

Aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Axel Gödecke

Der Effekt von Insulin-like growth factor 1 und Insulin auf die Polarisierung von Makrophagen

Dissertation

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

vorgelegt von
Lisa Pogge-von Strandmann
2022

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Norbert Gerdes

Zusammenfassung (deutsch)

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Polarisierungsverhalten von Makrophagen und wie sich IGF1 und Insulin auf dieses auswirken.

IGF1 ist ein anaboles Hormon mit einer großen strukturellen Ähnlichkeit zu Insulin. In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass IGF1 positive Effekte auf die Regeneration nach Myokardinfarkt hat, indem es Makrophagen zu einem antiinflammatorischen M2-ähnlichen Phänotyp polarisiert. Um diesen Effekt genauer zu verstehen und zu evaluieren, ob er IGF1-spezifisch ist, werden in dieser Arbeit die Effekte von IGF1 und Insulin auf die Makrophagen-Polarisierung untersucht und verglichen.

Knochenmarkmakrophagen wurden aus Tibia- und Femurknochen von Mäusen isoliert, mit 10 ng/ml M-CSF (Makrophagenkolonien stimulierendem Faktor) kultiviert und mit oder ohne IGF1 oder Insulin behandelt. Mittels qPCR, Western Blot, Durchflusszytometrie und *next generation sequencing* wurden die entstandenen Phänotypen analysiert und die Expression typischer Marker des M2-Phänotyps untersucht. Mit IL4 und IL13 behandelte Makrophagen wurden als positive M2-Phänotyp Kontrolle verwendet.

In der qPCR-Analyse zeigte sich eine Hochregulation M2-Marker-Gene *Mrc1*, *Arg1* und *Retnla* in den IGF1-behandelten, aber nicht in den Insulin-behandelten Makrophagen. Passend zu diesen Ergebnissen zeigte sich in den Western Blot-Analysen Phosphorylierung von STAT6 und in der Durchflusszytometrie eine vermehrte CD206 (MRC)-Expression, jeweils nach IGF1- aber nicht nach Insulin-Behandlung.

Während IGF1 Makrophagen zu einem M2-ähnlichen Phänotyp polarisiert, zeigen die vorliegenden Ergebnisse diesen Effekt für Insulin nicht. Insulin scheint ebenfalls einen antiinflammatorischen Makrophagentyp zu induzieren, der sich aber von den IGF1-polarisierten Makrophagen deutlich unterscheidet. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass IGF1 und Insulin trotz ihrer großen Ähnlichkeit unterschiedliche Effekte auf die Makrophagen-Polarisierung haben. Außerdem deuten die Untersuchungen auf Transkriptionsebene darauf hin, dass die IGF1-Polarisierung nicht nur einen M2-ähnlichen Phänotyp in Makrophagen hervorruft, sondern auch über ähnliche Signaltransduktionswege abläuft wie die typische M2-Polarisierung und nicht über klassische IGF1/Insulin abhängige Signalwege.

Zusammenfassung (englisch)

This thesis deals with macrophage polarization and how the hormones IGF1 and insulin affect it.

IGF1 is an anabolic hormone with a highly similar molecular structure to insulin. Previous studies have shown that IGF1 improves cardiac function after myocardial infarction through driving macrophage polarization towards an anti-inflammatory M2-like phenotype. To understand this effect and evaluate if it is IGF1 specific this study investigates and compares the effects of IGF1 and insulin on macrophage polarization.

Bone marrow derived macrophages were isolated from mice, cultivated with macrophage colony-stimulating factor (10 ng/ml) and treated with or without IGF1 or insulin. QPCR, western blot, flow cytometry and next generation sequencing were performed to analyze the emerged phenotypes and the expression of M2-phenotype markers. Cells treated with IL4 and IL13 were used as a positive M2-phenotype control.

In qPCR analysis the M2-marker-genes *Mrc1*, *Arg1* and *Retnla* were upregulated in IGF1 treated but not in insulin treated macrophages. In line with these results the western blot analysis showed upregulation of phosphorylated STAT6 and the flow cytometry upregulation of CD206 (MRC) both after IGF1 but not after insulin treatment.

While IGF1 is driving macrophage polarization towards an M2-like phenotype the results are not showing this effect after insulin stimulation leading to the conclusion that IGF1 and insulin are affecting macrophage polarization differently. The Insulin-induced macrophages display anti-inflammatory properties which are different from the IGF1-polarized macrophages. However, the IGF1-dependent induction of the M2-like phenotype seems to be specific for IGF1 and not shared by insulin. Additionally, the analysis on transcription level indicates that IGF1-treatment not only induces an M2-like phenotype in macrophages, but also uses similar pathways as the M2-polarisation rather than canonical IGF1 targets.

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin	NaCl	Natriumchlorid
Abb	Abbildung	NO	Stickstoffmonoxid
APS	Ammoniumperoxodisulfat	NUDC	<i>nuclear Distribution C</i>
Arg1	Arginase1	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
ATP	Adenosintriphosphat	PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
BCA	Bicinchoninsäure	PPI	Proteinase/ Phosphatase- Inhibitor
BSA	Bovines Serumalbumin	qPCR	quantitative Polymerase- Kettenreaktion
ca.	circa	RAF	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
cDNA	kodierende DNA	RNA	Ribonukleinsäure
CO₂	Kohlenstoffdioxid	Rpm	<i>rounds per minute</i>
dNTP	Nukleosidtriphosphat	RPKM	<i>Reads per kilobase of transcript per Million mapped reads</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>	Rrelm-α	<i>resistin-like molecule alpha</i>
DTT	Dithiothreitol	S	siehe
EDTA	Ethylendinitrilotetraessig- säure	SDS	Natriumdodecylsulfat
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>	STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
FBS	Fetales Kälberseru	TBS	<i>Tris-buffered Saline</i>
IFN-γ	Interferon gamma	TBS-T	<i>Tris-buffered Saline + Tween</i>
IGF1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>	Temed	Ammoniumperoxodisulfat
IL	Interleukin	TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
iNOS	Induzierbare NO-Synthase	TOR	<i>target of rapamycin</i>
IRS	<i>insulin receptor substrate</i>	Tris	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan
LPS	Lipopolysaccharid		
M-CSF	Makrophagenkolonien stimulierender Faktor		
MAPK	<i>mitogen-activated protein- kinase</i>		
MRC	Mannose-Rezeptor		

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Makrophagen	1
1.1.1	Bildung und Funktion	1
1.1.2	Subtypen	1
1.1.3	Makrophagen im Myokardinfarkt.....	3
1.2	Insulin-like growth factor 1	5
1.2.1	Regulation und Bildung.....	5
1.2.2	Struktur und Signaltransduktion	5
1.2.3	Funktion.....	6
1.2.4	Effekte auf Myokard-Regeneration	7
1.3	Insulin	8
1.3.1	Regulation und Bildung.....	8
1.3.2	Struktur und Signaltransduktion – Vergleich mit IGF1	8
1.3.3	Funktion – Vergleich mit IGF1	10
1.4	Vorarbeiten	10
1.5	Ziele der Arbeit	11
2	Material und Methode	13
2.1	Geräte.....	13
2.2	Verbrauchsmaterialien.....	14
2.3	Tiere	15
2.4	Chemikalien.....	15
2.5	Kulturmedien	17
2.5.1	Makrophagen-Kultivierungsmedium.....	17
2.5.2	Makrophagen-Polarisierungsmedium.....	17
2.5.3	Makrophagen-Hungermedium.....	17
2.6	Lösungen und Puffer	18
2.7	Acrylamid-Gele	18
2.8	Antikörper	19
2.8.1	Antikörper für die Western Blot-Analyse.....	19
2.9	Kits	19
2.10	Software	20
2.11	Makrophagen	20
2.11.1	Isolation und Kultivierung von Makrophagen	20
2.11.2	Weitere Behandlung der Makrophagen	21
2.12	qPCR.....	22
2.12.1	Isolation von RNA	22
2.12.2	Reverse Transkription.....	23
2.12.3	Quantitative Realtime PCR.....	24
2.13	Durchflusszytometrie.....	25
2.14	Analyse auf Proteinebene	26
2.14.1	Erstellen von Proteinlysaten	26
2.14.2	Western Blot	27
2.15	Zellsortierung und Sequenzierung.....	28
2.15.1	Durchflusszytometrische Zellsortierung	28
2.15.2	RNA-Isolation.....	29

