

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Rheumatologie und Infektiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Auswirkung von Adipokinen auf den Immunphänotyp von
Makrophagensubpopulationen**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Lea Isabell Kredel
aus Berlin

Datum der Promotion: 22.06.2014

Meiner Mutter Ilse Stautner Kredel

Abkürzungen

AdR	Adiponektin-Rezeptor
AMP	Adenosinmonophosphat
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
BMI	<i>body mass index</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CCL	CC-Chemokin-Ligand
CCR	CC-Chemokinrezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
ConA	Concanavalin A
CRP	C-reaktives Protein
CXCL	CXC-Chemokin Ligand
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
<i>db/db</i>	Leptin-Rezeptor-Defizienz
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DANN	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
Dnase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSS	Dextran Natriumsulfat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiozyanat
<i>g</i>	Erdschwerebeschleunigung
gAd	globuläres Adiponektin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GNB2L1	<i>guanine nucleotide-binding protein, beta polypeptide 2-like 1</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	humanes Leukozytenantigen

HPF	<i>high power field</i>
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
ICH	Immunhistochemie
IκB	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor</i>
IL	Interleukin
IL-Ra	Interleukin-Rezeptorantagonist
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP	<i>IFN-induziertes Protein (inducible protein)</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	Magnetisch-aktivierte Zellauftrennung (<i>magnetic-activated cell separation</i>)
ManR	Mannose-Rezeptor
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MCP	<i>monocyte chemotactic protein</i>
M-CSF	<i>macrophage colony stimulating factor</i>
MFI	Durchschnittliche Fluoreszenzintensität (<i>mean fluorescence intensity</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
MMW	Mittleres Molekulargewicht (<i>medium molecular weight</i>)
MOMA	Monozyten-Makrophagenmarker
NF-κB	Nukleärer Faktor-κB
NOD	<i>nucleotide oligomerization domain</i>
Ob	<i>obese</i>
<i>ob/ob</i>	Defizienz des Leptin-Gens
Ob-R	Leptin-Rezeptor
Ob-Rb	Langkettige Isoform des Leptin-Rezeptors
PHA	Phytohämagglutinen
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
Pi3K	Phosphoinositol 3-Kinase
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptors</i>

PRR	Muster-erkennende Rezeptoren (<i>pattern recognition receptors</i>)
Ra	Rezeptorantagonist
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (<i>standard error of the mean</i>)
STAT 3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
TAE	Tris-Hydroxymethylaminomethan-Acetat/ Ethylendiamintetraessigsäure
TAM	tumorassoziierte Makrophagen (<i>tumor-associated macrophages</i>)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	transformierender Wachstumsfaktor (<i>transforming growth factor</i>)
Th	T-Helfer
TLR	<i>toll-like</i> -Rezeptor
TNBS	Trinitrobenzensulfonsäure
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TZM	T-Zell-Medium
TZR	T-Zell-Rezeptor
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung in Deutsch und Englisch	1
2	Einleitung.....	5
2.1	Morbus Crohn und Entzündung des mesenterialen Fettgewebes	5
2.2	Das Fettgewebe als Teil der angeborenen und erworbenen Immunität.....	7
2.3	Adipokine und ihre Rezeptoren.....	9
2.3.1	Leptin	9
2.3.2	Adiponektin.....	11
2.4	Makrophagen, Zellen des angeborenen Immunsystems.....	13
2.5	Makrophagen-Klassifikationen	14
2.6	<i>In-vitro</i> -Generierung von Makrophagensubtypen	18
2.6.1	M1-Makrophagen	18
2.6.2	M2-Makrophagen	18
2.7	Fragestellung.....	19
3	Material und Methoden	20
3.1	Materialien.....	20
3.1.1	Chemikalien, Lösungen und Kits.....	20
3.1.2	Materialien und Geräte	21
3.1.3	Puffer- und Standardlösungen	23
3.1.4	Medien für die Zellkultur	23
3.1.5	Oligonukleotide.....	24
3.1.6	Antikörper.....	25
3.1.7	Rekombinante Zytokine und Adipokine.....	26
3.1.8	Untersuchungsmaterial.....	26
3.2	Zellpräparation und Zellkultur	27
3.2.1	Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes	27
3.2.2	Bestimmung von Vitalität und Zellzahl	27
3.2.3	Anreicherung von CD14 ⁺ -Monozyten und CD4 ⁺ -T-Zellen	27

3.2.4	Gewinnung von CD3 ⁺ -Zellen aus PBMC.....	28
3.2.5	Polarisation in M1- und M2-Makrophagen <i>in vitro</i>	29
3.2.6	Kokultur und Nachweis der Transmigration von T-Zellen <i>in vitro</i>	30
3.3	Nachweis von IL-23 (p19/p40) und CCL1 in Zellkulturüberständen durch.....	32
	enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA)	32
3.4	Durchflusszytometrie	33
3.4.1	Allgemeines Funktionsprinzip	33
3.4.2	Darstellung von Oberflächenantigenen.....	34
3.4.3	<i>Cytometric Bead Array</i>	34
3.4.4	Quantifizierung von migrierten T-Zellen	35
3.4.5	<i>In-vitro</i> -Nachweis von Phagozytose	35
3.5	Quantifizierung der Expression auf mRNA-Ebene	36
3.5.1	RNA-Isolierung aus Zellen	36
3.5.2	Synthese komplementärer DNA	36
3.5.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen.....	37
3.5.4	Quantitative <i>Real-time</i> -Polymerasekettenreaktion	37
3.6	<i>In-situ</i> -Nachweis von Immunzellen im mesenterialen Fettgewebe	40
3.6.1	Vorbereitung von Gewebeschnitten	40
3.6.2	Immunhistochemie.....	41
3.6.3	Immunfluoreszenz	42
3.7	Statistische Methoden	43
4	Ergebnisse.....	44
4.1	<i>In-vitro</i> -Polarisierung von M1- und M2-Makrophagen	44
4.1.1	Morphologie der Makrophagensubtypen.....	44
4.1.2	Expression von Oberflächenmolekülen.....	45
4.1.3	Zytokinproduktion	47
4.1.4	Einfluss bakterieller Antigene auf das Zytokinprofil	48

4.1.5	Einfluss bakterieller Antigene auf die Expression von Oberflächenmolekülen..	50
4.1.6	Vergleich der Adipokinrezeptorexpression.....	52
4.2	Wirkung von Leptin auf Makrophagen während der <i>In-vitro</i> -Polarisation und auf <i>in vitro</i> polarisierte Zellen.....	54
4.2.1	Einfluss von Leptin auf die Morphologie.....	54
4.2.2	Einfluss von Leptin auf die Expression von Oberflächenmolekülen.....	55
4.2.3	Einfluss von Leptin auf das Zytokinprofil.....	57
4.2.4	Modulation der LPS-Wirkung durch Leptin.....	60
4.3	Wirkung von Leptin auf die Adipokinrezeptorexpression.....	63
4.4	Wirkung von Leptin auf die Mannose-Rezeptorexpression	65
4.5	Wirkung von Adiponektin auf polarisierte M1- und M2-Makrophagen.....	66
4.5.1	Einfluss von Adiponektin auf die Oberflächenmolekülexpression.....	66
4.5.2	Einfluss von Adiponektin auf die Zytokinproduktion	70
4.5.3	Wirkung von Adiponektin auf die Expression von Adipokinrezeptoren	72
4.5.4	Einfluss von Adiponektin auf die Expression des Mannose-Rezeptors	73
4.6	Makrophagensubpopulationen im mesenterialen Fettgewebe	74
4.7	Phagozytose.....	81
4.8	Wirkung von Adipokinen auf das Chemotaxispotenzial.....	83
4.8.1	Transmigrationsversuche.....	83
4.9	Chemokinprofil von Makrophagensubpopulationen.....	86
4.10	Immunzellinfiltration im mesenterialen Fettgewebe.....	88
4.10.1	T-Zell-Subpopulationen im <i>Creeping Fat</i>	88
5	Diskussion	95
6	Literaturverzeichnis.....	112
7	Abbildungsverzeichnis:	119
8	Tabellenverzeichnis	121
9	Publikationsliste	122
10	Lebenslauf	123

11	Eidesstattliche Versicherung	124
12	Danksagungen	126

1 Zusammenfassung

Einleitung

Hypertrophiertes mesenteriales Fettgewebe im Bereich entzündeter Darmabschnitte ist pathognomonisch für Morbus Crohn und wird als *Creeping Fat* bezeichnet. Im Vergleich zu Fettgewebe anderer Lokalisation oder mesenterialem Fettgewebe von Gesunden, zeichnet es sich durch eine höhere Anzahl kleinerer Adipozyten, erhöhte lokale Adipokinkonzentrationen und Immunzellinfiltrate, insbesondere von Makrophagen, aus. Adipokine beeinflussen als Mediatoren des Fettgewebes unter anderem die Immunantworten, z.B. moduliert Leptin die Zytokinproduktion und Rezeptorexpression von CD4⁺T-Zellen und Makrophagen. Adiponektin beeinflusst unter anderem die Aktivierung von Makrophagen. Beide Adipokine werden im mesenterialen Fettgewebe von Patienten mit Morbus Crohn vermehrt exprimiert.

Makrophagen lassen sich grob in klassisch aktivierte, pro-inflammatorische M1-Zellen und alternativ aktivierte, anti-inflammatorische M2-Makrophagen einteilen.

Um die Wirkung dieser Adipokine auf die infiltrierenden Makrophagen und deren Rolle im *Creeping Fat* beim Morbus Crohn zu verstehen, wurden die Effekte von Leptin und Adiponektin auf Makrophagensubpopulationen *in vitro* untersucht und das Immunzellinfiltrat im mesenterialen Fettgewebe *in situ* charakterisiert.

Methoden

CD14⁺-Zellen aus humanem Vollblut gesunder Spender wurden *in vitro* in M1- und M2-Makrophagen polarisiert. Anschließend wurde der Effekt von Leptin und Adiponektin auf die Adipokinrezeptorexpression, die phänotypischen Oberflächenmarker sowie die Zytokin- und Chemokinsynthese der Makrophagensubpopulationen auf Protein- und mRNA-Ebene untersucht. Ergänzend wurde die Wirkung von Adipokinen auf das chemotaktische Potenzial und die Phagozytose evaluiert.

Die Infiltration des mesenterialen Fettgewebes von Patienten mit Morbus Crohn durch Makrophagen und T-Zellen wurde immunhistologisch und mithilfe von Immunfluoreszenz *in situ* charakterisiert und mit Gewebsschnitten von Patienten mit Colitis ulcerosa, kolorektalem Karzinom und gesunden Kontrollen verglichen.

Ergebnisse

Leptin und Adiponektin modulierten *in vitro* den Phänotyp und die Funktion polarisierter Makrophagen. Dabei reagierten M2-Makrophagen stärker auf die Adipokinstimulation als M1-Makrophagen.

Die Phagozytoseleistung, Zytokinproduktion und das chemotaktische Potenzial von M1-Makrophagen wurde durch Leptin gesteigert. In M2-Makrophagen steigerte Leptin signifikant die Synthese von Interleukin(IL)-10, IL-6 und Tumornekrosefaktor- α sowie ihre Chemokinproduktion. Adiponektin zeigte eine vergleichbare, wenn auch schwächere Wirkung auf die untersuchten Makrophagensubpopulationen. Bei M2-Makrophagen steigert es die Zytokinproduktion, die Expression des Mannoserezeptors und verstärkt ihr chemotaktisches Potenzial gegenüber T-Zellen.

Das Immunzellinfiltrat im *Creeping Fat* bestand hauptsächlich aus CD68⁺-Makrophagen. Dabei handelte es sich überwiegend um CD163⁺- und Stabilin-1⁺-exprimierende M2-Makrophagen, während bei Patienten mit kolorektalem Karzinom iNOS⁺-M1-Makrophagen überwogen. Im Gegensatz hierzu waren im mesenterialen Fettgewebe von Patienten mit Colitis ulcerosa auch entzündungsnah kaum Makrophagen nachweisbar. Die Verschiebung in der Zusammensetzung der Makrophagenpopulation ist folglich kein genereller Ausdruck eines chronischen intestinalen Geschehens, sondern spezifisch für das mesenteriale Fett bei Morbus Crohn.

Schlussfolgerungen

Die vorliegenden Daten stützen die Hypothese einer protektiven Funktion des mesenterialen Fettgewebes bei Morbus Crohn und weisen den M2-Makrophagen eine Schlüsselfunktion in diesem Zusammenhang zu. Das *Creeping Fat* könnte dabei eine immunologische Barriere um die entzündeten Darmabschnitte darstellen, die sowohl an der Abwehr eindringende Erreger als auch an der Kontrolle einer systemischen Entzündungsreaktion beteiligt ist.

Abstract

Introduction

The hypertrophic mesenteric fat tissue wrapped around the inflamed parts of the intestine, called creeping fat, is pathognomonic for Crohn's disease (CD). This tissue shows specific features, differentiating creeping fat from healthy mesenteric fat and adipose tissue of other locations. Adipocytes are smaller but their count is fourfold increased. Furthermore the tissue is infiltrated by immune cells, especially macrophages and local adipokine levels are increased. Leptin alters cytokine production and receptor expression of CD4⁺ T cells and macrophages. Adiponectin modulates macrophage activation among others. Macrophages are generally classified into classically activated, pro-inflammatory M1-macrophages and alternatively activated, anti-inflammatory M2-macrophages.

The aim of the present study was to evaluate the impact of the specific milieu inside the creeping fat on infiltrating macrophages, depicting their role for the pathology of the human disease.

Methods

Human CD14⁺ cells were polarized *in vitro* into M1- and M2-macrophages. The effects of leptin and adiponectin treatment on the expression of adipokine receptors, phenotypic surface markers, cytokines and chemokines were assessed.

Macrophage subtypes and T-cells subsets were differentiated using immunohistochemical staining in samples of mesenteric fat tissue from patients with CD and compared to patients with ulcerative colitis (UC), colorectal carcinoma (CRC) and healthy controls (HC). The chemotactic potential of secreted macrophage products was analyzed by chemokine production *in vitro* and T cell migration.

Results

Both adipokines altered the phenotype and function of M1- and M2-macrophages *in vitro*. Leptin increased the production of tumor necrosis factor (TNF) α and Interleucin (IL)-8 expression of M1-macrophages and enhanced IL-10-,IL-6- and TNF- α synthesis of M2-macrophages. Adiponectin exerted similar effects on cytokine production of both subtypes. Furthermore adiponectin increased the expression of the mannose receptor in M2-macrophages. Remarkably, the response to adipokine stimulation was much stronger in M2-macrophages.

While leptin increased the potency of both subtypes to attract CD3⁺ T-cells *in vitro*, adiponectin only affected the chemokine production of M2-macrophages.

The number of CD68⁺ macrophages in the mesenteric fat tissue of patients with CD *in situ* was strongly increased compared to all other experimental groups included. The *in situ* studies identified a unique infiltration of predominantly CD163⁺ and stabilin1⁺ M2-macrophages within the *creeping fat*. In comparison, in the mesenteric fat of patients with CRC the macrophage balance was shifted towards the M1-subtype while there were hardly any immune cells present in samples of UC or HC.

Conclusion

The presented *in vitro* and *in situ* data suggest a protective role for the mesenteric fat in CD. The adipocyte-dependent microenvironment within the creeping fat modulates the local macrophage compartment to a preference towards a M2-subtype, which exerts regulatory, anti-inflammatory functions but is equally potent in producing pro-inflammatory molecules and chemokines. In this context the mesenteric fat in CD could function as an enveloping barrier around the inflamed gut, which could prevent systemic inflammation.

2 Einleitung

2.1 Morbus Crohn und Entzündung des mesenterialen Fettgewebes

Die chronisch entzündliche Darmerkrankung (CED) Morbus Crohn tritt in Deutschland mit einer Inzidenz von 5,6/100 000 auf. Die Erstdiagnose wird gehäuft bei jungen Menschen zwischen dem 15. und 34. Lebensjahr gestellt. Aufgrund des chronischen Verlaufs sind die Patienten in der Regel lebenslang von ihrer Erkrankung betroffen.[1, 2]

Die Ursachen der Erkrankung Morbus Crohn sind Gegenstand aktueller Forschung und nach wie vor nicht vollständig verstanden. Wahrscheinlich handelt sich um eine multifaktorielle Pathogenese, an welcher sowohl Umwelteinflüsse als auch genetische Prädisposition kausal beteiligt sind.

Morbus Crohn ist eine diskontinuierlich auftretende, transmurale Entzündung, die den gesamten Gastrointestinaltrakt betreffen kann.[2] Das terminale Ileum ist mit 90 % der am häufigsten befallene Darmabschnitt; nur bei 10 % der Patienten ist der Befall auf proximale Dünndarmabschnitte begrenzt. Einen reinen Dünndarmbefall weisen ca. 30-40 % der Patienten auf, bei 40-55 % ist auch der Dickdarm mit betroffen. Nur wenige Morbus-Crohn-Patienten, etwa 15-25 %, leiden ausschließlich an einer Kolitis.

Klinisch manifestiert sich die Erkrankung vornehmlich durch chronische Diarrhöen, abdominelle Schmerzen, Krämpfe, Fieber und Gewichtsverlust. Art und Intensität der Symptome sowie der Verlauf der Erkrankung sind sehr variabel.[2] Bei etwa 30 % der Patienten treten zusätzlich extraintestinae Manifestationen auf. Am häufigsten sind hierbei die Gelenke, in Form von Arthralgien und Arthritiden, betroffen.[2]

Histologisch ist das Auftreten von Epitheloidzellgranulomen charakteristisch für den Morbus Crohn. In den fokalen Entzündungsbereichen ist die Kryptenarchitektur der Mukosa gestört und es finden sich gehäuft Plasmazellen und Lymphozyten. Im endoskopischen Bild sind landkartenförmige Exulzerationen typisch. Dabei liegen nicht betroffene Darmbereiche zwischen den entzündeten Gebieten, sodass man von einem „Pflastersteinrelief“ spricht.[3]

Ein weiteres Charakteristikum des Morbus Crohn ist die Hypertrophie des mesenterialen Fettgewebes um die entzündeten Darmbereiche. Sie wurde bereits von dem Namensgeber der Erkrankung, Burrill B. Crohn, beschrieben.[4] Dieses Phänomen, auch *Creeping Fat* genannt, tritt ausschließlich bei Morbus Crohn auf. Es ist weder bei Colitis ulcerosa noch bei anderen intestinalen Entzündungen zu finden.

Definitionsgemäß muss für *Creeping Fat* das mesenteriale Fettgewebe mindestens 50 % der Serosa des betroffenen Darmabschnitts bedecken (Abbildung 1). Sowohl Dün- als

auch Dickdarm können betroffen sein.[5] Die Lokalisation der Fetthypertrophie korreliert mit der Entzündungsaktivität, mit der Darmwandverdickung und dem Auftreten von Strikturen und Ulzerationen im betroffenen Gebiet.[5]

Im Vergleich zu mesenterialem Fettgewebe gesunder Patienten weist das *Creeping Fat* einige Besonderheiten auf. Zum einen ist die Struktur des Fettgewebes verändert, zum anderen finden sich auf funktioneller Ebene gravierende Unterschiede, die die zelluläre Zusammensetzung sowie die sekretorische Aktivität des Gewebes betreffen. Die Hyperplasie des Gesamtorgans wird durch eine Hyperplasie der Adipozyten bedingt, deren Anzahl in den betroffenen Abschnitten um das Vierfache erhöht ist.[6] Außerdem finden sich, im Vergleich zu mesenterialem Fettgewebe von Gesunden, vermehrt Immunzellen im *Creeping Fat*. Auch die lokale Konzentration von Adipokinen und Zytokinen ist erhöht.[6-9]



Abbildung 1: *Creeping Fat* Operationssitus

Gezeigt wird der Dünndarm eines Patienten mit Morbus Crohn nach Laparotomie. Die Darmoberfläche ist, im Gegensatz zum gesunden Dünndarm, getrübt und erscheint granuliert. Das Fettgewebe erstreckt sich weit über die Serosa des betroffenen Darmabschnitts. Mit freundlicher Genehmigung von Herrn PD Dr. J. Ritz (Chefarzt für Allgemein- und Viszeralchirurgie, HELIOS Kliniken Schwerin).

2.2 Das Fettgewebe als Teil der angeborenen und erworbenen Immunität

Bei normalgewichtigen Menschen liegt der Fettanteil am Gesamtkörpergewicht zwischen 15 und 25 %.[10] Dabei wird zwischen braunem und weißem Fettgewebe unterschieden: Braunes Fettgewebe, welches reich an Ribosomen ist, dient vor allem der Thermogenese des Neugeborenen. Das beim Erwachsenen vorherrschende weiße Fettgewebe dagegen wird je nach Lokalisation und Funktion in Speicher-, Bau- und Isolierfettgewebe unterteilt. Adipozyten und ihre Vorläuferzellen, die Präadipozyten, bilden den größten Teil des Fettgewebes. Neben diesen sind auch sekundär eingewanderte Immunzellen wie Makrophagen und Lymphozyten im Fett zu finden.[11]

Lange Zeit wurde das Fettgewebe ausschließlich als Energiereserve angesehen, welche dem Organismus bei Bedarf gespeicherte Fettsäuren zur Verfügung stellt. Durch die Forschung der letzten Jahrzehnte hat sich diese Sichtweise stark verändert. Heute weiß man, dass das Fettgewebe als Organ (neuro-)endokrine, metabolische und immunologische Funktionen vereint (Abbildung 2).[12]

Die im Fettgewebe vorherrschenden Adipozyten produzieren Hormone, sogenannte Adipokine, die den Appetit und die Nahrungsaufnahme regeln. Außerdem sind sie an der Regulierung von Fortpflanzung und Insulinsensitivität beteiligt und beeinflussen darüber hinaus endotheliale, vaskuläre und hämatopoetische Funktionen des Körpers.[12] Die bekanntesten Vertreter der Adipokine sind Leptin und Adiponektin. Ihre Bedeutung bei pathologischen Prozessen wie Übergewicht, Diabetes und bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen ist weiterhin Gegenstand aktueller Forschung.

Adipozyten und Präadipozyten haben immunologisch relevante Eigenschaften: Sie exprimieren *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) und können damit auf bakterielle Stimuli reagieren.[13, 14] Außerdem können Präadipozyten einen makrophagen-ähnlichen Phänotyp ausbilden; sie exprimieren dann makrophagen-typische Oberflächenantigene, unter anderem der Monozyten-Makrophagenmarker(MOMA)-2 und das kostimulatorische Molekül CD80. [15] Des Weiteren sind Präadipozyten in der Lage, zu phagozytieren.[16] Die Produktion von Zytokinen, wie Interleukin(IL)-6, IL-1, Tumornekrosefaktor(TNF)- α und Chemokinen wie IL-8 und CCL-5, durch Adipozyten und Präadipozyten stellt eine weitere wichtige Verbindung zwischen Fettgewebe und Immunsystem dar.[17] Die immunologische Bedeutung der Adipokine, speziell von Leptin und Adiponektin, soll im Folgenden näher erläutert werden.

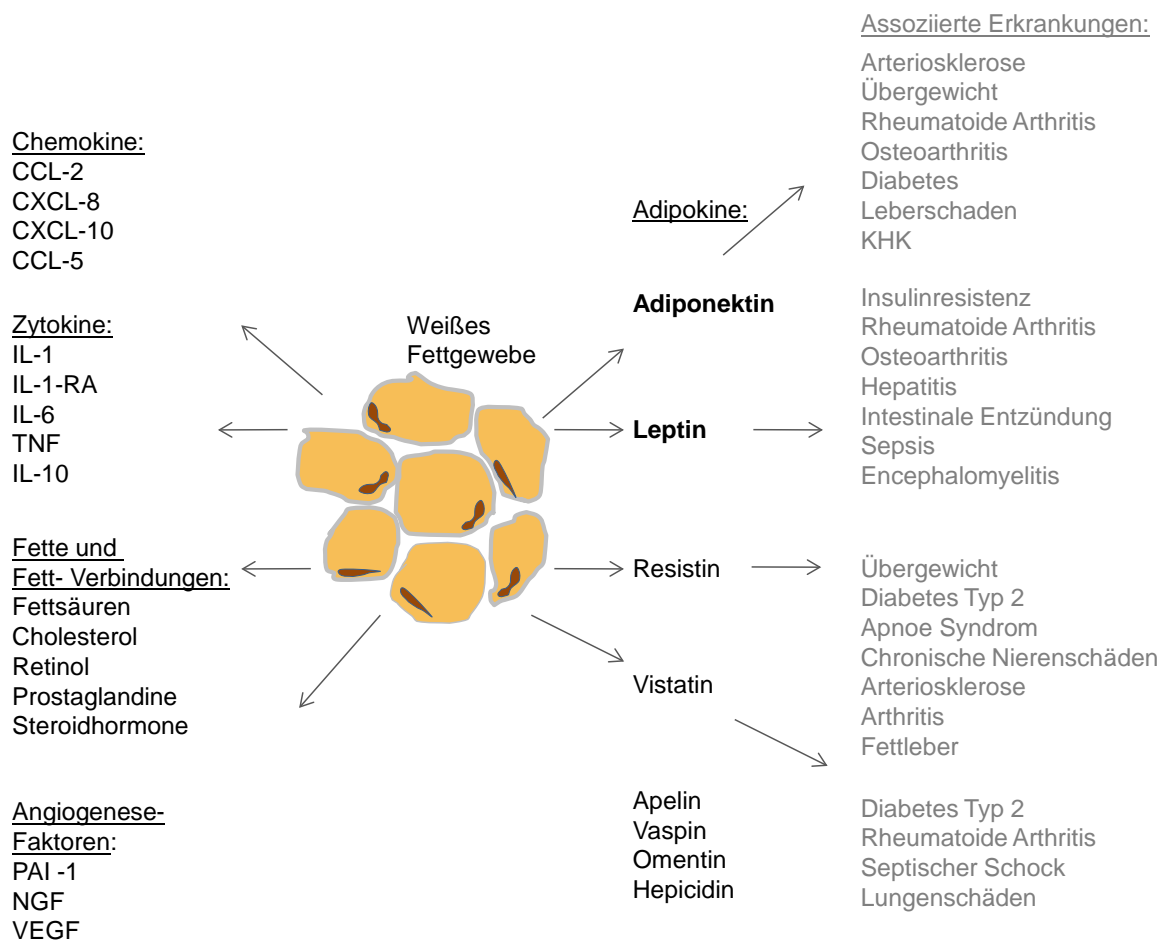


Abbildung 2: Endokrine Funktionen des weißen Fettgewebes [18]

Abkürzungen: Interleukin-1-Rezeptorantagonist (IL-1-RA); *nerve growth factor* (NGF); *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), CCL-Chemokin Ligand (CCL); CXCL-Chemokin Ligand (CXCL)

2.3 Adipokine und ihre Rezeptoren

2.3.1 Leptin

Leptin ist ein 16 kDa großes Peptidhormon, welches vornehmlich von Adipozyten produziert wird und regulatorisch im Metabolismus und im Immunsystem wirkt. Es wird durch das *Obese*(Ob)-Gen kodiert. Mäuse mit einer Mutation im Ob-Gen bilden einen charakteristisch adipösen Phänotyp aus, ihre Existenz ist bereits seit den 1950er Jahren bekannt.[19] Leptin bzw. der Leptinmangel als Ursache ihres Übergewichts konnte erst 1994 identifiziert werden.[20].

Leptin ist maßgeblich an der Regulierung von Nahrungsaufnahme und metabolischer Aktivität des Organismus beteiligt. Dabei korreliert seine Serumkonzentration direkt mit der Körperfettmasse.[21] Auf diese Weise übermittelt es dem Gehirn Informationen über die Energiereserven des Körpers und kann dadurch Nahrungsaufnahme und Energieverbrauch regeln. Es wirkt, unter anderem durch die Suppression der appetitsteigernden Mediatoren Neuropeptid-Y und Orexin sowie über die Induktion von Pro-Opiomelanocortin, appetitmindernd.[21, 22] Der geminderte Appetit wiederum verstärkt den Sympathikotonus und steigert auf diese Weise den Energieumsatz peripherer Organe. Zusätzlich wird über die Hypophysen-Hypothalamus-Achse die Freisetzung von Thyroid- und Steroidhormonen gefördert, welche im Organismus ebenfalls katabole Wirkungen entfalten.[23, 24] Leptin beeinflusst außerdem die Fertilität und den Knochenstoffwechsel.[25]

Wesentlich für die Bedeutung von Leptin ist seine regulatorische Wirkung im Immunsystem. Seine Aminosäuresequenz zeigt Homologien zur Familie der langkettigen helikalen Zytokine und weist damit auf seine immunologische Funktion hin.[26] Tatsächlich wird der Leptinrezeptor (Ob-R) ebenso in die Klasse I der Zytokinrezeptor-Superfamilie eingeordnet [27], zu welcher auch die Rezeptoren der Zytokine IL-2, IL-6, IL-11, IL-12 und der Rezeptor des *Granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF) zählen.[28, 29]

Die Bindung von Leptin an seinen Rezeptor führt zur Homodimerisierung der Rezeptoruntereinheiten und initiiert damit die Signaltransduktion.[28, 30]

Leptinrezeptoren können als kurze oder lange sowie als membranständige oder lösliche Isoform vorliegen.[30] Derzeit sind sechs verschiedene *Splice*-Varianten (Ob-Ra bis Ob-Rf) bekannt. Von diesen ist Ob-Rb die längste Isoform und die einzige Variante, für die eine durch Leptin-Bindung ausgelöste Signaltransduktion nachgewiesen werden konnte.[31]

Der Signaltransduktionsweg von Leptin weist Ähnlichkeit zum Wirkungsweg von IL-6 auf und wird über verschiedene Kinasewege, vor allem über *Signal-transducer-and-activator-of-transcription-3*(STAT-3)-, Phosphoinositol-3-Kinase (Pi3K), P38- und andere mitogen-aktivierte-Protein-Kinasen (MAPK) vermittelt.[32]

Leptin wirkt sowohl auf Zellen des angeborenen als auch auf Zellen des adaptiven Immunsystems. Als Voraussetzung für einen direkten Effekt konnte Ob-Rb auf allen bisher getesteten Immunzellen nachgewiesen werden.[32] Monozyten und Makrophagen exprimieren die langen und die kurzen Rezeptorisoformen. Verglichen mit anderen Leukozyten zeichnen sich diese Zellen durch eine besonders hohe Rezeptordichte aus.[33, 34] Im nicht aktivierten Zustand befinden sich jedoch nur 5-25 % der Rezeptormoleküle an der Zelloberfläche, die übrigen bilden einen intrazellulären *Pool*. Dieser ermöglicht bei einer Zellaktivierung eine unmittelbare Steigerung der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche und somit eine höhere Sensibilität der Zellen gegenüber Adipokinen.[30, 34]

Daten über die immunologische Bedeutung von Leptin beim Menschen stammen hauptsächlich aus Beobachtungen von Familien mit Leptinrezeptor-Defekten. Betroffene Patienten sind massiv adipös und haben ein defizitäres Immunsystem – bei ihnen wurden eine reduzierte Lymphozytenproliferation sowie verminderte Spiegel pro-inflammatorischer Zytokine festgestellt.[35, 36] Zusätzlich ist bei Kindern ein Leptin- oder Leptinrezeptordefekt mit einer erhöhten infektionsbedingten Mortalität assoziiert.[35, 36]

In vitro beeinflusst Leptin direkt die Aktivierung und Polarisation von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen. Dabei kommt es bei diesen Zellen zu einer vermehrten Expression von Aktivierungsmarkern und Adhäsionsmolekülen; außerdem verstärkt Leptin ihre Synthese pro-inflammatorischer Zytokine.[37] Die Proliferation von Gedächtnis-T-Zellen dagegen wird durch Leptin gehemmt.[38]

Auch Zellen des angeborenen Immunsystems können durch Leptin aktiviert werden. Bei humanen Monozyten fördert es dosisabhängig die Proliferation.[39] Außerdem steigert es die Expression verschiedener Aktivierungsmarker wie *Cluster of Differentiation (CD)* 38, CD25, CD71, CD11b/c und *Human Leukocyte Antigen (HLA)*-DR auf humanen Monozyten und Makrophagen.[39] Leptin stimuliert bei diesen Zellen die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α , G-CSF und des *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)*. [39, 40] Es fördert die Freisetzung von Stickstoffmonoxid, Cyclooxygenase-2 und Leukotrien-B4 sowie die Phagozytoseleistung dieser Zellen.[39-41]

Die Aktivierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) *in vitro*, z. B. durch Phytohämagglutine (PHA) oder Concanavalin A (ConA), führte bei diesen zu einer gesteigerten Expression von Ob-Rb. Auch *in vivo* konnte eine erhöhte Ob-Rb-Expression durch Zellaktivierung am Beispiel einer Infektion mit Humanem Immundefizienz-Virus (HIV) gezeigt werden.[33]

Eine Verbindung von Leptin zu entzündlichen Erkrankungen *in vivo* konnte sowohl im Tiermodell als auch bei Menschen nachgewiesen werden. Leptindefizienz zeigte einen protektiven Effekt in Entzündungsmodellen, wie bei der ConA-induzierten Hepatitis oder der experimentellen Arthritis.[42, 43] Dieses trifft auch auf verschiedene Kolitismodelle zu. So sind leptindefiziente Mäuse zum großen Teil sowohl vor einer Dextran-Natriumsulfat(DSS)- als auch vor einer Trinitrobenzolsulfonsäure(TNBS)-induzierten Kolitis geschützt. Wird Leptin jedoch supplementiert, kommt es auch bei diesen Tieren zur Entzündung.[43, 44] In Transfermodellen konnte gezeigt werden, dass naive T-Zellen aus leptindefizienten Tieren erst mit deutlicher Verzögerung eine Kolitis induzieren.[44, 45]

Interessanterweise ist die lokale Leptinkonzentration des mesenterialen Fettgewebes von Patienten mit Morbus Crohn auf mRNA- und Proteinebene – verglichen mit Colitis ulcerosa, kolorektalem Karzinom oder Divertikulitis – signifikant erhöht.[7, 46] Dagegen ist die Serumleptinkonzentration der Patienten mit Morbus Crohn im Vergleich zu allen Kontrollgruppen im Durchschnitt vermindert.[47]

2.3.2 Adiponektin

Adiponektin ist mit einem Proteinanteil von 0,05 % das Adipokin mit der höchsten Konzentration im humanen Plasma. Bei gesunden Individuen liegt diese bei 2-17 µg/ml und korreliert invers mit dem Körperfettanteil.[48] Auch AdipoQ, Acrp30 und GBP28 genannt, wird es ausschließlich von Adipozyten produziert.[49, 50] Adiponektin besteht aus 244 Aminosäurerestern, deren Sequenz Ähnlichkeiten zum Komplementfaktor C1q und zu Kollagen VIII und X aufweist.[49]

Das Molekül setzt sich aus Monomeren zusammen, die jeweils eine Masse von 30 kDa haben. Sie bestehen aus einem C-terminalen globulären und einem N-terminalen fibrillären Bereich. [49] Rekombinant hergestelltes Adiponektin ist sowohl als freie globuläre Domäne (gAd; 16 kDa) als auch in voller Länge erhältlich.

Adiponektin vermittelt seine Wirkung über Rezeptoren (AdR) mit sieben Transmembrandomänen, intrazellulärem N-Terminus und extrazellulärem C-Terminus. Derzeit sind zwei Isoformen, AdR1 und AdR2, bekannt.[51] Nicht nur die Rezeptoraffinität der diversen Adiponektinmoleküle unterscheidet sich; auch das Expressionsmuster der Rezeptorisoformen ist verschieden. Das gAd zeigt eine höhere Affinität zu AdR1, welcher unter anderem in der Skelettmuskulatur vorkommt und an der Regulierung des zellulären Lipidmetabolismus beteiligt ist. Adiponektinmultimere sind stärker affin zu AdipoR2, welcher unter anderem in der Leber exprimiert wird.[51, 52]

Die Rezeptorsignaltransduktion findet über Signalkaskaden statt, unter denen die Adenosinmonophosphat(AMP)-aktivierte Proteinkinase sowie der *peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR)-α* einen besonderen Stellenwert haben.[52] Dabei sind die Adiponektinformen mit niedrigem bis mittlerem Molekulargewicht in der Lage, den *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF-κB) zu aktivieren.[53] NF-κB ist ein Transkriptionsfaktor mit zentraler Bedeutung in der Regulation von Zellproliferation und Zelltod. Außerdem ist er essenziell für verschiedene Funktionen der Immunabwehr.

Für Adiponektin wurden metabolische, antikanzerogene, vaskuloprotektive und anti-inflammatorische Effekte beschrieben. Es scheint an der Blutzuckerkontrolle beteiligt zu sein und die Sensitivität von Geweben gegenüber Insulin zu erhöhen. Bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 sind Serumadiponektinspiegel niedriger als bei Gesunden.[54]

In der Leber kann Adiponektin die Glukoneogeneseaktivität reduzieren[52], außerdem fördert es eine vermehrte Translokation des Glukosetransporters-4 an die Zelloberfläche und steigert die Oxidation von Fettsäuren im Skelettmuskel.[55] Im Gefäßsystem wird Adiponektin eine protektive Wirkung gegenüber Arteriosklerose zugeschrieben. Unter anderem vermindert es die TNF-α-induzierte Expression von Adhäsionsmolekülen auf Makrophagen und die Aktivierung und Proliferation von Endothelzellen, die jeweils maßgeblich an der Entstehung von Arterioskleroseplaques beteiligt sind.[56-58] Tatsächlich konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass Adiponektin die Bildung arteriosklerotischer Plaques *in vivo* reduzieren.[58]

Auf myeloische Vorläuferzellen wirkt Adiponektin antiproliferativ.[59] Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass einige Tumorerkrankungen mit verminderten Adiponektinserumspiegeln einhergehen.[60]

Die Bedeutung von Adiponektin für Entzündungsprozesse wurde in den letzten Jahren intensiv beforscht. Es konnte gezeigt werden, dass Adiponektin die Produktion von IL-10 und die Synthese des IL-1 Rezeptorantagonist(IL-1Ra) humaner Makrophagen und dendritischer Zellen fördert und ihre Interferon-(IFN)γ-Synthese reduziert.[61, 62] Zusätzlich wurde eine hemmende Wirkung auf die Lipopolysaccharid (LPS) induzierte Expression von entzündungsfördernden Genen in Makrophagen von Mensch und Schwein sowie in einer murinen Makrophagen-Zelllinie (RAW264.7) nachgewiesen.[59, 63, 64] Adiponektin ist in der Lage, die TNF-α- und IL-6-Produktion humaner Makrophagen zu steigern, anschließend sprechen die aktivierten Zellen jedoch nicht mehr auf weitere bakterielle Stimulation an.[65] Diese Ergebnisse unterstützen das Konzept der adiponektin-vermittelten Endotoxintoleranz.[66]

Mechanistisch konnte diesbezüglich gezeigt werden, dass Adiponektin die Phosphorylierung des NF κ B-Inhibitors (I κ B) und die Aktivierung verschiedener Kinasewege (MAPK, wie c-Jun N-terminale Kinasen (JNK)) durch LPS oder TNF- α vermindert. Außerdem wirkt es hemmend auf die IL-6 induzierte Phosphorylierung von STAT3.[67] Adiponektin inhibiert zusätzlich die Expression von *Scavenger*-Rezeptoren der Klasse A und die Phagozytoseleistung humaner Makrophagen [61, 68] sowie ihre CX-Chemokin-Ligand (CXCL)-3-vermittelte Rekrutierung von T-Zellen.[69]

In-vivo-Ergebnisse zur Bedeutung von Adiponektin in Entzündungsreaktionen sind Gegenstand kontroverser Diskussionen: Auf der einen Seite waren adiponektin-defiziente Mäuse in einem Standardmodell intestinaler Inflammation vor der Induktion einer chemischen Kolitis durch *DSS* geschützt, wobei der Schutz wiederum durch die Gabe von Adiponektin aufgehoben werden konnte.[70] Auf der anderen Seite ist beschrieben, dass adiponektin-defiziente Tiere im Rahmen einer *DSS*-Kolitis eine stärkere intestinale Entzündung zeigten und hier eine Behandlung mit Adiponektin protektiv wirkte. Bei TNBS-induzierter Kolitis dagegen hatte Adiponektin keine Wirkung auf die Entzündungsreaktion.[71]

Beim Menschen besteht eine inverse Korrelation zwischen den Plasmakonzentrationen von Adiponektin und dem C-reaktiven Protein (CRP).[72] CRP ist im klinischen Alltag ein wichtiger Parameter für den Verlauf von Entzündungsreaktionen und in der Diagnostik chronisch entzündlicher Darmerkrankungen von Bedeutung.[2, 73]

Erhöhte Adiponektinplasmakonzentrationen wurden im Rahmen chronischer Erkrankungen, wie z. B. rheumatoider Arthritis, systemischem Lupus erythematoses oder Diabetes mellitus Typ 1, gefunden.[74] Bei Patienten mit Morbus Crohn ist die Plasmakonzentration von Adiponektin im Vergleich zu gesunden Kontrollen hingegen unverändert.[47] Die lokale Adiponektinkonzentration im hypertrophierten mesenterialen Fettgewebe dieser Patienten ist jedoch, wie bereits für Leptin beschrieben, erhöht.[7, 8]

2.4 Makrophagen, Zellen des angeborenen Immunsystems

Makrophagen gehören zur myeloiden Reihe der Leukozyten und zählen mit ihren Vorläuferzellen, den Monozyten, zum Phagozyten-System. Obwohl Makrophagen Effektorzellen des angeborenen Immunsystems sind und als solche eine wichtige Rolle in der unspezifischen Abwehr spielen, sind sie funktionell auch für die Aktivierung und Modulation der spezifischen T-Zellantwort von größter Bedeutung.[75, 76] Ihren Aufgaben kommen sie nach, indem sie lösliche Faktoren wie Zytokine, Chemokine und Enzyme, aber auch Bestandteile extrazellulärer Matrix absondern. Sie sind mit einer Vielzahl von Oberflächenmo-

lekülen ausgestattet – Rezeptoren wie TLRs, dem LPS-Rezeptor (CD14), Mannose-(ManR) und *Scavenger*-Rezeptoren und auch Molekülen zur Antigenpräsentation wie dem humanen Leukozytenantigen (HLA) – die ihnen ermöglichen, Fremdkörper zu erkennen, diese zu internalisieren sowie exogene und endogene Antigene zu präsentieren.[77-79]

Zellen des Monozyten-Makrophagenkompartiments zeichnen sich durch eine große Plastizität aus. An die T-Helferzell(Th)-Klassifikation angelehnt, werden auch Makrophagen in M1 und M2 eingeteilt. Ihre Differenzierung, und damit ihr Phänotyp und ihre Funktion, werden maßgeblich von ihrer Umgebung beeinflusst.[80, 81]

Makrophagen entstehen aus zirkulierenden Monozyten, welche die Blutbahn verlassen und sich unter dem Einfluss lokaler Gewebefaktoren differenzieren. Um ihre Lokalisation in verschiedenen Geweben zu beschreiben, wurden ihnen Eigennamen gegeben. Im Zentralnervensystem heißen sie Mikrogliazellen, in der Leber spricht man von Kupfer-Zellen, in der Lunge von Alveolarmakrophagen und im Knochen von Osteoklasten, um nur einige Beispiele zu nennen.

