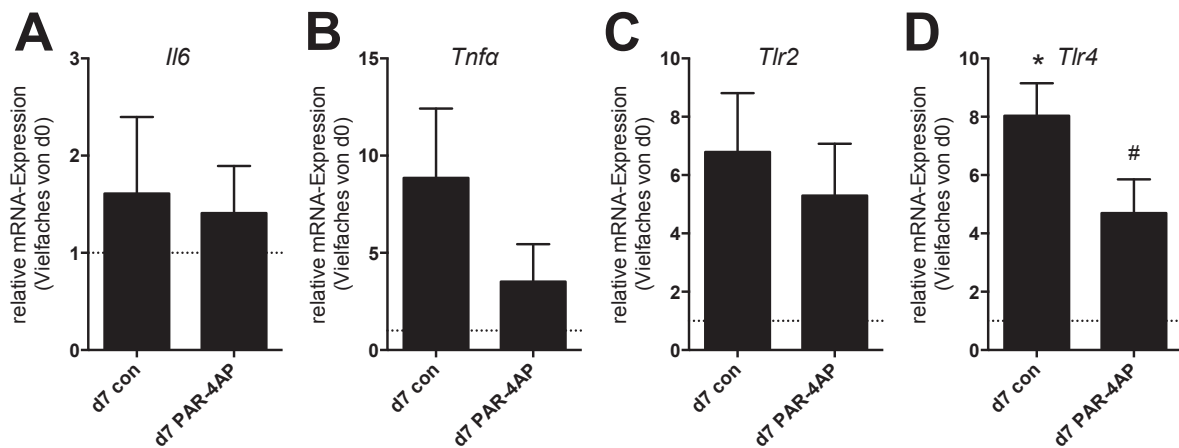


Abbildung 17: Genexpression inflammatorischer Gene unter PAR-4 Stimulation während der Differenzierung. 3T3-L1 wurden mit Differenzierungsmedium inkubiert und über 7 Tage mit PAR-4 AP stimuliert und anschließend mittels qPCR analysiert (n = 4). Mittelwerte \pm SEM dargestellt. *, p < 0,05 im Vergleich zu d0, #, p < 0,05 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

3.5.2 Einfluss auf die Monozytenadhäsion

Nun sollte untersucht werden, welche Auswirkungen die PAR-4 Stimulation auf die Interaktion der Präadipozyten und Adipozyten mit Monozyten hat. In unstimulierten Zellen findet man an Tag 7 im Vergleich zu Tag 0 eine Zunahme der *Mcp1*-Expression. Ich habe festgestellt, dass diese PAR-Aktivierung auf mRNA Ebene an Tag 7 die Expression des Zytokins nur leicht gegenüber der unstimulierten Kontrolle erhöht (Abbildung 18A). MCP-1 ist ein Chemokin für Monozyten [120] und löst *in vivo* eine Degranulation von Mastzellen aus [121]. Ein durchgeführter Monozyten-Adhäsions-Assay zeigte in Übereinstimmung mit der Literatur sowohl in PAR-4 AP stimulierten Präadipozyten als auch in Adipozyten an Tag 3 nach Induktion der Adipogenese keine veränderte Adhäsion von Monozyten (Abbildung 18B). Eine Induktion von *Mcp1*, so wie hier detektiert, scheint in diesem Experiment kein ausreichendes Signal für die Chemotaxis von Monozyten darzustellen.

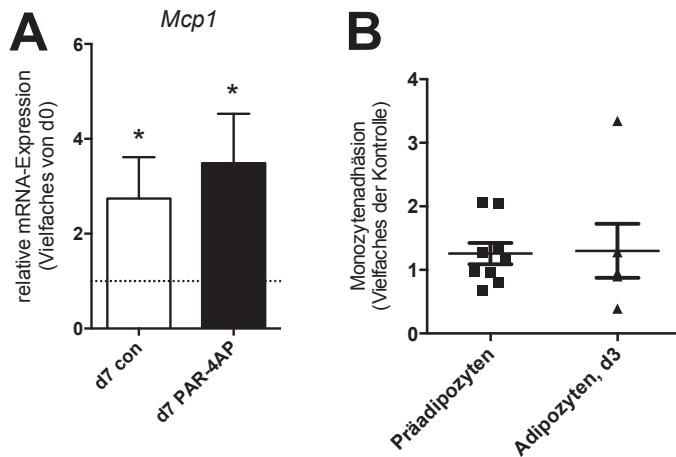


Abbildung 18: Einfluss von PAR-4 Stimulation auf die Monozytenadhäsion. A, 3T3-L1 wurden mit Differenzierungsmedium inkubiert, für sieben Tage mit PAR-4 AP stimuliert und anschließend mittels qPCR analysiert (n = 6). B, PAR4-AP stimulierte Präadipozyten (Stimulation für 24h, n = 9) und Adipozyten (stimuliert, Tag 3 nach Induktion der Differenzierung, n = 6) wurden dem Monozytenadhäsions-Assay unterzogen. Mittelwerte \pm SEM dargestellt. *, p < 0,05 im Vergleich zu A, d0, B, zur unstimulierten gepaarten Kontrolle.

3.6 Veränderungen der HA-Matrix von PAR-4 stimulierten 3T3-L1

Nun sollten die Veränderungen durch PAR-4 Stimulation auf die hyaluronsäurehaltige extrazelluläre Matrix untersucht werden. Dafür wurde zunächst der Überstand von differenzierenden 3T3-L1 Zellen abgenommen, nachdem sie für drei bzw. sieben Tage nach der Induktion der Adipogenese mit PAR-4 Peptid stimuliert wurden. Es zeigte sich kein Unterschied an sezernierter Hyaluronsäure zwischen den unstimulierten und stimulierten Zellen, weder an Tag 3 noch an Tag 7 (Abbildung 19).

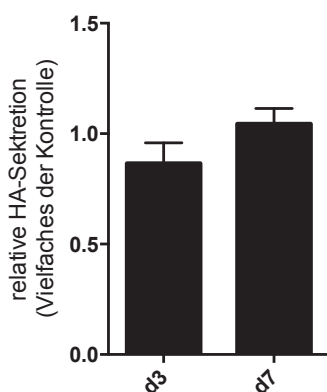


Abbildung 19: Hyaluronsäuresekretion in PAR-4 stimulierten Zellen. 3T3-L1 wurden mit Differenzierungsmedium inkubiert, mit PAR-4 AP stimuliert und der HA-Gehalt im Überstand an Tag 3 und 7 analysiert, jeweils 24h nach Mediumwechsel. (d0, n = 4. d7, n = 6). Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Vergleich zur gepaarten unstimulierten Kontrolle.

Die entsprechenden bedeutsamen Gene, welche im Zusammenhang mit Hyaluronsäure bei der Zusammensetzung der EZM eine Rolle spielen, wurden ebenfalls untersucht. Es fand sich nach 7-tägiger Stimulation sowohl im Vergleich zu Tag 0 als auch zur unstimulierten Kontrolle kein relevanter Effekt auf die Expression der mRNA von 1. den HA-Synthasen *Has1*, *Has2* und *Has3*, 2. den HA-Rezeptoren *Lyve*, *Cd44* und *Rhmm*, und 3. den Hyaluronidasen *Hyal1* und *Hyal2* (Abbildung 20).

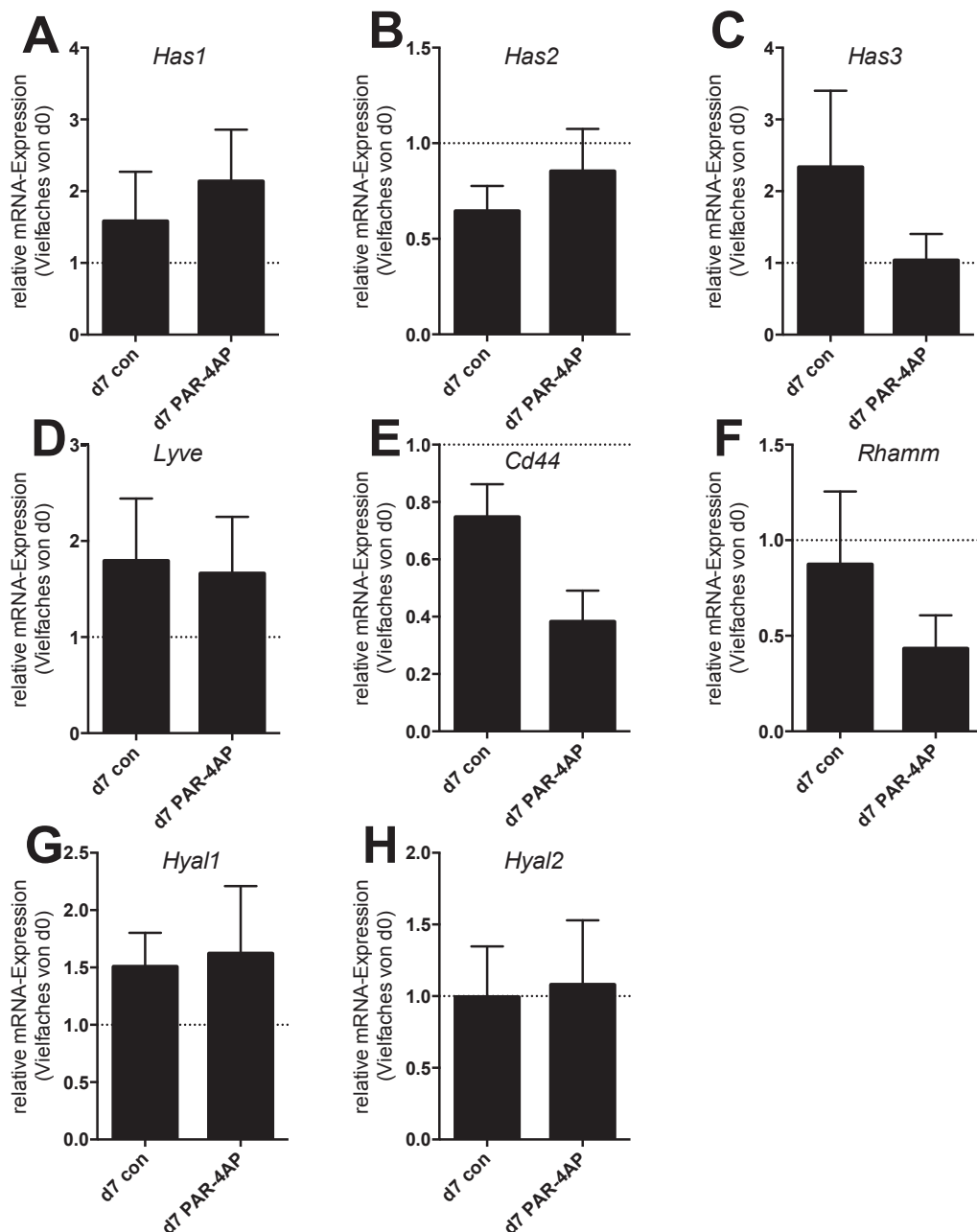


Abbildung 20: Einfluss von PAR-4 Stimulation auf die HA-Matrix. 3T3-L1 Zellen wurden mit Differenzierungsmedium behandelt und an Tag 7 der Adipogenese auf mRNA Ebene für die Gene *Has1*, *Has2*, *Has3*, *Lyve*, *Cd44*, *Rhmm*, *Hyal1* und *Hyal2* analysiert (n = 4-6). Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

3.7 Effekte von Cathepsin G auf 3T3-L1 Zellen

Nun wurde der PAR-4 AP Effekt mit dem der Protease Cathepsin G verglichen. Die Aktivierung des Rezeptors durch Cathepsin G hatte ähnliche Effekte wie die von PAR-4 AP. So zeigte sich eine Induktion von *Leptin* und *Ppar γ* an Tag 7 durch Cathepsin G unterdrückt (Abbildung 21).

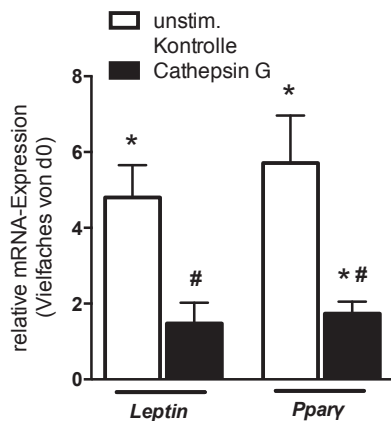


Abbildung 21: Einfluss von PAR-Aktivierung durch Cathepsin G auf die Expression von *Leptin* und *Ppar γ* während der 3T3-L1 Differenzierung. An Tag 7 wurde Genanalyse mittels qPCR durchgeführt (n = 6-9). Mittelwerte \pm SEM dargestellt. *, p < 0,05 im Vergleich d0, #, p < 0,05 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

Auch in Bezug auf die Lipidakkumulation zeigte Cathepsin G einen anti-adipogenen Effekt: es wurde weniger Fett angereichert als in Kontrollzellen (Abbildung 22). Dies deckte sich mit den Beobachtungen durch Stimulation mit PAR-4 AP.

