

# **Einfluss einer Thrombininhibition durch Dabigatran auf Entzündungsprozesse im Rahmen von Übergewicht und Atherosklerose**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Kathrin Feldmann**  
aus Arnsberg

Düsseldorf, Februar 2016

aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Jens W. Fischer

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Peter Proksch

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2016

Meiner Familie



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Nicht-Vitamin K-abhängige orale Antikoagulantien.....	1
1.1.1 Dabigatran .....	1
1.2 Thrombin.....	3
1.2.1 Bildung und Struktur .....	3
1.2.2 Funktion in der Hämostase.....	4
1.2.3 Rezeptor-vermittelte Effekte .....	5
1.3 Übergewicht und Adipositas .....	6
1.3.1 Einführung .....	6
1.3.2 Pathophysiologie der Adipositas.....	6
1.3.2.1 Struktur des weißen Fettgewebes.....	6
1.3.2.2 Veränderungen des Fettgewebes bei Übergewicht.....	7
1.3.2.3 Makrophageninfiltration ins Fettgewebe.....	8
1.4 Polarisation von Makrophagen .....	9
1.5 Thrombin im Rahmen von Übergewicht und Atherosklerose.....	10
1.6 Zielsetzung.....	11
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>13</b>
2.1 Tierversuche .....	13
2.1.1 Tiere und Behandlung .....	13
2.1.2 Tests zur Bestimmung der Glukosetoleranz und Insulinsensitivität.....	13
2.1.3 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) .....	14
2.1.4 Probenentnahme und -aufbereitung .....	14
2.1.5 Messung des Hämatogramms.....	15
2.2 Histologie und Immunhistochemie .....	15
2.2.1 Viszerales Fettgewebe .....	15

## Inhaltsverzeichnis

2.2.1.1	Paraffinschnitte von viszeralem Fettgewebe.....	15
2.2.1.2	Bestimmung der Fettzellgröße .....	15
2.2.1.3	Mac-2 Färbung zur Quantifizierung der Makrophagen im Fettgewebe .....	16
2.2.1.4	Für die Immunhistochemie verwendete Antikörper.....	17
2.2.2	Öl-Rot-O Färbung atherosklerotischer Läsionen in der Aorta.....	17
2.3	Zellversuche.....	17
2.3.1	<i>In vitro</i> Differenzierung und Kultivierung muriner 3T3 L1 Präadipozyten .....	17
2.3.1.1	<i>In vitro</i> Differenzierung muriner 3T3 L1 Präadipozyten .....	17
2.3.1.2	Öl-Rot-O Färbung und Quantifizierung.....	18
2.3.1.3	Proliferationsanalyse der 3T3 L1 Präadipozyten.....	19
2.3.1.4	Monozytenbindungsstudie.....	19
2.3.2	Isolation und <i>in vitro</i> Polarisierung muriner Knochenmarksmakrophagen.....	20
2.3.2.1	Isolation und Differenzierung muriner Knochenmarksmakrophagen.....	20
2.3.2.2	<i>In vitro</i> Polarisierung von Knochenmarksmakrophagen .....	21
2.4	Durchflusszytometrie .....	21
2.4.1	Analyse der stromal-vaskulären Fraktion des viszeralen Fettgewebes .....	22
2.4.2	Analyse der zirkulierenden Immunzellen im Blut .....	22
2.4.2.1	Lymphozyten .....	23
2.4.2.2	Monozyten und Neutrophile.....	23
2.4.3	Analyse der Immunzellen der Aortenwand .....	23
2.4.4	Analyse der Polarisierung muriner Knochenmarksmakrophagen.....	24
2.4.5	Durchführung der Antikörper-Färbung für die Durchflusszytometrie .....	24
2.4.5.1	Verwendete Antikörper-Kombinationen in der Durchflusszytometrie .....	25
2.5	Genexpressionsanalyse mittels quantitativer <i>Realtime</i> -PCR.....	26
2.5.1	RNA-Isolation aus 3T3 L1 Zellen und viszeralen Fettgewebeproben.....	26
2.5.2	Quantitative <i>Realtime Polymerase Chain Reaction</i> (qPCR).....	26
2.5.2.1	In der qPCR verwendete Primersequenzen .....	27
2.6	Protein- und Lipoproteinanalytik .....	27
2.6.1	Multiplex-Analyse von Zytokinen und Adipokinen .....	27
2.6.2	Bestimmung der Insulinspiegel im Plasma mittels ELISA .....	28
2.6.3	Bestimmung des Plasmacholesterins.....	28
2.7	Statistische Analyse.....	29

## Inhaltsverzeichnis

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>30</b>
3.1	Einfluss von Dabigatran auf die Entwicklung von Adipositas und Insulinresistenz ..	30
3.1.1	Fettzellgröße und Fettzellgrößenverteilung im viszeralen Fettgewebe .....	30
3.1.2	Gewichtszunahme und Körperfettanteil.....	32
3.1.3	Proliferation und <i>in vitro</i> Differenzierung muriner 3T3 L1 Präadipozyten nach Stimulation mit Thrombin .....	33
3.1.4	Entzündung des viszeralen Fettgewebes .....	36
3.1.4.1	Immunzellpopulationen im viszeralen Fettgewebe .....	36
3.1.4.2	Expression und Sekretion pro- und anti-entzündlicher Zytokine im viszeralen Fettgewebe.....	39
3.1.5	Entwicklung von Glukosetoleranz und Insulinresistenz .....	41
3.2	Einfluss von Thrombin und Dabigatran auf die Makrophagenbindung und - polarisation.....	46
3.2.1	Monozytenbindung an differenzierte 3T3 L1 Adipozyten.....	46
3.2.2	Polarisierung von Makrophagen .....	46
3.2.2.1	Direkter Effekt von Thrombin auf die Polarisierung von Makrophagen .....	47
3.2.2.2	Indirekter Effekt von Thrombin auf die Polarisierung von Makrophagen ...	49
3.2.2.3	Effekt von Fettgewebe aus mit Dabigatran behandelten Mäusen auf die Polarisierung von Makrophagen.....	51
3.2.2.4	mRNA-Expression in mit Thrombin stimulierten 3T3 L1 Zellen.....	52
3.2.2.5	Effekt der im Fettgewebe regulierten Zytokine auf die Polarisierung von Makrophagen.....	53
3.3	Einfluss von Dabigatran auf zirkulierende Immunzellen und Zytokine.....	54
3.3.1	Hämatogramm .....	55
3.3.2	Zirkulierende Immunzellen.....	55
3.3.3	Zytokine im Plasma .....	58
3.4	Einfluss von Dabigatran auf die Makrophagenpolarisation in atherosklerotischen Läsionen.....	59
3.4.1	Atherosklerotische Läsionen in der Aorta .....	60
3.4.2	Makrophagenpolarisation in der Aorta.....	61
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>64</b>
4.1	Einfluss von Dabigatran auf Morphologie und Inflammation des Fettgewebes .....	64
4.1.1	Modell- und substanzabhängige Effekte.....	67

## Inhaltsverzeichnis

4.2	Einfluss von Dabigatran auf zirkulierende Zytokine und Immunzellen.....	68
4.3	Einfluss von Dabigatran auf die Makrophagenpolarisation in atherosklerotischen Läsionen der Aorta.....	69
4.4	Limitierung und Ausblick.....	71
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>73</b>
<b>6</b>	<b>Summary.....</b>	<b>74</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>75</b>
	<b>Appendix.....</b>	<b>88</b>
	<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>100</b>
	Originalarbeiten.....	100
	Kongressbeiträge.....	101
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>102</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>103</b>
	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>104</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Struktur Dabigatranetexilat und Dabigatran .....	2
Abbildung 2. Studiendesign.....	13
Abbildung 3. Differenzierungsprotokoll 3T3 L1. ....	18
Abbildung 4. Gradientenzentrifugation Ficoll Paque. ....	20
Abbildung 5. Fettzellgröße und Fettzellgrößenverteilung im viszeralen Fettgewebe. ....	31
Abbildung 6. Gewichtszunahme, Body-Mass-Index und Körperfettanteil. ....	33
Abbildung 7. Differenzierung und Proliferation mit Thrombin stimulierter 3T3 L1 Zellen. .	35
Abbildung 8. Makrophageninfiltration im viszeralen Fettgewebe. ....	37
Abbildung 9. Immunzellpopulationen im viszeralen Fettgewebe.....	38
Abbildung 10. mRNA-Expression pro- und anti-entzündlicher Zytokine im viszeralen Fettgewebe.....	40
Abbildung 11. Zytokinsekretion des viszeralen Fettgewebes.....	41
Abbildung 12. Nüchternglukosekonzentration nach 7-9 Wochen Behandlung mit Dabigatran.....	42
Abbildung 13. Glukose-, Insulin- und Adipokinkonzentration nach 17-20 Wochen Behandlung. ....	43
Abbildung 14. Glukosetoleranz und Insulinsensitivität nach 7-9 Wochen Behandlung.....	44
Abbildung 15. Glukosetoleranz und Insulinsensitivität nach 17-19 Wochen Behandlung.	45
Abbildung 16. Monozytenbindung an 3T3 L1 Adipozyten. ....	46
Abbildung 17. mRNA-Expression Knochenmarksmakrophagen.....	48
Abbildung 18. Durchflusszytometrische Analyse mit Thrombin stimulierter Knochenmarksmakrophagen.....	49
Abbildung 19. Polarisierung von Makrophagen nach Stimulation mit konditioniertem Medium von 3T3 L1 Zellen. ....	50
Abbildung 20. Polarisierung von Makrophagen nach Stimulation mit konditioniertem Medium des viszeralen Fettgewebes. ....	52
Abbildung 21. mRNA Expression 3T3 L1 Zellen. ....	53
Abbildung 22. Effekte der im Fettgewebe regulierten Zytokine auf die Makrophagenpolarisation. ....	54
Abbildung 23. Hämatogramm.....	55
Abbildung 24. Immunzellpopulationen im Blut. ....	56
Abbildung 25. Monozytenpopulationen im Blut. ....	58
Abbildung 26. Zytokinkonzentration im Plasma. ....	59
Abbildung 27. Quantifizierung atherosklerotischer Läsionen der Aorta. ....	60

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 28. Plasmacholesterol.....	61
Abbildung 29. Makrophagenpopulationen in der Aorta.....	62
Abbildung 30. Schema zur durchflusszytometrischen Analyse der Makrophagen im viszeralen Fettgewebe.....	93
Abbildung 31. Schema zur durchflusszytometrischen Analyse der Lymphozyten im viszeralen Fettgewebe.....	94
Abbildung 32. Schema zur durchflusszytometrischen Analyse der Neutrophilen im viszeralen Fettgewebe.....	95
Abbildung 33. Schema zur durchflusszytometrischen Analyse <i>in vitro</i> polarisierter Makrophagen.....	96
Abbildung 34. Schema zur durchflusszytometrischen Analyse der Lymphozyten im Blut.....	97
Abbildung 35. Schema zur durchflusszytometrischen Analyse der Neutrophilen und Monozyten im Blut.....	98
Abbildung 36. Repräsentatives Schema zur durchflusszytometrischen Analyse der Makrophagen in der Aortenwand.....	99

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Antikörper Immunhistochemie. ....	17
Tabelle 2. In der Durchflusszytometrie verwendete Antikörper-Kombinationen.....	25
Tabelle 3. In der qPCR verwendete Primersequenzen. ....	27
Tabelle 4. Verwendete Nährmedien in der Zellkultur .....	89
Tabelle 5. Puffer und Lösungen Histologie, Immunhistochemie und Zellfärbungen. ....	90
Tabelle 6. Verwendete Substanzen und Lösungen in der Zellkultur .....	91
Tabelle 7. In der Durchflusszytometrie verwendete Puffer und Lösungen.....	92

# Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
APC/Cy7	Allophycocyanin-Cyanin7 Tandem-Konjugat
<i>ApoE</i>	<i>Apolipoprotein E</i>
<i>Arg1</i>	<i>Arginase 1</i>
AUC	<i>area under the curve</i> ; Fläche unter der Kurve
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Bovines Serumalbumin
Calcein-AM	Calcein-Acetoxymethylester
CCL	CC-Chemokinligand
CCR	CC-Chemokinrezeptor
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CLS	<i>crown-like structure</i>
CXCL	CXC-Chemokinligand
CYP	Zytochrom P
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
ECACC	<i>European Collection of Authenticated Cell Cultures</i>
F	Faktor
FBS	Fetales bovines Serum
FSC	<i>forward scatter</i> , Vorwärtsstreulicht
<i>Gapdh</i>	<i>Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase</i>
G-CSF	<i>granulocyte colony stimulating factor</i> ; Granulozyten-Kolonien-stimulierender Faktor
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i> ; Granulozyten-Makrophagen-Kolonien-stimulierender Faktor
GTT	Glukosetoleranztest
H&E	Hämatoxylin & Eosin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HDL	<i>High-density-lipoprotein</i>
hg	<i>high glucose</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> ; Meerrettichperoxidase
I.E.	Internationale Einheit

## Abkürzungsverzeichnis

i.p.	intraperitoneal
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare NO-Synthase 2 ( <i>Nos2</i> )
Isoton	Coulter® Isoton II Diluent
IST	Insulinsensitivitätstest
KG	Körpergewicht
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
<i>Ldlr</i>	<i>low density lipoprotein</i> Rezeptor
<i>LepR</i>	Leptin Rezeptor
LPS	Lipopolysaccharid
Mac-2	Galektin-3
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i> (CCL-2)
M-CSF	<i>macrophage colony stimulating factor</i> ; Makrophagenkolonien-stimulierender Faktor
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
<i>Mrc1</i>	Mannoserezeptor, C Typ 1 (CD206)
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernspinresonanzspektroskopie
NOAK	Nicht-Vitamin K-abhängige orale Antikoagulantien
<i>Nos2</i>	<i>Induzierbare NO-Synthase 2</i> (iNOS)
ORO	Öl-Rot-O
p.o.	peroral
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> ; Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PE/Cy7	Phycoerythrin-Cyanin7 Tandem-Konjugat
Poly(I:C)	Poly(Inosin:Cytosin)
qPCR	<i>Quantitative Realtime Polymerase Chain Reaction</i>
RANTES	<i>Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i> (CCL-5)
<i>Rn18s</i>	<i>18S ribosomale RNA</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> -Nährmedium
SEM	<i>Standard error of the mean</i> ; Standardfehler
SSC	<i>side scatter</i> , Seitwärtsstreulicht

## Abkürzungsverzeichnis

Tab.	Tabelle
TLR	<i>Toll-like-receptor</i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
U	<i>Unit</i> , Enzymeinheit
VLDL	<i>Very low-density-lipoprotein</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
z. B.	zum Beispiel

# 1 Einleitung

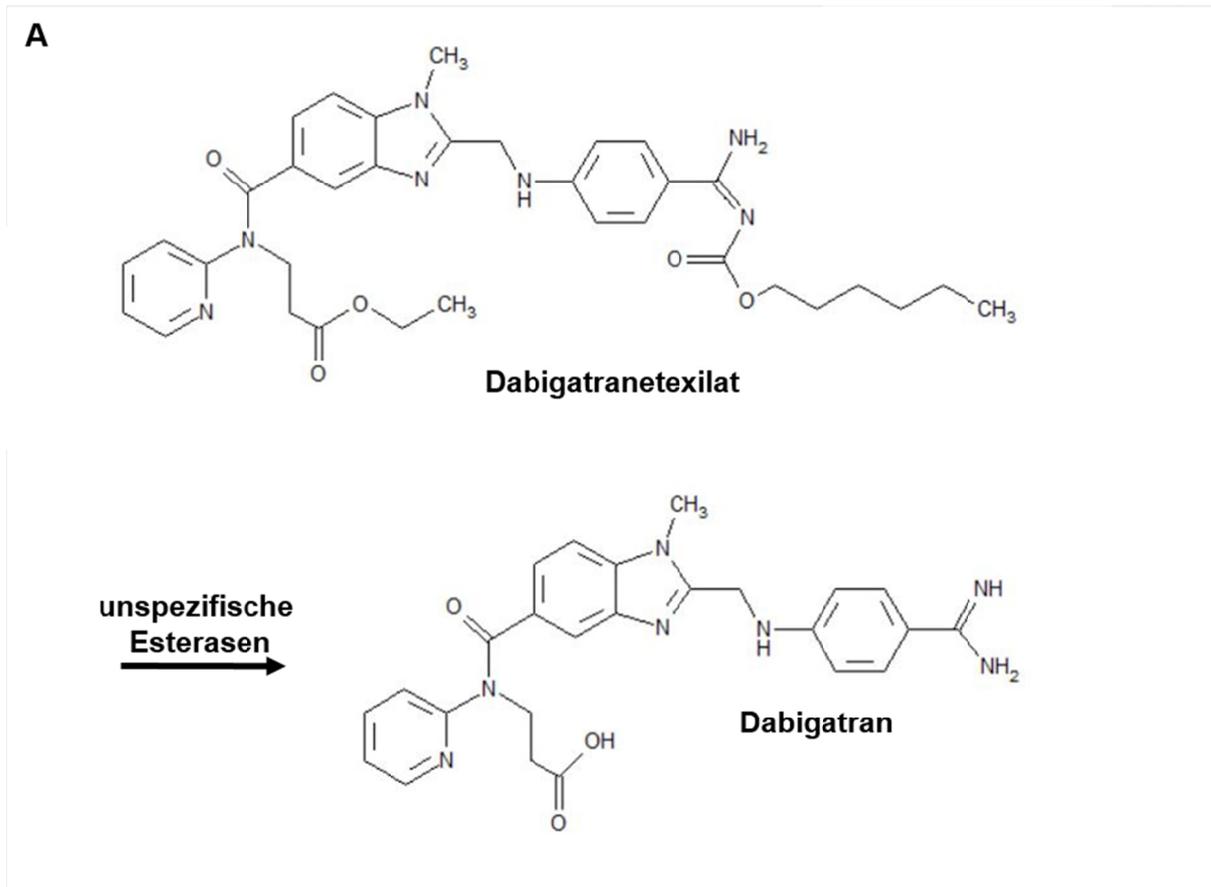
## 1.1 Nicht-Vitamin K-abhängige orale Antikoagulantien

Seit 2008 wurden in der europäischen Union vier neue Wirkstoffe zugelassen, die die Gruppe der Nicht-Vitamin K-abhängigen oralen Antikoagulantien (NOAK) bilden.<sup>1, 2</sup> Dazu gehören der direkte Thrombininhibitor Dabigatran (Pradaxa<sup>®</sup>, Boehringer Ingelheim, Biberach an der Riß), sowie die Faktor Xa-Inhibitoren Rivaroxaban, Apixaban und Edoxaban. Ziel bei der Entwicklung dieser Substanzen war es, eine oral bioverfügbare Alternative zu den Vitamin K-abhängig wirksamen Kumarinen Warfarin und Phenprocoumon zu finden. Letztere weisen einige Nachteile auf, z.B. einen verzögerten Eintritt der antithrombotischen Wirkung, ein hohes Wechselwirkungspotential sowohl mit Lebens- als auch mit anderen Arzneimitteln sowie eine regelmäßig durchzuführende Überprüfung und Anpassung der Dosierung, die durch die neuen Substanzen umgangen werden sollten.<sup>2-4</sup>

Seit der Markteinführung stieg die Verordnung der NOAK deutlich an. So betrug der Anteil der NOAK an den für gesetzlich versicherte Patienten insgesamt verordneten oralen Antikoagulantien in Jahr 2014 35 %.<sup>1</sup>

### 1.1.1 Dabigatran

Bei dem direkten Thrombininhibitor Dabigatran handelt es sich um ein niedermolekulares, trisubstituiertes Benzimidazolderivat, das kompetitiv und reversibel an das aktive Zentrum von Thrombin bindet.<sup>5, 6</sup> Da Dabigatran aufgrund seiner hohen Polarität selbst nicht oral bioverfügbar ist, wird es als lipophiles Prodrug Dabigatranetexilat appliziert (Abb. 1).<sup>5</sup>



**Abbildung 1. Struktur Dabigatranetexilat und Dabigatran**

**A** Das Prodrug Dabigatranetexilat wird durch unspezifische Esterasen in das aktive Dabigatran umgewandelt. Abbildung modifiziert nach Haeucl *et al.*<sup>5</sup>

Die orale Bioverfügbarkeit von Dabigatranetexilat liegt bei 6,5 %.<sup>7</sup> Da für die Absorption ein saures Milieu notwendig ist, wird Dabigatranetexilat in Form von weinsäurehaltigen Pellets, die in Kapseln verpackt sind, appliziert und so unabhängig vom pH-Wert des Magens resorbiert.<sup>3</sup>

Nach der Resorption wird Dabigatranetexilat schnell und vollständig durch unspezifische Esterasen im Darm, in der Leber und im Plasma zum aktiven Metaboliten Dabigatran hydrolysiert.<sup>7, 8</sup> Dieser inhibiert mit einer  $K_i$  von 4,5 nmol/l sowohl freies wie auch Fibrin-gebundenes Thrombin.<sup>4, 6, 7</sup> Die Halbwertszeit von Dabigatran beträgt ca. 9 Stunden in gesunden Patienten und die Elimination erfolgt hauptsächlich (zu 80 %) renal. Nur ca. 20 % werden in der Leber glucuronidiert und anschließend biliär eliminiert.<sup>7, 8</sup> Der Metabolismus von Dabigatran erfolgt unabhängig von Zytochrom P (CYP) 450-Enzymen, so dass kein Wechselwirkungspotential mit Inhibitoren oder Induktoren der CYP-Enzyme besteht.<sup>7</sup> Allerdings ist Dabigatranetexilat ein Substrat des p-Glykoproteins, so dass Inhibitoren wie Verapamil zu einer Erhöhung der Dabigatranplasmakonzentration führen können.<sup>3, 4</sup>

In Studien zur Prophylaxe venöser Thromboembolien in Patienten nach Hüft- oder Kniegelenksersatzoperation erwies sich Dabigatran als ähnlich wirksam und sicher wie Enoxaparin.<sup>9-11</sup> Auch im Vergleich mit Warfarin bei der Behandlung akuter venöser Thromboembolien war Dabigatran der Standardtherapie nicht unterlegen.<sup>12, 13</sup> In der RE-LY Studie zur Anwendung von Dabigatran bei Patienten mit nicht-valvulärem Vorhofflimmern wurde ebenfalls gezeigt, dass Dabigatran in einer Dosierung von zweimal täglich 110 mg eine ähnliche Wirksamkeit wie Warfarin, in einer Dosierung von zweimal täglich 150 mg sogar eine überlegene Wirksamkeit hat. Dabei war das Blutungsrisiko in der geringen Dosierung niedriger als unter Warfarin-Therapie, in der höheren Dosierung vergleichbar.<sup>14, 15</sup> Derzeit ist Dabigatran in der Europäischen Union zur Primärprävention venöser Thromboembolien nach elektivem Hüft- oder Kniegelenksersatz, zur Behandlung und Prophylaxe venöser Thromboembolien, sowie zur Schlaganfallprävention bei Patienten mit nicht-valvulärem Vorhofflimmern mit mindestens einem weiteren Risikofaktor zugelassen.<sup>2</sup>

Darüber hinaus konnte in Studien an *Apolipoprotein E-defizienten (ApoE<sup>-/-</sup>)* Mäusen bereits gezeigt werden, dass Dabigatran die Entstehung atherosklerotischer Läsionen hemmt und die Stabilität der atherosklerotischen Plaques erhöht.<sup>16-19</sup> Als möglicher Mechanismus wird hier eine Inhibition Thrombin-vermittelter Entzündungsprozesse diskutiert.<sup>16, 18</sup> Auch Studien zu anderen entzündlichen Erkrankungen, wie z.B. der nichtalkoholischen Steatohepatitis oder Morbus Alzheimer,<sup>20,21</sup> weisen auf einen protektiven Effekt einer Thrombininhibition durch Dabigatran hin.

## 1.2 Thrombin

### 1.2.1 Bildung und Struktur

Thrombin (Faktor (F) IIa) ist eine Serinprotease, die bei der Blutgerinnung eine zentrale Funktion einnimmt.<sup>22-25</sup>

Das aktive Thrombin ist ein 35,5 kDa großes Protein, das aus einer *light chain* und einer *heavy chain* besteht, die durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind.<sup>23</sup> Neben dem aktiven Zentrum zur proteolytischen Spaltung der Substrate, bestehend aus der katalytischen Triade, dem Oxyanion-Loch und Regionen, die der Substraterkennung dienen, besitzt es noch zwei weitere charakteristische Strukturen, die für die hohe Substratspezifität, sowie die Bindung von Kofaktoren und Inhibitoren essentiell sind. Diese werden als *anion binding exosites I* und *II* bezeichnet und interagieren spezifisch mit negativ geladenen Strukturen der Substrate und Kofaktoren.<sup>25, 26</sup> So wird die *anion binding exosite I* z.B. für die Bindung von Fibrinogen benötigt und spielt unter anderem ebenfalls eine Rolle bei der

Erkennung von FV, FVIII und Thrombomodulin. Die *anion binding exosite II* wird auch *heparin-binding exosite* genannt, ist aber auch in die Bindung anderer Substrate und Kofaktoren involviert. Des Weiteren findet sich noch eine Bindestelle für Natriumionen. Die Bindung von Natrium stabilisiert Thrombin im aktiven Zustand.<sup>22-24, 27</sup>

Thrombin liegt im Blut in der Form des inaktiven Zymogens Prothrombin vor, das erst im Rahmen der Hämostase proteolytisch zum aktiven Thrombin gespalten wird. Prothrombin wird in der Leber zunächst als Prä-Pro-Prothrombin gebildet und nach posttranslationaler Modifikation (Abspaltung des Signalpeptids, Vitamin K-abhängige  $\gamma$ -Carboxylierung von Glutamatresten, Abspaltung des Propeptids, Glykosylierung) als Prothrombin ins Blut sezerniert. Kommt es bei einer Endothelverletzung zur Aktivierung der Gerinnungskaskade, wird in der Endphase Prothrombin durch den Prothrombinasekomplex, der aus dem aktivierten Gerinnungsfaktor Xa (FXa), dem Kofaktor Va (FVa), sowie negativ geladenen Phospholipiden der Oberfläche aktivierter Thrombozyten und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen besteht, proteolytisch gespalten.<sup>23, 28</sup> Hierbei spielen die  $\gamma$ -Carboxylglutamat-Reste eine wichtige Rolle, die die Bindung von Prothrombin über  $\text{Ca}^{2+}$  an die Thrombozytenoberfläche ermöglichen und so zur Annäherung von Prothrombin und Prothrombinase-Komplexes führen.<sup>23</sup> Der Prothrombinase-Komplex spaltet Prothrombin an zwei Stellen. Dabei entsteht zunächst die bereits katalytisch aktive Zwischenform Meizothrombin, welche dann durch Abspaltung des Fragments 1.2 in  $\alpha$ -Thrombin umgewandelt wird.<sup>22, 23, 28</sup>

### 1.2.2 Funktion in der Hämostase

Im Rahmen der Hämostase ist die Bildung und Inhibition von Thrombin streng reguliert.<sup>29</sup> Die Initiierung der Blutgerinnung erfolgt zunächst unabhängig von Thrombin.<sup>22</sup> Bei Endothelverletzungen kommt es zur Freilegung des subendothelial exprimierten *Tissue Factors*, der im Komplex mit FVIIa, proteolytisch FIX zu FIXa sowie FX zu FXa aktiviert. Letzterer wiederum spaltet dann zunächst kleine Mengen an Prothrombin. Das so gebildete Thrombin aktiviert dann die Kofaktoren FV und FVIII.<sup>22, 23</sup> Letzterer ist ein Kofaktor für die Aktivierung von FX durch FIXa, während FVa als Kofaktor im Prothrombinase-Komplex die Bildung von Thrombin katalysiert. Durch diesen positiven Verstärkungsmechanismus fördert Thrombin seine eigene Aktivierung. Eine weitere wichtige Funktion des FIIa ist die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin, welches dann spontan polymerisiert und ein Fibrinnetzwerk bildet. Für diese wichtigsten prokoagulatorischen Funktionen von Thrombin sind keine Kofaktoren notwendig.<sup>22</sup> Das gebildete Fibrin wirkt dann wiederum selbst als Kofaktor bei der Thrombin-abhängigen Aktivierung von FXIII, der als Transglutaminase eine kovalente Quervernetzung der Fibrinfäden katalysiert und das entstehende Netzwerk so stabilisiert.<sup>22</sup> Die Bindung von Thrombin an Fibrin bewirkt außerdem, dass aktiviertes Thrombin sich vor

allem lokal im entstehenden Blutgerinnsel anreichert. Des Weiteren induziert Thrombin durch proteolytische Aktivierung von Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR) die Plättchenaktivierung.<sup>22</sup>

Eine Regulation der Thrombinfunktion erfolgt durch Thrombomodulin, das auf Endothelzellen exprimiert wird und ebenfalls als Kofaktor an Thrombin bindet. Da es eine höhere Bindungsaffinität hat als Fibrin, wird Thrombin, wenn intaktes Endothel vorhanden ist, vom Fibrinnetzwerk entfernt und an Thrombomodulin gebunden. Diese Bindung erhöht die Affinität von Thrombin für Protein C, einem antikoagulatorischen Protein, das nach Aktivierung durch Thrombin zusammen mit seinem Kofaktor Protein S die Faktoren V und VIII inhibiert und so die Thrombinbildung inhibiert.<sup>22</sup> Außerdem hemmt Thrombin im Komplex mit Thrombomodulin auch die Fibrinolyse durch Aktivierung des *thrombin-activated fibrinolysis inhibitors*, der durch Abbau von Lysinresten die Bindung fibrinolytischer Proteine verhindert.<sup>22, 23, 25</sup>

Die Inaktivierung von Thrombin erfolgt durch Serinprotease-Inhibitoren, wie Antithrombin oder Heparin-Kofaktor II.<sup>30, 31</sup> Thrombin bindet an Antithrombin oder Heparin-Kofaktor II und spaltet diese proteolytisch, wodurch ein inaktiver Komplex entsteht. Die inhibitorische Wirkung von Antithrombin und Heparin-Kofaktor II wird durch die Bindung von Glucosaminoglykanen (z.B. Heparin, Heparansulfat oder Dermatansulfat) verstärkt.<sup>22, 30, 31</sup>

### 1.2.3 Rezeptor-vermittelte Effekte

Neben seiner Rolle als zentrale Protease in der Hämostase, zeigt Thrombin auch direkte, rezeptorabhängige Wirkungen auf Zellen. Diese werden durch sogenannte Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) vermittelt.<sup>32-35</sup> PARs sind eine Gruppe G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, die durch proteolytische Spaltung aktiviert werden. Bisher sind vier Rezeptoren dieser Gruppe (PAR 1-4) bekannt, von denen Thrombin PAR-1, -3 und -4 aktiviert.<sup>35-37</sup> Die Aktivierung erfolgt durch proteolytische Spaltung der extrazellulären, N-terminalen Domäne des Rezeptors durch Thrombin, wodurch ein neuer N-Terminus entsteht, der als gebundener Ligand fungiert und durch intramolekulare Bindung an den Rezeptor die intrazelluläre Signaltransduktion aktiviert.<sup>32, 34, 36</sup> Diese erfolgt durch Kopplung an G-Proteine der G<sub>i</sub>, G<sub>q</sub> oder G<sub>12/13</sub> Familie.<sup>33</sup> PAR-1 und PAR-3 zeigen eine höhere Affinität zu Thrombin als PAR-4, da sie eine Hirudin-ähnliche Sequenz aufweisen, über die sie an die *anion-binding exosite I* von Thrombin binden können.<sup>34, 38</sup> Diese Sequenz fehlt im PAR-4 Rezeptor, wodurch für dessen Aktivierung höhere Thrombinkonzentrationen nötig sind.<sup>33, 34</sup>

Diese Form der PAR-vermittelten Thrombinwirkung spielt bei der Thrombozytenaktivierung eine wichtige Rolle,<sup>39</sup> aber auch bei vielen inflammatorischen Prozessen. So konnte gezeigt werden, dass Thrombin die Einwanderung von Immunzellen in das subendotheliale Gewebe

fördert, indem es einerseits die Permeabilität des Endothels erhöht,<sup>40-42</sup> andererseits auch die Bindung und die Extravasation von Neutrophilen, Monozyten und Lymphozyten verstärkt.<sup>43-50</sup> Außerdem induziert Thrombin, ebenfalls PAR-vermittelt, die Proliferation glatter Muskelzellen,<sup>51, 52</sup> sowie die Migration von Monozyten.<sup>53</sup> In einer Vielzahl von Zellen stimuliert Thrombin die Expression pro-inflammatorischer Zytokine.<sup>54</sup> So kommt es z.B. in Endothelzellen und Monozyten zur vermehrten Expression von *Monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1, CC-Chemokinligand (CCL)-2), das wiederum die Monozytenmigration fördert.<sup>55, 56</sup> Sowohl in Endothel- als auch in glatten Muskelzellen führt Thrombin zur Ausbildung eines pro-inflammatorischen Phänotyps mit vermehrter Sekretion von IL-6.<sup>57, 58</sup> Humane Monozyten bilden nach einer Stimulation mit Thrombin ebenfalls verstärkt pro-inflammatorische Zytokine, wie Interleukin (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$ , CCL-3, CCL-4, CXC-Chemokinligand (CXCL)-2 und CXCL-4.<sup>57, 59, 60</sup> Diese Rezeptor-vermittelten Effekte von Thrombin spielen z. B. bei der Pathogenese der Atherosklerose<sup>16-19, 61</sup> oder auch der nichtalkoholischen Steatohepatitis<sup>20, 62, 63</sup> eine Rolle, deren Entwicklung im Mausmodell durch die Behandlung mit Thrombininhibitoren gehemmt werden kann.

## 1.3 Übergewicht und Adipositas

### 1.3.1 Einführung

Die Prävalenz von Übergewicht hat sich in den letzten 35 Jahren weltweit nahezu verdoppelt.<sup>64</sup> Die *World Health Organisation* (WHO) klassifiziert Übergewicht und Adipositas anhand des Body-Mass-Index (BMI): Personen mit einem BMI  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup> gelten als übergewichtig, mit einem BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> als adipös. In Deutschland waren 2014 über 50 % der Erwachsenen übergewichtig, ca. 20 % adipös.<sup>64</sup> Ein erhöhter BMI steigert das Risiko für die Entstehung von Folgeerkrankungen und ist mit einer erhöhten Mortalität durch ischämische Herzerkrankungen, Schlaganfälle, Diabetes und bestimmte Arten von Krebs assoziiert.<sup>64, 65</sup> Weltweit waren in 2013 4,4 Millionen Todesfälle auf Übergewicht zurückzuführen.<sup>66</sup> Ziel der WHO ist es, die weltweite Zunahme von Übergewicht und Diabetes zu stoppen.

### 1.3.2 Pathophysiologie der Adipositas

#### 1.3.2.1 Struktur des weißen Fettgewebes

Das weiße Fettgewebe, das neben seiner Funktion als Energiespeicher auch eine wichtige Rolle als endokrines Organ spielt,<sup>67</sup> besteht aus einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen.

Nur 25 % der Zellen sind reife, zur Fettspeicherung dienende Fettzellen (Adipozyten), in deren Innerem die gespeicherten Lipide einen einzelnen, konfluenten Lipidtropfen bilden, der ca. 90 % des Zellvolumens ausmacht. Die Lipide liegen hauptsächlich in Form von Triacylglyceriden, aber auch als Diacylglyceride, Phospholipide, freie Fettsäuren und Cholesterin vor. Um zur Anpassung an eine vermehrte Energiezufuhr die Speicherkapazität für Lipide zu erhöhen, können Adipozyten ihr Volumen um das bis zu 1000-fache erhöhen.

Die restlichen 75 % der Zellen des weißen Fettgewebes bilden die stromal-vaskuläre Fraktion. Dazu gehören Makrophagen, Fibroblasten, Perizyten, Blutzellen, Endothelzellen und unreife Adipozytenvorläuferzellen (Präadipozyten).<sup>68</sup>

Sowohl die Adipozyten, als auch die Zellen der stromal-vaskulären Fraktion sezernieren eine Vielzahl von Faktoren und bilden ein komplexes Netzwerk para- und autokriner Regulation.<sup>68</sup>

Weißes Fettgewebe bildet im Körper verschiedene Fettdepots. Anhand ihrer anatomischen Lokalisation erfolgt eine Einteilung in subkutanes und innenliegendes Fettgewebe, letzteres wird weiter in viszerales und nicht-viszerales Fettgewebe unterteilt.<sup>69</sup> Insbesondere das viszerale, intraabdominale Fettgewebe scheint in Bezug auf die Entwicklung von Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2 eine entscheidende Rolle zu spielen<sup>70-72</sup> und wird im Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht.