2.15.3	Sequenzierung.....	29
2.16	Statistische Auswertung	29
3	Ergebnisse	31
3.1	Morphologie der Makrophagen.....	31
3.2	Einfluss verschiedener Polarisierungsprotokolle auf die Genexpression	33
3.2.1	Die Expression von M1-Marker-Genen in Makrophagen ändert sich nach Behandlung mit IGF1 und Insulin nicht	33
3.2.2	IGF1, aber nicht Insulin induziert die Expression von M2-Marker-Genen in Makrophagen..	35
3.3	Durchflusszytometrische Untersuchungen: Die Expression des M2 Markers CD206 ist auf Makrophagen nach IGF1 Behandlung nachweisbar	37
3.3.1	Expression von CD38	40
3.3.2	Expression von CD206	41
3.4	Western Blots: Die Behandlung mit IGF1 induziert phosphoSTAT6	44
3.5	Zellsortierung und Sequenzierung: IL4- und IGF1 zeigen auf Transkriptions-Ebene identische Effekte	46
1	Diskussion.....	52
1.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	52
1.2	Der Effekt von IGF1 auf die Makrophagen-Polarisierung	53
1.2.1	IGF1 induziert in Makrophagen einen M2-Phänotyp	53
1.2.2	Mechanismen der IGF1-abhängigen Makrophagen-Polarisierung: Die Rolle von STAT6.....	54
1.2.3	Die IGF1-abhängige Makrophagen-Polarisierung als sich selbst verstärkender Effekt	55
1.2.4	Mechanismen der IGF1-abhängigen Makrophagen-Polarisierung: Transkriptionsanalysen ...	56
1.3	Der Effekt von Insulin auf die Makrophagen-Polarisierung	57
1.4	Bedeutung.....	59
1.5	Ausblick	60
2	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	62
3	Danksagung.....	69

1 Einleitung

1.1 Makrophagen

1.1.1 Bildung und Funktion

Makrophagen zählen zu den Leukozyten und sind Zellen der angeborenen Immunabwehr. Man unterscheidet ortsunabhängige Makrophagen und organspezifische, ortsansässige Makrophagen. Ortsunabhängige Makrophagen entwickeln sich aus Monozyten (Volkman and Gowans, 1965). Nach ihrer Bildung im Knochenmark zirkulieren diese im Blutkreislauf. Im Rahmen von Entzündungsprozessen können sie in das betroffene Gewebe einwandern und zu Makrophagen differenzieren (van Furth and Cohn, 1968, Van Furth et al., 1973).

Zu den Funktionen von Makrophagen zählen das Erkennen von Mikroorganismen, entarteten oder gealterten körpereigenen Zellen und anderen Fremdkörpern, welche durch Phagozytose eliminiert werden. Über die Präsentation von Antigenen auf den an ihrer Oberfläche befindlichen MHC-II-Molekülen sind Makrophagen in der Lage mit CD4-positiven T-Helfer-Zellen in Kontakt zu treten und so die adaptive Immunantwort zu aktivieren. Durch die Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen sind sie an Entzündungsprozessen beteiligt. In der Endphase einer Entzündung tragen Makrophagen auch zu Narbenbildung und Neoangiogenese bei (van Furth et al., 1972, Albrecht and Hong, 1976).

Monoklonale Antikörper wie der F4/80-Antikörper binden an Oberflächenantigene von Makrophagen und können zu ihrer Identifikation genutzt werden (Austyn and Gordon, 1981).

1.1.2 Subtypen

Makrophagen lassen sich durch verschiedene Stimuli zu unterschiedlichen Phänotypen polarisieren. Bei den *in vitro* differenzierten Makrophagen-Subtypen werden zwei Hauptgruppen unterschieden. Dabei handelt es sich einerseits um M1-Makrophagen, die auch als klassisch aktivierte Makrophagen bezeichnet werden, und andererseits M2-Makrophagen, oder alternativ aktivierte Makrophagen. Diese beiden Gruppen stellen

allerdings nur die extremsten Formen der Makrophagen-Phänotypen dar. Die Makrophagen-Population ist breit gefächert, und es ist ein weites Spektrum verschiedener Subtypen bekannt (Ginhoux et al., 2016, Mosser and Edwards, 2008, Martinez and Gordon, 2014). Das im Folgenden dargestellte sogenannte M1-M2-Paradigma (Abb. 1) wurde von verschiedenen Autoren als eine vereinfachte Modellvorstellung beschrieben (Ginhoux et al., 2016, Mosser and Edwards, 2008, Martinez and Gordon, 2014).

Die klassische Aktivierung von Makrophagen zum M1-Phänotyp wird unter anderem durch Lipopolysaccharide, die auf der Zellmembran gramnegativer Bakterien zu finden sind, und immunstimulierende Zytokine wie IFN- γ vermittelt (Nathan et al., 1983). Der durch IFN- γ induzierte Signalweg beinhaltet die Aktivierung von STAT1 (Martinez and Gordon, 2014). M1-Makrophagen sind typisch für die frühe Phase einer Entzündung und haben proinflammatorische Wirkungen. Sie zeichnen sich durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL6 und IL12 und die Produktion von NO aus und haben phagozytäre und bakterizide Aktivität. Sie sind mit der Abwehr akuter Infektionen assoziiert (Hesketh et al., 2017, Benoit et al., 2008).

M2- oder auch alternativ aktivierte Makrophagen erscheinen in der Spätphase einer Entzündung. Sie werden unter anderem durch antiinflammatorische Zytokine wie IL4 und IL13 (Doyle et al., 1994, Stein et al., 1992), apoptotische Zellen und Parasiten induziert. Sie sind allgemein als antiinflammatorisch und proregenerativ bekannt und tragen zu Wundheilung und Geweberegeneration bei (Roszer, 2015).

Zu den klassischen Markern des M2-Phänotyps gehören das Harnstoffzyklus-Enzym Arginase (Corraliza et al., 1995, Munder et al., 1998), der Mannose-Rezeptor (auch CD206) (Stein et al., 1992, DeFife et al., 1997), und das Protein Relm- α (auch Fizz1) (Raes et al., 2002, Loke et al., 2002). STAT6 ist ein Schlüsselprotein in dem IL4/IL13-abhängigen Aktivierungsweg des M2-Makrophagen (Rutschman et al., 2001, Takeda et al., 1996).

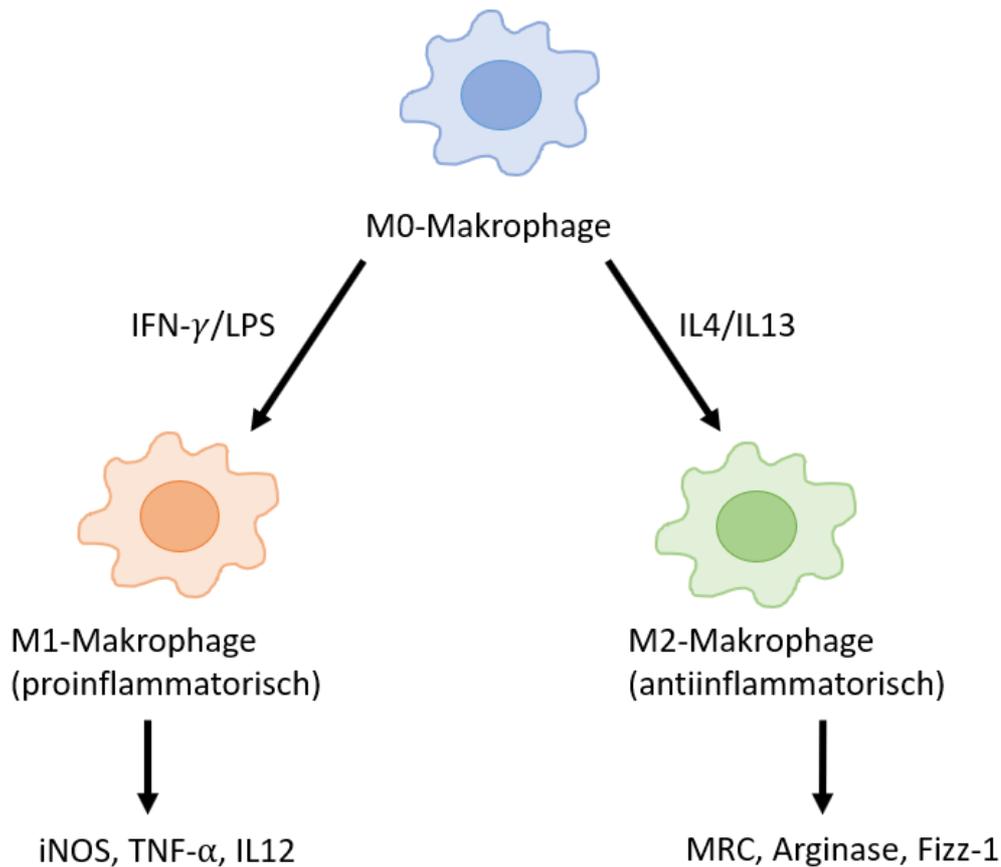


Abb. 1 Das M1-M2-Paradigma der Makrophagen-Polarisierung In der Modell-Vorstellung des M1-M2-Paradigmas wird zwischen zwei Phänotypen unterschieden, zu denen der M0-Makrophage polarisiert werden kann. LPS und IFN- γ induzieren den proinflammatorischen M1-Phänotyp. IL4 und IL13 induzieren den antiinflammatorischen M2-Phänotyp. Es werden klassische Marker der beiden Phänotypen dargestellt.