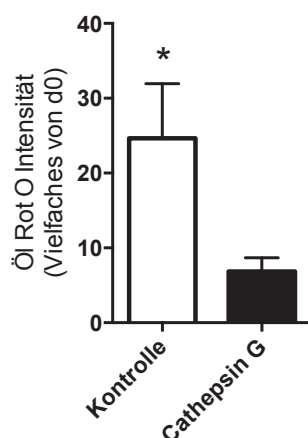


Abbildung 22: Quantitative Auswertung der Öl Rot O Färbung mittels Fluoreszenzanalyse im Phosphorimager. 3T3-L1 Zellen wurden 7 Tage nach Induktion der Differenzierung in PFA fixiert, mit Öl Rot O gefärbt und im Phosphorimager gescannt (n = 3). Mittelwerte \pm SEM dargestellt. *, p < 0,05 im Vergleich zu d0. #, p < 0,05 im Vergleich zur unstimulierten gepaarten Kontrolle.

Im Kurzzeitversuch über 60 Minuten konnten mittels Western Blot proliferative Effekte aufgezeigt werden. Die Phosphorylierung der Kinase ERK1/2 war nach zehnmütiger Stimulation etwa verdreifacht (**Abbildung 23A**), allerdings nicht signifikant. Um Auswirkungen von Cathepsin G (CG) Stimulation auf eine wachsende Kultur von Präadipozyten zu demonstrieren, wurden Zellen ausgesät, stimuliert und nach 48 h bzw. 72 h unter CG Stimulation analysiert. Analog zu den Beobachtungen durch Stimulation mit PAR-4 AP zeigte sich hier unter Cathepsin G nach drei Tagen (72h) eine Zunahme der Zellzahl auf etwa das Vierfache verglichen mit der unstimulierten Kontrolle (**Abbildung 23B**). Auf mRNA Ebene wurde eine Zunahme der Transkription von *Birc3* gefunden. Im Gegensatz zur Stimulation mit AP war die *Ki67*-Expression jedoch supprimiert (**Abbildung 23C**).

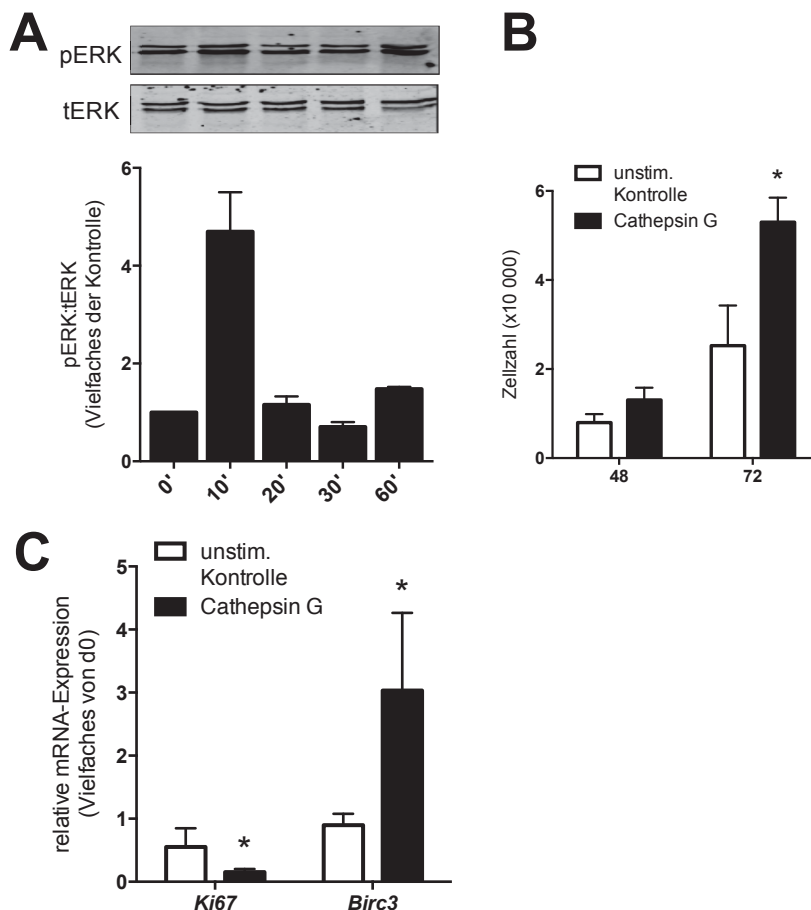


Abbildung 23: Proliferation von Cathepsin G stimulierten Zellen. A, Proteinanalyse mittels Western Blot in Präadipozyten, die 10, 20, 30 bzw 60 Minuten zuvor mit CG stimuliert wurden (n = 3). B, stimulierte Zellen wurden 48 h bzw. 72 h nach Aussaat gezählt (n = 4). C, an Tag 7 der Differenzierung wurde eine Genanalyse mittels qPCR durchgeführt (n = 5-6). Mittelwerte \pm SEM dargestellt. *, $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.

Der Effekt von Cathepsin G auf die Transkription von *Mcp1* unterscheidet sich von dem festgestellten Effekt durch PAR-4 AP (vgl. Abbildung 16A). Hier konnte nach sieben Tagen eine Hemmung der Transkription gesehen werden. Die unstimulierten Kontrollzellen zeigten im Vergleich eine deutlich höhere Expression des Chemokins (Abbildung 24A). Im durchgeführten Monozyten-Adhäsions-Assay verhielten sich sowohl Präadipozyten mit 24-stündiger Inkubation mit CG als auch Adipozyten an Tag 3 indifferent gegenüber der Stimulation (Abbildung 24B). Die Expression von *Tnfa* war, analog zur Stimulation durch PAR-4 Peptid (vgl.), während der Reifung nicht erhöht (Abbildung 24C).

In den untersuchten Aspekten ähnelt eine Stimulation mit Cathepsin somit einer solchen mit PAR-4 AP.

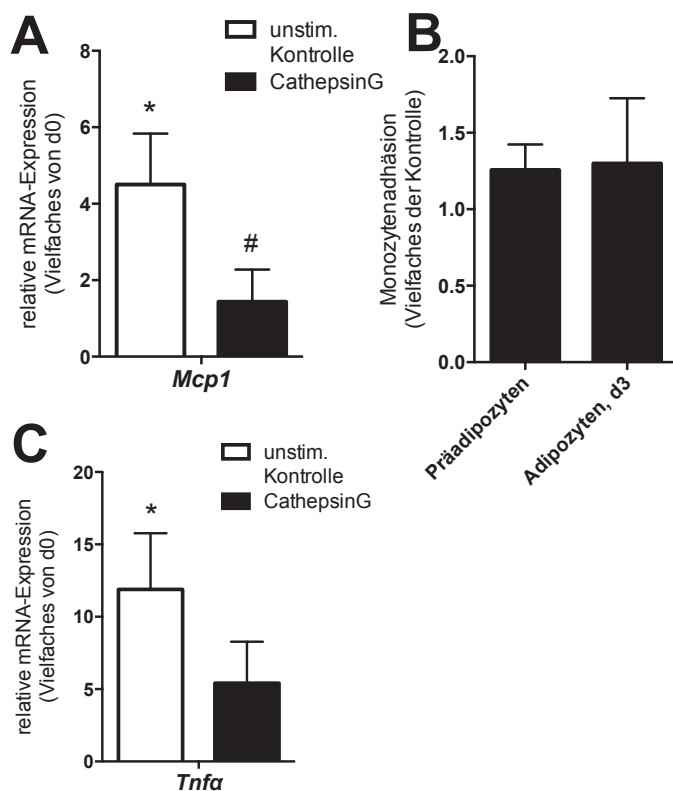


Abbildung 24: Auswirkungen der Stimulation mit Cathepsin G auf die Inflammation. A, 3T3-L1 wurden mit Differenzierungsmedium inkubiert, für sieben Tage mit Cathepsin G stimuliert und anschließend mittels qPCR analysiert (n = 6). B, Präadipozyten (Stimulation für 24h, n = 8) und Adipozyten (stimuliert, Tag 3 nach Induktion der Differenzierung, n = 6) wurden dem Monozytenadhäsions-Assay unterzogen. Mittelwerte \pm SEM dargestellt. *, p < 0,05 A, C im Vergleich zu d0, B, im Vergleich zur unstimulierten gepaarten Kontrolle. #, p < 0,05 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle

3.8 Einfluss von Mastzell-konditioniertem Medium auf 3T3-L1

Um herauszufinden, ob Cathepsin G oder andere Proteasen aus Mastzellen die Reifung von Adipozyten beeinflussen, wurden 3T3-L1 Zellen ab der Differenzierung mit MCCM oder Kontrollmedium behandelt. Anschließend wurde eine Öl Rot O Färbung durchgeführt. Inkubation der Zellen mit MCCM zeigte den Trend einer gesteigerten Lipidanreicherung gegenüber der Kontrolle. Dies wurde durch Vorbehandlung des Mediums mit den spezifischen Inhibitoren gegen Cathepsin G oder PAR-4 weiter verstärkt, was für eine Beteiligung des Cathepsin G / PAR-4 Signalweges bei der Reifung spricht. Mit einer Inhibition von Cathepsin G, welches sich u.a. im MCCM befindet, stieg die Akkumulation von Fett auf etwa das Doppelte (5,52) im Vergleich zur basalen Kontrolle (2,71), bei der die Zellen lediglich mit MCCM behandelt wurden. Ausschaltung von PAR-4 führte zu einem ähnlichen, jedoch nicht signifikanten Effekt (4,64) (Abbildung 25). In den mit Kontrollmedium behandelten Zellen hatten die Inhibitoren keinen Effekt (Daten nicht gezeigt).

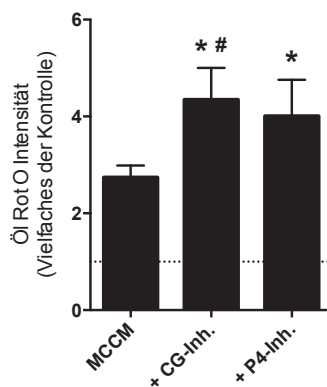


Abbildung 25: Quantitative Auswertung der Öl Rot O Färbung mittels Fluoreszenzanalyse im Phosphorimager. 3T3-L1 Zellen wurden für sieben Tage nach Induktion der Differenzierung mit MCCM \pm Inhibitoren behandelt, mit Öl Rot O gefärbt und im Phosphorimager gescannt ($n = 4$). Mittelwerte \pm SEM dargestellt. *, $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle, die weder mit MCCM noch mit Inhibitoren behandelt wurde. #, $p < 0,05$ im Vergleich zu Zellen, die nur mit MCCM behandelt wurden (basal).

Die Stimulation von 3T3-L1 mit MCCM führte nur zu einer nicht signifikant veränderten Genexpression von *Leptin* und *Ppar γ* , die durch Zugabe von PAR-4- bzw. Cathepsin G Inhibitor auf signifikante Werte verstärkt wurde (Abbildung 26A, B). Der Proliferationsmarker *Ki67* wurde in Anwesenheit des CG-Inhibitors im MCCM induziert und durch PAR-4 Inhibition kaum beeinflusst (Abbildung 26C).

