

# **Regulation und Expression des antimikrobiellen Peptids Cathelicidin**

Inaugural- Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Humanmedizin

der Justus- Liebig- Universität Gießen

vorgelegt von Leonie Rebekka Mattern

aus Thurgau/ Schweiz

2026

# **Regulation und Expression des antimikrobiellen Peptids Cathelicidin**

Inaugural- Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Humanmedizin

der Justus- Liebig- Universität Gießen

vorgelegt von Leonie Rebekka Mattern

aus Thurgau/ Schweiz

2026

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Klinik und Poliklinik III für Innere Medizin und Endokrinologie

Labor für Molekulare Endokrinologie

Gutachter: Prof. Dr. med Andreas Schäffler

Gutachter: PD. Dr. med. univ. Ulrich Matt, PhD

Tag der Disputation: 14.01.2026

Anmerkung:

Teile der vorliegenden Arbeit konnten mit meiner Co-Autorenschaft im Rahmen einer wissenschaftlichen Publikation bereits publiziert werden:

Höpfinger A, Schmid A, Schweitzer L, Marissa Patz, Anja Weber, Andreas Schäffler, Thomas Karrasch

Regulation of Cathelicidin Antimicrobial Peptide (CAMP) Gene Expression by TNF $\alpha$  and cfDNA in Adipocytes.

*International Journal of Molecular Science*. 2023;24(21). doi:10.3390/ijms242115820.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Fettgewebe.....	1
1.1.1	Anatomie des Fettgewebes.....	1
1.1.2	Aufbau des Fettgewebes.....	2
1.1.2.1	Das weiße Fettgewebe .....	2
1.1.2.2	Das braune Fettgewebe .....	3
1.1.3	Endokrine Rolle des Fettgewebes .....	5
1.2	Die Rolle des Fettgewebes im Immunsystem .....	7
1.3	Innate Rezeptoren des Fettgewebes.....	9
1.3.1	Toll- <i>like</i> -Rezeptoren (TLRs).....	9
1.3.2	<i>Nod-like</i> -Rezeptoren .....	11
1.4	Signalmoleküle des Fettgewebes .....	13
1.4.1	Sekretionsmoleküle .....	13
1.4.2	Antimikrobielle Peptide .....	14
1.5	Das antimikrobielle Peptid Cathelicidin (CAMP).....	16
1.5.1	Aufbau und Expression.....	16
1.5.2	Einflussfaktoren.....	16
1.5.3	Rolle im Immunsystem.....	17
1.5.3.1	Regulierung durch Toll- <i>like</i> -Rezeptoren.....	18
1.5.4	Die Rolle des humanen Cathelicidins LL-37 .....	20
1.5.4.1	Aufbau und Vorkommen .....	20
1.5.4.2	Wirkung .....	21
1.6	Zielsetzung der Arbeit .....	23
2	Material und Methoden .....	24
2.1	Materialien, Geräte und Chemikalien .....	24
2.2	Zellkulturversuche an den Zellen der murinen 3T3-L1 Linie.....	30
2.2.1	Aussäen und Splitten der Zellen .....	30

2.2.2	Differenzierung der Zellen .....	31
2.2.3	Durchführung eines Stimulationsversuches .....	35
2.2.4	Durchführung der Zellernte .....	38
2.2.5	Bestimmung der Vitalität der Zellen .....	39
2.2.6	Generelles Prinzip des LDH-Assay.....	39
2.2.7	Durchführung des LDH-Tests .....	40
2.2.8	Bestimmung der Proteinkonzentration mithilfe des BCA-Tests.....	41
2.2.9	Prinzip des BCA-Assays.....	41
2.2.10	Durchführung des BCA-Assays.....	42
2.3	Zellkulturversuche an der SGBS-Zelllinie .....	43
2.3.1	Auftauen und Aussaat der SGBS-Adipozyten.....	43
2.3.2	Differenzierung der SGBS-Adipozyten.....	43
2.3.3	Stimulation der SGBS-Adipozyten .....	47
2.4	Quantifizierung der CAMP-Expression.....	47
2.4.1	Isolation der RNA.....	47
2.4.2	Durchführung der RNA-Isolation .....	47
2.4.3	Ermittlung der Konzentration der gewonnenen RNA .....	49
2.5	Gewinnung der cDNA durch reverse Transkription.....	49
2.5.1	Generelles Prinzip der reversen Transkription.....	49
2.5.2	Durchführung der reversen Transkription .....	49
2.6	Bestimmung der CAMP-Expression mittels Realtime-PCR.....	50
2.6.1	Generelles Prinzip der Realtime-PCR.....	50
2.6.2	Durchführung der PCR .....	52
2.7	Bestimmung der CAMP-Konzentration mittels ELISA .....	53
2.7.1	Generelles Prinzip des ELISA .....	53
2.7.2	Durchführung des ELISA-Tests.....	54
2.8	Versuche am Mausmodell.....	55
2.9	Statistische Auswertung .....	57
3	Ergebnisse.....	58

3.1	Genexpressionsanalyse (PCR).....	58
3.1.1	Ergebnisse der 3T3-L1-Zellkulturversuche.....	58
3.1.2	Ergebnisse der SGBS-Zellkulturversuche .....	69
3.2	ELISA.....	70
3.2.1	Quantifizierung von CAMP in murinen Blutseren .....	70
3.2.2	Proteinbestimmung aus Zellkulturversuchen .....	72
4	Diskussion.....	74
4.1	Allgemeine Diskussion.....	74
4.2	Spezielle Diskussion: CAMP im Zellversuch.....	75
4.2.1	CAMP-Regulation in 3T3-L1 Adipozyten und SGBS-Zellen .....	75
4.2.1.1	Toll- <i>like</i> -Rezeptoren .....	76
4.2.1.2	Nod- <i>like</i> -Rezeptoren .....	83
4.2.1.3	Zell-freie DNA.....	84
4.2.1.4	Signalwegsinhibitoren .....	84
4.3	Fazit und Ausblick.....	87
5	Zusammenfassung.....	90
6	Summary.....	92
7	Verzeichnisse .....	94
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	94
7.2	Tabellenverzeichnis.....	96
7.3	Abbildungsverzeichnis .....	96
7.4	Literaturverzeichnis .....	98
8	Ehrenwörtliche Erklärung .....	121
9	Publikationsverzeichnis .....	122
10	Danksagung .....	122

# 1 Einleitung

Die Zahl der übergewichtigen und adipösen Menschen steigt weltweit stetig an<sup>1</sup>. Auch in Deutschland nimmt die Prävalenz der Adipositas seit Jahren zu<sup>2</sup>. Laut Robert-Koch-Institut sind über zwei Drittel der Männer und etwa die Hälfte der Frauen in Deutschland übergewichtig; ein Viertel der Erwachsenen ist adipös<sup>3</sup>. *Per definitionem* handelt es sich ab einem *body mass index* (BMI) von  $\geq 25 \text{ kg/m}^2$  um Übergewicht und ab einem BMI von  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$  um Adipositas<sup>4</sup>. Es steht fest, dass Adipositas ein schwerwiegendes Gesundheitsproblem darstellt, da mit dieser Erkrankung ein erhöhtes Risiko für zahlreiche Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes Mellitus Typ 2, Dyslipidämie und verschiedene kardiovaskuläre Erkrankungen einhergehen. Aber auch weniger häufig mit Adipositas in Verbindung gebrachte Erkrankungen wie die Demenz, eine Erkrankung des zentralen Nervensystems, oder das obstruktive Schlafapnoesyndrom werden häufig bei Patienten mit Adipositas beobachtet<sup>5</sup>. Darüber hinaus ist die Diagnose und Behandlung der Adipositas oftmals schwierig oder erfolglos aufgrund des multifaktoriellen Entstehungsbildes dieser Krankheit<sup>6</sup>. Es ist daher von großer Bedeutung, zugrunde liegende molekularen Pathomechanismen zu verstehen, um neue Angriffspunkte im Fettstoffwechsel zu erkennen und zu erforschen.

## 1.1 Das Fettgewebe

### 1.1.1 Anatomie des Fettgewebes

Man unterscheidet grundsätzlich drei verschiedene Arten von Fettgewebe: weißes, braunes und rosa Fettgewebe, wobei der Anteil des weißen den größten Teil des menschlichen Fettgewebes ausmacht<sup>7</sup>. Wie viel weißes Fettgewebe ein Mensch besitzt, hängt von genetischen, umweltbedingten und metabolischen Faktoren ab<sup>8,9</sup>. Das Fettgewebe wird je nach Lage im Körper in zwei Kategorien unterteilt, die sich in ihrer Funktion unterscheiden: Zum einen das metabolisch unkritische subkutane Fettgewebe, welches den größten Anteil am weißen Fettgewebe darstellt<sup>10</sup>. Eine seiner vielen Funktionen besteht darin, den Energiespeicher für den Organismus bereitzustellen, sowie die Isolation des Körpers gegenüber der Umwelt, um eine Körperkerntemperatur von circa  $37^\circ\text{C}$  aufrecht zu halten<sup>7</sup>. Darüber hinaus spielt es eine wichtige metabolische Rolle, da es in der Lage ist, Hormone sowie Signalmoleküle zu produzieren, die den Stoffwechsel und auch das Immunsystem beeinflussen<sup>7,11,12</sup>. Auch immunologisch besitzt das subkutane Fettgewebe eine signifikante Bedeutung als lokaler Verteidigungsmechanismus gegen Infektionen und dient als Barriere gegenüber

äußeren Einflüssen<sup>13</sup>. Neben dem subkutanen Fettgewebe besitzt der menschliche Körper das metabolisch deletäre viszerale Fettgewebe. Es stellt prozentual einen wesentlich geringeren Anteil am Gesamtfettgewebe dar als das subkutane<sup>7,14</sup>. Das viszerale Fettgewebe, auch Bauchfett genannt, dient nicht nur als Bedeckung wichtiger Organe und Körperstrukturen, indem es lebenswichtige Gewebe polstert und schützt. Dieses Fettgewebe ist vor allem immunologisch besonders aktiv. Im Vergleich zu subkutanem Fettgewebe ist das viszerale besser vaskularisiert, innervierter und besitzt mehr inflammatorische und immuninvolvierte Zellen. Auch befinden sich im viszeralen Fettgewebe mehr aktive Glukokortikoide und Androgenrezeptoren als im Unterhautfettgewebe<sup>15</sup>. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass eine übermäßige Ansammlung von viszeralem im Vergleich zu subkutanem Fett eine starke pathogene Wirkung auf den Metabolismus hat. Die Ansammlung von viszeralem Fettgewebe steht in Zusammenhang mit einer verstärkten peripheren Insulinresistenz und einem systemischen, chronischen Entzündungszustand, der als Lipoinflammation bezeichnet wird<sup>16–18</sup>. Auch die pathologische Verbindung zwischen viszeralem Fett im Rahmen der Entwicklung einer Fettleber, zeigt die zentrale Rolle des viszeralen Fettgewebes bei metabolischen Erkrankungen: Es trägt durch eine vermehrte Freisetzung freier Fettsäuren (Lipolyse) und die daraus resultierende verstärkte Speicherung dieser im hepatischen Gewebe maßgeblich zur Entwicklung einer Fettleber bei<sup>19,20</sup>. Studien zeigten einen Zusammenhang von ektopen, viszeralen Fettablagerungen und Artherosklerose<sup>21–23</sup>. Hierzu konnten unter anderem auf molekularer Ebene sezernierte Faktoren des viszeralen Fettgewebes identifiziert werden, welche arterielle Entzündungen und so das Krankheitsbild der Artherosklerose fördern<sup>24</sup>.

## **1.1.2 Aufbau des Fettgewebes**

### **1.1.2.1 Das weiße Fettgewebe**

Die humanen Adipozyten des weißen Fettgewebes bestehen zu 90-99% aus Trilglyzeriden<sup>25</sup> und erreichen einen Durchmesser von bis zu 120µm<sup>7</sup>. Es wird auch als univakuoläres Fettgewebe bezeichnet, da sich lichtmikroskopisch in humanen Adipozyten zumeist nur ein großer Lipidtropfen befindet<sup>7</sup>. Weitere Zellen, die im Fettgewebe enthalten sind, sind Präadipozyten, Fibroblasten, Abwehrzellen, wie Monozyten und Leukozyten, sowie auch Endothelzellen, Makrophagen und die sogenannte Stroma-vaskuläre Fraktion, eine Subpopulation von vor allem Stammzellen<sup>26</sup>. Alle Adipozyten entstammen den mesenchymalen Stammzellen des Mesoderms. Diese pluripotenten mesenchymalen Stammzellen sind in der Lage, sich in

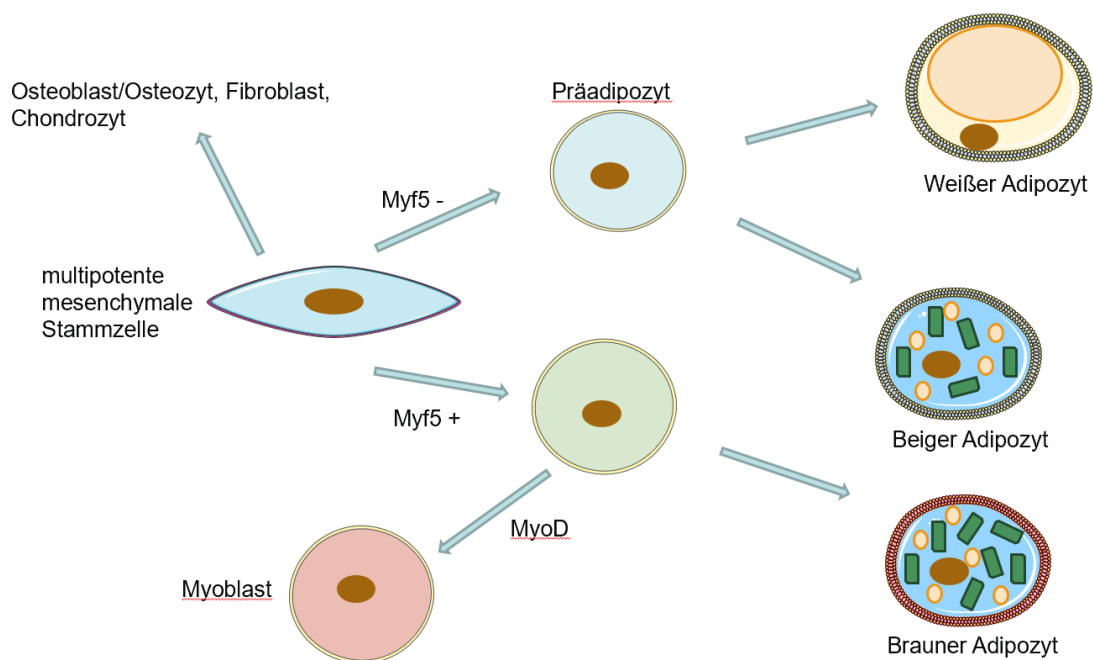
Adipozyten, Muskelzellen, Chondrozyten, Osteophyten und Fibroblasten zu differenzieren<sup>27,28</sup>. Eine Gruppe von Adipozyten wird jeweils von Bindegewebsfasern miteinander verbunden. So kommt es zur sogenannten „Kissenpolsterung“ und der damit verbesserten allgemeinen Funktion der Einbettung innerer Strukturen<sup>7</sup>. Sobald erkennbar ist, dass eine der mesenchymalen Stammzellen die Differenzierung zur Fettzelle beginnt, wird diese Präadipozyt genannt. Der Einfluss von genregulatorischen Proteinen der Peroxisom-Proliferator-aktivierten-Rezeptoren (PPAR)-Familie ist entscheidend für die Entwicklung zum Präadipozyt<sup>7,29</sup>. PPARs sind intrazellulär gelegene Kernrezeptoren, die als Transkriptionsfaktoren die Expression vieler Gene beeinflussen<sup>30</sup>. Bisher sind im menschlichen Organismus drei Subtypen der PPAR bekannt:  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$ ,  $\gamma$ . Diese Subtypen unterscheiden sich hinsichtlich ihres Genexpressionsmuster und ihrer Lokalisation<sup>31</sup>.

Ausdifferenzierte Adipozyten können sich im Gegensatz zu Präadipozyten nicht mehr mitotisch teilen. Allerdings besitzen Adipozyten eine hohe Plastizität. Bei einer Ernährung im Kalorienüberschuss kommt es zur Hypertrophie der Fettzellen durch Einlagerung von Triglyceriden. Dieser Mechanismus wird unter anderem Insulin-abhängig über einen sich an der Zellmembran befindenden Insulinrezeptor gesteuert<sup>7</sup>. Katecholamine wie Adrenalin fördern, wie auch Glukagon und Cortisol, wiederum die Freisetzung von Fettsäuren (Lipolyse)<sup>7,23</sup>. Die Fähigkeit, Lipide zu verstoffwechseln und damit aus dem Blutkreislauf zu eliminieren, lässt mit dem Alter des Menschen nach, wohingegen die Lipidaufnahme weitgehend konstant bleibt. Man nimmt an, dass dieser Effekt eine der Ursachen für eine leichtere Gewichtszunahme im Alter ist<sup>32</sup>. Bei fortgeschrittener Adipositas kommt es nicht nur zur Adipozytenhypertrophie, es können zudem neue Fettzellen gebildet werden (Hyperplasie). Hierbei spielen vor allem Wachstumshormone und der *Insulin-like growth factor-1* (IGF-1) eine Rolle<sup>7</sup>. Die Größe der Adipozyten ist ein Prädiktor für die Insulinresistenz und damit auch für das Risiko, an Diabetes-Typ-2 zu erkranken<sup>33,34</sup>.

### **1.1.2.2 Das braune Fettgewebe**

Braunes Fettgewebe, auch plurivakuoläres Fettgewebe genannt, besteht aus Adipozyten mit vermehrt kleinen Lipideinlagerungen, vielen Mitochondrien sowie Gefäßen, die die Zelle bräunlich erscheinen lassen. Es dient der Thermogenese und wirkt antidiabetisch und antiadipös<sup>7</sup>. Diese Zellen besitzen das Protein *uncoupling protein-1* (UCP-1), welches in den Mitochondrien die ATP- Bildung in der Atmungskette entkoppelt und damit zur Wärmebildung beiträgt. Zudem sind sie in der Lage, im Kreislauf zirkulierende Substrate zu oxidieren und damit die Stoffwechselrate zu

erhöhen<sup>7,35,36</sup>. Braune Fettzellen stammen von einer Progenitorzelle ab, welche den Transkriptionsfaktor myogener Faktor 5 (MyF5) exprimiert<sup>7</sup>. MyF5 gehört zu den myogenen regulatorischen Faktoren und spielt unter anderem auch eine Rolle auf transkriptioneller Ebene der Muskelbildung<sup>37</sup>. Daher kann sich diese Art von Adipozyten unter dem Einfluss des Transkriptionsfaktors MyoD auch zu Myoblasten differenzieren. Weiße Fettzellen besitzen MyF5 hingegen nicht<sup>7</sup>. Es gibt allerdings auch Myf5-negative Vorläuferzellen, welche sich dennoch von univakuolären, den weißen Adipozyten ähnelnden Zellen, zu plurivakuolären Fettzellen entwickeln können. Diese plurivakuolären Zellen werden „beiges“ Fettgewebe genannt<sup>7,38,39</sup>. Jenes Phänomen wurde vor allem unter Kälteexposition<sup>40,41</sup> und hormoneller Stimulation<sup>42,43</sup> beobachtet. Es ist bekannt, dass sich beim erwachsenen Menschen innerhalb des weißen Fettgewebes immer wieder Regionen von braunen Fettzellen und jeglichen Zwischenformen befinden<sup>7,44</sup>. Folgende Abbildung zeigt schematisch die Entwicklungs- und Differenzierungsschritte des Adipozyten (**Abbildung 1-1**).



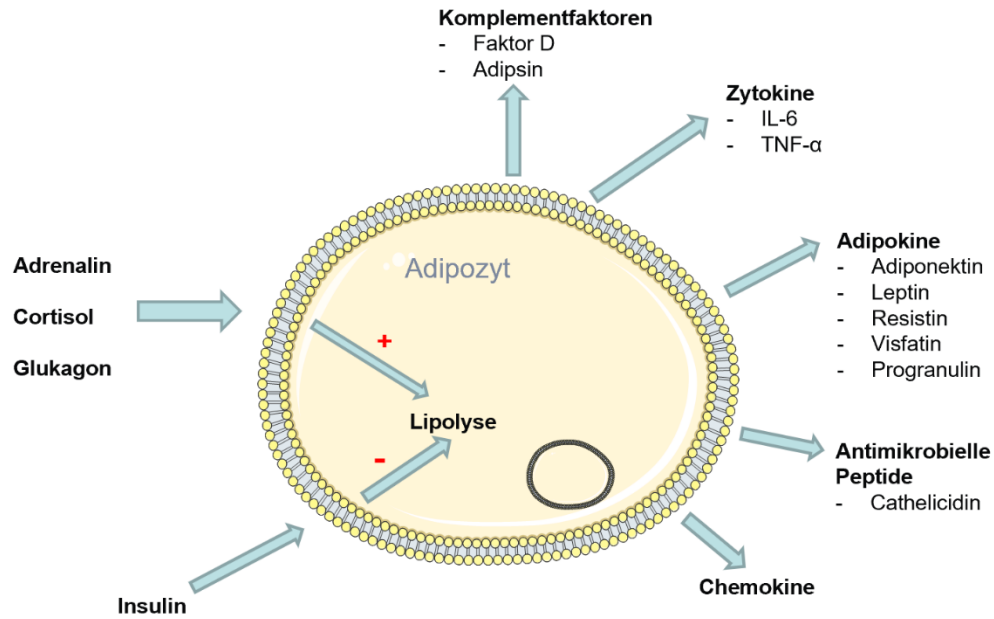
**Abbildung 1-1 Entwicklung der verschiedenen Fettzellen** Schematische Darstellung der zellulären Entwicklungs- und Differenzierungsschritte von mesenchymalen Stammzellen zu ausgewachsenen Adipozyten unter Einbeziehung von Transkriptionsfaktoren. (modifiziert nach Deller, Welsch et al. (Hg.) 2018<sup>7</sup>)

Seit kurzem bekannt sind auch die sogenannten rosafarbenen Adipozyten. Hierbei handelt es sich um im subkutanen Fettgewebe gebildete Fettzellen in der Schwangerschaft und in der Stillzeit<sup>45</sup>

### 1.1.3 Endokrine Rolle des Fettgewebes

Heute weiß man, dass das Fettgewebe eines der wichtigsten endokrinen Organe des menschlichen Körpers darstellt<sup>12,46</sup>. Auf Adipozyten wirken verschiedenste neuronale und endokrine Substanzen ein, woraufhin die Adipozyten in der Lage sind, durch Ausschüttung von Botenstoffen zu reagieren<sup>7,12</sup>. Die reifen Fettzellen besitzen spezifische Gene, für adipozytäre Marker, wie zum Beispiel den Transkriptionsfaktor PPAR- $\gamma$ , welcher eine große Rolle bei der Differenzierung während der Adipogenese spielt<sup>47</sup> : Eine Aktivierung des PPAR- $\gamma$  steigert die Aufnahme freier Fettsäuren in die Zelle und stimuliert andere Gene, welche für Lipidsynthese und intrazellulären Fettsäuretransport zuständig sind<sup>48-50</sup>.

Adipozyten sind zudem in der Lage, spezifische Hormone zu produzieren und zu sezernieren. Zu diesen gehören unter anderem zahlreiche Adipokine<sup>51</sup>. Auch Zytokine, Chemokine, Komplementfaktoren und das Enzym Adipsin werden von den Fettzellen des Menschen hergestellt<sup>7,52</sup>. Mit der Entdeckung des Adipokins Leptin, ein Peptidhormon, das Hunger- und Sättigungsgefühl reguliert, durch die Forschungsgruppe Zhang et al. im Jahr 1994 wurde die Bedeutung der adipozytären Hormone für den gesamten Organismus deutlich<sup>44,53</sup>. Heutzutage sind zahlreiche Adipokine bekannt, wie Adiponektin, Resistin, Visfatin<sup>16,45,7,26,54</sup>. Diese spielen eine Rolle in metabolischen Regelkreisen, aber auch bei der Hämostase, durch ihre Wirkung auf das Endothel, im Kreislaufgeschehen und bei der Reproduktion<sup>46,7,55</sup>. Durch diese Botenstoffe sind Adipozyten in der Lage, den gesamten Organismus zu beeinflussen. Zahlreiche Erkrankungen können deshalb heute unter anderem auf die endokrine Dysfunktion des Fettgewebes zurückgeführt werden. Hierzu zählen: Adipositas, Diabetes Mellitus Typ 2 und das polyzystische Ovarsyndrom<sup>45,54,55</sup>. Folgende Abbildung veranschaulicht schematisch einige Einflussfaktoren und Produkte der Adipozyten (**Abbildung 1-2**).



**Abbildung 1-2 Regulation des Adipozyten** (Schematische Abbildung der Einflussfaktoren auf Adipozyten sowie einer Auswahl ihrer sezernierten Produkte, die metabolische und inflammatorische Prozesse im Körper beeinflussen.) (modifiziert nach Deller, Welsch et al. (Hg.) 2018<sup>7</sup>). IL = Interleukin, TNF = Tumornekrosefaktor-alpha.

## 1.2 Die Rolle des Fettgewebes im Immunsystem

Das Fettgewebe spielt eine große Rolle im Immunsystem. Adipozyten sind unter anderem über die Sezernierung von Adipokinen in der Lage, einen pro- oder antiinflammatorischen Einfluss auf das Immunsystem zu nehmen<sup>11</sup>. Die Gründe, weshalb übermäßiges Fettgewebe metabolischen Stress verursacht, sind vielfältig. Zum einen weist ein expandiertes Fettpolster zunehmend eine gestörte Angiogenese auf, was zu einer lokalen Hypoxie führt. Dadurch wiederum kommt es zu einer Hypoxie-induzierten Fibrose, die zu erhöhtem zellulärem Stress, vermehrter Nekrose und chronischen Entzündungen führen kann<sup>56-58</sup>.

Die gestörte metabolische Funktion der Adipozyten zeigt sich am Beispiel der Adipositas: Normalgewichtige Menschen besitzen vornehmlich Adipozyten, welche antiinflammatorische Adipokine sezernieren, wie beispielsweise das Adiponektin<sup>11</sup>. Bei chronischer Adipositas dagegen kommt es zu einer signifikanten proinflammatorischen Umwandlung des Fettgewebes<sup>59</sup>. Die dysregulierte Sekretion von Zytokinen, Chemokinen und Adipokinen durch die betroffenen Adipozyten führt zu einer Störung des interzellulären Milieus sowie zu einer Insulinresistenz<sup>58, 60, 61</sup>.

Viszerales Fettgewebe exprimiert mehr proinflammatorische Gene und Zytokine als subkutanen. Diese Stoffe führen zu einer erhöhten Rekrutierung von Makrophagen in das Gewebe und einem überwiegend proinflammatorischen Milieu<sup>62</sup>. Die Infiltration von Makrophagen in das Omentalfett ist besonders bei stammbetonter Adipositas stark ausgeprägt, welche mit kardiovaskulären Begleiterkrankungen in Verbindung steht<sup>60, 63</sup>.

Die durch Hypertrophie der Zellen bedingte und durch Adipositas beschleunigte Nekrose der Adipozyten stellt einen starken phagozytären Stimulus dar, welcher die Infiltration von Makrophagen in das betroffene Gewebe reguliert<sup>64</sup>. Diese durch die Adipositas induzierten Immunzellen fördern weitere inflammatorische Prozesse<sup>56</sup> durch Sezernierung entzündungsfördernder Zytokine wie TNF-alpha, Interleukine und Chemokine<sup>59, 65-67</sup>. Adipozyten sind die Hauptakteure der lokalen Veränderungen des Fettgewebes bei Adipositas, allerdings deuten viele Hinweise darauf hin, dass auch adipös bedingte Veränderungen der im Fettgewebe residenten Makrophagen eine Rolle im chronischen Entzündungsprozess des Milieus spielen: Bei Adipositas wurde unter anderem eine Verschiebung des vorherrschenden Makrophagenphänotypes im Fettgewebe hin zu einem entzündungsfördernden (M1-)Phänotyp beobachtet<sup>68</sup>. Im schlanken Zustand sind residente Makrophagen eher auf eine entzündungshemmende Form (M2-Phänotyp) polarisiert, welche die normale Funktion der Adipozyten unterstützt<sup>69</sup>. Die von Adipozyten aktivierten, vermehrt proinflammatorischen

Signalwege können im chronischen Verlauf zu Insulinresistenz und den bekannten pathologischen Prozessen der Adipositas führen<sup>67,70,71</sup>. Diese proinflammatorischen Signalwege werden unter anderem durch Aktivierung von Toll-*like*-Rezeptoren (TLRs) induziert<sup>72</sup>.

## 1.3 Innate Rezeptoren des Fettgewebes

### 1.3.1 Toll-like-Rezeptoren (TLRs)

Toll-like-Rezeptoren sind sogenannte *pattern-recognition-receptors* (PRRs), also Mustererkennungsrezeptoren. Sie detektieren Moleküle, welche zum Beispiel nach einer Verletzung von Zellen freigesetzt werden, und werden unter dem Begriff DAMPs (*damage associated molecular patterns*) zusammengefasst. Sie sind in der Lage, Muster mikrobieller Krankheitserreger, sogenannte PAMPs (*Pathogen associated molecular patterns*), zu registrieren<sup>73–75</sup>.

Der strukturelle Aufbau der TLRs ist einheitlich: Alle Rezeptoren besitzen eine Domäne, welche den Liganden erfasst. Zudem existieren eine Transmembrandomäne, die als Verankerung des Rezeptors innerhalb der Membran fungiert, und eine Toll-/Interleukin-1-Rezeptor-Domäne (TIR). Diese TIR-Domäne dient der Interaktion mit TIR-haltigen Liganden und initiiert die Signalkaskade<sup>76</sup>. Beim Menschen sind bisher 10 Toll-like-Rezeptoren bekannt<sup>77, 78</sup>. Je nach zellulärer Lokalisation werden die Rezeptoren in zwei Subgruppen eingeteilt: Zum einen TLR-2 (gebildet durch ein Heterodimer mit TLR-1 oder TLR-6), TLR-4, TLR-5, und TLR-10. Diese Gruppe an Rezeptoren kommt membrangebunden auf der Zelloberfläche vor. Im Gegensatz dazu sind TLR-3, TLR-7, TLR-8 und TLR-9 eine Gruppe sich intrazellulär in Vesikeln befindender Rezeptoren<sup>79–81</sup>. Thomalla et al. konnten bereits die Expression von TLR-9 und TLR-7 in Adipozyten und eine über diese Rezeptoren vermittelte Beteiligung an immunabwehrenden Mechanismen nachweisen<sup>82, 83</sup>. Die TLRs der membrangebundenen Gruppe erkennen vor allem Bestandteile der Zellmembranen einiger Mikroorganismen wie Lipoproteine und Lipopolysaccharide sowie Flagellin als Bestandteil bakterieller Flagellen. Bereits seit langem ist bekannt, dass die intrazellulären TLRs auf Desoxyribonukleinsäure (DNA)- und Ribonukleinsäure (RNA)-Bestandteile reagieren<sup>84, 85</sup>. Toll-like-Rezeptor 10 konnte bisher kenntnisgemäß keinen Ligand sicher zugeordnet werden<sup>86</sup>. Folgende Tabelle zeigt die verschiedenen Expressionsorte und Angriffspunkte der TLRs (**Tabelle 1-1**):

Toll-like-Rezeptor	Lokalisation	Exprimierende Zellen (Auswahl)	DAMPs	PAMPs
<b>TLR-2 (+1/6)</b>	Extrazellulär membrangebunden	Adipozyt, B-Zelle,	Hitzeschockproteine, Hyaluronsäure, HDL	Lipoproteine, Peptidoglykane

		Monozyt, Makrophage, dendritische Zelle		
<b>TLR-3</b>	Intrazellulär membrangebunden	Adipozyt, B-Zelle, dendritische Zelle	Zelleigene dsRNA	Virale dsRNA
<b>TLR-4</b>	Extrazellulär membrangebunden	Adipozyt, Monozyt, Makrophage, Neutrophiler Granulozyt	Hitzeschockproteine, Fibrinogen, Hyaluronsäure, oxidiertes LDL	Lipopolysaccharide
<b>TLR-5</b>		Monozyt, Makrophage, dendritische Zelle	HMGB1	Flagellin
<b>TLR-7</b>	Intrazellulär membrangebunden	Adipozyt, Monozyt, B-Zelle, pDZ	Zelleigene ssRNA	Virale ssRNA
<b>TLR-8</b>		Monozyt, Makrophage, dendritische Zelle	Zelleigene ssRNA	Virale ssRNA
<b>TLR-9</b>		Adipozyt, Monozyt, Makrophage, B-Zelle pDZ	Zelleigene DNA	Bakterielle und virale CpG- DNA
<b>TLR-10</b>	Extrazellulär membrangebunden	Monozyt, B-Zelle,	-	-

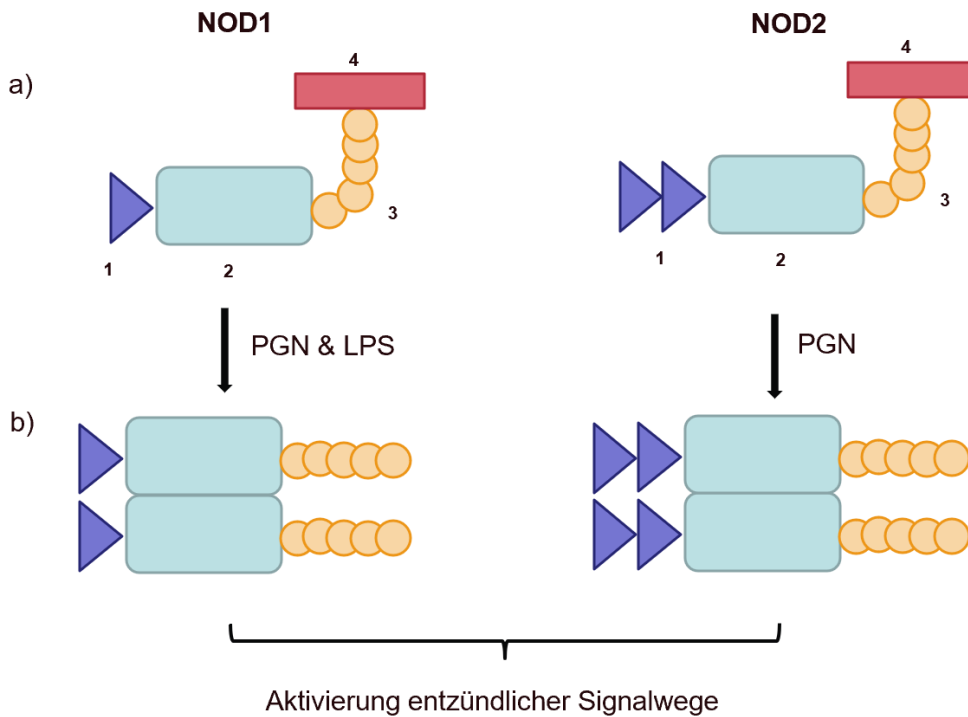
**Tabelle 1-1 Übersicht der einzelnen Toll-*like*-Rezeptoren mit jeweiliger zellulärer Lokalisation, exprimierenden Zelltypen sowie Reaktanten** (modifiziert nach Anwar, Shah et al. 2019<sup>87</sup>)

Toll-*like*-Rezeptoren spielen bei vielen Erkrankungen eine Rolle: Zum Beispiel wurde gezeigt, dass eine Reduktion der TLR-Aktivität ein Ansatz zur Reprimierung der chronisch pulmonalen obstruktiven Erkrankung (COPD) sein könnte<sup>88</sup>. Auch in Bezug auf das metabolische Syndrom konnte ein Bezug zu den TLRs, genauer TLR-5

dargestellt werden: Ein Verlust von TLR-5 führte im Mausmodell zu einem dem metabolischen Syndrom ähnelnden Phänotyp<sup>89</sup>.

### 1.3.2 *Nod-like*-Rezeptoren

Adipozyten exprimieren zudem *Nod-Like*-Rezeptoren (NLRs). Diese gehören wie die Toll-*like*-Rezeptoren zu den Mustererkennungsrezeptoren des innate Immunsystems und aktivieren proinflammatorische Signalwege<sup>72</sup>. Als lösliche zytosolische Rezeptoren sind sie in der Lage, konservierte bakterielle Peptidoglykanfragmente zu erkennen und eine Immunantwort auszulösen<sup>90, 91</sup>. NLRs besitzen eine dreigliedrige Domänenstruktur: Am C-Terminus sitzt eine Leucin-reiche Repeat-Domäne, welche wesentlich für die Ligandenerkennung ist. Zentral gelegen befindet sich eine Nukleotid-bindende Domäne, welche für die Oligomerisierung des Rezeptors verantwortlich ist. N-Terminus liegt eine variable Effektor-domäne, die Interaktionen mit Effektorproteinen möglich macht<sup>77, 92</sup>. *Nod-like*-Rezeptoren werden anhand ihrer N-terminalen Domäne in vier Untergruppen unterteilt. Für diese Arbeit von besonderem Interesse ist die vierte Gruppe. Diese Rezeptoren besitzen eine Aktivierungs- beziehungsweise Rekrutierungsdomäne für die Protease Caspase<sup>92</sup>. Zu dieser Gruppe gehören die gut charakterisierten NLRs NOD1 und NOD2, sie haben einen ähnlichen Aufbau und unterscheiden sich lediglich in der Anzahl ihrer N-terminalen Domänen<sup>93</sup> (**Abbildung 1-3**). Sie bewirken die Aktivierung und Rekrutierung von Signalmolekülen, welche die vom Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B abhängige Produktion von proinflammatorischen Zytokinen beschleunigen<sup>90</sup>. Die Stimulation von NOD1/2 führt unter anderem zu einer erhöhten Produktion von IFN- $\gamma$  und verschiedener Interleukine sowie zu einer verstärkten CD8-T-Zell- und B-Zell-Antwort nach Interaktion mit Antigenen<sup>94–97</sup>. Über ihren C-Terminus sind sie in der Lage, Fragmente der Zellwand grampositiver Bakterien, sogenannte Peptidoglykane, zu erkennen<sup>98, 99</sup>. NOD1 könnte zudem als intrazellulär gelegener Rezeptor zur Erkennung von bakteriellen Lipopolysacchariden dienen<sup>98</sup>.



**Abbildung 1-3 Aktivierung der NLRs NOD1 und NOD2** (modifiziert nach Trindade, Chen 2020<sup>77</sup>) Die Abbildung zeigt unter a) eine schematische Darstellung der inaktiven Form von NOD1 und NOD2

Unter b) wird eine schematische Darstellung der durch Liganden aktivierten Form von NOD1 und NOD2 skizziert: Die Erkennung der Liganden führt zu einer Konformationsänderung und Homo-Oligomerisierung zweier NOD-Moleküle, welche dann in der Lage sind, weitere entzündliche Signalwege zu aktivieren<sup>77</sup>. Legende: (1) N-terminale Caspase-Aktivierungs- und Rekrutierungsdomäne; (2) Kernnukleotid-bindende Domäne; (3) C-terminale Leucin-reiche Wiederholungsdomäne; (4) Chaperonproteine zur Stabilisierung der inaktiven Form. LPS = Lipopolysacharide; NOD = *nucleotide binding oligomerization domain*; PGN = Peptidoglykane.

## 1.4 Signalmoleküle des Fettgewebes

### 1.4.1 Sekretionsmoleküle

Zu den Sekretionsmolekülen des Fettgewebes gehören Adipokine, Zytokine, Komplementfaktoren und Chemokine<sup>52</sup>. Mit der Entdeckung und Charakterisierung des Adipokins Leptin wurde die Bedeutung dieser bioaktiven Proteine und damit die des Fettgewebes für den gesamten Organismus erstmals deutlich<sup>53</sup>. Heutzutage sind zahlreiche Adipokine bekannt, wie Adiponektin, Resistin und Visfatin<sup>7, 26, 54</sup>. Adipokine können auto-, para- und endokrin wirken<sup>100</sup>. Adipokine werden als Regulatoren der Ganzkörper-Homöostase angesehen<sup>11</sup>. Adipozyten sind nicht die einzigen Zellen, die Botenstoffe wie Adiponektin, Resistin und Visfatin exprimieren: Auch Immunzellen, Chondrozyten und Synoviozyten bilden diese Proteine<sup>100</sup>. Bei chronischer Adipositas kommt es zu einer gestörten beziehungsweise veränderten Sekretion der Adipokine<sup>101</sup>.