1.1.3 Makrophagen im Myokardinfarkt

Neben anderen Immunzellen sind Makrophagen maßgeblich an den Reparaturprozessen und der Regeneration des Herzmuskels nach einem Myokardinfarkt beteiligt. So führt die Depletion von Makrophagen im Tiermodell zu einer höheren Sterblichkeit 30 Tage nach Myokardinfarkt, sowie negativen Effekten auf Infarktgröße, linksventrikuläre Gewebeumbauprozesse und Herzfunktion (Ben-Mordechai et al., 2013).

Nach einem Myokardinfarkt kommt es initial zum Untergang von Kardiomyozyten, gefolgt von einer akuten inflammatorischen Reaktion. Durch Stimuli wie nekrotische Herzmuskelzellen, Zytokine und Chemokine wird die angeborene Immunabwehr aktiviert und Immunzellen werden zum Infarktgebiet rekrutiert. Hierbei kommt es zunächst durch neutrophile Granulozyten vermittelt zu einem Fortschreiten des Zellsterbens und einer Vergrößerung des Infarktgebiets (Chen and Frangogiannis, 2017).

Im weiteren Verlauf wandern vermehrt Makrophagen in das Infarktgebiet ein, wobei diese eine Heterogenität ihrer Phänotypen zeigen. Es werden in den ersten 1 - 3 Tagen nach einem Myokardinfarkt vornehmlich proinflammatorische M1-Makrophagen beobachtet, während nach 5 Tagen die antiinflammatorischen M2-Makrophagen vorherrschen (Yan et al., 2013). So lassen sich bei den Geschehnissen nach einem Myokardinfarkt zwei Makrophagenwellen beschreiben, wobei die erste von M1-Makrophagen dominiert ist, welche an der Phagozytose von Zelldebris und Matrixfragmenten, sowie dem weiteren Fortschreiten von Entzündung und Gewebeuntergang beteiligt sind. Später ist die Einwanderung einer zweiten Makrophagenwelle und damit ein Wechsel des Phänotyps zu antiinflammatorischen Makrophagen zu beobachten, die Charakteristika des alternativ aktivierten M2-Makrophagen aufweisen. Diese führen zur Beendigung der Entzündungsprozesse und induzieren Gewebeumbau und die Bildung einer stabilen, kollagenreichen Narbe, die das tote Myokard ersetzt und die ventrikuläre Wand stabilisiert (Ma et al., 2016, Troidl et al., 2009).

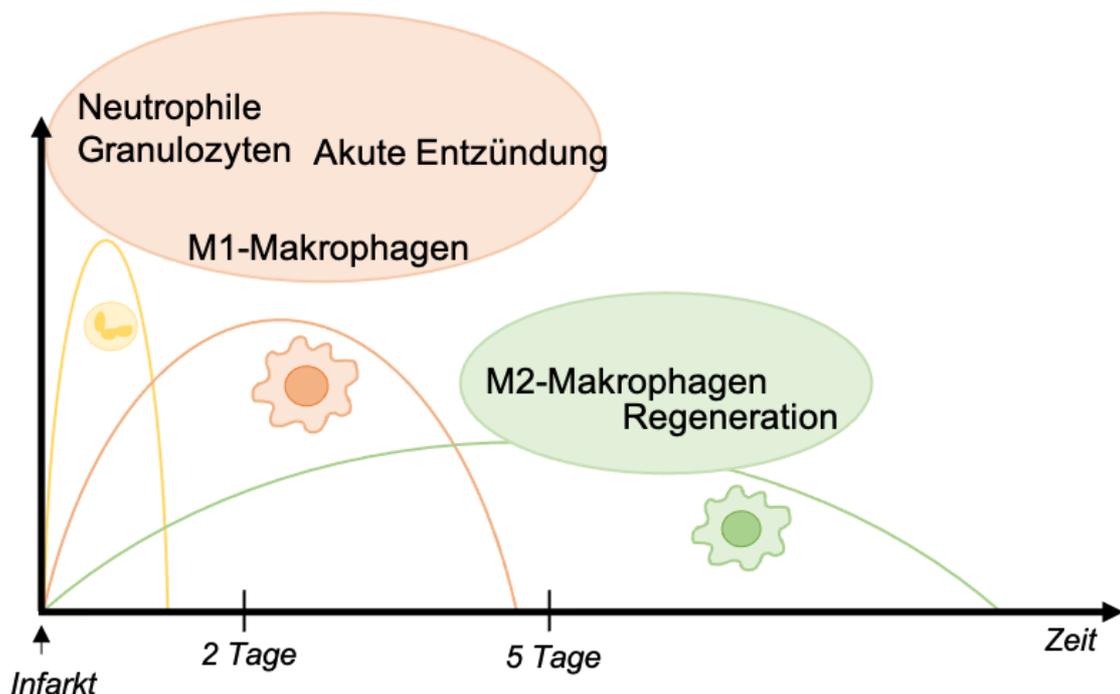


Abb. 2 Dynamik von Immunzellen nach Myokardinfarkt Immunzellen spielen eine wichtige Rolle in den Prozessen nach einem Myokardinfarkt. Unmittelbar nach einem Infarkt bilden neutrophile Granulozyten die größte Immunzell-Gruppe. In den nachfolgenden Tagen wandern vermehrt Makrophagen in das Infarktgebiet ein, wobei zunächst M1-Makrophagen dominieren. Im Verlauf kommt es zu einem Wechsel des vorherrschenden Makrophagen-Phänotyps zu antiinflammatorischen M2-Makrophagen.

1.2 Insulin-like growth factor 1

IGF1 ist ein anaboles Hormon, welches hauptsächlich in der Leber synthetisiert wird und eine wichtige Rolle in der Wachstumsphase eines Organismus spielt.

1.2.1 Regulation und Bildung

80 % des IGF1 im menschlichen Körper werden als endokrines Hormon in der Leber synthetisiert (Yakar et al., 1999). Extrahepatische Syntheseorte sind Zielorgane wie Skelettmuskel, Knochen, Gehirn und die Reproduktionsorgane. Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass das extrahepatisch produzierte IGF1 autokrine und parakrine Wirkungen hat (Daughaday and Rotwein, 1989). Die Synthese unterliegt der Regulation durch das in der Hypophyse gebildete Somatotropin, welches wiederum in Abhängigkeit des hypothalamischen Somatoliberins gebildet wird (Pollak et al., 2004).

98-99 % des Serum-IGF1 liegen in Komplexen mit spezifischen IGF1-Bindeproteinen vor. Dabei handelt es sich um eine Gruppe von hochaffinen, an IGF1 bindenden Transportproteinen, die die Bioverfügbarkeit und Aktivität von IGF1 modulieren. 80 % des IGF1 liegt an das IGF1-Bindeprotein IGF-BP-3 gebunden vor (Jones and Clemmons, 1995, Baxter, 2000).

1.2.2 Struktur und Signaltransduktion

IGF1 ist ein 7649 Dalton schweres Polypeptid, welches aus 70 Aminosäuren besteht und drei Disulfidbrücken enthält (Rinderknecht and Humbel, 1978).

Die intrazelluläre Signaltransduktion von IGF1 wird größtenteils durch den IGF1-Rezeptor vermittelt. Dabei handelt es sich um einen transmembranären Tyrosinkinase-Rezeptor bestehend aus zwei α - und zwei β -Untereinheiten. Durch Bindung von IGF1 an die extrazellulär gelegenen α -Untereinheiten erfolgt eine ATP-abhängige Autophosphorylierung der ins Cytosol reichenden β -Untereinheiten an den Tyrosinen 1131, 1135 und 1136 (Ullrich et al., 1986, Jacobs et al., 1983, Riedemann and Macaulay, 2006).

Im Folgenden kommt es zu weiteren Autophosphorylierungen des Rezeptors an juxtamembranären Tyrosinen und carboxyterminalen Serinen und zur Rekrutierung, sowie Phosphorylierung spezifischer Zielproteine, zu denen IRS-1 und Shc zählen. Distal werden zahlreiche Signalwege aktiviert. So zählt zu den *downstream*-Zielen von IRS-1 unter anderem das Protein PI3K, woraus die Aktivierung des PI3K-AKT-mTOR-Signalwegs

resultiert. Über die Phosphorylierung von Shc wird unter anderem der RAS-RAF-MEK-ERK-Weg aktiviert, der in der Beeinflussung nukleärer Transkriptionsfaktoren mündet. (Pollak et al., 2004, LeRoith et al., 1995).