### 1.3.2.2 Veränderungen des Fettgewebes bei Übergewicht

Das der Entstehung von Übergewicht zugrunde liegende Ungleichgewicht in Energiezufuhr und -verbrauch bedingt eine Vergrößerung der Masse an weißem Fettgewebe, um die überschüssig zugeführte Energie speichern zu können. Diese Vergrößerung des weißen Fettgewebes wird zum einen durch eine Erhöhung des Adipozytenvolumens (Adipozytenhypertrophie), zum anderen durch eine Erhöhung der Anzahl reifer Adipozyten durch vermehrte Differenzierung unreifer Präadipozyten zu reifen Adipozyten (Adipozytenhyperplasie) erreicht.<sup>73, 74</sup> Hierbei handelt es sich um einen periodischen Prozess, bei dem eine Expansion der Fettgewebsmasse zunächst primär durch die Entwicklung einer Adipozytenhypertrophie erfolgt. Reicht diese nicht mehr aus, kommt es im Folgenden zur Rekrutierung neuer Adipozyten und somit zu einer Erhöhung der Zellzahl.<sup>75-77</sup>

Eine Adipozytenhypertrophie geht einher mit erhöhtem oxidativen Stress, der zur vermehrten Freisetzung freier Fettsäuren aus den Adipozyten, sowie zur vermehrten Bildung pro-inflammatorischer Zytokine, wie IL-6 oder *Monocyte chemoattractant protein* (MCP)-1, führt.<sup>78</sup> Außerdem werden hypertrophe Adipozyten dysfunktional und es kommt, insbesondere im viszeralen Fettgewebe, zum Absterben der hypertrophen Zellen, wobei der hier zugrunde liegende Mechanismus Merkmale sowohl von Apoptose als auch Nekrose

aufweist.<sup>75, 76</sup> Das Absterben der Adipozyten und die vermehrte Expression inflammatorischer Zytokine, führt zu einer Infiltration von Makrophagen ins Fettgewebe, die sich in charakteristischen *crown-like structures* (CLS) um die toten Adipozyten anlagern.<sup>75, 76,</sup>  
79

### 1.3.2.3 Makrophageninfiltration ins Fettgewebe

Die im weißen Fettgewebe bei Übergewicht freigesetzten inflammatorischen Mediatoren führen zu einer vermehrten Infiltration von Makrophagen.<sup>79</sup> In nicht-übergewichtigen Mäusen machen Makrophagen nur ca. 10 % der im Fettgewebe vorhandenen Zellen aus. Sie liegen einzeln, im Fettgewebe verstreut vor. Bei Übergewicht kommt es zu einer starken Erhöhung der Makrophagenanzahl auf bis zu 50 % der Gesamtzellzahl im Fettgewebe und die infiltrierenden Makrophagen liegen nun in charakteristischen CLS vor, die tote Adipozyten umgeben und für deren Abbau verantwortlich sind.<sup>76, 79</sup> Der Mechanismus, der der Makrophageninfiltration ins Fettgewebe zugrunde liegt, ist bislang noch nicht vollständig bekannt. MCP-1 scheint jedoch in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle zu spielen. So konnte gezeigt werden, dass aus Adipozytenprogenitorzellen freigesetztes MCP-1 an der frühen Infiltration von Makrophagen beteiligt ist.<sup>80</sup> Studien an Mäusen, in denen MCP-1 fettgewebsspezifisch überexprimiert wurde, sowie Untersuchungen an CC-Chemokinrezeptor (CCR)-2-defizienten Mäusen, belegen einen Einfluss von MCP-1 auf die Makrophageninfiltration ins Fettgewebe.<sup>81, 82</sup> Untersuchungen an MCP-1-defizienten Mäusen kamen jedoch zu widersprüchlichen Ergebnissen.<sup>81, 83, 84</sup> Neuere Untersuchungen weisen auch auf eine Beteiligung von IL-6 hin,<sup>85</sup> wobei hier die Art der Signaltransduktion eine Rolle zu spielen scheint. So wurde gezeigt, dass das so genannte *trans-signalling*, bei dem eine Komplex aus IL-6 und seinem löslichen Rezeptors an Glykoprotein130 bindet und so die Signaltransduktion aktiviert,<sup>86</sup> die Chemotaxis von Makrophagen induziert.<sup>85</sup> Mäuse, bei denen spezifisch diese Form der Signaltransduktion inaktiviert war, zeigten eine verminderte Makrophagenakkumulation im Fettgewebe.<sup>85</sup> Eine Deletion des IL-6-Rezeptors in myeloiden Zellen führte jedoch zu erhöhten Makrophagenzahlen im Fettgewebe.<sup>87</sup> Neben der Anzahl der Makrophagen im Fettgewebe, ändert sich bei Übergewicht auch deren Phänotyp.<sup>88-91</sup> Die im Fettgewebe schlanker Mäuse vorliegenden, residenten Makrophagen zeigen einen anti-inflammatorischen, sogenannten M2-polarisierten Phänotyp, der durch die Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine, wie IL-10 gekennzeichnet ist. Im Gegensatz dazu sind die bei Übergewicht infiltrierenden Makrophagen durch die Expression von *Cluster of Differentiation* (CD) 11c gekennzeichnet und exprimieren einen pro-inflammatorischen M1-polarisierten Phänotyp.<sup>88, 92, 93</sup> Während die residenten M2-polarisierten Makrophagen inflammatorischen Veränderungen des Fettgewebes entgegenwirken und vor der Entstehung

einer Glukosetoleranz und Insulinresistenz schützen,<sup>94</sup> sezernieren die CD11c<sup>+</sup> Makrophagen pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6, die eine entzündliche Veränderung des Fettgewebes weiter befeuern.<sup>88, 93, 95</sup> Aus hypertrophen Adipozyten sezernierte freie Fettsäuren verstärken die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$ ) aus CD11c<sup>+</sup> Makrophagen.<sup>93</sup> Diese aktivieren ihrerseits in Adipozyten die Lipolyse, sowie ebenfalls die Expression pro-inflammatorischer Faktoren (MCP-1, IL-6).<sup>96, 97</sup> Weiterhin hemmen TNF- $\alpha$  und IL-6 die Differenzierung von Präadipozyten zu reifen Adipozyten sowie die metabolischen Funktionen reifer Adipozyten.<sup>98, 99</sup> Es entsteht also ein „parakriner Zyklus“<sup>96</sup>, der die entzündlichen Veränderungen im Fettgewebe weiter fördert. Diese chronische Entzündung des Fettgewebes ist an der Entstehung von Folgeerkrankungen, wie Insulinresistenz oder Atherosklerose, beteiligt.<sup>100, 101</sup>

### 1.4 Polarisierung von Makrophagen

Makrophagen sind Zellen des mononukleären Phagozytensystems, die nach Einwanderung zirkulierender Monozyten aus dem Blut im Gewebe zu reifen Makrophagen differenzieren.<sup>89, 102</sup> Sie bilden eine sehr heterogene Zellgruppe mit variablem Phänotyp, der aufgrund lokaler, im Gewebe freigesetzter Faktoren (z.B. Zytokinen) unterschiedlich ausgeprägt sein kann (Polarisierung oder Polarisierung).<sup>103-105</sup> Die Polarisierung von Makrophagen ist nicht irreversibel, sondern passt sich dynamisch an physiologische Veränderungen im Gewebe an.<sup>89, 106</sup>

Eine erste Klassifizierung unterschiedlich polarisierter Makrophagen erfolgte in klassisch und alternativ aktivierte Makrophagen,<sup>107</sup> die in Analogie zur Nomenklatur der T-Helferzellen auch als M1- und M2-polarisierte Makrophagen bezeichnet wurden.<sup>103, 106</sup> Diese repräsentieren die beiden extremen Zustände der Makrophagenpolarisierung und sind *in vitro* bereits gut charakterisiert. Eine M1-Polarisierung erfolgt durch Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS), einem Agonisten an *Toll-like* Rezeptoren (TLR) in Kombination mit dem T<sub>H</sub>1-Zytokin Interferon (IFN)- $\gamma$ , während die T<sub>H</sub>2-Zytokine IL-4 oder IL-13 eine alternative Aktivierung induzieren.<sup>107, 108</sup> M1-Makrophagen zeigen einen pro-inflammatorischen Phänotyp und sezernieren entzündliche Zytokine, wie IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-12, während M2-Makrophagen das anti-inflammatorische IL-10 freisetzen. Neben der Zytokinexpression unterscheidet sich auch der Arginin-Stoffwechsel der unterschiedlich polarisierten Makrophagenpopulationen. Während in alternativ aktivierten Makrophagen die Arginase-1 (*Arg1*) exprimiert wird, die L-Arginin zu Harnstoff, Polyaminen und Prolin abbaut, wird in klassisch aktivierten Makrophagen die induzierbare NO-Synthase (iNOS; *Nos2*), verstärkt exprimiert, was zur vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führt.<sup>89, 90, 103, 106</sup>

Diese beiden *in vitro* charakterisierten Stadien der Makrophagenpolarisation repräsentieren die beiden Extremzustände, zwischen denen eine Vielzahl weiterer möglicher Polarisationsformen existiert.<sup>109</sup> Die *in vivo* auftretenden Polarisationszustände sind aufgrund der im Gewebe vorliegenden Kombination an stimulierenden Faktoren wesentlich komplexer als die *in vitro* definierten Extremzustände.<sup>89, 104, 105</sup>

Physiologisch spielen M1-Makrophagen vor allem eine wichtige Rolle bei der Immunantwort auf mikrobielle Infektionen, sowie im akuten Entzündungsgeschehen. Sie entstehen aus Ly-6C<sup>+</sup> Monozyten, die vor allem an Orten der Infektion oder Inflammation ins Gewebe einwandern. Dort differenzieren sie zu klassisch aktivierten Makrophagen, die durch die Expression pro-inflammatorischer Zytokine und toxischer Sauerstoffspezies die Abwehr von Mikroorganismen aber auch lokale Entzündungsvorgänge unterstützen. M2-Makrophagen entstehen durch die Einwanderung patrouillierender, Ly-6C<sup>-</sup> Monozyten in nicht-entzündetes Gewebe. Dort sind sie an der Beseitigung von Zellresten, Umbauvorgängen im Gewebe und der Förderung der Angiogenese beteiligt. Im Rahmen der Immunantwort spielen sie außerdem eine Rolle bei Wurminfektionen, der Regulation pro-inflammatorischer Vorgänge und der Wundheilung.<sup>89, 103</sup>

Auch bei vielen pathophysiologischen Vorgängen im Rahmen entzündlicher Erkrankungen spielt das Gleichgewicht zwischen klassisch und alternativ aktivierten Makrophagen eine wichtige Rolle.

Wie in Absatz 1.3.2.3 dargelegt, liegen im gesunden Fettgewebe vor allem CD11c<sup>-</sup>, M2-polarisierte Makrophagen vor, die durch die Sekretion von IL-10 die umgebenden Adipozyten vor der Entstehung einer Insulinresistenz schützen,<sup>94</sup> während bei Übergewicht die CD11c<sup>+</sup>, M1-polarisierten Makrophagen dominieren, die zur Inflammation des Fettgewebes beitragen.<sup>88</sup> Eine Inhibition der alternativen Polarisierung führte in diesem Zusammenhang zur Entstehung einer Insulinresistenz, während die Deletion von CD11c<sup>+</sup> Zellen dies verhindern konnte.<sup>88-91</sup>

Auch im Rahmen der Atherosklerose spielt die Polarisation der in den Läsionen vorhandenen Makrophagen eine wichtige Rolle.<sup>110, 111</sup> So wurde gezeigt, dass eine Inhibition der M2-Polarisierung von Makrophagen bzw. eine vermehrte M1-Polarisation zur vermehrten Entstehung atherosklerotischer Läsionen führt,<sup>112-115</sup> während die Applikation von IL-13, das die alternative Aktivierung von Makrophagen induziert, die Progression der Atherosklerose inhibieren konnte.<sup>116</sup>

### **1.5 Thrombin im Rahmen von Übergewicht und Atherosklerose**

Im Zusammenhang mit Übergewicht kommt es zu einer verstärkten Aktivierung des Gerinnungssystems. Es konnte gezeigt werden, dass übergewichtige Patienten sowie

Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus unter anderem erhöhte Spiegel an zirkulierendem *Tissue Factor*, FVII, Fibrinogen sowie ein erhöhtes endogenes Thrombinpotential und mehr des bei der proteolytischen Aktivierung von Thrombin entstehenden Fragments 1.2 aufweisen, welches als Indikator für die Thrombinaktivierung dient.<sup>117-120</sup> Diese prothrombotischen Veränderungen sind durch eine Gewichtsreduktion reversibel.<sup>121, 122</sup> Auch in Mäusen konnte gezeigt werden, dass Übergewicht die Expression von *Tissue factor*,<sup>123</sup> sowie die Konzentration von FVIII und Thrombin-Antithrombin-Komplexen erhöht und zur Entstehung eines prothrombotischen Phänotyps beiträgt.<sup>124</sup>

Welche Rolle die bei Übergewicht erhöhte Thrombinbildung bei den im Fettgewebe auftretenden Veränderungen und der Entstehung von Folgeerkrankungen spielt, ist noch nicht vollständig geklärt. Eine erste Studie an Mäusen<sup>125</sup> sowie die *ex vivo* Analyse humanen Fettgewebes<sup>126</sup> deuten darauf hin, dass Thrombin an Entzündungsprozessen im Fettgewebe sowie der Entstehung einer Insulinresistenz beteiligt ist.

Auch bei der Atheroskleroseentwicklung spielen Thrombin-vermittelte Effekte eine Rolle. Studien an *ApoE*<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten, dass eine Thrombininhibition die Entstehung atherosklerotischer Läsionen hemmt und die Plaquestabilität erhöht.<sup>16-18, 61</sup> Als möglicher Mechanismus wird auch hier die Inhibition Thrombin-vermittelter Entzündungsprozesse diskutiert.<sup>16, 18, 61</sup>

## 1.6 Zielsetzung

Übergewicht und Diabetes mellitus Typ 2 sind assoziiert mit einer erhöhten Bildung prokoagulatorischer Faktoren und einer vermehrten Thrombinaktivierung. Thrombin ist neben seiner zentralen Rolle bei der Blutgerinnung auch an einer Vielzahl entzündlicher Prozesse beteiligt (siehe Absatz 1.2.3 und 1.5). Wie bereits in Absatz 1.3.2.2 dargelegt, kommt es bei Übergewicht zur Entwicklung einer chronischen Entzündung des Fettgewebes. Diese unterschwellige Entzündung ist vermutlich an der Entstehung von Folgeerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2 oder auch Atherosklerose beteiligt.

Der orale Thrombininhibitor Dabigatranetexilat zeigte in Studien an *ApoE*<sup>-/-</sup> Mäusen bereits einen inhibitorischen Effekt auf die Atheroskleroseentwicklung, der möglicherweise durch die Hemmung Thrombin-abhängiger Entzündungsprozesse vermittelt wurde.<sup>16-18, 61</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit soll nun ein möglicher Einfluss des Thrombininhibitors Dabigatran auf Entzündungsprozesse im Fettgewebe sowie ein potentieller Zusammenhang zur Entstehung der Atherosklerose untersucht werden. Zu diesem Zweck wird der Effekt einer Behandlung mit Dabigatran in einem Mausmodell der diätinduzierten Adipositas und der akzelerierten Atherosklerose analysiert. Untersucht werden soll ein möglicher Einfluss von Dabigatran auf inflammatorische Prozesse im Fettgewebe, mögliche Veränderungen

## Einleitung

zirkulierender Zytokine und Immunzellen sowie potentielle Zusammenhänge zu entzündlichen Prozessen in atherosklerotischen Läsionen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Tierversuche

#### 2.1.1 Tiere und Behandlung

Weibliche *low density lipoprotein (LDL)*-Rezeptor-defiziente Mäuse ( $Ldlr^{-/-}$ , bezogen von Charles River, Burlington, MA, USA) erhielten ab einem Alter von 10 Wochen für eine Behandlungsdauer von 4 oder 20 Wochen eine fettreiche Diät (D12451; Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ, USA), die entweder den direkten Thrombininhibitor Dabigatranetexilat (im Folgenden als Dabigatran bezeichnet) in einer Dosierung von 5 mg/g Futter oder die entsprechende Placebo-Substanz enthielt (Abb. 2). Das Futter wurde von Boehringer Ingelheim (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH und Co. KG, Biberach/Riß) zur Verfügung gestellt. Alle Tiere hatten freien Zugang zum Trinkwasser und wurden unter standardisierten Bedingungen in einem normalen 12-stündigen Tag-/Nacht-Zyklus gehalten. Zur Dokumentation der Gewichtszunahme wurden die Tiere wöchentlich gewogen. Alle Versuche erfolgten gemäß den gesetzlichen Vorgaben nach § 8 des Deutschen Tierschutzgesetzes und wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) genehmigt.



**Abbildung 2. Studiendesign.**

**A** Weibliche,  $Ldlr^{-/-}$  Mäuse wurden ab einem Alter von 10 Wochen für eine Behandlungsdauer von 4 oder 20 Wochen mit einer fettreichen Diät behandelt, die entweder den Thrombininhibitor Dabigatranetexilat oder die entsprechende Placebo-Substanz enthielt.

#### 2.1.2 Tests zur Bestimmung der Glukosetoleranz und Insulinsensitivität

Im Alter von 17, 18 und 19 oder 27, 28 und 29 Wochen wurden Tests zur Bestimmung der Glukosetoleranz und Insulinsensitivität der Dabigatran- oder Placebo-behandelten  $Ldlr^{-/-}$  Mäuse durchgeführt. Dazu wurden die Tiere 6 Stunden vor Testbeginn nüchtern gesetzt. Zum Zeitpunkt Null wurde zunächst die basale Glukosekonzentration im Blut gemessen. Für

die Messung wurde Blut aus der Schwanzvene der Tiere entnommen und die Glukosekonzentration mithilfe eines GlucoSmart® Swing Glukometers (MSP bodmann GmbH, Bobingen) in Dreifachbestimmung gemessen. Zur Ermittlung der Nüchtern-Glukosespiegel wurden die Mittelwerte der bei allen drei Tests gemessenen Basalwerte berechnet. Für die Glukosetoleranztests (GTT) wurde den Tieren dann 1 g Glukose pro kg Körpergewicht (KG) entweder intraperitoneal (GTT i.p., 17./27. Woche) oder peroral (GTT p.o., 18./28. Woche) verabreicht. Für den Insulinsensitivitätstest (IST, 19./29. Woche) wurden 0,75 I.E. Insulin (Insuman® Rapid, Sanofi-Aventis, Frankfurt am Main) pro kg KG intraperitoneal appliziert. Die Blutglukosespiegel wurden nach 5, 10, 15, 30, 60 und 90 (IST) bzw. 120 Minuten (GTT) im Schwanzvenenblut, ebenfalls in Dreifachbestimmung, gemessen. Dargestellt sind die Werte als Vielfaches der Basalkonzentration, sowie die berechnete Fläche unter der Kurve (*Area under the curve*, AUC).

### 2.1.3 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Zur Bestimmung des Körperfettanteils der Dabigatran- und Placebo-behandelten Tiere wurden die Fettmasse, sowie die fettfreie Körpermasse mittels Kernspinresonanzspektroskopie (*nuclear magnetic resonance*, NMR) an einem *Minispec mq 7.5* (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA) bestimmt. Dargestellt ist der Anteil der Fettmasse am Gesamtgewicht.

### 2.1.4 Probenentnahme und -aufbereitung

Die für 20 Wochen mit Dabigatran- oder Placebo-Futter behandelten Mäuse wurden im Alter von 30 Wochen durch Inhalation von CO<sub>2</sub> getötet.

Zur Gewinnung von Plasma wurde das Blut mittels Herzpunktion aus dem rechten Vorhof entnommen und mit einer Endkonzentration von 0,32 % Natriumcitrat antikoaguliert. Die Plasmagewinnung erfolgte durch Zentrifugation bei 800 x g für 15 Minuten bei 4 °C. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und erneut bei 15.700 x g für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das gewonnene Plasma wurde bei -20 °C für die spätere Analyse gelagert.

Das viszerale Fettgewebe und die Aorta wurden entnommen, gewogen und entweder in Roti®-Histofix 4 % (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) zur späteren histologischen und immunhistochemischen Analyse fixiert oder für die durchflusszytometrische Untersuchung aufgearbeitet.

Zur Gewinnung von konditioniertem Medium wurde ein Teil des viszeralen Fettgewebes bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in *Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose*, 0 % fetales bovines

Serum (FBS) (DMEM hg 0 %, Tab. 4) inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgenommen und bei -80 °C gelagert.

### **2.1.5 Messung des Hämatogramms**

Die Anzahl an Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten wurde im Vollblut (Endkonzentration 0,32 % Natriumcitrat) mit Hilfe des *scil Vet abc* Hämatologiegeräts (*scil animal care company*, Viernheim) bestimmt.

## **2.2 Histologie und Immunhistochemie**

### **2.2.1 Viszerales Fettgewebe**

#### **2.2.1.1 Paraffinschnitte von viszeralem Fettgewebe**

Viszerales Fettgewebe wurde nach der Entnahme in Roti<sup>®</sup>-Histofix 4 % (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) für 24 Stunden bei 4 °C fixiert, anschließend entwässert und in Paraffin eingebettet. Mit Hilfe eines Mikrotoms (Rotationsmikrotom RM 2255, Leica Microsystems, Wetzlar) wurden 5 µm dicke, konsekutive Gewebeschnitte angefertigt und je drei Schnitte, die im Abstand von 300 µm angefertigt wurden, auf einen Objektträger aufgezogen. Für jede Färbung wurde je ein Objektträger verwendet. Die Gewebeschnitte wurden für 1 Stunde bei 60 °C hitzefixiert und vor der Färbung entparaffiniert. Dazu wurden die Schnitte dreimal 15 Minuten in Roticlear<sup>®</sup> (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe), dann jeweils 2 Minuten in Ethanol 100 %, 95 % und 70 % inkubiert und anschließend dreimal 5 Minuten in phosphat-gepufferter Salzlösung (*phosphate-buffered saline*, PBS) gewaschen.

Die Zusammensetzungen aller für die Histologie und Immunhistochemie verwendeten Lösungen und Puffer befinden sich in Tabelle 5 im Appendix.

#### **2.2.1.2 Bestimmung der Fettzellgröße**

Die Fettzellgröße im viszeralen Fettgewebe wurde an Hämatoxylin und Eosin (H&E)-gefärbten Paraffinschnitten bestimmt. Dazu wurden zunächst die Zellkerne mittels Hämalan-Lösung (Merck KGaA, Darmstadt) angefärbt, anschließend erfolgte die Eosin-Färbung in einer 0,1 %-igen Eosin-Lösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Die Schnitte wurden wasserfrei in Roti<sup>®</sup>-Mount Eindeckmedium (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) eingedeckt. Zur Bestimmung der Fettzellgröße wurden von jedem der drei gefärbten Schnitte repräsentative Bilder in 100-facher Vergrößerung an einem

Axiomager.M2 Mikroskop mit AxioCam und der AxioVS40V 4.8.2.0 (alles von Zeiss, Jena) aufgenommen. Die Bestimmung von Größe und Umfang der Fettzellen erfolgte halbautomatisch mit Hilfe der *Image J 1.37 software* (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA), *Fiji*<sup>127</sup> und der *BioVoxel Image Processing and Analysis Toolbox* (BioVoxel, Mutterstadt). Die Adipozytenfläche ist in  $\mu\text{m}^2$ , der Adipozytenumfang in  $\mu\text{m}$  angegeben. Eine relative Verteilung der Adipozytengröße wurde als prozentualer Anteil an der Gesamtheit aller ausgemessenen Fettzellen berechnet.

Die Methode zur halbautomatischen Bestimmung der Fettzellgröße wurde von Frau Birte Valentin optimiert.

### **2.2.1.3 Mac-2 Färbung zur Quantifizierung der Makrophagen im Fettgewebe**

Zur Analyse der Makrophagenzahl im viszeralen Fettgewebe wurde eine immunhistochemische Färbung für Mac-2 (Galektin-3) durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte zunächst für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit Blockierlösung (Zusammensetzung siehe Tab. 5) behandelt und anschließend über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper *anti-mouse/human* Mac-2 inkubiert. Eine Negativkontrolle wurde anstelle des Primärantikörpers nur mit dem entsprechenden Puffer behandelt. Anschließend erfolgte nach dreimaligem Waschen mit PBS die Inaktivierung endogener Peroxidasen durch Behandlung mit 3 %-iger  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung. Nach erneutem Waschen wurden die Schnitte für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Verwendet wurde ein Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierter anti-Ratte IgG2a Antikörper, der mithilfe von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) detektiert wurde. Eine Liste der für die Immunhistochemie verwendeten Antikörper findet sich in Tabelle 1. Die Kernfärbung erfolgte mittels Hämalaun-Lösung und die Schnitte wurden wasserfrei in Roti<sup>®</sup>-Mount Eindeckmedium (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) eingedeckt.

Von jedem der drei gefärbten Schnitte wurden jeweils drei repräsentative Bilder in 100-facher Vergrößerung aufgenommen und die Anzahl der charakteristischen, Mac-2 positiven CLS wurde gezählt. Dargestellt ist die Anzahl der CLS pro 100 Adipozyten.

### 2.2.1.4 Für die Immunhistochemie verwendete Antikörper

Tabelle 1. Antikörper Immunhistochemie.

Antikörper	Klon	Verdünnung	Hersteller
Anti-Mouse/Human Mac-2 (Galectin-3)	M3/38	1:130 in 1 % BSA in PBS	Cedarlane, Burlington, Canada CL8942AP
Goat anti-Rat IgG2A Secondary Antibody [HRP]		1:200 in PBS	Novus Biologicals, Abingdon, Großbritannien NB7126

### 2.2.2 Öl-Rot-O Färbung atherosklerotischer Läsionen in der Aorta

Die Aorten wurden vom Aortenbogen bis zu den Nierenabgängen entnommen und in Roti<sup>®</sup>-Histofix 4 % (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) bei 4 °C fixiert. Eingelagerte Lipide wurden mittels Öl-Rot-O (ORO)-Färbung detektiert. Dazu wurden die Aorten in PBS überführt und das periaortale Fettgewebe vorsichtig entfernt. Die fixierte Aorta wurde dann für 5 Minuten in 78 % Methanol gewaschen und anschließend für 90 Minuten in der Öl-Rot-O Färbelösung für Aorten (siehe Tab. 5) gefärbt. Es folgte ein 5-minütiger Entfärbungsschritt in 78 % Methanol, bevor die Aorten wieder in PBS überführt und zur Auswertung der Länge nach aufgeschnitten wurden. Die Quantifizierung der atherosklerotischen Läsionen erfolgte mit der *Image J 1.37v Software*.

Die Entnahme, Aufarbeitung und Analyse der Aorten wurden von Frau Dr. Nadine Nagy durchgeführt.

## 2.3 Zellversuche

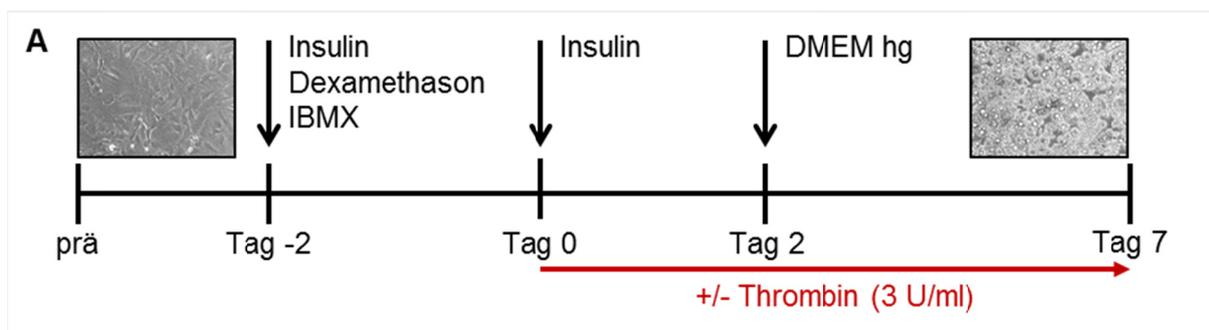
Eine Übersicht über alle in der Zellkultur verwendete Nährmedien findet sich in Tabelle 4, alle zur Stimulation verwendeten Substanzen sind in Tabelle 6 aufgelistet. Alle Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 2.3.1 *In vitro* Differenzierung und Kultivierung muriner 3T3 L1 Präadipozyten

#### 2.3.1.1 *In vitro* Differenzierung muriner 3T3 L1 Präadipozyten

Murine 3T3 L1 Präadipozyten (European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC), Salisbury, Großbritannien) wurden *in vitro* gemäß den Angaben von ECACC zu reifen Adipozyten differenziert. Dazu wurden die Zellen in einer Dichte von 10.000 Zellen/cm<sup>2</sup> in eine 24-Loch-Zellkulturplatte ausgesät und in DMEM hg 10 % (siehe Tab. 4) kultiviert, bis sich ein konfluenter Zellrasen gebildet hatte (Zeitpunkt „prä“). 48 Stunden später wurde die Differenzierung zu Adipozyten durch Zugabe eines Differenzierungscocktails

(Zusammensetzung siehe Tab. 6) induziert (Tag -2). Nach weiteren 48 Stunden wurde das Nährmedium gewechselt und die Zellen mit 1 µg/ml Insulin stimuliert (Tag 0). Weitere 48 Stunden später erfolgte ein erneuter Mediumswechsel (Tag 2) und die Zellen wurden für weitere 5 Tage in DMEM hg 10 % kultiviert. Die Stimulation mit Thrombin (3 U/ml, siehe Tab. 6) begann an Tag 0 und wurde alle 48 Stunden wiederholt (Abb. 3). Der Thrombininhibitor Dabigatran (Endkonzentration 500 nM, siehe Tab. 6) wurde jeweils 30 Minuten vor der Stimulation mit Thrombin zugegeben. An Tag 7 der Differenzierung wurde der Zellüberstand abgenommen und als konditioniertes Medium bei -80 °C eingefroren. Die Zellen wurden entweder zur Färbung der eingelagerten Lipide für 20 Minuten in Roti®-Histofix 4 % fixiert oder für die mRNA-Isolation in PeqGOLD TriFast (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) lysiert.



**Abbildung 3. Differenzierungsprotokoll 3T3 L1.**

**A** 3T3 L1 Präadipozyten wurden bis zur Konfluenz der Zellen kultiviert. Nach 48 Stunden wurde die Differenzierung zu Adipozyten durch Zugabe von Insulin, Dexamethason und 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) induziert. Nach weiteren 48 Stunden erfolgte eine weitere Stimulation mit Insulin allein. Die Stimulation mit Thrombin begann an Tag 0 und wurde alle 48 Stunden, bis zum Tag 7 der Adipozytendifferenzierung wiederholt.

### 2.3.1.2 Öl-Rot-O Färbung und Quantifizierung

Zur Quantifizierung der in die differenzierten 3T3 L1 Zellen eingelagerten Lipidtropfen wurde eine ORO-Färbung durchgeführt. Dazu wurden die Zellen an Tag 7 der Differenzierung mit Roti®-Histofix 4 % für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert, anschließend dreimal mit demineralisiertem Wasser gewaschen und dann bei 37 °C für ca. 20 Minuten getrocknet.

Die ORO-Lösung (Tab. 5) wurde vor der Färbung durch einen 0,2 µm-Filter (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) filtriert. Die Zellen wurden dann 10 Minuten mit der ORO-Lösung inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit 60 % Isopropanol und dreimal mit demineralisiertem Wasser gewaschen um überschüssiges ORO zu entfernen.

Die Quantifizierung der ORO-Färbung erfolgte durch Messung der Fluoreszenzintensität im Cy5-Kanal (Exzitationswellenlänge 633 nm, Emmissionswellenlänge 670 nm) am *Typhoon™*

*8600 Variable Mode Imager* (GE Healthcare, Uppsala, Schweden). Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität als Vielfaches der undifferenzierten Kontrolle.

### 2.3.1.3 Proliferationsanalyse der 3T3 L1 Präadipozyten

Zur Proliferationsanalyse wurden die undifferenzierten 3T3 L1 Präadipozyten in einer Dichte von 5000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. Die Zellen wurden in DMEM hg kultiviert und für 24 oder 48 Stunden mit Thrombin (3 U/ml) stimuliert. Zur Analyse der Proliferation wurden zwei verschiedene Methoden verwendet.

Zum einen wurde der Gesamtproteingehalt mittels Coomassie-Färbung bestimmt. Dazu wurden die Zellen in 100 % Methanol für 5 Minuten fixiert. Zur Ermittlung des Gesamtproteingehaltes wurden die Zellen für 15 Minuten mit einer 0,2 % Coomassie-Lösung (Tab. 5) gefärbt und überschüssiger Farbstoff anschließend durch dreimaliges Waschen mit destilliertem Wasser entfernt. Die Quantifizierung der Färbung erfolgte am *Odyssey infrared imaging system* mit Hilfe der *Image Studio 2.0* Software (beides von LI-COR<sup>®</sup> Biosciences, Lincoln, NE, USA). Die Menge an Gesamtprotein korreliert mit der vorhandenen Zellzahl.<sup>128</sup>

Zum anderen wurde der kolorimetrische Rotitest<sup>®</sup> Vital (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) zur Analyse der Proliferation eingesetzt. Hier wurden die Zellen gemäß den Herstellerangaben für drei Stunden mit der Testlösung inkubiert.<sup>129</sup> Der Test basiert auf der Reduktion eines Tetrazoliumsals durch lebende Zellen. Der entstehende Formazan-Farbstoff wurde photometrisch am *Multiscan FC* (Thermo Scientific, Waltham, USA) bei 450 nm erfasst. Angegeben ist jeweils das Vielfache der 24 Stunden-Kontrolle.

### 2.3.1.4 Monozytenbindungsstudie

Zur Untersuchung der Monozytenbindung an differenzierte 3T3 L1 Adipozyten wurde ein modifiziertes Protokoll von DiCorleto und de la Motte<sup>130</sup> verwendet. 3T3 L1 Zellen wurden in eine 96-Loch-Zellkulturplatte ausgesät und, wie in Abschnitt 2.3.1.1 beschrieben, 7 Tage mit oder ohne Zugabe von 3 U/ml Thrombin zu reifen Adipozyten differenziert. Eine Positivkontrolle wurde 24 Stunden vor Zugabe der Monozyten (an Tag 6) mit 20 µg/ml Poly(Inosin:Cytosin) (Poly(I:C), siehe Tab. 6) stimuliert. Eine Negativkontrolle wurde für eine Stunde bei 37 °C mit 2 U/ml Hyaluronidase (aus *Streptomyces hyalurolyticus*, siehe Tab. 6) behandelt.

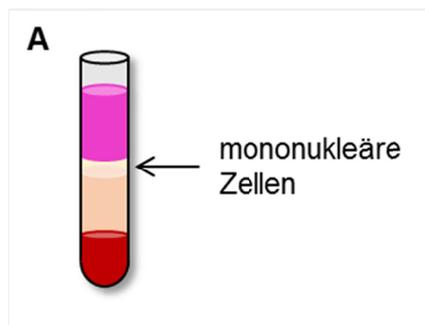
An Tag 7 wurden humane, monozytäre U-937 Zellen (U-937, CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim) für 30 Minuten mit 10 µg/ml Calcein-Acetoxy-methylester (Calcein-AM, siehe Tab. 6) inkubiert und so markiert. Je 500.000 markierte Zellen wurden dann in RPMI 10% Medium (siehe Tab. 4) zu den differenzierten 3T3 L1 Zellen gegeben und 90 Minuten bei

4 °C lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit kaltem *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS, siehe Tab. 4) gewaschen, bevor die Menge der gebundenen Zellen durch Messung der Fluoreszenz-Intensität (Extinktion 485 nm, Emission 535 nm) mittels eines *BioTek® Synergy™ Mx Microplate Readers* (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) erfasst wurde. Angegeben ist die Fluoreszenzintensität als Vielfaches der unstimulierten Kontrolle.

## 2.3.2 Isolation und *in vitro* Polarisierung muriner Knochenmarksmakrophagen

### 2.3.2.1 Isolation und Differenzierung muriner Knochenmarksmakrophagen

Murine Knochenmarksmakrophagen wurden aus 8-12 Wochen alten C57BL/6J Mäusen (erworben von Janvier, Le Genest St Isle, Frankreich) isoliert. Die Isolation und nachfolgende



**Abbildung 4. Gradientenzentrifugation Ficoll Paque.**

**A** Die mononukleären Zellen bilden einen Ring zwischen der Mediums- und der Ficoll-Phase.

Polarisierung erfolgte nach einem Protokoll von Zhang *et al.*<sup>131</sup>, mit einigen Änderungen. Die Mäuse wurden getötet und mit 70 % Isopropanol desinfiziert, bevor *Femur* und *Tibia* mit sterilem Besteck freipräpariert und entnommen wurden. Das Knochenmark wurde mit Hilfe einer Spritze mit 26G-Kanüle mit sterilem DPBS aus dem Knochen ausgespült und aufgefangen. Diese Suspension wurde sodann durch einen 100 µm Nylonfilter (Greiner Bio-One, Frankfurt) filtriert und für 10 Minuten bei 500 x g und 4 °C zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 5 ml Makrophagen-Isolationsmedium (Tab. 4) resus-

pendiert. Zur Aufreinigung der mononukleären Zellen wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Dazu wurden 5 ml Ficoll Paque™ PLUS ( $\rho = 1,077$  g/ml; GE Healthcare, Uppsala, Schweden) vorsichtig mit der Zellsuspension überschichtet und 35 Minuten bei 450 x g und Raumtemperatur mit ausgeschalteter Bremse zentrifugiert. Anschließend wurde vorsichtig der Ring mononukleärer Zellen (Abb. 4) in ein neues Gefäß überführt. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 10 Minuten bei 500 x g, bevor die Zellen in 10 ml Makrophagen-Nährmedium, versetzt mit 10 ng/ml murinem Makrophagen-Kolonienstimulierendem Faktor (*macrophage colony stimulating factor*, M-CSF) zur Makrophagen-Differenzierung (siehe Tab. 4, 6), ausgesät wurden. Es wurden maximal  $10^7$  Zellen in einer Zellkulturflasche mit 25 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche kultiviert. Nach 24 Stunden wurden die bereits adhärenen Zellen verworfen, das Nährmedium zusammen mit den nicht adhärenen Zellen in eine größere Zellkulturflasche mit 75 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche überführt und weitere 10 ml Makrophagen-Nährmedium hinzugegeben. Die Zellen wurden noch weitere 6 Tage kultiviert,

wobei alle 2 bis 3 Tage 10 ml frisches Makrophagen-Nährmedium zugesetzt wurde. Nach insgesamt 7 Tagen war die Differenzierung abgeschlossen und die reifen Makrophagen konnten für weitere Versuche verwendet werden.

### **2.3.2.2 *In vitro* Polarisierung von Knochenmarksmakrophagen**

Nach siebentägiger *in vitro* Differenzierung mit M-CSF wurden die reifen Makrophagen für die folgenden Polarisations-Experimente abgelöst. Dazu wurden die Zellen mit einer Dispase II-Lösung (1 mg/ml in DPBS, siehe Tab. 6) für ca. 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde die doppelte Menge an Makrophagen-Nährmedium hinzugegeben. Die abgelösten Zellen wurden für 10 Minuten bei 500 x g und Raumtemperatur zentrifugiert und in Makrophagen-Hungermedium (siehe Tab. 4) resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt und in einer Dichte von 37.500 Zellen/cm<sup>2</sup> in einer 12-Loch-Zellkultur-Platte ausgesät. 6 Stunden später erfolgte die Stimulation zur Polarisierung der Zellen. Die Polarisierung zu inflammatorischen M1-Makrophagen erfolgte durch Zugabe von 10 U/ml IFN- $\gamma$  und 1  $\mu$ g/ml LPS,<sup>132</sup> die Polarisierung zu anti-inflammatorischen M2-Makrophagen durch Stimulation mit 20 ng/ml IL-4 (siehe Tab. 6).<sup>133</sup> Thrombin wurde in einer Konzentration von 3 U/ml entweder allein oder in Kombination mit den M1- oder M2-Stimuli eingesetzt. Die Stimulation mit IL-5 (10 ng/ml), Granulozyten-Kolonien-stimulierender Faktor (*granulocyte colony stimulating factor*, G-CSF, 3 ng/ml), IL-6 (50 ng/ml) und dem löslichen IL-6-Rezeptor (50 ng/ml) erfolgte ebenfalls allein oder in Kombination für 24 Stunden. Außerdem wurden konditioniertes Medium von 3T3 L1 Zellen, die für 7 Tage mit oder ohne den Zusatz von 3 U/ml Thrombin differenziert worden waren (siehe Abschnitt 2.3.1.1), sowie der konditionierte Überstand von viszeralem Fettgewebe aus Dabigatran- oder Placebo-behandelten *Ldlr*-defizienten Mäusen verwendet. Letzterer wurde vor der Stimulation auf eine Konzentration von 100 mg Fettgewebe/ml Nährmedium eingestellt. 24 Stunden nach der Stimulation erfolgte die Charakterisierung des Makrophagenphänotyps mittels mRNA-Expressionsanalyse oder Durchflusszytometrie.

