



**Boehringer  
Ingelheim**



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg  
*Hamburg University of Applied Sciences*

# **Der Einfluss von Gewebsmakrophagen auf metabolische Erkrankungen**

---

**MASTERARBEIT**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Master of Science  
an der Hochschule für Angewandte Wissenschaften  
Hamburg

Fakultät Life Sciences  
Department Biotechnology

Prof. Dr. Oliver Ullrich

Dr. Andre Broermann

eingereicht von: Christiane Dickel

Dienstag, 13. November 2012



# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	VI
1.1 Fettleibigkeit und Insulinresistenz.....	VI
1.2 Evolutionsbiologische Perspektive.....	VIII
1.3 Makrophagen in metabolischen Erkrankungen.....	X
1.3.1 Makrophagensubtypen.....	X
1.3.2 Transendotheliale Migration von Makrophagen.....	XIII
1.3.3 Rolle von CCR2 und MCP-1 in der Makrophagenrekrutierung.....	XIII
1.4 Leukozytenmarker für die FACS-Analyse.....	XV
1.5 Tiermodelle.....	XVI
1.5.1 Die <i>ob/ob</i> Maus.....	XVI
1.5.2 Die <i>db/db</i> Maus.....	XVII
1.5.3 DIO-Maus.....	XVII
1.6 Therapiemöglichkeiten von Typ II Diabetes.....	XVIII
1.7 Zielsetzung.....	XXII
2. Materialien und Methoden.....	XXIII
2.1 Materialien.....	XXIII
2.1.1 Verbrauchsmaterial.....	XXIII
2.1.2 Verwendete Geräte.....	XXIII
2.1.3 Chemikalien.....	XXIV
2.1.4 Antikörper.....	XXVI
2.1.5 Tierfuttermischungen.....	XXVI
2.2 Methoden.....	XXVII
2.2.1 Gewebepreparation.....	XXVII
2.2.2 Zellisolation.....	XXVII
2.2.3 Zellzählung.....	XXVII
2.2.4 Immunfluoreszenzfärbung.....	XXVIII
2.2.5 <i>Fluorescence activated cell sorter</i> (FACS) Analyse.....	XXIX

2.2.6 Auswertung.....	XXX
2.2.7 Insulintoleranztest (ITT) .....	XXXI
2.2.8 Oraler Glukose-Toleranztest (oGTT).....	XXXII
2.2.9 Cytokinassay .....	XXXII
2.2.10 Tiere .....	XXXIII
2.2.11 Statistik .....	XXXIII
3. Ergebnisse.....	XXXIV
3.1 Etablierung einer Aufarbeitungsstrategie von murinem, epididymalem Fettgewebe für FACS-Analyse von ATMs .....	XXXIV
3.2 Etablierung einer FACS-Methode zur quantitativen Analyse von Leukozyten.....	XXXV
3.2.1 Tandempanel (4er Panel) .....	XXXV
3.2.2 Analysen mit 3-fach Färbungen .....	XXXVI
3.2.3 Kombinationspanel (4er Panel).....	XLI
3.3 Test des Systems.....	XLIV
3.3.1 Leukozyten in einem genetischen Diabetesmodell.....	XLIV
3.3.1.1 Methodenabgleich .....	XLIV
3.3.1.2 Analyse mit 3er Panels.....	XLVII
3.3.1.3 Analyse mit dem Kombinationspanel.....	LI
3.3.1.4 Ergebnisvergleich.....	LII
3.3.2 Leukozyten in einem diätinduzierten Diabetesmodell.....	LIII
3.4 Subchronische Studie eines CCR2-Antagonisten in huCCR2 Mäusen .....	LVI
3.4.1 Leukozyten .....	LVI
3.4.2 Blutplasmakonzentration von MCP-1 .....	LXII
3.4.3 Metabolische Parameter .....	LXIII
4. Diskussion .....	LXV
4.1 Etablierung einer FACS-Analyse zur Quantifizierung von gesamt- und proinflammatorischen Makrophagen in murinem Fettgewebe .....	LXV
4.1.1 Tandempanel.....	LXV
4.1.2 Kombinationspanel .....	LXV
4.1.3 Dreifach-Färbungen .....	LXVI
4.1.4 M1/M2-Panel .....	LXVI

4.2 Methodenabgleich .....	LXVII
4.3 Genetische Mausmodelle .....	LXVIII
4.4 Das Diät induzierte Adipositas-(DIO) Modell.....	LXX
4.5 Vergleich der Adipositas-Modelle .....	LXXI
4.6 Erhöhte ATM-Zahlen in adipösen Mäusen.....	LXXII
4.7 CCR2-Antagonismus als Therapiemöglichkeit für Typ II Diabetes .....	LXXIII
4.7.1 ATM-Zahlen vor Substanzbehandlung .....	LXXIII
4.7.2 Anti-inflammatorische Wirkung von Pioglitazon im DIO-Modell .....	LXXIV
4.7.3 CCR2-Antagonismus ohne anti-inflammatorischen Effekt im Hodenfettgewebe .....	LXXIV
4.7.4 Zusammenhang zwischen der Fettgewebs-Inflammation und den metabolischen Parametern in diesem Versuch.....	LXXV
5. Ausblick .....	LXXVI
6. Zusammenfassung .....	LXXVII
7. Abkürzungsverzeichnis .....	LXXVIII
8. Abbildungsverzeichnis .....	LXXXI
9. Tabellenverzeichnis .....	LXXXIV
10. Literaturverzeichnis.....	LXXXV
11. Anhang .....	LXXXIX
11.1 Datenblätter der Futtermischungen .....	LXXXIX
11.1.1 Datenblatt des Haltungsfutters .....	LXXXIX
11.1.2 Datenblatt der Hochfettdiät .....	XC
11.1.3 Datenblatt der Normaldiät .....	XCI
11.2 FACS-Protokoll der Arbeitsgruppe Dr. Chavakis an der TU Dresden .....	XCII
Eidesstattliche Erklärung .....	XCVII
Danksagung .....	XCVIII

# 1. Einleitung

## 1. Einleitung

### 1.1 Fettleibigkeit und Insulinresistenz

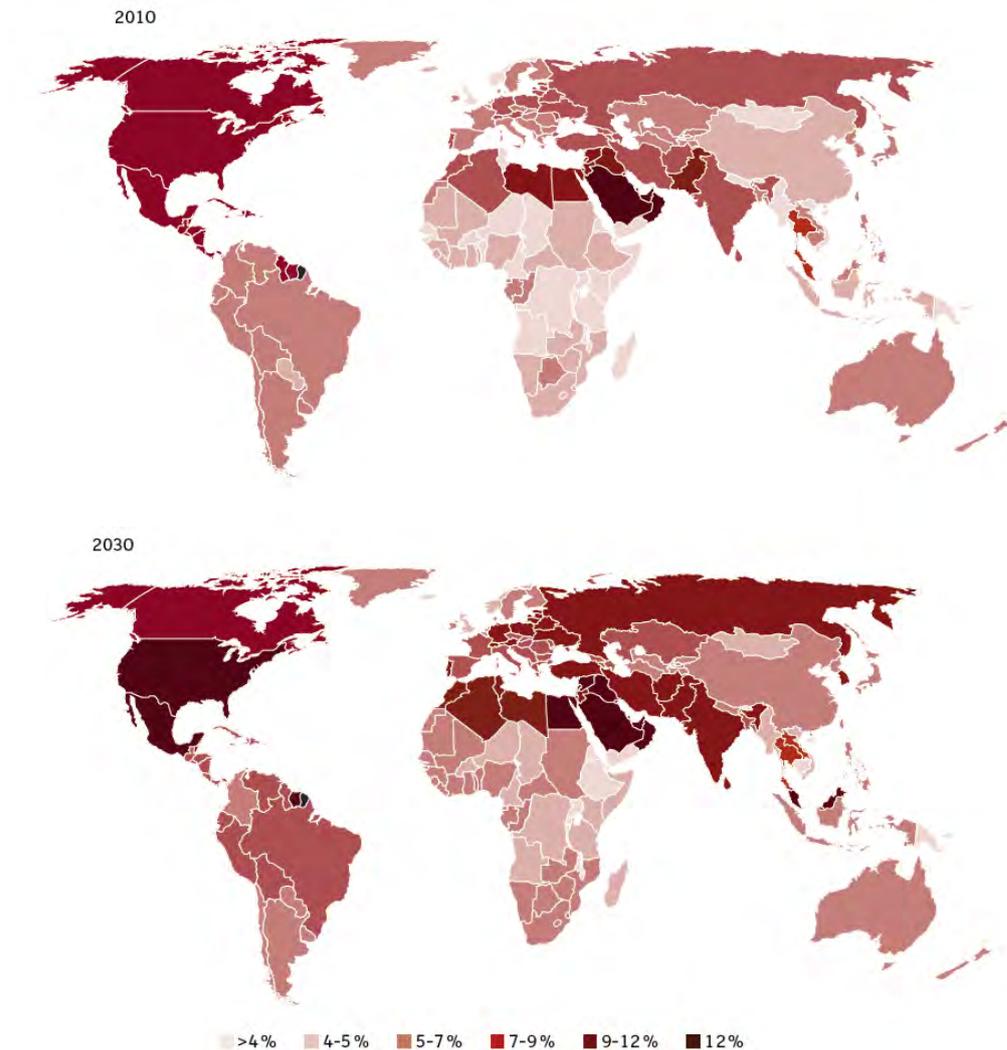
Im Hinblick auf die sich ergebenden Risiken von Übergewicht und Adipositas (Definition Übergewicht: Body mass index BMI = Gewicht in Kilogramm durch Größe in Metern zum Quadrat  $\geq 25$ ; Adipositas BMI  $\geq 30$ ) sind die Entwicklungen der letzten Jahre alarmierend. An den Folgen von Übergewicht und Adipositas sterben heutzutage weltweit mehr Menschen als an Unterernährung (WHO, 2012). Die Gründe hierfür sind vor allem der Anstieg von einer hoch kalorischen Ernährung mit viel Fett, Salz und Zucker, mit gleichzeitig wenigen Vitaminen, Mineralien und anderen Nährstoffen, sowie wenig physischer Aktivität in Folge von Büroarbeiten, Transportmitteln und steigender Urbanisierung. Menschen mit erhöhtem BMI haben ein größeres Risiko, an Herzgefäß-, Atemwegs- und Gallenblasenerkrankungen, Diabetes, Neurodegeneration, Osteoarthritis, Bluthochdruck, Schlaflosigkeit, Dislipidemia, muskuloskeletalen Erkrankungen und Gebärmutter-, Brust- und Darmkrebs zu erkranken (Hotamisligil, 2006; WHO, 2012; Gutierrez et al., 2009). Bei adipösen Kindern treten Schwierigkeiten beim Atmen, das Risiko von Frakturen, Bluthochdruck und Insulinresistenz auf. Dazu kommt die gesellschaftliche Diskriminierung von übergewichtigen Menschen, die Depressionen und Essstörungen verursachen kann (WHO, 2012).

Nach Angaben der WHO (2012) hat sich die Zahl von Übergewichtigen seit dem Jahr 1980 weltweit verdoppelt. Mehr als 1,4 Billionen Erwachsene, die 20 Jahre oder älter waren, hatten im Jahr 2008 Übergewicht. Darunter waren 200 Millionen Männer und 300 Millionen Frauen adipös. Aber auch über 40 Millionen Kinder unter fünf Jahren hatten im Jahr 2010 Übergewicht. Die Prävalenz von Adipositas in den Vereinigten Staaten von Amerika zwischen 2009 und 2010 lag insgesamt bei 35,7 % (Flegal et al., 2012). Im Jahr 2009 und 2010 lag die Prävalenz von Adipositas bei Kindern und Jugendlichen in den USA bei 16,9 % (Ogden et al., 2012).

Wurde früher diese Entwicklung als Problem von Hochverdiener-Ländern angesehen, steigen die Zahlen von Übergewichtigen und an Adipositas Erkrankten auch in Niedrig- (Brutto Sozial Produkt (BSP)  $< 800$  \$ pro Jahr *per capita*) und Mittelverdiener-Ländern (BSP  $< 3000$  \$ pro Jahr *per capita*). 35 Millionen übergewichtige Kinder leben in Entwicklungsländern, während in entwickelten Ländern acht Millionen Kinder Übergewicht haben (WHO, 2012). In Entwicklungsländern haben sich in den vergangenen 20 Jahren die Zahlen von adipösen Menschen verdreifacht (Hossain et al., 2007).

# 1. Einleitung

Mit den steigenden Zahlen von übergewichtigen und adipösen Menschen häufen sich auch die Fälle von *Diabetes mellitus* und die Prognosen gehen davon aus, dass der Anteil der an Typ II Diabetes erkrankten Bevölkerung weiter zunehmen wird (Abb. 1).



**Abbildung 1: Typ II Diabetes weltweit**

Voraussichtlich wird sich die Anzahl von Patienten mit Typ II Diabetes in den kommenden 20 Jahren von 285 Millionen Menschen um 50 % auf 438 Millionen Menschen erhöhen.

([www.boehringer-ingelheim.de](http://www.boehringer-ingelheim.de))

Adipositas führt zu einer chronischen Veränderung der metabolischen Homöostase. Charakteristisch für die durch Fettleibigkeit induzierte metabolische Dysfunktion ist die Resistenz von Fettgewebe, Leber und Muskeln im Hinblick auf die anabolische Wirkung von Insulin. Diese so genannte Insulinresistenz manifestiert sich als verminderte Glukoseaufnahme im Muskel und einer angeregten Triglyceridlipolyse im Fettgewebe, welche zu Hyperinsulinämie, Hyperglykämie und Dyslipidämie führt (Chawla et al., 2011). Dieser Zustand wird auch metabolisches Syndrom oder Insulinresistenzsyndrom genannt (Olefsky & Glass, 2010; Reaven, 1988). Durch die verminderte Insulinsensitivität werden die

# 1. Einleitung

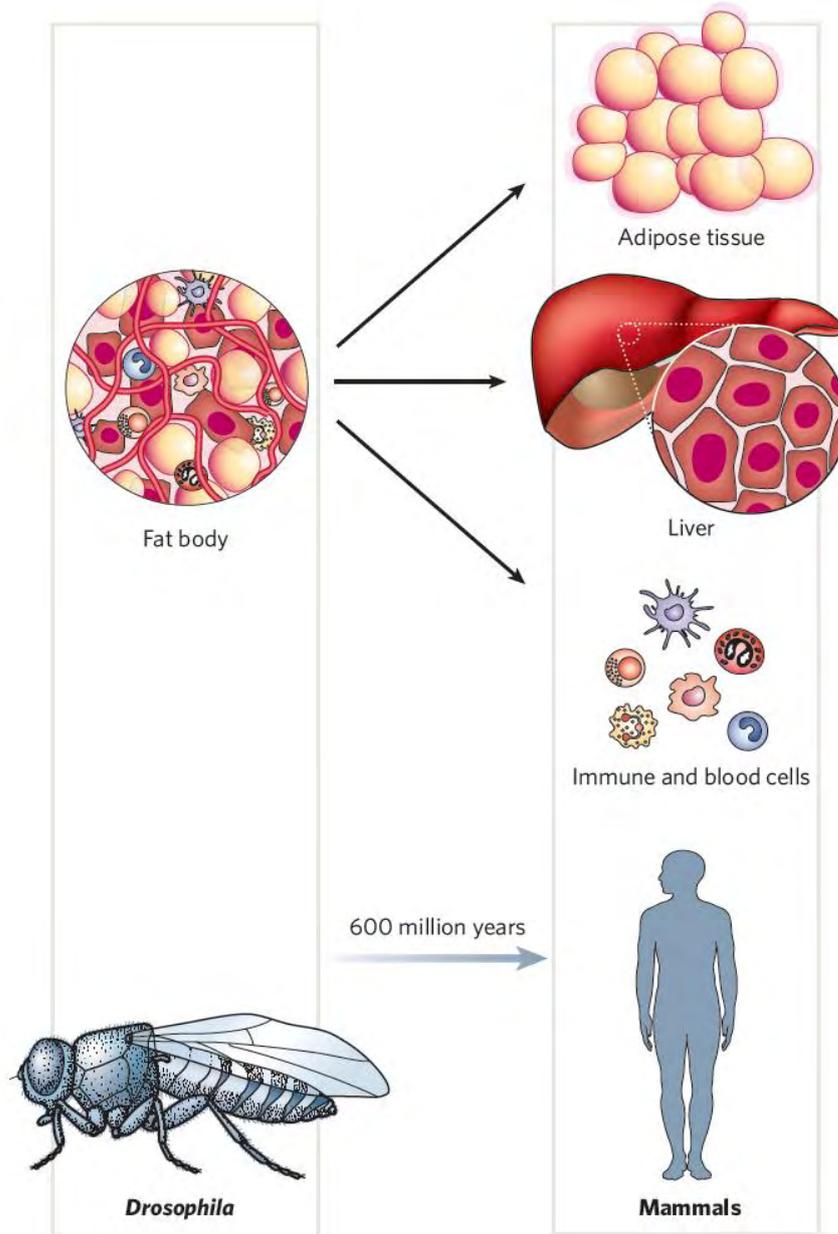
$\beta$ -Zellen im Pankreas angeregt, mehr Insulin zu sekretieren, um über die erhöhte Ausschüttung die verminderte Wirkung des Insulins ausgleichen zu können. Dieser Vorgang wird kompensatorische Hyperinsulinämie genannt. Diese vermehrte Insulinsekretion führt zu einer Überlastung der  $\beta$ -Zellen. Bei einem chronischen Zustand ist die vermehrte Insulinausschüttung der  $\beta$ -Zellen daher rückläufig, weil die  $\beta$ -Zellen nach der vermehrten Insulinsekretion ihre Funktion einstellen. Die Folgen sind Hyperglykämie und Typ II Diabetes (Chawla et al., 2011).

## 1.2 Evolutionsbiologische Perspektive

Sowohl die Eigenschaft, Phasen mit geringem Nahrungsangebot zu überstehen, als auch ein gut funktionierendes Immunsystem zu besitzen, waren in der Evolution des Menschen vorteilhaft. Überschüssige Energie wurde in Form von Fett für Zeiten gespeichert, in denen Nahrung rar war. Sich wiederholende Epidemien und Pandemien wie Cholera, Grippe, Typhus, Pest und Kinderlähmung führten dazu, dass diejenigen Individuen mit einem gut funktionierenden Immunsystem mehr Nachkommen hatten als Menschen, die anfällig für die Erreger waren. Innerhalb der Population entstanden so Individuen, die in der Lage sind Energie effizient zu speichern und dazu ein sensibles Immunsystem besitzen (Hotamisligil, 2006).

Dazu kommt, dass die Wirkungskaskaden von metabolischen und immunologischen Reaktionen im Körper eng miteinander verknüpft sind. Dies ist ebenfalls evolutionsbiologisch erklärbar. So sind die Säugetierhomologe von Leber, hämatopoetischem- und Immunsystem im Fettkörper der *Drosophila melanogaster* zusammengefasst (Abb. 2). Da Fettgewebe, Leber und hämatopoetisches System in höheren Organismen eine gemeinsame Entwicklungsgeschichte haben, ist folgendes immer noch erkennbar: Es finden sich sowohl in Fettgewebe als auch Leber metabolische Zellen, wie Adipozyten oder Hepatozyten, in enger Nähe zu Immunzellen, wie Makrophagen und Kupfferzellen, mit einem unmittelbaren Zugang zu einem großen Blutgefäßnetzwerk (Hotamisligil, 2006).

# 1. Einleitung



**Abbildung 2: Evolution von Fettgewebe, Leber und hämatopoetischem System in einzelne Organe bei Säugetieren**

In *Drosophila melanogaster* sind Fettgewebe, Leber und hämatopoetisches System in einer funktionalen Einheit, die Fettkörper genannt wird, zusammengefasst. Dieser Entwicklungsursprung spiegelt sich im sich ähnelndem Aufbau der Säugetierhomologe wieder. Die Effekte von Adipozyten im Fettgewebe und Hepatozyten in der Leber auf die entsprechenden Immunzellen, Makrophagen und Kupferzellen, ähneln sich stark. Außerdem besteht ein enger Zusammenhang zwischen Immunsystem und metabolischen Systemantworten, welcher sich durch den unmittelbaren Zugang der beiden Gewebe mit dem Blutgefäßnetzwerk widerspiegelt.

(Hotamisligil, 2006)

# 1. Einleitung

## 1.3 Makrophagen in metabolischen Erkrankungen

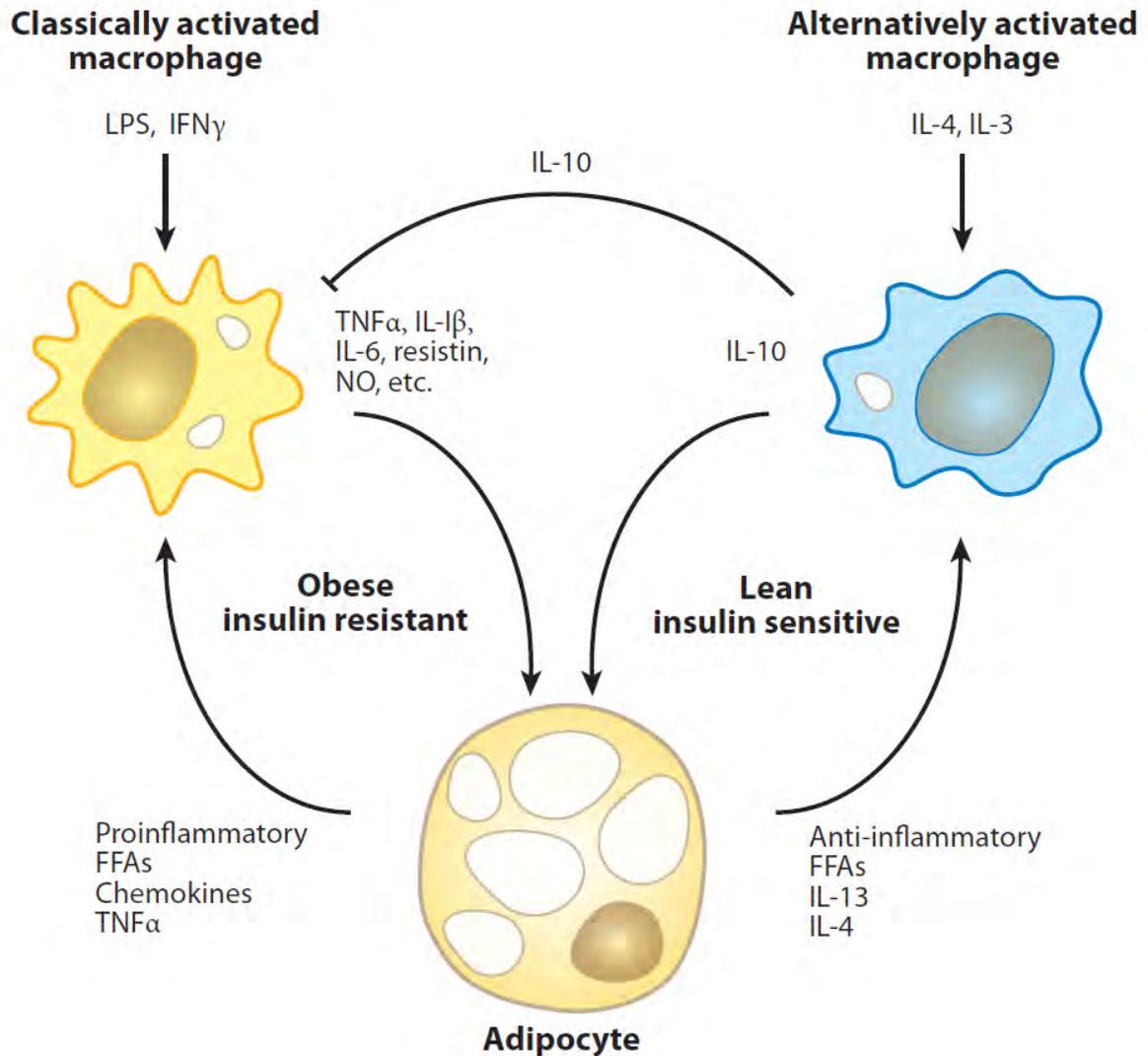
### 1.3.1 Makrophagensubtypen

Im Jahr 2003 wurde erstmals ein Zusammenhang zwischen adipös bedingter Insulinresistenz und einer chronischen Entzündung im Fettgewebe, die sich in Form von einer Akkumulation von Makrophagen im weißen Fettgewebe ausdrückte, veröffentlicht (Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003).

Makrophagen sind differenzierte Monozyten, die sich aus Vorläuferzellen des Rückenmarks entwickeln. Sie gehören somit zu den zirkulierenden weißen Blutzellen. Sowohl Monozyten als auch Makrophagen sind heterogene Zellpopulationen. Ursprünglich wurden zwei Makrophagensubtypen definiert: Die klassisch aktivierten proinflammatorischen M1 Makrophagen und die alternativ aktivierten M2 Makrophagen (Gutierrez et al., 2009; Schipper et al., 2010).

In normalgewichtigen Säugetieren sind Leukozyten in Fettgewebe, Leber, Muskel und Pankreas zu finden. Ihr Phänotyp entspricht dem der M2 Makrophagen, die an der Gewebshomöostase beteiligt sind (Lumeng et al., 2007c; Lumeng et al., 2008; Odegaard et al., 2008; Olefsky & Glass, 2010; Lumeng et al., 2007b). Dabei sezernieren sie anti-inflammatorische Cytokine wie Interleukin (IL)-10, IL-4 und IL-13 (Abb. 3).

## 1. Einleitung



**Abbildung 3: Makrophagenpolarisierung in fettleibigkeitsinduzierter Insulinresistenz im adipösen Fettgewebe**

Unter normalgewichtigen Bedingungen sezernieren Adipozyten Faktoren wie Interleukin (IL)-13, welches die alternative Aktivierung von Makrophagen induziert. Alternativ aktivierte (M2) Makrophagen sekretieren anti-inflammatorische Mediatoren wie IL-10. Diese anti-inflammatorischen Cytokine wirken sich positiv auf die Insulinsensitivität aus. Fettleibigkeit induziert Veränderungen im Adipozytenmetabolismus und in der Genexpression von Cytokinen. Dies führt zu einer verstärkten Lipolyse und Freisetzung von proinflammatorisch wirkenden freien Fettsäuren (*free fatty acids*=FFAs) und Faktoren, die Makrophagen rekrutieren und aktivieren. Solche Faktoren sind das Monozyten Chemotactic Protein-1 (MCP-1) und der Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). Klassisch aktivierte M1 Makrophagen produzieren große Mengen von proinflammatorischen Mediatoren, wie TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und Resistin, welches auf Adipozyten wirkt, und damit die Insulinresistenz induziert. Auf diese Weise etabliert sich ein sich selbst verstärkender Teufelskreis, der die Inflammation und Insulinresistenz weiter verstärkt.

(Olefsky & Glass, 2010; Abbildung 2, S. 223)

## 1. Einleitung

Eine Nahrungszufuhr, die über den Kalorienbedarf hinausgeht, bedingt eine Gewichtszunahme, da die überschüssige Energie in Form von Fett in Adipozyten gespeichert wird (Xu et al., 2003). Aufgrund einer Verschlechterung der Nährstoffversorgung des wachsenden Fettgewebes, können die Adipozyten nekrotisch werden. Dies führt zu einer Rekrutierung von M1 Makrophagen, die sonst auch bei einer klassischen Entzündung mit Rötungen, Schwellungen, Hitze und Schmerzen beteiligt sind. Die M1 Makrophagen lagern sich im interstitiellen Raum um die sterbenden Adipozyten in Form von „*crown like structures*“ ab (Lumeng et al., 2008). Es wird angenommen, dass es während der Adipositas zu einer Verschiebung des M1/M2 Verhältnisses kommt, bei dem sich mehr M1 Makrophagen im Fettgewebe von fettleibigen Menschen befinden als bei Normalgewichtigen. (Lumeng et al., 2007a). Dabei sekretieren Adipozyten und M1 Makrophagen proinflammatorische Cytokine wie Makrophagenmigrations-Inhibitionsfaktor (MIF), Tumornekrosefaktor (TNF)  $\alpha$ , IL-6 und IL-1 $\beta$  (Abb.3) (Olefsky & Glass, 2010). Sie aktivieren proinflammatorisch wirkende Signalkaskadenproteine, einschließlich der Junk N-terminal Kinase (JNK), Inhibitor der  $\kappa$ B Kinase (IKK)  $\beta$  und anderer Serinkinasen. Diese phosphorylieren wiederum Insulinrezeptorsubstrat (IRS)-Proteine, Insulinrezeptoren und andere Insulinsignalmoleküle. So kommt es durch eine chronische meta Entzündung im Fettgewebe, die sich durch eine Zunahme von Fettgewebsmakrophagen (*adipose tissue macrophages* = ATMs) manifestiert (Anderson et al., 2010), zu einer lokalen Insulinresistenz, die sich auf das gesamte Gewebe und schließlich auf den gesamten Organismus übertragen kann (Gregor & Hotamisligil, 2011).

M1 Makrophagen Vorläuferzellen machen 2-5 % der weißen Blutzellen in der Blutbahn aus. Während diese proinflammatorischen Monozyten schnell zu infizierten und entzündeten Stellen rekrutiert werden können, sind Vorläuferzellen von M2 Makrophagen an der Gewebshomöostase und Reparatur beteiligt (Shi & Pamer, 2011; Anderson et al., 2010).

*In vitro* führt eine Behandlung von Makrophagen mit LPS und Interferon (IFN)  $\gamma$  zu einem inflammatorisch wirkenden M1 Phänotyp, während eine Behandlung mit Interleukin (IL) 4 oder IL-13 zur Ausbildung eines anti-inflammatorischen M2 Phänotyp führt (Anderson et al., 2010; Mantovani et al., 2004).

*In vivo* ist der alternativ aktivierte M2 Phänotyp von ATMs durch eine gesteigerte Expression von IL-10 und Arginase charakterisiert (Lumeng et al., 2007a). Der proinflammatorische klassisch aktivierte M1 Phänotyp von ATMs weist erhöhte IL-6 Level auf (Lumeng et al., 2007a; Lumeng et al., 2008; Nguyen et al., 2007; Wentworth et al., 2010).

M2 Makrophagen sind durch den durch Peroxisomproliferator aktivierten Rezeptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) induzierte Signale aktiviert und erhalten Funktion von Adipozyten, Insulinsensitivität

## 1. Einleitung

und Glukosetolleranz (Lumeng et al., 2007a; Odegaard et al., 2007). Es besteht die Möglichkeit, dass bei fortschreitender Adipositas ATMs ihren M2 Phänotyp zu einem klassisch aktiviertem M1 Phänotyp mit einem pro-inflammatorischen Aktionspotential ändern (Odegaard & Chawla, 2011).

### 1.3.2 Transendotheliale Migration von Makrophagen

Bei einer Immunantwort werden Monozyten über die Blutzirkulation zu peripherem Gewebe transportiert, wo sie aus dem Gefäßsystem ins Gewebe extravasieren. Die Monozytenrekrutierung folgt dem allgemeinen Paradigma der Leukozytenadhäsion und -Extravasation. Dies beinhaltet die Selektin-vermittelte Adhäsion, das „Rollen“ der Leukozyten auf den Endothelzellen, ihre Chemokin gesteuerte Aktivierung, die Integrin-abhängige Adhäsion, das intraluminale „Kriechen“ und die transendotheliale Migration über den parazellulären oder transzellulären Weg (Shi & Pamer, 2011).

Die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen oder dendritischen Zellen wird durch Wachstumsfaktoren, pro-inflammatorische Cytokine und mikrobiologische Produkte z.B. Lipopolysaccharide (LPS) reguliert. Makrophagen spielen eine Schlüsselrolle in der Kontrolle und Behebung von viralen-, bakteriellen-, Pilz- und Protozoeninfektionen und scheinen auch an der Pathogenese von entzündlichen und degenerativen Erkrankungen beteiligt (Shi & Pamer, 2011).

### 1.3.3 Rolle von CCR2 und MCP-1 in der Makrophagenrekrutierung

Der C-C Motiv Chemokinrezeptor-2 (CCR2) und sein hoch-affiner Ligand das *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1, CCL2) sind das am besten erforschte Chemokin/Rezeptor-Paar in der ATM-Rekrutierung (Anderson et al., 2010). CCR2 ist auf zirkulierenden Monozyten und ATMs exprimiert, wohingegen MCP-1 in den extrazellulären Raum zwischen Adipozyten als lokaler Faktor sezerniert wird (Dahlman et al., 2005). Bindet MCP-1 an CCR2, wird der Rezeptor von seinem Liganden aktiviert. Es wird davon ausgegangen, dass CCR2 und sein Ligand MCP-1 essentiell für die Einwanderung von Monozyten in Gewebe sind, da das Chemokin/Rezeptor-Paar eine Schlüsselrolle bei der durch M1 Makrophagen ausgelösten Entzündungsantwort spielt (Tsou et al., 2007; Lumeng et al., 2007b; Lumeng et al., 2007c; Shi & Pamer, 2011; Si et al., 2010).

Im Mausmodell zeigen CCR2- und MCP-1-defiziente Tiere eine verminderte Nahrungsaufnahme und damit auch eine geringere Ausprägung der Adipositas (Weisberg et al., 2006). Diese Parameter lassen sich desweiteren mit einer geringeren Makrophagenzahl

## 1. Einleitung

und einem rückläufigen inflammatorischem Profil im Fettgewebe im Vergleich zu adipösen Wildtyptieren in Zusammenhang setzen (Anderson et al., 2010).

Die Behandlung mit einem pharmakologischem Antagonisten von CCR2 verringert nicht nur die Makrophagenzahlen im Fettgewebe, sondern konnte auch eine gesteigerte Insulinsensitivität bewirken, ohne dass sich Körpergewicht oder Lebergröße veränderten (Weisberg et al., 2006; Anderson et al., 2010; Lumeng et al., 2008; Kanda et al., 2006).