Neben der Bindung an den IGF1-Rezeptor ist IGF1 fähig mit geringerer Affinität an strukturell verwandte Rezeptoren zu binden. Dazu gehört der Insulin-Rezeptor, an den IGF1 mit einer in Relation zu Insulin etwa 100-fach geringeren Affinität bindet (De Meyts et al., 1995). In Zellen, die sowohl den IGF1-Rezeptor als auch den Insulin-Rezeptor exprimieren besteht die Möglichkeit der Bildung eines Hybridrezeptors. Dieser besteht aus je einer α - und einer β -Untereinheit des IGF1-Rezeptors und des Insulin-Rezeptors (Pandini et al., 1999, Riedemann and Macaulay, 2006).

1.2.3 Funktion

IGF1 und der IGF1-Rezeptor sind im menschlichen Organismus ubiquitär vorhanden und haben verschiedene wachstumsfördernde Funktionen (Humbel, 1990).

Zu den wichtigsten Funktionen zählt die Stimulation des Knochen- und Muskelwachstums. IGF1 vermittelt den Großteil der wachstumsstimulierenden Effekte von Somatotropin. Es spielt eine große Rolle in der Wachstumsphase des Organismus, sowie der Organentwicklung und hat wachstumsfördernde Effekte auf fast alle Körperzellen (Baserga et al., 2003). Unter anderem ist es an der Entwicklung des zentralen Nervensystems und der Reproduktionsorgane beteiligt (Jones and Clemmons, 1995, Pollak et al., 2004). So zeigen Mäuse mit Deletionen des IGF1- oder IGF1-Rezeptor-Gens Störungen wie ein reduziertes Geburtsgewicht, Hypoplasie der Skelettmuskulatur und Unfruchtbarkeit (Baker et al., 1993, Baker et al., 1996). Auch als Krankheitsbild im Menschen führt IGF1-Mangel zu Störungen von Wachstum und Entwicklung (Woods et al., 1996).

Auf zellulärer Ebene induziert IGF1 in fast allen Zelltypen Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung und inhibiert Apoptose. Es bestehen Zusammenhänge zwischen IGF1 und der Entstehung von Neoplasien (Pollak et al., 2004, Khandwala et al., 2000).

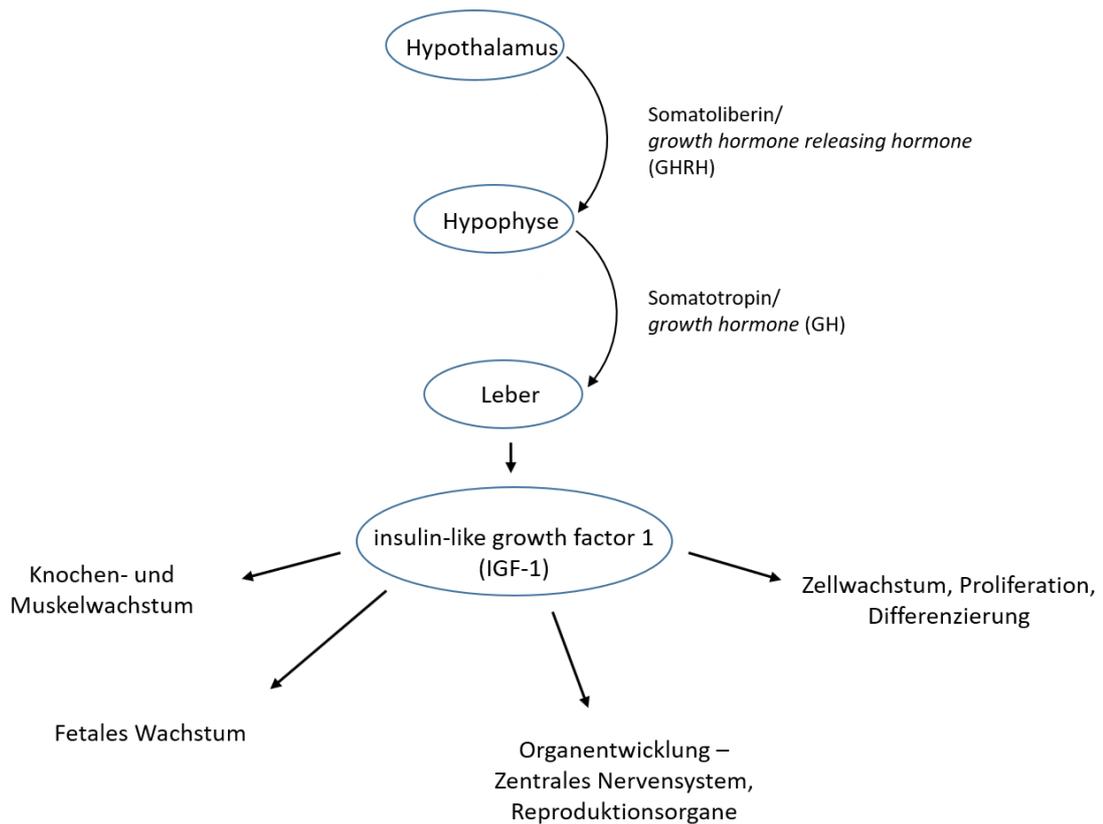


Abb. 3 Bildung und Funktion von IGF1 IGF1 wird in Abhängigkeit von den Hormonen Somatoliberin und Somatotropin der Hypothalamus-Hypophysen-Achse in der Leber gebildet. Zu den zahlreichen Funktionen von IGF1 zählen die Stimulation von Knochen- und Muskelwachstum, fetalem Wachstum, die Entwicklung verschiedener Organe, sowie Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung.

1.2.4 Effekte auf Myokard-Regeneration

Es bestehen verschiedene Hinweise darauf, dass IGF1 positive Einflüsse auf die kardialen Regenerationsprozesse nach einem Myokardinfarkt hat.

Im Menschen zeigen epidemiologische Daten eine inverse Korrelation zwischen dem IGF1-Plasmaspiegel und dem Auftreten von koronarer Herzkrankheit (Juul et al., 2002). Ebenso zeigt sich eine solche inverse Korrelation zwischen dem IGF1-Plasmalevel nach stattgefundenem Myokardinfarkt und der Gesamtmortalität, sowie dem Risiko eines Myokardinfarkt-Rezidivs (Bourron et al., 2015).

Im Tiermodell konnten ebenfalls kardioprotektive Effekte von IGF1 gezeigt werden. So führt im Mausmodell die Gabe von IGF1 vor einem Myokardinfarkt unter anderem zu geringerer kardialer Nekrose und weniger Kardiomyozyten-Untergang (Buerke et al., 1995). Eine Einzelgabe von IGF1 nach Myokardinfarkt führt in Schweinen zu verringerter Apoptose von Kardiomyozyten, kleinerer Infarktgröße und verbesserter ventrikulärer Funktion und Wandbeweglichkeit (O'Sullivan et al., 2011).

1.3 Insulin

Insulin wird in den β -Zellen des Pankreas produziert und ist ein anaboles Peptidhormon. 1921 wurde es erstmals aus Pankreasgewebe isoliert (Banting et al., 1922).

1.3.1 Regulation und Bildung

Die erste Stufe der Insulinsynthese in den pankreatischen β -Zellen ist das Präproinsulin, welches aus einem Signalpeptid, der A-Kette, dem C-Peptid und der B-Kette besteht. Durch die Abspaltung des Signalpeptids entsteht Proinsulin, durch die Bildung von Disulfidbrücken zwischen A- und B-Kette und die Abspaltung des C-Peptids Insulin (Steiner and Oyer, 1967, Bell et al., 1979). Verschiedene Reize können zur Ausschüttung von Insulin aus den β -Zellen führen, wobei hohe Blutglukosespiegel als Hauptfaktor zu nennen sind.

1.3.2 Struktur und Signaltransduktion – Vergleich mit IGF1

Insulin und IGF1 weisen große Ähnlichkeiten in ihrer Struktur und Signaltransduktion auf. In der Primärstruktur von IGF1 und Proinsulin gibt es Homologien. Die Aminosäuren 1-29 von IGF1 sind homolog zur C-Kette des Insulins, Positionen 42-62 sind homolog zur A-Kette. Der Zwischenbereich weist keine Homologien zum C-Peptid des Proinsulins auf. In der Struktur von IGF1 gibt es eine D-Domäne, die dem Insulin fehlt. Die dreidimensionale Struktur der beiden Proteine ist ebenfalls ähnlich (Rinderknecht and Humbel, 1978, Humbel, 1990, Bell et al., 1980).