Das wohl bekannteste Adipokin ist Leptin<sup>53</sup>. Es korreliert positiv mit der Masse des weißen Fettgewebes. Durch die Induktion anorexigener und Inhibition orexigener Faktoren ist es maßgeblich an der Appetitregulation und somit auch an der Adipositas-Entstehung beteiligt<sup>53, 102, 103</sup>. Ist das kodierende Gen des Leptins mutiert, kann hieraus ein funktioneller Mangel am Protein Leptin und bei Mutation des Rezeptors eine Leptinresistenz resultieren<sup>104</sup>. Dies kann einen gesteigerten Appetit und einen verminderten Energieverbrauch bewirken. Die Folge kann eine frühe und schwere Adipositas sein. Aufgrund seiner Struktur und der seines Rezeptors wirkt Leptin nicht nur im neuroendokrinen System, sondern ist auch ein Botenstoff im Immunsystem. Leptin wird aufgrund seines molekularen Aufbaus zu den langkettigen helikalen Zytokinen gezählt, zu denen auch IL-6, IL-12 und IL-15 gehören<sup>105</sup>. In vitro wurde eine Aktivierung von CD4+- und CD8-T-Zellen durch die Stimulation mit Leptin gezeigt sowie eine hochregulierte Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen<sup>106</sup>. Auch wurden bei entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis und Osteoarthritis erhöhte proinflammatorische Leptin-Serumspiegel in Zusammenhang mit Krankheitsverlauf und Aktivität gemessen<sup>107-110</sup>.

Ein weiteres Adipokin, das Resistin, fördert die Rekrutierung der Immunzellen<sup>111, 112</sup>. Bei Mäusen konnte ein Zusammenhang zwischen Resistin und der Entwicklung von Adipositas bedingter Insulinresistenz bis zur Entwicklung des Diabetes Mellitus Typ 2 gezeigt werden<sup>113-115</sup>. Welche immunmodulatorische Wirkung Resistin besitzt, ist abhängig vom jeweiligen Gewebe<sup>116</sup>.

Auch das Adipokin Progranulin zeigt immunmodulatorische Wirkung. Die Untereinheiten des Progranulins sowie das gesamte Protein selbst haben die Fähigkeit, sowohl antiinflammatorische als auch proinflammatorische Mediatoren zu sein<sup>117</sup>. Bei Adipositas, Insulinresistenz und Diabetes Typ-2 zeigten sich erhöhte Serumspiegel des Proteins<sup>118, 119</sup>.

Adiponektin, welches hauptsächlich von Fettzellen sezerniert wird, ist für seine entzündungshemmende Funktion bekannt<sup>120</sup>. Es wirkt unter anderem bei Atherosklerose und Diabetes Mellitus Typ 2<sup>121, 122</sup>. Das Adipokin liegt posttranslational in verschiedenen Isoformen vor und entfaltet seine Hauptwirkung als Trimer, Hexamer und Multimer in der Blutbahn<sup>123</sup>. Das antiinflammatorische Adipokin wirkt systemisch auf Effektorzellen der Arthritis, indem es proinflammatorische Faktoren wie Prostaglandin E2 und IL-6 ansteigen lässt<sup>122, 124</sup>. Über seine Rezeptoren AdipoR1 und -R2 löst es gewebespezifische Signaltransduktionen aus, wie beispielweise eine erhöhte Ligandenaktivität von PPAR- $\alpha$ <sup>125</sup>.

Ein weiteres in das Immunsystem involvierte Adipokin ist Visfatin. Dieses wird auch PBEF (*pre-b-cell-colony-enhancing-factor*) genannt<sup>52</sup>, da es durch enzymatische Aktivität auch die Differenzierung von B-Zell Vorläufern<sup>122</sup> fördert. Visfatin wird durch Hypoxie induziert und wirkt proinflammatorisch<sup>126, 127</sup>. Zudem besitzt das Adipokin eine insulinähnliche Wirkung, da es sowohl die Insulinsekretion als auch die insulinbezogene intrazelluläre Signalübertragung reguliert<sup>128</sup>.

#### **1.4.2 Antimikrobielle Peptide**

Adipozyten sezernieren im Sinne der Erregerabwehr noch eine weitere Klasse an Faktoren: die antimikrobiellen Peptide (AMP). Über 100 humane AMPs sind derzeit dokumentiert<sup>129</sup>. Hierzu gehören unter anderem die Cathelicidine und Defensine<sup>130, 131</sup>. Von verschiedenen Immunzellen, zum Beispiel Epithelzellen sezernierte Cathelicidine und Defensine besitzen die Fähigkeit, Bakterien, Pilze sowie auch Viren *in vitro* abzutöten und/ oder auszuschalten<sup>132-135</sup>. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass diese AMPs zur Immunabwehr des Wirtes beitragen<sup>136-138</sup>. Aus evolutionärer Sicht gehören antimikrobielle Peptide zu einer der frühesten molekularen Effektoren der angeborenen Immunabwehr<sup>139</sup>. Humane AMPs wie das Cathelicidin LL-37 oder das beta-Defensin 2 kommen vor allem auf Oberflächen mit Kontakt zur Außenwelt vor. Hierzu zählen unter anderem Haut, Augen, Atemwege und der Urinaltrakt<sup>140, 141</sup>. In der Regel sind AMPs genkodiert und können konstitutionell exprimiert oder induziert werden, um potenzielle

Eindringlinge zu bekämpfen<sup>142</sup>. Sie besitzen eine Vielzahl an immunmodulatorischen Funktionen. Proinflammatorisch zeichnen sie sich durch eine direkte bakterizide Wirkung<sup>143</sup> oder die Induktion der Rekrutierung von Abwehrzellen aus. Der bakterizide Wirkmechanismus der meisten antimikrobiellen Peptide beruht auf der elektrostatischen Bindung mit anionischen Einheiten und anschließender Zerstörung der Mikrobe Membran, wobei auch weitere Mechanismen gezeigt werden konnten<sup>144</sup>. Antiinflammatorisch wirken sie zum Beispiel, indem sie Reaktionen des Körpers auf das Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) minimieren und damit eine potentiell überschießende Entzündungsreaktion verhindern<sup>145, 146</sup>. Auch Funktionen bei der Apoptose und Wundheilung sind den AMPs zugeschrieben<sup>147, 148</sup>. In verschiedenen Untersuchungen wurden AMPs auch wiederholt mit der Dysregulation von Entzündungen in Verbindung gebracht, wie beispielweise bei Psoriasis und Lupus Erythematodes, zwei chronisch autoinflammatorischen Immunerkrankungen<sup>149</sup>. Ergo kann eine Verstärkung der von AMP vermittelten Immunsignale die Reaktion auf eine Infektion verstärken, wohingegen eine Unterbrechung dieses Signalweges eine therapeutische Möglichkeit für Autoimmunerkrankungen bieten könnte<sup>149, 150</sup>.

Defensine sind die am meisten untersuchte Familie der AMPs. Bis heute gibt es über 80 bekannte  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\theta$ - Defensine<sup>151-153</sup>. Sie sind Cystein-haltige Peptide mit drei Disulfidbrücken, die in einer  $\beta$ -Faltblatt-Struktur gefaltet sind<sup>135, 154, 155</sup>. Für AMPs der  $\alpha$ - und  $\beta$ - Defensin- Familien gibt es bisher keine Anhaltspunkte einer Expression im Adipozyten<sup>13</sup>.

Einer der Schlüsselmechanismen der lokalen Immunabwehr ist es, antimikrobielle Peptide durch ortsansässige Zellen zu sezernieren, um in den Organismus eingedrungene Pathogene an ihrer Ausbreitung zu hindern<sup>156, 157</sup>. Nicht nur die klassischen Abwehrzellen wie Leukozyten und Monozyten sind an der Wirtsabwehr durch Sezernierung von AMPs beteiligt, sondern auch Adipozyten<sup>13, 158</sup>. Vor allem eine starke Induktion der Produktion des antimikrobiellen Peptids Cathelicidin in Präadipozyten wurde im Mausmodell nach einer Infektion beobachtet. Die Familie der Cathelicidine wird im Folgenden genauer erläutert.

## 1.5 Das antimikrobielle Peptid Cathelicidin (CAMP)

### 1.5.1 Aufbau und Expression

Cathelicidine umfassen eine Familie antimikrobieller Proteine, welche ein N-terminales Signalpeptid, eine hochkonservierte Cathelin (Cathepsin-L-Inhibitor)-ähnliche Domäne und am C-terminalen Teil eine weniger konservierte antimikrobielle Domäne besitzen<sup>133, 135</sup>. Verschiedene Zellen des Körpers, unter anderem Fettzellen und Mastzellen, exprimieren das *cathelicidine antimicrobial peptide* (CAMP)<sup>13, 159</sup>. Die Expression von CAMP steigt während der adipozytären Differenzierung an<sup>13, 160, 161</sup>. CAMP-mRNA ist im murinen Modell im weißen häufiger vorhanden, als im braunen Fettgewebe<sup>13</sup>.

### 1.5.2 Einflussfaktoren

Der CAMP-Serumspiegel ist abhängig von Ernährung und Fettanteil des Körpers: Je fettreicher die Ernährung, desto höhere CAMP-Spiegel konnten gemessen werden<sup>13</sup>. Das antimikrobielle Peptid steht in positiver Korrelation mit einer negativen Stoffwechsellage, charakterisiert durch die allgemein als ungünstig bezeichneten Stoffwechselfaktoren. Das heißt, hohe Resistin-, Triglyzerid- und BMI-Werte korrelieren positiv mit dem CAMP-Spiegel. Günstige Stoffwechsel-Faktoren wie HDL und Adiponektin sind hingegen erniedrigt bei hohen CAMP-Serumspiegeln<sup>162</sup>. Durch die Untersuchungen an humanen Seren (Hochberg et al.<sup>162</sup>) konnte sowohl die basale CAMP-Konzentration im Serum bei Adipositas dargestellt werden als auch ihre Veränderung während einer Gewichtsreduktion. Die Untersuchungen zeigten, dass adipöse Patienten, die nach einer bariatrischen Operation erheblich an Gewicht verloren, reduzierte CAMP-Spiegel im Serum aufwiesen. Bei einer Gewichtsabnahme rein durch Kalorienrestriktion gab es hingegen keine Änderung der CAMP-Serumspiegel<sup>162</sup>. Es existieren im Mausmodell auch bereits erste Ansatzpunkte einer potenziellen pharmakologischen Verwendung von CAMP. Durch sehr fettreiche Ernährung oder Alkoholabusus hervorgerufene Fettlebererkrankung zeigte bei Deletion von CAMP ein Fortschreiten der Krankheit, wohingegen eine Überexpression oder pharmakologische Behandlung mit exogenem CAMP das Fortschreiten verhinderte<sup>163, 164</sup>.

Höpfinger et al. konnten die Beeinflussung von CAMP durch nutritive Faktoren darstellen, indem ein Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Glukose im Rahmen eines standardisierten Glukosetoleranztests und einem anschließenden Anstieg systemischer CAMP-Konzentrationen im humanen Serum gezeigt werden konnte. Dies

zeigt Glukose als mutmaßlich positiven postprandialen Regulator zirkulierender CAMP-Spiegel<sup>165</sup>.

Bei Adipositas wurde ein erhöhtes entzündliches Potenzial beobachtet. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Expression des CAMP-Gens sowohl im subkutanen, als auch im viszeralen Fettgewebe deutlich positiv mit jener korreliert<sup>166</sup>. Im murinen Modell wurden bei durch fettreiche Ernährung induzierter Atherosklerose erhöhte CAMP-Spiegel im Serum festgestellt<sup>167</sup>.

Die Konzentration an CAMP im Serum scheint zudem durch Sexualhormone beeinflusst zu sein<sup>160</sup>. Die basalen Level sind bei Frauen deutlich niedriger als bei Männern<sup>162</sup>. Geschlechtshormone wie Testosteron und Estradiol spielen keine Rolle in der Regulation von CAMP<sup>162</sup>. Im Tierversuch konnte bereits gezeigt werden, dass im gonadalen Fettgewebe von männlichen Mäusen ein höheres Expressionsniveau von CAMP vorlag. Im subkutanen Fettgewebe war dies hingegen nicht nachzuweisen<sup>160</sup>.

### 1.5.3 Rolle im Immunsystem

Das Cathelicidin CAMP spielt eine Schlüsselrolle im immuninvolvierten Fettgewebe, auch „Killerfett“ genannt<sup>168</sup>. Durch die von der Forschungsgruppe Zhang et al. bewiesene starke Induktion von CAMP unter einer *Staphylococcus-aureus*-Infektion des betroffenen subdermalen Fettgewebes konnte erstmalig ein Zusammenhang der adipozytären Expression von CAMP mit immunologischer Funktion gezeigt werden<sup>13</sup>. So wurde zum Beispiel eine rasche Proliferation von Präadipozyten innerhalb des subkutanen Fettgewebes an der infizierten Stelle beobachtet sowie eine Hypertrophie der reifen Adipozyten<sup>13</sup>. Dabei fiel ebenfalls auf, dass vor allem die Präadipozyten in großem Umfang das antimikrobiell wirkende Peptid CAMP sezernierten<sup>13</sup>. Zudem wiesen die Zellen der infizierten Haut ein größeres adipogenes Potential auf als gesunde dermale Zellen<sup>13</sup>. Adipogenes Potential bedeutet die reaktive Differenzierung zu Adipozyten<sup>169</sup>. Ist die Adipogenese gestört, ist folglich die Fähigkeit, das Bakterienwachstum zu hemmen, eingeschränkt<sup>13</sup>. Da durch zu viele reife Adipozyten die CAMP-Produktion durch Verdrängung der Präadipozyten eingeschränkt ist, ließe sich die erhöhte Infektanfälligkeit adipöser Patienten erklären<sup>170</sup>. Diese Vermutung würde die maßgebliche Rolle des Fettgewebes im Immunsystem bestätigen. Ein wichtiger Regulator der Entzündungsreaktionen im Körper ist das Zytokin Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ ). Eine übermäßige oder anhaltende Produktion von TNF- $\alpha$  kann zur chronischen Inflammation führen, welche mit diversen chronischen

Erkrankungen assoziiert ist<sup>171, 172</sup>. Auch die adipozytäre CAMP-Ausschüttung scheint *in vitro* mit erhöhter TNF- $\alpha$ -Konzentrationen positiv zu korrelieren<sup>166</sup>.

Dass CAMP weitere Rollen im Immunsystem hat, konnte durch die Forschungsgruppe Di Nado et al. gezeigt werden: Diese konnten zeigen, dass in Mastzellen exprimiertes CAMP ein wichtiger Faktor für die antimikrobielle Wirkung dieser Abwehrzellen ist<sup>173</sup>. Die Hauptfunktionen lassen sich als direkte Erregerelimination durch Membranperforation sowie indirekte Immunabwehr durch Chemotaxis auf Immunzellen und die Degranulation von Entzündungszellen beschreiben<sup>159, 173-175</sup>.

Unabhängig von seiner antimikrobiellen Aktivität zeigte CAMP im Mausmodell auch bei endogener Expression entzündungshemmende Aktivität<sup>176</sup>. Zusammenfassend deuten die Daten darauf hin, dass CAMP zwei Funktionen im angeborenen Immunsystem hat: die Vermittlung einer antimikrobiellen, lokalen und systemischen Immunabwehr und die Regulierung von Entzündungen. Zudem wird vermutet, dass CAMP eine Funktion der Co-Regulierung hinsichtlich metabolischer Funktionen innehat<sup>176</sup>.

### **1.5.3.1 Regulierung durch Toll-like-Rezeptoren**

Cathelicidin unterliegt der Regulation durch verschiedene Toll-like-Rezeptoren. Die Aktivierung eines TLR durch konservierte Moleküle führt zur Translokation des zentralen Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und damit zu Transkription sogenannter „Early-Response“-Gene. Diese kodieren Zytokine, Chemokine und auch ausgewählte antimikrobielle Peptide wie CAMP<sup>177, 178</sup>. Hervorzuheben ist die Rolle von TLR-9:

TLR-9 erkennt bakterielle, nicht-methylierte CpG-DNA-Motive<sup>75</sup> sowie doppelsträngige DNA von Viren<sup>179, 180</sup>. Dies hat zur Folge, dass TLR-9 Zytokine unter anderem über den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B im Zellkern aktiviert. Dabei entfaltet der Rezeptor seine proinflammatorische Wirkung auf die Zellen des Abwehrsystems<sup>181</sup>. TLR-9 gehört zu der Gruppe der Toll-like-Rezeptoren, die nicht ausschließlich mikrobielle Nucleinsäuren erkennen, sondern auch in der Lage ist, körpereigene zellfreie DNA (cfDNA), zu detektieren<sup>182-186</sup>. Die Unterscheidung, ob es sich bei der erkannten Nucleinsäure um körpereigene oder exogene handelt, wird über die Zugänglichkeit der Liganden zum Rezeptor reguliert. Die Toll-like-Rezeptoren 3, 7, 8 und 9 befinden sich in intrazellulären Kompartimenten, sogenannten Endosomen. Diese Rezeptoren sind physiologisch gegenüber endozytotisch aufgenommenen Pathogenen exponiert, aber nicht gegenüber körpereigenen Nucleinsäuren<sup>187-190</sup>. Kommt es allerdings zu Schädigung und Absterben von Zellen, können körpereigene Nucleinsäuren zu jenen Rezeptoren

gelangen, erkannt werden und zu einer autoimmunen Zellreaktion führen<sup>191–195</sup>. CAMP wirkt auf Immunzellen als Aktivator des TLR-9: es fügt sich zu einem superhelikalen Protofibrillengerüst zusammen und bildet somit einen für TLR-9 spezifischen, nanokristallinen Immun-Komplex mit Oligodesoxyribonukleotiden (ODNs). Damit erleichtert CAMP die Erkennung der bakteriellen Bestandteile für Immunzellen durch TLR-9<sup>196</sup>. Thomalla et al. konnten bereits zeigen, dass auch Adipozyten in der Lage sind, einen funktionell aktiven TLR-9 mit dort anti-inflammatorischer Funktion zu exprimieren<sup>82</sup>.

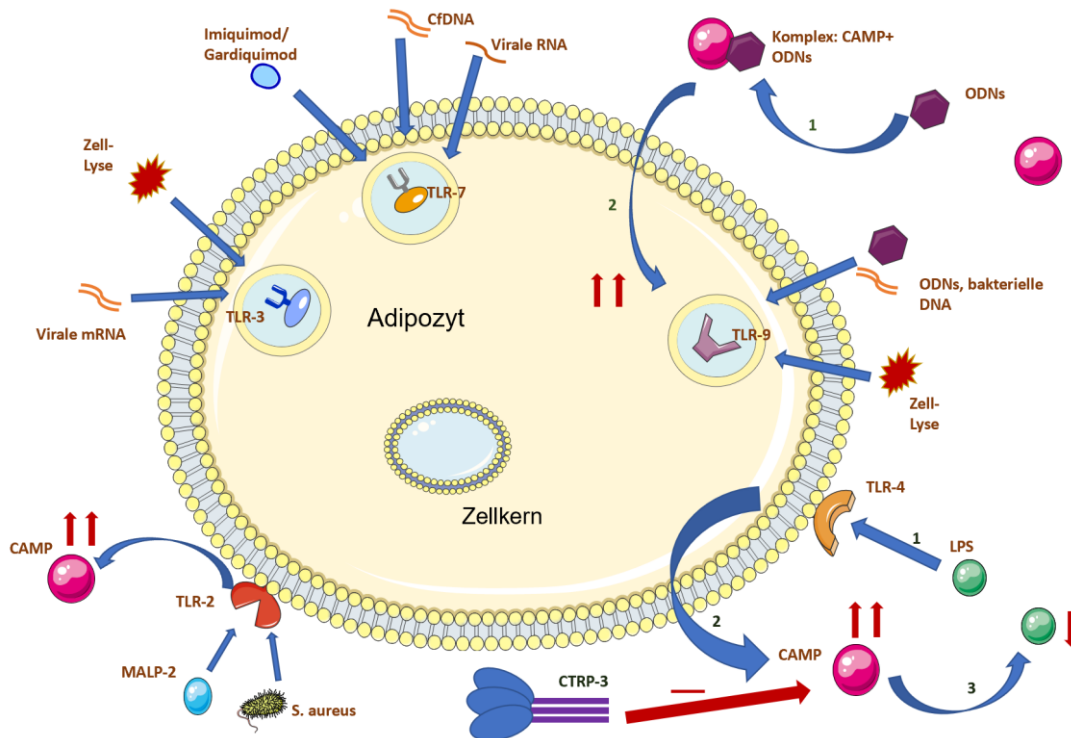
Adipozyten exprimieren zudem Toll-*like*-Rezeptor 7, ein ebenfalls endosomaler Rezeptor, der in der Lage ist, virale Einzelstrang-RNA zu erkennen<sup>197</sup>. In vitro konnte von Thomalla et al. auch die Erkennung von synthetisch hergestellten Liganden wie Imiquimod durch adipozytären TLR-7 nachgewiesen werden<sup>83</sup>. Auch die Erkennung von körpereigener, zellfreier DNA (cfDNA), deren systemische Konzentrationen bei Adipositas erhöht ist, wird TLR-7 sowie auch TLR-9 zugeschrieben<sup>198</sup>.

TLR-3 wird in Adipozyten stark exprimiert<sup>199</sup>. Der Rezeptor ist in der Lage sowohl virale doppelsträngige mRNA als auch mRNA von sterbenden Adipozyten, wie sie vermehrt bei Adipositas vorliegt<sup>200</sup>, zu erkennen<sup>201</sup>.

Mithilfe von Lipopolysacchariden (LPS), die als Liganden für TLR-4 bekannt sind, wurde eine starke Induktion von CAMP beobachtet<sup>160, 161</sup>. LPS, auch als Endotoxine bekannt - sind ein Bestandteil der Wand gramnegativer Bakterien. CAMP besitzt eine positive Ladung, wodurch bakterielle Lipopolysaccharide gebunden und neutralisiert werden können<sup>202</sup>. Einer der möglichen Mechanismen der entzündungshemmenden Wirkung von CAMP scheint die Veränderung der Zellmembranfunktion und damit einhergehend die Hemmung der TLR-4-Signaltransduktion zu sein<sup>176, 203</sup>. Dies schützt vor einer überschießenden Reaktion auf bakterielle Reize und der Einleitung des systemischen Entzündungsreaktionssyndroms (SIRS) oder einer Sepsis<sup>204</sup>. Der TLR-4-Antagonist CTRP-3<sup>205, 206</sup>, welcher zur Familie der Adiponectin-C1q/TNF-verwandten Proteine gehört und als entzündungshemmendes Protein charakterisiert ist<sup>207</sup>, konnte eine Inhibition der CAMP-Sekretion hervorrufen<sup>208</sup>. Auch werden dem Acridinfarbstoff Acriflavin entzündungshemmende Eigenschaften zugeschrieben, da er die LPS induzierte Inflammation über eine Suppression des TLR-4 zu inhibieren vermochte<sup>209</sup>. Eine Interaktion mit CAMP wurde bisher nicht beschrieben.

Wie TLR-4 bewirkt auch TLR-2 eine Induktion der CAMP-Expression<sup>160, 161</sup>. In vivo wird eine Infektion mit grampositiven Bakterien wie *Staphylococcus aureus* durch TLR-2 erfasst, der das Signal als Heterodimer TLR-1/2 oder TLR-2/6 weitergibt<sup>161</sup>. Diese

Mustererkennungszepatoren sind auch in der Lage, in vitro synthetische Liganden wie MALP-2 zu erkennen<sup>161, 210</sup>. Folgende Abbildung veranschaulicht schematisch die wichtigsten Signalwege der TLR/CAMP- Interaktionen beim Adipozyten (**Abbildung 1-4**):



**Abbildung 1-4 Schematische Darstellung der wichtigsten Toll-like-Rezeptor/Cathelicidin Interaktionen beim Adipozyten** (Eigenentwurf). CAMP = Cathelicidin antimikrobielles Peptid, CfDNA = cell-free DNA, CTRP-3 = C1q/TNF-Related Protein 3, LPS = Lipopolysacharide, ODN = Oligodesoxyribonukleotid, TLR = Toll-like-Rezeptor.

## 1.5.4 Die Rolle des humanen Cathelicidins LL-37

### 1.5.4.1 Aufbau und Vorkommen

LL-37 ist das einzige bekannte menschliche Cathelicidin mit Fettgewebs-expression und fungiert als Teil der angeborenen Immunabwehr<sup>211</sup>. Es wirkt als pleiotroper Immunmodulator, sowohl antibakteriell als auch antiinflammatorisch<sup>212</sup>. Bei der Spaltung des Propeptids des humanen Cathelicidin (hCAP18) wird seine C-terminale, antimikrobielle Domäne freigesetzt. Diese beginnt mit zwei Leucinresten und ist 37 Aminosäuren lang, daher die Bezeichnung LL-37<sup>135, 213</sup>. Die C-terminale Domäne ist hochvariabel und zeigt eine schnelle und starke Abwehraktivität gegen körperfremde Pathogene<sup>214</sup>. Es wird auf Chromosom 3 im Gen FALL-39 codiert. Seine antimikrobielle

Aktivität codiert das Exon 4, welches hypervariabel ist<sup>213,215</sup>. Gefördert wird die Aktivität durch entzündliche Zytokine, Wachstumsfaktoren, sowie die aktive Form des Vitamin D<sup>216</sup>.

Vor allem auf der Haut von Neugeborenen wurde Cathelicidin als mikrobieller Schutz entdeckt<sup>140</sup>. Auch in Fußwunden von Diabetikern zeigte sich eine erhöhte Konzentration von CAMP<sup>217</sup>.

#### 1.5.4.2 Wirkung

LL-37 wurde zum einen als antimikrobielles Breitbandpeptid identifiziert. Es weist einen breiten Wirkungsbereich gegen gramnegative<sup>218,219</sup> und grampositive<sup>220,221</sup> Bakterien auf, indem es in der Lage ist, die Membranen von Bakterien zu perforieren. LL-37 kann bakterielle Endotoxine inhibieren<sup>219</sup>. Es wirkt proinflammatorisch als Chemoattraktans zur Förderung der Chemokinproduktion und der Infiltration von Neutrophilen<sup>222</sup>. Seine antiinflammatorische Wirkweise zeigt sich durch die Hemmung der LPS-Bindung an Makrophagen<sup>223</sup>. Es hat die Fähigkeit, infektionsinduzierte entzündliche Prozesse zu hemmen und somit einer überschießenden Immunreaktion entgegenzuwirken. Dies erreicht LL-37, indem es proinflammatorische Signalwege hemmt und entzündungsfördernde Zytokinspiegel senkt<sup>224,225</sup>.

Sein murines Pendant ist das *cathelicidin-related-antimicrobial-peptide* (mCRAMP)<sup>226</sup>. mCRAMP zeigt bemerkenswerte Ähnlichkeiten zum humanen CAMP/LL-37 und bietet daher ein nützliches Modell für die Untersuchung der Funktion und Regulation des humanen Cathelicidins<sup>226</sup>. Murine und humane Cathelicidine sind beide antimikrobiell aktiv und haben zusätzlich immunmodulatorische Funktionen<sup>164,166,216–218,174,176,227–229</sup>. Beide zeigen Affinität für DNA und auch RNA<sup>187,216,197,227</sup>. Vor allem das humane LL-37 bindet DNA, aktiviert TLR-9 und induziert damit proinflammatorische Prozesse<sup>219,230</sup>. LL-37 ist in der Lage, Nukleinsäuren zu komplexieren und in menschliche plasmazytoide und myeloische dendritische Zellen zu transportieren, was zu einer Aktivierung von TLR-9 (DNA) und TLR-7 (RNA) führt<sup>187,220,197,231</sup>. Auch konnte in diesem Zusammenhang bereits festgestellt werden, dass eine Überexpression des humanen LL-37 zu verstärkten proinflammatorischen Zuständen bei Autoimmunerkrankungen durch TLR-9-Hyperaktivierung in Immunzellen und Keratinozyten führt<sup>221–223,232–234</sup>.

Die Rolle von CAMP bei Diät-induzierter Adipositas zeigte sich folgendermaßen im Mausmodell: Mäuse, bei denen das Gen CAMP deletiert wurde, nahmen weniger an Gewicht zu und zeigten zudem eine höhere Insulinsensitivität als Wildtypmäuse unter gleicher Diät<sup>224,235</sup>.

Das humane LL-37 ist zudem in der Lage, die Regeneration von pankreatischen

Inselzellen zu regulieren, wodurch die Glukosehomöostase gefördert wird<sup>225,236</sup>. Dies könnte Patienten mit Diabetes mellitus zugutekommen. Ferner zeigt sich die antimikrobielle Eigenschaft des LL-37 positiv in Bezug auf das diabetische Fußsyndrom und seine verlängerte Wundheilung. Es zeigten sich eine gesteigerte Wundheilungsrate sowie eine Verringerung der aeroben Bakterienbesiedelung<sup>226,237</sup>. Eine verbesserte Behandlung des diabetischen Fußsyndroms ist für den klinischen Einsatz hochrelevant, da diabetische Fußgeschwüre eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität der westlichen Welt sind und einen immensen Kostenfaktor im Gesundheitssystem darstellen<sup>227,238</sup>.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Fettgewebe besitzt wichtige endokrine und immunologische Funktionen im menschlichen Organismus<sup>11, 12, 46</sup>. Das Wechselspiel zwischen Fettgewebe und dem Immunsystem spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Stoffwechselprozessen und der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase. Bei Erkrankungen wie Adipositas ist die immunologische Funktion der Adipozyten eingeschränkt<sup>239, 240</sup>. Zudem steht die chronische Entzündung des Fettgewebes im Vordergrund, wenn es darum geht, Pathomechanismen der schwerwiegenden Insulinresistenz zu verstehen, die der Entstehung der Volkskrankheit Diabetes Mellitus Typ 2 vorausgeht<sup>241</sup>. Aus diesem Grund ist es von besonderem Interesse, Kenntnisse der Funktion und Regulation von adipozytären, proinflammatorischen und antimikrobiellen Peptiden wie CAMP im Immunsystem zu gewinnen und ihre inflammatorische Komponente zu untersuchen.

Ziel dieser Arbeit ist es, *in vitro* die Regulation der CAMP-Genexpression in murinen 3T3-L1-Prä-Adipozyten sowie in humanen Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom (SGBS)-Adipozyten zu untersuchen. Im Vordergrund steht die Analyse konzentrationsabhängiger Effekte unterschiedlicher Stimulanzen auf die Sekretion von CAMP der Adipozyten. Ausgewählt wurden Substanzen anhand aktueller Literatur, deren Effekte im Zusammenhang mit proinflammatorischen und immunologischen Signalwegen stehen. Die Genexpression und Sekretion des adipozytären CAMPs unterliegt der Regulation von Mustererkennungsrezeptoren wie Toll-*like*-Rezeptoren und NOD-Rezeptoren. Inflammatorische Einflüsse regulieren *in vitro* und *in vivo* die Sekretion von CAMP aus Adipozyten<sup>13</sup>. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf verschiedenen Stimulanzen, die vor allem auf eben diese immunologische und proinflammatorische Ebene des CAMPs abzielen, wie Toll-*like*-Rezeptoren, NOD-Rezeptoren und zellfreie DNA.

Um noch umfassendere Ergebnisse zur eingeschränkten immunologischen Funktion der Adipozyten bei Adipositas zu erzielen, ist es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse im Mausmodell auf Proteinebene zu erweitern. Dies erfolgte durch die Quantifizierung der CAMP-Konzentration im murinen Serum, sowie subkutanen Fettgewebe.

Zudem soll die humane Zelllinie der SGBS-Adipozyten als neues Modell für adipozytäre CAMP-Expression *in vitro* etabliert werden. Ziel hierbei ist es, die gewonnenen Kenntnisse am Mausmodell auf menschliche Zellen *in vitro* übertragen zu können, um die Funktionen von CAMP im menschlichen Organismus besser zu verstehen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien, Geräte und Chemikalien

In den nun folgenden Tabellen sind die verwendeten Materialien, Geräte sowie Chemikalien nach der jeweiligen angewandten Methode aufgelistet (**Tabelle 2-1; Tabelle 2-2; Tabelle 2-3**).

Materialien	Hersteller
Pipette research plus 0,5- 10 µl	Eppendorf
Pipette research plus 10- 100 µl	Eppendorf
Pipette research plus 20- 200 µl	Eppendorf
Pipette research plus 100- 1000 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen	Sarstedt
Filterpipettenspitzen	Sarstedt
Multipette E3	Eppendorf
Multipette M4	Eppendorf
Accu-jet pro	Brand
Cellstar Pipetten (2, 5, 10, 25, 50 ml)	Greiner bio-one
Reaktionsgefäß (1,5 ml, 5 ml)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Sarstedt
12 Well Platte	Greiner bio-one
75cm <sup>2</sup> -Zellkulturflaschen	Sarstedt
Zellschaber	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one
Neubauer <i>improved</i> Zählkammer	Roth
ELISA 96-Well-Mikrotiterplatten	Greiner bio-one
RNeasy® Kit	Qiagen
QIAshredder Kit	Qiagen
Vakuumpumpe D62	Biometra

Hei-Standard Magnetrührer	Heidolph
Analysewaage ACJ-220-4M	Kern

**Tabelle 2-1 Liste der verwendeten Materialien**

<b>Gerätetyp</b>	<b>Hersteller</b>
CO <sub>2</sub> -Inkubator 150L	Heracell
Sicherheitswerkbank KL.II 120cm	Thermo Fisher
Inverses Mikroskop Modell DM IL LED	Leica
Wasserbad (4-12L)	Memmert
-80°C-Schrank HFU600TV	Thermo Fisher
-20°C Gefrierschrank	Arctis
Vortex 1	IKA
Mikroliterzentrifuge	sprout
Große Zentrifuge Rotina 380R	Hettich
Kleine Zentrifuge Mikro 200R	Hettich
Zentrifuge Mikro 120	Hettich
Orbital Incubator SI500	stuart
Epoch Spektrometer	Bio-Tek
Thermocycler T100™	BioRad
Real-Time-System-PCR CFX Connect™	BioRad
Ultraschallhomogenisator Sonoplus	Bandelin

**Tabelle 2-2 Liste der verwendeten Geräte**

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Zellkulturversuche:</b>	
<i>Dulbecco`s modified eagle medium</i>	Biochrom
<i>Dulbecco`s modified eagle medium F-12</i>	Lonza
Neugeborenen Kälberserum	Sigma Aldrich
Fetales Kälberserum	Sigma-Aldrich
Apo-Transferrin	Sigma-Aldrich
Biotin	Sigma-Aldrich
3-Isobutyl-1-Methylxanthin	Serva Electrophoresis
Pantothensäure	Sigma-Aldrich
Fetuin	MP Biomedicals
Bovines Insulin	Sigma-Aldrich
Corticosteron	Sigma-Aldrich
Ascorbat	Sigma-Aldrich
Transferrin	Sigma Aldrich
Humanes Insulin	Sigma Aldrich
Cortisol	Sigma Aldrich
Trijodthyronin (T3)	Sigma Aldrich
Dexamethason	Sigma Aldrich
Rosiglitazon (BRL 49653)	Caymann Tallinn
Trypsin/EDTA	PAN-Biotech
Tryptanblau	Sigma-Aldrich
Ethanol (unvergällt)	Sigma-Aldrich
Ethanol (vergällt)	SAV Liquid Production
Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Phosphatase/Protease Inhibitor Cocktail	Roche

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Cytotoxicity Detection Kit	Sigma-Aldrich
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich
Oil-Red-O Stammlösung	Sigma Aldrich
2- Propanol	Roth
Formaldehyd	Sigma Aldrich
TE-Pufferlösung	Eigenherstellung Labor
Bovines Serum Albumin	Sigma Aldrich
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
Liraglutid	Sigma-Aldrich
D-Alanin-2-GIP	Sigma-Aldrich
Mimosin	Sigma-Aldrich
Acriflavin	Sigma-Aldrich
<i>Glucagon-like-Peptide-1</i> (GIP-1)	Sigma-Aldrich
Glukose-abhängiges-insulinotropes-Peptid	Sigma-Aldrich
Imiquimod	InvivoGen
Gardiquimod	InvivoGen
ODN A (1585)	InvivoGen
ODN B (1826)	InvivoGen
ODN C (2395)	InvivoGen
ODN 2088	Miltenyi Biotec
ODN 2087 (ODN 2088 control)	Miltenyi Biotec
ODN 1826 Control	InvivoGen
<i>Cell-free</i> DNA	Eigenprodukt des Labors
TriDAP (L-Ala-y-D-Glu-mDAP)	InvivoGen
Ammoniumhydroxidlösung	Sigma-Aldrich

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
BAY 11-7085	Sigma-Aldrich
LY294002	Sigma-Aldrich
S3I-201	Sigma-Aldrich
SB239063	Sigma-Aldrich
Poly I:C	InvivoGen
<b>PCR:</b>	
Muriner Primer forward CAMP desalted (5'-CCC AAG TCT GTG AGG TTC CG-3')	Metabion
Muriner Primer reverse CAMP desalted (5'-GTG CAC CAG GCT CGT TAC A-3')	Metabion
Muriner Primer forward GAPDH desalted (5'-TGT CCG TCG TGG ATC TGA C-3')	Metabion
Muriner Primer reverse GAPDH desalted (5'-AGG GAG ATG CTC AGT GTT GG-3')	Metabion
Muriner Primer forward Adiponektin desalted (5'-AGG GAG AGA AAG GAG ATG CAG-3')	Metabion
Muriner Primer reverse Adiponektin desalted (5'-CAG ACT TGG GCT CCC ACC TC-3')	Metabion
iTaq Universal SYBR Green Supermix	BioRad
Nuclease-freies H <sub>2</sub> O	Qiagen
Reverse-Transkription Kit Quantitect	Qiagen
Rneasy Kit	Qiagen
QIASHredder Kit	Qiagen
<b>ELISA:</b>	
Coating Buffer	Abbeva

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Blocking Buffer	Abbexa
Standard Diluent	Abbexa
Wash Buffer	Abbexa
Detection Antibody Diluent	Abbexa
Streptavidin-HRP	Abbexa
Streptavidin-HRP Diluent	Abbexa
Stop Solution	Abbexa
TMB-Substrat Solution	Abbexa
Standard	Abbexa
Capture Antibody	Abbexa
Biotin-Conjugated Detection Antibody	Abbexa

**Tabelle 2-3 Liste der verwendeten Chemikalien**

## **2.2 Zellkulturversuche an den Zellen der murinen 3T3-L1 Linie**

Zur Verwendung kamen murine 3T3-L1-Adipozyten. Die Fibroblasten-artigen Präadipozyten werden unter Zugabe bestimmter Supplemente innerhalb eines 8tägigen Protokolls zu reifen Adipozyten differenziert.

Diese ehemals aus embryonalem Gewebe der Maus stammenden Zellen lagern im Rahmen der Differenzierung Triglyzeride in Lipidvakuolen ein und sezernieren zunehmend adipozytenspezifische Proteine wie Adiponektin.

Die Zellen wurden zu allen Zeitpunkten in einem Brutschrank, in welchem sich auf 5% CO<sub>2</sub> angereicherte Luft befand, bei 37°C kultiviert. Jegliche Eingriffe bis zur finalen Zellernte wurden unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt, um Sterilität zu gewährleisten und damit einer Kontamination der Zellkultur durch Mikroorganismen vorzubeugen.

### **2.2.1 Aussäen und Splitten der Zellen**

Um die kryogelagerten Fibroblasten der Zelllinie 3T3-L1 zu kultivieren, wurden diese zunächst aufgetaut und in Kulturflaschen mit je 12 ml Anzuchtsmedium DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* von Biochrom), supplementiert mit 10 % Kälberserum (*newborn calf serum*), gegeben. Sobald der Zellrasen eine Konfluenz von circa 80-90% erreicht hatte, wurde das Medium abgesaugt und das Ablösen der Zellen mithilfe von 3 ml Trypsin, welches als verdauendes Enzym die extrazelluläre Matrix auflöst, initiiert. Nach Zugabe des Trypsins wurden die Zellen für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Um im Anschluss die Reaktion durch Deaktivierung des Enzyms zu stoppen, wurden 7 ml Anzuchtsmedium mit 10% Kälberserum (*newborn calf serum*) hinzugegeben. Die nun gelösten Zellen wurden bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde vom initialen Medium getrennt und in 5 ml neuem Anzuchtsmedium resuspendiert.