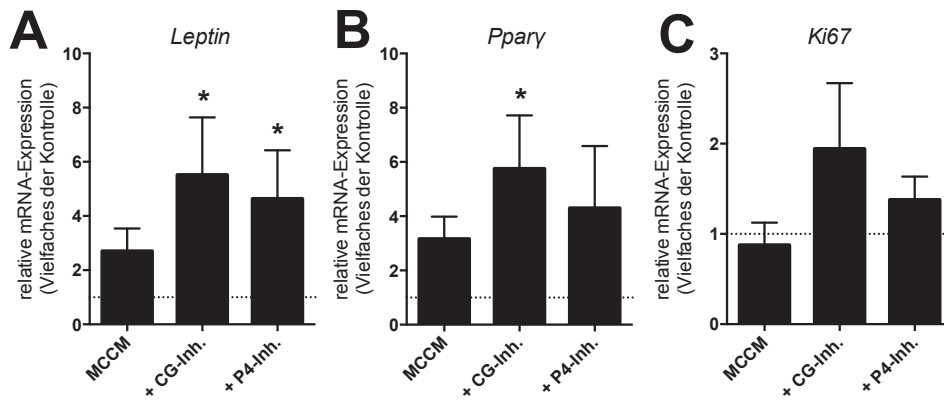


Abbildung 26: Auswirkung der Stimulierung mit MCCM auf die auf die Expression von *Leptin*, *Pparγ* und *Ki67* während der 3T3-L1 Differenzierung. An Tag 7 wurde Genanalyse mittels qPCR durchgeführt (n = 4). Mittelwerte ± SEM dargestellt, *, p < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle, die weder mit MCCM noch mit Inhibitoren behandelt wurde.

Bei der Inflammation zeigte eine Inkubation von 3T3-L1 mit MCCM (17,53) eine signifikante Erhöhung von *IL6* im Vgl. zum Kontrollmedium (1,0). Diese blieb bei Behandlung mit Cathepsin G Inhibitor (6,14) und PAR-4 Inhibitor (2,16) aus. PAR-4 Inhibition senkte die *IL6*-Produktion gegenüber der im Inhibitor-freiem Medium stark (Abbildung 27A). Auf die Expression von *Tnfa* hatten weder MCCM noch die Inhibitoren einen Einfluss (Abbildung 27B). Die Inkubation mit MCCM stellte einen ausreichenden Reiz für die mRNA-Synthese des Hyaluronsäure-Rezeptors *Tlr2* dar (Abbildung 27C). Durch Zugabe von Cathepsin G Inhibitor zum MCCM wurde eine vermehrte Expression sowohl von *Tlr2* als auch von *Tlr4* erreicht (Abbildung 27C-D).

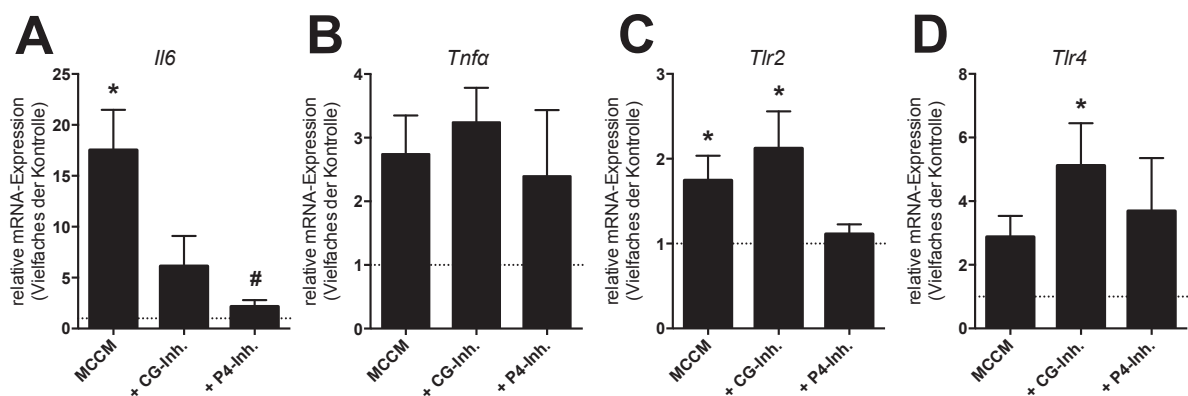


Abbildung 27: Effekte der Stimulation mit MCCM auf die Inflammation. 3T3-L1 Zellen wurden mit Differenzierungsmedium inkubiert, für sieben Tage mit MCCM stimuliert und dann für eine Genanalyse durch qPCR aufbereitet, n = 4. Mittelwerte ± SEM dargestellt. *, p < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle, die weder mit MCCM noch mit Inhibitoren behandelt wurde. #, p < 0,05 im Vergleich zu Zellen, die nur mit MCCM behandelt wurden (basal).

4 Diskussion

4.1 Überblick

Wie anfänglich beschrieben, gibt es in der Literatur Hinweise darauf, dass die Infiltration von Mastzellen ins Fettgewebe bei Adipositas-induzierter Insulinresistenz von Bedeutung sein könnte. Adipöses Fettgewebe sezerniert pro-inflammatorische Zytokine, wodurch sich Entzündungszellen dort ansammeln. Makrophagen beispielweise tragen in diesem Milieu maßgeblich zur der Entstehung einer Insulinresistenz bei. Mastzellen kommen im adipösen FG zwar in deutlich geringerer Anzahl vor als Makrophagen, allerdings ist ihre Anzahl relativ gesehen bei Adipositas deutlich erhöht. Sie infiltrieren das Fettgewebe zusammen mit anderen Immunzellen wie neutrophilen Granulozyten noch vor anderen Entzündungszellen. In Übereinstimmung hiermit werden bei übergewichtigen Menschen erhöhte Plasmaspiegel von Proteasen bestimmt, die vermutlich von diesen Immunzellen stammen.

Auf Adipozyten, die den größten Teil des Fettgewebes ausmachen, sind u.a. die Protease aktivierten Rezeptoren 2 und 4 (PAR-2/-4) exprimiert, die durch sezernierte Proteasen aktiviert werden können. Eine pro-adipogene Rolle von PAR-2 im FG wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen bereits untersucht.

Gänzlich unbekannt war in diesem Zusammenhang bisher die Rolle von PAR-4. Diese Arbeit zeigt erstmals eine dynamische Regulation von PAR-4 in reifenden Adipozyten. Seine Aktivierung durch synthetische Liganden oder die rekombinante Protease Cathepsin G aus Mastzellen scheint die Reifung der Adipozyten zu unterdrücken und stellt für die Zellen einen mitogenen Stimulus dar. Darüber hinaus spricht die erhöhte Expression von IL6 durch PAR-4 allerdings auch für die Begünstigung eines inflammatorischen Phänotyps in Fettzellen. Der wichtigste Befund ist jedoch die Hemmung der Adipogenese in PAR-4 stimulierten Adipozyten.

4.2 Adipogenese *in vitro* und Quantifizierung der Lipidmenge

Die Reifung von 3T3-L1 Zellen wurde nach dem konventionellen *in vitro* Modell der Adipogenese durch die Zugabe der differenzierungs-induzierenden Substanzen Insulin, IBMX und Dexamethason in der Zellkultur initiiert. Tatsächlich zeigte sich durch Färbung von Fetten mit Öl Rot O im Zeitverlauf eine zunehmende Akkumulation von Lipiden und Triglyzeriden. Wie bereits im Methodik-Teil beschrieben, erfuhr ich bei der quantitativen Auswertung der Lipidmenge allerdings anfänglich große Schwierigkeiten. Es bot sich in Veröffentlichungen kein standardisiertes Protokoll, um Fette in der Zellkultur zu quantifizieren. In früheren Arbeiten in der Literatur wurde die Öl Rot O Färbung bisher nur verwendet, um die Fettspeicherung rein optisch darzustellen. Diese Methode war allerdings

für die Quantifizierung der Lipidakkumulation unbrauchbar, denn am Plastik der Kulturschalen blieben nach der Färbung ungebundene Pigmente haften, welche mit ausgewaschen wurden. Diese erhöhten die Hintergrundaktivität der Messungen so sehr, dass eine Auswertung der Veränderungen in der Fettanreicherung kaum zu erfassen war und sich nicht mit den optischen Ergebnissen deckte. So fehlte eine Methode zur adäquaten Messung der Lipidakkumulation. Nach einigen Widrigkeiten mit einer angestrebten möglichen photospektrometrischen Quantifizierung des Pigments durch mechanisches Abwaschen der ungebundenen Pigmente wurde langfristig eine völlig neue Methode etabliert. So konnte die Lipidmenge letztlich durch Erfassung der Öl Rot O Eigenfluoreszenz mit Hilfe des Phosphoimagers quantifiziert werden. Für eine ausführliche Beschreibung dieser Methoden siehe Fluoreszenzmessung unter Abschnitt 2.3.5.

Die erfolgreiche Etablierung des Modells der Adipozytenreifung wurde auch auf Ebene der Genexpression in meinen Experimenten verifiziert. Sie zeigte Charakteristika von ausgereiften Fettzellen. So wurde mit Beginn der Differenzierung die Expression von *Ppar γ* induziert und fiel erwartungsgemäß im Zeitverlauf auf Ausgangsniveau. Die Menge des exprimierten Leptins spiegelt den steigenden Fettgehalt in reifenden Adipozyten. Dies konnte in unserem Modell bestätigt werden, da eine mit der Zeit zunehmende Expression von *Leptin* detektiert wurde.

4.3 PAR-Regulation und Einfluss von PAR-Aktivierung während der Adipozytenreifung

Ich konnte zeigen, dass die Protease-aktivierten Rezeptoren 2 und 4 Vertreter der PAR-Familie auf Adipozyten darstellen. Dies deckt sich mit den Angaben in der Literatur, denn Strände *et al.* detektierten bereits PAR-4 auf humanen Präadipozyten und reifen Adipozyten und Badeanlou *et al.* zeigten PAR-2 Expression auf murinen Adipozyten [101, 104]. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit aber erstmals für 3T3-L1 Zellen demonstriert. PAR-2 und PAR-4 werden auf reifenden Fettzellen im Zeitverlauf vermehrt exprimiert.

Um die funktionelle Auswirkung dieser Hochregulation zu untersuchen, wurde der Einfluss selektiver PAR-Aktivatoren in der Zellkultur untersucht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine selektive PAR-2 Aktivierung mit synthetischem Hexapeptid zu einer gesteigerten Expression der Reifungsmarker *Ppar γ* und *Leptin* in differenzierenden Adipozyten führt; die PAR-2 Aktivierung hatte eine adipogene Wirkung sowohl auf Präadipozyten als auch auf reifende Adipozyten. In der Literatur ist bereits beschrieben, dass PAR-2 im Fettgewebe, vermutlich auf Adipozyten, an der Entwicklung einer Insulinresistenz beteiligt ist [100]. Badeanlou *et al.* postulierten, dass die Aktivierung von

PAR-2 auf Adipozyten die Entstehung von Adipositas fördert. Sie beschrieben, dass durch eine PAR-2 abhängige Blockierung der Akt-Kinase in Fettzellen der Energieumsatz reduziert wird. In ihrer Studie führte ein *Knockout* von *Tissue Factor* (TF) (einem Liganden von PAR-2), oder PAR-2 direkt, unabhängig vom Körpergewicht zu einer geringeren Blutglukosekonzentrationen, einer größeren Glukosetoleranz und Insulinsensitivität [101]. Die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse stützen die These, dass eine Stimulation von PAR-2 eine pro-adiogene Wirkung auf Fettzellen hat.

In Adipozyten, die während der Differenzierung mit PAR-4 AP behandelt wurden, zeigte sich allerdings ein anderes Bild. So führte eine Stimulation von PAR-4 in Adipozyten zu einer stark erniedrigten *Leptin*-Expression im Vergleich zu der in differenzierten Kontrollzellen. Für dieses Ergebnis kommen verschiedene Mechanismen in Frage: erstens könnte die Reifung von Anfang an durch Stimulation von PAR-4 behindert werden. Zweitens könnte durch sezernierte Substanzen die *Leptin*-Expression supprimiert werden. In der Literatur ist beschrieben, dass die *Leptin*-Expression nicht nur von der Zellgröße des Adipozyten beeinflusst wird, sondern auch durch lokal sezernierte Zytokine [39]. So ist bekannt, dass Insulin und TNF α zu einer Erhöhung, Fettsäuren und eine Stimulation von PPAR γ zu einer Erniedrigung von *Leptin* führen [122]. Die Sekretion von Fettsäuren ist ein Charakteristikum reifer Adipozyten und könnte so die *Leptin*-Expression unterdrücken. Wir konnten in unserem Experiment keine Erhöhung von *Ppar γ* feststellen, so dass als Ursache für eine erniedrigte *Leptin*-Expression der Mechanismus einer Stimulation von PPAR γ nicht in Frage kommt. Möglicherweise wurde also die Differenzierung der Präadipozyten durch PAR-4 Stimulation gar nicht erst induziert, so dass es sich hier nicht um eine durch extrazelluläre Mediatoren supprimierte *Leptin*-Expression handelt, sondern um eine fehlende endogene Transkription dieses Gens. Um diese These zu untersuchen, wurde anschließend die akkumulierte Fettmenge in den reifen, stimulierten Fettzellen untersucht.