Auch im Fettgewebe stellen Makrophagen eine wichtige Zellpopulation dar. Bei der Einwanderung von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark scheint *Monocyte chemoattractant protein*-(MCP)-1, welches von Adipozyten produziert wird und mit dem C-Chemokinrezeptor Typ 2 (CCR-2) interagiert, eine entscheidende Rolle zu spielen.[82, 83] Zeyda *et al.* haben 2007 eine spezifische Form der Fettgewebemakrophagen beschrieben: Die aus humanem Fettgewebe gewonnenen Zellen entsprachen phänotypisch M2-Makrophagen und exprimieren entsprechend CD163 und CD14 und IL-10. Interessanterweise sind sie jedoch auch in der Lage, große Mengen an pro-inflammatorischen Zytokinen zu produzieren. Ihre TNF- α -, IL-6-, IL-1 β - und MCP-1-Synthese übertraf sogar die der M1-Makrophagen.[84] Während also bei gesunden Menschen M2-Makrophagen im Fettgewebe vorherrschen, kommt es bei adipösen Patienten zu einem Phänotyp-Wechsel. Hier überwiegen pro-inflammatorische M1-Makrophagen.[85, 86] Diese Zellen stehen im Verdacht, Anteil an der chronischen Entzündung bei Adipositas zu haben. Sie sind mit dem Auftreten von Insulinresistenz, Diabetes mellitus Typ 2 und kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert.[87]

2.5 Makrophagen-Klassifikationen

Die Einteilung in M1- und M2-Makrophagen ist eine grobe Vereinfachung, bei der M1 und M2 zwei Extreme im Aktivierungsmuster von Makrophagen beschreiben, wobei *in vivo* wahrscheinlich ein plastisches Kontinuum unterschiedlicher Aktivierungszwischenstufen vorliegt. Diese Überlegung liegt der Makrophagenklassifikation von Mosser und Edwards

zugrunde, welche die funktionelle Einteilung der Makrophagen in den Vordergrund stellt. (Abbildung 3) In ihrer Darstellung verzichten die Autoren auf klare Grenzen zwischen den Subtypen und zeigen damit, dass es sich nicht um ein starres System handelt, sondern die unterschiedlichen Funktionstypen auch ineinander übergehen können. [79]

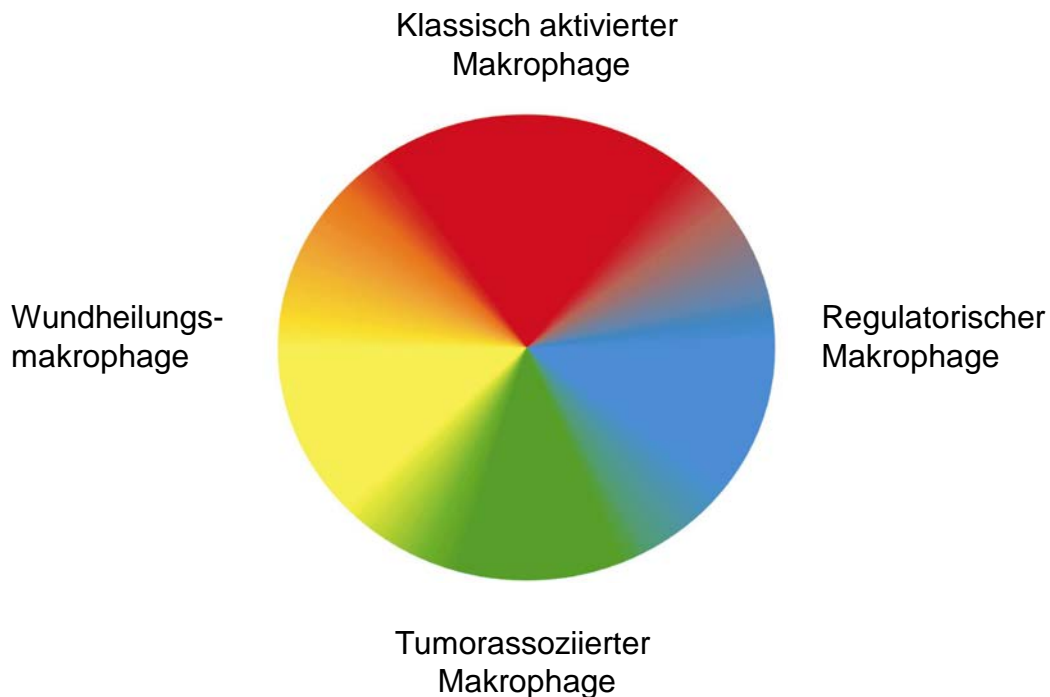


Abbildung 3: Makrophagenklassifikation nach Mosser und Edwards [79].

Dargestellt ist eine funktionelle Einteilung von Makrophagensubtypen, wobei klassisch aktivierte M1-Makrophagen rot, Wundheilungsmakrophagen, die zu den M2-Makrophagen zählen, gelb und die regulatorischen Makrophagen blau dargestellt sind. Dazwischen liegt, in grün, die Sonderform der tumorassoziierten Makrophagen (TAM). Der Farbverlauf symbolisiert den Übergang der Subtypen ineinander.

Während bei dieser Klassifikation berücksichtigt wird, dass Makrophagen im Gewebe einer Vielzahl an Stimuli gleichzeitig ausgesetzt sind, ziehen andere Autoren schärfere Grenzen zwischen den Subtypen und definieren diese über die Expression spezifischer Marker.

Mantovani *et al.* stellen in ihrer Klassifikation den pro-inflammatorischen, durch eine Kombination aus IFN γ und LPS oder TNF- α klassisch aktivierten M1-Makrophagen, die Gruppe der „alternativ“ aktivierten M2-Makrophagen gegenüber. Diese werden noch einmal in drei Untergruppen eingeteilt: M2a-, M2b- und M2c-Makrophagen. (Abbildung 4)

Eine M2a-Polarisation wird durch IL-4 oder IL-13 induziert. Zellen dieser Untergruppe produzieren keine pro-inflammatorischen Zytokine. Funktionell wird ihnen vor allem eine wich-

tige Rolle in der Abwehr von Parasiten sowie bei Allergien zugesprochen. M2c-Makrophagen entstehen durch den Einfluss von IL-10 und Glukokortikoiden. Sie sind an der Produktion extrazellulärer Matrix und am Gewebsumbau beteiligt und wirken immunregulatorisch. Auch sie sind nicht in der Lage, pro-inflammatorische Zytokine zu produzieren.

In diesem Punkt lässt sich der M2b-Subtyp von den anderen beiden Untergruppen deutlich abgrenzen. Die Entstehung von M2b-Makrophagen wird durch Immunkomplexe, TLR-Agonisten oder die Stimulation des IL-1-Rezeptors induziert. Trotz des M2-typischen IL-10^{high}-IL-12^{low}-Phänotyps sind sie im Gegensatz zu M2a- und M2c-Makrophagen in der Lage, hohe Konzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine abzusondern. Ein spezifisches Merkmal dieser Untergruppe ist die Produktion von CCL-1. CCL-1 interagiert mit dem CCR-8, welcher sich vor allem auf Th2-Zellen und regulatorischen T-Zellen findet. M2b-Makrophagen wird eine wichtige Rolle in der Th2-Aktivierung und der Regulation von Abwehr und Entzündung zugeschrieben.[78, 81, 88]

Die große Plastizität der Makrophagen erlaubt es ihnen, sich an die Gegebenheiten ihrer Umgebung anzupassen. Dabei scheint ihr Aktivierungszustand dynamisch und reversibel zu sein [89, 90], sodass trotz ihrer Variabilität das Zusammenfassen diverser Unterformen zu M2-Makrophagen durch ihre Gemeinsamkeiten gerechtfertigt zu sein scheint und sich besonders für die experimentelle Arbeit anbietet. Aus diesem Grund ist das M1-M2-Paradigma nicht nur in der experimentellen Forschung nach wie vor von Bedeutung.

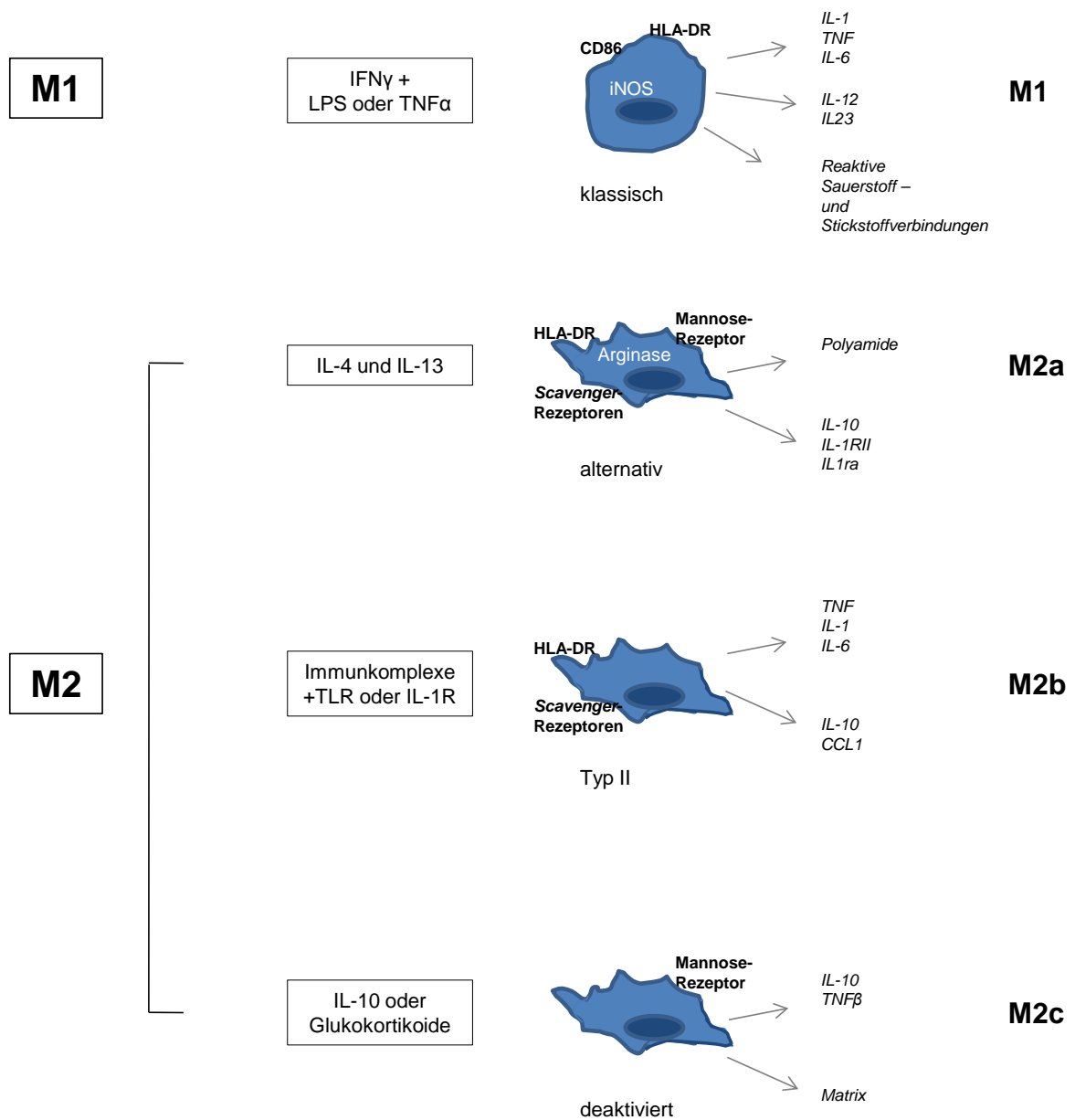


Abbildung 4: Makrophagenklassifikation nach Mantovani *et al.*[78]

Aus Monozyten entstehen umgebungsabhängig M1- und M2-Makrophagen. Durch unterschiedliche Stimuli, kommt es innerhalb des M2-Typus zur Ausprägung spezifischer Oberflächenmarker und Funktionen, sodass die M2-Zellen in drei Unterkategorien, M2a- M2c, eingeteilt werden können.

2.6 *In-vitro*-Generierung von Makrophagensubtypen

2.6.1 M1-Makrophagen

In vitro können nach einem Protokoll von Verreck *et al.* mit GM-CSF bzw. M-CSF aus CD14⁺-Zellen des peripheren Blutes M1- und M2-Makrophagen generiert werden.[91]

Durch Zugabe von GM-CSF zum Kulturmedium entstehen dabei klassisch aktivierte, pro-inflammatorische M1-Makrophagen. Diese zeichnen sich durch einen adhärenen Phänotyp mit rundlicher, spiegeleiähnlicher Morphologie aus.[92] M1-Makrophagen exprimieren HLA-DR und den IL-18-Rezeptor in hoher Dichte, sowie CD14 in mittlerer Intensität. Außerdem zeigen sie ein charakteristisches Zytokinprofil, bei dem die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-12/IL-23, IL-1 β , TNF- α und IL-6 im Vordergrund steht.[91, 92] Charakteristisch ist überdies eine hohe Produktion von Stickstoffmonoxid durch die induzierbare NO-Synthetase (iNOS). Die Expression der Chemokine/Chemokinrezeptoren CCL-2, CCL-5, CXCL-8 und CCR-7 wurde ebenfalls als typisches Merkmal des M1-Subtyps beschrieben.[77, 93] Eine M1-Aktivierung spielt eine wichtige Rolle bei der Abwehr intrazellulärer Erreger und wird mit septischen Krankheitsverläufen in Verbindung gebracht.[77, 94]

2.6.2 M2-Makrophagen

Durch die Anwesenheit von M-CSF generierte M2-Makrophagen zeichnen sich durch einen adhärenen Phänotyp mit einer gestreckten, spindelförmigen Morphologie aus. Diese Zellen sind charakteristischerweise CD14^{high}, HLA-DR^{low} und exprimieren spezifisch CD163, einen cysteinreichen *Scavenger*-Rezeptor. Auch Stabilin-1, ein weiterer multifunktionaler *Scavenger*-Rezeptor, und der Mannose-Rezeptor CD206 wurden als spezifische M2-Marker identifiziert.[95-99] Untergruppenunabhängig und ungeachtet einer möglichen Stimulation produzieren M2-Makrophagen große Mengen IL-10.[91, 92] Die Sekretion von IL-8, MCP-1, IFN γ -induziertem Protein-10 (IP-10, entspricht CXCL-10), *Macrophage inflammatory protein-1* β (MIP-1 β , entspricht CCL-4) und CCL-5 spricht für eine potenzielle Funktion dieses Subtyps in der Rekrutierung weiterer Immunzellen.[92]

2.7 Fragestellung

Der Aktivierungszustand und das Funktionsmuster von Makrophagen werden hauptsächlich durch das lokale Milieu bestimmt, in welchem sich die Zellen befinden.[90, 100] Da die erhöhte Adipokinkonzentration im mesenterialen Fettgewebe von Patienten mit Morbus Crohn eine einzigartige Umgebung für die einwandernden Makrophagen darstellt und bekannt ist, dass Makrophagen funktionell durch Adipokine beeinflusst werden können, beschäftigt sich diese Arbeit mit dem Einfluss von Adipokinen auf den Phänotyp und die Funktion von Makrophagen. Dabei wurde ein besonderer Schwerpunkt auf die Unterschiede zwischen Makrophagensubpopulationen gelegt.

Für die vorliegende Arbeit ergaben sich daraus folgende Fragestellungen:

1. Unter welchen Bedingungen polarisieren CD14⁺-Monozyten aus humanem peripherem Blut *in vitro* in M1- bzw. M2-Makrophagen und exprimieren diese Adipokinrezeptoren als nötige Voraussetzung für eine Beeinflussung der Zellen durch diese Moleküle?
2. Welchen Einfluss haben Leptin und Adiponektin auf die Differenzierung, den Phänotyp und die Funktion von humanen M1- und M2-Makrophagen?
3. Welche Makrophagensubpopulationen finden sich im mesenterialen Fettgewebe von Patienten mit Morbus Crohn?
4. Haben Adipokine einen Einfluss auf das chemotaktische Potenzial von Makrophagen gegenüber T-Zellen?

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien, Lösungen und Kits

Alle verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Lösungen hatten den höchsten verfügbaren Reinheitsgrad.

Biocoll-Trennlösung (Dichte 1,077 g/ml)	Biochrom, Berlin, Deutschland (DE)
Citronensäure	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Cytometric Bead Arrays (CBA):	BD Bioscience, San Diego, Vereinigte Staaten (USA)
- <i>Human Inflammatory Cytokine Kit</i> :	
- Flex Sets: human IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF	
- Flex Set Single Plex, human TGF- β 1	
- Flex Set Single Plex: human IL12p70	
Desoxyribonukleosidtriphosphat-Stammlösung (dNTP); jeweils 40 mM dATP, dCTP, dGTP bzw. dTTP	Peqlab, Erlangen, DE
Dimethylsulfoxid	Sigma, Deisenhofen, DE
ELISA Kit: humanes CCL-1	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, DE
ELISA Kit: humanes IL-23(p19/p40)	eBioscience, Hatfield, Großbritannien (UK)
Eselserum	Dianova, Hamburg, DE
Ethanol (96 %, 80 % und 70 %) vergällt mit 1-prozentigem Methylethylketon	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ethanol (absolut)	Merck, Darmstadt, DE
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg, DE
Fötales Rinderserum (FBS)	Linaris, München, DE
Grundmedium: RPMI1640 mit Phenolrot; #E15-039	PAA Laboratories, Pasching, Österreich (AT)
Grundmedium: RPMI1640 ohne Phenolrot; Gibco #11835	Invitrogen, Darmstadt, DE
HCl	Merck, DE
Hematoxylin-Lösung; Meyers Hämatoxylin	Merck, DE
Heparin (25000 IE/mL); steril	B. Braun, Melsungen, DE
KCl	Merck KGaA, DE
KH ₂ PO ₄	Carl Roth, DE
Latexpartikel; 2 μ m, Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markiert	Polysciences, Inc, Warrington, USA
L-Glutaminlösung (200 mM); steril	PAA Laboratories, AT
<i>MicroBeads</i> :	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
- humanes CD14, CD4	

Na ₂ HPO ₄	Carl Roth, DE
NaCl	Sigma, DE
NaOH	Merck, DE
Natriumcitrat	Carl Roth, DE
PCR-Mastermix; SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, UK
Penicillin (10.000 U/mL) / Streptomycin (10.000 µg/mL)-Lösung; steril	Biochrom, Berlin, DE
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ohne Ca ⁺⁺ und Mg ⁺⁺ ; pH 7,4 (PBS)	PAA Laboratories, AT
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Sigma, DE
Propidiumiodid	MP Biomedicals, Ilkirch, Frankreich (FR)
Reverse Transkriptase; MultiScribe™ Reverse Transcriptase	Invitrogen, DE
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, DE
RNAse-Inhibitor; RNAse-OUT, 40 U/µL	Invitrogen, DE
RNeasy <i>Mini Kit</i> und Qia-Shredder	Qiagen, Hilden, DE
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth, DE
Tris-HCl	Merck, DE
Trypanblaulösung (0,5 %); steril	Biochrom, DE
Trypsin (0,5 %)/EDTA (0,2 %)-Lösung; steril	PAA Laboratories, AT
Xylol	Carl Roth, DE
Zähl- <i>Beads</i> ; Calibrite	BD Biosciences, USA

3.1.2 Materialien und Geräte

Analysenwaage; BP210D	Sartorius, Göttingen, DE
Autoklav; Varioklav 500E	H+P Labortechnik, Oberschleißheim, DE
Axiolmager Z1, <i>Inverses Mikroskop mit Phasenkontrast</i>	Zeiss, Berlin, DE
Begasungsbrutschrank; Heracell 150	Heraeus, Hanau, DE
Durchflusszytometer; FACSCanto™ II mit Software FACSDiva™ (Version 6.1.3), CellQuest™ Pro (Version 5.2.1) und FCAP Array™ (Version 1.0.1)	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Eisbereiter, AF100	Scotsman, Bettolino di Poliano, Italien (IT)
ELISA-Platten; <i>Coat Corning Costar</i> 9018	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Kühlschrank, 4 °C	Liebherr, Biberach, DE

Kühlzentrifuge; Biofuge fresco	Heraeus, DE
Kühlzentrifuge; Eppi:und Heraeus Fresco	Fisher Scientific, Schwerte, DE
Magnetrührer; Ikamag RH	IKA, Staufen, DE
Mixer; Vortex Reax 2000	Heidolph, München, DE
pH-Meter; 766 Calimatic mit Einstab-Messelektrode	Knick, Berlin, DE
Photometer für Mikrotiterplatten mit Software Easy-WinFitting (Version 6.0 a)	Tecan, Crailsheim, DE
Reaktionsgefäße für PCR; 100 µL, <i>Fast Optical 96-well Reaction Plate</i> ;	Applied Biosystems, Foster City, USA
Real-Time PCR System; StepOne ^{PLUS}	Applied Biosystems, USA
Rollenmischer; RM5, Assistent 348	Fröbel, Lindau, DE
Säulen für MACS; LS-Säule	Miltenyi Biotec, DE
Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom; Herasafe 1.8	Kendro, Langenselbold, DE
Software: ImageJ (http://rsb.info.nih.gov/nih-image/)	National Institutes of Health, Bethesda, USA
Spektrophotometer; Nanodrop® ND-1000	Agilent Technologies, Böblingen, DE
Thermocycler; T3000	Biometra, Göttingen, DE
Tiefkühlschrank -20 °C	Liebherr, DE
Tiefkühlschrank -80 °C	SANYO Component Europe GmbH, München, DE
Wasserbad, Isotemp 210	Fisher Scientific, DE
Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim, DE
Zellkulturplatte: 24-Well	BD Biosciences, USA
Zellkulturplatte: 6-Well, Flachboden	Sigma, DE

3.1.3 Puffer- und Standardlösungen

Annexin V-Bindungspuffer	10 mM HEPES/NaOH 140 mM NaCl 2,5 mM CaCl ₂ pH 7,4
Citratpuffer, 100 mM	4,94 l Aqua dest, 10,5 g Citronensäure-Monohydrat 60 ml 2M NaOH pH 6,0
MACS-Puffer	450 ml PBS 50 ml BSA 5 % +/- 2mM EDTA
PBS	11,6 g Na ₂ HPO ₄ 2 g KH ₂ PO ₄ 2 g KCl auf 10 L mit A. dest. pH 6,5–7,0
PBS-Tween	2 l PBS 1 ml Tween 20

3.1.4 Medien für die Zellkultur

Einfriermedium für T-Zellen	80 % FBS 20 % Dimethylsulfoxid
Komplettmedium	RPMI1640 mit Phenolrot 10 % FBS 2 mM L-Glutamin 1.000 U/ml Penicillin 1 mg/ml Streptomycin
Transmigrationsmedium	RPMI1640 ohne Phenolrot 10 % FBS 2 mM L-Glutamin 1.000 U/ml Penicillin 1 mg/ml Streptomycin

3.1.5 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden durch die Firma TIB Molbiol (Berlin, DE) hergestellt und hatten eine für die RT-PCR geeignete Reinheit (Tabelle 1).

Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotide

Template	Name	Sequenz (5' → 3')	Anlagerungs- temperatur (°C)
mRNA	Oligo-dT ₁₅	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	
	Random Hexamer	NNNNNN [‡]	
GNB2L1	Forward	GAG TGT GGC CTT CTC CTC TG	56
	Reverse	GCT TGA AGT TAG CCA GGT TC	
ManR	Forward	AGG AAA GAA TAA ACC CTG GGC CAT	64
	Reverse	CAC GCA GCG CTT GTG STC TTC ATT	
AdR1	Forward	TTC TTC CTC ATG GCT GTG ATG	57
	Reverse	AAG AAG CGC TCA GGA ATT CG	
AdR2	Forward	ATA GGG CAG ATA GGC TGG TTG A	58
	Reverse	GGA TCC GGG CAG CAT ACA	
Ob-Rb	Forward	GCC AAC AAC TGT GGT CTC TC	62
	Reverse	AGA GAA GCA CTT GGT GAC TG	
CCL1	Forward	CCT GCG CCT TGG ACA CAG T	59
	Reverse	CAG AGC CCA CAA TGG AAA GAA A	

GNB2L1 - *Guanine nucleotide-binding protein, beta polypeptide 2-like 1*; [‡]N beliebige Base (A, C, G oder T)

3.1.6 Antikörper

Tabelle 2: Verwendete primäre Antikörper

Antigen	Herkunft, Subtyp, Klon	Konjugation/Fluorochrom	Hersteller
CD14	Maus, IgG1, κ, 61D3	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	eBioscience, USA
CD163	Maus, IgG1, κ, GHI/61	Phycoerythrin (PE)	BD Biosciences, USA
CD80	Maus, IgG1, κ, 2D10,4	PE	eBioscience, USA
HLA-DR	Maus, IgG2b, κ, LN3	Allophycocyanin (APC)	eBioscience, USA
CD163	Maus, IgG1, 10D6	nicht konjugiert	Novocastra, Berlin, DE
CD68	Maus, IgG1, PG-M1-	nicht konjugiert	Dako, Glostrup, Dänemark (DK)
iNOS	Kaninchen, IgG, polyklonal	nicht konjugiert	Abcam plc, Cambridge, UK
Stabilin 1	Kaninchen, polyklonal	nicht konjugiert	Sigma-Aldrich, USA
CD3	Maus, polyklonal	nicht konjugiert	Dako, DK
CD4	Maus, IgG1, κ, BC/1F6	nicht konjugiert	A.Menarini, Florenz, IT
Foxp3	Maus, IgG1, κ 236A/E7	nicht konjugiert	eBioscience, USA
IFN γ	Kaninchen, polyklonal	nicht konjugiert	PeptoTech, USA
IL-10	Kaninchen, polyklonal	nicht konjugiert	PeptoTech, USA
IL-17	Kaninchen, polyklonal	nicht konjugiert	Bioss, Inc., Woburn, USA

Tabelle 3: Sekundäre Antikörper

Antigen	Herkunft, Subtyp	Konjugation/Fluorochrome*
Kaninchen	Ziege	Alexa555
Ziege	Esel	Alexa488
Maus	Esel	Alexa350

* Alle hergestellt von Invitrogen, D

3.1.7 Rekombinante Zytokine und Adipokine

Tabelle 4: Rekombinante Zytokine und Adipokine

Protein*	rekombinant aus	Spezifische Aktivität [U/mg]/	Stammkonzentration [µg/mL]
GM-CSF	<i>E. coli</i>	$\geq 1 \times 10^7$	$\leq 0,001$
M-CSF	<i>E. coli</i>	$\geq 2 \times 10^5$	$\leq 0,005$
Leptin	<i>E. coli</i>		1
Adiponektin	Insektenzellen (Hi-5)		3-5
CXCL-12	<i>E. coli</i>		$\leq 0,001$

* Alle hergestellt von PeproTech, USA

3.1.8 Untersuchungsmaterial

Den freiwilligen Probanden wurde mit einer Spritze, deren Innenwände zuvor mit Heparin (25000 IE/ml) benetzt worden war, Vollblut abgenommen. Dieses wurde innerhalb von 2 Stunden nach Entnahme weiterverarbeitet. Das Blut wurde ausschließlich zum Zweck der Versuche abgenommen. Alle Probanden fühlten sich zum Zeitpunkt der Blutabnahme gesund und waren normalgewichtig (*Body-Mass-Index* zwischen 19 und 25).

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Biopsien des mesenterialen Fettgewebes von Patienten mit Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, kolorektalem Karzinom und nicht dysplastischen Neoplasien als gesunde Kontrollen aus dem Archiv des Institutes für Pathologie am Campus Benjamin Franklin, Charité – Universitätsmedizin Berlin verwendet. Bei Morbus Crohn stammten die Proben ausschließlich von Patienten mit aktivem ileozökalem Befall oder Befall des Kolons.

Die Operationsindikation bei Colitis ulcerosa war ein therapierefraktärer Verlauf. Alle Proben wurden an entzündeten Bereichen aus dem mesenterialen Fett entnommen.

Für alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche lag eine Genehmigung der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin vor (Antragsnummer: EA4/059/10).

3.2 Zellpräparation und Zellkultur

3.2.1 Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes

Die Isolation peripherer mononukleärer Zellen erfolgte über einen Dichtegradienten.[101] Biocoll-Trennlösung enthält Ficoll 400, ein synthetisches, polysaccharidähnliches Makromolekül mit einer Dichte von 1,077 g/ml. Ficoll kann für die Isolation mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) verwendet werden, da diese bei der Dichtezentrifugation in der Interphase zwischen dem Blutplasma und der Ficoll-Lösung konzentriert werden. Aufgrund ihrer höheren spezifischen Dichte finden sich Erythrozyten und Granulozyten in den Ficollschichten, während Thrombozyten ihrer geringen Dichte wegen im aufgelagerten Plasma enthalten sind.

Heparinisiertes Vollblut wurde zu gleichen Teilen mit PBS gemischt, 20 ml des Gemisches in einem 50-ml-Röhrchen über 15 ml Biocoll-Trennlösung geschichtet und anschließend 25 min bei 20 °C mit 1200 x g und kleinstmöglicher Bremsung zentrifugiert. Die Zellen in der Interphase wurden sofort mit der Pipette in ein anderes Röhrchen überführt und zweimal mit jeweils 20 ml MACS-Puffer gewaschen.

Aus den so erhaltenen PBMC wurden die Subpopulationen CD3⁺-, CD4⁺- bzw. CD14⁺-Zellen isoliert.

3.2.2 Bestimmung von Vitalität und Zellzahl

Die Trypanblaufärbung ist ein Vitalitätstest, welcher sich die veränderte Membrandurchlässigkeit abgestorbener Zellen für den Farbstoff zunutze macht. Bei toten Zellen kann sich der kolloidale Farbstoff in das Zytoplasma einlagern, wodurch diese blau erscheinen. Die intakte Membran vitaler Zellen verhindert dies, sodass vitale, weiße Zellen lichtmikroskopisch in einer Zählkammer nach Neubauer gezählt werden können.[102]

Um die Zellzahl zu ermitteln, wurden Zellen in Puffer oder dem entsprechenden Medium resuspendiert und einer geeignete Verdünnung mit Trypanblau-Lösung angefärbt und lichtmikroskopisch ausgezählt. Hierfür wurden jeweils vier Großquadrate der Zählkammer ausgezählt und ihr Mittelwert bestimmt.

3.2.3 Anreicherung von CD14⁺-Monozyten und CD4⁺-T-Zellen

Das Prinzip der MACS beruht auf *MicroBeads*, die an spezifische Antikörper gekoppelt sind. *MicroBeads* sind dextran-umhüllte Nanosphären mit einem Eisenoxidkern. Durch Antikörperbindung markierte Zellen werden in Suspension auf eine mit gleichmäßig kugelför-

migen Stahlpartikeln gefüllte Säule in einem starken Magnetfeld (0,6 Tesla) gegeben. Über die magnetischen Kräfte verbleiben die markierten Zellen in der Säule, nicht markierte Zellen werden ausgewaschen. Im Anschluss können die angereicherten Zellen durch Unterbrechung des Magnetfeldes aus der Säule eluiert werden.[103]

CD14⁺-Makrophagen und Monozyten oder CD4⁺-T-Zellen wurden durch MACS über die entsprechenden Markermoleküle aus den zuvor gewonnenen PBMC angereichert.

Alle folgenden Schritte wurden auf Eis und mit auf 4 °C vorgekühlten Lösungen durchgeführt. Die Zellzahl wurde auf 10⁷ Zellen pro 80 µl MACS-Puffer eingestellt. Die Zellsuspension wurde 20 min mit 20 µl CD14⁺- bzw. CD4⁺-*MicroBeads*/10⁷-Zellen bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert und gelegentlich geschwenkt. Eine LS-Säule wurde in den Magneten eingespannt und mit 2 ml MACS-Puffer benetzt. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen in 500 µl MACS-Puffer aufgenommen und die Zellsuspension in die vorbereitete Säule gegeben. Nachdem die Suspension fast vollständig eingelaufen war, wurde die Säule sukzessive mit 10 ml MACS-Puffer gespült. Der Durchlauf der Probe und des Waschschriftes wurde als Negativfraktion gesammelt. Danach wurde die Säule aus dem Magneten entfernt und mit 5 ml MACS-Puffer unter Zuhilfenahme des Stempels als Positivfraktion eluiert. Aus beiden Fraktionen wurden die Zellzahlen ermittelt.

Die Effektivität der Zellaufreinigung wurde durchflusszytometrisch über den Anteil CD14⁺- bzw. CD4⁺-Zellen überprüft. In die Experimente eingeschlossen wurden nur Proben mit einer Reinheit der Positivfraktion ≥ 97 % der entsprechenden Zellpopulation. Die CD14⁺-Zellen wurden für die weiteren Versuche in Kompletmedium aufgenommen, die CD4⁺-T-Zellen in Transmigrationsmedium.

3.2.4 Gewinnung von CD3⁺-Zellen aus PBMC

Aus der Negativfraktion aus der Anreicherung von CD14⁺-Zellen wurden jeweils 1x10⁷ Zellen in 750 µl Kompletmedium aufgenommen, mit dem gleichen Volumen Einfriermedium für T-Zellen gemischt und in Röhrchen für die Kryokonservierung bei -80 °C tiefgefroren.

Zwei Tage vor der weiteren Verwendung wurde die Zellsuspension im Kryoröhrchen schnell getaut und dieses danach unmittelbar auf Eis gestellt. Die Suspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und zweimal mit jeweils 7 ml kaltem Kompletmedium gewaschen. Nach dem Zählen wurden die Zellen mit 1x10⁶/ml in Kompletmedium resuspendiert, jeweils 2 ml in einer 24-Well-Platte verteilt und die Zellkultur über Nacht inkubiert. Der Anteil der CD3⁺-Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Bei einem Reinheitsgrad >97 % wurden diese Zellen nach dem Auftauen als ruhende CD3⁺-T-Zellen in Transmigra-

tionsversuchen mit Zellkulturüberständen autologer, *in vitro* polarisierter Makrophagen eingesetzt.

3.2.5 Polarisation in M1- und M2-Makrophagen *in vitro*

Die Makrophagenpolarisation erfolgte nach einem Protokoll von Verreck *et al.*[91] Für die Differenzierung wurden 50 U/ml GM-CSF oder 50 ng/ml M-CSF zum Komplettmedium hinzugegeben. Es wurden jeweils 5×10^5 frisch isolierte CD14⁺-Zellen mit 3 ml Medium in 6-Well-Zellkulturplatten überführt und insgesamt sechs Tage inkubiert. Am dritten Tag wurde jeweils 1 ml des Zellkulturmediums abgenommen und durch frisches Komplettmedium mit Zytokinen ersetzt. Die Zellkultur erfolgte bei 37 °C in wassergesättigter Atmosphäre und einem CO₂-Gehalt von 6 %.

Wurde die Wirkung von Leptin auf die Polarisierung der Makrophagen untersucht, wurde das Adipokin von Beginn an zu den Kulturen hinzugegeben. Beim Halbmedienwechsel wurde auch Leptin frisch zugegeben.

Für die Untersuchung der Wirkung von LPS oder Adipokinen auf polarisierte Makrophagen erhielten die o.g. Kulturen nach 6 Tagen LPS (100 ng/ml), Leptin (1 bzw. 10 µg/ml) oder Adiponektin (3 µg/ml) für weitere 24 h.

Nach 7 Tagen wurden die Zellkulturüberstände vorsichtig abgenommen und bei -20° C eingefroren. Aus diesen Überständen wurden die Konzentrationen sezernierter Zytokine und Chemokine bestimmt. Für diese Untersuchungen wurden die Überstände im Wasserbad bei 37° C schnell getaut und danach auf Eis gekühlt.

Der Zellrasen wurde zweimal mit 3 ml PBS gespült und die Zellen mithilfe von Trypsin abgelöst. Vitale adhärente Zellen wurden in funktionellen Experimenten eingesetzt. Für den Nachweis der Expression auf mRNA-Ebene wurden jeweils 5×10^6 Zellen in 350 µl β-mercaptopurin-versetztem RLT-Puffer, der Bestandteil des RNeasy-mini-Kits war, aufgenommen. Die so gewonnenen Lysate wurden bei -80 °C aufbewahrt.

3.2.6 Kokultur und Nachweis der Transmigration von T-Zellen *in vitro*

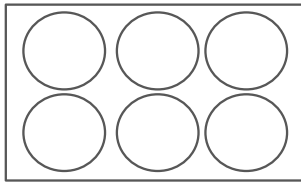
In einem *Transwell*-Kultursystem werden Zellen in einer oberen Kammer durch eine poröse Polycarbonatmembran von einer unteren Kammer räumlich getrennt. Erhalten Zellen im oberen Kompartiment einen Migrationsstimulus aus der unteren Kammer, können sie dorthin migrieren.[104] Für den Nachweis entsprechender Wirkungen von Makrophagensubpopulationen auf T-Zellen wurden diese *Transwell*-Systeme (Porendurchmesser: 3 µm) in Transmigrationsversuchen verwendet, bei denen definierte T-Zellen in der oberen Kammer mit Kulturüberständen aus der Polarisation autologer Makrophagen inkubiert wurden (Abbildung 7).

CD4⁺- bzw. CD3⁺-T-Zellen des Spenders, aus dem die CD14⁺-Zellen für die *In-vitro*-Polarisation von M1- und M2-Makrophagen gewonnen wurden, wurden zweifach mit Transmigrationsmedium gewaschen und auf eine Zelldichte von 5x10⁴/ml eingestellt.

Jeweils 100 µl T-Zell-Suspension wurden vorsichtig auf die Membran des *Transwell*-Einsatzes pipettiert. Frisch getaute Kulturüberstände (600 µl) aus der *In-vitro*-Polarisation von Makrophagen wurden blasenfrei in die untere Kammer gefüllt, sodass die obere Kammer gerade Kontakt zum Flüssigkeitsspiegel in der unteren Kammer erhielt. Als Positivkontrolle dienten 10 ng/ml CXCL12, ein Chemokin, welches dafür bekannt ist, CD3⁺-/CD4⁺-Zellen anzuziehen.[105] Um auszuschließen, dass die Adipokine selbst oder andere Bestandteile des Mediums die Zellen anlocken, wurde Kompletmedium allein sowie mit 3 µg/ml Adiponektin oder 1 µg/ml Leptin als Negativkontrollen verwendet. Die Kulturen wurden 90 min im Brutschrank inkubiert. Nach dem vorsichtigen Entfernen der *Transwell*-Einsätze wurde der Inhalt der unteren Kammer durch Pipettieren sorgfältig resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen überführt. Diese Zellen wurden mit anti-CD4, anti-CD45RA bzw. anti-CD3 und Propidiumiodid gefärbt. Die Zahl vitaler T-Zellen wurde durchflusszytometrisch mithilfe von Zählbeads (siehe Abschnitt Durchflusszytometrie) bestimmt.

Das Potenzial der Makrophagenkulturüberstände, eine Migration autologer T-Zellen auszulösen, wurde aus dem Verhältnis der Zellen aus der unteren Kammer zur Gesamtzahl ursprünglich eingesetzter Zellen ermittelt.

Zellkulturplatte mit Transmigrationseinsätzen



Beispielhafter Aufbau eines Wells

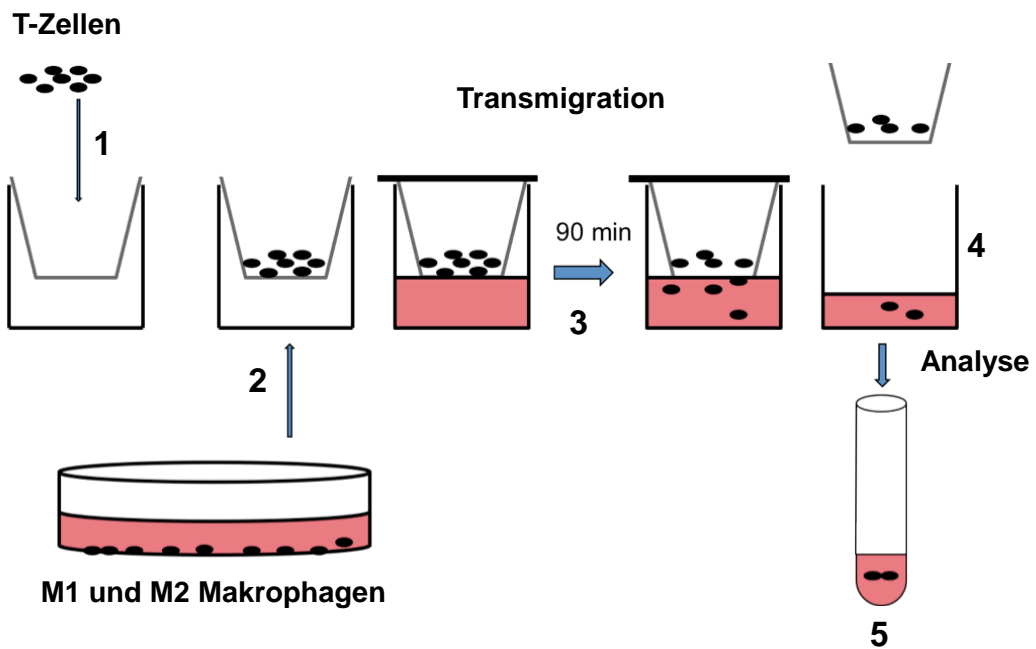
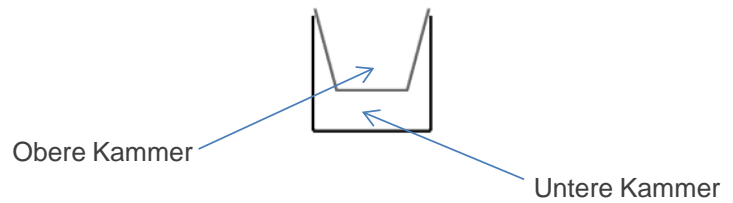


Abbildung 5: Schematische Darstellung der T-Zell-Transmigration

T-Zellen werden in die obere Kammer eines Transmigrationswells gegeben (1). Die untere Kammer wird vorsichtig mit Kulturüberständen von M1- oder M2-Makrophagenkulturen befüllt (2). Die Zellen können innerhalb einer definierten Zeitspanne über eine Membran mit Poren von der oberen in die untere Kammer migrieren (3). Die obere Kammer wird entfernt (4) und das Medium in der unteren Kammer auf eingewanderte T-Zellen untersucht (5).

3.3 Nachweis von IL-23 (p19/p40) und CCL1 in Zellkulturüberständen durch enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA)

Mit einem ELISA ist ein spezifischer quantitativer und qualitativer Nachweis von Zytokinen und Chemokinen aus Proteingemischen möglich. Das Zielantigen geht eine spezifische Bindung mit den auf der Platte haftenden Fang-Antikörpern ein. Die auf diese Weise gebundenen Proteine werden durch einen zweiten spezifischen Nachweisantikörper markiert, welcher biotinyliert ist. Das Biotin geht einen Komplex mit Avidin oder Streptavidin ein, an das z.B. eine Peroxidase gebunden ist. Das Enzym setzt Tetramethylbenzidin, ein chromogenes Substrat, um und verursacht einen Farbumschlag. Dabei korreliert die Farbintensität mit der Menge des gebundenen Proteins und kann fotometrisch bestimmt werden. Die Konzentration des zu bestimmenden Faktors wird mithilfe von Standardtitrationen ermittelt.

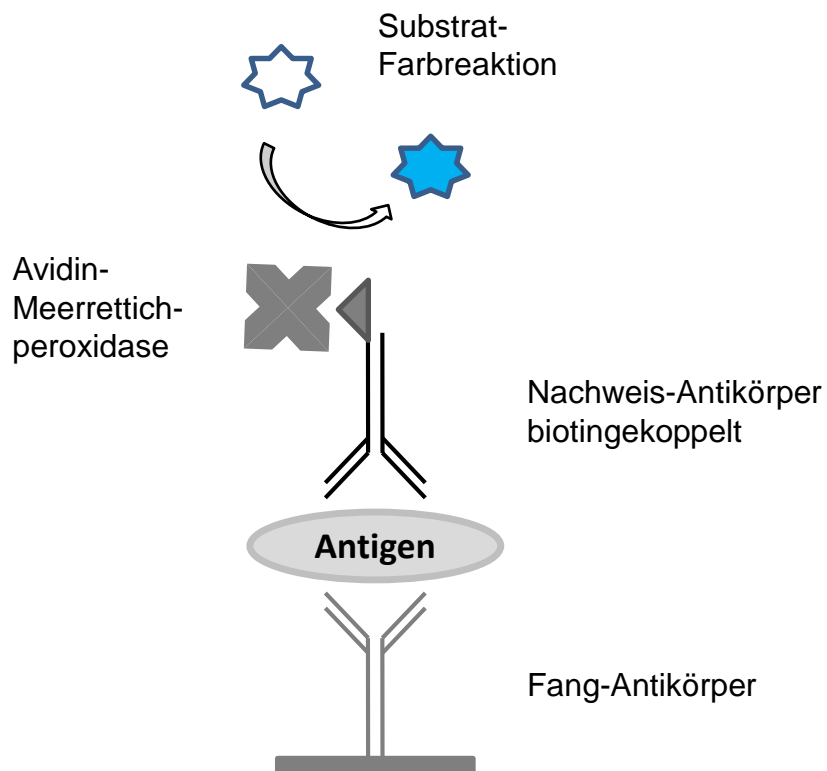


Abbildung 6: Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

Das nachzuweisende Antigen bindet sich an einen plattengekoppelten Fang-Antikörper und wird seinerseits von einem biotinylierten Nachweisantikörper gebunden. Durch eine Peroxidase-vermittelte Farbreaktion kann das Antigen spezifisch dargestellt werden.

Alle Bestandteile der Kits waren durch den Hersteller vortitriert und entsprechend der Vorgaben des Herstellers wurden alle Inkubationsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt. ELISA-Platten wurden mit 100 µl Fang-Antikörper-Lösung beladen, die Platte mit Folie verschlossen und 4 h inkubiert. Es folgten fünf Waschschriffe mit jeweils ~300 µl PBS-T pro *Well*. Dazu wurde der Puffer in jedem Schritt etwa 1 min in den *Wells* belassen, bevor er durch Ausschlagen der Platte auf saugfähiger Unterlage entfernt und die Flächen mit 200 µl/*Well* Probenverdünner für 1 h bei Raumtemperatur geblockt wurde. Nach erneutem fünfmaligen Waschen erfolgte die Inkubation mit jeweils 100 µl Zellkulturüberständen, der entsprechenden Standardreihe sowie der Leerprobe für 2 h bei Raumtemperatur. Alle Proben wurden in Duplikaten aufgetragen. Dann wurde die Platte erneut gewaschen, 1 h mit 100 µl/*Well* Nachweis-Antikörper-Lösung inkubiert und nach Zugabe von 100 µl/*Well* peroxidase-gekoppeltem Avidin eine weitere Stunde. Nach fünfmaligem Waschen erfolgte die Inkubation mit jeweils 200 µl/*Well* Substrat-Lösung. Für die Farbreaktion wurde die Platte an einen lichtgeschützten Ort gestellt. Nach ca. 15 min wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 50 µl/*Well* Stop-Lösung beendet und innerhalb von 2 h fotometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Korrekturwellenlänge von 560 nm bestimmt.