Analog zur Ähnlichkeit der beiden Hormone sind auch der IGF1 und der Insulin-Rezeptor strukturell ähnlich aufgebaut. Auch beim Insulin-Rezeptor handelt es sich um ein Heterotetramer bestehend aus zwei extrazellulären α - und zwei transmembranären β -Untereinheiten mit Tyrosinkinaseaktivität (Chernausk et al., 1981, Ullrich et al., 1986, Ullrich et al., 1985).

IGF1 und Insulin sind in der Lage mit geringerer Affinität an den Rezeptor des jeweils anderen Hormons zu binden. Dabei wird von einer etwa 100-fach höheren Affinität der Rezeptoren zu ihrem jeweiligen Hormon als zu dem jeweils anderen ausgegangen (Czech, 1989, Schumacher et al., 1991).

Darüber hinaus sind in fast allen Geweben Hybridrezeptoren aus je einer α - β -Einheit des IGF1-Rezeptors und einer α - β -Einheit des Insulin-Rezeptors zu finden (Moxham et al.,

1989, Soos et al., 1990, Bailyes et al., 1997). An diese bindet IGF1 mit einer höheren Affinität als Insulin (Kasuya et al., 1993, Slaaby et al., 2006).

Die intrazelluläre Signaltransduktion ist der des IGF1-Rezeptors ebenfalls ähnlich. Wie auch beim IGF1-Rezeptor kommt es beim Insulin-Rezeptor nach Ligandenbindung zu Autophosphorylierung des Rezeptors an Tyrosinen der β -Untereinheiten (White et al., 1988) und anschließender Rekrutierung und Phosphorylierung verschiedener Zielproteine. Insulin führt wie IGF1 unter anderem zur Phosphorylierung der beiden Hauptsubstrate IRS-1 (Sun et al., 1991) und Shc (Pronk et al., 1993) und schaltet neben zahlreichen anderen die in 1.2.2 beschriebenen Signalwege an (Myers et al., 1992, Rozakis-Adcock et al., 1992).

Insgesamt sprechen IGF1 und Insulin zu großen Teilen gleiche Signalwege an, jedoch sind einige Zielmoleküle bekannt, die spezifisch für eines der beiden Hormone sind. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass sowohl das Protein GRB10 (*Growth factor receptor-bound protein 10*), als auch das Glykoprotein pp120 vornehmlich mit dem Insulin-Rezeptor und nicht mit dem IGF1-Rezeptor interagieren (Laviola et al., 1997, Najjar et al., 1997).

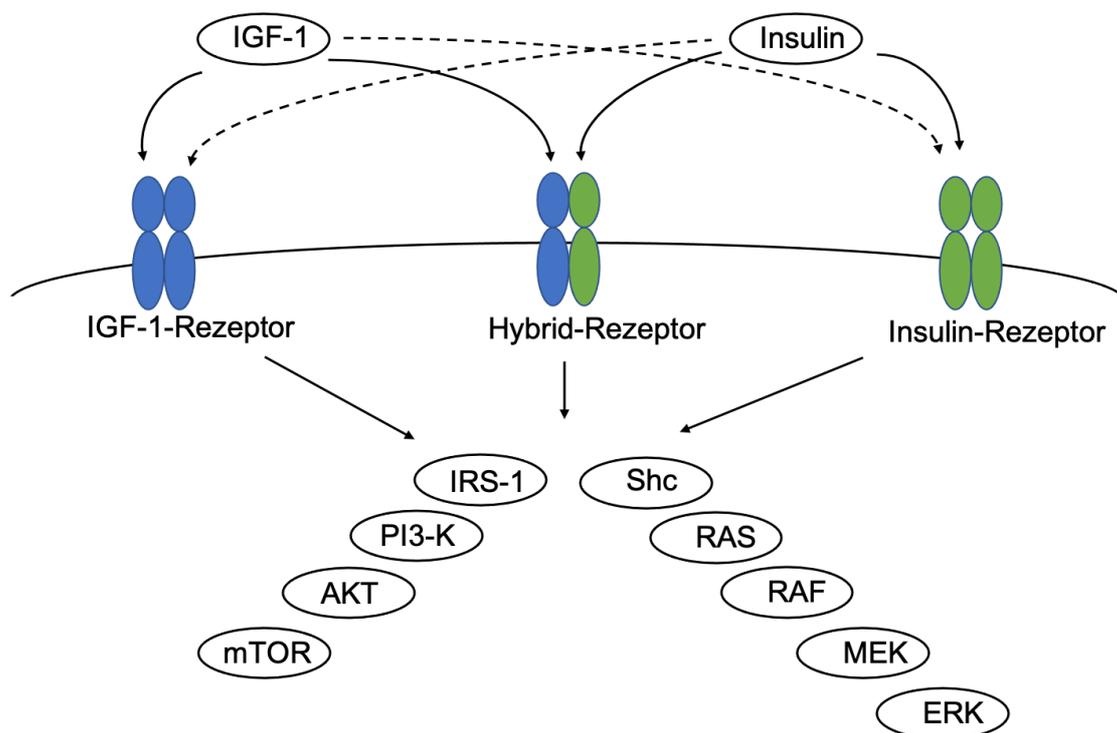


Abb. 4 Rezeptoren und Signaltransduktion von IGF1 und Insulin Die intrazelluläre Signaltransduktion von IGF1 und Insulin wird durch ihre strukturell verwandten Rezeptoren vermittelt. Beide Proteine können sowohl an ihren eigenen Rezeptor als auch mit niedrigerer Affinität an den Rezeptor des jeweils anderen Hormons und an den Hybrid-Rezeptor binden. Intrazellulär werden zahlreiche, größtenteils ähnliche Signalwege angeschaltet, von denen hier beispielhaft die beiden wichtigsten in groben Zügen dargestellt werden.

1.3.3 Funktion – Vergleich mit IGF1

Als Insulin 1921 erstmals aus Pankreasgewebe isoliert wurde, wurden eine blutzuckersenkende Wirkung und positive Effekte in der Behandlung von Diabetes beobachtet (Banting et al., 1922).

Heute ist Insulin als eines der stärksten anabolen Hormone des Körpers bekannt. Durch den Einbau von Glukosetransportern in die Zellmembran beschleunigt Insulin die Aufnahme von Glukose aus dem Blut in Fett- und Skelettmuskelzellen und wirkt so senkend auf die Blutglukosekonzentration (Suzuki and Kono, 1980, Cushman and Wardzala, 1980).

Zu den Wirkungen auf den Zucker- und Fettstoffwechsel zählen die Synthese von Energiespeichern wie Glykogen und Triglyceriden und analog dazu die Inhibition von Lipolyse, Glykogenolyse und hepatischer Glukoneogenese (Saltiel and Kahn, 2001, Michael et al., 2000).

Mäuse mit einem homozygoten *knock-out* des Insulin-Rezeptors werden mit normaler Größe geboren, zeigen aber ein reduziertes Wachstum nach der Geburt. Sie entwickeln Hyperglykämie und Hyperketoanämie und sterben in den ersten Tagen nach der Geburt an diabetischer Ketoazidose (Accili et al., 1996, Joshi et al., 1996).

Als Medikament wird Insulin in der Therapie des Diabetes mellitus eingesetzt. Ein absoluter Insulin-Mangel führt zu Typ-1-Diabetes mellitus. Eine sogenannte „Insulin-Resistenz“, eine Kombination aus herabgesetzter Insulin-Wirkung und verringerter β -Zellfunktion zu Typ-2-Diabetes mellitus.

Insgesamt weisen Insulin und IGF1 große Homologien sowohl in ihrer Struktur als auch in der Struktur ihrer Rezeptoren auf und sprechen zu großen Teilen überlappende Signalwege an. Trotzdem zeigen sie unterschiedliche physiologische Wirkungen, wobei IGF1 eher wachstumsstimulierend wirkt und Insulin eher metabolische Funktionen hat, wie auch die *knock-out*-Modelle der beiden Rezeptoren zeigen. Worin die Ursache für diese unterschiedlichen Wirkungen trotz großer Ähnlichkeiten in Struktur und Signaltransduktion liegt, bleibt Gegenstand aktueller Forschung. Diskutiert werden sowohl externe Faktoren wie Rezeptorverteilung und Sekretion der beiden Hormone, als auch interne Faktoren, wie Unterschiede in den angesprochenen Signalwegen (Kim and Accili, 2002, De Meyts, 2002).