Um nun die richtige Konzentration der Zellen in der Lösung zu ermitteln, wurden für eine 1 zu 2 Verdünnung 15 µl der Zellsuspension zu 15 µl Trypanblau gegeben. Das Trypanblau dient hierbei als Färbelösung, da es verstorbene Zellen dunkelblau anfärbt und somit die anschließende Auszählung der ungefärbten, vitalen Zellen unter dem Mikroskop möglich macht. Besagte Auszählung fand mithilfe einer Zählkammer statt, in welche 10 µl der Lösung pipettiert wurden. Ziel der Zählung war es, durch anschließende Verdünnung eine Suspension mit einer Konzentration von 11400 Zellen pro Milliliter Anzuchtsmedium zu generieren. Hiervon wurden 0,5 ml pro Well auf eine 12-Well-Platte

ausgesät. Die sich auf der Well-Platte befindenden Zellen waren ab dem folgenden Tag adhären angewachsen und bereit für die Initiierung der adipozytären Differenzierung.

Ein Teil der Zellen wurde gesplittet. Ziel des Splittens ist es, dass sich circa 250000 Zellen pro neuer Kulturflasche ansiedeln. Hierfür wurde das mithilfe der Auszählung berechnete Volumen der Zellsuspension zu etwa 12 ml Anzuchtsmedium in eine neue Kulturflasche gegeben. Dieses Verfahren konnte bis Zell-Passage 8 wiederholt werden. Höhere Passagen wurden nicht mehr verwendet, da die Differenzierungsfähigkeit der 3T3-L1 Zelllinie ab besagter Passagenzahl abnimmt und die Zellen an Vitalität verlieren, sodass diese als Adipozyten-Modell für die geplanten Experimente nicht geeignet sind.

### **2.2.2 Differenzierung der Zellen**

Die gesamte Differenzierung von Fibroblasten zu Adipozyten benötigt in der 3T3-L1 Zelllinie 8 Tage. Innerhalb dieser Zeit sind verschiedene Schritte notwendig, welche im Folgenden dargelegt werden.

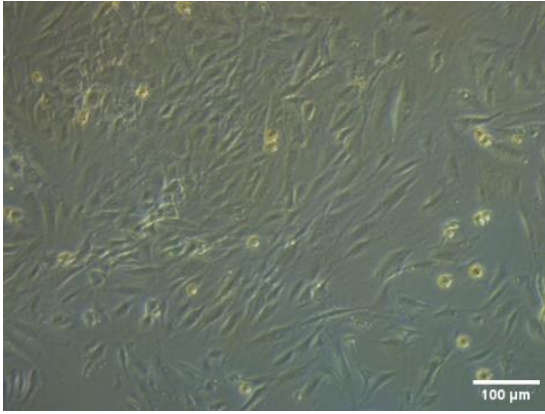
Zu dem hierfür verwendeten Differenzierungsmedium DMEM/F12 wurden verschiedene Zusätze hinzugegeben (**Tabelle 2-4**).

Zusatz	Konzentration
Fetales Kälberserum	10 % v/v
Apo-Transferrin	2 µg/ml
Ascorbat (in 3 mM NaCl gelöst)	200 µg/ml
Biotin (in H <sub>2</sub> O gelöst)	1 µM
Corticosteron (in Ethanol gelöst)	1 µM
Fetuin	300 µg/ml
3-Isobutyl-1-Methylxanthin	20 µM
Insulin (in HCl gelöst)	100 nM

**Tabelle 2-4 Liste der im Differenzierungsmedium der 3T3-L1 Adipozyten enthaltenen Zusätze und deren jeweilige Konzentration**

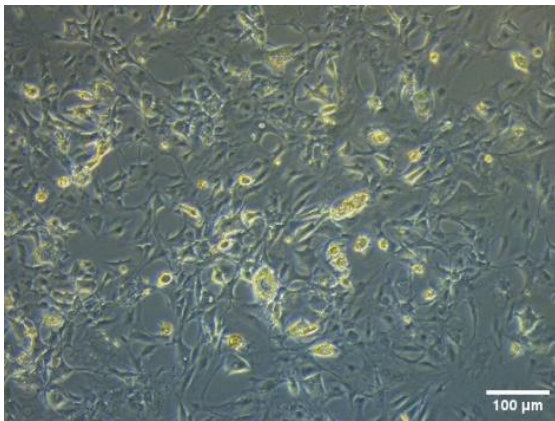
Die stabilen Zusätze fötales Kälberserum, Apo-Transferrin, Biotin, Fetuin und Pantothersäuren konnten – einmal hinzugegeben – im Medium gelöst bei 4°C gelagert werden, wohingegen die restlichen Zusätze vor jeder Anwendung neu in der angegebenen Konzentration hinzugegeben werden mussten. Dieses Medium mit genannten Zusätzen wurde sowohl bei Beginn der Differenzierung (Tag 0) als auch bei den darauffolgenden Medienwechseln (Tag 3 und 6) verwendet.

Vor jedem Differenzierungsschritt wurde eine visuelle Kontrolle der Zellen unter dem Mikroskop durchgeführt. Die Zellen besitzen nun noch einen fibroblastischen Phänotyp mit charakteristischen langgezogenen, spindelförmigen Ausläufern (**Abbildung 2-1**).



**Abbildung 2-1 3T3-L1 an Tag 0 der Differenzierung (nativ)<sup>166</sup>**

Das DMEM-F/12 mit den bereits hinzugegebenen Zusätzen wurde mit Insulin, Ascorbat, Corticosteron und 3-Isobutyl-1-Methylxanthin vervollständigt und im Wasserbad auf 37°C aufgewärmt. Die vom vorherigen Tag im Anzuchtsmedium ausgesäten Zellen wurden unter sterilen Bedingungen von diesem befreit und anschließend 0,5 ml vorbereitetes Differenzierungsmedium in jedes Well pipettiert. Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank inkubiert. Genauso wurde an Tag 3 und 6 der Differenzierung verfahren. Man erkennt deutlich, dass die Zellen eine rundere Morphologie annehmen und vermehrt Triglyzeride einlagern, welche ab Tag 3 bis 6 als kleine Lipidtropfen sichtbar werden (**Abbildungen 2-2**).

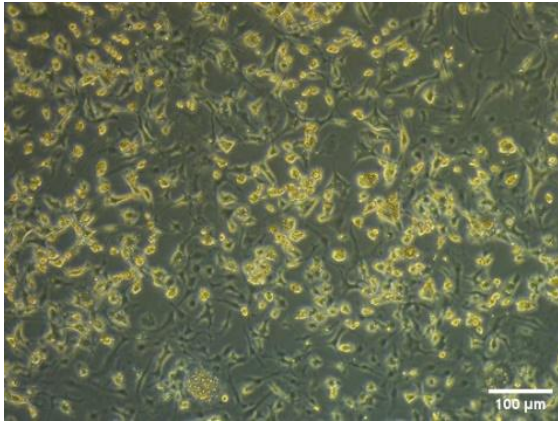


**Abbildung 2-2 3T3-L1 Präadipozyten Tag 6 der Differenzierung (nativ)**

An Tag 7 wurde der 3. Medienwechsel durchgeführt. Hierbei wurde serumfreies DMEM/F12 mit frisch hinzugegebenem 1  $\mu$ M Insulin verwendet. Der Rest der Arbeitsschritte erfolgt analog zu dem 1. und 2. Medienwechsel. Die hohe Dosis an Insulin sorgt für einen Reifungsschub der Zellen in Richtung reifer Adipozyten.

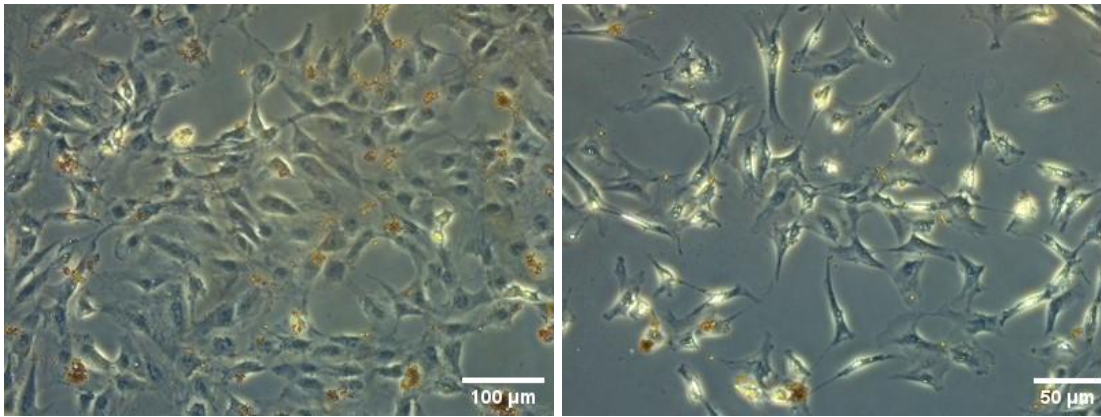
Tag 8 ist der abschließende Tag der Differenzierung. Die Zellen sind reif mit rundlichem Phänotyp und tragen große Lipidvakuolen in sich (**Abbildung 2-4**). An diesem Tag

wurde serumfreies DMEM/F12 ohne Zusätze auf die Zellen gegeben. Diese wurden unter diesen serumfreien Bedingungen für mindestens drei Stunden inkubiert, bevor ggf. mit einer experimentellen Stimulation begonnen wurde.

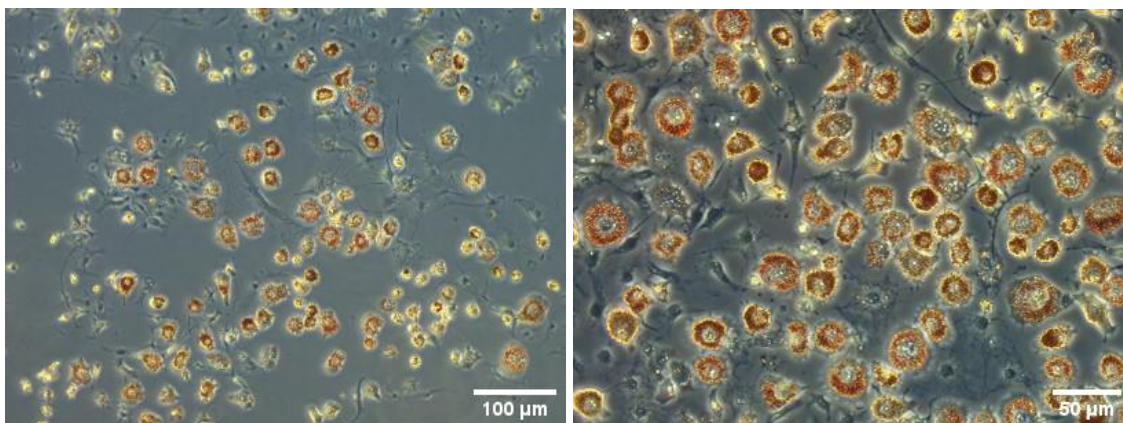


**Abbildung 2-3 3T3-L1 Adipozyten Tag 8 der Differenzierung 10- Vergrößerung (nativ)<sup>166</sup>**

Um die Differenzierung von Fibroblasten zu Adipozyten zu verdeutlichen, wurden ausgewählte Zellen an Tag 0 bzw. an Tag 8 der Differenzierung mit *Oil-Red-O* angefärbt (**Abbildung 2-5; Abbildung 2-6**). Dieser Farbstoff dient dazu, die Triglyceride innerhalb der Zellen rot anzufärben und somit die Lipidtropfen als Maß für den Differenzierungsgrad des Adipozyten besser zu visualisieren. Der Zellüberstand der Fettzellen wurde unter der Sterilbank abgenommen und die Adipozyten wurden mit sterilem PBS (500 µl pro Well) gewaschen. Alle weiteren Schritte wurden unter dem Abzug durchgeführt. Nach der Entfernung des PBS wurden die Zellen mit je 400 µl 10%-igem Formaldehyd (verdünnt in PBS) fixiert. Es folgte eine 5-minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur. Die 3T3-L1 Adipozyten wurden pro Well mit 500 µl 60%-igem Isopropanol gewaschen und nach anschließendem Absaugen des Reagenzes kurz an der Luft getrocknet. Anschließend wurden pro Well je 500 µl mit ddH<sub>2</sub>O (im Verhältnis 3:2) verdünnte Oil-Red-O-Stammlösung (0,175 g Oil-Red-O in 50 ml 2-Propanol) auf die Zellen gegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mindestens drei Waschschritten mit filtriertem H<sub>2</sub>O wurden die Zellen unter dem Mikroskop fotografiert. An Tag 8 der Differenzierung wurden die eingelagerten Lipidtropfen und die Siegelform der reifen Adipozyten sehr deutlich (**Abbildung 2-6**).



**Abbildung 2-4 Oil Red-O Färbung: 3T3-L1 Adipozyten Tag 0 der Differenzierung<sup>166</sup>**



**Abbildung 2-5 Oil Red-O Färbung: 3T3-L1 Adipozyten Tag 8 der Differenzierung<sup>166</sup>**

### 2.2.3 Durchführung eines Stimulationsversuches

Nachdem die Zellen mindestens drei Stunden in serumfreiem Medium inkubiert worden waren, wurde für Zellkulturversuche das jeweilige Stimulanz nach Absaugen des alten Mediums (DMEM/F-12) hinzugegeben.

Zu beachten ist, dass jeder Versuch in mindestens 6 technischen Replikaten ausgeführt wurde, zusätzlich mit je 6 Replikate der zugehörigen Vektor-Kontrolle. Diese *solvent control* ist abhängig von dem jeweiligen Medium, in dem der Stimulus gelöst wurde (H<sub>2</sub>O, Ethanol oder DMEM/F-12-Medium). Hierdurch können Effekte des Solvens auf die Zellen ausgeschlossen werden. Vor Gabe des Stimulus bzw. der Kontrolle auf die Zellen wurde dieser in auf 37°C erwärmtem DMEM/F-12 verdünnt, um während der anschließenden Inkubation die Adipozyten in ihrem gewohnten Milieu zu belassen. In jedes Well wurden 300 µl der Lösung gegeben. Anschließend wurden die Zellen für 18

Stunden im Brutschrank inkubiert.

Die Stimulanzen wurden anhand aktueller Literatur ausgewählt. Unbeabsichtigte zytotoxische Wirkungen wurden durch Ermittlung verträglicher Stimulationsdosen in Vorversuchen anhand der LDH-Aktivität ausgeschlossen. Zu jedem Stimulationsexperiment wurde dennoch eine LDH-Messung durchgeführt (**Abschnitt 2.2.7**), um eventuell ergebnisverfälschende Zytotoxizität sicher auszuschließen.

In folgender Tabelle sind alle verwendeten Stimulanzen sowie deren Konzentrationen aufgeführt (**Tabelle 2-5**).

Stimulanz	Verwendete Konzentration	Lösungsmittel
<b>Gruppe 1: Inkretine</b>		
Liraglutid	10 nM	H <sub>2</sub> O
	100 nM	
D-Ala <sup>2</sup> -GIP	10 nM	
	50 nM	
GIP	10 nM	
	100 nM	
GLP-1	50 nM	
	100 nM	
<b>Gruppe 2: TLR (Toll-like-Rezeptoren) - Agonisten</b>		
<b>1. TLR-9-Agonisten</b>		
ODN A 1585	1 µg/ml	H <sub>2</sub> O
	5 µg/ml	
	20 µg/ml	
ODN B 1826	1 µg/ml	
	5 µg/ml	
	20 µg/ml	

ODN C 2395	5 µg/ml		
	10 µg/ml		
	20 µg/ml		
ODN 2087 (ODN 2088 Control)	20 µg/ml	Tris-EDTA (TE)- Pufferlösung	
<b>2. TLR-3 Agonisten</b>			
Poly I:C	1 µg/ml	H <sub>2</sub> O	
	5 µg/ml		
<b>3. TLR-7 Agonisten</b>			
Imiquimod	5 µg/ml		
	20 µg/ml		
Gardiquimod	0,1 µg/ml		
	1 µg/ml		
	2 µg/ml		
<b>4. TLR-2 Agonisten</b>			
L-Mimosin	400 µM		Ammoniumhydroxidlösung
Acriflavin	5 µM	H <sub>2</sub> O	
<b>5. TLR-2/6-Agonist</b>			
MALP-2	100 ng/ml	PBS + 1% BSA	
<b>6. TLR-9 Signalwegs- inhibitoren</b>			
BAY-11	5 µM	DMSO	
LY294002	5 µM		
S3I-201	50 µM		
SB239063	5 µM		
<b>Gruppe 3: NOD1- Agonisten</b>			
TriDAP	100 ng/ml	H <sub>2</sub> O	

	1 µg/ml	
--	---------	--

**Tabelle 2-5 Verwendete Stimulanzen mit Endkonzentrationen im Zellkulturmedium**

#### **2.2.4 Durchführung der Zellernte**

Um nun den Effekt der Stimulation zu analysieren, wurden die Zellen geerntet. Anschließend konnten mithilfe des Überstandes sezernierte Proteine gewonnen werden und aus den Zellen das Gesamtprotein sowie die mRNA asserviert werden.

Nach einer visuellen Kontrolle der Zellen unter dem Mikroskop wurden diese auf Eis gelegt. Der Überstand wurde abgenommen und in vorbereitete Cups überführt. Um eventuell mitaufgenommene Zellreste von Überstand zu entfernen, wurde dieser bei 4000 rpm für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert, sodass Überstand und Zellen sicher differenziert werden konnten. Der zellfreie Überstand wurde in neue Gefäße überführt und diese für weitere Tests bei 4°C gelagert.

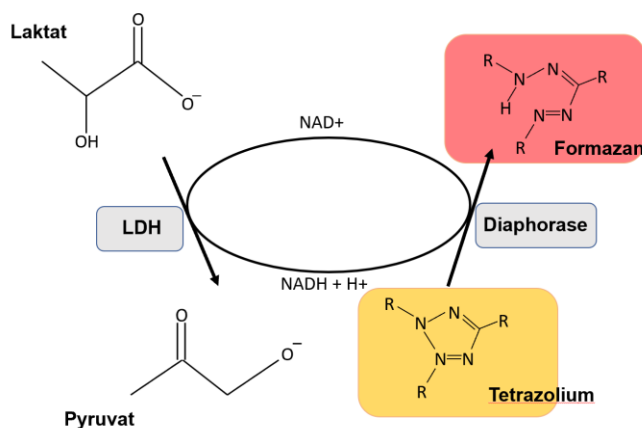
Um ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden, wurden in jedes Well 350 µl PBS-Puffer und ein Proteinase-Inhibitor (Protease Inhibitor Cocktail, Roche) gegeben. PBS diente hierbei dazu, ein möglichst physiologisches Milieu für die Adipozyten mit einem pH-Wert von 7,4 zu schaffen. Der Proteinase-Inhibitor ist wichtig, da die Freisetzung von Proteasen, welche die vorhandenen Proteine verdauen würden, unvermeidlich ist, sodass mit dem Inhibitor eine höhere Ausbeute an nativen Proteinen erzielt werden kann. Die Zellen wurden mit einem in PBS + Proteinase-Inhibitor angefeuchteten Zellschaber vom Boden des Wells abgeschabt und anschließend als Zellsuspension in Gefäße, in denen sich bereits die abzentrifugierten Zellen aus dem Überstand befanden, überführt. Zum Pelletieren der Zellen wurden die Eppendorf-Gefäße bei 4000 rpm und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand über dem Pellet wurde abgezogen und verworfen. Die Resuspension des Pellets erfolgte mit 50 µl RIPA-Puffer (Phosphatase/Protease Inhibitor Cocktail, Roche). Damit der Inhalt der Zellen untersucht werden kann, ist es unabdingbar, diese möglichst Detergenzien frei aufzuschließen: hierfür wurde die Methode der Sonifizierung verwendet. Um die Zellwände aufzubrechen, wurden die sich in Lösung befindenden Zellen für 10 Sekunden bei 30% Intensität sonifiziert. Die Aufbewahrung der erhaltenen Zelllysate erfolgte bei -20°C.

## 2.2.5 Bestimmung der Vitalität der Zellen

Um später gewonnene Ergebnisse richtig interpretieren zu können, musste das Ausmaß der Zytotoxizität in den Zellkulturansätzen bestimmt werden. Dies ist relevant, da abgestorbene Zellen die Proteinbestimmung beeinflussen können. Ein weit verbreitetes Testverfahren hierfür ist der Lactatdehydrogenase-Test (im Folgenden LDH-Test genannt).

## 2.2.6 Generelles Prinzip des LDH-Assay

Die Lactat-Dehydrogenase ist ein in allen Zellen des Körpers gegenwärtiges Enzym, welches gewebsspezifisch in unterschiedlichen Isoformen vorkommt<sup>78</sup>. Kommt es zur Verletzung der Integrität der Plasmamembran, tritt die LDH vermehrt in die extrazelluläre Matrix aus<sup>78</sup>. Die Messung der LDH-Aktivität in der extrazellulären Matrix ist somit ein valider Marker für die Beurteilung der Vitalität der Zellen. Folgende Graphik verdeutlicht das Messverfahren (**Abbildung 2-7**).



**Abbildung 2-6 Schematische Darstellung der Reaktion der Lactatdehydrogenase:** (modifiziert nach *Cytotoxicity Detection Kit Plus* (LDH), Roche, 2016<sup>242</sup>) Oxidation des Laktats zu Pyruvat mit anschließender Reduktion des Tetrazolium (gelb) in Formazan (rot); LDH = Lactatdehydrogenase, NAD+ = Nikotinamidadenindinukleotid, H+ = Proton

Die kolorimetrische Messung erfolgt bei 490 nm. Somit ist der augenscheinliche und kolorimetrisch gemessene Farbumschlag zur Farbe Rot proportional zum Umsatz des Salzes beziehungsweise zur Aktivität der LDH und damit zur Zytotoxizität<sup>243, 244</sup>.

Dies geschieht mithilfe des sich ebenfalls im Reagenz befindenden Katalysators Diaphorase. Diese überträgt bei der LDH-katalysierten Umwandlung von Laktat und NAD+ (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid) zu Pyruvat und NADH/H+ (reduzierte Form des

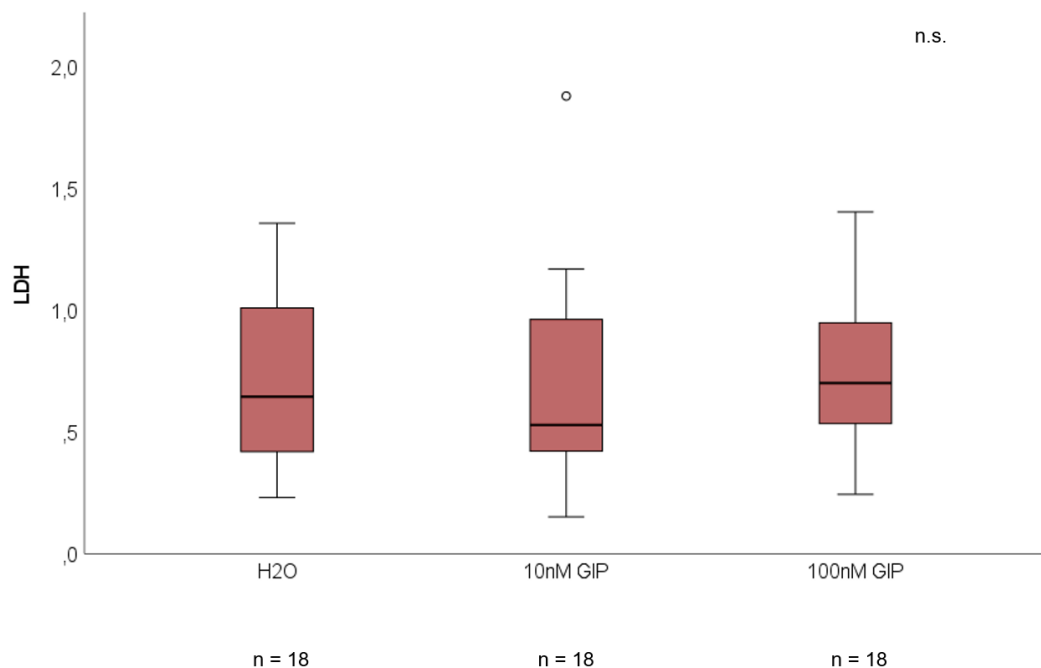
Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid) zwei Wasserstoffatome auf das Tetrazolium-Salz<sup>242</sup>. Das im Reagenz enthaltene Tetrazolium-Salz (gelb) wurde durch die LDH zu Formazan-Salz (rot) reduziert. Die extrazelluläre LDH-Aktivität korreliert direkt mit der Menge an gebildetem Formazan.

### **2.2.7 Durchführung des LDH-Tests**

Das Vorgehen fand anhand des Handbuch-Protokolls des Herstellers Roche statt. Der LDH-Test wurde jeweils am Tag der Zellernte durchgeführt. In eine 96-Well-ELISA-Platte wurden pro Well 25 µl des Zellkulturmediums vorgelegt, DMEM- oder DMEM/F-12 Medium. Hinzu kamen pro Well 25 µl des Überstandes der Probe als Unikat und anschließend 50 µl des LDH-Reaktionsmix in jedes Well. Dieses bestand in einem Mischverhältnis von 1:45 aus Färbelösung (Lösung A) und Katalysator (Lösung B). Zusätzlich wurde eine Kontrolle, bestehend aus 50 µl Medium und 50 µl LDH-Working-Reagens, verwendet. Die 96-Well-ELISA-Platte ist anschließend für 30 Minuten lichtgeschützt inkubiert worden. Im Anschluss wurde im Mikrospektralphotometer die Absorption von Licht der Wellenlänge 490 nm gemessen und die Ergebnisse der verschiedenen Proben in der Software Gen5 2.05 verglichen.

Ausgeschlossen wurden Proben, die sich signifikant von den anderen Proben unterscheiden. Somit konnte nun ausgeschlossen werden, dass eine eventuelle Zellyse Einfluss auf die Proteinbestimmung genommen hat.

Die Folgende Abbildung zeigt exemplarisch die erfolgte Auswertung für alle durchgeführten Zytotoxizitätstest (**Abbildung 2-8**).



**Abbildung 2-7 Exemplarische Darstellung der Zytotoxizität anhand der Stimulation der 3T3-L1 Adipozyten mit dem Inkretin GIP.** n.s. = nicht signifikant, GIP = glukoseabhängiges insulinotropes Peptid, LDH = Laktatdehydrogenase. Darstellung der Werte als Box-Plot Diagramm. Zur Berechnung der P-Werte und der statistischen Signifikanz ( $P < 0,05$ ) wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Pro experimentellen Versuch wurden 18 Wells untersucht.

## 2.2.8 Bestimmung der Proteinkonzentration mithilfe des BCA-Tests

Die bereits sonifizierten Zelllysate wurden mithilfe des Bicinchoninsäure- (BCA)-Tests auf ihre Proteinkonzentration getestet. Grund hierfür ist die notwendige Normierung der gemessenen LDH-Aktivität sowie Protein-Konzentrationen im Zellüberstand auf die jeweilige Gesamtproteinmenge in den Zellen. Im Folgenden werden generelles Prinzip und Durchführung des BCA-Tests beschrieben.

## 2.2.9 Prinzip des BCA-Assays

Ziel dieses Verfahrens ist es, mithilfe der kolorimetrischen Messung die Gesamtproteinmenge zu quantifizieren. Die Methode beruht auf dem Prinzip der Biuret-Reaktion, das heißt der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$  durch Proteine im alkalischen Milieu. Die gebildeten  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen werden anschließend mit der Bicinchoninsäure nachgewiesen, indem eine Chelatbildung zweier BCA-Moleküle mit einem  $\text{Cu}^{1+}$ -Ion entsteht<sup>245</sup>. Dieser Komplex weist im Spektralphotometer eine starke Lichtabsorption bei der Wellenlänge 562 nm auf. Um die Proteinkonzentration genau quantifizieren zu

können, wird zusätzlich eine Standardreihe aus Albuminlösungen (Thermo Scientific™ Pierce™ BSA Standard Ampules) mit festgelegten Proteinkonzentrationen (Konzentrationsbereich 15.6-2000 ng/ml) angelegt.

### **2.2.10 Durchführung des BCA-Assays**

Die Durchführung des BCA-Tests nach Protokoll des Herstellers Pierce, Thermo Fischer fand auf einer 96-Well-ELISA Platte statt und wurde sowohl beim Standard als auch bei den Proben in Triplikaten ausgeführt. Zunächst wurde eine Arbeitslösung aus Lösung A und B in einem Mischverhältnis 50:1 hergestellt. Vom sonifizierten Zellysat wurden in Triplikaten jeweils 10 µl in die Wells gegeben. Für die Standardreihe wurde der höchste Standard (2000 µg/ml) sieben Mal mit PBS 1 zu 2 weiterverdünnt. Als Blank wurde 10 µl PBS aufgetragen. Standardreihe und Blank wurden ebenfalls in Triplikaten aufgetragen. 100 µl der Arbeitslösung wurden in jedes Well gegeben und die Platte wurde bei 37°C für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die kolorimetrische Messung der Absorption bei 562 nm mithilfe des ELISA-Readers durchgeführt. Die Quantifizierung der Proteinkonzentration erfolgte anhand der Standardreihe in der Software Gen5.

## **2.3 Zellkulturversuche an der SGBS-Zelllinie**

Diese Linie von Präadipozyten entstammt Patienten mit Simpson-Golabi-Behmel Syndrom (SGBS)<sup>246</sup>. Die Zellen besitzen die Fähigkeit, sich in vitro zu humanen Adipozyten zu differenzieren. Sie gelten weithin als repräsentatives in-vitro-Modell humaner, weißer Adipozyten. Die Differenzierungsfähigkeit der SGBS-Adipozyten bleibt über viele Zellpassagen hinweg stabil. Dies stellt einen grundlegenden Unterschied zu mesenchymalen Stammzellen dar, die aus gesunden Probanden entnommen werden<sup>247</sup>.

### **2.3.1 Auftauen und Aussaat der SGBS-Adipozyten**

Das Auftauen der humanen SGBS-Adipozyten erfolgte analog dem Vorgehen der 3T3-L1 Zelllinie (unter 2.2.1 beschrieben). Als Anzuchtmedium wurde DMEM-F12 (1:1-Mischung) mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) verwendet. Nach drei Tagen Inkubation der Kulturflaschen bei 37°C im Inkubator wurden je 15000 Zellen pro Well in 12-Well-Platten ausgesät. Pro Well wurde 1 ml DMEM-F12 mit 10% FCS hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen für drei Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Zellen sollten an Tag drei eine 90%ige Konfluenz erreicht haben.

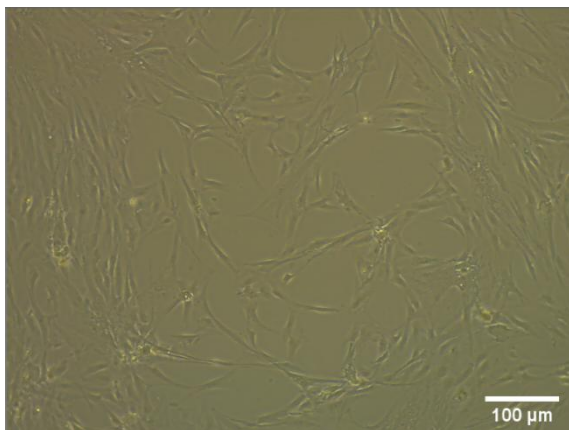
### **2.3.2 Differenzierung der SGBS-Adipozyten**

Die Differenzierung der SGBS-Präadipozyten zu reifen, stimulationsfähigen Adipozyten dauert 14 Tage. An Tag 0 der Differenzierung erhielten die Präadipozyten mit nachfolgend aufgelisteten Zusätzen angereichertes DMEM-F12. Pro Well wurden 0,5 ml Medium hinzugegeben (**Tabelle 2-6**).

Zusatz	Konzentration
Humanes Insulin	20 nM
Cortisol	100 nM
Dexamethason	25 nM
T3	0.2 nM
Rosiglitazon	2 $\mu$ M
Isobutylmethylxanthin (IBMX)	250 $\mu$ M
Transferrin	0.01 g/ml

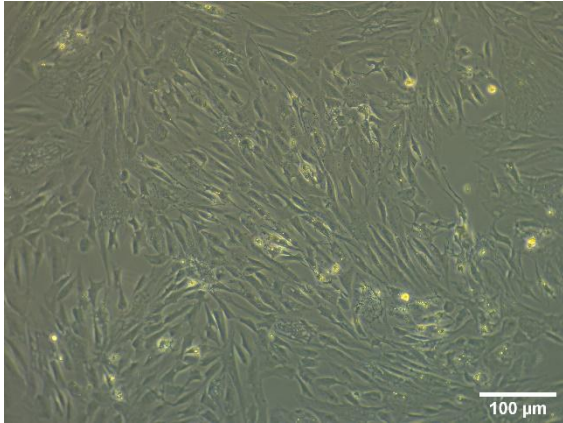
**Tabelle 2-6 Auflistung der Zusätze des Differenzierungsmediums Tag 3 der SGBS-Adipozyten**

Der Phänotyp der Präadipozyten zeigte sich Fibroblasten-ähnlich, mit langen, spindelförmigen Ausläufern (**Abbildung 2-9**).



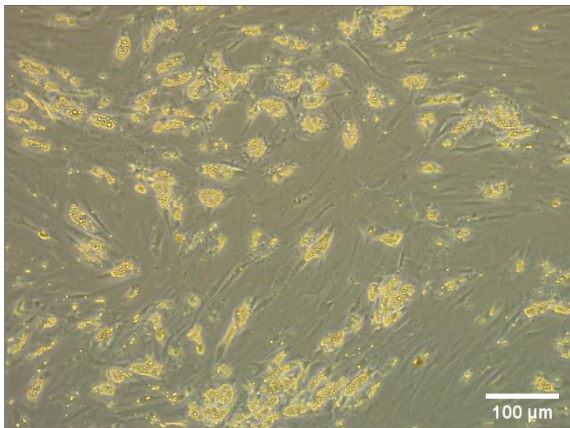
**Abbildung 2-8 SGBS-Adipozyten Tag 0 der Differenzierung<sup>166</sup>**

An Tag 4 der Differenzierung wurde mit Insulin, T3, Cortisol und Transferrin angereichertes DMEM-F12 auf die lichtmikroskopisch kontrollierten Adipozyten gegeben (**Abbildung 2-10**).

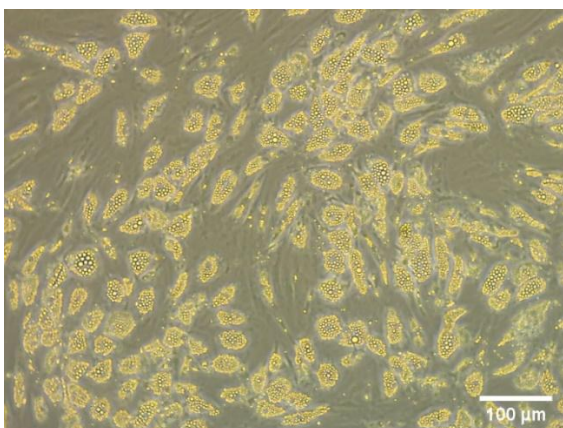


**Abbildung 2-9 SGBS-Adipozyten Tag 4 der Differenzierung**

Dieser Schritt wurde an Tag 8 und 11 der Differenzierung wiederholt. Es wurde eine zunehmende Einlagerung von Lipiden beobachtet (**Abbildung 2-11; Abbildung 2-12**).



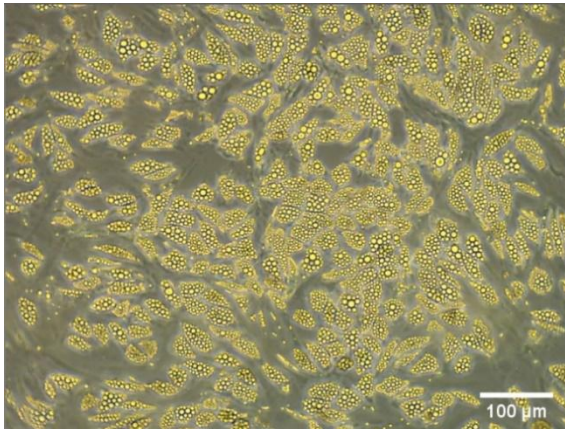
**Abbildung 2-10 SGBS-Adipozyten Tag 8 der Differenzierung**



**Abbildung 2-11 SGBS-Adipozyten Tag 11 der Differenzierung**

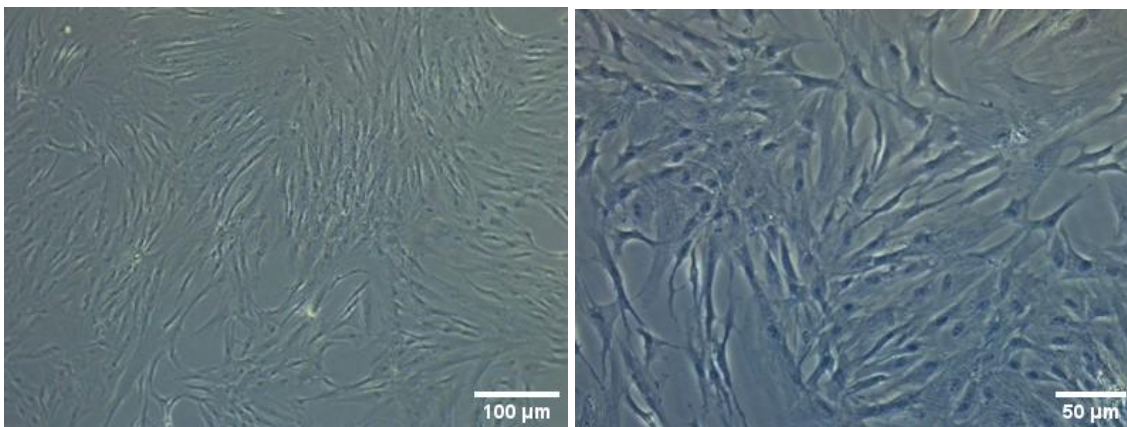
An Tag 14 zeigten sich die reifen Adipozyten mit dicht eingelagerten, zentralen Lipidtropfen (**Abbildung 2-13**). Die Stimulation erfolgte am gleichen Tag. Für diese

wurden die reifen Adipozyten für mindestens 3 Stunden auf DMEM-F12 ohne Zusätze gesetzt. Anschließend erfolgte eine Stimulation über 18 Stunden.

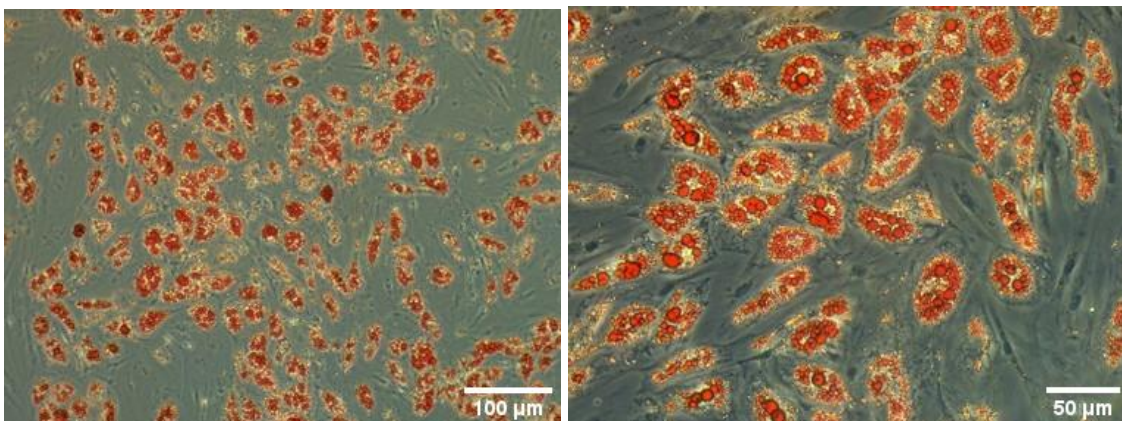


**Abbildung 2-12 SGBS-Adipozyten Tag 14 der Differenzierung<sup>166</sup>**

Zur Verdeutlichung der Differenzierung wurden die SGBS-Adipozyten an Tag 0 und 14 der Differenzierung mithilfe der Oil-Red-O-Methode angefärbt. Es zeigte sich eine deutliche vermehrte Lipideinlagerung von Tag 0 zu Tag 14 (**Abbildung 2-14; Abbildung 2-15**).



**Abbildung 2-13 Oil-Red-O-Färbung SGBS-Adipozyten Tag 0 der Differenzierung<sup>166</sup>**



## Abbildung 2-14 Oil-Red-O-Färbung SGBS-Adipozyten Tag 14 der Differenzierung<sup>166</sup>

### 2.3.3 Stimulation der SGBS-Adipozyten

Alle aufgelisteten Stimulanzen wurden in DMEM-F12 gegeben (**Tabelle 2-7**). Es galten die unter 2.2.3 geschilderten Kontrollbedingungen für jedes Stimulanz. Pro Well wurden 300 µl Medium verwendet.