Die Zytokin- bzw. Chemokin-Konzentrationen aus allen Proben wurden mithilfe der entsprechenden Standardkurven von der jeweils gleichen Platte über leerwert-korrigierte Mittelwerte bestimmt.

3.4 Durchflusszytometrie

3.4.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Die Durchflusszytometrie ermöglicht es, Partikel wie z.B. Zellen zu quantifizieren, sie qualitativ zu unterscheiden und sie zu sortieren. Das Prinzip beruht auf der Messung der Lichtemission einer Zelle, die von einem Laserstrahl getroffen wird. Im Sinne einer hydrodynamischen Fokussierung werden die Zellen in einem laminaren Flüssigkeitsstrom in einer Kapillare stark beschleunigt, sodass sie einzeln einen Laserstrahl passieren und dabei das Licht streuen. Dieses wird von Detektoren in elektrische Signale umgewandelt. Art und Ausmaß der Lichtstreuung korrelieren mit Eigenschaften von Zellen: Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter* = FSC) ist vom Volumen der Zelle abhängig, Seitwärtsstreulicht (*Side-ward Scatter* = SSC) ist ein Maß für die Granularität.

Zusätzlich können partikel- oder zellgebundene Fluoreszenzfarben gemessen werden. Den Detektoren vorgeschaltete Bandpassfilter trennen das aufgefangene Licht nach Wellenlängen auf und erlauben es, einzelne Farbstoffe zu quantifizieren.

3.4.2 Darstellung von Oberflächenantigenen

Die Makrophagen wurden nach Inkubation mit Trypsin aus den Kulturgefäßen abgelöst, in 15-ml-Röhrchen überführt und zweimal mit jeweils 10 ml MACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen nach Trypanblaufärbung gezählt und jeweils $2\text{-}5 \times 10^5$ Zellen mit einem Gemisch aus direkt fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD14, CD80, CD163 und HLA-DR auf Eis inkubiert. Ansätze ohne Antikörper sowie Einzelfärbungen aller Antikörper wurden als Kontrollen für alle Subtypen mitgeführt. Alle Proben wurden nach 20 min mit 2 ml MACS-Puffer gewaschen. Direkt vor der Messung wurde $1 \mu\text{g}$ PI als Vitalitätsfärbung zur Probe hinzugegeben. Es wurden jeweils $10^4\text{-}10^6$ Zellen am Durchflusszytometer aufgenommen. Für die Aufnahme wurde FACS Diva™, die Standard-Software des FACS Canto II genutzt, für die Auswertung der gesammelten Daten die Software CellQuest™ Pro.

3.4.3 Cytometric Bead Array

Der *Cytometric Bead Array* (CBA) erlaubt, verschiedene lösliche Proteine wie Zytokine oder Chemokine aus kleinen Probenvolumina von z. B. Zellkulturüberständen oder Seren gleichzeitig zu bestimmen. Die Proteine werden über spezifische primäre Antikörper, welche auf *Capture Beads* unterschiedlicher Fluoreszenzintensität gekoppelt sind, gebunden und über PE-markierte Sekundärantikörper durchflusszytometrisch detektiert. In Kombination mit auf die gleiche Weise bearbeiteten definierten Proteinen in Standardreihen können mehrere Zytokine oder Chemokine aus einem Ansatz einzeln quantifiziert werden. (Anwenderheft CBA; BD Biosciences)

Für diese Arbeit wurden die Chemokin- und Zytokinproduktion von Makrophagensubpopulationen in aufgetauten Zellkulturüberständen untersucht. Zum Nachweis von IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF und IL-12p70 kam das *Human Inflammation Kit* zum Einsatz; *Flex Sets* zum Nachweis derselben Zytokine sowie für TGF- β 1 ergänzten das Kit. Die Höchstkonzentrationen der Standardreihen für jeden Faktor aus dem Kit betrug 5 ng/ml, aus den *Flex Sets* 2 ng/ml. Die Standards wurden in Kompletmedium verdünnt. Der verwendete Waschpuffer war Teil des *Kits* bzw. der *Flex Sets*.

Unmittelbar vor der Verwendung wurde eine *Beadsuspension* hergestellt, die für jeden Ansatz 4 μl jedes der zu verwendenden *Capture Beads* und 20 μl Detektionsreagenz mit PE-markierten Sekundärantikörpern enthielt. In 1,5-ml-Reaktionsgefäßen wurden jeweils 20 μl Probe, Standardverdünnung oder Kompletmedium als Negativkontrolle mit 20 μl *Beadsuspension* gut gemischt und 3 h (*Kit*) bzw. 2 h (*Flex Sets*) bei Raumtemperatur lichtgeschützt auf einem Schüttler inkubiert. Unmittelbar vor dem Ende der Inkubationszeit der

Proben und Standards wurden in einem gesonderten Röhrchen die *Set-up Beads* als Positivkontrollen vorbereitet. Alle Proben wurden mit 2 ml Waschpuffer, der Teil des *Kits* bzw. der *Flex Sets* war, gewaschen und bei 200xg für fünf Minuten zentrifugiert. Die *Beads* wurden in 200 µl Waschpuffer resuspendiert. Die Messung erfolgte am FACS-Canto II und die Auswertung über FCAP Array™.

3.4.4 Quantifizierung von migrierten T-Zellen

Um im Rahmen der Transmigrationsversuche die Zellzahl der migrierten T-Zellen zu bestimmen, wurden Zählbeads (*FITC Fluoresbrite Plain XG 20.0 Micron Microspheres*) verwendet. Hierzu wurden dem aus der unteren Kammer gewonnenen Probevolumen (siehe Abbildung 5) 10 µl einer Zählbead-Suspension hinzugefügt. Das Exzitations- und Emissionsspektrum der verwendeten Beads entspricht etwa dem von FITC. Die Beads werden vom Hersteller in einer definierten Konzentration von 5.68×10^6 Partikeln/ml hergestellt, sodass die Zellzahl im Probevolumen in Bezug auf die durchflusszytometrisch aufgenommene Anzahl an Beads innerhalb eines bestimmten Zeitraums ermittelt werden kann.

3.4.5 *In-vitro*-Nachweis von Phagozytose

Latexpartikel definierter Größe werden über Phagozytose in einem energieabhängigen Schritt in Zellen aufgenommen. Sind diese Partikel mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, können sie durchflusszytometrisch mit den Zellen dargestellt werden. Mit diesem System wurde Phagozytosekapazität von Makrophagensubpopulationen verglichen.

Vor der Verwendung wurden fluoreszenzmarkierte Latexpartikel (Durchmesser 2 µm) mit Kompletmedium, welches mit 10 % BSA angereichert worden war, bei 37 °C inkubiert.

M1- und M2-Makrophagen wurden *in vitro* aus CD14⁺-Zellen polarisiert und mit Leptin bzw. Adiponektin behandelt. Frisch isolierte CD14⁺Exzitation und Emissionsspektrum Zellen des gleichen Spenders dienten als Vergleichsgruppe. Jeweils $1,5 \times 10^5$ Zellen in 150 µl wurden in 1,5-ml Reaktionsgefäße überführt und zur Vereinheitlichung der Ausgangsbedingungen 20 min auf Eis inkubiert, bevor Latexbeads im Verhältnis von 1:100 zu den Zellen hinzugegeben wurden. Die verwendeten Beads liegen in einer Konzentration von $N = (6,03 \times 10^{10} \times 2,5) / 3,3 \times 2,5 = 5,68 \times 10^9$ vor. Das Verhältnis von 100 Beads pro Zelle entspricht der vom Hersteller empfohlenen Konzentration. Für einen maximalen Kontakt zwischen den Zellen und den Latexpartikeln in der Suspension erfolgte die Inkubation auf einem Rollenmischer bei 37 °C bzw. 4 °C. Nach 60 min wurden alle Ansätze dreimal mit jeweils 15 ml PBS gewaschen, um freie Latexpartikel und solche, die an Zellen haften, möglichst weitgehend zu

entfernen. Nach der Resuspension der Zellpellets in MACS-Puffer wurden zellgebundene/internalisierte Latexpartikel durchflusszytometrisch quantifiziert. Dabei kann über das Ausmaß der Helligkeit der analysierten Zellen, auf die Anzahl der von ihnen internalisierten Partikel zurück geschlossen werden. Die aktive Phagozytose wurde aus der Differenz zellgebundener FITC-Fluoreszenz nach der Inkubation bei 37 °C (Phagozytose und unspezifische Anhaftung der Latexpartikel) und bei 4 °C (unspezifische Anhaftung der Latexpartikel) ermittelt.

3.5 Quantifizierung der Expression auf mRNA-Ebene

3.5.1 RNA-Isolierung aus Zellen

Die RNA-Isolierung erfolgte mit den Puffern und Materialien aus dem *RNeasy Mini Kit*. Homogenisierte Zellenlysate wurden aufgetaut und zu gleichen Teilen mit Ethanol gemischt, um die Bindungsfähigkeit der RNA an die Kieselgel-Matrix zu vergrößern.

Das Gemisch wurde auf eine Säule mit einer Kieselgel-Membran gegeben und bei 8000xg für 1 min bei Raumtemperatur durch die Säule zentrifugiert. Diese Zentrifugationsbedingungen galten auch für alle folgenden Schritte. Störende Bestandteile aus der Probe wurden in drei Waschschritten mit jeweils 350 µl Puffer RW1 weitgehend entfernt. Auf jede Säule wurde 70 µl RDD Puffer mit 10µl DNase gegeben. Nach 15 min bei Raumtemperatur wurde die Säule erneut mit jeweils 350 µl Puffer RW1 gewaschen und in einem letzten Zentrifugationsschritt ohne Pufferzugabe getrocknet. Die RNA wurde mit 30-50 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die Konzentration und Reinheit der so gewonnen Gesamt-RNA wurde spektrofotometrisch über das Verhältnis der optischen Dichte bei Wellenlängen von 260 und 280 nm im Nanodrop ermittelt. Abhängig von der RNA-Konzentration im Isolat wurden 250-500 ng RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben.

3.5.2 Synthese komplementärer DNA

Um als Matrize für DNA-abhängige DNA-Polymerasen zu dienen, muss die mRNA zunächst mithilfe einer reversen Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, in cDNA umgeschrieben werden. Der dabei entstehende Doppelstrang erhöht gleichzeitig die Stabilität der aus den Zellen gewonnenen mRNA.[106] Für den Start der Synthese benötigten DNA-Polymerasen 3'-Enden von kurzen doppelsträngigen DNA-Abschnitten, sogenannten Primern, welche am Poly-A-Schwanz (50 bis 200 Adenosin-Nukleotide) reifer eukaryontischer mRNA binden.[107] *Random-Primer* sind ein Gemisch aus Hexanukleotiden

unterschiedlicher Sequenz, die sich zufällig an RNA-Abschnitte binden und so zu einem *Pool* unterschiedlich langer cDNA führen.

Um bei den eingesetzten geringen Volumina der einzelnen Ansätze eine Gleichverteilung in allen Reaktionsansätzen zu sichern, wurden alle konstanten Reaktionsbestandteile in einem RT-Mix vorgemischt. Für jede Synthesereaktion enthielt der RT-Ansatz 2 µl Reverse Transkriptase, 2 µl RNase-Inhibitor, 4 µl 10x RT-Puffer, 1,6 µl 25x dNTP-Mix, 4 µl 10x RT *Random-Primers*, 6,4 µl *A. dest.*

In alle Reaktionsgefäße wurden 20 µl des RT-Mixes vorgelegt. 300 ng Gesamt-RNA wurden in einem Volumen von 20 µl hinzugegeben und im Thermocycler inkubiert: (1) 25 °C, 10 min; (2) 37 °C, 120 min; (3) 85 °C, 5 min und (4) 4 °C, unbegrenzt.

Die Reaktionsansätze wurden unmittelbar nach der cDNA-Synthese in die PCR überführt oder maximal drei Tage aufbewahrt bei 4 °C.

3.5.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren kann mithilfe eines Spektrofotometers anhand des spezifischen Absorptionsverhaltens bei 260/280 nm bestimmt werden.

Das Prinzip beruht darauf, dass sich in Lösung befindende Moleküle, wenn diese mit Licht einer definierten Intensität bestrahlt werden, eine für sie spezifische Wellenlänge dieses Lichts absorbieren. Bei konstanter Entfernung von Licht und Lösung und bekanntem Stoff kann mithilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes die Konzentration einer bestimmten Substanz berechnet werden.[108] Die Reinheit eines Nukleinsäurepräparats kann mit dem Quotienten der Absorption bei 260 nm zu der bei 280 nm bestimmt werden, da proteinverunreinigte Proben eine wesentlich höhere Absorption bei 280 nm zeigen. Eine hinreichende Reinheit wurde nur angenommen, wenn ein Quotient von 1,8 für DNA bzw. 1,9 für RNA nicht unterschritten wurde.

Die spektrofotometrische Konzentrationsbestimmung erfolgte mit 2 µl der jeweiligen Nukleinsäurelösung nach Kalibrierung des Gerätes mit *A. dest.*

3.5.4 Quantitative *Real-time*-Polymerasekettenreaktion

Eine PCR dient zur Vervielfältigung definierter DNA-Abschnitte *in vitro*. Dieses geschieht mithilfe einer temperaturstabilen DNA-Polymerase. Aus einer bekannten DNA-Sequenz leitet man spezifische Primer ab, zwei Oligonukleotide, die mit jeweils einem der beiden

komplementären Stränge hybridisieren und den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt am 5'- und 3'-Ende begrenzen. Sie dienen der DNA-Polymerase als Startpunkt.

Jeder PCR-Zyklus zur Vervielfältigung der DNA von der Matrize wiederholt sequenziell die folgenden Schritte: (1) Erhitzen der doppelsträngigen DNA auf 94-96 °C, sodass sich die Wasserstoffbrückenbindungen lösen und Einzelstränge entstehen, d. h. denaturieren, (2) Anlagerung der Primer an die komplementären DNA-Stränge. In diesem Schritt entscheiden die für den Primer spezifische Optimaltemperatur und seine Passgenauigkeit über die Spezifität der Reaktion. (3) Synthese des komplementären Stranges durch die hitzestabile DNA-Polymerase bei 68-72 °C. In jedem Zyklus verdoppelt sich theoretisch die Anzahl der gewünschten Moleküle. Nach Beendigung der Kettenreaktion stabilisieren sich die DNA-Doppelstränge bei 72 °C.

Die Kombination von reverser Transkription und PCR weist spezifische mRNA-Moleküle nach und ermöglicht so Untersuchungen zur Genexpression auf transkriptioneller Ebene.[109] Bei einer Standardmethode der quantitativen PCR (qPCR) werden interkalierende fluoreszierende Farbstoffe wie Sybr-Green während der Elongation in die neu synthetisierten doppelsträngigen DNA-Abschnitte eingebaut und stellen sich so proportional zur Produktzunahme dar. Nur während der exponentiellen Phase der PCR ist eine korrekte Quantifizierung möglich, da während dieser Phase die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen.

Konstante Reaktionsbestandteile wurden, wie auch für die reverse Transkription, vorge-mischt. Für jeden qPCR-Ansatz enthielten diese Gemische: 6,25 µl Sybr-Green PCR-Mastermix, 0,5 µl 5 µm Primer *forward*, 0,5 µl 5 µm Primer *reverse* und 3,25 µl *A. dest.* Zu jeweils 10,5 µl es entsprechenden Gemisches wurden 2 µl aus der cDNA-Synthese gegeben. Für die Negativkontrolle wurde anstelle der cDNA 2 µl *A. dest.* eingesetzt. Unmittelbar vor Reaktionsbeginn im StepOnePlus Real-Time PCR System wurden die Reaktionsansätze mit 800xg 1 min abzentrifugiert.

Die qPCR wurde standardmäßig unter den folgenden Bedingungen durchgeführt: ein Zyklus einer initialen Denaturierung (95 °C, 10 min), 40 Zyklen zur Vervielfältigung bestehend aus (1) Denaturierung (95 °C, 30 sec), (2) Anlagerung der Primer (Primer-spezifische Temperatur gemäß Tabelle 5, 30 sec) und (3) Strangsynthese (72 °C, 30 sec). Die Reaktionen wurden mit einem Zyklus von 5 min bei 72 °C beendet.

Tabelle 5: Spezifische Schmelztemperaturen der Primer

Primer	Temperatur in °C
AdR1	57
AdR2	58
CCL-1	59
GNB2L1	56
ManR	64
ObRb	62

Der Anfang der quantifizierbaren Phase ist durch den sogenannten Ct-Wert (Cycle Threshold) markiert. Der Ct-Wert entspricht dem Zeitpunkt im PCR-Zyklus, in dem sich das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal deutlich vom Hintergrund abhebt. Er dient als Messgröße der Realtime-PCR. Je eher sich das Signal also vom Hintergrund abhebt, je niedriger damit der Ct-Wert ist, desto mehr Kopien des Zielgens sind in der untersuchten Probe enthalten.

Eine Methode zur quantitativen Expressionsmessung ist der relative Vergleich mit einem *Housekeeping Gene*. Ein Gen kann als *Housekeeping Gene* genutzt werden, wenn seine Expression unabhängig vom Aktivierungszustand der Zelle weitgehend konstant ist.[110].

Für relative quantitative Bestimmungen wurde die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode mit GNB2L1 als *Housekeeping Gene* genutzt. Diese Methode ermöglicht es, relative Expressionsveränderungen eines Zielgens im Vergleich zu einem Kontrollgen anzugeben. Dazu wird der Ct des *Housekeeping Gene* vom Ct des Zielgens derselben Probe subtrahiert: $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{Zielgen}) - \text{Ct}(\text{GNB2L1})$. Der Mittelwert der ΔCt -Werte aller Kontrollen wird im Anschluss daran von den ΔCt -Werten der Proben abgezogen: $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}(\text{Probe}) - \Delta\text{Ct}(\text{Kontrollen})$. Der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte gibt also den Unterschied der Expression des Zielgens im Verhältnis zur Expression des Kontrollgens innerhalb einer Probe an: Menge des Zielgens = $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

3.6 *In-situ*-Nachweis von Immunzellen im mesenterialen Fettgewebe

3.6.1 Vorbereitung von Gewebeschnitten

Klinische Gewebeproben werden häufig mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet (FFPE) aufbewahrt. Durch diese Bearbeitung können antigene Strukturen für den Nachweis durch spezifische primäre Antikörper unzugänglich werden. Um diese für die Primärantikörper zugänglich zu machen, werden die Paraffinschnitte zunächst von Paraffin befreit, dann rehydriert, um im Anschluss die Antigene zu demaskieren.

Hierfür wurden die angefertigten Dünnschnitte (Dicke: 2 µm) auf spezielle Objektträger aufgebracht, mit Xylol (zweimal 10 min) entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (96 %, 80 %, 70 %) gewässert, um das Gewebe für wasserlösliche Stoffe zugänglich zu machen. Nachfolgend wurden die Proben in einem Bad mit *A dest.* vollständig rehydriert. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte 5 min in Citratpuffer (100 mM, pH 6) unter Dampfdruck gekocht. Um unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers zu reduzieren, wurden die Schnitte mit 100 µl Eselserum (30 min, Raumtemperatur) blockiert.

3.6.2 Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbungen beruhen prinzipiell auf einer Komplexbildung zwischen dem gesuchten Antigen und einem spezifisch gegen dieses Antigen gerichteten Antikörper. In der vorliegenden Arbeit wurde die indirekte Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB-Methode) angewandt. (Abbildung 7)

Nachdem der spezifische Primärantikörper an das gesuchte unkonjugierte Antigen gebunden hat, wird ein zweiter Antikörper hinzugegeben, welcher biotinkoppelt ist und die Immunoglobulin-domäne des Primärantikörpers erkennt. Anschließend wird eine an Streptavidin gebundene alkalische Phosphatase oder Peroxidase hinzugegeben. Streptavidin, ein Eiweißglykoprotein, ist in der Lage, vier Moleküle Biotin mit sehr hoher Affinität zu binden und vermittelt somit die Verknüpfung des Enzyms mit dem Antigen-Antikörper-Komplex. Die Umsetzung eines Färbesubstrates in Farbstoff durch die alkalische Phosphatase macht schließlich das gesuchte Antigen sichtbar.

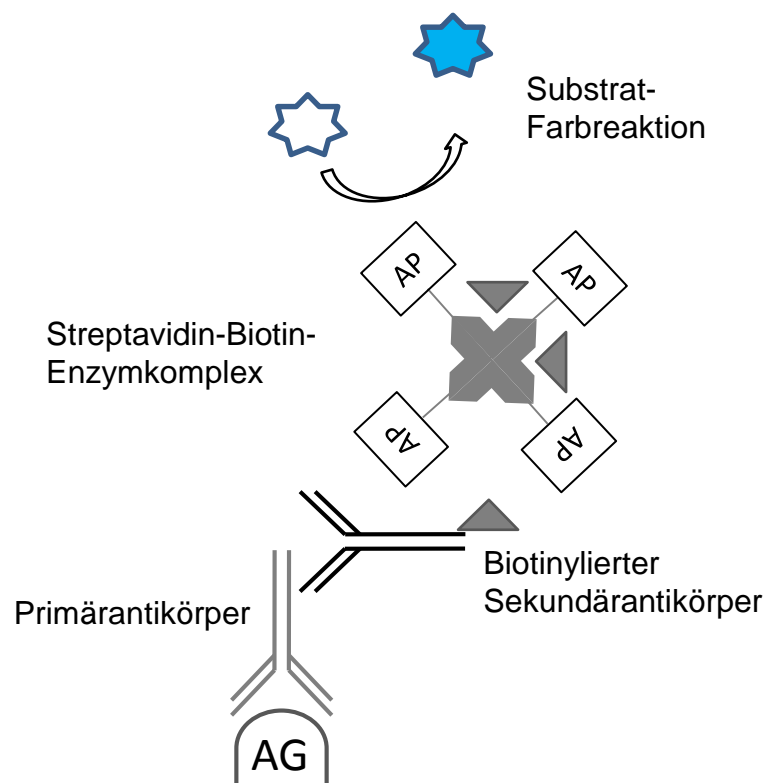


Abbildung 7: Modell der Streptavidin-Biotin-Methode

Das gesuchte Antigen (AG) wird mit einem spezifischen Antikörper markiert, welcher wiederum von einem zweiten, biotinylierten Antikörper speziesspezifisch gebunden wird. Eine an Streptavidin gebundene alkalische Phosphatase (AP) kann über die Affinität von Avidin zu Biotin an den Antigen-Antikörper-Komplex binden und vermittelt die Farbreaktion, welche das Antigen sichtbar macht.

Die Schnitte wurden zuerst mit spezifischen Antikörpern inkubiert. Unmittelbar vor der Verwendung wurden die Antikörperlösungen im Verhältnis 1:200 (CD68 oder Stabilin-1), 1:400 (CD163) oder 1:500 (iNOS) mit TBS-Puffer verdünnt. Die Inkubation erfolgte für 30 min (CD163) bzw. 1 h (CD68, Stabilin-1 oder iNOS) bei Raumtemperatur. Nach einem Waschschriff mit TBS-T wurde biotinylierter Anti-Kaninchen-Antikörper (Verdünnung 1:200 in TBS-Puffer) auf die Schnitte gegeben und diese weitere 30 min inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBS-T wurden die Schnitte 30 min mit einer an Streptavidin gekoppelten alkalischen Phosphatase behandelt und anschließend erneut gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Proben mit 100 µg frisch hergestellter Entwicklungsreagenz (Herstellung erfolgte nach Herstellerprotokoll) für weitere 30 min inkubiert.

Die Kernfärbung erfolgte mit Hämatoxylin. Die Schnitte wurden hierfür 5 min in ein vorbereitetes Hämalaun-Bad gegeben, abschließend wurden sie mit Leitungswasser abgespült und Glycingelatine eingedeckelt.

Zur Auswertung der Proben wurden in jedem Schnitt farbmarkierte Zellen in zehn *High Power Fields* (hpf: 0,237 mm²) an einem Axioimager-Z1-Mikroskop gezählt.

3.6.3 Immunfluoreszenz

Auch in der indirekten Immunfluoreszenz *in situ* bindet ein Primärantikörper spezifisch ein Antigen; der Sekundärantikörper ist jedoch mit einem Fluorochrom gekoppelt und seine Bindung kann fluoreszenzmikroskopisch direkt dargestellt werden. Entsprechend der Lokalisation des Epitops, innerhalb oder auf der Zelle, zeigt sich für jeden Antikörper ein spezifisches Fluoreszenzmuster und so kann die Immunfluoreszenz unter bestimmten Umständen eine höhere Auflösung als die Immunhistochemie bieten.

Hier wurden die Schnitte lichtgeschützt mit den Primärantikörpern für 45 min in folgenden Verdünnungen inkubiert: CD4 (1:5), CD3 (unverdünnt), IL-17 (1:25), IFN γ (1:200), IL-10 (1:200), FoxP3 (1:50). Nach dem Waschen mit TBS-T wurden die Proben 30 min mit den entsprechenden fluorchrom-markierten Sekundärantikörpern inkubiert – anti-Maus für CD3, CD4 und FoxP3, anti-Kaninchen für IFN γ und IL-10, welche 1:100 mit TBS-T verdünnt waren. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI (1:1000). Anschließend wurden die Schnitte mit Fluoromount G (Southern Biotechnology) eingedeckelt. Die Schnitte wurden fluoreszenzmikroskopisch mithilfe eines Axioimager-Z1-Mikroskops analysiert: hierfür wurden in jedem Schnitt fluoreszierende Zellen in fünf *High Power Fields* (hpf: 0,237 mm²) ausgezählt.

3.7 Statistische Methoden

Die Ergebnisse sind, wenn keine Normalverteilung vorlag, als Median beschrieben. Zur Ermittlung einer statistischen Signifikanz wurde bei zwei Vergleichsgruppen der zweiseitige t-Test nach Mann-Whitney durchgeführt. Es wurde ein Konfidenzintervall von 95 % festgesetzt.

Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen. Alle statistischen Berechnungen wurden mithilfe der Software GraphPad Prism (Version 5.00; GraphPad Software, La Jolla, USA) vorgenommen.

4 Ergebnisse

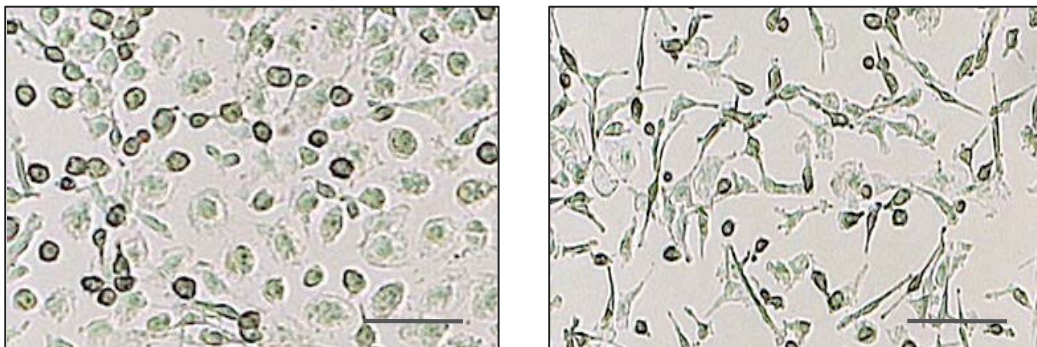
4.1 *In-vitro*-Polarisierung von M1- und M2-Makrophagen

4.1.1 Morphologie der Makrophagensubtypen

Um den Einfluss von Adipokinen auf Makrophagensubpopulationen zu untersuchen, wurden zunächst Versuchsbedingungen für die Polarisation und Stimulation der Zellen etabliert. Dafür wurden frisch isolierte CD14⁺-Zellen aus dem peripheren Blut insgesamt sechs Tage mit GM-CSF oder M-CSF nach einem Protokoll von Verreck *et al.* inkubiert.[91]

Bereits nach zwei Tagen begann sich die Morphologie der Zellen zu ändern, nach sechs Tagen unterschieden sich die Zellen aus den beiden Kulturansätzen deutlich in ihrer Morphologie. Mit GM-CSF inkubierte Zellen waren rundlich bis „spiegeleiförmig“ und entsprachen damit dem Bild M1-polarisierter Makrophagen. Im Medium mit M-CSF entwickelten sich spindelförmig gestreckte, adhärente Zellen, die phänotypisch M2-Makrophagen entsprachen. (Abbildung 8)

Somit lieferte das lichtmikroskopische Bild erste Hinweise auf die gelungene *In-vitro*-Polarisation unterschiedlicher Makrophagensubtypen.



M1 (GM-CSF)

M2 (M-CSF)

Abbildung 8: Morphologie *in vitro* polarisierter Makrophagensubtypen

CD14⁺-Zellen wurden mit GM-CSF (links) oder M-CSF (rechts) inkubiert und nach 6 Tagen direkt in der Zellkulturplatte analysiert. Dargestellt sind repräsentative Bilder im Phasenkontrast in 50-facher Originalvergrößerung. Die Balken in der rechten, unteren Bildecke entsprechen 50 µm.

4.1.2 Expression von Oberflächenmolekülen

Nach Abschluss der Zellkultur wurde der Phänotyp der Makrophagen durchflusszytometrisch charakterisiert. Dieser wurde anhand der Expressionshöhe von CD14, CD80, CD163 und HLA-DR über die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) bestimmt. (Abbildung 9: Expression von Oberflächenmolekülen)

Die Polarisation in Gegenwart von GM-CSF führte zu einer Herunterregulation des LPS-Rezeptors CD14 im Mittel um das Vierfache, verglichen mit Makrophagen aus M-CSF-geprägten Kulturbedingungen. Der Hämoglobin-Scavenger-Rezeptor CD163 wurden von Zellen, die mit M-CSF polarisiert worden waren, im Vergleich zur Kultur mit GM-CSF signifikant stärker exprimiert. Im Gegensatz dazu exprimierten Zellen aus den Kulturen mit GM-CSF mehr HLA-DR als vergleichbare Kulturen mit M-CSF. In Bezug auf die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD80 zeigte sich kein Unterschied zwischen den polarisierten Makrophagen.

CD14 und CD163 gelten als Markermoleküle für M2-Makrophagen [91, 111], sodass zusammenfassend festgehalten werden kann, dass M-CSF *in vitro* die Ausprägung des M2-Subtyps begünstigt. Hingegen gilt eine hohe Expression von HLA-DR und CD80, kombiniert mit einer niedrigen Expression von CD14 und CD163 als charakteristisch für M1-Makrophagen.[91, 93] Dieses entspricht dem Phänotyp der in Gegenwart von GM-CSF polarisierten Zellen.

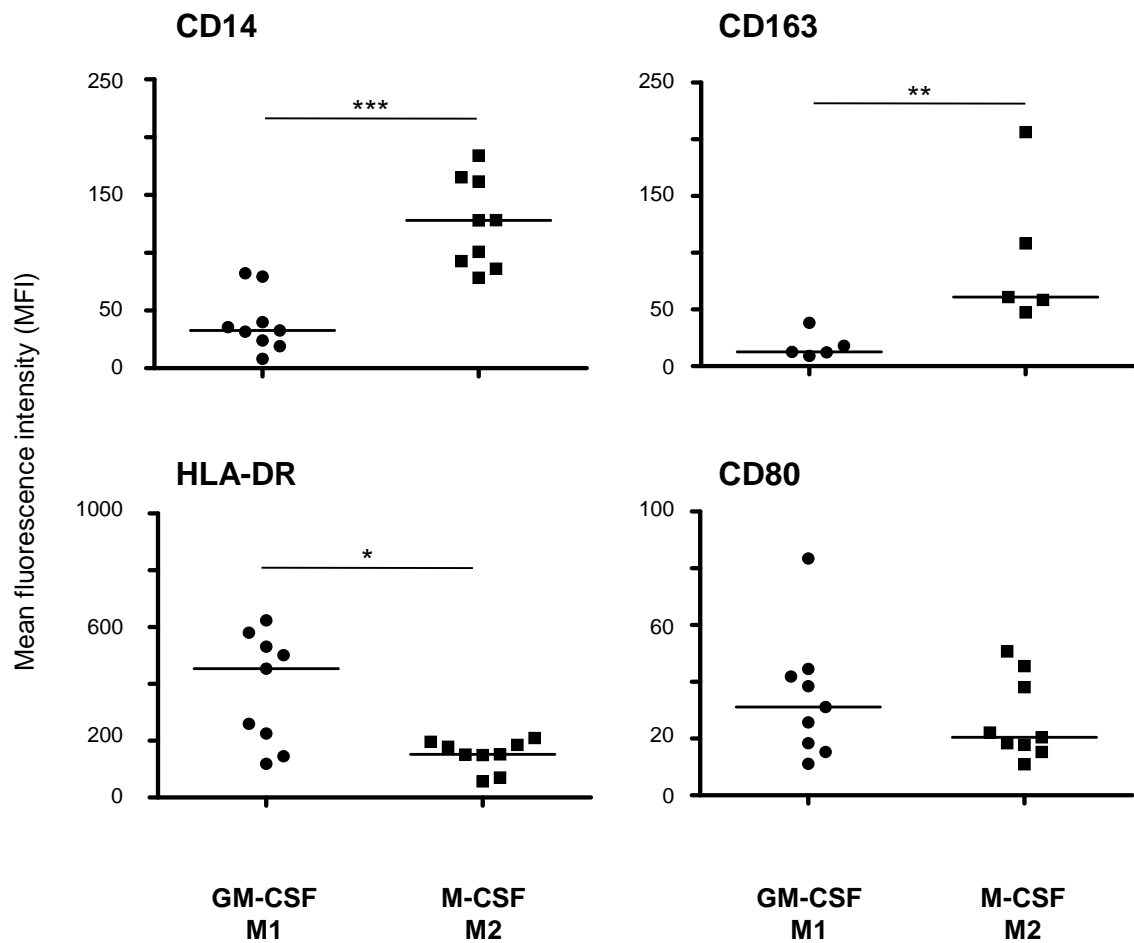


Abbildung 9: Expression von Oberflächenmolekülen von *in vitro* polarisierten humanen Makrophagen

CD14⁺-Zellen wurden in Gegenwart von GM-CSF oder M-CSF insgesamt 6 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen abgelöst, mit direkt markierten Antikörpern für CD14, CD163, HLA-DR und CD80 gefärbt und mit Propidiumiodid gegengefärbt. Die Expressionshöhe der Marker wurde durchflusszytometrisch über die MFI auf vitalen Zellen bestimmt. Dargestellt ist der Median von n= 5-9 Einzelspendern. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

4.1.3 Zytokinproduktion

Das unterschiedliche Zytokinprofil von Makrophagensubtypen ist ein wichtiges Kriterium, M1- und M2-Subpopulationen voneinander abzugrenzen. Zunächst wurde die basale Zytokinproduktion in Zellkulturüberständen von M1- und M2-Makrophagen durchflusszytometrisch gemessen.

Ohne vorangegangene Stimulation ließen sich nur geringe Zytokinkonzentrationen in den untersuchten Zellkulturüberständen nachweisen (Tabelle 6). Mit M-CSF polarisierte Makrophagen zeigten im Mittel eine höhere basale Zytokinproduktion als mit GM-CSF behandelte Zellen. Dabei war die TNF- α -Synthese der M-CSF-Zellen mehr als viermal so hoch, und ihre IL-6-Produktion übertraf die Produktion der mit GM-CSF generierten Zellen im Mittel um das Dreifache. IL-8, welches eigentlich zu den Chemokinen zählt, war unter den analysierten Mediatoren der Einzige, welcher von beiden Subpopulationen auch im Ruhezustand in hohen Konzentrationen produziert wurde.

Makrophagen, die in Gegenwart von M-CSF generiert worden waren, produzierten signifikant mehr IL-10, welches als M2-Markerzytokin gilt, als Zellen aus GM-CSF-Kulturen (Abbildung 10).

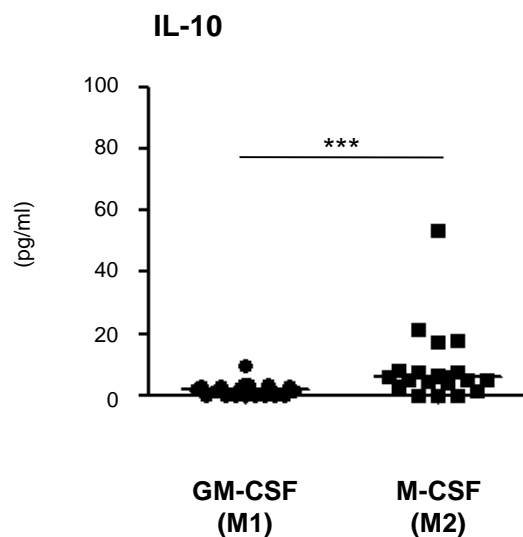


Abbildung 10: IL-10-Produktion unstimulierter, *in vitro* polarisierter humaner Makrophagen

CD14⁺-Zellen wurden in Gegenwart von GM-CSF respektive M-CSF 6 Tage kultiviert. Im Anschluss wurden die IL-10-Konzentrationen in Zellkulturüberständen durchflusszytometrisch mit einem CBA ermittelt. Dargestellt ist der Median der Zytokinproduktion in pg/ml aus Einzelkulturen von n=16 verschiedenen Spendern. ***p<0,001

Tabelle 6: Basale Zytokinproduktion von M1- und M2-Makrophagen

Die Zytokinproduktion polarisierten M1- und M2-Makrophagen wurde durchflusszytometrisch in Zellkulturüberständen ermittelt. Dargestellt ist der Median von n=13-25 Einzelkulturen verschiedener Spender in pg/ml.

Zytokin	GM-CSF (M1)	M-CSF (M2)
IL-6	4,4 (0- 219,8)	13,6 (0- 1488,7)
IL-10	1,5 (0- 5,6)	6 (0- 167,4)
TNF α	1,6 (0- 53,5)	9,2 (0- 183,7)
IL-1 β	0 (0- 7,52)	0 (0- 34,3)
IL-12	2 (0- 8,4)	2,1 (0- 12,1)
IL-8	1673,1 (52,2- 15745,4)	12816 (162,4- 44185)

4.1.4 Einfluss bakterieller Antigene auf das Zytokinprofil

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob *in vitro* generierte M1- und M2-Makrophagen unterschiedlich auf bakterielle Stimuli reagieren. Zu diesem Zweck wurden polarisierte Zellen 24 h mit LPS stimuliert und im Anschluss die Zytokinkonzentration in Zellkulturüberständen durchflusszytometrisch ermittelt.

LPS steigerte erwartungsgemäß die Produktion von IL-6, IL-10, TNF- α und IL-8 bei beiden Makrophagensubtypen, verglichen mit Kontrollkulturen ohne bakteriellen Stimulus, signifikant. In Zellkulturüberständen von GM-CSF-Kulturen waren zusätzlich die TGF β - und IL-12-Konzentrationen signifikant erhöht. Verglichen mit Makrophagen aus M-CSF-Kulturen, steigerte LPS die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-1 β bei Zellen, welche in Gegenwart von GM-CSF polarisiert worden waren, signifikant.

Bei mit M-CSF polarisierten Makrophagen dagegen förderte LPS die IL-10-Synthese, so dass der Unterschied zwischen beiden Subpopulationen in Bezug auf die IL-10 noch deutlicher hervortrat.

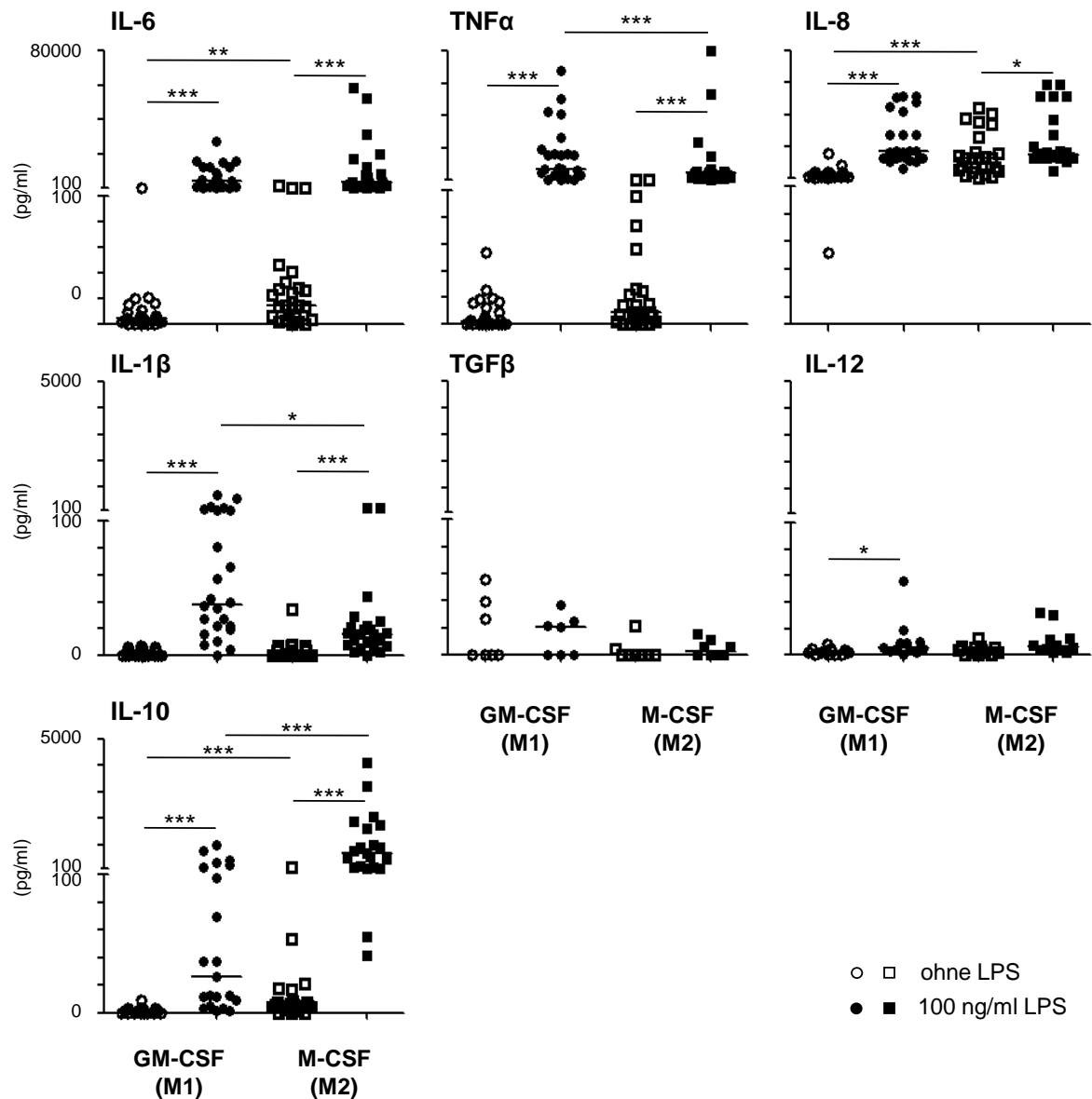


Abbildung 11: Zytokinprofil *in vitro* polarisierter Makrophagensubpopulationen nach Behandlung mit LPS

CD14⁺-Zellen wurden 6 Tage in Gegenwart von GM-CSF oder M-CSF polarisiert und im Anschluss 24 h mit LPS (100 ng/ml) stimuliert. Die Zytokinkonzentrationen in den Überständen der Kulturen wurden durchflusszytometrisch mit einem CBA bestimmt. Dargestellt ist der Median der Zytokinproduktion in pg/ml aus n=6-24 Einzelkulturen verschiedener Spender. *p<0,05, ***p<0,001

4.1.5 Einfluss bakterieller Antigene auf die Expression von Oberflächenmolekülen

Neben der Zytokinproduktion wurde auch der Einfluss von LPS auf die Expression unterschiedlicher Oberflächenmoleküle von Makrophagensubpopulationen untersucht (Abbildung 12).

Eine Stimulation mit LPS reduzierte die Expression von CD14 bei Zellen beider Kulturbedingungen im Vergleich zu unstimulierten Zellen signifikant. Ein Einfluss auf die CD163-Expression war nicht nachweisbar. Bei Zellen aus GM-CSF-Kulturen halbierte eine Stimulation mit LPS das Niveau der HLA-DR-Expression. Der Expressionsgrad nach LPS-Behandlung entsprach damit ungefähr dem Niveau von M-CSF-polarisierten Makrophagen. Bei diesen wurde die HLA-DR-Expression durch LPS nicht beeinflusst.