## **2.4 Durchflusszytometrie**

Die Zusammensetzungen aller in der Durchflusszytometrie verwendeten Puffer und Lösungen finden sich in Tabelle 7. Die verwendeten Antikörper und Antikörper-Kombinationen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

### **2.4.1 Analyse der stromal-vaskulären Fraktion des viszeralen Fettgewebes**

Zur durchflusszytometrischen Analyse der im viszeralen Fettgewebe vorhandenen Immunzellen wurde zunächst nach einem leicht modifizierten Protokoll von Ait-Lounis *et al.*<sup>134</sup> eine Einzelzellsuspension der isolierten stromal-vaskulären Zellen des viszeralen Fettgewebes hergestellt. Dazu wurde das entnommene Fettgewebe direkt nach der Entnahme in DMEM hg-Medium überführt und in kleine, ca. 1-4 mm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten. Diese wurden in eine Kollagenase D-Lösung (siehe Tab. 7) überführt, mit Hilfe des *gentleMACS™ Dissociators* (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) weiter zerkleinert und anschließend für 20 Minuten bei 37 °C unter kontinuierlichem Schütteln enzymatisch verdaut. Darauf folgte ein erneuter Homogenisierungsschritt mit dem *gentleMACS™ Dissociator*. Anschließend wurden die Zellen durch kurzes Schütteln auf dem Vortexmischer endgültig in eine Einzelzellsuspension überführt und durch einen 70 µm Nylonfilter (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) filtriert um unverdaute Gewebereste zu entfernen. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 300 x g und 4 °C bildeten die Fettzellen einen Ring oberhalb der Kollagenase-Lösung und wurden zusammen mit dem Überstand verworfen. Die sedimentierten, stromal-vaskulären Zellen wurden in hypotonem Erythrozyten-Lyse-Puffer resuspendiert (siehe Tab. 7) und 5 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach einer weiteren 10-minütigen Zentrifugation bei 300 x g und 4 °C wurden die verbliebenen Zellen in DMEM hg-Medium resuspendiert und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 300 x g und 4 °C wurden die Zellen in PEB-Puffer (siehe Tab. 7) aufgenommen und, wie in Absatz 2.4.5 beschrieben, mit den entsprechenden Antikörperkombinationen zur Analyse von Makrophagen und Lymphozyten-Populationen gefärbt (siehe Tabelle 2). Analysiert wurden die Gesamtzahl der Makrophagen (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> Zellen), sowie die entzündlichen M1-polarisierten (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) und anti-entzündlichen M2-polarisierten (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>) Makrophagen-Populationen. Außerdem wurde die Anzahl der Leukozyten (CD45<sup>+</sup> Zellen) und der B- (CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>) und T-Lymphozyten (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>) sowie der Neutrophilen (CD11b<sup>+</sup>Ly-6G<sup>+</sup>) im viszeralen Fettgewebe untersucht. Angegeben sind jeweils die absoluten Zellzahlen pro mg Fettgewebe.

### **2.4.2 Analyse der zirkulierenden Immunzellen im Blut**

Das Blut wurde durch Herzpunktion entnommen und mit einer Endkonzentration von 0,32 % Natriumzitrat (siehe Tab. 7) antikoaguliert.

### 2.4.2.1 Lymphozyten

Für die Analyse der zirkulierenden Lymphozyten wurden zunächst durch Zugabe von hypotonem Erythrozyten-Lyse-Puffer (siehe Tab. 7) und 7-minütiger Inkubation bei 4 °C die Erythrozyten lysiert. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 300 x g und 4 °C. Das verbleibende Zellpellet wurde in PEB-Puffer resuspendiert und, wie in Absatz 2.4.5 beschrieben, mit den Antikörpern zur Analyse der Lymphozyten-Populationen (siehe Tab. 2) behandelt. Analysiert wurde die Anzahl der Leukozyten (CD45<sup>+</sup> Zellen) und der B- (CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>) und T-Lymphozyten (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>) im Blut. Angegeben sind jeweils die absoluten Zellzahlen pro µl Vollblut.

### 2.4.2.2 Monozyten und Neutrophile

Die Analyse der zirkulierenden Monozyten und Neutrophilen erfolgte, mit kleineren Änderungen, wie von Breslin *et al.*<sup>135</sup> beschrieben. Aufgrund der instabilen Oberflächenexpression des Oberflächen-Antigens CD115 erfolgte die Antikörperfärbung hier vor der Lyse der Erythrozyten. Das entnommene Blut wurde nach 10-minütiger Blockierung unspezifischer Bindestellen mit einem CD16/32-Antikörper (Klon 93, Biolegend, San Diego, CA, USA) mit den in Tabelle 2 zur Färbung von Monozyten und Neutrophilen angegebenen Antikörpern gefärbt und darauf folgend für 7 Minuten bei 4 °C mit hypotonem Erythrozyten-Lyse-Puffer inkubiert. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 750 x g und 4 °C. Das resultierende Zellpellet wurde zur Fixierung in einer 1 % Formalin-Lösung (siehe Tab. 7) resuspendiert und 20 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 750 x g und 4 °C für 10 Minuten wurden die Zellen in PEB-Puffer aufgenommen und zur Messung mit 200 µl Coulter<sup>®</sup> Isoton II Diluent (Isoton, Beckman Coulter Inc., Krefeld) versetzt. Bestimmt wurden die Anzahl der Neutrophilen (CD11b<sup>+</sup>Ly-6G<sup>+</sup>), der Gesamtmonozyten (CD11b<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup>), sowie der Ly-6C<sup>+</sup>- und Ly-6C<sup>-</sup> exprimierenden Monozyten-Subpopulationen. Angegeben sind jeweils die absoluten Zellzahlen pro µl Vollblut.

### 2.4.3 Analyse der Immunzellen der Aortenwand

Zur Analyse der Makrophagen-Populationen in atherosklerotischen Läsionen der Aortenwand wurde die Aorta vor der Entnahme mit 400 I.E. Heparin-Natrium (Rotexmedica, Trittau) in 20 ml DPBS perfundiert um eine Kontamination mit Blutresten zu vermeiden. Dann wurde die Aorta vollständig, vom Aortenbogen bis zu den Abgängen der Beinarterien, entnommen und von Fettgewebsresten befreit. Die Aufarbeitung der Aortenwand erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Butcher *et al.*<sup>136</sup> Die isolierte Aortenwand wurde in

kleine, ca. 1 mm<sup>2</sup> große Stücke zerkleinert, in eine Kollagenase II-Lösung überführt (siehe Tab. 7) und für 60 Minuten bei 37 °C unter ständiger Rotation enzymatisch verdaut. Danach wurden die Zellen durch zweimaliges, kurzes Schütteln auf dem Vortexmischer in eine Einzelzellsuspension überführt und unverdaute Gewebereste durch Filtration durch einen 70 µm Nylonfilter entfernt. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 300 x g und 4 °C wurden die Zellen in *Roswell Park Memorial Institute*-Nährmedium (RPMI 10%, siehe Tab. 4) resuspendiert und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Es folgte eine weitere, 10-minütige Zentrifugation bei 300 x g und 4 °C bevor die isolierten Zellen in PEB-Puffer aufgenommen und wie in Abschnitt 2.4.5 beschrieben mit der entsprechenden Antikörper-Kombination (siehe Tab. 2) gefärbt wurden. Analysiert wurde die Anzahl der Gesamtmakrophagen (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>), sowie der entzündlichen M1-polarisierten (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>) und der anti-entzündlichen M2-polarisierten (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>) Makrophagen in der Aortenwand. Angegeben ist jeweils die absolute Anzahl der Makrophagen pro Aorta.

### 2.4.4 Analyse der Polarisierung muriner Knochenmarksmakrophagen

Die Knochenmarksmakrophagen wurden 24 Stunden nach Induktion der Polarisierung wie in Absatz 2.3.2.2 beschrieben mit Dispase II-Lösung von der Zellkulturplatte abgelöst und für 10 Minuten bei 500 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Makrophagen-Hungermedium resuspendiert und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine weitere 10-minütige Zentrifugation bei 500 x g und 4 °C und die Zellen wurden in PEB-Puffer resuspendiert und, wie in Absatz 2.4.5 beschrieben mit der entsprechenden Antikörper-Kombination (siehe Tab. 2) gefärbt. Bestimmt wurden der prozentuale Anteil der CD86<sup>+</sup>, M1-polarisierten, sowie der CD206<sup>+</sup>, M2-polarisierten Makrophagen an den Gesamtmakrophagen (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>). Des Weiteren wurde das Verhältnis der CD86<sup>+</sup> zu den CD206<sup>+</sup> Makrophagen bestimmt.

### 2.4.5 Durchführung der Antikörper-Färbung für die Durchflusszytometrie

Die in PEB-Puffer resuspendierten Zellen wurden zunächst für 10 Minuten bei 4 °C mit einem CD16/32-Antikörper inkubiert um unspezifische Bindestellen zu blockieren. Anschließend wurden tote Zellen durch eine 30-minütige Inkubation mit dem *LIVE/DEAD<sup>®</sup> Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit* (Live/Dead-Aqua, molecular probes<sup>®</sup>, life technologies<sup>™</sup>, Eugene, OR, USA) bei 4 °C angefärbt. Dann wurden die Proben für die unterschiedlichen Färbeprotokolle aufgeteilt und mit den in Tabelle 2 aufgeführten Antikörper-Kombinationen gefärbt. Alle Antikörper, sowie auch das Live/Dead-Aqua Kit wurden in einer Verdünnung von 1:25 eingesetzt. Die Proben wurden für 15 Minuten bei 4 °C mit den entsprechenden

Antikörpern inkubiert und anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von jeweils 200 µl Isoton gestoppt. Zusätzlich zu den mit Antikörpern gefärbten Proben wurden für jede Probe auch die entsprechenden Isotyp-Kontrollen gemessen. Zur Bestimmung der absoluten Zellzahlen wurden *Flow-Count™ Fluorospheres* (Beckman Coulter Inc., Krefeld) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Die Messung der Proben erfolgte an einem *Gallios™* Durchflusszytometer und zur Auswertung wurde die *Kaluza® Flow Analysis Software* (beides von Beckman Coulter Inc., Krefeld) verwendet. Die Auswertung erfolgte anhand der Isotyp-Kontrollen, repräsentative Schemata für die Analyse aller Antikörper-Kombinationen sind im Appendix gezeigt.

### 2.4.5.1 Verwendete Antikörper-Kombinationen in der Durchflusszytometrie

**Tabelle 2. In der Durchflusszytometrie verwendete Antikörper-Kombinationen**

<b>Analysierte Zellen</b>	<b>Antikörper-Kombination</b>	<b>Klon</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Makrophagen</b> Fettgewebe	F4/80-AlexaFluor®488	BM8	alle Antikörper von Biolegend, San Diego, CA, USA
	CD11c-APC	N418	
	CD11b-PacificBlue™	M1/70	
	Live/Dead-Aqua		
<b>Neutrophile</b> Fettgewebe	CD11b-PE	M1/70	BD Biosciences, San Jose, USA
	Ly-6G-PacificBlue™	1A8	Biolegend, San Diego, CA, USA
	Live/Dead-Aqua		molecular probes®, life technologies™, Eugene, OR, USA
<b>Lymphozyten</b> Fettgewebe und Blut	CD45-PE	30-F11	alle Antikörper von Biolegend, San Diego, CA, USA
	CD3-APC/Cy7	17A2	
	CD19-PacificBlue™	6D5	
	Live/Dead-Aqua		
<b>Monozyten/Neutrophile</b> Blut	Ly-6C-AlexaFluor®488	HK1.4	Biolegend, San Diego, CA, USA
	CD11b-PE	M1/70	BD Biosciences, San Jose, USA
	CD115-APC	AFS98	eBioscience, San Diego, CA, USA
	Ly-6G-PacificBlue™	1A8	Biolegend, San Diego, CA, USA
<b>Makrophagen</b> Aorta	F4/80-AlexaFluor®488	BM8	alle Antikörper von Biolegend, San Diego, CA, USA
	CD45-PE	30-F11	
	CD86-PE/Cy7	GL-1	
	CD206-AlexaFluor®647	C068C2	
	CD11b-PacificBlue™	M1/70	
	Live/Dead-Aqua		
<b>Knochenmarks- makrophagen</b>	F4/80-PE	BM8	alle Antikörper von Biolegend, San Diego, CA, USA
	CD86-PE/Cy7	GL-1	
	CD206-AlexaFluor®647	C068C2	
	CD11b-PacificBlue™	M1/70	
	Live/Dead-Aqua		

## 2.5 Genexpressionsanalyse mittels quantitativer *Realtime*-PCR

### 2.5.1 RNA-Isolation aus 3T3 L1 Zellen und viszeralem Fettgewebsproben

Zur Isolation der Gesamt-RNA aus differenzierten 3T3 L1 Zellen, Knochenmarksmakrophagen und viszeralem Fettgewebsproben wurde die Guanidinisothiocyanat-Phenol-Chloroform-Methode verwendet.<sup>137</sup>

Dazu wurden die 3T3 L1 Zellen an Tag 7 der Differenzierung, die Knochenmarksmakrophagen 24 Stunden nach Induktion der Polarisierung, für 5 Minuten bei Raumtemperatur in *PeqGOLD TriFast* (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) lysiert.

Die gefrorenen Fettgewebsproben wurden mit Hilfe der Schwingmühle MM400 (Retsch GmbH, Haan) homogenisiert und anschließend ebenfalls in *PeqGOLD TriFast* für 5 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Die Fettgewebsproben wurden dann einer zusätzlichen Zentrifugation (10 Minuten, 12.000 x g, 4 °C) unterzogen. Die obere, lipidhaltige Phase wurde verworfen und die untere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt.<sup>68</sup> Die weitere Aufarbeitung verlief für alle Proben gleich. Nach Zugabe von Chloroform und einer weiteren 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben für 10 Minuten bei 16.000 x g zentrifugiert und anschließend die obere, wässrige Phase in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die gleiche Menge an Isopropanol zugesetzt. Die Fällung der RNA erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde die ausgefallene RNA durch 40-minütige Zentrifugation bei 16.000 x g und 4 °C sedimentiert. Das erhaltene Pellet wurde zweimal in 75 % Ethanol gewaschen und anschließend jeweils für 10 Minuten bei 16.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde die RNA getrocknet und 5 Minuten bei 65 °C in RNase-freiem Wasser gelöst. Die RNA-Konzentration und -Qualität wurde mit Hilfe eines NanoDrop™ 1000 Spektrophotometers (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) durch Messung der Absorption bei 230 nm, 260 nm und 280 nm bestimmt. Jeweils 1 µg der isolierten RNA wurde mit dem *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen, Hilden) gemäß der Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben.

### 2.5.2 Quantitative *Realtime* Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Die Quantifizierung der cDNA erfolgte mittels qPCR am *Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Darmstadt) unter Verwendung des *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG* Kits (Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA). Für die Reaktion wurden 2,083 ng/µl cDNA, sowie 0,625 pmol/µl des jeweiligen Vorwärts- und Rückwärts-Primers in einem Endvolumen von 20 µl eingesetzt. Die Sequenzen der verwendeten Primer wurden anhand von Literaturangaben<sup>138-144</sup> ausgewählt oder unter Verwendung der *Primer3Plus* Software<sup>145</sup> und *Primer-BLAST*<sup>146</sup> entworfen und sind in

Tabelle 3 aufgeführt. Die PCR-Bedingungen wurden entsprechend der Vorgaben des Herstellers gewählt. Alle Messungen erfolgten als Doppelbestimmungen. Eine Analyse der Schmelzkurve wurde durchgeführt und Proben, die mehrere Maxima aufwiesen, wurden von der Analyse ausgeschlossen. Die Auswertung der qPCR-Messung erfolgte mit Hilfe der *7300 Real-Time PCR System RQ Study Software Version 1.4* (Applied Biosystems, Darmstadt) unter Verwendung der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode.<sup>147</sup> Als endogene Kontrolle dienten *18S (Rn 18s)* für Proben aus 3T3 L1 Zellen und *Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (Gapdh)* für Knochenmarksmakrophagen und Proben des viszeralen Fettgewebes.

### 2.5.2.1 In der qPCR verwendete Primersequenzen

**Tabelle 3. In der qPCR verwendete Primersequenzen.**

Gen	Vorwärtsprimer (5'-3')	Rückwärtsprimer (5'-3')	Literatur
<i>Arg1</i>	CTGGGGATTGGCAAGGTGAT	CCCGTCGACATCAAAGCTCA	
<i>Ccl2</i>	TTCCTTCTTGGGGTCAGCAC	GGCTGGAGAGCTACAAGAGG	Röck <i>et al.</i> <sup>138</sup>
<i>Cxcl1</i>	GCACCCAAACCGAAGTCATA	AGGTGCCATCAGAGCAGTCT	Müller <sup>139</sup>
<i>Gapdh</i>	TGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC	AAGATGGTGTATGGGCTTCCCG	Grandoch <i>et al.</i> <sup>140</sup>
<i>Il10</i>	TGGGTGAGAAGCTGAAGACC	GCTCCACTGCCTTGCTCTTA	
<i>Il13</i>	TCCAATTGCAATGCCATCTA	TGGGCTACTTCGATTTTGGT	
<i>Il1b</i>	GGATGAGGACATGAGCACCT	CGTCACACACCAGCAGTTA	
<i>Il6</i>	GATGGATGCTACCAAAGTGA	GGTACTCCAGAAGACCAGAGGA	Müller <i>et al.</i> <sup>141</sup>
<i>Mrc1</i>	TTGTGGTGTGAGCTGAAAGGTG	GTGGATTGTCTTGTGGAGCA	Lech <i>et al.</i> <sup>142</sup>
<i>Nos2</i>	GAAGAAAACCCCTTGTGCTG	TTCTGTGCTGTCCCAGTGAG	Melchior-Becker <sup>143</sup>
<i>Rn 18s</i>	GCAATTATCCCATGAACG	GGCCTCACTAAACCATCCAA	Ray <i>et al.</i> <sup>144</sup>
<i>Tnf</i>	TCGAGTGACAAGCCTGTAGC	AAGGTACAACCCATCGGCTG	Grandoch <i>et al.</i> <sup>140</sup>

## 2.6 Protein- und Lipoproteinanalytik

### 2.6.1 Multiplex-Analyse von Zytokinen und Adipokinen

Zur Bestimmung der Zytokin- und Adipokinkonzentrationen im Plasma, sowie der Konzentration der aus dem Fettgewebe freigesetzten Zytokine im konditionierten Medium des viszeralen Fettgewebes wurden Multiplex-Analysen durchgeführt. Verwendet wurden kommerziell erhältliche Tests der Firma Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, CA, USA). Der Vorteil dieser Testmethode liegt darin, dass bis zu 100 verschiedene Analyte in einer Probe gleichzeitig erfasst werden können. Das Testprinzip beruht auf unterschiedlich gefärbten Kügelchen, an die Reagenzien zur Erkennung der zu erfassenden Analyte gebunden sind. Für jeden Analyten gibt es ein Set an gleichfarbigen Kügelchen, die das entsprechende, spezifische Reagenz zur Bindung des Zielanalyten tragen. Nach Bindung der Analyte an die entsprechenden Kügelchen, wird ein weiterer, biotinylierter Antikörper hinzugegeben, der ebenfalls an den gebundenen Analyten bindet. Zur Detektion dient Streptavidin-konjugiertes

Phycoerythrin (PE). Die Detektion erfolgt durchflusszytometrisch. In einem ersten Schritt werden die Kügelchen gemäß ihrer Farbe sortiert, die Konzentrationsbestimmung der einzelnen Analyte erfolgt durch Messung der Fluoreszenzintensität des Reporterfarbstoffs PE.<sup>148</sup>

Die Bestimmung von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-17, Eotaxin, G-CSF, Granulozyten-Makrophagen-Kolonien stimulierender Faktor (*granulocyte macrophage colony stimulating factor*, GM-CSF), IFN- $\gamma$ , CXC-Chemokinligand-1 (CXCL-1), MCP-1, *Macrophage inflammatory protein* (MIP)-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , CCL-5 (RANTES) und TNF- $\alpha$  erfolgte mit Hilfe des *Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine 23-plex Assays*. Zur Bestimmung der Konzentrationen von Ghrelin, Glukagon, Insulin, Leptin, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI)-1 und Resistin im Plasma wurde der *Bio-Plex Pro™ Mouse Diabetes 8-plex Assay*, für Adiponektin der *Bio-Plex Pro™ Mouse Diabetes Adiponectin Assay* verwendet. Die Plasmaproben wurden gemäß der Angaben des Herstellers in einer 1:4-Verdünnung gemessen, die Messung des konditionierten Mediums des viszeralen Fettgewebes erfolgte unverdünnt. Zur Messung wurde ein *Bioplex 200 suspension array* System verwendet und die Berechnung der gemessenen Konzentrationen erfolgte mit Hilfe der *Bio-Plex Manager Software* Version 6.0 (alles von Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). Dargestellt sind jeweils die Konzentrationen als Vielfaches der Placebo-behandelten Kontrolltiere.

Die Multiplex-Messungen wurden von Frau Dr. Sonja Hartwig und Herrn Dr. Stefan Lehr am Deutschen Diabetes-Zentrum durchgeführt.

### **2.6.2 Bestimmung der Insulinspiegel im Plasma mittels ELISA**

Zur Bestimmung der Plasmainsulinspiegel wurde das *Ultra Sensitive Rat Insulin ELISA Kit* (Crystal Chem Inc., Zaandam, Niederlande) gemäß der Herstellerinformationen verwendet. Die Proben wurden unverdünnt gemessen und die Detektion erfolgte am *Multiscan FC* (Thermo Scientific, Waltham, USA). Die Konzentration ist in ng/ml angegeben.

### **2.6.3 Bestimmung des Plasmacholesterins**

Die Plasmakonzentrationen von Gesamtcholesterin, *Low-density-lipoprotein* (LDL)/*Very low-density-lipoprotein* (VLDL)- und *High-density-lipoprotein* (HDL)-Cholesterin wurden mit Hilfe des *HDL and LDL/VLDL Quantification Colorimetric/Fluorometric Kit* (BioVision Inc., Milpitas, CA, USA) den Herstellerangaben entsprechend bestimmt. Die Cholesterinkonzentration ist in mg/dl angegeben.

Die ELISA-Messung sowie die Bestimmung der Cholesterinkonzentration wurden von Frau Irmhild Rüter durchgeführt.

### 2.7 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der *GraphPad Prism Software* Version 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Die Daten wurden jeweils als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) dargestellt. Ausreißer wurden mit Hilfe des Grubb's Test ( $\alpha = 0,05$ ) identifiziert und von der Analyse ausgeschlossen. Die Datensätze wurden unter Verwendung des *d'Agostino-Pearson Tests* auf eine Normalverteilung der generierten Daten getestet. Bei einer Stichprobengröße von weniger als zehn wurde kein Test durchgeführt und eine Normalverteilung der Daten angenommen. Normalverteilte Daten wurden unter Verwendung des ungepaarten, zweiseitigen *student's t-test* analysiert. Für nicht-normalverteilte Daten wurde der ungepaarte, zweiseitige, *Mann-Whitney Test* verwendet. Zur Analyse von Zellkultur-Daten, die auf eine zugehörige Kontrolle normalisiert waren, wurde der gepaarte *Wilcoxon-Test* angewandt.

Bei der Analyse von mehr als zwei Datensätzen wurde eine *One-Way-ANOVA* mit anschließendem *Sidak's multiple comparison Test* durchgeführt. Die Daten der Multiplex-Analyse wurden mit Hilfe des *Kruskal-Wallis-Tests* und anschließendem *Dunn's multiple comparisons Test* durchgeführt. Waren die Daten auf eine eigene Kontrolle normalisiert, erfolgte die Analyse mit Hilfe des gepaarten *Friedman Tests* mit anschließendem *Dunn's multiple comparisons Test*. Der Gewichtsverlauf der Tiere sowie die Verlaufskurven der Glukosekonzentration in den Glukosetoleranztests wurden mittels *Two-Way-ANOVA* analysiert. Ein *P*-Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant erachtet.

## 3 Ergebnisse

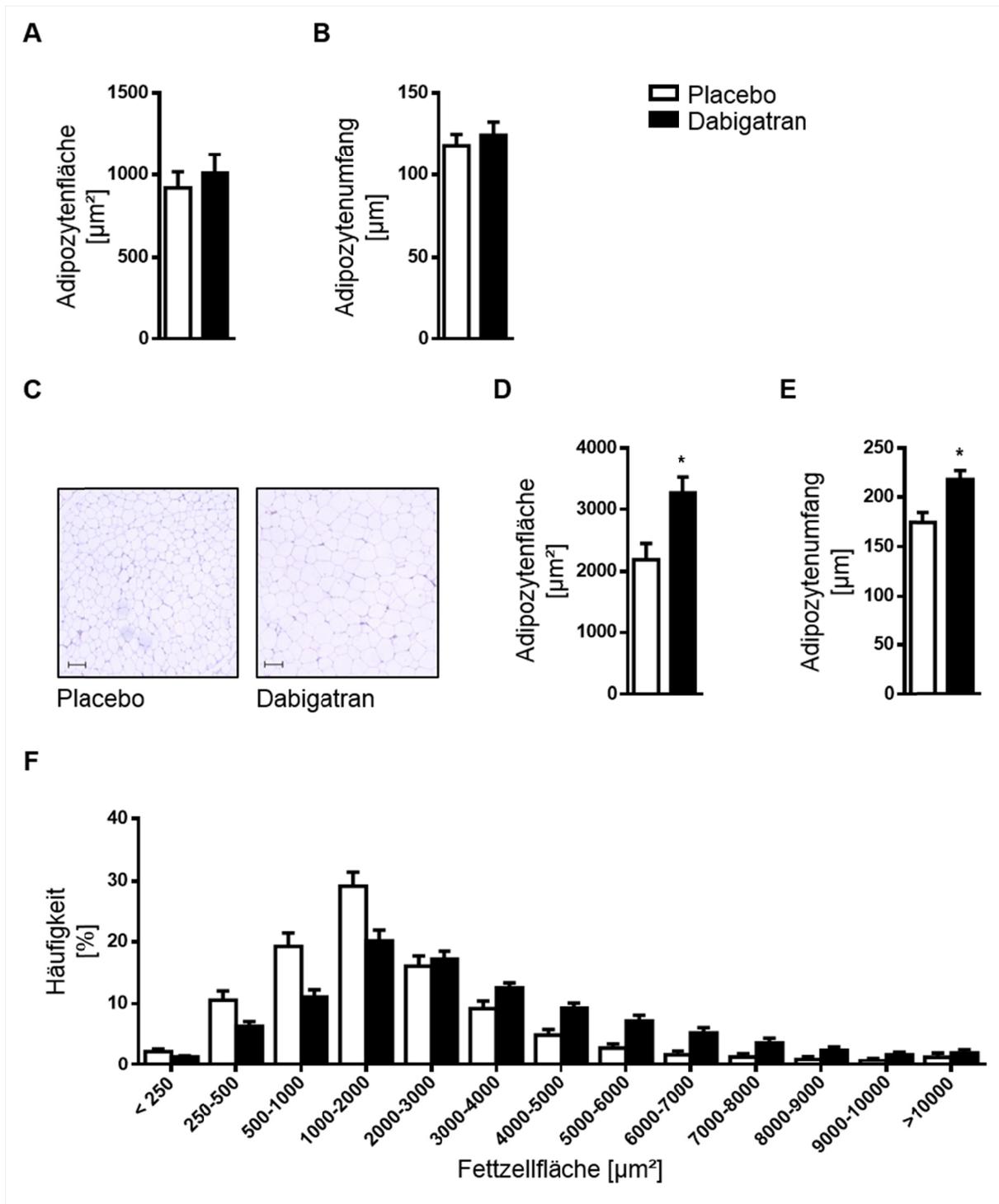
Um den Einfluss einer pharmakologischen Thrombininhibition durch den oralen Thrombininhibitor Dabigatran auf Entzündungsprozesse, insbesondere im Fettgewebe, aber auch in atherosklerotischen Läsionen der Aorta, zu untersuchen, wurde ein Mausmodell der diätinduzierten Adipositas und akzelerierten Atherosklerose gewählt. Weibliche *Ldlr*-defiziente Mäuse wurden ab einem Alter von 10 Wochen mit einer fettreichen Diät, die entweder mit 5 mg/g Futter Dabigatranetexilat oder der entsprechenden Placebosubstanz versetzt war, behandelt (siehe Abb. 2).

### 3.1 Einfluss von Dabigatran auf die Entwicklung von Adipositas und Insulinresistenz

#### 3.1.1 Fettzellgröße und Fettzellgrößenverteilung im viszeralen Fettgewebe

Um einen Einfluss von Dabigatran auf die Fettgewebsmorphologie zu untersuchen, wurde die Fettzellgröße im viszeralen Fettgewebe der behandelten Tiere an H&E gefärbten Paraffinschnitten bestimmt. Nach 4-wöchiger Behandlung zeigte sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf Fläche und Umfang der Adipozyten zwischen den Behandlungsgruppen (Abb. 5 A, B). Nach 20-wöchiger Behandlung waren jedoch die Fettzellen der Dabigatran-behandelten Tiere im Vergleich zur Placebo-Gruppe signifikant vergrößert (Abb. 5 C-E) und die relative Verteilung der Fettzellgröße verschob sich in dieser Gruppe zu größeren Fettzellflächen (Abb. 5 F).

Da erst nach 20-wöchiger Behandlung signifikante Unterschiede im Fettgewebe der Behandlungsgruppen auftraten, wurden alle weiteren Untersuchungen an Tieren durchgeführt, die 20 Wochen behandelt worden waren.



**Abbildung 5. Fettzellgröße und Fettzellgrößenverteilung im viszeralen Fettgewebe.**

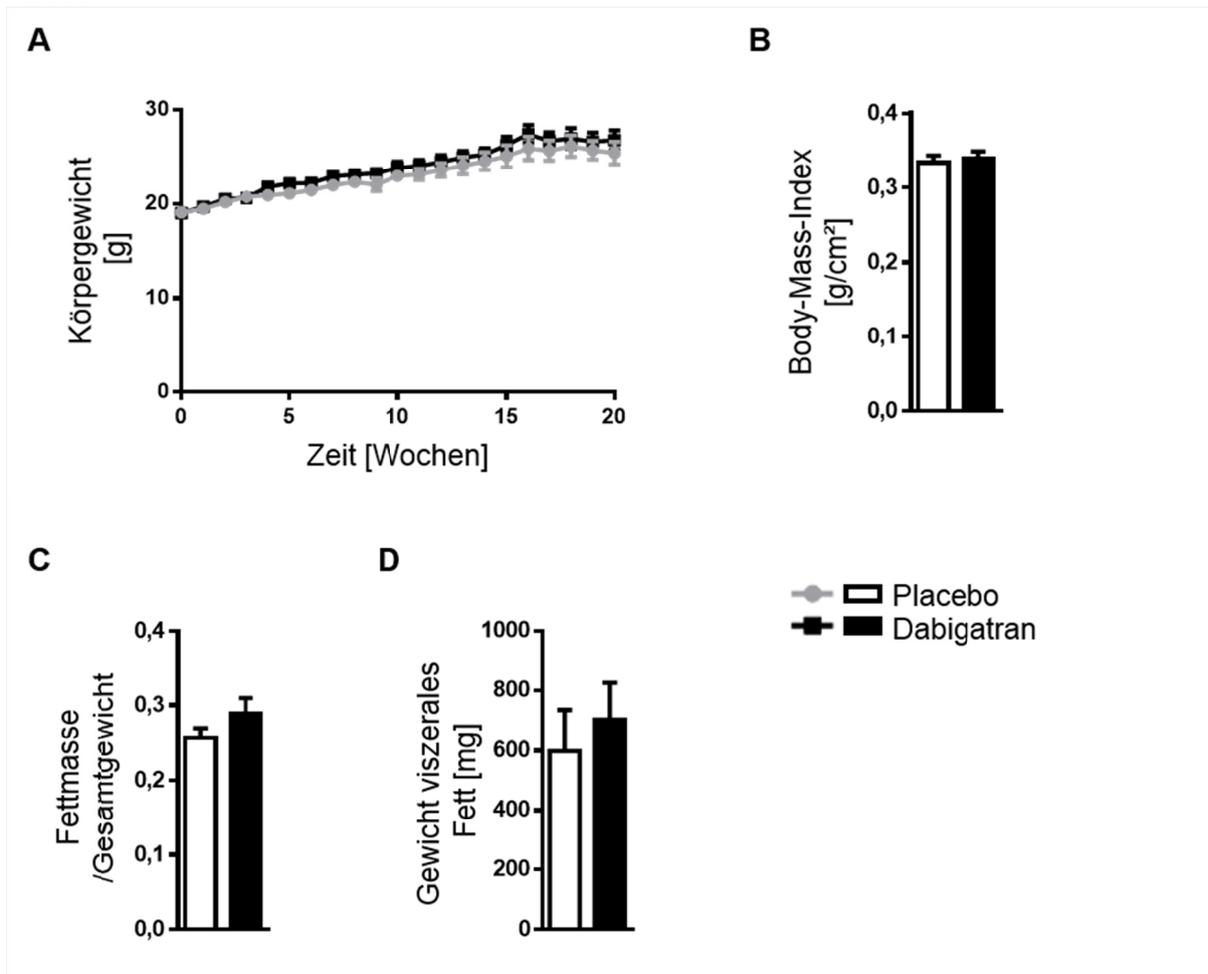
Die Adipozytengröße im viszeralen Fettgewebe wurde an H&E gefärbten Paraffinschnitten bestimmt. **A** und **B** zeigen die Adipozytenfläche und den Adipozytenumfang nach vierwöchiger Behandlung mit Dabigatran oder Placebo. In **C** sind repräsentative Bilder der H&E-Färbung des viszeralen Fettgewebes nach 20 Wochen Behandlung gezeigt. Die Bilder wurden in 100-facher Vergrößerung aufgenommen und die Maßstabsbalken entsprechen 100  $\mu\text{m}$ . In **D** und **E** sind Fläche und Umfang der Adipozyten nach 20-wöchiger Behandlungsdauer gezeigt. **F** zeigt die relative Verteilung der Fettzellgröße in den Behandlungsgruppen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM;  $n=5$  in A und B,  $n=24, 22$  in D-F; \*  $P < 0,05$ .

Teile dieser Abbildung sind auch Bestandteil der Habilitationsschrift von Frau Dr. Maria Grandoch.

### **3.1.2 Gewichtszunahme und Körperfettanteil**

Um auszuschließen, dass eventuelle Veränderungen des Fettgewebes durch Unterschiede im Körpergewicht oder Körperfettanteil der Behandlungsgruppen begründet waren, wurden die Tiere während der 20-wöchigen Behandlungsdauer wöchentlich gewogen. Die Gewichtszunahme unterschied sich nicht zwischen den beiden Behandlungsgruppen und auch der am Ende des Behandlungszeitraums berechnete BMI zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen (Abb. 6 A und B).

Die Bestimmung des Körperfettanteils erfolgte am Ende der Behandlungsdauer mit Hilfe eines Kernspinresonanztomographen und die Masse des viszeralen Fetts wurde nach der Organentnahme bestimmt. Auch hier zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Placebo- und Dabigatran-behandelten Tieren (Abb. 6 C und D).



**Abbildung 6. Gewichtszunahme, Body-Mass-Index und Körperfettanteil.**

Weibliche *Ldlr*<sup>-/-</sup> erhielten für 20 Wochen eine fettreiche Diät, die entweder Dabigatran oder die entsprechende Placebosubstanz enthielt. **A** zeigt die Entwicklung des Körpergewichts während der 20-wöchigen Behandlung, **B** den Body-Mass-Index zum Endzeitpunkt. In **C** ist der mittels Kernspinresonanzspektroskopie ermittelte Anteil der Fettmasse am Gesamtkörpergewicht gezeigt, in **D** die Masse des viszeralen Fetts. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM; n = 11, 10.

### 3.1.3 Proliferation und *in vitro* Differenzierung muriner 3T3 L1 Präadipozyten nach Stimulation mit Thrombin

Um zu untersuchen, ob der Adipozytenhypertrophie, die in Dabigatran-behandelten *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäusen auftrat, ein direkter Effekt von Thrombin auf die Differenzierung von Adipozyten zugrunde lag, wurden Differenzierungsversuche an 3T3 L1 Zellen durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine murine Präadipozyten-Zelllinie, die *in vitro* zu reifen Adipozyten differenziert werden kann. Die Zellen wurden wie in Abbildung 3 gezeigt mit oder ohne Stimulation mit 3 U/ml Thrombin in 7 Tagen zu reifen Adipozyten differenziert und die eingelagerten Lipidvesikel mittels ORO-Färbung quantifiziert. Hier zeigte sich eine hemmende Wirkung von Thrombin auf die Lipidakkumulation in 3T3 L1 Zellen, die durch

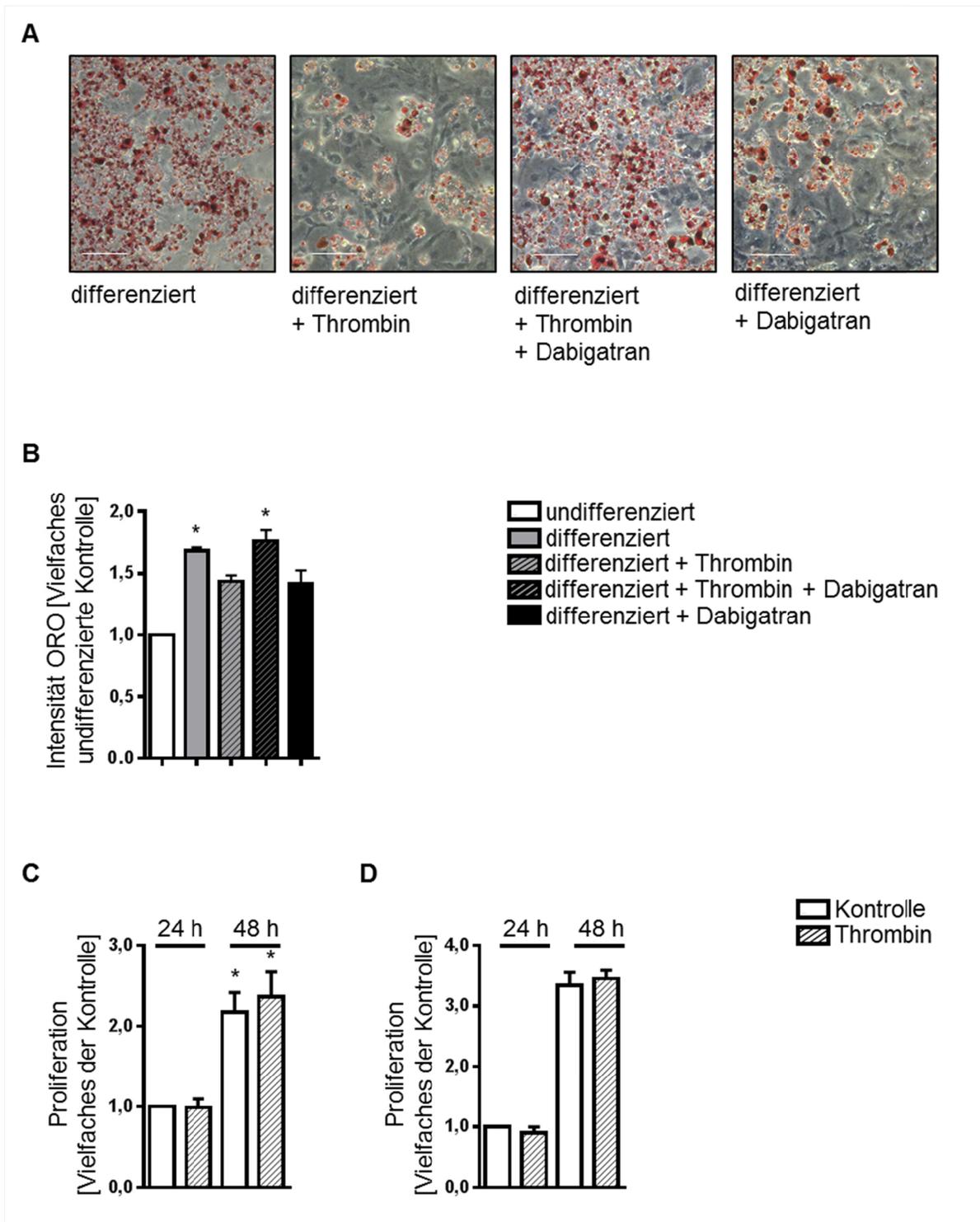
## Ergebnisse

zusätzliche Applikation von Dabigatran wieder aufgehoben werden konnte. Interessanterweise zeigte eine Applikation von Dabigatran allein ebenfalls einen inhibitorischen Effekt auf die Fettzellendifferenzierung (Abb. 7 A, B), was möglicherweise auf Thrombin-unabhängige Effekte von Dabigatran hindeutet.