Stimulanz	Konzentration
TLR-9 Agonist: ODN B (1826)	5 µg/ml
	20 µg/ml
NOD1-Agonist: Poly I:C	10 µg/ml
TLR-2/6-Agonist: MALP-2	100 ng/ml

**Tabelle 2-7** Verwendete Stimulanzen der SGBS-Adipozyten mit Konzentrationen

### 2.4 Quantifizierung der CAMP-Expression

Um die gewonnenen Zelllysate zu analysieren, wurde als Verfahren die Polymerasekettenreaktion (PCR) und der ELISA gewählt. Für diese Methoden mussten die Proben entsprechend aufgearbeitet werden. Die Schritte der Aufarbeitung und die anschließende Durchführung der Methoden wird im Folgendem beschrieben.

#### 2.4.1 Isolation der RNA

Um die Adipozyten für weitere Methoden wie die cDNA-Synthese und die sich anschließende Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zu nutzen, muss aus jenen ihre RNA isoliert werden. Hierfür gibt es ein eigenes Verfahren, welches im Folgendem erläutert wird.

#### 2.4.2 Durchführung der RNA-Isolation

Die Durchführung der RNA-Isolation erfolgte anhand des Protokolls des Herstellers Qiagen mithilfe des Rneasy-Kit. Eine ständige Kühlung der Zellen auf Eis und der später daraus gewonnenen Proben ist unabdingbar, da RNA sehr zülig abgebaut wird. Zudem muss beachtet werden, dass RNA im Vergleich zu DNA sehr empfindlich gegenüber

abbauenden Enzymen, sogenannten Ribonukleasen (RNAsen) ist, wodurch jene durch Spaltung in kleinere Fragmente für die weiteren Versuche unbrauchbar wird. Deshalb sollte auf ein steriles Arbeiten geachtet werden, da RNAsen von allen Organismen gebildet werden und sich somit auch auf der Handfläche des Menschen befinden. Zudem sollten RNase-freies Wasser und spezielle Verbrauchsmaterialien nur für die Anwendung an RNA eingesetzt werden.

Der Lysepuffer, bestehend aus Puffer RLT+  $\beta$ -Mercaptoethanol-Puffer, wurde in einem Mischverhältnis von 1:100 unter dem Abzug hergestellt, ebenso 70% Ethanol. Beide Lösungen wurden anschließend auf Eis gestellt.

Zunächst wurden die vorher visuell unter dem Mikroskop auf ihre Integrität kontrollierten Zellen auf Eis gestellt, der Überstand abgenommen und in zuvor vorbereitete Eppendorf-Gefäße gegeben. Diese wurden anschließend für 5 Minuten bei 4000 rpm bei 4°C abzentrifugiert und je 50  $\mu$ l Zellreste-freier Überstand in neue Eppendorfgefäße überführt. Der LDH-Test wurde nach dem unter 2.2.7 beschriebenen Vorgehen durchgeführt, um eine eventuelle Zytotoxizität auszuschließen. Auf die Zellen ist pro Well 350  $\mu$ l RLT-Lyse-Puffer und  $\beta$ -Mercaptoethanol gegeben worden. Dadurch blieben die Zellen feucht, da eine zu lange Trockenperiode zu Zellschäden führen kann. Aufgrund der gesundheitlichen Schädlichkeit von  $\beta$ -Mercaptoethanol, fand jeder nun folgende Schritt unter dem Abzug statt. Mit einem zuvor mit RLT- $\beta$ -Mercaptoethanol-Puffer angefeuchteten Zellschaber wurden die Adipozyten in jedem Well gründlich abgeschabt. Die gesamte Lösung wurde nach mehrmaligen Spülen im Well auf die QiaShredder (Qiagen) gegeben. Pro Well wurde ein QiaShredder verwendet. Im Anschluss wurden diese für 2 Minuten bei 15000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation war der obere Teil der Säule zu verwerfen und der zuvor bereits gekühlte 70% Ethanol im Verhältnis 1 zu 1 wurde hinzugegeben. Durch Auf- und Abpipettieren ist der Inhalt homogenisiert worden und konnte anschließend auf die RNeasy-spin-columns (Qiagen), welche zu RNA-Gewinnung dienen, gegeben werden. Pro QIAShredder ist ein Spin Column zu verwenden. Die Spin-Columns wurden für 30 Sekunden bei 10 000 rpm bei 4°C zentrifugiert und der Durchfluss im Anschluss verworfen. Zum Waschen der Säule wurden in drei Schritten Puffer hinzugegeben, danach zentrifugiert und der Durchfluss anschließend verworfen, bevor ein neuer Puffer hinzugegeben wurde: 700  $\mu$ l RW1 Puffer (Qiagen) mit 30 Sekunden Zentrifugation bei 10 000 rpm bei 4°C. Anschließend 500  $\mu$ l RPE-Puffer 30 Sekunden bei 10 000 rpm bei 4°C. Der letzte Waschschrift erfolgte mit 500  $\mu$ l RPE-Puffer und zweiminütiger Zentrifugation bei 10000 rpm bei 4°C. Die jetzt gewaschenen Säulen sind auf ein neues Auffanggefäß gesetzt und bei maximaler Geschwindigkeit für eine Minute bei 4°C zentrifugiert worden. Im Anschluss wurden die

Säulen auf die zuvor vorbereiteten RNase-freien Eppendorfgefäße gesetzt, 30 µl RNase-freies H<sub>2</sub>O hinzugegeben und eine Minute bei 10 000 rpm zentrifugiert. Als finaler Schritt wurde, um die RNA-Ausbeute zu erhöhen, das Eluat nochmals auf die Säule gegeben. Die nun isolierte RNA konnte bei -80°C eingefroren werden.

### **2.4.3 Ermittlung der Konzentration der gewonnenen RNA**

Damit die RNA nun für weitere Verfahren genutzt werden konnte, musste ihre Konzentration nach dem Wiederauftauen ermittelt werden. Dies wurde mithilfe eines Spektralphotometers (Epoch) durchgeführt. Hierzu wurden je 14 Proben als Unikate auf eine 16-Well-Platte pipettiert, sowie zwei Wasserkontrollen pro Platte. Anschließend wurde das Verhältnis der Wellenlängen 260/280 detektiert. Dies diente dazu die Menge an reiner einzelsträngiger RNA zu ermitteln und eventuelle Messfehler durch genomischer DNA und "falschen" Bausteinen zu detektieren. Bei Werten zwischen 2,0 und 2,3 sowie einer ausreichenden Konzentration in ng/µl (Werte ab 20 ng/µl wurden eingeschlossen), wurde die Probe für weitere Verfahren akzeptiert.

## **2.5 Gewinnung der cDNA durch reverse Transkription**

Um die Genexpression von CAMP mithilfe der PCR zu ermitteln, muss die gewonnene RNA zunächst in cDNA umgewandelt werden. Dies geschieht mit dem nun im Folgendem beschriebenen Verfahren der Reversen Transkription.

### **2.5.1 Generelles Prinzip der reversen Transkription**

Die Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, welche aus einzelsträngiger RNA, doppelsträngige *complementary*-DNA (cDNA) herstellen kann. Natürlicherweise kommt dieses Enzym in Retroviren vor<sup>75</sup>. Das Enzym teilt sich in drei Teilaktivitäten auf: Zunächst beginnt die RNA-abhängige Polymeraseaktivität des Enzyms. Sie hybridisiert an das Poly(A)-Ende der RNA Thymin-Oligonucleotide als Primer für die Herstellung eines RNA-DNA-Hybridstrangs. Als zweites wird mithilfe der Ribonuklease-H-Aktivität der RNA-Strang des Hybridstrangs hydrolysiert. Um nun den DNA-Einzelstrang zu vervollständigen, synthetisiert die dritte Teilaktivität des Enzyms, eine DNA-abhängige DNA-Polymerase einen komplementären Einzelstrang. Nun liegt eine doppelsträngige cDNA vor<sup>78</sup>.

### **2.5.2 Durchführung der reversen Transkription**

Die gewonnene, bei -80°C gelagerte und (wie in Punkt 2.2.4 beschrieben) kontrollierte RNA wurde direkt auf Eis gestellt. Damit alle RNA-Proben die gleiche Konzentration

besitzen, wurde anhand der Probe mit der niedrigsten Konzentration die Verdünnung der anderen mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O berechnet und nach diesem Schema in RNase-freie Eppendorfgefäße pipettiert. Zielvolumen waren 12 µl. Die Positivkontrolle ist in zweifacher Konzentration bei doppeltem Volumen hergestellt worden.

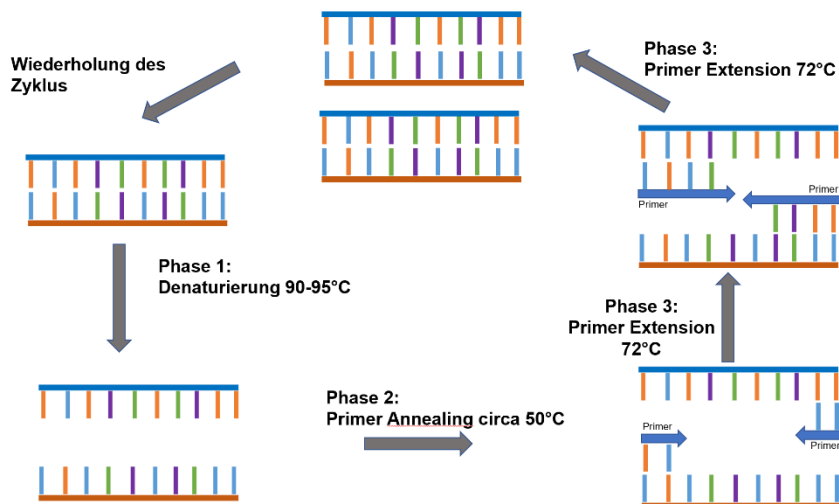
Es wurde anhand des Protokolls des Herstellers des Reverse Transkription Kit (QuantiTect) mit der Elimination der genomischen DNA begonnen: Je 2 µl gDNA Wipeout-Puffer (QuantiTect) wurden zu den verdünnten RNA-Proben gegeben. Anschließend wurde die Lösung bei 42°C für 2 Minuten in einem Thermocycler (BioRad) inkubiert. Nach Beendigung wurden die Proben sofort auf Eis gelegt. Für die Herstellung des MasterMix wurden pro Probe, abgesehen von der Negativkontrolle, 1 µl Quantiskript PrimerMix mit 4 µl Quantiskript Reverse Transkriptase Puffer und als letztes 1 µl Reverse Transkriptase Mix vorgelegt. Für die Positivkontrolle wurde jedes Solvens in doppelter Menge hinzugegeben. Zur Herstellung der Negativkontrolle verwendete man bei gleicher Menge RT Puffer und RT Primer Mix, 1 µl H<sub>2</sub>O anstatt des Enzyms. Dieser Mastermix wurden nun zu 14 µl der gereinigten RNA hinzugegeben, sodass man auf ein Endvolumen von 20 µl gekommen ist. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation der hergestellten Ansätze bei 42°C für 30 Minuten und danach für 3 Minuten bei 95°C. Der letzte Schritt diente dazu die Reverse Transkriptase zu inaktivieren. Die erhaltene cDNA konnte nun direkt im Anschluss zur Detektion der Genexpression via PCR-Methode verwendet werden oder wurde bei -20°C für weitere Versuche gelagert.

## **2.6 Bestimmung der CAMP-Expression mittels Realtime-PCR**

Um die Expression eines Ziel-Gens zu quantifizieren, ist die Amplifikation der hergestellten cDNA erforderlich. Hierzu wurde die Methode der Realtime-PCR verwendet. Im Folgenden wird das Prinzip und die Vorgehensweise im Labor dieser Methode genauer erläutert.

### **2.6.1 Generelles Prinzip der Realtime-PCR**

Die PCR ist ein Verfahren zur Amplifikation von DNA. Die Vervielfältigung der DNA findet in einem Thermocycler statt. Es werden drei Phasen unterschieden: Die Denaturierung, das Annealing und die Elongation <sup>78</sup> (**Abbildung 2-16**).



**Abbildung 2-15 Schematische Darstellung der Phasen der PCR (Eigenentwurf)**

Phase 1: Denaturierung: der Einzelstränge der DNA; Phase 2: Annealing: Hybridisierung der Primer (forward und reverse); Phase 3: Elongation: Verlängerung der Primer mithilfe der thermostabilen Taq-Polymerase; Wiederholung des Zyklus

Durch die Realtime- PCR lässt sich eine quantitative Analyse durchführen<sup>75</sup>. Mithilfe von fluoreszierenden Molekülen (Fluorophore) als Detektionsmittel wird nach jedem Amplifikationszyklus die Menge der produzierte DNA analysiert. Diese Fluorophore emittieren eine stark erhöhte Intensität an Fluoreszenzlicht mit zunehmender Menge an doppelsträngiger DNA<sup>248</sup>.

In der ersten Phase des Zyklus wird die doppelsträngige DNA durch Erhöhung der Temperatur auf etwa 90-95°C in ihre Einzelstränge aufgetrennt. Die Hybridisierung der Primer findet am jeweils komplementären Bereich des DNA-Einzelstrangs statt. Es werden jeweils ein forward Primer und ein reverse Primer im Verhältnis 1 zu 1 verwendet. Der forward Primer ist verantwortlich für den Antisensestrang, der reverse Primer für den Sensestrang. Das Annealing erfolgt abhängig von der Basenzusammensetzung des Primers bei einer Temperatur von etwa 50-60°C<sup>75</sup>. Der dritte Schritt ist die Elongation, die eigentliche Polymerasereaktion, in der die Synthese der DNA stattfindet. Die Primer werden mithilfe der thermostabilen DNA-Polymerase sowie der Desoxyribonukleotide (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) verlängert. Das Temperaturoptimum der hier verwendeten Taq-Polymerase liegt bei etwa 70-72°C<sup>78</sup>. Der Zyklus wird unterbrochen durch ein Erhöhen der Temperatur auf 95°C und der damit einhergehenden Denaturierung des DNA-Doppelstrangs in seine Einzelstränge. Im Anschluss wird ein neuer Zyklus gestartet. Wie viele Zyklen die Amplifizierung des Gens benötigt, ist wiederum abhängig von der zu amplifizierenden Länge des Genabschnittes

und den Primern<sup>75</sup>.

Der finale Extensionsschritt erfolgt für etwa 5 bis 15 Minuten bei 72°C. Er dient der Vervollständigung partiell kompletter Produkte der Polymerase. Mithilfe eines Amplifikationsdiagramms kann im Anschluss an die PCR das Produkt analysiert werden. In jenem ist auf der x-Achse einerseits die Anzahl der Zyklen und andererseits auf der y-Achse die Fluoreszenz der Reaktion dargestellt. Zu Beginn der Reaktion bleibt die Fluoreszenz im Hintergrund, trotz exponentiellen Anstieges des Produktes. Der Quantifizierungszyklus, auch als Cq-Wert bezeichnet, ist der Zyklus, bei dem es zur Überschreitung eines vorher festgelegten Schwellenwertes des Fluoreszenzsignals kommt. Der Schwellenwert befindet sich üblicherweise im Bereich des exponentiellen Anstieges der PCR-Amplifikation. Je mehr Template zuvor vorhanden war, desto früher beziehungsweise nach umso weniger Amplifikationszyklen kommt es zu diesem Cq-Wert<sup>75, 249</sup>.

Um diese nun ermittelten Cq-Werte zu interpretieren, werden sie auf die Cq-Werte eines konstitutiv und gleichmäßig exprimierten, sogenannten *housekeeping gene* (häufig GAPDH) normiert. In der Analyse wird hierfür die Delta-Delta-Ct-Methode verwendet.

## 2.6.2 Durchführung der PCR

Zunächst wurden die bei -20°C gelagerten cDNA-Proben auf 4°C aufgetaut. Mithilfe von Nuclease-freiem H<sub>2</sub>O wurde die an den verwendeten Primer angepassten Verdünnung hergestellt. Für den Housekeeper-Primer GAPDH (von Metabion) wurde eine 1 zu 10 Verdünnung der cDNA verwendet, für den murinen CAMP-Primer wurde eine 1 zu 3 Verdünnung hergestellt. Von dieser verdünnten cDNA-Lösung wurden pro Probe je 4 µl in Triplikaten auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Zusätzlich wurden auch 4 µl einer in gleicher Weise verdünnten Positivkontrolle als Triplikat verwendet. Als Negativkontrolle wurde ein Triplikat bestehend aus einer Negativkontrolle und zwei Wells mit H<sub>2</sub>O anstelle von cDNA verwendet. Anschließend wurde der Mastermix, aus Primermix und Supermix (Hersteller BioRad) bestehend, hergestellt. Der für die Reaktion benötigte Mastermix - bestehen aus zwei sequenzspezifischen Primern und einem bereits vom Hersteller vorgefertigten Supermixes - wurde vorher per Hand zu der cDNA auf eine 96-Well-Platte pipettiert. In dem hier verwendeten Supermix (BioRad) befanden sich eine hitzestabile Taq-Polymerase, Desoxyribonukleotide für die Neusynthese der DNA, MgCl<sub>2</sub> zur Katalyse der Polymerase und einer Pufferlösung. Die thermische Stabilität der Polymerase ist essenziell, da in jedem Zyklus zur Trennung der DNA-Doppelstränge eine kurze Hitzebehandlung notwendig war.

Sowohl die beiden Primer (*reverse* und *forward*), als auch der Supermix wurden bei -20°C gelagert. Der Primermix wurde 1 zu 1 aus den beiden Primern hergestellt in einer Konzentration mit je 5 µM, welche mit Nuclease-freiem H<sub>2</sub>O 1 zu 10 verdünnt wurde (Stocklösungen: 100 µM). Anschließend wurde der Primermix in einem Verhältnis von 1 zu 5 mit dem Supermix vermengt. Jeweils 6 µl des nun hergestellten Mastermixes wurden in die Wells gegeben. Anschließend ist die 96-Well-Plate kurz abzentrifugiert und in den Thermocycler gegeben worden. Das Ergebnis konnte im Anschluss mithilfe des PC-Programms „Bio-Rad CFX Manager“ abgelesen und mit Microsoft Excel und SPSS (Version 26) ausgewertet werden.

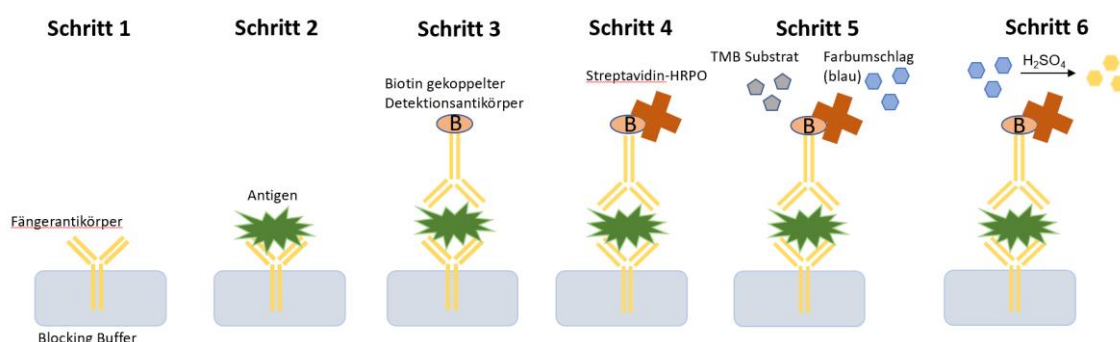
Um die Methode der PCR zu verifizieren, wurden anhand einer Messung an einer Differenzierungsreihe das etablierte Adipokin Adiponektin und CAMP gemessen. Die Grafiken 14 und 15 zeigen die Ergebnisse (siehe Abschnitt 3).

## 2.7 Bestimmung der CAMP-Konzentration mittels ELISA

In den Überständen der Zellkulturproben wurde in Duplikaten die Konzentration des sezernierten CAMP-Proteins mittels ELISA quantifiziert.

### 2.7.1 Generelles Prinzip des ELISA

Ein etabliertes und weit verbreitetes Verfahren, Proteine nachzuweisen, stellt der ELISA dar (**Abbildung 2-17**). Mithilfe spezifischer Antikörper können einzelne Proteine erkannt und quantifiziert werden<sup>75</sup>.



**Abbildung 2-16 Schematische Darstellung des „Sandwich-ELISA“** (Eigenentwurf). Schritt 1: Fangantikörper wird auf die Oberfläche der Platte gebunden; Schritt 2: Binden des Antigens; Schritt 3 Bindung des Antigens durch mit Biotin verbundenem Detektionsantikörper; Schritt 4: Bindung des Streptavidin-Merretichperoxidase(HRPO)-Molekül; Schritt 5: Redoxreaktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Tetramethylbenzin (TMD) mit Farbumschlag zu blau; Schritt 6: Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mit Farbumschlag zu gelb

In dem hier verwendeten sogenannten „Sandwich-ELISA“ wird ein Fangantikörper (Primärer Antikörper) auf die Oberfläche einer 96-Well-Platte gebunden. Dieser dient dazu das nachzuweisende Antigen zu binden. Dieses wird im Anschluss durch einen Detektionsantikörper (sekundärer Antikörper) gebunden, welcher mit einem Enzym gekoppelt wurde, wodurch die messbare Farbreaktion stattfinden kann. So können mit dieser Methode bereits Mengen von unter einem Nanogramm Protein nachgewiesen werden<sup>78</sup>. Zwischen den verschiedenen Reaktionsschritten finden immer wieder Waschschriffe statt, um ungebundene Antigene bzw. Detektionsantikörper zu entfernen. Der sekundäre Antikörper bindet einerseits das Antigen und andererseits über ein konjugiertes Biotin-Molekül das Protein Streptavidin. Damit die Farbreaktion stattfinden kann, ist das Streptavidin mit einer Merretichperoxidase gekoppelt. Diese ist in der Lage mit einer hinzugegeben Chromogenlösung aus ihrem Cosubstrat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und dem Elektronendonator Tetramethylbenzin diesen in Form einer Redoxreaktion zu oxidieren und so die Lichtabsorption zu ändern<sup>250</sup>. Optisch ist ein Farbumschlag zu blau zu erkennen. Diese Reaktion findet im Dunkeln statt und wird anschließend mithilfe der Säure H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> durch Änderung des pH-Werts gestoppt

Die Geschwindigkeit der Farbbildung ist direkt proportional zur Menge des vorhandenen Antigens, woraus sich die quantitative Komponente des Nach-weises ergibt<sup>75</sup>.

## **2.7.2 Durchführung des ELISA-Tests**

Die Durchführung der Methode fand anhand des Protokolls des Herstellers Abbexa statt, dessen ELISA-Kit „Cathelicidin Antimicrobial Peptide (CAMP) Antibody Pair“ und „Antibody Pair Support Kit (Sandwich Method)“ verwendet wurde. Die Rekonstruktion der als Pulver vorliegenden Detergenzien erfolgt nach Angaben des Herstellers jeweils in spezifischer Menge destilliertem H<sub>2</sub>O. Die beiden verwendeten Antikörper, das Streptavidin-HRP und der vollkonzentrierte Standard, wurden bei -20°C gelagert. Alle weiteren benötigten Detergenzien wurden bei 4°C verwahrt.

Am Tag vor dem Experiment wurden pro Platte 40 µl des primären Antikörpers, welcher in einer Konzentration von 0,5 mg/ml gelöst vorlag, in 5 ml „Coating Buffer“ gegeben. So entstand durch die 125-fache Verdünnung eine Endkonzentration von 4 µg/ml, wovon je 50 µl pro Well einer 96-Well-Platte pipettiert wurden. Anschließend wurde die Platte mit einer Folie abgeklebt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Am Tag der Durchführung wurde die Platte zunächst mit einem Waschpuffer gewaschen. Dieser sollte etwa ein bis zwei Minuten zwischen den Waschschriffen einwirken. Das ausführliche Waschen dient dazu, dass kein ungebundener Antikörper sich in den Wells befindet. Für den nun folgenden Blockierungsschritt wurden pro Well 100 µl Blocking Buffer verwendet und im Anschluss

wurde die Platte für eine halbe Stunde bei 37°C rotierend im Dunkeln inkubiert. Die Überstände, sowie der für die Verifizierung der Proben benötigte Standard, wurden mit Standard Diluent des Herstellers verdünnt. Um eine Standardreihe mit absteigender Konzentration des Standardproteins zu erreichen, wurde in sechs Verdünnungsschritten vom Standard, mit der höchsten Konzentration von 100 ng/ml ausgehend, je um den Faktor 1 zu 2 in Standard Diluent verdünnt. Die Negativkontrolle stellte das Standard Diluent an sich dar. Die Proben-verdünnungen, die Negativkontrolle und der Standard wurden im Anschluss an die Inkubation je in Duplikaten mit einem Volumen von 45 µl in die Wells gegeben und wieder für eine Stunde unter Rotation bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschrift nach dem gleichen Schema wie zuvor bei der Beschichtung mit den primären Antikörpern, um ungebundene Proben zu entfernen. Im Anschluss erfolgte die Beschichtung mit dem sekundären Biotin-konjugiertem Antikörper, welcher zur Detektion des gesuchten Proteins dient. Dieser Antikörper lag wie auch der primäre in einer Konzentration von 0,2 mg/ml vor. Es wurden 40 µl dieser Lösung in 5 ml „*Detection Antibody Diluent*“ verdünnt. Somit wurde eine Endkonzentration von 1 µg/ml hergestellt. Jedes Well wurde mit 50 µl beladen. Es folgte ein einstündiger Inkubationsschritt unter denselben Bedingungen wie zuvor. Um auch jetzt ungebundene Antikörper zu entfernen, wurde wieder der ein bis zweiminütige Waschschrift mit ELISA-Puffer durchgeführt. Das bei -20°C gekühlt gelagerte Streptavidin-HRP-Konjugat wurde nun in einer 1:100 Verdünnung mit „*Streptavidin-HRP Diluent*“ mit je 50 µl auf die Wells gegeben. Anschließend wurde die Platte bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Nach einem finalen Waschschrift wurde die Substrate Solution mit Tetramethylbenzidin im Verhältnis eins zu eins in die Wells gegeben. Das Volumen hierbei betrug je 45 µl. Die Platte wurde im Dunkeln bei 37°C inkubiert und nach der Blaufärbung nach circa 10-20 Minuten mit je 25 µl der Stopplösung gestoppt. Die Stopplösung enthält 0,1% Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Durch das Auftragen der Stopplösung kam es zu einem sofortigen Farbumschlag von blau zu gelb. Direkt im Anschluss wurde die Absorption mithilfe des ELISA-Readers (Epoch Biotek) bei 450nm gemessen. Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden anhand der Standardreihe quantifiziert.

## **2.8 Versuche am Mausmodell**

Um die CAMP-Konzentration im murinen Blutserum zu untersuchen, wurden Messungen in bereits aus einem anderen Projekt der Arbeitsgruppe vorhandenen Serumproben aus unter Standardbedingungen gehaltenen C57BL/6J (WT)- und transgenen C57BL/6J-*Tlr*-

*g<sup>M7Btlr</sup>/Mmjax* (TLR-9-KO)-Mäusen durchgeführt. Hierfür wurde in Form von technischen Doppelbestimmungen der ELISA (siehe 2.7.2) verwendet. Der Testbereich des ELISA-Kits befand sich zwischen 1,56 und 100 ng/mL. Tests mit Standardabweichungen von über 20% innerhalb der Duplikat-Messungen wurden wiederholt. Die Verwendung der betreffenden Tiere zum Zweck der Organentnahme war an der Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland durchgeführt worden und der lokalen Regierungsbehörde (Regierungspräsidium Gießen) angezeigt worden.

## 2.9 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde das Statistikprogramm SPSS (Version 26, SPSS Institute INC., Chicago, US) verwendet. Die Daten wurden als nicht normalverteilt und unabhängig eingestuft, sodass deren Mittelwerte mithilfe des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Tests (bei mehr als 2 Proben) und bei zwei zu vergleichenden Proben mithilfe des Mann-Whitney-U Test verglichen werden konnten. Für die Abbildungen der verschiedenen Stimulationsversuche wurden Box-Plot-Diagramme verwendet. Die als Rechteck dargestellte Box, entspricht dem Bereich der Lage der mittleren 50% der Daten und wird nach oben von dem 75%-Quantil und nach unten von dem 25%-Quantil begrenzt. Der schwarze Strich innerhalb der Box ist der Median. Die sogenannten „Whiskers“ stellen das Minimum und das Maximum der Daten dar. Eingeschlossen wurden alle Werte, welche vom Mittelwert höchstens zwei Standardabweichungen entfernt lagen. Ausreißer werden durch Kreise und Sterne markiert. Als signifikant wurden P-Werte unter 0.05 angenommen, diese wurden in den jeweiligen Diagrammen angegeben.

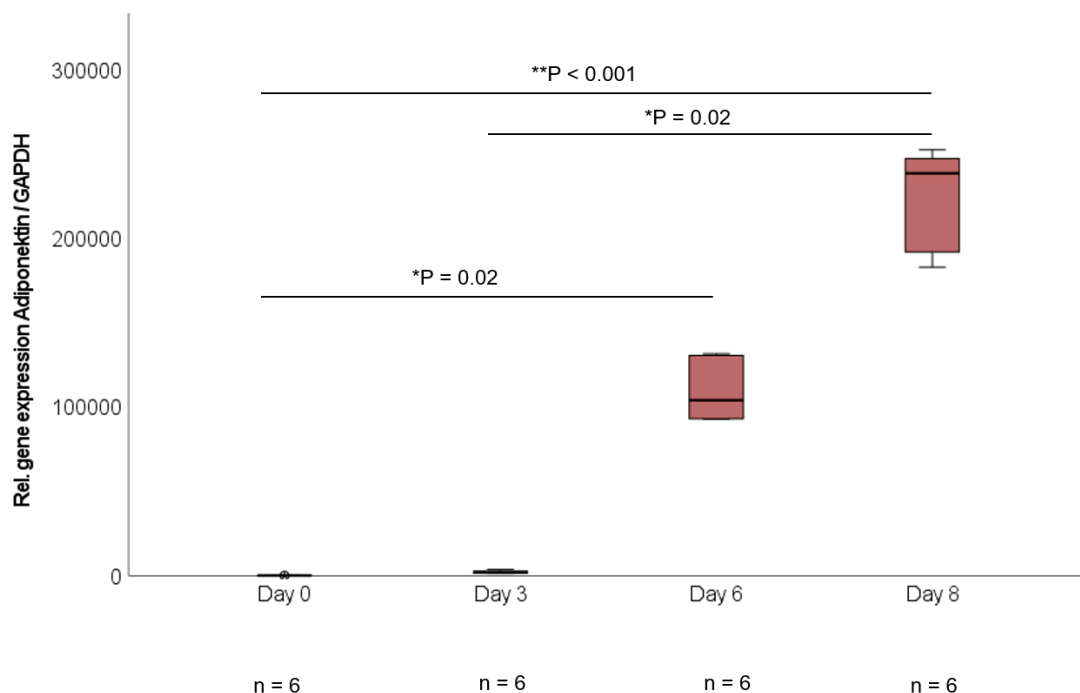
Um die Beziehungen der Daten verschiedener Parameter untereinander darzustellen, wurde als statistisches Verfahren die Korrelationsanalyse nach Spearman verwendet. Die Vorteile des Testes bestehen in seiner Robustheit gegenüber Ausreißern und der Möglichkeit ihn bei nicht normalverteilten, unabhängigen Variablen zu verwenden. Hierbei liegt der Korrelationskoeffizient ( $\rho$ ) zwischen -1 und 1, wobei +1 als eine perfekte positive Beziehung und -1 auf eine perfekte negative Beziehung zu interpretieren ist. Ein  $\rho$ -Wert von 0 deutet darauf hin, dass kein Zusammenhang zwischen den Variablen besteht.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Genexpressionsanalyse (PCR)

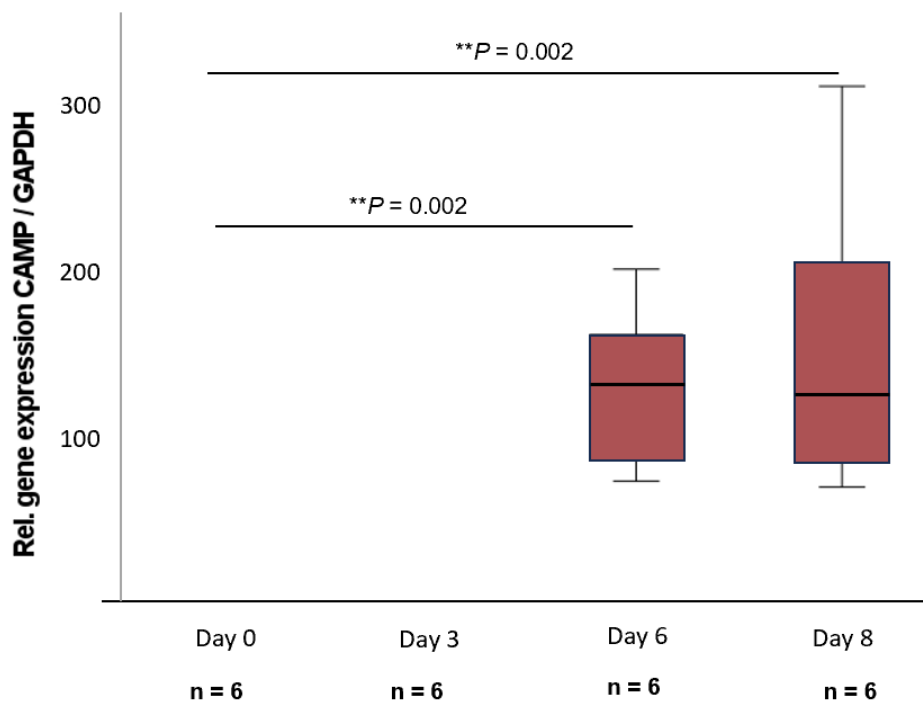
##### 3.1.1 Ergebnisse der 3T3-L1-Zellkulturversuche

Um die Funktionalität der für die weiteren Versuche verwendeten 3T3-L1-Adipozyten zu verifizieren, wurde eine Differenzierungsreihe auf ihre Adiponektin-Konzentration hin analysiert. Das Protein Adiponektin wird von Adipozyten produziert und spielt eine wichtige Rolle in Stoffwechselprozessen des menschlichen Organismus. Es ist vor allem für seine entzündungs-hemmende Eigenschaft bekannt<sup>120</sup>. Der Gesamtanstieg der Adiponektin-Expres-sion während der Differenzierung zeigte sich wie erwartet als sehr signifikant (\*\*P < 0.001). Diesen deutlichen Anstieg bestätigen im Detail die signifikante Induktion von Tag 0 zu Tag 6 (\*P = 0.02) und Tag 3 zu 8 (\*P = 0.02) (**Abbildung 3-1**).



**Abbildung 3-1 Darstellung der Adiponektin-Expression einer Differenzierungsreihe von 3T3-L1 Adipozyten.** GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Rel.= *relative*. Darstellung der Werte als Box-Plot Diagramm. Zur Berechnung der P-Werte und der statistischen Signifikanz ( $P < 0,05$ ) wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Pro experimentellen Versuch wurden  $n = 6$  Wells untersucht.

Zur Überprüfung der murinen 3T3-L1-Adipozyten in Bezug auf die CAMP-Genexpression wurde anhand einer Differenzierungsreihe die CAMP-Expression der verschiedenen Reifestadien der Zellen gemessen (**Abbildung 3-2**). Es zeigte sich eine stark signifikanter Gesamtanstieg der CAMP-Genexpression (\*\*P = 0.002) innerhalb von acht Tagen. Auch Tag 0 zu Tag 6 zeigte bereits einen stark signifikanten Anstieg (\*\*P = 0.002)<sup>166</sup>.

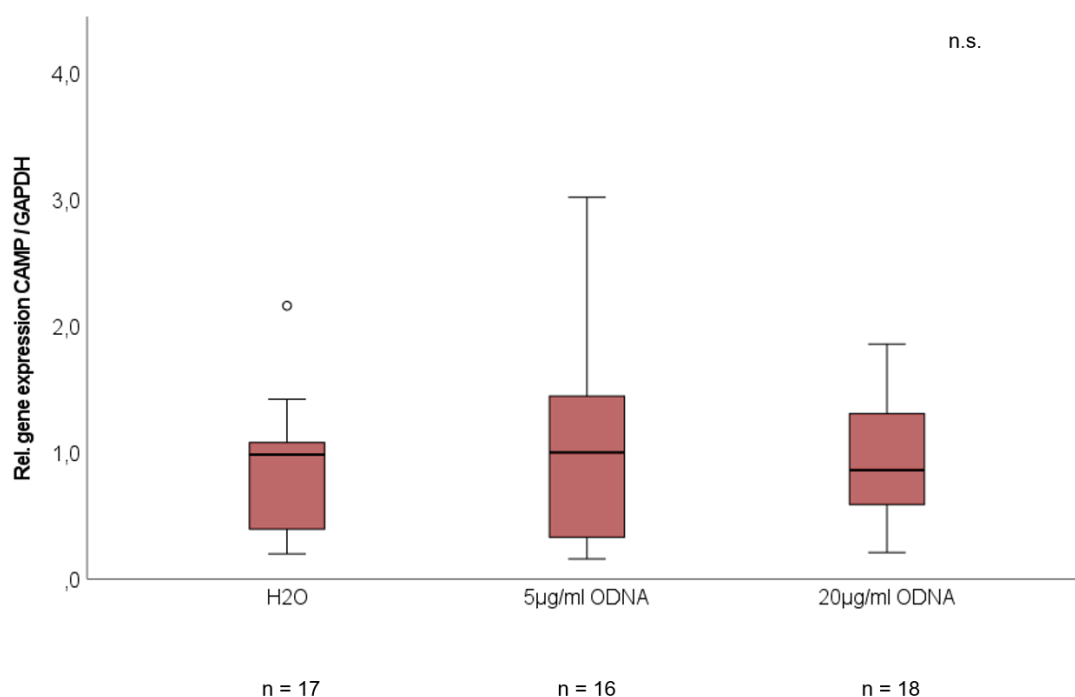


**Abbildung 3-2 Darstellung der CAMP-Expression einer Differenzierungsreihe von 3T3-L1 Adipozyten.** (modifiziert nach Höpfinger, Schmid et al. 2023<sup>166</sup>). CAMP = Cathelicidin Antimikrobielles Peptid, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Rel. = *relative*. Darstellung der Werte als Box-Plot Diagramm. Zur Berechnung der P-Werte und der statistischen Signifikanz ( $P < 0,05$ ) wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Pro experimentellen Versuch wurden n = 6 Wells untersucht.

Eine wesentliche Rolle in der Signalgebung des TLR-9-Rezeptors als Immunantwort spielt die Erkennung von Oligodesoxyribonukleotiden(ODNs)<sup>196</sup>. Um die Interaktion zwischen verschiedenen ODNs und TLR-9 hinsichtlich der CAMP-Regulation zu verifizieren, wurden Versuche mit ODN A, B und C durchgeführt. Die Stimulation reifer Adipozyten mit dem TLR-9-Agonisten ODN A in verschiedenen Konzentrationen zeigte keinen Anstieg oder Abfall der CAMP-Expression (**Abbildung 3-3**)<sup>166</sup>.