Erwartungsgemäß führte LPS zu einer Steigerung der CD80-Expression beider Subtypen. Bei Zellen aus M-CSF-Kulturen erreichte dieser Trend keine Signifikanz. Bei Makrophagen, die in Gegenwart von GM-CSF polarisiert worden waren, war die MFI der CD80-Expression im Mittel mehr als doppelt so hoch, verglichen mit unstimulierten Zellen aus gleichen Kulturbedingungen.

Zusammenfassend wurde ein Protokoll etabliert, welches es ermöglicht, mit GM-CSF bzw. M-CSF *in vitro* stabil zwei Makrophagensubtypen zu differenzieren, die phänotypisch und funktionell voneinander unterschieden werden können.

GM-CSF förderte die Entstehung „spiegeleiförmiger“ Zellen, die stark HLA-DR, aber kaum CD14 und CD163 exprimierten. Eine Stimulation mit LPS führte bei diesen Zellen zu einem signifikanten Anstieg der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, wie IL-12, TNF- α und IL-1 β . Dieser Phänotyp entspricht dem in der Literatur beschriebenen M1-Makrophagen.[81, 92, 112]

M-CSF hingegen generierte spindelförmige, adhärente Zellen, die CD14 und CD163 hoch exprimierten. Sie zeigten eine starke Produktion von IL-10, welche durch Stimulation mit bakteriellem Antigen potenziert wurde. Zusammengenommen handelt es sich hierbei um charakteristische Eigenschaften von M2-Makrophagen.[81, 92, 112]

Zellen, die unter den oben genannten Bedingungen *in vitro* polarisiert wurden, werden daher im Folgenden als M1- bzw. M2-Makrophagen bezeichnet.

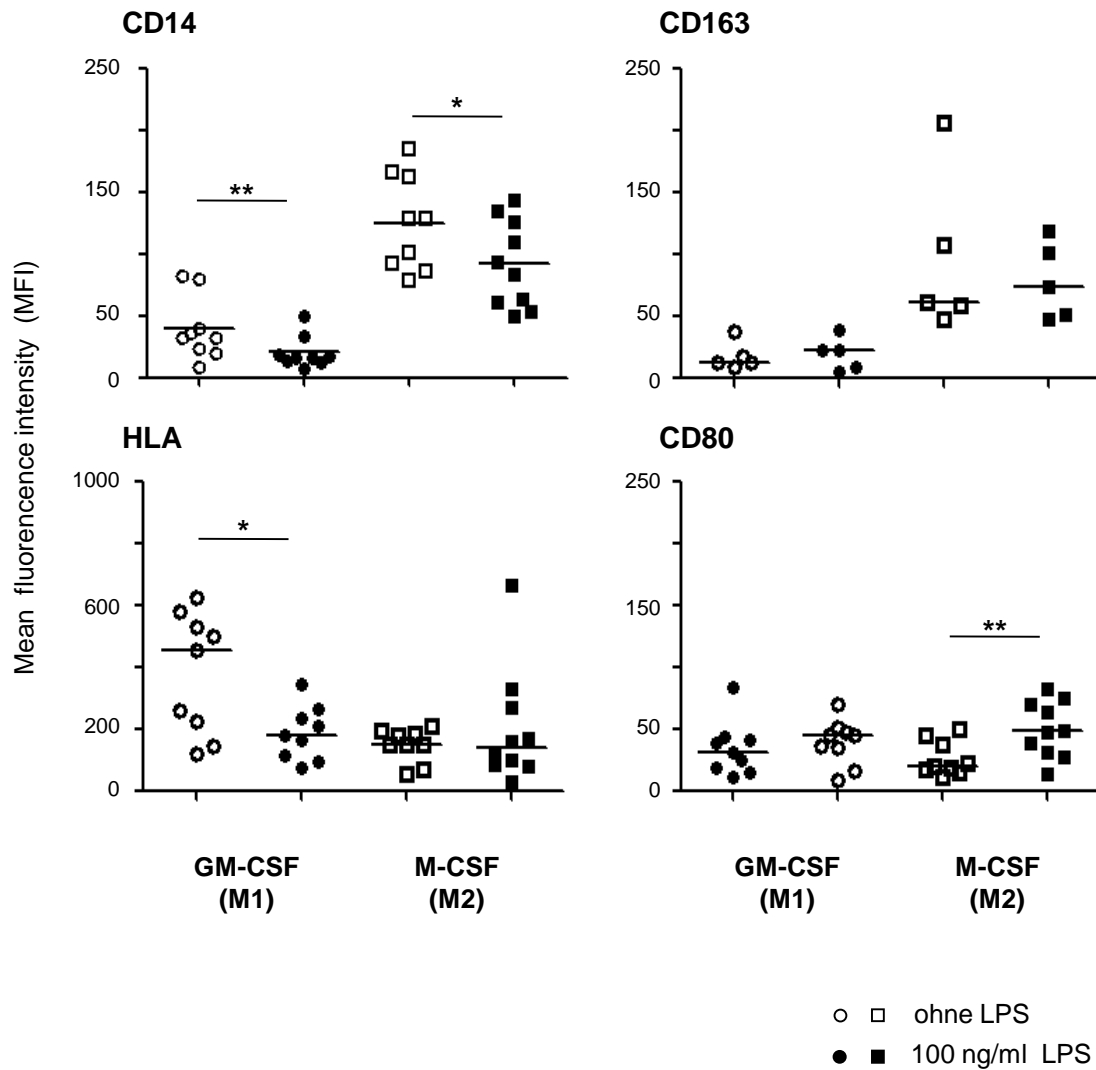


Abbildung 12: Wirkung von LPS auf die Expression von Oberflächenmolekülen

CD14⁺-Zellen wurden in der Gegenwart von GM-CSF respektive M-CSF 6 Tage kultiviert und die polarisierten Zellen im Anschluss 24 h mit/ohne LPS (100 µg/ml) stimuliert. Die Höhe der Expression von CD14, CD163, HLA-DR und CD80 wurde durchflusszytometrisch auf vitalen Zellen ermittelt. Dargestellt ist der Median der MFI von Zellen aus n= 5-9 Einzelkulturen verschiedener Spender. *p<0,05, **p<0,01

4.1.6 Vergleich der Adipokinrezeptorexpression

Die Signaltransduktion von Adipokinen wird über spezifische Rezeptoren vermittelt. Ihre Expression auf der Zelloberfläche ist die Voraussetzung dafür, dass Zellen auf eine Adipokinstimulation reagieren können. Daher wurde die Expression der entsprechenden Rezeptoren auf transkriptioneller Ebene in frisch isolierten CD14⁺-Zellen (M0) und polarisierten Makrophagen mithilfe der qPCR analysiert (Abbildung 13).

Vor und nach der Polarisation waren der langkettige Leptinrezeptor ObRb sowie die Adiponektinrezeptoren AdR1 und AdR2 bei den untersuchten Zellen nachweisbar. Der Grad ihrer Expressionshöhe auf mRNA-Ebene veränderte sich durch die Polarisation kaum. Bezogen auf frisch isolierte Zellen war nur die Expression von Ob-Rb bei M1-Makrophagen mit einem Median von 2,77 gesteigert. Bezüglich der Adiponektinrezeptoren bestand kein Unterschied in der relativen Expression zwischen polarisierten und unpolarisierten Makrophagen. Die relative Rezeptorexpression der beiden Subpopulationen unterschied sich nur unwesentlich voneinander.

Somit erfüllen sowohl nicht polarisierte als auch *in vitro* polarisierte Makrophagen Grundvoraussetzungen, spezifisch auf die Fettgewebsmediatoren Leptin und Adiponektin zu reagieren.

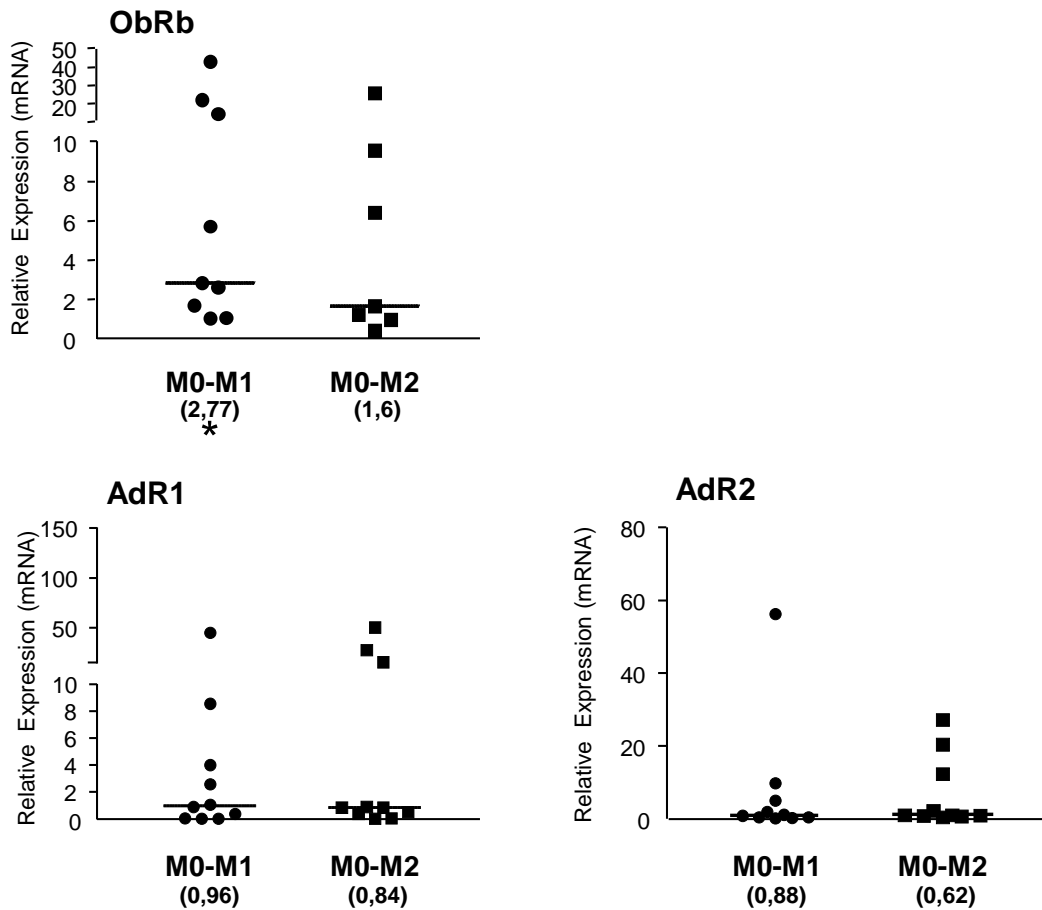


Abbildung 13: Expression von Adipokinrezeptoren *in vitro* polarisierter Makrophagensubpopulationen

Aus jeweils 5×10^5 *in vitro* polarisierten Makrophagen und frisch isolierten $CD14^+$ -Zellen wurden die mRNA für Ob-Rb, AdR1 und AdR2 mit RT und anschließender quantitativer PCR verarbeitet und im Vergleich zu GNB2L1 als *Housekeeping Gene* analysiert. Die dargestellte relative Expression zeigt die Veränderung in den entsprechenden M1- und M2-polarisierten Zellen im Verhältnis zu frisch isolierten, unpolarisierten $CD14^+$ -Zellen des gleichen Spenders. Median von n=7-11 Einzelkulturen unterschiedlicher Spender. *p<0,05

4.2 Wirkung von Leptin auf Makrophagen während der *In-vitro*-Polarisation und auf *in vitro* polarisierte Zellen

4.2.1 Einfluss von Leptin auf die Morphologie

Im nächsten Schritt wurde die Wirkung von Leptin während der Polarisation von Makrophagen *in vitro* untersucht.

Bereits lichtmikroskopisch ließ sich ein Einfluss des Adipokins auf die Makrophagensubpopulationen feststellen. In M1-Makrophagenkulturen, welche während der Polarisation mit Leptin inkubiert wurden, zeigten sich zwischen den typischerweise rundlichen Zellen dosisabhängig vermehrt Makrophagen mit spindelförmiger Morphologie. Bei M2-Kulturen war dieses Phänomen noch deutlicher ausgeprägt. Der Anteil spindelförmiger Zellen war in Gegenwart von Leptin deutlich gesteigert. Eine Steigerung der Leptinkonzentration um das Zehnfache verstärkte diesen Effekt, außerdem erschienen die Zellen, soweit lichtmikroskopisch beurteilbar, adhärenter (Abbildung 14).

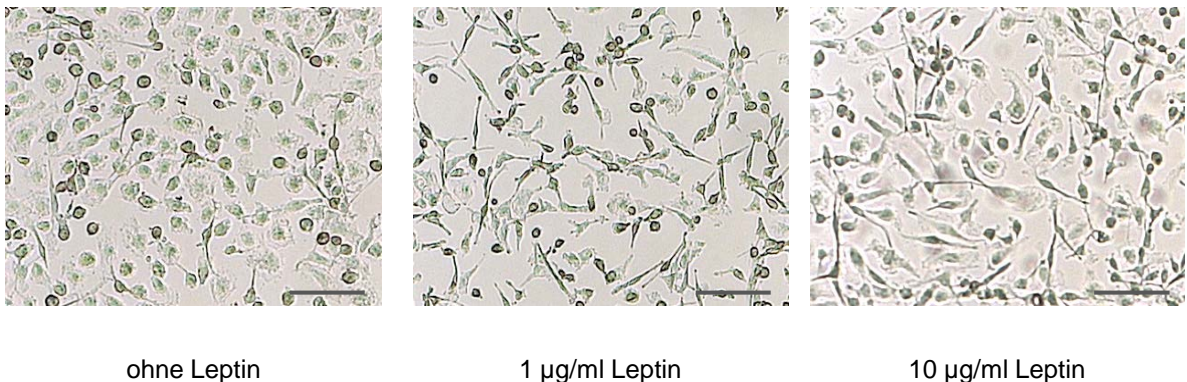


Abbildung 14: Morphologie in Gegenwart von Leptin *in vitro* polarisierter M2-Makrophagen

CD14⁺-Zellen wurden 6 Tage in Gegenwart von M-CSF und unterschiedlichen Konzentrationen von Leptin polarisiert. Kulturen ohne Leptin dienen als Kontrolle. Die Zellen wurden direkt in der Zellkulturplatte bewertet. Gezeigt sind repräsentative Bilder im Phasenkontrast; Originalvergrößerung: 50x; Die Balken in der Bildecke rechts unten entsprechen 50 µm.

4.2.2 Einfluss von Leptin auf die Expression von Oberflächenmolekülen

Die Wirkung von Leptin auf die Expression verschiedener Oberflächenmarker wurde zunächst während der *In-vitro*-Polarisation von Makrophagen untersucht. Dafür wurde die Expressionshöhe von CD14, CD80, CD163 und HLA-DR von M1- und M2-Makrophagen, die in Gegenwart von Leptin polarisiert wurden, durchflusszytometrisch bestimmt und mit Kontrollen ohne Leptin verglichen. (Tabelle 7)

Die Anwesenheit von Leptin veränderte die Expression der untersuchten Oberflächenmoleküle unter oben genannten Bedingungen nicht.

Tabelle 7: Einfluss von Leptin auf die Oberflächenmarkerexpression während der Polarisation von Makrophagen

Makrophagen wurden in Gegenwart von Leptin (1 µg/ml) polarisiert. Die Expression der Oberflächenmarker wurde im Anschluss an die Zellkultur auf vitalen Zellen durchflusszytometrisch bestimmt und mit der Expression von Kontrollen ohne Leptin verglichen. Dargestellt ist der Median von n=5-7 Einzelkulturen unterschiedlicher Spender.

Zugabe von Leptin	M1		M2	
	ohne	1 µg/ml	ohne	1 µg/ml
CD14	32,6 (8,1-82,3)	20,6 (15,7-89,4)	128,1 (78,25-184,2)	126,1 (21,1-188)
CD80	31,14 (11,2-83,5)	31,1 (12,5-68,8)	20,5 (10,9-50,7)	24,2 (10,5-47,8)
CD163	12,6 (9-38,2)	15,5 (8,5-38)	60,9 (47,4-206,3)	73,5 (83,8-154,9)
HLA-DR	453,9 (118,8-623,5)	180,6 (132,6-1132,4)	152,3 (57,4-209,8)	114,9 (43,4-227)

In einem weiteren Schritt wurden Makrophagen im Anschluss an die 6-tägige Polarisation für 24 h mit Leptin behandelt, anschließend wurde auch bei diesen Zellen die Expression der gleichen Oberflächenmarker untersucht.

Während nach 6 Tagen der Polarisation in Gegenwart von Leptin kein signifikanter Unterschied zu leptinunbehandelten Zellen nachweisbar war, hatte Leptin im Anschluss an die

Polarisation einen modulierenden Effekt auf die Expression von HLA-DR- und CD80-Expression (Abbildung 15). Die Expression von CD163 und CD14 wurde durch Leptin nicht beeinflusst.

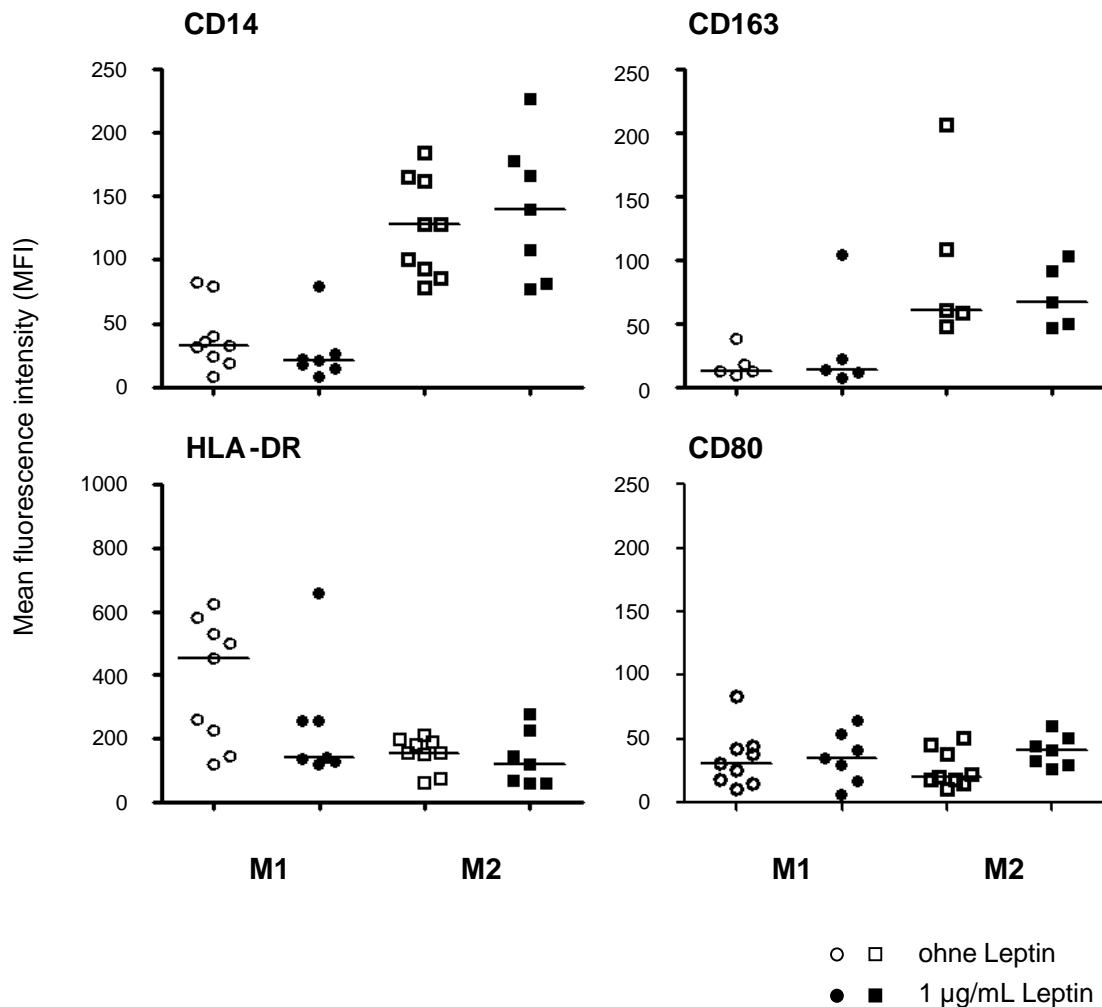


Abbildung 15: Einfluss von Leptin auf die Oberflächenmoleküle polarisierter Makrophagen

M1- und M2-Makrophagen wurden im Anschluss an ihre Polarisation für 24 h mit Leptin (1 µg/ml) inkubiert. Die Expression von CD14, CD163, CD80 und HLA-DR wurde durchflusszytometrisch auf vitalen Zellen ermittelt und mit Kontrollen ohne Leptin verglichen. Median der MFI von n=5-9 Einzelkulturen unterschiedlicher Spender

4.2.3 Einfluss von Leptin auf das Zytokinprofil

Auch in Bezug auf die Zytokinproduktion wurde der Einfluss von Leptin auf die Polarisation von Makrophagensubpopulationen sowie auf polarisierte M1- und M2-Makrophagen untersucht.

Die Anwesenheit von Leptin während der Polarisation hatte keinen Einfluss auf die Synthese der untersuchten Zytokine. Tabelle 8: Effekt von Leptin während der *In-vitro*-Polarisation von Makrophagen auf ihre Zytokinproduktion (Tabelle 8)

Tabelle 8: Effekt von Leptin während der *In-vitro*-Polarisation von Makrophagen auf ihre Zytokinproduktion

M1- und M2-Makrophagen wurden mit oder ohne Leptin (1 µg/ml) polarisiert. Die Zytokinkonzentration in Zellkulturüberständen wurde am Ende der Kultur durchflusszytometrisch ermittelt. Dargestellt ist der Median der Zytokinkonzentration in pg/ml von n=6-25 Einzelkulturen unterschiedlicher Spender.

Zytokine	M1-Makrophagen		M2-Makrophagen	
	ohne	Leptin	ohne	Leptin
TNFα	2,31 (0-53,5)	0 (0-11897,6)	9,2 (0-183,7)	11,2 (0-237,8)
IL-12p70	9,2 (0-53,5)	11,2 (0-11897,6)	2,3 (0-183,7)	0 (0-237,8)
IL-10	1,93 (0-9,6)	1,5 (0-532,7)	6 (0-167,4)	9,5 (0-108,5)
IL-6	4,3 (0-219,8)	3,6 (0-8309,2)	14,4 (0-1488,7)	19,9 (0-836,2)
IL-1β	1,5 (0-7,5)	0 (0-182,2)	1,4 (0-34,3)	2,1 (0-1658,7)
TGFβ	0 (0-55,4)	0 (0-24,8)	0 (0-21,7)	16,5 (0-25,2)
IL-8	1770,6 (52,2-15754,4)	865,8 (865,77-8639)	12816 (162,4-44185)	12816 (0-36820,8)

Median mit Rang (n=6-25),

Dagegen veränderte Leptin die Zytokinproduktion bereits polarisierter M1- und M2-Makrophagen deutlich. (Abbildung 16)

Bei M1-Makrophagen führte Leptin zu einem signifikanten Anstieg der pro-inflammatorischen Zytokine TNF α und IL-6. Auch die bereits hohe IL-8-Synthese konnte durch den Einfluss von Leptin um das Dreifache gesteigert werden. Die mittlere IL-10-Produktion von M1-Makrophagen wurde durch Leptin ebenfalls signifikant verstärkt (Abbildung 16).

Die Zytokinsynthese von M2-Makrophagen war, verglichen mit M1-Zellen, noch stärker durch Leptin beeinflussbar. Bei diesen Zellen führte die Stimulation mit Leptin zu einer deutlich gesteigerten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine. Insbesondere waren die Zytokinspiegel von TNF α im Vergleich zu Kontrollen ohne Leptin fast 30-fach erhöht. Die IL-6-Synthese wurde durch Leptin etwa um den Faktor 20 gesteigert.

In etwas geringerem Ausmaß förderte die Anwesenheit von Leptin auch die Produktion anti-inflammatorischer Zytokine von M2-Makrophagen. Die IL-10-Synthese war nach Behandlung mit Leptin im Mittel verdoppelt, verglichen mit M2-Makrophagen ohne Leptinbehandlung (Abbildung 16).

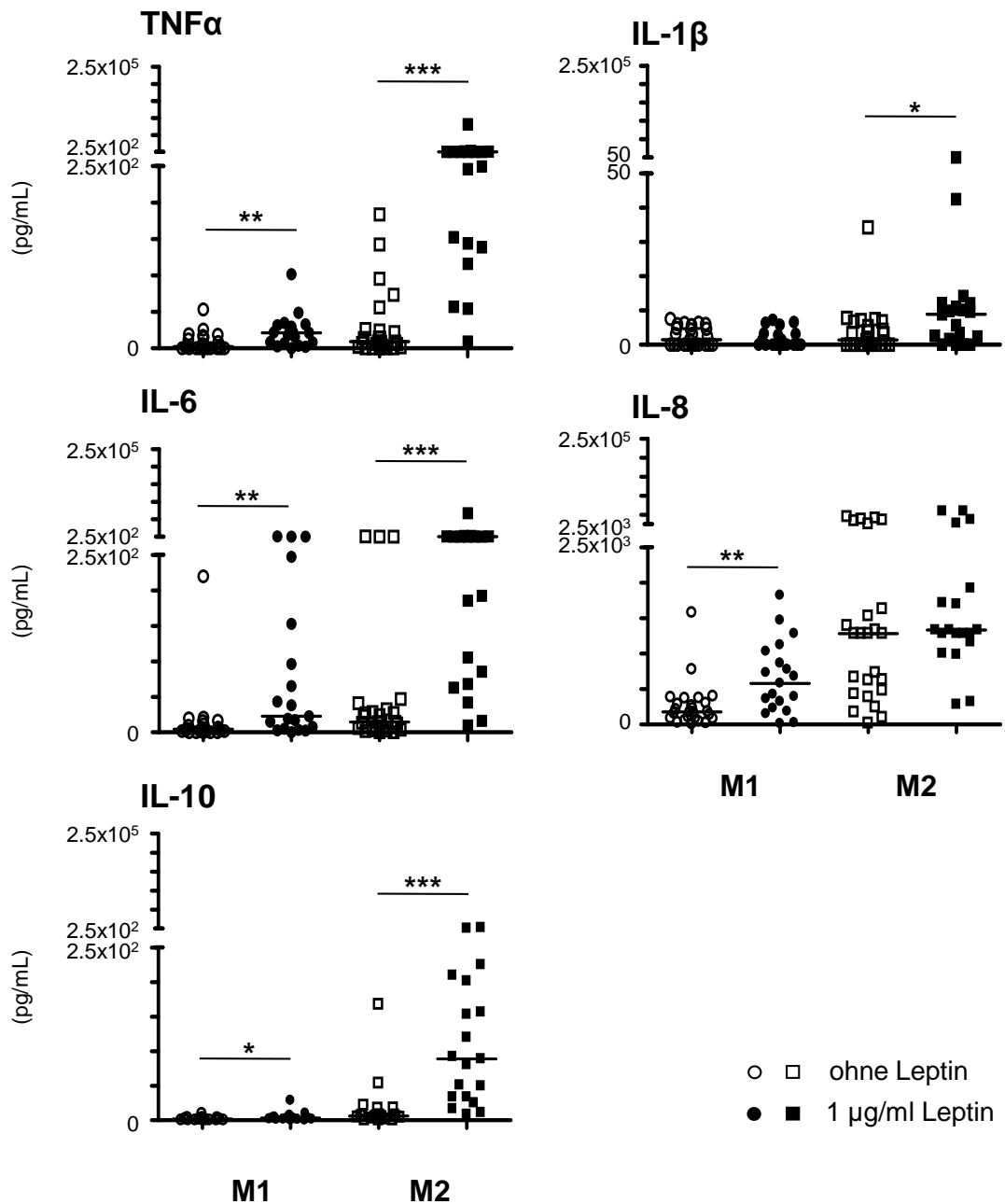


Abbildung 16: Leptinwirkung auf die Zytokinproduktion von Makrophagensubpopulationen

M1- und M2-Makrophagen wurden im Anschluss an die Polarisation 24 h mit Leptin (1 μg/ml) behandelt. Die Zytokinkonzentration wurde durchflusszytometrisch in Zellkulturüberständen bestimmt und mit Kontrollen ohne Leptin der gleichen Spender verglichen. Dargestellt ist der Median der Zytokinkonzentration in pg/ml von n=18-24 Einzelkulturen unterschiedlicher Spender. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

4.2.4 Modulation der LPS-Wirkung durch Leptin

Zusätzlich wurde untersucht, inwieweit Leptin die Reaktion von Makrophagensubtypen auf das bakterielle Antigen modulieren kann. Dazu wurden Makrophagen, die mit oder ohne Leptin polarisiert worden waren, 24 h mit LPS oder einer Kombination aus LPS und Leptin stimuliert.

Die CD163-Expression von Makrophagensubpopulationen wurde durch LPS nicht beeinflusst. Leptin veränderte die Wirkung des bakteriellen Antigens auf die Expression dieses Oberflächenmoleküls nicht, unabhängig davon, ob Makrophagen in Gegenwart von Leptin polarisiert worden waren oder ob eine gleichzeitige Stimulation mit Leptin und LPS stattfand. Während LPS die HLA-DR-Expression von M2-Makrophagen nicht veränderte, senkte es den Expressionsgrad auf M1-Makrophagen. Leptin hatte keine modulierende Wirkung auf diesen Effekt. (Tabelle 9)

Im Gegensatz dazu wird die LPS-beeinflusste CD14- und CD80-Expression von M2-Makrophagen kaum, die von M1-Makrophagen jedoch deutlich durch Leptin moduliert (Abbildung 17).

LPS hemmt die CD14-Expression dieser Zellen, ein Effekt, der durch die Gegenwart von Leptin so gut wie aufgehoben werden kann. Die Expression von CD80 auf M2-Makrophagen wird durch bakterielles Antigen mehr als verdoppelt. Die gleichzeitige Zugabe von LPS und Leptin potenziert diesen Effekt.

Tabelle 9: Wirkung von Leptin auf die LPS-beeinflusste CD163 und HLA-DR von Makrophagensubpopulationen

M1- und M2-Makrophagen wurden mit oder ohne Leptin (1 µg/ml) polarisiert oder im Anschluss an die Polarisation 24 h mit Leptin, LPS oder einer Kombination aus Leptin und LPS behandelt. Verglichen wurde der Effekt von LPS (100 ng/ml) auf die Expression von CD163 und HLA-DR von mit Leptin vorbehandelten Zellen mit Zellen, welche gleichzeitig mit Leptin und LPS inkubiert worden waren. Die Oberflächenmolekülexpression wurde durchflusszytometrisch bestimmt; als Kontrollen dienten M1- und M2 Makrophagen, welche ausschließlich mit LPS stimuliert worden waren sowie Zellen, die keinen zusätzlichen Stimulus erhielten. Median der MFI von n=5-9 Einzelkulturen unterschiedlicher Spender

	M1-Makrophagen	M2-Makrophagen
CD163		
Medium	12,6 (9-38,2)	60,9 (47,4-206,3)
LPS	22,2 (5,5-38,9)	73,9 (48,2-119,5)
Leptin 24h+LPS	17,2 (5,7-168,8)	71 (46,1-125,6)
Leptin 6d+LPS	18,5 (4,9-37,2)	67,5 (50,4-153,8)
HLA-DR		
Medium	453,9 (118,8-623,5)	152,3 (57,4-209,8)
LPS	181,7 (76,6-346)	142,4 (32,3-668,1)
Leptin 24h+LPS	148,8 (123,6-509,9)	153,8 (70,7-345,5)
Leptin 6d+LPS	225,5 (110,9-606,5)	121,3 (42,13-276)

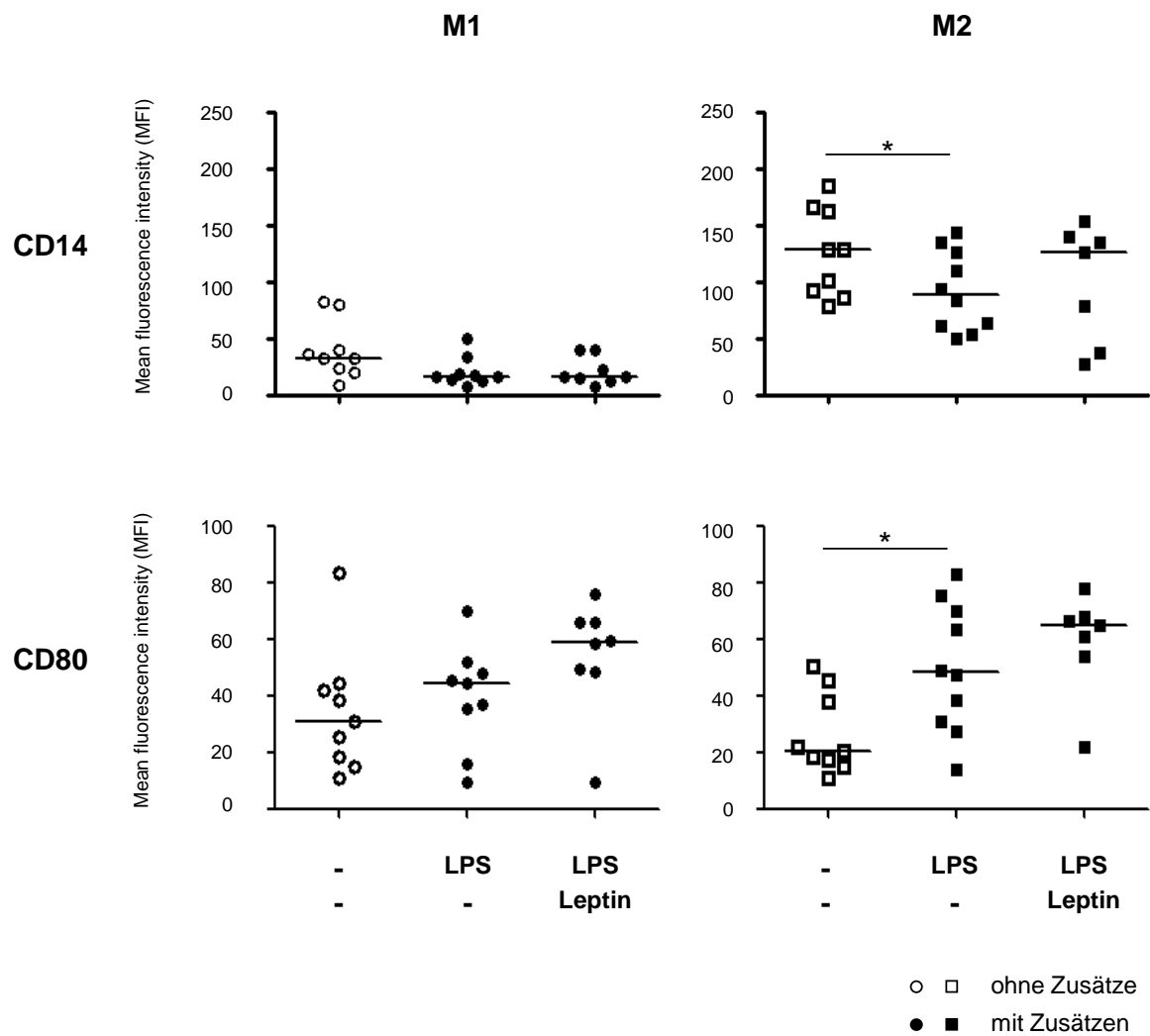


Abbildung 17: Modulation der LPS-induzierten Expression verschiedener Oberflächenmoleküle durch Leptin

M1- und M2-Makrophagen wurden im Anschluss an die Polarisierung 24 h mit LPS (100 ng/ml) oder einer Kombination aus Leptin (1 µg/ml) und LPS stimuliert. Die Expression von CD14 und CD80 wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Dargestellt ist der Median der MFI von n=9-10 Einzelkulturen unterschiedlicher Spender. *p<0,05

4.3 Wirkung von Leptin auf die Adipokinrezeptorexpression

Im Folgenden wurde molekulargenetisch untersucht, inwieweit Leptin die Adipokinrezeptorexpression von Makrophagen beeinflusst und somit gegebenenfalls seine eigene Wirkung modulieren kann.

Sowohl von Makrophagen, die in der Gegenwart von Leptin polarisiert wurden, als auch von M1- und M2-Makrophagen, welche im Anschluss an die Polarisation 24 h mit Leptin inkubiert worden waren, wurde mRNA isoliert und die Expressionsraten von AdR1, AdR2 und Ob-Rb durch quantitative PCR ermittelt. GNB2L1 diente dabei als *Housekeeping Gene*. [113] Die Rezeptorexpression nicht leptin-stimulierter Zellen wurde auf frisch isolierte CD14⁺-Zellen bezogen, bei leptin-stimulierten Makrophagen erfolgte der Vergleich mit polarisierten, nicht-leptin-stimulierten Zellen des gleichen Spenders. In Abbildung 18 sind die $\Delta\Delta CT$ -Werte beider Bedingungen dargestellt.

Während der Polarisation wirkt Leptin in geringem, aber signifikantem Maße hemmend auf die Expression seines eigenen Rezeptors Ob-Rb bei M1-Makrophagen. Dieser Effekt war nicht nachweisbar, wenn M1-Makrophagen erst im Anschluss an ihre Polarisation mit Leptin behandelt wurden. Die Adiponektinrezeptorexpression von M1-Makrophagen wurde durch Leptin nicht signifikant verändert. Bei M2-Makrophagen fördert Leptin die Expression von AdR2 bei polarisierten Zellen. Während der Polarisation beeinflusste Leptin die Adipokinrezeptorexpression auf mRNA-Ebene nicht.

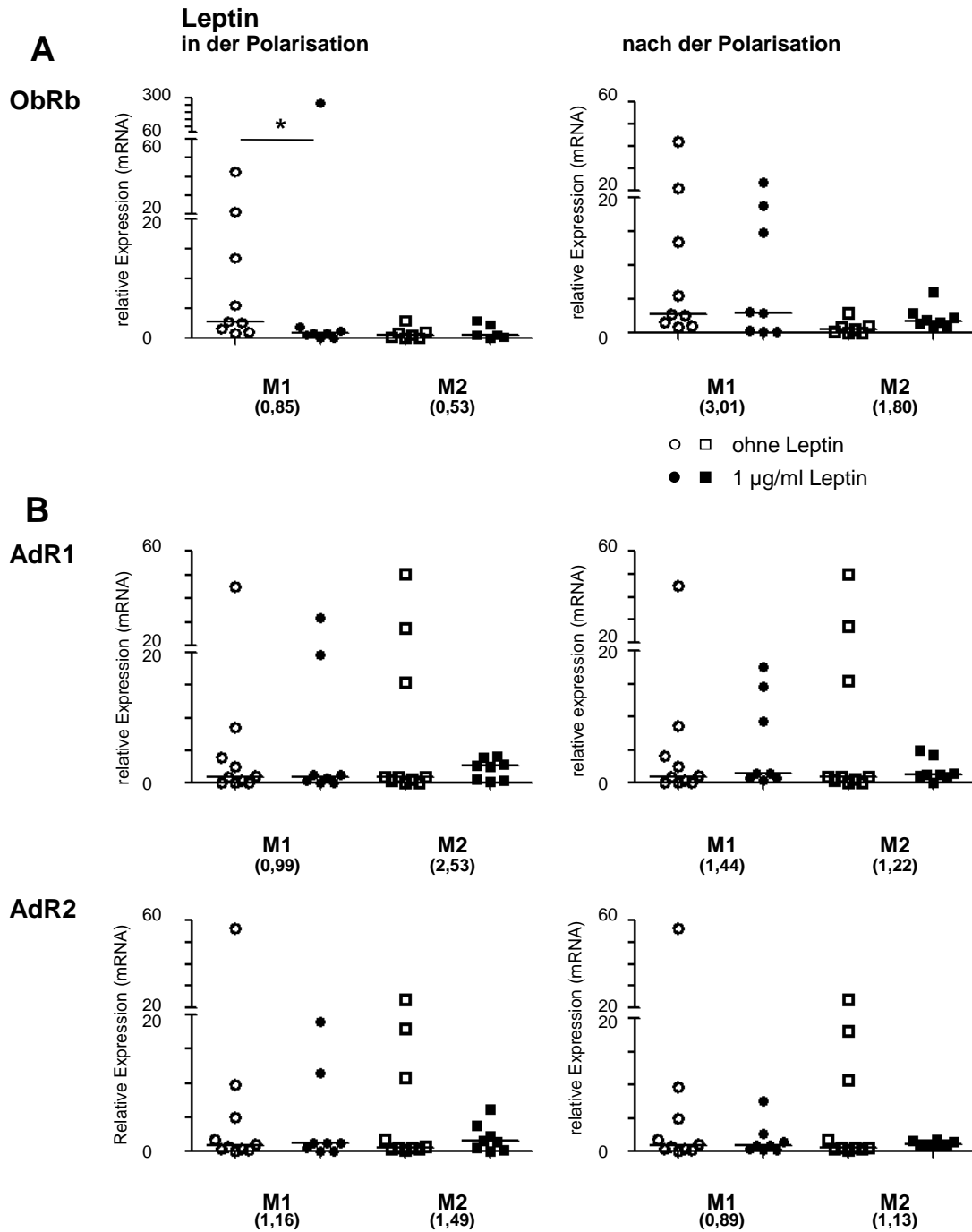


Abbildung 18: Einfluss von Leptin auf die Adipokinrezeptoren

Frisch isolierte CD14⁺-Zellen aus humanem Vollblut wurden entweder in Gegenwart von Leptin (1 µg/ml) polarisiert (linke Spalte) oder im Anschluss an die *In-vitro*-Polarisation zu M1- und M2-Makrophagen 24 h mit Leptin (1 µg/ml) inkubiert (rechte Spalte). Die mRNA der Zellen wurde isoliert und die relative Rezeptorexpression mit quantitativer PCR untersucht. Die rezeptorspezifische mRNA jeder Probe wurde gegen das koamplifizierte *Housekeeping Gene* GNB2L1 normalisiert. Die dargestellten, relativen Expressionsveränderungen beziehen sich in der linken Spalte auf frisch isolierte CD14⁺-Zellen, in der rechten auf polarisierte Makrophagen, welche nicht mit Leptin behandelt wurden. **(A)** Expression des Leptinrezeptorisoform ObRb **(B)** Expression der Adiponektinrezeptoren AdR1 und AdR2. Dargestellt ist der Median der relativen Expression der Adipokinrezeptoren von n=7-11 Einzelkulturen verschiedener Spender. *p<0,05

4.4 Wirkung von Leptin auf die Mannose-Rezeptorexpression

Der Mannose-Rezeptor (CD206) gehört zu den *Pattern-Recognition*-Rezeptoren und gilt als ein weiteres Markermolekül für M2-Makrophagen.[76] Seine Expression wurde molekularbiologisch mit quantitativer PCR untersucht und der modulierende Einfluss von Leptin auf diese evaluiert.

Sowohl bei M1- als auch bei M2-Makrophagen führte die Anwesenheit von Leptin in der Zellkultur zu einer signifikant gesteigerten Expression des Mannose-Rezeptors. Dieser Effekt war unabhängig davon, ob die Makrophagen bereits während oder erst nach der Polarisation mit Leptin in Kontakt gekommen waren, nachweisbar. Bei bereits polarisierten Zellen war die Wirkung von Leptin jedoch stärker.

Insgesamt fördert Leptin die Mannoserezeptorexpression bei M2-Makrophagen signifikant stärker als bei M1-Makrophagen.