CCR2-Defizienz bei *knock-out* (KO) Mäusen auf HFD führt hingegen zu keiner Insulinresistenz. CCR2 KO Mäuse auf HFD zeigten eine verringerte ATM-Infiltration, AT-Inflammation, systemisch Insulin Resistenz und hepatische Steatose (Weisberg et al., 2006).

In Studien mit MCP-1 KO-Mäusen konnte eine reduzierte Makrophagenakkumulation in AT, verbesserte Insulinsensitivität und Verbesserung der hepatischen Steatose festgestellt werden (Kanda et al., 2006; Kamei et al., 2006). Diese Ergebnisse sind in der Literatur jedoch nach Veröffentlichungen von Kirk et al. (2008) und Inouye et al. (2007), die keine solchen Veränderungen nachweisen konnten, umstritten. Es ist nach aktuellem Kenntnisstand nicht zu sagen, ob ebenfalls eine MCP-1-Defizienz bei *knock-out* Mäusen die ATM-Zahlen verringern kann und die Tiere vor Insulinresistenz schützt (Weisberg et al., 2006).

Trotz sich ähnelnder Phänotypen weisen sowohl CCR2- noch MCP-1-defiziente Mäuse auf HFD noch Parameter für ein Ungleichgewicht der Homöostase in Adipositas auf (Ferrante, Jr., 2007).

Durch transgene Überexpression von MCP-1 werden die Makrophagenzahlen in AT erhöht und die Insulinwirkung beeinträchtigt (Weisberg et al., 2006; Ferrante, Jr., 2007). Zudem gibt es Anhaltspunkte, dass MCP-1, welches durch Adipozyten sekretiert wird, lokal das Insulinsignal beeinflusst (Sartipy & Loskutoff, 2003b).

Neben MCP-1, welches auch CCL2 genannt wird, binden auch noch andere Cytokine an CCR2. Die anderen Liganden von CCR2, die im Fettgewebe exprimiert werden, sind CCL7 (MCP-3), CCL8 (MCP-2) und CCL11 und könnten ebenfalls die ATM-Rekrutierung beeinflussen (Huber et al., 2008; Kamei et al., 2006). In Experimenten mit Mäusen ohne MCP-1, MCP-3, MCP-5 oder MCP-2 und MCP-5 zeigte sich, dass MCP-3 und MCP-1 hauptverantwortlich für die Erhaltung der normalen Blutmonozytenanzahl sind (Tsou et al., 2007).

Es müssen weitere Untersuchungen vorgenommen werden, um herauszufinden wie Makrophagen in das Fettgewebe einwandern, und wie ATMs von einem M1 zu einem M2 Status polarisiert werden können (Anderson et al., 2010).

# 1. Einleitung

## 1.4 Leukozytenmarker für die FACS-Analyse

Die *Fluorescence activated cell sorter* (FACS)-Analyse ist eine Form der Durchflusszytometrie, bei der Zellen durch die Parameter Größe, Granularität und Fluoreszenzintensität quantitativ erfasst werden können. Mittels Lasertechnik werden Fluoreszenzfarbstoffe von konjugierten Antikörpern, die spezifisch an Oberflächenmoleküle binden, angeregt und die Emission detektiert. Über die Auswahl von spezifischen Oberflächenproteinen, die charakteristisch für bestimmte Zelltypen im Fettgewebe sind, können diese Zellpopulationen in den zu analysierenden Proben markiert werden. Da die spezifischen Antikörper fluoreszenzmarkiert sind, können diese mittels Lasertechnik detektiert werden.

Der *Cluster of Differentiation* (CD) 45 ist ein transmembranes Glykoprotein, welches in hohen Zahlen auf der Zelloberfläche von hämatopoetischen Stammzellen und allen Zellen mit hämatopoetischer Abstammung ausgenommen Erythrozyten exprimiert wird. Durch die CD45-Expression sind Leukozyten klar von nicht-hämatopoetischen Zellen abzugrenzen. Das Glykoprotein gehört zur Familie der Protein Tyrosin Phosphatasen (PTP). Dieser Familie gemeinsam ist eine intrazelluläre Carboxy-terminale Region mit ein oder zwei PTP katalytischen Domänen, während die extrazelluläre Region aufgrund des alternativen Spleißens der Exons hoch variabel ist. Die verschiedenen Isoformen von CD45 spielen komplexe Rollen in T- und B-Zell Antigen Rezeptor Signaltransduktionen (Technisches Datenblatt BD).

Das F4/80 Antigen ist ein 160 kDa großes Glykoprotein der Familie der EGF-TM7 und wird auf einer großen Bandbreite von reifenden Gewebemakrophagen wie Kupffer Zellen, Langerhans, Mikroglia, Makrophagen im *lamina propria* des Darms, Bauchhöhle, Lungen, Thymus, Knochenmarkstroma und roten Pulpa der Milz exprimiert (Technisches Datenblatt AbD serotec). Das kodierende Gen heißt *Emr1* (Murray & Wynn, 2011).

CD11b ist eine Proteinuntereinheit, die zusammen mit CD18 ein Integrin Molekül, welches als Makrophagen-1 Antigen (MAC-1) bekannt ist, bildet. MAC-1 ist auf der Oberfläche von Leukozyten des angeborenen Immunsystems wie Monozyten, Granulozyten, Makrophagen, Mikroglia, B-1 Zellen, natürlichen Killerzellen und sich aus myeloid Zellen entwickelten dendritischen Zellen exprimiert. Dabei vermittelt MAC-1 über die Regulation der Leukozyten-Adhäsion und -Migration die Entwicklung einer Inflammation bei Prozessen wie Phagozytose, Zell-vermittelte Cytotoxizität, Chemotaxis und zelluläre Aktivierung (Solovjov et al., 2005). Das kodierende Gen von CD11b heißt *Itgam* (Murray & Wynn, 2011).

CD11c ist ein Typ I Transmembranprotein, dass in hohen Zahlen auf den meisten humanen dendritischen Zellen sowie Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen exprimiert ist (Murray

## 1. Einleitung

& Wynn, 2011). Proinflammatorische CD11c<sup>+</sup> ATMs exprimieren hohe Konzentrationen an Integrinen und Molekülen der Antigenpräsentation wie IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$  und CCL-3. Im Unterschied dazu exprimieren CD11c<sup>-</sup> ATMs Proteine, die in der Erhaltung und Reparatur von Gewebe beteiligt sind (Wentworth et al., 2010). Eine Entfernung aller CD11c<sup>+</sup> Zellen in Mäusen führte zu einer schnellen Normalisierung der Insulinsensitivität, sowie einem Rückgang an inflammatorischen Markern (Patsouris et al., 2008).

### 1.5 Tiermodelle

Als Tiermodelle für die Typ II Diabetesforschung stehen unter anderem verschiedene Maus- und Rattenmodelle zur Verfügung. Die in dieser Arbeit verwendeten genetischen Mausmodelle sind die homozygoten *ob/ob*- und *db/db*-Mäuse. Beide Mutationen sind spontan bei der Züchtung von *C57BL/6*-Mäusen aufgetreten und die Tiermodelle entwickeln Adipositas, Hyperinsulinämie und Insulinresistenz (Coleman & Hummel, 1974; Coleman, 1978; Kieffer & Habener, 2000).

Eine weitere Möglichkeit für die pharmakologische Forschung ist, bei Mäusen eine Adipositas durch Diäten zu induzieren. Bei diesen so genannten DIO (*diet induced obesity*)-Mäusen liegt der Vorteil gegenüber den genetischen Modellen darin, dass ähnlich wie beim Menschen die Insulinresistenz durch Aufnahme von zu hochkalorischer Nahrung induziert wird. Die Anfütterungsphasen bedingen jedoch eine aufwändigere Planung und Durchführung der Versuche als bei den genetischen Mausmodellen.

#### 1.5.1 Die *ob/ob*-Maus

Die *ob/ob*-Maus ist ein Tiermodell für Adipositas (*ob=obesity protein*). Bei ihnen ist das Gen für das Hormon Leptin mutiert. Im Körper wird durch Leptin der Appetit geregelt, da durch dieses Hormon dem Gehirn signalisiert wird, dass das Tier genügend Nahrung aufgenommen hat. Die Genmutation bei der *ob/ob*-Maus kodiert ein Stopp-Codon in der Proteinsequenz, wodurch ein zu kurzes nicht-funktionstüchtiges Protein synthetisiert wird. Dies führt zu einer unkontrollierten Nahrungsaufnahme, die zu einer Adipositas korreliert mit einer stark erhöhten Fettmasse führt. Dieses Phänomen tritt allerdings nur bei homozygoten Tieren auf, da der Gendefekt rezessiv ist. Bei Tieren mit diesem Gendefekt kann das Gewicht dreimal so hoch sein wie das von nicht-mutierten *C57BL/6*-Mäusen. Die in diesem Projekt verwendeten *ob/ob*-Mäuse mit *C57BL/6J* Hintergrund von Janvier sind durch eine Hyperglykämie im Alter von 8-12 Wochen charakterisiert. Die  $\beta$ -Zellen kompensieren durch einen gesteigerten Insulinlevel die Insulinresistenz, was die Glukosehomeostase wieder ins Gleichgewicht bringt (Coleman & Hummel, 1974; Kennedy et al., 2010; Srinivasan &

## 1. Einleitung

Ramarao, 2007). Die Insulinmenge im gesamten Pankreas ist bei *ob/ob*-Mäusen erhöht (Tomita et al., 1984).

### 1.5.2 Die *db/db*-Maus

Im Unterschied zu *ob/ob*-Mäusen haben *db/db*-Mäuse eine mangelhafte Leptin-Rezeptor-Aktivität. Grund dafür ist eine Punktmutation im Gen des Leptin-Rezeptors, die sich nur bei homozygoten Tieren phänotypisch ausprägt (Abb. 4). Anders als bei *ob/ob*-Mäusen kann daher bei Gabe von Leptin keine verminderte Nahrungsaufnahme oder ein vermehrter Energieverbrauch induziert werden. Die in diesem Projekt verwendete *db/db*-Maus mit *C57BLKsJ* Hintergrund von Janvier ist nicht nur ein Tiermodell für Insulinresistenz, sondern sie prägt auch einen Typ II Diabetes aus. Dieser äußert sich in einem erhöhten Blutzuckerspiegel (Hyperglykämie), einer beeinträchtigten Insulinsekretion und einer geringeren Insulinsensitivität in Leber, Muskel und Fettgewebe.



Abbildung 4: *C57BL/6* und *db/db* im Alter von 11 Wochen

### 1.5.3 DIO-Maus

Durch die Verwendung von entsprechenden Diäten kann bei Mäusen eine Insulinresistenz induziert werden. Gängige Diätformen sind die Cafeteriadiät, die *Western-Type Diet*, oder die Hochfett-diät. Die Cafeteriadiät ist im Gegensatz zur *Western-Type Diet* und Hochfett-diät keine definierte Diät, sondern es werden den Tieren neben dem normalen Haltungsfutter zusätzlich Nahrungsmittel zur Verfügung gestellt, die den Ernährungsgewohnheiten beim Menschen entsprechen (z.B. Kekse und Schokolade). *Western-Type Diet* und Hochfett-diäten sind im Handel erhältliche definierte Futtermischungen, die durch ihren hohen Fettanteil charakterisiert sind. In *Western-Type Diets* sind hohe Cholesterinanteile enthalten und es

## 1. Einleitung

wird Milchfett verwendet. Diese Diät ist von ihren Bestandteilen der Nahrung in westlichen Industrieländern nachempfunden. Eine Hochfettdiät ist nur durch ihren Fettanteil definiert und die Fettquelle ist je nach Diätfuttermischung unterschiedlich. Die entsprechenden Kontrolldiäten für Western Diets und Hochfettdiäten kennzeichnen sich durch dieselben Kalorienkonzentrationen, Protein-, Cholesterol-, Mineral- und Vitaminanteile, enthalten aber mehr Kohlenhydrate um den geringeren Fettanteil auszugleichen.

### 1.6 Therapiemöglichkeiten von Typ II Diabetes

Im Gegensatz zum Typ I ist der Typ II Diabetes genetisch bedingt. Es liegt ein Insulinmangel aufgrund einer Zerstörung der  $\beta$ -Zellen der Langerhans-Inseln im Pankreas vor. Im Gegensatz dazu ist der Typ II Diabetes in den meisten Fällen durch Übergewicht und Adipositas induzierte Insulinresistenz bedingt, die durch einen Bewegungsmangel begünstigt wird. Die Bekämpfung der Fettleibigkeit durch Verhaltens- und Diätveränderungen der Betroffenen wäre zwar effektiv, da die Charakteristika des metabolischen Syndroms wie Insulinresistenz, Hyperglykämie, Bluthochdruck und Dyslipidemie durch Gewichtsreduktion reversibel sind (O'Brien et al., 2006), Patienten ändern ihren Lebensstil jedoch meistens nicht (Chawla et al., 2011). Daher werden diese konservativen Methoden in den meisten Fällen durch orale und/oder injizierbare Diabetesmedikamente unterstützt. Aktuell sind sechs Klassen von oralen Typ II Antidiabetika zugelassen: Sulfonylharnstoffe, Meglitinide, Biguanide, Thiazolidindione, Alpha-Glukosidasehemmer und Dipeptidyl Peptidase 4 (DPP-4) Inhibitoren. Außerdem kommen auch je nach Verträglichkeit und Krankheitsbild injizierbare Antidiabetika wie Insulin (z.B. Lantus®) zum Einsatz (American Diabetes Association, 2012). Natürlich gibt es diverse mögliche Therapiekombinationen (z.B. Insulin und Metformin als Kombinationspräparat). Bei einem gut eingestellten Diabetiker liegen die Blutzuckerwerte im Normalbereich (Tabelle 1).

Einstufung	Nüchternblutzucker	Blutzucker 2 Stunden nach oraler Glukosegabe
Normal	< 6,1 mM	< 7,8 mM
Abnorme Nüchternglukose	$\geq 6,1$ - < 7,0 mM	< 7,8 mM
Gestörte Glukosetolleranz	< 7,0 mM	< 7,8 - < 11,1 mM
Diabetes mellitus	$\geq 7,0$ mM	$\geq 11,1$ mM

Tabelle 1: Diabetes/Blutzucker Kriterien und Einstufung (WHO, 2012)

## 1. Einleitung

Sulfonylharnstoffe regen die Insulinausschüttung in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas an, indem sie die ATP-sensitiven Kaliumkanäle der  $\beta$ -Zellen durch Bindung an spezifische Sulfonylharnstoffrezeptor-1 (*sulfonylurea receptor* = SUR-1)-Bindungsstellen blockieren. Als Folge dieser Depolarisation öffnen sich die spannungsgesteuerten Calciumkanäle der Zellen, welches wiederum zur Ausschüttung des Insulins aus den Speichervesikeln führt. Sulfonylharnstoffe werden in zwei Generationen unterteilt. Der einzige Sulfonylharnstoff aus der ersten Generation, der heute immer noch verwendet wird, ist Chlorpropanid (Diabinese®). Zu der Gruppe der zweiten Generation gehören Glipizid (Glukotrol® und Glukotrol® XL), Glyburid (Micronase, Glynase und Diabeta) und Glimperid (Amaryl). Der Effekt der verschiedenen Sulfonylharnstoffe auf den Blutzucker ist weitgehend gleich und glukoseunabhängig, wodurch die Gefahr einer Hypoglykämie besteht (American Diabetes Association, 2012).

Repaglinid (Prandin®) und Nateglinid (Starlix®) gehören zu den Meglitiniden und regen wie auch Sulfonylharnstoffe  $\beta$ -Zellen an, mehr Insulin auszuschütten. Da Sulfonylharnstoffe und Meglitinide auf dieselbe Weise wirken, kann es bei beiden Medikamenten durch die Glukoseunabhängigkeit zur Hypoglykämie kommen (American Diabetes Association, 2012).

Biguanide verringern die Blutzuckerwerte, indem sie sich aufgrund ihrer Lipophilie in die Membran der Darmepithelzellen und die Mitochondrien-Membran der Leberzellen einlagern. In der Darmepithelzellmembran beeinträchtigen sie den aktiven Transport der Glukose in die Zelle und somit die Resorption aus dem Darm. In der Mitochondrien-Membran der Leberzellen hemmen sie den Pyruvat-Transport in die Mitochondrien, wodurch die Atmungskette unterbrochen wird. Als Folge wird die Glukoneogenese und ATP-Synthese gehemmt. Das nicht verstoffwechselte Pyruvat akkumuliert außerhalb der Mitochondrien und beeinträchtigt die Atmungskette als Gleichgewichtsreaktion, woraufhin der anaerobe Glukose-Abbau mit Laktat als Endprodukt zunimmt. Die Leber setzt unter diesen Bedingungen weniger Glukose frei und die Aufnahme von Glukose im peripheren Gewebe steigt (Bailey, 1992). Außerdem führen Biguanide zu einer erhöhten Expression von Insulinrezeptoren am Skelettmuskel, welche die Insulinwirkung verstärken wird. Zu dieser Substanzklasse gehört auch das meist verschriebene Antidiabetikum Metformin (Glukophage®) (American Diabetes Association, 2012). Metformin führt, wie alle Biguanide, zu einem erhöhtem Risiko von Nierenschädigung, weil es durch die Laktatanreicherung im Körper durch den anaeroben Glukoseabbau zu einer pH-Absenkung in Blut und Gewebe kommen kann. Metformin wird renal ausgeschieden und aufgrund der Laktatacidosegefahr ist Metformin nur für Patienten mit intakter Nierenfunktion als Medikament geeignet, weil diese in der Lage sind das überschüssige Laktat abzubauen.

## 1. Einleitung

Thiazolidindione wie Rosiglitazon (Avandia) oder Pioglitazon (ACTOS) erhöhen die Insulinsensitivität in Leber, Muskulatur und Fettgewebe und reduzieren die Glukoseproduktion in der Leber. Diese hoch spezifische Gruppe von Wirkstoffen aktivieren PPAR $\gamma$ . Dieser Rezeptor induziert über Wirkungskaskaden die Aktivierung von M2 Makrophagen, die an der Funktion von Adipozyten, Insulinsensitivität und Glukosetolleranz beteiligt sind. Troglitazon (rezulin) war das erste Medikament aus dieser Gruppe, wurde jedoch vom Markt genommen als die lebertoxische Wirkung bekannt wurde. Bei Rosiglitazon und Pioglitazon ist diese Nebenwirkung noch nicht aufgetreten, bei einer Behandlung wird jedoch aus Vorsicht verstärkt auf Leberprobleme geachtet (American Diabetes Association, 2012). Rosiglitazon und Pioglitazon reduzieren die ATM-Zahlen und verringern ebenfalls die Genexpression von inflammatorischen Mediatoren im Mausmodell (Xu et al., 2003; Di Gregorio et al., 2005). Die Expression von MCP-1 wird ebenfalls durch Behandlung mit Rosiglitazon und Pioglitazon reduziert (Ferrante, Jr., 2007; Takahashi et al., 2003; Weisberg et al., 2006; Sartipy & Loskutoff, 2003a; Mohanty et al., 2004). Nebenwirkungen sind jedoch ein erhöhtes Risiko für Herzinsuffizienz und Herzinfarkte (American Diabetes Association, 2012). Außerdem kommt es zu einer signifikanten Gewichtszunahme des Patienten und es ist eine erhöhte Ödemneigung zu verzeichnen (Matthaei et al., 2009). Auf Anordnung des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte ruht für Rosiglitazon daher die Verkehrsfähigkeit des Wirkstoffes und auch von der Einnahme von Pioglitazon wird abgeraten.

Zu der Gruppe der Alpha-Glukosidasehemmern gehören Acarbose (Precose®) und Meglitrol (Glyset®). Sie senken den Blutzucker indem sie den Abbau von Stärke im Darm blockieren. Auch einige andere Zucker werden langsamer abgebaut. Das führt zu einem langsameren Anstieg des Blutzuckers nach dem Essen. Zu den Nebenwirkungen der Alpha-Glukosidase Inhibitoren gehören Beschwerden des Magen-Darm-Trakts und Diarrhö (American Diabetes Association, 2012).

Dipeptidyl Peptidase 4 (DPP-4)-Inhibitoren hemmen den Abbau des Hormons *Glukagon-like Peptide-1* (GLP-1), welches somit länger im Körper verbleibt. GLP-1 wird glukoseabhängig sekretiert und erhöht die Insulinsekretion in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas und senkt gleichzeitig die Glukagonsekretion der  $\alpha$ -Zellen. Dies führt zu einem verbessertem Blutzuckerwert, bei geringerem Risiko von Hypoglykämien. Der Glykohämoglobin(HbA1C)-Wert, der ein Maß für den mittleren Blutzuckerwert der letzten acht Wochen ist, wird deshalb durch DPP-4-Inhibitoren verringert (American Diabetes Association, 2012). Der Vorteil von DPP-4 Inhibitoren ist, dass keine Dosisanpassung nötig ist.

Boehringer Ingelheim erforscht und entwickelt ständig weitere antidiabetische Wirkstoffe. In einer Partnerschaft mit Eli Lilly and company wurde ein Natriumglukose-Cotransporter

## 1. Einleitung

(*sodium glucose transport protein-2* = SGLT)-2-Inhibitor (Empagliflozin®) entwickelt, der sich aktuell in Phase III der klinischen Entwicklung befindet. SGLT-2-Hemmer senken den Blutzuckerspiegel unabhängig von Insulin, indem sie die Resorption von Glukose in den Nieren blockieren. Die Glukose wird über den Urin ausgeschieden, wodurch eine Senkung des HbA1c-Wertes und des Gewichts unabhängig von der  $\beta$ -Zellfunktion oder Insulinresistenz resultieren können ([www.boehringer-ingelheim.com](http://www.boehringer-ingelheim.com)).

Als Grundlage für einen neuen Therapieansatz im Feld Diabetes Typ II-Forschung wird seit dem Jahr 2003 der molekulare Zusammenhang zwischen Fettleibigkeit, Insulinresistenz und der chronischen meta-Inflammation untersucht, denn bei der Vielzahl an Insulinsignalübertragungswegen ist kein eindeutiger Angriffspunkt bei der Wirkstoffforschung identifizierbar (Gregor & Hotamisligil, 2011). Die Einwanderung von Immunzellen hingegen spielt eine Schlüsselrolle in der Entwicklung einer adipösen Entzündung (Anderson et al., 2010). Klassisch aktivierte proinflammatorische M1 Makrophagen lösen eine meta-Entzündung durch die Sezernierung von proinflammatorischen Cytokinen wie TNF $\alpha$  im Fettgewebe aus. Die dadurch entstehende Makrophagen-Adipozyten-Interaktion verstärkt sich autogen wie in einem Teufelskreis, da Adipozyten als Reaktion darauf ebenfalls Cytokine, unter anderem TNF $\alpha$ , sezernieren. Mögliche *Targets* in der Wirkstoffforschung sind daher Proteine, die an der Einwanderung von Makrophagen beteiligt sind. Ein Therapieansatz in der metabolischen Wirkstoffforschung ist die Verabreichung eines CCR2-Antagonisten, der die Wechselwirkung des Liganden MCP1 mit dem Rezeptor CCR2 inhibiert. Das biopharmazeutische Unternehmen ChemoCentryx, das auf klinische Studien von Chemokin- und Chemoattractantsystemen spezialisiert ist, hat die Klinische Phase II des CCR2-Antagonisten CCX140-B abgeschlossen. Der orale, spezifische CCR2-Antagonist zeigte in Phase II der klinischen Studie einen signifikanten Rückgang des HbA1c-Werts (ChemoCentryx, 2012).

Für anti-inflammatorische Therapien und ihr Potential in der Behandlung von adipös bedingter Insulinresistenz und Glukoseintoleranz muss die Rolle von Makrophagen in metabolischen Krankheiten besser verstanden werden. Dazu gehören die Signaltransduktionskaskaden, die in der metabolisch induzierten Makrophagenaktivierung beteiligt sind.

# 1. Einleitung

## 1.7 Zielsetzung

Da eine meta-Inflammation sich unter anderem in Makrophagenzahlen im Fettgewebe manifestiert, ist es von großem wissenschaftlichen Interesse, eine Methode zur Quantifizierung der Makrophagen im Hodenfettgewebe und zur Bestimmung ihres inflammatorischen Phänotyps als Werkzeug in der Wirkstoffforschung einzusetzen.

Ziel dieses Projekts ist daher zunächst die Etablierung einer Aufarbeitungsstrategie von murinem Fettgewebe und die anschließende Etablierung einer FACS-Analyse der isolierten Zellen im Hinblick auf gesamt- und proinflammatorische Makrophagenzahlen. Dazu müssen geeignete Leukozytenmarker für diese Analyse bestimmt werden.

Ein Abgleich der in der Abteilung CMDR entwickelten FACS-Methode findet in Zusammenarbeit mit der Technischen Universität Dresden statt. Dazu werden *ob/ob*- und *db/db*-Tiere als genetische Mausmodelle vergleichend mit Wildtypmäusen (*C57BL/6J*) an der TU Dresden und in der Abteilung CMDR analysiert und die Ergebnisse miteinander verglichen.

Ziel ist der Nachweis einer signifikanten Erhöhung der ATM-Zahlen bei der FACS-Analyse von den genetischen und DIO Adipositas-Mausmodellen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren. Dies eröffnet in Substanzbehandlungs-Versuchen der Diabetes Typ II-Forschung die Detektion einer möglichen Reduktion der ATM-Zahlen durch potentiell neue Wirkstoffe. Die FACS-Ergebnisse sollen zusammen mit den ermittelten metabolischen Parametern Aufschluss über die anti-inflammatorische Wirkung und Verbesserung der Insulinsensitivität von getesteten Substanzen geben.

Die erste Anwendung der etablierten Methode im DIO-Modell findet in einer subchronischen Studie eines CCR2-Antagonisten mit *huCCR2*-Mäusen statt.

## 2. Materialien und Methoden

### 2. Materialien und Methoden

#### 2.1 Materialien

##### 2.1.1 Verbrauchsmaterial

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller #Produktnr.</b>
Handschuhe Nitril	Kimberly-Clark #90627
Mikroreaktionsgefäße Safe Lock Tubes (0,5, 1,5, 2,0 mL)	eppendorf #0030121.023 eppendorf #0030120.086 eppendorf #0030120.094
Pipettenspitzen (20, 200, 1000, 5000 µl)	eppendorf #022491521 eppendorf #022491539 eppendorf #022491555 eppendorf #022492080
Matrixpipettenspitzen	Thermo Scientific #7281
Einwegpipetten	costar
Reagenzienreservoir	VWR #613-0430
Zentrifugenröhrchen (15, 50 mL)	greiner #188271, 227261
5 mL-Tubes	BD Falcon #352058
96-well Platte mit tiefem Rundboden	BD Falcon #353918
Petri Dish	BD Falcon #351007
Einwegzellzählkammern	invitrogen #10283
Blutzuckermessstäbchen	Gluko Smart® Swing #21
Zellstrayner	Fisherbrand #223635448

##### 2.1.2 Verwendete Geräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Produktname</b>	<b>Hersteller</b>
Analysenwaage	AC211S	Sartorius
Waage	A30	Mettler
Brutschrank	BBD 6220	Heraeus
Kippschüttler	PTR-30	Grant-bio
Kühlzentrifuge	Heraeus Megafuge 40R	Thermo Scientific
Pipetten	2, 10, 20, 100, 200, 1000, 5000 µl	eppendorf

## 2. Materialien und Methoden

Matrixpipetten	1250 Matrix Impact <sup>2</sup>	Thermo Scientific
Pipettierhilfe	accu-jet	BRAND
Sicherheitswerkbänke	Hera Safe	Thermo Scientific
Tischzentrifuge	5417C	eppendorf
Vortexer	VF2	Janke&Kunkel
Zellzähler	Countess	invitrogen
Fluorescence activated cell sorter	MACS Quant	Miltenyi Biotech
Blutzuckermessgerät	AGM-4000	Gluko Smart® Swing
MSD-Messgerät	Cobas Integra 400 plus	Roche

### 2.1.3 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller #Produktnr.
Bacillol® plus	BODE
RPMI 1640 mit Glutamin	Lonza #4464
Fetal Bovine Serum	Biological Industries #04-001AUS-1A
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Lonza #6716
Collagenase	Sigma #C0130
Trypanblau	invitrogen #T10282
Running Buffer	MACS Buffer #130-092-747
Storage Solution	MACS Buffer #130-092-748
Washing Solution	MACS Buffer #130-092-749
Bleach Solution	MACS Buffer #130-093-663
Ammoniumchlorid	Sigma A9434-500G
EDTA	Sigma #E5134-500G
Kaliumhydrogencarbonat	
Natriumchlorid	MERCK #1.06404.1000
Kaliumchlorid	MERCK #1.04936.0500
Dinatriumhydrogenphosphat	MERCK #1.06580.1000
Magnesiumsulfat	MERCK #1.05886.0500

## 2. Materialien und Methoden

Calciumchlorid	Sigma #C3306-250G
Kaliumdihydrogenhydrogenphosphat	MERCK #1.04873.1000
Hepes	Fluka #54466
Natriumhydrogencarbonat	MERCK #1.06329.1000
Glukose	Sigma-Aldrich #15,896-8
Pioglitazon	Takeda
CCR2-Antagonist	intern hergestellt

### Hämolysepuffer

150 mM NH<sub>4</sub>Cl  
250 µM EDTA  
10 mM KHCO<sub>3</sub>

### KRBH Puffer:

#### **Lösung 1 (4-fach)**

137 mM NaCl  
5,36 mM KCl  
0,34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,81 mM MgSO<sub>4</sub>  
1,26 mM CaCl<sub>2</sub>  
0,44 mM KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

#### **Lösung 2 (4-fach)**

10 mM Hepes  
4,17 mM NaHCO<sub>3</sub>

Jeweils 1 Teil von Lösung 1 und 2 werden mit 2 Teilen doppeldestilliertem Wasser gemischt und mit NaOH bei einer Lösungstemperatur von 4 °C auf einen pH von 7,3 eingestellt.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1.4 Antikörper

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller #Produktnr.</b>
PE Rat Anti-Mouse CD45	BD Pharmingen #553081
PE Rat IgG2b, κ Isotype Control	BD Pharmingen #553989
APC Rat Anti-Mouse CD11b	BD Pharmingen #553312
APC Rat IgG2b, κ Isotype Control	BD Pharmingen #553991
PE-Cy™7 Hamster Anti-Mouse CD11c	BD Pharmingen #558079
PE-Cy™7 Hamster IgG1, λ1 Isotype Control	BD Pharmingen #557798
PE Hamster Anti-Mouse CD11c	BD Pharmingen #553802
PE Hamster IgG1, λ1 Isotype Control	BD Pharmingen #553954
FITC Hamster Anti-Mouse CD11c	BD Pharmingen #553801
FITC Hamster IgG1, λ1 Isotype Control	BD Pharmingen #553953
Alexa Fluor® 700 Rat Anti-Mouse CD45	BD Pharmingen #560510
Alexa Fluor® 700 Rat IgG2b, κ Isotype Control	BD Pharmingen #557964
Rat Anti-Mouse F4/80 Antigen:FITC	AbDserotec #MCA497FB
Rat IgG2b Negative Control:FITC	abDserotec #MCA1125FT
FC Block Rat Anti-Mouse CD16/CD32	BD Pharmingen #553141

### 2.1.5 Tierfuttermischungen

Haltungsfutter	Kliba Nafag #3438
45 % kcal Hochfettdiät	Research diets #D12451
10 % kcal Kontrolldiät	Research diets #D12450B

Die entsprechenden Datenblätter der Futtermischungen sind im Anhang (Kap. 11.1) zu finden.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Gewebepräparation

Den Mäusen wird bei der Sektion nach Eutanasierung epididymales Fettgewebe entnommen.

Für FACS-Analysen wird das epididymale Gewebe in PBS (mit 0,5 % BSA) auf Eis gelagert und muss sofort weiterverarbeitet werden.

#### 2.2.2 Zellisolation

Das Gewebe wird mit einer Schere fein zerschnitten und mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Probe wird mit PBS (0,5 % BSA) auf ein Volumen von 10 mL aufgefüllt und dann bei 500 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Es bilden sich drei Phasen. Im Pellet befinden sich Erythrozyten und freie Leukozyten aus dem Gefäßsystem. Es folgt die wässrige Interphase und oben auf schwimmt sich das Fettgewebe, welches mit einer Pipette in Reaktionsgefäße überführt wird. Pro Gramm Fettgewebe wird 1 mL Verdaumedium (RPMI 1640 mit 2 mg/mL Collagenase) eingesetzt, um die Zellverbände aufzulösen. Der Verdau inkubiert für 1 h bei 37 °C auf einem Schüttler im Wärmeschrank. Danach wird die Reaktion mit 1 mL BSA gestoppt und die Emulsion über ein 70 µm Kunststoffsieb passiert. Das Sieb wird mit 2 mL Medium (RPMI 1640) gespült und der Durchfluss ebenfalls mit Medium auf 10 mL aufgefüllt. Anschließend wird für 5 min bei 500 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 0,5 mL PBS resuspendiert. Es werden 5 mL Hämolysepuffer (150 mM NH<sub>4</sub>Cl, 250 µM EDTA, 10 mM KHCO<sub>3</sub>) zugegeben und die Lyse 10 min auf Eis inkubiert. Es folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 500 g für 5 min bei 4 °C. Das Pellet wird in einem adäquaten Volumen Krebs-Ringer-Puffer mit Hapes (KRBH) mit 10 % BSA resuspendiert.

#### 2.2.3 Zellzählung

Die Zellzählung erfolgt mit dem Countess-Counter der Firma Invitrogen und dient in der Methode zur Überprüfung der Aufarbeitungsqualität. Da dieses Gerät auf der Bildanalyse von Trypanblaufärbungen basiert, werden die Proben 1:2 mit Trypanblau verdünnt und 10 µL der Verdünnung in die Einwegzellzählkammern pipettiert.