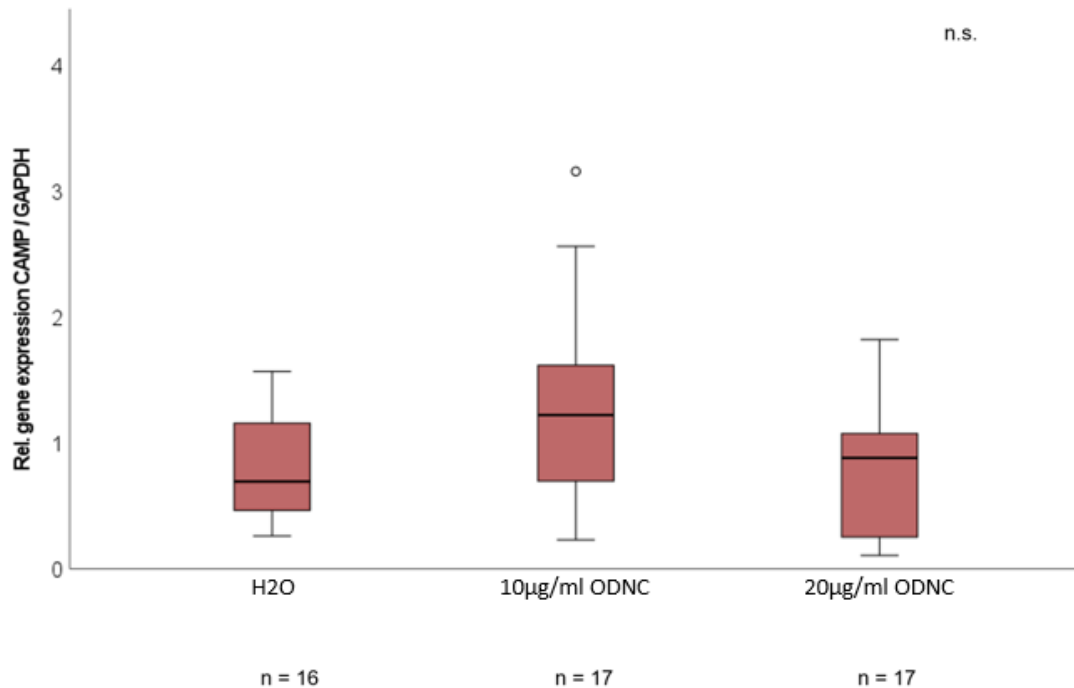
Der TLR-9-Agonist ODN B zeigte in der Stimulation reifer Adipozyten mit steigenden Konzentrationen keine signifikante Gesamtsteigerung der CAMP-Expression (Daten nicht dargestellt)<sup>166</sup>.

Auch die Stimulation der Adipozyten mit dem TLR-9-Antagonisten ODN 2087 erbrachte keine signifikanten Ergebnisse (Daten nicht dargestellt)<sup>166</sup>.



**Abbildung 3-3 Resultate nach Stimulation mit TLR-9-Agonist ODN A auf die CAMP-Expression reifer 3T3-L1 Adipozyten.** (modifiziert nach Höpfinger, Schmid et al. 2023<sup>166</sup> CAMP = Cathelicidin Antimikrobielles Peptid, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, N.s.: nicht signifikant, ODN = Oligodesoxyribonukleotid, Rel. = *relative*. Darstellung der Werte als Box-Plot Diagramm. Zur Berechnung der P-Werte und der statistischen Signifikanz ( $P < 0,05$ ) wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Pro experimentellen Versuch wurden n=16-18 Wells untersucht.

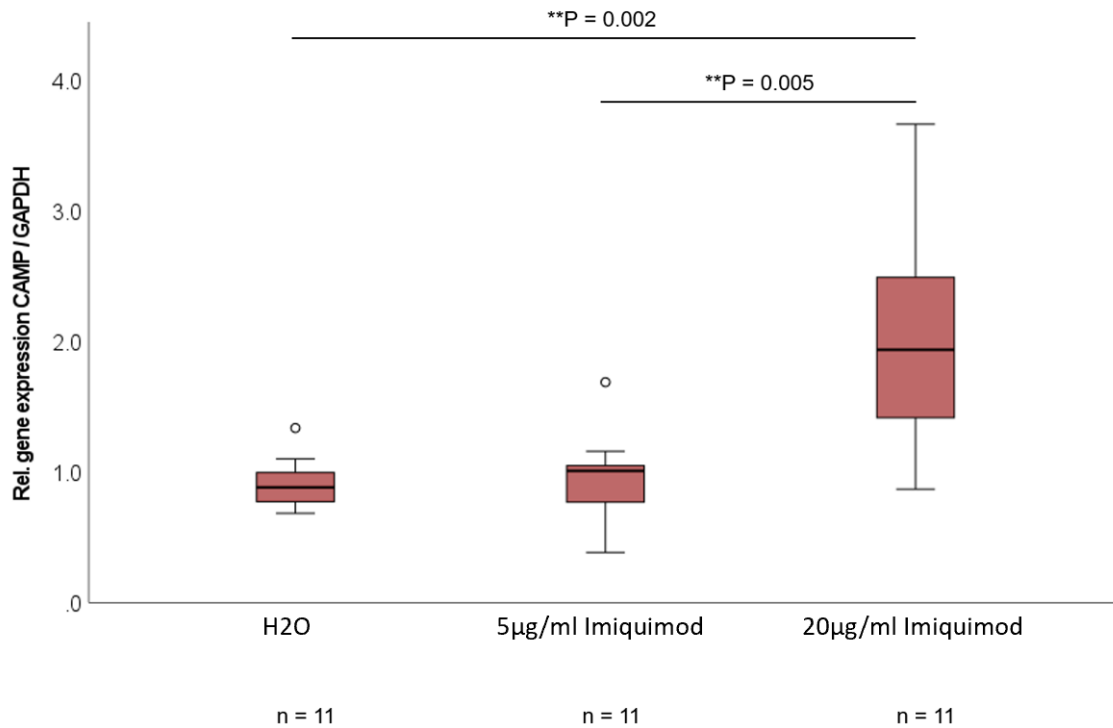
Die Stimulation der Zellen mit ODN C, einem weiteren TLR-9-Agonisten, ließ ebenfalls keine signifikante Veränderung in Expression oder Repression des CAMPs erkennen (**Abbildung 3-4**)<sup>166</sup>.



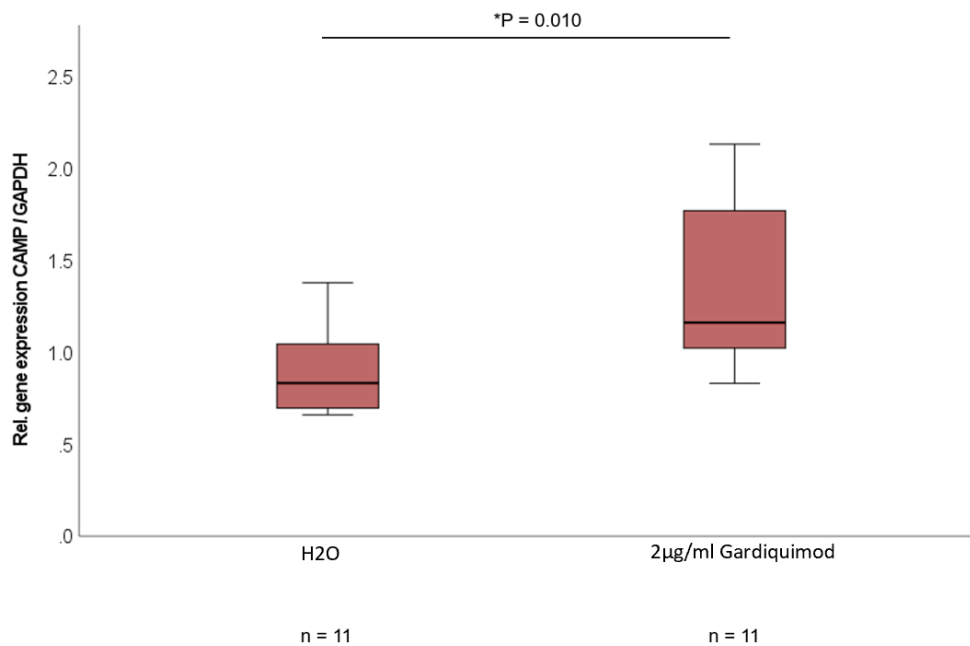
**Abbildung 3-4 Resultate nach Stimulation mit TLR-9-Agonist ODN C auf die CAMP-Expression reifer 3T3-L1 Adipozyten.** (modifiziert nach Höpfinger, Schmid et al. 2023<sup>166</sup>) CAMP = Cathelicidin Antimikrobielles Peptid, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, N.s.: nicht signifikant, ODN = Oligodesoxyribonukleotid, Rel. = *relative*. Darstellung der Werte als Box-Plot Diagramm. Zur Berechnung der P-Werte und der statistischen Signifikanz ( $P < 0,05$ ) wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Pro experimentellen Versuch wurden  $n = 16-17$  Wells untersucht.

In vorangegangenen Studien konnte TLR-7 eine immunologische Aktivität zugeschrieben werden<sup>251</sup>. Auf dieser Grundlage galt es herauszufinden, inwieweit durch Agonisierung des Rezeptors eine Verbindung zur CAMP-Expression bestünde.

Die TLR-7-Agonisten Imiquimod und Gardiquimod induzierten beide die CAMP-Expression. Imiquimod steigerte diese stark signifikant (\*\* $P = 0.002$ ) mit der Höchstdosis von 20 µg/ml (**Abbildung 3-5**). Eine dosisabhängige Steigerung ließ sich von 5 µg/ml zu 20 µg/ml Imiquimod detektieren (\*\* $P = 0.005$ ). Der Stimulationsversuch mit Gardiquimod zeigte ebenfalls eine dosisabhängige Steigerung der CAMP-Expression. Die Stimulation mit 1 µg/ml Gardiquimod führte bereits zu einer deutlichen Induktion, aber noch keiner Signifikanz (Daten nicht dargestellt). Durch die Dosiserhöhung auf 2 µg/ml ließ sich ein signifikanter Anstieg (\* $P = 0.010$ ) erzielen (**Abbildung 3-6**).

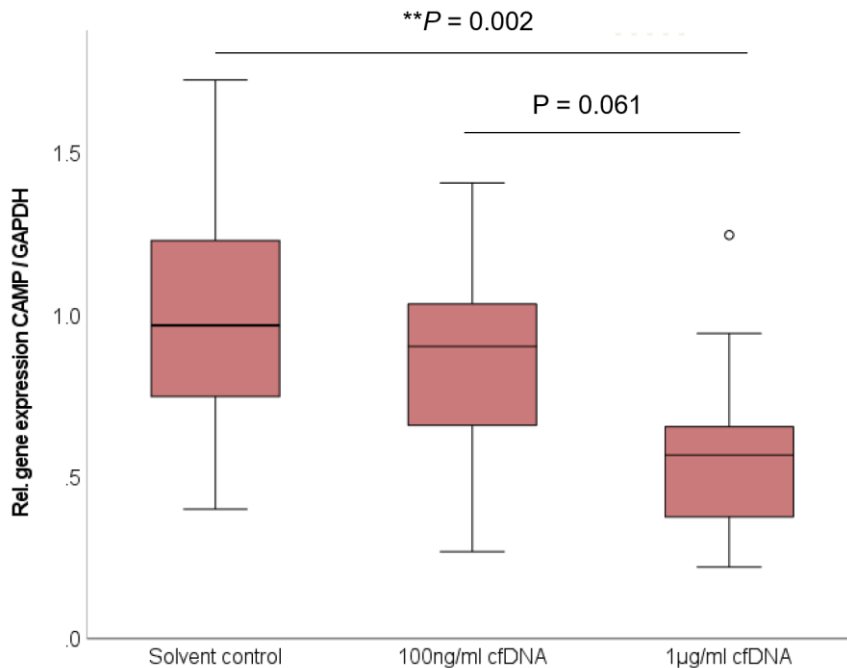


**Abbildung 3-4** Resultate nach Stimulation mit TLR-7-Agonist Imiquimod auf die **CAMP-Expression reifer 3T3-L1 Adipozyten**. CAMP = Cathelicidin Antimikrobielles Peptid, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Rel. = *relative*. Darstellung der Werte als Box-Plot Diagramm. Zur Berechnung der P-Werte und der statistischen Signifikanz ( $P < 0,05$ ) wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Pro experimentellen Versuch wurden  $n = 11$  Wells untersucht.



**Abbildung 3-5 Resultate nach Stimulation mit TLR-7-Agonist Gardiquimod auf die CAMP-Expression reifer 3T3-L1 Adipozyten.** CAMP = Cathelicidin Antimikrobielles Peptid, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydroge-nase, Rel. = *relative*. Darstellung der Werte als Box-Plot Diagramm. Zur Be-rechnung der P-Werte und der statistischen Signifikanz ( $P < 0,05$ ) wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Pro experimentellen Versuch wurden  $n = 11$  Wells untersucht.

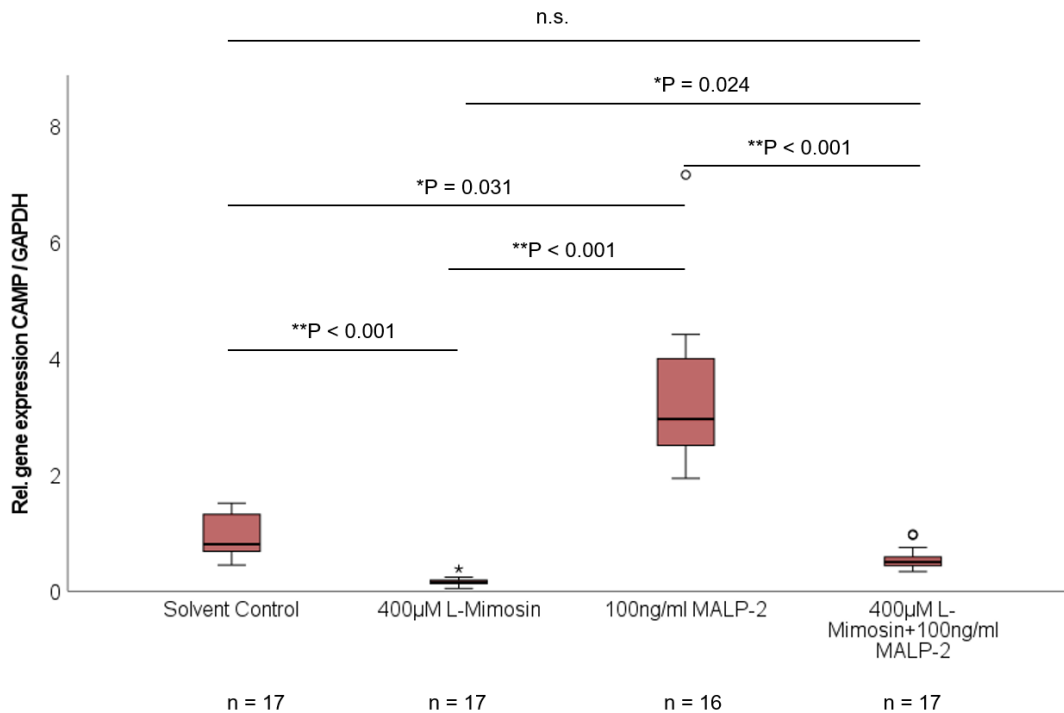
Als Reaktion auf Stress, auch im Sinne eines entzündlichen Geschehens, setzen Adipozyten cfDNA frei. Diese ist zudem in der Lage Immunzellen zu rekrutieren<sup>252</sup>. Inwieweit CAMP unter dieser Regulation steht, ist bisher nicht bekannt. Daher wurden Stimulationsversuche *in vitro* durchgeführt, um dies zu untersuchen. Ein stark signifikanter Abfall der CAMP-Expression der 3T3-L1-Adipozyten zeigte sich unter der Stimulation mit einer Dosis von 1 µg/ml cfDNA (\*P = 0.002). Auch ließ sich eine nicht signifikante Tendenz zu dosisabhängiger Repression (\*P = 0.061) im Vergleich beider eingesetzten Dosen (100 ng/ml und 1 µg/ml) beobachten (**Abbildung 3-7**)<sup>166</sup>.



**Abbildung 3-6 Resultate nach Stimulation mit cfDNA auf die CAMP-Expression reifer 3T3-L1 Adipozyten** (modifiziert nach Höpfinger, Schmid et al. 2023<sup>166</sup>). CAMP = Cathelicidin Antimikrobielles Peptid, cfDNA = *cell free* DNA, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Rel. = *relative*. Darstellung der Werte als Box-Plot Diagramm. Zur Berechnung der P-Werte und der statistischen Signifikanz ( $P < 0,05$ ) wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Pro experimentellen Versuch wurden  $n = 16-18$  Wells untersucht.

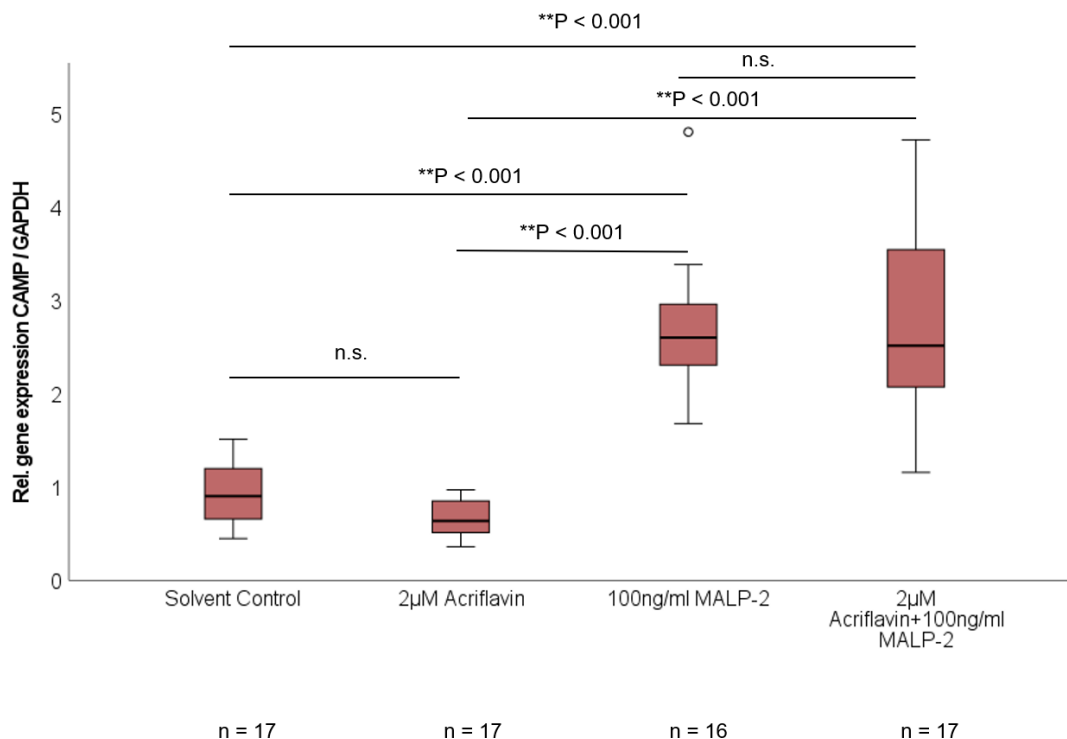
Ein weiterer interessanter Ansatzpunkt war die Regulation der CAMP-Expression unter TLR-2. Eine Hochregulierung von CAMP konnte bereits gezeigt werden<sup>161</sup>. Das Interesse bestand nun darin einen möglichen Weg der Antagonisierung dieser Hochregulierung zu untersuchen. Hierfür wurde die immunmodulatorisch wirksame Aminosäure L-Mimosin verwendet.

Die reifen 3T3-L1- Adipozyten wurden mit 100 ng/ml TLR-2-Aktivator MALP-2 und 400 mM L-Mimosin stimuliert (**Abbildung 3-8**). Es zeigte sich ein stark signifikanter Anstieg der CAMP-Expression ( $**P < 0.001$ ) unter alleiniger Zugabe MALP-2. Unter isolierter Stimulation der Zellen mit L-Mimosin zeigte sich eine signifikante Reduktion ( $**P < 0.001$ ). Auch die kombinierte Zugabe beider Stimulanzen erzielte eine signifikante Repression ( $**P < 0.001$ ) der CAMP-Expression. Als *solvent control* wurde eine Ammoniumhydroxidlösung + PBS +1% BSA verwendet.



**Abbildung 3-7 Effekt von L-Mimosin und MALP-2, sowie deren kombinierte Zugabe auf die CAMP-Expression 3T3-L1 Adipozyten. N.s.: nicht signifikant.** CAMP = Cathelicidin Antimikrobielles Peptid, GAPDH = Glycerin-aldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, MALP-2 =, *Macrophage-activating lipo-peptide 2*, n.s. = nicht signifikant, Rel. = *relative*. Darstellung der Werte als Box-Plot Diagramm. Zur Berechnung der P-Werte und der statistischen Signifikanz ( $P < 0,05$ ) wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Pro experimentellen Versuch wurden  $n = 16-17$  Wells untersucht.

Acriflavin zeigte in vorangegangenen Studien einen hemmenden Einfluss auf die von Toll-*like*-Rezeptoren induzierten Signalwege<sup>209</sup>. Daher war es von Interesse den Effekt der Zugabe des Acriflavins und eine eventuelle Regulation der unter MALP-2 hervorgerufenen Steigerung der CAMP-Expression zu untersuchen (**Abbildung 3-9**). Eine alleinige Zugabe von 2 µM Acriflavin zeigte keine Auswirkungen auf die Expression von CAMP der reifen Adipozyten. Ein signifikanter Anstieg (\*\*P < 0.001) ließ sich bei Hinzugabe von 100 ng/ml MALP-2 beobachten. Es zeigte sich auch ein signifikanter Unterschied (\*\*P < 0.001) zwischen den isolierten Stimulierungen durch Acriflavin und MALP-2. Die zusätzliche Hinzugabe von Acriflavin zu den mit MALP-2 stimulierten Zellen beeinflusste die durch MALP-2 hervorgerufene Steigerung der CAMP-Expression nicht signifikant.



**Abbildung 3-8 Effekt von Acriflavin und MALP-2, sowie deren kombinierte Zugabe auf die CAMP-Expression 3T3-L1 Adipozyten. N.s.: nicht signifikant.** CAMP = Cathelicidin Antimikrobielles Peptid, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, MALP-2 =, *Macrophage-activating lipopeptide 2*, n.s. = nicht signifikant, Rel. = *relative*. Darstellung der Werte als Box-Plot Diagramm. Zur Berechnung der P-Werte und der statistischen Signifikanz ( $P < 0,05$ ) wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Pro experimentellen Versuch wurden  $n = 16-17$  Wells untersucht.

Auch TLR-3 wird von Adipozyten stark exprimiert<sup>199</sup>. Der Rezeptor spielt unter anderem bei der Erkennung von organismusfremder RNA eine große Rolle<sup>201</sup>. Inwiefern eine Verbindung zu CAMP besteht, sollte mithilfe des TLR-3 agonisierenden ds-RNA-Moleküls Polyinosin-Polycytidylsäure (PolyI:C) untersucht werden.

Poly I:C zeigte lediglich einen Trend zur Senkung der CAMP-Expression bei der Dosiserhöhung von 1 µg/ml auf 5 µg/ml ( $P = 0.057$ ). Zur Solvent-Control H<sub>2</sub>O zeigte sich keine signifikante Änderung der Expression (Daten nicht dargestellt).

Ob eine Beeinflussung der CAMP-Genexpression über den adipozytären, immunolatorisch wirksamen Nod-Like-1(NOD1)-Rezeptor- Signalweg<sup>72</sup> besteht, ist bisher nicht untersucht worden. Die Stimulation der 3T3-L1 Adipozyten mit steigenden

Dosen des NOD1-Agonisten L-Ala-y-D-Glu-mDAP (TriDAP) zeigte keinen Effekt auf die Expression von CAMP (Daten nicht dargestellt).

Um die Inhibition auf Signalwegebene genauer zu untersuchen, wurden reife 3T3-L1-Adipozyten mit jeweils 20 µg/ml ODN B und einem aus der Literatur ausgewählten Signalweginhibitor stimuliert (**Abbildung 3-10**).

Zunächst wurde eine Regulation der CAMP- Genexpression über Inhibition, mithilfe von S3I-201 des *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*(STAT3)-Signalweges untersucht. Bereits bekannt ist, dass die Hochregulierung von CAMP über TLR-2 mithilfe des STAT3-Signalwegs vermittelt wird<sup>166</sup>.

Die stärkste Inhibition, im Vergleich zur alleinigen Zugabe von ODN B auf die Zellen, erzeugte eine Konzentration von 50 µM S3I-201 (\*\*P < 0.001).

Des Weiteren war es von Interesse den Signalweg der Phosphoinosid-3-Kinasen (PI3K) zu untersuchen. Dieser spielt eine entscheidende Rolle bei der Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, die maßgeblich die Genexpression der Zelle steuern<sup>78</sup>.

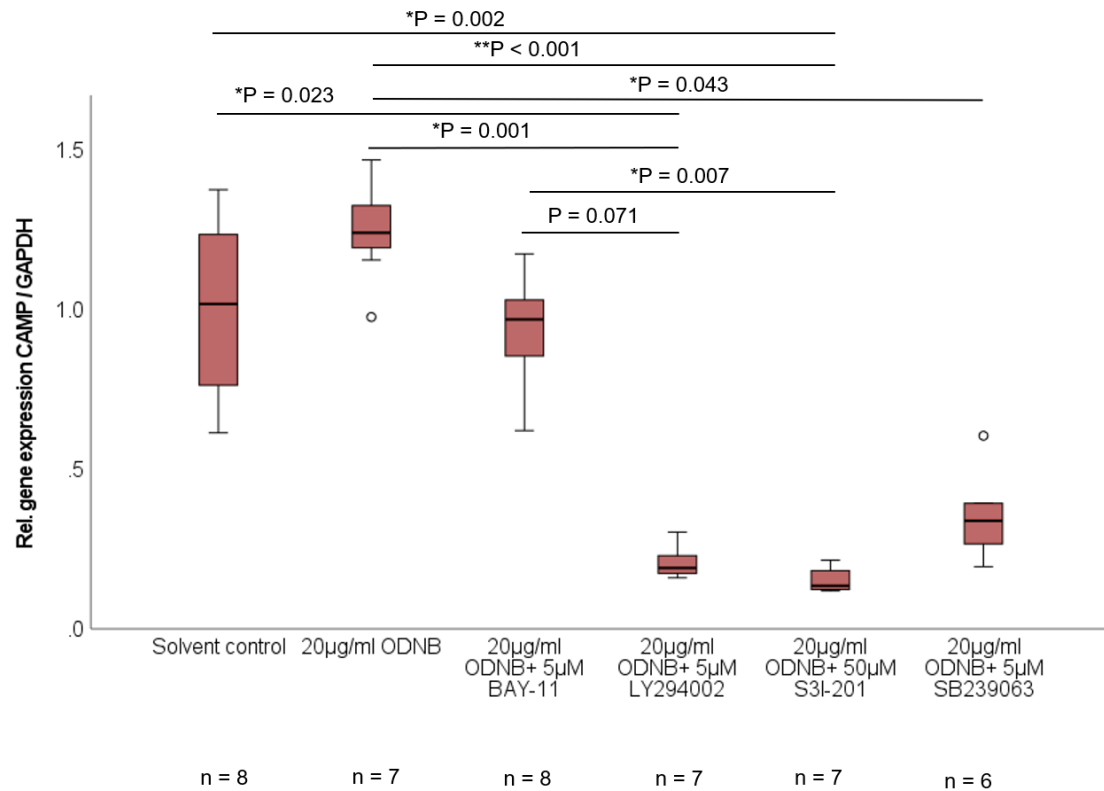
Das Hinzufügen von 5 µM des PI3K- Inhibitors LY294002 führte zu einer signifikanten Reduktion (\*P = 0.001) der durch ODN B hervorgerufenen CAMP-Expression.

Der MAPK-Signalweg ist der Aktivierung einiger TLRs nachgeschaltet und somit der Genexpression verschiedener Effektormoleküle<sup>253,78</sup>.

Mithilfe von 5 µM des *p38-mitogen- activated-protein-kinase* (MAPK)-Inhibitors SB239063 konnte eine Reduktion der hochregulierten CAMP-Genexpression beobachtet werden (\*P = 0.043).

Des Weiteren war von Interesse ob eine Regulation der CAMP-Genexpression über den Transkriptionsfaktor NF-κB bestünde, welche eine entscheidende Rolle in der Immunantwort des humanen Organismus spielt<sup>78</sup>.

Bezogen auf die durch ODN B hervorgerufenen CAMP-Expression, ließ sich mithilfe der Stimulierung mit 5 µM des Inhibitors BAY-11 eine senkende Tendenz erkennen.

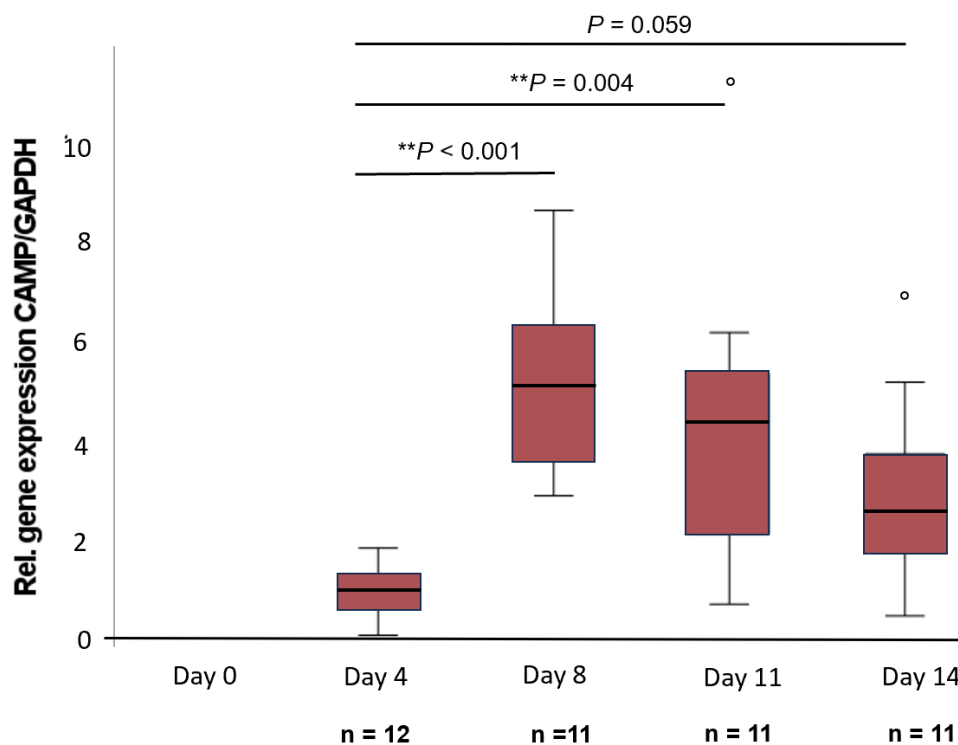


**Abbildung 3-9** Resultate des Vergleiches der Stimulation mit TLR-9-Agonisten ODN B und die Kombination ODN B + einen Signalweginhibitor (BAY-11, LY294002, S3I-201 und SB239063) auf reife 3T3-L1-Adipozyten. CAMP = Cathelicidin Antimikrobielles Peptid, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, n.s.= nicht signifikant, ODN = Oligodesoxyribonuk-leotid, Rel. = *relative*. Darstellung der Werte als Box-Plot Diagramm. Zur Berechnung der P-Werte und der statistischen Signifikanz ( $P < 0,05$ ) wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Pro experimentellen Versuch wurden n = 6-8 Wells untersucht.

### 3.1.2 Ergebnisse der SGBS-Zellkulturversuche

In einem Ansatz wurde eine Differenzierungsreihe humaner SGBS-Adipozyten durchgeführt, um ihre Adiponektin-Expression zu überprüfen und die Ergebnisse sowie die Funktionalität der verwendeten Zellen zu validieren. Es wurde eine Steigerung jener Expression mit Reifung der SGBS-Zellen erwartet. Diese konnte bestätigt werden (Daten nicht dargestellt).

Die Differenzierungsreihe wurde zudem auf ihre Expression von CAMP mit fortlaufender Reifung der Adipozyten geprüft (**Abbildung 3-11**). Es zeigte sich eine signifikante Steigerung der CAMP-Expression, sowohl an Tag 8 (\*\*P < 0.001), als auch an Tag 11 (\*\*P = 0.004), im Vergleich zu Tag 4 der Differenzierung. Die stärkste Expression von CAMP wurde an Tag 8 erreicht. An Tag 11 und 14 sank die Expression des CAMP-Gens deutlich ab. Dennoch blieb die Expression bis Tag 11 gegenüber der Ausgangsexpression insgesamt gesteigert (P = 0.059)<sup>166</sup>.



**Abbildung 3-10 Darstellung der CAMP-Expression einer Differenzierungsreihe von SGBS-Adipozyten** (modifiziert nach Höpfinger, Schmid et al. 2023<sup>166</sup>) AMP = Cathelicidin Antimikrobielles Peptid, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Rel. = *relative*. Darstellung der Werte als Box-Plot Diagramm. Zur Berechnung der P-Werte und der statistischen Signifikanz (P < 0,05) wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Pro experimentellen Versuch wurden n = 11-12 Wells untersucht.

Die Stimulation der SGBS-Zellen mit dem TLR-9-Agonisten ODN B zeigte eine Tendenz zur Steigerung der CAMP-Expression mit Erhöhung der ODN B-Dosis (5 µg/ml und 20 µg/ml). Allerdings zeigten sich die Unterschiede nicht signifikant, trotz hohem Zellumfang (n = 20) (Daten nicht dargestellt).

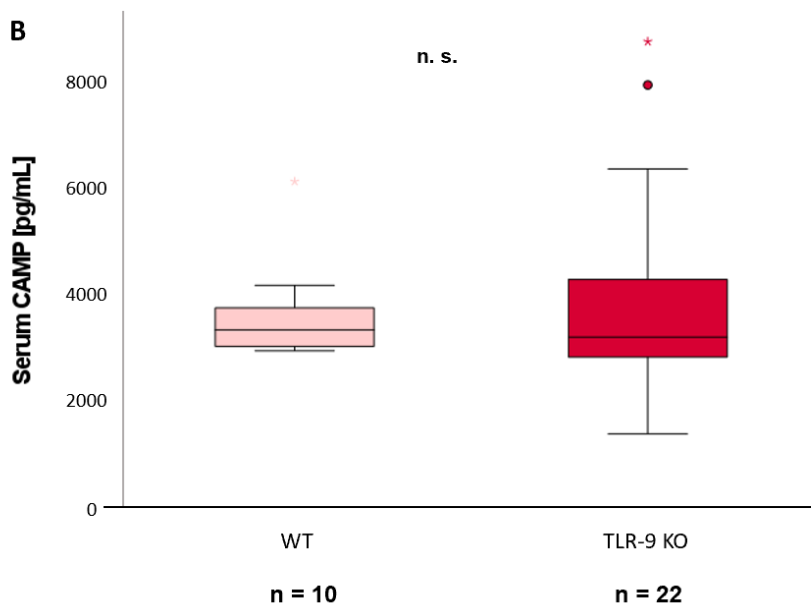
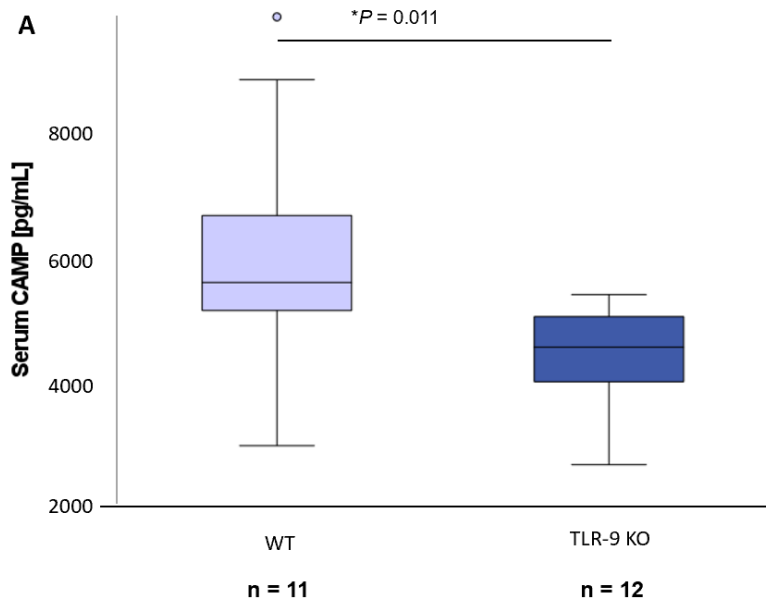
Der Stimulationsversuch mit MALP-2 (100 ng/ml) und PolyI:C konnte keine signifikanten Effekte auf die CAMP-Expression der SGBS-Adipozyten hervor-rufen (Daten nicht dargestellt).

## **3.2 ELISA**

### **3.2.1 Quantifizierung von CAMP in murinen Blutseren**

Um zu analysieren, ob die Regulation von CAMP auf Genexpressionsebene auch einen Einfluss auf die Protein-Regulation hat, wurden murine Blutseren sowie subkutanes Fettgewebe per ELISA untersucht. Für die vorliegenden Ergebnisse wurden aus anderen Projekten der Arbeitsgruppe bereits vorhandene Blutseren und Fettgewebe von Mäusen verwendet.

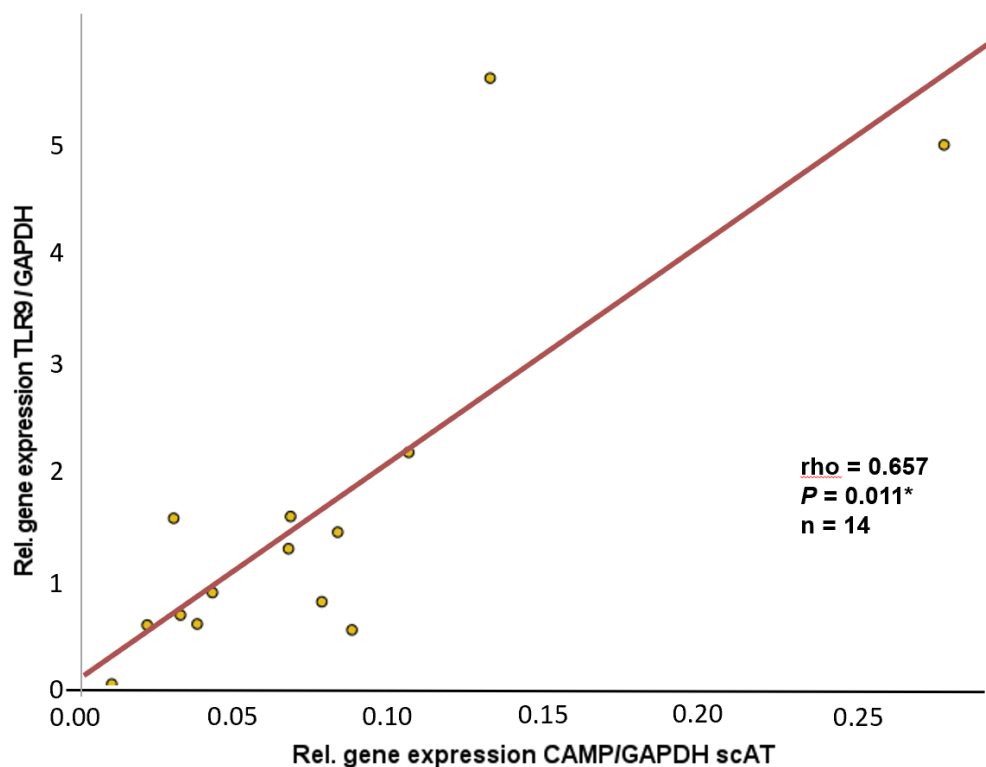
Von besonderem Interesse war die Regulation über den TLR-9-Signalweg. In der Analyse der Blutseren von Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu TLR-9-Knockout (KO)-Mäusen zeigte sich ein geschlechtsspezifischer Unterschied der CAMP-Konzentration (**Abbildung 3-14**). Bei männlichen TLR-9-KO-Mäusen ergab sich eine signifikant (\*P = 0.011) niedrigere CAMP-Konzentration (Graphik A), wohingegen sich in der weiblichen Kohorte kein Unterschied der Konzentrationen ergab (Graphik B)<sup>166</sup>.



**Abbildung 3-11** Resultate der Analyse der CAMP-Expression in Blutseren von männlichen (A) und weiblichen (B) Wildtyp-Mäusen und TLR-9-Knockout-Mäusen (modifiziert nach Höpfinger, Schmid et al. 2023<sup>166</sup>). CAMP = Cathelicidin Antimikrobielles Peptid, n.s. = nicht signifikant, TLR = Toll-*like*-Rezeptor. Darstellung der Werte als Box-Plot Diagramm. Zur Berechnung der P-Werte und der statistischen Signifikanz ( $P < 0,05$ ) wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Pro experimentellen Versuch wurden (A)  $n = 11-12$ , (B)  $n = 10-22$  Wells untersucht.

Ergänzend zu den Untersuchungen der Blutseren, war ein weiteres Ziel einen möglich bestehenden Zusammenhang von CAMP und TLR-9 im subkutanen Fettgewebe der Mäuse zu untersuchen.

Die CAMP- und TLR-9-Expression im subkutanen Fettgewebe von männlichen C57BL/6J Wildtyp-Mäusen wurde mithilfe einer Korrelationsanalyse untersucht (**Abbildung 3-13**). Es zeigte sich eine positive Korrelation der Parameter von  $\rho = 0.657$  und eine Signifikanz von  $*P = 0.011^{166}$ .