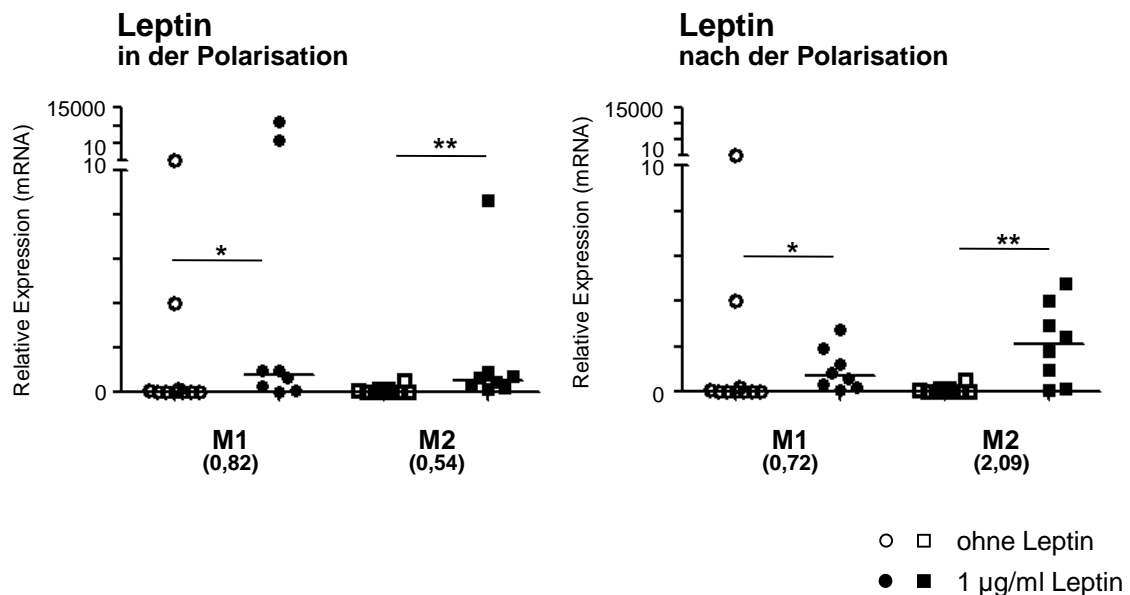


Abbildung 19: Modulation der Mannose-Rezeptorexpression (mRNA) durch Leptin

Humane Makrophagen wurden in der Gegenwart von Leptin (1 µg/ml) *in vitro* polarisiert, oder Leptin (1 µg/ml) wurde zu polarisierten M1- und M2-Makrophagen für 24 h hinzugegeben. Im Anschluss wurde die mRNA der Zellen isoliert und die relative Rezeptorexpression des Mannose-Rezeptors mit quantitativer PCR untersucht. Dabei wurde die rezeptorspezifische mRNA jeder Probe gegen das koamplifizierte *Housekeeping Gene* GNB2L1 normalisiert. Die dargestellten relativen Expressionsveränderungen beziehen sich auf frisch isolierte, unpolarisierte CD14⁺. Gezeigt ist der Median von n=8-12 Einzelkulturen verschiedener Spender. *p<0,05, **p<0,01

4.5 Wirkung von Adiponektin auf polarisierte M1- und M2-Makrophagen

4.5.1 Einfluss von Adiponektin auf die Oberflächenmolekülexpression

Neben Leptin wurde der Einfluss eines weiteren Adipokins, der von Adiponektin, auf Phänotyp und Funktion humaner Makrophagensubpopulationen untersucht. Die Stimulation der Makrophagen erfolgte im Anschluss an die Polarisation analog zu den Versuchen mit Leptin. M1- und M2-Makrophagen wurden jeweils mit 3 µg/ml Adiponektin inkubiert. Zunächst wurde die Wirkung von Adiponektin auf die Expression unterschiedlicher Oberflächenmoleküle untersucht.

Adiponektin beeinflusste die CD14-, CD163- und CD80-Expression polarisierter Makrophagen kaum (Abbildung 20). Die HLA-DR-Expression auf M1-Makrophagen wird durch die Zugabe von Adiponektin auf etwa ein Viertel der Ausgangshöhe vermindert. Das HLA-DR-Expressionsniveau von M1-Makrophagen entspricht dann in etwa der Höhe von M2-Makrophagen, welche durch Adiponektin nur geringfügig reduziert wird.

Auch in Bezug auf Adiponektin wurde untersucht, inwieweit dieses die TLR4-vermittelte Aktivierung von Makrophagen beeinflusst. Dafür wurden *in vitro* polarisierte M1- und M2-Makrophagen mit LPS und Adiponektin zeitgleich 24 h stimuliert. Im Vergleich zu Zellen, welche ausschließlich mit bakteriellem Antigen stimuliert worden waren, wurde die der Einfluss von Adiponektin auf die Aktivierung dieser Zellen untersucht.

Die LPS-Wirkung auf die CD163- und HLA-DR-Expression beider Subpopulationen blieb durch Adiponektin weitgehend unbeeinflusst. (Tabelle 10)

Adiponektin zeigte hingegen einen modulierenden Effekt auf die LPS-induzierte Expressionsänderung von CD14 und CD80. Die Zugabe von LPS vermindert die mittlere Expression von CD14 auf M2-Makrophagen. Wird Adiponektin gleichzeitig mit LPS in das Zellkulturmedium hinzugegeben, scheint dieses die LPS-induzierte Herunterregulation der CD14-Expression tendenziell zu hemmen.

LPS steigert hingegen die CD80-Expression beider Subpopulationen. Dieser Effekt wird durch Adiponektin potenziert. Nach kombinierter Stimulation der polarisierten Makrophagen mit einer Kombination aus LPS und Adiponektin ist die mittlere Fluoreszenzintensität der CD80-Expression mehr als doppelt so hoch im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen (Abbildung 21).

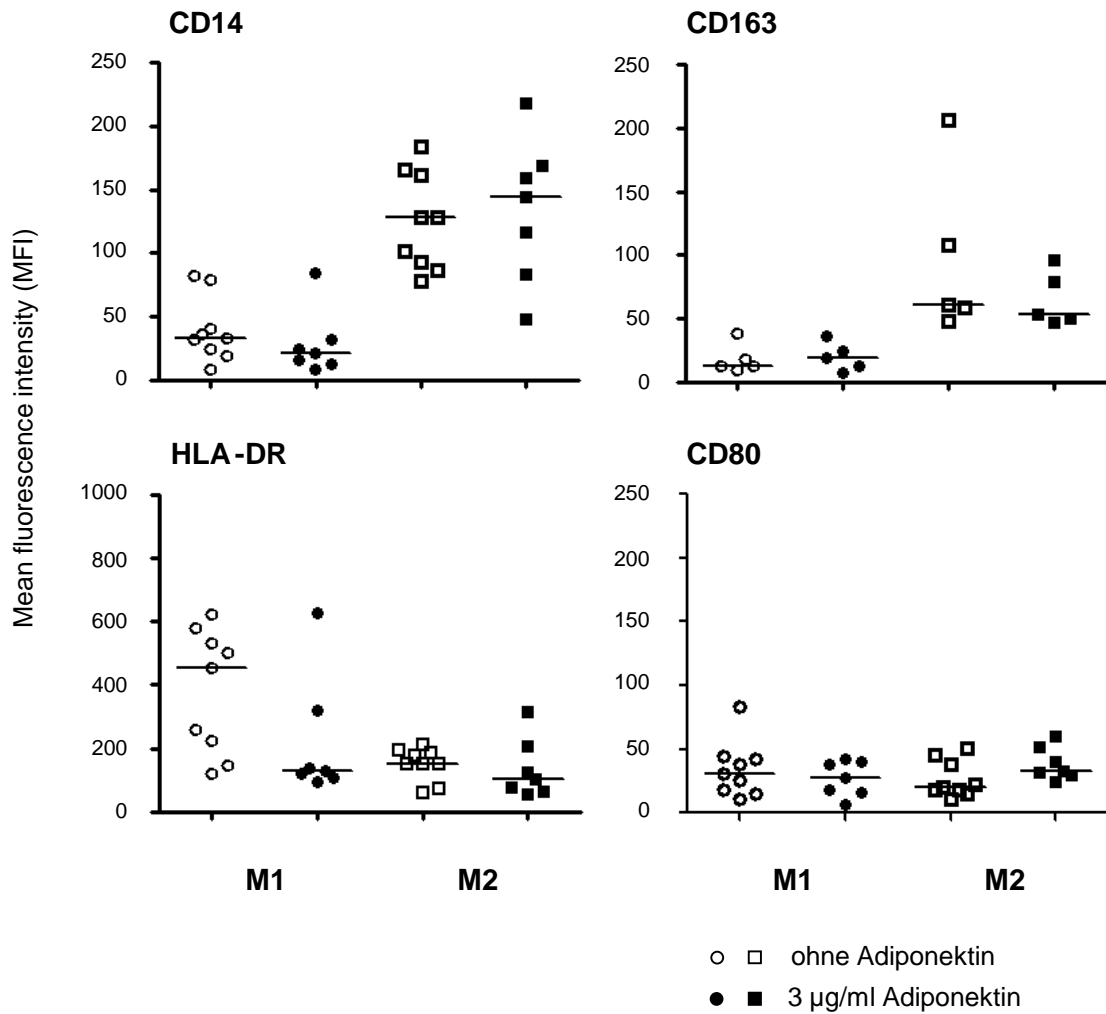


Abbildung 20: Einfluss von Adiponektin auf Oberflächenmoleküle

In vitro polarisierte Makrophagen wurden für 24 h mit Adiponektin (3 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurde die CD14-, CD163-, CD80- und HLA-DR-Expression durchflusszytometrisch auf vitalen Zellen ermittelt und mit polarisierten Zellen ohne Adiponektinkontakt verglichen. Dargestellt ist der Median der MFI von n=5-9 Einzelkulturen unterschiedlicher Spender.

Tabelle 10: Wirkung von Adiponektin auf die LPS-beeinflusste CD163 und HLA-DR von Makrophagensubpopulationen

M1- und M2- Makrophagen wurden 24 h mit LPS (100 ng/ml) oder einer Kombination aus Adiponektin (3 µg/ml) und LPS behandelt. Die Oberflächenmolekülexpression wurde durchflusszytometrisch bestimmt, als Kontrollen dienten M1- und M2 Makrophagen, welche keine weiteren Zusätze im Zellkulturmedium erhalten hatten. Dargestellt ist der Median der MFI von n=5-9 Einzelkulturen unterschiedlicher Spender.

	M1-Makrophagen	M2-Makrophagen
CD163		
Medium	12,6 (9-38,2)	60,9 (47,4-206,3)
LPS	22,2 (5,5-38,9)	73,9 (48,2-119,5)
Adiponektin	19,4 (7,5-36,5)	53,2 (47,1-96,2)
Adiponektin+LPS	12,1 (6,4-21,6)	78,5 (49,7-142,3)
HLA-DR		
Medium	453,9 (118,8-623,5)	152,3 (57,4-209,8)
LPS	181,7 (76,6-346)	142,4 (32,3-668,1)
Adiponektin	129,6 (93,5-627)	101,3 (54,7-314,9)
Adiponektin+LPS	150,6 (85,8-925,6)	137,6 (68-384)

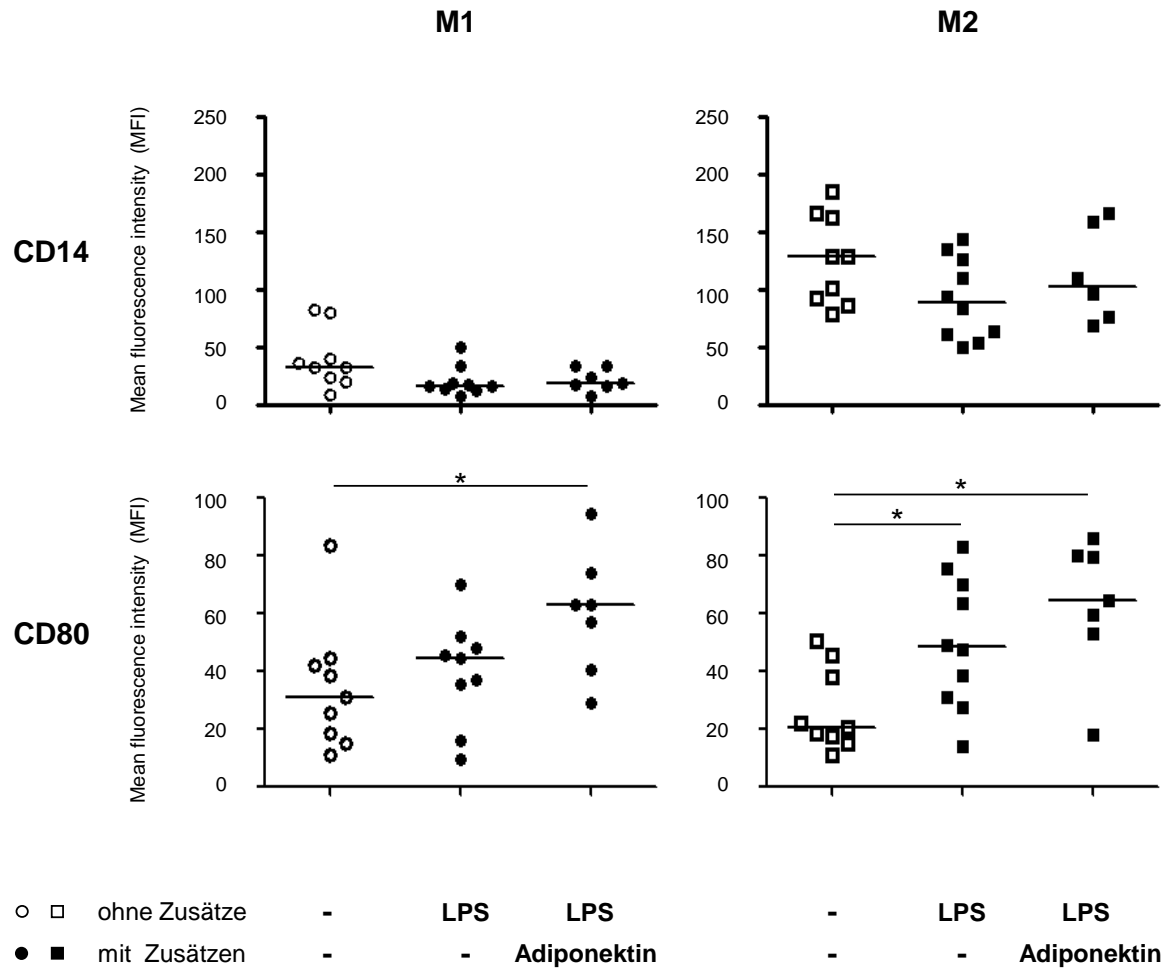


Abbildung 21: Modulation der LPS-induzierten Expression von CD14 und CD80 durch Adiponektin

In vitro polarisierte M1- und M2-Makrophagen wurden mit LPS (100 ng/ml) oder einer Kombination aus LPS und Adiponektin (3 µg/ml) 24 h inkubiert. Die Expression von CD14 und CD80 wurde auf vitalen Zellen durchflusszytometrisch gemessen und mit polarisierten Makrophagen, welche keine zusätzliche Stimulation erhalten hatten, verglichen. Dargestellt ist der Median der MFI von n=7-10 Einzelkulturen unterschiedlicher Spender. *p<0,05

4.5.2 Einfluss von Adiponektin auf die Zytokinproduktion

Der Einfluss von Adiponektin auf die Zytokinproduktion von Makrophagensubpopulationen wurde entsprechend dem Vorgehen mit Leptin durchflusszytometrisch untersucht (Abbildung 22).

Adiponektin beeinflusste M1- und M2-Makrophagen in unterschiedlichem Maße. M1-Makrophagen zeigten nach Zugabe von Adiponektin eine signifikant stärkere Produktion pro-inflammatorischer Zytokine: So war die IL-6-Synthese im Vergleich zu unstimulierten M1-Makrophagen etwa verdreifacht. Auch die IL-8-Produktion wurde signifikant gefördert, nach Inkubation mit Adiponektin waren die gemessenen Konzentrationen im Vergleich mehr als verdoppelt.

Die Wirksamkeit von Adiponektin auf M2-Makrophagen erwies sich als breiter und stärker ausgeprägt als auf M1-Makrophagen. Die Stimulation mit Adiponektin führte bei diesen Zellen sowohl zu einer gesteigerten Produktion der getesteten pro-inflammatorischen Zytokine als auch der IL-10 Synthese. Adiponektin steigerte sowohl die IL-6- als auch die TNF α -Produktion um mehr als das 13-Fache. Die IL-1 β -Konzentration in den getesteten Zellkulturüberständen war nach Adiponektin im Mittel mehr als 5-mal so hoch. Die bei M2-Makrophagen vergleichsweise hohe basale IL-10-Synthese wurde durch die Adiponektinstimulation um mehr als das 7-Fache gesteigert.

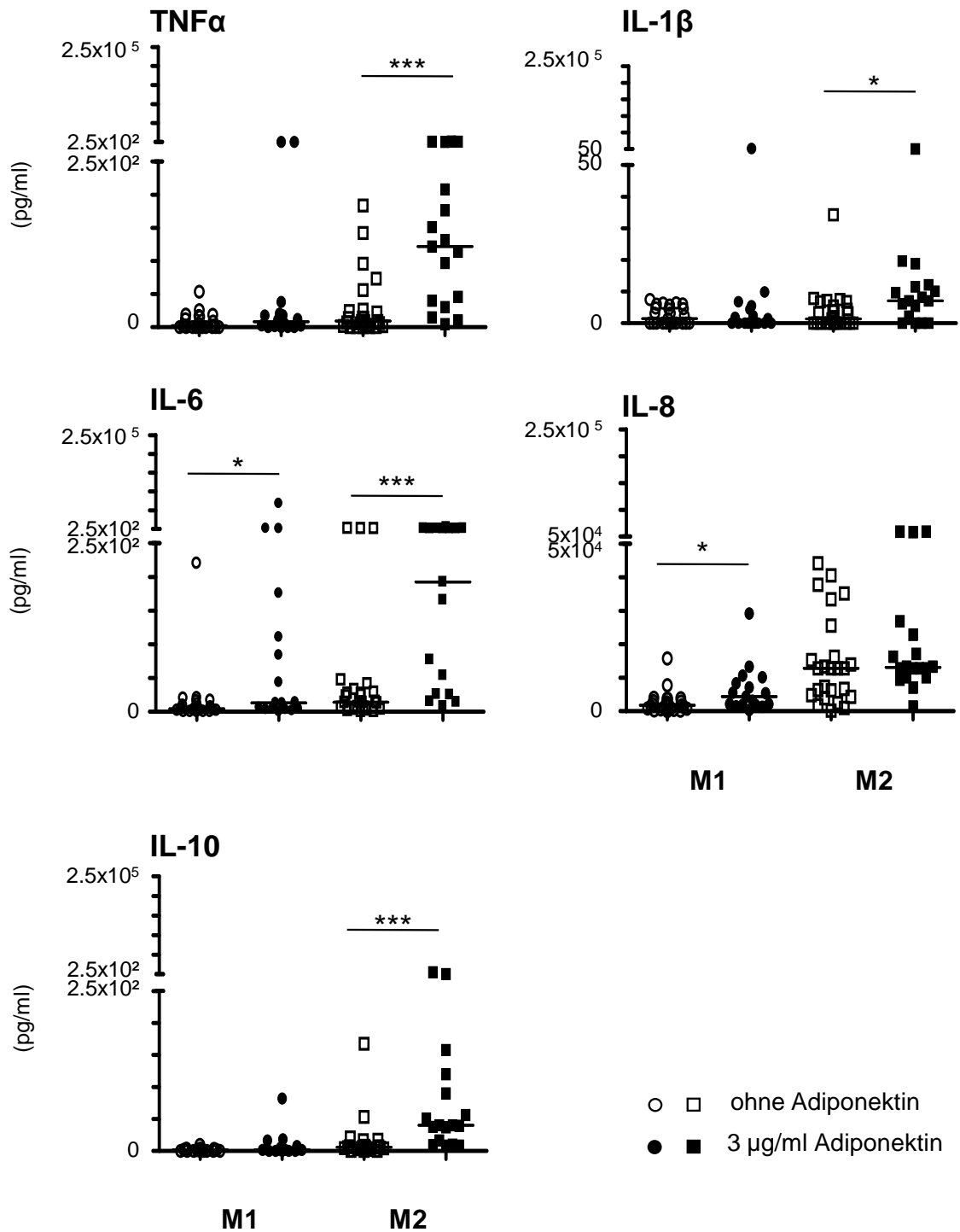


Abbildung 22: Zytokinprofil nach Adiponektinzugabe

M1- und M2-Makrophagen wurden im Anschluss an die Polarisation 24 h mit Adiponektin (3 μg/ml) behandelt. Die Zytokinkonzentration wurde durchflusszytometrisch in Zellkulturüberständen bestimmt und mit Kontrollen ohne Adiponektin der gleichen Spender verglichen. Dargestellt ist der Median der Zytokinkonzentration in pg/ml von n=16-24 Einzelkulturen unterschiedlicher Spender. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

4.5.3 Wirkung von Adiponektin auf die Expression von Adipokinrezeptoren

Inwieweit auch Adiponektin die Expression seiner Rezeptoren oder anderer Adipokinrezeptoren beeinflussen kann, wurde molekularbiologisch untersucht. Dabei konnte kein relevanter Einfluss von Adiponektin auf die untersuchte mRNA-Rezeptorexpression nachgewiesen werden.

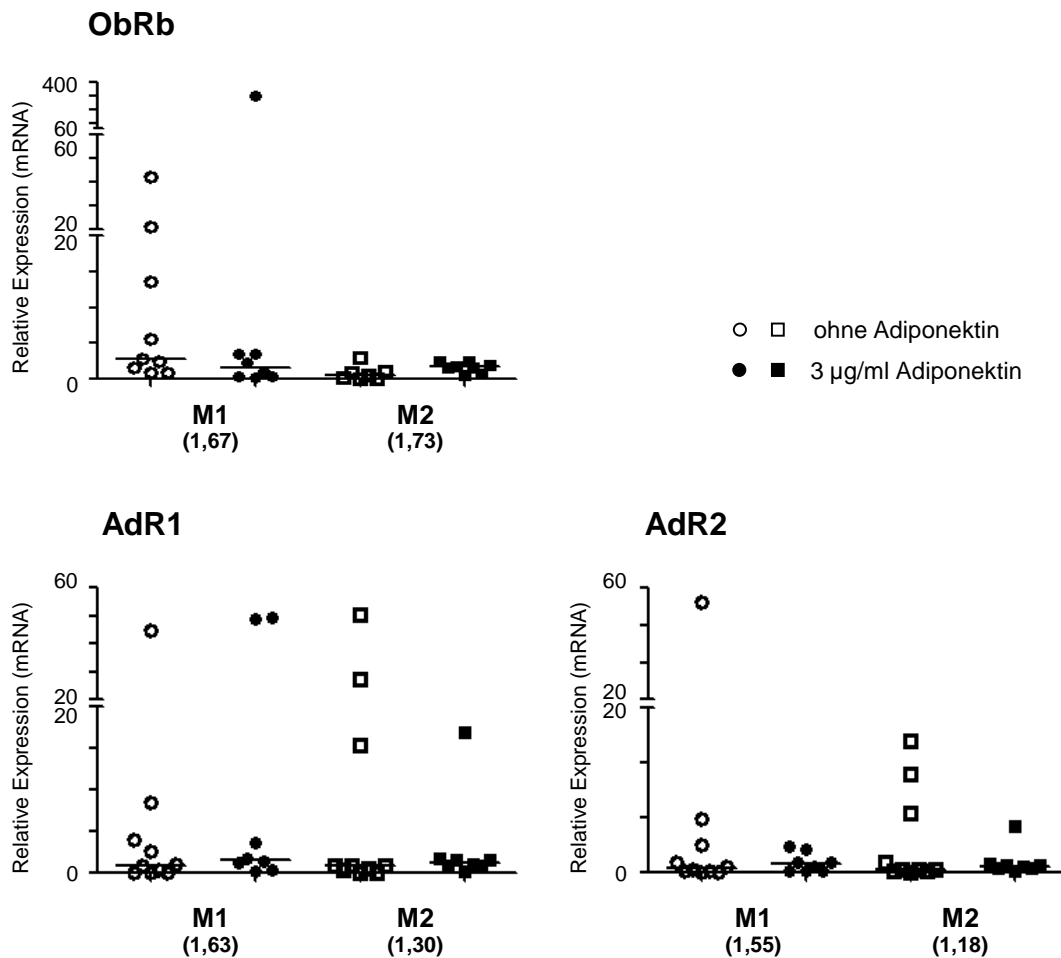


Abbildung 23: Einfluss von Adiponektin auf die Adipokinrezeptorexpression

Humane Makrophagen wurden *in vitro* polarisiert und im Anschluss 24 h mit Adiponektin (3 µg/ml) inkubiert. Die mRNA der Zellen wurde isoliert und die relative Rezeptorexpression mit quantitativer PCR untersucht. Die rezeptorspezifische mRNA von ObRb, AdiR1 und AdiR2 jeder Probe wurde gegen das koamplifizierte *Housekeeping Gene* GNB2L1 normalisiert. Die dargestellten relativen Expressionsveränderungen beziehen sich auf frisch isolierte CD14⁺-Zellen. Dargestellt ist der Median der relativen Expression der Adipokinrezeptoren von n=6-11 Einzelkulturen verschiedener Spender.

4.5.4 Einfluss von Adiponektin auf die Expression des Mannose-Rezeptors

Die Wirkung von Adiponektin auf polarisierte, humane Makrophagen wurde auch bezüglich der Mannose-Rezeptorexpression auf m-RNA-Ebene überprüft (Abbildung 24).

Dabei zeigte sich, dass die Mannose-Rezeptorexpression bei M1-Makrophagen durch Adiponektin kaum beeinflusst wird. Im Gegensatz dazu verdoppelt Adiponektin die Expression des Rezeptors bei M2-Makrophagen. Während sich die Rezeptorexpression bei M1- und M2-Makrophagen vor Adipokinstimulation kaum unterscheidet, exprimieren M2-Makrophagen nach Zugabe von Adiponektin signifikant mehr Mannose-Rezeptor-mRNA.

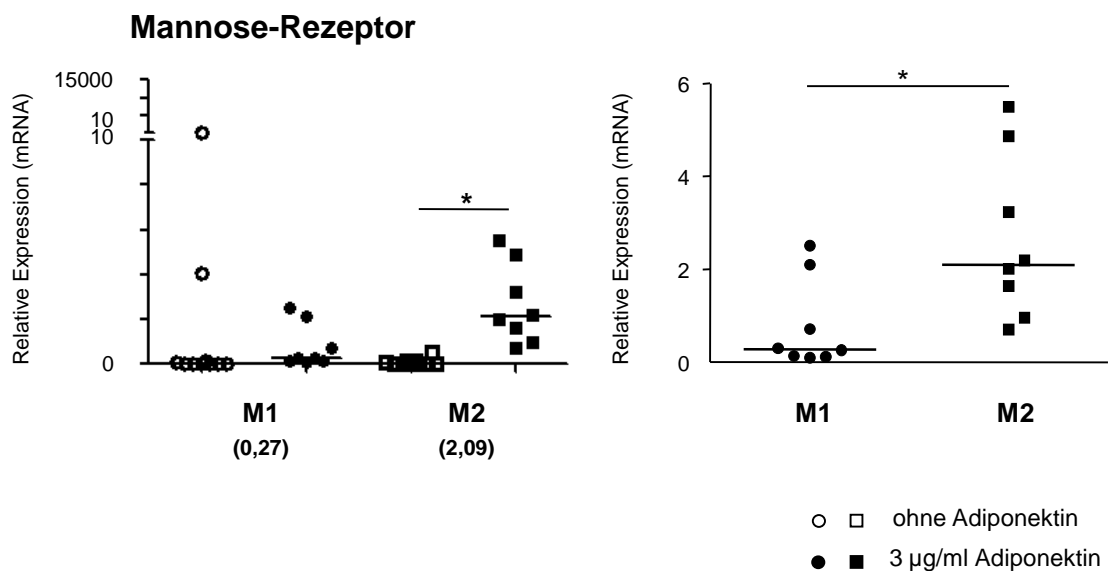


Abbildung 24: Wirkung von Adiponektin auf die Expression des Mannose-Rezeptors

Humane Makrophagen wurden *in vitro* polarisiert und anschließend 24 h mit Adiponektin (3 µg/ml) inkubiert. Die mRNA der Zellen wurde isoliert und die relative Rezeptorexpression des Mannose-Rezeptors mit quantitativer PCR untersucht. Dabei wurde die rezeptorspezifische mRNA jeder Probe gegen das koamplifizierte *Housekeeping Gene* GNB2L1 normalisiert. Die dargestellten relativen Expressionsveränderungen beziehen sich auf frisch isolierte, unpolarisierte CD14⁺-Zellen. In der rechten Spalte ist der Unterschied zwischen adiponektinstimulierten M1- und M2-Makrophagen dargestellt. Gezeigt ist der Median von n=8-12 Einzelkulturen verschiedener Spender. *p<0,05

4.6 Makrophagensubpopulationen im mesenterialen Fettgewebe

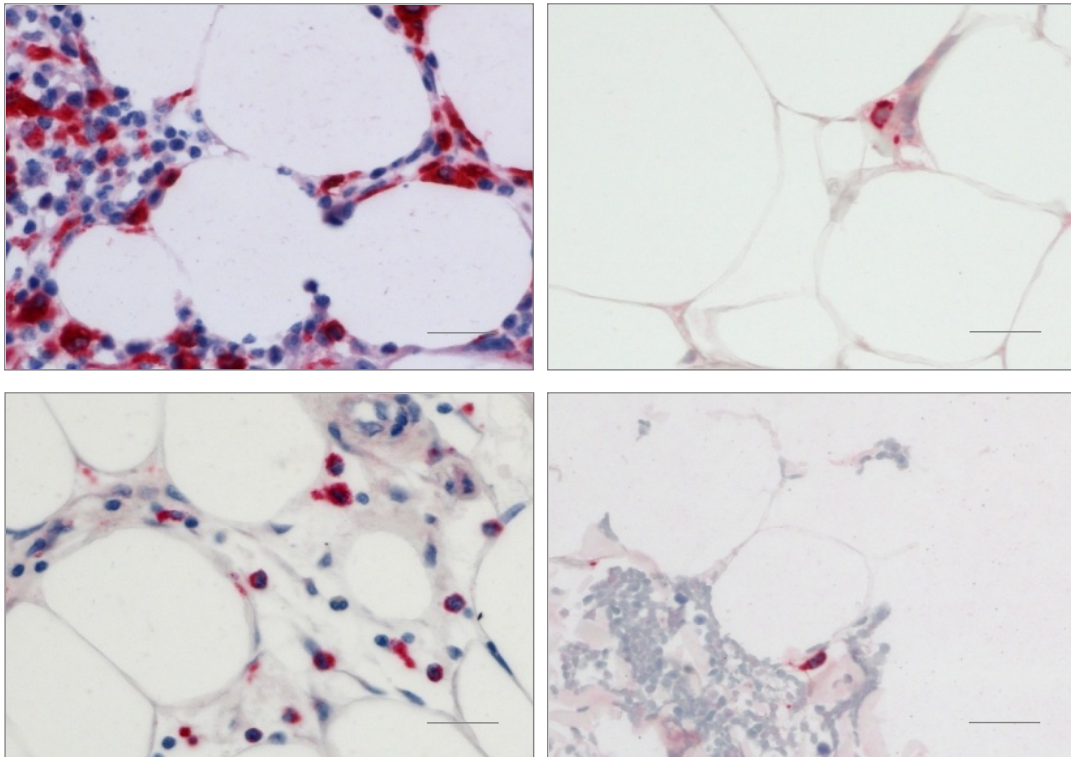
Nachdem gezeigt werden konnte, dass sowohl Leptin als auch Adiponektin die Morphologie und die Funktion von M1- und M2-Makrophagen *in vitro* beeinflussen können, sollte die *In-vivo*-Situation im mesenterialen Fettgewebe näher beleuchtet werden.

Dabei stellte sich zunächst die Frage, welchen Phänotyp die infiltrierenden Makrophagen im *Creeping Fat* haben. In diesem Zusammenhang sollten auch etwaige Unterschiede zu anderen entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa, bei welcher es nicht zu einer Hypertrophie des Fettgewebes kommt, untersucht werden. Außerdem diene das mesenteriale Fettgewebe von Patienten mit kolorektalem Karzinom und von gesunden Probanden mit nicht neoplastischen Dysplasien als Kontrollgruppe.

Zunächst wurde die Größenordnung der Makrophageninfiltration im Fettgewebe bestimmt. Hierfür wurde die Zahl der Makrophagen des mesenterialen Fettgewebes aus Paraffinschnitten ermittelt. Die Makrophageninfiltration wurde durch eine immunhistochemische Färbung gegen CD68, einem Oberflächenprotein, das vor allem von Makrophagen exprimiert wird, quantitativ erfasst (Abbildung 25).

Im Fettgewebe von Patienten mit Morbus Crohn und kolorektalem Karzinom zeigte sich eine massive Infiltration durch CD68⁺-Zellen, die bei Colitis-ulcerosa-Patienten oder gesunden Kontrollen nicht nachweisbar war ($p \leq 0,05$). Dabei überstieg die Zahl der eingewanderten Zellen bei Patienten mit Morbus Crohn die Infiltration bei kolorektalem Karzinom im Mittel um das 3-Fache ($p \leq 0,001$, verglichen mit Colitis ulcerosa, gesunden Kontrollen und kolorektalem Karzinom).

CD68



Morbus Crohn	CU
KRK	Kontrolle

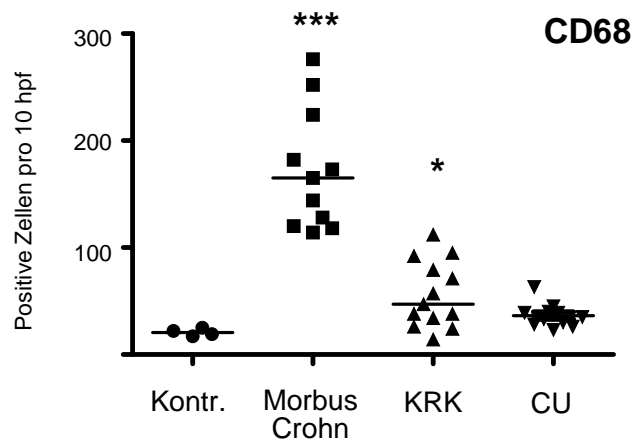


Abbildung 25: Makrophagen im mesenterialen Fettgewebe

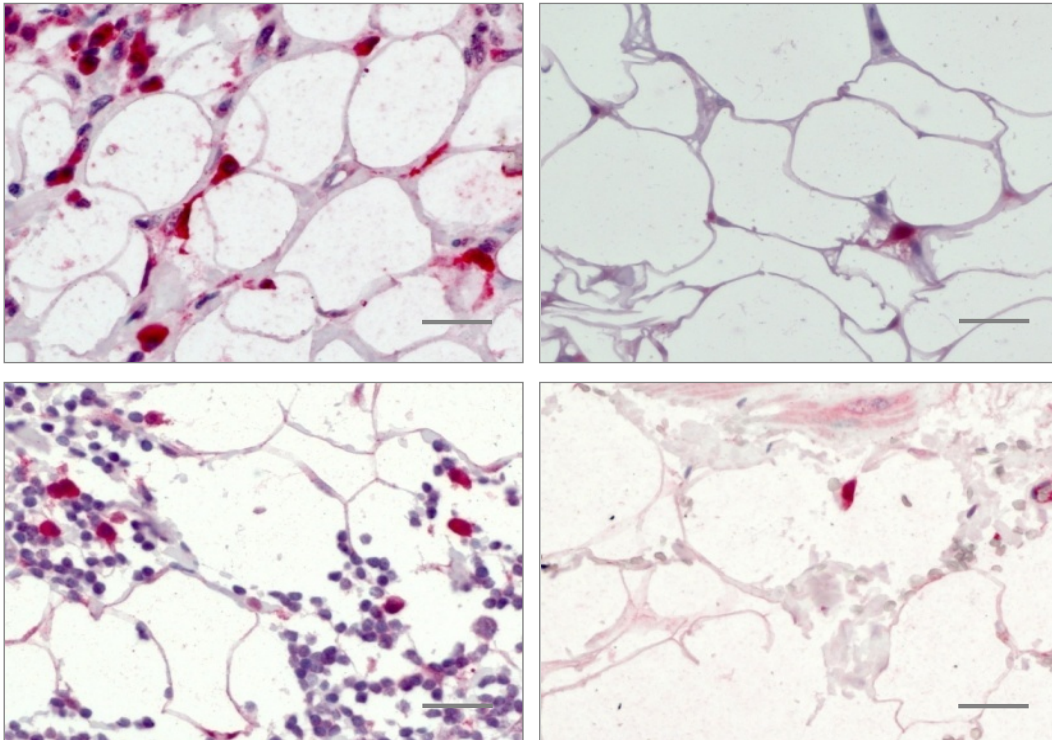
In Paraffin eingebettetes Probenmaterial des mesenterialen Fettgewebes von Patienten mit Morbus Crohn, Colitis ulcerosa (CU), kolorektalem Karzinom (KRK) und gesunden Kontrollen mit nicht dysplastischen Neoplasien (Kontr.) wurde immunhistochemisch auf die Anwesenheit von CD68⁺-Makrophagen untersucht. Im oberen Block sind repräsentative Bilder der CD68-Färbung in 400-facher Vergrößerung gezeigt. Die Bildbalken entsprechen 50 µm, die Legende gibt die Anordnung der immunhistologischen Bilder wieder. Unten rechts im Bild ist die Zusammenfassung der statistischen Verteilung CD68⁺-Zellen im Fettgewebe gezeigt, ausgewertet wurden jeweils 10 repräsentative *high power fields* (HPF) eines Schnittes. Dargestellt ist der Median von n=4-12 Schnitten unterschiedlicher Patienten. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

Die Makrophagen im mesenterialen Fettgewebe wurden anschließend mit subgruppenspezifischen Markern genauer charakterisiert.

Um M1-Makrophagen sichtbar zu machen, wurde eine Färbung gegen die induzierbare NO-Synthase (iNOS) gewählt (Abbildung 26).[114]

Im mesenterialen Fettgewebe von Patienten mit Colitis ulcerosa und kolorektalem Karzinom waren im spärlichen zellulären Infiltrat kaum iNOS⁺-Zellen nachweisbar. Dagegen war die Zahl der iNOS⁺-M1-Makrophagen im Bereich der CD68⁺-Zellen bei kolorektalem Karzinom und Morbus Crohn signifikant größer. Das Ausmaß der Infiltration in beiden Gruppen entsprach in etwa der gleichen Größenordnung.

iNOS



Morbus Crohn	CU
KRK	Kontrolle

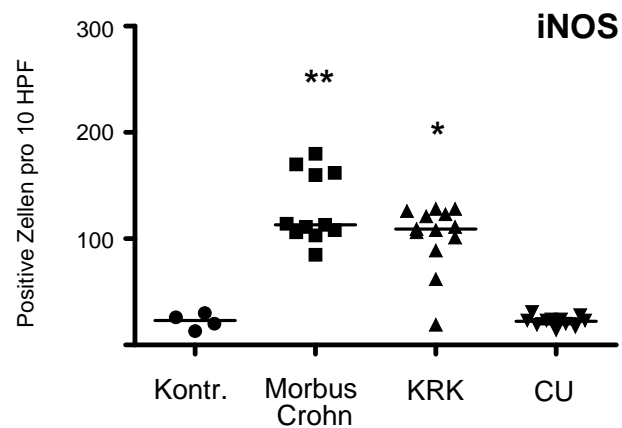
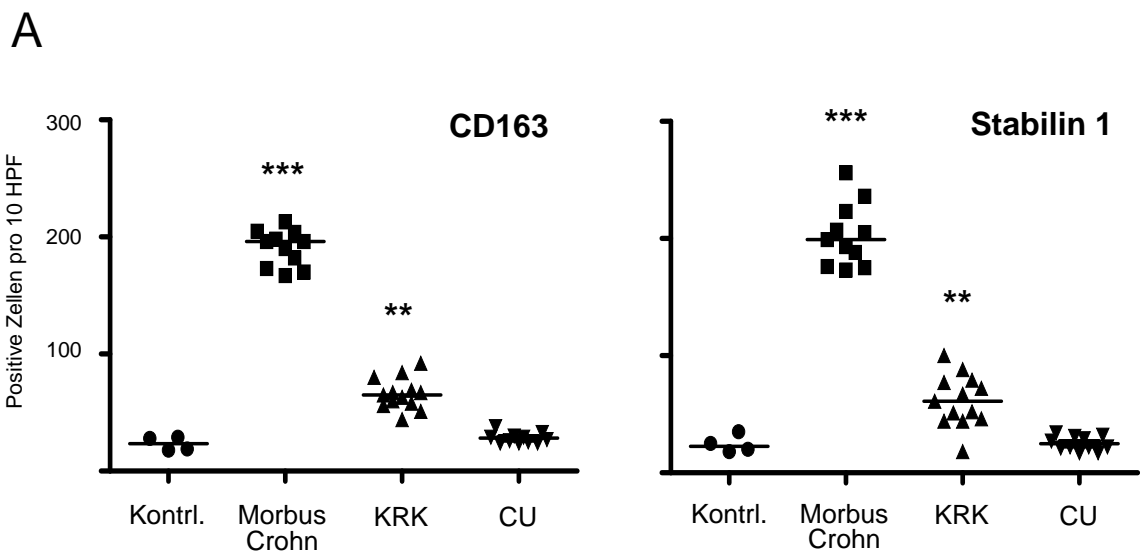


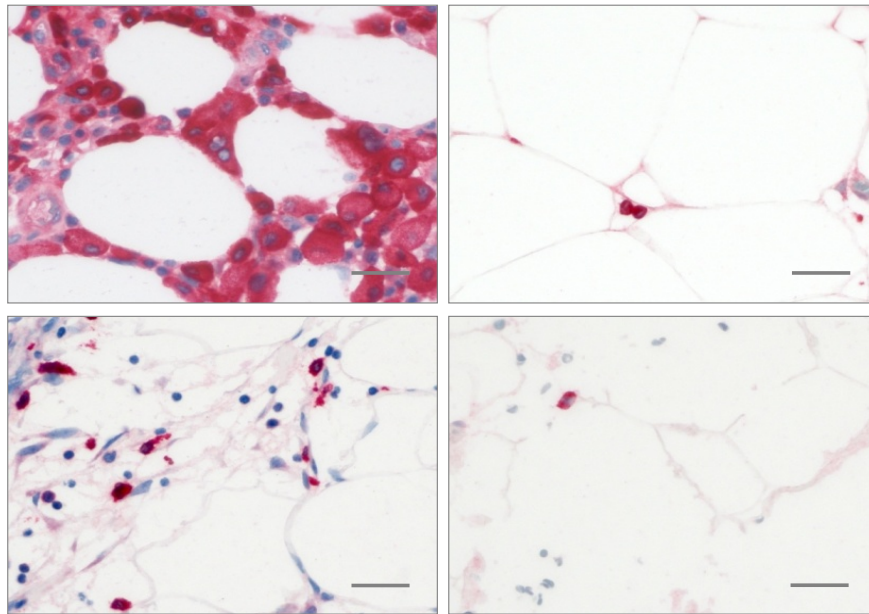
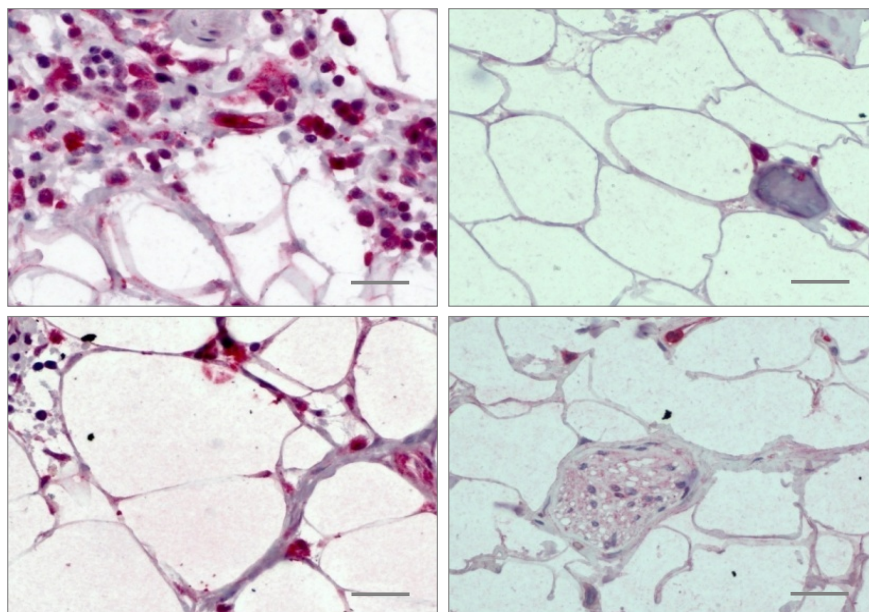
Abbildung 26: iNOS⁺-M1-Makrophagen im mesenterialen Fettgewebe

In Paraffin eingebettetes Probenmaterial des mesenterialen Fettgewebes von Patienten mit Morbus Crohn, Colitis ulcerosa (CU), kolorektalem Karzinom (KRK) und gesunden Kontrollen mit nicht dysplastischen Neoplasien (Kontr.) wurde immunhistochemisch auf die Anwesenheit von iNOS⁺-M1-Makrophagen untersucht. Der obere Block zeigt repräsentative Bilder der iNOS-Färbung in 400-facher Vergrößerung. Die Bildbalken entsprechen 50 µm, die Legende gibt die Anordnung der immunhistologischen Bilder wieder. Im *Dotplot*-Diagramm ist die Zusammenfassung der statistischen Verteilung von M1-Makrophagen im Fettgewebe aufgeführt: Ausgewertet wurden jeweils 10 repräsentative *high power fields* (HPF) eines Schnittes. Dargestellt ist der Median von n=4-12 Schnitten unterschiedlicher Patienten. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

Als Marker für M2-Makrophagen wurden CD163 und Stabilin-1 gewählt (Abbildung 27). Außerdem wurde die IL-10-Expression im mesenterialen Fettgewebe mit Immunfluoreszenz untersucht, um erste Rückschlüsse auf die Aktivität der M2-Makrophagen im mesenterialen Fettgewebe ziehen zu können (Abbildung 28).