In PAR-4 stimulierten Adipozyten war die Menge akkumulierter Lipide tatsächlich geringer als in reifen Kontrollzellen. So scheint PAR-4 Stimulation im Gegensatz zu PAR-2 Stimulation keine adipogenen Effekte auf Adipozyten zu haben, sondern einen gegensätzlichen, anti-adipogenen Effekt. Scott *et al.* postulierten, dass die Präadipozyten zur Induktion der Adipogenese an einem bestimmten Zeitpunkt in der G1-Phase des Zellzyklus, G $_0$, arretiert sein müssten. Die Zelle könne an diesem Zeitpunkt entweder den Weg der Differenzierung einschlagen, oder aber durch einen mitogenen Stimulus erneut zur Proliferation gebracht werden [16]. In folgenden Experimenten untersuchten wir demnach den potentiellen proliferativen Effekt von PAR-4 in 3T3-L1 Zellen.

Zur Untersuchung dessen ist eine Analyse der Expression der Kinase ERK1/2 (MAPK) geeignet. Tang *et al.* etwa beschrieben, dass ERK1/2 von Präadipozyten im

Wachstumsarrest innerhalb der ersten Stunde nach Induktion der Differenzierung phosphoryliert wird [17]. Eine Hemmung der Phosphorylierung von ERK1/2 verringert in ihren Experimenten das Ausmaß der Differenzierung. In nachfolgenden Studien konnte gezeigt werden, dass ERK1/2 den Transkriptionsfaktor C/EBP- β phosphoryliert [123]. C/EBP- β ist wichtig für die Induktion der nachfolgenden adipogenen Signaltransduktion. Allerdings ist in der Literatur beschrieben, dass es dafür zwei Mal phosphoryliert werden muss (sog. Hyperphosphorylierung); nicht nur durch ERK1/2, sondern zu einem späteren Zeitpunkt auch durch die Glykogen Synthase Kinase 3 β (GSK-3 β) [123, 124]. Es gibt mittlerweile viele erforschte Mechanismen der posttranslationalen Modifikation von C/EBP- β , und so ist beispielweise auch die Methylierung von C/EBP- β wichtig [125], die unter gewissen komplexen Umständen von ERK1/2 unterbunden werden kann. Dadurch wird die adipogene Signaltransduktion unterbrochen und die Differenzierung von Adipozyten gehemmt [124]. Des Weiteren beschrieben Tang *et al.*, dass der Zeitpunkt der Phosphorylierungen von C/EBP- β relevant sei. Sie fanden nach Induktion der Differenzierung erst nach vier Stunden die größte Aktivität, während unser Maximum bei zehn Minuten lag und die Menge an phosphoryliertem ERK1/2 dann wieder auf Ausgangsniveau abfiel.

In Zusammenschau dieser Ergebnisse muss also eine Aktivierung von ERK1/2, so wie wir sie gesehen haben, nicht mit einer Induktion der Differenzierung einhergehen. Das für die adipogene Signaltransduktion wichtige C/EBP- β wird wahrscheinlich innerhalb so kurzer Zeit unzureichend phosphoryliert, als dass es seine Wirkung als Transkriptionsfaktor entfalten kann. Gegebenenfalls kann man bei solch einer geringen und kurzen Aktivierung (10 Min vs. 4 h) sogar von einer Hemmung sprechen.

Andere Kinasen, die bei metabolischen Erkrankungen eine Rolle spielen könnten, wie z.B. Akt, wurden durch PAR-4 AP nicht signifikant aktiviert. Badeanlou und Kollegen hatten durch PAR-2 Stimulation mit *Tissue Factor in vivo* wegen einer verringerten Phosphorylierung von Akt eine verminderte Expression von Adiponektin und eine reduzierte β -Oxidation beobachtet [101, 126]. Die Versuchstiere wurden adipös. Wir konnten durch PAR-4 Stimulation *in vitro* keinerlei Effekt auf die Kinase feststellen; die Aktivierung von Akt blieb unverändert.

Die Vermutung einer gehemmten Differenzierung wird durch unsere Befunde bei der Zellzählung und bei der Genanalyse gestützt. So konnten wir durch PAR-4 Stimulation eine verstärkte Proliferation von Präadipozyten beobachten. In Adipozyten, die im Reifungsprozess mit PAR-4 AP stimuliert wurden, war das antiapoptotische *Birc3*-Gen und der proliferative Marker *Ki67* eine Woche nach Differenzierung nicht supprimiert. Dies spricht für eine Aufrechterhaltung der proliferativen Aktivität der Zelle, denn Ki-67 wird

ausschließlich von sich im Wachstum befindlichen Zellen exprimiert [127]. *In vitro* Untersuchungen von Maumus *et al.* zeigten, dass das proliferative Potential von humanem Fettgewebe u.a. abhängig ist von der Größe der Fettzellen. Sie beobachteten eine positiv mit dem BMI korrelierende Menge an Ki-67-positiven Zellen in der stromal-vaskulären Fraktion, in welcher sich u.a. Vorläuferzellen befinden, und schlussfolgerten, dass Zytokine aus reifen, hypertrophen Adipozyten (Leptin, IL6 und Lysophosphatidsäure) die Proliferation von Präadipozyten stimulieren [128]. In unserem Versuchsaufbau konnten wir ebenfalls eine leicht erhöhte *Il6* Expression durch PAR-4 Stimulation messen. Dieses könnte parakrin auf die benachbarten 3T3-L1 Zellen wirken und so zur Proliferation beitragen.

In einem noch größeren Umfang wurde allerdings von PAR-4 stimulierten Präadipozyten das Zytokin *Tnfa* exprimiert, was wir in reifen Adipozyten allerdings nicht messen konnten. In den Experimenten von Ruan *et al.* führte TNF α zu einer veränderten Expression von *Adiponektin* und *Il6* und reduzierte die Expression von Genen, die bei der Adipogenese und Lipogenese von Bedeutung sind [118, 129]. Es behindert in Adipozyten das Insulin-Signaling und reduziert *in vitro* den Fettgehalt von Adipozyten [118, 130]. Dies könnte also ein zusätzlicher möglicher Mechanismus für die reduzierte Lipidakkumulation von PAR-4 stimulierten, differenzierten Adipozyten sein, vor allem, wenn es eine Koexistenz von Präadipozyten und differenzierten Zellen gibt. Denn nicht konfluent im Zellverband sitzende Präadipozyten reagieren aufgrund fehlender Kontaktinhibition nicht auf das Differenzierungsmedium. So könnten Präadipozyten durch PAR-4 Stimulation eine Quelle für TNF α darstellen, welches wiederum in Anbetracht der Ergebnisse von Ruan ein weiterer Faktor sein könnte, der die umliegenden Zellen an der Reifung behindern könnte. Diese These passt auch dazu, dass wir in der Kultur mit differenzierten Zellen einen leichten Anstieg von *Tnfa* gemessen haben.

In Adipozyten wurde eine Woche nach Induktion der Differenzierung eine verminderte Expression von *Tlr4* unter PAR-4 Stimulation im Vergleich zu Kontrollzellen gemessen. *Toll-like* Rezeptoren, allem voran TLR4, spielen eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit den pro-inflammatorischen Effekten von gesättigten Fettsäuren [30]. Dies ist insofern relevant, da in der Literatur beschrieben ist, dass durch Deletion von *Tlr4* auf Adipozyten die Fettsäure-induzierte Inflammation von Makrophagen inhibiert wird [131, 132]. *Tlr4-Knockout* Mäuse nahmen unter HFD zwar zu, jedoch blieben sie von Adipositas-induzierter Insulinresistenz verschont [133]. Der von uns beobachtete Anstieg von TLR4 könnte also im Zusammenspiel mit anderen Zellen einen Teilmechanismus darstellen, der zu einer Fettgewebsinflammation beiträgt.

Der Stimulation von TLR4 wird auch eine Bedeutung bei der Reifung von Fettzellen zugeschrieben. So haben Poulain-Godefroy und Kollegen in ihrer Studie durch TLR4

Stimulation eine supprimierte Differenzierung festgestellt. Sie setzten differenzierende 3T3-L1 Zellen einem inflammatorischen Milieu aus, indem sie dem Kulturmedium Lipopolysaccharide zusetzten, welche als Liganden für TLR4 wirken [32]. Allerdings beschreiben die Autoren im Unterschied zu unseren Ergebnissen eine Aufrechterhaltung der Leptinexpression. *Ppar γ* war in ihren Versuchen, analog zu unseren Messungen, supprimiert. Sie detektierten in undifferenzierten Zellen, nicht aber in reifen Adipozyten, eine erhöhte Transkription inflammatorischer Gene wie *Il6* und *Mcp1* durch Stimulation von TLR4. Daher postulierten sie, dass reife Fetzellen unter inflammatorischen Bedingungen in einem undifferenzierten Zustand verbleiben. In den von uns durchgeführten Experimenten scheint die PAR-4 Stimulation in der Kultur nicht zu einem Mikromilieu geführt zu haben, das genügend Reize für eine *Tlr4* Aktivierung aufwies. Die Expression war im Gegenteil sogar supprimiert. Ob dies an den kurzen Versuchszeiten lag oder an einer veränderten Sekretion von bspw. FFA, ist unklar.

Hyaluronsäurefragmente stellen ebenfalls Liganden für TLR4 dar [134]. Eine Veränderung der EZM hätte eine mögliche Ursache für eine veränderte TLR4-Expression darstellen können. Allerdings haben unsere Versuche nach sieben Tagen Stimulation mit PAR-4 weder eine vermehrte Sekretion von Hyaluronsäure ergeben, noch eine Veränderung der Expression von Genen, die für die Zusammensetzung der EZM relevant sind. So ist die *Tlr4*-Induktion, wie wir sie nur in unstimulierten Adipozyten messen konnten, möglicherweise physiologisch und auf die im Vergleich zu PAR-4 stimulierten Zellen intensivierete Adipogenese in diesen Kontrollzellen zurückzuführen.

Strande *et al.* zeigten in humanen Adipozyten eine vermehrte Freisetzung des Zytokins MCP-1 nach Thrombin Stimulation. Da die Autoren in diesem Zelltyp keine Expression von PAR-1 nachweisen konnten, könnte dies PAR-4 vermittelt sein [29]. In meiner Arbeit konnte in reifen Kontroll-Adipozyten ein Anstieg der Genexpression von *Mcp1* gezeigt werden, der durch PAR-4 Stimulation allerdings kaum weiter erhöht wurde. Wie bereits beschrieben, stellt MCP-1 ein Chemokin für Immunzellen wie Monozyten dar, welche sich in gewebsständige Makrophagen umwandeln können [120]. *In vivo* löst MCP-1 eine Degranulation von Mastzellen aus [121]. PAR-aktivierende Proteasen wie Cathepsin G und Tryptase befinden sich in ihren Granula. Im Monozyten-Adhäsions-Assay konnten wir jedoch weder in Präadipozyten noch in reifen Fetzellen durch PAR-4 Stimulation eine erhöhte Monozytenadhäsion feststellen. Eventuell war die Induktion nicht intensiv genug, als dass sie ein ausreichendes chemotaktisches Signal dargestellt hat, oder es wurde, dem Versuchsaufbau verschuldet, in noch zu unreifen Adipozyten gemessen. So könnte sich mit Fortschreiten der Reifungszeit auch die *Mcp1* Induktion verstärken und gegebenenfalls ein suffizientes Signal für Immunzellen darstellen.

4.4 Einfluss der Protease Cathepsin G auf 3T3-L1 Zellen

Analog zu den bereits durchgeführten Versuchen inkubierte ich in unseren Experimenten 3T3-L1 Zellen nun mit Cathepsin G, welches den PAR-4 proteolytisch spaltet und aktiviert. Wie auch das PAR-4 AP konnte Cathepsin G die Reifung von 3T3L1 Zellen unterdrücken, da *Leptin* und *Ppar γ* trotz künstlicher Induktion der Differenzierung kaum anstiegen. Auch die Lipidfärbung zeigte einen antiadipogenen Effekt des PAR-4-Aktivators, denn die Cathepsin G-stimulierten Zellen reicherten signifikant weniger Fette an. Allerdings akkumulierten die Cathepsin G stimulierten Zellen drei Mal so viel Fett wie PAR-4 AP stimulierte Zellen. Übereinstimmend mit den PAR-4 AP Ergebnissen nahm nach Stimulation in Präadipozyten schnell die Phosphorylierung der Kinase ERK1/2 zu, allerdings nur etwa halb so viel wie unter PAR-4 AP. Bei der Zellzählung fanden sich nach drei Tagen trotzdem ähnlich viele Zellen wie bei PAR-4 AP, entsprechend einem proliferativen Effekt von Cathepsin G.