**Abbildung 3-12 Korrelationsanalyse mittels Spearman-Test zwischen CAMP- und TLR-9-Expression im subkutanen Fettgewebe (scAT) von C57BL6J-Wildtyp-Mäusen. Rho = Korrelationskoeffizient nach Spearman.** (modifiziert nach Höpfinger, Schmid et al. 2023<sup>166</sup>) CAMP = Cathelicidin Antimikrobielles Peptid, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Rel. = *relative*, TLR = *Toll-like*-Rezeptor.

### 3.2.2 Proteinbestimmung aus Zellkulturversuchen

Es wurde versucht das hier verwendete ELISA-Kit auch für die Quantifizierung von CAMP in Zellkultur-Überständen zu nutzen. Allerdings zeigte sich, dass die Proben eine zu geringe Konzentration für die Sensitivität des ELISA-Kit hatten und lediglich Tendenzen der CAMP-Konzentration zu messen waren. Hierunter ließ sich eine

Steigerung der cAMP-Konzentration mit steigender Differenzierung der Zellen erkennen  
(Daten nicht gezeigt).

## 4 Diskussion

### 4.1 Allgemeine Diskussion

Die Untersuchung der proinflammatorischen Faktoren des adipozytären Immunsystems ist von besonderem wissenschaftlichem Interesse. Dies liegt daran, dass bei Volkskrankheiten wie Adipositas eine metabolische Fehlregulation des Immunprofils des Fettgewebes vorliegt („Adipoflamination“). Diese Fehlregulation kann zu einem chronischen Entzündungszustand („Metaflammation“) führen und weitere Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2, eine Steatosis Hepatis und einige Krebsarten bedingen<sup>232-236</sup>. Genauer zu verstehen, welche inflammatorischen Mechanismen auf Ebene der Adipozyten hierbei greifen, ist die Grundlage für spätere therapeutische Ansatzpunkte.

Antimikrobielle Peptide, wie CAMP, sind ein wichtiger Teil der immunologischen Funktion des Adipozyten<sup>254</sup>. Ziel dieser Arbeit war es, die CAMP-Expression auf zellulärer und physiologischer Ebene zu untersuchen. Umgesetzt wurde dies anhand von in-vitro Versuchen mit repräsentativen murinen 3T3-L1-Adipozyten, humanen SGBS-Adipozyten und Serumproben aus Mausmodellen. Die Linie der 3T3-L1 Adipozyten ist ein lange bewährtes und genauestens definiertes Adipozyten-Modell. Die für die dargestellten Versuche verwendeten Fettzellen wurden vor jedem Stimulationsversuch anhand etablierter Verfahren, wie des in Kapitel 2.2.7 beschriebenen LDH- Testes und der lichtmikroskopischen Kontrolle auf ihre Funktionalität geprüft. Die hier verwendeten Stimulanzen wurden anhand aktueller Literatur ausgewählt. Es erfolgten Stimulationsversuche, um die Modulation von CAMP auf adipozytärer Ebene genauer zu erforschen. Genauer wurde die Expression auf Transkriptionsebene und die Sekretion des antimikrobiellen Peptids analysiert. Um vom murinen auch auf das menschliche Modell Schlüsse ziehen zu können, wurden anhand der Ergebnisse der 3T3-L1-Zelllinie Effekte an humanen SGBS-Adipozyten untersucht. SGBS-Fettzellen<sup>247</sup> wurden in dieser Arbeit erstmalig zur Erforschung der CAMP-Expression verwendet und zeigten sich hierbei als durchaus robustes und verlässliches Modell für die Analyse der Regulation von CAMP. Um umfassendere Kenntnisse über komplexere Regulationsmechanismen der Cathelicidinausschüttung im Organismus zu gewinnen, wurden die Experimente zur Erforschung der Sekretion von CAMP in Mausseren ergänzend zu den vorangegangenen in-vitro-Versuchen erweitert. Dies ermöglicht es, Rückschlüsse auf

physiologische und pathophysiologische Regulations-mechanismen im Gesamtorganismus ziehen zu können.

Durch die gemeinsame Auswertung der Resultate der Zellkulturforschung und der Ergebnisse des Mausmodells konnten neuartige Einsichten bezüglich der Funktion und Steuerung des antimikrobiellen Peptids CAMP auf zellulärer (in vi-tro) und physiologischer (in vivo) Stufe erlangt werden.

## **4.2 Spezielle Diskussion: CAMP im Zellversuch**

### **4.2.1 CAMP-Regulation in 3T3-L1 Adipozyten und SGBS-Zellen**

2015 wurde adipozytäres CAMP erstmals von der Arbeitsgruppe Zhang et al. beschrieben. Hierbei ist vor allem die Rolle CAMPs in der lokalen Wirtsabwehr im subkutanen Fettgewebe hervorgehoben worden<sup>13</sup>. CAMP als antimikrobielles Peptid wird unter anderem bei subkutanen, bakteriellen Infektionen von Adipozyten sezerniert<sup>13</sup>. Dass dies von metabolischen Faktoren abhängt, konnte gezeigt werden, indem sich die Wirtsabwehr bei Adipositas als eingeschränkt erwiesen hat<sup>240</sup>.

Stimulanzen zu untersuchen, die zur Aktivierung oder Repression des adipozytären CAMP führen, ist deshalb von besonderem Interesse, da es unmittelbare Konsequenzen auf die Immunabwehrfähigkeit gegenüber Infektionen hat.

Anhand von Messungen der CAMP-Expression in verschiedenen Reifestadien konnte im murinen 3T3-L1-Modell eine stetige signifikante Steigerung (Tag 0 zu Tag 8 der Differenzierung) der CAMP-Expression festgestellt werden. Damit konnte die von Zhang et al. aufgestellte These, die Genexpression des CAMP-Gens steige während der Reifung vom Präadipozyten zum ausgereiften Adipozyten an<sup>13</sup>, bestätigt werden. CAMP reiht sich hierbei in eine Reihe weiterer Adipokine, welche vermehrt bei steigender Ausreifung der Fettzelle exprimiert werden ein<sup>255</sup>.

Um von dieser Beobachtung auf menschliche Fettzellen Rückschlüsse ziehen zu können wurde in dieser Arbeit erstmalig die Gen-Expression von CAMP während der Differenzierung humaner Adipozyten -Adipozyten untersucht. Im SGBS-Modell zeigte sich die höchste Expression an Tag 8 mit daraufhin fallenden Werten bis Tag 14, dem Tag der vollständigen Ausreifung der Zellen. Insgesamt lag eine anhaltend erhöhte Expression des CAMP-Gens bis zur vollständigen Reife der Zellen gegenüber dem Ausgangsniveau vor. Es kann diesen Erkenntnissen zufolge erstmalig gesagt werden, dass das Modell der SGBS-Adipozyten als geeigneter in-vitro-Entwurf für weitere CAMP-

Analysen im Menschen verwendet werden kann.

Der Zusammenhang zwischen der Reife der Adipozyten und der ansteigenden Genexpression von CAMP trägt dazu bei, die lokale Immunabwehr gegen Infektionen zu verstehen und könnte zudem zur Erklärung der bereits im Mausmodell beobachteten erhöhter Infektionsanfälligkeit bei gestörter Adipogenese<sup>13</sup> herangezogen werden.

#### **4.2.1.1 Toll-like-Rezeptoren**

Toll-like-Rezeptoren gehören zu den am besten charakterisierten Musterkennungsrezeptoren und sind unter anderem unerlässlich für die immunologische Abwehr von mikrobiellen Krankheitserregern. Erkennen sie solche DAMPs, sind sie in der Lage proinflammatorische Signalkaskaden einzuleiten<sup>73, 76</sup>. Auch die aufgrund von Adipositas bedingten metabolischen Entzündung und chronischen Lipoflammation spielen hier eine wichtige Rolle: Adipositas steht im Mausmodell in Verbindung mit der hochregulierten Expression mehrerer Toll-like-Rezeptoren<sup>256</sup>. Dass nun auch CAMP eine Rolle in dieser Entzündungsreaktion der Adipozyten über TLRs spielt, war eine der Hypothesen dieser Arbeit. Hierfür wurden verschiedene, anhand aktueller Literatur ausgewählte TLRs auf ihrer regulatorischen Verbindung mit CAMP untersucht.

Thomalla et al. zeigten in unserer Arbeitsgruppe, dass Adipozyten in der Lage sind, funktionalen Toll-like-Rezeptor-9 zu exprimieren, und dass die Expression mit fortlaufender Differenzierung der Zellen steigt<sup>82</sup>. TLR-9 ist in der Lage unmethylierte DNA, welche von Bakterien und Viren stammt, zu erkennen<sup>257</sup>. Die Fähigkeit, die Nukleinsäuren zu erkennen, insbesondere von TLR-9, soll zudem in Verbindung mit Adipositas und Insulinresistenz stehen<sup>258-260</sup>.

Im Tierversuchsmodell konnte bereits an Keratinozyten und Makrophagen gezeigt werden, dass für eine normale TLR-9 Signaltransduktion die endogene Expression von CAMP erforderlich ist<sup>230</sup>. Ergebnisse einer Studie von Lee, Zhang et al. konnten sowohl im murinen als auch humanen Makrophagensystem eine signifikante TLR-9-abhängige Induktion von Zytokinen wie Interferon durch das Cathelicidin LL-37 zeigen. Dies deutet darauf hin, dass LL-37 in der Lage ist eine entzündliche Reaktion über TLR-9 zu vermitteln<sup>196</sup>.

Auf Grundlage dieser Daten wurde untersucht, inwieweit CAMP mit TLR-9 im adipozytären Modell interagiert. Zunächst wurde die CAMP-Regulation anhand von Blutseren von TLR-9-Knockout-Mäusen analysiert. Anschließend erfolgte eine Untersuchung in vitro an 3T3-L1- und SGBS-Adipozyten unter Zugabe von TLR-9-Agonisten und -Antagonisten. Abschließend wurde der Zusammenhang zwischen TLR-9 und CAMP in vivo genauer im subkutanen Fettgewebe von Mäusen untersucht.

Um zu ermitteln inwieweit sich eine TLR-9 vermittelte Ausschüttung im Serum von CAMP in vivo zeigt, ist ein TLR-9-KO/Wildtyp-Ansatz gewählt worden. Es wurden im Mausmodell die CAMP-Konzentrationen von C57BL/6J-Wildtyp- und TLR-9-KO-Mäusen gemessen und miteinander verglichen. Hierbei zeigten sich signifikant niedrigere Konzentrationen von CAMP bei TLR-9-KO-Mäusen. In vitro konnte am 3T3-L1-Modell keine Inhibition der CAMP-Genexpression durch den TLR-9-Antagonisten ODN 2087 beobachtet werden. Dieser Widerspruch weist auf eine komplexe Regulation der CAMP-Ausschüttung auf Proteinebene im Serum hin. Hier gilt es in weiteren Versuchen die bisher unbekanntenen Signaltransduktionswege und molekularen Mechanismen zu identifizieren.

Bezüglich der erniedrigten Konzentration auf Proteinebene im TLR-9-Knockout-Modell trat interessanterweise ein geschlechtsspezifischer Unterschied auf. Die signifikante Konzentrationsminderung von CAMP im Serum zeigte sich nur bei männlichen Mäusen. Weibliche TLR-9-KO-Mäuse hatten keine Differenz zu ihren Wildtyp-Artgenossen. Diese Beobachtung war überraschend, da in vorherigen in-vitro- Experimenten von Höpfinger et al. gezeigt werden konnte, dass weder Testosteron, noch das weibliche Geschlechtshormon Östradiol eine signifikante Änderung der adipozytären CAMP-Expression hervorrufen konnten<sup>162</sup>. Bereits durchgeführte humane Studien konnten diesen am Mausmodell gesehenen Geschlechtsunterschied bestätigen. Auch hier konnte gezeigt werden, dass sowohl mRNA-Expressionslevel im subkutanen Fettgewebe als auch die Serumkonzentrationen von Cathelicidin bei Männern deutlich höher lagen als bei Frauen<sup>162</sup>. Es scheint demnach einen geschlechtsspezifischen Unterschied in der CAMP-Expression und Ausschüttung in Bezug auf TLR-9 zu geben, welcher nicht unter der Regulation von Testosteron oder Östradiol allein zu liegen scheint. Die Aufgabe weiterer Studien ist es hier anzusetzen, um zu erkennen auf welcher Ebene die Regulation von CAMP im Bereich der geschlechtsspezifischen Mechanismen liegen könnte.

Um die im Serum gewonnenen Daten zur TLR-9-abhängigen CAMP-Proteinmenge am Adipozyten zu erweitern, wurden zunächst auf Genexpressionsebene in vitro Liganden des TLR-9 untersucht. Dies erfolgte an murinen 3T3-L1- und humanen SGBS-Adipozyten.

Die Forschungsgruppe Takeshita et al. zeigte bereits, dass eine wesentliche Komponente der Initiierung der TLR-9-Signalgebung die Bindung von CpG-Oligodesoxynukleotide (ODNs) ist<sup>261</sup>. Für diese Arbeit wurden bereits etablierte TLR-9-Liganden zur Stimulierung der 3T3-L1 Adipozyten verwendet: Diese Oligodesoxynukleotide waren ODN 1585 (ODN A), ODN 1826 (ODN B), ODN 2395

(ODN C)<sup>262</sup>, sowie ODN 2087<sup>83, 263</sup>. Während ODN 2087 als Inhibitor von TLR-9, und TLR-7 gilt<sup>263</sup>, sind ODN A, B und C Agonisten des TLR-9<sup>83, 262</sup>. Die ODNs unterscheiden sich jeweils in unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften und sind daher prinzipiell in der Lage unterschiedliche immunologische Reaktionen hervorzurufen. Genauer ist ODN A ein Ligand für TLR-9 in peripheren dendritischen Zellen, wohingegen ODN B ein Agonist von TLR-9 in positiven B-Zellen ist<sup>264</sup>. Thomalla et al. konnten zeigen, dass sich durch ODN-Behandlung, vor allem ODN A, die Konzentration des entzündungsfördernden Adipokins Resistin über Stimulation des adipozytären TLR-9 verringerte, was eher einer antiinflammatorischen Komponente des TLR-9 entsprach<sup>82</sup>. Dies deutet auf eine komplexe, immunmodulierende Funktionalität des TLR-9 von Adipozyten hin.

ODN C enthält sowohl von A als auch von B Motive und gilt als aktiver<sup>262, 265</sup>. Dies konnte bei den hier vorliegenden Ergebnissen für die Genexpression von adipozytären CAMP nicht bestätigt werden.

Es zeigte sich bei der Stimulierung der 3T3-L1- Adipozyten in vitro, dass weder ODN A, ODN B noch ODN C einen signifikanten Effekt auf die CAMP-Expression auf mRNA-Ebene haben. Lediglich die ODN B-Stimulierung ließ eine Tendenz der Steigerung der CAMP-Genexpression erkennen, allerdings ohne statistische Signifikanz. Die zusätzliche Stimulierung der Zellen mit dem TLR-9-Antagonisten ODN 2087 erbrachte keine signifikanten Änderungen bezüglich der CAMP-Expression. Demnach scheinen ODNs keinen Einfluss auf die Regulation von CAMP auf Genexpressionsebene in murinen Adipozyten zu haben.

Interessant war es nun herauszufinden, ob sich im humanen Modell eine Regulierung der CAMP-Expression unter TLR-9-Aktivierung durch ODNs zeigt. Die Stimulierung der SGBS-Adipozyten mit ODN B (20 µg/ml) erbrachte, gleich dem murinen Modell, lediglich eine schwache, nicht-signifikante Steigerung der CAMP-Expression.

Um den Zusammenhang zwischen TLR-9-Aktivierung und adipozytärer CAMP-Expression auf Proteinebene zu erfassen, wurde dieser in vivo untersucht. Im subkutanen Fettgewebe von Wildtyp-Mäusen zeigte sich eine signifikante positive Korrelation zwischen TLR-9-Expression und CAMP-Sekretion. Im Anschluss an diese Ergebnisse konnte auch im menschlichen Fettgewebe diese positive Korrelation gezeigt werden<sup>166</sup>. Der Zusammenhang von TLR-9, einem Mustererkennungsrezeptor, der bakterielle DNA detektiert<sup>87</sup>, und CAMP im subkutanen Fettgewebe bestätigt die in einer vorherigen Studie nachgewiesene antimikrobielle Funktion von CAMP gegen *Staphylococcus aureus*<sup>13</sup>.

Zusammenfassend zeigen die in vivo Studien eine klare TLR-9-abhängige Regulation

der CAMP-Konzentration im Serum und subkutanen Fettgewebe von Mäusen sowie im menschlichen Gewebe. Dies steht jedoch im Widerspruch zu den in vitro gewonnenen Daten, bei denen weder die Aktivierung noch die Inhibition von TLR-9 durch ODNs signifikante Effekte auf die CAMP-Expression in 3T3-L1- und SGBS-Adipozyten zeigten.

Diese Diskrepanz deutet auf eine komplexe Regulation der CAMP-Expression und -Sekretion hin, die in vivo durch zusätzliche Signalwege oder zelluläre Interaktionen beeinflusst wird, welche im isolierten in vitro System fehlen. Insbesondere die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der CAMP-Konzentration bei TLR-9-KO-Mäusen, die in vivo festgestellt wurden, unterstreichen die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen zu den zugrunde liegenden Mechanismen, die über die isolierte TLR-9-Aktivierung hinausgehen.

Toll-like-Rezeptor-7 gehört, wie auch TLR-9, zu den sich intrazellulär befindenden Mustererkennungsrezeptoren<sup>266</sup>. Die TLR-7-Expression ist bei Fettleibigkeit hochreguliert<sup>267</sup>. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation des Rezeptors das spontane Auftreten von Autoimmundiabetes bei Mäusen beschleunigt<sup>268</sup>. Die zugrundeliegende Vermutung für unsere, darauf basierenden Versuche war, dass über TLR-7 die proinflammatorische CAMP-Expression der Adipozyten moduliert wird, wodurch im weiteren Sinne die chronische Entzündung des Fettgewebes beeinflusst werden könnte. In vorangegangenen Forschungsstudien wurde bereits festgestellt, dass der TLR-7-Agonist Imiquimod eine immunmodulatorische Wirkung hat, indem er das immunmodulierende Adipokin<sup>251</sup> Resistin reduziert<sup>83</sup>. Auf dieser Grundlage aufbauend, galt es herauszufinden, wie Imiquimod über TLR-7 die Genexpression von CAMP der murinen Adipozyten beeinflusst.

Mithilfe des TLR-7-Agonisten Imiquimod (20 µg/ml) konnte eine signifikante, dosisabhängige Steigerung der CAMP-Expression im Zellversuch erzeugt werden. Ein weiterer Ligand des TLR-7, Gardiquimod, ließ bei einer Dosis von 2 µg/ml einen dosisabhängig signifikant steigenden Effekt erkennen.

Die schon früher vertretene Hypothese, dass TLR-7 an metabolisch induzierten Entzündungen in Bezug auf Adipositas und Insulinresistenz<sup>198,266</sup> beteiligt ist, würde mit der gesehenen Induktion des proinflammatorischen CAMP übereinstimmen.

Dies könnte sich als therapeutisch höchst relevanter Ausgangspunkt herausstellen, wobei es gilt diese in vitro beobachteten Effekte in folgenden Studien am physiologischen Modell zu prüfen und weiter zu differenzieren.

Ein weiterer Ansatzpunkt galt dem Untersuchen der Wirkung von TLR-3 auf die CAMP-Expression. Toll-like-Rezeptor-3 gehört wie auch TLR-7 und TLR-9 zu den

intrazellulären Mustererkennungsrezeptoren und ist für die Erkennung von zelleigener und viraler doppelsträngiger RNA zuständig<sup>87</sup>. Interessanterweise wird TLR-3 in Adipozyten stark exprimiert, wohingegen andere TLRs hauptsächlich in der stromavaskulären Fraktion des Fettgewebes präsent sind<sup>199</sup>. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das humane Cathelicidin LL-37 in der Lage ist die Signalgebung von TLR-3 bei Epithelzellen zu verstärken<sup>269</sup>. Zudem konnte am Mausmodell gezeigt werden, dass LL-37 eine wichtige Rolle in der Abwehr viraler Infektionen spielt<sup>270</sup>. Bisherige Studien zeigten, dass in Bezug auf Adipositas-induzierte Entzündungen der Rezeptor eher eine untergeordnete Rolle spielt<sup>199</sup>.

Aufgrund der starken Präsenz des Rezeptors in Adipozyten war es wichtig für die vorliegende Arbeit, herauszufinden, inwiefern die Signalgebung von TLR-3 die Genexpression von CAMP modulieren kann.

Es zeigten sich im 3T3-L1-Modell unter Stimulierung der Zellen mit TLR-3-Agonist PolyI:C keine signifikanten Veränderungen in der CAMP-Expression der Adipozyten. Auch der Stimulationsversuch mit PolyI:C der humanen SGBS-Adipozyten erbrachte keinen Effekt. Laut der hier vorliegenden Ergebnisse scheint TLR-3 weder im murinen noch im humanen Modell einen Einfluss auf die CAMP-Genexpression von Adipozyten zu haben. Die Tatsache, dass das entzündungsfördernde CAMP im Zusammenhang mit der Entzündung des Fettgewebes nicht ausgeschüttet wird, passt zu den Ergebnissen der Forschungsgruppe Ballak et al.<sup>199</sup>. Diese konnten darstellen, dass TLR-3 in lebenden Organismen keine Rolle bei der Entzündung des Fettgewebes spielt<sup>199</sup>.

Zu der Gruppe der extrazellulären, membrangebundenen Mustererkennungsrezeptoren gehört Toll-like-Rezeptor-2<sup>271</sup>. Eine der Hauptaufgaben dieser membranständigen Rezeptoren ist die Erkennung von zellfremden Mikroorganismen<sup>272</sup>. TLR-2 spielt hierbei eine wichtige Rolle, da er in der Lage ist Membranbestandteile grampositiver Bakterien, Mykobakterien und Mykoplasmen zu detektieren<sup>273</sup>. Bereits von Höpfinger et al. konnte gezeigt werden, dass die Stimulation des TLR-2-Agonisten MALP-2 zu einer signifikanten Hochregulierung der CAMP-Expression führte<sup>160</sup>. Interessant war es nun anschließend an diese Arbeiten herauszufinden, inwiefern die Expression von CAMP über TLR-2 moduliert werden kann. Es konnte im 3T3-L1 Modell eine signifikante Induktion im Versuch der Expression von Cathelicidin durch den TLR-2-Agonisten MALP-2 (100 ng/ml) hervorgerufen werden und somit die von Höpfinger et al.<sup>160</sup> gemessenen Ergebnisse bestätigt werden.

Es wurde ein Stimulationsversuch mit MALP-2 an humanen SGBS-Adipozyten durchgeführt, um zu beobachten, ob die murinen Effekte sich auch im menschlichen Setting widerspiegeln. Dieser Stimulationsversuch erbrachte keinen Effekt von MALP-2

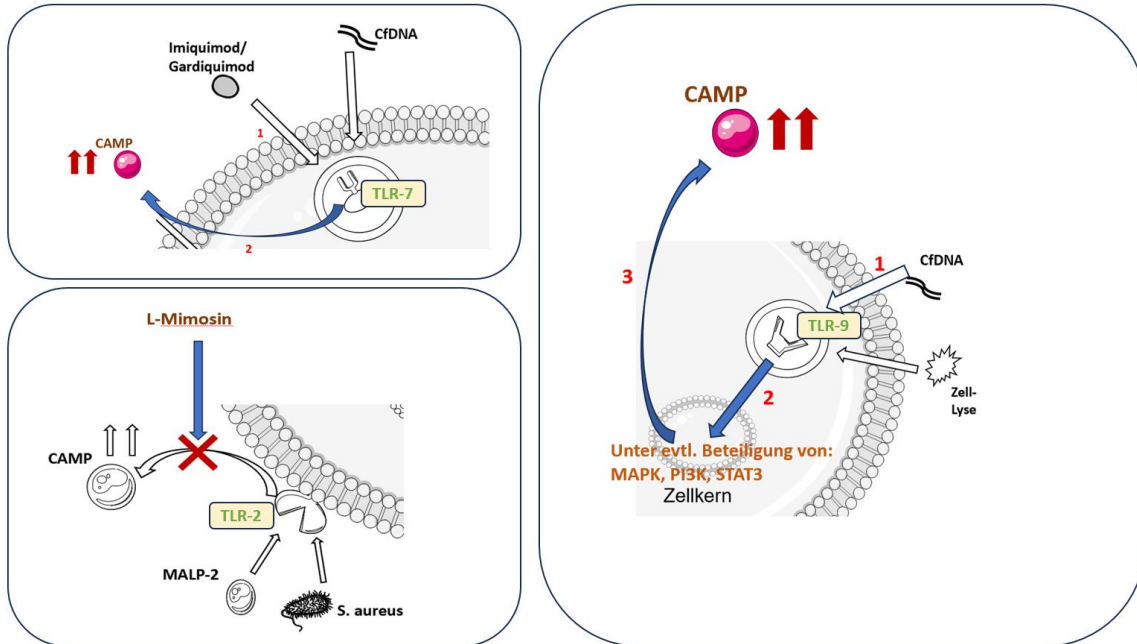
auf die humane CAMP-Expression. Hier gilt es zu diskutieren, ob der Signalweg der CAMP- Expression über TLR-2 ausschließlich in murinen Adipozyten existiert, oder ob das hier gewählte Modell der SGBS und die Stimulation mit MALP-2 nicht geeignet ist für das humane Setting.

Die pflanzliche Nicht-Protein-Aminosäure L-Mimosin ist bekannt für ihre komplexe Wirkung auf das Immunsystem. Einerseits hemmt diese die humorale Immunantwort der T-Zellen, andererseits verbessert sie gleichzeitig die Aktivität von Makrophagen<sup>274</sup>. Die Stimulation mit L-Mimosin allein zeigte eine signifikante Reduktion der CAMP-Genexpression der 3T3-L1-Adipozyten.

Interessanterweise ließ sich die durch MALP-2 hervorgerufene Induktion der CAMP-Expression vollständig durch Zugabe von L-Mimosin (400 µg/ml) aufheben. Die Zusammenschau dieser Ergebnisse zeigt, dass L-Mimosin in der Lage ist, an einem Punkt des Signalweges der durch TLR-2 hervorgerufenen Induktion von CAMP einzugreifen und diesen zu unterbrechen. Es ist bekannt, dass L-Mimosin verschiedene Signalwege innerhalb der Zelle modulieren kann. Einer der wichtigsten ist hierbei der Hypoxie-induzierbare Faktor (HIF)- Signalweg<sup>275</sup>. Inwieweit der HIF-Signalweg auch bei der Expression von adipozytären CAMP eine Rolle spielt, gilt es in zukünftigen Studien herauszufinden.

Das antitumoral wirkende<sup>276</sup> Acriflavin wurde ebenfalls zu mit MALP-2 stimulierten Zellen hinzugegeben. Die Idee hierbei war es, herauszufinden, ob die Induktion von CAMP durch MALP-2 über den STAT3/5 Signalweg hervorgerufen wird. Die Modulation dieses Signalweges wird Acriflavin zugeschrieben<sup>277</sup>. Allerdings ließen sich keine bei der CAMP-Expression beobachten. Es könnte hieraus geschlossen werden, dass der Signalweg STAT3/5 keine Rolle in der Induktion von CAMP in Adipozyten spielt.

Folgende Graphik zeigt zusammenfassend die signifikanten Erkenntnisse dieser Arbeit in Bezug auf die Interaktionen zwischen Toll-like-Rezeptoren und der Regulation von CAMP.



**Abbildung 4-1 Schematische Zusammenfassung der wichtigsten Hypothesen im Bezug zur Interaktion der untersuchten Toll-like-Rezeptoren und der Expression von CAMP (Eigenentwurf).** CAMP = Cathelicidin Antimikrobielles Peptid, cfDNA = cell free DNA, MALP-2 =, *Macrophage-activating lipopeptide 2*, MAPK = *p38-mitogen-activated-protein-kinase*, PI3K = Phosphoinositid-3-Kinasen, STAT3 = *signal transducer and activator of transcription 3*, TLR = Toll-like-Rezeptor.

#### 4.2.1.2 Nod-like-Rezeptoren

Die Mustererkennungsrezeptoren NOD1 und NOD2 sind immunrelevante Rezeptoren, die an der zytosolischen Identifikation bakterieller Peptidoglykane beteiligt sind. Es konnte bereits gezeigt werden, dass NOD1 ein spezifisches Peptidoglykan-Motiv, welches im Peptidoglykan von gramnegative Bakterien vorkommt, erkennt<sup>278</sup> und daraufhin eine proinflammatorische Signalkette innerhalb des Adipozyten aktiviert<sup>279,280</sup>. Unter in vitro Stimulation des adipozytären NOD1-Rezeptor mit dem Diaminopimelinsäure-Derivat L-Ala-gamma-D-Glu-mDAP (TriDAP) wurde die Ausschüttung proinflammatorischer Chemokine in vitro an der Zelllinie 3T3-L1 beobachtet<sup>281</sup>.

Es existieren allerdings zum jetzigen Zeitpunkt keine Literaturquellen dazu, ob der Rezeptor NOD1 auch das antimikrobielle Peptid CAMP im Adipozyten induzieren kann. Zur Klärung dieser Frage wurde in dieser Arbeit die Expression von CAMP bei 3T3-L1 Adipozyten in vitro untersucht. Als NOD1-Agonist, ist das bereits für diese Zelllinie etablierte TriDAP verwendet worden. Im murinen Zellversuch zeigten sich keine signifikanten Effekte auf die CAMP- Sekretion. Dies lässt vermuten, dass CAMP in 3T3-L1-Adipozyten nicht durch einen zytoplasmatischen Signalweg über NOD1 aktiviert wird.

Liganden des Rezeptors NOD2 sind Peptidoglykane, die sowohl in grampositiven als auch in gramnegativen Bakterien vorkommen<sup>282</sup>. Ob eventuell NOD2, eine Rolle im Signalweg für die Ausschüttung von CAMP spielt, wäre ein weiterer Ansatz zukünftiger Forschungen.

#### 4.2.1.3 Zell-freie DNA

Die Freisetzung von cfDNA gilt als lethales Ergebnis von zellulärem Stress<sup>252</sup>. Ein Teil der gesundheitsgefährdenden, chronischen Entzündung des Fettgewebes bei übergewichtigen Personen ist die vermehrte Ausschüttung von cfDNA, aufgrund der adipös bedingten Adipozyten-Degeneration<sup>198</sup>. Diese frei-gesetzte cfDNA führt dazu, dass Makrophagen in das subkutane Fettgewebe eindringen und inflammatorische Prozesse auslösen<sup>252</sup>.

Thomalla et al. konnten bereits zeigen, dass sich unter Stimulierung mit cfDNA die Konzentration verschiedener Adipokine, unter anderem des proinflammatorischen Resistins, reduziert<sup>83</sup>. Interessanterweise zeigte sich im Stimulationsversuch der 3T3-L1-Adipozyten mit cfDNA eine signifikante Reduktion der CAMP-Expression. CAMP scheint sich hierbei also in die Reihe der negativ regulierten, proinflammatorischen Adipokine einzureihen. Die cfDNA könnte in diesem Zusammenhang antiinflammatorisch wirken. Scheinbar widersprüchlich zu diesem Punkt ist die Beobachtung, dass cfDNA vermehrt Immunzellen in das Fettgewebe rekrutiert, die wiederum proinflammatorische Prozesse auslösen<sup>252</sup>. Hier gilt es dieses komplexe Zusammenspiel in weiteren Studien genauer zu identifizieren.

Die Erkennung von cfDNA wird den Mustereerkennungsrezeptoren TLR7 und TLR-9 zugeschrieben<sup>173–177,188,183\_186,198</sup>. Angesichts der in dieser Studie identifizierten Zusammenhänge zwischen einerseits TLR-7/-9 und CAMP (siehe **Abschnitt 4.2.1.1**) und andererseits zwischen cfDNA und CAMP, demnach kann davon ausgegangen werden, dass die Reduktion von CAMP bei Zellstimulierung durch cfDNA über TLR-7/-9 erfolgt<sup>166</sup>. Auch die immunologische, antimikrobielle Funktion von CAMP könnte in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen: Bereits gezeigt wurde, dass cfDNA-Spiegel bei übergewichtigen und insulinresistenten Personen im systemischen Blutkreislauf erhöht sind<sup>187,198</sup>. Die bei Adipositas festgestellte verminderte Ausschüttung des antimikrobiellen Peptids CAMP durch cfDNA könnte ein entscheidender Faktor für die von Zhang et al. beschriebene verminderte Abwehrfähigkeit der subkutanen Adipozyten bei übergewichtigen Personen gegenüber Bakterien sein<sup>148,13</sup>. Dies könnte sich als ein wichtiger Ansatzpunkt für zukünftige Behandlungsmethoden jener erhöhten Infektanfälligkeit bei Adipositas darstellen.

#### 4.2.1.4 Signalwegsinhibitoren

Die vorangegangenen Experimente dieser Arbeit ließen die Vermutung einer Hochregulierung der CAMP-Genexpression durch TLR-9 im murinen Adipozyten zu. Im Hinblick auf die Regulation dieser Expression war es notwendig herauszufinden,

welche Signalwegskomponenten an der vermuteten Hochregulierung der CAMP-Expression durch TLR-9 beteiligt sind.

Anhand aktueller Literatur wurden spezifische Signalwegsinhibitoren ausgewählt. Es sollte in einem ersten Ansatz herausgefunden werden, mithilfe welcher Signaltransduktionskomponente CAMP durch TLR-9 induziert wird.

*Signal-transducer-and-activator-of-transcription* (STAT3) ist ein Transkriptionsfaktor, welcher in Reaktion auf verschiedene extrazelluläre Signale hin aktiviert wird. Durch Translokation des STAT3 in den Zellkern kommt es zur Regulation der Genexpression<sup>78</sup>. Bereits bekannt ist, dass die Aktivierung von TLRs, vor allem von TLR-4, zur Stimulierung von STAT3 führen kann<sup>283</sup>. Dies bedingt wiederum unter anderem die Modulation von Entzündungsreaktionen<sup>78, 283</sup>.

Es ist bereits bekannt, dass eine Hochregulierung von CAMP durch TLR-2 über Signaltransduktionswege wie STAT3 vermittelt wird<sup>160</sup>. Bezogen auf TLR-9 zeigte sich eine stark signifikante Reduktion der hochregulierten CAMP-Gen-Expression durch Zugabe des STAT3-Inhibitors S3i-201.

Eine ähnlich signifikante Reduktion konnte unter dem Phosphoinosid-3-Kinasen (PI3K)-Inhibitor LY294002 beobachtet werden. PI3K ist ein weiteres Effektorenzym, das in der Lage ist nach Aktivierung verschiedene Transkriptionsfaktoren zu phosphorylieren und so die Genexpression der Zelle zu beeinflussen<sup>78</sup>. Die Forschungsgruppe Höpfinger et al. konnte zeigen, dass die Hochregulierung von CAMP durch TNF- $\alpha$  über den PI3K-Signalweg gesteuert wird<sup>166</sup>.

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich die These aufstellen, dass, wie auch für TLR-2 beobachtet<sup>160</sup>, STAT3 und PI3K Teile des Signalwege der CAMP-Genexpression durch TLR-9 sind.

Ziel war es nun herauszufinden, ob auch weitere klassische Signalwegskomponenten eine Rolle in der CAMP-Genexpression spielen:

Der mitogen-activated-protein-kinase (MAPK)- Signalweg ist eng mit Toll-like-Rezeptoren verbunden. Durch die Bindung von Liganden an TLRs kommt es zur Aktivierung von Kinasen, die Teil des MAPK-Signalweges sind<sup>253</sup>. Schließlich führt dies zur Phosphorylierung verschiedener Zielmoleküle, unter anderem Transkriptionsfaktoren, welche die Genexpression der Zelle modulieren<sup>78</sup>. Daher war es ein Ziel dieser Arbeit die Beteiligung des MAPK-Signalweges an der CAMP-Genexpression unter TLR-9-Agonisierung genauer zu analysieren. Für TLR-2 konnte bereits eine Tendenz der Beteiligung der *p38-mitogen-activated-protein-kinase* (MAPK) am CAMP-Signalweg gezeigt werden<sup>160</sup>. Unter Stimulierung des TLR-9 in Adipozyten zeigte der MAPK-Inhibitor SB239063 eine signifikante Reduktion

der CAMP-Expression.

Hieraus lässt sich schließen, dass der MAPK-Signalweg eine wichtige Verbindung zwischen der Aktivierung des TLR-9 und der Genexpression von CAMP sein könnte.

Einer der wichtigsten nukleären Transkriptionsfaktoren stellt *nuclear-factor-κB* (NF-κB) dar<sup>78</sup>. In Bezug auf Toll-*like*-Rezeptor 9 konnte für Immunzellen bereits gezeigt werden, dass diese über die Aktivierung von NF-κB eine starke Entzündungsreaktion auslösen können<sup>181,284</sup>. Auch in der Regulation der Immunantwort ist der Faktor NF-κB beteiligt<sup>78</sup>.

Von daher war es von großem Interesse herauszufinden, ob der Transkriptionsfaktor NF-κB auch eine Rolle im Signalweg der adipozytären CAMP-Genexpression spielt.

Der Inhibitor BAY-11 des *nuclear-factor-κB* konnte in vitro keine signifikante Reduktion der hochregulierten CAMP-Expression hervorrufen.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen auf ein komplexes Zusammenspiel der CAMP-Expression durch TLR-9 schließen (**Tabelle 4-1**). Hierbei ist zu beachten, dass die Ergebnisse Daten von in vitro Versuche unter Ausschaltung physio-logischer Regulationsmechanismen darstellen. Zudem ist zu beachten, dass der TLR-9-Agonist ODN B nicht die gewünschte signifikante Steigerung der CAMP- Expression erzielt hat, sondern lediglich eine deutliche Tendenz zur vermehrten CAMP-Genexpression gezeigt hat. Für detaillierte Kenntnisse über die Signalwege von CAMP über TLR-9 sind zukünftige Studien anhand erweiterter Modelle von Nöten.

<b>Betroffene Signaltransduktionskomponente</b>	<b>Verwendeter Signalwegsinhibitor</b>	<b>Mögliche Beteiligung am TLR-9/CAMP-Signalweg</b>
STAT3	S3i-201	+
PI3K	LY294002	+
MAPK	SB239063	+
NF-κB	BAY-11	-

**Tabelle 4-1 Zusammenfassende Darstellung der untersuchten Signaltransduktionskomponenten**

### 4.3 Fazit und Ausblick

Anhand der Zusammenschau der Ergebnisse der Zellkulturversuche und der des Mausmodells lassen sich neue Erkenntnisse über die zellulären und physiologischen Funktionen des antimikrobiellen Peptids CAMP schließen.

Die Zelllinie der SGBS-Adipozyten konnte erfolgreich als Modell für in vitro Versuche mit CAMP etabliert werden. Zudem konnte eine Steigerung der CAMP-Genexpression im Laufe der Differenzierung der SGBS-Adipozyten gezeigt werden. Die vorliegenden Daten bieten eine solide Basis für zukünftige Forschungsansätze, bei denen das humane Adipozyten-Modell im Zellkultur-Setting genutzt werden kann, um die Regulation von CAMP genauer zu untersuchen.

Um die Rolle des antimikrobiellen Peptids Cathelicidin in Adipozyten an der Schnittstelle zwischen Metabolismus und Immunsystem zu untersuchen, wurden die Auswirkungen von zellfreier DNA im murinen Zellmodell in vitro getestet. Es zeigte sich eine signifikante Repression der CAMP-Genexpression unter dem Einfluss von cfDNA.

Ein Einfluss auf die CAMP-Expression des NOD1-Rezeptors konnte, sowohl im murinen als auch im humanen Zellkulturmodell nicht nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die adipozytäre Expression und Sekretion von CAMP durch die Toll-like-Rezeptoren 9, 2 und 7 reguliert wird. Ein Einfluss weiterer Oligodesoxyribonukleotide wie ODN A und C auf die CAMP-Genexpression konnte ausgeschlossen werden. Die in vitro im murinen Modell beobachtete Steigerung der CAMP-Genexpression durch den TLR-9-Agonisten ODN B wurde auch im humanen Modell nachvollzogen, zeigte jedoch nur eine nicht signifikante Zunahme.

Zusätzlich wurde in vitro eine Beteiligung der Signalwege STAT3, PI3K und MAPK am TLR-9-vermittelten CAMP-Signalweg nachgewiesen.