Die inhibitorische Wirkung von Thrombin auf die Lipideinlagerung könnte eine mögliche Erklärung für die vergrößerten Adipozyten im viszeralen Fettgewebe der Dabigatran-behandelten Tiere sein, in denen der inhibitorische Effekt von Thrombin auf die Lipideinlagerung in Adipozyten durch Dabigatran aufgehoben wird.

Die Proliferation der Präadipozyten wurde durch Thrombin nicht beeinflusst (Abb. 7 C, D).

## Ergebnisse



**Abbildung 7. Differenzierung und Proliferation mit Thrombin stimulierter 3T3 L1 Zellen.**

3T3 L1 Zellen wurden *in vitro* für sieben Tage unter Zugabe von 3 U/ml Thrombin, 500 nM Dabigatran oder einer Kombination von beiden zu reifen Adipozyten differenziert und die Lipideinlagerung mittels ORO quantifiziert. In **A** sind repräsentative Bilder der ORO-gefärbten Zellen unter den unterschiedlichen Behandlungsbedingungen gezeigt. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 µm. **B** zeigt die Quantifizierung der ORO-Färbung. In **C** und **D** wurde die Proliferation undifferenzierter 3T3 L1 Präadipozyten nach Stimulation mit Thrombin durch Färbung des Gesamtproteins mit Coomassie (**C**) und mit Hilfe des Rotitest<sup>®</sup> Vital (**D**) analysiert. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert ± SEM; n = 7 in **B**, n = 6 in **C** und n = 3 in **D**; \*  $P < 0,05$  versus undifferenziert (**B**) bzw. Kontrolle 24 h (**C**).

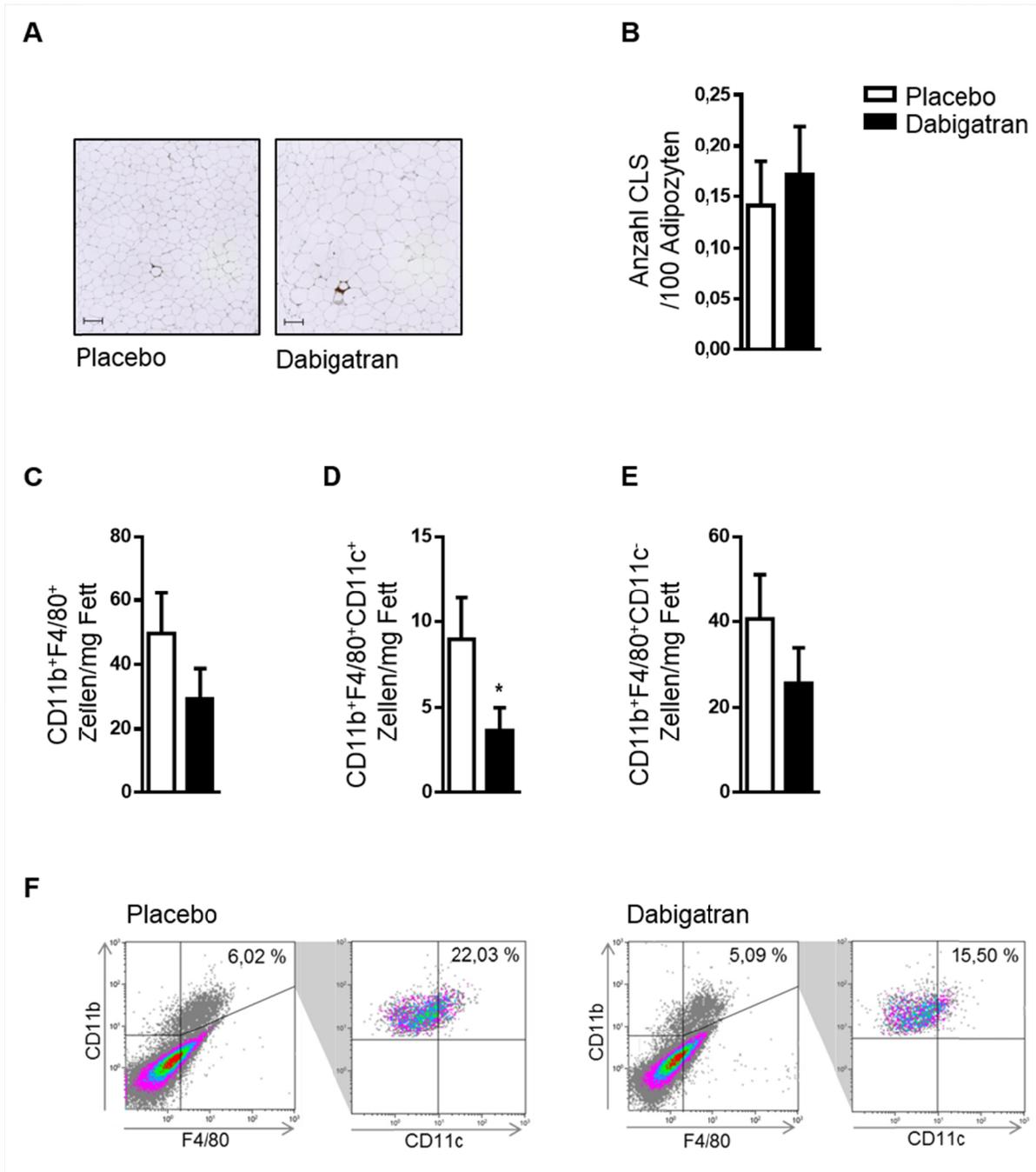
### **3.1.4 Entzündung des viszeralen Fettgewebes**

#### **3.1.4.1 Immunzellpopulationen im viszeralen Fettgewebe**

Da eine Adipozytenhypertrophie in der Regel entzündliche Veränderungen im Fettgewebe und eine vermehrte Akkumulation von Makrophagen bedingt,<sup>79</sup> wurde das viszerale Fettgewebe der Dabigatran-behandelten Tiere auf die Infiltration von Makrophagen untersucht. Eine immunhistochemische Färbung von Mac-2 und die Quantifizierung der angefärbten, charakteristischen CLS im viszeralen Fettgewebe, zeigte jedoch keinen Unterschied in der Makrophageninfiltration zwischen den Behandlungsgruppen (Abb. 8 A, B). Auch eine durchflusszytometrische Analyse der aus dem viszeralen Fettgewebe isolierten stromal-vaskulären Zellen auf CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> Makrophagen zeigte keinen Unterschied in der Makrophagenakkumulation zwischen den Dabigatran- und Placebo-behandelten Mäusen (Abb. 8 C, F). Eine detailliertere Analyse der Makrophagensubpopulationen ergab jedoch, dass in den Dabigatran-behandelten Mäusen die Anzahl der entzündlichen CD11c-exprimierenden Makrophagen signifikant reduziert war, während die Anzahl anti-entzündlicher CD11c-negativer Makrophagen nicht beeinflusst war (Abb. 8 D-F).

Die durchflusszytometrische Analyse weiterer Immunzellpopulationen im viszeralen Fettgewebe der beiden Behandlungsgruppen zeigte keine Unterschiede in der Anzahl der CD45<sup>+</sup> Leukozyten, der CD11b<sup>+</sup>Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophilen, der CD19<sup>+</sup> B-Zellen sowie der CD3<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 9).

Repräsentative Schemata für die durchflusszytometrische Analyse der verschiedenen Immunzellpopulationen finden sich in den Abbildungen 30 (Makrophagen), 31 (Lymphozyten) und 32 (Neutrophile) im Appendix.

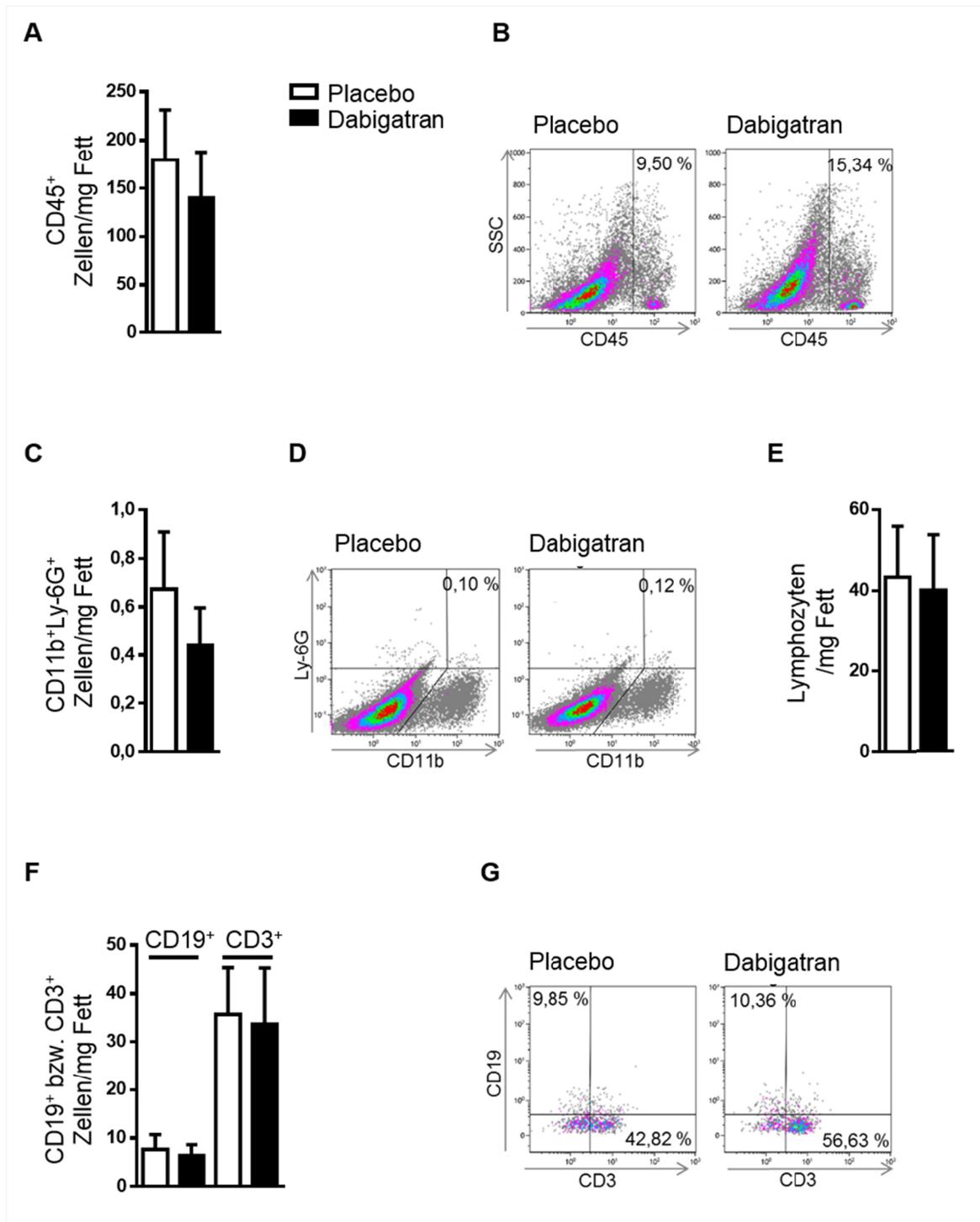


**Abbildung 8. Makrophageninfiltration im viszeralen Fettgewebe.**

**A** Repräsentative Bilder von Mac-2 gefärbten CLS im viszeralen Fettgewebe Dabigatran- und Placebo-behandelter *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse. Die Bilder wurden in 100-facher Vergrößerung aufgenommen, die Maßstabsbalken entsprechen 100 µm. In **B** ist die Anzahl der CLS pro 100 Adipozyten gezeigt. **C** Durchflusszytometrische Analyse der CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> Zellen im viszeralen Fettgewebe, sowie der CD11c<sup>+</sup> (**D**) und CD11c<sup>-</sup> (**E**) Makrophagenpopulationen. Es ist jeweils die Anzahl der Zellen pro mg Fettgewebe gezeigt. In **F** sind repräsentative Plots der CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> und CD11c<sup>+</sup> Zellen dargestellt, gezeigt sind jeweils nur die lebenden Zellen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert ± SEM; n = 24, 21 in B und n = 13, 11 in C-E; \* *P* < 0,05 versus Placebo.

Teile dieser Abbildung sind auch Bestandteil der Habilitationsschrift von Frau Dr. Maria Grandoch.

## Ergebnisse



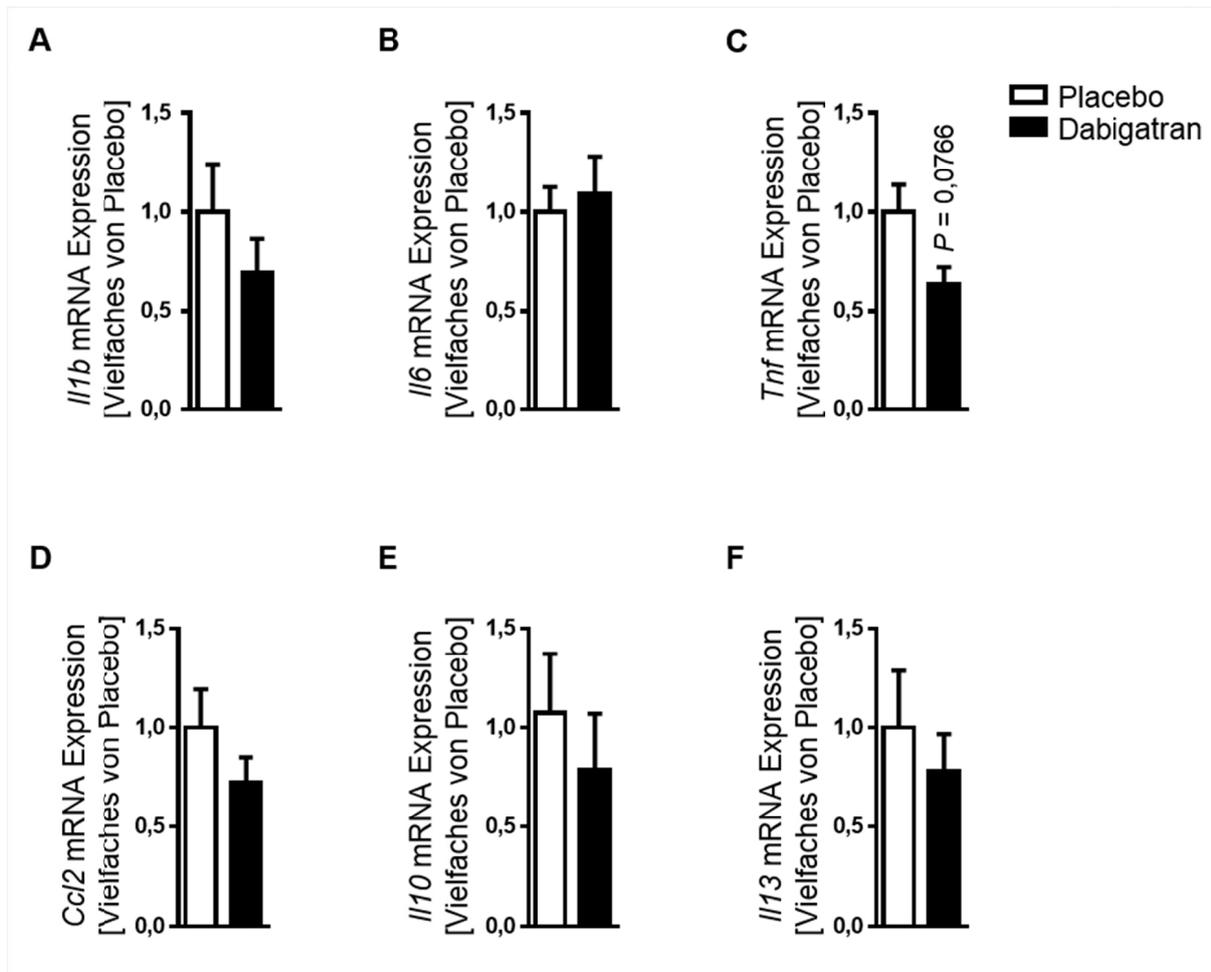
### Abbildung 9. Immunzellpopulationen im viszeralen Fettgewebe.

Durchflusszytometrische Analyse von **A, B** CD45<sup>+</sup> Leukozyten, **C, D** CD11b<sup>+</sup>Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophilen, **E** Lymphozyten und **F, G** CD19<sup>+</sup> B- und CD3<sup>+</sup> T Zellen im viszeralen Fettgewebe Dabigatran- und Placebo-behandelter *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse. Es ist jeweils die absolute Zellzahl pro mg Fettgewebe angegeben. In **B, D** und **G** sind repräsentative Plots der durchflusszytometrischen Analyse gezeigt. In **B** und **D** sind jeweils nur die lebenden Zellen, in **G** nur die CD45<sup>+</sup>Zellen gezeigt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert ± SEM; n = 8 in A, E und F und n = 7, 5 in C.

### **3.1.4.2 Expression und Sekretion pro- und anti-entzündlicher Zytokine im viszeralem Fettgewebe**

Um den Einfluss von Dabigatran auf pro- und anti-entzündliche Prozesse im Fettgewebe weiter zu charakterisieren, wurden neben den Immunzellpopulationen im Fettgewebe auch die Expression und Sekretion verschiedener entzündlicher und anti-entzündlicher Zytokine untersucht. Eine qPCR-Analyse des viszeralem Fettgewebes zeigte einen deutlichen Trend zu einer reduzierten Expression von *Tnfa* in Dabigatran-behandelten Tieren, der jedoch nicht signifikant war. Die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine *Il1b*, *Il6* und *Ccl2* war ebenfalls nicht signifikant reguliert und auch die mRNA-Expression der anti-entzündlichen Zytokine *Il10* und *Il13* war in den untersuchten Behandlungsgruppen nicht unterschiedlich (Abb. 10).

## Ergebnisse

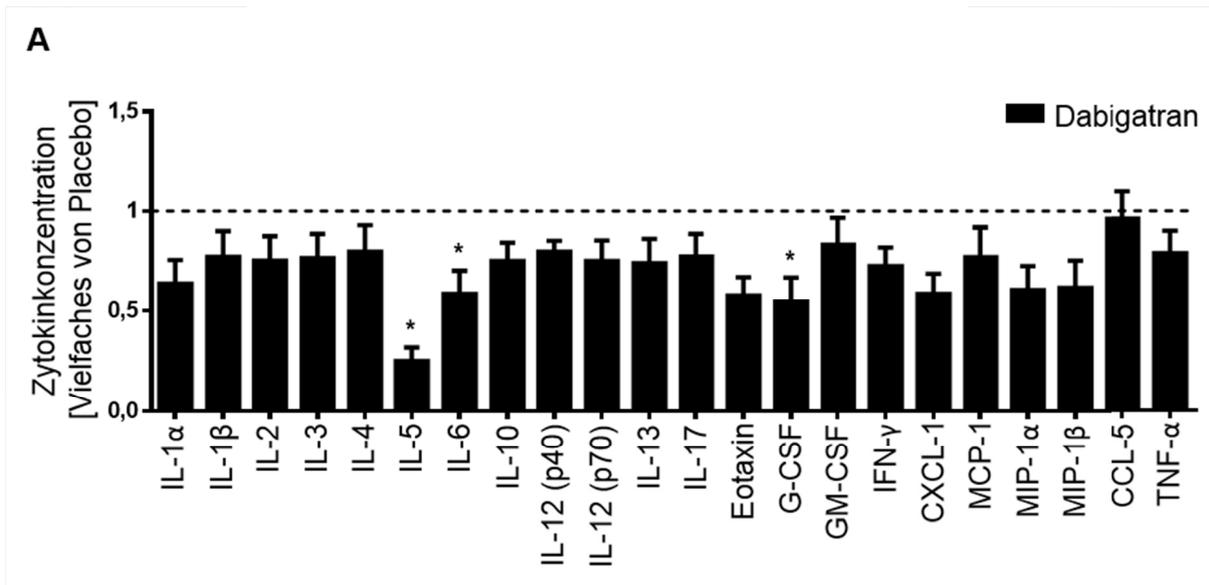


**Abbildung 10. mRNA-Expression pro- und anti-entzündlicher Zytokine im viszeralen Fettgewebe.**

Die mRNA-Expression der Zytokine **A** *Il1b*, **B** *Il6*, **C** *Tnfa*, **D** *Ccl2*, **E** *Il10* und **F** *Il13* wurde mittels qPCR analysiert. Dargestellt ist jeweils die mRNA-Expression als Vielfaches der Placebo-behandelten Tiere. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM; n = 10,12 in A, E n = 8,9 in B, F n = 10,13 in C, n = 12,13 in D.

Zusätzlich zur mRNA-Expression der Zytokine im Fettgewebe wurde die Sekretion diverser pro- und anti-inflammatorischer Zytokine aus dem viszeralen Fettgewebe der Dabigatran- und Placebo-behandelten Tiere untersucht. Dazu wurden die Zytokinkonzentrationen im konditionierten Medium des viszeralen Fettgewebes mittels Multiplex-Analyse bestimmt. Hier zeigte sich analog zu den Ergebnissen der qPCR-Analyse des viszeralen Fettgewebes ein Trend zur reduzierten Sekretion, jedoch keine signifikante Regulation, der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und MCP-1 (CCL-2). Die IL-6 Sekretion aus dem viszeralen Fettgewebe war in den Dabigatran-behandelten Tieren signifikant reduziert. Dies impliziert eine post-transkriptionelle Regulation, da die mRNA-Expression unverändert war. Neben IL-6 waren auch die Konzentrationen von IL-5 und G-CSF in den Dabigatran-behandelten Tieren signifikant reduziert, während die Sekretion

anti-inflammatorischer Zytokine, wie IL-4, IL-10 oder IL-13 unverändert war und höchstens einen Trend zu verringerter Sekretion zeigte (Abb. 11).



**Abbildung 11. Zytokinsekretion des viszeralen Fettgewebes.**

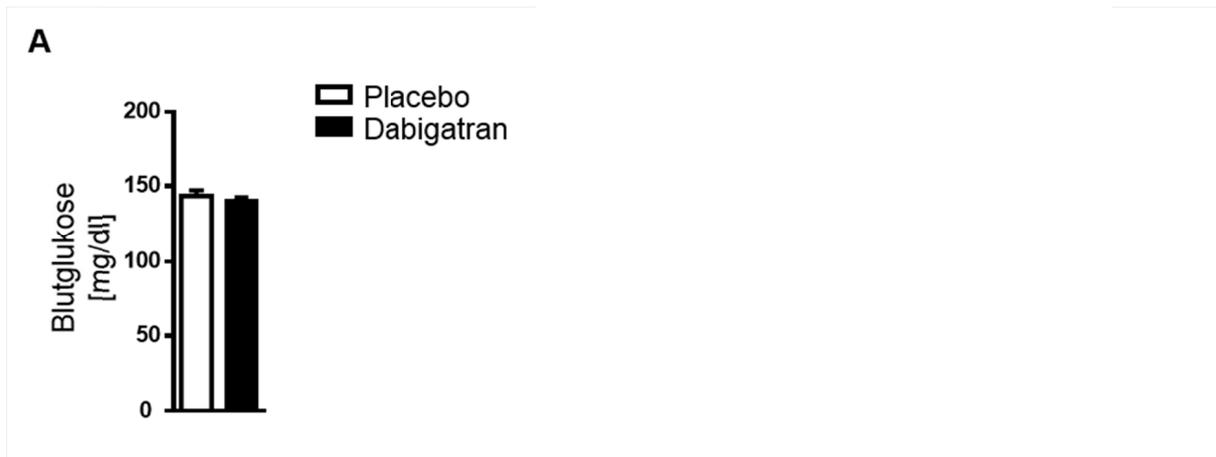
**A** Die Zytokinsekretion im konditionierten Medium des viszeralen Fettgewebes der Dabigatran- und Placebo-behandelten Tiere wurde mittels eines Multiplex-Immunoassays bestimmt. Gezeigt ist die Zytokinsekretion als Vielfaches der Placebo-behandelten Tiere. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM;  $n = 7-8$ . \*  $P < 0,05$  versus Placebo.

IL-6 wird im Fettgewebe sowohl von Adipozyten als auch von M1-polarisierten, CD11c<sup>+</sup>, entzündlichen Makrophagen sezerniert.<sup>79, 88</sup> Die reduzierte Sekretion von IL-6 im viszeralen Fettgewebe ging hier mit einer Reduktion der Anzahl an CD11c<sup>+</sup> Makrophagen in den Dabigatran-behandelten Mäusen einher, welche möglicherweise eine Ursache für die verminderte Sekretion darstellt.

### 3.1.5 Entwicklung von Glukosetoleranz und Insulinresistenz

Um zu untersuchen, ob die durch die Dabigatran-Therapie hervorgerufenen Veränderungen des viszeralen Fettgewebes einen Einfluss auf die Entwicklung einer Glukosetoleranz und Insulinresistenz hatten, wurden zu einem frühen (7-9 Wochen Behandlung) und einem späten (17-19 Wochen Behandlung) Zeitpunkt Glukosetoleranz- und Insulinsensitivitätstests durchgeführt.

Eine Bestimmung der Nüchternglukosekonzentration im Blut nach 7-9 Wochen zeigte keinen Unterschied zwischen Dabigatran- und Placebo-behandelten Tieren (Abb. 12).



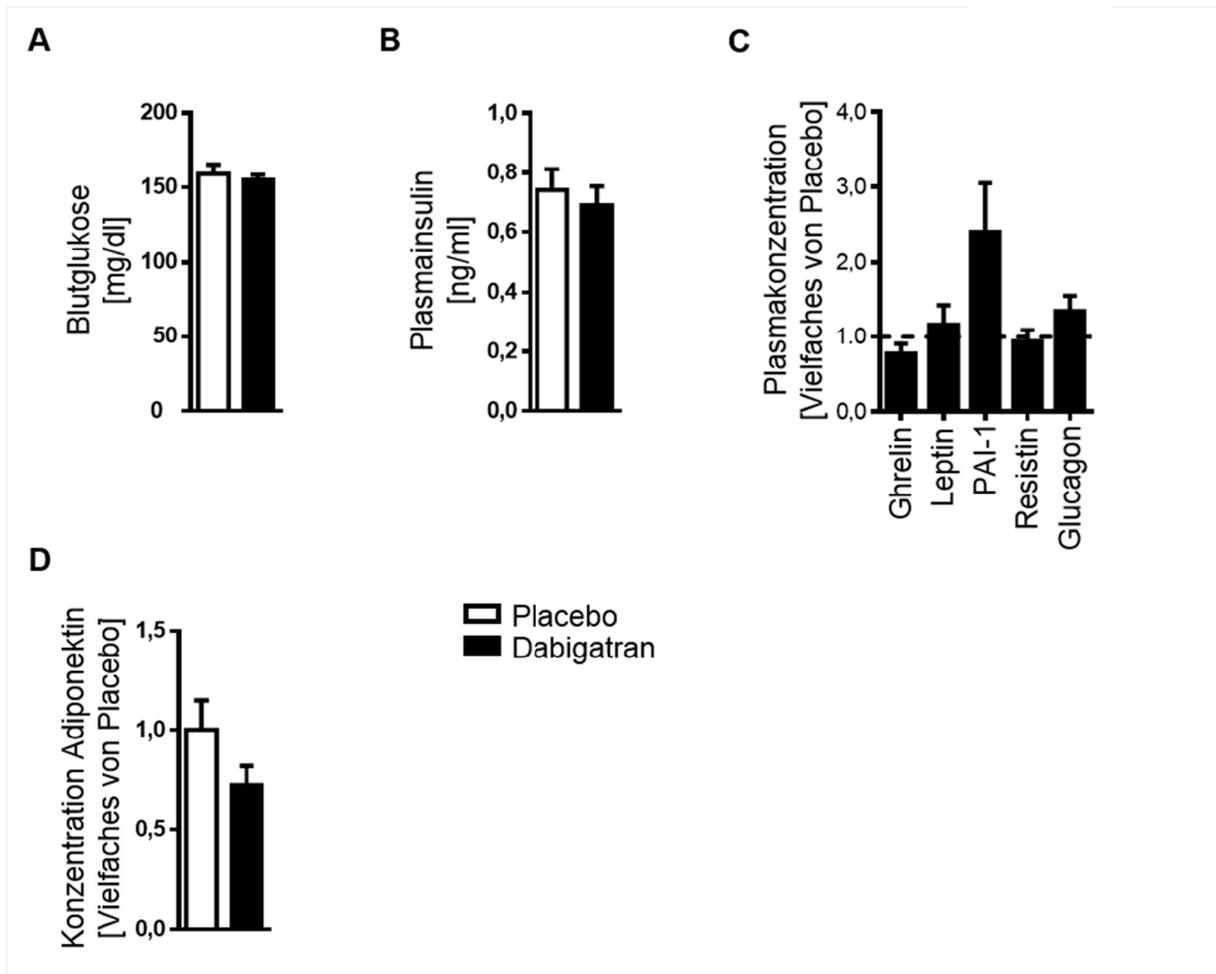
**Abbildung 12. Nüchternblutglukosekonzentration nach 7-9 Wochen Behandlung mit Dabigatran.**

Weibliche *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse wurden mit dem Thrombininhibitor Dabigatran oder der entsprechenden Placebosubstanz behandelt. **A** Nach 7-9-wöchiger Behandlung wurden die Tiere für 6 Stunden nüchtern gehalten und die Glukosekonzentration im Blut bestimmt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM; n = 9, 8.

Auch am Ende der 20-wöchigen Behandlungsdauer zeigte sich kein Unterschied in Bezug auf die Blutglukose-, sowie die Plasmainsulinkonzentration zwischen den Dabigatran- und Placebo-behandelten *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäusen. Eine Bestimmung der Konzentration der Adipokine Ghrelin, Leptin, PAI-1, Resistin, Glukagon und Adiponektin im Plasma der für 20 Wochen behandelten Mäuse zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (Abb. 13).

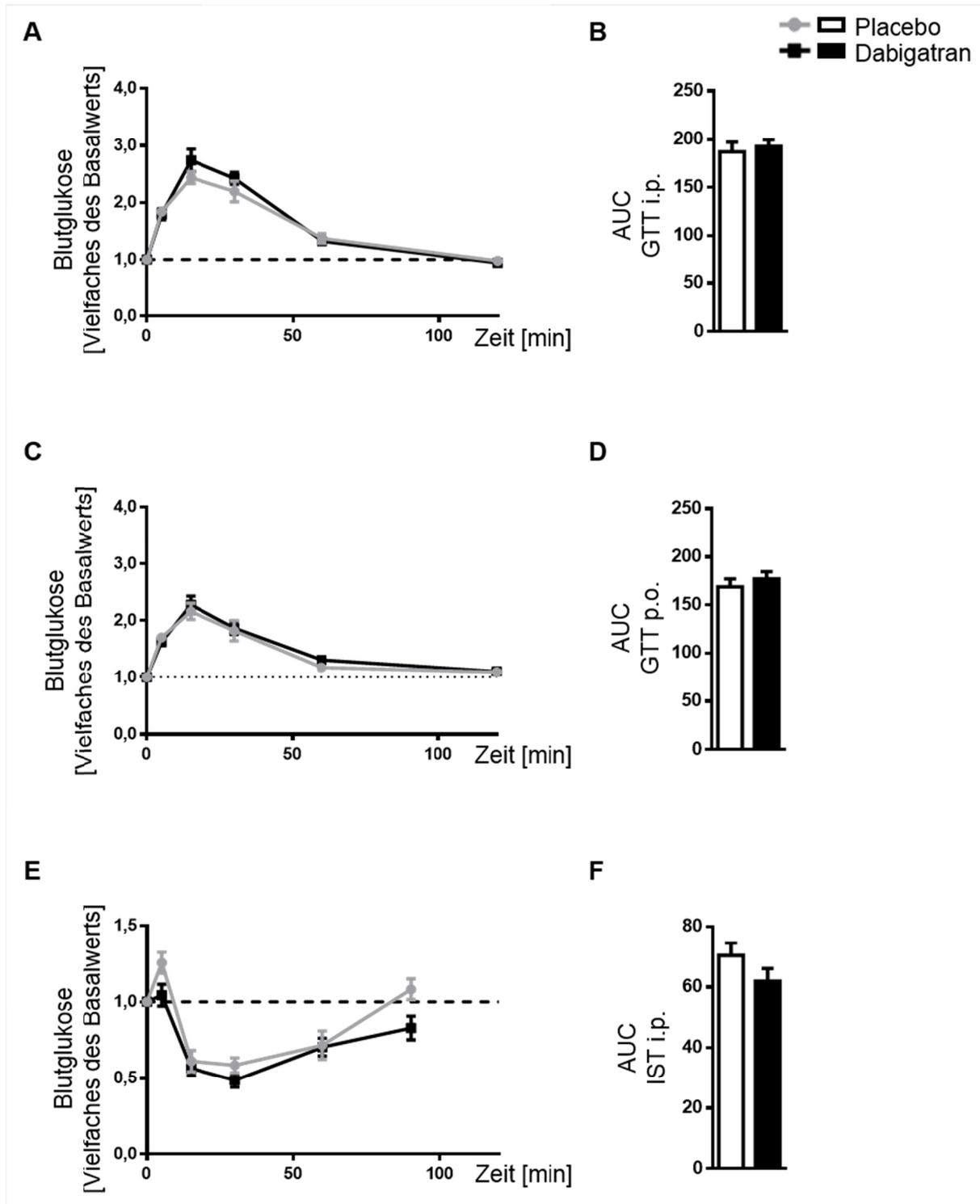
Die Glukosetoleranz der Tiere wurde zum einen nach intraperitonealer, zum anderen nach peroraler Applikation von Glukose untersucht. Bei beiden fand sich kein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen, weder zum frühen, noch zum späten Messzeitpunkt (Abb. 14 und 15, jeweils A-D). Auch die Tests der Insulinsensitivität zeigten keinen signifikanten Unterschied, jedoch zeigte sich hier zu beiden Zeitpunkten ein leichter Trend zu einer verbesserten Insulinsensitivität in den Dabigatran-behandelten Tieren (Abb. 14 und 15, jeweils E und F).

## Ergebnisse



**Abbildung 13. Glukose-, Insulin- und Adipokinkonzentration nach 17-20 Wochen Behandlung.**

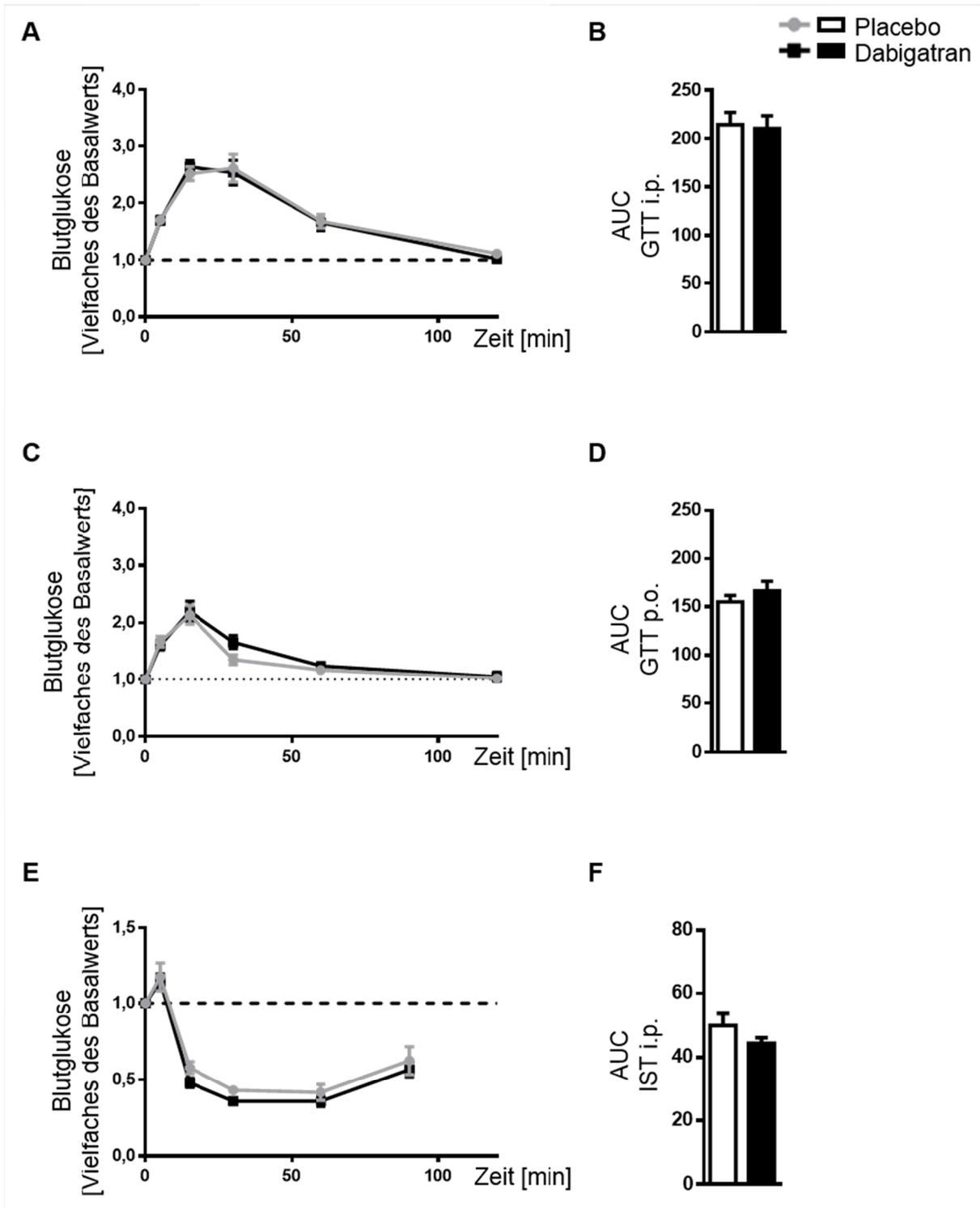
Weibliche *Ldlr<sup>-/-</sup>* Mäuse wurden mit dem Thrombininhibitor Dabigatran oder der entsprechenden Placebosubstanz behandelt. **A** Nach 17-19-wöchiger Behandlung wurden die Tiere für 6 Stunden nüchtern gehalten und die Glukosekonzentration im Blut bestimmt. **B** Die Plasmainsulinkonzentrationen wurden mit Hilfe eines ELISAs bestimmt. **C** Die Konzentration der Adipokine Ghrelin, Leptin, PAI-1, Resistin, Glukagon und **D** Adiponektin im Plasma wurde mit Hilfe eines Multiplex Immunoassays bestimmt. Gezeigt sind die absoluten Konzentrationen von Glukose und Insulin, sowie die Adipokinkonzentration als Vielfaches der Placebo-behandelten Tiere. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM; n = 13 (A), n = 6 (B), n = 5-8 (C), n = 8 (D).



**Abbildung 14. Glukosetoleranz und Insulinsensitivität nach 7-9 Wochen Behandlung.**

**A, B** Messung der Glukosetoleranz nach intraperitonealer Glukoseapplikation (GTT i.p.) im Alter von 17 Wochen. **C, D** Messung der Glukosetoleranz nach peroraler Glukoseapplikation (GTT p.o.) im Alter von 18 Wochen und **E, F** Messung der Insulinsensitivität nach intraperitonealer Applikation von Insulin (IST i.p.) im Alter von 19 Wochen. Gezeigt sind jeweils der Verlauf der Blutglukosekonzentration als Vielfaches der Basalkonzentration (A, C, E), sowie die berechnete Fläche unter der Kurve (AUC; B, D, F). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SEM; n = 9, 8 (A, B), n = 8 (C, D), n = 7 (E, F).