Das Gerät verwendet einen Bildanalysealgorithmus zur Berechnung ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)) und gibt die Gesamtzellzahl sowie die Lebend- und Totzellzahl und die Vitalität der Ausgangszellsuspension aus. Auch die Zellgröße der Proben kann analysiert werden und

## 2. Materialien und Methoden

liegt bei der Analyse der stromal vaskulären Fraktion (SVF) der Fettgewebeproben zwischen 7-12 µm.

### 2.2.4 Immunfluoreszenzfärbung

Für die Antikörperfärbungen werden die Antikörper in KRBH mit 1 % BSA verdünnt. 100 µl der Zellsuspension werden mit 10 µL des 1:100 vorverdünnten Fc-Rezeptorblocks vorgelegt und mit je 20 µL Antikörperlösung für 45 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert.

Die Färbungen mit den Zellmarkern werden in Doppelbestimmung gefärbt und vermessen. Außerdem wird in Einfachbestimmung von jeder Probe eine entsprechende Isotypkontrolle für jedes *Panel* vermessen. Dabei werden die Isotypkontrollen in denselben Verdünnungen eingesetzt wie auch die entsprechenden Antikörper.

**Tabelle 2: Verdünnungen verwendeter Antikörper**

Antikörperpanel	PE	FITC	APC	PE-Cy7	Alexa Fluor700
<b>4er Tandem</b>	Rat Anti-Mouse CD45 1:20	Rat Anti-Mouse F4/80 1:2	Rat Anti-Mouse CD11b 1:20	Hamster Anti-Mouse CD11c 1:20	
<b>3er Makrophagen</b>	Rat Anti-Mouse CD45 1:20	Rat Anti-Mouse F4/80 1:2	Rat Anti-Mouse CD11b 1:20		
<b>3er pro-inflammatorische Makrophagen</b>	Rat Anti-Mouse CD45 1:20	Hamster Anti-Mouse CD11c 1:20	Rat Anti-Mouse CD11b 1:20		
<b>3er Dresden</b>	Hamster Anti-Mouse CD11c 1:20	Rat Anti-Mouse F4/80 1:2	Rat Anti-Mouse CD11b 1:20		
<b>4er Alexa 700</b>	Hamster Anti-Mouse CD11c 1:20	Rat Anti-Mouse F4/80 1:2	Rat Anti-Mouse CD11b 1:20		Rat Anti-Mouse CD45 1:20

Die gefärbten Zellen werden zweimal mit 150 µL KRBH (1 % BSA) gewaschen. Dazu werden die Zellen bei 500 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert und der Überstand ausgeschlagen. Für die Messung werden die Zellpellets nach der letzten Zentrifugation ebenfalls in KRBH (1 % BSA) resuspendiert. Die Messung erfolgt sofort oder nach einer Lagerung bei 4 °C im Dunkeln.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.2.5 Fluorescence activated cell sorter (FACS) Analyse

Eine Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung ist eine Form von Durchflusszytometrie. Über die Erfassung der Lichtstreuung können die Zellgröße (Forward scatter FSC), cytoplasmische Granularität (Side scatter SSC) und Zellzahl analysiert werden. Zusätzlich zu diesen intrinsischen, strukturellen Parametern können auch über Zellmarker extrinsische strukturelle und funktionelle Parameter wie Phänotypen bestimmt werden. Auch die Analyse von Nukleinsäuren oder Zellorganellen ist möglich. In diesem Projekt wurden Zellpopulationen innerhalb der so genannten Stromalen Vaskulären Fraktion (SVF) aus Fettgewebeproben bestimmt. Die konjugierten Antikörper binden dabei an die Zelloberflächenmoleküle. Eine Bestrahlung mit hoch energetischem Licht regt ein Fluorochrom an. Dieses emittiert niedriger energetisches Licht, welches detektiert werden kann.

Die Analyse der fluoreszenzmarkierten Zellen erfolgt mit dem Fluoreszenz aktiviertem Zellsortiergerät MACSQuant® Analyser der Firma Miltenyi Biotec. Es enthält drei Laser: Einen violetten Diodenlaser mit einer Leistung von 40 mW und einer Wellenlänge von 405 nm, einen blauen Argonlaser mit 25 mW und einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einen roten Diodenlaser mit 20 mW und einer Wellenlänge von 635 nm. Die Laser geben monochromatisches, kohärentes, unidirektionales und sehr helles Licht mit hoher Intensität aus. Das emittierte Licht wird mit *Photomultiplier tubes* (PMTs) detektiert. Sie messen die Anzahl der Photonen und wandeln das optische Signal in ein proportionales elektronisches Signal in Form von Spannung um. Das Instrument ist in der Lage fluoreszenzmarkierte Zellen im Hinblick auf bis zu neun oder zehn optische Parameter (sieben oder acht Fluoreszenzkanäle und zwei Lichtstreuungssignale) zu analysieren.

Innerhalb der MACSQuant® Analyse Software ist es möglich, sich die Messergebnisse in drei unterschiedlichen optischen Diagrammen anzeigen zu lassen: Mit dem Histogramm kann jeweils nur ein optischer Parameter angezeigt werden, während es mit dem *Dot Plot* oder *Density Plot* möglich ist, zwei optische Parameter zur selben Zeit anzuzeigen. Bei dem Histogramm wird die gemessene Zellzahl auf der y-Achse gegen die Fluoreszenzintensität auf der x-Achse aufgetragen. Bei dem *Dot Plot* wird für jedes Event der erfasste Wert von zwei Parametern als Punkt aufgetragen, während beim *Density Plot* die *Eventdichte* der beiden Parametern in verschiedenen Farben ausgegeben wird, wobei rot die höchste und blau die niedrigste Dichte darstellt.

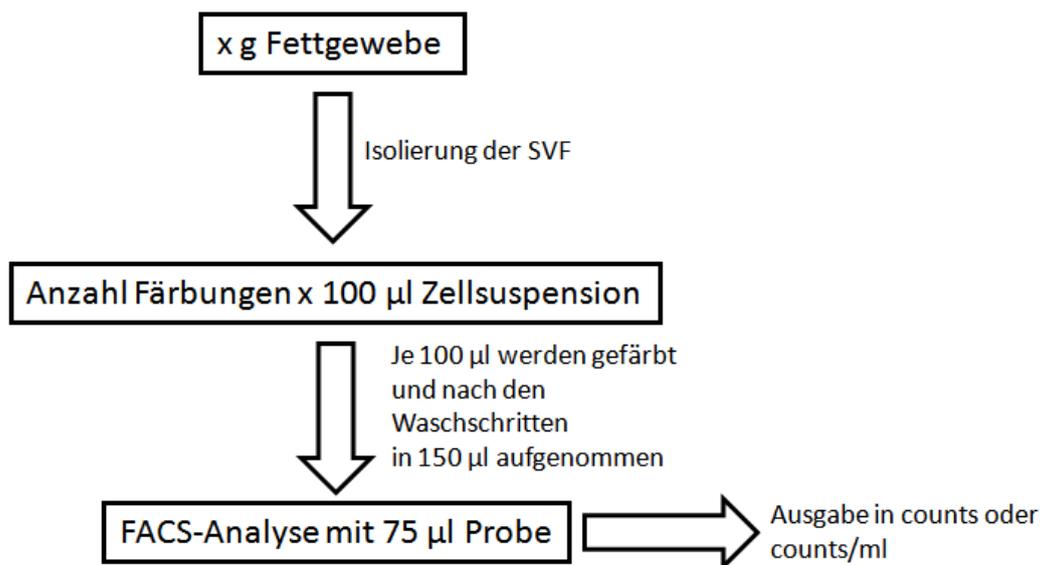
Innerhalb der Diagramme werden über *Gates* Zellpopulationen definiert und weitere Diagramme auf diese bezogen. Dadurch ergibt sich eine *Gatinghierarchie*. In den Diagrammen der oberen *Gatinghierarchie* ist es durch Farbgebung möglich, auf sich in der Hierarchie darunterliegende *Gates* zurückzugaten. Dieses *Backgating* ermöglicht Rückschlüsse auf Verteilungen von Subpopulationen innerhalb einer Zellpopulation.

## 2. Materialien und Methoden

Das verwendete Gerät ist mit einem MACS MiniSampler ausgestattet und ist daher in der Lage Proben im 96-well Format vollautomatisch zu vermessen. Die Proben werden vor der Aufnahme der Probe durch auf- und absaugen der Zellsuspension alle gleichmäßig durchmischt. Ein definiertes Volumen der Proben wird vermessen, wodurch das Gerät in der Lage ist positive Zellen pro Milliliter als Konzentration auszugeben.

### 2.2.6 Auswertung

Über die Auftragung von *Side scatter* und *Forward scatter* (SSC/FSC) werden die Zellen ihrer Größe und Granularität nach aufgetragen. Im *Dot Blot* ist eine distinkte Zellpopulation erkennbar, die als P1 definiert wird. Diese Zellpopulation schließt Zelldebris aus und wird als SVF definiert. Alle *Gating*strategien bauen auf diesem ersten P1 *Gate* auf.



#### Abbildung 5: Auswertungsschema

Aus dem entnommenen x g Fettgewebe wird eine SVF isoliert und das Zellpellet in dem benötigten Volumen aufgenommen. Dieses errechnet sich aus der Anzahl der Färbungen multipliziert mit 100 µL. Je Färbung werden dann 100 µL Zellsuspension eingesetzt. Nach zwei Waschsritten werden die gefärbten Zellen in 150 µL Puffer für die Messung aufgenommen. Es werden je 75 µL Probe vom Gerät vermessen und für jedes *Gate* können die gemessene Zellzahl sowie die die Zellzahl pro mL Zellsuspension ausgewertet werden.

Die Ausgabe des FACS-Geräts in Zellen/mL wird auf eine Konzentration von ATMs im Hodenfettgewebe umgerechnet (Formel 3.1) und Zellen werden zur Berechnung des Makrophagenanteils verwendet (Formel 3.2).

## 2. Materialien und Methoden

### Berechnung einer Konzentration von ATMs im Fettgewebe:

$$\frac{\text{positive Zellen}}{\text{mg}} = \frac{\text{positive Zellen Gate}}{\text{mL}} * \text{Verdünnungsfaktor} * \frac{\text{Anzahl Färbungen} * 0.1 \text{ mL}}{\text{Fettgewicht mg}} \quad (3.1)$$

positive Zellen Gate :=	positiv gezählte Zellen innerhalb eines Gates
Verdünnungsfaktor :=	Verdünnung der 100 µL eingesetzten Zellsuspension um den Faktor 1:1,5 auf 150 µL
Anzahl der Färbungen :=	Summe aller <i>Panels</i> und Isotypkontrollen
Fettgewicht :=	Gewicht des eingesetzten Fettgewebes

### Berechnung des Makrophagenanteils in der SVF:

$$\text{positiver Anteil in SVF} = \frac{\text{positive Zellen Gate}}{\text{Zellen SVF}} * 100 \% \quad (3.2)$$

positiver Anteil in SVF :=	positive Zellen bezogen auf alle Zellen der SVF
positive Zellen Gate :=	Zellen oder Zellen/mL aus dem Gate der zu analysierenden Zellfraktion
Zellen SVF :=	Zellen in P1

#### 2.2.7 Insulintoleranztest (ITT)

Der Insulintoleranztest (ITT) wird auch Insulin-Hypoglykämie-Test genannt und wird zum Nachweis einer Insulinresistenz verwendet.

Nach einer Injektion von Insulin kommt es beim gesunden Organismus zu einer deutlichen Absenkung der Blutzuckerkonzentration. Liegt eine Insulinresistenz vor, ist die Absenkung der Blutglukose als Antwort auf eine Insulingabe vermindert.

Zwei Stunden vor Versuchsbeginn werden die Tiere nüchtern gesetzt. Nach diesen zwei Stunden, unmittelbar vor der Insulinapplikation, wird der Nüchternwert genommen. Die Insulinlösung wird den Tieren i.p. appliziert (z.B. 0,5 I.E./kg). Zu den Zeitpunkten 10, 20, 30, 60 und 120 min nach Insulingabe wird der Blutzuckerwert der Tiere mit Blutzuckermessstreifen und –messgerät der Firma Gluko Smart® Swing gemessen. Dazu wird Kapillarblut aus der Schwanzspitze verwendet.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.2.8 Oraler Glukose-Toleranztest (oGTT)

Der orale Glukosetoleranz-Test (oGTT) heißt auch Zuckerbelastungstest und wird zum Nachweis einer gestörten Glukoseverstoffwechselung und damit der Diagnostik der *Diabetes mellitus* verwendet.

Nach einer oralen Applikation einer definierten Menge an Glukose kommt es zu einem Anstieg der Blutglukosekonzentration. Dadurch wird die Sekretion von Insulin im Körper stimuliert und der Blutzuckerwert fällt bei gesunden Organismen wieder. Bei Diabetikern ist die Insulin-Sekretion vermindert und der Abfall der Blutglukosekonzentration verläuft verzögert. Vor allem die 60- und 120-min-Blutzuckerwerte sind im Vergleich zu gesunden Organismen erhöht.

Zwölf Stunden vor Versuchsbeginn werden die Tiere nüchtern gesetzt. Danach wird vor der Glukoseapplikation der Nüchternwert genommen. Die Glukoselösung wird den Tieren p.o. appliziert (2 g/kg). Dann werden nach 15, 30, 60, 120 und 180 min die Blutzuckerwerte der Tiere gemessen. Dazu wird Kapillarblut aus der Schwanzspitze verwendet.

### 2.2.9 Cytokinassay

Mittels *Meso Scale Discovery*® (MSD) Cytokinassays können Cytokine im 96-well Multi-array Format gemessen werden. Es handelt sich um ein Sandwichimmunoassayformat, bei dem die Welloberfläche mit einem Fängerantikörper beschichtet ist. Die Probe wird mit einer Lösung, die den elektrochemilumineszenz markierten Detektionsantikörper enthält, gemischt. In diesem Gemisch bindet der Fängerantikörper das Cytokin in der Probe, an das wiederum der Detektionsantikörper bindet. Über eine angelegte Spannung emittieren die auf der Elektrodenoberfläche gebundenen *Labels* Licht. Die Intensität dieses Lichtes erlaubt eine quantitative Messung des Cytokins in der Probe.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.2.10 Tiere

Alle Tierversuche wurden unter den Richtlinien des Regierungspräsidiums Tübingen durchgeführt.

Die Mäuse wurden in einer pathogenfreien Umgebung unter einem Standard-Lichtzyklus (12h Licht/Dunkel) mit freiem Zugang zu Wasser und Futter gehalten.

Die Tiere wurden bei Janvier bestellt.

In diesem Projekt wurde eine Hochfettdiät zur Induzierung der Insulinresistenz verwendet. Dazu wurden C57BL/6J-Mäusen die Diät D12451 (20 % kcal Protein, 35 % kcal Kohlenhydrate, 45 % kcal Fett) und die passende Kontrolldiät D12450B (20 % kcal Protein, 70 % kcal Kohlenhydrate, 10 % kcal Fett) von Research Diets mit gleich viel kcal insgesamt verfüttert.

### 2.2.11 Statistik

Die Statistikanalyse wurde mit der Prism Version 5.0 Software für Windows der Firma Graphpad durchgeführt. Für den Vergleich von zwei Gruppen wurde dazu der *t*-Test angewendet. Für eine Gruppenanalyse mit mehr als zwei Gruppen, wurde die Analyse mit ANOVA und Dunnett-Test durchgeführt. P-Werte  $\leq 0,05$  wurden als signifikant angesehen. Die Signifikanzen wurden wie folgt gekennzeichnet: \* entspricht  $p \leq 0,05$ , \*\* entspricht  $p \leq 0,01$  und \*\*\* entspricht  $p \leq 0,001$ .

## 3. Ergebnisse

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Etablierung einer Aufarbeitungsstrategie von murinem, epididymalem Fettgewebe für FACS-Analyse von ATMs

Das in dieser Arbeit erarbeitete Aufarbeitungsprotokoll für die Zellisolierung aus murinem Fettgewebe (*adipose tissue* = AT) isoliert aus der Gesamtheit der Gewebszellen die stromal vaskuläre Fraktion (SVF). Sie besteht aus Makrophagen, Fibroblasten, Präadipozyten, Perizyten, Endothelzellen, Mastzellen und gering differenzierten mesenchymalen Zellen. Adipozyten werden aufgrund ihres Zelldurchmessers über ein Kunststoffsieb mit 70 µm Porengröße abgetrennt, während Erythrozyten durch eine Hämolyse entfernt werden. Nur die SVF wird in der nachfolgenden FACS-Analyse im Hinblick auf die Makrophagenanteile untersucht. Die SVF entspricht nur der sich im Fettgewebe befindlichen Zellen, so dass mit dem FACS-Gerät keine Analyse des gesamten Fettgewebes stattfindet.

Jedem analysierten Versuchstier wird auf beiden Seiten das epididymale Fettgewebe entnommen. Dabei ist es wichtig alles des tot endenden Gewebes zu entfernen und dabei sowohl die Hoden als auch die Samenleiter und Nebenhoden zu entfernen. Das Gewicht beider Hodenfettgewebslappen wird für die Berechnung von Zellkonzentrationen pro mg gewogen.

Da Gewebsmakrophagen mit dieser Methode analysiert werden sollen, wird vor dem Collagenaseverdau nach der Zerkleinerung des Gewebes ein Zentrifugationsschritt zur Abtrennung der freien Leukozyten im Blutgefäßsystem verwendet.

In Anlehnung an das in Dresden verwendete Protokoll (Kap. 11.2) wird der Verdau mit einer Konzentration von 2 mg/mL Collagenase auf einem Schüttler im Wärmeschrank bei 37 °C durchgeführt.

Vor der Inkubation der Antikörperfärbung, die über 45 min bei 4 °C erfolgt, werden die Zellen mit einem Fc-Rezeptorblocker behandelt und nach der Färbung zweimal gewaschen, um unspezifische Bindungen zu reduzieren.

Mittels des Countess-*Counters* kann optional bei jeder Aufarbeitung die Vitalität der Zellen überprüft werden, was bei den Versuchen als Qualitätskontrolle der Aufarbeitung fungieren kann.

Die in diesem Projekt entwickelte Strategie liefert in den FACS-Analysen reproduzierbare und zuverlässige Ergebnisse.

## 3. Ergebnisse

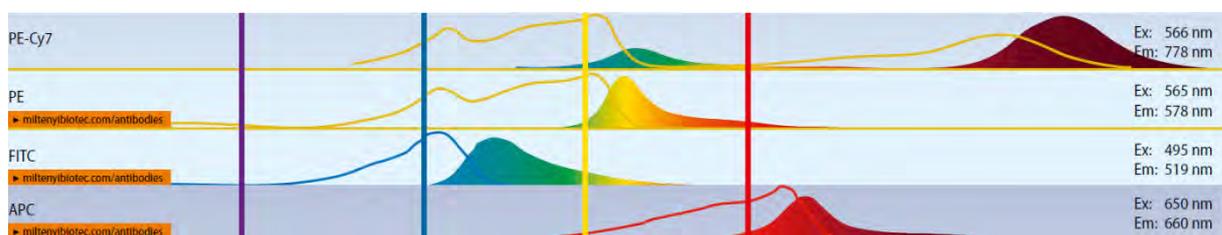
### 3.2 Etablierung einer FACS-Methode zur quantitativen Analyse von Leukozyten

Für die Quantifizierung der Makrophagen und zur Bestimmung ihres proinflammatorischen Phänotyps werden die Zellen mit konjugierten Antikörpern markiert, die über für Zellpopulationen spezifische Oberflächenproteine erkennen. Da die verwendeten Antikörper mit Fluorophoren gekoppelt sind, können diese mittels Lasertechnik detektiert werden. Eine Zusammenstellung von mehreren konjugierten Antikörpern mit verschiedenen Fluorophoren wird *Panel* genannt. Antikörper sind mit verschiedenen aber nicht allen Fluorophoren, die auch *Labels* genannt werden, im Handel erhältlich. Bei einer *Panel*-zusammenstellung mit Antikörpern, die alle an ein anderes Oberflächenmolekül spezifisch binden, ist wichtig, dass sich die Emissionsspektren der verschiedenen Antikörper-*Labels* nicht überschneiden.

#### 3.2.1 Tandempanel (4er Panel)

Für die ersten Versuche wurde ein Antikörperpanel aus dem Leukozytenmarker CD45 mit Phycoerythrin(PE)-*Label*, den beiden Makrophagenmarkern F4/80 und CD11b mit (Fluoreszein)FITC- und (Allophycocyanin)APC-*Label* sowie dem proinflammatorischen Makrophagenmarker CD11c mit dem Tandemkonjugat/*label* PE-Cy7 verwendet.

Wie in Abb. 6 zu erkennen ist, überlagern sich die Emissionsspektrumsmaxima der vier verschiedenen *Label* nicht. Trotzdem war keine Kompensation des Tandempanels möglich, da das Signal im Fluoreszenzmaximum des Tandemlabels PE-Cy7 sowohl für die Antikörperfärbung als auch die entsprechende Isotypkontrolle für dieses *Panel* das gleiche Signal zeigte. Es konnte somit das negative- nicht von einem positiven Signal unterschieden werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 6: Fluoreszenzspektren des Tandempanels (4er Panel)**  
(Miltenyi Biotec GmbH 2012)

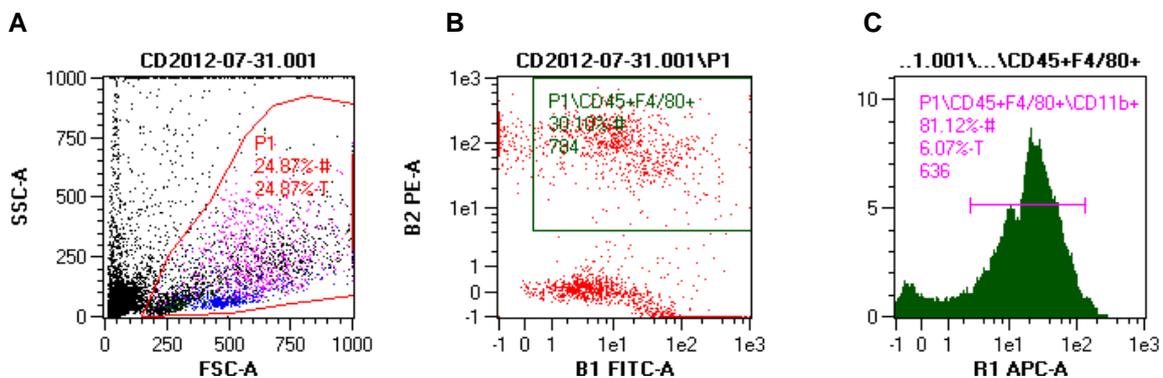
### 3. Ergebnisse

#### 3.2.2 Analysen mit 3-fach Färbungen

Da eine Kompensation zwischen PE, FITC und APC spezifisch positive Signale in den Kanälen der Fluoreszenzemissionen lieferte, wurde in den folgenden Versuchen mit drei verschiedenen 3-fach Färbungen gearbeitet. Mit CD45-PE, F4/80-FITC und CD11b-APC (Abb. 7) können die Makrophagen in der SVF analysiert werden (*Makrophagenpanel*). Das Panel mit CD45-PE, CD11b-APC und CD11c-FITC (*proinflammatorisches Makrophagenpanel*) (Abb. 9) analysiert proinflammatorische Makrophagen, während das Panel mit F4/80-FITC, CD11b-APC und CD11c-PE (*Panel ohne Anti-CD45-Antikörper*) (Abb. 11) sowohl F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Makrophagen und F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> proinflammatorische Makrophagen analysieren kann. Das *Panel ohne Anti-CD45-Antikörper* ist zwar, anders als die beiden anderen 3er *Panels*, in der Lage sowohl Makrophagen als auch proinflammatorische Makrophagen zu quantifizieren, da jedoch die Analyse nicht über das CD45<sup>+</sup> Leukozytensignal erfolgt, sind größere Messunsicherheiten zu erwarten.

Gezeigt sind in Abb. 7-12 exemplarisch die *Plots* der Analyse einer Probe aus einer 10 Wochen alten C57BL/6J-Maus auf Haltungsfutter am FACS-Gerät mit den entsprechenden Isotypkontrollen derselben Probe.

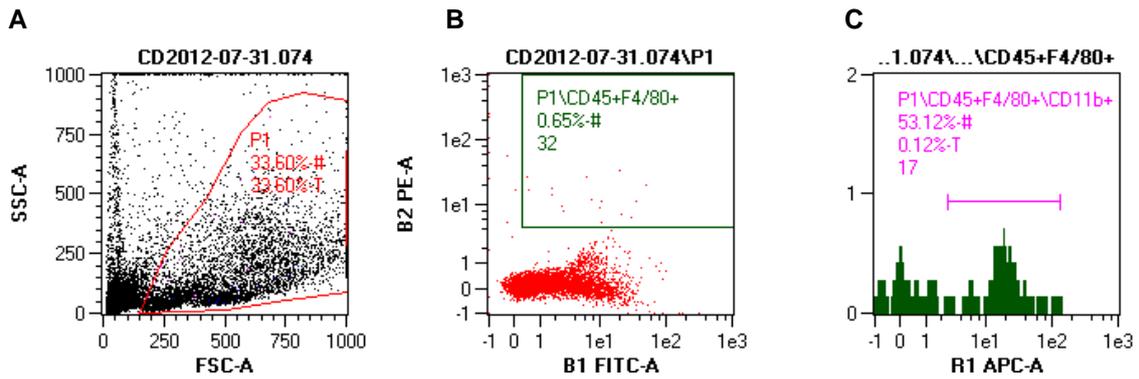
Die Gatingstruktur des *Makrophagenpanels* zeigt die Analyse der CD45<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Makrophagen (Abb. 7) mit entsprechender Istoypkontrolle (Abb. 8).



**Abbildung 7: Gates des Makrophagenpanels mit CD45-PE, F4/80-FITC und CD11b-APC**

**A** Im *Dot Blot* von SSC gegen FSC wird ein *Gate* P1 (rot) definiert, welches die SVF abbildet. **B** PE- und FITC-Signal dieses P1 *Gates* werden im *Dot Blot* weiter analysiert. Eine distinkte Population die für beide *Label* positiv ist, wird als CD45<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> (grün) *gategatet*. **C** Diese doppelpositiven Zellen werden im Histogramm gegen ihr APC-Signal aufgetragen und das positive Signal (pink) bildet die trippelpositiven Makrophagen der SVF ab.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 8: Isotypkontrolle des Makrophagenpanels mit Rat IgG2b  $\kappa$ -PE, Rat IgG2b-FITC und Rat IgG2b  $\kappa$ -APC**

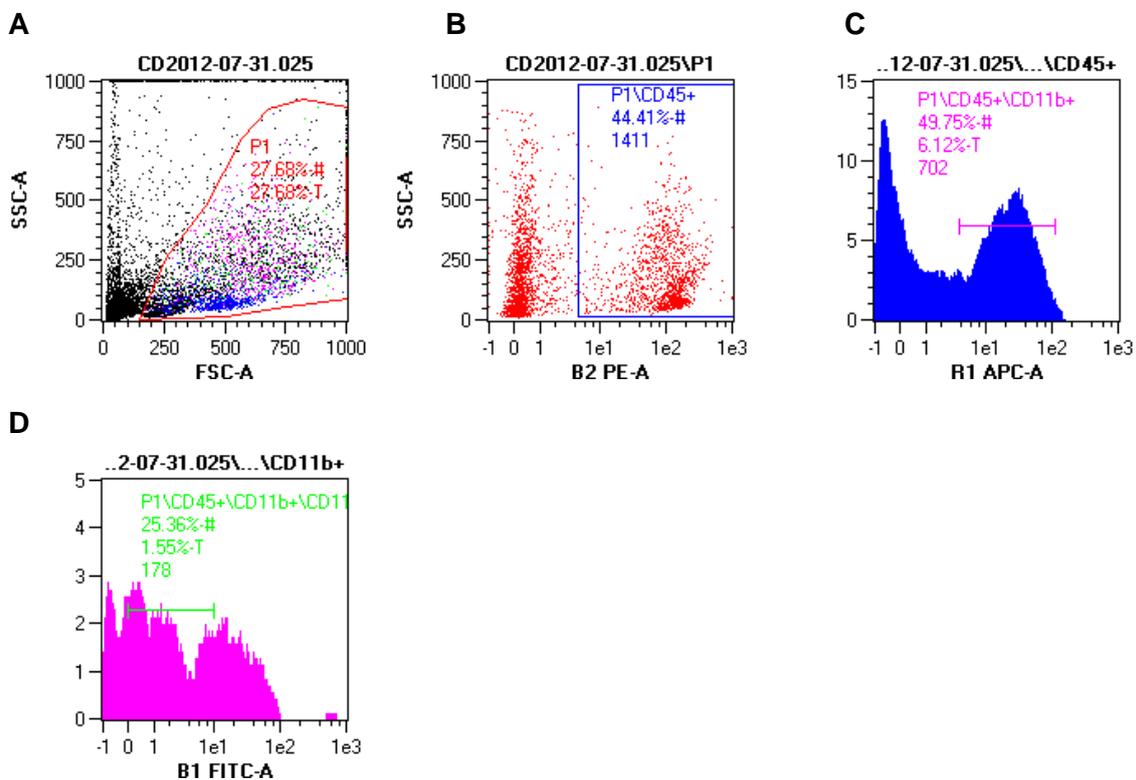
**A** Im *Dot Blot* von SSC gegen FSC wird ein *Gate* P1 (rot) definiert, welches die SVF abbildet. **B** PE- und FITC-Signal dieses P1 *Gates* werden im *Dot Blot* weiter analysiert. Eine distinkte Population, die für beide *Label* positiv ist wird als CD45<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> (grün) *gegatet*. **C** Diese doppelpositiven Zellen werden im Histogramm gegen ihr APC-Signal aufgetragen und das positive Signal (pink) bildet die trippelpositiven Makrophagen der SVF ab.

Es wird eine spezifische CD45<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> Zellpopulation definiert (Abb. 7B). Die doppelpositiven Zellen werden im APC-Kanal auf das spezifische CD11b positive Signal untersucht (Abb. 7C). Diese trippelpositiven Zellen sind Makrophagen. Die entsprechende Isotypkontrolle zeigt sowohl für den PE/FITC-Dot Blot (Abb. 8B) wie auch für das APC Histogramm (Abb. 8C) wie erwartet nur ein sehr niedriges unspezifisches Signal.

### 3. Ergebnisse

In Abb. 9 ist die Gatingstruktur für die Analyse der CD45<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> proinflammatorischen Makrophagen durch das proinflammatorische Makrophagenpanel dargestellt. Die entsprechende Isotypkontrolle ist in Abb. 10 abgebildet.

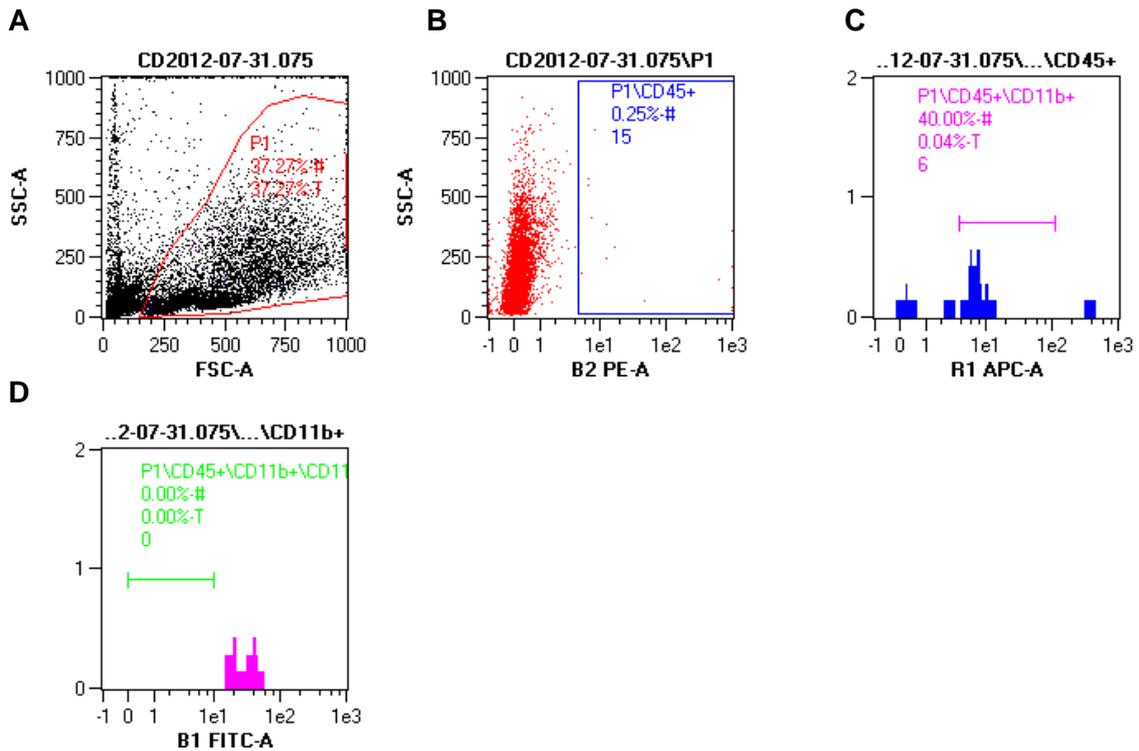
Das grüne Gate für die CD45<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> Zellen in dieser Gatingstruktur (Abb. 9) erfasst ausschließlich das spezifische FITC-Signal. Dieses wurde unter zur Hilfenahme von Isotypkontrollen und *Fluorescence minus one* (FMO) (Daten nicht gezeigt) definiert und schließt die wenigen hoch positiven unspezifischen Zellen, die über Isotypkontrolle und FMOs als solche erkannt werden konnten, rechts des Gates aus. Das starke Hintergrundsignal ist durch die Autofluoreszenz der Makrophagen bedingt.