Überraschend war daher der Befund, dass der Proliferationsmarker *Ki67* in einem analogen Versuch deutlich supprimiert war. Eine mögliche Erklärung könnte eine bereits stattgefunden Limitierung der Proliferation sein. Die Zellen könnten sich zum Untersuchungszeitpunkt (Tag 7) bereits in einem Wachstumsstopp befunden haben. Wie einleitend beschrieben, wird dieser Arrest auch postkonfluent beobachtet und ist ein essentieller Bestandteil der frühen Adipogenese. Ob dieser Wachstumsarrest durch Konfluenz oder durch PAR-4 Stimulation durch Cathepsin G induziert wurde, ist unklar. Er könnte auch eine Erklärung dafür sein, warum wir zwischen PAR-4 AP und Cathepsin G Stimulation eine unterschiedlich intensive Lipidakkumulation beobachtet haben, denn möglicherweise fand der Arrest in einigen Zellen der Zellkultur bereits vor der Messung am Tag 7 statt. Allerdings widerspricht diese These der ähnlich intensiven Zunahme der Zellzahl im Vergleich zu PAR-4 AP Stimulation.

Das Gen *Birc3* war ebenfalls induziert; sogar intensiver als unter PAR-4 AP Stimulation. Dies zeigt eine Reduzierung der Zellapoptoserate an. Während der Adipogenese ist eine Balance zwischen pro- und antiapoptotischen Faktoren entscheidend, und eine Veränderung dieser führt zu einer größeren Resistenz gegen Apoptose [135, 136]. So passt diese Messung zu den anderen Ergebnissen, welche ähnliche anti-adipogene Effekte von Cathepsin G wie durch PAR-4 AP zeigen. Yin *et al.* identifizierten *Birc3* als ein überexprimiertes Gen bei adipösen Frauen [137].

Für die Expression von *Mcp1* scheint die Cathepsin G Stimulation einen noch geringeren Reiz darzustellen als die direkte Aktivierung des Rezeptors, denn diese war im Vergleich zu Kontrollzellen signifikant supprimiert. Konkordant dazu beobachteten wir auch keine veränderte Monozytenadhäsion zwischen Präadipozyten und reiferen Adipozyten.

Zusammengefasst haben wir durch Aktivierung des PAR-4- / Cathepsin G-Signalweges einen proliferativen Effekt auf 3T3-L1 festgestellt. Anstelle von Wachstumsarrest und Lipidakkumulation, also Differenzierung einhergehend mit Hypertrophie, sahen wir in der Zellkultur eine Hyperplasie der Präadipozyten. Bereits in glatten Gefäßmuskelzellen (SMCs) wurde eine tragende Rolle von PAR-4 bei der Entstehung einer neointimalen Hyperplasie festgestellt [111]. Pavic *et al.* stellten fest, dass PAR-4 unter hyperglykämischen Bedingungen maßgeblich an der Proliferation von SMCs beteiligt ist. *Par4-Knockout* Mäuse waren vor einem verstärkten *Remodeling* nach Gefäßverletzung geschützt, was auf das Unterbinden der Zellproliferation und eine verminderte Ansammlung von Makrophagen wegen eben dieser PAR-4 Defizienz zurückzuführen war [111].

Im Zusammenhang mit einer Proliferation von Präadipozyten wurde PAR-4 allerdings in der Literatur noch nicht beschrieben. Spalding *et al.* stellten nach Studien am Menschen die These auf, dass die Anzahl reifer Fettzellen lebenslang konstant sei und diese in Kindheit und Jugend festgelegt werde. So hätten adipöse Kinder am Ende ihrer Kindheit zwar mehr Fettzellen als schlanke, aber die Anzahl bleibe lebenslang konstant. Die Arbeitsgruppe postulierte, dass jährlich etwa 10 % der reifen Fettzellen erneuert würden und dass Zelltod und Erneuerungsrate stets im Gleichgewicht stünden [138]. Dies impliziert, dass eine Hyperplasie / Proliferation im Erwachsenenalter nicht stattfindet. Allerdings wurden in ihrer Studie nur Patienten untersucht, die bereits in ihrer Kindheit adipös waren. So ist es fraglich, ob ihre Ergebnisse auf Patienten übertragbar sind, die erst später im Leben adipös werden. Hier könnte der von uns festgestellte Mechanismus der Proliferation von Bedeutung sein. Denn wenn eine Fettzelle so hypertroph wird, dass ihr Fettaufnahmepotential ausgeschöpft ist, könnten neue Zellen aus dem Pool von Präadipozyten rekrutiert werden, sich mitotisch vermehren (proliferieren) und teilweise beginnen, sich in reife Adipozyten zu vermehren. So bleibt zwar der Pool aus Präadipozyten konstant, allerdings gehen aus ihm Adipozyten hervor. In späteren Arbeiten bei der Untersuchung von Fettproben adipöser Individuen ergänzte die Arbeitsgruppe, dass eine Fettzell-Hyperplasie zu einer besseren Insulinsensitivität führe. Fettzell-Hypertrophie verschlechtere sie hingegen, bei gleichem BMI [139]. Für die Ergebnisse meiner Arbeit bedeutet dies, dass der beobachtete mitogene Effekt zwar zu mehr (Prä-)Adipozyten führt, was aber – rein theoretisch auf einen Organismus bezogen – nicht negative Konsequenzen auf die metabolische Gesundheit haben muss.

4.5 Effekt von Proteasen aus Mastzellen auf 3T3-L1 Zellen

In anschließenden Untersuchungen wurde nun der Effekt von Proteasen speziell aus peritonealen Mastzellen untersucht. Es sind, ähnlich wie bei Makrophagen, verschiedene

Phänotypen von Mastzellen bekannt: MC_{TC} , welche u.a. Tryptase, Chymase (beides PAR-2 aktivierend), Cathepsin G (PAR-4 aktivierend) enthalten, und MC_T , welche nur Tryptase beinhalten [62, 140]. Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen gehören dem MC_{TC} -Typ an. Die beiden Typen können sich unter bestimmten Bedingungen ineinander umwandeln, obschon im FG vornehmlich MC_{TC} zu finden sind [141].

In der Literatur ist beschrieben, dass Mastzellen schon früh das adipöse Fettgewebe infiltrieren [61, 63-66]. Sie könnten parakrine Effekte auf Adipozyten und andere Zellen im Fettgewebe haben. Der Effekt der Mastzell-Proteasen wurde in dieser Arbeit durch Inkubation von reifenden Fettzellen mit konditioniertem Medium aus degranulierten Mastzellen (MCCM) demonstriert. Diese Inkubation hatte einen pro-adipogenen Effekt. Sie führte zu einer mehr als doppelt so großen Lipidakkumulation wie die Differenzierung in Kontrollmedium. Durch Vorbehandlung des MCCM mit reinem spezifischen Inhibitor von Cathepsin G kam es zu einer noch intensiveren Fettsanreicherung. Der gleiche Effekt wurde beobachtet, wenn MCCM mit einem PAR-4 Inhibitor vorbehandelt wurde. Auch die MCCM-induzierte Zunahme der Reifungsmarker *Leptin* und *Ppar γ* wurde durch die Cathepsin G / PAR-4 Inhibitoren unterdrückt. Dies bestätigt unsere Beobachtung, dass die Aktivierung des Cathepsin G / PAR-4 Signalweges die Differenzierung hemmt. In Gegenwart der spezifischen Inhibitoren treten vermutlich die Tryptase / PAR-2 vermittelten Wirkungen des MCCM zum Vorschein, welche einen pro-adipogenen Charakter haben, welcher bereits in der Literatur beschrieben wurde [101].

Der Proliferationsmarker *Ki67* wurde durch MCCM nicht signifikant beeinflusst. Eine Erklärung wäre, dass im MCCM neben PAR-4-aktivierenden Proteasen auch PAR-2-aktivierende Proteasen enthalten sind, die durch ihre adipogene Wirkung den proliferativen Effekt der PAR-4 Aktivierung abschwächen. Auch unter PAR-4 Inhibition änderte sich die Expression von *Ki67* nicht. Dieses Resultat zeigt, dass eine isolierte Signalkaskade, deren Aktivierung wir in den Vorversuchen durch PAR-4 AP erreicht hatten, im Zusammenspiel mit anderen Mastzell-Proteasen einen attenuierenden Effekt hat. Physiologisch werden neben den PARs auch andere Rezeptoren auf der Zelloberfläche der Adipozyten durch die Proteasen aktiviert, die in dem hier gewählten Versuchsaufbau nicht erfasst wurden. Neben PAR-4 kann zum Beispiel auch TLR4 durch CG aktiviert werden, um nur ein mögliches belegtes Beispiel zu nennen [142]. Dies konnten wir in diesem Versuch allerdings nicht bestätigen. Durch Blockade der Cathepsin G Wirkung im MCCM wurde gegenteilig sogar eine verstärkte *Tlr4* Expression detektiert.

Möglicherweise ist jedoch die Synthese von *Tlr2* PAR-4 abhängig, denn unter Inkubation mit MCCM exprimierten die Fettzellen vermehrt *Tlr2*. Dieser Effekt fiel durch Zugabe des PAR-4 Inhibitors weg, blieb allerdings unter Cathepsin G Inhibitor erhalten. Lin *et al.* beschrieben

TLR2 und TLR4 in murinen Fettzellen und postulierten eine vermehrte Expression von TLR2 durch Stimulation von TLR4 mit Lipopolysacchariden [143]. Letztere stellen einen Bestandteil der grampositiven Bakterien- und der Pilzzellwand dar. In der Literatur wird daher weitgehend angenommen, dass Adipozyten Eigenschaften besitzen, welche eigentlich typisch für angeborene Immunzellen sind [143, 144]. Eine mögliche Quelle für TNF α im Fettgewebe stellen inflammatorische M1-Makrophagen oder andere Adipozyten dar [30, 145]. In Versuchen der Arbeitsgruppe um Bès-Houtmann führte eine Stimulation von TLR2 in humanen Adipozyten zu einer vermehrten Produktion von TNF α [145]. Letztlich gibt es also eine Assoziation zwischen TLR2 Aktivierung und TNF α Produktion. Wie bereits beschrieben, fördert TNF α die Entstehung einer Insulinresistenz im Fettgewebe. Eine vermehrte Expression von *Tnfa* wurde allerdings in unseren Versuchen bei Inkubation mit MCCM nicht gemessen.

Die Expression des Zytokins *Il6* hingegen wurde durch die Inkubation der Zellen mit MCCM erhöht. Eine Inhibition von Cathepsin G / PAR-4 führte dazu, dass das Expressionslevel von *Il6* nahezu auf das in Kontrollzellen fiel. Wie bereits erwähnt postulierten Maumus *et al.* einen proliferativen Effekt von IL6, allerdings auf Präadipozyten [128]. *Il6* könnte translatiert, von reifen Adipozyten nach extrazellulär sezerniert werden und über diesen Mechanismus autokrin und parakrin auf die (Prä-)Adipozyten wirken. Wie einleitend bereits beschrieben, führt IL6 zu einer Rekrutierung von Makrophagen und anderen Entzündungszellen, welche zur Entstehung einer Insulinresistenz beitragen. Die bei adipösen Patienten gefundenen erhöhten IL6 Spiegel könnten also auch durch diesen Mechanismus der PAR-4 Aktivierung durch Proteasen aus Mastzellen gespeist werden.

4.6 Klinische Relevanz und Ausblick

Die in dieser Arbeit beschriebenen Beobachtungen dienen als Basis für weiterführende Versuche *in vivo*. Insbesondere muss untersucht werden, ob die Ergebnisse auf das gesamte Fettgewebe übertragbar sind. *In vitro* Versuche liefern nur einen limitierten Einblick, da viele physiologische Interaktionen außer Betracht gelassen werden. In den durchgeführten Versuchen wurde beispielsweise nur eine Zelllinie analysiert. Die Zellen waren zu den Untersuchungszeitpunkten stets alle gleichen Alters, was physiologisch im Fettgewebe nicht vorkommt. Außerdem wurden keine Interaktionen mit anderen Zellen, wie der im Fettgewebe wichtigen stromal-vaskulären Fraktion (SVF), untersucht. Eine Möglichkeit, einen genaueren Einblick in den Effekt von PAR-4 Stimulation im gesamten Fettgewebe und nicht nur in einzelnen Adipozyten zu bekommen, wäre, Gewebeproben zu

kultivieren, in welchen alle Zellen des Fettgewebes vertreten sind. So könnten auch die parakrinen Effekte der SVF untersucht werden.