## Ergebnisse



**Abbildung 15. Glukosetoleranz und Insulinsensitivität nach 17-19 Wochen Behandlung.**

**A, B** Messung der Glukosetoleranz nach intraperitonealer Glukoseapplikation (GTT i.p.) im Alter von 27 Wochen. **C, D** Messung der Glukosetoleranz nach peroraler Glukoseapplikation (GTT p.o.) im Alter von 28 Wochen und **E, F** Messung der Insulinsensitivität nach intraperitonealer Applikation von Insulin (IST i.p.) im Alter von 29 Wochen. Gezeigt sind jeweils der Verlauf der Blutglukosekonzentration als Vielfaches der Basalkonzentration (A, C, E), sowie die berechnete Fläche unter der Kurve (AUC; B, D, F). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SEM; n = 13.

Teile dieser Abbildung sind auch Bestandteil der Habilitationsschrift von Frau Dr. Maria Grandoch.

## 3.2 Einfluss von Thrombin und Dabigatran auf die Makrophagenbindung und -polarisation

Die Ursache für die reduzierte Anzahl CD11c<sup>+</sup> Makrophagen im viszeralen Fettgewebe Dabigatran-behandelter *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse könnte zum einen eine verminderte Einwanderung der Makrophagen ins Fettgewebe, zum anderen eine Hemmung der M1-Polarisation der residenten Fettgewebsmakrophagen durch Dabigatran sein. Im Folgenden wurden darum der Einfluss von Thrombin auf die Monozytenbindung an Adipozyten und die Polarisierung von Makrophagen analysiert.

### 3.2.1 Monozytenbindung an differenzierte 3T3 L1 Adipozyten

Um einen möglichen Einfluss von Thrombin auf die Bindung von Monozyten an Adipozyten zu untersuchen, wurden 3T3 L1 Adipozyten, die für sieben Tage mit oder ohne die Zugabe von Thrombin differenziert worden waren, mit Calcein-AM-markierten, humanen, monozytären U-937 Zellen inkubiert. Eine Quantifizierung der gebundenen U-937 Zellen zeigte, dass eine Stimulation der 3T3 L1 Adipozyten mit Thrombin das Bindungsverhalten der U-937 Zellen nicht beeinflusste (Abb. 16).



**Abbildung 16. Monozytenbindung an 3T3 L1 Adipozyten.**

**A** 3T3 L1 Zellen wurden unter Kontrollbedingungen oder unter Stimulation mit 3 U/ml Thrombin für sieben Tage zu reifen Adipozyten differenziert und mit Calcein-AM-markierten U-937 Zellen inkubiert. Die Quantifizierung der Monozytenbindung ist als Vielfaches der jeweiligen differenzierten Kontrolle dargestellt. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM; n = 6.

### 3.2.2 Polarisierung von Makrophagen

Eine weitere mögliche Ursache für die Reduktion der CD11c<sup>+</sup> Makrophagen im viszeralen Fettgewebe der Dabigatran-behandelten Tiere wäre ein Einfluss von Thrombin auf die

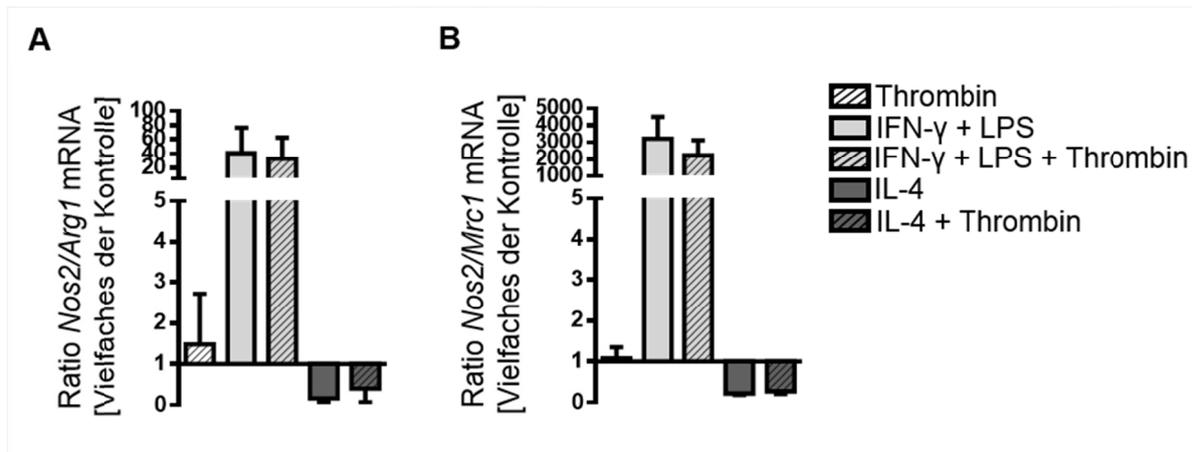
Polarisation von Makrophagen. Um dies zu untersuchen wurden *in vitro* Polarisationsversuche mit aus dem Knochenmark von C57BL/6J-Mäusen isolierten Makrophagen durchgeführt.

### 3.2.2.1 Direkter Effekt von Thrombin auf die Polarisierung von Makrophagen

In einem ersten Schritt wurde ein direkter Einfluss von Thrombin auf die Makrophagenpolarisation untersucht. Dazu wurden die isolierten Makrophagen *in vitro* 7 Tage lang durch Zugabe von M-CSF zu reifen Makrophagen differenziert. Diese wurden dann für 24 Stunden entweder mit IFN- $\gamma$  und LPS zu pro-inflammatorischen M1-Makrophagen oder mit IL-4 zu anti-inflammatorischen M2-Makrophagen polarisiert. Eine Stimulation mit Thrombin erfolgte entweder allein oder in Kombination mit den zur M1- oder M2-Polarisation eingesetzten Zytokinen.

Die Reinheit der untersuchten Zellpopulation wurde durchflusszytometrisch durch Analyse der Expression der Makrophagenmarker CD11b und F4/80 untersucht.  $94,02 \pm 0,89$  % der untersuchten Zellen war CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> (Daten nicht gezeigt).

Zur Charakterisierung des Makrophagenphänotyps wurde zunächst die mRNA-Expression der für M1-Makrophagen spezifischen *Nos2*, sowie des M2-spezifischen *Mannoserezeptors* *CD206 (Mrc1)* und der ebenfalls M2-spezifischen *Arg1* untersucht. Analysiert wurde das Verhältnis der *Nos2* mRNA-Expression zur Expression von *Mrc1* bzw. *Arg1*. Bei M1-polarisierten Makrophagen ergibt sich eine Ratio  $> 1$ , bei M2-polarisierten Makrophagen  $< 1$ . Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen unpolarisierten und mit Thrombin stimulierten Makrophagen und auch eine Stimulation mit Thrombin zusätzlich zu den zur M1- und M2-Polarisation verwendeten Zytokinen hatte keinen Effekt (Abb. 17).



**Abbildung 17. mRNA-Expression Knochenmarksmakrophagen.**

Aus dem Knochenmark isolierte Makrophagen wurden für sieben Tage *in vitro* zu reifen Makrophagen differenziert und anschließend für 24 Stunden mit 3 U/ml Thrombin, 10 U/ml IFN- $\gamma$  und 1  $\mu$ g/ml LPS oder 20 ng/ml IL-4 stimuliert. Die Expression des M1-Markers *Nos2* sowie der M2-Marker *Arg1* und *Mrc1* wurden mittels qPCR analysiert. Gezeigt ist jeweils die Ratio der **A** *Nos2/Arg-1* und **B** *Nos2/Mrc1* mRNA-Expression als Vielfaches der unpolarisierten Kontrolle. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM; n = 3 (A) und n = 4 (B).

Neben der Analyse der mRNA-Expression, wurden die polarisierten Makrophagen auch durchflusszytometrisch untersucht. Hier diente die Expression von CD86 als Marker für M1-polarisierte Makrophagen, die Expression von CD206 als Kennzeichen einer M2-Polarisierung. Auch hier konnte kein direkter Einfluss einer Stimulation mit Thrombin auf die Makrophagenpolarisation gezeigt werden (Abb. 18). Repräsentative Schemata der durchflusszytometrischen Analyse von M1- und M2-polarisierten Makrophagen sind in Abbildung 33 im Appendix gezeigt.



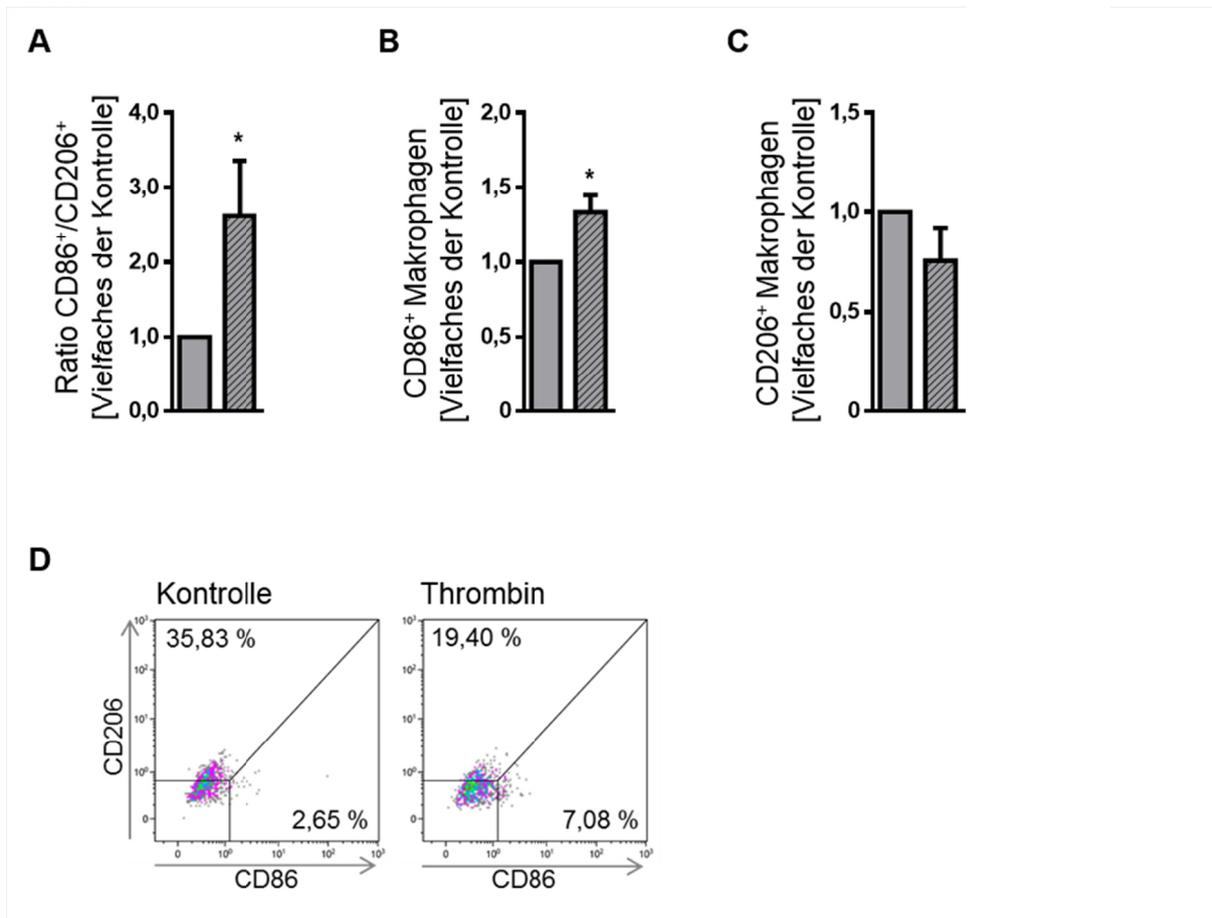
**Abbildung 18. Durchflusszytometrische Analyse mit Thrombin stimulierter Knochenmarksmakrophagen.**

Aus dem Knochenmark isolierte Makrophagen wurden für sieben Tage *in vitro* zu reifen Makrophagen differenziert und anschließend für 24 Stunden mit 3 U/ml Thrombin, 10 U/ml IFN- $\gamma$  und 1  $\mu$ g/ml LPS oder 20 ng/ml IL-4 stimuliert. Die Expression von CD86 und CD206 wurde durchflusszytometrisch analysiert. **A** Die Ratio der CD86<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup> Makrophagen ist als Vielfaches der unpolarisierten Kontrolle dargestellt. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 6.

### 3.2.2.2 Indirekter Effekt von Thrombin auf die Polarisierung von Makrophagen

Da eine direkte Stimulation mit Thrombin keinen Einfluss auf die Polarisierung der Makrophagen hatte, schien es sich um einen indirekt vermittelten Effekt zu handeln. Um die Hypothese zu überprüfen, dass Thrombin die Sekretion von Faktoren aus Fettzellen veränderte und diese sezernierten Faktoren wiederum die Polarisierung von Makrophagen beeinflussten, wurden aus dem Knochenmarkt isolierte und *in vitro* differenzierte Makrophagen für 24 Stunden mit konditioniertem Medium von 3T3 L1 Zellen, die für sieben Tage in An- oder Abwesenheit von Thrombin differenziert worden waren, stimuliert. Die Makrophagenpolarisation wurde durchflusszytometrisch durch Analyse der Expression von CD86 (M1) und CD206 (M2) untersucht.

Das Verhältnis der CD86<sup>+</sup> zu CD206<sup>+</sup> Zellen war signifikant erhöht, wenn die Makrophagen mit dem Medium der mit Thrombin stimulierten 3T3 L1 Zellen inkubiert wurden. Diese Verschiebung beruhte auf einer signifikant größeren Anzahl an CD86<sup>+</sup>, M1-polarisierten Makrophagen im Vergleich zur Stimulation mit Medium von Kontroll-behandelten 3T3 L1 Zellen. Die Anzahl CD206<sup>+</sup>, M2-polarisierter Makrophagen war nicht beeinflusst (Abb 19).



**Abbildung 19. Polarisierung von Makrophagen nach Stimulation mit konditioniertem Medium von 3T3 L1 Zellen.**

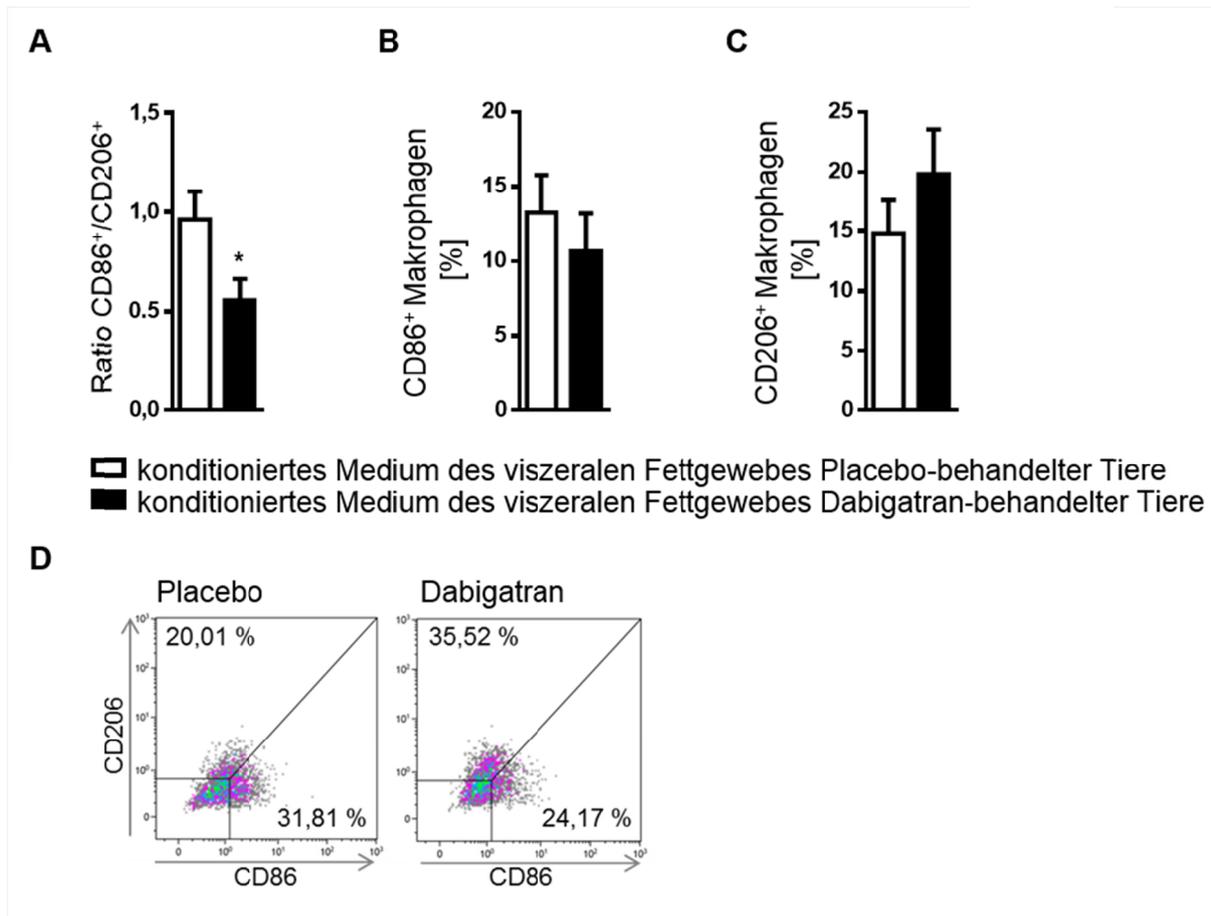
Aus dem Knochenmark isolierte Makrophagen wurden für sieben Tage *in vitro* zu reifen Makrophagen differenziert und anschließend für 24 Stunden mit konditioniertem Medium von 3T3 L1 Zellen, die sieben Tage mit oder ohne Zugabe von Thrombin differenziert worden waren, inkubiert. Die Expression von CD86 und CD206 wurde durchflusszytometrisch analysiert. In **A** ist die Ratio aus CD86<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup> Makrophagen dargestellt, in **B** der Anteil CD86<sup>+</sup> und in **C** der Anteil CD206<sup>+</sup> Makrophagen gezeigt. **D** Repräsentative Plots der mit konditioniertem Medium behandelten CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> Makrophagen. Gezeigt ist jeweils das Vielfache der mit konditioniertem Medium nicht mit Thrombin stimulierter, differenzierter 3T3 L1 Zellen behandelten Kontrolle. Dargestellt sind der Mittelwert ± SEM, n = 7, \* P < 0,05 versus differenzierte Kontrolle.

Dieses Ergebnis stützte die Hypothese, dass Thrombin durch Veränderung des Sekretionsprofils von Adipozyten zu einer verstärkten M1-Polarisierung von Makrophagen im Fettgewebe beiträgt, ohne jedoch einen direkten Effekt auf die Makrophagenpolarisation zu haben. Dies ist auch eine mögliche Erklärung für die reduzierte Anzahl pro-inflammatorischer, CD11c<sup>+</sup> Makrophagen im viszeralen Fettgewebe Dabigatran-behandelter Tiere, bei gleichzeitig unveränderter Gesamtzahl an CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> Makrophagen.

### **3.2.2.3 Effekt von Fettgewebe aus mit Dabigatran behandelten Mäusen auf die Polarisierung von Makrophagen**

Um zu verifizieren, dass die Reduktion an CD11c<sup>+</sup> Makrophagen im viszeralen Fettgewebe Dabigatran-behandelter *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse auf einer veränderten Sekretion von Faktoren aus dem Fettgewebe beruhte, wurden aus dem Knochenmark isolierte und *in vitro* differenzierte Makrophagen mit konditioniertem Medium des viszeralen Fettgewebes der mit Dabigatran- oder Placebo-behandelten Tiere stimuliert und die resultierende Makrophagenpolarisation durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 20).

Die Stimulation mit konditioniertem Medium aus Dabigatran-behandelten Tieren führte im Vergleich zu den Placebo-behandelten Tiere zu einer signifikanten Reduktion des Verhältnisses von CD86<sup>+</sup> zu CD206<sup>+</sup> Makrophagen, was die Ergebnisse der Versuche mit konditioniertem Medium von mit Thrombin stimulierten 3T3 L1 Zellen bestätigte. Der prozentuale Anteil der CD86<sup>+</sup> und CD206<sup>+</sup> Makrophagen war hier nicht signifikant verändert, die Verringerung des Verhältnisses von M1- zu M2-polarisierten Makrophagen scheint hier sowohl auf einer Verringerung der Anzahl CD86<sup>+</sup> Zellen als auch einer Erhöhung der Menge an CD206<sup>+</sup> Zellen zu beruhen.



**Abbildung 20. Polarisation von Makrophagen nach Stimulation mit konditioniertem Medium des viszeralen Fettgewebes.**

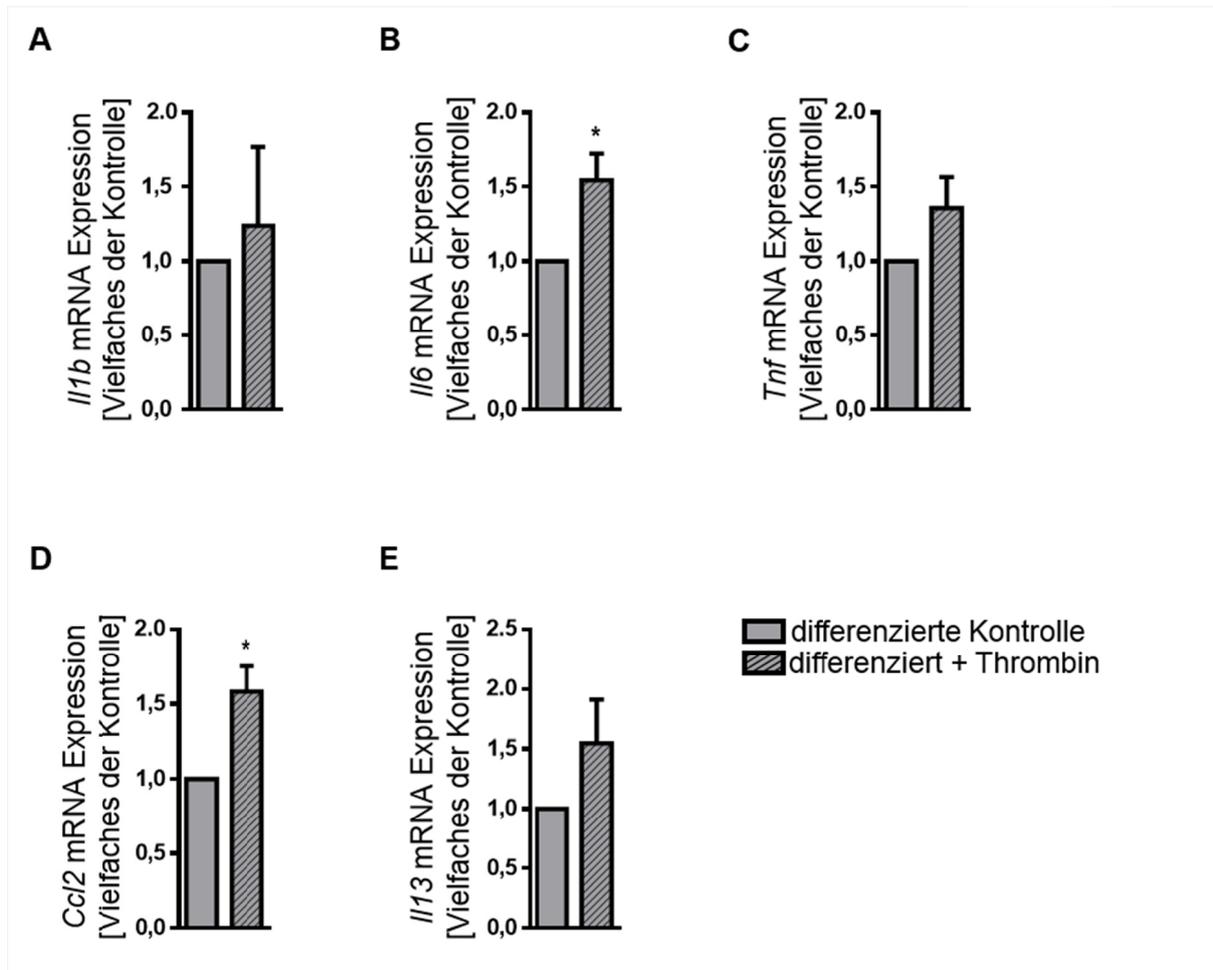
Aus dem Knochenmark isolierte Makrophagen wurden für sieben Tage *in vitro* zu reifen Makrophagen differenziert und anschließend für 24 Stunden mit konditioniertem Medium des viszeralen Fettgewebes Dabigatran- und Placebo-behandelter *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse, inkubiert. Die Expression von CD86 und CD206 wurde durchflusszytometrisch analysiert. In **A** ist die Ratio aus CD86<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup> Makrophagen dargestellt, in **B** der prozentuale Anteil CD86<sup>+</sup> und in **C** der CD206<sup>+</sup> an den analysierten CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> Makrophagen gezeigt. **D** Repräsentative Plots der mit konditioniertem Medium beider Behandlungsgruppen stimulierten CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> Makrophagen. Dargestellt sind der Mittelwert ± SEM, n = 13, \* *P* < 0,05 versus Placebo.

### 3.2.2.4 mRNA-Expression in mit Thrombin stimulierten 3T3 L1 Zellen

Um ein möglicherweise für die Polarisierungseffekte verantwortliches Zytokin zu identifizieren wurde die mRNA-Expression in mit Thrombin stimulierten 3T3 L1 Zellen untersucht (Abb. 21) Eine Stimulation mit Thrombin induzierte eine signifikant erhöhte Expression von *Il6* und *Ccl2*. Die Expression von *Il1b*, *Tnfa* und *Il13* wurde durch Thrombin nicht reguliert. Die erhöhte Expression von *Il6* korrelierte mit der reduzierten Sekretion von IL-6 aus dem viszeralen Fettgewebe Dabigatran-behandelter Tiere. Allerdings zeigte sich dort keine Regulation der mRNA-Expression, sondern nur ein Effekt auf die aus dem Fettgewebe

## Ergebnisse

freigesetzte Konzentration. Jedoch ist zu bedenken, dass die Zytokinsekretion aus dem Fettgewebe sowohl aus Fettzellen, als auch aus Zellen der stromal-vaskulären Fraktion, wie Makrophagen erfolgt, während die 3T3 L1 Zellen nur die Effekte auf Adipozyten abbilden. Dies ist eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Effekte auf die mRNA-Expression.



**Abbildung 21. mRNA Expression 3T3 L1 Zellen.**

3T3 L1 Zellen wurden für sieben Tage mit oder ohne Stimulation mit Thrombin zu reifen Adipozyten differenziert. Die mRNA-Expression der Zytokine **A** *Il1 $\beta$* , **B** *Il6*, **C** *Tnf $\alpha$* , **D** *Ccl2*, und **E** *Il13* wurde mittels qPCR analysiert. Dargestellt ist jeweils die mRNA-Expression als Vielfaches der differenzierten Kontrolle. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM;  $n = 4$  in A,  $n = 7$  in B-E, \*  $P < 0,05$  versus differenzierte Kontrolle.

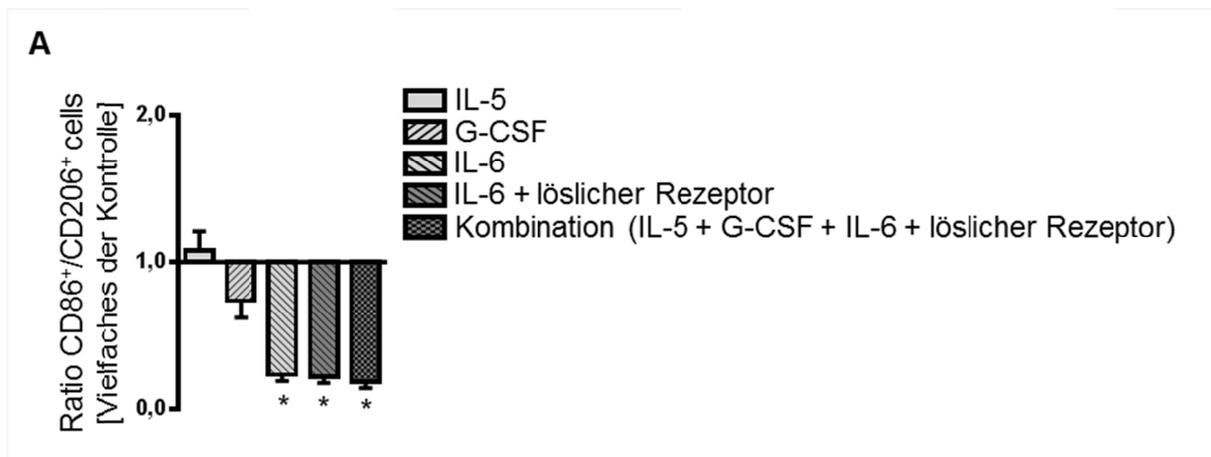
### 3.2.2.5 Effekt der im Fettgewebe regulierten Zytokine auf die Polarisierung von Makrophagen

Neben IL-6, welches sowohl im Fettgewebe der Dabigatran-behandelten *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse, als auch in den mit Thrombin stimulierten 3T3 L1 Zellen reguliert war, könnten auch die

ebenfalls durch Dabigatran im Fettgewebe reduziert freigesetzten Zytokine G-CSF und IL-5 für die veränderte Makrophagenpolarisation verantwortlich sein.

Um dies zu untersuchen, wurden aus dem Knochenmark isolierte und *in vitro* differenzierte Makrophagen mit jedem dieser Zytokine allein oder mit einer Kombination von IL-5, G-CSF und IL-6 stimuliert. IL-6 wurde sowohl allein als auch zusammen mit seinem löslichen Rezeptor eingesetzt, um auch eine Signaltransduktion durch *trans-signalling* zu ermöglichen. Nach 24 Stunden wurde die Polarisierung der Makrophagen durchflusszytometrisch anhand der CD86 und CD206 Expression analysiert. (Abb. 22).

Jedoch konnte durch keines dieser Zytokine oder die Kombination aller Faktoren eine M1-Polarisation der Makrophagen induziert werden. IL-6 allein und in Kombination mit seinem löslichen Rezeptor, sowie die Kombination aller Faktoren führte sogar zu einer vermehrten M2-Polarisation der Makrophagen, so dass die Frage nach dem für die Effekte auf die Makrophagenpolarisierung verantwortlichen Faktor hier nicht abschließend geklärt werden konnte.



**Abbildung 22. Effekte der im Fettgewebe regulierten Zytokine auf die Makrophagenpolarisation.**

Aus dem Knochenmark isolierte Makrophagen wurden für sieben Tage *in vitro* zu reifen Makrophagen differenziert und anschließend für 24 Stunden mit 10 ng/ml IL-5, 3 ng/ml G-CSF, 50 ng/ml IL-6 mit oder ohne Zusatz von 50 ng/ml des löslichen IL-6-Rezeptors oder einer Kombination der genannten Faktoren stimuliert. Die Expression von CD86 und CD206 wurde durchflusszytometrisch analysiert. **A** Die Ratio der CD86+/CD206+ Makrophagen ist als Vielfaches der unpolarisierten Kontrolle dargestellt. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 8, \* P < 0,05 versus unpolarisierte Kontrolle.

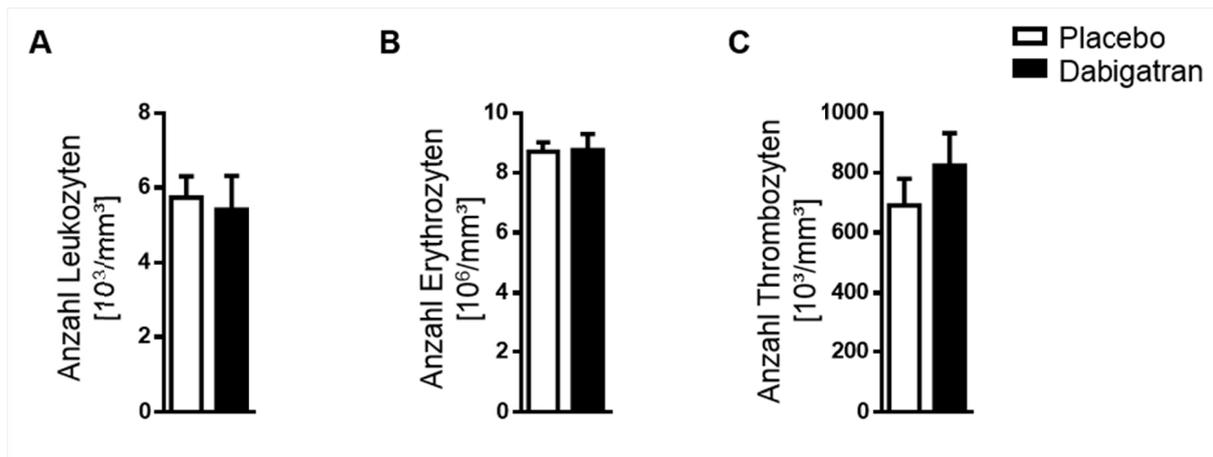
### 3.3 Einfluss von Dabigatran auf zirkulierende Immunzellen und Zytokine

Um zu untersuchen, ob neben den anti-entzündlichen Veränderungen, die durch Dabigatran im Fettgewebe der behandelten *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse hervorgerufen wurden, auch systemische

Entzündungsparameter beeinflusst waren, wurden im Folgenden die im Blut zirkulierenden Immunzellpopulationen sowie die Konzentration verschiedener Zytokine im Plasma untersucht.

### 3.3.1 Hämatogramm

Eine erste Analyse der Anzahl an Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten im Hämatogramm zeigte keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (Abb. 23).



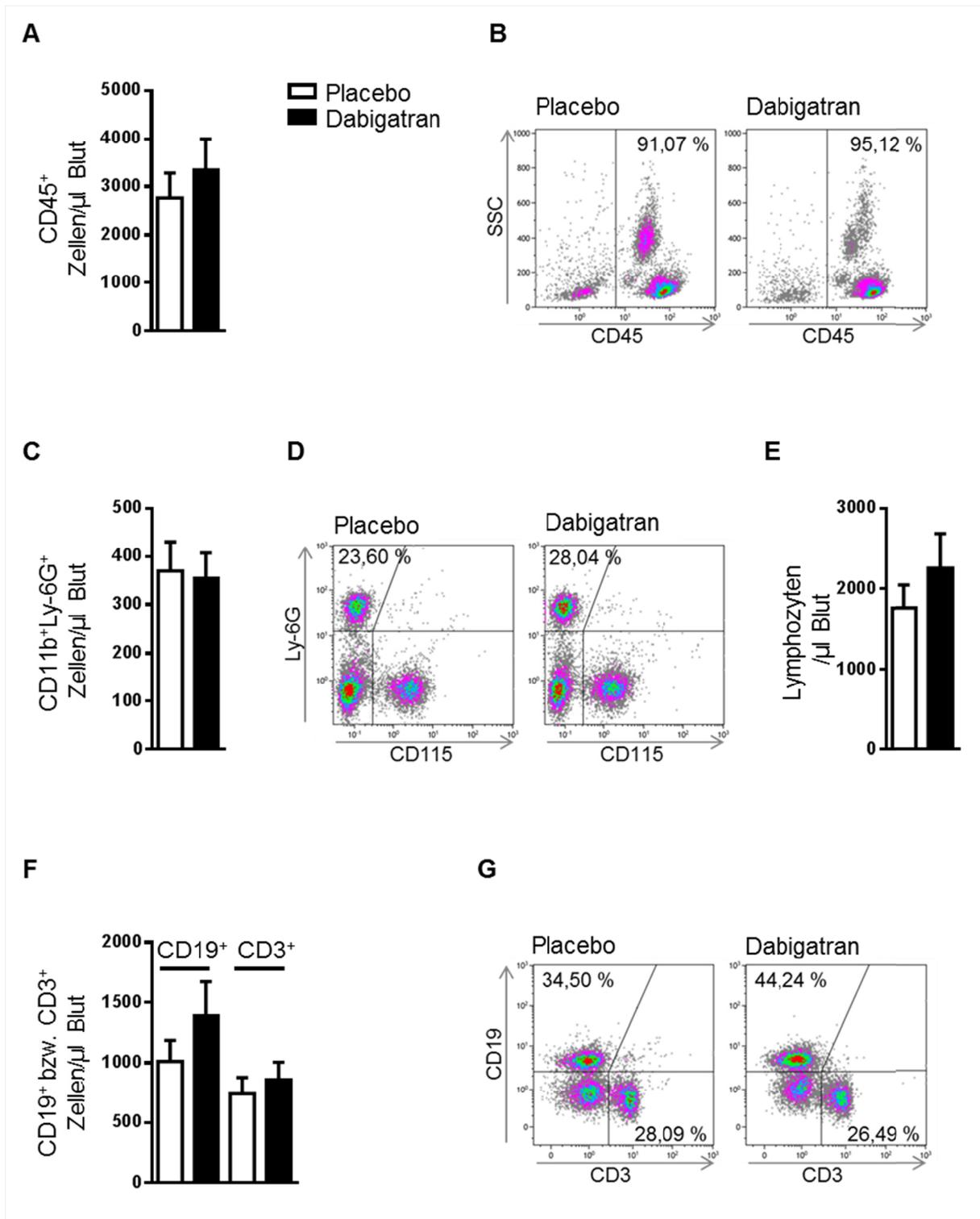
**Abbildung 23. Hämatogramm.**

Die Anzahl an **A** Leukozyten, **B** Erythrozyten und **C** Thrombozyten wurde im Vollblut Dabigatran- und Placebo-behandelter *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse bestimmt. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 11,10.

### 3.3.2 Zirkulierende Immunzellen

Eine detailliertere Analyse der im Blut zirkulierenden Leukozyten erfolgte durchflusszytometrisch. Auch hier zeigte sich, analog zu den Befunden aus dem Blutbild, kein Unterschied in der Anzahl der CD45<sup>+</sup> Leukozyten. Auch die Anzahl der CD11b<sup>+</sup>Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophilen und der CD19<sup>+</sup> B- und der CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten war unverändert (Abb. 24).