Interessanterweise waren im mesenterialen Fettgewebe von Patienten mit kolorektalem Karzinom und Morbus Crohn signifikant mehr CD163⁺-M2-Makrophagen präsent als bei Colitis ulcerosa oder gesunden Kontrollen. Dabei war die M2-Infiltration im *Creeping Fat* etwa 3-mal so groß wie bei kolorektalem Karzinom ($p \leq 0,001$ im Vergleich zu allen Vergleichsgruppen). Dieses Ergebnis konnte durch die Stabilin-1-Färbung bestätigt werden (Abbildung 27). Die Makrophagen scheinen dabei nicht nur phänotypisch M2-Makrophagen zu entsprechen, sondern auch funktionell dieser Subgruppe zuzugehören. Dazu passend ließ sich in der Immunfluoreszenz eine starke Expression von IL-10 im Bereich der zellulären Infiltration des mesenterialen Fettgewebes nachweisen. Da neben Makrophagen Th2-Zellen die wichtigsten Produzenten von IL-10 sind, wurde eine Doppelfärbung gegen IL-10 und CD4 durchgeführt. In IL-10-reichen Gebieten waren fast keine CD4-positiven Zellen zu finden (Abbildung 28).



B**CD163****Stabilin 1**

Morbus Crohn	CU
KRK	Kontrolle

Abbildung 27: M2-Makrophagen im mesenterialen Fettgewebe

In Paraffin eingebettetes Probenmaterial des mesenterialen Fettgewebes von Patienten mit Morbus Crohn, Colitis ulcerosa (CU), kolorektalem Karzinom (KRK) und gesunden Kontrollen mit nicht dysplastischen Neoplasien (Kontrl.) wurde immunhistochemisch mit Anti-CD163- bzw. Anti-Stabilin-1-Antikörpern auf die Anwesenheit von M2-Makrophagen untersucht. Teil (A) zeigt die Zusammenfassung der statistischen Verteilung von M2-Makrophagen im Fettgewebe: Ausgewertet wurden jeweils 10 repräsentative *high power fields* (HPF) eines Schnittes. Dargestellt ist der Median von n=4-12 Schnitten unterschiedlicher Patienten. (B) zeigt repräsentative Bilder beider Färbungen in 400-facher Vergrößerung. Die Bildbalken entsprechen 50 µm, in der Legende links unten ist die Anordnung der Bilder wiedergegeben. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

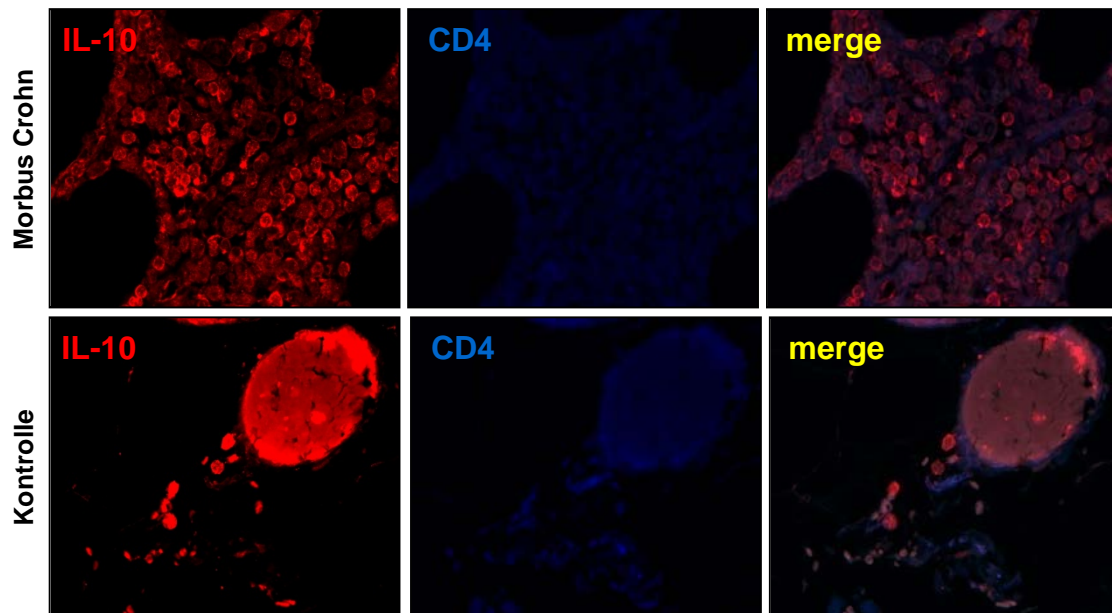


Abbildung 28: IL-10-Expression im mesenterialen Fettgewebe

In Paraffin eingebettetes Probenmaterial des mesenterialen Fettgewebes von Patienten mit Morbus Crohn (obere Zeile) und gesunder Kontrollen mit nicht dysplastischen Neoplasien (untere Zeile) wurde die IL-10- und die CD4-Expression mit *In-situ*-Immunfluoreszenz untersucht. Gezeigt sind repräsentative Bilder in 400-facher Originalvergrößerung.

Die immunhistochemischen Daten zusammenfassend, lässt sich feststellen: Eine Infiltration des mesenterialen Fettgewebes durch Makrophagen ist sowohl bei Patienten mit kolorektalem Karzinom als auch bei Morbus Crohn zu finden. Eine starke Akkumulation von M2-Makrophagen scheint jedoch ein Alleinstellungsmerkmal des *Creeping Fat* bei Morbus Crohn zu sein.

4.7 Phagozytose

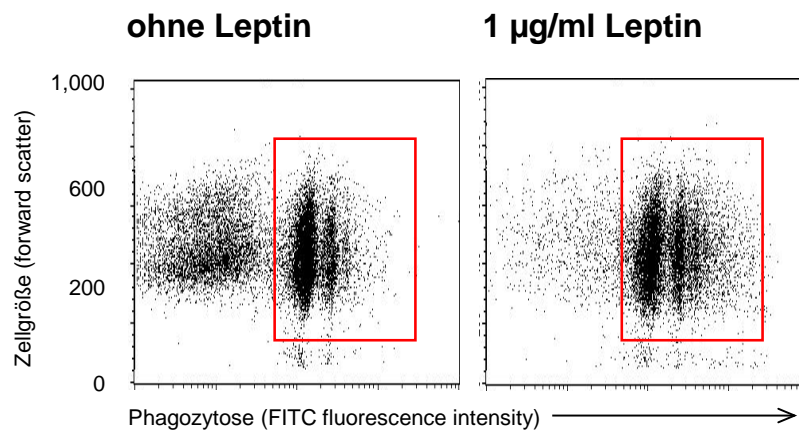
Mit dem Ziel, die funktionelle Bedeutung der adipokinbeeinflussten Makrophagen im mesenterialen Fettgewebe genauer zu definieren, wurde die Wirkung von Leptin und Adiponektin auf die Phagozytosefähigkeit von Makrophagensubpopulationen evaluiert. Zu diesem Zweck wurden Phagozytoseversuche mit Latex-Beads durchgeführt (Abbildung 29).

Beide Makrophagensubpopulationen waren erwartungsgemäß in der Lage, die Beads zu internalisieren. Dabei unterschieden sich die adipokin-naiven Subpopulationen in ihrer Effektivität nicht signifikant voneinander.

Mit Leptin stimulierte M1-Makrophagen phagozytierten signifikant mehr Beads als M1-Makrophagen ohne zusätzliche Adipokinstimulation. Auch M2-Makrophagen, die zuvor mit Leptin inkubiert worden waren, internalisierten mehr Beads als unbehandelte M2-Zellen.

Das Gegenteil ließ sich nach Adiponektinstimulation beobachten. Adiponektin hemmte die Phagozytose der M2-Makrophagen signifikant. Die Phagozytoseleistung von M1-Makrophagen wurde durch Adiponektin nicht beeinflusst (*Daten nicht gezeigt*).

A



B

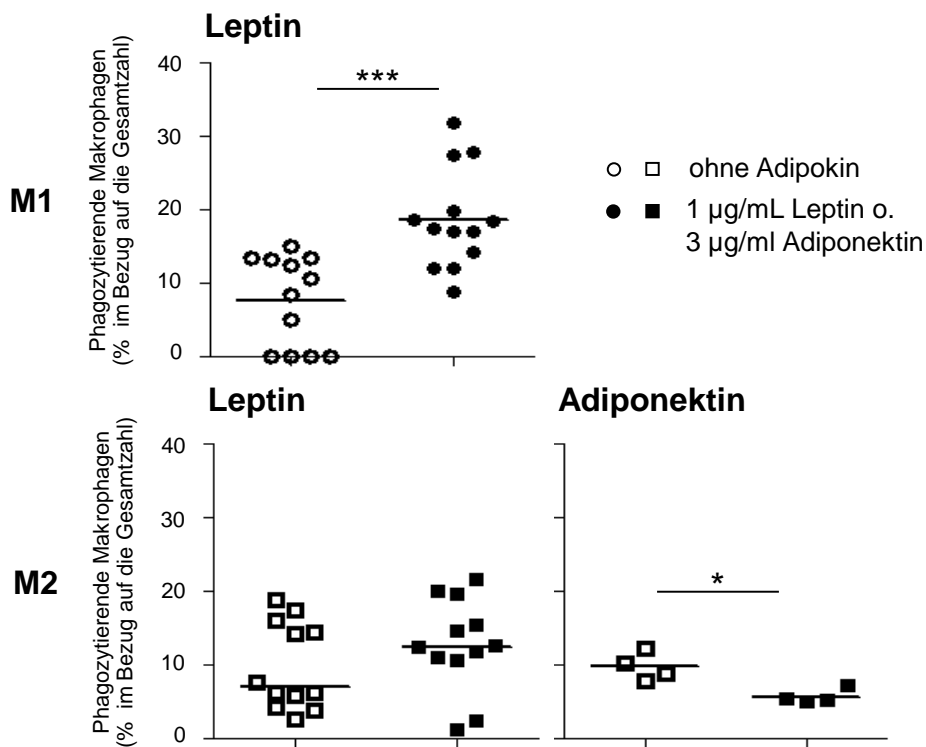


Abbildung 29: Einfluss von Leptin auf die Phagozytoseleistung

In-vitro-Phagozytose von M1- und M2-Makrophagen wurde mit BSA-opsonisierten Latexbeads (2 µm) untersucht. Die polarisierten Zellen wurden 24 h mit Leptin (1 µg/ml) oder Adiponektin (3 µg/ml) stimuliert und im Anschluss 90 min mit Latexpartikeln inkubiert. Die Phagozytoseleistung wurde durchflusszytometrisch gemessen. Der Anteil phagozytotisch aktiver Makrophagen an der Gesamtpopulation wurde aus der Differenz aufgenommener Partikel von Zellen, die bei 37 °C inkubiert worden waren, im Vergleich zu gleich vorbehandelten Zellen desselben Spenders bei 4 °C ermittelt. (A) zeigt repräsentative *Dotplots* der gesteigerten Phagozytose leptin-stimulierter M1-Makrophagen. Die roten Boxen umrahmen Zellen, welche mindestens ein fluoreszierendes Partikel internalisiert haben. Teil (B) zeigt die statistische Auswertung der Phagozytoseversuche, von n=4-13 unterschiedlichen Probanden. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

4.8 Wirkung von Adipokinen auf das Chemotaxispotenzial

4.8.1 Transmigrationsversuche

Im mesenterialen Fettgewebe von Patienten mit Morbus Crohn finden sich unterschiedliche Immunzellen. Neben den Makrophagen stellen T-Zellen eine weitere große Gruppe der infiltrierenden Zellen dar (Abbildung 30A). Es stellte sich die Frage, ob Makrophagen ursächlich an der Einwanderung anderer Immunzellen ins mesenteriale Fettgewebe beteiligt sein können. Insbesondere sollte untersucht werden, inwiefern Adipokine das chemotaktische Potenzial von Makrophagen gegenüber T-Zellen modulieren können.

Um dieser Frage nachzugehen, wurde die chemotaktische Wirkung von Zellkulturüberständen polarisierter, adipokinbehandelter Makrophagensubpopulationen auf die Migration von CD3⁺- und CD4⁺-T-Zellen untersucht. CXCL-12, ein Chemokin für T-Zellen, diente als Positiv-, Zellkulturmedium als Negativkontrolle.[115] Um sicher auszuschließen, dass nicht Leptin oder Adiponektin die T-Zellen-Migration beeinflussen, wurde leptin- bzw. adiponektin-versetztes Medium als weitere Kontrolle mitgeführt (Abbildung 30).

Weder das Zellkulturmedium noch die eingesetzten Adipokine allein lösten eine T-Zellen-Migration aus.

Die Zellkulturüberstände von M1- und M2-Makrophagen hingegen zogen die T-Zellen an und lösten damit eine deutliche Migration aus. Dabei unterschied sich das chemotaktische Potenzial von M1- und M2-Makrophagen, welche nicht mit Adipokinen behandelt worden waren, gegenüber CD3⁺-Zellen kaum.

Die Inkubation mit Leptin steigerte das chemotaktische Potenzial beider Subpopulationen signifikant. Zellkulturüberstände leptin-stimulierter M1-Makrophagen zogen im Mittel über ein Drittel mehr CD3⁺-Zellen an als solche adipokin-naiver M1-Makrophagen.

Die Wirkung von Leptin auf das chemotaktische Potenzial von M2-Makrophagen war noch stärker: Verglichen mit unbehandelten M2-Makrophagen verdoppelte sich hier die Anzahl migrierter T-Zellen.

Adiponektin hatte keine Wirkung auf das chemotaktische Potenzial von M1-Makrophagen. Die Chemotaxis von M2-Makrophagen hingegen wurde durch Adiponektin deutlich gesteigert. Adiponektin-behandelte M2-Makrophagen waren sogar noch effektiver darin, T-Zellen anzuziehen, als M2-Makrophagen, welche zuvor mit Leptin inkubiert worden waren.

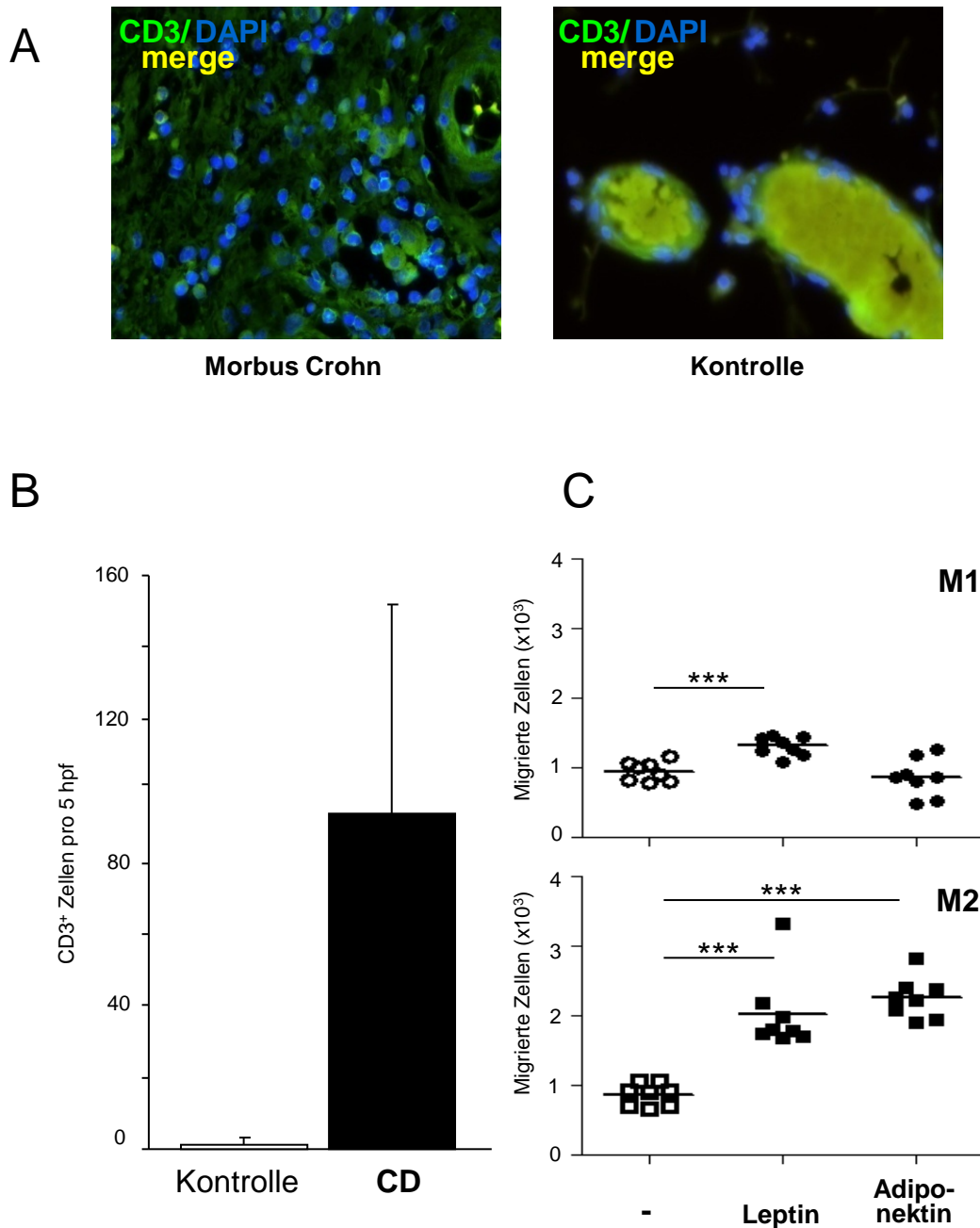


Abbildung 30: Migration von CD3[±]-Zellen, ausgelöst durch Makrophagenchemotaxis

Teil (A) zeigt repräsentative Immunfluoreszenz-Bilder von CD3⁺-Zellen (grün) im mesenterialen Fettgewebe von Morbus-Crohn-Patienten und gesunden Kontrollen in 400-facher Vergrößerung. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Positive Zellen wurden jeweils in 5 repräsentativen HPF ausgezählt. Abbildung (B) zeigt die grafische Auswertung, Mean ± SD von 5 unabhängigen Proben. (C) Das chemotaktische Potenzial von M1- und M2-Makrophagen mit und ohne Adipokinstimulation auf CD3⁺-Zellen wurden in einem *In-vitro-Transwell-Migration-Assay* untersucht. Dargestellt ist der Median von n=7-10 jeweils mit Doppelwerten verschiedener Probanden. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

Entsprechend dem Vorgehen bei der CD3-Migration wurden auch Migrationsversuche mit CD4⁺-Zellen durchgeführt (Abbildung 31).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der CD3⁺-Zellmigration hatte Leptin keinen Einfluss auf das chemotaktische Potenzial von M1-Makrophagen gegenüber CD4⁺-T-Zellen.

Bei M2-Makrophagen hingegen führte Leptin zu einer signifikant stärkeren chemotaktischen Wirkung gegenüber CD4⁺-T-Zellen. Adiponektin hatte keinen Einfluss auf das chemotaktische Potenzial beider Makrophagensubpopulationen gegenüber CD4⁺-T-Zellen.

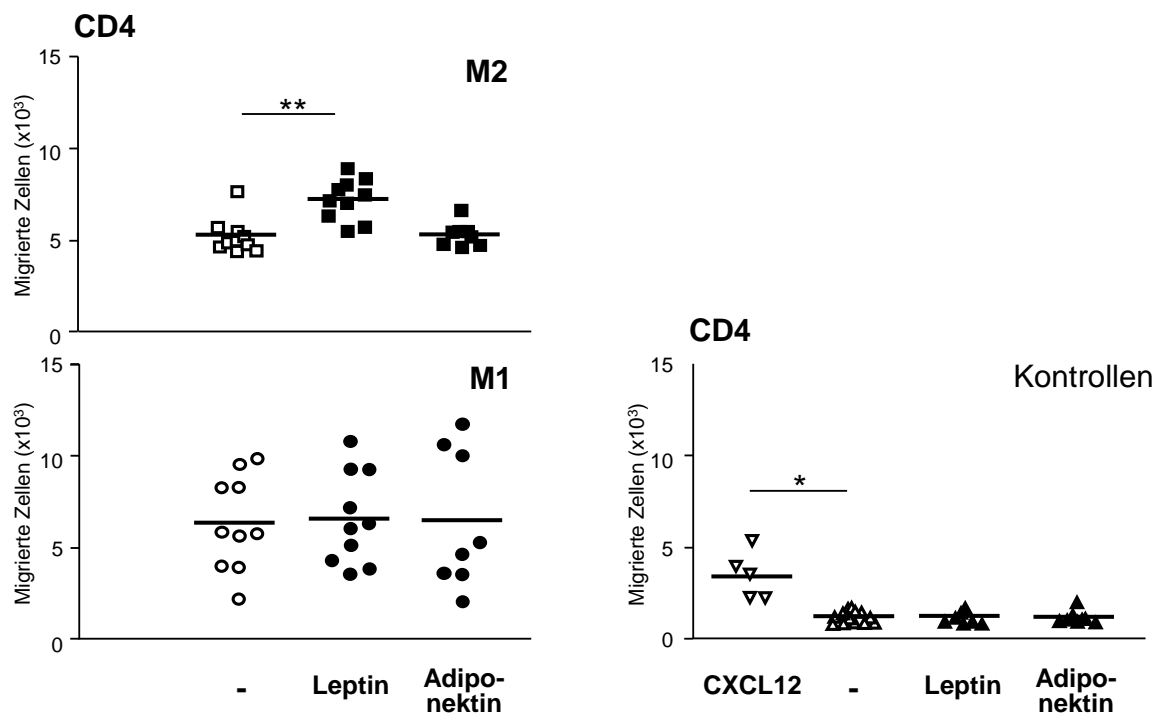


Abbildung 31: Migration von CD4[±]-Zellen, ausgelöst durch Makrophagenchemotaxis

Die chemotaktische Wirkung Zellkulturüberständen adipokin-stimulierter M1- und M2-Makrophagen auf CD4⁺-Zellen wurden *in vitro* im *Transwell Migration Assay* untersucht. CXCL-12 diente als Positivkontrolle, Zellkulturmedium und leptin- bzw. adiponektin-versetztes Medium als Negativkontrolle. Dargestellt ist die statistische Auswertung mit dem Median von n=7-10 verschiedenen Spendern jeweils mit Doppelwerten. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

4.9 Chemokinprofil von Makrophagensubpopulationen

Zellkulturüberstände von M1- und M2-Makrophagenkulturen beeinflussen die T-Zellmigration. Um die verantwortlichen Chemokine benennen zu können, wurden die Zellkulturüberstände durchflusszytometrisch untersucht und dabei die Konzentration von IL-8 (Abbildung 11), CCL-1, CCL-5, CXCL-9 und CXCL-10 gemessen (Abbildung 32).

Die Produktion der untersuchten Chemokine wurde bei M1-Makrophagen hoch signifikant durch LPS gesteigert ($p \leq 0,001$). Jedoch weder Leptin noch Adiponektin konnte die Sekretion von CCL-5, CXCL-9 und CXCL-10 beeinflussen. Die CCL-1-Produktion von M1-Makrophagen hingegen wird durch Adipokine stimuliert. Adiponektin erhöhte diese um mehr als das Doppelte, die Zugabe von Leptin zu den polarisierten Zellen steigerte deren CCL-1-Produktion sogar um mehr als das 5-Fache (Abbildung 32).

Beide getesteten Adipokine beeinflussten das Chemokinprofil von M2-Makrophagen wesentlich stärker als das der M1-Zellen. Insbesondere kam es zu einem starken Anstieg der CCL-1-Produktion. Dabei übertraf die Wirkung von Leptin sogar den stimulatorischen Effekt von LPS. Auch Adiponektin steigerte die Produktion signifikant auf fast 300 % des Basalwertes.

In einem weiteren Schritt wurde die Wirkung beider Adipokine auf die CCL-1-Produktion auch auf mRNA-Ebene nachvollzogen. Leptin führte zu einer signifikanten Steigerung der CCL-1-mRNA-Expression bei M1-Makrophagen ($\Delta\Delta CT = 8,75$; $*p < 0,05$) und bei M2-Makrophagen ($\Delta\Delta CT = 4,68$; $*p < 0,05$). Die Stimulation mit Adiponektin hingegen steigerte nur die CCL-1-mRNA-Expression bei M1-Makrophagen ($\Delta\Delta CT = 17,18$; $*p < 0,05$), M2-Makrophagen wurden kaum beeinflusst ($\Delta\Delta CT = 1,81$).

Die CCL-5-Konzentration im Zellkulturmedium war nach Inkubation von M2-Makrophagen mit Leptin etwa um den Faktor 5 gesteigert, durch die Stimulation der Zellen mit Adiponektin verdoppelte sich die CCL-5-Produktion der M2-Makrophagen. Beide Adipokine steigerten außerdem die CXCL-9- und CXCL-10-Produktion der M2-Makrophagen. Für Adiponektin konnte diesbezüglich nur ein deutlicher Trend ausgemacht werden, während die Leptinstimulation der Zellen zu einem signifikanten Anstieg der Chemokinsynthese führte.

Zusammengenommen unterstützen diese Ergebnisse die Daten des *In vitro Migration Assay* und der *In-situ*-Beobachtungen in Bezug auf das mesenteriale Fettgewebe von Patienten mit Morbus Crohn. Wie bereits bei der Zytokinexpression beobachtet, war die Wirkung von Adiponektin auf die Chemokinproduktion der Makrophagensubpopulationen, verglichen mit Leptin, schwächer ausgeprägt. Auch die Tatsache, dass M2-Makrophagen empfänglicher für eine Adiponektinstimulation zu sein scheinen, ließ sich auch für die Chemokinproduktion zeigen.

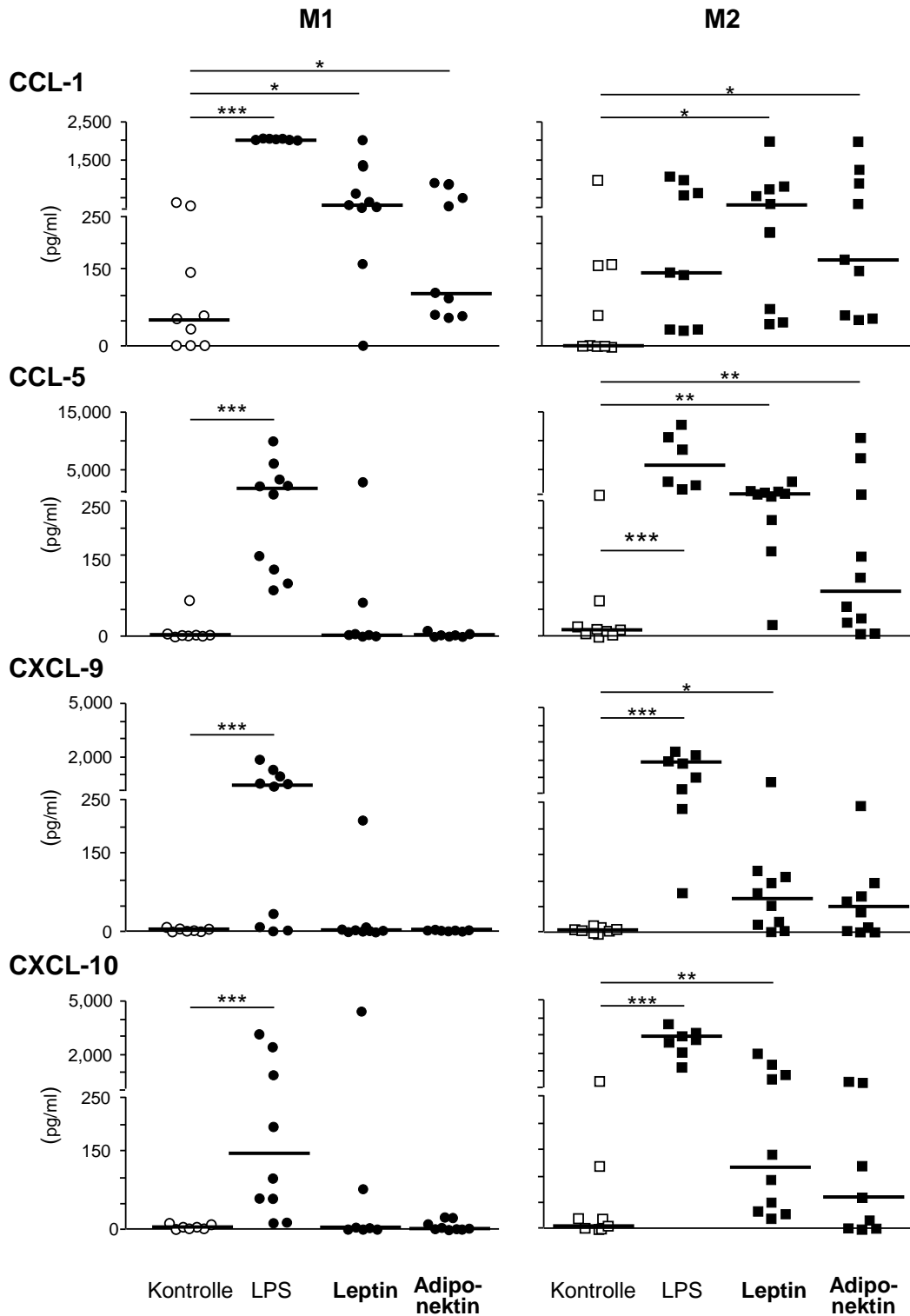


Abbildung 32: Chemokinproduktion von M1- und M2-Makrophagen

M1- und M2-Makrophagen wurden im Anschluss an die Polarisation 24 h mit LPS (100 ng/ml), Leptin (1 µg/ml) oder Adiponektin (3 µg/ml) inkubiert. Die Chemokin­konzentration wurde durchflusszytometrisch in Zellkultur­überständen bestimmt und mit Kontrollen der gleichen Spender ohne Zusätze verglichen. Dargestellt ist der Median der Zytokin­konzentration in pg/ml von n=9-10 Einzelkulturen unterschiedlicher Spender. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

4.10 Immunzellinfiltration im mesenterialen Fettgewebe

4.10.1 T-Zell-Subpopulationen im *Creeping Fat*

Um das zelluläre Kompartiment im mesenterialen Fettgewebe näher zu untersuchen und damit unter anderem auch Informationen über die biologische Relevanz der adipokinmodulierten Chemokinproduktion von Makrophagensubpopulationen *in situ* zu gewinnen, wurden die Zellen im mesenterialen Fettgewebe, welche keine Makrophagenmarker exprimierten, näher betrachtet. Hierfür wurden zunächst in Paraffinschnitte des mesenterialen Fettgewebes von Morbus-Crohn-Patienten und von gesunden Kontrollen CD3⁺- und CD4⁺-Zellen immunfluoreszenzoptisch detektiert, um einen groben Überblick über das T-Zell-Kompartiment zu erhalten. Zellkerne wurden mit einer DAPI-Färbung sichtbar gemacht (Abbildung 33).

Im mesenterialen Fettgewebe gesunder Kontrollen waren nahezu keine T-Zellen nachweisbar (der Mittelwert der CD3⁺-Zellen entsprach 1,25). Im Gegensatz dazu konnte im mesenterialen Fettgewebe von Patienten mit Morbus Crohn eine starke Infiltration durch CD3⁺-Zellen gezeigt werden. Im Mittel fanden sich hier 93,7 positive Zellen in den untersuchten Bereichen (Median=80,5) (Abbildung 34).

Interessanterweise waren unter diesen keine doppelt positiven CD3⁺/CD4⁺-T-Zellen zu finden. Obwohl in der angrenzenden Mukosa CD4⁺-T-Helferzellen vorhanden waren, fehlten diese im mesenterialen Fettgewebe fast vollkommen (Abbildung 33: Immunfluoreszenz: T-Zellen im mesenterialen Fettgewebe; Abbildung 33 und Abbildung 34).

Um dieses Ergebnis zu validieren, wurde eine immunhistochemische Färbung gegen CD4 durchgeführt. Dabei bestätigte sich, dass im mesenterialen Fettgewebe der Patienten mit Morbus Crohn so gut wie keine CD4⁺-T-Zellen zu finden waren. In der benachbarten Mukosa waren diese auch immunhistochemisch nachzuweisen (Abbildung 35).

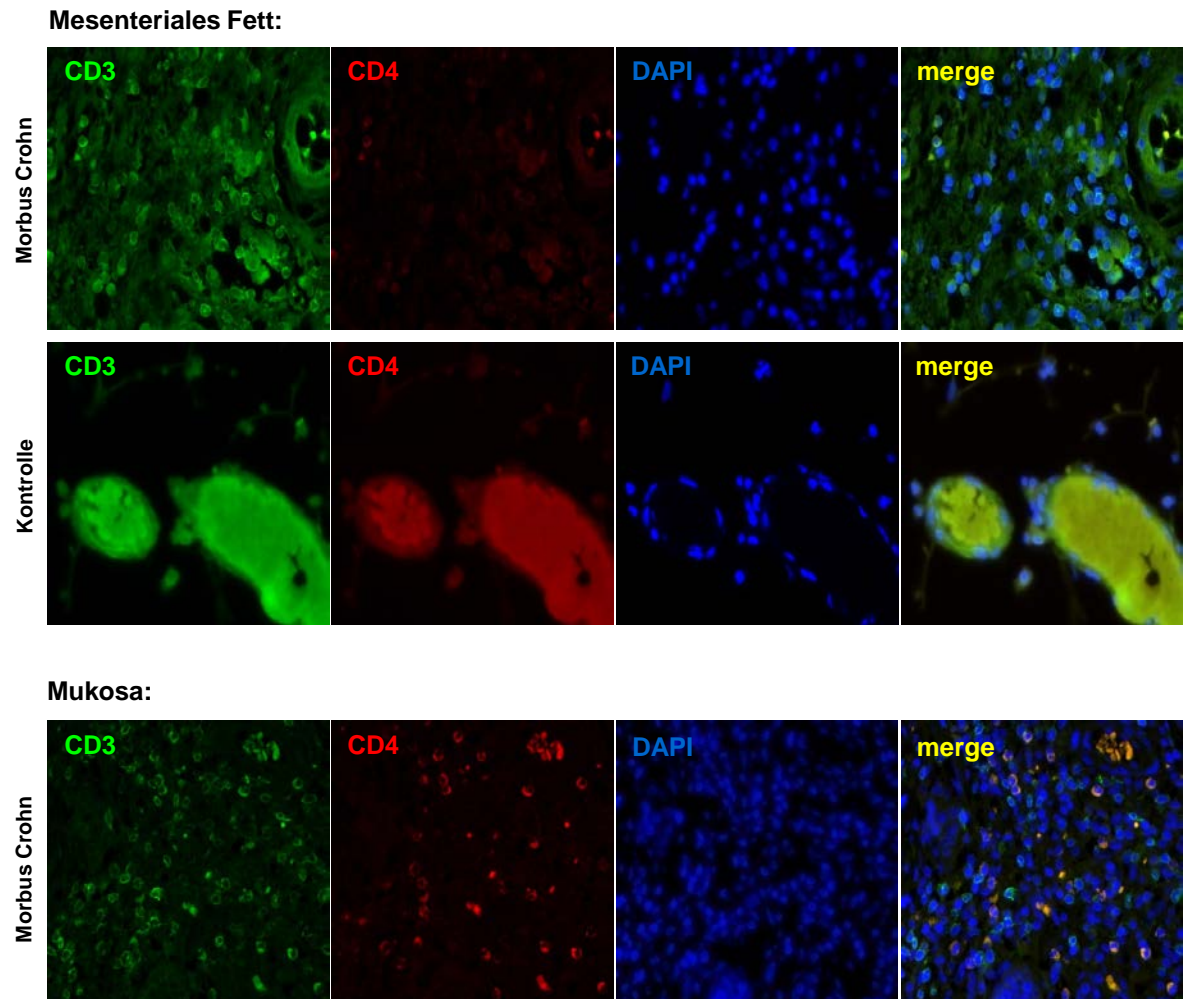


Abbildung 33: Immunfluoreszenz: T-Zellen im mesenterialen Fettgewebe

In Paraffin eingebettetes Probenmaterial des mesenterialen Fettgewebes von Patienten mit Morbus Crohn und gesunden Kontrollen mit nicht dysplastischen Neoplasien wurde mit Immunfluoreszenz auf die Anwesenheit CD3⁺- und CD4⁺-positiver T-Zellen untersucht. Dargestellt sind CD3⁺- (grün) und CD4⁺-Zellen (rot) im mesenterialen Fettgewebe (obere Zeilen) und der angrenzenden Mukosa (untere Zeile). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) sichtbar gemacht. Es handelt sich um repräsentative Immunfluoreszenzbilder in 400-facher Originalvergrößerung. Die statistische Auswertung findet sich in Abbildung 34.

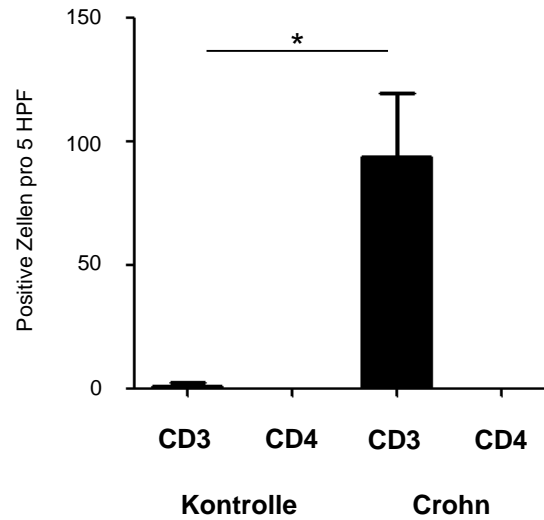


Abbildung 34: Grafische Auswertung der T-Zellen im mesenterialen Fettgewebe

Dargestellt ist die statistische Verteilung CD3⁺- und CD4⁺-Zellen im mesenterialen Fettgewebe bei Morbus Crohn im Vergleich zu gesunden Kontrollen mit nicht dysplastischen Neoplasien. Es wurden fluoreszierende Zellen in jeweils 5 repräsentative *high power fields* (HPF) eines Schnittes ausgewertet. Median von n=5-10 Schnitten unterschiedlicher Patienten. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

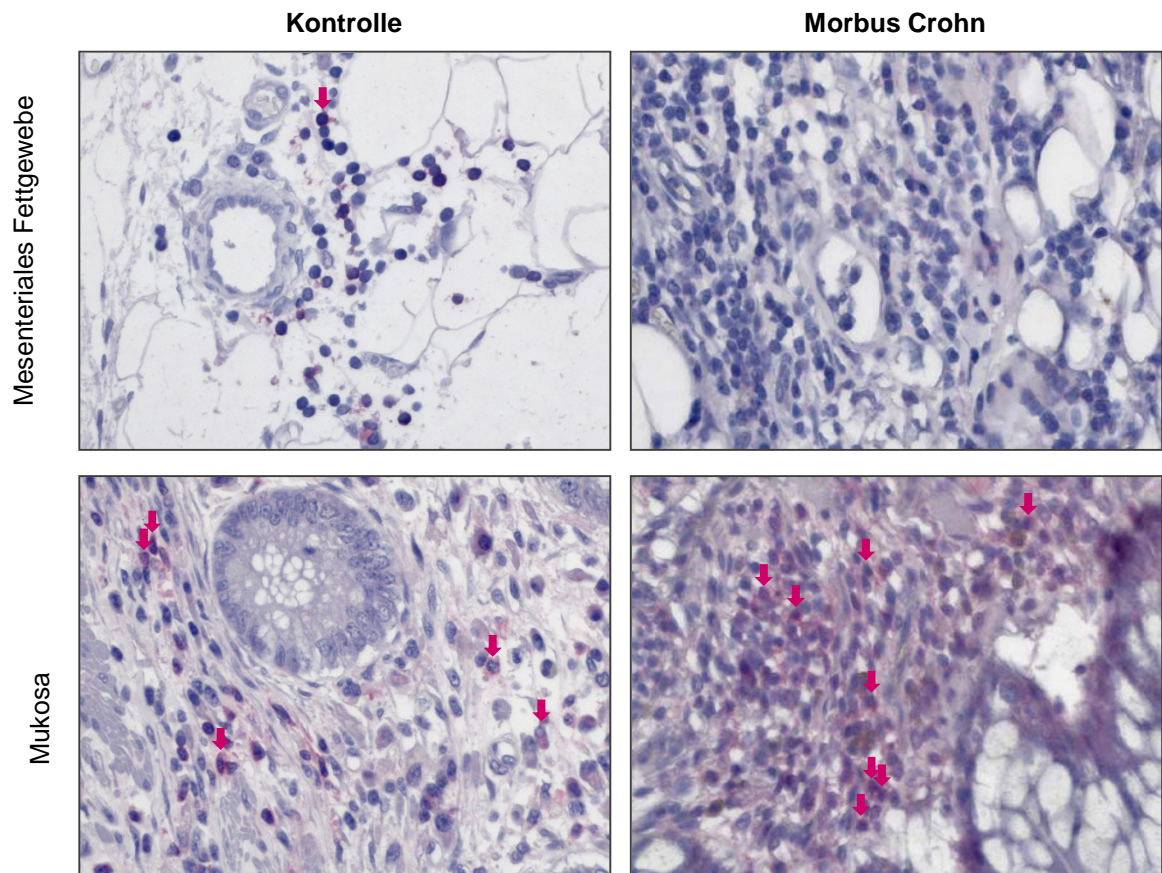


Abbildung 35: Immunhistologischer Nachweis von CD4⁺-Zellen

In Paraffin eingebettetes Probenmaterial des mesenterialen Fettgewebes (obere Zeile) sowie der angrenzenden Mukosa (untere Zeile) von Patienten mit Morbus Crohn und gesunden Kontrollen mit nicht dysplastischen Neoplasien wurde immunhistochemisch mit Anti-CD4-Antikörpern angefärbt. Die pinkfarbenen Pfeile markieren Beispiele positiver Zellen. Dargestellt sind repräsentative Bilder in 400-facher Originalvergrößerung.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass im Fettgewebe von Patienten mit Morbus Crohn signifikant mehr CD3⁺-T-Zellen zu finden sind als bei gesunden Kontrollen. Die anwesenden Zellen im Fett sind dabei nahezu ausschließlich CD4⁺.

Charakterisierung der CD4⁺-T-Zellen im mesenterialen Fettgewebe

Nachdem die T-Zell-Infiltration der untersuchten Proben von Morbus-Crohn-Patienten fast ausschließlich aus CD4⁺-Zellen bestand, wurden die entsprechenden Präparate als Nächstes auf die Anwesenheit von NKT- und CD8⁺-zytotoxische T-Zellen untersucht.

NKT-Zellen wurden über ihren Oberflächenmarker CD57 detektiert. Ausgewählte Präparate von Patienten mit Morbus Crohn wurden auf die Anwesenheit von CD8⁺-Zellen im mesenterialen Fettgewebe und in der Mukosa untersucht und mit gesunden Kontrollen verglichen. Zu diesem Zweck wurde eine Doppelfärbung CD8/FoxP3 durchgeführt (Abbildung 36).

Es zeigte sich, dass im mesenterialen Fettgewebe von Patienten mit Morbus Crohn signifikant mehr CD57⁺-NKT-Zellen vorzufinden sind als bei gesunden Kontrollen. Die Größenordnung dieser Zellpopulation stellte jedoch im Mittel nur etwa ein Siebtel der CD3⁺-Zellen dar (Mittelwert der CD3⁺: $93,7 \pm 63,5$ zu CD57⁺: $13,5 \pm 10,1$ positive Zellen/5 HPF; n=4-11).