**Abbildung 9: Gates des proinflammatorischen Makrophagenpanels mit CD45-PE, CD11b-APC und CD11c-FITC**

**A** Im *Dot Blot* von SSC gegen FSC wird ein Gate P1 (rot) definiert, welches die SVF abbildet. **B** Das PE-Signal dieses P1 Gates wird im *Dot Blot* weiter analysiert. Die CD45 positiven Zellen (blau) werden *gategat* und **C** im Histogramm gegen ihr APC-Signal abgebildet. Das positive Signal (pink) wird dann noch **D** im Hinblick auf das FITC-Signal *gategat*. Die trippelpositiven proinflammatorischen Makrophagen der SVF (grün) können so analysiert werden.

### 3. Ergebnisse



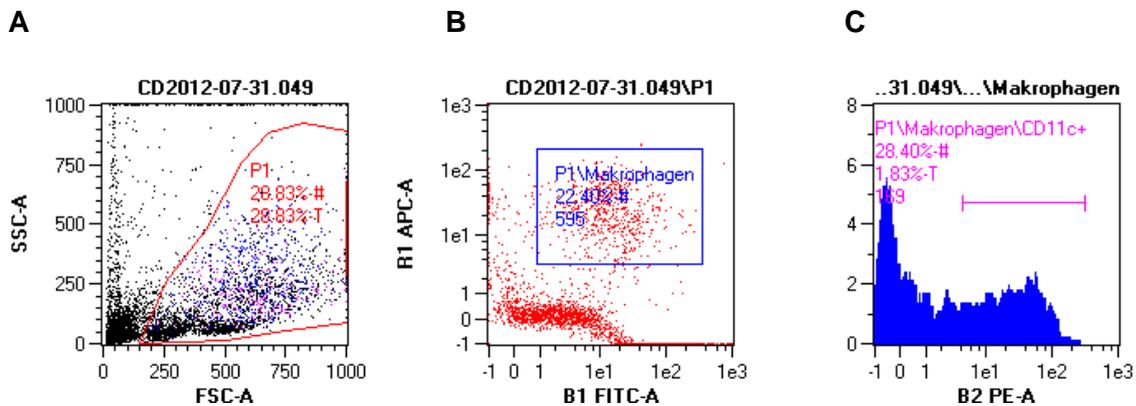
**Abbildung 10: Isotypkontrolle des proinflammatorischen Makrophagenpanels mit Rat IgG2b  $\kappa$ -PE, Rat IgG2b  $\kappa$ -APC und Hamster IgG1  $\lambda$ 1-FITC**

**A** Im *Dot Blot* von SSC gegen FSC wird ein *Gate* P1 (rot) definiert, welches die SVF abbildet. **B** Das PE-Signal dieses P1 *Gates* wird im *Dot Blot* weiter analysiert. Die CD45 positiven Zellen (blau) werden *gated* und **C** im Histogramm gegen ihr APC-Signal abgebildet. Das positive Signal (pink) wird dann noch **D** im Hinblick auf das FITC-Signal *gated*. Die die trippelpositiven proinflammatorischen Makrophagen der SVF (grün) können so analysiert werden.

Das PE Signal des anti-CD45-Antikörpers zeigt zwei klar voneinander abgrenzbare Punktwolken (Abb. 9B). Im APC-Histogramm sind ebenfalls zwei klar umrissene *Peaks* zu erkennen (Abb. 9C). In beiden Kanälen sind in der Isotypkontrolle keine unspezifischen Bindungen vorhanden (Abb. 10B und 10C). Die doppelpositiven Zellen zeigen jedoch für die Fluoreszenzemission im FITC-Kanal ein hohes Hintergrundrauschen (Abb. 9D). Über das gesetzte Gate können jedoch alle unspezifischen Signale ausgeschlossen werden (Abb. 10D).

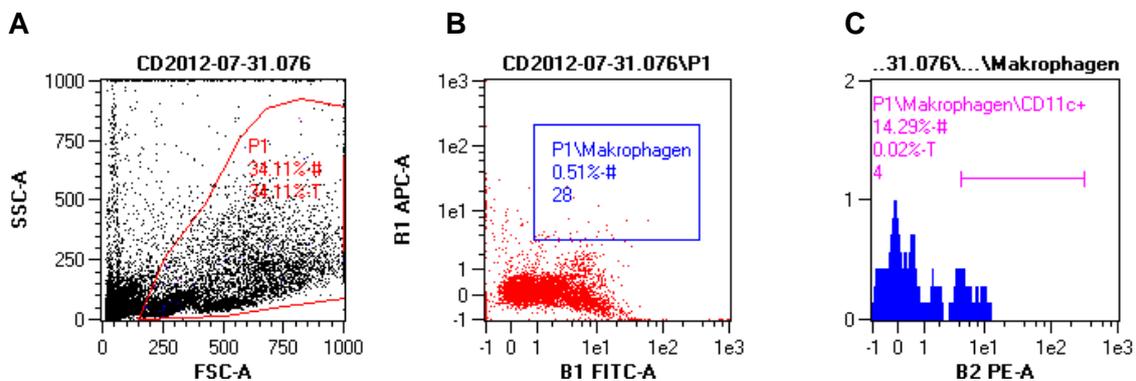
### 3. Ergebnisse

In Abb. 11 ist die Gatingstruktur für die Analyse der F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Makrophagen und F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> proinflammatorischen Makrophagen durch das *Panel* ohne Anti-CD45-Antikörper dargestellt. Die entsprechende Isotypkontrolle ist in Abb. 12 zu erkennen.



**Abbildung 11: Gates des Antikörperpanels ohne Anti-CD45-Antikörper mit F4/80-FITC, CD11b-APC und CD11c-PE**

**A** Im *Dot Blot* von SSC gegen FSC wird ein *Gate* P1 (rot) definiert, welches die SVF abbildet. **B** APC- und FITC-Signal dieses P1 *Gates* werden im *Dot Blot* und das PE-Signal im Histogramm weiter analysiert. Eine distinkte Population, die für beide *Label* positiv ist, wird als F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> (blau) *gateget*. Diese doppelpositiven Zellen werden **C** im Histogramm auf ihr PE-Signal weitergehend analysiert. Das positive Signal (pink) der Makrophagen wird als trippelpositive proinflammatorischen Makrophagen der SVF definiert.



**Abbildung 12: Isotypkontrolle des Antikörperpanels ohne Anti-CD45-Antikörper mit Rat IgG2b-FITC, Rat IgG2b κ-APC und Hamster IgG1 λ1-PE**

**A** Im *Dot Blot* von SSC gegen FSC wird ein *Gate* P1 (rot) definiert, welches die SVF abbildet. **B** APC- und FITC-Signal dieses P1 *Gates* werden im *Dot Blot* und das PE-Signal im Histogramm weiter analysiert. Eine distinkte Population, die für beide *Label* positiv ist, wird als F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> (blau) *gateget*. Diese doppelpositiven Zellen werden **C** im Histogramm auf ihr PE-Signal weitergehend analysiert. Das positive Signal (pink) der Makrophagen wird als trippelpositive proinflammatorischen Makrophagen der SVF definiert.

### 3. Ergebnisse

Die F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Zellen bilden eine distinkte Zellpopulation im FITC/APC-Diagramm (Abb. 11B). Diese doppelpositiven Makrophagen bilden auch im PE-Histogramm ein negatives und ein positives Signal (Abb. 11C). Sowohl in dem Makrophagengate als auch die weitergegateen CD11c<sup>+</sup> Zellen sind für die Isotypkontrolle ohne Signal (Abb. 12B und 12C).

#### 3.2.3 Kombinationspanel (4er Panel)

Da eine Analyse der vier Zellmarker in einem Antikörperpanel große Vorteile wie einen geringeren Antikörperverbrauch und einen geringen Zeitaufwand als bei der Analyse von zwei 3-fach Färbungen des Makrophagen- und proinflammatorischen Makrophagenpanels bedeutet, wurde das Panel mit F4/80-FITC, CD11b-APC und CD11c-PE durch einen Anti-CD45-Antikörper mit Alexa Fluor®700-Label erweitert. Die Abb. 13 zeigt die Emissionsspektren der vier verwendeten Labels. Die Kombination dieser Fluorochrome sollte möglich sein, da sich die Emissionsspektren in ihren Maxima nicht überlagern.

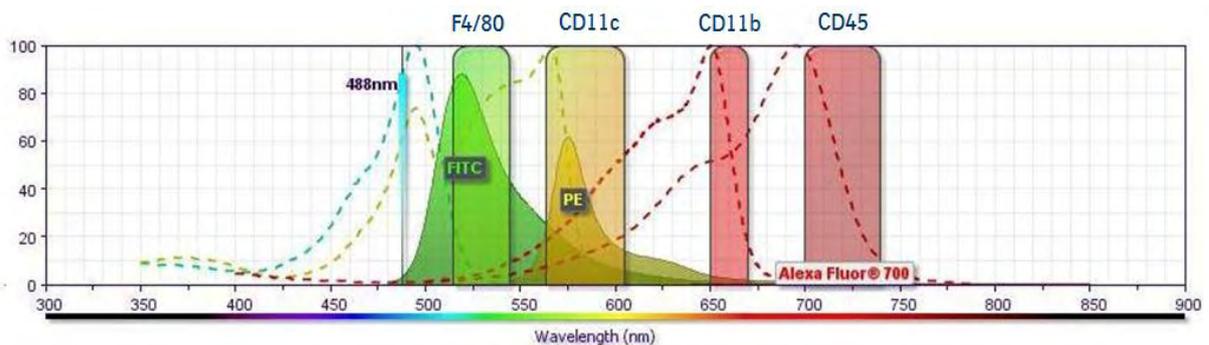
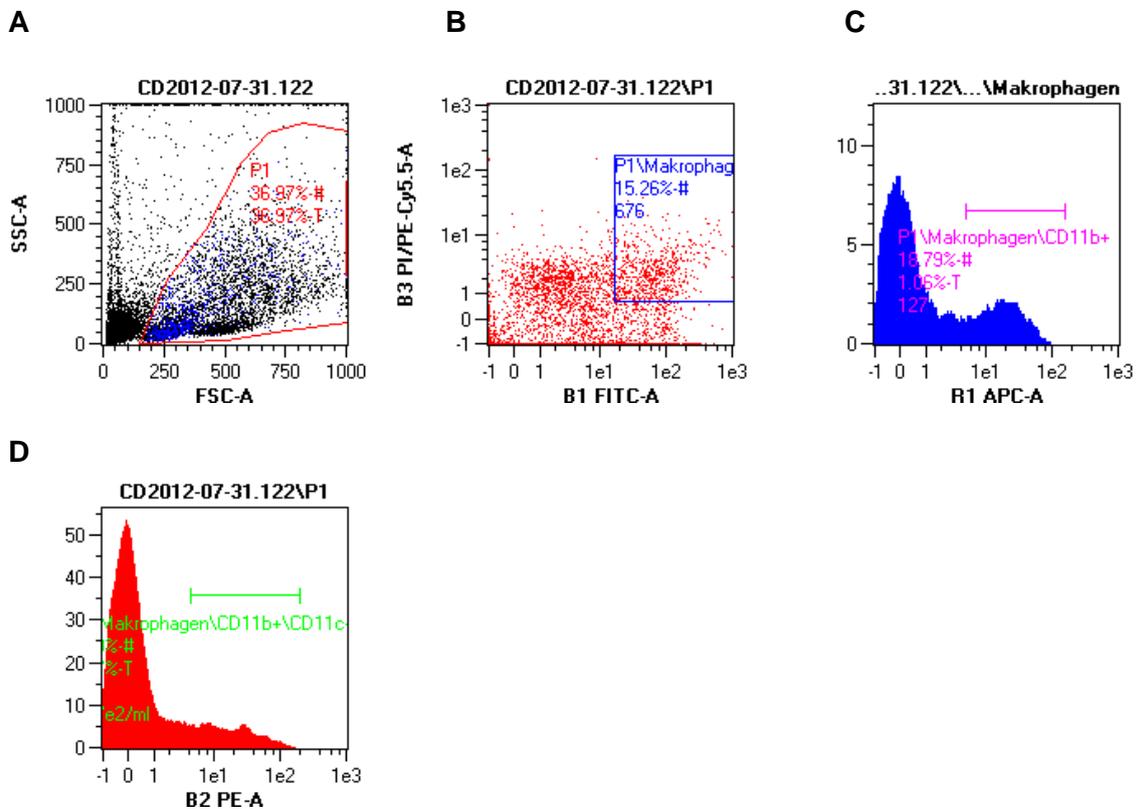


Abbildung 13: Fluoreszenzspektren des Kombinationspanels (4er Panel) mit FITC, PE, APC und Alexa Fluor700

### 3. Ergebnisse

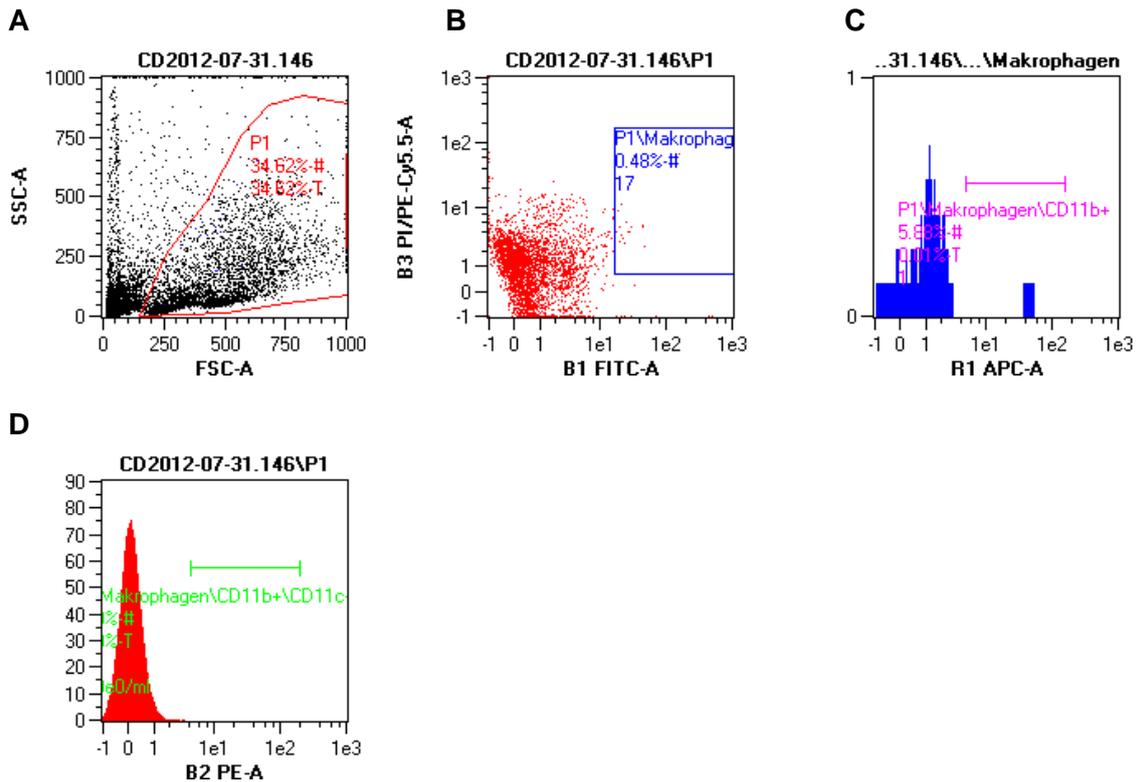
Die sich daraus ergebende *Gating*struktur zur Analyse von Makrophagen und proinflammatorischen Makrophagen ist nachfolgend abgebildet (Abb. 14). Die entsprechende Isotypkontrolle ist in Abb. 15 zu erkennen.



**Abbildung 14: Gates des 4er-Antikörperpanels mit CD45-Alexa700, F4/80-FITC, CD11b-APC und CD11c-PE**

**A** Im *Dot Blot* von SSC gegen FSC wird ein *Gate* P1 (rot) definiert, welches die SVF darstellt. **B** Alexa Fluor700- und FITC-Signal dieses P1 *Gates* werden im *Dot Blot* weiter analysiert. Eine distinkte Population, die für beide *Label* positiv ist, wird als CD45+ F4/80+ (blau) *gategatet*. Diese doppelpositiven Zellen werden **C** im Histogramm gegen ihr APC-Signal aufgetragen und das positive Signal (pink) stellt die trippelpositiven Makrophagen der SVF dar. Diese Makrophagen werden **D** in einem weiteren Histogramm auf ihr PE-Signal untersucht. Die durch das grüne *Gate gategateten* CD11c positiven proinflammatorischen Makrophagen der SVF können direkt auf die Makrophagen der SVF derselben Probe in einer Messung bezogen werden.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 15: Isotypkontrolle des 4er-Antikörperpanels mit Rat IgG2b  $\kappa$ -Alexa700, Rat IgG2b-FITC, Rat IgG2b  $\kappa$ -APC und IgG1  $\lambda$ 1-PE**

**A** Im *Dot Blot* von SSC gegen FSC wird ein *Gate* P1 (rot) definiert, welches die SVF darstellt. **B** Alexa Fluor700- und FITC-Signal dieses P1 *Gates* werden im *Dot Blot* weiter analysiert. Eine distinkte Population, die für beide *Label* positiv ist, wird als CD45<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> (blau) *gegatet*. Diese doppelpositiven Zellen werden **C** im Histogramm gegen ihr APC-Signal aufgetragen und das positive Signal (pink) stellt die trippelpositiven Makrophagen der SVF dar. Diese Makrophagen werden **D** in einem weiteren Histogramm auf ihr PE-Signal untersucht. Die durch das grüne *Gate* *gegateten* CD11c positiven proinflammatorischen Makrophagen der SVF können direkt auf die Makrophagen der SVF derselben Probe in einer Messung bezogen werden.

Die CD45<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> zeigen zwar eine spezifische Zellpopulation, die jedoch im Diagramm nicht klar von den negativen Zellen abzugrenzen ist (Abb. 14B). Diese doppelpositiven Zellen bilden im APC-Histogramm ein negatives und ein positives Signal (Abb. 14C). Dieses CD11b-spezifische Signal zeigt in den PE-Kanal *gegatet* eine hohe Spezifität, da die Isotypkontrolle für diese vierfach positiven Zellen kein Signal zeigt (Abb. 15D)

## 3. Ergebnisse

### 3.3 Test des Systems

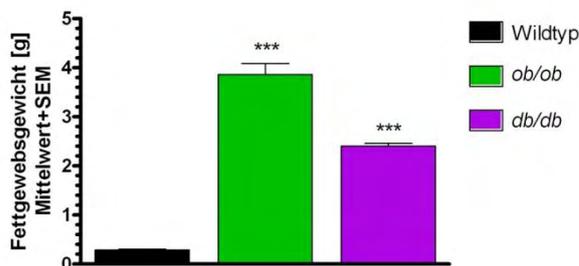
#### 3.3.1 Leukozyten in einem genetischen Diabetesmodell

##### 3.3.1.1 Methodenabgleich

Zur Überprüfung der entwickelten FACS-Analyse fand ein Methodenabgleich im Labor der Arbeitsgruppe von Dr. Chavakis an der Technischen Universität Dresden statt. Dazu wurden je vier männliche Mäuse pro Gruppe (Wildtyp = WT, *ob/ob*, *db/db*) im Alter von 10 Wochen mit zwei verschiedenen Antikörperpanels analysiert. Das eine entspricht dem auch in anderen Teilen dieser Arbeit verwendeten Antikörperpanel ohne Anti-CD45-Antikörper (Abb. 17-18). Das andere bestimmt einen M1 und M2 Phänotyp über die Fluoreszenzmarkierung von F4/80, CD11c und CD206 (Abb. 19-20). Dabei werden  $F4/80^+ CD11c^+ CD206^-$  Zellen als M1 Makrophagen und  $F4/80^+ CD11c^- CD206^+$  als M2 Makrophagen definiert.

Die Aufarbeitung erfolgte in diesem Versuch nach dem in Dresden etablierten Protokoll (Kap. 11.2). Maßgeblicher Unterschied zwischen dem in dieser Arbeit etablierten Protokoll und dem in Dresden Verwendeten sind Waschschrte nach der Antikörperinkubation. Die Analyse erfolgte in Dresden mit dem FACS-Gerät Canto II der Firma BD Bioscience. Da dieses Gerät nicht in der Lage ist Zellzahlen pro Milliliter als Konzentration auszugeben, erfolgt die Berechnung aus der Zellzahlbestimmung über die Neubauerzählkammer und dem Anteil der zu analysierenden Zellpopulation innerhalb der SVF. Vor der Inkubation mit dem Anti-CD206-Antikörper ist eine Fixierung der Zellen mit Foxp3 Permeabilisier-Lösung über Nacht nötig. Die Färbung wird nach den notwendigen Waschschrten zur Abtrennung der Fixierlösung inkubiert.

Wie in Abb. 16 zu erkennen ist, sind die Gewichtsunterschiede des Hodenfettgewebes der genetischen Modelle im Vergleich zum WT mit  $p \leq 0,001$  signifikant.

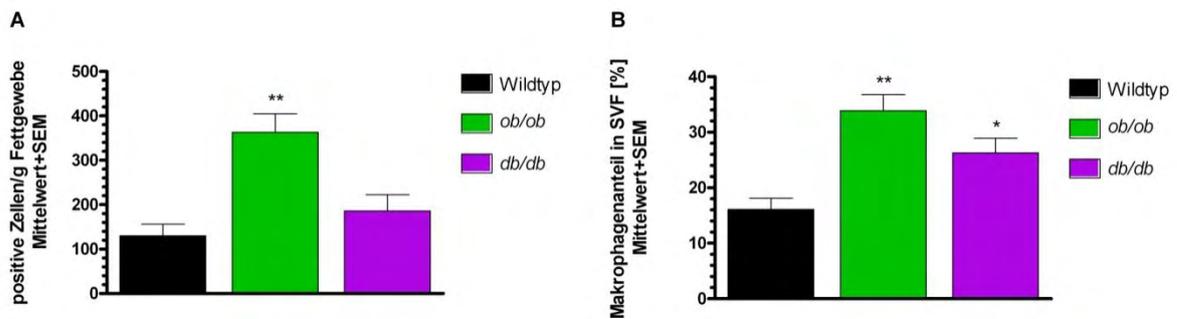


**Abbildung 16: Hodenfettgewebsgewicht der FACS-Analyse in Dresden von 10 Wochen alten männlichen C57BL/6J-, *ob/ob*- und *db/db*-Mäusen**

n=4, One-Way ANOVA mit Dunnett-Test auf Wildtyp bezogen, \* entspricht  $p \leq 0,05$ , \*\* entspricht  $p \leq 0,01$ , \*\*\* entspricht  $p \leq 0,001$

### 3. Ergebnisse

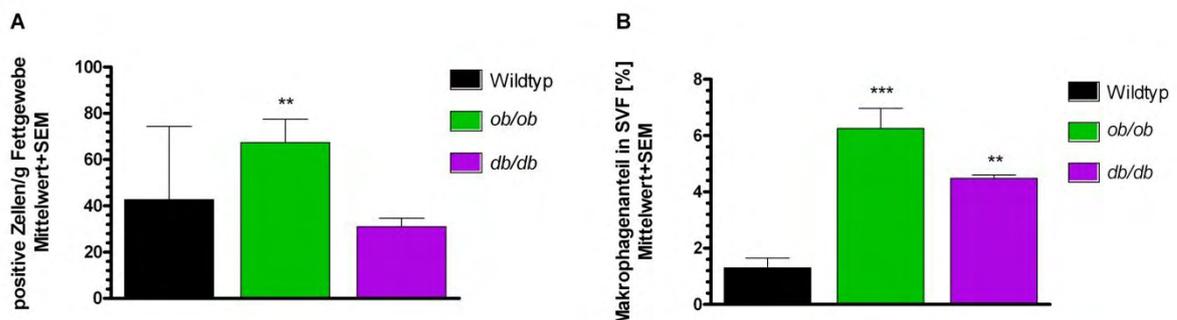
Die  $F4/80^+$   $CD11b^+$  Gesamtmakrophagenkonzentration bei WT-Tieren und  $db/db$ -Mäusen ist gleich hoch, während diese bei  $ob/ob$ -Tieren im Vergleich dazu signifikant erhöht ist (Abb. 17A). Der Gesamtmakrophagenanteil zeigt jedoch für  $ob/ob$ - und  $db/db$ -Tiere einen Erhöhung von Makrophagen im Hodenfett im Vergleich zu den Wildtyptieren, wobei  $ob/ob$ -Tiere mit  $p \leq 0,01$  eine höhere Signifikanz aufweisen als die  $db/db$ -Mäuse mit  $p \leq 0,05$  (Abb. 17B).



**Abbildung 17:  $F4/80^+$   $CD11b^+$  Makrophagen aus der FACS-Analyse in Dresden von 10 Wochen alten männlichen  $C57BL/6J$ -,  $ob/ob$ - und  $db/db$ -Mäusen**

**A** Makrophagenkonzentrationen pro g Hodenfettgewebe; **B** Makrophagenanteil in der SVF;  $n=4$ , One-Way ANOVA mit Dunnett-Test auf Wildtyp bezogen, \* entspricht  $p \leq 0,05$ , \*\* entspricht  $p \leq 0,01$ , \*\*\* entspricht  $p \leq 0,001$

Die  $F4/80^+$   $CD11b^+$   $CD11c^+$  proinflammatorische Makrophagenkonzentration ist bei  $ob/ob$ -Mäusen verglichen mit Wildtyptieren signifikant erhöht (Abb. 18A). Bei  $db/db$ -Mäusen ist die proinflammatorische Makrophagenkonzentration jedoch genauso hoch wie bei Wildtyptieren. Bei dem proinflammatorischen Makrophagenanteil sind beide genetischen Modelle verglichen mit dem WT erhöht (Abb. 18B).  $Ob/ob$ -Mäuse zeigen mit  $p \leq 0,001$  jedoch eine höhere Signifikanz als  $db/db$ -Tiere mit  $p \leq 0,01$  (Abb. 18B).

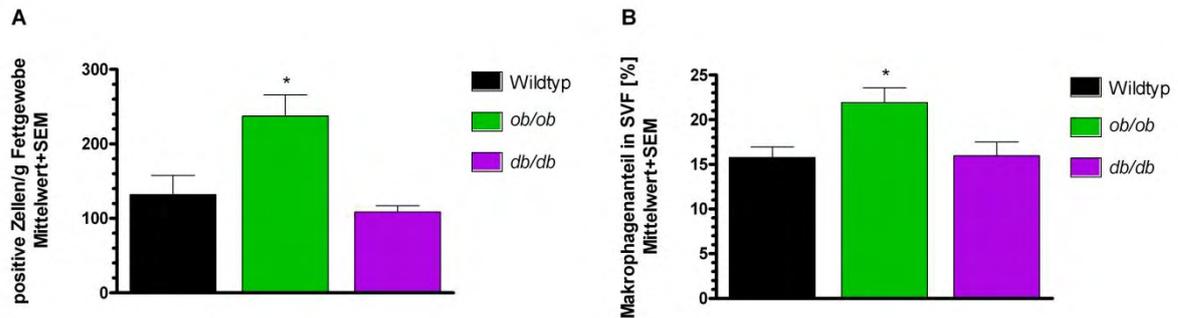


**Abbildung 18:  $F4/80^+$   $CD11b^+$   $CD11c^+$  proinflammatorische Makrophagenzahlen aus der FACS-Analyse in Dresden von 10 Wochen alten männlichen  $C57BL/6J$ -,  $ob/ob$ - und  $db/db$ -Mäusen**

**A** Makrophagenkonzentrationen pro g Hodenfettgewebe; **B** Makrophagenanteil in der SVF;  $n=4$ , One-Way ANOVA mit Dunnett-Test auf Wildtyp bezogen, \* entspricht  $p \leq 0,05$ , \*\* entspricht  $p \leq 0,01$ , \*\*\* entspricht  $p \leq 0,001$

### 3. Ergebnisse

Die  $F4/80^+ CD11c^- CD206^+$  M2-Makrophagenkonzentration ist bei den *ob/ob*-Tieren mit 237 Zellen/mg am höchsten und zeigt zu beiden anderen Gruppen Signifikanzen. Die M2-Konzentration ist jedoch in den *db/db*-Mäusen mit 109 Zellen/mg niedriger als bei den Wildtyp-Tieren mit 132 Zellen/mg. *ob/ob*-Tiere haben einen mit  $p \leq 0,05$  signifikant höheren M2-Makrophagenanteil verglichen mit Wildtypmäusen, während *db/db*- Mäusen und WT-Tiere gleich hohe M2 Makrophagenanteile haben (Abb. 19B).

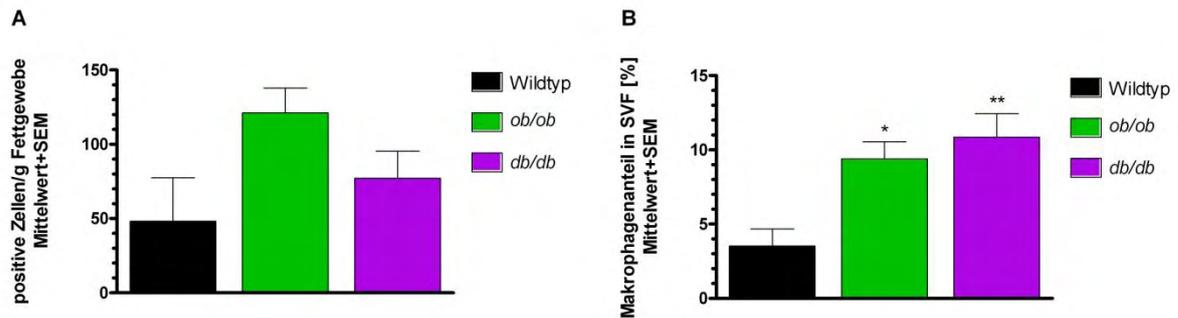


**Abbildung 19:  $F4/80^+ CD11c^- CD206^+$  M2 Makrophagen der FACS-Analyse in Dresden von 10 Wochen alten männlichen *C57BL/6J*-, *ob/ob*- und *db/db*-Mäusen**

**A** Makrophagenkonzentrationen pro g Hodenfettgewebe; **B** Makrophagenanteil in der SVF;  $n=4$ , One-Way ANOVA mit Dunnett-Test auf Wildtyp bezogen, \* entspricht  $p \leq 0,05$ , \*\* entspricht  $p \leq 0,01$ , \*\*\* entspricht  $p \leq 0,001$

Die Konzentration an  $F4/80^+ CD11c^+ CD206^-$  M1-Makrophagen der stromal vaskulären Fraktion (Abb. 20A) bei den *ob/ob*-Tieren ist höher als bei den *db/db*-Tieren und beide genetischen Modelle zeigen höhere Werte im Vergleich zum Wildtyp. Der M1-Makrophagenanteil von *db/db*- mit 11 % und *ob/ob*-Tieren ist mit 9 % ungefähr gleich hoch und im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren mit einem Anteil von 4 % erhöht (Abb. 20B). Mit  $p \leq 0,01$  weisen *db/db*-Tiere im Hinblick auf den M1-Anteil eine höhere Signifikanz auf als *ob/ob*-Tiere mit  $p \leq 0,05$ . Das Verhältnis von M1- zu M2-Makrophagen ist bei den *db*-Tieren mit 71 % auch im Gegensatz zu *ob*-Mäusen mit 43 % und Wildtypmäusen mit 20 % (Daten nicht gezeigt) sehr hoch.

### 3. Ergebnisse



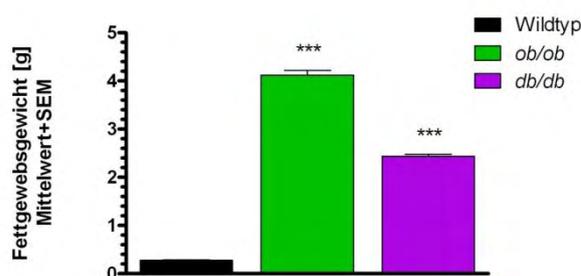
**Abbildung 20: F4/80<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> CD206<sup>-</sup> M1 Makrophagen der FACS-Analyse in Dresden von 10 Wochen alten männlichen C57BL/6J-, ob/ob- und db/db-Mäusen**

**A** Makrophagenkonzentrationen pro g Hodenfettschmelze; **B** Makrophagenanteil in der SVF; n=4, One-Way ANOVA mit Dunnett-Test auf Wildtyp bezogen, \* entspricht  $p \leq 0,05$ , \*\* entspricht  $p \leq 0,01$ , \*\*\* entspricht  $p \leq 0,001$

#### 3.3.1.2 Analyse mit 3er Panels

Der Versuch an der TU Dresden, in dem die beiden genetischen Modellen verglichen mit WT-Tieren analysiert wurden, wird in der Abteilung *Cardio Metabolic Diseases Research* (CMDR) der Firma Boehringer Ingelheim in Biberach mit einer höheren Tierzahl wiederholt (siehe Abb. 21-27). Zur Analyse des Versuchs werden sowohl die drei *3er Panels* als auch das *Kombinationspanel* (*4er Panel*) (Kap. 3.3.1.3) verwendet und miteinander verglichen.

Während WT-Mäuse in diesem Versuch Hodenfettschmelzgewichte von 0,23 g haben, liegt für die ob/ob-Mäuse eine signifikante Gewichtserhöhung auf 4,0 g und für db/db-Tiere auf 2,3 g vor (Abb. 21). Diese Daten spiegeln damit das Ergebnis aus dem Versuch in Dresden (Abb. 16) wieder.