## Ergebnisse



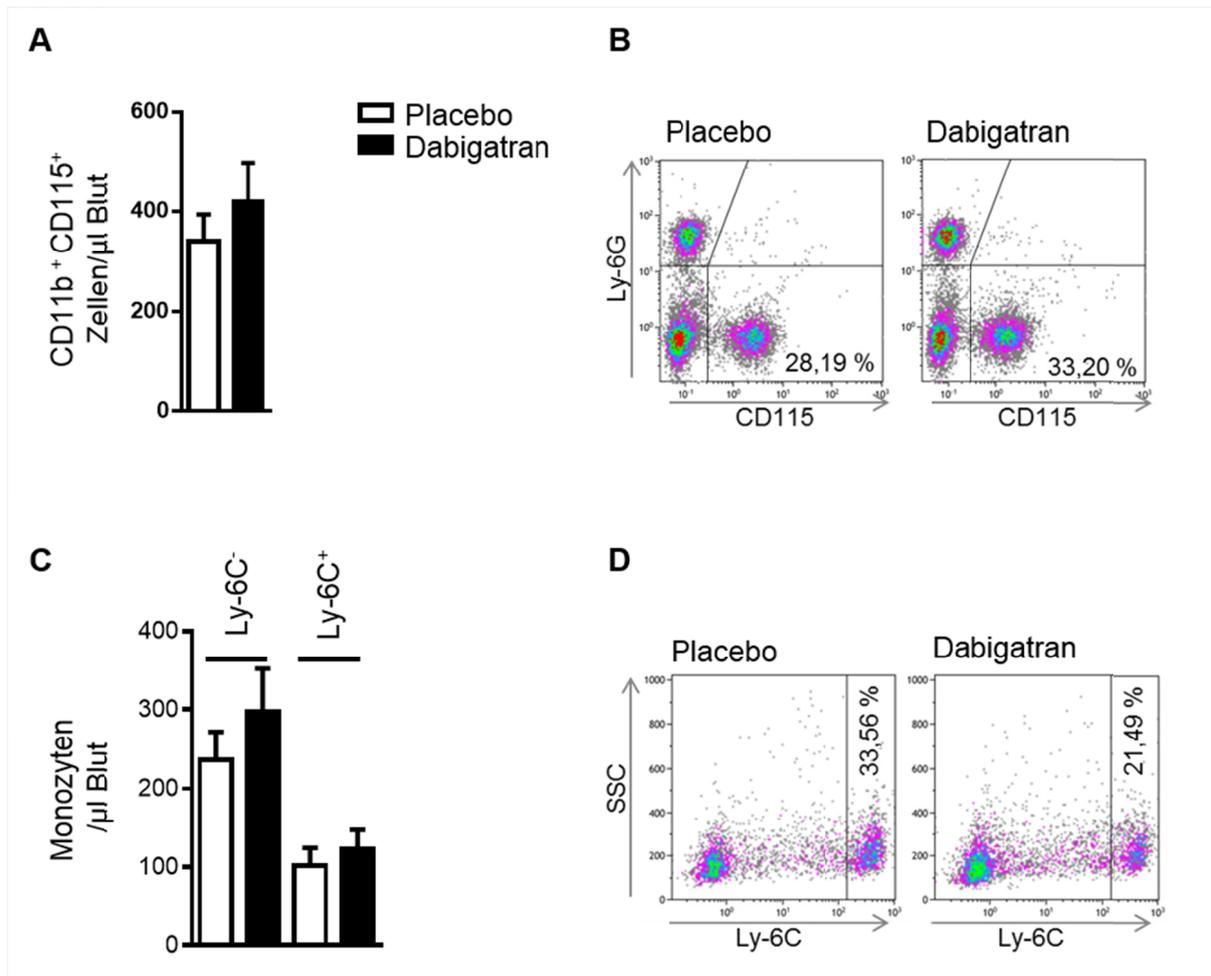
**Abbildung 24. Immunzellpopulationen im Blut.**

Durchflusszytometrische Analyse von **A, B** CD45<sup>+</sup> Leukozyten, **C, D** CD11b<sup>+</sup>Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophilen, **E** Lymphozyten und **F, G** CD19<sup>+</sup> B- und CD3<sup>+</sup> T Zellen im Blut Dabigatran- und Placebo-behandelter *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse. Es ist jeweils die absolute Zellzahl pro µl Blut angegeben. In **B, D** und **G** sind repräsentative Plots der durchflusszytometrischen Analyse gezeigt. In **D** sind nur die CD11b<sup>+</sup>, in **G** nur die CD45<sup>+</sup> Zellen gezeigt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert ± SEM; n = 13 in A, E und F und n = 15, 16 in C.

## Ergebnisse

Die Anzahl der CD11b<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup> Monozyten war ebenfalls nicht durch Dabigatran beeinflusst. Aufgrund der im Fettgewebe durch Dabigatran verursachten spezifischen Reduktion der CD11c<sup>+</sup>, pro-inflammatorischen Makrophagen, wurden auch im Blut die eher inflammatorischen, Ly-6C stark exprimierenden (Ly-6C<sup>+</sup>), und die patrouillierenden, Ly-6C schwach exprimierenden (Ly-6C<sup>-</sup>), Monozyten-Populationen untersucht. Doch auch hier wurde kein Unterschied zwischen den Dabigatran- und Placebo-behandelten Tieren gefunden (Abb. 25). Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass die Veränderungen in der Makrophagenpolarisation eher durch lokale Faktoren, als durch ein verändertes Migrationsverhalten der Monozyten begründet sind.

Repräsentative Schemata für die Analyse der verschiedenen Zellpopulationen im Blut finden sich in den Abbildungen 34 und 35 im Appendix.



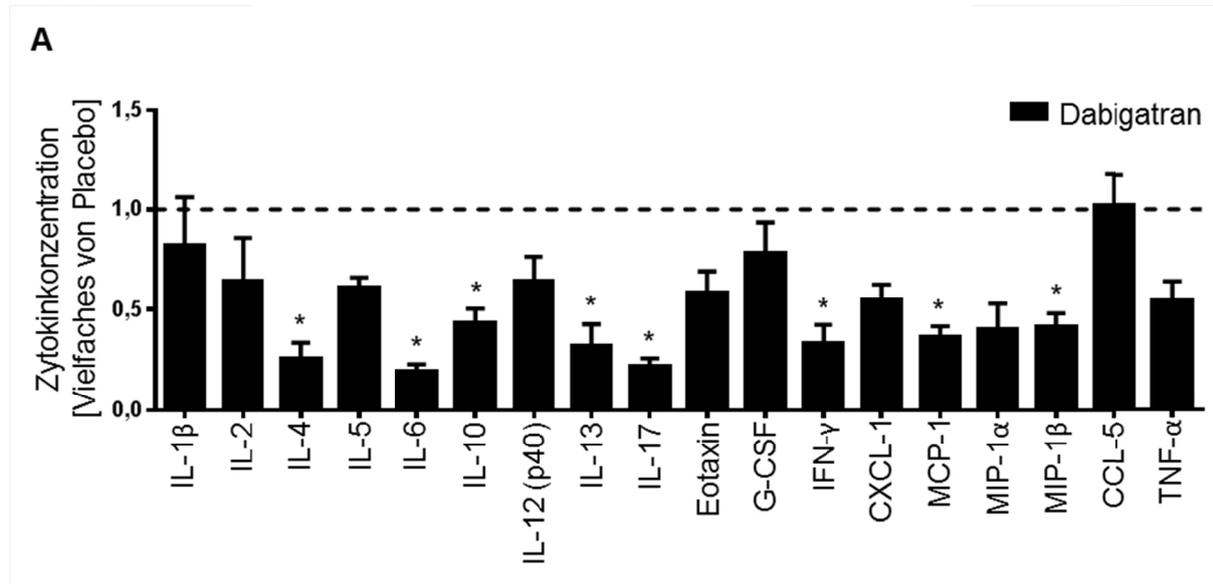
**Abbildung 25. Monozytenpopulationen im Blut.**

Durchflusszytometrische Analyse von **A**, **B** CD11b<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup> Monozyten, **C**, **D** Ly-6C<sup>-</sup> und Ly-6C<sup>+</sup> Monozyten im Blut Dabigatran- und Placebo-behandelter *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse. Es ist jeweils die absolute Zellzahl pro  $\mu$ l Blut angegeben. In **B** und **D** sind repräsentative Plots der durchflusszytometrischen Analyse gezeigt. In **D** sind nur die CD11b<sup>+</sup>, in **C** nur die CD11b<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup> Zellen gezeigt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM; n = 16, 17.

### 3.3.3 Zytokine im Plasma

Neben den im Blut zirkulierenden Immunzellen wurden auch die Konzentrationen verschiedener pro- und anti-entzündlicher Zytokine im Plasma bestimmt (Abb. 26). Hier zeigte sich in den Dabigatran-behandelten Tieren eine signifikante Reduktion verschiedener entzündlicher Zytokine, wie z.B. IL-17, MCP-1 und MIP-1 $\beta$ . Auch das vom Fettgewebe signifikant weniger sezernierte IL-6 war im Plasma signifikant reduziert, was auf die reduzierte Freisetzung aus dem Fettgewebe zurückzuführen sein könnte.<sup>149</sup> TNF- $\alpha$  zeigte einen deutlichen Trend zu einer reduzierten Plasmakonzentration in Dabigatran-behandelten Tieren. Allerdings wurde nicht nur die Konzentration pro-inflammatorischer Zytokine durch Dabigatran reduziert, auch die anti-entzündlichen Zytokine IL-4, IL-10 und IL-13 waren im

Plasma der Dabigatran-behandelten Tiere vermindert, so dass letztendlich kein eindeutig pro- oder anti-inflammatorischer Effekt einer Thrombininhibition durch Dabigatran festgestellt werden konnte, sondern ein komplexe Regulation des Zytokinprofils vorlag.



**Abbildung 26. Zytokinkonzentration im Plasma.**

**A** Die Zytokinkonzentration im Plasma der Dabigatran- und Placebo-behandelten Tiere wurde mittels eines Multiplex-Immunoassays bestimmt. Gezeigt ist die Zytokinkonzentration als Vielfaches der Placebo-behandelten Tiere. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM;  $n = 5-9$ . \*  $P < 0,05$  versus Placebo.

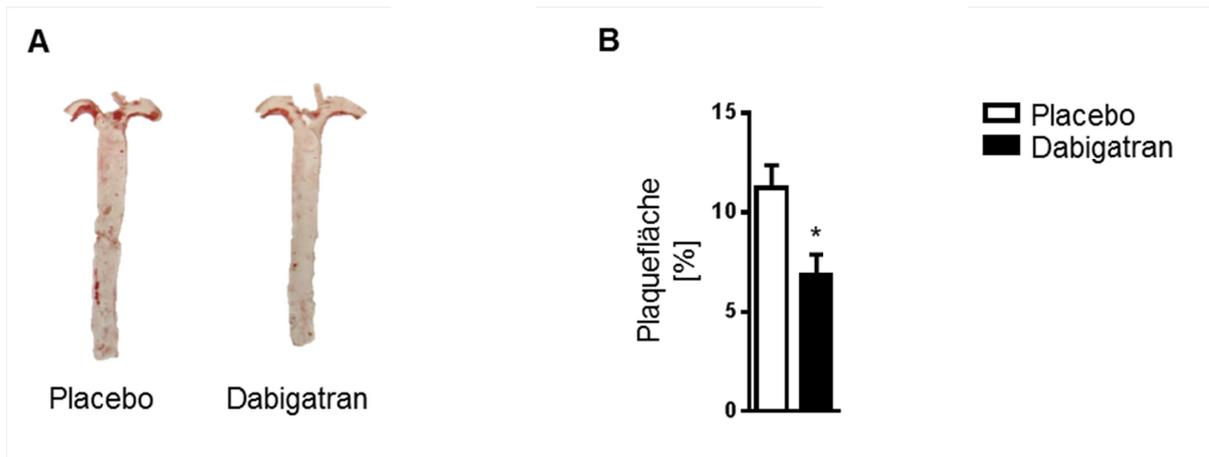
### 3.4 Einfluss von Dabigatran auf die Makrophagenpolarisation in atherosklerotischen Läsionen

Übergewicht ist ein Risikofaktor für die Entstehung von Atherosklerose.<sup>150</sup> Es ist bereits bekannt, dass Dabigatran die Entwicklung der Atherosklerose in *ApoE*<sup>-/-</sup> Mäusen hemmt.<sup>16-19</sup> Außerdem wurde bereits gezeigt, dass auch die Makrophagenpolarisation eine Rolle bei der Atheroskleroseentwicklung spielt.<sup>111</sup> So fördert eine vermehrte M1-Polarisierung die Entstehung atherosklerotischer Läsionen,<sup>114</sup> während M2-polarisierte Makrophagen einen protektiven Effekt zu haben scheinen.<sup>112, 113</sup>

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob der im Fettgewebe durch Dabigatran verursachte inhibitorische Effekt auf die M1-Polarisierung von Makrophagen auch im Kontext der Atherosklerose eine Rolle spielt und so möglicherweise zu der bereits bekannten atheroprotektiven Wirkung von Dabigatran beiträgt. Dazu wurde die Polarisation der Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen der Aortenwand untersucht.

### 3.4.1 Atherosklerotische Läsionen in der Aorta

In anderen Projekten unserer Arbeitsgruppe wurde zunächst verifiziert, dass eine Behandlung mit Dabigatran auch im Modell der *Ldlr<sup>-/-</sup>* Mäuse einen inhibierenden Einfluss auf die Entstehung von Atherosklerose hat. Eine Quantifizierung der atherosklerotischen Läsionen in der Aorta zeigte, dass die Dabigatran-behandelten Tiere eine signifikant verringerte Fläche atherosklerotischer Plaques aufwiesen (Abb. 27).

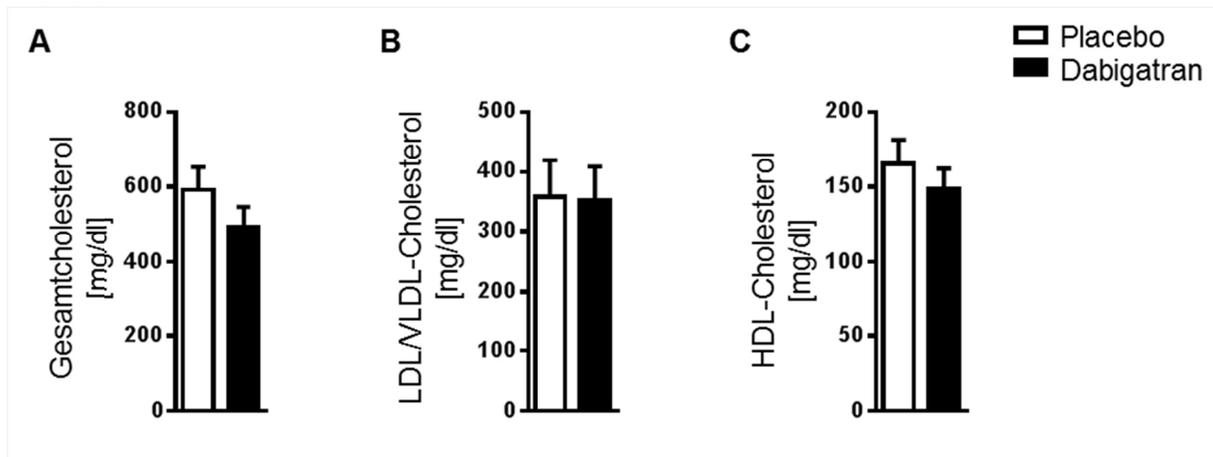


**Abbildung 27. Quantifizierung atherosklerotischer Läsionen der Aorta.**

**A** Repräsentative Bilder der ORO gefärbten Aorten Placebo- und Dabigatran-behandelter Tiere. **B** Quantifizierung der Plaquefläche in %. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM;  $n = 10$ , \*  $P < 0,05$  versus Placebo.

Die Aufarbeitung und Färbung der Aorten, sowie die Quantifizierung der atherosklerotischen Läsionen wurden von Frau Dr. Nadine Nagy durchgeführt.

Die Plasmakonzentrationen an Gesamtcholesterol, sowie LDL/VLDL- und HDL-Cholesterol wurden durch die Behandlung mit Dabigatran nicht verändert (Abb. 28).



**Abbildung 28. Plasmacholesterol.**

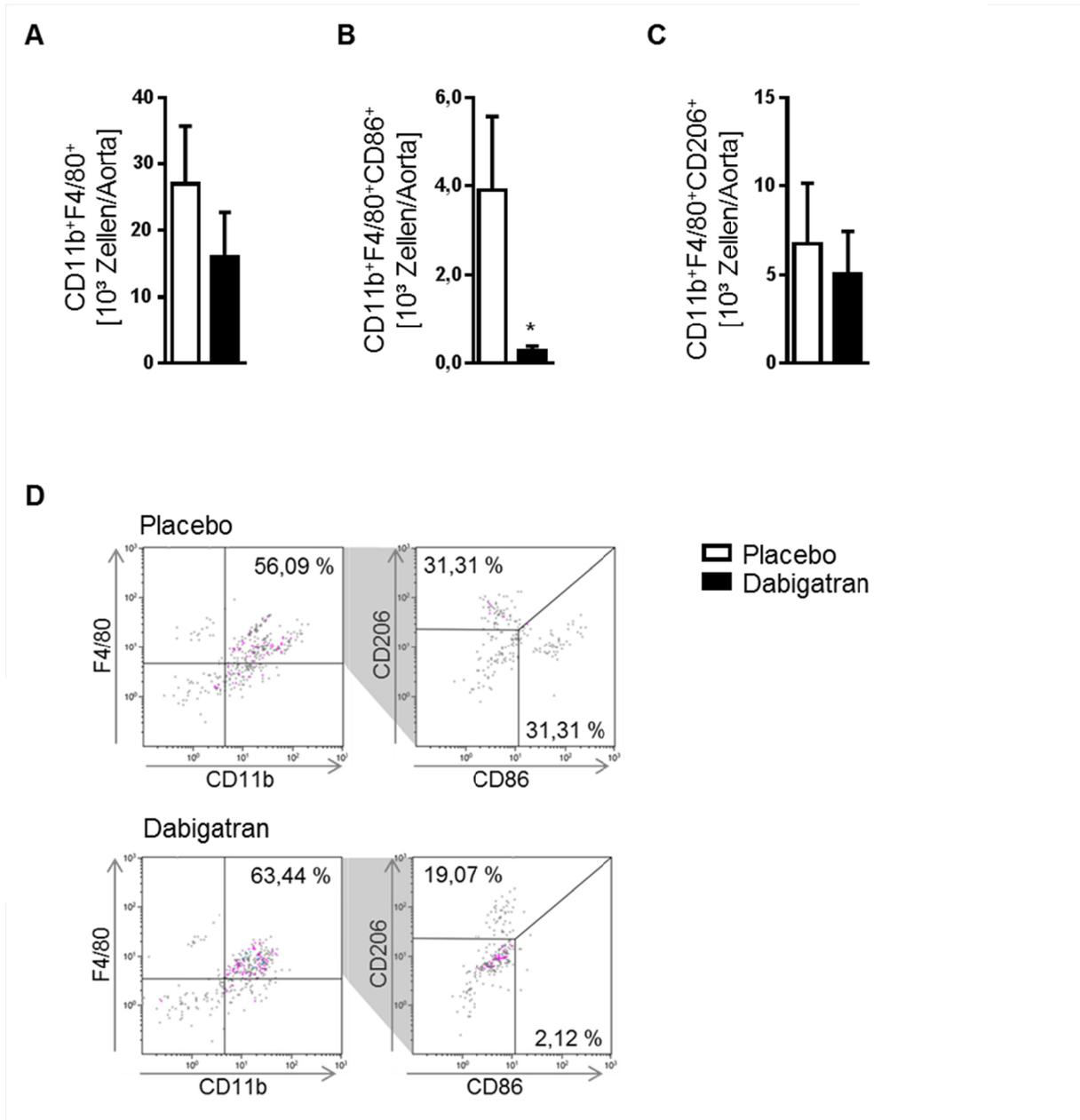
Die Plasmakonzentrationen von **A** Gesamt-, **B** LDL- und VLDL- sowie **C** HDL-Cholesterol wurden bestimmt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 6.

### 3.4.2 Makrophagenpolarisation in der Aorta

Dabigatran reduziert die Entstehung atherosklerotischer Läsionen in *ApoE*<sup>-/-</sup> Mäusen. Diese Inhibition wird zum Teil auf Veränderungen inflammatorischer Prozesse, an denen auch Makrophagen beteiligt sind, zurückgeführt.<sup>16, 18, 19</sup> Eine durchflusszytometrische Analyse der Makrophagenpopulationen in der Aortenwand sollte klären, inwiefern auch hier ein Einfluss von Dabigatran auf die Polarisation von Makrophagen nachzuweisen ist.

Die Gesamtzahl an CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> Makrophagen in der Aortenwand unterschied sich nicht in den Behandlungsgruppen. Eine detailliertere Analyse der Makrophagensubpopulationen zeigte aber auch hier, dass Dabigatran die Anzahl pro-inflammatorischer, CD86<sup>+</sup> M1-Makrophagen signifikant reduzierte, während die Anzahl anti-inflammatorischer, CD206<sup>+</sup> M2-Makrophagen nicht beeinflusst war (Abb. 29).

Ein repräsentatives Schema zur Analyse der Makrophagenpopulationen in der Aorta findet sich in Abb. 36 im Appendix.



**Abbildung 29. Makrophagenpopulationen in der Aorta.**

Durchflusszytometrische Untersuchung der Makrophagen in der Aortenwand. Analysiert wurde **A** die Gesamtzahl der CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> Makrophagen, **B** die Anzahl der CD86<sup>+</sup> und **C** der CD206<sup>+</sup> Makrophagen. Gezeigt ist jeweils die Zellzahl pro Aorta. In **D** sind repräsentative Plots der CD45<sup>+</sup> Zellen dargestellt. Aufgetragen wurden jeweils die Mittelwerte ± SEM, n = 10, 8, \* P < 0,05 versus Placebo.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Behandlung von *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäusen mit Dabigatran zu einer Adipozytenhypertrophie im viszeralen Fettgewebe führte, die durch eine Hemmung des direkten inhibitorischen Einflusses von Thrombin auf die Lipidakkumulation in Adipozyten zurückzuführen war. Diese Adipozytenhypertrophie ging jedoch nicht mit einer vermehrten Inflammation des Fettgewebes einher. Die Anzahl CD11c<sup>+</sup>, inflammatorischer

## Ergebnisse

Makrophagen war sogar signifikant reduziert und auch die Sekretion von IL-6 aus dem Fettgewebe wurde durch Dabigatran inhibiert. Der Effekt auf die Makrophagenpolarisation wurde nicht direkt über Thrombin vermittelt, sondern beruhte auf einem veränderten Sekretionsprofil des Fettgewebes. Eine ähnliche Änderung in der Makrophagenpolarisation ließ sich auch in den Makrophagen der Aortenwand der Dabigatran-behandelten Tiere finden, was darauf hinweist, dass dieser Effekt nicht auf das Fettgewebe beschränkt ist, sondern auch bei anderen entzündlichen Vorgängen eine Rolle spielt.

## 4 Diskussion

### 4.1 Einfluss von Dabigatran auf Morphologie und Inflammation des Fettgewebes

Eine 20-wöchige Behandlung weiblicher *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse, einem Modell der diätinduzierten Adipositas und akzelerierten Atherosklerose, mit dem direkten Thrombininhibitor Dabigatran beeinflusste sowohl die Morphologie als auch inflammatorische Prozesse im viszeralen Fettgewebe sowie in atherosklerotischen Läsionen der Aorta.

Die morphologische Analyse am Ende der 20-wöchigen Behandlungsdauer zeigte interessanterweise, dass eine Thrombininhibition durch Dabigatran zu einer signifikanten Vergrößerung der Fettzellen des viszeralen Fettgewebes führte. Die Entstehung dieser Adipozytenhypertrophie war nicht auf Unterschiede im Körpergewicht der Behandlungsgruppen zurückzuführen, da beide Gruppen während der Behandlung gleichermaßen an Gewicht zunahmen und sich auch BMI und Körperfettanteil in Dabigatran- und Placebo-behandelten Tieren nicht unterschieden. Eine mögliche Erklärung für die unter der Dabigatran-Behandlung auftretende Adipozytenhypertrophie bieten *in vitro* Untersuchungen an 3T3 L1 Präadipozyten, die zeigten, dass eine Stimulation mit Thrombin während der Adipoyztendifferenzierung zu einer signifikant verringerten Lipidakkumulation in den reifen Adipozyten führte. Dies impliziert, dass eine Thrombininhibition durch Dabigatran möglicherweise die Lipidspeicherung in Adipozyten verbessert und so zur Ausbildung einer Adipozytenhypertrophie führt.

Interessanterweise scheinen die hypertrophen Adipozyten der Dabigatran-behandelten Tiere nicht dysfunktional zu werden. In der Regel induziert eine Adipozytenhypertrophie entzündliche Prozesse im Fettgewebe und geht mit einer erhöhten Makrophageninfiltration einher<sup>75, 76, 79</sup>. Im Gegensatz dazu ist bei Dabigatran-behandelten Tieren, trotz der auftretenden Adipozytenhypertrophie, die Anzahl der Makrophagen im Fettgewebe im Vergleich zur Placebo-Gruppe nicht verändert. Die durchflusszytometrische Analyse der Makrophagensubpopulationen ergab sogar eine Reduktion der pro-inflammatorischen, M1-polarisierten CD11c<sup>+</sup> Makrophagen, während die Anzahl der residenten, M2-polarisierten CD11c<sup>-</sup> Makrophagen nicht beeinflusst war.

Damit einhergehend zeigte sich eine signifikant reduzierte Sekretion von IL-6 aus dem viszeralen Fettgewebe, sowie eine tendenziell reduzierte mRNA-Expression und Sekretion weiterer pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder MCP-1 (*Ccl2*). Diese

Beobachtungen implizieren einen eher anti-inflammatorischen Effekt der Behandlung mit Dabigatran auf das viszerale Fettgewebe, trotz hypertrophierter Adipozyten.

In *in vitro* Versuchen an aus dem Knochenmark isolierten Makrophagen sollte geklärt werden, ob die Reduktion der CD11c<sup>+</sup> Makrophagenpopulation im Fettgewebe der Dabigatran-behandelten Tiere durch einen Einfluss auf die Polarisation der Makrophagen zurückzuführen ist.

Hier zeigte sich zunächst, dass Thrombin selbst keinen direkten Effekt auf die Polarisation der Makrophagen hatte. Ein Stimulationsversuch mit konditioniertem Medium von 3T3 L1 Zellen, die in An- oder Abwesenheit von Thrombin differenziert worden waren, zeigte jedoch, dass die Stimulation von 3T3 L1 Zellen mit Thrombin über die Freisetzung löslicher Faktoren in das Medium eine M1-Polarisation der Makrophagen induzierte und so das Verhältnis der M1 zu den M2-polarisierten Makrophagen in Richtung der M1-Polarisation verschob. Dies lässt darauf schließen, dass die Stimulation mit Thrombin das Sekretionsprofil der Adipozyten so veränderte, dass die sezernierten Faktoren in der Folge eine pro-inflammatorische Polarisation von Makrophagen förderten. Dieses Ergebnis wurde durch einen weiteren *ex vivo* Versuch bestätigt, bei dem die Makrophagen mit konditioniertem Medium des viszeralen Fettgewebes der Dabigatran- und Placebo-behandelten Tiere stimuliert wurden. Hier zeigte sich, dass eine Stimulation mit dem konditionierten Medium des Fettgewebes Dabigatran-behandelter Tiere das Verhältnis in Richtung M2-polarisierter Makrophagen verschob, was die anti-inflammatorische Wirkung einer Thrombininhibition bestätigte.

Die *in vivo* festgestellte Reduktion CD11c<sup>+</sup>, M1-polarisierter Makrophagen im viszeralen Fettgewebe der Dabigatran-behandelten Tiere schien also durch ein anti-inflammatorisch verändertes Sekretionsprofil der Adipozyten und nicht direkt durch die Thrombininhibition vermittelt zu sein.

Welcher Faktor oder welche Faktoren dieser veränderten Makrophagenpolarisation zugrunde lag, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Die durch die Dabigatran-Behandlung im Fettgewebe vermindert sezernierten Zytokine IL-5 und G-CSF sind bislang im Zusammenhang mit einem möglichen Einfluss auf die Polarisation von Makrophagen nicht untersucht worden. Eine Analyse der mRNA-Expression der mit Thrombin stimulierten 3T3 L1 Zellen zeigte eine signifikant erhöhte Expression von *Ccl2* und *Il-6*. Die IL-6 Sekretion war im Fettgewebe durch Dabigatran signifikant reduziert, was für eine potentielle Rolle dieses Zytokins bei der veränderten Makrophagenpolarisation spricht.

IL-6 kann im Fettgewebe sowohl von Adipozyten als auch von Makrophagen sezerniert werden,<sup>79</sup> so dass die reduzierte Sekretion in Dabigatran-behandelten Tieren sowohl auf eine reduzierte Freisetzung aus Adipozyten als auch auf die reduzierte Anzahl an

CD11c<sup>+</sup> Makrophagen zurückzuführen sein könnte. Jedoch ist die Rolle von IL-6 im Fettgewebe und im Rahmen von Übergewicht sehr komplex. In *in vitro* Versuchen wurde bereits gezeigt, dass IL-6 die Adipozytenfunktion beeinträchtigt, die Expression pro-inflammatorischer Zytokine erhöht<sup>98</sup> und so inflammatorische Prozesse im Fettgewebe fördert. Studien an IL-6-defizienten Mäusen weisen jedoch auf einen protektiven Effekt hin. So wurde gezeigt, dass eine IL-6-Defizienz in Mäusen zur Ausbildung von Adipositas, Glukosetoleranz und Insulinresistenz sowie zur Entstehung entzündlicher Veränderungen in der Leber führt.<sup>151, 152</sup> In einer weiteren Studie konnte ein Einfluss von IL-6 auf die Entstehung von Adipositas jedoch nicht verifiziert werden.<sup>153</sup>

Auch in Bezug auf die Makrophagenfunktion ist die Rolle von IL-6 noch nicht vollständig geklärt. Hier scheinen die unterschiedlichen Wege der Signaltransduktion von Bedeutung zu sein. So wurde gezeigt, dass das von IL-6 vermittelte *trans-signalling* die Makrophagenmigration ins Fettgewebe fördert. In Mäusen, in denen spezifisch dieser Signaltransduktionsweg ausgeschaltet wurde, kam es zu einer signifikant verringerten Akkumulation von Makrophagen im Fettgewebe.<sup>85</sup> Andererseits wurde gezeigt, dass eine spezifische Deletion des IL-6-Rezeptors in myeloiden Zellen die Menge pro-inflammatorischer Makrophagen im Fettgewebe erhöhte und dass IL-6 auch die M2-Polarisation von Makrophagen fördert.<sup>87</sup> Eine Stimulation von aus dem Knochenmark isolierten und *in vitro* differenzierten Makrophagen mit IL-6 induzierte die M2-Polarisation der Makrophagen und bestätigte somit dieses Ergebnis. IL-5 und G-CSF hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Makrophagenpolarisation, so dass keiner der in Dabigatran-behandelten Mäusen reduziert aus dem Fettgewebe freigesetzten Faktoren als der für die veränderte Makrophagenpolarisation verantwortliche identifiziert werden konnte. Welcher Faktor oder welche Kombination aus Faktoren hier eine Rolle spielt, muss in weiteren Studien noch geklärt werden.

Insgesamt wiesen die Dabigatran-behandelten Tiere im Vergleich zur Placebo-Gruppe trotz der detektierten Adipozytenhypertrophie keine Veränderung der metabolischen Parameter auf. So waren Nüchternglukose und Nüchterninsulinspiegel unverändert und auch Tests der Glukosetoleranz und Insulinresistenz zeigten keinen Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen.

Diese Daten implizierten, dass die Thrombininhibition durch Dabigatran die Fettspeicherung in Adipozyten erhöhte und so die Entstehung einer Adipozytenhypertrophie begünstigte, jedoch gleichzeitig die Expression pro-inflammatorischer Zytokine im viszeralen Fettgewebe reduzierte und so den pro-inflammatorischen, „parakrinen Zyklus“<sup>96</sup> zwischen Adipozyten und

Makrophagen im Fettgewebe adipöser Mäuse unterbrach und einen metabolisch neutralen Phänotyp aufrecht erhielt.

#### 4.1.1 Modell- und substanzabhängige Effekte

Die Frage nach der Rolle von Thrombin im Fettgewebe wurde bereits 2010 von Mihara *et al.* adressiert.<sup>125</sup> In dieser Studie wurden männliche Mäuse mit einer Punktmutation im Leptinrezeptor ( $Lep^{db/db}$ ) für 4 Wochen mit dem direkten Thrombininhibitor Argatroban behandelt und der Einfluss auf das Fettgewebe und die Entstehung einer Insulinresistenz untersucht.

Hier konnte zunächst gezeigt werden, dass die adipösen Mäuse im Vergleich zu schlanken Wurfgeschwistern im Fettgewebe vermehrt FVII exprimierten. Dies impliziert, dass auch die Thrombinaktivierung im Fettgewebe adipöser Mäuse potentiell erhöht ist.

Im Einklang mit unseren Ergebnissen konnte auch hier ein anti-inflammatorischer Effekt einer Thrombininhibition gezeigt werden; Argatroban reduzierte die Expression von *Il6* und *Ccl2* im Fettgewebe.

Allerdings führte eine Behandlung mit Argatroban in  $Lep^{db/db}$  Mäusen zu einer signifikanten Reduktion der Adipozytengröße im viszeralen Fettgewebe, während Dabigatran in  $Ldlr^{-/-}$  Mäusen eine Adipozytenhypertrophie hervorrief. Eine mögliche Erklärung für diese gegensätzlichen Beobachtungen ist die Verwendung unterschiedlicher Mausmodelle.  $Lep^{db/db}$  Mäuse entwickeln einen sehr viel drastischeren, adipösen Phänotyp und eine ausgeprägtere Insulinresistenz als weibliche  $Ldlr^{-/-}$  Mäuse, die unter einer hochkalorischen Diät lediglich leicht an Gewicht zunehmen. Diese stark unterschiedliche Ausprägung des metabolischen Phänotyps könnte auch der Grund dafür sein, dass die Behandlung mit Argatroban in  $Lep^{db/db}$  Mäusen zu einer Reduktion der Nüchternglukosespiegel und einer Verbesserung der Insulinsensitivität führte, während Dabigatran in  $Ldlr^{-/-}$  Mäusen diese Parameter nicht beeinflusste.

Neben der Verwendung unterschiedlicher Mausmodelle könnten natürlich auch das Geschlecht der verwendeten Versuchstiere, sowie möglicherweise substanzspezifische Effekte der verwendeten Thrombininhibitoren der Grund für unterschiedliche Ergebnisse der beiden Studien sein. Auch mögliche dosisabhängige Effekte sind denkbar, da unklar ist ob mit beiden Substanzen in der verwendeten Dosierung eine ähnlich effektive Thrombininhibition erreicht wurde. Weitere Studien werden notwendig sein um zu klären welche dieser Faktoren hier eine Rolle spielen.

In Bezug auf inflammatorische Vorgänge im Fettgewebe kommen jedoch beide Studien zu dem Ergebnis, dass eine Thrombininhibition entzündliche Veränderungen inhibiert.

Diese durch Thrombininhibitoren induzierten anti-inflammatorischen Veränderungen spielen möglicherweise auch beim Menschen eine Rolle. Strande und Phillips zeigten 2009, dass humane Adipozyten und Präadipozyten den Thrombinrezeptor PAR-4 exprimieren und dass eine Stimulation isolierter, differenzierter humaner Adipozyten mit Thrombin *ex vivo* die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und MCP-1 erhöht.<sup>126</sup>

Diese Ergebnisse sprechen für ähnliche Effekte von Thrombin in murinem und humanem Fettgewebe und implizieren, dass eine Behandlung mit direkten Thrombininhibitoren möglicherweise auch im Menschen positive Effekte auf entzündliche Vorgänge im Fettgewebe haben könnte.

### **4.2 Einfluss von Dabigatran auf zirkulierende Zytokine und Immunzellen**

Es ist bekannt, dass die bei Übergewicht im Fettgewebe ablaufenden inflammatorischen Prozesse, sowie die aus dem Fettgewebe freigesetzten Zytokine und Adipokine zu der mit Übergewicht assoziierten chronischen, unterschweligen Entzündung führen und an der Entstehung von Insulinresistenz, Diabetes mellitus Typ 2 und weiteren Folgeerkrankungen von Übergewicht beteiligt sind.<sup>94, 95, 100, 101</sup>

Um zu untersuchen, ob die durch Dabigatran im Fettgewebe hervorgerufenen anti-inflammatorischen Veränderungen sich auch im systemischen, im Blut zirkulierenden Zytokinprofil widerspiegeln, wurden die Konzentrationen einer Vielzahl zirkulierender Zytokine im Plasma bestimmt. Von den aus dem Fettgewebe reduziert freigesetzten Zytokinen war im Plasma nur IL-6 ebenfalls signifikant reduziert. Neben IL-6 waren allerdings auch anti-inflammatorische Zytokine wie IL-4 oder IL-10 im Plasma der Dabigatran-behandelten Tiere signifikant reduziert. Da neben dem Fettgewebe noch viele weitere Gewebe und Zelltypen Zytokine ins Blut sezernieren, ergibt sich eine komplexen Regulation der zirkulierenden Zytokine, die weder als eindeutig pro- noch eindeutig anti-inflammatorisch charakterisiert werden kann.

Auch die Anzahl verschiedener zirkulierender Immunzellpopulationen wurde untersucht, jedoch war die Anzahl an Lymphozyten, Neutrophilen und Monozyten ebenfalls durch Dabigatran unbeeinflusst. Auch eine Analyse der Ly6c<sup>-</sup>, patrouillierenden und der Ly6c<sup>+</sup>, inflammatorischen Monozyten-Subpopulation zeigte keine Unterschiede in den Behandlungsgruppen.

Diese Ergebnisse deuten ebenfalls darauf hin, dass die reduzierte Anzahl CD11c<sup>+</sup>, pro-inflammatorischer Makrophagen im Fettgewebe tatsächlich auf lokalen Veränderungen in der Zytokinsekretion und parakrinen Mechanismen der Zellen im Fettgewebe beruht und

nicht durch systemische Veränderungen der Monozytensubpopulationen oder einen allgemeinen anti-inflammatorischen Effekt einer Thrombininhibition hervorgerufen wird.

### **4.3 Einfluss von Dabigatran auf die Makrophagenpolarisation in atherosklerotischen Läsionen der Aorta**

Es ist bereits bekannt, dass Thrombin auf vielfältige Weise zur Entstehung atherosklerotischer Veränderungen beiträgt.<sup>154</sup> So bewirkt Thrombin PAR-vermittelt die Aktivierung von Thrombozyten,<sup>39</sup> trägt zur Entstehung einer endothelialen Dysfunktion bei,<sup>17, 43</sup> fördert die Leukozytenrekrutierung in die Gefäßwand<sup>154, 155</sup> und induziert die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen.<sup>52, 156</sup> Darüber hinaus stimuliert Thrombin die Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie MCP-1, IL-1 $\beta$ , IL-6 oder TNF- $\alpha$  in einer Vielzahl von Zellen, unter anderem glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Monozyten/Makrophagen.<sup>54-60</sup> In Studien an *ApoE*<sup>-/-</sup> Mäusen wurde bereits gezeigt, dass eine Thrombininhibition durch Melagatran oder Dabigatran die Atheroskleroseentwicklung hemmt und zur Ausbildung stabilerer Plaques führt.<sup>16-18, 61</sup> Arbeiten von Frau Dr. Nadine Nagy in unserem Labor konnten zeigen, dass eine Thrombininhibition mit Dabigatran auch in weiblichen *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäusen die Entstehung atherosklerotischer Läsionen in der Aorta inhibierte. Diese Inhibition beruhte nicht auf Veränderung im Plasmalipidprofil, welches in beiden Behandlungsgruppen ähnlich war.