1.4 Vorarbeiten

Um den kardioprotektiven Effekt von IGF1 näher zu untersuchen, wurde ein Mausmodell genutzt, in dem Mäuse in den ersten drei Tagen nach einem Myokardinfarkt mit IGF1

behandelt wurden. Bei diesen IGF1-behandelten Mäusen konnte echokardiographisch eine bessere Herzfunktion gezeigt werden als in einer Kontrollgruppe ohne IGF1-Behandlung. So hatten die IGF1-behandelten Mäuse im Gegensatz zu den unbehandelten eine erhöhte Ejektionsfraktion und ein erhöhtes Schlagvolumen nach Myokardinfarkt. Außerdem wurden eine kleinere Narbengröße und vermehrte Neoangiogenese in den Tieren mit IGF1-Behandlung gezeigt.

Diese kardioprotektiven Effekte von IGF1 waren in Mäusen mit einem *knock-out* des *Igf1r*-Gens in myeloiden Zellen nicht reproduzierbar, was die Vermutung nahelegt, dass die Effekte durch myeloide Zellen vermittelt werden. Es wurde gezeigt, dass IGF1 Effekte auf die Polarisierung von Makrophagen hat und einen M2-Phänotyp induziert. In durchflusszytometrischen und qPCR-Untersuchungen wurde bei IGF1-behandelten Knochenmarkmakrophagen eine Heraufregulation von typischen Markern für den M2-Phänotyp gezeigt (Heinen et al., 2019).

1.5 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Effekte von IGF1 und Insulin auf die Polarisierung von Makrophagen. Der Phänotyp des IGF1-polarisierten Makrophagen sollte näher charakterisiert und dabei verschiedene IGF1-Konzentrationen getestet werden. Außerdem sollte untersucht werden, über welche intra-zellulären Signalwege die IGF1-Wirkung vermittelt wird.

Um herauszufinden, ob der Effekt spezifisch für IGF1 ist, sollte zusätzlich der Effekt von Insulin auf die Makrophagen-Polarisierung analysiert werden. Aufgrund der beschriebenen Ähnlichkeiten in der Signaltransduktion von IGF1 und Insulin und der Möglichkeit der Bindung an den jeweils anderen Rezeptor war die Hypothese, dass Insulin *in vitro* ähnliche Effekte wie IGF1 zeigen und ebenfalls einen M2-Phänotyp in Makrophagen induzieren würde.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden Knochenmarkmakrophagen aus Mäusen isoliert und kultiviert. Diese wurden mit verschiedenen Faktoren zur Polarisierung inkubiert, sowie mit IGF1 und Insulin behandelt und anschließend mittels qPCR, Western Blot und durchflusszytometrischer Analyse auf Marker der verschiedenen Makrophagen-Phänotypen getestet.

In Abb. 5 werden die Ziele dieser Arbeit zusammengefasst.

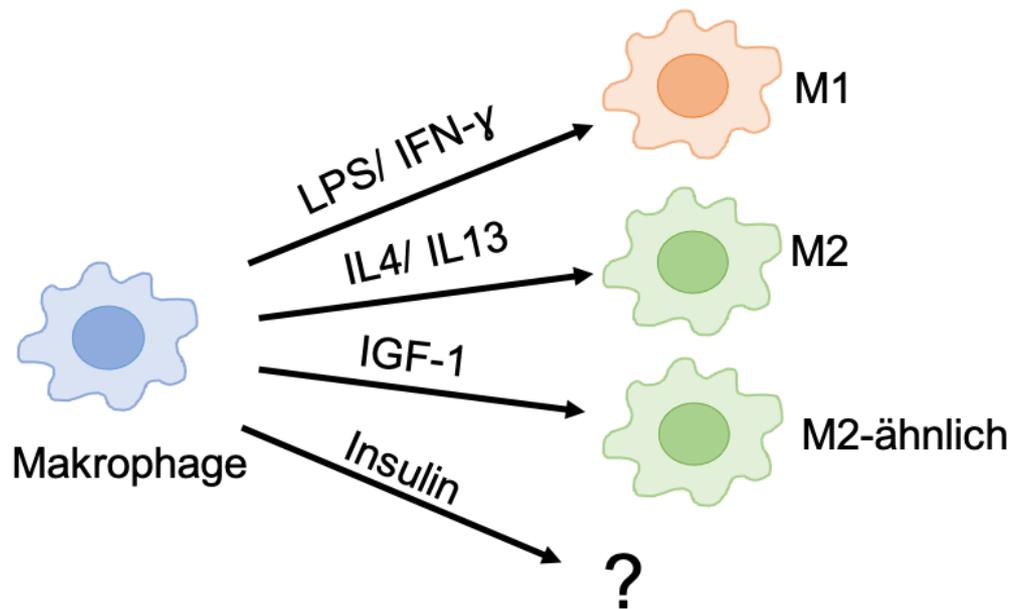


Abb. 5 Ziele der Arbeit Es ist bekannt, dass LPS und IFN- γ Makrophagen zum proinflammatorischen M1-Phänotyp polarisieren, während IL4 und IL13 Makrophagen zum antiinflammatorischen M2-Phänotyp polarisieren. Bezüglich des Effekts von IGF1 auf die Makrophagen-Polarisierung konnten Ähnlichkeiten zum antiinflammatorischen M2-Phänotyp gezeigt werden. Ziel dieser Arbeit war, den Phänotyp des IGF1-polarisierten Makrophagen näher zu charakterisieren und den Effekt von Insulin auf die Makrophagen-Polarisierung zu untersuchen.

2 Material und Methode

2.1 Geräte

Gerät	Hersteller (Produktname)
Blotting-System	Thermo Scientific (PierceG2 Fast Blotter)
Durchflusszytometer	BD (BD FACSCanto II)
Eismaschine	Ziegra
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr
Gefrierschrank (-80 °C)	Thermo Scientific
Gelkammern und Kämme	Bio-Rad
Heizblock	Eppendorf (Thermomixer comfort)
Hochgeschwindigkeitssorter	Beckman-Coulter (MoFlo XDP)
Infrared Imaging System	Li-Cor (Odyssey)
Inkubator	Thermo Scientific (HERACell Vios 250i)
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr
Laufkammern	Bio-Rad
Lichtmikroskop	Zeiss (ID 03)
Microplate Reader	Bio-Rad (iMark Microplate Reader)
Pipetten (10 µl – 1000 µl)	Gilson
Pipetten (5 ml – 25 ml)	Hirschmann (Pipetus)
Real-Time PCR System	Applied Biosystems (StepOnePlus)
Schüttler	Bio-Rad
Spektralphotometer	Peqlab (NanoDrop)
Sterilwerkbank	Thermo Scientific
Stromquelle	Fisher Scientific (Power 608)
Thermocycler	Eppendorf (Mastercycler)
Vortexmischer	Heidolph (Reax top)
Warmlagerschrank	Heraeus
Wasserbad	GFL
Wasserreinigung	Millipore (Milli-Q)
Zentrifugen	Hettich (Rotofix 32)

	Eppendorf (Centrifuge 5402)
	Eppendorf (Centrifuge 5415 R)

Tabelle 1 Auflistung der verwendeten Geräte

2.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller (Produktname)
96-Well-Platte	Greiner bio-one (Microplate 96 Well)
96-Well-Platte für PCR	Applied biosystems (MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate (0,1 ml))
Abdeckfolie für 96-Well-Platte	Thermo Scientific (Adhesive Sealing Sheets)
Einmal-Injektions-Kanüle	Braun (Sterican)
Einmal-Pipetten (5-25 ml)	Costar (Stripette)
Facs-Röhrchen	Falcon (5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube)
<i>Fast Reaction Tubes</i>	Applied Biosystems (MicroAmp Fast Reaction Tubes)
Filter	Greiner Bio-one (EASYstrainer 40 µm – sterile)
Nitrozellulosemembran	GE Healthcare Life science (Nitrocellulose Blotting Membrane)
Pipettenspitzen (10 – 1000 µl)	Star Lab (TipOne, Graduated, Filter Tip)
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one (Falcon Tubes)
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf (Safe-Lock Tubes)
Spritze (10 ml)	Braun (Omnifix)
Zellkulturschalen (10 cm, 15 cm)	TPP (Zellkulturschale 150, Zellkulturschale 100)
Zellkulturplatten (6-Well-Platte, 12-Well-Platte)	Greiner bio-one Cellstar
Zellschaber	VWR (25 cm Cell Scraper)

Tabelle 2 Auflistung der Verbrauchsmaterialien

2.3 Tiere

Für diese Arbeit wurden Wildtyp-Mäuse des Stammes C57BL/6J genutzt. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Ein Übungsschein im Töten von Wirbeltieren der Spezies Maus und Ratte wurde an der ZETT der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erworben. Die Gewinnung primärer Makrophagen aus Mausknochenmark erfolgte im Rahmen eines Projektes zur Organentnahme unter der Nummer O16/04.