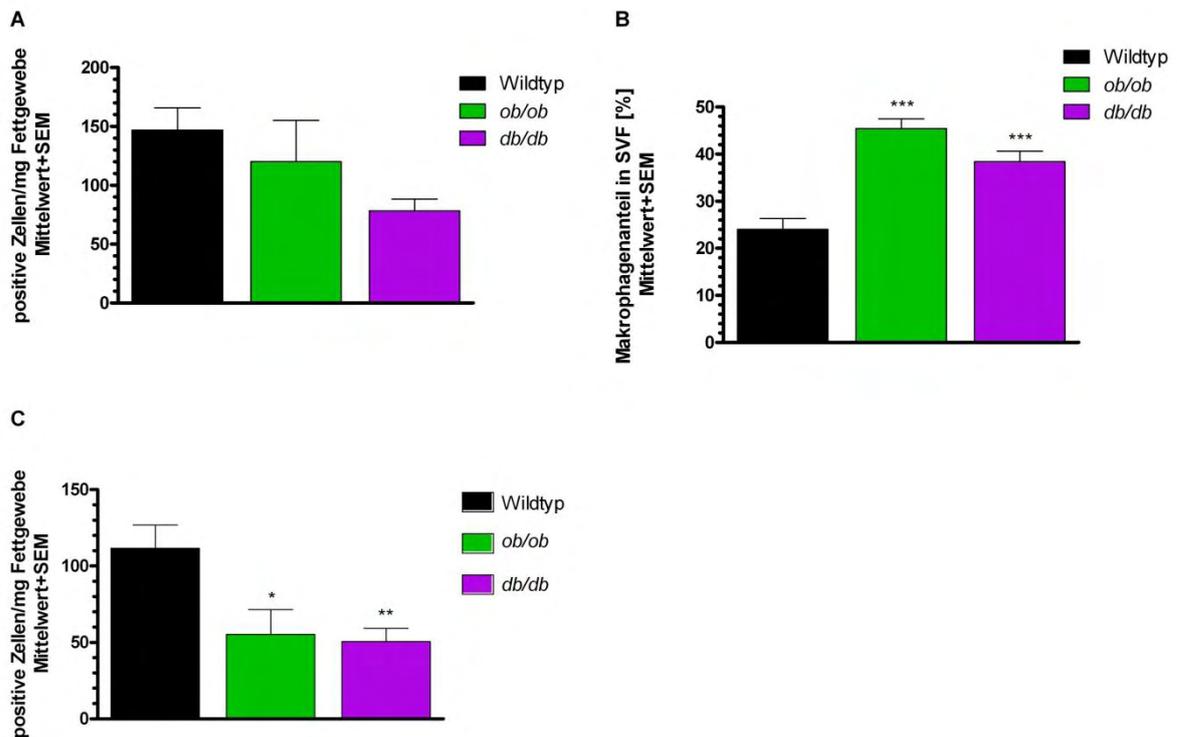
**Abbildung 21: Hodenfettschmelzgewicht der FACS-Analyse mit 10 Wochen alten männlichen C57BL/6J-, ob/ob- und db/db-Mäusen**

n=8, One-Way ANOVA mit Dunnett-Test auf Wildtyp bezogen, \* entspricht  $p \leq 0,05$ , \*\* entspricht  $p \leq 0,01$ , \*\*\* entspricht  $p \leq 0,001$

### 3. Ergebnisse

In der CD45<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Makrophagenkonzentration bezogen auf das Fettgewicht (Abb. 22A) kann zwar kein Unterschied zwischen WT- und *ob/ob*-Tieren, wohl aber zu *db/db*-Mäusen festgestellt werden. Die Makrophagenkonzentration ist bei den *db/db*-Tieren niedriger als bei den Wildtypen und *ob/ob*-Mäusen. Makrophagen werden auf die Gesamtzellzahl der SVF (Abb. 22B) bezogen, wodurch sich eine mit  $p \leq 0,001$  signifikante Erhöhung der beiden genetischen Modelle im Bezug auf die WT-Mäuse verzeichnen lässt. Bei *ob/ob*-Tieren sind 45 % und bei *db/db*-Tieren 38 % aller Zellen der SVF Makrophagen, wohingegen es beim Wildtyp nur 24 % sind.

Das Panel ohne Anti-CD45-Antikörper, welches auch im Versuch zum Methodenabgleich in Dresden verwendet wurde (Kap. 3.3.1.1), zeigt für die F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Makrophagen beider genetischen Modelle einen signifikanten Rückgang in den Konzentrationen bezogen auf die Wildtypiere (Abb. 22C).



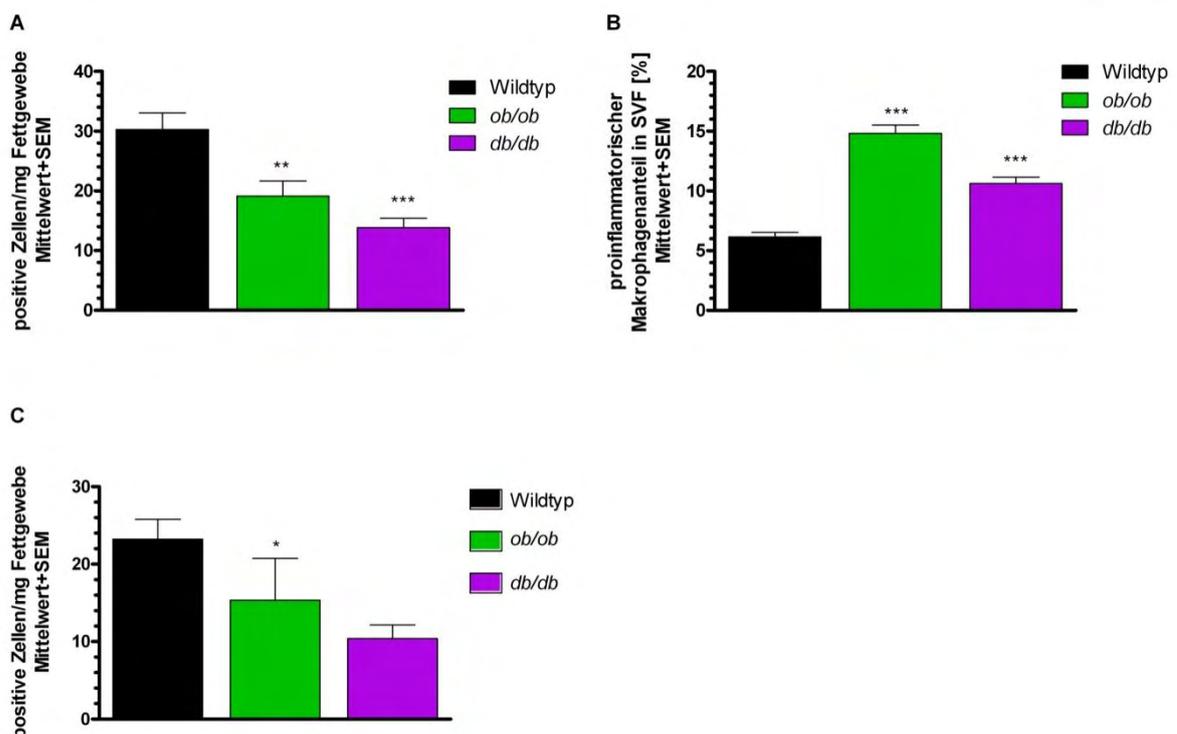
**Abbildung 22: Makrophagen der FACS-Analyse mit 10 Wochen alten männlichen C57BL/6J-, *ob/ob*- und *db/db*-Mäusen**

**A** Makrophagenkonzentrationen pro mg Hodenfettgewebe, CD45<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> **B** Makrophagenanteil in der SVF, CD45<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> **C** Makrophagenkonzentrationen pro mg Hodenfettgewebe, F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>; n=8, One-Way ANOVA mit Dunnett-Test auf Wildtyp bezogen, \* entspricht  $p \leq 0,05$ , \*\* entspricht  $p \leq 0,01$ , \*\*\* entspricht  $p \leq 0,001$

### 3. Ergebnisse

Die Konzentration der CD45<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> proinflammatorischen Makrophagen (Abb. 23A) ist sowohl für *ob/ob*- als auch für *db/db*-Mäuse signifikant niedriger als bei den Kontrolltieren. Durch den Bezug dieser Konzentrationen pro mg Fettgewicht auf das um das 10- bzw. 20-fach höhere Fettgewebsgewicht in den genetischen Modellen im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 21) wird jedoch deutlich, dass die Absolutzahlen für die beiden genetischen Modelle deutlich erhöht im Vergleich zum Wildtyp sind. Der Anteil von CD45<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> proinflammatorischen Makrophagen bezogen auf die SVF (Abb. 23B) liegt bei den *ob/ob*-Tieren mit 15 % signifikant höher als bei den Wildtypmäusen mit 6 %. Auch bei dem *db/db*-Modell ist eine signifikante Erhöhung auf 11 % festzustellen.

Die Konzentrationen der F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> proinflammatorischen Makrophagen (Abb. 23C) beider genetischen Modelle sind jedoch wie auch bei den CD45<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> proinflammatorischen Makrophagen (Abb. 23A) niedriger verglichen mit den WT-Mäusen. Beide Panels liefern damit vergleichbare Ergebnisse.



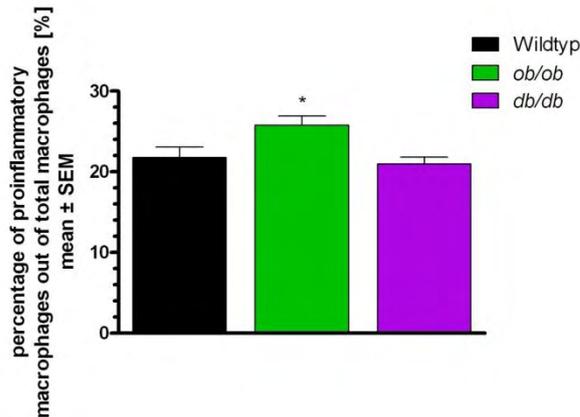
**Abbildung 23: Proinflammatorische Makrophagen der FACS-Analyse mit 10 Wochen alten männlichen C57BL/6J-, *ob/ob*- und *db/db*-Mäusen**

**A** proinflammatorische Makrophagenkonzentration pro mg Hodenfettgewebe, CD45<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>  
**B** proinflammatorischer Makrophagenanteil in der SVF, CD45<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>  
**C** proinflammatorische Makrophagenkonzentration pro mg Hodenfettgewebe, F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>;  
n=8, One-Way ANOVA mit Dunnett-Test auf Wildtyp bezogen, \* entspricht p≤0,05, \*\* entspricht p≤0,01, \*\*\* entspricht p≤0,001

### 3. Ergebnisse

Aus dem Panel ohne anti-CD45-Antikörper lässt sich aus den trippelpositiven proinflammatorischen Makrophagen und den doppelpositiven Makrophagen der Anteil der proinflammatorischen Makrophagen von den Gesamtmakrophagen berechnen (Abb. 24):

Der  $F4/80^+ CD11b^+ CD11c^+$  proinflammatorische Anteil der  $F4/80^+ CD11b^+$  Gesamtmakrophagen (Abb. 24) ist nur für die *ob/ob*-Mäuse im Bezug auf die Wildtyptiere signifikant erhöht, während er bei *db/db*-Tieren und der Kontrollgruppe gleich ist.



**Abbildung 24:  $F4/80^+ CD11b^+ CD11c^+$  Proinflammatorischer Anteil der  $F4/80^+ CD11b^+$  Gesamtmakrophagen der FACS-Analyse von 10 Wochen alten männlichen *C57BL/6*, *ob/ob*- und *db/db* Mäusen**

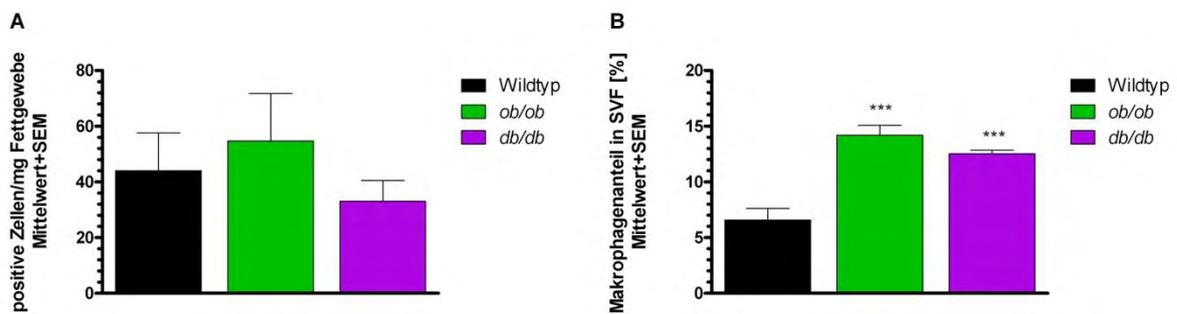
n=8, One-Way ANOVA mit Dunnett-Test auf Wildtyp bezogen, \* entspricht  $p \leq 0,05$ , \*\* entspricht  $p \leq 0,01$ , \*\*\* entspricht  $p \leq 0,001$

### 3. Ergebnisse

#### 3.3.1.3 Analyse mit dem Kombinationspanel

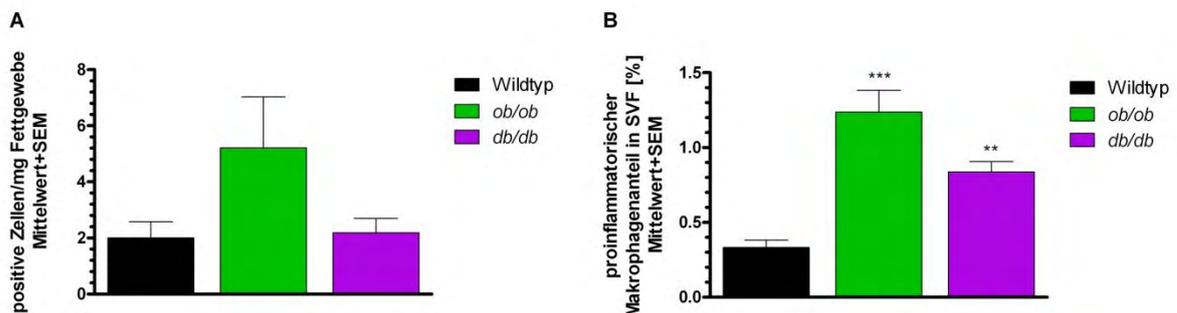
Für einen direkten Vergleich der Ergebnisse zwischen 3er und 4er *Panel* wurden die Proben der genetischen Mausmodelle (Kap. 3.3.1.2) auch mit allen vier *Panels* vermessen.

Ein Vergleich der Ergebnisse für das Kombinationspanel (4er *Panel*) (Abb. 25-27) mit denen der Makrophagen- und proinflammatorischen Makrophagenpanels (Abb. 22-24) zeigt zwar dieselben Relationen der drei Gruppen untereinander, jedoch mit deutlich niedrigeren Werten. So sind beispielsweise nur 14 % der SVF bei den *ob/ob*-Tieren Makrophagen (Abb. 25B) (ein Drittel von dem Wert aus der Analyse mit dem 3er *Panel*) und nur 1,2 % zeigen den proinflammatorischen Phänotyp bezogen auf die SVF (Abb. 26B) (weniger als ein Zehntel aus der 3er *Panel* Analyse).



**Abbildung 25: CD45<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Makrophagen der FACS-Analyse mit dem Kombinationspanel in der Abteilung CMDRII mit 10 Wochen alten männlichen C57BL/6J-, *ob/ob*- und *db/db*-Mäusen**

**A** Makrophagenkonzentrationen pro mg Hodenfettgewebe **B** Makrophagenanteil in der SVF; n=8, One-Way ANOVA mit Dunnett-Test auf Wildtyp bezogen, \* entspricht  $p \leq 0,05$ , \*\* entspricht  $p \leq 0,01$ , \*\*\* entspricht  $p \leq 0,001$

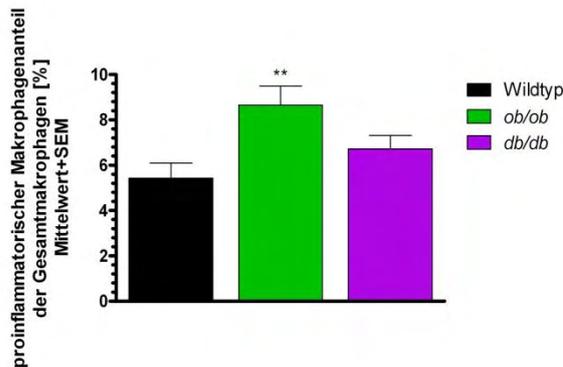


**Abbildung 26: CD45<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> proinflammatorische Makrophagen der FACS-Analyse mit dem Kombinationspanel in der Abteilung CMDRII mit 10 Wochen alten männlichen C57BL/6J-, *ob/ob*- und *db/db*-Mäusen**

**A** proinflammatorische Makrophagenkonzentrationen pro mg Hodenfettgewebe **B** proinflammatorischer Makrophagenanteil in der SVF; n=8, One-Way ANOVA mit Dunnett-Test auf Wildtyp bezogen, \* entspricht  $p \leq 0,05$ , \*\* entspricht  $p \leq 0,01$ , \*\*\* entspricht  $p \leq 0,001$

### 3. Ergebnisse

Analog zu dem *Panel* ohne anti-CD45-Antikörper (Abb. 24) ist es auch bei diesem Kombinationspanel möglich, die proinflammatorischen Makrophagen der Gesamtmakrophagen zu berechnen (Abb. 27). Dabei werden CD45<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Zellen als Makrophagen und CD45<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> Zellen als proinflammatorische Makrophagen definiert.



**Abb. 27: CD45<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> proinflammatorischer Makrophagenanteil der CD45<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Gesamtmakrophagen der FACS-Analyse mit Kombinationspanel von 10 Wochen alten männlichen C57BL/6, ob/ob- und db/db Mäusen**

n≥7, One-Way ANOVA mit Dunnett-Test auf Wildtyp bezogen, \* entspricht p≤0,05, \*\* entspricht p≤0,01, \*\*\* entspricht p≤0,001

#### 3.3.1.4 Ergebnisvergleich

Während bei der Analyse in Dresden eine signifikante Erhöhung der gesamt- und proinflammatorischen Makrophagenkonzentration für ob/ob-Mäuse im Vergleich zu WT-Tieren festgestellt werden konnte, ist die Makrophagenkonzentrationen im Wiederholungsversuch für die beiden genetischen Modelle gleich hoch wie beim WT. Die proinflammatorischen Makrophagenkonzentration ist bei den beiden genetischen Modellen sogar signifikant niedriger als beim Wildtyp.

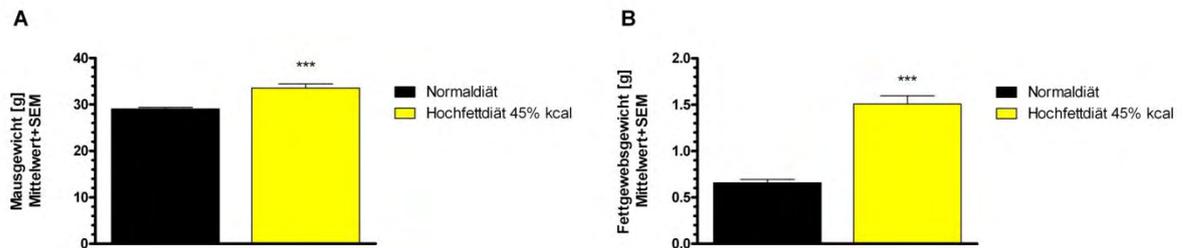
Bei beiden Versuchen sind die gesamt- und proinflammatorischen Makrophagenanteile der SVF signifikant erhöht.

## 3. Ergebnisse

### 3.3.2 Leukozyten in einem diätinduzierten Diabetesmodell

In diesem Versuch wurden 24 männliche *C57BL/6J*-Mäuse ab dem Alter von 7-8 Wochen 17 Wochen lang mit einer 45 % kcal Hochfettdiät (D12451 Kap. 11.1.1) gefüttert. Die Kontrolltiere bekamen die entsprechende Kontrolldiät mit 10% kcal Fettanteil (D12450B Kap. 11.1.2). Es wurde nach dem Gewicht randomisiert, so dass aus jeder Gruppe jeweils die drei leichtesten und schwersten Tiere nicht analysiert wurden.

Obwohl sich schon das Körpergewicht (Abb. 28A) der HFD-Tiere mit 33,6 g von dem der NC-Mäuse mit 29,0 g signifikant unterscheidet, ist der Unterschied im Hodenfettgewicht (Abb. 28B) noch deutlicher. Die HFD-Mäuse haben mit 1,5 g Hodenfettgewebe mehr als doppelt so viel Fett wie die Tiere auf der Kontrolldiät mit 0,6 g.



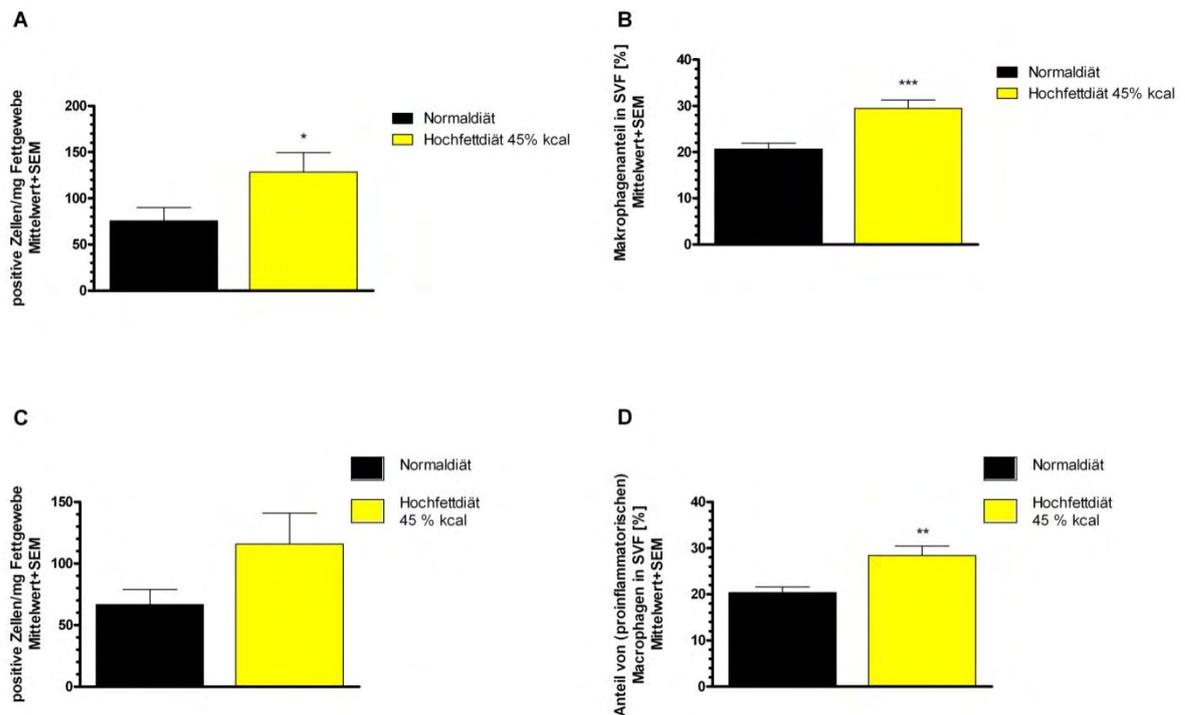
**Abbildung 28: Gewichte der FACS-Analyse von männlichen *C57BL/6J* Mäusen 17 Wochen auf Hochfettdiät**

**A** Körpergewicht, n=24, **B** Hodenfettgewebsgewicht, n=18; t-Test: \* entspricht  $p \leq 0,05$ , \*\* entspricht  $p \leq 0,01$ , \*\*\* entspricht  $p \leq 0,001$

### 3. Ergebnisse

Die HFD-Mäuse haben eine mit  $p=0,0446$  signifikant höhere  $CD45^+ F4/80^+ CD11b^+$  Makrophagenkonzentration (Abb. 29A) im Hodenfettgewebe als die Mäuse auf Kontrolldiät. Für den Makrophagenanteil bezogen auf die Gesamtzellzahl in der SVF (Abb. 29B) zeigt die HFD-Gruppe mit  $p=0,0003$  ebenfalls eine Signifikanz verglichen mit den NC-Mäusen.

Es lässt sich ein Anstieg der  $F4/80^+ CD11b^+$  Makrophagenkonzentration bei den HFD-Tieren mit 129 Zellen/mg im Vergleich zu den Tieren auf Kontrolldiät mit 76 Zellen/mg feststellen (Abb. 29C). Für die prozentualen Anteile der SVF (Abb. 29D) ergeben sich bei den Makrophagen mit  $p=0,0031$  signifikante Unterschiede.



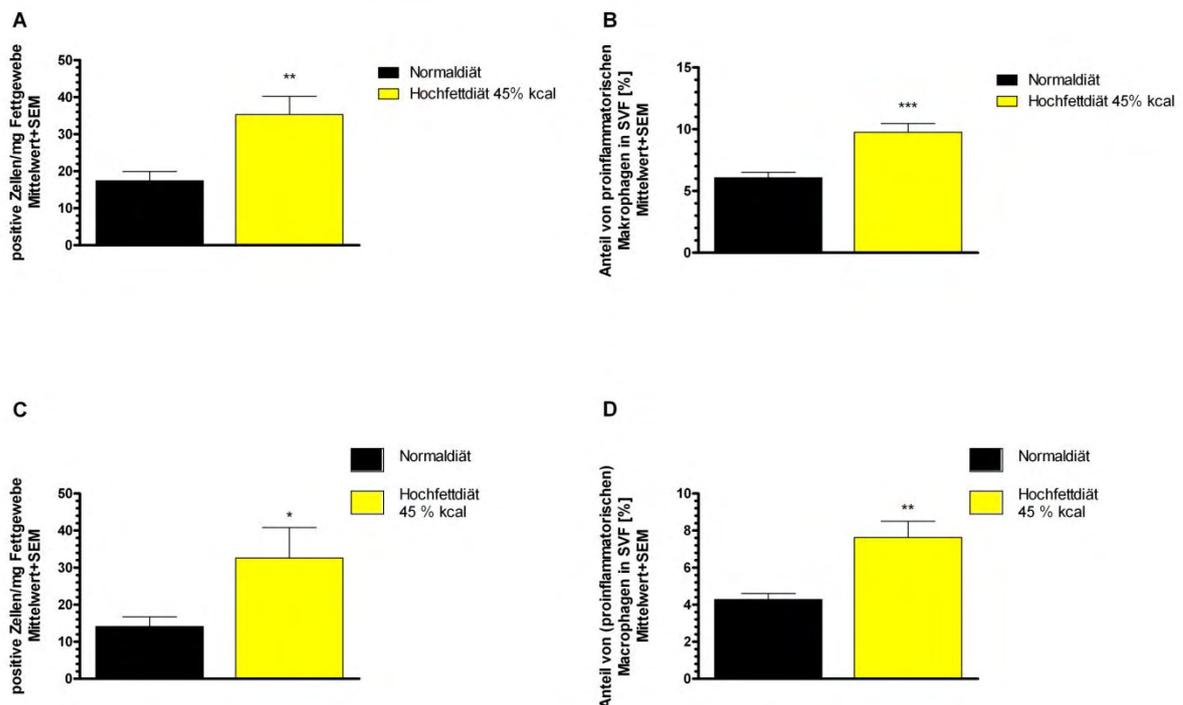
**Abbildung 29: Makrophagen der FACS-Analyse von männlichen *C57BL/6J* Mäusen 17 Wochen auf Hochfett diät**

**A** Makrophagenkonzentrationen pro mg Hodenfettgewebe,  $CD45^+ F4/80^+ CD11b^+$  **B** Makrophagenanteil in der SVF,  $CD45^+ F4/80^+ CD11b^+$  **C** Makrophagenkonzentration pro mg Hodenfettgewebe,  $F4/80^+ CD11b^+$  **D** Makrophagenanteil der SVF,  $F4/80^+ CD11b^+$ ; **A-B**  $n=18$  **C-D**  $n=12$ ; *t*-Test: \* entspricht  $p\leq 0,05$ , \*\* entspricht  $p\leq 0,01$ , \*\*\* entspricht  $p\leq 0,001$

### 3. Ergebnisse

Die CD45<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> Makrophagen mit proinflammatorischen Charakter zeigen einen signifikanten Anstieg der Konzentrationen von den NC-Mäusen im Vergleich zu den HFD-Tieren (Abb. 30A). Auch der prozentuale Anteil der proinflammatorischen Makrophagen in der SVF (Abb. 30B) zeigt die hohe Signifikanz von p=0,0003.

Eine Erhöhung der F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> proinflammatorische Makrophagenkonzentration zwischen HFD und NC ist mit p=0,042 signifikant (Abb. 30C). Für die prozentualen Anteile der SVF (Abb. 30D) ergeben sich jedoch sowohl bei den Makrophagen mit p=0,0031 als auch bei den proinflammatorischen Makrophagen mit p=0,0016 signifikante Unterschiede.



**Abbildung 30: proinflammatorische Makrophagen der FACS-Analyse von männlichen C57BL/6J Mäusen 17 Wochen auf Hochfett diät**

**A** proinflammatorische Makrophagenkonzentration pro mg Hodenfettgewebe, CD45<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> **B** proinflammatorischer Makrophagenanteil in der SVF, CD45<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> **C** proinflammatorische Makrophagenkonzentrationen pro mg Hodenfettgewebe, F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> **D** Proinflammatorischer Anteil der SVF, F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>; n=12, t-Test: \* entspricht p≤0,05, \*\* entspricht p≤0,01, \*\*\* entspricht p≤0,001

In diesem verwendeten DIO-Modell mit C57BL/6J-Mäusen zeigt sich eine signifikante Erhöhung der gesamt- und proinflammatorischen Makrophagenkonzentration für die Hochfett diätgruppe verglichen mit den NC-Tieren.

Auch für die gesamt- und proinflammatorischen Makrophagenanteile ergeben sich signifikante Erhöhungen bei den HFD-Mäusen im Vergleich zu den NC-Tieren.

### 3. Ergebnisse

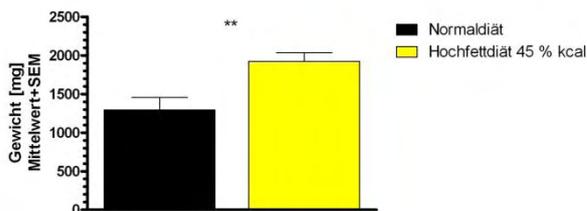
#### 3.4 Subchronische Studie eines CCR2-Antagonisten in huCCR2 Mäusen

Der in dieser Studie getestete CCR2-Antagonist ist humanspezifisch und nicht kreuzreaktiv. Aufgrund dessen wurden in diesem Versuch humanisierte CCR2 (huCCR2) Mäuse mit C57BL/6-Hintergrund verwendet.

##### 3.4.1 Leukozyten

Männliche *huCCR2* Mäuse wurden ab dem Alter von 7-8 Wochen 11 Wochen lang mit einer 45 % kcal Hochfettdiät (D12451) gefüttert. Die Kontrolltiere bekamen die entsprechende Kontrolldiät mit 10% kcal Fettanteil (D12450B). Ein Teil der Tiere ging für 6 Wochen in ein Substanztreatment (Abb. 34-37), während in einem Versuch vorab mit je sechs Tieren pro Gruppe der Ausgangszustand analysiert wurde (Abb. 31-33).

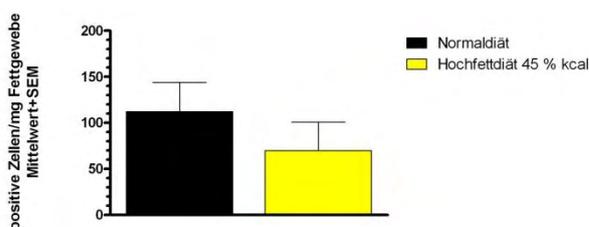
Der Hodenfettgewichtsunterschied zwischen den NC- mit 1,3 g im Vergleich zu den HFD-Mäusen mit 1,9 g ist mit  $p=0,0087$  signifikant (Abb. 31).



**Abbildung 31: Hodenfettgewebsgewicht der FACS-Analyse von männlichen huCCR2 Mäusen nach 11 Wochen Hochfettdiät**

n=6, t-Test: \* entspricht  $p\leq 0,05$ , \*\* entspricht  $p\leq 0,01$ , \*\*\* entspricht  $p\leq 0,001$

In den  $CD45^+ F4/80^+ CD11b^+$  Makrophagenkonzentrationen (Abb. 32) kann hingegen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Anstatt einer vermuteten erhöhten Makrophagenkonzentration bei den HFD-Mäusen zeigt die HFD-Gruppe die Tendenz einer niedrigeren Makrophagenkonzentration.

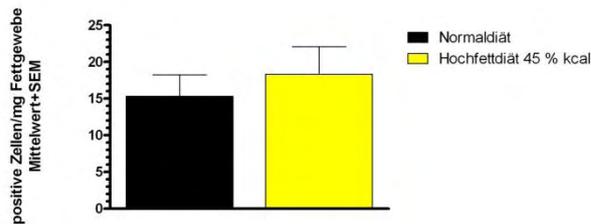


**Abbildung 32:  $CD45^+ F4/80^+ CD11b^+$  Makrophagenkonzentration pro mg Fettgewebe der FACS-Analyse von männlichen huCCR2 Mäusen nach 11 Wochen Hochfettdiät**

n=6, t-Test: \* entspricht  $p\leq 0,05$ , \*\* entspricht  $p\leq 0,01$ , \*\*\* entspricht  $p\leq 0,001$

### 3. Ergebnisse

Bei den CD45<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> proinflammatorischen Makrophagen (Abb. 33) kann ebenfalls kein Unterschied festgestellt werden.