A CD57

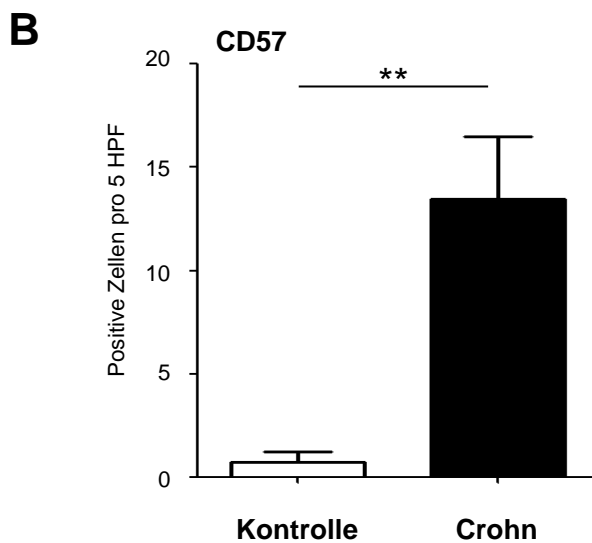
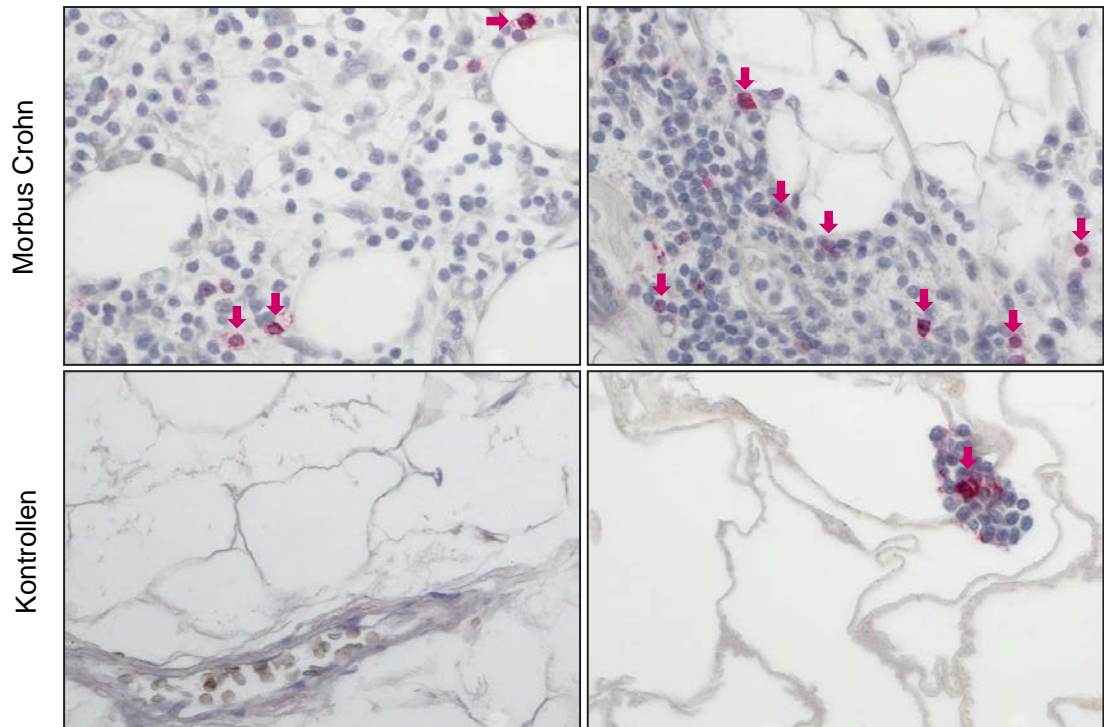


Abbildung 36: NKT-Zellen im mesenterialen Fettgewebe

Repräsentative Bilder einer immunhistochemischen Färbung gegen CD57⁺-NKT-Zellen im mesenterialen Fettgewebe von Patienten mit Morbus Crohn und gesunden Kontrollen mit nicht dysplastischen Neoplasien in 400-facher Originalvergrößerung. (A) Einige positive Zellen (rot) wurden beispielhaft mit pinken Pfeilen markiert. In (B) ist die statistische Auswertung der Auszählung von repräsentativen 5 HPF gezeigt. Dargestellt ist der Median von n=4-11 Einzelproben unterschiedlicher Patienten. **p<0,01

Des Weiteren erfolgte eine Doppelfärbung gegen FoxP3⁺- und CD8⁺-T-Zellen. Als Kontrolle wurde erneut die benachbarte Mukosa hinzugezogen (Abbildung 37).

FoxP3⁺-T-Zellen konnten ausschließlich in der Mukosa, nicht aber im mesenterialen Fettgewebe von Patienten mit Morbus Crohn gefunden werden. Dieses Ergebnis wurde in der Immunfluoreszenz bestätigt.

CD8⁺-Zellen waren sowohl in der Mukosa als auch im mesenterialen Fettgewebe präsent. In beiden Kompartimenten waren jeweils bei Patienten mit Morbus Crohn mehr positive Zellen nachweisbar als bei gesunden Kontrollen. Die Infiltration des mesenterialen Fettgewebes durch CD8⁺-T-Zellen war dabei deutlich stärker als die durch CD57⁺-NKT-Zellen.

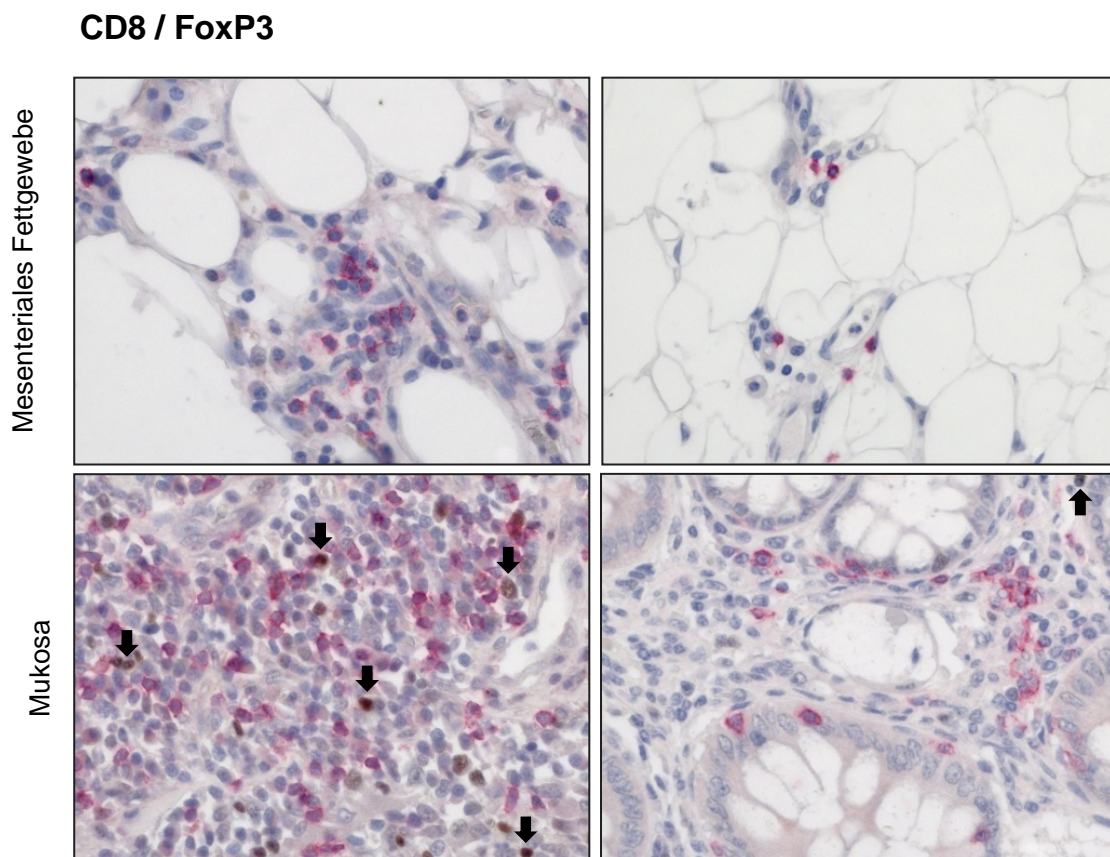


Abbildung 37: CD8⁺- und FoxP3⁺-Zellen im mesenterialen Fettgewebe

Repräsentative Bilder von CD8⁺- (rot) und FoxP3⁺-Zellen (braun) im mesenterialen Fettgewebe und der Mukosa von Morbus-Crohn-Patienten und gesunden Kontrollen mit nicht dysplastischen Neoplasien. Die Bilder stammen jeweils vom selben Patienten; es handelt sich um eine 400-fache Originalvergrößerung. Beispielhaft wurden einige FoxP3⁺-Zellen durch Pfeile markiert.

5 Diskussion

Die Hypertrophie des mesenterialen Fettgewebes im Bereich der entzündeten Darmabschnitte wurde bereits zu Beginn des letzten Jahrhunderts als Hyperplasie der Fettzellen erkannt und als charakteristisch für den Morbus Crohn beschrieben.[4, 6] Dieses *Creeping Fat* ist räumlich mit entzündeten Darmsegmenten assoziiert und korreliert mit dem Auftreten von Ulzerationen, Strikturen und Wandverdickungen. Damit besteht eine Verbindung zwischen der typischen Ausprägung des Fettgewebes und lokaler Entzündungsaktivität.[5]

Hinsichtlich seiner morphologischen Beschaffenheit zeichnet sich das *Creeping Fat* gegenüber dem mesenterialen Fettgewebe gesunder Individuen durch einige Besonderheiten aus: Die Adipozyten im hypertrophierten Bereich sind besonders klein, ihre Zahl hingegen ist etwa 4-mal so hoch wie in gesundem Vergleichsgewebe.[5, 116, 117] Es werden vermehrt pro-inflammatorische Moleküle exprimiert, gleichzeitig sind jedoch auch anti-inflammatorische Mediatoren im Fettgewebe hochreguliert.[117-119] Außerdem ist das zelluläre Kompartiment des *Creeping Fat* durch eine starke Infiltration von Immunzellen, insbesondere von Makrophagen gekennzeichnet. Charakteristischerweise sind die lokalen Adipokinkonzentrationen im *Creeping Fat* signifikant erhöht.[7, 8]

***Creeping Fat* – Freund oder Feind?**

Die Bedeutung des *Creeping Fat* für die Pathogenese und die Aktivität der Erkrankung Morbus Crohn ist umstritten.[117-120] Während die Veränderungen des Fettgewebes noch vor einigen Jahren vornehmlich als reaktives Phänomen auf die lokale Entzündung betrachtet wurden [5, 121], weisen neue Daten auf eine aktive Rolle des Fettgewebes im Rahmen der chronischen Entzündung hin. Bisher konnte jedoch über die Art der Aktivität und ihre Bedeutung für die Pathogenese der Entzündung noch keine endgültige Klarheit erlangt werden.

Einige Autoren vertreten den Standpunkt, dass durch bakterielle Einwanderung ins Fettgewebe zunächst eine lokalisierte asymptotische Entzündung entsteht, welche eine Art Erregerreservoir darstellt. Über dieses könnten Bakterien und mit ihnen die Entzündung retrograd über die Lymphwege auf die Mukosa übergreifen.[122-125] Ein genetischer Defekt mit Beteiligung der angeborenen Immunabwehr könnte dabei prädisponierend sein.[126, 127] Dieses stellt eine mögliche Erklärung für die longitudinalen Ulzerationen an den Übergängen zum mesenterialen Fettgewebe dar.[4, 116]

Das hyperplastische Fettgewebe könnte außerdem, unabhängig von seinem pathogenetischen Ursprung, durch die starke Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF α ,

IL-6 und Leptin zum Erhalt der intestinalen Entzündung beitragen oder diese verstärken.[46, 128, 129]

Auf der anderen Seite mehren sich die Hinweise auf eine mögliche protektive Bedeutung des *Creeping Fat*. Beispielsweise vermitteln peroxisom-proliferator-aktivierte Rezeptoren- γ , deren Überexpression von signifikanter Bedeutung für die Entstehung der Hyperplasie des mesenterialen Fettgewebes zu sein scheinen, wesentliche anti-inflammatorische Wirkungen.[128, 130] Das Fettgewebe könnte sich im Verlauf der Erkrankung also auch verändern, um die Dissemination einwandernder Bakterien durch zelluläre Mechanismen wie Phagozytose von Präadipozyten selbst zu kontrollieren und so entzündliche Reaktionen zu begrenzen.[122] Der Nachweis hochregulierter anti-inflammatorischer Moleküle im Fettgewebe, besonders in Bereichen, die direkt an die entzündete Mukosa angrenzen, bestärkt diese These.[117]

Kleine Adipozyten, die typisch für das hyperplastische mesenteriale Fett bei Morbus Crohn sind, produzieren weniger pro-inflammatorische Moleküle als durchschnittlich große Zellen.[131] Hinzu kommt, dass Adipozyten aus entzündungsnahen Bereichen eine erhöhte Toleranz gegenüber TLR-Liganden aufweisen.[132, 133] Beides könnte zur lokalen Kontrolle der mukosalen Entzündung beitragen.[122]

Dass es sich beim *Creeping Fat* nicht nur um ein rein lokales Phänomen handelt und seine Bedeutung über eine reaktive Reaktion hinausgeht, dafür sprechen unter anderen neuen Daten von Zulian *et al.* Diese zeigen, dass die bakterielle Stimulation von Präadipozyten und Adipozyten im mesenterialen Fettgewebe von Patienten mit Morbus Crohn zu einer gesteigerten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine führt. Insbesondere konnte in der Arbeit das mesenteriale Fettgewebe neben der Leber als ein zweiter bedeutender Ursprungsort des CRP identifiziert werden. In diesem Rahmen kann die durch bakterielle Translokation getriggerte Synthese von CRP und pro-inflammatorischen Zytokinen als ein Mechanismus betrachtet werden, welcher die chronische Entzündung im Darm unterhält.[117]

Einen anderen Blickwinkel eröffnen die Daten von Peyrin-Biroulet *et al.*, die neben pro-inflammatorischen auch anti-inflammatorische Moleküle wie CD163 und IL-1-RA im mesenterialen Fettgewebe hochreguliert fanden. Dies und die Tatsache, dass die besonders kleinen Adipozyten im *Creeping Fat* nicht nur weniger pro-inflammatorische Zytokine produzieren als normal große Fettzellen, sondern auch selbst mehr anti-inflammatorische Moleküle exprimieren, lassen die Autoren annehmen, dass dem *Creeping Fat* eine protektive Bedeutung zukommt.[119]

Gestützt wird diese These außerdem durch die Fähigkeit von Präadipozyten, als Phagozyten zu wirken; damit könnten sie einwandernde Bakterien vor Ort bekämpfen.[15] Bakterien und bakterielle Antigene regen bei Präadipozyten und Adipozyten zusätzlich die Produktion chemotaktisch wirkender Moleküle (z.B. MCP-1) an. Diese wiederum können Immunzellen in das Fettgewebe locken, die eine erfolgreiche Erregerabwehr unterstützen.[134] Tatsächlich findet man im *Creeping Fat* eine auffallend starke Infiltration durch Immunzellen, insbesondere durch Makrophagen.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob und inwiefern lokal hohe Adipokin-konzentrationen im *Creeping Fat* [7, 8] die Makrophagen im Fettgewebe tatsächlich sub-typspezifisch beeinflussen. Zunächst wurde hierfür die Wirkung von Adipokinen auf den Phänotyp und die Funktionalität von humanen Makrophagen gesunder Probanden *in vitro* evaluiert. Mit dem Fokus auf Morbus Crohn wurden die Makrophagensubpopulationen im mesenterialen Fettgewebe *in situ* charakterisiert und hinsichtlich ihres Potenzials, direkt auf die adipokinreiche Umgebung reagieren zu können, untersucht. Auf dieser Grundlage sollen neue Erkenntnisse über die Funktion des mesenterialen Fettgewebes in der chronischen Entzündung beigetragen werden.

Adipokine modulieren den Phänotyp von Makrophagensubpopulationen

Im Organismus sind Makrophagendifferenzierung und -polarisation direkt von der Umgebung der Zellen abhängig.[90] Entsprechend des Organs oder Gewebes, in welches die Zellen einwandern, differenzieren sich Monozyten/Makrophagen sowohl phänotypisch als auch funktionell. Das plastische Genexpressionsprofil der Zellen wird dabei durch Intensität und Wirkungsdauer lokaler Faktoren beeinflusst.[90, 135] Chemokine, Zytokine, apoptotische Zellen, Zelldebris und Zell-Zell-Interaktion, z. B. mit verschiedenen T-Zellsubtypen, aber auch autokrine und parakrine Mechanismen spielen für die Differenzierung und Polarisation der Makrophagen eine entscheidende Rolle.[136]

Demzufolge ist davon auszugehen, dass Makrophagen, die das *Creeping Fat* infiltrieren, von den dort herrschenden, einzigartigen Bedingungen beeinflusst werden. Insbesondere können die außergewöhnlich hohen lokalen Konzentrationen von Leptin und Adiponektin einen Einfluss auf die Zellen ausüben, da für diese ein immunmodulatorischer Effekt auf Makrophagen beschrieben ist.[7, 8, 22, 29, 39, 137]

Makrophagen exprimieren die biologisch aktive Form des Leptinrezeptors.[22, 33, 138] Verglichen mit anderen Leukozyten tragen mononukleäre Phagozyten die höchste Dichte an Leptinrezeptoren. Dies könnte ein Hinweis auf ihre besondere Sensitivität gegenüber

dem Liganden Leptin sein.[34, 41] Adiponektin vermittelt seine Wirkung über die ubiquitär exprimierten Rezeptoren AdiR1 und AdiR2 und kann auf diesem Weg auch die inflammatorische Aktivität von Monozyten und Makrophagen beeinflussen.[61, 64, 65, 139, 140]

Die Wirkung von Leptin und Adiponektin auf Monozyten und Makrophagen im Tiermodell und beim Menschen war und ist Gegenstand unterschiedlicher Untersuchungen. In der hier vorgelegten Arbeit wurde erstmals der Effekt von Leptin und von Adiponektin, das als rekombinantes Gesamtmolekül eingesetzt wurde, auf funktionelle Aspekte humaner M1- und M2-Makrophagen in Bezug auf ihre potenzielle Wirkung im hyperplastischen mesenterialen Fettgewebe bei chronischer Entzündung genauer definiert. Dabei wurden insbesondere Moleküle, die für die Zell-Zell-Interaktion im Entzündungsgeschehen von Bedeutung sind, betrachtet.

Leptin steigert konzentrationsabhängig die Expression des für die Antigenpräsentation notwendigen HLA-DR sowie als weitere Marker der Aktivierung die α -Kette des hochaffinen IL-2-Rezeptors CD25, das mit der Zelladhäsion assoziierte Ektoenzym CD38 und den Transferrinrezeptor-1 CD71, auf zirkulierenden humanen CD68⁺-Makrophagen.[39] Der stärkste Effekt wurde dabei mit 100 nM Leptin erzielt, aber bereits eine 1000-fach geringere Konzentration führte zu einer signifikanten Steigerung der Expression der genannten Oberflächenmoleküle.[39] In der vorliegenden Arbeit wurde Leptin in einer Konzentration von 62,5 nM (1 μ g/ml) eingesetzt.

Zunächst wurde der Effekt von Leptin auf die Expression von HLA-DR in Kombination mit dem kostimulatorischen Molekül CD80 auf humanen Makrophagensubpopulationen untersucht, die *in vitro* aus CD14⁺-Monozyten generiert worden waren. Unter diesen Bedingungen veränderte Leptin die HLA-DR-Expression weder auf M1- noch auf M2-Makrophagen. Es steigert jedoch die CD80-Expression von M2-Makrophagen. Über diese Expressionsänderung könnte Leptin die Aktivierung von T-Zellen durch M2-Makrophagen verbessern.

Neben dem direkten Effekt auf Makrophagen moduliert Leptin auch die LPS-Wirkung auf diese Zellen.[39] Leptin potenziert die LPS-induzierte Expressionssteigerung von CD80 beider Subpopulationen. Die durch LPS hervorgerufene Expressionssteigerung des TLR-Rezeptors-4 (CD14) auf M1- und M2-Makrophagen wird durch die gleichzeitige Anwesenheit von Leptin dagegen gehemmt. Durch diese Art der Rezeptormodulation könnte Leptin die T-Zellaktivierung positiv beeinflussen, eine weitere Stimulation der Makrophagen durch bakterielles Antigen jedoch vermindern.

Es ist bekannt, dass Leptin selbst überwiegend pro-inflammatorisch wirkt und unter anderem die Synthese von IL-6, IL-1, IL-12 und TNF α bei Makrophagen fördert. [29, 39, 40, 137, 138] Die vorliegenden Daten zeigen, dass sich dabei die Zytokinantwort von M1- und

M2-Makrophagen auf eine Leptinstimulation deutlich unterscheidet. Während sich die Produktion der untersuchten Zytokine durch M1-Makrophagen maximal verdreifachte – mit Ausnahme von IL-6 und IL-8, welche sogar um etwa eine Zehnerpotenz gesteigert wurde – reagierten M2-Zellen im Vergleich sehr viel sensitiver auf die Leptinstimulation. Insbesondere die TNF α -Synthese dieses Subtyps war nach Stimulation mit Leptin im Mittel um mehr als das 150-Fache erhöht. Und auch die Produktion von IL-6 war mehr als dreifach stärker als die von gleichbehandelten M1-Makrophagen. Ein deutlicher Unterschied zeigte sich überdies in der Synthese des anti-inflammatorischen IL-10. Während M1-Makrophagen nach Leptinstimulation im Mittel ihre IL-10-Produktion verdoppelten, waren die gemessenen Konzentrationen in M2-Kulturen nach Inkubation mit Leptin mehr als verzehnfacht.

Bereits das lichtmikroskopische Bild der Zellenkulturen suggerierte durch die dosisabhängige Zunahme spindelförmiger Zellen eine leptin-induzierte Veränderung des Subtyps Richtung M2-Zelle bereits während der Polarisation. Neue Daten untermauern diese einfache Beobachtung. Humane Monozyten, die nur in Gegenwart von Leptin polarisiert wurden, exprimierten M2-typische Oberflächenmarker, sind jedoch in der Lage, TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-1ra, IL-10, MCP-1 und MIP-1 α zu produzieren, sodass sie weitestgehend dem Phänotyp der Fettgewebismakrophagen entsprechen.[141]

Auch Adiponektin hat anti-inflammatorische, immunmodulatorische Eigenschaften. Daten dazu stammen von murinen und porkinen, aber auch von humanen Makrophagen. Unter anderem supprimiert rekombinantes Adiponektin *in vitro* die LPS-induzierte TNF α - und IL-6-Synthese porkiner Makrophagen und forciert gleichzeitig die IL-10-Produktion der Zellen.[64] Peritonealmakrophagen aus Adiponektin-Knock-out-Mäusen zeigen eine deutlich verminderte Expression von M2-Makrophagenmarkern, welche durch die Zugabe von Adiponektin teilweise wieder rekonstituiert werden kann.[140] Auch beim Menschen scheint Adiponektin die Entwicklung von M2-Makrophagen zu unterstützen und M2-typische Funktionen zu fördern. Durch Adiponektin wird die Expression des Mannose-Rezeptors auf humanen Makrophagen hochreguliert. Auch andere M2-typische Rezeptormoleküle, wie der *Scavenger*-Rezeptor CD163, werden nach Adiponektinstimulation vermehrt exprimiert.[140, 142] Des Weiteren fördert es die IL-10-Synthese und hemmt die TLR-vermittelte NF κ B-Aktivität humaner Makrophagen.[54, 62, 68, 140]

Die Wirkung von Adiponektin auf Makrophagen und Monozyten scheint stärker von den lokalen Bedingungen und der Konzentration abhängig zu sein als die von Leptin. Eine Hemmung der Oberflächenexpression des für die Aufnahme von Hämoglobin und Haptoglobin sowie im Lipidstoffwechsel wichtigen *Scavenger*-Rezeptors CD163 wurde bei humanen Monozyten und Makrophagen in Gegenwart von 10 bis 15 μ g/ml Adiponektin *in vitro* beobachtet. Konzentrationen unterhalb dieses Bereiches veränderten die Expression we-

der auf Protein noch auf mRNA-Ebene.[111, 143, 144] Die 2- bis 3-fache Konzentration an rekombinantem Adiponektin (30 µg/ml) steigert hingegen nicht nur die Expression von CD163, sondern auch des Mannose-Rezeptors und von IL-10 auf mRNA-Ebene.[142]

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte, niedrige Adiponektinkonzentration (3 mg/ml) veränderte die CD163-Expression *in vitro* polarisierter M1- oder M2-Makrophagen nicht. Konzentrationen in diesem Bereich scheinen somit weder bei unpolarisierten Makrophagen noch bei polarisierten M1- und M2-Zellen die CD163-Expression zu beeinflussen. Interessanterweise wird jedoch die mRNA-Expression des Mannose-Rezeptors, welcher ebenfalls zu den *Pattern-Recognition*-Rezeptoren zählt und eine wichtige Bedeutung für die Abwehr pathogener Erreger durch M2-Makrophagen hat, durch diese geringe Konzentration von Adiponektin signifikant gesteigert.[143]

Während Leptin überwiegend als pro-inflammatorisches Zytokin beschrieben ist, galt Adiponektin zunächst als eher anti-inflammatorischer Mediator, der die Zytokinproduktion von Makrophagen hemmt.[145] Diese Trennung konnte, bezogen auf humane Makrophagen, in dieser Schärfe nicht aufrechterhalten werden, da auch Adiponektin pro-inflammatorische Zytokine wie TNF α , IL-6 und IL-10 hochregulieren kann. Dies wurde auf mRNA- und Proteinebene sowohl für gAd als auch für das ganze Molekül gezeigt.[146-148] Dabei führte insbesondere gAd zunächst zu einer pro-inflammatorischen Aktivierung der Zellen, anschließend waren diese resistent gegenüber weiterer Stimulation.[65, 148] Zusätzlich wurde über eine gesteigerte Synthese von IL-10, wahrscheinlich auf autokrinem oder parakrinem Wege, die TNF α - und IL-6-Produktion der aktivierten Zellen wieder inhibiert.[62, 64, 148]

Die eigenen Versuche mit *in vitro* polarisierten humanen Makrophagen zeigten, dass beide Adipokine die Zytokinsynthese der Makrophagen beeinflussen. Dabei unterschieden sich Leptin und Adiponektin weniger in der Qualität als in der Stärke der Wirkung mit signifikanten Unterschieden in der Reaktion der beiden Subpopulationen.

Adiponektin fördert nicht nur die Entstehung eines anti-inflammatorischen Subtyps. Die vorliegenden Daten zeigen erstmals, dass der alternativ aktivierte, eher anti-inflammatorische M2-Makrophagensubtyp deutlich sensitiver auf eine Stimulation mit Adiponektin reagiert als klassisch aktivierte M1-Zellen. Auch im Anschluss an die Polarisation steigert Adiponektin bei M2-Makrophagen die Produktion von IL-10 signifikant. Die Synthese der pro-inflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-6 wird durch Adiponektin ebenfalls signifikant verstärkt.

Adiponektin zeigte in den durchgeführten Versuchen eine geringere Wirkstärke als Leptin. Eine Ausnahme stellten hierbei die IL-6- und IL-10-Synthese von M2-Makrophagen dar, welche nach Adiponektinstimulation stärker zunimmt als nach Inkubation mit Leptin.

In der eingesetzten Konzentration von 3 µg/ml moduliert Adiponektin die LPS-induzierte Zytokinexpression von M1- und M2-Makrophagen nicht. Dies könnte der geringen Konzentration geschuldet sein. Suppressierende Effekte von Adiponektin wurden erst für 5- bis 10-fach höhere Adipokinkonzentrationen beschrieben.[65, 148] Außerdem konnte der Zeitpunkt der Applikation von entscheidender Bedeutung sein. Makrophagen, die mindestens 24 h vor LPS-Stimulation mit Adiponektin vorbehandelt wurden, zeigten eine verminderte Zytokinproduktion. In der hier gewählten Versuchsdurchführung erfolgte die Applikation von Adipokinen und LPS zeitgleich. Dies unterstützt die These, dass eine kurzfristige Einwirkung von Adiponektin einen pro-inflammatorischen Effekt haben kann, während das anti-inflammatorische Potenzial dieses Adipokins vor allem bei langfristiger Einwirkung zum Tragen kommt.[65, 148]

Die Untersuchungen an Makrophagensubpopulationen zeigen, dass Leptin und Adiponektin generell die Syntheseleistung von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen bei M1- und M2-Makrophagen fördern. M2-Makrophagen reagieren dabei sensibler auf Adipokinstimulation. Speziell Adiponektin vermag einen stärkeren Effekt auf diesen Subtyp auszuüben.

Adipokine beeinflussen die Funktionalität von M1- und M2-Makrophagen

Von der immunmodulatorischen Wirkung von Adipokinen auf Makrophagensubpopulationen *in vitro* ausgehend, war der Einfluss von Adipokinen auf die Interaktion von Makrophagen mit anderen Zellarten des mesenterialen Fettgewebes von besonderem Interesse. Dabei stellte sich die Frage, inwieweit Adipokine auch das chemotaktische Potenzial von Makrophagensubpopulationen und damit deren Fähigkeit, andere Immunzellen in das entzündungsnahe Fettgewebe zu rekrutieren, beeinflussen.

Nicht nur rezeptorvermittelte, kontaktabhängige Mechanismen, sondern auch von Zellen sezernierte lösliche Faktoren sind für eine Chemotaxis notwendig.[81, 90, 149]

Um Letzteres für Makrophagensubpopulationen funktionell zu zeigen, wurden Kulturüberstände humaner M1- und M2-Makrophagen in *In-vitro*-Transmigrationversuchen mit T-Zellen eingesetzt.

Die eingesetzten Kulturüberstände steigerten unabhängig vom Makrophagensubtyp die CD3⁺-T-Zellmigration. Leptin konnte das chemotaktische Potenzial von M1-Makrophagen

um etwa 50 % steigern. In Transmigrationsversuchen mit aufgereinigten CD4⁺-T-Zellen, ließ sich dieser Effekt nicht nachweisen. Adiponektin beeinflusste das chemotaktische Potenzial der M1-Zellen nicht.

Beide Adipokine steigerten die chemotaktische Effizienz von M2-Makrophagen gegenüber T-Zellen signifikant. Insbesondere durch adiponektin-behandelter M2-Makrophagen konnten die Zahl migrierender CD3⁺-Zellen verdoppelt werden. Dabei scheint Adiponektin vornehmlich die Makrophagenchemotaxis gegenüber CD4⁺-T-Zellen zu beeinflussen, eine vermehrte Migration von CD4⁺-Zellen war unter gleichen Bedingungen nicht nachweisbar. Im Kontext der erhöhten Adipokinspiegel im *Creeping Fat* betrachtet [7, 8], ist erneut hervorzuheben, dass sich M2-Makrophagen auch in diesem Bereich als sensibler für eine Adipokinstimulation erwiesen als M1-Zellen.

Chemokine spielen eine zentrale Rolle in der Rekrutierung von T-Zellen.[149] Typische homöostatische Chemokine wie CCL-18, CCL-22, CXCL-13 und ihre Rezeptoren CCR-4 und CXCR-5 werden in der Entzündung durch induzierbare Chemokine wie CCL-5, CXCL-9 und CXCL-10 abgelöst.[81] Wie auch für Zytokine gibt es also Muster, die eine Homöostase im Unterschied zu entzündlichen Geschehen definieren, zu dem Makrophagen beitragen.[81] Makrophagen werden dabei durch exogene Faktoren, wie z.B. Adipokine, beeinflusst.

Leptin steigert die Expression von CCL-3/MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein* (MIP)), CCL4/MIP-1 β und CCL5/RANTES bei murinen Makrophagen *in vitro*. [150] Diese Chemokine der CC-Familie interagieren mit CCR-5, welches unter anderem auf T-Lymphozyten, aber auch von Makrophagen und Mikroglia exprimiert wird. CCL-5 aktiviert zusätzlich NK-Zellen und fördert ihre Proliferation.[151] Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass CCL-5 Makrophagen ins Fettgewebe zieht und dort eine anti-apoptotische Wirkung auf residente Zellen ausübt.[152] In Experimenten mit humanen PBMC steigerte Leptin die CXCL-10-Synthese der Zellen, ihre CCL-5-Produktion veränderte sich hingegen nicht.[153]

Im Gegensatz zu Leptin steigert Adiponektin in humanen Monozyten die CCL-2- und CCL-5-Produktion humaner Monozyten, während die Expression der Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR5 supprimiert wird.[153, 154]

Der Einfluss dieser beiden Adipokine auf das Chemokinprofil von M1- und M2-Makrophagen wurde bis zum Stand dieser Arbeit noch nicht differenziert untersucht.

Daher sollten in den Zellkulturüberständen beider Makrophagensubpopulationen Chemokine identifiziert werden, welche für den beobachteten chemotaktischen Effekt in den *In-*

in vitro-Transmigrationsversuchen verantwortlich sein könnten und deren Expression durch die Wirkung von Adipokinen verändert wird.

In den vergleichenden Untersuchungen der Makrophagensubpopulationen zeigten sich M1-Makrophagen auch bezüglich der Chemokinsynthese weniger beeinflussbar durch Adipokine als M2-Zellen.

Bei M2-Makrophagen steigerte Leptin die Produktion aller getesteten Chemokine. Insbesondere die CCL-5-Synthese wurde durch Leptin mehr als verzehnfacht. Die CCL-1-Produktion der Zellen wurde durch Leptin hoch signifikant verstärkt, der Anstieg war sogar höher als nach LPS-Stimulation. Dieser Effekt scheint dabei auf M2-Makrophagen beschränkt zu sein, da eine Leptinwirkung auf die CCL-1-Synthese weder bei M1-Makrophagen noch bei PBMC im nachweisbar ist.[153] Adiponektin beeinflusste die Chemokinsynthese der M2-Makrophagen zwar in geringerem Maße, aber auch durch Adiponektin wurde die Produktion von CCL-1 und CCL-5 signifikant gesteigert. CXCL-9 und -10 waren, verglichen mit nicht-stimulierten M2-Zellen, tendenziell erhöht.

CCL-5, CXCL-9 und -10 werden von einigen Autoren auch als "M1-Chemokine" bezeichnet. Vornehmlich von M1-Makrophagen produziert, haben sie ein hohes pro-inflammatorisches Potenzial und spielen eine wichtige Rolle in der akuten Entzündung.[81] Es scheint daher bemerkenswert, dass beide Adipokine die Synthese dieser Mediatoren gerade bei M2-Makrophagen induzieren. Adiponektin hemmt hingegen die LPS-induzierte Expression von CXCL-9, CXCL-10 und CXCL-11 auf mRNA und Proteinebene in humanen Makrophagen. Unterschiede zwischen den Subtypen wurden in diesem Zusammenhang noch nicht untersucht. [69]

Wie bereits in Bezug auf die Zytokinsynthese beschrieben, scheinen Adipokine, insbesondere Adiponektin, kurzfristig entzündungsfördernd wirken zu können. Langfristig – auf Genexpressionsebene – scheinen sie jedoch auch direkt anti-inflammatorisch zu wirken bzw. zusätzliche pro-inflammatorische Stimulation, wie LPS, zu blockieren.[67] Eine Erklärung hierfür könnte das Konzept der adiponektin-vermittelten Endotoxintoleranz bieten.[66] Adiponektin selbst führt zu einer Aktivierung der Zellen, in diesem Fall zur Synthese verschiedener Chemokine, unterdrückt jedoch im Weiteren zusätzliche Stimulation, indem es über anti-inflammatorische Signalwege z. B. die LPS-Wirkung hemmt.[67]

Adiponektin hemmt verschiedene Schritte pro-inflammatorischer Signalwege wie die Phosphorylierung von I κ B, die c-Jun-Kinase (JNK), die p38-mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) sowie die Aktivierung von STAT3.[66, 67] Zusätzlich steigert Adiponektin die Expression anti-inflammatorischer Proteine, wie z. B. *A20*, *suppressor of cytokine signaling* (SOCS) 3, *B-cell CLL/lymphoma* (BCL) 3, *TNF receptor-associated factor* (TRAF) 1. In

Experimenten mit nicht-polarisierten, humanen Makrophagen konnte außerdem gezeigt werden, dass gAd in der Lage ist, die Toleranz gegenüber TLR-4-vermittelten Signalen zu erhöhen und darüber die Sensitivität gegenüber bakteriellen Toxinen vermindert.[66] Des Weiteren scheint das M2-Markerzytokin IL-10 in diesem Zusammenhang erneut von wichtiger Bedeutung zu sein, da IL-10 die CXCL-9 und CXCL-10 Expression über STAT1 direkt inhibiert. [155]

Diese Ergebnisse gestatten die Interpretation, dass die in den Transmigrationsversuchen gefundene verstärkte Migration in Gegenwart von Zellkulturüberständen aus adipokinstimulierten M2-Makrophagen zumindest teilweise auf ein durch diese Mediatoren aus dem Fettgewebe hervorgerufenes, verändertes Muster der Chemokinproduktion zurückzuführen ist.

Zusammenfassend haben die *In-vitro*-Versuche gezeigt, dass Leptin und Adiponektin direkt sowohl den Immunphänotyp als auch die Aktivität von Makrophagen der Subtypen M1 und M2 modulieren können. Obwohl sich beide Adipokine als wirkungsvoll erwiesen, waren die Veränderungen durch Leptin insgesamt stärker ausgeprägt. Alternativ aktivierte M2-Makrophagen reagierten dabei empfindlicher auf die Adipokinstimulation als klassisch aktivierte M1-Zellen.

Im *Creeping Fat* überwiegen M2-Makrophagen

Welche Bedeutung aber haben die oben genannten Befunde zum Ansprechen polarisierter Makrophagen auf Adipokine aus dem Fettgewebe für das Verständnis der Rolle des *Creeping Fat* beim Morbus Crohn? Dieser Frage wurde mit immunhistologischen Untersuchungen der Immunzellen im humanen mesenterialen Fettgewebe nachgegangen. Auch hier standen zunächst die Makrophagensubtypen im Fokus.

Im Fettgewebe finden sich neben Adipozyten und Präadipozyten auch Stromazellen, Nervenzellen sowie Lymphozyten und Makrophagen, die essenziell an der Homöostase des Organs beteiligt sind.[11] Der Makrophagenanteil am zellulären Kompartiment des Fettgewebes ist abhängig vom Ernährungszustand und Metabolismus des Organismus und beträgt zwischen 10 % bei Schlanken bis 40 % bei adipösen Menschen .[85, 156] Humane Fettgewebsmakrophagen haben einen charakteristischen Phänotyp: Sie exprimieren M2-Oberflächenmarker wie den Mannose-Rezeptor CD206 und CD163 und sind dabei trotzdem in der Lage, pro-inflammatorische Zytokine zu produzieren.[84]

Bei Übergewicht kommt es nicht nur zu einer vermehrten Infiltration durch Makrophagen ins viszerale Fett, typerweise verlagert sich auch das Makrophagensubtypverhältnis zugunsten eines M1-Phänotyps.[85, 86] Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die

erhöhten Konzentrationen pro-inflammatorischer Mediatoren im und aus dem Fettgewebe bei Adipositas zum großen Teil von Makrophagen stammen, [156] sodass davon auszugehen ist, dass Makrophagen ursächlich am chronischen Entzündungszustand bei Adipositas beteiligt sind.[11, 157] Auch bei einer chronischen Entzündung im Rahmen von Morbus Crohn ist die zelluläre Verteilung im mesenterialen Fettgewebe verändert. Es kommt zu einer verstärkten Infiltration durch Makrophagen.[7, 8] Die genauere Analyse der Subtypenverteilung von Makrophagen war ein Hauptanliegen dieser Arbeit.

In den untersuchten Proben des mesenterialen Fettgewebes von Patienten mit Morbus Crohn zeigte sich eine massive Akkumulation von CD68⁺-Makrophagen. Eine Infiltration durch Makrophagen war auch im mesenterialen Fettgewebe von Patienten mit kolorektalem Karzinom nachzuweisen. Im Fettgewebe um die entzündeten Darmabschnitte von Colitis-Ulcerosa-Patienten fanden sich, wie auch bei den gesunden Kontrollen, fast keine Makrophagen.

M1-Makrophagen begünstigen und verstärken eine Entzündung, indem sie die Aktivität von Th1-Zellen und NKT-Zellen unterstützen.[81] Sie sind an der Abwehr von zellulären Pathogenen und Tumorzellen beteiligt, indem sie phagozytieren und pro-inflammatorische Zytokine, wie TNF α , IL-12 und IL-6 produzieren, und reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen synthetisieren.[77, 78, 92] Letztere entstehen unter anderem durch die iNOS, ein Enzym, welches zur Detektion von M1-Makrophagen verwendet werden kann. Im mesenterialen Fettgewebe bei Patienten mit Morbus Crohn und kolorektalem Karzinom war die Anzahl der iNOS⁺-Zellen signifikant erhöht. Dabei war der Anteil, den M1-Zellen an der absoluten Makrophagenzahl ausmachten, bei kolorektalem Karzinom deutlich größer als bei Proben des mesenterialen Fettgewebes von Morbus-Crohn-Patienten. Diese *In-situ*-Befunde unterstützen die Annahme aus den Ergebnissen der *In-vitro*-Versuche, dass innerhalb der Makrophagenpopulation im *Creeping Fat* bei Morbus Crohn die M2-Makrophagen eine zentrale Rolle spielen.

M2-Makrophagen wurden über ihre Expression von CD163 und Stabilin-1 im mesenterialen Fettgewebe detektiert. Wie CD163 gehört auch Stabilin-1 zu den multifunktionellen *Scavenger*-Rezeptoren und ist unter anderem an der Endozytose von azetylierten *Low-density*-Lipoproteinen (acLDL) beteiligt.[95, 96, 158]

Der Anteil an CD163⁺- und Stabilin-1⁺-M2-Makrophagen war im Vergleich zu gesunden Kontrollen und Colitis ulcerosa bei kolorektalem Karzinom nur leicht erhöht. Auffallend stark war die M2-Infiltration im mesenterialen Fettgewebe von Morbus-Crohn-Patienten. Verglichen mit den Proben von Karzinompatienten war die Zellzahl im Mittel dreimal so hoch. Die Infiltration durch CD163⁺- und Stabilin-1⁺-M2-Makrophagen war damit im Cree-

ping Fat bei Morbus Crohn im Vergleich zum mesenterialen Fettgewebe von Patienten mit Colitis ulcerosa signifikant erhöht. Diese Anreicherung von M2-Makrophagen scheint also nicht nur ein Ausdruck einer chronischen Entzündung im Allgemeinen zu sein, sondern vielmehr ein Alleinstellungsmerkmal des Morbus Crohn.

Neben der absoluten Zellzahl von M2-Makrophagen ist auch die Expression des M2-typischen IL-10 im mesenterialen Fettgewebe bei Patienten mit Morbus Crohn im Vergleich zu allen anderen Kontrollgruppen wesentlich stärker. Es ist also davon auszugehen, dass die Akkumulation von M2-Makrophagen das Milieu im *Creeping Fat* funktionell beeinflusst. In diesem Zusammenhang erscheint erwähnenswert, dass eine hohe IL-10-Expression in der Mukosa einer der wichtigsten Prädiktoren für das Ansprechen von Morbus-Crohn-Patienten auf eine Therapie mit Kortikosteroiden ist.[159] Ob also auch die IL-10-Konzentration im Fettgewebe von prognostischer Bedeutung für den Therapieerfolg bei Morbus Crohn sein könnte, bleibt eine spannende Frage.

Daten zur Wirkung von Leptin und Adiponektin auf humane und murine Makrophagen *in vitro* [140, 141, 160] und die eigenen Ergebnisse mit der *in vitro* nachgewiesenen Wirkung von Leptin und Adiponektin auf polarisierte M1- und M2-Makrophagen legen einen kausalen Zusammenhang zwischen hohen Adipokinkonzentrationen im *Creeping Fat* und dem vermehrten Auftreten von M2-Makrophagen nahe.

T-Zellen im mesenterialen Fettgewebe

Vor dem Hintergrund, dass M2-Makrophagen das Makrophagenkompartiment im *Creeping Fat* dominieren und das chemotaktische Potenzial dieser Zellen durch Adipokine moduliert werden kann, wurden mögliche Auswirkungen dieser Makrophagensubpopulation auf das Ausmaß und die Qualität von T-Zellinfiltrationen im mesenterialen Fettgewebe *in situ* betrachtet.

In vitro wurde gezeigt, dass Leptin und Adiponektin nicht nur die Produktion von CCL-1, CCL-5, CXCL-9 und CXCL-10 durch M2-Makrophagen fördert, sondern die produzierten löslichen Faktoren auch zur direkten Steigerung der Fähigkeit dieses Makrophagentyps beitragen, T-Zellen anzuziehen. CCL-5 wirkt über CCR-5 auf Th1- und zytotoxische T-Zellen (Tc) der Klasse 1 und insbesondere auch auf NK-Zellen anziehend. CXCR-3 und -6, die Rezeptoren von CXCL-9 und CXCL-10 befinden sich ebenfalls auf Th1- und Tc1-Zellen. CCL-1 rekrutiert hingegen eher immunmodulatorische Zellen – wie Th2-, Tc2- und Treg-Zellen – sowie eosinophile Granulozyten zum Ort der Entzündung.

Tatsächlich konnten im Immunzellinfiltrat des *Creeping Fat* von Patienten mit Morbus Crohn über den pan-T-Zellmarker CD3 durch Immunfluoreszenz vermehrt T-Zellen

nachgewiesen werden. Mit der Frage nach dem Phänotyp dieser T-Zellen wurde immun-histochemisch *in situ* bestätigt, dass es sich mehrheitlich nicht um CD4⁺-T-Zellen handelt. Diese Abwesenheit von CD4⁺-T-Zellen war auf das Fettgewebe beschränkt. In der angrenzenden entzündeten Darmmukosa wurden T-Helferzellen gefunden. Dies passt zu den Beobachtungen von Naser *et al.*, die zeigen konnten, dass die Zahl der CD4⁺-T-Zellen in den Bereichen des mesenterialen Fettgewebes, das direkt an die entzündeten Darmbereiche angrenzt, im Vergleich zu weiter entfernt liegenden Anteilen oder gesundem Gewebe deutlich reduziert ist.[161]

Die dargestellten Chemokindaten legten die Vermutung nahe, dass vor allem CD8⁺-T-Zellen, sowie NKT-Zellen im Fettgewebe zu finden sein müssten. In der Darmmukosa bei Morbus Crohn sind die CD8⁺-T-Zellen mit einem Anteil von über 80 % ebenfalls stark in der Überzahl. [162] Erste Untersuchungen weisen ebenfalls in diese Richtung, eine quantitative Analyse des T-Zellinfiltrats sollte zukünftig genauer Aufschluss darüber geben.