2.4 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
1-Butanol	Roth
7-AAD Viability Staining Solution	BioLegend
Acrylamid (40 %)	Roth
Albumin Faktion V	Roth
Aminocaprinsäure	Sigma
APS	Roth
<i>Blocking Buffer</i>	Li-Cor (Odyssey Blocking Buffer)
Bromphenolblau	Roth
Chloroform	Merck
Dinatriumphosphat (Na_2HPO_4)	Merck
DPBS	Gibco
DTT	VWR
EDTA	Sigma
Ethanol 98 %	VWR
Essigsäure	Merck
Fc-Block	BioLegend (Purified anti-mouse CD16/32)
Glycerol	Sigma
Glycin	Roth
Glykogen (5mg/ml)	Invitrogen
Größenmarker	Thermo Scientific (PageRuler Prestained Protein Ladder)
Hydrochlorid (HCl)	Merck

IFN- γ	PeproTech (Murine IFN- γ)
Igepal	Sigma
IGF1	Miltenyi Biotec (Human IGF1)
IL13	PeproTech (Murine IL13)
IL4	PeproTech (Murine IL4)
Insulin	Sanofi (Insuman Rapid)
Isopropanol	VWR
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kalium-dihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
LPS	Sigma (Lipopolysaccharides from Escherichia coli)
M-CSF	PeproTech (Murine M-CSF)
Natriumchlorid (NaCl)	VWR
PPI	Thermo Scientific (Halt Protease & Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail)
Revert Total Protein Stain	Li-Cor
RPMI-Medium	gibco
SDS	Sigma
β -Mecaptoethanol	Sigma
Temed	Roth
Tricin	Roth
Tris	Roth
Trizol	Invitrogen
Tween20	Sigma
VLE Dulbecco's MEM	Biochrom GmbH
Zelldissoziationspuffer	gibco

Tabelle 3 Auflistung der Chemikalien

2.5 Kulturmedien

2.5.1 Makrophagen-Kultivierungsmedium

Als Kultivierungsmedium für die Makrophagen wurde VLE Dulbecco's MEM (Hersteller: Biochrom GmbH) mit den im Folgenden aufgeführten Zusätzen genutzt:

Chemikalie	Hersteller	Prozentigkeit
Hepes-Buffer (1M)	Biochrom GmbH	0,9 %
Penicillin-Streptomycin	Sigma	0,9 %
Hitze-inaktiviertes FBS 1	gibco	8,9 %

Tabelle 4 Zusammensetzung des Makrophagen-Kultivierungsmediums

2.5.2 Makrophagen-Polarisierungsmedium

Als Grundlage für das Makrophagen-Polarisierungsmediums wurde ebenfalls VLE Dulbecco's MEM genutzt. Die folgenden Zusätze wurden noch hinzugegeben:

Chemikalie	Hersteller	Prozentigkeit
Hepes-Buffer (1M)	Biochrom GmbH	0,95 %
Penicillin-Streptomycin	Sigma	0,95 %
Hitze-inaktiviertes FBS 1	gibco	2,8 %

Tabelle 5 Zusammensetzung des Makrophagen-Polarisierungsmediums

2.5.3 Makrophagen-Hungermedium

Als Hungermedium für die Makrophagen wurde VLE Dulbecco's MEM mit den folgenden Zusätzen genutzt:

Chemikalie	Hersteller	Prozentigkeit
Hepes-Buffer (1M)	Biochrom GmbH	0,98 %
Penicillin-Streptomycin	Sigma	0,98 %

Tabelle 6 Zusammensetzung des Makrophagen-Hungermediums

2.6 Lösungen und Puffer

Anodenpuffer:	300 mM Tris, 100 mM Tricin
Blocking-Lösung:	50 % Blocking Buffer, 50 % TBS
Facs-Puffer:	PBS + 0,5 % BSA + 2 mM EDTA
PBS:	pro 1 l: 0,2 g KCl, 0,2 g KH ₂ PO ₄ , 8 g NaCl, 1,17 g Na ₂ HPO ₄
Kathodenpuffer:	300 mM Aminocaprinsäure, 30 mM Tris, pH 8,7
Lämmli-puffer:	pro 50 ml: 30 ml 20 % SDS, 12,5 ml Tris-HCl pH 6,8 (250 mM), 10 ml Glycerol, 5 mg 0,005 % Bromphenolblau
Laufpuffer:	pro 1 l: 3,02 g Tris Base, 14,4 g Glycin, 0,1 % SDS
Lysispuffer:	10 nM Tris pH 7,4, 100 nM NaCl, 1 % Igepal
Saline EDTA:	pro 1 l: 0,2 g EDTA, 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na ₂ HPO ₄ , 0,2 g KH ₂ PO ₄
TBS:	pro 1 l: 2,42 g Tris, 8 g NaCl, pH 7,5
TBS-T:	pro 1 l: 2,42 g Tris, 8 g NaCl, 0,1 % Tween20
Total Protein Stain-Lösung:	Washing-Solution + 10 % Revert Total Protein Stain
Washing-Solution:	6,7 % Essigsäure, 30 % Ethanol

2.7 Acrylamid-Gele

Sammelgel:	Für zwei kleine Gele: 3,7 ml Wasser, 625 µl Acrylamid (40 %), 625 µl 1 M Tris pH 6,8, 50 µl 10 % SDS, 10 µl Temed, 15 µl 10 % APS
Trenngel (10 %):	Für zwei kleine Gele: 5 ml Wasser, 2,5 ml Acrylamid (40 %), 2,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8, 100 µl 10 % SDS, 20 µl Temed, 25 µl 10 % APS

2.8 Antikörper

2.8.1 Antikörper für die Western Blot-Analyse

Primärantikörper

Antikörper	Hersteller	Produktnummer	Tier	Verdünnung
AKT	Cell Signaling	2920	Maus	1:2000
pAKT	Cell Signaling	9271	Kaninchen	1:1000
pSTAT1	Cell Signaling	9167	Kaninchen	1:1000
pSTAT6	Invitrogen		Kaninchen	1:2000
IGF1 Rezeptor	Cell Signaling	3027	Kaninchen	1:500
Insulin-Rezeptor	Cell Signaling	3025	Kaninchen	1:500
Phospho IGF1 / Insulin-Rezeptor	Cell Signaling	3024	Kaninchen	1:500

Tabelle 7 Auflistung der Primärantikörper für die Western Blot-Analyse Alle Primärantikörper wurden in TBS-T mit einem Zusatz von 5% BSA gelöst.

Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller	Produktname
Anti-Maus	Li-Cor Odyssey	Goat anti-Mouse IRDye 800CW
Anti-Kaninchen	Li-Cor Odyssey	Goat anti-Rabbit IRDye 690

Tabelle 8 Auflistung der Sekundärantikörper Alle Sekundärantikörper wurden in einer 1:1-Mischung von TBS-T und Blocking-Buffer in einer Verdünnung von 1:10.000 gelöst.

2.9 Kits

Name	Hersteller
Reverse Transcription Kit (200)	Qiagen
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
RNeasy Kit	Qiagen
RNase-Free DNase Set	Qiagen
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix	Thermo Scientific

Tabelle 9 Auflistung der verwendeten Kits

2.10 Software

Name	Hersteller
BD FACS Diva Software	BD Biosciences
Graph Pad Prism 7	GraphPad
ImageStudioLite v5.2.5	Li-Cor Biosciences
Microplate Manager Software	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Step One Software v2.1	Applied Biosystems

Tabelle 10 Auflistung der verwendeten Software-Programme

2.11 Makrophagen

2.11.1 Isolation und Kultivierung von Makrophagen

Für diese Arbeit wurden Knochenmarkmakrophagen aus Mäusen genutzt. Zur Isolation der Zellen erfolgte zunächst die Tötung der Maus durch zervikale Dislokation und die Organentnahme der Tibia und Femur-Knochen (Abb. 6 A). Die Knochen wurden daraufhin für 40 Sekunden in 70-prozentiges Ethanol gelegt und anschließend in RPMI-Medium bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Unter sterilen Bedingungen wurde mit einer mit RPMI-Medium gefüllten Spritze und einer Einmal-Injektions-Kanüle das Knochenmark aus den Knochen herausgespült und in einem 50 ml-Röhrchen aufgefangen (Abb. 6 B). Die gewonnene Flüssigkeit wurde dann für 10 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert und das Pellet für eine Minute in 1 ml 0,2-prozentiger NaCl-Lösung resuspendiert, um eine hypotone Lyse der im Knochenmark enthaltenen Erythrozyten herbeizuführen. Anschließend wurde durch die Zugabe von 1 ml 1,6-prozentiger NaCl-Lösung wieder eine physiologische Umgebung hergestellt, die entstandene Suspension durch einen Filter (Easy Strainer 40 µl) gegeben und erneut für 10 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. In einem Waschschrift wurde das entstandene Pellet in 1 ml *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS) resuspendiert und zusätzlich 40 ml DPBS hinzugegeben. Nach erneutem Zentrifugieren unter den genannten Bedingungen wurden die Zellen im Makrophagen-Kultivierungsmedium unter Zugabe von 10 ng/ml M-CSF bei 37 °C und 5 % CO₂ für insgesamt sieben Tage inkubiert.