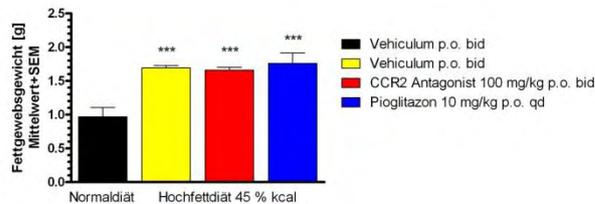


**Abbildung 33: CD45<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> proinflammatorische Makrophagenkonzentration pro mg Fettgewebe der FACS-Analyse von männlichen *huCCR2* Mäusen nach 11 Wochen Hochfett diät n=6, t-Test: \* entspricht p≤0,05, \*\* entspricht p≤0,01, \*\*\* entspricht p≤0,001**

Zu Beginn der Substanzbehandlung war bei den gesamt- und proinflammatorischen Makrophagenkonzentrationen kein Unterschied zwischen HFD- und NC-Tieren feststellbar, wohingegen in einem vor oralen Glukosetoleranztest eine signifikante Erhöhung des Blutzuckerwertes der HFD-Gruppe im Vergleich zu NC-Tieren ermittelt wurde (Daten nicht gezeigt).

### 3. Ergebnisse

In der subchronischen Studie in huCCR2-Mäusen eines CCR2-Antagonisten stellt sich das Gewicht des Fettgewebes (Abb. 34) der verschiedenen Gruppen wie erwartet dar. Die Kontrollgruppe auf der Normal chow zeigt mit 0,9 g Signifikanzen zu allen drei Gruppen auf HFD. Während die Kontrolle auf HFD und die Substanzbehandlungs-Gruppe sich mit jeweils 1,6 g Fettgewicht nicht unterscheiden, zeigt sich in der Gruppe mit der Pioglitazon-Behandlung mit 1,7 g eine leichte Erhöhung des Gewichts.



**Abbildung 34: Hodenfettgewebsgewicht FACS-Analyse von männlichen huCCR2 Mäusen der subchronischen Studie eines CCR2-Antagonisten**

n≥8; One-Way ANOVA mit Dunnett-Test auf HFD Vehikel-Gruppe bezogen, \* entspricht p≤0,05, \*\* entspricht p≤0,01, \*\*\* entspricht p≤0,001

Auffällig und entgegen der Erwartungen sind jedoch starke Fettgewebsgewichtsabweichungen innerhalb der Kontrollgruppe auf NC. Diese sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

**Tabelle 3: Gewichte der Mäuse aus der chronischen Studie eines CCR2-Antagonisten**

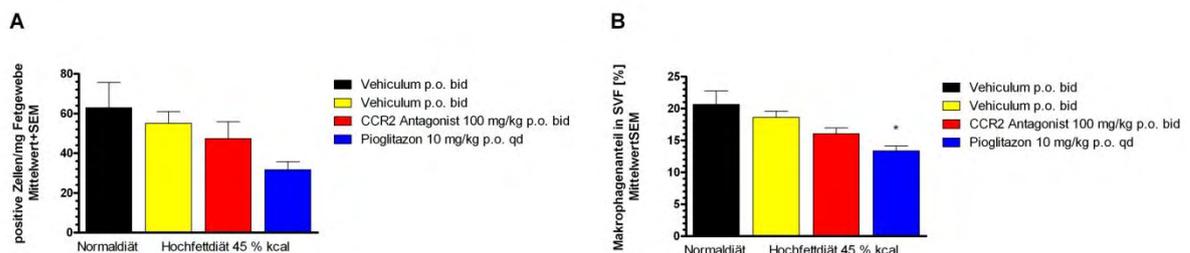
Tiernr.	Normal chow Vehikel [g]	High fat diet 45 % kcal Vehicle [g]	High fat diet 45 % kcal CCR2-Antagonist [g]	High fat diet 45 % kcal Pioglitazon [g]
1	0,61	1,46	1,58	1,49
2	0,66	1,71	1,59	2,63
3	0,83	1,66	1,55	2,06
4	1,66	1,69	-	1,46
5	1,49	1,75	1,78	2,21
6	1,30	1,77	1,75	1,90
7	0,47	1,61	1,84	1,37
8	0,99	1,84	1,64	1,54
9	0,69	1,75	1,55	1,19

### 3. Ergebnisse

Die Tiere 4, 5 und 6 aus der Vehikelgruppe auf NC zeigen ein ähnlich hohes Fettgewebsgewicht wie auch die Tiere der anderen Gruppen auf HFD. Bei näherer Betrachtung der Daten aus der Anfütterungsphase des Versuchs (Daten nicht gezeigt) fällt auf, dass diese Tiere schon bereits vor Substanzbehandlung deutlich mehr Körpergewicht hatten als die anderen Tiere aus der Gruppe. Die großen Gewichtsunterschiede sind jedoch nicht erklärbar.

Die Konzentrationen der CD45<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Makrophagen aus den verschiedenen Gruppen (Abb. 35A) zeigen nicht wie erwartet für die drei Gruppen auf HFD eine Erhöhung im Vergleich zur NC-Gruppe. Die Tiere der Kontrollgruppe auf NC zeigen mit einem Mittelwert von 63 Zellen/mg eine höhere Makrophagenkonzentration als die Tiere auf HFD mit 55 Zellen/mg. Der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) ist jedoch auch sehr hoch. Grund hierfür sind die bereits oben erwähnten Versuchstiere 4, 5 und 6 aus der Vehikelgruppe auf NC. Neben dem erhöhten Körper- und Fettgewicht zeigen diese auch erhöhte Werte in der Makrophagenkonzentration. Bei einem Vergleich der drei Gruppen auf HFD untereinander zeigt sich jedoch das erwartete Ergebnis. Die Makrophagenkonzentration verringert sich mit  $p \leq 0,05$  signifikant durch die Pioglitazonbehandlung und auch die Behandlung mit dem CCR2-Antagonisten lässt die Tendenz einer verringerten Makrophagenkonzentration im Hodenfettgewebe erkennen.

Der Makrophagenanteil der SVF (Abb. 35B) zeigt aufgrund der drei sehr schweren Versuchstiere 4, 5 und 6 aus der NC-Gruppe ein ähnliches Bild wie die Makrophagenkonzentrationen. Die Kontrollgruppe auf NC ist auch hier mit 21 % höher als die Kontrollgruppe auf HFD mit 19%. Der Makrophagenanteil für die Pioglitazonbehandlung ist verglichen mit der Kontrollgruppe auf HFD mit 13 % signifikant und auch ein Abfall des Makrophagenanteils durch die Behandlung mit dem CCR2-Antagonisten ist mit 16 % erkennbar.



**Abbildung 35: CD45<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Makrophagen der FACS-Analyse von männlichen *huCCR2* Mäusen der subchronischen Studie eines CCR2-Antagonisten**

**A** Makrophagenkonzentrationen pro mg Hodenfettgewebe,  $n \geq 8$  **B** Makrophagenanteil in der SVF,  $n=9$ ; One-Way ANOVA mit Dunnett-Test auf HFD Vehikel-Gruppe bezogen, \* entspricht  $p \leq 0,05$ , \*\* entspricht  $p \leq 0,01$ , \*\*\* entspricht  $p \leq 0,001$

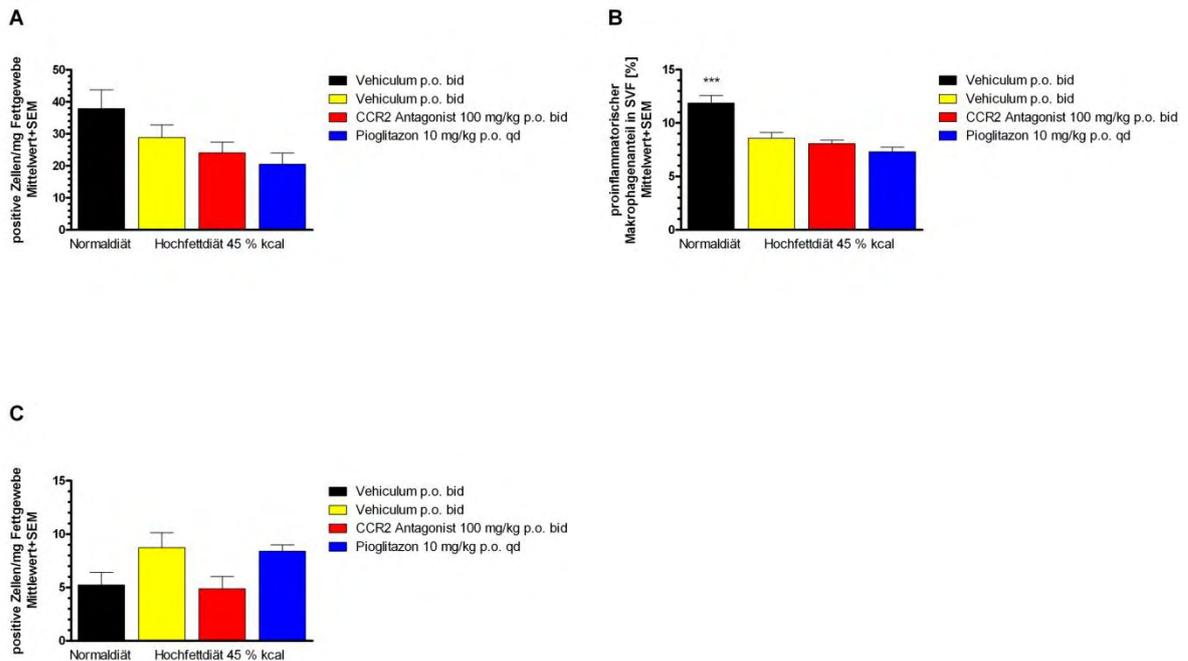
### 3. Ergebnisse

Die Konzentration der CD45<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> Zellen ist in Abb. 36 A aufgetragen. Diese repräsentieren einen proinflammatorischen Makrophagensubtyp. Auch hier ist die Kontrollgruppe auf NC mit 38 Zellen/mg im Vergleich zu der Kontrollgruppe auf HFD mit 29 Zellen/mg erhöht. Die proinflammatorischen Makrophagensubtypkonzentrationen der beiden Behandlungsgruppen sind mit 23 Zellen/mg bei dem CCR2-Antagonisten und 20 Zellen/mg bei Pioglitazon im Vergleich zur Kontrollgruppe auf HFD verringert.

Bei der Betrachtung des CD45<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> proinflammatorischen Makrophagenanteils in der SVF (Abb. 36B) zeigen sich mit 7-9 % keine Unterschiede zwischen den Gruppen auf HFD. Eine erwartete Reduktion des Makrophagenanteils bei der Kontrollgruppe auf NC entspricht mit einer Erhöhung auf 12 % dem Gegenteil.

Das F4/80-FITC, CD11b-APC und CD11c-PE Antikörperpanel wurde basierend auf dem Vorversuch vor Substanzbehandlung eingestellt. Bei der Analyse der Proben dieses Versuches zeigte sich jedoch, dass die Makrophagenpunktewolke im *Dot Blot* (F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Zellen) ein schwächeres CD11b-Signal zeigte als die Proben aus dem DIO-Versuch mit WT-Tieren (Daten nicht gezeigt). Da dieses Signal jedoch spezifisch für die CD11b<sup>+</sup> Zellen war, wurde das *Gate* entsprechen verschoben. Die distinkte positive Zellpopulation wurde wie in dem vorangegangenen Versuch analysiert und mit der Isotypkontrolle überprüft. Die Konzentration der F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> Zellen (Abb. 36C) zeigen keinen Unterschied zwischen den NC- mit 5 Zellen/mg und HFD Tieren mit 9 Zellen/mg. Pioglitazon scheint mit 8 Zellen/mg keine Auswirkungen bei diesem Versuch zu haben, der CCR2-Antagonist zeigt mit 5 Zellen/mg jedoch eine Reduktion auf den Ausgangswert der NC Tiere.

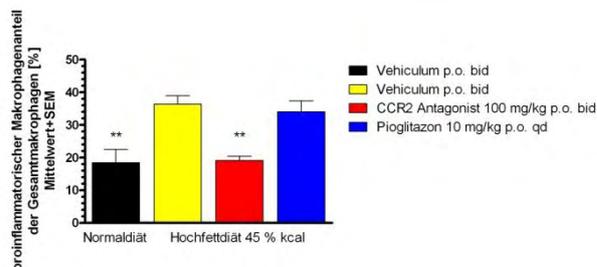
### 3. Ergebnisse



**Abbildung 36: Proinflammatorische Makrophagen der FACS-Analyse von männlichen *huCCR2* Mäusen der subchronischen Studie eines CCR2-Antagonisten**

**A** proinflammatorische Makrophagenkonzentration pro mg Hodenfettgewebe,  $CD45^+ CD11b^+ CD11c^+$ ,  $n \geq 8$  **B** proinflammatorischer Makrophagenanteil in der SVF,  $CD45^+ CD11b^+ CD11c^+$ ,  $n=9$  **C** proinflammatorische Makrophagenkonzentrationen pro mg Hodenfettgewebe,  $F4/80^+ CD11b^+ CD11c^+$ ,  $n=3$  **C** Pro-inflammatorischer Anteil der Gesamtmakrophagen,  $F4/80^+ CD11b^+ CD11c^+$ ,  $n=3$ ; One-Way ANOVA mit Dunnett-Test auf HFD Vehikel-Gruppe bezogen, \* entspricht  $p \leq 0,05$ , \*\* entspricht  $p \leq 0,01$ , \*\*\* entspricht  $p \leq 0,001$

Bei diesem Versuch wird ein proinflammatorischer Anteil der Gesamtmakrophagen berechnet. Dies wird durch das *Panel* ohne anti-CD45-Antikörper möglich. Beim Anteil der proinflammatorischen Makrophagen ( $F4/80^+ CD11b^+ CD11c^+$ ) von den Gesamtmakrophagen ( $F4/80^+ CD11b^+$ ) zeigt sich bei den Gruppen ein mit  $p < 0,01$  signifikanter Unterschied zwischen NC mit 18 % und HFD mit 36 % (Abb. 37). Auch die Reduktion der inflammatorischen Makrophagen durch die CCR2-Antagonist auf 19 % zeigt mit  $p < 0,01$  eine Signifikanz. Pioglitazon zeigt mit 34 % dagegen kaum einen Effekt.



**Abbildung 37:  $F4/80^+ CD11b^+ CD11c^+$  proinflammatorischer Makrophagenanteil der  $F4/80^+ CD11b^+$  Gesamtmakrophagen der FACS-Analyse von männlichen *huCCR2* Mäusen der subchronischen Studie eines CCR2-Antagonisten**

$n=3$ ; One-Way ANOVA mit Dunnett-Test auf HFD Vehikel-Gruppe bezogen, \* entspricht  $p \leq 0,05$ , \*\* entspricht  $p \leq 0,01$ , \*\*\* entspricht  $p \leq 0,001$

### 3. Ergebnisse

Die nach dem Versuch mit *C57BL/6J*-Mäusen auf HFD erwartete signifikante Erhöhung der gesamt- und proinflammatorischen Makrophagenkonzentration und -anteile kann in diesem Versuch nicht zwischen den HFD-Gruppen und den NC-Tieren festgestellt werden.

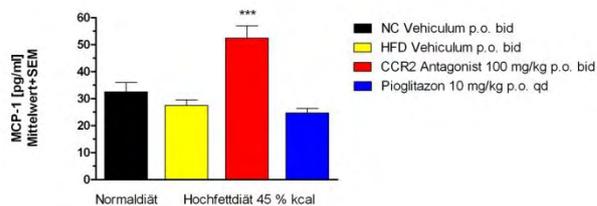
Die Positivkontrolle Pioglitazon zeigt die Tendenz die Makrophagenzahlen zu reduzieren und ist für den Makrophagenanteil der SVF sogar verglichen mit der HFD-Kontrollgruppe signifikant.

Der in dieser Studie getestete CCR2-Antagonist zeigt keinen Effekt auf die Makrophagenzahlen.

#### 3.4.2 Blutplasmakonzentration von MCP-1

Im Rahmen des Versuchs wurden verschiedene Cytokinkonzentrationen bestimmt. In Abb. 38 ist exemplarisch die Konzentration des CCR2-Liganden MCP-1 im Blutplasma dargestellt.

Da durch den CCR2-Antagonisten keine Bindung des Liganden MCP-1 an den Rezeptor CCR2 erfolgt, erhöht sich die Blutplasmakonzentration auf 52 pg/mL bei der mit dem CCR2-Antagonisten behandelten Gruppe signifikant. Alle drei anderen Gruppen sind mit 25-33 pg/mL ungefähr gleich.



**Abbildung 38: MCP-1 Konzentration im Blutplasma von männlichen huCCR2 Mäusen der subchronischen Studie eines CCR2-Antagonisten**

MSD-Messung,  $n \geq 12$ , One-Way ANOVA mit Dunnett-Test auf HFD Vehikel-Gruppe bezogen, \* entspricht  $p \leq 0,05$ , \*\* entspricht  $p \leq 0,01$ , \*\*\* entspricht  $p \leq 0,001$

MCP-1 ist im Blutplasma der mit dem CCR2-Antagonisten behandelten Gruppe signifikant erhöht.

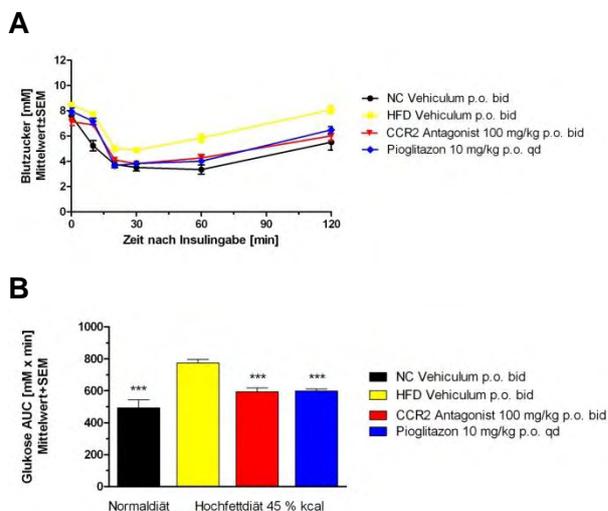
## 3. Ergebnisse

### 3.4.3 Metabolische Parameter

Der Insulintoleranztest (ITT) und der orale Glukosetoleranztest (oGTT) werden in der Diagnose von *Diabetes mellitus* dazu verwendet die Wirkung von Insulin im System zu überprüfen. In der subchronischen Studie des CCR2-Antagonisten werden diese beiden Standardtests (siehe Abb. 39-40) dazu verwendet den systemischen Effekt des CCR2-Antagonisten im Vergleich mit Pioglitazon als Positivkontrolle zu analysieren.

Der zeitliche Verlauf des ITTs in Abb. 39A zeigt deutlich die veränderte Insulinwirkung in der Kontrollgruppe auf HFD verglichen mit der Kontrollgruppe auf NC.

Die Abb. 39B zeigt die durch Integralrechnung ermittelte Flächen unter der in Abb. 39A gezeigten Konzentrations-Zeit-Kurven (*area under the curve* = AUC). Die erhöhten Blutzuckerwerte nach Insulingabe sind auf die verschlechterte Insulinsensitivität zurückzuführen. Die beiden Substanzgruppen (CCR2-Antagonist und Pioglitazon) zeigen beide einen signifikanten Effekt mit 600 mM x min verglichen mit der Kontrollgruppe auf HFD mit 775 mM x min und sinken damit beinahe auf den Level der Kontrollgruppe auf NC mit 500 mM x min (Abb. 39B).



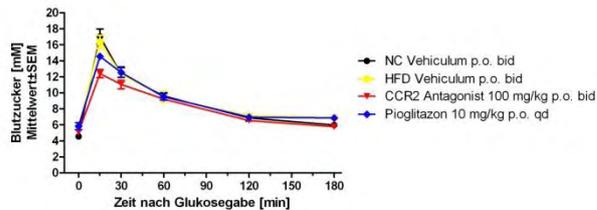
**Abbildung 39: ITT Tag21 in männlichen huCCR2 Mäusen der subchronischen Studie eines CCR2-Antagonisten**

**A** Blutzucker über die Zeit **B** Fläche unter der Kurve (AUC)  $n \geq 12$ , One-Way ANOVA mit Dunnett-Test auf HFD Vehikel-Gruppe bezogen, \* entspricht  $p \leq 0,05$ , \*\* entspricht  $p \leq 0,01$ , \*\*\* entspricht  $p \leq 0,001$

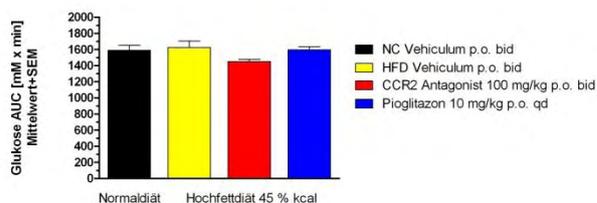
### 3. Ergebnisse

Im zeitlichen Verlauf des oGTTs in Abb. 40A ist hingegen kein Unterschied zwischen den beiden Kontrollgruppen erkennbar. Auch bei der Analyse der AUC zeigen beide Gruppen mit ca. 1600 mM x min gleich hohe Werte (Abb. 40B). Bei den beiden Substanzgruppen ist mit 1450 mM x min bei den mit dem CCR2-Antagonisten behandelten Mäusen und 1600 mM x min bei der Pioglitazongruppe ebenfalls keine Veränderung der Glukosetoleranz feststellbar.

**A**



**B**



**Abbildung 40: oGTT Tag 36 in männlichen huCCR2 Mäusen der subchronischen Studie eines CCR2-Antagonisten**

**A** Blutzucker über die Zeit **B** Fläche unter der Kurve (AUC);  $n \geq 12$ , One-Way ANOVA mit Dunnett-Test auf HFD Vehikel-Gruppe bezogen, \* entspricht  $p \leq 0,05$ , \*\* entspricht  $p \leq 0,01$ , \*\*\* entspricht  $p \leq 0,001$

Trotz einer verbesserten Insulinresistenz der Kontrollgruppe auf NC und den Substanzbehandelten Gruppen auf HFD im ITT zeigt sich im oGTT kein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen.

## 4. Diskussion

### 4. Diskussion

#### 4.1 Etablierung einer FACS-Analyse zur Quantifizierung von gesamt- und proinflammatorischen Makrophagen in murinem Fettgewebe

In diesem Projekt werden in der isolierten stromal vaskulären Fraktion (SVF) Makrophagen und ihr proinflammatorischer Phänotyp quantifiziert. Im Verlauf der Arbeit werden fünf verschiedene Antikörperpanels getestet. Sie markieren drei oder vier Proteine (CD45, F4/80, CD11b, CD11c). Alle *Gating*strategien der *Panels* basieren auf dem *Gate* P1, welches über SSC und FSC Zelldebris ausschließt und als SVF definiert wird.

##### 4.1.1 Tandempanel

Ein 4er *Panel* hat viele Vorteile wie Zeitersparnis, geringerer Antikörperinsatz und Zahlen für sowohl gesamt- als auch proinflammatorische Makrophagen aus einer Messung. Daher wird zur Analyse von gesamt- und proinflammatorischen Makrophagen zunächst ein solches 4er *Panel*, das Tandempanel, mit den Antikörpern CD45 PE, F4/80-FITC, CD11b-APC und CD11c-PECy7 verwendet (Kap. 3.2.1). CD45<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Zellen werden als Makrophagen und CD45<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> Zellen als proinflammatorische Makrophagen analysiert. Bei dieser *Labelzusammenstellung* kommt es jedoch bei dem PE-Cy7 Signal zu einer hohen Unspezifität (Kap 3.2.1). Dieses könnte durch den Anti-CD45-Antikörper mit PE-Label bedingt sein, der in den Kanal des PE-Cy7-Tandemlabels scheint. Dieses *Panel* wird aus diesem Grunde nicht weiter verwendet.

##### 4.1.2 Kombinationspanel

Das Kombinationspanel (4er *Panel*) mit den Antikörpern CD45-Alexa®700, F4/80-FITC, CD11b-APC und CD11c-PE hat ebenfalls die Vorteile eines 4er *Panels*. Das Alexa Fluor®700 Signal des Anti-CD45-Antikörpers im Kombinationspanel (4er *Panel*) hat jedoch eine geringere Intensität als das Signal des gleichen Antikörpers mit PE-Label (Kap. 3.2.3). Daher wird dieses *Panel* für weitere Versuche nicht mehr eingesetzt, weil in diesem Fall die gesamte *Gating*strategie auf dem zu schwachen Alexa Fluor®700 Signal des Anti-CD45-Antikörpers basiert (Abb.14B). Der entstehende Fehler könnte Ursache für die Abweichungen in den Makrophagenanteilen zwischen 4er und 3er *Panels* sein. Der Vorteil, alle vier Marker auf einmal messen zu können, überwiegt an dieser Stelle nicht den Nachteil von höheren mittleren Standardabweichungen. Die Analyse mit diesem *Panel* führt auf Grund dessen zu einer höheren Varianz und schlechteren Reproduzierbarkeit.

## 4. Diskussion

### 4.1.3 Dreifach-Färbungen

Die Signale der *Label* PE und APC sind aufgrund von schmalen *Peaks* hoch spezifisch (Abb. 9B und 9C). Sie weisen ferner weder ein ausgeprägtes *Fronting* noch *Tailing*, das heißt eine Signalstreuung vor oder nach dem *Peak*, auf. Das FITC-Signal hat hingegen ein hohes unspezifisches Hintergrundsignal, welches durch die hohe Autofluoreszenz der Makrophagen bedingt ist. Um trotzdem ein spezifisches Signal zu erhalten, wird der FITC-markierte anti-F4/80-Antikörper 10-fach stärker eingesetzt als die anderen Antikörper.

Der PE-markierte anti-CD45-Antikörper liefert zwei sehr scharfe *Peaks*. Eine *Gating*-Strategie, die auf diesem Signal basiert, führt daher zu sehr geringen systematischen Messfehlern, wodurch auch die geringen mittleren Standardabweichungen bei den Analysen bedingt sind. Das *Panel* ohne anti-CD45-Antikörper hat daher eine höhere Varianz der einzelnen Messungen als bei Messungen mit dem Makrophagen- und proinflammatorischen Makrophagenpanel, die beide den anti-CD45-Antikörper mit PE-*Label* enthalten.

Die Zusammenstellung des Makrophagenpanels mit CD45-PE, F4/80-FITC und CD11b-APC sowie des proinflammatorische Makrophagenpanels mit CD45-PE, CD11b-APC und CD11c-FITC hat sich als sehr genau erwiesen, da mit dieser Strategie die reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden konnten (Kap. 3.2.2). Diese beiden Panels werden daher für nachfolgende Versuche verwendet.

### 4.1.4 M1/M2-Panel

Das M1/M2-*Panel*, das in Dresden analysiert wurde, definiert nicht nur proinflammatorische Makrophagen basierend auf der CD11c-Expression, sondern definiert F4/80<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> CD206<sup>-</sup> Zellen als M1 Makrophagen und F4/80<sup>+</sup> CD11c<sup>-</sup> CD206<sup>+</sup> Zellen als M2 Phänotyp (Wentworth et al., 2010). Dieses doppelte *Gating* ist in der Lage eine gesicherte Aussage über die Polarisierung der Makrophagen zu treffen. Auffällig ist hierbei, dass Zellen existieren, die sowohl CD11c<sup>+</sup> als auch CD206<sup>+</sup> sind. Diese Makrophagen befinden sich in einer Polarisierungsänderung vom M1 zum M2 Phänotyp oder umgekehrt. Da jedoch keine Aussage darüber möglich ist, in welche Richtung die Polarisierung erfolgt, ist dieses Ergebnis nicht interpretierbar.

Für die Bestimmung von M1- und M2-Makrophagen müssen die Zellen permeabilisiert und fixiert werden, da die vom anti-CD206-Antikörper erkannte Region intrazellulär liegt. Die zusätzliche Aussage über die M1/M2-Polarisierung (Abb. 19-20) führt zu der gleichen Aussage wie die Analyse des proinflammatorischen Phänotyps (Abb. 17-18). Die Verhältnisse der analysierten Gruppen sind bei beiden Panels gleich. Das Ziel, Makrophagen und ihren Phänotyp zu quantifizieren, kann somit auch ohne einen anti-CD206-Antikörper

## 4. Diskussion

getroffen werden. Die Analyse der M1/M2-Polarisierung wiegt den Mehraufwand durch die Fixierung nicht auf.

Die Aussage über die Anzahl der Gesamtmakrophagen wird über das Makrophagenpanel möglich. Die Aussage über den proinflammatorischen Phänotyp der Makrophagen kann durch das proinflammatorische Makrophagenpanel umgesetzt werden. Dieses proinflammatorische Makrophagenpanel wird auch in anderen Arbeitsgruppen verwendet, was durch Veröffentlichungen deutlich wird (Nguyen et al., 2007). Somit können Fettgewebeproben im Hinblick auf ihren Inflammationsstatus untersucht werden. Dieses Ergebnis erfüllt damit das Ziel einer FACS-Analyse von Leukozyten im murinen Fettgewebe.

### 4.2 Methodenabgleich

Zur Überprüfung der FACS-Methode werden *ob/ob*- und *db/db*-Mäuse im Vergleich mit WT-Tieren (*C57BL/6J*) sowohl in der Arbeitsgruppe Chavakis an der TU Dresden als auch in der Abteilung CMDR von Boehringer Ingelheim in Biberach analysiert. Dabei werden Makrophagen und ihr proinflammatorischer Phänotyp quantifiziert.

Der Versuch mit dem Panel ohne Anti-CD45-Antikörper, welcher an der TU Dresden durchgeführt wurde, kann eine signifikante Erhöhung der Makrophagenkonzentration bei *ob/ob*-Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren feststellen (Abb. 17A). Mit dem Makrophagenpanel (Abb. 22A) war dies im Wiederholungsversuch genauso wenig möglich wie mit dem Panel ohne Anti-CD45-Antikörper (Abb. 22C). Eine Erklärung für die Abweichungen in den Ergebnissen des in Dresden durchgeführten Versuches und der Reproduktion in der Abteilung CMDR gibt es nicht. Ausgehend von einer Varianz im *in vivo* Modell könnte jedoch die Anzahl der analysierten Tiere eine Erklärung sein. Im Versuch mit den 3er Panels und dem Kombinationspanel, der in der Abteilung CMDRII durchgeführt wurde, wurden doppelt so viele Tiere pro Gruppe analysiert als bei der ersten Analyse mit dem Panel ohne anti-CD45-Antikörper und dem M1/M2-Panel, die an der TU Dresden in der Arbeitsgruppe Chawakis stattfand.

Trotz dieses Unterschiedes in den Makrophagenkonzentrationen kann in beiden Versuchen eine signifikante Erhöhung in den gesamt- und proinflammatorischen Makrophagenanteilen der SVF gezeigt werden. Mit dem Makrophagen- und proinflammatorischen Makrophagenpanel ist es in dem in der Abteilung CMDR durchgeführten Versuch sogar möglich höhere Signifikanzen für beide genetische Modelle mit beiden Antikörperpanels zu erzielen (Abb. 22B und 23B) als bei dem in Dresden durchgeführten Versuch (Abb. 17B und 18B).

## 4. Diskussion

Im Bezug auf die Makrophagenkonzentrationen der *ob/ob*-Mäuse weichen die Ergebnisse der beiden Versuche voneinander ab. Die Ergebnisse bei den gesamt- und proinflammatorischen Makrophagenanteilen der SVF zeigen für beide genetischen Modelle eine deutliche Erhöhung im Vergleich zu WT-Tieren. Allerdings ist der Unterschied im Vergleich zu WT-Mäusen für das *ob/ob*- größer als das *db/db*-Modell, wodurch die *ob/ob*-Mäuse als Insulinresistenzmodell im Hinblick auf die FACS-Analyse für Substanzbehandlungsversuche gewählt werden sollten.

### 4.3 Genetische Mausmodelle

In diesem Versuch werden *ob/ob*- und *db/db*-Mäuse im Bezug auf ATMs mit WT-Tieren (*C57BL/6J*) verglichen. Die in diesem Projekt verwendeten *C57BL/KsJ-db* Mäuse sind insulinresistent, hyperglykämisch und prägen einen Diabetes Typ II aus. Die *C57BL/6J-ob* Mäuse sind jedoch nur insulinresistent, da die  $\beta$ -Zellen eine Hyperglykämie durch kompensatorische Hyperinsulinämie ausgleichen (Coleman & Hummel, 1974; Kennedy et al., 2010; Srinivasan & Ramarao, 2007). Es wird erwartet, dass die genetischen Mausmodelle, die beide Insulinresistenzen ausprägen, sowohl in gesamt- als auch proinflammatorischen Makrophagenkonzentrationen und -anteilen erhöht sind.

Der Vergleich der beiden getesteten genetischen Mausmodelle, die beide Insulinresistenzen ausprägen, zeigt eine Erhöhung der gesamt- und proinflammatorischen Makrophagenkonzentrationen, und auch bei den Makrophagenanteilen bei *ob/ob*-Mäusen im Vergleich zu *db/db*-Tieren. Die Makrophagenzahlen korrelieren zudem mit dem Körpergewicht, welches bei den adipösen *ob/ob*-Mäusen ebenfalls erhöht verglichen mit den *db/db*-Tieren ist.

Es hat sich gezeigt, dass in den genetischen Modellen die Konzentration der gesamt- und proinflammatorischen Makrophagen, bezogen auf das Fettgewebsgewicht verglichen mit dem Wildtyp, in der Analyse mit den 3er *Panels* und dem Kombinations*panel*, die in der Abteilung CMDRII durchgeführt wurde, (Kap. 3.3.1.2) nicht erhöht ist (Abb. 22A und 23A).