Das Mikromilieu von Adipozyten *in vivo* unterscheidet sich darüber hinaus sehr von dem einer singulären, kultivierten Zelllinie oder von kultivierten Fettgewebeproben, weil sich die verschiedenen Zelltypen im Zellverband *in vivo* reziprok beeinflussen und modulieren. Es könnte in einem *in vivo* Modell auch die Wirkung von endokrin sezernierten Zytokinen und Hormonen untersucht werden, welche im Fettgewebe einen großen Stellenwert haben. Zu allerletzt ist es jedoch noch der Unterschied zwischen murinen und humanen Zellen, der die Übertragbarkeit von Daten aus Mausmodellen auf den Menschen limitiert. In der Literatur ist beschrieben, dass die Funktion von PAR-4 zwischen den unterschiedlichen Spezies variiert [146]. In menschlichen Fibroblasten der Lunge beispielsweise waren die in Tieren beobachteten Effekte nur unter gleichzeitiger Anwesenheit inflammatorischer Zytokine reproduzierbar [147].

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine Aktivierung des Protease-aktivierten Rezeptors 4 einen mitogenen Stimulus für Adipozyten darstellt. Aus Mastzellen stammende Proteasen führen zu einer intensivierten Fettakkumulation in Adipozyten, welche durch Stimulation von PAR-4 attenuiert werden kann. Neben dem Effekt einer verminderten Adipogenese durch PAR-4 Stimulation konnte eine induzierende Wirkung auf die Expression des inflammatorischen Adipozytokins IL6 demonstriert werden. Dieses Ergebnis könnte bedeuten, dass PAR-4 Stimulation an der Entstehung einer Insulinresistenz im adipösen Fettgewebe beteiligt ist.

Die Anwendung von PAR-4 selektiven Antagonisten im Fettgewebe, beispielsweise in Mäusen, könnte auf Basis unserer Ergebnisse ein erfolgversprechender Ansatz für die Reduktion einer Fettgewebsinflammation auf Basis von Fettzellhyperplasie und -stress sein. Jedoch müssen für eine mögliche Therapieoption einer Rezeptorblockade im Organismus neben den vorteilhaften Folgen auch mögliche negative Auswirkungen bedacht werden, da die vielfältigen physiologischen Funktionen dieser Targets *in vivo* bisher nur unzureichend verstanden sind. Die weiterführenden Studien im Tiermodell mit einem *Par4-Knockout* werden zeigen, ob eine Inhibition – dann längerfristig und ubiquitär im Organismus – tatsächlich eine Wirkung auf das Fettgewebe hat und welche weiteren Effekte dadurch ausgelöst werden. Sambrano *et al.* beschrieben den Phänotyp von *Par4-Knockout* Mäusen als unauffällig betreffend Aussehen, Größe und Fertilität der Tiere [99].

Dass PAR-4 aufgrund seiner geringeren Thrombinaffinität der Korezeptor bei der Plättchenaggregation ist [78], lässt vermuten, dass die Blutgerinnung durch Applikation PAR-4 selektiver Antagonisten beeinträchtigt wird. Dieser Effekt sollte bei der oralen Antikoagulation durch die Blockade von PAR-1, dem Hauptrezeptor für Thrombin auf

Thrombozyten, genutzt werden. Allerdings stieg in klinischen Studien unter Einnahme selektiver PAR-1 Antagonisten wie Vorapaxar und Atopaxar das Risiko für Hirnblutungen signifikant und limitierte den Einsatz von PAR-1 Rezeptorantagonisten zur oralen Antikoagulation [148]. Eine Antikoagulation durch PAR-4 Antagonisten könnte aufgrund der Rolle von PAR-4 als Nebenrezeptor bei der Plättchenaggregation weniger Blutungskomplikationen zur Folge haben. So hätte eine mögliche PAR-4 Blockade ein therapeutisches Potenzial zur Vermeidung kardialer Ischämien, sollte es zu einer effektiven Antikoagulation führen. Ein Einsatz solcher Medikamente würde es darüber hinaus möglich machen, die Reaktionen des Fettgewebes unter PAR-4 Blockade im menschlichen Organismus zu untersuchen.

Letztendlich bleibt wohl der bisher beste Weg, die mit Adipositas assoziierten metabolischen Komplikationen einzudämmen, eine Reduzierung des Körpergewichts – wenn möglich. Bereits eine Abnahme von 10 % des Körpergewichts führt zu einer deutlichen Reduzierung metabolischer Komplikationen [31, 149]. Eine begleitende Behandlung mit anti-inflammatorischen Medikamenten könnte daneben gleichzeitig die metabolischen Risiken minimieren [31]. Allerdings ist solch ein Trend nicht absehbar, denn unsere Bevölkerung wird immer adipöser und morbider. Dies ist nicht nur verschuldet durch Stress, Bewegungsmangel und Kalorienexzess, sondern z.B. auch durch modulierende Zusatzstoffe in der Nahrung und andere Gifte in unserem Umfeld und betrifft die Gesundheit unseres gesamten Organismus [150]. So stellt der Fortschritt der Wissenschaft einen wichtigen Grundpfeiler für die Bekämpfung dieser Missstände, doch steht die Vorbeugung an erster Stelle, denn Prävention ist immer besser als Heilung. Erkenntnisse über Grundlagen einer gesunden Ernährung und Lebensweise sind die Basis dieser Prävention. Würde sich die Menschheit im täglichen Leben dieser Erkenntnisse besser bedienen, wären viele unserer heutigen Zivilisationskrankheiten vermeidbar.

5 Zusammenfassung

Adipositas ist eine der größten Herausforderungen für die Gesundheit unserer Gesellschaft. Schon lange ist bekannt, dass das Fettgewebe (FG) nicht nur als Isolator zur Temperaturregulierung des Körpers dient. Seit der Entdeckung der Adipokine gilt das FG als endokrines Organ. Während der letzten Jahre war vor allem die Rolle von Immunzellen im FG für die Wissenschaft von Interesse. Sie beeinflussen nicht nur die Gesundheit des FGs selbst, sondern die des gesamten Körpers. Denn dem FG wird im Rahmen der Insulinsensitivität eine große Bedeutung beigemessen. Das adipöse FG und seine Interaktion mit Immunzellen, vor allem im Hinblick auf die Entzündung, sind seither im Fokus der Forschung.

Makrophagen spielen bei der Entstehung einer Insulinresistenz eine tragende Rolle. Sie infiltrieren das weiße FG bei der Entstehung einer Adipositas schon früh und in großer Menge. Sie werden begleitet von anderen Immunzellen wie Mastzellen und neutrophilen Granulozyten. Letztere stellen eine Quelle von Proteasen wie Trypsinase und Cathepsin G dar, deren Spiegel im Blut adipöser Patienten erhöht sind. Ihre Funktion im Fettgewebe ist bisher nicht ausreichend bekannt. Diese Proteasen sind Liganden für die Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR), von welchen bisher vier identifiziert wurden. PAR-2 und PAR-4 werden von Adipozyten exprimiert, wobei PAR-2 bereits in Verbindung mit Adipositas beschrieben wurde.

In dieser Arbeit wurde die Rolle von PAR-4 während der Adipozytenreifung untersucht. Dafür wurde ein Zellkulturmodell entwickelt, bestehend aus 3T3-L1 Zellen, welche mit selektiven PAR-aktivierenden Peptiden behandelt wurden. In weiterführenden Experimenten inkubierten wir reife Adipozyten mit Medien, welche Proteasen aus murinen peritonealen Mastzellen enthielten.

Ich konnte zeigen, dass eine PAR-2 Stimulation die Fettakkumulation in reifenden Adipozyten fördert. Ein proadipogener Effekt von PAR-2 wurde bereits bei Mäusen beschrieben und hier erstmals in der Zellkultur gezeigt. Eine PAR-4 Stimulation hatte einen gänzlich anderen Effekt auf die reifenden Adipozyten; es schien die Reifung zu unterdrücken. Die Ergebnisse zeigten, dass das PAR-4 aktivierende Peptid (AP) einen mitogenen Effekt auf die Zellen hatte, was sich durch eine Zunahme der Zellzahl und eine Abnahme der Fettakkumulation zeigte. Darüber hinaus förderte es die Expression von antiapoptotischen und von proliferativen Genen wie *Birc3* und *Ki67*. Eine Inkubation der Zellen mit der PAR-4 aktivierenden Protease Cathepsin G zeigte ähnliche Effekte.

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss von Mastzell-konditioniertem Medium (MCCM) auf reifende 3T3-L1 Zellen demonstriert. Die Ergebnisse zeigten unter Einfluss von MCCM einen pro-adipogenen Effekt. Durch die Verwendung von PAR-4 / Cathepsin G Inhibitoren konnte ich die PAR-4 bzw. Cathepsin G vermittelten Effekte aufzeigen, welche aus einer intensivierten Lipidakkumulation bestanden. Des Weiteren kam es zu einer Induktion der *IL6* Expression durch PAR-4. IL6 ist ein Adipokin, welches im weißen Fettgewebe (WAT) in Zusammenhang mit einer Verschlechterung der Insulinresistenz steht.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass Mastzellen und die von ihnen ausgehenden Proteasen zu einer Inflammation im Fettgewebe beitragen könnten. Ein Mediator könnte PAR-4 sein, dessen Aktivierung in der Fettzelle während der Reifung zu einer Sekretion von IL6 führt. Der mitogene Effekt einer PAR-4 Aktivierung könnte im Organismus zu einer größeren Anzahl an Fettzellen führen, die im schlanken Menschen zu einer besseren metabolischen Gesundheit oder im adipösen Patienten zu einer schlechteren Insulinresistenz beitragen könnte.

6 Summary

Obesity is one of the most serious threats to our metabolic health. It is commonly accepted that adipose tissue is not merely an insulator keeping the body warm. The discovery of adipokines has highlighted adipose tissue as an endocrine organ. Recent research has increased understanding of the role of various immune cells in the adipose tissue, which influence not only the health of adipose tissue itself but that of the whole organism which hosts them. In particular, adipose tissue plays a major role in influencing insulin sensitivity.

Macrophages play a crucial role in promoting insulin resistance in the adipose tissue. They intensely infiltrate the white adipose tissue (WAT) at the onset of obesity, accompanied (or even preceded) by other immune cells such as mast cells and neutrophil granulocytes. The latter two are a source of proteases such as tryptase and cathepsin G, which show elevated concentrations in the bloodstream of obese individuals. Their precise action in adipose tissue had not been systematically studied so far. The cellular effects of such proteases are mediated through protease-activated receptors (PAR), of which four isoforms have been identified. PAR-2 and PAR-4 are expressed on adipocytes, and PAR-2 has been linked to promoting obesity in mice.

This study was set up to evaluate which role PAR-4 plays during adipocyte differentiation. I utilized an established cell-culture model, consisting of the murine 3T3-L1 cell line and treated the cells with selectively activating PAR agents. In advanced experiments, maturing adipocytes were incubated with medium containing proteases derived from murine peritoneal mast cells.

I was able to demonstrate for the first time that PAR-2 stimulation directly promotes lipid accumulation in maturing adipocytes, in keeping with a previously reported pro-adipogenic effect of PAR-2 in mice. By contrast, I observed an inhibition of adipocyte maturation when cells were exposed to PAR-4 stimulants during differentiation. I could show that the PAR-4 activating peptide exerts mitogenic actions in preadipocytes, as it elevated cell numbers and lowered lipid accumulation. PAR-4 activation further increased the expression of anti-apoptotic and proliferative genes such as *Birc3* and *Ki67*. Very similar findings were obtained by incubating the cells with cathepsin G, a protease released by mast cells and neutrophils.

In further experiments, the influence of mast cell-conditioned medium on maturing 3T3-L1 cells was examined. Results implicate a pro-adipogenic effect mediated by mast cell proteases, since exposure to conditioned medium from degranulated mast cells (MCCM)

further increased lipid accumulation in differentiating cells. This was enhanced to an even greater extent when MCCM was pretreated with cathepsin G or PAR-4 inhibitors, confirming an anti-adipogenic response to cathepsin G / PAR-4 signaling. Another striking finding was that activation of the cathepsin G / PAR-4 pathway by MCCM seems to boost adipocyte expression of IL6 – an adipokine which has been linked to promoting insulin resistance in the adipose WAT.