Lee *et al.* haben bei CD8⁺-T-Zellen aus dem peripheren Blut von Morbus-Crohn-Patienten ein spezifisches Genexpressionsmuster gefunden, das prognostische Aussagen über das Therapieansprechen und den Krankheitsverlauf ermöglicht.[163] Eine Analyse der Funktionalität von CD8⁺-T-Zellen und NKT-Zellen im *Creeping Fat* könnte daher besonders unter dem Aspekt ihrer Wirkung auf das benachbarte Entzündungsgeschehen spannend sein.

Bedeutung des *Creeping Fat* für die intestinale Entzündung beim Morbus Crohn

In einer Übersichtsarbeit von Fink (2012) sind die klinischen und experimentellen Befunde der vergangenen Jahre zusammengefasst, die dem *Creeping Fat* für die Pathogenese und den Verlauf von Morbus Crohn eine aktive Rolle zusprechen und die Bedeutung des *Creeping Fat* für die Suche nach neuen Therapieoptionen hervorheben.[120] Die zentrale Frage, ob das *Creeping Fat* eine kausale Bedeutung in der Entzündung hat oder ob es sich um ein konsekutives Phänomen handelt, ist bisher noch nicht beantwortet. Ein Ziel der hier vorliegenden Arbeit war, über die Rolle von Makrophagensubpopulationen neue Einblicke in funktionelle Zusammenhänge innerhalb des *Creeping Fat* sowie in der Interaktion mit dem angrenzenden entzündeten Darmgewebe zu erhalten.

Vor welchem konkreten Hintergrund könnten hier Makrophagen von Bedeutung sein?

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen die Hypothese, dass das *Creeping Fat* bei Morbus Crohn protektiv wirkt. In dieser Arbeit konnte dabei zum ersten Mal gezeigt werden, dass M2-Makrophagen dabei eine zentrale Rolle spielen. Die Abbildung 38 illustriert die aus der Literatur in Kombination mit den eigenen Befunden abgeleitete Modellvorstellung, welche das mesenteriale Fettgewebe bei Morbus Crohn als eine zweite Barriere um

die entzündeten Darmbereiche versteht, die den Organismus vor systemischen Folgen des mukosalen Defekts schützen kann.

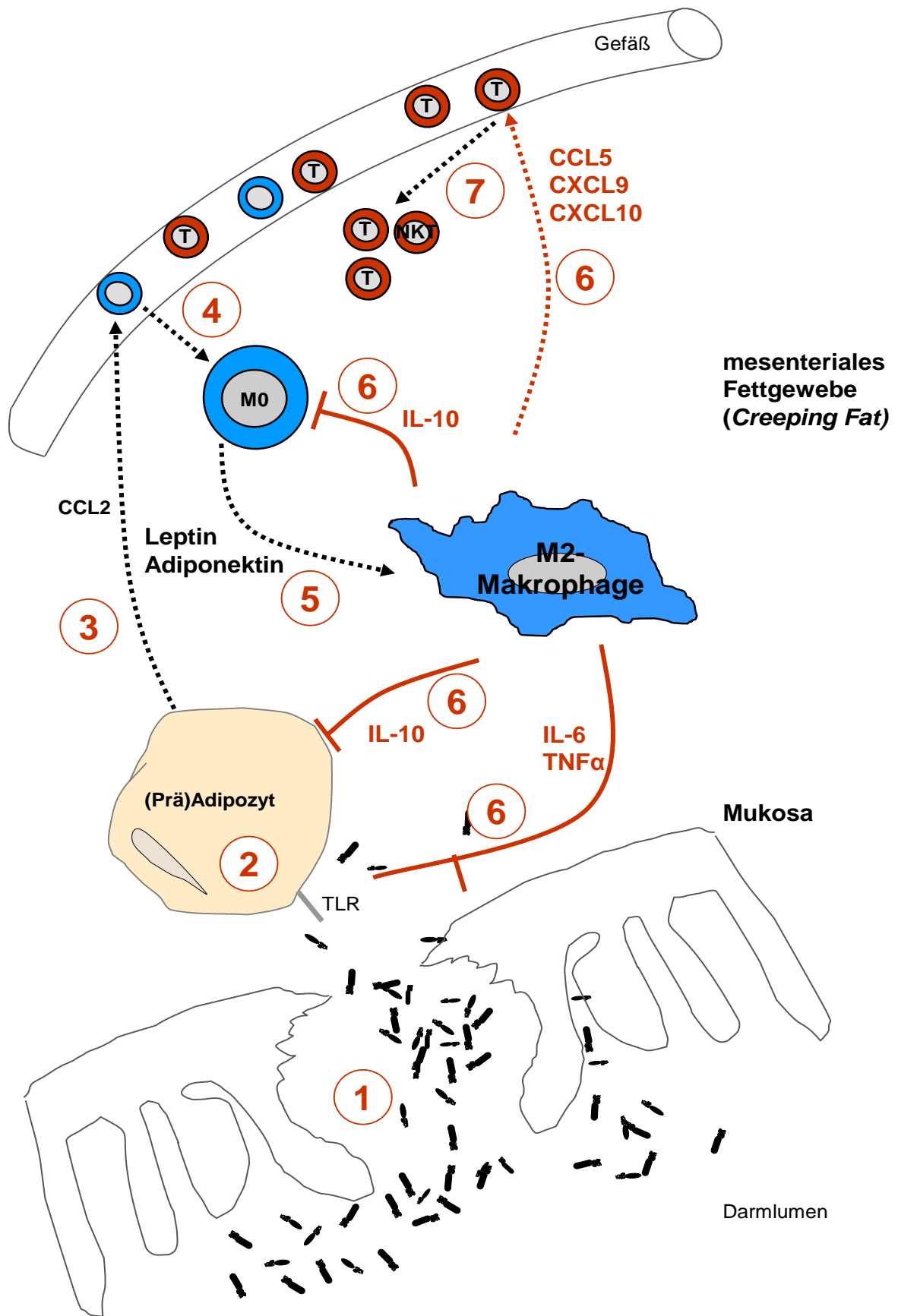


Abbildung 38 : Modell zur Rolle der M2-Makrophagen im *Creeping Fat*

Die transmurale Entzündung bei Morbus Crohn führt zu einem Defekt der intestinalen Barriere. Im mesenterialen Fettgewebe um die entzündeten Darmabschnitte können vermehrt Bakterien nachgewiesen werden. Diese konnten wahrscheinlich die geschädigte Mukosa durchdringen, gelangen zunächst jedoch nicht in die Blutbahn, sondern verbleiben im Fettgewebe.[134, 164] Diese Bakterien aktivieren über Rezeptoren des angeborenen Immunsystems Adipozyten und Präadipozyten.[13, 134] Die aktivierten Fettzellen produzieren vermehrt pro-inflammatorische Zytokine und CRP, jedoch auch Chemokine wie CCL-2 sowie Adipokine.[117-119] Chemokine ermöglichen die lokale Einwanderung von Immunzellen, welche die Bakterien im mesenterialen Fettgewebe bekämpfen können. Im Fettgewebe kann neben Chemokinen auch Leptin chemotaktisch auf Monozyten und Makrophagen wirken und gleichzeitig ihre Diapedese erleichtern.[165], [166] Durch die von Adipozyten und Präadipozyten produzierten Moleküle kommt es also zu einer spezifischen adipokinreichen Mikroumgebung, welche die einwandernden Immunzellen umgibt.

Damit kann das mesenteriale Fettgewebe eine systemische Ausbreitung der Entzündung unmittelbar verhindern. Gleichzeitig führt aber die Synthese eines breiten Spektrums an Mediatoren zu einer Mikroumwelt, welche (i) über Adipokine direkt die Differenzierung von M2-Makrophagen unterstützt und (ii) die Infiltration von Makrophagen verstärkt.

In Bezug auf den ersten Punkt wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Aktivität der M2-Makrophagen, sowohl ihre anti-inflammatorischen Funktionen, wie die IL-10-Synthese und die Expression von *PRRs*, als auch die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen durch Leptin und Adiponektin potenziert werden können. Zum zweiten Punkt wurde beobachtet, dass über das chemotaktische Potenzial der M2-Makrophagen, welches ebenfalls durch beide Adipokine unterstützt wird, die Migration anderer Immunzellen moduliert werden könnte. Adipokine forcieren so im Makrophagenkompartiment die Entstehung eines M2-Subtyps aus eingewanderten Makrophagen, welcher auf der einen Seite über pro-inflammatorische Mediatoren und Chemokine an der bakteriellen Abwehr beteiligt ist und weitere Immunzellen ins mesenteriale Fettgewebe lockt, auf der anderen Seite aber auch regulatorisch auf umliegende Zellen einwirkt und die lokale Entzündungsreaktion eindämmen kann.

Die adipokinbestimmte Dominanz von M2-Makrophagen im *Creeping Fat* bei Morbus Crohn könnte somit einen Grad der Entzündung unterhalten, der auf der einen Seite eine adäquate Immunabwehr gegen exogene Pathogene ermöglicht, auf der anderen Seite die Entzündungsreaktion moduliert und eine systemische Entzündungsreaktion verhindert. Über Adiponektin und IL-10 können zusätzlich pro-inflammatorische Stimuli unterdrückt werden.

Diese Hypothese weist den Makrophagen – und hier insbesondere den M2-Makrophagen im mesenterialen Fettgewebe – eine wichtige regulatorische Rolle bei der lokalen Entzündung zu.

6 Literaturverzeichnis

1. Shivananda, S., et al., *Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD)*. Gut, 1996. 39(5): p. 690-7.
2. J. C. Hoffmann^{1*}, J. C. Preiß^{2**}, F. Autschbach³, H. J. Buhr⁴, W. Huser⁵, K. Herrlinger⁶, W. Hçhne², S. Koletzko⁷, W.K. C. F. Krieglstein⁸, H. Matthes¹⁰, G. Moser¹¹, M. Reinshagen¹², G. Rogler¹³, S. Schreiber¹⁴, A. G. Schreyer¹⁵, and B.S. B. Sido¹⁶, A. Stallmach¹⁷, B. Bokemeyer^{18*}, E. F. Stange^{6*}, M. Zeitz², *S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn“ Ergebnisse einer Evidenz-basierten Konsensuskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten zusammen mit dem Kompetenznetz Chronisch entzündliche Darmerkrankungen*. Z Gastroenterol, 2008. 46: p. 1094-1146.
3. Tanaka, M., et al., *Morphologic criteria applicable to biopsy specimens for effective distinction of inflammatory bowel disease from other forms of colitis and of Crohn's disease from ulcerative colitis*. Scand J Gastroenterol, 1999. 34(1): p. 55-67.
4. Crohn BB , G.L.O.G., *Regional ileitis, a pathologic an dclinical entity*. J Am Med Assac, 1932(99): p. 1323-9.
5. Sheehan, A.L., et al., *Fat-wrapping in Crohn's disease: pathological basis and relevance to surgical practice*. Br J Surg, 1992. 79(9): p. 955-8.
6. Desreumaux, P., et al., *Inflammatory alterations in mesenteric adipose tissue in Crohn's disease*. Gastroenterology, 1999. 117(1): p. 73-81.
7. Paul, G., et al., *Profiling adipocytokine secretion from creeping fat in Crohn's disease*. Inflamm Bowel Dis, 2006. 12(6): p. 471-7.
8. Yamamoto, K., et al., *Production of adiponectin, an anti-inflammatory protein, in mesenteric adipose tissue in Crohn's disease*. Gut, 2005. 54(6): p. 789-96.
9. Perminow, G., et al., *Increased number and activation of colonic macrophages in pediatric patients with untreated Crohn's disease*. Inflamm Bowel Dis, 2009. 15(9): p. 1368-78.
10. Welsch, *Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie*. 2 ed. 2006, München: Elsevier GmbH.
11. Fruhbeck, G., *Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders*. Methods Mol Biol, 2008. 456: p. 1-22.
12. Schaffler, A., et al., *Role of adipose tissue as an inflammatory organ in human diseases*. Endocr Rev, 2006. 27(5): p. 449-67.
13. Batra, A., et al., *Leptin-dependent toll-like receptor expression and responsiveness in preadipocytes and adipocytes*. Am J Pathol, 2007. 170(6): p. 1931-41.
14. Lin, Y., et al., *The lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes*. J Biol Chem, 2000. 275(32): p. 24255-63.
15. Charriere, G., et al., *Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity*. J Biol Chem, 2003. 278(11): p. 9850-5.
16. Cousin, B., et al., *A role for preadipocytes as macrophage-like cells*. FASEB J, 1999. 13(2): p. 305-12.
17. Batra, A., M. Zeitz, and B. Siegmund, *Adipokine signaling in inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2009. 15(12): p. 1897-905.
18. Lago, F., et al., *Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2007. 3(12): p. 716-24.
19. Ingalls, A.M., M.M. Dickie, and G.D. Snell, *Obese, a new mutation in the house mouse*. J Hered, 1950. 41(12): p. 317-8.
20. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature, 1994. 372(6505): p. 425-32.
21. Ahima, R.S., et al., *Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting*. Nature, 1996. 382(6588): p. 250-2.
22. Sanchez-Margalet, V., et al., *Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action*. Clin Exp Immunol, 2003. 133(1): p. 11-9.
23. Flier, J.S. and E. Maratos-Flier, *Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways*. Cell, 1998. 92(4): p. 437-40.
24. Bates, S.H. and M.G. Myers, *The role of leptin-->STAT3 signaling in neuroendocrine function: an integrative perspective*. J Mol Med (Berl), 2004. 82(1): p. 12-20.

25. Ahima, R.S. and J.S. Flier, *Leptin*. *Annu Rev Physiol*, 2000. 62: p. 413-37.
26. Madej, T., M.S. Boguski, and S.H. Bryant, *Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine*. *FEBS Lett*, 1995. 373(1): p. 13-8.
27. Tartaglia, L.A., et al., *Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R*. *Cell*, 1995. 83(7): p. 1263-71.
28. Fong, T.M., et al., *Localization of leptin binding domain in the leptin receptor*. *Mol Pharmacol*, 1998. 53(2): p. 234-40.
29. Fantuzzi, G. and R. Faggioni, *Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis*. *J Leukoc Biol*, 2000. 68(4): p. 437-46.
30. Sweeney, G., *Leptin signalling*. *Cell Signal*, 2002. 14(8): p. 655-63.
31. Tartaglia, L.A., *The leptin receptor*. *J Biol Chem*, 1997. 272(10): p. 6093-6.
32. Lam, Q.L. and L. Lu, *Role of leptin in immunity*. *Cell Mol Immunol*, 2007. 4(1): p. 1-13.
33. Sanchez-Margalet, V., et al., *Leptin receptor (Ob-R) expression is induced in peripheral blood mononuclear cells by in vitro activation and in vivo in HIV-infected patients*. *Clin Exp Immunol*, 2002. 129(1): p. 119-24.
34. Zarkesh-Esfahani, H., et al., *High-dose leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes*. *J Immunol*, 2001. 167(8): p. 4593-9.
35. Ozata, M., I.C. Ozdemir, and J. Licinio, *Human leptin deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of leptin-mediated defects*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999. 84(10): p. 3686-95.
36. Farooqi, I.S., et al., *Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency*. *J Clin Invest*, 2002. 110(8): p. 1093-103.
37. Lord, G.M., et al., *Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression*. *Nature*, 1998. 394(6696): p. 897-901.
38. Lord, G.M., et al., *Leptin inhibits the anti-CD3-driven proliferation of peripheral blood T cells but enhances the production of proinflammatory cytokines*. *J Leukoc Biol*, 2002. 72(2): p. 330-8.
39. Santos-Alvarez, J., R. Goberna, and V. Sanchez-Margalet, *Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes*. *Cell Immunol*, 1999. 194(1): p. 6-11.
40. Gainsford, T., et al., *Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(25): p. 14564-8.
41. Dixit, V.D., et al., *Leptin induces growth hormone secretion from peripheral blood mononuclear cells via a protein kinase C- and nitric oxide-dependent mechanism*. *Endocrinology*, 2003. 144(12): p. 5595-603.
42. Faggioni, R., et al., *Leptin-deficient (ob/ob) mice are protected from T cell-mediated hepatotoxicity: role of tumor necrosis factor alpha and IL-18*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(5): p. 2367-72.
43. Siegmund, B., et al., *Leptin deficiency, not obesity, protects mice from Con A-induced hepatitis*. *Eur J Immunol*, 2002. 32(2): p. 552-60.
44. Siegmund, B., H.A. Lehr, and G. Fantuzzi, *Leptin: a pivotal mediator of intestinal inflammation in mice*. *Gastroenterology*, 2002. 122(7): p. 2011-25.
45. Siegmund, B., et al., *Leptin receptor expression on T lymphocytes modulates chronic intestinal inflammation in mice*. *Gut*, 2004. 53(7): p. 965-72.
46. Barbier, M., et al., *Overexpression of leptin mRNA in mesenteric adipose tissue in inflammatory bowel diseases*. *Gastroenterol Clin Biol*, 2003. 27(11): p. 987-91.
47. Karmiris, K., et al., *Circulating levels of leptin, adiponectin, resistin, and ghrelin in inflammatory bowel disease*. *Inflamm Bowel Dis*, 2006. 12(2): p. 100-5.
48. Arita, Y., et al., *Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. 257(1): p. 79-83.
49. Scherer, P.E., et al., *A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes*. *J Biol Chem*, 1995. 270(45): p. 26746-9.
50. Nakano, Y., et al., *Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma*. *J Biochem*, 1996. 120(4): p. 803-12.
51. Yamauchi, T., et al., *Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects*. *Nature*, 2003. 423(6941): p. 762-9.
52. Kadowaki, T. and T. Yamauchi, *Adiponectin and adiponectin receptors*. *Endocr Rev*, 2005. 26(3): p. 439-51.

53. Tsao, T.S., et al., *Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways.* J Biol Chem, 2003. 278(50): p. 50810-7.
54. Kadowaki, T., et al., *Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome.* J Clin Invest, 2006. 116(7): p. 1784-92.
55. Ceddia, R.B., et al., *Globular adiponectin increases GLUT4 translocation and glucose uptake but reduces glycogen synthesis in rat skeletal muscle cells.* Diabetologia, 2005. 48(1): p. 132-9.
56. Ouchi, N., et al., *Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin.* Circulation, 1999. 100(25): p. 2473-6.
57. Arita, Y., et al., *Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BB-binding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell.* Circulation, 2002. 105(24): p. 2893-8.
58. Okamoto, Y., et al., *Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.* Circulation, 2002. 106(22): p. 2767-70.
59. Yokota, T., et al., *Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages.* Blood, 2000. 96(5): p. 1723-32.
60. Kelesidis, I., T. Kelesidis, and C.S. Mantzoros, *Adiponectin and cancer: a systematic review.* Br J Cancer, 2006. 94(9): p. 1221-5.
61. Wolf, A.M., et al., *Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes.* Biochem Biophys Res Commun, 2004. 323(2): p. 630-5.
62. Kumada, M., et al., *Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages.* Circulation, 2004. 109(17): p. 2046-9.
63. Yamaguchi, N., et al., *Adiponectin inhibits Toll-like receptor family-induced signaling.* FEBS Lett, 2005. 579(30): p. 6821-6.
64. Wulster-Radcliffe, M.C., et al., *Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages.* Biochem Biophys Res Commun, 2004. 316(3): p. 924-9.
65. Tsatsanis, C., et al., *Adiponectin induces TNF-alpha and IL-6 in macrophages and promotes tolerance to itself and other pro-inflammatory stimuli.* Biochem Biophys Res Commun, 2005. 335(4): p. 1254-63.
66. Zacharioudaki, V., et al., *Adiponectin promotes endotoxin tolerance in macrophages by inducing IRAK-M expression.* J Immunol, 2009. 182(10): p. 6444-51.
67. Folco, E.J., et al., *Adiponectin inhibits pro-inflammatory signaling in human macrophages independent of interleukin-10.* J Biol Chem, 2009. 284(38): p. 25569-75.
68. Ouchi, N., et al., *Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages.* Circulation, 2001. 103(8): p. 1057-63.
69. Okamoto, Y., et al., *Adiponectin inhibits the production of CXC receptor 3 chemokine ligands in macrophages and reduces T-lymphocyte recruitment in atherogenesis.* Circ Res, 2008. 102(2): p. 218-25.
70. Fayad, R., et al., *Adiponectin deficiency protects mice from chemically induced colonic inflammation.* Gastroenterology, 2007. 132(2): p. 601-14.
71. Nishihara, T., et al., *Effect of adiponectin on murine colitis induced by dextran sulfate sodium.* Gastroenterology, 2006. 131(3): p. 853-61.
72. Ouchi, N., et al., *Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue.* Circulation, 2003. 107(5): p. 671-4.
73. Gabay, C. and I. Kushner, *Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation.* N Engl J Med, 1999. 340(6): p. 448-54.
74. Fantuzzi, G., *Adiponectin and inflammation: consensus and controversy.* J Allergy Clin Immunol, 2008. 121(2): p. 326-30.
75. Mantovani, A., *The chemokine system: redundancy for robust outputs.* Immunol Today, 1999. 20(6): p. 254-7.
76. Gordon, S., *Alternative activation of macrophages.* Nat Rev Immunol, 2003. 3(1): p. 23-35.
77. Benoit, M., B. Desnues, and J.L. Mege, *Macrophage polarization in bacterial infections.* J Immunol, 2008. 181(6): p. 3733-9.
78. Martinez, F.O., et al., *Macrophage activation and polarization.* Front Biosci, 2008. 13: p. 453-61.

79. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nat Rev Immunol, 2008. 8(12): p. 958-69.
80. Mantovani, A. and M. Locati, *Orchestration of macrophage polarization*. Blood, 2009. 114(15): p. 3135-6.
81. Mantovani, A., et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. Trends Immunol, 2004. 25(12): p. 677-86.
82. Kanda, H., et al., *MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity*. J Clin Invest, 2006. 116(6): p. 1494-505.
83. Kamei, N., et al., *Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance*. J Biol Chem, 2006. 281(36): p. 26602-14.
84. Zeyda, M., et al., *Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production*. Int J Obes (Lond), 2007. 31(9): p. 1420-8.
85. Lumeng, C.N., J.L. Bodzin, and A.R. Saltiel, *Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization*. J Clin Invest, 2007. 117(1): p. 175-84.
86. Lumeng, C.N., et al., *Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes*. Diabetes, 2008. 57(12): p. 3239-46.
87. Apovian, C.M., et al., *Adipose macrophage infiltration is associated with insulin resistance and vascular endothelial dysfunction in obese subjects*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. 28(9): p. 1654-9.
88. Mantovani, A., et al., *Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes*. Trends Immunol, 2002. 23(11): p. 549-55.
89. Porcheray, F., et al., *Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation*. Clin Exp Immunol, 2005. 142(3): p. 481-9.
90. Stout, R.D. and J. Suttles, *Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments*. J Leukoc Biol, 2004. 76(3): p. 509-13.
91. Verreck, F.A., et al., *Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(13): p. 4560-5.
92. Verreck, F.A., et al., *Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation*. J Leukoc Biol, 2006. 79(2): p. 285-93.
93. Mosser, D.M., *The many faces of macrophage activation*. J Leukoc Biol, 2003. 73(2): p. 209-12.
94. Shaughnessy, L.M. and J.A. Swanson, *The role of the activated macrophage in clearing Listeria monocytogenes infection*. Front Biosci, 2007. 12: p. 2683-92.
95. Goerdts, S. and C.E. Orfanos, *Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells*. Immunity, 1999. 10(2): p. 137-42.
96. Goerdts, S., et al., *Alternative versus classical activation of macrophages*. Pathobiology, 1999. 67(5-6): p. 222-6.
97. Kodolija, V., et al., *Alternative macrophage activation-associated CC-chemokine-1, a novel structural homologue of macrophage inflammatory protein-1 alpha with a Th2-associated expression pattern*. J Immunol, 1998. 160(3): p. 1411-8.
98. Park, S.Y., et al., *Stabilin-1 mediates phosphatidylserine-dependent clearance of cell corpses in alternatively activated macrophages*. J Cell Sci, 2009. 122(Pt 18): p. 3365-73.
99. Martinez, F.O., et al., *Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression*. J Immunol, 2006. 177(10): p. 7303-11.
100. Gordon, S., et al., *Macrophages in tissues and in vitro*. Curr Opin Immunol, 1992. 4(1): p. 25-32.
101. Boyum, A., *Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g*. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 1968. 97: p. 77-89.
102. Goldmann, E.E., *Vitalfärbung am Zentralnervensystem*. Abh. Preuss. Akd. Wiss. Phys. - Math. , 1913. Kl. I (1): p. 1-13.
103. Miltenyi, S., et al., *High gradient magnetic cell separation with MACS*. Cytometry, 1990. 11(2): p. 231-8.

104. Hilary A. Sherman, M.E.R.G., C. (2012) *Considerations when Optimizing your Chemotaxis or Invasion Assay with Corning® Transwell® Permeable Supports.*
105. Nanki, T. and P.E. Lipsky, *Cutting edge: stromal cell-derived factor-1 is a costimulator for CD4+ T cell activation.* J Immunol, 2000. 164(10): p. 5010-4.
106. Dina, D., M. Crippa, and E. Beccari, *Hybridization properties and sequence arrangement in a population of mRNAs.* Nat New Biol, 1973. 242(117): p. 101-5.
107. Dina, D., I. Meza, and M. Crippa, *Relative positions of the "repetitive", "unique" and poly(A) fragments of mRNA.* Nature, 1974. 248(448): p. 486-90.
108. C., M., *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics.* 2009: Spektrum akademischer Verlag der Wissenschaft.
109. Rappolee, D.A., et al., *Novel method for studying mRNA phenotypes in single or small numbers of cells.* J Cell Biochem, 1989. 39(1): p. 1-11.
110. Lee, L.G., C.R. Connell, and W. Bloch, *Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes.* Nucleic Acids Res, 1993. 21(16): p. 3761-6.
111. Kristiansen, M., et al., *Identification of the haemoglobin scavenger receptor.* Nature, 2001. 409(6817): p. 198-201.
112. Mantovani, A., C. Garlanda, and M. Locati, *Macrophage diversity and polarization in atherosclerosis: a question of balance.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. 29(10): p. 1419-23.
113. Ishii, T., et al., *Stability of housekeeping genes in alveolar macrophages from COPD patients.* Eur Respir J, 2006. 27(2): p. 300-6.
114. Bronte, V. and P. Zanovello, *Regulation of immune responses by L-arginine metabolism.* Nat Rev Immunol, 2005. 5(8): p. 641-54.
115. Ding, Z., K. Xiong, and T.B. Issekutz, *Regulation of chemokine-induced transendothelial migration of T lymphocytes by endothelial activation: differential effects on naive and memory T cells.* J Leukoc Biol, 2000. 67(6): p. 825-33.
116. Peyrin-Biroulet, L., et al., *Mesenteric fat in Crohn's disease: a pathogenetic hallmark or an innocent bystander?* Gut, 2007. 56(4): p. 577-83.
117. Zulian, A., et al., *Visceral adipocytes: old actors in obesity and new protagonists in Crohn's disease?* Gut, 2012. 61(1): p. 86-94.
118. Siegmund, B., *Mesenteric fat in Crohn's disease: the hot spot of inflammation?* Gut, 2012. 61(1): p. 3-5.
119. Peyrin-Biroulet, L., et al., *Mesenteric fat as a source of C reactive protein and as a target for bacterial translocation in Crohn's disease.* Gut, 2012. 61(1): p. 78-85.
120. Fink, C., et al., *Adipose tissue and inflammatory bowel disease pathogenesis.* Inflamm Bowel Dis, 2012. 18(8): p. 1550-7.
121. Pond, C.M., *Adipose tissue and the immune system.* Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2005. 73(1): p. 17-30.
122. Drouet, M., et al., *Visceral fat and gut inflammation.* Nutrition, 2012. 28(2): p. 113-7.
123. Behr, M.A., *The path to Crohn's disease: is mucosal pathology a secondary event?* Inflamm Bowel Dis, 2010. 16(5): p. 896-902.
124. Bertin, B., P. Desreumaux, and L. Dubuquoy, *Obesity, visceral fat and Crohn's disease.* Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2010. 13(5): p. 574-80.
125. Pierce, E.S., *Where are all the Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in patients with Crohn's disease?* PLoS Pathog, 2009. 5(3): p. e1000234.
126. Smith, A.M., et al., *Disordered macrophage cytokine secretion underlies impaired acute inflammation and bacterial clearance in Crohn's disease.* J Exp Med, 2009. 206(9): p. 1883-97.
127. Regeling, A., et al., *Role of defective autophagia and the intestinal flora in Crohn disease.* Self Nonsell, 2010. 1(4): p. 323-327.
128. Schaffler, A., J. Scholmerich, and C. Buchler, *Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue--emerging role in intestinal and mesenteric diseases.* Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2005. 2(2): p. 103-11.
129. Sitaraman, S., et al., *Colonic leptin: source of a novel proinflammatory cytokine involved in IBD.* FASEB J, 2004. 18(6): p. 696-8.
130. Okuno, A., et al., *Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats.* J Clin Invest, 1998. 101(6): p. 1354-61.
131. Skurk, T., et al., *Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion.* J Clin Endocrinol Metab, 2007. 92(3): p. 1023-33.

132. Weber, M., et al., *Adiponectin downregulates galectin-3 whose cellular form is elevated whereas its soluble form is reduced in type 2 diabetic monocytes*. FEBS Lett, 2009. 583(22): p. 3718-24.
133. Kopp, A., et al., *Toll-like receptor ligands cause proinflammatory and prodiabetic activation of adipocytes via phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase but not interferon regulatory factor-3*. Endocrinology, 2010. 151(3): p. 1097-108.
134. Batra, A., et al., *Mesenteric fat - control site for bacterial translocation in colitis?* Mucosal Immunol, 2012. 5(5): p. 580-91.
135. Biswas, S.K., A. Sica, and C.E. Lewis, *Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms*. J Immunol, 2008. 180(4): p. 2011-7.
136. Cassetta, L., E. Cassol, and G. Poli, *Macrophage polarization in health and disease*. ScientificWorldJournal, 2011. 11: p. 2391-402.
137. Loffreda, S., et al., *Leptin regulates proinflammatory immune responses*. FASEB J, 1998. 12(1): p. 57-65.
138. Martin-Romero, C., et al., *Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes*. Cell Immunol, 2000. 199(1): p. 15-24.
139. Weigert, J., et al., *Reduced response to adiponectin and lower abundance of adiponectin receptor proteins in type 2 diabetic monocytes*. FEBS Lett, 2008. 582(12): p. 1777-82.
140. Lovren, F., et al., *Adiponectin primes human monocytes into alternative anti-inflammatory M2 macrophages*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. 299(3): p. H656-63.
141. Acedo, S.C., et al., *Participation of leptin in the determination of the macrophage phenotype: an additional role in adipocyte and macrophage crosstalk*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2013. 49(6): p. 473-8.
142. Ohashi, K., et al., *Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype*. J Biol Chem, 2010. 285(9): p. 6153-60.
143. Peiser, L., S. Mukhopadhyay, and S. Gordon, *Scavenger receptors in innate immunity*. Curr Opin Immunol, 2002. 14(1): p. 123-8.
144. Sporrer, D., et al., *Adiponectin downregulates CD163 whose cellular and soluble forms are elevated in obesity*. Eur J Clin Invest, 2009. 39(8): p. 671-9.
145. Tilg, H. and A.R. Moschen, *Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity*. Nat Rev Immunol, 2006. 6(10): p. 772-83.
146. Haugen, F. and C.A. Drevon, *Activation of nuclear factor-kappaB by high molecular weight and globular adiponectin*. Endocrinology, 2007. 148(11): p. 5478-86.
147. Park, P.H., et al., *Short-term treatment of RAW264.7 macrophages with adiponectin increases tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) expression via ERK1/2 activation and Egr-1 expression: role of TNF-alpha in adiponectin-stimulated interleukin-10 production*. J Biol Chem, 2007. 282(30): p. 21695-703.
148. Kyriazi, E., et al., *Effects of adiponectin in TNF-alpha, IL-6, and IL-10 cytokine production from coronary artery disease macrophages*. Horm Metab Res, 2011. 43(8): p. 537-44.
149. Anderson, E.K., D.A. Gutierrez, and A.H. Hasty, *Adipose tissue recruitment of leukocytes*. Curr Opin Lipidol, 2013. 21(3): p. 172-7.
150. Kiguchi, N., et al., *Leptin enhances CC-chemokine ligand expression in cultured murine macrophage*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. 384(3): p. 311-5.
151. Maghazachi, A.A., A. Al-Aoukaty, and T.J. Schall, *CC chemokines induce the generation of killer cells from CD56+ cells*. Eur J Immunol, 1996. 26(2): p. 315-9.
152. Keophiphath, M., et al., *CCL5 promotes macrophage recruitment and survival in human adipose tissue*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. 30(1): p. 39-45.
153. Meier, C.A., et al., *IP-10, but not RANTES, is upregulated by leptin in monocytic cells*. Cytokine, 2003. 21(1): p. 43-7.
154. Neumeier, M., et al., *Adiponectin stimulates release of CCL2, -3, -4 and -5 while the surface abundance of CCR2 and -5 is simultaneously reduced in primary human monocytes*. Cytokine, 2011. 56(3): p. 573-80.
155. Ito, S., et al., *Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma- induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1*. Blood, 1999. 93(5): p. 1456-63.
156. Weisberg, S.P., et al., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue*. J Clin Invest, 2003. 112(12): p. 1796-808.
157. Zeyda, M. and T.M. Stulnig, *Adipose tissue macrophages*. Immunol Lett, 2007. 112(2): p. 61-7.

158. Kzhyshkowska, J., A. Gratchev, and S. Goerd, *Stabilin-1, a homeostatic scavenger receptor with multiple functions*. J Cell Mol Med, 2006. 10(3): p. 635-49.
159. Santaolalla, R., et al., *Apoptosis resistance of mucosal lymphocytes and IL-10 deficiency in patients with steroid-refractory Crohn's disease*. Inflamm Bowel Dis, 2011. 17(7): p. 1490-500.
160. Mandal, P., et al., *Molecular mechanism for adiponectin-dependent M2 macrophage polarization: link between the metabolic and innate immune activity of full-length adiponectin*. J Biol Chem, 2011. 286(15): p. 13460-9.
161. Naser, S.A., et al., *Cellular infiltration and cytokine expression correlate with fistulizing state in Crohn's disease*. Clin Vaccine Immunol, 2011. 18(9): p. 1416-9.
162. Selby, W.S., et al., *Intestinal lymphocyte subpopulations in inflammatory bowel disease: an analysis by immunohistological and cell isolation techniques*. Gut, 1984. 25(1): p. 32-40.
163. Lee, J.C., et al., *Gene expression profiling of CD8+ T cells predicts prognosis in patients with Crohn disease and ulcerative colitis*. J Clin Invest, 2011. 121(10): p. 4170-9.
164. Laffineur, G., et al., *[Bacterial translocation in Crohn disease]*. Gastroenterol Clin Biol, 1992. 16(10): p. 777-81.
165. Curat, C.A., et al., *From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes*. Diabetes, 2004. 53(5): p. 1285-92.
166. Gruen, M.L., et al., *Leptin requires canonical migratory signaling pathways for induction of monocyte and macrophage chemotaxis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. 293(5): p. C1481-8.

7 **Abbildungsverzeichnis:**

Abbildung 1: <i>Creeping Fat</i> Operationssitus.....	6
Abbildung 2: Endokrine Funktionen des weißen Fettgewebes [19]	8
Abbildung 3: Makrophagenklassifikation nach Mosser und Edwards [85].....	15
Abbildung 4: Makrophagenklassifikation nach Mantovani <i>et al.</i> [84].....	17
Abbildung 5: Schematische Darstellung der T-Zell-Transmigration	31
Abbildung 6: Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)	32
Abbildung 7: Modell der Streptavidin-Biotin-Methode.....	41
Abbildung 8: Morphologie <i>in vitro</i> polarisierter Makrophagensubtypen.....	44
Abbildung 9: Expression von Oberflächenmolekülen von <i>in vitro</i> polarisierten humanen Makrophagen	46
Abbildung 10: IL-10-Produktion unstimulierter, <i>in vitro</i> polarisierter humaner Makrophagen	47
Abbildung 11: Zytokinprofil <i>in vitro</i> polarisierter Makrophagensubpopulationen nach Behandlung mit LPS.....	49
Abbildung 12: Wirkung von LPS auf die Expression von Oberflächenmolekülen.....	51
Abbildung 13: Expression von Adipokinrezeptoren <i>in vitro</i> polarisierter Makrophagensubpopulationen	53
Abbildung 14: Morphologie in Gegenwart von Leptin <i>in vitro</i> polarisierter M2-Makrophagen	54
Abbildung 15: Einfluss von Leptin auf die Oberflächenmoleküle polarisierter Makrophagen	56
Abbildung 17: Leptinwirkung auf die Zytokinproduktion von Makrophagensubpopulationen	59
Abbildung 16: Modulation der LPS-induzierten Expression verschiedener Oberflächenmoleküle durch Leptin	62
Abbildung 18: Einfluss von Leptin auf die Adipokinrezeptoren	64
Abbildung 19: Modulation der Mannose-Rezeptorexpression (mRNA) durch Leptin	65
Abbildung 20: Einfluss von Adiponektin auf Oberflächenmoleküle	67

Abbildung 21: Modulation der LPS-induzierten Expression von CD14 und CD80 durch Adiponektin	69
Abbildung 22: Zytokinprofil nach Adiponektinzugabe	71
Abbildung 23: Einfluss von Adiponektin auf die Adipokinrezeptorexpression	72
Abbildung 24: Wirkung von Adiponektin auf die Expression des Mannose-Rezeptors	73
Abbildung 25: Makrophagen im mesenterialen Fettgewebe	75
Abbildung 26: iNOS ⁺ -M1-Makrophagen im mesenterialen Fettgewebe	77
Abbildung 27: M2-Makrophagen im mesenterialen Fettgewebe	79
Abbildung 28: IL-10-Expression im mesenterialen Fettgewebe	80
Abbildung 29: Einfluss von Leptin auf die Phagozytoseleistung	82
Abbildung 30: Migration von CD3 ⁺ -Zellen, ausgelöst durch Makrophagenchemotaxis	84
Abbildung 31: Migration von CD4 ⁺ -Zellen, ausgelöst durch Makrophagenchemotaxis	85
Abbildung 32: Chemokinproduktion von M1- und M2-Makrophagen	87
Abbildung 33: Immunfluoreszenz: T-Zellen im mesenterialen Fettgewebe	89
Abbildung 34: Grafische Auswertung der T-Zellen im mesenterialen Fettgewebe	90
Abbildung 35: Immunhistologischer Nachweis von CD4 ⁺ -Zellen	91
Abbildung 36: NKT-Zellen im mesenterialen Fettgewebe	93
Abbildung 37: CD8 ⁺ - und FoxP3 ⁺ -Zellen im mesenterialen Fettgewebe	94
Abbildung 38 : Modell zur Rolle der M2-Makrophagen im <i>Creeping Fat</i>	109

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotide.....	24
Tabelle 2: Verwendete primäre Antikörper	25
Tabelle 3: Sekundäre Antikörper.....	25
Tabelle 4: Rekombinante Zytokine und Adipokine	26
Tabelle 5: Spezifische Schmelztemperaturen der Primer	39
Tabelle 6: Basale Zytokinproduktion von M1- und M2-Makrophagen	48
Tabelle 7: Einfluss von Leptin auf die Oberflächenmarkerexpression während der Polarisation von Makrophagen	55
Tabelle 8: Effekt von Leptin während der <i>In-vitro</i> -Polarisation von Makrophagen auf ihre Zytokinproduktion.....	57
Tabelle 9: Wirkung von Leptin auf die LPS-beeinflusste CD163 und HLA-DR von Makrophagensubpopulationen	61
Tabelle 10: Wirkung von Adiponektin auf die LPS-beeinflusste CD163 und HLA-DR von Makrophagensubpopulationen	68

9 Publikationsliste

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgender internationaler Fachzeitschrift als Originalartikel veröffentlicht

Kredel LI, Batra A, Stroh T, Kühl AA, Zeitz M, Erben U, Siegmund B.: Adipokines from local fat cells shape the macrophage compartment of the creeping fat in Crohn's disease. *Gut*, 2013. **62**(6):852-62

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in Teilen auf folgenden Kongressen vorgestellt und als Abstract veröffentlicht worden

Kredel LI, Batra A, Zeitz M, Siegmund B: Adipokine induced polarization of macrophages in the mesenteric fat tissue. *Berlin Immunology Day, Research Center of Immunoscience 09.12.2010, Berlin*

Kredel LI, Batra A, Kühl AA, Zeitz M, Siegmund B: Adipokine modulieren den Immunphänotyp lokaler Makrophagen im mesenterialen Fettgewebe. *65. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen (DGVS). 15.-18.09.2010, Stuttgart*

Kredel LI, Batra A, Kühl AA, Zeitz M, Siegmund B: Adipokine modulieren den Immunphänotyp lokaler Makrophagen im mesenterialen Fettgewebe. *Deutsche Arbeitsgemeinschaft chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (DACED), 19.06.2010, Mainz*

Kredel LI, Batra A, Zeitz M, Siegmund B: The influence of adipokines on the polarization and responsibility of M1- and M2- macrophages. *Master Class, Mucosal Immunology, with Sidonia Fagarasan (RIKEN, Japan), Per Brandtzaeg (Oslo, Norway), William Agace (Lund, Sweden). 04.-05.06.2009, MHH, Hannover*

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen als Poster präsentiert und teilweise als Abstract veröffentlicht:

Kredel LI, Batra A, Lissner D, Kühl AA, Zeitz M, Siegmund B: Adipokines of the mesenteric fat tissue modulate the immune phenotype of resident macrophages. *Congress of the European Crohn's and Colitis Organization (ECCO), 24.-26.02. 2011, Dublin, Irland*

Kredel LI, Batra A, Fedke I, Kühl AA, Zeitz M, Siegmund B: Adipokines in M1- and M2- macrophage responsiveness. *European Congress of Immunology, 13.-16.09.2009, Berlin*

Batra A, Kredel LI, Freise I, Zeitz M, Siegmund B : Regulation of Macrophage Phenotype in Crohn's Disease Hypertrophied Adipose Tissue. *Gastroenterology*, 2011. 140(5): pp. 487-487

Batra A, **Kredel LI**, Kühl AA, Zeitz M, Siegmund B: Altered local adipokine production in Crohn's disease mesenteric fat - a regulator of macrophage activity? *Digestive Disease Week (DDW), 01.-05.05. 2010 in New Orleans, USA*

Lissner D, Schumann M, Stroh T, **Kredel LI**, Batra A, Kuehl AA, Zeitz M, Siegmund B: Disruption of the Intestinal Barrier Through M1- Macrophages - Relevance for IBD? *Gastroenterology*, 2012. 142(5): Supplement 1, p 887

Lissner D, Batra A, **Kredel LI**, Schumann M, Kühl A, Siegmund B: Polarisation und Funktion von Makrophagen-Subtypen – Relevanz für CED? *Z Gastroenterol* 2013; 51 - K06

10 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

11 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Lea Isabell Kredel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Auswirkung von Adipokinen auf den Immunphänotyp von Makrophagensubpopulationen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Lea Isabell Kredel hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Kredel LI, Batra A, Stroh T, Kühl AA, Zeitz M, Erben U, Siegmund B.: Adipokines from local fat cells shape the macrophage compartment of the creeping fat in Crohn's disease. Gut, 2013. 62(6):852-62

Beitrag im Einzelnen:

Leistungen der Promovendin bestanden in der Planung und Durchführung der Versuche unter Supervision, in der Auswertung und Interpretation der Daten, der Präsentation der Ergebnisse, sowie der Erstellung des Manuskriptes unter Anleitung.

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

12 Danksagungen

Zuerst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Britta Siegmund für die Überlassung des Promotionsthemas, die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, sowie für die kontinuierliche Unterstützung während der experimentellen Phase und im Schreibprozess herzlich bedanken.

Ich danke Dr. Arvind Batra für die Betreuung der Arbeit. Außerdem möchte ich Inka Freise für die praktische Unterstützung im Labor danken, sowie allen Mitarbeitern der AG Siegmund für wichtige Anregungen, Hilfestellung und eine interessante und lehrreiche Zeit.

Dr. Anja Kühl, Katja Dörfel und Simone Spieckermann gilt mein Dank für die praktische Arbeit bei der Herstellung der Schnitte und die Unterstützung nicht nur bei immunhistologischen Themen.

Mein besonderer Dank geht an Dr. Ulrike Erben für ihre unermüdliche Beistand, viele wichtige Hinweise und spannende Diskussionen sowie ihr Vertrauen in mich.

Ich danke dem Graduiertenkolleg „Immuko“ des Sonderforschungsbereiches 633 der Deutschen Forschungsgemeinschaft e.V. für das Lehrangebot sowie die finanzielle Unterstützung.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, insbesondere meiner Mutter, und Felix.