Dabei muss jedoch die im FACS-Gerät analysierte Zellfraktion mit einbezogen werden. Denn die SVF entspricht nur den sich im Fettgewebe befindlichen Zellpopulationen. Ausgenommen sind neben Erythrozyten und freien Leukozyten im Blutgefäßsystem auch die Adipozyten. Diese Zellpopulation bildet jedoch das Fettgewebe und ist in *ob/ob*- und *db/db*-Tieren stark vergrößert, um die überschüssige Energie in Form von Fett speichern zu können (Xu et al., 2003). Da sich Makrophagen nur in Zellzwischenräumen bewegen, ist die Verteilung der Immunzellen im Fettgewebe von den genetischen Tiermodellen aufgrund dessen anders als bei WT-Mäusen. Die in der SVF gemessenen Makrophagen werden auf

## 4. Diskussion

das Gewicht des Gesamtfettgewebes bezogen, wobei die SVF nicht dem Fettgewebe selber, sondern nur die sich im Fettgewebe befindlichen Zellen, entspricht. Da das Fettgewebe bei den genetischen Modellen und den WT-Mäusen sich aber im Hinblick auf das Fettgewebsgewicht um ein vielfaches unterscheidet, ist der Vergleich im Hinblick auf die Zellkonzentration daher schwierig. Die Darstellung der Ergebnisse in Zellzahl/mg ist trotzdem wichtig, stellt sie doch multipliziert mit dem Fettgewicht (Abb. 21) eine Absolutzahl an gesamt- und proinflammatorischen Makrophagen dar. Es wird durch erhöhte Makrophagenzahlen im Fettgewebe eine chronische meta-Entzündung ausgelöst, die bei den Adipozyten eine lokale Insulinresistenz auslösen kann.

Für eine Aussage über den Status einer meta-Entzündung im Fettgewebe kann außerdem der gesamt- und proinflammatorische Makrophagenanteil innerhalb der SVF verwendet werden. Mit der Gesamtzellzahl der analysierten Fraktion als Bezugsgröße ist es möglich eine Aussage über die im genetischen Tiermodell veränderte Makrophageninfiltration im Fettgewebe zu treffen. Diese ist wie erwartet auch signifikant erhöht (Abb. 22B und 23B) und bietet ein Fenster für Effekte nach einer Substanzbehandlung.

Für einen solchen Versuch werden mit Substanzen behandelte *ob/ob*- oder *db/db*-Mäuse mit einer Vehikelgruppe desselben genetischen Modells als Kontrolle verglichen. Ziel ist es, eine Reduktion der ATM-Zahlen einer entwickelten Substanz gegen das metabolische Syndrom nachzuweisen, die sich auch in einer erhöhten Insulinsensitivität äußern würde. Da bei einem solchen Versuchsaufbau ohne eine signifikante Gewichtsabnahme der Mäuse von einer vergleichbaren Adipozytengröße ausgehen kann, könnten sich die möglichen Effekte auch in der gesenkten Makrophagenkonzentrationen pro Gewicht widerspiegeln.

In Folge der Gendefekte kommt es bei *ob/ob*- und *db/db*-Mäusen zu einer Gewichtszunahme mit Entwicklung einer Insulinresistenz. Als Arbeitshypothese für diese Arbeit wird angenommen, dass sich eine entstehende meta-Entzündung in erhöhten gesamt- und proinflammatorischen Makrophagenzahlen im Vergleich zu Wildtyptieren niederschlagen würde. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass weder für *db/db*- noch für *ob/ob*-Mäuse erhöhte gesamt- und proinflammatorische Makrophagenkonzentrationen im Vergleich zu WT-Mäusen nachweisbar sind (Kap. 3.3.1). Im genetischen Mausmodell sollten die Makrophagenkonzentrationen daher nicht als *Readout* für Substanzeffekte verwendet werden.

Die gesamt- und proinflammatorischen Makrophagenanteile der SVF sind jedoch für *db/db*- und *ob/ob*-Mäuse im Vergleich zu WT-Tieren signifikant erhöht (Kap. 3.3.1). Diese Daten sind konsistent zu der Beschreibung eines Versuchs, in dem drei Monate alte *ob/ob*-Mäuse

## 4. Diskussion

im Unterschied zu WT-Tieren im selben Alter einen deutlich erhöhten gesamt- und proinflammatorischen Makrophagenanteil aufweisen (Nguyen et al., 2007).

Aufgrund des größeren Unterschieds im Vergleich zu WT-Mäusen bei den gesamt- und proinflammatorischen Makrophagenanteilen der SVF, ist das *ob/ob*- im Hinblick auf die FACS-Analyse dem *db/db*-Modell vorzuziehen.

### 4.4 Das Diät induzierte Adipositas(DIO)-Modell

Bei dem in diesem Projekt verwendeten DIO-Modell handelt es sich um eine Induzierung der Adipositas durch die 45 % kcal HFD (D12451). Als Kontrollfutter wird die vom Hersteller Research Diets empfohlene NC (D12450B) mit 10 % kcal aus Fett verwendet. Innerhalb der Gruppen auf HFD und NC kommt es zu Körpergewichtsunterschieden, die sich in der Masse des Hodenfetts und den Makrophagenzahlen widerspiegeln. Ursache für die Gewichtsunterschiede innerhalb einer Versuchsgruppe kann jedoch auch die normale biologische Variabilität der einzelnen Versuchstiere sein. Daher werden die Tiere im DIO-Versuch um starke Schwankungen auszuschließen ihrem Gewicht nach randomisiert.

Sowohl in der gesamt- und proinflammatorischen Makrophagenkonzentration (Abb. 15C und 15E) als auch im gesamt- und proinflammatorischen Makrophagenanteil der SVF (Abb. 15D und 15F) ergibt sich eine signifikante Erhöhung bei HFD-Mäusen im Vergleich zu NC-Tieren. Das DIO-Modell eignet sich aufgrund dessen für den Nachweis einer Reduktion der ATM-Zahlen durch Substanzbehandlung. In einem solchen Versuchsaufbau würde von einer antiinflammatorischen Wirkung einer getesteten Substanz in HFD-Tieren ausgegangen werden, die sich in verringerten ATM-Werten im Vergleich zu einer Vehikel-HFD-Gruppe als Negativkontrolle äußern würde. Dabei sollten die ATM-Zahlen einer Wirkstoffgruppe zwischen dieser Negativkontrolle und den NC gefütterten Tieren liegen.

Da bei DIO-Mäusen die Insulinresistenz ähnlich wie beim Menschen durch hoch kalorische Nahrung induziert ist, könnte nach aktuellem Forschungsstand eine durch Makrophagen ausgelöste meta-Entzündung im Fettgewebe einen Beitrag zur Entwicklung einer Insulinresistenz leisten. In diesem Projekt konnte gezeigt werden, dass sowohl der gesamt- und proinflammatorische Makrophagenanteil der SVF als auch die gesamt- und proinflammatorische Makrophagenkonzentration bezogen auf das Fettgewicht in HFD-Mäusen im Vergleich zu NC-Tieren signifikant erhöht ist (Kap. 3.3.2). Diese Daten werden durch die Ergebnisse vorangegangener Publikationen gestützt, bei denen  $F4/80^+ CD11b^+$  Makrophagen und ihr  $F4/80^+ CD11b^+ CD11c^+$  proinflammatorischer Phänotyp durch HFD bei *C57BL/6*-Mäusen signifikant erhöht waren (Nguyen et al., 2007; Oh et al., 2012).

## 4. Diskussion

Die Makrophagenkonzentration wird aufgrund der signifikanten Erhöhung im DIO-Modell als Vergleichsgröße verwendet. Sie gibt zusätzlich zu den Makrophagenanteilen in der SVF Aufschluss über die erhöhte Monozytenextravasation im DIO-Modell in absoluten Zahlen.

### 4.5 Vergleich der Adipositas-Modelle

In diesem Projekt wurden zwei genetische Adipositas-Modelle, *ob/ob*- und *db/db*-Mäuse, sowie ein durch HFD induziertes Adipositas-Modell verwendet. Ziel war der Nachweis von signifikanten Unterschieden für die Substanzbehandlung bei der Wirkstoffforschung.

Die genetischen Insulinresistenzmodelle weisen nur für die gesamt- und proinflammatorischen Makrophagenanteile signifikante Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp auf, während sich im DIO-Modell auch die gesamt- und proinflammatorische Makrophagenkonzentration als Parameter für den Test von Substanzeffekten eignet. Dieses Modell bietet zusätzlich den Vorteil auch Wirkstoffe bei gentechnisch veränderten Mäusen testen zu können. Ist eine Substanz humanspezifisch und nicht kreuzreaktiv, kann über die Humanisierung des molekularen Angriffspunkts mit DIO-Modell dennoch eine Substanzbehandlung in Mäusen ohne die Rückkreuzung der Tiere in ein Krankheitsmodell, möglich gemacht werden (so geschehen im CCR2-Versuch).

Der Nachteil des DIO-Modells gegenüber den genetischen Mausmodellen ist jedoch die längerfristige Versuchsplanung für Substanzbehandlungs-Versuche aufgrund der Anfütterungsphase. Es hat sich in den letzten Versuchen außerdem der Trend abgezeichnet, dass Mäuse auf den entsprechenden Diäten hohe biologische Variabilität im Körpergewicht aufweisen. Um dieses Problem zu umgehen, sollten die Versuchstiere daher vor Substanzbehandlung nach dem Gewicht randomisiert werden, um verlässliche FACS-Daten zu erhalten.

Bei den beiden genetischen Modellen besteht die in Kap. 4.3 erörterte Problematik mit den Makrophagenkonzentrationen aufgrund der Adipozytengröße. Die Adipozyten sind bei den adipösen Mausmodellen durch die Einlagerung von Fett im Vergleich zu den Wildtyptieren stark vergrößert und das Hodenfettgewebsgewicht damit ebenfalls stark erhöht. Bei einem Bezug der in der SVF gemessenen Makrophagen auf das Hodenfettgewebsgewicht sind die sich daraus ergebenden Konzentrationen für die Wildtypmäuse im Vergleich mit den genetischen Modellen erhöht. Diese Diskrepanz kann jedoch in einer Versuchsplanung mit *ob/ob*- oder *db/db*-Mäusen in allen Gruppen vermieden werden, weil dann von einer gleichen Adipozytengröße und Fettgewebsgewichtkonzentration ausgegangen werden kann.

## 4. Diskussion

### 4.6 Erhöhte ATM-Zahlen in adipösen Mäusen

Im Fettgewebe nimmt die Zahl der ATMs mit steigendem Körpergewicht zu. Ihre Anzahl korreliert außerdem mit Werten für Insulinresistenz (Cancello et al., 2005; Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003; Lumeng et al., 2007a). Desweiteren sind ATMs Quelle für proinflammatorische Cytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-6, die in der Lage sind die Insulinwirkung in Adipozyten zu inhibieren. Daher stehen sie im Mittelpunkt der Forschung nach einer möglichen Verbindung zwischen Inflammation und Insulinresistenz (Xu et al., 2003; Lumeng et al., 2007a).

Die Marker für Makrophagen und ihren proinflammatorischen Phänotyp sind bekannt und etabliert. Desweiteren ist ein Zusammenhang zwischen Körpergewicht und einer Fettgewebsinflammation, die sich durch erhöhte ATMs manifestiert, bekannt. Doch auch der Anteil der Zellen, die den Makrophagenmarker F4/80 exprimieren, ist signifikant positiv korreliert mit der Adipozytengröße und dem Körpergewicht (Weisberg et al., 2003). Deshalb eignet sich die FACS-Methode sehr gut, um eine Aussage über den Inflamationsstatus im Fettgewebe zu treffen. Diese ist von großem Interesse da eine anti-inflammatorische Wirkung einer Substanz einen zusätzlichen Vorteil gegenüber Konkurrenzwirkstoffen bedeuten könnte.

Die in dieser Arbeit generierten Daten sowie die Literaturdaten beschreiben eine meta-Inflammation im Fettgewebe von adipösen Mäusen, die sich in einer erhöhten gesamt- und proinflammatorischen Makrophagenanzahl äußert. In späteren Versuchen wird geklärt werden, wie stark die Auswirkung von reduzierten ATM-Zahlen auf metabolische Parameter wie Insulinresistenz ist.

## 4. Diskussion

### 4.7 CCR2-Antagonismus als Therapiemöglichkeit für Typ II Diabetes

CCR2 und sein Ligand MCP-1 spielen eine Schlüsselrolle bei der durch M1 Makrophagen ausgelösten Entzündungsantwort. Ausgehend von einer Interaktion der beiden Proteine, die essentiell für die Einwanderung von Monozyten in Gewebe ist, wird eine Reduktion der Fettgewebismakrophagen durch einen CCR2-Antagonisten erwartet (Weisberg et al., 2006; Anderson et al., 2010; Lumeng et al., 2008; Kanda et al., 2006).

Der in diesem Versuch getestete CCR2-Antagonist ist ein humanspezifischer nicht-kreuzreaktiver Wirkstoff. Aus diesem Grund werden männliche *huCCR2* Mäuse verwendet, bei denen der molekulare Angriffspunkt des CCR2-Antagonisten humanisiert wurde. Für die Induzierung einer Adipositas wird den Mäusen eine HFD (D12451) oder als Kontrolle eine entsprechende NC (D12450B) gefüttert. Die Positivkontrolle für die Abnahme der Makrophagenzahlen ist Pioglitazon (Xu et al., 2003). Die Kontrollgruppen auf HFD und NC bekommen einen Vehikel appliziert.

#### 4.7.1 ATM-Zahlen vor Substanzbehandlung

In einem Vorversuch vor Beginn der Substanzbehandlung konnte bei den *huCCR2* Mäusen nach 6 Wochen Diät kein Unterschied bei den gesamt- und proinflammatorischen Makrophagenkonzentrationen nachgewiesen werden (Abb. 32-33). Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kontrollgruppen auf NC und HFD, der zum Nachweis von Substanzeffekten benötigt wird, nachweisbar. Dieser Umstand könnte auf die kurze Anfütterungsphase zurückzuführen sein.

Da in dem vorangegangenen DIO-Versuch mit *C57BL/6J* Tieren, die 17 Wochen mit den Diäten gefüttert wurden, signifikante Erhöhungen der HFD Tiere im Vergleich zu den NC-Mäusen nachgewiesen werden konnte (Kap. 3.3.2), wird auch in diesem Versuch ein Unterschied in den ATM-Zahlen zwischen den beiden Kontrollgruppen auf HFD und NC erwartet. In den gesamt- und proinflammatorischen Makrophagenzahlen bei den verwendeten *huCCR2* Mäusen konnte jedoch auch nach Ende der sechs Wochen dauernden Substanzbehandlung und einer Diätfütterung von insgesamt 17 Wochen kein Unterschied zwischen den beiden Kontrollgruppen auf NC und HFD festgestellt werden (Abb. 35-36). Für die Substanzbehandlung in diesem Versuch wurde jedoch nicht nach dem Körpergewicht randomisiert, sondern primär nach metabolischen Parametern. Dies könnte zu den hohen Schwankungen im Körpergewicht, Hodenfettgewebsgewicht und Makrophagenzahlen der NC-Gruppe geführt haben. Daher sollte in Zukunft bei nachfolgenden Versuchen im Hinblick auf die FACS-Analyse auf das Körpergewicht der Versuchstiere randomisiert werden.

## 4. Diskussion

### 4.7.2 Anti-inflammatorische Wirkung von Pioglitazon im DIO-Modell

In einer vorangegangenen Publikation konnte bei HFD-Mäusen eine Reduktion der Makrophagenkonzentration bezogen auf das Fettgewicht sowie eine Verschiebung der Makrophagenpolarisation zum M1 Phänotyp durch Pioglitazonbehandlung festgestellt werden (Fujisaka et al., 2009). In diesem Projekt wurde Pioglitazon daher als Positivkontrolle getestet. Beim Makrophagenanteil in der SVF kann im Versuch ein signifikanter Rückgang der Pioglitazon-behandelten Gruppe gezeigt werden (Abb. 35B). Für die gesamt- und proinflammatorische Makrophagenkonzentration (Abb. 35A und 36A) sowie den proinflammatorischen Makrophagenanteil (Abb. 36B) ist eine Tendenz erkennbar.

### 4.7.3 CCR2-Antagonismus ohne anti-inflammatorischen Effekt im Hodenfettgewebe

Es konnte bereits gezeigt werden, dass der CCR2-Antagonist Propagermanium die ATM-Akkumulation im Hodenfettgewebe reduziert und die Makrophagenpolarisation von einem proinflammatorischen M1- zu einem M2-Phänotyp in DIO-Mäusen verändert (Tamura et al., 2010). Ähnliche Effekte werden daher auch von dem in diesem Versuch getesteten CCR2-Antagonisten erwartet.

Bei einem CCR2-Antagonismus wird von einer kompetitiven oder nicht-kompetitiven Bindung des CCR2-Antagonisten an CCR2 ausgegangen, die zu einer Erhöhung der MCP-1-Konzentration im Blutplasma führen würde. In der mit dem CCR2-Antagonist behandelten Gruppe ist dieser erhöhte Plasmaspiegel nachweisbar (Kap. 3.4.2), womit die Bindung des getesteten CCR2-Antagonisten an den Rezeptor nachgewiesen ist.

Ausgehend von einem kompetitiven Antagonismus konkurrieren Agonist, der endogene Ligand MCP-1, und der Antagonist um die Bindungsstelle des Rezeptors CCR2. Diese Gleichgewichtsreaktion ist von den Konzentrationen des Agonisten und Antagonisten abhängig. Aufgrund einer sehr viel höheren Affinität des CCR2-Antagonisten zu dem Rezeptor kann es trotz eines erhöhten MCP-1 Plasmaspiegels zu keiner Verdrängung des Antagonisten im kompetitiven Modell kommen. Bei sinkender Antagonistenkonzentration sind jedoch bei der erhöhten MCP-1-Konzentration negative Effekte auf die meta-Inflammation im Fettgewebe durch eine erhöhte Einwanderung von Monozyten zu befürchten. Diese sind mit einer transgenen Überexpression von MCP-1 zu vergleichen, welche sich in erhöhten ATM-Zahlen äußert, und zu einer Beeinträchtigung der Insulinwirkung führt (Ferrante, Jr., 2007). Eine abgesenkte CCR2-Antagonistenkonzentration wäre daher durch regelmäßige Dosen unbedingt zu vermeiden.

## 4. Diskussion

Entgegen der Erwartungen zeigt der CCR2-Antagonist unter den untersuchten Bedingungen trotz Bindung an den Rezeptor keinen Effekt auf die Makrophagenakkumulation im Hodenfettgewebe der getesteten männlichen *huCCR2*-Mäuse (Abb. 35-37). Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis ist der Rückschluss auf einen oder mehrere kompensatorische Mechanismen für die Einwanderung der ATMs. Diese Schlussfolgerung wird durch Studien gestützt, in denen in männlichen MCP-1 KO Mäusen mit *C57BL/6* Hintergrund ebenfalls keine veränderten Makrophagenlevel nachgewiesen werden konnten (Inouye et al., 2007; Kirk et al., 2008). Unter den untersuchten Bedingungen zeigte der CCR2-Antagonist keinen Einfluss auf die ATM-Akkumulation. Es besteht trotzdem die Möglichkeit, dass der Wirkstoff mit anderen Versuchsparametern, wie genetischer Hintergrund, Alter und Geschlecht der Mäuse sowie Analysezeitpunkt, einen Einfluss auf den Inflammationsstatus im Fettgewebe zeigt. Nach einem Versuch kann keine gefestigte Aussage über den Einfluss eines CCR2-Antagonisten auf die ATM-Zahlen getroffen werden.

### **4.7.4 Zusammenhang zwischen der Fettgewebs-Inflammation und den metabolischen Parametern in diesem Versuch**

Seit dem Jahr 2003 wird in der Forschung von einem Zusammenhang zwischen adipös bedingter Insulinresistenz und einer chronischen Entzündung im Fettgewebe, die sich in Form von einer Akkumulation von Makrophagen im weißen Fettgewebe ausdrückt, ausgegangen (Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003).

Sowohl bei der Kontrollgruppe als auch bei den mit Substanz behandelten Gruppen kann eine verbesserte Insulintoleranz im ITT an Tag 21 der Substanzbehandlung, die sich durch gesenkte Blutzuckerwerte nach Insulingabe im Vergleich zur Kontrollgruppe auf HFD äußert, festgestellt werden (Abb. 39).

Die Erwartung, beim oGTT eine verbesserte Glukosetolleranz bei der Kontrollgruppe auf NC, verglichen mit der Kontrollgruppe auf HFD zu erzielen, wurde nicht erfüllt. Im oGTT an Tag 36 der Substanzbehandlung (Abb. 40) kann kein Unterschied zwischen den beiden Kontrollgruppen auf NC und HFD festgestellt werden.

In diesem Versuch ist ein Zusammenhang zwischen einer Makrophagenakkumulation und adipös bedingter Insulinresistenz nicht erkennbar. Ein Zusammenhang zwischen metabolischen Parametern in der Diabetes Typ II-Forschung und Makrophagenzahlen als Nachweis für eine Inflammation im Fettgewebe ist nach den in diesem Versuch erarbeiteten Daten jedoch auch nicht auszuschließen.

## 5. Ausblick

### 5. Ausblick

Die in der Abteilung CMDR etablierte und in Zusammenarbeit mit der TU Dresden validierte FACS-Methode zur Analyse von gesamt- und proinflammatorischen ATMs aus murinem Fettgewebe wird in Zukunft als zusätzliche Methode für Versuche in der Diabetes Typ II Forschung verwendet werden. Mittels der FACS-Analyse kann eine Aussage über die meta-Inflammation im Fettgewebe getroffen, und somit ein wertvoller Beitrag bei Substanztests in genetischen *db/db*- und *ob/ob*- sowie in DIO-Mausmodellen geleistet werden.

Welchen Anteil ATMs an der Entwicklung von Insulinresistenz und Diabetes Typ II haben, wird in Zukunft weiter geklärt werden müssen. Die FACS-Daten können in Verbindung mit metabolischen Parametern in Versuchen der Abteilung CMDR einen wesentlichen Beitrag bei der Entscheidung über Wirkstoffweiterentwicklungen leisten.

Für weitergehende Forschung könnte die Entwicklung einer FACS-Analysemethode anderer Gewebe (z.B. Leber) aus Mäusen oder auch anderer Spezies (z.B. Ratten) möglich sein. Die in dieser Arbeit entwickelte FACS-Analyse für murine Fettgewebsproben kann dabei die Grundlage für weitere Methoden darstellen.

## 6. Zusammenfassung

### 6. Zusammenfassung

Die Forschung auf dem Gebiet des Typ II Diabetes gewinnt aufgrund der steigenden Prävalenz von Adipositas und den gesundheitlichen Risiken für Menschen mit erhöhtem BMI an Bedeutung. Beim metabolischen Syndrom wird von einem kausalen Zusammenhang zwischen adipös bedingter Insulinresistenz und einer Inflammation im Fettgewebe ausgegangen. Letztere manifestiert sich unter anderem in einer erhöhten Anzahl von Fettgewebsmakrophagen (ATMs) verglichen mit normalgewichtigen Individuen. Aufgrund dessen ist die Analyse des Inflamationsstatus im Fettgewebe von großem wissenschaftlichem Interesse.

In dieser Arbeit wurde daher ein Aufarbeitungsprotokoll zur Isolierung der stromal vaskulären Fraktion (SVF) aus murinem Fettgewebe entwickelt. Diese Zellfraktion wurde mit einem FACS-Gerät analysiert. Mittels dieser Methode besteht die Möglichkeit CD45<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Makrophagen und CD45<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> proinflammatorische Makrophagen quantitativ zu analysieren.

Ein Methodenabgleich fand in der Arbeitsgruppe von Dr. Chavakis an der TU Dresden statt. Es wurden sowohl *db/db*- als auch *ob/ob*-Mäuse als genetische Modelle für Insulinresistenz im Hinblick auf ihren Inflamationsstatus im Fettgewebe untersucht. Dabei konnte für beide Modelle eine signifikante Erhöhung des gesamt- und proinflammatorischen Makrophagenanteils in der SVF im Vergleich zu Wildtyptieren (*C57BL/6J*) gemessen werden. Aufgrund der höheren gesamt- und proinflammatorischen Makrophagenanteilen im *ob/ob*-Modell ist dieses im Hinblick auf die FACS-Analyse dem *db/db*-Modell vorzuziehen.

Für das Hochfett-diät-induzierte Adipositas-Modell wurde, sowohl für gesamt- und proinflammatorische Makrophagenkonzentrationen pro mg Fettgewebe, als auch für den gesamt- und proinflammatorischen Makrophagenanteil in der SVF, ein signifikanter Unterschied zu den entsprechenden Kontrolltieren nachgewiesen.

Die etablierte Methode zur Untersuchung des Inflamationsstatus kann einen wertvollen Beitrag zur Wirkstoffentwicklung im Bereich der Diabetes Typ II Forschung leisten. Ein molekularer Angriffspunkt in der durch ATMs ausgelösten meta-Inflammation ist die Leukozytenextravasation, wobei der Rezeptor CCR2 und sein Ligand MCP-1 eine Schlüsselrolle spielen. Ein getesteter CCR2-Antagonist zeigte keinen Effekt auf die Reduktion der gesamt- und proinflammatorische ATM-Zahlen, was möglicherweise auf kompensatorische Mechanismen im *in vivo* Modell zurückzuführen ist.

Die FACS-Analyse kann in Zukunft in Verbindung mit metabolischen Parametern in Substanztests der Abteilung CMDR einen Beitrag zur Wirkstoffentwicklung von Diabetes Typ II-Medikamenten leisten.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

### 7. Abkürzungsverzeichnis

µL	Mikroliter
APC	Allophycocyanin
AT	<i>Adipose tissue</i>
ATM	<i>Adipose tissue macrophage</i>
AUC	<i>area under the curve</i>
bid	<i>bis in die</i> (lateinisch für: zweimal täglich)
BMI	<i>Body mass index</i>
BSP	Bruttosozialprodukt
CCL11	C-C Motiv Chemokinrezeptor 11
CCL2	MCP-1; C-C Motiv Chemokinligand 2
CCL7	C-C Motiv Chemokinrezeptor 7
CCL8	C-C Motiv Chemokinrezeptor 8
CCR2	C-C Motiv Chemokinrezeptor 2
CMDR	Cardio Metabolic Diseases Research
DB	diabetische Maus
DIO	<i>Diet induced obesity</i>
DPP-4	Dipeptidyl Peptidase 4
E	Einheiten
EGF-TM7	<i>epidermal growth factor seven-transmembrane receptor</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FITC	Fluorescein
FMO	<i>fluorescence minus one</i>
FSC	<i>forwards scatter</i>
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide 1</i>
H <sub>2</sub> O	Wasser
HbA1C	Glykohämoglobin
HFD	Hochfettdiät
i.p.	intra peritoneal
IFN	Interferon
IKK	Inhibitor der κB Kinase
IL-10	Interleukin 10
IL-13	Interleukin 13
IL-1β	Interleukin 1β

## 7. Abkürzungsverzeichnis

IL-4	Interleukin 4
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
ITT	Insulintolleranztest
JNK	Junk N-terminal Kinase
kg	Kilogramm
KO	<i>knock-out</i>
KRBH	Krebs Ringer Buffer with Hepes
LPS	Lipopolysaccharide
M1	klassisch aktivierte Makrophagen
M2	alternativ aktivierte Makrophagen
MAC-1	Makrophagen-1 Antigen
MCP-1	CCL2; <i>monocyte chemotactic protein-1</i>
mg	Milligramm
MIF	Makrophagenmigrations-Inhibitionsfaktor
min	Minute
mL	Milliliter
NC	Normal chow
OB	<i>obesity protein mouse</i>
oGTT	oral Glucosetolleranztest
p.o.	per oral
PE	Phycoerythrin
PMT	<i>Photomultiplier tubes</i>
PPAR $\gamma$	Peroxisomproliferator aktivierter Receptor $\gamma$
PTP	Protein Tyrosin Phosphatase
qd	<i>quaque die</i> (lateinisch für: jeden Tag)
RT	Raumtemperatur
rtPCR	<i>real time</i> Polymerasekettenreaktion
SGLT-2	<i>sodium glucose transport protein</i>
SSC	<i>sidewards scatter</i>
SUR-1	<i>sulfonylurea receptor 1</i>
SVF	stromal vaskuläre Fraktion
Th1	T-Helfer 1-Zelle
Th2	T-Helfer 2-Zelle
TNF	Tumornekrosisfaktor
TU	Technische Universität

## 7. Abkürzungsverzeichnis

USA	<i>United States of America</i>
WHO	<i>World health organisation</i>
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

## 8. Abbildungsverzeichnis

### 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Typ II Diabetes weltweit .....	VII
Abbildung 2: Evolution von Fettgewebe, Leber und hämatopoetischem System in einzelne Organe bei Säugetieren .....	IX
Abbildung 3: Makrophagenpolarisierung in fettleibigkeitsinduzierter Insulinresistenz im adipösen Fettgewebe.....	XI
Abbildung 4: <i>C57BL/6</i> und <i>db/db</i> im Alter von 11 Wochen.....	XVII
Abbildung 5: Auswertungsschema .....	XXX
Abbildung 6: Fluoreszenzspektren des Tandempanels (4er Panel).....	XXXV
Abbildung 7: Gates des Makrophagenpanels mit CD45-PE, F4/80-FITC und CD11b-APC .....	XXXVI
Abbildung 8: Isotypkontrolle des Makrophagenpanels mit Rat IgG2b $\kappa$ -PE, Rat IgG2b-FITC und Rat IgG2b $\kappa$ -APC .....	XXXVII
Abbildung 9: Gates des proinflammatorischen Makrophagenpanels mit CD45-PE, CD11b-APC und CD11c-FITC .....	XXXVIII
Abbildung 10: Isotypkontrolle des proinflammatorischen Makrophagenpanels mit Rat IgG2b $\kappa$ -PE, Rat IgG2b $\kappa$ -APC und Hamster IgG1 $\lambda$ 1-FITC.....	XXXIX
Abbildung 11: Gates des Antikörperpanels ohne Anti-CD45-Antikörper mit F4/80-FITC, CD11b-APC und CD11c-PE .....	XL
Abbildung 12: Isotypkontrolle des Antikörperpanels ohne Anti-CD45-Antikörper mit Rat IgG2b-FITC, Rat IgG2b $\kappa$ -APC und Hamster IgG1 $\lambda$ 1-PE .....	XL
Abbildung 13: Fluoreszenzspektren des Kombinationspanels (4er Panel) mit FITC, PE, APC und Alexa Fluor700 .....	XLI
Abbildung 14: Gates des 4er-Antikörperpanels mit CD45-Alexa700, F4/80-FITC, CD11b-APC und CD11c-PE .....	XLII
Abbildung 15: Isotypkontrolle des 4er-Antikörperpanels mit Rat IgG2b $\kappa$ -Alexa700, Rat IgG2b-FITC, Rat IgG2b $\kappa$ -APC und IgG1 $\lambda$ 1-PE .....	XLIII
Abbildung 16: Hodenfettgewebsgewicht der FACS-Analyse in Dresden von 10 Wochen alten männlichen <i>C57BL/6J</i> -, <i>ob/ob</i> - und <i>db/db</i> -Mäusen.....	XLIV
Abbildung 17: F4/80 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> Makrophagen aus der FACS-Analyse in Dresden von 10 Wochen alten männlichen <i>C57BL/6J</i> -, <i>ob/ob</i> - und <i>db/db</i> -Mäusen .....	XLV
Abbildung 18: F4/80 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup> proinflammatorische Makrophagenzahlen aus der FACS-Analyse in Dresden von 10 Wochen alten männlichen <i>C57BL/6J</i> -, <i>ob/ob</i> - und <i>db/db</i> -Mäusen.....	XLV

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 19: F4/80 <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup> CD206 <sup>+</sup> M2 Makrophagen der FACS-Analyse in Dresden von 10 Wochen alten männlichen <i>C57BL/6J</i> -, <i>ob/ob</i> - und <i>db/db</i> -Mäusen .....	XLVI
Abbildung 20: F4/80 <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup> CD206 <sup>-</sup> M1 Makrophagen der FACS-Analyse in Dresden von 10 Wochen alten männlichen <i>C57BL/6J</i> -, <i>ob/ob</i> - und <i>db/db</i> -Mäusen .....	XLVII
Abbildung 21: Hodenfettgewebsgewicht der FACS-Analyse mit 10 Wochen alten männlichen <i>C57BL/6J</i> -, <i>ob/ob</i> - und <i>db/db</i> -Mäusen .....	XLVII
Abbildung 22: Makrophagen der FACS-Analyse mit 10 Wochen alten männlichen <i>C57BL/6J</i> -, <i>ob/ob</i> - und <i>db/db</i> -Mäusen .....	XLVIII
Abbildung 23: Proinflammatorische Makrophagen der FACS-Analyse mit 10 Wochen alten männlichen <i>C57BL/6J</i> -, <i>ob/ob</i> - und <i>db/db</i> -Mäusen.....	XLIX
Abbildung 24: F4/80 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup> Proinflammatorischer Anteil der F4/80 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> Gesamtmakrophagen der FACS-Analyse von 10 Wochen alten männlichen <i>C57BL/6</i> -, <i>ob/ob</i> - und <i>db/db</i> Mäusen.....	L
Abbildung 25: CD45 <sup>+</sup> F4/80 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> Makrophagen der FACS-Analyse mit dem Kombinationspanel in der Abteilung CMDRII mit 10 Wochen alten männlichen <i>C57BL/6J</i> -, <i>ob/ob</i> - und <i>db/db</i> -Mäusen .....	LI
Abbildung 26: CD45 <sup>+</sup> F4/80 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup> proinflammatorische Makrophagen der FACS-Analyse mit dem Kombinationspanel in der Abteilung CMDRII mit 10 Wochen alten männlichen <i>C57BL/6J</i> -, <i>ob/ob</i> - und <i>db/db</i> -Mäusen.....	LI
Abb. 27: CD45 <sup>+</sup> F4/80 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup> proinflammatorischer Makrophagenanteil der CD45 <sup>+</sup> F4/80 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> Gesamtmakrophagen der FACS-Analyse mit Kombinationspanel von 10 Wochen alten männlichen <i>C57BL/6</i> -, <i>ob/ob</i> - und <i>db/db</i> Mäusen.....	LII
Abbildung 28: Gewichte der FACS-Analyse von männlichen <i>C57BL/6J</i> Mäusen 17 Wochen auf Hochfettdiät.....	LIII
Abbildung 29: Makrophagen der FACS-Analyse von männlichen <i>C57BL/6J</i> Mäusen 17 Wochen auf Hochfettdiät.....	LIV
Abbildung 30: proinflammatorische Makrophagen der FACS-Analyse von männlichen <i>C57BL/6J</i> Mäusen 17 Wochen auf Hochfettdiät.....	LV
Abbildung 31: Hodenfettgewebsgewicht der FACS-Analyse von männlichen <i>huCCR2</i> Mäusen nach 11 Wochen Hochfettdiät .....	LVI
Abbildung 32: CD45 <sup>+</sup> F4/80 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> Makrophagenkonzentration pro mg Fettgewebe der FACS-Analyse von männlichen <i>huCCR2</i> Mäusen nach 11 Wochen Hochfettdiät .....	LVI
Abbildung 33: CD45 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup> proinflammatorische Makrophagenkonzentration pro mg Fettgewebe der FACS-Analyse von männlichen <i>huCCR2</i> Mäusen nach 11 Wochen Hochfettdiät .....	LVII
Abbildung 34: Hodenfettgewebsgewicht FACS-Analyse von männlichen <i>huCCR2</i> Mäusen der subchronischen Studie eines CCR2-Antagonisten .....	LVIII