Thus, mast cell-derived proteases might add to the inflammation of the WAT, resulting in a poorer metabolic health. One crucial candidate mediator is PAR-4, potentially promoting insulin resistance by stimulating the maturing adipocyte to release IL6. The mitogenic effect of PAR-4 stimulation might add to a higher number of fat cells, which could either result in a better metabolic health in lean individuals or in augmented insulin resistance in the obese.

7 Literaturverzeichnis

1. Lenz, M., T. Richter, and I. Muhlhauser, *The morbidity and mortality associated with overweight and obesity in adulthood: a systematic review*. Dtsch Arztebl Int, 2009. **106**(40): p. 641-8.
2. Go, A.S., et al., *Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association*. Circulation, 2014. **129**(3): p. e28-e292.
3. Kopelman, P.G., *Obesity as a medical problem*. Nature, 2000. **404**(6778): p. 635-43.
4. Wang, C.C., M.L. Goalstone, and B. Draznin, *Molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology*. Diabetes, 2004. **53**(11): p. 2735-40.
5. Keller, U., *From obesity to diabetes*. Int J Vitam Nutr Res, 2006. **76**(4): p. 172-7.
6. Grundy, S.M., et al., *Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement: Executive Summary*. Crit Pathw Cardiol, 2005. **4**(4): p. 198-203.
7. Isomaa, B., et al., *Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome*. Diabetes Care, 2001. **24**(4): p. 683-9.
8. Stumvoll, M., B.J. Goldstein, and T.W. van Haeften, *Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy*. Lancet, 2005. **365**(9467): p. 1333-46.
9. Foster, D.O. and M.L. Frydman, *Nonshivering thermogenesis in the rat. II. Measurements of blood flow with microspheres point to brown adipose tissue as the dominant site of the calorogenesis induced by noradrenaline*. Can J Physiol Pharmacol, 1978. **56**(1): p. 110-22.
10. Grether-Beck and Krutmann, *Fettgewebe. Zelluläre und molekulare Grundlagen. Adipose tissue. Cellular and molecular principles in Der Hautarzt*. 2010.
11. Bourlier, V., et al., *Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages*. Circulation, 2008. **117**(6): p. 806-15.
12. Henegar, C., et al., *Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity*. Genome Biol, 2008. **9**(1): p. R14.
13. Hausman, D.B., et al., *The biology of white adipocyte proliferation*. Obes Rev, 2001. **2**(4): p. 239-54.
14. Hirsch, J. and B. Batchelor, *Adipose tissue cellularity in human obesity*. Clin Endocrinol Metab, 1976. **5**(2): p. 299-311.
15. Gregoire, F.M., C.M. Smas, and H.S. Sul, *Understanding adipocyte differentiation*. Physiol Rev, 1998. **78**(3): p. 783-809.
16. Scott, R.E., et al., *Coupling of growth arrest and differentiation at a distinct state in the G1 phase of the cell cycle: GD*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(3): p. 845-9.
17. Tang, Q.Q., T.C. Otto, and M.D. Lane, *Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(1): p. 44-9.
18. Torres-Leal, F.L., et al., *Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance*. 2012.
19. Ntambi, J.M. and K. Young-Cheul, *Adipocyte differentiation and gene expression*. J Nutr, 2000. **130**(12): p. 3122s-3126s.
20. Umek, R.M., A.D. Friedman, and S.L. McKnight, *CCAAT-enhancer binding protein: a component of a differentiation switch*. Science, 1991. **251**(4991): p. 288-92.
21. Chawla, A., et al., *Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files*. Science, 2001. **294**(5548): p. 1866-70.
22. Tontonoz, P., et al., *Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR gamma and RXR alpha*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(25): p. 5628-34.
23. Tontonoz, P., et al., *PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(1): p. 351-7.

24. Rosen, E.D. and B.M. Spiegelman, *Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis*. Nature, 2006. **444**(7121): p. 847-53.
25. Hajer, G.R., T.W. van Haeften, and F.L. Visseren, *Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases*. Eur Heart J, 2008. **29**(24): p. 2959-71.
26. Lee, M.J., Y. Wu, and S.K. Fried, *Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2010. **13**(4): p. 371-6.
27. Sun, K., C.M. Kusminski, and P.E. Scherer, *Adipose tissue remodeling and obesity*. J Clin Invest, 2011. **121**(6): p. 2094-101.
28. Hausman, G.J. and R.L. Richardson, *Adipose tissue angiogenesis*. J Anim Sci, 2004. **82**(3): p. 925-34.
29. Halberg, N., I. Wernstedt-Asterholm, and P.E. Scherer, *The adipocyte as an endocrine cell*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2008. **37**(3): p. 753-68, x-xi.
30. Olefsky, J.M. and C.K. Glass, *Macrophages, inflammation, and insulin resistance*. Annu Rev Physiol, 2010. **72**: p. 219-46.
31. Johnson, A.R., J.J. Milner, and L. Makowski, *The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity*. Immunol Rev, 2012. **249**(1): p. 218-38.
32. Poulain-Godefroy, O. and P. Froguel, *Preadipocyte response and impairment of differentiation in an inflammatory environment*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **356**(3): p. 662-7.
33. Poulain-Godefroy, O., et al., *Inflammatory role of Toll-like receptors in human and murine adipose tissue*. Mediators Inflamm, 2010. **2010**: p. 823486.
34. Schweiger, M., et al., *Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism*. J Biol Chem, 2006. **281**(52): p. 40236-41.
35. Boden, G. and G.I. Shulman, *Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction*. Eur J Clin Invest, 2002. **32 Suppl 3**: p. 14-23.
36. Unger, R.H. and L. Orci, *Lipotoxic diseases of nonadipose tissues in obesity*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2000. **24 Suppl 4**: p. S28-32.
37. Siiteri, P.K., *Adipose tissue as a source of hormones*. Am J Clin Nutr, 1987. **45**(1 Suppl): p. 277-82.
38. Gutierrez, D.A., M.J. Puglisi, and A.H. Hasty, *Impact of increased adipose tissue mass on inflammation, insulin resistance, and dyslipidemia*. Curr Diab Rep, 2009. **9**(1): p. 26-32.
39. Kershaw, E.E. and J.S. Flier, *Adipose Tissue as an Endocrine Organ*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2004. **89**(6): p. 2548-2556.
40. Fantuzzi, G., *Adipose tissue, adipokines, and inflammation*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(5): p. 911-9; quiz 920.
41. Weisberg, S.P., et al., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1796-808.
42. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature, 1994. **372**(6505): p. 425-32.
43. Ahima, R.S., et al., *Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting*. Nature, 1996. **382**(6588): p. 250-2.
44. Bellingan, G.J., et al., *In vivo fate of the inflammatory macrophage during the resolution of inflammation: inflammatory macrophages do not die locally, but emigrate to the draining lymph nodes*. J Immunol, 1996. **157**(6): p. 2577-85.
45. Han, C.Y., et al., *Adipocyte-derived serum amyloid A3 and hyaluronan play a role in monocyte recruitment and adhesion*. Diabetes, 2007. **56**(9): p. 2260-73.
46. Reaven, G.M., *Why Syndrome X? From Harold Himsworth to the insulin resistance syndrome*. Cell Metab, 2005. **1**(1): p. 9-14.
47. Shepherd, P.R. and B.B. Kahn, *Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus*. N Engl J Med, 1999. **341**(4): p. 248-57.
48. Herold, G., *Innere Medizin*. 2012, Köln: Gerd Herold und Mitarbeiter.

49. DeFronzo, R.A., *Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes*. Diabetes Reviews, 1997. **5**(3): p. 177-269.
50. Kelley, D.E., M. Mokan, and L.J. Mandarino, *Intracellular defects in glucose metabolism in obese patients with NIDDM*. Diabetes, 1992. **41**(6): p. 698-706.
51. Abel, E.D., et al., *Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver*. Nature, 2001. **409**(6821): p. 729-33.
52. Reaven, G.M., *Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease*. Diabetes, 1988. **37**(12): p. 1595-607.
53. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2005. **28 Suppl 1**: p. S37-42.
54. Maquoi, E., et al., *Modulation of adipose tissue expression of murine matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors with obesity*. Diabetes, 2002. **51**(4): p. 1093-101.
55. Sun, K., et al., *Fibrosis and adipose tissue dysfunction*. Cell Metab, 2013. **18**(4): p. 470-7.
56. Rosen, E.D. and B.M. Spiegelman, *What we talk about when we talk about fat*. Cell, 2014. **156**(1-2): p. 20-44.
57. Kanneganti, T.D. and V.D. Dixit, *Immunological complications of obesity*. Nat Immunol, 2012. **13**(8): p. 707-12.
58. Gordon, S., *The macrophage*. Bioessays, 1995. **17**(11): p. 977-86.
59. Mantovani, A., et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. Trends Immunol, 2004. **25**(12): p. 677-86.
60. Kawanishi, N., et al., *Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice*. Exerc Immunol Rev, 2010. **16**: p. 105-18.
61. Elgazar-Carmon, V., et al., *Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding*. J Lipid Res, 2008. **49**(9): p. 1894-903.
62. Xu, J.M. and G.P. Shi, *Emerging role of mast cells and macrophages in cardiovascular and metabolic diseases*. Endocr Rev, 2012. **33**(1): p. 71-108.
63. Altintas, M.M., et al., *Mast cells, macrophages, and crown-like structures distinguish subcutaneous from visceral fat in mice*. J Lipid Res, 2011. **52**(3): p. 480-8.
64. Chaldakov, G.N., et al., *Adipose Tissue and Mast Cells*, in *Adipose Tissue and Adipokines in Health and Disease*, G. Fantuzzi and T. Mazzone, Editors. 2007, Humana Press: Totowa, NJ. p. 151-158.
65. Liu, J., et al., *Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 940-5.
66. Strissel, K.J., et al., *Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications*. Diabetes, 2007. **56**(12): p. 2910-8.
67. Xu, H., et al., *Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1821-30.
68. Wang, P., et al., *The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue*. J Cell Physiol, 2008. **216**(1): p. 3-13.
69. Scherer, P.E., *Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ*. Diabetes, 2006. **55**(6): p. 1537-45.
70. Tajiri, Y., K. Mimura, and F. Umeda, *High-sensitivity C-reactive protein in Japanese patients with type 2 diabetes*. Obes Res, 2005. **13**(10): p. 1810-6.
71. Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman, *Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance*. Science, 1993. **259**(5091): p. 87-91.
72. Cai, D., et al., *Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB*. Nat Med, 2005. **11**(2): p. 183-90.