Im Mausmodell wurde eine signifikante positive Korrelation zwischen der TLR-9-Expression und der CAMP-Sekretion im subkutanen Fettgewebe festgestellt. Zudem zeigte sich in murinen Seren ein signifikanter Sexualdimorphismus: Männliche TLR-9-KO-Mäuse wiesen deutlich niedrigere CAMP-Proteinspiegel auf, während weibliche Mäuse keinen Einfluss des TLR-9-Knockouts auf die zirkulierende CAMP-Konzentration zeigten.

Die Rolle geschlechtsspezifischer Hormone bei der Regulation des antimikrobiellen Peptids CAMP im menschlichen Organismus bleibt bisher nicht abschließend geklärt und eröffnet neue Perspektiven für zukünftige Studien.

Diese Kenntnisse könnten ein neuer Ansatzpunkt für zukünftige translationale Forschung sein. Neue die chronische Inflammation des Fettgewebes direkt beeinflussende Therapeutika könnten zum Beispiel eine durch Adipositas bedingte Insulinresistenz verhindern, die als Ursprung des Diabetes mellitus Typ 2 betrachtet wird. Aber auch für weitere leidens- und ressourcenintensive Krankheiten wie eine Steatosis Hepatis und einige Krebsarten, bei denen die chronische Inflammation des Fettgewebes ursächlich ist, könnten von einem neuen Standpunkt aus angegangen werden<sup>239, 241, 285–287</sup>.

Während für TLR-3 keine signifikanten Einflüsse, sowohl im murinen als auch im humanen Zellkultur-Modell auf die CAMP-Expression festgestellt werden konnten, zeigte sich die Stimulierung von TLR-7 neu murinen Adipozyten als höchst signifikant. Da die durch TLR-7 ausgelösten proinflammatorischen Signalwege maßgeblich an der chronischen Inflammation des Fettgewebes und an der Entstehung der dem Diabetes vorausgehende Insulinresistenz beteiligt sind, gilt es hier erweiterte Studien in vivo in zukünftigen Forschungsarbeiten durchzuführen. Damit könnte der proinflammatorische Einfluss von CAMP bei TLR-7-Agonisierung unter physiologischen Bedingungen verifiziert werden.

Der Einfluss von TLR-2 auf die adipozytäre CAMP-Expression wurde in vorangegangenen Studien der Forschungsgruppe Höpfinger et al. im murinen Modell bereits als stark signifikant dargestellt<sup>160</sup>. Weiterführend konnte in dieser Arbeit eine Aufhebung der hochregulierten CAMP-Genexpression durch den Inhibitor L-Mimosin gezeigt werden und ein Effekt des TLR-Modulator Acriflavin ausgeschlossen werden. Eine Übertragung der TLR-2-Agonisierung auf das humane SGBS-Modell konnte keine Beeinflussung der CAMP-Expression zeigen.

Bei der Interpretation der gewonnenen Erkenntnisse muss beachtet werden, dass es sich hier um Zellkulturversuche und murine Modelle handelt. Im humanen Organismus wird CAMP nicht nur von Adipozyten, sondern auch von Mastzellen<sup>159</sup>, Epithelzellen und Neutrophilen<sup>174</sup> sezerniert. Zudem spielen systemische Einflussfaktoren wie Ernährung und Fettanteil des Körpers eine Rolle in der CAMP-Regulation<sup>13</sup>. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse sollten dahingehend in zukünftigen Studien an humanen, physiologischen Modellen verifiziert werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse neue, umfassende Erkenntnisse über die Regulation von CAMP durch Toll-*like*-Rezeptoren im murinen, sowie auch humanen Zellkultur-Setting. Eine Übertragung der Erkenntnisse auf physiologische Modelle könnte zu neuen Kenntnissen über chronische Inflammation des Fettgewebes führen

und damit vorrausschauend die Grundlage für neue therapeutische Ansatzpunkte bieten.

Die Ergebnisse zur Regulation von CAMP unter TLR-9 und cfDNA in vitro und am Mausmodell wurden am 31.10.2023 im *international journal of molecular science* mit mir als Co-Autorin publiziert<sup>166</sup>.

Die Ergebnisse dieser aktuellen Studie tragen wesentlich dazu bei, unser Verständnis hinsichtlich der Funktion und Regulation des antimikrobiellen Peptids CAMP zu vertiefen. Sie legen die Grundlage für weitere Forschungsbemühen, insbesondere im Kontext der Auswirkungen der Adipozyten auf die chronische Entzündung des Fettgewebes, sowie des innaten Immunsystems.

## 5 Zusammenfassung

Das Fettgewebe spielt eine wichtige Rolle in der Regulation physiologischer und pathophysiologischer Immun- und Entzündungsprozesse des Körpers („Adipoflammation“ und „Metaflammation“). Adipozyten sind durch die Sekretion von Adipokinen/Zytokinen hormonell aktiv und fungieren unter anderem als Bestandteile des angeborenen Immunsystems. 2015 konnte erstmalig die Expression des antimikrobiellen Peptides *cathelicidin antimicrobial peptide* (CAMP) in Adipozyten und dessen Funktion bei der Infektabwehr nachgewiesen werden. Im Rahmen einer Entzündungsreaktion wirkt CAMP chemotaktisch auf Immunzellen und ist in der Lage, potenzielle Krankheitserreger unschädlich zu machen.

Die Funktion und Regulation von CAMP in Adipozyten ist bislang weitgehend unbekannt und daher Gegenstand neuester Forschungsinitiativen.

Ziel dieser Arbeit war es, die Regulation von adipozytärer CAMP-Expression *in vitro* anhand unterschiedlicher Stimulanzen, Hypothesen-basiert zu untersuchen. Darüber hinaus galt es, die *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse am Mausmodell durch Quantifizierung der CAMP-Proteinkonzentration im murinen Serum und der CAMP-Expression im subkutanen Fettgewebe zu erweitern.

Zudem sollte die humane Zelllinie der Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom (SGBS)-Adipozyten als neues Modell für die adipozytäre CAMP-Expression *in vitro* etabliert werden.

Zur Untersuchung der Funktion und Regulation von CAMP in Adipozyten wurde der Einfluss der Toll-*like*-Rezeptoren (TLR) -2, -3, -7, -9 und des NOD-*like* (NOD)-Rezeptor 1 sowie von zellfreier DNA (cfDNA) auf die CAMP-Expression und -Sekretion in humanen und murinen Modellen analysiert. Die CAMP-Genexpression in murinen 3T3-L1-Adipozyten sowie humanen SGBS-Adipozyten unter Stimulation mit TLR- und NOD-Agonisten sowie cfDNA wurde mittels *reverse transcriptase realtime polymerase chain reaction* (RT-PCR) quantifiziert. Die Serumkonzentrationen von CAMP in TLR-9-Knockout (KO)-Mäusen und C57BL/6J Wildtyp-Mäusen wurden mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) ermittelt. Die CAMP- und TLR-9-Expression im subkutanen Fettgewebe von männlichen Wildtyp-Mäusen wurde per RT-PCR verifiziert.

Dabei konnten folgende Ergebnisse erarbeitet werden:

1. Die CAMP-Genexpression in murinen Adipozyten wird durch Agonisten des TLR-7 induziert.
2. L-Mimosin reduziert die CAMP-Expression in murinen Adipozyten.
3. CfDNA reduziert signifikant die CAMP-Genexpression in murinen Adipozyten.
4. Adipozyten der SGBS-Zelllinie exprimieren CAMP und stellen ein geeignetes Zellkulturmodell für die Untersuchung der CAMP-Regulation in humanen Adipozyten dar.
5. Die CAMP-Genexpression steigt signifikant während der adipozytären Differenzierung von humanen SGBS-Zellen an.
6. Die TLR-9-Expression korreliert positiv mit der CAMP-Expression im murinen subkutanen Fettgewebe.
7. Männliche TLR-9-KO-Mäuse zeigen signifikant niedrigere CAMP-Proteinkonzentrationen im Serum als Wildtyp-Mäuse.

Die dargestellten Ergebnisse leisten einen wichtigen Beitrag zur erweiterten Kenntnis der adipozytären Regulation und Funktion des antimikrobiellen Peptids CAMP. Die erfolgreiche Etablierung des SGBS-Modells für Versuche mit CAMP ermöglicht es, die Regulation von CAMP auch in humanen Adipozyten *in vitro* zu untersuchen.

Die Beeinflussung von CAMP durch Toll-*like*-Rezeptoren stellt eine wichtige Grundlage für weitergehende Studien und potenzielle Ansatzpunkte von translationaler Forschung dar, insbesondere hinsichtlich chronischer Inflammation sowie der antimikrobiellen Aktivität des Fettgewebes.

## 6 Summary

Adipose tissue plays an important role in the regulation of physiological and pathophysiological immune and inflammatory processes (Adipoflammation and Metaflammation). Adipocytes are hormonally active through secretion of adipokines/cytokines and are also part of the innate immune system. In 2015, the expression of the antimicrobial peptide cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) in adipocytes and its role in host defence was demonstrated for the first time. During an inflammatory response, CAMP exhibits chemotactic effects on immune cells and neutralizes potential pathogens.

The function and regulation of CAMP in adipocytes remain largely unknown and are therefore in the focus of current research.

The aim of the present study was the hypothesis-driven investigation of the regulation of CAMP in adipocytes *in vitro* under various stimuli. To obtain more comprehensive results, the *in vitro* findings were extended by quantifying CAMP concentrations in murine serum and CAMP expression in murine subcutaneous adipose tissue *in vivo*.

Additionally, the human Simpson-Golabi-Behmel syndrome (SGBS) adipocyte cell line was to be established as a new *in vitro* model for adipocyte CAMP expression.

To explore the function and regulation of CAMP in adipocytes, the impact of Toll-like receptor (TLR) -2, -3, -7, -9, NOD-like receptor (NOD) 1, and cell-free DNA (cfDNA) on CAMP expression and secretion was analysed in human and murine models. Regulation of CAMP expression was assessed by stimulation of murine 3T3-L1 adipocytes and human SGBS adipocytes, followed by mRNA quantification applying reverse transcriptase realtime polymerase chain reaction (RT-PCR). Serum CAMP concentrations in TLR-9 knockout (KO) and wild-type mice were determined via enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). CAMP and TLR-9 expression in subcutaneous adipose tissue of male C57BL/6J wild-type mice were quantified via RT-PCR.

The findings demonstrated:

1. CAMP gene expression in murine adipocytes is induced by TLR-7 agonists.
2. L-Mimosine reduces TLR-2 induced CAMP expression in murine adipocytes.
3. CfDNA significantly decreases CAMP gene expression in murine adipocytes.
4. Adipocytes of the SGBS cell line express CAMP and provide a suitable cell culture model for studying CAMP regulation in human adipocytes.
5. CAMP gene expression significantly increases during adipocyte differentiation in the SGBS model.
6. TLR-9 expression positively correlates with CAMP expression in murine subcutaneous adipose tissue.
7. Male TLR-9-KO-mice exhibit significantly lower serum CAMP protein concentrations compared to wild-type mice.

The presented results provide valuable insights into the regulation and function of the antimicrobial peptide CAMP in adipocytes. The successful establishment of the SGBS model for CAMP-related experiments enables further investigation of CAMP regulation in a human cell model in vitro.

The novel insights in modulation of CAMP by Toll-like receptor agonists provide a valuable basis for future studies and potential targets for translational research, particularly regarding chronic inflammation and the antimicrobial activity of adipose tissue.

## 7 Verzeichnisse

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

AMP	Antimikrobielles Peptid
BCA	Bicinchoninsäure
BMI	<i>Body-mass-index</i>
CAMP	Cathelicidin Antimikrobielles Peptid
cfDNA	<i>Cell free</i> (zellfreie) DNA
CTRP-3	<i>C1q/TNF-related protein 3</i>
CpG-DNA	DNA mit sich wiederholender Nukleotid- folge Cytosin-Guanin
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dd	<i>double distilled</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase
GIP	<i>Glucose dependent insulintropic Peptide</i>
GLP-1	<i>Glucagon-like Peptide</i>
HDL	<i>High Densitiy Lipoprotein</i>
HMGB-1	<i>High-Mobility Group Box-1</i>
HRPO	Meerrettichperoxidase
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor-1</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
MALP-2	<i>Macrophage-activating lipopeptide 2</i>
MAPK	<i>p38-mytogen-activated-protein-kinase</i>

MW	Mittelwert
NAD	Nicotinsäureamidadenindinukleotid
NLR	Nod-like-Rezeptor
NOD	<i>nucleotide binding oligomerization domain</i>
ODN	Oligodesoxyribonukleotid
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
pDZ	Plasmazytoide dendritische Zelle
PGN	Peptidoglykan
PI3K	Phosphoinosin-3-Kinasen
PGRN	Progranulin
PolyI:C	Polyinosin-Polycytidylsäure
Rel.	<i>relative</i>
scAT	Subkutanes Fettgewebe
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
TE-Puffer	TRIS-EDTA-Puffer
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TLR	Toll-like-Rezeptor
TMD	Tetramethylbenzin
TriDAP	L-Ala-gamma-D-Glu-mDAP
Var.	Varianz

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1 Übersicht der einzelnen Toll- <i>like</i> -Rezeptoren mit jeweiliger zellulärer Lokalisation, exprimierenden Zelltypen sowie Reaktanten (modifiziert nach Anwar, Shah et al. 2019 <sup>87</sup> )	10
Tabelle 2-1 Liste der verwendeten Materialien	25
Tabelle 2-2 Liste der verwendeten Geräte	25
Tabelle 2-3 Liste der verwendeten Chemikalien	29
Tabelle 2-4 Liste der im Differenzierungsmedium der 3T3-L1 Adipozyten enthaltenen Zusätze und deren jeweilige Konzentration	32
Tabelle 2-5 Verwendete Stimulanzen mit Endkonzentrationen im Zellkulturmedium	38
Tabelle 2-6 Auflistung der Zusätze des Differenzierungsmediums Tag 3 der SGBS-Adipozyten	44
Tabelle 2-7 Verwendete Stimulanzen der SGBS-Adipozyten mit Konzentrationen	47
Tabelle 4-1 Zusammenfassende Darstellung der untersuchten Signaltransduktionskomponenten	86

## 7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Entwicklung der verschiedenen Fettzellen Schematische Darstellung der zellulären Entwicklungs- und Differenzierungsschritte von mesenchymalen Stammzellen zu ausgewachsenen Adipozyten unter Einbeziehung von Transkriptionsfaktoren. (modifiziert nach Deller, Welsch et al. (Hg.) 2018 <sup>7</sup> )	4
Abbildung 1-2 Regulation des Adipozyten (Schematische Abbildung der Einflussfaktoren auf Adipozyten sowie einer Auswahl ihrer sezernierten Produkte, die metabolische und inflammatorische Prozesse im Körper beeinflussen.) (modifiziert nach Deller, Welsch et al. (Hg.) 2018 <sup>7</sup> ). IL = Interleukin, TNF = Tumornekrosefaktor-alpha.	6
Abbildung 1-3 Aktivierung der NLRs NOD1 und NOD2 (modifiziert nach Trindade, Chen 2020 <sup>77</sup> ) Die Abbildung zeigt unter a) eine schematische Darstellung der inaktiven Form von NOD1 und NOD2 Unter b) wird eine schematische Darstellung der durch Liganden aktivierten Form von NOD1 und NOD2 skizziert: Die Erkennung der Liganden führt zu einer Konformationsänderung und Homo-Oligomerisierung zweier NOD-Moleküle, welche dann in der Lage sind, weitere entzündliche Signalwege zu aktivieren <sup>77</sup> . Legende: (1) N-terminale Caspase-Aktivierungs- und	

Rekrutierungsdomäne; (2) Kernnukleotid-bindende Domäne; (3) C-terminale Leucinreiche Wiederholungsdomäne; (4) Chaperonproteine zur Stabilisierung der inaktiven Form. LPS = Lipopolysaccharide; NOD = <i>nucleotide binding oligomerization domain</i> ; PGN = Peptidoglykane.	12
Abbildung 1-4 Schematische Darstellung der wichtigsten Toll-like-Rezeptor/Cathelicidin Interaktionen beim Adipozyten (Eigenentwurf). CAMP = Cathelicidin antimikrobielles Peptid, CfDNA = <i>cell-free DNA</i> , CTRP-3 = <i>C1q/TNF-Related Protein 3</i> , LPS = Lipopolysaccharide, ODN = Oligodesoxyribonukleotid, TLR = Toll-like-Rezeptor	
Abbildung 2-1 3T3-L1 an Tag 0 der Differenzierung (nativ) <sup>166</sup>	33
Abbildung 2-2 3T3-L1 Präadipozyten Tag 6 der Differenzierung (nativ)	33
Abbildung 2-3 3T3-L1 Adipozyten Tag 8 der Differenzierung 10- Vergrößerung (nativ) <sup>166</sup>	34
Abbildung 2-4 Oil Red-O Färbung: 3T3-L1 Adipozyten Tag 0 der Differenzierung <sup>166</sup>	35
Abbildung 2-5 Oil Red-O Färbung: 3T3-L1 Adipozyten Tag 8 der Differenzierung <sup>166</sup>	35
Abbildung 2-7 Schematische Darstellung der Reaktion der Lactatdehydrogenase: (modifiziert nach <i>Cytotoxicity Detection Kit Plus (LDH)</i> , Roche, 2016 <sup>241</sup> ) Oxidation des Laktats zu Pyruvat mit anschließender Reduktion des Tetrazolium (gelb) in Formazan (rot); LDH = Laktatdehydrogenase, NAD <sup>+</sup> = Nikotinamadenindinukleotid, H <sup>+</sup> = Proton	39
Abbildung 2-8 Exemplarische Darstellung der Zytotoxizität anhand der Stimulation der 3T3-L1 Adipozyten mit dem Inkretin GIP. n.s. = nicht signifikant, GIP = glukoseabhängiges insulinotropes Peptid, LDH = Laktatdehydrogenase. Darstellung der Werte als Box-Plot Diagramm. Zur Berechnung der P-Werte und der statistischen Signifikanz (P < 0,05) wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Pro experimentellen Versuch wurden 18 Wells untersucht.	41
Abbildung 2-9 SGBS-Adipozyten Tag 0 der Differenzierung <sup>166</sup>	44
Abbildung 2-10 SGBS-Adipozyten Tag 4 der Differenzierung	45
Abbildung 2-11 SGBS-Adipozyten Tag 8 der Differenzierung	45
Abbildung 2-12 SGBS-Adipozyten Tag 11 der Differenzierung	45
Abbildung 2-13 SGBS-Adipozyten Tag 14 der Differenzierung <sup>166</sup>	46
Abbildung 2-14 Oil-Red-O-Färbung SGBS-Adipozyten Tag 0 der Differenzierung <sup>166</sup>	46
Abbildung 2-15 Oil-Red-O-Färbung SGBS-Adipozyten Tag 14 der Differenzierung <sup>166</sup>	47
Abbildung 2-16 Schematische Darstellung der Phasen der PCR (Eigenentwurf)	51
Abbildung 2-17 Schematische Darstellung des „Sandwich-ELISA“ (Eigenentwurf)	53
Abbildung 3-1 Darstellung der Adiponektin-Expression einer Differenzierungsreihe von 3T3-L1 Adipozyten.	58

Abbildung 3-2 Darstellung der CAMP-Expression einer Differenzierungsreihe von 3T3-L1 Adipozyten. (modifiziert nach Höpfinger, Schmid et al. 2023 <sup>166</sup> ).	59
Abbildung 3-3 Resultate nach Stimulation mit TLR-9-Agonist ODN A auf die CAMP-Expression reifer 3T3-L1 Adipozyten. (modifiziert nach Höpfinger, Schmid et al. 2023 <sup>166</sup> )	60
Abbildung 3-5 Resultate nach Stimulation mit TLR-7-Agonist Imiquimod auf die CAMP-Expression reifer 3T3-L1 Adipozyten.	62
Abbildung 3-6 Resultate nach Stimulation mit TLR-7-Agonist Gardiquimod auf die CAMP-Expression reifer 3T3-L1 Adipozyten.	63
Abbildung 3-7 Resultate nach Stimulation mit cfDNA auf die CAMP-Expression reifer 3T3-L1 Adipozyten (modifiziert nach Höpfinger, Schmid et al. 2023 <sup>166</sup> ).	64
Abbildung 3-8 Effekt von L-Mimosin und MALP-2, sowie deren kombinierte Zugabe auf die CAMP-Expression 3T3-L1 Adipozyten.	65
Abbildung 3-9 Effekt von Acriflavin und MALP-2, sowie deren kombinierte Zugabe auf die CAMP-Expression 3T3-L1 Adipozyten.	66
Abbildung 3-10 Resultate des Vergleiches der Stimulation mit TLR-9-Agonisten ODN B und die Kombination ODN B + einen Signalweginhibitor (BAY-11, LY294002, S3I-201 und SB239063) auf reife 3T3-L1-Adipozyten.	68
Abbildung 3-11 Darstellung der CAMP-Expression einer Differenzierungsreihe von SGBS-Adipozyten (modifiziert nach Höpfinger, Schmid et al. 2023 <sup>166</sup> )	69
Abbildung 3-12 Resultate der Analyse der CAMP-Expression in Blutseren von männlichen (A) und weiblichen (B) Wildtyp-Mäusen und TLR-9-Knockout-Mäusen (modifiziert nach Höpfinger, Schmid et al. 2023 <sup>166</sup> ).	71
Abbildung 3-13 Korrelationsanalyse mittels Spearman-Test zwischen CAMP- und TLR-9-Expression im subkutanen Fettgewebe (scAT) von C57BL6J-Wildtyp-Mäusen.	72
Abbildung 4-1 Schematische Zusammenfassung der wichtigsten Hypothesen im Bezug zur Interaktion der untersuchten Toll- <i>like</i> -Rezeptoren und der Expression von CAMP (Eigenentwurf).	82

## 7.4 Literaturverzeichnis

- 1 Obesity Prevention Source. Obesity Causes. <https://www.hsph.harvard.edu/obesity-prevention-source/obesity-causes/>. Updated April 12, 2016. Accessed December 1, 2021.

- 2 Mensink GBM, Lampert T, Bergmann E. Übergewicht und Adipositas in Deutschland 1984-2003. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2005;48(12):1348-1356. doi:10.1007/s00103-005-1163-x.
- 3 RKI - Themenschwerpunkt Übergewicht und Adipositas - Übergewicht und Adipositas. [https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Themen/Uebergewicht\\_Adipositas/Adipositas\\_TAB.html](https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Themen/Uebergewicht_Adipositas/Adipositas_TAB.html). Updated September 17, 2022. Accessed September 17, 2022.
- 4 Weir CB, Jan A. *StatPearls: BMI Classification Percentile And Cut Off Points*. Treasure Island (FL); 2022.
- 5 Blüher M. Do adipokines link obesity to its related metabolic and cardiovascular diseases? *Clin Lipidol* 5. 2010:95-107.
- 6 Frühbeck G, Kiortsis DN, Catalán V. Precision medicine: diagnosis and management of obesity. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2018;6(3):164-166. doi:10.1016/S2213-8587(17)30312-1.
- 7 Deller T, Welsch U, Kummer W, eds. *Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie : das Lehrbuch*. 5. Auflage. München: Elsevier; 2018.
- 8 Cinti S. The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005;73(1):9-15. doi:10.1016/j.plefa.2005.04.010.
- 9 Giordano A, Smorlesi A, Frontini A, Barbatelli G, Cinti S. White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. *Eur J Endocrinol*. 2014;170(5):R159-71. doi:10.1530/EJE-13-0945.
- 10 Thomas EL, Saeed N, Hajnal JV, et al. Magnetic resonance imaging of total body fat. *J Appl Physiol (1985)*. 1998;85(5):1778-1785. doi:10.1152/jappl.1998.85.5.1778.
- 11 Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(2):85-97. doi:10.1038/nri2921.
- 12 Scherer PE. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes*. 2006;55(6):1537-1545. doi:10.2337/db06-0263.
- 13 Zhang L, Guerrero-Juarez CF, Hata T, et al. Innate immunity. Dermal adipocytes protect against invasive *Staphylococcus aureus* skin infection. *Science*. 2015;347(6217):67-71. doi:10.1126/science.1260972.
- 14 Després J-P. Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome? *Ann Med*. 2006;38(1):52-63. doi:10.1080/07853890500383895.
- 15 Ibrahim MM. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev*. 2010;11(1):11-18. doi:10.1111/j.1467-789X.2009.00623.x.
- 16 Caprio S, Perry R, Kursawe R. Adolescent Obesity and Insulin Resistance: Roles of Ectopic Fat Accumulation and Adipose Inflammation. *Gastroenterology*. 2017;152(7):1638-1646. doi:10.1053/j.gastro.2016.12.051.

- 17 Izaola O, Luis D de, Sajoux I, Domingo JC, Vidal M. INFLAMACIÓN Y OBESIDAD (LIPOINFLAMACIÓN). *Nutr Hosp*. 2015;31(6):2352-2358.  
doi:10.3305/nh.2015.31.6.8829.
- 18 Lee S, Kuk JL, Kim Y, Arslanian SA. Measurement site of visceral adipose tissue and prediction of metabolic syndrome in youth. *Pediatr Diabetes*. 2011;12(3 Pt 2):250-257.  
doi:10.1111/j.1399-5448.2010.00705.x.
- 19 Fabbrini E, Mohammed BS, Magkos F, Korenblat KM, Patterson BW, Klein S. Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2008;134(2):424-431.  
doi:10.1053/j.gastro.2007.11.038.
- 20 Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1343-1351. doi:10.1172/JCI200523621.
- 21 González N, Moreno-Villegas Z, González-Bris A, Egido J, Lorenzo Ó. Regulation of visceral and epicardial adipose tissue for preventing cardiovascular injuries associated to obesity and diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2017;16(1):44. doi:10.1186/s12933-017-0528-4.
- 22 Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, et al. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2007;116(1):39-48. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.675355.
- 23 Neeland, Ian J et al. Visceral and ectopic fat, atherosclerosis, and cardiometabolic disease: a position statement. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*:715-725.
- 24 Tang Y, Yang L-J, Liu H, et al. Exosomal miR-27b-3p secreted by visceral adipocytes contributes to endothelial inflammation and atherogenesis. *Cell Reports*. 2023;42(1):111948. doi:10.1016/j.celrep.2022.111948.
- 25 Martin H. Floch. *Netter's Gastroenterology*. 3rd ed; 2019.
- 26 Siemińska L. Tkanka tłuszczowa. Patofizjologia, rozmieszczenie, różnice płciowe oraz znaczenie w procesach zapalnych i nowotworowych. *Endokrynol Pol*. 2007;58(4):330-342.
- 27 Winter A, Breit S, Parsch D, et al. Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis Rheum*. 2003;48(2):418-429. doi:10.1002/art.10767.
- 28 Hauner H. The new concept of adipose tissue function. *Physiol Behav*. 2004;83(4):653-658. doi:10.1016/j.physbeh.2004.09.016.
- 29 Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev*. 1998;78(3):783-809. doi:10.1152/physrev.1998.78.3.783.
- 30 Muoio DM, Newgard CB. Obesity-related derangements in metabolic regulation. *Annu Rev Biochem*. 2006;75:367-401. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142512.

- 31 Tyagi S, Gupta P, Saini AS, Kaushal C, Sharma S. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *J Adv Pharm Technol Res.* 2011;2(4):236-240. doi:10.4103/2231-4040.90879.
- 32 ARNER P, Bernard S, Appelsved L, et al. Adipose lipid turnover and long-term changes in body weight. *Nat Med.* 2019;25(9):1385-1389. doi:10.1038/s41591-019-0565-5.
- 33 Lundgren M, Svensson M, Lindmark S, Renström F, Ruge T, Eriksson JW. Fat cell enlargement is an independent marker of insulin resistance and 'hyperleptinaemia'. *Diabetologia.* 2007;50(3):625-633. doi:10.1007/s00125-006-0572-1.
- 34 Weyer C, Foley JE, Bogardus C, Tataranni PA, Pratley RE. Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance. *Diabetologia.* 2000;43(12):1498-1506. doi:10.1007/s001250051560.
- 35 Heaton GM, Wagenvoord RJ, Kemp A, Nicholls DG. Brown-adipose-tissue mitochondria: photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation. *Eur J Biochem.* 1978;82(2):515-521. doi:10.1111/j.1432-1033.1978.tb12045.x.
- 36 Ricquier D, Kader J-C. Mitochondrial protein alteration in active brown fat: A sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. *Biochem Biophys Res Commun.* 1976;73(3):577-583. doi:10.1016/0006-291x(76)90849-4.
- 37 Braun T, Gautel M. Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. *Nature reviews. Molecular cell biology.* 2011;12(6):349-361. doi:10.1038/nrm3118.
- 38 Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem.* 2010;285(10):7153-7164. doi:10.1074/jbc.M109.053942.
- 39 Wu J, Cohen P, Spiegelman BM. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes Dev.* 2013;27(3):234-250. doi:10.1101/gad.211649.112.
- 40 Fisher FM, Kleiner S, Douris N, et al. FGF21 regulates PGC-1 $\alpha$  and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev.* 2012;26(3):271-281. doi:10.1101/gad.177857.111.
- 41 Smorlesi A, Frontini A, Giordano A, Cinti S. The adipose organ: white-brown adipocyte plasticity and metabolic inflammation. *Obes Rev.* 2012;13 Suppl 2:83-96. doi:10.1111/j.1467-789X.2012.01039.x.
- 42 Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, et al. A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature.* 2012;481(7382):463-468. doi:10.1038/nature10777.

- 43 Ohno H, Shinoda K, Spiegelman BM, Kajimura S. PPAR $\gamma$  agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. *Cell Metab.* 2012;15(3):395-404. doi:10.1016/j.cmet.2012.01.019.
- 44 Bartelt A, Heeren J. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat Rev Endocrinol.* 2014;10(1):24-36. doi:10.1038/nrendo.2013.204.
- 45 Cawthorn WP, Scheller EL, MacDougald OA. Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. *J Lipid Res.* 2012;53(2):227-246. doi:10.1194/jlr.R021089.
- 46 ARNER P. The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 2003;14(3):137-145. doi:10.1016/S1043-2760(03)00024-9.
- 47 Mota de Sá P, Richard AJ, Hang H, Stephens JM. Transcriptional Regulation of Adipogenesis. *Compr Physiol.* 2017;7(2):635-674. doi:10.1002/cphy.c160022.
- 48 Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. PPAR $\gamma$  Promotes Monocyte/Macrophage Differentiation and Uptake of Oxidized LDL. *Cell.* 1998;93(2):241-252. doi:10.1016/s0092-8674(00)81575-5.
- 49 Moore KJ, Rosen ED, Fitzgerald ML, et al. The role of PPAR-gamma in macrophage differentiation and cholesterol uptake. *Nat Med.* 2001;7(1):41-47. doi:10.1038/83328.
- 50 Gervois P, Torra IP, Fruchart JC, Staels B. Regulation of lipid and lipoprotein metabolism by PPAR activators. *Clin Chem Lab Med.* 2000;38(1):3-11. doi:10.1515/CCLM.2000.002.
- 51 Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr.* 2004;92(3):347-355. doi:10.1079/bjn20041213.
- 52 Neumann E, Junker S, Schett G, Frommer K, Müller-Ladner U. Adipokines in bone disease. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(5):296-302. doi:10.1038/nrrheum.2016.49.
- 53 Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994;372(6505):425-432. doi:10.1038/372425a0.
- 54 Trayhurn P. Hypoxia and adipocyte physiology: implications for adipose tissue dysfunction in obesity. *Annu Rev Nutr.* 2014;34:207-236. doi:10.1146/annurev-nutr-071812-161156.
- 55 Morrison SF. Central pathways controlling brown adipose tissue thermogenesis. *News Physiol Sci.* 2004;19:67-74. doi:10.1152/nips.01502.2003.
- 56 Ferrante AW. Macrophages, fat, and the emergence of immunometabolism. *J Clin Invest.* 2013;123(12):4992-4993. doi:10.1172/JCI73658.
- 57 Odegaard JI, Chawla A. The immune system as a sensor of the metabolic state. *Immunity.* 2013;38(4):644-654. doi:10.1016/j.immuni.2013.04.001.

- 58 Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest*. 2011;121(6):2094-2101. doi:10.1172/JCI45887.
- 59 Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1796-1808. doi:10.1172/JCI19246.
- 60 Curat CA, Wegner V, Sengenès C, et al. Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. *Diabetologia*. 2006;49(4):744-747. doi:10.1007/s00125-006-0173-z.
- 61 Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1821-1830. doi:10.1172/JCI19451.
- 62 Gesta S, Tseng Y-H, Kahn CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*. 2007;131(2):242-256. doi:10.1016/j.cell.2007.10.004.
- 63 Harman-Boehm I, Blüher M, Redel H, et al. Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(6):2240-2247. doi:10.1210/jc.2006-1811.
- 64 Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res*. 2005;46(11):2347-2355. doi:10.1194/jlr.M500294-JLR200.
- 65 Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444(7121):860-867. doi:10.1038/nature05485.
- 66 Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest*. 1995;95(5):2111-2119. doi:10.1172/JCI117899.
- 67 Lee YS, Li P, Huh JY, et al. Inflammation is necessary for long-term but not short-term high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes*. 2011;60(10):2474-2483. doi:10.2337/db11-0194.
- 68 Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007;117(1):175-184. doi:10.1172/JCI29881.
- 69 Satriano J. Arginine pathways and the inflammatory response: interregulation of nitric oxide and polyamines: review article. *Amino Acids*. 2004;26(4):321-329. doi:10.1007/s00726-004-0078-4.
- 70 Caputo T, Gilardi F, Desvergne B. From chronic overnutrition to metaflammation and insulin resistance: adipose tissue and liver contributions. *FEBS Lett*. 2017;591(19):3061-3088. doi:10.1002/1873-3468.12742.

- 71 Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:415-445. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101322.
- 72 Kopp A, Buechler C, Bala M, Neumeier M, Schölmerich J, Schäffler A. Toll-like receptor ligands cause proinflammatory and prodiabetic activation of adipocytes via phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase but not interferon regulatory factor-3. *Endocrinology*. 2010;151(3):1097-1108. doi:10.1210/en.2009-1140.
- 73 Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. 2010;140(6):805-820. doi:10.1016/j.cell.2010.01.022.
- 74 Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(12):826-837. doi:10.1038/nri2873.
- 75 Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ, et al. *Stryer Biochemie*. 8. Auflage. Berlin: Springer Spektrum; 2018.
- 76 Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(7):499-511. doi:10.1038/nri1391.
- 77 Trindade BC, Chen GY. NOD1 and NOD2 in inflammatory and infectious diseases. *Immunol Rev*. 2020;297(1):139-161. doi:10.1111/imr.12902.
- 78 Heinrich PC, Müller M, Graeve L. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014.
- 79 Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:335-376. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126.
- 80 Casanova J-L, Abel L, Quintana-Murci L. Human TLRs and IL-1Rs in host defense: natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:447-491. doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101335.
- 81 Pace E, Di Sano C, Ferraro M, et al. Budesonide increases TLR4 and TLR2 expression in Treg lymphocytes of allergic asthmatics. *Pulm Pharmacol Ther*. 2015;32:93-100. doi:10.1016/j.pupt.2015.02.003.
- 82 Thomalla M, Schmid A, Neumann E, et al. Evidence of an anti-inflammatory toll-like receptor 9 (TLR 9) pathway in adipocytes. *J Endocrinol*. 2019;240(2):325-343. doi:10.1530/JOE-18-0326.
- 83 Thomalla M, Schmid A, Hehner J, et al. Toll-like Receptor 7 (TLR7) Is Expressed in Adipocytes and the Pharmacological TLR7 Agonist Imiquimod and Adipocyte-Derived Cell-Free Nucleic Acids (cfDNA) Regulate Adipocyte Function. *Int J Mol Sci*. 2022;23(15). doi:10.3390/ijms23158475.
- 84 Shah G, Patel B, Chorawala M. Toll like receptors: an overview. *International Journal of Pharmacology and Toxicology*. 2014;2(2). [https://www.academia.edu/59421707/Toll\\_like\\_receptors\\_an\\_overview](https://www.academia.edu/59421707/Toll_like_receptors_an_overview).

- 85 Blasius AL, Beutler B. Intracellular toll-like receptors. *Immunity*. 2010;32(3):305-315. doi:10.1016/j.immuni.2010.03.012.
- 86 Oosting M, Cheng S-C, Bolscher JM, et al. Human TLR10 is an anti-inflammatory pattern-recognition receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(42):E4478-84. doi:10.1073/pnas.1410293111.
- 87 Anwar MA, Shah M, Kim J, Choi S. Recent clinical trends in Toll-like receptor targeting therapeutics. *Med Res Rev*. 2019;39(3):1053-1090. doi:10.1002/med.21553.
- 88 Gao W, Xiong Y, Li Q, Yang H. Inhibition of Toll-Like Receptor Signaling as a Promising Therapy for Inflammatory Diseases: A Journey from Molecular to Nano Therapeutics. *Frontiers in Physiology*. 2017;8:508. doi:10.3389/fphys.2017.00508.
- 89 Vijay-Kumar M, Aitken JD, Carvalho FA, et al. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science*. 2010;328(5975):228-231. doi:10.1126/science.1179721.
- 90 Caruso R, Warner N, Inohara N, Núñez G. NOD1 and NOD2: signaling, host defense, and inflammatory disease. *Immunity*. 2014;41(6):898-908. doi:10.1016/j.immuni.2014.12.010.
- 91 Pashenkov MV, Dagil YA, Pinegin BV. NOD1 and NOD2: Molecular targets in prevention and treatment of infectious diseases. *Int Immunopharmacol*. 2018;54:385-400. doi:10.1016/j.intimp.2017.11.036.
- 92 Chen X, Zou X, Qi G, et al. Roles and Mechanisms of Human Cathelicidin LL-37 in Cancer. *Cell Physiol Biochem*. 2018;47(3):1060-1073. doi:10.1159/000490183.
- 93 Chen G, Shaw MH, Kim Y-G, Nuñez G. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:365-398. doi:10.1146/annurev.pathol.4.110807.092239.
- 94 Magalhaes JG, Fritz JH, Le Bourhis L, et al. Nod2-dependent Th2 polarization of antigen-specific immunity. *J.I.* 2008;181(11):7925-7935. doi:10.4049/jimmunol.181.11.7925.
- 95 Fritz JH, Le Bourhis L, Sellge G, et al. Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity. *Immunity*. 2007;26(4):445-459. doi:10.1016/j.immuni.2007.03.009.
- 96 Kim D, Kim Y-M, Kim W-U, Park J-H, Núñez G, Seo S-U. Recognition of the microbiota by Nod2 contributes to the oral adjuvant activity of cholera toxin through the induction of interleukin-1 $\beta$ . *Immunology*. 2019;158(3):219-229. doi:10.1111/imm.13105.
- 97 Kim D, Kim Y-G, Seo S-U, et al. Nod2-mediated recognition of the microbiota is critical for mucosal adjuvant activity of cholera toxin. *Nat Med*. 2016;22(5):524-530. doi:10.1038/nm.4075.
- 98 Inohara N, Ogura Y, Chen FF, Muto A, Nuñez G. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem*. 2001;276(4):2551-2554. doi:10.1074/jbc.M009728200.

- 99 Bertsche U, Mayer C, Götz F, Gust AA. Peptidoglycan perception--sensing bacteria by their common envelope structure. *Int J Med Microbiol*. 2015;305(2):217-223. doi:10.1016/j.ijmm.2014.12.019.
- 100 Azamar-Llamas D, Hernández-Molina G, Ramos-Ávalos B, Furuzawa-Carballeda J. Adipokine Contribution to the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:5468023. doi:10.1155/2017/5468023.
- 101 Lehr S, Hartwig S, Sell H. Adipokines: a treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. *Proteomics Clin Appl*. 2012;6(1-2):91-101. doi:10.1002/prca.201100052.
- 102 Abella V, Scotece M, Conde J, et al. Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders. *Nat Rev Rheumatol*. 2017;13(2):100-109. doi:10.1038/nrrheum.2016.209.
- 103 Francisco V, Pérez T, Pino J, et al. Biomechanics, obesity, and osteoarthritis. The role of adipokines: When the levee breaks. *J Orthop Res*. 2018;36(2):594-604. doi:10.1002/jor.23788.
- 104 Zhang Y, Chua S. Leptin Function and Regulation. *Compr Physiol*. 2017;8(1):351-369. doi:10.1002/cphy.c160041.
- 105 Zabeau L, Lavens D, Peelman F, Eyckerman S, Vandekerckhove J, Tavernier J. The ins and outs of leptin receptor activation. *FEBS Lett*. 2003;546(1):45-50. doi:10.1016/s0014-5793(03)00440-x.
- 106 Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*. 1998;394(6696):897-901. doi:10.1038/29795.
- 107 Scotece M, Pérez T, Conde J, et al. Adipokines induce pro-inflammatory factors in activated Cd4+ T cells from osteoarthritis patient. *J Orthop Res*. 2017;35(6):1299-1303. doi:10.1002/jor.23377.
- 108 Yoshino T, Kusunoki N, Tanaka N, et al. Elevated serum levels of resistin, leptin, and adiponectin are associated with C-reactive protein and also other clinical conditions in rheumatoid arthritis. *Intern Med*. 2011;50(4):269-275. doi:10.2169/internalmedicine.50.4306.
- 109 Ku J, Lee CK, Joo BS, et al. Correlation of synovial fluid leptin concentrations with the severity of osteoarthritis. *Clin. Rheumatol*. 2009;(28):1431-1435.
- 110 Simopoulou T, Malizos KN, Iliopoulos D, et al. Differential expression of leptin and leptin's receptor isoform (Ob-Rb) mRNA between advanced and minimally affected osteoarthritic cartilage; effect on cartilage metabolism. *Osteoarthr. Cartil*. 2007;(15):872-883.