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 35: CD45 <sup>+</sup> F4/80 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> Makrophagen der FACS-Analyse von männlichen <i>huCCR2</i> Mäusen der subchronischen Studie eines CCR2-Antagonisten.....	LIX
Abbildung 36: Proinflammatorische Makrophagen der FACS-Analyse von männlichen <i>huCCR2</i> Mäusen der subchronischen Studie eines CCR2-Antagonisten.....	LXI
Abbildung 37: F4/80 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup> proinflammatorischer Makrophagenanteil der F4/80 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> Gesamtmakrophagen der FACS-Analyse von männlichen <i>huCCR2</i> Mäusen der subchronischen Studie eines CCR2-Antagonisten .....	LXI
Abbildung 38: MCP-1 Konzentration im Blutplasma von männlichen <i>huCCR2</i> Mäusen der subchronischen Studie eines CCR2-Antagonisten .....	LXII
Abbildung 39: ITT Tag21 in männlichen <i>huCCR2</i> Mäusen der subchronischen Studie eines CCR2-Antagonisten .....	LXIII
Abbildung 40: oGTT Tag 36 in männlichen <i>huCCR2</i> Mäusen der subchronischen Studie eines CCR2-Antagonisten.....	LXIV

## 9. Tabellenverzeichnis

### 9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Diabetes/Blutzucker Kriterien und Einstufung (WHO, 2012).....	XVIII
Tabelle 2: Verdünnungen verwendeter Antikörper.....	XXVIII
Tabelle 3: Gewichte der Mäuse aus Versuch 12B045 .....	LVIII

## 10. Literaturverzeichnis

### 10. Literaturverzeichnis

- American Diabetes Association (2012). Oral Medication of Type II Diabetis. <http://www.diabetes.org/living-with-diabetes/treatment-and-care/medication/oral-medications/what-are-my-options.html> [On-line]. Available: <http://www.diabetes.org/living-with-diabetes/treatment-and-care/medication/oral-medications/what-are-my-options.html>
- Anderson, E. K., Gutierrez, D. A., & Hasty, A. H. (2010). Adipose tissue recruitment of leukocytes. *Curr.Opin.Lipidol.*, 21, 172-177.
- Bailey, C. J. (1992). Biguanides and NIDDM. *Diabetes Care*, 15, 755-772.
- Canello, R., Henegar, C., Viguerie, N., Taleb, S., Poitou, C., Rouault, C. et al. (2005). Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes*, 54, 2277-2286.
- Chawla, A., Nguyen, K. D., & Goh, Y. P. (2011). Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat.Rev.Immunol.*, 11, 738-749.
- ChemoCentryx (2012). CCR2 Program. <http://www.chemocentryx.com/product/CCR2.html> [On-line].
- Coleman, D. L. (1978). Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia*, 14, 141-148.
- Coleman, D. L. & Hummel, K. P. (1974). Hyperinsulinemia in pre-weaning diabetes (db) mice. *Diabetologia*, 10 Suppl, 607-610.
- Dahlman, I., Kaaman, M., Olsson, T., Tan, G. D., Bickerton, A. S., Wahlen, K. et al. (2005). A unique role of monocyte chemoattractant protein 1 among chemokines in adipose tissue of obese subjects. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 90, 5834-5840.
- Di Gregorio, G. B., Yao-Borengasser, A., Rasouli, N., Varma, V., Lu, T., Miles, L. M. et al. (2005). Expression of CD68 and macrophage chemoattractant protein-1 genes in human adipose and muscle tissues: association with cytokine expression, insulin resistance, and reduction by pioglitazone. *Diabetes*, 54, 2305-2313.
- Ferrante, A. W., Jr. (2007). Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. *J.Intern.Med.*, 262, 408-414.
- Flegal, K. M., Carroll, M. D., Kit, B. K., & Ogden, C. L. (2012). Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999-2010. *JAMA*, 307, 491-497.
- Fujisaka, S., Usui, I., Bukhari, A., Iktani, M., Oya, T., Kanatani, Y. et al. (2009). Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes*, 58, 2574-2582.
- Gregor, M. F. & Hotamisligil, G. S. (2011). Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu.Rev.Immunol.*, 29, 415-445.
- Gutierrez, D. A., Puglisi, M. J., & Hasty, A. H. (2009). Impact of increased adipose tissue mass on inflammation, insulin resistance, and dyslipidemia. *Curr.Diab.Rep.*, 9, 26-32.

## 10. Literaturverzeichnis

- Hossain, P., Kavar, B., & El, N. M. (2007). Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge. *N.Engl.J.Med.*, 356, 213-215.
- Hotamisligil, G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444, 860-867.
- Huber, J., Kiefer, F. W., Zeyda, M., Ludvik, B., Silberhumer, G. R., Prager, G. et al. (2008). CC chemokine and CC chemokine receptor profiles in visceral and subcutaneous adipose tissue are altered in human obesity. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 93, 3215-3221.
- Inouye, K. E., Shi, H., Howard, J. K., Daly, C. H., Lord, G. M., Rollins, B. J. et al. (2007). Absence of CC chemokine ligand 2 does not limit obesity-associated infiltration of macrophages into adipose tissue. *Diabetes*, 56, 2242-2250.
- Kamei, N., Tobe, K., Suzuki, R., Ohsugi, M., Watanabe, T., Kubota, N. et al. (2006). Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J.Biol.Chem.*, 281, 26602-26614.
- Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K., Kitazawa, R. et al. (2006). MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J.Clin.Invest*, 116, 1494-1505.
- Kennedy, A. J., Ellacott, K. L., King, V. L., & Hasty, A. H. (2010). Mouse models of the metabolic syndrome. *Dis.Model.Mech.*, 3, 156-166.
- Kieffer, T. J. & Habener, J. F. (2000). The adipoinsular axis: effects of leptin on pancreatic beta-cells. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab*, 278, E1-E14.
- Kirk, E. A., Sagawa, Z. K., McDonald, T. O., O'Brien, K. D., & Heinecke, J. W. (2008). Monocyte chemoattractant protein deficiency fails to restrain macrophage infiltration into adipose tissue [corrected]. *Diabetes*, 57, 1254-1261.
- Lumeng, C. N., Bodzin, J. L., & Saltiel, A. R. (2007a). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J.Clin.Invest*, 117, 175-184.
- Lumeng, C. N., Delproposto, J. B., Westcott, D. J., & Saltiel, A. R. (2008). Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes*, 57, 3239-3246.
- Lumeng, C. N., Deyoung, S. M., Bodzin, J. L., & Saltiel, A. R. (2007b). Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes*, 56, 16-23.
- Lumeng, C. N., Deyoung, S. M., & Saltiel, A. R. (2007c). Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab*, 292, E166-E174.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., & Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.*, 25, 677-686.
- Matthaei, S., Bierwirth, R., Fritsche, A., Gallwitz, B., Haring, H. U., Joost, H. G. et al. (2009). Medical antihyperglycaemic treatment of type 2 diabetes mellitus: update of the evidence-based guideline of the German Diabetes Association. *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes*, 117, 522-557.

## 10. Literaturverzeichnis

- Mohanty, P., Aljada, A., Ghanim, H., Hofmeyer, D., Tripathy, D., Syed, T. et al. (2004). Evidence for a potent antiinflammatory effect of rosiglitazone. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 89, 2728-2735.
- Murray, P. J. & Wynn, T. A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat.Rev.Immunol.*, 11, 723-737.
- Nguyen, M. T., Favelyukis, S., Nguyen, A. K., Reichart, D., Scott, P. A., Jenn, A. et al. (2007). A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J.Biol.Chem.*, 282, 35279-35292.
- O'Brien, P. E., Dixon, J. B., Laurie, C., Skinner, S., Proietto, J., McNeil, J. et al. (2006). Treatment of mild to moderate obesity with laparoscopic adjustable gastric banding or an intensive medical program: a randomized trial. *Ann.Intern.Med.*, 144, 625-633.
- Odegaard, J. I. & Chawla, A. (2011). Alternative macrophage activation and metabolism. *Annu.Rev.Pathol.*, 6, 275-297.
- Odegaard, J. I., Ricardo-Gonzalez, R. R., Goforth, M. H., Morel, C. R., Subramanian, V., Mukundan, L. et al. (2007). Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature*, 447, 1116-1120.
- Odegaard, J. I., Ricardo-Gonzalez, R. R., Red, E. A., Vats, D., Morel, C. R., Goforth, M. H. et al. (2008). Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab*, 7, 496-507.
- Ogden, C. L., Carroll, M. D., Kit, B. K., & Flegal, K. M. (2012). Prevalence of obesity and trends in body mass index among US children and adolescents, 1999-2010. *JAMA*, 307, 483-490.
- Oh, D. Y., Morinaga, H., Talukdar, S., Bae, E. J., & Olefsky, J. M. (2012). Increased macrophage migration into adipose tissue in obese mice. *Diabetes*, 61, 346-354.
- Olefsky, J. M. & Glass, C. K. (2010). Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu.Rev.Physiol*, 72, 219-246.
- Patsouris, D., Li, P. P., Thapar, D., Chapman, J., Olefsky, J. M., & Neels, J. G. (2008). Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. *Cell Metab*, 8, 301-309.
- Reaven, G. M. (1988). Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 37, 1595-1607.
- Sartipy, P. & Loskutoff, D. J. (2003a). Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 100, 7265-7270.
- Sartipy, P. & Loskutoff, D. J. (2003b). Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 100, 7265-7270.
- Schipper, H. S., de, J. W., van Dijk, M. E., Meeding, J., Zelissen, P. M., Adan, R. A. et al. (2010). A multiplex immunoassay for human adipokine profiling. *Clin.Chem.*, 56, 1320-1328.
- Shi, C. & Pamer, E. G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat.Rev.Immunol.*, 11, 762-774.

## 10. Literaturverzeichnis

- Si, Y., Tsou, C. L., Croft, K., & Charo, I. F. (2010). CCR2 mediates hematopoietic stem and progenitor cell trafficking to sites of inflammation in mice. *J.Clin.Invest*, 120, 1192-1203.
- Solovjov, D. A., Pluskota, E., & Plow, E. F. (2005). Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alphaMbeta2. *J.Biol.Chem.*, 280, 1336-1345.
- Srinivasan, K. & Ramarao, P. (2007). Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian J.Med.Res.*, 125, 451-472.
- Takahashi, K., Mizuarai, S., Araki, H., Mashiko, S., Ishihara, A., Kanatani, A. et al. (2003). Adiposity elevates plasma MCP-1 levels leading to the increased CD11b-positive monocytes in mice. *J.Biol.Chem.*, 278, 46654-46660.
- Tamura, Y., Sugimoto, M., Murayama, T., Minami, M., Nishikaze, Y., Ariyasu, H. et al. (2010). C-C chemokine receptor 2 inhibitor improves diet-induced development of insulin resistance and hepatic steatosis in mice. *J.Atheroscler.Thromb.*, 17, 219-228.
- Tomita, T., Doull, V., Kimmel, J. R., & Pollock, H. G. (1984). Pancreatic polypeptide and other hormones in pancreas of obese (ob/ob) mice. *Diabetologia*, 27, 454-459.
- Tsou, C. L., Peters, W., Si, Y., Slaymaker, S., Aslanian, A. M., Weisberg, S. P. et al. (2007). Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J.Clin.Invest*, 117, 902-909.
- Weisberg, S. P., Hunter, D., Huber, R., Lemieux, J., Slaymaker, S., Vaddi, K. et al. (2006). CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J.Clin.Invest*, 116, 115-124.
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J.Clin.Invest*, 112, 1796-1808.
- Wentworth, J. M., Naselli, G., Brown, W. A., Doyle, L., Phipson, B., Smyth, G. K. et al. (2010). Pro-inflammatory CD11c+CD206+ adipose tissue macrophages are associated with insulin resistance in human obesity. *Diabetes*, 59, 1648-1656.
- WHO (2012). Obesity and overweight. <http://www.who.int> [On-line]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
- Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J. et al. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J.Clin.Invest*, 112, 1821-1830.

# 11. Anhang

## 11. Anhang

### 11.1 Datenblätter der Futtermischungen

#### 11.1.1 Datenblatt des Haltungsfutters





# 3438

---

**Maus und Ratte**  
**Souris et rat**  
**Mouse and rat**

**Haltung**  
**Entretien**  
**Maintenance**

---

GLP, vitamin-fortified, autoklavierbar | GLP, renforcé en vitamines, convient à l'autoclavage  
GLP, vitamin-fortified, suitable for autoclaving

---

Inhaltsstoffe   Substances   Major Nutrients		Rohstoffe   Ingrédients   Ingredients	
Trockensubstanz   Matière sèche   Dry matter	88.0 %	Weizen, Gerste, Sojaextraktionsschrot (NGVO), Weizenkleie, Mais (NGVO), Geflügelfleischmehl, Weizenstärke, Molkenpulver, Sojaöl, Bierhefe, Hafer, Mineralstoffe, Vitamine, Aminosäuren	
Rohprotein   Protéines brutes   Crude protein	18.5 %	Blé, orge, tourteau d'extraction de soja (sans OGM), son de blé, maïs (sans OGM), farine de viande de volaille, amidon de blé, petit lait en poudre, huile de soja, levure de bière, avoine, substances minérales, vitamines, acides aminés	
Rohfett   Graisses brutes   Crude fat	4.5 %	Wheat, barley, soybean meal (NGMO), wheat middlings, corn (NGMO), poultry meal, wheat starch, whey powder, soybean oil, brewer's dried yeast, oats, minerals, vitamins, amino acids	
Rohfaser   Fibres brutes   Crude fiber	4.5 %		
Rohasche   Cendres brutes   Crude ash	6.3 %		
NFE   ENA   NFE	54.2 %		
Bruttoenergie   Energie brute   Gross energy	16.1 MJ/kg		
Umsetzbare Energie   Energie métabolisable   Metabol. energy	13.2 MJ/kg		
Stärke   Amidon   Starch	35.0 %		

---

Aminosäuren   Acides aminés   Amino acids	
Arginin   Arginine   Arginine	1.10 %
Lysin   Lysine   Lysine	1.00 %
Methionin   Méthionine   Methionine	0.39 %
Methionin + Cystin   Méthionine + cystine   Methionine + cystine	0.75 %
Tryptophan   Tryptophane   Tryptophan	0.20 %
Threonin   Thréonine   Threonine	0.65 %

---

Mengenelemente   Macro-éléments   Major mineral elements	
Calcium   Calcium   Calcium	1.05 %
Phosphor   Phosphore   Phosphorus	0.80 %
Magnesium   Magnésium   Magnesium	0.20 %
Natrium   Sodium   Sodium	0.20 %
Kalium   Potassium   Potassium	0.78 %
Chlor   Chlore   Chlorine	0.36 %

---

Spurenelemente   Oligo-éléments   Trace elements	
Eisen   Fer   Iron	250 mg/kg
Zink   Zinc   Zinc	60 mg/kg
Kupfer   Cuivre   Copper	14 mg/kg
Jod   Iode   Iodine	1 mg/kg
Mangan   Manganèse   Manganese	60 mg/kg
Selen   Sélénium   Selenium	0.3 mg/kg

---

Vitamine   Vitamines   Vitamins	
Vitamin A   Vitamine A   Vitamin A	18'000 IE UI IU/kg
Vitamin D <sub>3</sub>   Vitamine D <sub>3</sub>   Vitamin D <sub>3</sub>	1'000 IE UI IU/kg
Vitamin E   Vitamine E   Vitamin E	125 mg/kg
Vitamin K <sub>3</sub>   Vitamine K <sub>3</sub>   Vitamin K <sub>3</sub>	8 mg/kg
Vitamin B <sub>1</sub>   Vitamine B <sub>1</sub>   Vitamin B <sub>1</sub>	31 mg/kg
Vitamin B <sub>2</sub>   Vitamine B <sub>2</sub>   Vitamin B <sub>2</sub>	20 mg/kg
Vitamin B <sub>6</sub>   Vitamine B <sub>6</sub>   Vitamin B <sub>6</sub>	16 mg/kg
Vitamin B <sub>12</sub>   Vitamine B <sub>12</sub>   Vitamin B <sub>12</sub>	0.05 mg/kg
Nicotinsäure   Acide nicotinique   Nicotinic acid	95 mg/kg
Pantothensäure   Acide pantothénique   Pantothenic acid	40 mg/kg
Folsäure   Acide folique   Folic acid	2 mg/kg
Biotin   Biotine   Biotin	0.24 mg/kg
Cholin   Choline   Choline	2'000 mg/kg
Vitamin C   Vitamine C   Vitamin C	67 mg/kg

**Bemerkungen | Remarques | Remarks**

- Alleinfuttermittel für Mäuse und Ratten, auch für Hamster und Gerbille geeignet
- Angegebene Gehalte sind berechnete Mittelwerte bezogen auf lufttrockene Substanz vor dem Sterilisationsverfahren
- Herstellung auf Anfrage für Boehringer Ingelheim Pharma (D)
- Aliment complet pour souris et rats, convenant également aux hamsters et aux gerbilles
- Les teneurs indiquées sont des valeurs moyennes se rapportant à la matière séchée à l'air avant le processus de stérilisation
- Fabrication sur demande pour Boehringer Ingelheim Pharma (D)
- Complete food for mice and rats, also appropriate for hamsters and gerbils
- Given values are calculated averages in air-dry feed prior to sterilization process
- Production on demand for Boehringer Ingelheim Pharma (D)

**Bestellform | Conditionnements | Delivery form**

Pellets 10 mm eckig | Pellets carrés 10 mm | Pellets 10 mm square

**3438.PM.S25:**  
25 kg in Papiersäcken  
25 kg en sacs en papier  
25 kg in paper bags

**3438.PM.BB1:**  
In Big Bags  
En big bags  
In big bags

Granulat | Miette | Granulate

**3438.G4.S25:**  
25 kg in Papiersäcken  
25 kg en sacs en papier  
25 kg in paper bags

## 11. Anhang

### 11.1.2 Datenblatt der Hochfettdiät

#### Product Data

# D12451



#### Description

Rodent Diet with 45% kcal% fat.

#### Used in Research

Obesity

Diabetes

#### Packaging

Product is packed in 12.5 kg box.

Each box is identified with the product name, description, lot number and expiration date.

#### Lead Time

IN-STOCK. Ready for next day shipment.

#### Gamma-Irradiation

Yes. Add 10 days to delivery time.

#### Form

Pellet, Powder, Liquid

#### Shelf Life

Most diets require storage in a cool dry environment. Stored correctly they should last 3-6 months.

#### Control Diets

D12450B

#### Formula

Product #	D12451	
	gm%	kcal%
Protein	24	20
Carbohydrate	41	35
Fat	24	45
	Total	100
	kcal/gm	4.73

Ingredient	gm	kcal
Casein, 80 Mesh	200	800
L-Cystine	3	12
Corn Starch	72.8	291
Maltodextrin 10	100	400
Sucrose	172.8	691
Cellulose, BW200	50	0
Soybean Oil	25	225
Lard*	177.5	1598
Mineral Mix S10026	10	0
DiCalcium Phosphate	13	0
Calcium Carbonate	5.5	0
Potassium Citrate, 1 H2O	16.5	0
Vitamin Mix V10001	10	40
Choline Bitartrate	2	0
FD&C Red Dye #40	0.05	0
<b>Total</b>	<b>858.15</b>	<b>4057</b>

Formulated by E. A. Ulman, Ph.D., Research Diets, Inc., 8/26/98 and 3/11/99.

\*Typical analysis of cholesterol in lard = 0.95 mg/gram.

Cholesterol (mg)/4057 kcal = 168.6

Cholesterol (mg)/kg = 196.5

**RESEARCH  
DIETS**  
INC.   
www.ResearchDiets.com

Research Diets, Inc.  
20 Jules Lane  
New Brunswick, NJ 08901  
Tel: 732.247.2390  
Fax: 732.247.2340  
info@researchdiets.com

Copyright © 2006 Research Diets, Inc. All rights reserved. D12451

## 11. Anhang

### 11.1.3 Datenblatt der Normaldiät

#### Product Data

# D12450B



#### Description

Rodent Diet with 10% kcal% fat.

#### Used in Research

Obesity

Diabetes

#### Packaging

Product is packed in 12.5 kg box.

Each box is identified with the product name, description, lot number and expiration date.

#### Lead Time

IN-STOCK. Ready for next day shipment.

#### Gamma-Irradiation

Yes. Add 10 days to delivery time.

#### Form

Pellet, Powder, Liquid

#### Shelf Life

Most diets require storage in a cool dry environment. Stored correctly they should last 3-6 months.

#### Control Diets

Used as a control diet for D12451 and D12492

#### Formula

Product #	D12450B	
	gm%	kcal%
Protein	19.2	20
Carbohydrate	67.3	70
Fat	4.3	10
	Total	100
	kcal/gm	3.85

Ingredient	gm	kcal
Casein, 80 Mesh	200	800
L-Cystine	3	12
Corn Starch	315	1260
Maltodextrin 10	35	140
Sucrose	350	1400
Cellulose, BW200	50	0
Soybean Oil	25	225
Lard*	20	180
Mineral Mix S10026	10	0
DiCalcium Phosphate	13	0
Calcium Carbonate	5.5	0
Potassium Citrate, 1 H2O	16.5	0
Vitamin Mix V10001	10	40
Choline Bitartrate	2	0
FD&C Yellow Dye #5	0.05	0
<b>Total</b>	<b>1055.05</b>	<b>4057</b>

Formulated by E. A. Ulman, Ph.D., Research Diets, Inc., 8/26/98 and 3/11/99.

\*Typical analysis of cholesterol in lard = 0.95 mg/gram.

Cholesterol (mg)/4057 kcal = 19

Cholesterol (mg)/kg = 18

**RESEARCH  
DIETS**  
INC.   
www.ResearchDiets.com

Research Diets, Inc.  
20 Jules Lane  
New Brunswick, NJ 08901  
Tel: 732.247.2390  
Fax: 732.247.2340  
info@researchdiets.com

Copyright © 2006 Research Diets, Inc. All rights reserved. D12450B

## 11. Anhang

### 11.2 FACS-Protokoll der Arbeitsgruppe Dr. Chavakis an der TU Dresden

#### Adipocyte and SVF isolation from fat pads

Reference- Carey N. Lumeng group (117:175-184, 2007, JCI)

#### **Materials:**

Bovine Serum Albumin - (Sigma, A7030-10g)

Collagenase type I (Gibco, 17100-017)

Cell strainer with 100 µm nylon mesh (BD, 352360)

RBC lysis buffer – (ACK solution, Quality Biological, 118-156-721)

Buffer I: PBS with 1mM CaCl<sub>2</sub> and 0.5 % BSA

DMEM (high Glukose) including 0.5 % BSA

FACS buffer (0.1% BSA, 0.1% NaN<sub>3</sub>, Hanks Balanced Salt Solution-GIBCO-cat: 14175053)

#### **Methods:**

- Anaesthesia of mouse with isoflurane and decapitation
- Serum is obtained after centrifugation of blood at 8000rpm for 15 min at 4°C and is stored at -80°C
- Perigonadal and subcutaneous fat pads from C57BL/6 mice fed a (normal diet or) high fat diet are excised (for T-cell analysis lymph node has to be discarded) and put in 3 cm dishes including 1 ml buffer I (some tissues are kept at -80°C for PCR/ WB) on ice.
- Liver samples are harvested; weight is protocolled and frozen at -80 °C for further analysis.
- Femoral muscle is excised and just the weight is protocolled.
- \* Before putting fat pads in dish, check weight.
- Discard buffer I, mince the tissues finely, transfer to 15 ml tube and add buffer I until 10 ml are reached.
- Tissue suspensions are centrifuged at 500 g (2,000 rpm) and 4°C for 10 minutes to remove erythrocytes and free leukocytes.

## 11. Anhang

- \* After centrifugation, we can see the separated fraction, the upper phase is adipose tissue we want and the pellets are erythrocytes and free leukocytes.
- \* In this time, we prepare a fresh collagenase (2 mg/ml) in DMEM (high Glukose) including 0.5 % BSA depending on tissue weight (1 ml/ tissue g)
  - Carefully collect floating tissue using 1 ml tip (the end of tip was cut) and transfer to 15 ml polypropylene tube.
  - Collected tissues are resuspended with DMEM (high Glukose) including 0.5% BSA and collagenase and incubated at 37°C for 45 - 60 minutes with shaking (water bath).
  - Cell suspension is topped up to 10 ml by adding DMEM medium, filtered through a 100-µm filter and centrifuged at 500 g for 5 minutes to separate floating adipocytes from the SVF pellet.
  - After removal or collection of the adipocyte fraction, SVF pellet is resuspended in 0.5 ml RBC Lysis Buffer, incubated for 5 minutes on ice and filled up with 10 ml FACS buffer.
  - The erythrocyte-depleted SVF is centrifuged at 500 g for 5 minutes and supernatant is discarded.

## 11. Anhang

### FACS analysis of endothelial, leukocyte and macrophage cells from Stromal-Vascular Fraction (SVF)

#### Materials:

- \*Anti-CD45-Alexa fluor 488 (BioLegend, clone: 30-F11, cat: 103122)
  - \* *Anti-CD45-PE (BD, clone 30-F11, cat: 553081) – just for compensation*
  - \*Anti-CD31-APC (eBioscience, clone: 390, cat: 17-0311-82)
  - \*Anti-CD11b-APC (BD, clone: M1/70, cat: 553312)
  - \*Anti-CD11c-APC (Biolegend, clone: N418, cat: 117310)
  - \*Anti-CD11c-PE (BD, clone: HL3, cat: 553802)
  - \*Anti-F4/80-Alexa fluor 488 (eBioscience, clone: BM8, cat: 53-4801-82)
  - \*Anti-CD206/MRC1-PE (Acris, cat: SM1857R) → AB prediluted in aqua bidest: 3 µl/ tube used
  - \*Anti-Gr-1-PE (BD, clone: RB6-8C5, cat: 553128)
  - \*Anti-CD8a-APC (MACS, 130-091-606) → AB prediluted: 2,5 µl/ tube used
  - \*Anti-CD4-FITC (MACS, 130-091-608) → AB prediluted: 2,5 µl/ tube used
  - \*Anti-CD3e-PE (MACS, 130-092-976) → AB prediluted: 2,5 µl/ tube used
  - \*Alexa Fluor 488 Rat IgG2b, k (Isotype Ctrl): BioLegend, # 400625 → 10 µl from 1:100 dilution/ tube
  - \*PE Armenian Hamster IgG (Isotype Ctrl): BioLegend, # 400908
  - \*PE Rat IgG2a (Isotype Ctrl): eBioscience # 12-4321-82
  - \*APC Rat IgG2b, k (Isotype Ctrl): BioLegend, # 400612
  - \*FITC Rat IgG2b (Isotype Ctrl): eBioscience, # 11-4031-81 → 10 µl from 1:100 dilution/ tube
- FACS buffer-(0.1% BSA, 0.1% NaN<sub>3</sub>, Hanks Balanced Salt Solution-GIBCO-cat: 14025-092)
- Blocking antibody-2.4G2 (BD, 553141) - 10 µl are used in each tube (dilution 1:100)
- \*: if not described else wise above, than 10 µl from 1:40 diluted antibody/ tube are used

## 11. Anhang

### Methods:

- Work on ice. Add 10 µl 2.4G2 (blocking Fc receptor to avoid non specific binding) in each FACS tube.
- Dilute SVF samples in FACS buffer (1500 µl for 11 stainings) and pass it through a cell strainer (40 µm pore size).
- Distribute 100 µl cell suspension in each FACS tube and count cells from remaining volume.
- Add each antibody (multiple stainings are premixed to save time and tips) to FACS tube and incubate for 45 min at 4°C (tubes protected from light)
- Add 250 µl FACS buffer, resuspend the cells and FACS with BD FACS Canto II.

Tube Name		
1	No Fc-blocker	unstained
2	FITC Rat IgG2b + PE Armenian Hamster IgG + APC Rat IgG2b	isotype ctrl T-cell staining
3	Anti-CD8a-APC + Anti-CD4-FITC + Anti-CD3e-PE	T-cells
4	Alexa Fluor 488 Rat IgG2b + APC Rat IgG2b + PE Armenian Hamster IgG	isotype ctrl further stainings
5	Anti-F4/80-Alexa fluor 488 + Anti-CD11b-APC + Anti-CD11c-PE	M1 / M2 macrophages
6	Anti-CD45-Alexa fluor 488 + Anti-CD31-APC	Leukocyte / endothelial cells
7	<i>Anti-Gr-1-PE + Anti-CD11b-APC</i>	<i>Myeloid derived suppressor cells (MDSC)</i>

## 11. Anhang

### CD206 staining:

#### 1. day:

- Stain cell surface antigen(s) as described (45 min).
- Wash cells with 1 mL FACS buffer and centrifuge at 500 g for 5 min.
- Discard the supernatant and pulse vortex the sample to completely dissociate the pellet.
- Add 200 µl of Foxp3 Fixation/Permeabilization (1:3 diluted) working solution to each tube and pulse vortex.
- Incubate at 4°C or room temperature for 30-60 minutes in the dark. (Mouse samples can be incubated for up to 18 hours at 4°C in the dark).

#### 2. day:

- Add 1 mL of FACS buffer to each tube and centrifuge samples at 300-400 g at room temperature or 4°C for 5 minutes. Discard the supernatant.
- Add the recommended amount of fluorochrome-conjugated antibody for detection of intracellular antigen to cells and incubate in the dark at 4°C for 45 minutes.
- Add 1 mL of FACS buffer to each tube, centrifuge at 300-400xg at room temperature for 5 minutes and discard the supernatant.
- Resuspend stained cells in an appropriate volume of FACS buffer and acquire data on BD FACS Canto II.

Tube Name	1. day	2. day
1	No Fc-blocker	
2	Alexa Fluor 488 Rat IgG2b + APC Rat IgG2b + PE Rat IgG2a	
3	Anti-F4/80-Alexa fluor 488 + Anti-CD11c-APC	+ PE Rat IgG2a
4	Anti-F4/80-Alexa fluor 488 + Anti-CD11c-APC	+ CD206

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt habe.

Die verwendeten Literaturquellen sind im Literaturverzeichnis vollständig zitiert.

Biberach, den 13. November 2012

Unterschrift: \_\_\_\_\_  
(Christiane Dickel)

Adresse: Erftweg 95  
47807 Krefeld

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Als erstes danke ich Dr. Michael Mark und Dr. Rüdiger Streicher für die Möglichkeit diese Masterarbeit in der Abteilung CardioMetabolic Diseases Research bei Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG schreiben zu können.

Vor allem danke ich Dr. Andre Broermann für die Betreuung dieser Arbeit vor Ort. Bei diesem hoch motivierten Chef stand mir die Tür immer offen. Außerdem bekam ich von ihm immer die Förderung und Hilfe, die ich gebraucht habe. Seine Begeisterung für die Forschung war ansteckend.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Oliver Ullrich für die unkomplizierte Betreuung der Masterarbeit seitens der HAW Hamburg, die trotz der größeren Entfernung super funktioniert hat.

Insbesondere möchte ich mich bei Dr. Triantafyllos Chavakis und seiner Arbeitsgruppe an der TU Dresden bedanken. Dort durfte ich eine Woche als Gast mit Dr. Kyoung-Jin Chung arbeiten, der mir viele wertvolle Tipps für die FACS-Analyse von ATMs gegeben hat.

Mein besonderer Dank gilt meinen beiden Laborkollegen Anke Voigt und Lars Pischzan für Ihre Zeit und die gute Zusammenarbeit. Desweiteren danke ich Tobias Geiger, der seine FACS-Erfahrungen mit mir geteilt hat, und mir bei meinen ersten Schritten in der Durchflusszytometrie eine große Hilfe war.

Desweiteren möchte ich mich herzlich bei allen Mitarbeitern der Abteilung CMDR für ihre umfangreiche Hilfe und Unterstützung bedanken.

Zuletzt möchte ich mich außerdem bei meiner Familie und meinem Freund für die seelische und moralische Unterstützung während meines Studiums bedanken. Ohne Sie wäre ich heute nicht da wo ich bin.