Im Rahmen der Entstehung atherosklerotischer Läsionen spielen Makrophagen eine wichtige Rolle und es konnte bereits gezeigt werden, dass auch hier dynamische Veränderungen des Makrophagenphänotyps in Abhängigkeit der lokalen Mikroumgebung eine Rolle spielen.<sup>111, 132</sup> So scheinen M2-polarisierte Makrophagen einen eher protektiven Einfluss zu haben,<sup>112, 113, 116</sup> während pro-inflammatorische M1-Makrophagen die Atheroskleroseentwicklung zu fördern scheinen.<sup>114, 115</sup>

Eine durchflusszytometrische Analyse der Makrophagenpopulation in der Aortenwand der Dabigatran-behandelten *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse ergab ein ähnliches Bild wie auch im Fettgewebe der behandelten Tiere. Während die Gesamtzahl der Makrophagen unbeeinflusst war und auch die Menge der anti-inflammatorischen M2-polarisierten, CD206<sup>+</sup> Makrophagen nicht verändert war, zeigte sich eine signifikante Reduktion der Zahl der CD86<sup>+</sup>, pro-inflammatorischen, M1-polarisierten Makrophagen in der Aortenwand Dabigatran-behandelter Tiere. Diese Veränderungen im Polarisationsprofil der Makrophagen in den atherosklerotischen Läsionen könnten zum bereits beschriebenen protektiven Effekt einer Thrombininhibition bei Atherosklerose beitragen.

Da, wie bereits ausgeführt, Dabigatran keinen Einfluss auf die zirkulierenden Monozytenpopulationen hatte, implizieren diese Befunde, dass auch hier lokale Veränderungen parakriner Faktoren für die veränderte Makrophagenpolarisation verantwortlich sind. Welche Zelltypen und Faktoren hier im Detail beteiligt sind, bleibt in weiteren Untersuchungen zu klären. Denkbar wäre eine Beteiligung von Zellen des perivaskulären Fettgewebes. Es wurde bereits gezeigt, dass dieses die Gefäßfunktion z.B. durch die Freisetzung vasodilatierender oder vasokonstriktiver Faktoren beeinflussen kann.<sup>157-159</sup> Außerdem ist bekannt, dass eine fettreiche Diät auch in perivaskulärem Fettgewebe zur vermehrten Sekretion inflammatorischer Zytokine, wie IL-6, IL-8 oder MCP-1 führt und die Chemotaxis von Leukozyten induziert.<sup>160, 161</sup> Dass entzündliche Veränderungen im perivaskulären Fettgewebe die Entstehung einer Atherosklerose fördern, wurde durch eine weitere Studie an *ApoE*<sup>-/-</sup> Mäusen bestätigt. Hier wurde die Transplantation von viszeralem Fettgewebe um die Karotis der Versuchstiere als Modell einer isolierten Fettgewebsinflammation genutzt, ohne dass weitere metabolische Parameter verändert waren. Es konnte gezeigt werden, dass die Transplantation des entzündeten Fettgewebes um die Karotis zur Entstehung einer Atherosklerose führte, was für den Einfluss parakriner Faktoren aus dem perivaskulären Fettgewebe auf die Atherogenese spricht.<sup>100</sup> Auch im Menschen wurde bereits gezeigt, dass die Menge an perivaskulärem Fettgewebe mit der Größe atherosklerotischer Läsionen korreliert.<sup>162</sup>

Ob Dabigatran im perivaskulären Fettgewebe zu ähnlichen Veränderungen führt, wie im untersuchten viszeralen Fettgewebe und ob diese für die Modifikation der Makrophagenpolarisation verantwortlich sind, muss in weiteren Untersuchungen analysiert werden. Neben den Zellen des perivaskulären Fettgewebes könnten auch Endothel- oder glatte Muskelzellen für die veränderte Makrophagenpolarisation ursächlich sein, da für diese Zelltypen bereits gezeigt wurde, dass eine Stimulation mit Thrombin die Expression pro-inflammatorischer Faktoren stimuliert.<sup>54, 57, 58</sup>

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine pharmakologische Thrombininhibition durch den direkten Thrombininhibitor Dabigatran in einem Mausmodell der diätinduzierten Adipositas und akzelerierten Atherosklerose im viszeralen Fettgewebe die Entstehung einer Adipozytenhypertrophie fördert, welche jedoch nicht zu inflammatorischen Veränderungen des Fettgewebes führt. Interessanterweise ist die Anzahl pro-inflammatorischer Makrophagen im Fettgewebe sogar signifikant reduziert, was auf Veränderungen in der Polarisation der Makrophagen zurückzuführen ist, die wiederum durch Veränderungen im lokalen Sekretionsprofil im Fettgewebe bedingt ist. Ein ähnlicher Effekt zeigt sich auch in atherosklerotischen Läsionen der Aortenwand, was darauf schließen lässt, dass Dabigatran

auch im Rahmen begleitender chronisch-entzündlicher Erkrankungen einen positiven Einfluss vermittelt.

### 4.4 Limitierung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde beschrieben, dass die Dabigatran-vermittelte Thrombininhibition die Anzahl M1-polarisierter Makrophagen sowohl im Fettgewebe, als auch in atherosklerotischen Läsionen der Aortenwand indirekt über Veränderungen im Sekretionsprofil anderer Zellen in der lokalen Umgebung reduziert.

Eine mögliche Limitierung stellt das verwendete Mausmodell dar. Weibliche *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse sind ein sehr mildes Modell der diätinduzierten Adipositas. Ein Vorteil ist, dass sie gleichzeitig als Modell für die Atheroskleroseentwicklung verwendet werden können, so dass ein möglicher Einfluss des Fettgewebes auf die Entstehung der Atherosklerose untersucht werden kann.<sup>163</sup> Allerdings zeigt der Vergleich mit der Studie von Mihara *et al.*<sup>125</sup>, dass eine Thrombininhibition in einem extremen Modell der Adipositas zum Teil andere Effekte hat. So treten zwar ähnliche anti-inflammatorische Veränderungen auf, jedoch zeigen sich im extremen Modell der *Lep<sup>r</sup><sup>db/db</sup>* Mäuse zusätzliche, protektive Effekte einer Thrombininhibition auf die Entstehung einer Insulinresistenz, die über die in *Ldlr*<sup>-/-</sup> detektierten, protektiven Effekte auf die Fettgewebsinflammation hinausgehen. Ob dieser Effekt tatsächlich allein dem gewählten Mausmodell zuzuschreiben ist, oder ob hier auch substanz-spezifische oder dosisabhängige Effekte eine Rolle spielen, werden weitere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die vorhandenen Makrophagenpopulationen nur im sehr vereinfachten Modell der M1- und M2-Polarisierung analysiert. Diese beiden Phänotypen repräsentieren lediglich die zwei Extremzustände der Makrophagenpolarisation, während *in vivo* noch eine Vielzahl weiterer Phänotypen auftreten, die in ihrer Funktion irgendwo zwischen den beiden beschriebenen extremen Phänotypen liegen.<sup>104</sup> Eine genauere Beschreibung des vorliegenden Polarisationsphänotyps mit einer detaillierten Analyse der exprimierten Oberflächenantigene und des Genexpressionsprofils der untersuchten Makrophagenpopulationen in zukünftigen, weiterführenden Untersuchungen wäre interessant und sinnvoll.

Außerdem konnte der, der veränderten Polarisation zugrunde liegende, Mechanismus nicht vollständig geklärt werden. Hier sind ebenfalls weitere Studien nötig um die beteiligten Zelltypen sowie die für die veränderte Polarisation verantwortlichen Faktoren oder Kombination an Faktoren zu identifizieren.

## Diskussion

Es wäre ebenfalls interessant zu untersuchen, ob ähnliche Effekte im Menschen auftreten und ob somit z.B. Patienten mit Typ 2 Diabetes von einer Therapie mit direkten Thrombininhibitoren besonders profitieren könnten.

Teile der Abbildungen 5, 8 und 15 sind auch Bestandteil der Habilitationsschrift von Frau Dr. Maria Grandoch.

## 5 Zusammenfassung

Der direkte, orale Thrombininhibitor Dabigatran wird zur Prophylaxe und Therapie venöser Thromboembolien eingesetzt. In Studien an *ApoE<sup>-/-</sup>* Mäusen zeigte sich auch eine atheroprotektive Wirkung, die möglicherweise auf anti-inflammatorische Effekte der Thrombininhibition zurückzuführen war. Entzündungsprozesse spielen auch im Zusammenhang mit Übergewicht eine wichtige Rolle, da entzündlichen Veränderungen im Fettgewebe zur Entstehung von Folgeerkrankungen wie Insulinresistenz, Diabetes mellitus Typ 2 oder Atherosklerose beitragen. Außerdem wurde gezeigt, dass Übergewicht und Diabetes mellitus Typ 2 mit einer vermehrten Expression und Aktivierung prokoagulatorischer Faktoren, wie unter anderem Thrombin, einhergehen. Thrombin ist neben seiner zentralen Rolle in der Blutgerinnung auch in viele Entzündungsvorgänge involviert. Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt einer pharmakologischen Thrombininhibition durch Dabigatran auf entzündliche Prozesse sowohl im Fettgewebe als auch in atherosklerotischen Läsionen zu untersuchen. Dazu wurden weibliche *Ldlr<sup>-/-</sup>* Mäuse, als Modell der diätinduzierten Adipositas und akzelerierten Atherosklerose, im Alter von 10 Wochen für eine Dauer von 20 Wochen mit einer fettreichen Diät in Kombination mit Dabigatran oder der entsprechenden Placebosubstanz behandelt.

Die Analyse des viszeralen Fettgewebes der behandelten Tiere zeigte, dass Dabigatran eine signifikante Vergrößerung der Fettzellen bewirkte, obwohl sich Gewichtszunahme, *Body-Mass-Index* und Körperfettanteil in den beiden Behandlungsgruppen nicht unterschieden. Die Adipozytenhypertrophie führte jedoch nicht zu einer vermehrten Inflammation des Fettgewebes, sondern im Gegenteil sogar zu einer signifikant verringerten Anzahl pro-inflammatorischer CD11c<sup>+</sup> Makrophagen und einer verminderten Sekretion des entzündlichen Zytokins Interleukin-6 aus dem Fettgewebe. *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass Thrombin einen direkten inhibitorischen Effekt auf die Lipidspeicherung in Adipozyten hat, während die Änderung der Makrophagenpolarisation indirekt über ein verändertes sekretorisches Profil des Fettgewebes verursacht wurde.

Der Einfluss von Dabigatran auf die Makrophagenpolarisation zeigte sich auch in atherosklerotischen Läsionen, wo die Anzahl pro-inflammatorischer CD86<sup>+</sup> Makrophagen signifikant verringert, die Zahl der anti-inflammatorischen CD206<sup>+</sup> Makrophagen jedoch unbeeinflusst war. Dies könnte zum bekannten atheroprotektiven Effekt von Dabigatran beitragen.

Dabigatran führt also sowohl im Fettgewebe als auch in atherosklerotischen Läsionen zu einer verringerten M1-Polarisation von Makrophagen. Dieser Effekt wird vermutlich durch Beeinflussung des lokalen Sekretionsprofils vermittelt.

## 6 Summary

The direct oral thrombin inhibitor dabigatran etexilate is used for the prophylaxis and treatment of venous thromboembolism and has already been shown to display atheroprotective effects in *apolipoprotein E* deficient mice, probably due to anti-inflammatory actions. Obesity is associated with inflammation of the adipose tissue. This chronic low-grade inflammation promotes the development of insulin resistance, type 2 diabetes mellitus and atherosclerosis. Obese patients as well as patients with type 2 diabetes mellitus show increased expression of a variety of procoagulant proteins and enhanced thrombin generation. Despite its crucial role in the coagulation cascade, the serine protease thrombin is involved in many inflammatory processes.

Aim of this study was to investigate the effects of thrombin inhibition by dabigatran on adipose tissue inflammation as well as inflammatory processes in atherosclerotic lesions. For this purpose, 10-week-old female *low density lipoprotein receptor* deficient mice, a model for diet-induced obesity and accelerated atherosclerosis, were fed a high-fat diet containing the thrombin inhibitor dabigatran or the matching placebo for 20 weeks.

Analysis of the visceral adipose tissue revealed that treatment with dabigatran induced a significant increase in adipocyte size, although weight gain, body-mass index and the amount of body fat were not different in dabigatran and placebo-treated animals. However, the observed adipocyte hypertrophy did not result in increased adipose tissue inflammation. In contrast, the amount of pro-inflammatory CD11c<sup>+</sup> macrophages was significantly reduced in dabigatran-treated animals, as was the secretion of pro-inflammatory IL-6 from adipose tissue. *In vitro* studies using 3T3 L1 preadipocytes and bone marrow-derived macrophages revealed that thrombin had a direct inhibitory effect on adipocyte lipid storage, while the changes in macrophage polarization were mediated indirectly by changes in the secretory profile of adipose tissue. A similar effect of dabigatran on macrophage polarization was found in atherosclerotic lesions, where numbers of CD86<sup>+</sup>, M1-polarized macrophages were also significantly reduced, while the amount of anti-inflammatory CD206<sup>+</sup> macrophages remained unchanged. This effect might contribute to the known atheroprotective effect of dabigatran.

Treatment with the direct thrombin inhibitor dabigatran reduces M1-polarization of macrophages in adipose tissue as well as atherosclerotic lesions, likely by changing the secretory profile of adipocytes or other cells in the local microenvironment.

## Literaturverzeichnis

1. Schwabe U, Paffrath D. Arzneiverordnungs-Report 2015. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2015.
2. Yeh CH, Hogg K, Weitz JI. Overview of the new oral anticoagulants: opportunities and challenges. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(5):1056-65.
3. Eisert WG, Huel N, Stangier J, Wiene W, Clemens A, van Ryn J. Dabigatran: an oral novel potent reversible nonpeptide inhibitor of thrombin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(10):1885-9.
4. Hankey GJ, Eikelboom JW. Dabigatran etexilate: a new oral thrombin inhibitor. *Circulation.* 2011;123(13):1436-50.
5. Huel NH, Nar H, Pripke H, Ries U, Stassen J-M, Wiene W. Structure-Based Design of Novel Potent Nonpeptide Thrombin Inhibitors. *J Med Chem.* 2002;45(9):1757-66.
6. Wiene W, Stassen J-M, Pripke H, Ries UJ, Huel N. In-vitro profile and ex-vivo anticoagulant activity of the direct thrombin inhibitor dabigatran and its orally active prodrug, dabigatran etexilate. *Thrombosis and Haemostasis.* 2007.
7. Blech S, Ebner T, Ludwig-Schwellinger E, Stangier J, Roth W. The metabolism and disposition of the oral direct thrombin inhibitor, dabigatran, in humans. *Drug Metab Dispos.* 2008;36(2):386-99.
8. Stangier J, Rathgen K, Stahle H, Gansser D, Roth W. The pharmacokinetics, pharmacodynamics and tolerability of dabigatran etexilate, a new oral direct thrombin inhibitor, in healthy male subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2007;64(3):292-303.
9. Eriksson BI, Dahl OE, Rosencher N, Kurth AA, van Dijk CN, Frostick SP, et al. Dabigatran etexilate versus enoxaparin for prevention of venous thromboembolism after total hip replacement: a randomised, double-blind, non-inferiority trial. *The Lancet.* 2007;370(9591):949-56.
10. Eriksson BI, Dahl OE, Rosencher N, Kurth AA, van Dijk CN, Frostick SP, et al. Oral dabigatran etexilate vs. subcutaneous enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism after total knee replacement: the RE-MODEL randomized trial. *J Thromb Haemost.* 2007;5(11):2178-85.
11. Eriksson BI, Dahl OE, Huo MH, Kurth AA, Hantel S, Hermansson K, et al. Oral dabigatran versus enoxaparin for thromboprophylaxis after primary total hip arthroplasty (RE-NOVATE II\*). A randomised, double-blind, non-inferiority trial. *Thromb Haemost.* 2011;105(4):721-9.
12. Schulman S, Kearon C, Kakkar AK, Mismetti P, Schellong S, Eriksson H, et al. Dabigatran versus warfarin in the treatment of acute venous thromboembolism. *N Engl J Med.* 2009;361(24):2342-52.

13. Schulman S, Kakkar AK, Goldhaber SZ, Schellong S, Eriksson H, Mismetti P, et al. Treatment of acute venous thromboembolism with dabigatran or warfarin and pooled analysis. *Circulation*. 2014;129(7):764-72.
14. Connolly S, Ezekowitz MD, Yusuf S, Eikelboom J, Oldgren J, Parekh A, et al. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 2009;361(12):1139-51.
15. Connolly S, Ezekowitz MD, Yusuf S, Reilly PA, Wallentin L. Newly identified events in the RE-LY trial. *N Engl J Med*. 2010;363(19):1875-6.
16. Kadoglou NP, Moustardas P, Katsimpoulas M, Kapelouzou A, Kostomitsopoulos N, Schafer K, et al. The beneficial effects of a direct thrombin inhibitor, dabigatran etexilate, on the development and stability of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice : dabigatran etexilate and atherosclerosis. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2012;26(5):367-74.
17. Lee IO, Kratz MT, Schirmer SH, Baumhake M, Bohm M. The effects of direct thrombin inhibition with dabigatran on plaque formation and endothelial function in apolipoprotein E-deficient mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012;343(2):253-7.
18. Borisoff JI, Otten JJ, Heeneman S, Leenders P, van Oerle R, Soehnlein O, et al. Genetic and pharmacological modifications of thrombin formation in apolipoprotein e-deficient mice determine atherosclerosis severity and atherothrombosis onset in a neutrophil-dependent manner. *PLoS One*. 2013;8(2):e55784.
19. Preusch MR, Ieronimakis N, Wijelath ES, Cabbage S, Ricks J, Bea F, et al. Dabigatran etexilate retards the initiation and progression of atherosclerotic lesions and inhibits the expression of oncostatin M in apolipoprotein E-deficient mice. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:5203-11.
20. Kopec AK, Joshi N, Towery KL, Kassel KM, Sullivan BP, Flick MJ, et al. Thrombin inhibition with dabigatran protects against high-fat diet-induced fatty liver disease in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014;351(2):288-97.
21. Tripathy D, Sanchez A, Yin X, Luo J, Martinez J, Grammas P. Thrombin, a mediator of cerebrovascular inflammation in AD and hypoxia. *Front Aging Neurosci*. 2013;5:19.
22. Crawley JTB, Zanardelli S, Chion CKNK, Lane DA. The central role of thrombin in hemostasis. *J Thromb Haemost*. 2007;5(Suppl. 1):95-101.
23. Davie EW, Kulman JD. An overview of the structure and function of thrombin. *Semin Thromb Hemost*. 2006;32 Suppl 1:3-15.
24. Huntington JA. Thrombin plasticity. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1824(1):246-52.
25. Bode W. The structure of thrombin: a janus-headed proteinase. *Semin Thromb Hemost*. 2006;32 Suppl 1:16-31.

## Literaturverzeichnis

26. Bode W, Turk D, Karshikov A. The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human alpha-thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships. *Protein Sci.* 1992;1(4):426-71.
27. Pineda AO, Carrell CJ, Bush LA, Prasad S, Caccia S, Chen ZW, et al. Molecular dissection of Na<sup>+</sup> binding to thrombin. *J Biol Chem.* 2004;279(30):31842-53.
28. Krishnaswamy S, Church WR, Nesheim ME, Mann KG. Activation of human prothrombin by human prothrombinase. Influence of factor Va on the reaction mechanism. *J Biol Chem.* 1987;262(7):3291-9.
29. Mann KG. Thrombin generation in hemorrhage control and vascular occlusion. *Circulation.* 2011;124(2):225-35.
30. Tollefsen DM, Majerus DW, Blank MK. Heparin cofactor II. Purification and properties of a heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma. *J Biol Chem.* 1982;257(5):2162-9.
31. Rosenberg RD, Damus PS. The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor. *J Biol Chem.* 1973;248(18):6490-505.
32. Coughlin SR. How the protease thrombin talks to cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96(20):11023-7.
33. Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature.* 2000;407(6801):258-64.
34. Déry O, Bunnett NW. Proteinase-activated receptors: a growing family of heptahelical receptors for thrombin, trypsin and tryptase. *Biochem Soc Trans.* 1999;27(2):246-54.
35. Sidhu TS, French SL, Hamilton JR. Differential signaling by protease-activated receptors: implications for therapeutic targeting. *Int J Mol Sci.* 2014;15(4):6169-83.
36. Vu T, Hung D, Wheaton V, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell.* 1991;64(6):1057-68.
37. Ishihara H, Connolly A, Zeng D, Kahn M, Zheng Y, Timmons C, et al. Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature.* 1997;386(6624):502-6.
38. Vu T, Wheaton V, Hung D, Charo I, Coughlin SR. Domains specifying thrombin-receptor interaction. *Nature.* 1991;353(6345):674-7.
39. Kahn M, Zheng Y, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, et al. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature.* 1998;394(6694):690-4.

40. Aschner JL, Lum H, Fletcher PW, Malik AB. Bradykinin- and thrombin-induced increases in endothelial permeability occur independently of phospholipase C but require protein kinase C activation. *J Cell Physiol.* 1997;173(3):387-96.
41. Vouret-Craviari V, Boquet P, Pouysségur J, Van Obberghen-Schilling E. Regulation of the actin cytoskeleton by thrombin in human endothelial cells: role of Rho proteins in endothelial barrier function. *Mol Biol Cell.* 1998;9(9):2639-53.
42. Rabiet M-J, Plantier J-L, Rival Y, Genoux Y, Lampugnani M-G, Dejana E. Thrombin-Induced Increase in Endothelial Permeability Is Associated With Changes in Cell-to-Cell Junction Organization. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 1996;16(3):488-96.
43. Garcia JG, Patterson C, Bahler C, Aschner J, Hart CM, English D. Thrombin receptor activating peptides induce Ca<sup>2+</sup> mobilization, barrier dysfunction, prostaglandin synthesis, and platelet-derived growth factor mRNA expression in cultured endothelium. *J Cell Physiol.* 1993;156(3):541-9.
44. Kaplanski G, Fabrigoule M, Boulay V, Dinarello CA, Bongrand P, Kaplanski S, et al. Thrombin induces endothelial type II activation in vitro: IL-1 and TNF-alpha-independent IL-8 secretion and E-selectin expression. *J Immunol.* 1997;158(11):5435-41.
45. Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Thrombin stimulates the adherence of neutrophils to human endothelial cells in vitro. *J Clin Invest.* 1985;76(6):2235-46.
46. Kaur J, Woodman RC, Ostrovsky L, Kubes P. Selective recruitment of neutrophils and lymphocytes by thrombin: a role for NF-kappaB. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;281(2):H784-95.
47. Toothill VJ, Van Mourik JA, Niewenhuis HK, Metzelaar MJ, Pearson JD. Characterization of the enhanced adhesion of neutrophil leukocytes to thrombin-stimulated endothelial cells. *J Immunol.* 1990;145(1):283-91.
48. Vergnolle N, Derian CK, D'Andrea MR, Steinhoff M, Andrade-Gordon P. Characterization of Thrombin-Induced Leukocyte Rolling and Adherence: A Potential Proinflammatory Role for Proteinase-Activated Receptor-4. *The Journal of Immunology.* 2002;169(3):1467-73.
49. Kaplanski G, Marin V, Fabrigoule M, Boulay V, Benoliel AM, Bongrand P, et al. Thrombin-activated human endothelial cells support monocyte adhesion in vitro following expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; CD54) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1; CD106). *Blood.* 1998;92(4):1259-67.
50. Rahman A. Galphaq and Gbetagamma Regulate PAR-1 Signaling of Thrombin-Induced NF-kappaB Activation and ICAM-1 Transcription in Endothelial Cells. *Circulation Research.* 2002;91(5):398-405.
51. Bretschneider E, Kaufmann R, Braun M, Nowak G, Glusa E, Schrör K. Evidence for functionally active protease-activated receptor-4 (PAR-4) in human vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* 2001;132(7):1441-6.

## Literaturverzeichnis

52. McNamara CA, Sarembok IJ, Gimple LW, Fenton JW, 2nd, Coughlin SR, Owens GK. Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor. *J Clin Invest.* 1993;91(1):94-8.
53. Bar-Shavit R, Kahn A, Fenton JW, 2nd, Wilner GD. Chemotactic response of monocytes to thrombin. *J Cell Biol.* 1983;96(1):282-5.
54. Ma L, Dorling A. The roles of thrombin and protease-activated receptors in inflammation. *Semin Immunopathol.* 2012;34(1):63-72.
55. Colotta F, Sciacca FL, Sironi M, Luini W, Rabiet M-J, Mantovani A. Expression of monocyte chemotactic protein-1 by monocytes and endothelial cells exposed to thrombin. *Am J Pathol.* 1994;144(5):975-85.
56. Kawanami D, Matoba K, Kanazawa Y, Ishizawa S, Yokota T, Utsunomiya K. Thrombin induces MCP-1 expression through Rho-kinase and subsequent p38MAPK/NF-kappaB signaling pathway activation in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;411(4):798-803.
57. Johnson K, Choi Y, DeGroot E, Samuels I, Creasey A, Aarden L. Potential mechanisms for a proinflammatory vascular cytokine response to coagulation activation. *J Immunol.* 1998;1998(160):10.
58. Chung SW, Park JW, Lee SA, Eo SK, Kim K. Thrombin promotes proinflammatory phenotype in human vascular smooth muscle cell. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;396(3):748-54.
59. Lopez ML, Bruges G, Crespo G, Salazar V, Deglesne PA, Schneider H, et al. Thrombin selectively induces transcription of genes in human monocytes involved in inflammation and wound healing. *Thromb Haemost.* 2014;112(5):992-1001.
60. Naldini A, Sower L, Bocci V, Meyers B, Carney DH. Thrombin receptor expression and responsiveness of human monocytic cells to thrombin is linked to interferon-induced cellular differentiation. *J Cell Physiol.* 1998;177(1):76-84.
61. Bea F, Kreuzer J, Preusch M, Schaab S, Isermann B, Rosenfeld ME, et al. Melagatran reduces advanced atherosclerotic lesion size and may promote plaque stability in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(12):2787-92.
62. Kassel KM, Owens AP, 3rd, Rockwell CE, Sullivan BP, Wang R, Tawfik O, et al. Protease-activated receptor 1 and hematopoietic cell tissue factor are required for hepatic steatosis in mice fed a Western diet. *Am J Pathol.* 2011;179(5):2278-89.
63. Kassel KM, Sullivan BP, Cui W, Copple BL, Luyendyk JP. Therapeutic administration of the direct thrombin inhibitor argatroban reduces hepatic inflammation in mice with established fatty liver disease. *Am J Pathol.* 2012;181(4):1287-95.
64. World Health Organisation (WHO). Global status report on noncommunicable diseases 2014. 2014.

65. Prospective Studies Collaboration. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet*. 2009;373:1083-96.
66. GBD 2013 Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2015 Sep 10; doi: 10.1016/S0140-6736(15)00128-2. [Epub ahead of print].
67. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab*. 2000;11(8):327-32.
68. Yang K. *Adipose tissue protocols*. 2nd ed. Totowa, N.J.: Humana; 2008.
69. Shen W, Wang Z, Punyanita M, Lei J, Sinav A, Kral JG, et al. Adipose Tissue Quantification by Imaging Methods: A Proposed Classification. *Obes Res*. 2003;11(1):5-16.
70. Wajchenberg BL. Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Their Relation to the Metabolic Syndrome. *Endocr Rev*. 2000;21(6):697-738.
71. Gabriely I, Ma XH, Yang X, Atzmon G, Rajala M, Berg A, et al. Removal of Visceral Fat Prevents Insulin Resistance and Glucose Intolerance of Aging: An Adipokine-Mediated Process? *Diabetes*. 2002;51(10):2951-8.
72. Pitombo C, Araujo EP, De Souza CT, Pareja JC, Geloneze B, Velloso LA. Amelioration of diet-induced diabetes mellitus by removal of visceral fat. *J Endocrinol*. 2006;191(3):699-706.
73. Faust IM, Johnson PR, Stern JS, Hirsch J. Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity. *Am J Physiol*. 1978;235(3):E279-E86.
74. Jo J, Gavrilova O, Pack S, Jou W, Mullen S, Sumner AE, et al. Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. *PLoS Comput Biol*. 2009;5(3):e1000324.
75. Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW, 2nd, DeFuria J, Jick Z, et al. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes*. 2007;56(12):2910-8.
76. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res*. 2005;46(11):2347-55.
77. MacKellar J, Cushman SW, Periwai V. Waves of adipose tissue growth in the genetically obese Zucker fatty rat. *PLoS One*. 2010;5(1):e8197.
78. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation*. 2004;114(12):1752-61.

## Literaturverzeichnis

79. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1796-808.
80. Kaplan JL, Marshall MA, C CM, Harmon DB, Garmey JC, Oldham SN, et al. Adipocyte progenitor cells initiate monocyte chemoattractant protein-1-mediated macrophage accumulation in visceral adipose tissue. *Mol Metab.* 2015;4(11):779-94.
81. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest.* 2006;116(6):1494-505.
82. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest.* 2006;116(1):115-24.
83. Inouye KE, Shi H, Howard JK, Daly CH, Lord GM, Rollins BJ, et al. Absence of CC chemokine ligand 2 does not limit obesity-associated infiltration of macrophages into adipose tissue. *Diabetes.* 2007;56(9):2242-50.
84. Kirk EA, Sagawa ZK, McDonald TO, O'Brien KD, Heinecke JW. Monocyte chemoattractant protein deficiency fails to restrain macrophage infiltration into adipose tissue [corrected]. *Diabetes.* 2008;57(5):1254-61.
85. Kraakman MJ, Kammoun HL, Allen TL, Deswaerte V, Henstridge DC, Estevez E, et al. Blocking IL-6 trans-signaling prevents high-fat diet-induced adipose tissue macrophage recruitment but does not improve insulin resistance. *Cell Metab.* 2015;21(3):403-16.
86. Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamasaki K, Yasukawa K, Matsuda T, et al. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell.* 1989;58(3):573-81.
87. Mauer J, Chaurasia B, Goldau J, Vogt MC, Ruud J, Nguyen KD, et al. Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin. *Nat Immunol.* 2014;15(5):423-30.
88. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* 2007;117(1):175-84.
89. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature.* 2013;496(7446):445-55.
90. Odegaard JI, Chawla A. Alternative macrophage activation and metabolism. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:275-97.
91. Chawla A, Nguyen KD, Goh YP. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(11):738-49.

92. Lumeng CN, DelProposto JB, Westcott DJ, Saltiel AR. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes*. 2008;57(12):3239-46.
93. Nguyen MT, Favelyukis S, Nguyen AK, Reichart D, Scott PA, Jenn A, et al. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem*. 2007;282(48):35279-92.
94. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, Morel CR, Subramanian V, Mukundan L, et al. Macrophage-specific PPAR $\gamma$  controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature*. 2007;447(7148):1116-20.
95. Patsouris D, Li PP, Thapar D, Chapman J, Olefsky JM, Neels JG. Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. *Cell Metab*. 2008;8(4):301-9.
96. Suganami T, Nishida J, Ogawa Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(10):2062-8.
97. Suganami T, Tanimoto-Koyama K, Nishida J, Itoh M, Yuan X, Mizuarai S, et al. Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(1):84-91.
98. Gustafson B, Smith U. Cytokines promote Wnt signaling and inflammation and impair the normal differentiation and lipid accumulation in 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem*. 2006;281(14):9507-16.
99. Lacasa D, Taleb S, Keophiphath M, Miranville A, Clement K. Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes. *Endocrinology*. 2007;148(2):868-77.
100. Ohman MK, Shen Y, Obimba CI, Wright AP, Warnock M, Lawrence DA, et al. Visceral adipose tissue inflammation accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2008;117(6):798-805.
101. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1821-30.
102. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 2010;327(5966):656-61.
103. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004;25(12):677-86.

104. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 2014;41(1):14-20.
105. Gautier EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, Ivanov S, et al. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat Immunol*. 2012;13(11):1118-28.
106. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*. 2014;6:13.
107. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med*. 1992;176(1):287-92.
108. Doyle AG, Herbein G, Montaner LJ, Minty AJ, Caput D, Ferrara P, et al. Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: comparison with interleukin-4 and interferon-gamma. *Eur J Immunol*. 1994;24(6):1441-5.
109. Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages Sequentially Change Their Functional Phenotype in Response to Changes in Microenvironmental Influences. *The Journal of Immunology*. 2005;175(1):342-9.
110. Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(10):709-21.
111. Leitinger N, Schulman IG. Phenotypic polarization of macrophages in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(6):1120-6.
112. Babaev VR, Yancey PG, Ryzhov SV, Kon V, Breyer MD, Magnuson MA, et al. Conditional knockout of macrophage PPARgamma increases atherosclerosis in C57BL/6 and low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(8):1647-53.
113. Sharma N, Lu Y, Zhou G, Liao X, Kapil P, Anand P, et al. Myeloid Kruppel-like factor 4 deficiency augments atherogenesis in ApoE<sup>-/-</sup> mice--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(12):2836-8.
114. Hanna RN, Shaked I, Hubbeling HG, Punt JA, Wu R, Herrley E, et al. NR4A1 (Nur77) deletion polarizes macrophages toward an inflammatory phenotype and increases atherosclerosis. *Circ Res*. 2012;110(3):416-27.
115. Hamers AA, Vos M, Rassam F, Marinkovic G, Kurakula K, van Gorp PJ, et al. Bone marrow-specific deficiency of nuclear receptor Nur77 enhances atherosclerosis. *Circ Res*. 2012;110(3):428-38.
116. Cardilo-Reis L, Gruber S, Schreier SM, Drechsler M, Papac-Milicevic N, Weber C, et al. Interleukin-13 protects from atherosclerosis and modulates plaque composition by skewing the macrophage phenotype. *EMBO Mol Med*. 2012;4(10):1072-86.

## Literaturverzeichnis

117. Rosito GA, D'Agostino RB, Massaro J, Lipinska I, Mittleman MA, Sutherland P, et al. Association between obesity and a prothrombotic state: the Framingham Offspring Study. *Thrombosis and Haemostasis*. 2004.
118. Boden G, Vaidyula VR, Homko C, Cheung P, Rao AK. Circulating tissue factor procoagulant activity and thrombin generation in patients with type 2 diabetes: effects of insulin and glucose. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(11):4352-8.
119. Cimenti C, Mangge H, Haidl H, Zach D, Muntean W. Thrombin generation in severely obese children. *J Thromb Haemost*. 2006;4(8):1834-6.
120. Siklar Z, Ocal G, Berberoglu M, Hacıhamdioglu B, Savas Erdeve S, Egin Y, et al. Evaluation of hypercoagulability in obese children with thrombin generation test and microparticle release: effect of metabolic parameters. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2011;17(6):585-9.
121. Ay L, Kopp HP, Brix JM, Ay C, Quehenberger P, Schernthaner GH, et al. Thrombin generation in morbid obesity: significant reduction after weight loss. *J Thromb Haemost*. 2010;8(4):759-65.
122. Kopp CW, Kopp HP, Steiner S, Kriwanek S, Krzyzanowska K, Bartok A, et al. Weight loss reduces tissue factor in morbidly obese patients. *Obes Res*. 2003;11(8):950-6.
123. Samad F, Pandey M, Loskutoff DJ. Regulation of tissue factor gene expression in obesity. *Blood*. 2001;98(12):3353-8.
124. Nagai N, Hoylaerts MF, Cleuren AC, Van Vlijmen BJ, Lijnen HR. Obesity promotes injury induced femoral artery thrombosis in mice. *Thromb Res*. 2008;122(4):549-55.
125. Mihara M, Aihara K, Ikeda Y, Yoshida S, Kinouchi M, Kurahashi K, et al. Inhibition of thrombin action ameliorates insulin resistance in type 2 diabetic db/db mice. *Endocrinology*. 2010;151(2):513-9.
126. Strande JL, Phillips SA. Thrombin increases inflammatory cytokine and angiogenic growth factor secretion in human adipose cells in vitro. *J Inflamm (Lond)*. 2009;6:4.
127. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):676-82.
128. Laughton C. Quantification of Attached Cells in Microtiter Plates Based on Coomassie Brilliant Blue G-250 Staining of Total Cellular Protein. *Anal Biochem*. 1984;140(2):417-23.
129. Carl Roth GmbH + Co. KG. Rotitest® Vital. Instructions for use. 2015.
130. DiCorleto PE, de la Motte CA. Characterization of the adhesion of the human monocytic cell line U937 to cultured endothelial cells. *J Clin Invest*. 1985;75(4):1153-61.
131. Zhang X, Goncalves R, Mosser DM. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol*. 2008;Chapter 14:Unit 14 1.

132. Kadl A, Meher AK, Sharma PR, Lee MY, Doran AC, Johnstone SR, et al. Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2. *Circ Res.* 2010;107(6):737-46.
133. Kigerl KA, Gensel JC, Ankeny DP, Alexander JK, Donnelly DJ, Popovich PG. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J Neurosci.* 2009;29(43):13435-44.
134. Ait-Lounis A, Laraba-Djebari F. TNF-alpha involvement in insulin resistance induced by experimental scorpion envenomation. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(7):e1740.
135. Breslin WL, Strohacker K, Carpenter KC, Haviland DL, McFarlin BK. Mouse blood monocytes: standardizing their identification and analysis using CD115. *J Immunol Methods.* 2013;390(1-2):1-8.
136. Butcher MJ, Herre M, Ley K, Galkina E. Flow cytometry analysis of immune cells within murine aortas. *J Vis Exp.* 2011(53).
137. Chomczynski P, Sacchi N. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9.
138. Rock K, Meusch M, Fuchs N, Tigges J, Zipper P, Fritsche E, et al. Estradiol protects dermal hyaluronan/versican matrix during photoaging by release of epidermal growth factor from keratinocytes. *J Biol Chem.* 2012;287(24):20056-69.
139. Müller J. Untersuchung der Effekte von Interleukin-6 auf den Umbau der kardialen extrazellulären Matrix nach akutem Myokardinfarkt (Dissertation) 2014.
140. Grandoch M, Feldmann K, Gothert JR, Dick LS, Homann S, Klatt C, et al. Deficiency in Lymphotoxin Receptor Protects From Atherosclerosis in apoE-Deficient Mice. *Circulation Research.* 2015;116(8):e57-e68.
141. Müller J, Gorressen S, Grandoch M, Feldmann K, Kretschmer I, Lehr S, et al. Interleukin-6-dependent phenotypic modulation of cardiac fibroblasts after acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 2014;109(6):440.
142. Lech M, Susanti HE, Rommele C, Grobmayr R, Gunthner R, Anders HJ. Quantitative expression of C-type lectin receptors in humans and mice. *Int J Mol Sci.* 2012;13(8):10113-31.
143. Melchior-Becker A. Molecular and functional characterization of biglycan during pathologic cardiac remodelling (Dissertation). Universität Duisburg-Essen: Universität Duisburg-Essen; 2011.
144. Ray S, Dutta D, Rumi MA, Kent LN, Soares MJ, Paul S. Context-dependent function of regulatory elements and a switch in chromatin occupancy between GATA3 and GATA2 regulate Gata2 transcription during trophoblast differentiation. *J Biol Chem.* 2009;284(8):4978-88.