- 111** Silswal N, Singh AK, Aruna B, Mukhopadhyay S, Ghosh S, Ehtesham NZ. Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-12 in macrophages by NF-kappaB-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;334(4):1092-1101. doi:10.1016/j.bbrc.2005.06.202.
- 112** Bokarewa M, Nagaev I, Dahlberg L, Smith U, Tarkowski A. Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J.I.* 2005;174(9):5789-5795. doi:10.4049/jimmunol.174.9.5789.
- 113** Li F-P, He J, Li Z-Z, Luo Z-F, Yan L, Li Y. Effects of resistin expression on glucose metabolism and hepatic insulin resistance. *Endocrine.* 2009;35(2):243-251. doi:10.1007/s12020-009-9148-4.
- 114** Nakata M, Okada T, Ozawa K, Yada T. Resistin induces insulin resistance in pancreatic islets to impair glucose-induced insulin release. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;353(4):1046-1051. doi:10.1016/j.bbrc.2006.12.134.
- 115** Emamalipour M, Seidi K, Jahanban-Esfahlan A, Jahanban-Esfahlan R. Implications of resistin in type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease: Impairing insulin function and inducing pro-inflammatory cytokines. *J Cell Physiol.* 2019;234(12):21758-21769. doi:10.1002/jcp.28913.
- 116** Zhao C-W, Gao Y-H, Song W-X, et al. An Update on the Emerging Role of Resistin on the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Mediators Inflamm.* 2019;2019:1532164. doi:10.1155/2019/1532164.
- 117** Wei J, Hettinghouse A, Liu C. The role of progranulin in arthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 2016;1383(1):5-20. doi:10.1111/nyas.13191.
- 118** Qu H, Deng H, Hu Z. Plasma progranulin concentrations are increased in patients with type 2 diabetes and obesity and correlated with insulin resistance. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:360190. doi:10.1155/2013/360190.
- 119** Li H, Zhou B, Xu L, et al. Circulating PGRN is significantly associated with systemic insulin sensitivity and autophagic activity in metabolic syndrome. *Endocrinology.* 2014;155(9):3493-3507. doi:10.1210/en.2014-1058.
- 120** Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem.* 1995;270(45):26746-26749. doi:10.1074/jbc.270.45.26746.
- 121** Neumann E, Frommer KW, Vasile M, Müller-Ladner U. Adipocytokines as driving forces in rheumatoid arthritis and related inflammatory diseases? *Arthritis Rheum.* 2011;63(5):1159-1169. doi:10.1002/art.30291.
- 122** Fatel ECdS, Rosa FT, Simão ANC, Dichi I. Adipokines in rheumatoid arthritis. *Adv Rheumatol.* 2018;58(1):25. doi:10.1186/s42358-018-0026-8.

- 123** Garaulet M, Hernández-Morante JJ, Heredia FP de, Tébar FJ. Adiponectin, the controversial hormone. *Public Health Nutr.* 2007;10(10A):1145-1150. doi:10.1017/S1368980007000638.
- 124** Neumann E, Frommer KW, Vasile M, Müller-Ladner U. Adipocytokines as driving forces in rheumatoid arthritis and related inflammatory diseases? *Arthritis Rheum.* 2011;63(5):1159-1169. doi:10.1002/art.30291.
- 125** Fang H, Judd RL. Adiponectin Regulation and Function. *Compr Physiol.* 2018;8(3):1031-1063. doi:10.1002/cphy.c170046.
- 126** Yang S, Ryu J-H, Oh H, et al. NAMPT (visfatin), a direct target of hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$ , is an essential catabolic regulator of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2015;74(3):595-602. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204355.
- 127** Lee YH, Bae S-C. Zirkulierender Leptinwert bei rheumatischer Arthritis und seine Korrelation mit der Erkrankungsaktivität: eine Metaanalyse. *Z Rheumatol.* 2016;75(10):1021-1027. doi:10.1007/s00393-016-0050-1.
- 128** Brown JEP, Onyango DJ, Ramanjaneya M, et al. Visfatin regulates insulin secretion, insulin receptor signalling and mRNA expression of diabetes-related genes in mouse pancreatic beta-cells. *J Mol Endocrinol.* 2010;44(3):171-178. doi:10.1677/JME-09-0071.
- 129** Wang G. Human antimicrobial peptides and proteins. *Pharmaceuticals (Basel).* 2014;7(5):545-594. doi:10.3390/ph7050545.
- 130** Nakatsuji T, Gallo RL. Antimicrobial Peptides: Old Molecules with New Ideas. *Journal of Investigative Dermatology.* 2012;132(3):887-895. doi:10.1038/jid.2011.387.
- 131** Braff MH, Bardan A, Nizet V, Gallo RL. Cutaneous Defense Mechanisms by Antimicrobial Peptides. *Journal of Investigative Dermatology.* 2005;125(1):9-13. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.23587.x.
- 132** Ganz T, Lehrer RI. Defensins. *Current Opinion in Immunology.* 1994;6(4):584-589. doi:10.1016/0952-7915(94)90145-7.
- 133** Lehrer RI, Ganz T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Current Opinion in Immunology.* 1999;11(1):23-27. doi:10.1016/S0952-7915(99)80005-3.
- 134** Ouellette AJ, Selsted ME. Paneth cell defensins: endogenous peptide components of intestinal host defense. *FASEB J.* 1996;10(11):1280-1289. doi:10.1096/fasebj.10.11.8836041.
- 135** Zanetti M, Gennaro R, Romeo D. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett.* 1995;374(1):1-5. doi:10.1016/0014-5793(95)01050-O.
- 136** Wilson CL, Ouellette AJ, Satchell DP, et al. Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science.* 1999;286(5437):113-117. doi:10.1126/science.286.5437.113.

- 137** Bals R, Weiner DJ, Meegalla RL, Wilson JM. Transfer of a cathelicidin peptide antibiotic gene restores bacterial killing in a cystic fibrosis xenograft model. *J Clin Invest*. 1999;103(8):1113-1117. doi:10.1172/JCI6570.
- 138** Bals R, Weiner DJ, Moscioni AD, Meegalla RL, Wilson JM. Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide. *Infect Immun*. 1999;67(11):6084-6089. doi:10.1128/IAI.67.11.6084-6089.1999.
- 139** Boman HG. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol*. 1995;13:61-92. doi:10.1146/annurev.iy.13.040195.000425.
- 140** Marchini G, Lindow S, Brismar H, et al. The newborn infant is protected by an innate antimicrobial barrier: peptide antibiotics are present in the skin and vernix caseosa. *Br J Dermatol*. 2002;147(6):1127-1134. doi:10.1046/j.1365-2133.2002.05014.x.
- 141** Gschwandtner M, Zhong S, Tschachler A, et al. Fetal human keratinocytes produce large amounts of antimicrobial peptides: involvement of histone-methylation processes. *J Invest Dermatol*. 2014;134(8):2192-2201. doi:10.1038/jid.2014.165.
- 142** Boman HG. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern Med*. 2003;254(3):197-215. doi:10.1046/j.1365-2796.2003.01228.x.
- 143** Yount NY, Yeaman MR. Peptide antimicrobials: cell wall as a bacterial target. *Ann N Y Acad Sci*. 2013;1277:127-138. doi:10.1111/nyas.12005.
- 144** Hancock RE, Chapple DS. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(6):1317-1323. doi:10.1128/AAC.43.6.1317.
- 145** Gough M, Hancock RE, Kelly NM. Antiendotoxin activity of cationic peptide antimicrobial agents. *Infect Immun*. 1996;64(12):4922-4927. doi:10.1128/iai.64.12.4922-4927.1996.
- 146** Dankesreiter S, Hoess A, Schneider-Mergener J, Wagner H, Miethke T. Synthetic endotoxin-binding peptides block endotoxin-triggered TNF-alpha production by macrophages in vitro and in vivo and prevent endotoxin-mediated toxic shock. *J.I.* 2000;164(9):4804-4811. doi:10.4049/jimmunol.164.9.4804.
- 147** Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol*. 2009;30(3):131-141. doi:10.1016/j.it.2008.12.003.
- 148** Yount NY, Yeaman MR. Emerging themes and therapeutic prospects for anti-infective peptides. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2012;52:337-360. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010611-134535.
- 149** Nicholls EF, Madera L, Hancock REW. Immunomodulators as adjuvants for vaccines and antimicrobial therapy. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1213:46-61. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05787.x.
- 150** Morizane S, Gallo RL. Antimicrobial peptides in the pathogenesis of psoriasis. *J Dermatol*. 2012;39(3):225-230. doi:10.1111/j.1346-8138.2011.01483.x.

- 151** Ganz T. Defensins and host defense. *Science*. 1999;286(5439):420-421.  
doi:10.1126/science.286.5439.420.
- 152** Lehrer RI, C. L., Bevins and T. Ganz. Defensins and other antimicrobial peptides. *Mucosal Immunology*. 1999:89-99.
- 153** Martin E, Ganz T, Lehrer RI. Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. *J Leukoc Biol*. 1995;58(2):128-136. doi:10.1002/jlb.58.2.128.
- 154** Lehrer RI, Lichtenstein AK, Ganz T. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:105-128.  
doi:10.1146/annurev.iy.11.040193.000541.
- 155** Selsted ME, Ouellette AJ. Defensins in granules of phagocytic and non-phagocytic cells. *Trends Cell Biol*. 1995;5(3):114-119. doi:10.1016/s0962-8924(00)88961-8.
- 156** Ong PY, Ohtake T, Brandt C, et al. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med*. 2002;347(15):1151-1160.  
doi:10.1056/NEJMoa021481.
- 157** Nizet V, Ohtake T, Lauth X, et al. Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature*. 2001;414(6862):454-457. doi:10.1038/35106587.
- 158** Nestle FO, Di Meglio P, Qin J-Z, Nickoloff BJ. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(10):679-691. doi:10.1038/nri2622.
- 159** Di Nardo A, Vitiello A, Gallo RL. Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide. *J.I*. 2003;170(5):2274-2278.  
doi:10.4049/jimmunol.170.5.2274.
- 160** Höpfinger A, Karrasch T, Schäffler A, Schmid A. Regulation of CAMP (cathelicidin antimicrobial peptide) expression in adipocytes by TLR 2 and 4. *Innate Immun*. 2021;27(2):184-191. doi:10.1177/1753425920988167.
- 161** Schmid A, Karrasch T, Thomalla M, et al. Innate Immunity of Adipose Tissue in Rodent Models of Local and Systemic Staphylococcus aureus Infection. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:5315602. doi:10.1155/2017/5315602.
- 162** Hochberg A, Patz M, Karrasch T, Schäffler A, Schmid A. Serum Levels and Adipose Tissue Gene Expression of Cathelicidin Antimicrobial Peptide (CAMP) in Obesity and During Weight Loss. *Horm Metab Res*. 2021;53(3):169-177. doi:10.1055/a-1323-3050.
- 163** Hoang-Yen Tran D, Hoang-Ngoc Tran D, Mattai SA, et al. Cathelicidin suppresses lipid accumulation and hepatic steatosis by inhibition of the CD36 receptor. *Int J Obes (Lond)*. 2016;40(9):1424-1434. doi:10.1038/ijo.2016.90.
- 164** Li F, Zhao C, Shao T, et al. Cathelicidin-related antimicrobial peptide alleviates alcoholic liver disease through inhibiting inflammasome activation. *J Pathol*. 2020;252(4):371-383.  
doi:10.1002/path.5531.

- 165** Höpfinger A, Karrasch T, Schäffler A, Schmid A. Circulating Concentrations of Cathelicidin Anti-Microbial Peptide (CAMP) Are Increased during Oral Glucose Tolerance Test. *Int J Mol Sci.* 2023;24(16). doi:10.3390/ijms241612901.
- 166** Höpfinger A, Schmid A, Schweitzer L, et al. Regulation of Cathelicidin Antimicrobial Peptide (CAMP) Gene Expression by TNF $\alpha$  and cfDNA in Adipocytes. *Int J Mol Sci.* 2023;24(21). doi:10.3390/ijms242115820.
- 167** Höpfinger A, Schmid A, Karrasch T, Pankuweit S, Schäffler A, Grote K. Cathelicidin Antimicrobial Peptide Levels in Atherosclerosis and Myocardial Infarction in Mice and Human. *Int J Mol Sci.* 2024;25(5). doi:10.3390/ijms25052909.
- 168** Alcorn JF, Kolls JK. Physiology. Killer fat. *Science.* 2015;347(6217):26-27. doi:10.1126/science.aaa4567.
- 169** Zhang L, Chen SX, Guerrero-Juarez CF, et al. Age-Related Loss of Innate Immune Antimicrobial Function of Dermal Fat Is Mediated by Transforming Growth Factor Beta. *Immunity.* 2019;50(1):121-136.e5. doi:10.1016/j.immuni.2018.11.003.
- 170** Cawthorn WP, Scheller EL, MacDougald OA. Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. *J Lipid Res.* 2012;53(2):227-246. doi:10.1194/jlr.R021089.
- 171** Old LJ. Tumor necrosis factor (TNF). *Science.* 1985;230(4726):630-632. doi:10.1126/science.2413547.
- 172** Maury CP. Tumour necrosis factor--an overview. *Acta Med Scand.* 1986;220(5):387-394. doi:10.1111/j.0954-6820.1986.tb02785.x.
- 173** Di Nardo A, Yamasaki K, Dorschner RA, Lai Y, Gallo RL. Mast cell cathelicidin antimicrobial peptide prevents invasive group A Streptococcus infection of the skin. *J.I.* 2008;180(11):7565-7573. doi:10.4049/jimmunol.180.11.7565.
- 174** de Yang, Chen Q, Schmidt AP, et al. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med.* 2000;192(7):1069-1074. doi:10.1084/jem.192.7.1069.
- 175** Kurosaka K, Chen Q, Yarovinsky F, Oppenheim JJ, de Yang. Mouse cathelin-related antimicrobial peptide chemoattracts leukocytes using formyl peptide receptor-like 1/mouse formyl peptide receptor-like 2 as the receptor and acts as an immune adjuvant. *J.I.* 2005;174(10):6257-6265. doi:10.4049/jimmunol.174.10.6257.
- 176** Di Nardo A, Braff MH, Taylor KR, et al. Cathelicidin antimicrobial peptides block dendritic cell TLR4 activation and allergic contact sensitization. *J.I.* 2007;178(3):1829-1834. doi:10.4049/jimmunol.178.3.1829.

- 177 Jagielo PJ, Thorne PS, Watt JL, Frees KL, Quinn TJ, Schwartz DA. Grain dust and endotoxin inhalation challenges produce similar inflammatory responses in normal subjects. *Chest*. 1996;110(1):263-270. doi:10.1378/chest.110.1.263.
- 178 Clapp WD, Becker S, Quay J, et al. Grain dust-induced airflow obstruction and inflammation of the lower respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;150(3):611-617. doi:10.1164/ajrccm.150.3.8087327.
- 179 Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med*. 2003;198(3):513-520. doi:10.1084/jem.20030162.
- 180 Krug A, French AR, Barchet W, et al. TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity*. 2004;21(1):107-119. doi:10.1016/j.immuni.2004.06.007.
- 181 Korneev KV, Atretkhany K-SN, Drutskaya MS, Grivennikov SI, Kuprash DV, Nedospasov SA. TLR-signaling and proinflammatory cytokines as drivers of tumorigenesis. *Cytokine*. 2017;89:127-135. doi:10.1016/j.cyto.2016.01.021.
- 182 Scharfe-Nugent A, Corr SC, Carpenter SB, et al. TLR9 provokes inflammation in response to fetal DNA: mechanism for fetal loss in preterm birth and preeclampsia. *J.I.* 2012;188(11):5706-5712. doi:10.4049/jimmunol.1103454.
- 183 Barrat FJ, Meeker T, Gregorio J, et al. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med*. 2005;202(8):1131-1139. doi:10.1084/jem.20050914.
- 184 Lee J-G, Lim E-J, Park D-W, Lee S-H, Kim J-R, Baek S-H. A combination of Lox-1 and Nox1 regulates TLR9-mediated foam cell formation. *Cell Signal*. 2008;20(12):2266-2275. doi:10.1016/j.cellsig.2008.08.022.
- 185 Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(11):823-835. doi:10.1038/nri1957.
- 186 Vollmer J. TLR9 in health and disease. *Int Rev Immunol*. 2006;25(3-4):155-181. doi:10.1080/08830180600743107.
- 187 Lee J, Chuang T-H, Redecke V, et al. Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(11):6646-6651. doi:10.1073/pnas.0631696100.
- 188 Heil F, Ahmad-Nejad P, Hemmi H, et al. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol*. 2003;33(11):2987-2997. doi:10.1002/eji.200324238.
- 189 Barton GM, Kagan JC, Medzhitov R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol*. 2006;7(1):49-56. doi:10.1038/ni1280.

- 190** Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, et al. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J.I.* 2003;171(6):3154-3162. doi:10.4049/jimmunol.171.6.3154.
- 191** Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2004;5(10):987-995. doi:10.1038/ni1112.
- 192** Marshak-Rothstein A, Busconi L, Lau CM, et al. Comparison of CpG s-ODNs, chromatin immune complexes, and dsDNA fragment immune complexes in the TLR9-dependent activation of rheumatoid factor B cells. *J Endotoxin Res.* 2004;10(4):247-251. doi:10.1179/096805104225005850.
- 193** Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature.* 2002;416(6881):603-607. doi:10.1038/416603a.
- 194** Crowl JT, Gray EE, Pestal K, Volkman HE, Stetson DB. Intracellular Nucleic Acid Detection in Autoimmunity. *Annu Rev Immunol.* 2017;35:313-336. doi:10.1146/annurev-immunol-051116-052331.
- 195** Theofilopoulos AN, Kono DH, Beutler B, Baccala R. Intracellular nucleic acid sensors and autoimmunity. *J Interferon Cytokine Res.* 2011;31(12):867-886. doi:10.1089/jir.2011.0092.
- 196** Lee EY, Zhang C, Di Domizio J, et al. Helical antimicrobial peptides assemble into protofibril scaffolds that present ordered dsDNA to TLR9. *Nat Commun.* 2019;10(1):1012. doi:10.1038/s41467-019-08868-w.
- 197** Ganguly D. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. 2009.
- 198** Revelo XS, Ghazarian M, Chng MHY, et al. Nucleic Acid-Targeting Pathways Promote Inflammation in Obesity-Related Insulin Resistance. *Cell Rep.* 2016;16(3):717-730. doi:10.1016/j.celrep.2016.06.024.
- 199** Ballak DB, van Asseldonk EJP, van Diepen JA, et al. TLR-3 is present in human adipocytes, but its signalling is not required for obesity-induced inflammation in adipose tissue in vivo. *PLoS One.* 2015;10(4):e0123152. doi:10.1371/journal.pone.0123152.
- 200** Alkhouri N, Gornicka A, Berk MP, et al. Adipocyte apoptosis, a link between obesity, insulin resistance, and hepatic steatosis. *J Biol Chem.* 2010;285(5):3428-3438. doi:10.1074/jbc.M109.074252.
- 201** Karikó K, Ni H, Capodici J, Lamphier M, Weissman D. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem.* 2004;279(13):12542-12550. doi:10.1074/jbc.M310175200.
- 202** Rosenfeld Y, Papo N, Shai Y. Endotoxin (lipopolysaccharide) neutralization by innate immunity host-defense peptides. Peptide properties and plausible modes of action. *J Biol Chem.* 2006;281(3):1636-1643. doi:10.1074/jbc.M504327200.

- 203** Mookherjee N, Brown KL, Bowdish DME, et al. Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. *J.I.* 2006;176(4):2455-2464. doi:10.4049/jimmunol.176.4.2455.
- 204** Davies MG, Hagen PO. Systemic inflammatory response syndrome. *Br J Surg.* 1997;84(7):920-935. doi:10.1002/bjs.1800840707.
- 205** Kopp A, Bala M, Buechler C, et al. C1q/TNF-related protein-3 represents a novel and endogenous lipopolysaccharide antagonist of the adipose tissue. *Endocrinology.* 2010;151(11):5267-5278. doi:10.1210/en.2010-0571.
- 206** Kopp A, Bala M, Weigert J, et al. Effects of the new adiponectin paralogous protein CTRP-3 and of LPS on cytokine release from monocytes of patients with type 2 diabetes mellitus. *Cytokine.* 2010;49(1):51-57. doi:10.1016/j.cyto.2009.10.001.
- 207** Murayama MA, Kakuta S, Maruhashi T, et al. CTRP3 plays an important role in the development of collagen-induced arthritis in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;443(1):42-48. doi:10.1016/j.bbrc.2013.11.040.
- 208** Karrasch T, Höpfinger A, Schäffler A, Schmid A. The adipokine C1q/TNF-related protein-3 (CTRP-3) inhibits Toll-like receptor (TLR)-induced expression of Cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) in adipocytes. *Cytokine.* 2021;148:155663. doi:10.1016/j.cyto.2021.155663.
- 209** Xiang, X., et al. Acriflavine inhibits LPS-induced inflammation through suppression of TLR4-NF- $\kappa$ B signaling pathway in RAW264.7 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;61-66.
- 210** Liggins MC, Li F, Zhang L, Dokoshi T, Gallo RL. Retinoids Enhance the Expression of Cathelicidin Antimicrobial Peptide during Reactive Dermal Adipogenesis. *J.I.* 2019;203(6):1589-1597. doi:10.4049/jimmunol.1900520.
- 211** Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, Kumral T, Branwood AW, Grishman A. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *The American Journal of Cardiology.* 1972;30(6):595-602. doi:10.1016/0002-9149(72)90595-4.
- 212** Fabisiak A, Murawska N, Fichna J. LL-37: Cathelicidin-related antimicrobial peptide with pleiotropic activity. *Pharmacol Rep.* 2016;68(4):802-808. doi:10.1016/j.pharep.2016.03.015.
- 213** Gudmundsson GH, Agerberth B, Odeberg J, Bergman T, Olsson B, Salcedo R. The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *Eur J Biochem.* 1996;238(2):325-332. doi:10.1111/j.1432-1033.1996.0325z.x.
- 214** Zanetti M, Litteri L, Gennaro R, Horstmann H, Romeo D. Bactenecins, defense polypeptides of bovine neutrophils, are generated from precursor molecules stored in the large granules. *J Cell Biol.* 1990;111(4):1363-1371. doi:10.1083/jcb.111.4.1363.

- 215** Tomasinsig L, Zanetti M. The cathelicidins--structure, function and evolution. *Curr Protein Pept Sci*. 2005;6(1):23-34. doi:10.2174/1389203053027520.
- 216** Yuk J-M, Shin D-M, Lee H-M, et al. Vitamin D3 induces autophagy in human monocytes/macrophages via cathelicidin. *Cell Host & Microbe*. 2009;6(3):231-243. doi:10.1016/j.chom.2009.08.004.
- 217** Rivas-Santiago B, Trujillo V, Montoya A, et al. Expression of antimicrobial peptides in diabetic foot ulcer. *J Dermatol Sci*. 2012;65(1):19-26. doi:10.1016/j.jdermsci.2011.09.013.
- 218** Sochacki KA, Barns KJ, Bucki R, Weisshaar JC. Real-time attack on single Escherichia coli cells by the human antimicrobial peptide LL-37. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(16):E77-81. doi:10.1073/pnas.1101130108.
- 219** Scheenstra MR, van den Belt M, Tjeerdsma-van Bokhoven JLM, et al. Cathelicidins PMAP-36, LL-37 and CATH-2 are similar peptides with different modes of action. *Sci Rep*. 2019;9(1):4780. doi:10.1038/s41598-019-41246-6.
- 220** Barns KJ, Weisshaar JC. Real-time attack of LL-37 on single Bacillus subtilis cells. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1828(6):1511-1520. doi:10.1016/j.bbamem.2013.02.011.
- 221** Travis SM, Anderson NN, Forsyth WR, et al. Bactericidal activity of mammalian cathelicidin-derived peptides. *Infect Immun*. 2000;68(5):2748-2755. doi:10.1128/IAI.68.5.2748-2755.2000.
- 222** Tjabringa GS, Ninaber DK, Drijfhout JW, Rabe KF, Hiemstra PS. Human cathelicidin LL-37 is a chemoattractant for eosinophils and neutrophils that acts via formyl-peptide receptors. *Int Arch Allergy Immunol*. 2006;140(2):103-112. doi:10.1159/000092305.
- 223** Hu Z, Murakami T, Suzuki K, et al. Antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 inhibits the LPS/ATP-induced pyroptosis of macrophages by dual mechanism. *PLoS One*. 2014;9(1):e85765. doi:10.1371/journal.pone.0085765.
- 224** Ruan Y, Shen T, Wang Y, Hou M, Li J, Sun T. Antimicrobial peptide LL-37 attenuates LTA induced inflammatory effect in macrophages. *Int Immunopharmacol*. 2013;15(3):575-580. doi:10.1016/j.intimp.2013.01.012.
- 225** Hou M, Zhang N, Yang J, et al. Antimicrobial peptide LL-37 and IDR-1 ameliorate MRSA pneumonia in vivo. *Cell Physiol Biochem*. 2013;32(3):614-623. doi:10.1159/000354465.
- 226** Pestonjamas VK, Huttner KH, Gallo RL. Processing site and gene structure for the murine antimicrobial peptide CRAMP. *Peptides*. 2001;22(10):1643-1650. doi:10.1016/s0196-9781(01)00499-5.
- 227** Kahlenberg JM, Kaplan MJ. Little Peptide, Big Effects: The Role of LL-37 in Inflammation and Autoimmune Disease. *J.I*. 2013;191(10):4895-4901. doi:10.4049/jimmunol.1302005.

- 228** Elssner A, Duncan M, Gavrilin M, Wewers MD. A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 beta processing and release. *J.I.* 2004;172(8):4987-4994. doi:10.4049/jimmunol.172.8.4987.
- 229** Tjabringa GS, Aarbiou J, Ninaber DK, et al. The antimicrobial peptide LL-37 activates innate immunity at the airway epithelial surface by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J.I.* 2003;171(12):6690-6696. doi:10.4049/jimmunol.171.12.6690.
- 230** Nakagawa Y, Gallo RL. Endogenous Intracellular Cathelicidin Enhances TLR9 Activation in Dendritic Cells and Macrophages. *J.I.* 2015;194(3):1274-1284. doi:10.4049/jimmunol.1402388.
- 231** Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature.* 2007;449(7162):564-569. doi:10.1038/nature06116.
- 232** Lande R, Botti E, Jandus C, et al. The antimicrobial peptide LL37 is a T-cell autoantigen in psoriasis. *Nat Commun.* 2014;5:5621. doi:10.1038/ncomms6621.
- 233** Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, et al. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med.* 2011;3(73):73ra19. doi:10.1126/scitranslmed.3001180.
- 234** Morizane S, Yamasaki K, Mühleisen B, et al. Cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 in psoriasis enables keratinocyte reactivity against TLR9 ligands. *J Invest Dermatol.* 2012;132(1):135-143. doi:10.1038/jid.2011.259.
- 235** Braster Q, Silvestre-Roig C, Hartwig H, et al. Cathelicidin regulates myeloid cell accumulation in adipose tissue and promotes insulin resistance during obesity. *Thromb Haemost.* 2016;115(6):1237-1239. doi:10.1160/TH16-02-0112.
- 236** Pound LD, Patrick C, Eberhard CE, et al. Cathelicidin Antimicrobial Peptide: A Novel Regulator of Islet Function, Islet Regeneration, and Selected Gut Bacteria. *Diabetes.* 2015;64(12):4135-4147. doi:10.2337/db15-0788.
- 237** Miranda E, Bramono K, Yunir E, et al. Efficacy of LL-37 cream in enhancing healing of diabetic foot ulcer: a randomized double-blind controlled trial. *Arch Dermatol Res.* 2023. doi:10.1007/s00403-023-02657-8.
- 238** Boulton AJ. The diabetic foot. 2016.
- 239** Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol.* 2019;15(5):288-298. doi:10.1038/s41574-019-0176-8.
- 240** Zhang L, Guerrero-Juarez CF, Chen SX, et al. Diet-induced obesity promotes infection by impairment of the innate antimicrobial defense function of dermal adipocyte progenitors. *Sci Transl Med.* 2021;13(577). doi:10.1126/scitranslmed.abb5280.

- 241** Chmelar J, Chung K-J, Chavakis T. The role of innate immune cells in obese adipose tissue inflammation and development of insulin resistance. *Thromb Haemost.* 2013;109(3):399-406. doi:10.1160/TH12-09-0703.
- 242** mantheyd. *Cytotoxicity Detection Kit Plus (LDH)*. [Version 07]. 2016.
- 243** Racher AJ, Looby D, Griffiths JB. Use of lactate dehydrogenase release to assess changes in culture viability. *Cytotechnology.* 1990;3(3):301-307. doi:10.1007/BF00365494.
- 244** Legrand C, Bour JM, Jacob C, et al. Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the cultured eukaryotic cells as marker of the number of dead cells in the medium corrected. *J Biotechnol.* 1992;25(3):231-243. doi:10.1016/0168-1656(92)90158-6.
- 245** Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150(1):76-85. doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- 246** Poetke M, Jamil B, Müller U, Berlien HP. Diffuse neonatal hemangiomas associated with Simpson-Golabi-Behmel syndrome: a case report. *European journal of pediatric surgery : official journal of Austrian Association of Pediatric Surgery ... [et al] = Zeitschrift für Kinderchirurgie.* 2002;12(1):59-62. doi:10.1055/s-2002-25084.
- 247** Wabitsch M, Brenner RE, Melzner I, et al. Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001;25(1):8-15. doi:10.1038/sj.ijo.0801520.
- 248** Holzapfel B, Wickert L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biol. Unserer Zeit.* 2007;37(2):120-126. doi:10.1002/biuz.200610332.
- 249** Ruijter JM, Pfaffl MW, Zhao S, et al. Evaluation of qPCR curve analysis methods for reliable biomarker discovery: bias, resolution, precision, and implications. *Methods.* 2013;59(1):32-46. doi:10.1016/j.ymeth.2012.08.011.
- 250** Nakane PK, Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J Histochem Cytochem.* 1974;22(12):1084-1091. doi:10.1177/22.12.1084.
- 251** Fernández CM, del Arco A, Gallardo N, et al. S-resistin inhibits adipocyte differentiation and increases TNF $\alpha$  expression and secretion in 3T3-L1 cells. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1803(10):1131-1141. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.06.012.
- 252** Nishimoto S, Fukuda D, Higashikuni Y, et al. Obesity-induced DNA released from adipocytes stimulates chronic adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Sci Adv.* 2016;2(3):e1501332. doi:10.1126/sciadv.1501332.
- 253** Gajanayaka N, Dong SXM, Ali H, et al. TLR-4 Agonist Induces IFN- $\gamma$  Production Selectively in Proinflammatory Human M1 Macrophages through the PI3K-mTOR- and JNK-MAPK-Activated p70S6K Pathway. *J.I.* 2021;207(9):2310-2324. doi:10.4049/jimmunol.2001191.

- 254** Zhang L, Guerrero-Juarez CF, Hata T, et al. Innate immunity. Dermal adipocytes protect against invasive *Staphylococcus aureus* skin infection. *Science*. 2015;347(6217):67-71. doi:10.1126/science.1260972.
- 255** Sheng X, Tucci J, Malvar J, Mittelman SD. Adipocyte differentiation is affected by media height above the cell layer. *Int J Obes (Lond)*. 2014;38(2):315-320. doi:10.1038/ijo.2013.96.
- 256** Kim S-J, Choi Y, Choi Y-H, Park T. Obesity activates toll-like receptor-mediated proinflammatory signaling cascades in the adipose tissue of mice. *J Nutr Biochem*. 2012;23(2):113-122. doi:10.1016/j.jnutbio.2010.10.012.
- 257** Ohto U, Shibata T, Tanji H, et al. Structural basis of CpG and inhibitory DNA recognition by Toll-like receptor 9. *Nature*. 2015;520(7549):702-705. doi:10.1038/nature14138.
- 258** Wang X, Wang Y, Antony V, Sun H, Liang G. Metabolism-Associated Molecular Patterns (MAMPs). *Trends Endocrinol Metab*. 2020;31(10):712-724. doi:10.1016/j.tem.2020.07.001.
- 259** Hotamisligil GS. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature*. 2017;542(7640):177-185. doi:10.1038/nature21363.
- 260** Schäffler A, Schölmerich J. Innate immunity and adipose tissue biology. *Trends Immunol*. 2010;31(6):228-235. doi:10.1016/j.it.2010.03.001.
- 261** Takeshita F, Gursel I, Ishii KJ, Suzuki K, Gursel M, Klinman DM. Signal transduction pathways mediated by the interaction of CpG DNA with Toll-like receptor 9. *Semin Immunol*. 2004;16(1):17-22. doi:10.1016/j.smim.2003.10.009.
- 262** Becker Y. CpG ODNs treatments of HIV-1 infected patients may cause the decline of transmission in high risk populations - a review, hypothesis and implications. *Virus Genes*. 2005;30(2):251-266. doi:10.1007/s11262-004-5632-2.
- 263** Lenert PS. Classification, mechanisms of action, and therapeutic applications of inhibitory oligonucleotides for Toll-like receptors (TLR) 7 and 9. *Mediators Inflamm*. 2010;2010:986596. doi:10.1155/2010/986596.
- 264** Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*. 1999;284(5421):1835-1837. doi:10.1126/science.284.5421.1835.
- 265** Marshall JD, Fearon K, Abbate C, et al. Identification of a novel CpG DNA class and motif that optimally stimulate B cell and plasmacytoid dendritic cell functions. *J Leukoc Biol*. 2003;73(6):781-792. doi:10.1189/jlb.1202630.
- 266** O'Neill LAJ, Golenbock D, Bowie AG. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(6):453-460. doi:10.1038/nri3446.

- 267** Latorre J, Moreno-Navarrete JM, Sabater M, et al. Decreased TLR3 in Hyperplastic Adipose Tissue, Blood and Inflamed Adipocytes is Related to Metabolic Inflammation. *Cell Physiol Biochem*. 2018;51(3):1051-1068. doi:10.1159/000495487.
- 268** Lee AS, Ghoreishi M, Cheng WK, Chang T-YE, Zhang YQ, Dutz JP. Toll-like receptor 7 stimulation promotes autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Diabetologia*. 2011;54(6):1407-1416. doi:10.1007/s00125-011-2083-y.
- 269** Lai Y, Adhikarakunnathu S, Bhardwaj K, et al. LL37 and cationic peptides enhance TLR3 signaling by viral double-stranded RNAs. *PLoS One*. 2011;6(10):e26632. doi:10.1371/journal.pone.0026632.
- 270** Gaudreault E, Gosselin J. Leukotriene B4 induces release of antimicrobial peptides in lungs of virally infected mice. *J.I.* 2008;180(9):6211-6221. doi:10.4049/jimmunol.180.9.6211.
- 271** Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010;11(5):373-384. doi:10.1038/ni.1863.
- 272** Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2001;2(8):675-680. doi:10.1038/90609.
- 273** Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;388(4):621-625. doi:10.1016/j.bbrc.2009.08.062.
- 274** Hueza IM, Dipe VV, Gotardo AT, Gardner DR, Almeida ERM de, Górnaiak SL. Potential immunomodulatory response associated with L-mimosine in male Wistar rats. *Toxicol*. 2023;226:107084. doi:10.1016/j.toxicol.2023.107084.
- 275** Janjić K, Edelmayer M, Moritz A, Agis H. L-mimosine and hypoxia can increase angiogenin production in dental pulp-derived cells. *BMC Oral Health*. 2017;17(1):87. doi:10.1186/s12903-017-0373-6.
- 276** Hassan S, Laryea D, Mahteme H, et al. Novel activity of acriflavine against colorectal cancer tumor cells. *Cancer Sci*. 2011;102(12):2206-2213. doi:10.1111/j.1349-7006.2011.02097.x.
- 277** Hallal R, Nehme R, Brachet-Botineau M, et al. Acriflavine targets oncogenic STAT5 signaling in myeloid leukemia cells. *J Cell Mol Med*. 2020;24(17):10052-10062. doi:10.1111/jcmm.15612.
- 278** Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LAM, et al. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science*. 2003;300(5625):1584-1587. doi:10.1126/science.1084677.
- 279** Nembrini C, Kisielow J, Shamshiev AT, et al. The kinase activity of Rip2 determines its stability and consequently Nod1- and Nod2-mediated immune responses. *J Biol Chem*. 2009;284(29):19183-19188. doi:10.1074/jbc.M109.006353.

- 280** Hu Z, Chai J. Structural Mechanisms in NLR Inflammasome Assembly and Signaling. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2016;397:23-42. doi:10.1007/978-3-319-41171-2\_2.
- 281** Schmid A, Schäffler A, Karrasch T. CTRP-3 Regulates NOD1-mediated Inflammation and NOD1 Expression in Adipocytes and Adipose Tissue. *Inflammation*. 2021;44(6):2260-2269. doi:10.1007/s10753-021-01497-w.
- 282** Girardin SE, Boneca IG, Viala J, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem*. 2003;278(11):8869-8872. doi:10.1074/jbc.C200651200.
- 283** Balic JJ, Albargy H, Luu K, et al. STAT3 serine phosphorylation is required for TLR4 metabolic reprogramming and IL-1 $\beta$  expression. *Nat Commun*. 2020;11(1):3816. doi:10.1038/s41467-020-17669-5.
- 284** Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med*. 2007;13(11):460-469. doi:10.1016/j.molmed.2007.09.002.
- 285** Chung K-J, Nati M, Chavakis T, Chatzigeorgiou A. Innate immune cells in the adipose tissue. *Rev Endocr Metab Disord*. 2018;19(4):283-292. doi:10.1007/s11154-018-9451-6.
- 286** Man K, Kutuyavin VI, Chawla A. Tissue Immunometabolism: Development, Physiology, and Pathobiology. *Cell Metab*. 2017;25(1):11-26. doi:10.1016/j.cmet.2016.08.016.
- 287** Brestoff JR, Artis D. Immune regulation of metabolic homeostasis in health and disease. *Cell*. 2015;161(1):146-160. doi:10.1016/j.cell.2015.02.022.

## 8 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Unterschrift

---

Ort, Datum

## **9 Publikationsverzeichnis**

Höpfinger A, Schmid A, Schweitzer L, Marissa Patz, Anja Weber, Andreas Schäffler, Thomas Karrasch

Regulation of Cathelicidin Antimicrobial Peptide (CAMP) Gene Expression by TNF $\alpha$  and cfDNA in Adipocytes.

*International Journal of Molecular Science*. 2023;24(21). doi:10.3390/ijms242115820.

## **10 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt und begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Schäffler, meinem Doktorvater, für die fachliche Betreuung, die anregenden Diskussionen und die kontinuierliche Unterstützung während meiner Promotion.

Ebenso danke ich Frau Dr. Höpfinger, die mich eng begleitet hat. Ihre Expertise und konstruktiven Ratschläge haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Die wertvollen Hinweise, die Unterstützung bei experimentellen Fragestellungen sowie die stets ermutigenden Worte von Frau Dr. Höpfinger waren mir eine große Hilfe.

Ein großer Dank gilt auch Herrn Dr. Schmid, meinem Laborleiter, für die hervorragende Organisation und seine Unterstützung im Laboralltag. Durch seine geduldige Anleitung und sein Engagement habe ich viele wichtige methodische und praktische Erfahrungen sammeln können.

Ich möchte mich bei meinen Kolleginnen und Kollegen im Labor bedanken, die durch ihre Zusammenarbeit, ihre Hilfsbereitschaft und den kollegialen Austausch eine motivierende Arbeitsatmosphäre geschaffen haben.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung, die Ermutigungen und das Interesse an dieser Arbeit bedanken. Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern Bernhard und Annette Schweitzer, meinem Ehemann Nick Mattern sowie Hans-Peter Mattern, die mich in vielfältiger Weise begleitet und unterstützt haben.