73. Shoelson, S.E., J. Lee, and M. Yuan, *Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2003. **27 Suppl 3**: p. S49-52.
74. Karlsson, C., et al., *Human adipose tissue expresses angiotensinogen and enzymes required for its conversion to angiotensin II*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(11): p. 3925-9.
75. Schechter, N.M., et al., *Identification of a cathepsin G-like proteinase in the MCTC type of human mast cell*. J Immunol, 1990. **145**(8): p. 2652-61.
76. Shi, G., *Mast cell stabilizers in the treatment of obesity*. 2009, Google Patents.
77. Vergnolle, N., et al., *Protease-activated receptors in inflammation, neuronal signaling and pain*. Trends Pharmacol Sci, 2001. **22**(3): p. 146-52.
78. Coughlin, S.R., *Thrombin signalling and protease-activated receptors*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 258-64.
79. Dery, O. and N.W. Bunnett, *Proteinase-activated receptors: a growing family of heptahelical receptors for thrombin, trypsin and tryptase*. Biochem Soc Trans, 1999. **27**(2): p. 246-54.
80. Vu, T.K., et al., *Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation*. Cell, 1991. **64**(6): p. 1057-68.
81. Ishihara, H., et al., *Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans*. Nature, 1997. **386**(6624): p. 502-6.
82. Xu, W.F., et al., *Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 6642-6.
83. Coughlin, S.R. and E. Camerer, *PARTicipation in inflammation*. J Clin Invest, 2003. **111**(1): p. 25-7.
84. Adams, M.N., et al., *Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors*. Pharmacol Ther, 2011. **130**(3): p. 248-82.
85. Sambrano, G.R., et al., *Cathepsin G activates protease-activated receptor-4 in human platelets*. J Biol Chem, 2000. **275**(10): p. 6819-23.
86. Soh, U.J., et al., *Signal transduction by protease-activated receptors*. Br J Pharmacol, 2010. **160**(2): p. 191-203.
87. Hollenberg, M.D., et al., *Proteinase-activated receptors: structural requirements for activity, receptor cross-reactivity, and receptor selectivity of receptor-activating peptides*. Can J Physiol Pharmacol, 1997. **75**(7): p. 832-41.
88. Hollenberg, M.D. and M. Saifeddine, *Proteinase-activated receptor 4 (PAR4): activation and inhibition of rat platelet aggregation by PAR4-derived peptides*. Can J Physiol Pharmacol, 2001. **79**(5): p. 439-42.
89. Cheung, W.M., et al., *Altered vascular injury responses in mice deficient in protease-activated receptor-1*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(12): p. 3014-24.
90. Song, S.J., et al., *The role of protease-activated receptor-1 in bone healing*. Am J Pathol, 2005. **166**(3): p. 857-68.
91. Jenkins, R.G., et al., *Ligation of protease-activated receptor 1 enhances alpha(v)beta6 integrin-dependent TGF-beta activation and promotes acute lung injury*. J Clin Invest, 2006. **116**(6): p. 1606-14.
92. Alberelli, M.A. and E. De Candia, *Functional role of protease activated receptors in vascular biology*. Vascul Pharmacol, 2014. **62**(2): p. 72-81.
93. Riewald, M. and W. Ruf, *Science review: role of coagulation protease cascades in sepsis*. Crit Care, 2003. **7**(2): p. 123-9.
94. Antoniak, S., et al., *Protease-activated receptor 2 deficiency reduces cardiac ischemia/reperfusion injury*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(11): p. 2136-42.
95. Afkhami-Goli, A., et al., *Proteinase-activated receptor-2 exerts protective and pathogenic cell type-specific effects in Alzheimer's disease*. J Immunol, 2007. **179**(8): p. 5493-503.
96. Busso, N., et al., *Evaluation of protease-activated receptor 2 in murine models of arthritis*. Arthritis Rheum, 2007. **56**(1): p. 101-7.

97. Kawagoe, J., et al., *Effect of protease-activated receptor-2 deficiency on allergic dermatitis in the mouse ear*. Jpn J Pharmacol, 2002. **88**(1): p. 77-84.
98. Weiss, E.J., et al., *Protection against thrombosis in mice lacking PAR3*. Blood, 2002. **100**(9): p. 3240-4.
99. Sambrano, G.R., et al., *Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis*. Nature, 2001. **413**(6851): p. 74-8.
100. Zhang, N. and D.A. Lawrence, *Tissue factor and obesity, a two-way street*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1343-4.
101. Badeanlou, L., et al., *Tissue factor-protease-activated receptor 2 signaling promotes diet-induced obesity and adipose inflammation*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1490-7.
102. Mihara, M., et al., *Inhibition of thrombin action ameliorates insulin resistance in type 2 diabetic db/db mice*. Endocrinology, 2010. **151**(2): p. 513-9.
103. van den Berghe, N., et al., *Activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase signaling pathway alone is not sufficient to induce glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(4): p. 2372-7.
104. Strande, J.L. and S.A. Phillips, *Thrombin increases inflammatory cytokine and angiogenic growth factor secretion in human adipose cells in vitro*. J Inflamm (Lond), 2009. **6**: p. 4.
105. Lim, J., et al., *Diet-induced obesity, adipose inflammation, and metabolic dysfunction correlating with PAR2 expression are attenuated by PAR2 antagonism*. Faseb j, 2013. **27**(12): p. 4757-67.
106. Beijers, H.J., et al., *Body composition as determinant of thrombin generation in plasma: the Hoorn study*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(12): p. 2639-47.
107. Carr, M.E., *Diabetes mellitus: a hypercoagulable state*. J Diabetes Complications, 2001. **15**(1): p. 44-54.
108. Dangwal, S., et al., *High glucose enhances thrombin responses via protease-activated receptor-4 in human vascular smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(3): p. 624-33.
109. Ritchie, E., et al., *Cytokine upregulation of proteinase-activated-receptors 2 and 4 expression mediated by p38 MAP kinase and inhibitory kappa B kinase beta in human endothelial cells*. Br J Pharmacol, 2007. **150**(8): p. 1044-54.
110. Hamilton, J.R., A.G. Frauman, and T.M. Cocks, *Increased expression of protease-activated receptor-2 (PAR2) and PAR4 in human coronary artery by inflammatory stimuli unveils endothelium-dependent relaxations to PAR2 and PAR4 agonists*. Circ Res, 2001. **89**(1): p. 92-8.
111. Pavic, G., et al., *Thrombin receptor protease-activated receptor 4 is a key regulator of exaggerated intimal thickening in diabetes mellitus*. Circulation, 2014. **130**(19): p. 1700-11.
112. Agency, H.P. *Health Protection Agency culture collections*. [cited 2015; Available from: http://www.hpacultures.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=86052701&collection=ecacc_gc.
113. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
114. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
115. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
116. Lee, B.C. and J. Lee, *Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(3): p. 446-62.

117. Bost, F., et al., *The extracellular signal-regulated kinase isoform ERK1 is specifically required for in vitro and in vivo adipogenesis*. *Diabetes*, 2005. **54**(2): p. 402-11.
118. Ruan, H., et al., *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*, 2002. **51**(5): p. 1319-36.
119. Lee, J.Y., et al., *Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(20): p. 16683-9.
120. Deshmane, S.L., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview*. *J Interferon Cytokine Res*, 2009. **29**(6): p. 313-26.
121. Alam, R., et al., *Macrophage inflammatory protein-1 alpha and monocyte chemoattractant peptide-1 elicit immediate and late cutaneous reactions and activate murine mast cells in vivo*. *J Immunol*, 1994. **152**(3): p. 1298-303.
122. Margetic, S., et al., *Leptin: a review of its peripheral actions and interactions*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2002. **26**(11): p. 1407-33.
123. Tang, Q.Q., et al., *Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein beta by MAPK and glycogen synthase kinase 3beta is required for adipogenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(28): p. 9766-71.
124. Guo, L., X. Li, and Q.Q. Tang, *Transcriptional regulation of adipocyte differentiation: a central role for CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) beta*. *J Biol Chem*, 2015. **290**(2): p. 755-61.
125. Kowenz-Leutz, E., et al., *Crosstalk between C/EBPbeta phosphorylation, arginine methylation, and SWI/SNF/Mediator implies an indexing transcription factor code*. *Embo j*, 2010. **29**(6): p. 1105-15.
126. Kidani, T., et al., *Bisphenol A downregulates Akt signaling and inhibits adiponectin production and secretion in 3T3-L1 adipocytes*. *J Atheroscler Thromb*, 2010. **17**(8): p. 834-43.
127. Scholzen, T. and J. Gerdes, *The Ki-67 protein: from the known and the unknown*. *J Cell Physiol*, 2000. **182**(3): p. 311-22.
128. Maumus, M., et al., *Evidence of in situ proliferation of adult adipose tissue-derived progenitor cells: influence of fat mass microenvironment and growth*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008. **93**(10): p. 4098-106.
129. Ruan, H., et al., *Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor-alpha: implications for insulin resistance*. *Diabetes*, 2002. **51**(11): p. 3176-88.
130. Gerhardt, C.C., et al., *Chemokines control fat accumulation and leptin secretion by cultured human adipocytes*. *Mol Cell Endocrinol*, 2001. **175**(1-2): p. 81-92.
131. Nguyen, M.T., et al., *A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(48): p. 35279-92.
132. Shi, H., et al., *TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(11): p. 3015-25.
133. Saberi, M., et al., *Hematopoietic cell-specific deletion of toll-like receptor 4 ameliorates hepatic and adipose tissue insulin resistance in high-fat-fed mice*. *Cell Metab*, 2009. **10**(5): p. 419-29.
134. Rifkin, I.R., et al., *Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease*. *Immunol Rev*, 2005. **204**: p. 27-42.
135. Papineau, D., A. Gagnon, and A. Sorisky, *Apoptosis of human abdominal preadipocytes before and after differentiation into adipocytes in culture*. *Metabolism*, 2003. **52**(8): p. 987-92.
136. Kostyuk, S., et al., *GC-Rich Extracellular DNA Induces Oxidative Stress, Double-Strand DNA Breaks, and DNA Damage Response in Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells*. *Oxid Med Cell Longev*, 2015. **2015**: p. 782123.

137. Yin, Z., et al., *Transcriptome analysis of human adipocytes implicates the NOD-like receptor pathway in obesity-induced adipose inflammation*. Mol Cell Endocrinol, 2014. **394**(1-2): p. 80-7.
138. Spalding, K.L., et al., *Dynamics of fat cell turnover in humans*. Nature, 2008. **453**(7196): p. 783-7.
139. Arner, E., et al., *Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology*. Diabetes, 2010. **59**(1): p. 105-9.
140. Qiu, J., et al., *Simultaneous labeling of mast cell proteases and protease mRNAs at the bone-implant interface of aseptically loosened hip implants*. J Orthop Res, 2005. **23**(4): p. 942-8.
141. Irani, A.A., et al., *Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(12): p. 4464-8.
142. Pham, C.T., *Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(7): p. 541-50.
143. Lin, Y., et al., *The lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes*. J Biol Chem, 2000. **275**(32): p. 24255-63.
144. Choy, L.N., B.S. Rosen, and B.M. Spiegelman, *Adipsin and an endogenous pathway of complement from adipose cells*. J Biol Chem, 1992. **267**(18): p. 12736-41.
145. Bes-Houtmann, S., et al., *Presence of functional TLR2 and TLR4 on human adipocytes*. Histochem Cell Biol, 2007. **127**(2): p. 131-7.
146. French, S.L. and J.R. Hamilton, *Protease-activated receptor 4: from structure to function and back again*. Br J Pharmacol, 2016.
147. Ramachandran, R., et al., *Inflammatory mediators modulate thrombin and cathepsin-G signaling in human bronchial fibroblasts by inducing expression of proteinase-activated receptor-4*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **292**(3): p. L788-98.
148. Chatterjee, S., A. Sharma, and D. Mukherjee, *PAR-1 antagonists: current state of evidence*. J Thromb Thrombolysis, 2013. **35**(1): p. 1-9.
149. Reaven, G.M., *Insulin resistance: the link between obesity and cardiovascular disease*. Med Clin North Am, 2011. **95**(5): p. 875-92.
150. Regnier, S.M. and R.M. Sargis, *Adipocytes under assault: environmental disruption of adipose physiology*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(3): p. 520-33.

8 Danksagung

Mein allergrößter Dank gilt meiner Mutter und meinem Vater. Sie haben mich in allen Lebenslagen immer und bestmöglich unterstützt. Ich könnte mir keine besseren Eltern vorstellen, denn auf euch kann man sich immer verlassen. Ich werde euch ewig dankbar sein! Danke auch an Thomas für den Rückhalt und das Ertragen vieler Sinneskrisen.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Anke Fender bedanken. Du bist in der Zeit, in der diese Arbeit wuchs, nicht nur Felix' und Jules Mama geworden, sondern warst auch immer für mich da. Das schätze ich sehr und ich hoffe, wir werden noch lange Freunde bleiben. Ich danke dir für die vielen anregenden Diskussionen, deine Unterstützung im Labor und vor allem deine ewige Geduld mit mir. Wir hatten wirklich viele verrückte Ideen.

Herrn Prof. Timm Filler danke ich für die lange Zusammenarbeit während der Zeit des Studiums und darüber hinaus. Besonderen Dank für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Allen Mitarbeitern des Instituts für klinische Pharmakologie möchte ich von ganzem Herzen für die vielen Mühen danken und vor allem für die Geduld, die sie mit mir hatten. Meine Fragen schienen endlos zu sein, und doch wurde mir stets geholfen und eine Lösung für die vielen Problemchen gefunden, die mir während der Arbeit im Institut so begegneten. Es war eine sehr lehrreiche Zeit. Der pinke Kittel wird mich für immer daran erinnern.

Vor allem für die Hilfe von Julia Maier und Sören Twarock, die zu allen Tages- und Nachtzeiten von mir hörten, bin ich sehr dankbar. Wir haben viel gelacht und diskutiert und hatten wahnsinnige Geistesblitze. Ohne euch wäre ich nicht so weit gekommen.

9 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht verwendet und den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit nur an der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt habe und diese nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Düsseldorf, den 04.04.2016

Vivien Fischinger