## Literaturverzeichnis

145. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(15):e115.
146. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012;13:134.
147. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols.* 2008;3(6):1101-8.
148. Bio-Rad Laboratories Inc. Multiplex Immunoassays. 2015 [cited 2015 10 Oct]. Available from: <http://www.bio-rad.com/de-de/applications-technologies/multiplex-immunoassays>.
149. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, et al. Subcutaneous Adipose Tissue Releases Interleukin-6, But Not Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , *in Vivo*. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(12):4196-200.
150. Gast KB, den Heijer M, Smit JW, Widya RL, Lamb HJ, de Roos A, et al. Individual contributions of visceral fat and total body fat to subclinical atherosclerosis: The NEO study. *Atherosclerosis.* 2015;241(2):547-54.
151. Wallenius V, Wallenius K, Ahrén B, Rudling M, Carlsten H, Dickson SL, et al. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nature Medicine.* 2002;8:75-9.
152. Matthews VB, Allen TL, Risis S, Chan MH, Henstridge DC, Watson N, et al. Interleukin-6-deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance. *Diabetologia.* 2010;53(11):2431-41.
153. Di Gregorio GB, Hensley L, Lu T, Ranganathan G, Kern PA. Lipid and carbohydrate metabolism in mice with a targeted mutation in the IL-6 gene: absence of development of age-related obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004;287(1):E182-7.
154. Alberelli MA, De Candia E. Functional role of protease activated receptors in vascular biology. *Vascul Pharmacol.* 2014;62(2):72-81.
155. Drake WT, Issekutz AC. A role for alpha-thrombin in polymorphonuclear leukocyte recruitment during inflammation. *Semin Thromb Hemost.* 1992;18(3):333-40.
156. Pape R, Rauch BH, Rosenkranz AC, Kaber G, Schror K. Transcriptional inhibition of protease-activated receptor-1 expression by prostacyclin in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(3):534-40.
157. Soltis EE, Cassis LA. Influence of Perivascular Adipose Tissue on Rat Aortic Smooth Muscle Responsiveness. *Clinical and Experimental Hypertension Part A: Theory and Practice.* 2009;13(2):277-96.
158. Löhn M, Dubrovskaja G, Lauterbach B, Luft FC, Gollasch M, Sharma AM. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. *FASEB J.* 2002;16(9):1057-63.

## Appendix

159. Meyer MR, Fredette NC, Barton M, Prossnitz ER. Regulation of vascular smooth muscle tone by adipose-derived contracting factor. *PLoS One*. 2013;8(11):e79245.
160. Henrichot E, Juge-Aubry CE, Pernin A, Pache JC, Velebit V, Dayer JM, et al. Production of chemokines by perivascular adipose tissue: a role in the pathogenesis of atherosclerosis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(12):2594-9.
161. Chatterjee TK, Stoll LL, Denning GM, Harrelson A, Blomkalns AL, Idelman G, et al. Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes: influence of high-fat feeding. *Circ Res*. 2009;104(4):541-9.
162. Verhagen SN, Vink A, van der Graaf Y, Visseren FL. Coronary perivascular adipose tissue characteristics are related to atherosclerotic plaque size and composition. A post-mortem study. *Atherosclerosis*. 2012;225(1):99-104.
163. Neuhofer A, Wernly B, Leitner L, Sarabi A, Sommer NG, Staffler G, et al. An accelerated mouse model for atherosclerosis and adipose tissue inflammation. *Cardiovasc Diabetol*. 2014;13:23.

# Appendix

## Appendix

**Tabelle 4. Verwendete Nährmedien in der Zellkultur**

<b>Nährmedium</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Hersteller</b>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>	Gibco® Life Technologies™, Paisley, Großbritannien
DMEM hg, 0 %	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , 4,5 g/l Glukose 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin	alles von Gibco® Life Technologies™, Paisley, Großbritannien
DMEM hg, 10 %	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , 4,5 g/l Glukose 10 % FBS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin	alles von Gibco® Life Technologies™, Paisley, Großbritannien
RPMI, 0 %	RPMI Medium 1640 (1X) + GlutaMAX™-I 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin	alles von Gibco® Life Technologies™, Paisley, Großbritannien
Makrophagen-Nährmedium	Makrophagen-Isolationsmedium 10 ng/ml M-CSF 10 % hitzeinaktiviertes FBS	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Makrophagen-Hungermedium	Makrophagen-Isolationsmedium 5 % hitzeinaktiviertes FBS	
RPMI, 10 %	RPMI Medium 1640 (1X) + GlutaMAX™-I 10 % FBS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin	alles von Gibco® Life Technologies™, Paisley, Großbritannien

## Appendix

**Tabelle 5. Puffer und Lösungen Histologie, Immunhistochemie und Zellfärbungen.**

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Hersteller</b>
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,4	
0,1 % Eosin-Lösung	0,1 % Eosin Y Dinatrium-Salz 0,05 % Essigsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Blockierlösung	20 mM Tris·HCl 137 mM NaCl 10 % fetales bovines Serum (FBS) 1 % bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in PBS	
Öl-Rot-O-Lösung (Aorten)	35 ml 0,5 %-ige ÖRO-Lösung (in Methanol) 10 ml 1 M NaOH	
Öl-Rot-O-Lösung (3T3 L1)	1,8 mg/ml Öl-Rot-O in 60 % Isopropanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Coomassie-Lösung	0,2 % Coomassie <sup>®</sup> Brilliant Blue G250 10 % Essigsäure 50 % Isopropanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

## Appendix

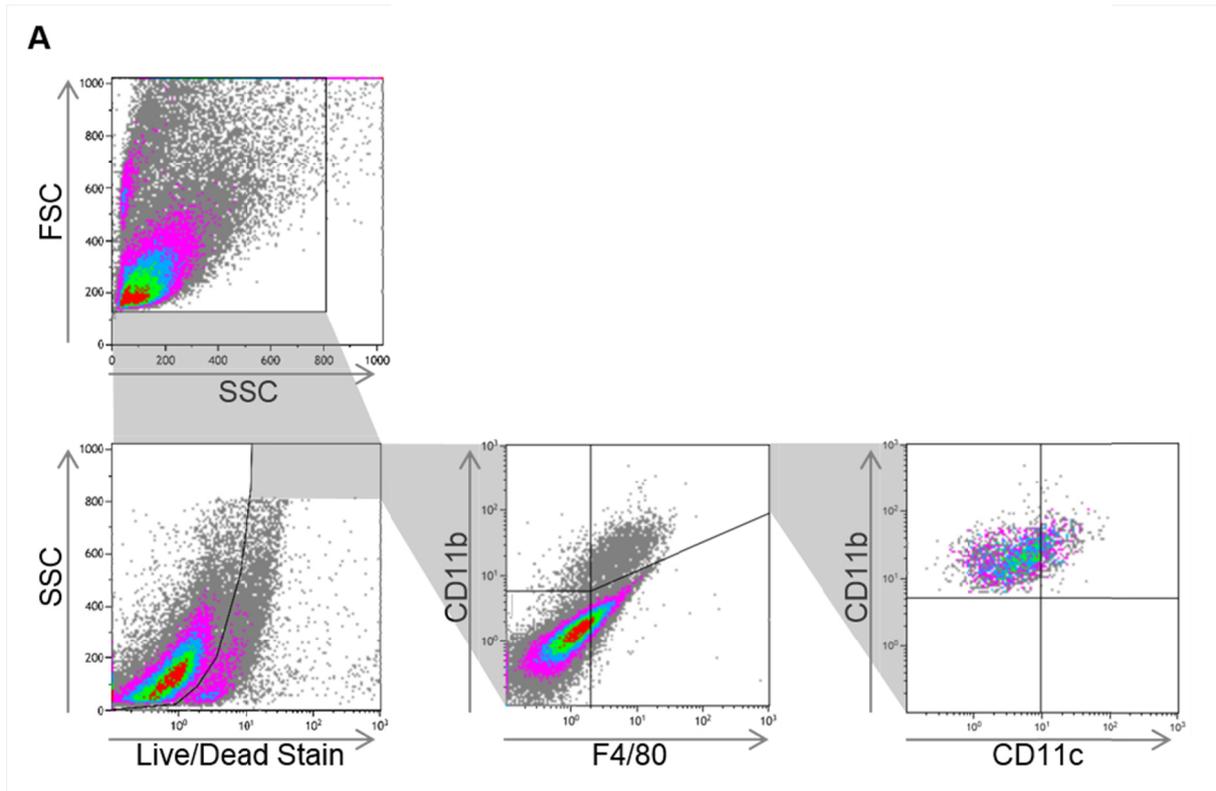
**Tabelle 6. Verwendete Substanzen und Lösungen in der Zellkultur**

<b>Substanz/Lösung</b>	<b>Endkonzentration/Zusammensetzung</b>	<b>Hersteller</b>
Differenzierungscocktail	1 µg/ml Insulin (aus bovinem Pankreas) 0,25 µM Dexamethason 0,5 mM IBMX	alles von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Humanes α-Thrombin	3 U/ml Thrombin	Sekisui Diagnostics, LLC, Stamford, CT, USA
Dabigatran (50 µM)	2,35 mg Dabigatran 50 µl 1M HCl 450 µl destilliertes Wasser 500 µl 0,9 % NaCl → 1:200 in 0,9 %NaCl verdünnt  Eingesetzte Endkonzentration: 500 nM Dabigatran	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH und Co. KG, Biberach/Riß
Poly I:C	20 µg/ml Poly (Inosin:Cytosin)	InvivoGen, San Diego, CA, USA
Hyaluronidase	aus <i>Streptomyces hyalurolyticus</i> 2 U/ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Calcein-AM	10 µg/ml Calcein-Acetoxy-methylester	Calbiochem®, Merck KGaA, Darmstadt
Muriner, rekombinanter Monozytenkolonien-stimulierender Faktor	10 ng/ml M-CSF	PeptoTech, Rocky Hill, NJ, USA
Dispase-Lösung	1 mg/ml Dispase II in DPBS	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Murines, rekombinantes Interferon-γ	10 U/ml IFN-γ	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Lipopolysaccharid	1 µg/ml LPS (aus <i>Salmonella enterica</i> , Serotyp <i>Minnesota</i> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Murines, rekombinantes Interleukin-4	20 ng/ml IL-4	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Murines, rekombinantes Interleukin-5	10 ng/ml IL-5	PeptoTech, Rocky Hill, NJ, USA
Muriner, rekombinanter Granulozyten- Kolonien-stimulierender Faktor	3 ng/ml G-CSF	PeptoTech, Rocky Hill, NJ, USA
Humanes, rekombinantes Interleukin-6	50 ng/ml IL-6	Biomol, Hamburg
Humaner, löslicher IL-6-Rezeptor	50 ng/ml löslicher IL-6-Rezeptor	PeptoTech, Rocky Hill, NJ, USA

## Appendix

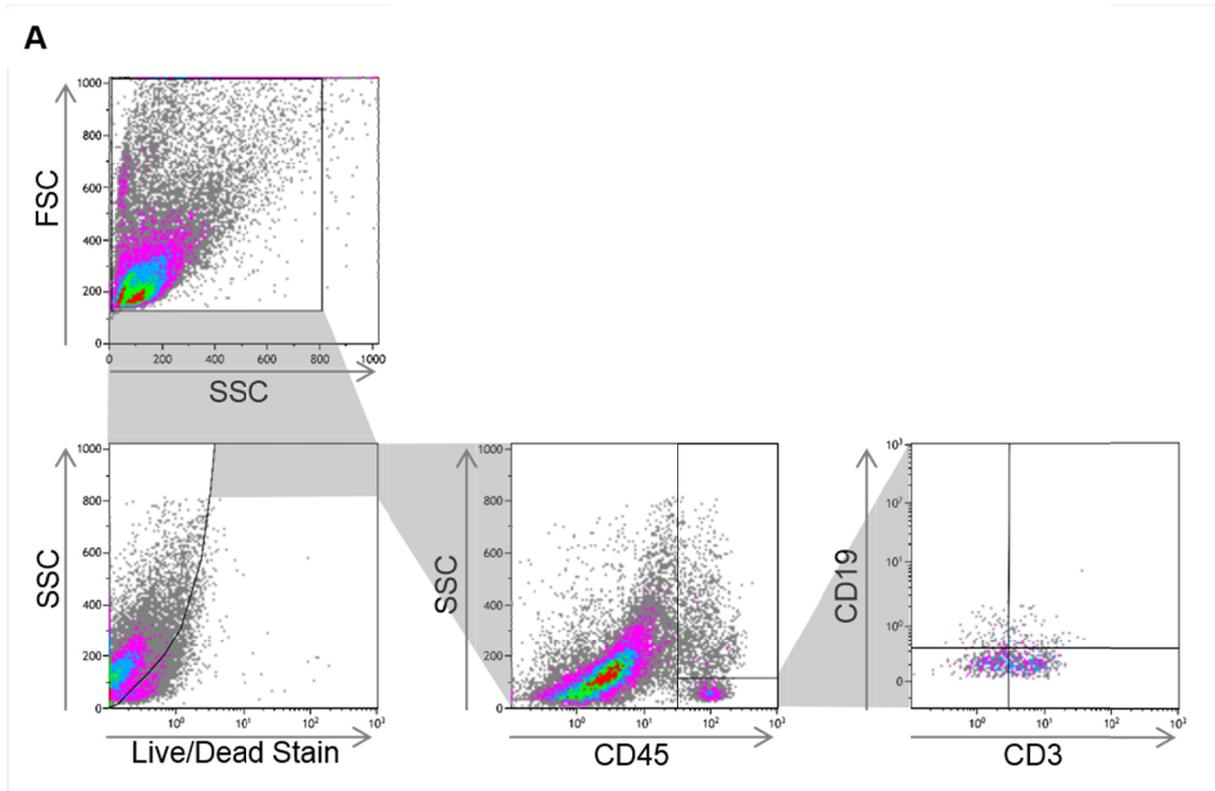
**Tabelle 7. In der Durchflusszytometrie verwendete Puffer und Lösungen**

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Hersteller</b>
Kollagenase D-Lösung	0,153 U/ml Kollagenase D 50 U/ml DNase I 0,5 % BSA in DPBS	beides von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Natriumzitat-Lösung	3,2 % Natriumzitat in destilliertem Wasser (zur Antikoagulation in einer Konzentration von 1:10 eingesetzt)	
Erythrozyten-Lyse-Puffer	155 mM NH <sub>4</sub> Cl 10 mM KHCO <sub>3</sub> 0,1 mM EDTA	
PEB-Puffer	2 mM EDTA 0,5 % BSA in DPBS	
1 % Formalin-Lösung	10 % Roti <sup>®</sup> -Histofix 10 % in PEB-Puffer	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Kollagenase II-Lösung	600 U/ml Kollagenase II 60 U/ml DNase I in <i>Hank's Balanced Salt Solution</i> (HBSS)	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
HBSS	1,26 mM CaCl <sub>2</sub> 0,49 mM MgCl <sub>2</sub> 0,41 mM MgSO <sub>4</sub> 5,3 mM KCl 0,44 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 4,17 mM NaHCO <sub>3</sub> 137,39 mM NaCl 0,34 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5,55 mM Glukose	



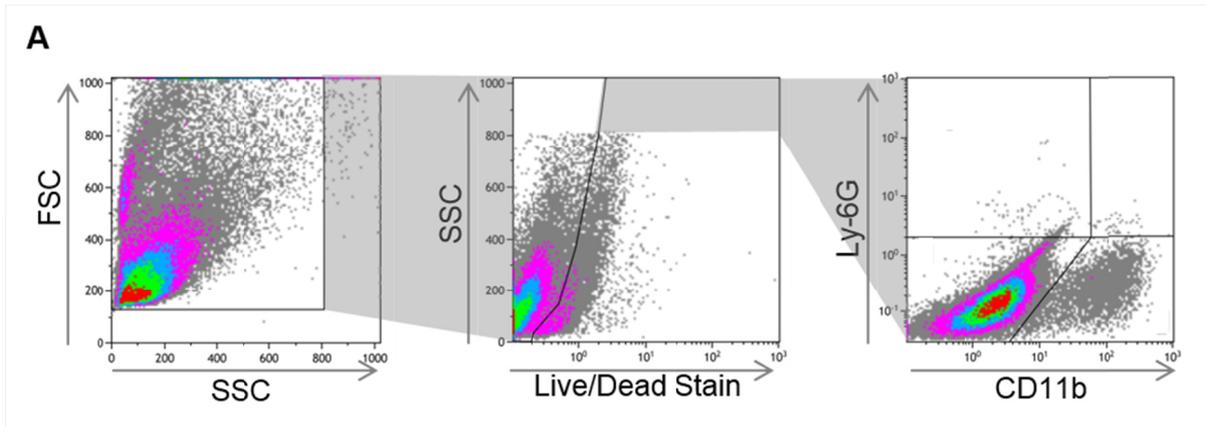
**Abbildung 30. Schema zur durchflusszytometrischen Analyse der Makrophagen im viszeralen Fettgewebe.**

**A** Bei der Analyse der Makrophagenpopulation in den aus viszeralem Fettgewebe isolierten stromal-vaskulären Zellen wurden zunächst die lebenden Zellen ausgewählt. Von diesen dann die  $CD11b^+F4/80^+$  Makrophagen. Eine weitere Unterteilung in entzündliche und anti-entzündliche Makrophagen erfolgte anhand der  $CD11c$ -Expression der  $CD11b^+F4/80^+$  Zellen. Dargestellt sind repräsentative Plots der stromal-vaskulären Zellen eines Placebo-behandelten Tiers. FSC, *forward scatter* (Vorwärtsstreulicht); SSC, *side scatter* (Seitwärtsstreulicht).



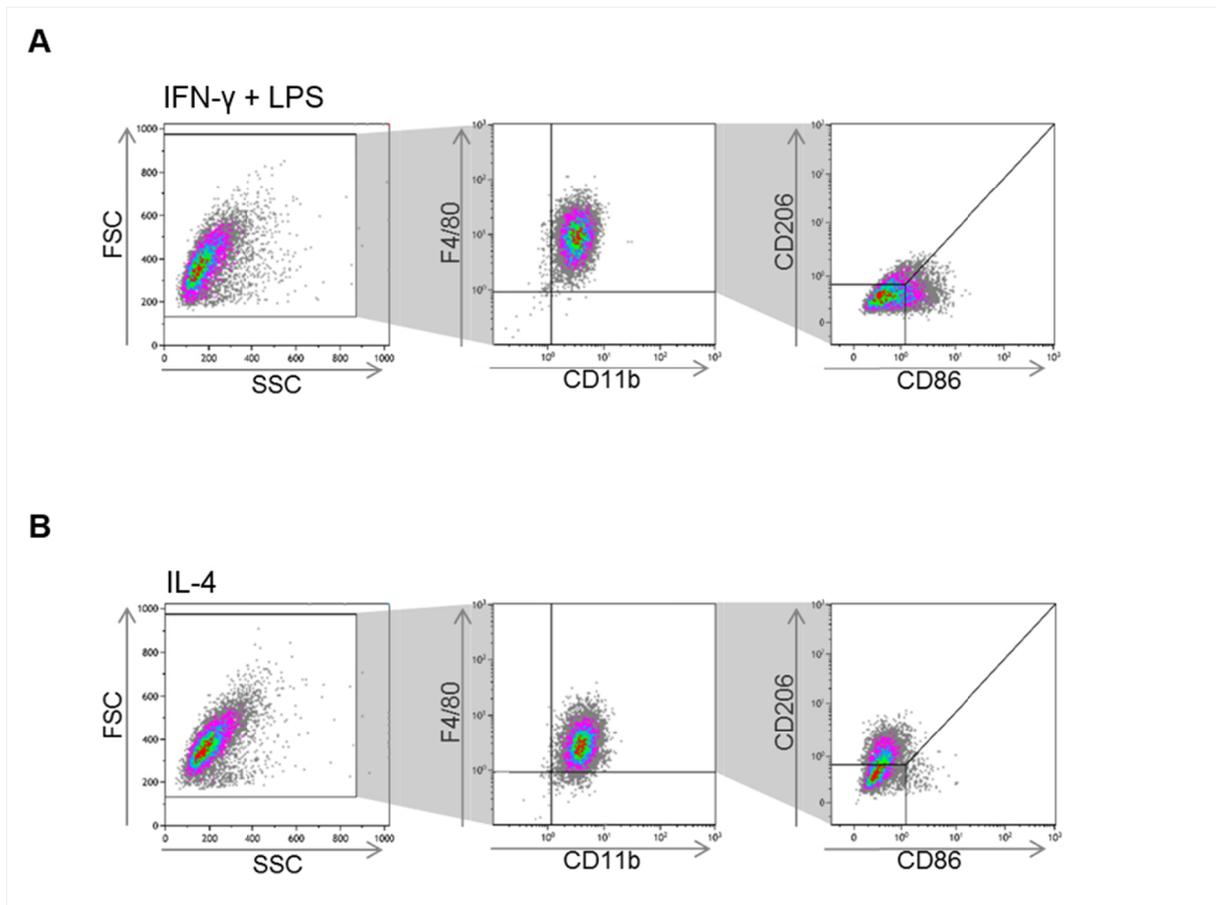
**Abbildung 31. Schema zur durchflusszytometrischen Analyse der Lymphozyten im viszeralen Fettgewebe.**

**A** Bei der Analyse der Leukozyten und Lymphozyten in den aus viszeralem Fettgewebe isolierten stromal-vaskulären Zellen wurden zunächst wieder die lebenden Zellen ausgewählt. Von diesen dann die  $CD45^+$  Leukozyten sowie die Lymphozyten, die  $CD45^+$  und gleichzeitig im SSC wenig granulär sind. Es folgte eine weitere Unterteilung der Lymphozyten in  $CD19^+$  B- und  $CD3^+$  T-Zellen. Dargestellt sind repräsentative Plots der stromal-vaskulären Zellen eines Placebo-behandelten Tiers. FSC, *forward scatter* (Vorwärtsstreulicht); SSC, *side scatter* (Seitwärtsstreulicht).



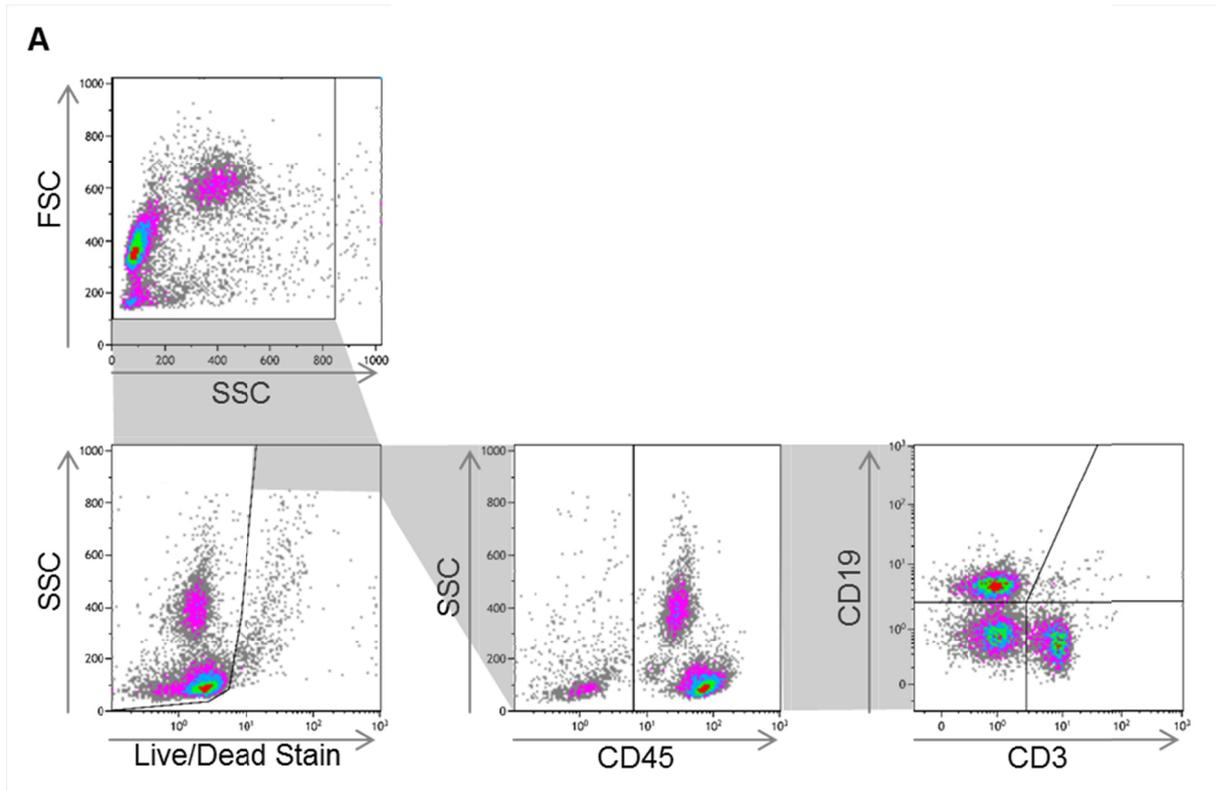
**Abbildung 32. Schema zur durchflusszytometrischen Analyse der Neutrophilen im viszeralen Fettgewebe.**

**A** Bei der Analyse der Neutrophilen in den aus viszeralem Fettgewebe isolierten stromal-vaskulären Zellen wurden zunächst ebenfalls die lebenden Zellen ausgewählt. Von diesen wurden dann die CD11b<sup>+</sup>Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophilen ausgewählt. Dargestellt sind repräsentative Plots der stromal-vaskulären Zellen eines Placebo-behandelten Tiers. FSC, *forward scatter* (Vorwärtsstreulicht); SSC, *side scatter* (Seitwärtsstreulicht).



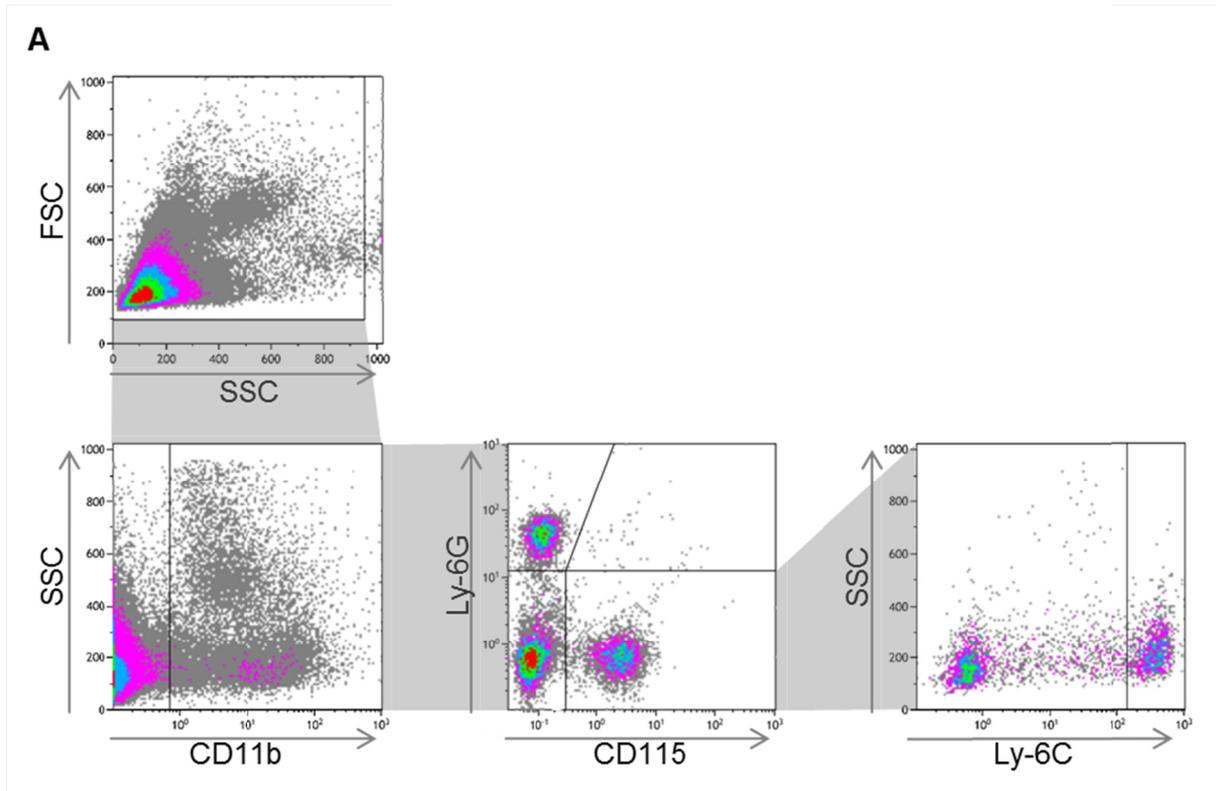
**Abbildung 33. Schema zur durchflusszytometrischen Analyse *in vitro* polarisierter Makrophagen.**

Aus dem Knochenmark isolierte Makrophagen wurden für sieben Tage *in vitro* zu reifen Makrophagen differenziert und anschließend für 24 Stunden mit **A** 10 U/ml IFN- $\gamma$  und 1  $\mu$ g/ml LPS zu CD86<sup>+</sup> M1-Makrophagen oder **B** 20 ng/ml IL-4 zu CD206<sup>+</sup> M2-Makrophagen polarisiert. Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden zunächst die CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> Makrophagen bestimmt und diese dann auf die Expression von CD86 und CD206 untersucht. Dargestellt sind repräsentative Plots IFN- $\gamma$  und LPS (A) sowie IL-4 (B) stimulierter Makrophagen.



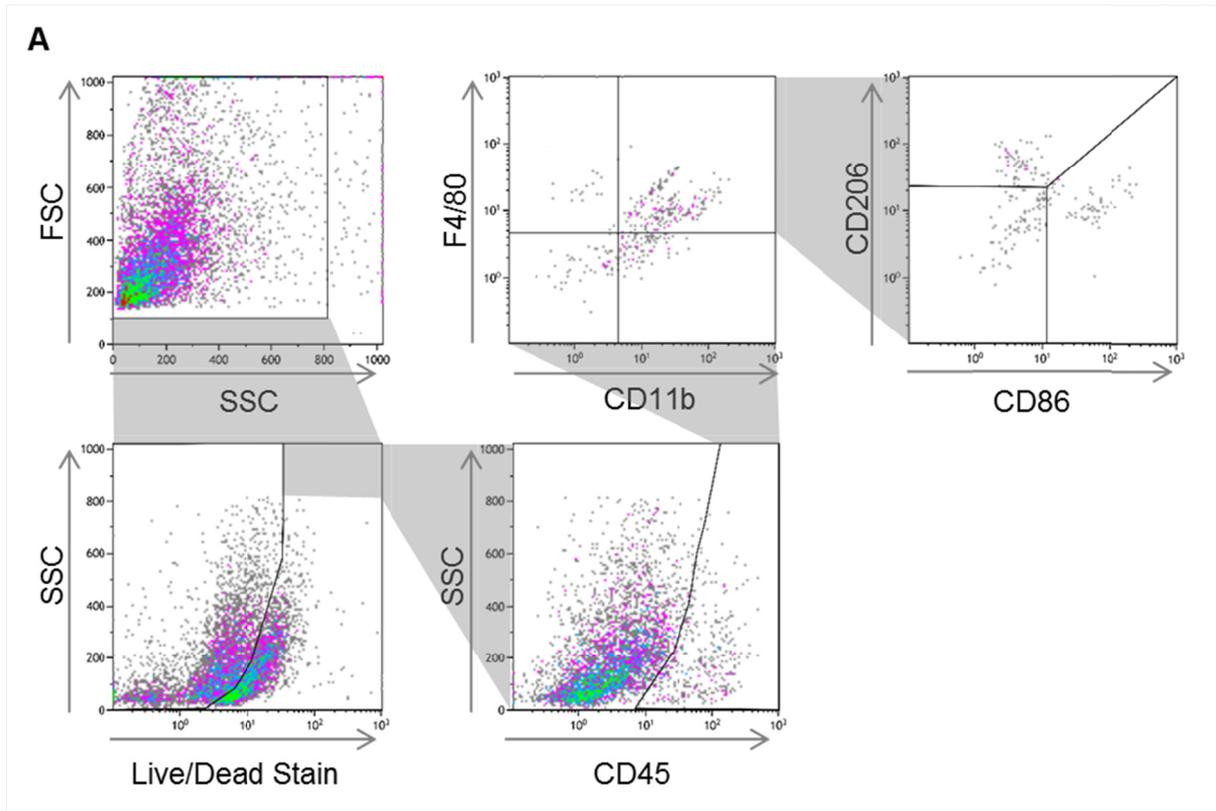
**Abbildung 34. Schema zur durchflusszytometrischen Analyse der Lymphozyten im Blut.**

**A** Bei der Analyse der Leukozyten und Lymphozyten im Blut der Dabigatran- und Placebo-behandelten Tiere wurden zunächst die lebenden Zellen ausgewählt. Von diesen dann die CD45<sup>+</sup> Leukozyten. Es folgte eine weitere Unterteilung der Lymphozyten in CD19<sup>+</sup> B- und CD3<sup>+</sup> T-Zellen. Dargestellt sind repräsentative Plots eines Placebo-behandelten Tiers. FSC, *forward scatter* (Vorwärtsstreulicht); SSC, *side scatter* (Seitwärtsstreulicht).



**Abbildung 35. Schema zur durchflusszytometrischen Analyse der Neutrophilen und Monozyten im Blut.**

**A** Bei der Analyse der Neutrophilen und Monozyten im Blut der Dabigatran- und Placebo-behandelten Tiere wurden zunächst die CD11b<sup>+</sup> Zellen ausgewählt. Von diesen dann die CD11b<sup>+</sup>Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophilen und die CD11b<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup> Monozyten. Es folgte eine weitere Unterteilung der Monozyten in Ly-6C<sup>-</sup> und Ly-6C<sup>+</sup> Monozyten. Dargestellt sind repräsentative Plots eines Placebo-behandelten Tiers. FSC, *forward scatter* (Vorwärtsstreulicht); SSC, *side scatter* (Seitwärtsstreulicht).



**Abbildung 36. Repräsentatives Schema zur durchflusszytometrischen Analyse der Makrophagen in der Aortenwand.**

**A** Bei der Analyse der Makrophagenpopulation in der Aortenwand wurden zunächst die lebenden Zellen ausgewählt. Von diesen dann die zunächst die CD45<sup>+</sup> Leukozyten und dann die CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> Makrophagen. Eine weitere Unterteilung in entzündliche und anti-entzündliche Makrophagen erfolgte anhand der CD86 und CD206-Expression der CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> Zellen. Dargestellt sind repräsentative Plots eines Placebo-behandelten Tiers. FSC, *forward scatter* (Vorwärtsstreulicht); SSC, *side scatter* (Seitwärtsstreulicht).

## Veröffentlichungen

### Originalarbeiten

Grandoch M, **Feldmann K**, Göthert JR, Dick LS, Homann S, Klatt C, Bayer JK, Waldheim JN, Rabausch B, Nagy N, Oberhuber A, Deenen R, Köhrer K, Lehr S, Homey B, Pfeffer K, Fischer JW. Deficiency in lymphotoxin  $\beta$  receptor protects from atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Circ Res.* 2015;116(8):e57-68

Müller J, Gorressen S, Grandoch M, **Feldmann K**, Kretschmer I, Lehr S, Ding Z, Schmitt JP, Schrader J, Garbers C, Heusch G, Kelm M, Scheller J, Fischer JW. Interleukin-6-dependent phenotypic modulation of cardiac fibroblasts after acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 2014;109(6):440

Grandoch M, Melchior-Becker A, Kohlmorgen C, **Feldmann K**, Gowert N, Müller J, Homann S, Kiene LS, Zeng-Brouwers J, Schmitz F, Nagy N, Polzin A, Skroblin P, Yin X, Elvers M, Mayr M, Schaefer L, Tannock L, Fischer JW. Loss of biglycan enhances thrombin generation in ApoE-deficient mice: Implications for inflammation and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* [Manuskript in Revision]

**Feldmann K**, Grandoch M, Kohlmorgen C, Valentin B, Nagy N, Hartwig S, Lehr S, Fischer JW. Decreased proinflammatory macrophage polarization in dabigatran-treated *Low density lipoprotein receptor* knockout mice: Implications for adipose tissue inflammation and vascular disease. [Manuskript in Vorbereitung]

## Kongressbeiträge

**Feldmann K**, Grandoch M, Lehr S, Fischer JW. Thrombin Inhibition by Dabigatran Reduces the Amount of Pro-Inflammatory CD11c-Positive Macrophages in Visceral Adipose Tissue of Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35:A386

**Feldmann K**, Grandoch M, Lehr S, Fischer JW. Dabigatran increases M2/M1-macrophage ratio in visceral adipose tissue of LDL receptor knockout mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (2014) 387 (Suppl 1):S1-S113

# Lebenslauf

## Person

Name: Kathrin Feldmann  
Geburtsdatum: 08. April 1986  
Geburtsort: Arnsberg  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

## Promotion

01/2011 – 02/2016 Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie,  
Universitätsklinikum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Doktorvater: Prof. Dr. Jens W. Fischer

Thema: „Einfluss einer Thrombininhibition durch Dabigatran auf  
Entzündungsprozesse im Rahmen von Übergewicht und  
Atherosklerose“

## Studium

11/2010 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung und  
Approbation als Apothekerin  
05/2010 – 10/2010 Praktische Ausbildung  
„Apotheke in den Arkaden“, Köln  
11/2009 – 04/2010 Praktische Ausbildung  
Apotheke des Klinikums der Universität zu Köln  
10/2009 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
09/2007 Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
08/2005 – 09/2009 Studium der Pharmazie  
Philipps-Universität Marburg

## Schulbildung

06/2005 Abitur  
Städtisches Franz-Stock-Gymnasium Arnsberg

Köln, den 16.02.2016

## Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jens W. Fischer dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gab diese Arbeit unter seiner Betreuung zu verfassen. Für das entgegengebrachte Vertrauen bin ich sehr dankbar. Bedanken möchte ich mich auch für die konstruktiven und motivierenden Gespräche zu diesem Projekt sowie die Ermöglichung der Teilnahme an den „Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2015 Scientific Sessions“ in San Francisco.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Maria Grandoch für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit. Die interessanten fachlichen Diskussionen sowie die offene und vertrauensvolle Zusammenarbeit haben entscheidend zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen. Vielen Dank auch für ein stets offenes Ohr alle Zweifel und Unsicherheiten betreffend und für die ermutigenden Gespräche.

Danken möchte ich auch Birte Valentin für die ausgiebige Beschäftigung mit der Optimierung der Auswertung der Fettzellgrößen sowie Dr. Stefan Lehr und Dr. Sonja Hartwig für die Durchführung der Multiplex-Messungen und Irmhild Rüter für die ELISA-Messungen.

Besonders danken möchte ich Christina Kohlmorgen für ihre stets hilfsbereite Art und die zuverlässige und kompetente Unterstützung bei vielen Gelegenheiten, auf die ich mich immer verlassen konnte. Auch meinen anderen langjährigen Mitdoktoranden Goran Pavic, Inga Kretschmer, Julia Müller, Nina Pasch, Lena Kiene, Julia Maier und Alexandra Schütze möchte ich für Ihre Unterstützung und viele schöne Erlebnisse danken. Dieser Dank gilt auch allen anderen Kolleginnen und Kollegen, die durch ihre hilfsbereite, freundliche und humorvolle Art für ein sehr schönes und angenehmes Arbeitsklima gesorgt haben.

Ein großer Dank gilt auch Kerstin Freidel, die mir ganz besonders in meiner Anfangszeit viel beigebracht hat und auch in den folgenden Jahren immer eine große Hilfe war. Auch Petra Rompel, Bärbel Reupert, Annika Zimmermann, Kirsten Bartkowsky und Beate Weyrauther möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung danken.

Auch an Erika Lohmann ein großes Dankeschön für die immer kompetente und freundliche Unterstützung in allen Belangen. Dank gebührt auch Karin Montag, für Ihre Geduld, die vielen „eiligen“ Bestellungen betreffend.

Ganz besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei Ralf Kitz für sein Verständnis, seine Geduld und seinen Zuspruch während der letzten Jahre. Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich von Herzen für ihr Verständnis, ihren Rückhalt und ihre bedingungslose Unterstützung.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit nur an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt habe.

Düsseldorf, den 19.02.2016

Kathrin Feldmann