Nach zwei und vier Tagen erfolgte ein Wechsel des Kultivierungsmediums mit frischer Zugabe von M-CSF.

Die Inkubation erfolgte entweder auf 15 cm² Zellkulturschalen (ca. 5 Zellkulturschalen/ 2 Mäuse), wobei ein späteres Umsetzen der Zellen auf eine 6- oder 12-Well-Platte erfolgte (s. 2.11.2), oder auf 6-Well-Platten (ca. 3 6-Well-Platten/ 2 Mäuse).

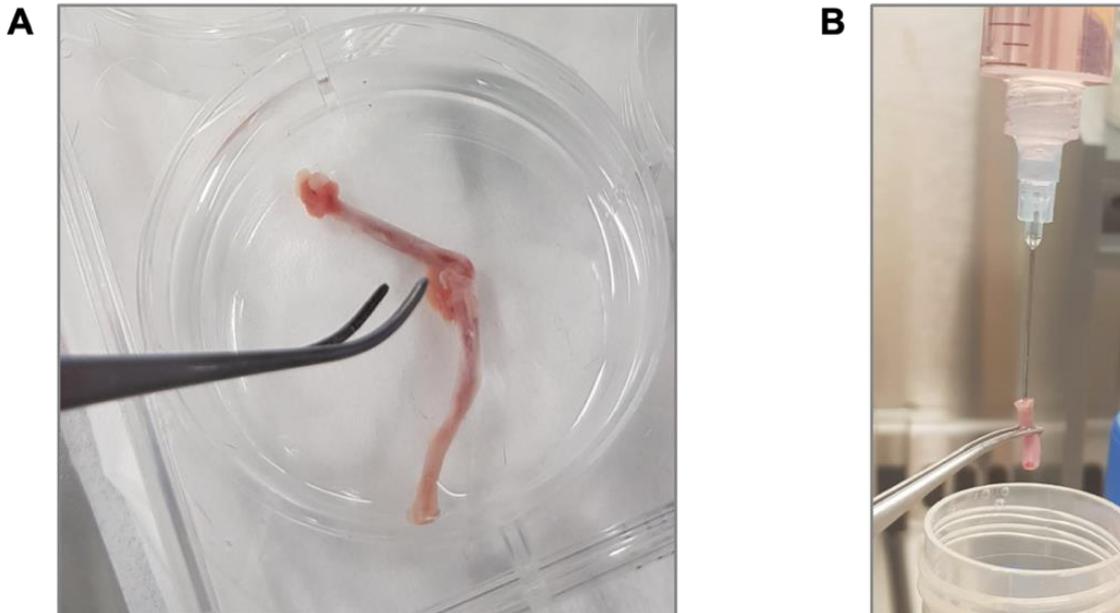


Abb. 6 Isolation von Knochenmarkmakrophagen A zeigt die entnommenen Tibia- und Femur-Knochen einer Maus. In B wird das Herausspritzen des Knochenmarks mit einer Einmal-Injektions-Kanüle gezeigt.

2.11.2 Weitere Behandlung der Makrophagen

Sieben Tage nach der Isolation erfolgte die weitere Behandlung der Makrophagen.

Zum Lösen der Makrophagen von den 15 cm² Zellkulturschalen wurde zunächst das Kultivierungsmedium abgenommen und die auf der Platte liegenden Zellen mit DPBS gewaschen. Dazu wurden 3 ml DPBS auf die Platte gegeben und wieder abgenommen. Dann wurden die Zellen für 15 Minuten bei 37 °C mit Zelldissoziationspuffer (3 ml auf jeder 15 cm² Zellkulturschale) inkubiert und dieser dann mitsamt der in ihm gelösten Zellen in einem Falcon gesammelt. Um die restlichen Zellen von der Platte zu lösen, wurde Saline-EDTA und ein Zellschaber genutzt. Die erhaltenen Zellen wurden anschließend mit DPBS gewaschen und auf eine 6- oder 12-Well-Platte ausgesät.

Zur Polarisierung der Makrophagen wurden diese für 48 Stunden in Makrophagen-Polarisierungsmedium unter Zugabe verschiedener Stoffe bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Hierbei wurden zum einen klassische Makrophagen-Polarisierer hinzugegeben. Für die Polarisierung der Makrophagen zum M1-Phänotyp wurden LPS (10 ng/ml) und IFN- γ (2 ng/ml), für die Polarisierung zum M2-Phänotyp IL4 (30 ng/ml) und IL13 (30 ng/ml)

genutzt. Zusätzlich wurden Zellen entweder mit IGF1 (10 ng/ml) oder Insulin (verschiedene Konzentrationen zwischen 3 und 100 ng/ml) behandelt.

Zur Untersuchung von Kurzzeiteffekten wurden die Makrophagen auf 6- oder 12-Well-Platten über Nacht mit dem Makrophagen-Hungermedium inkubiert und anschließend stimuliert.

Die Phänotypen der polarisierten Makrophagen wurden anschließend mit den im folgenden beschriebenen Methoden untersucht. Eine Zusammenfassung des Protokolls gibt Abb. 7 wieder.

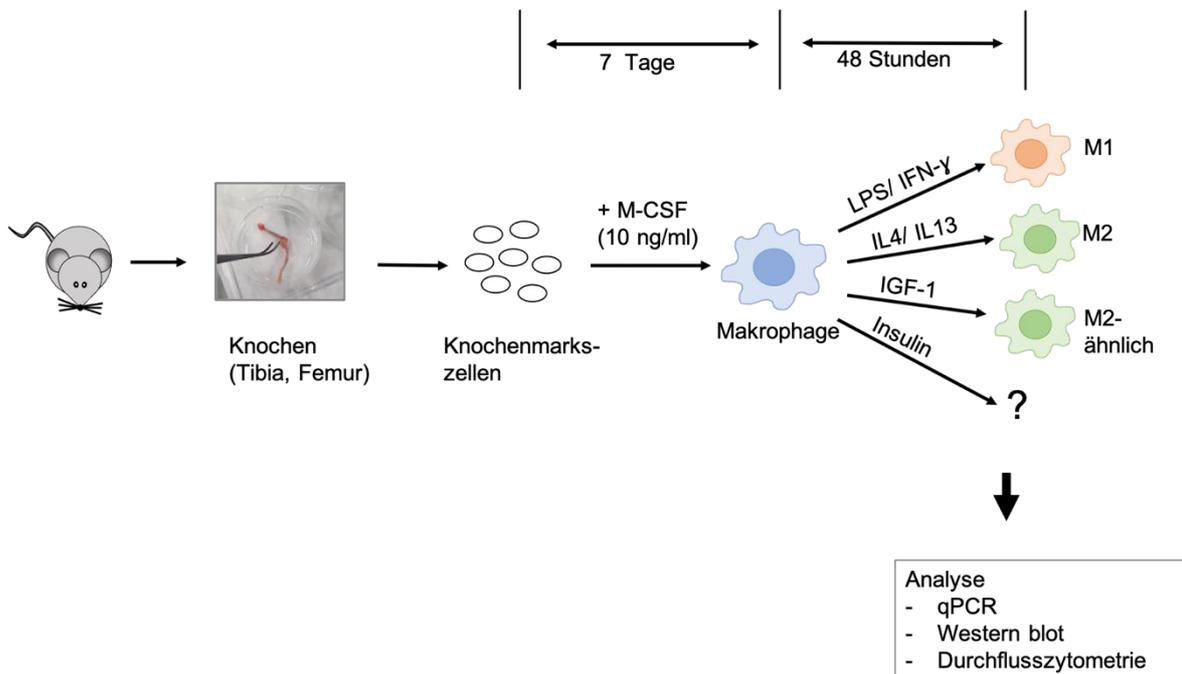


Abb. 7 Zusammenfassung des Protokolls Knochenmarkszellen wurden aus den Tibia- und Femurknochen von Mäusen isoliert und zu Makrophagen kultiviert. Diese wurden für 48 Stunden mit verschiedenen Stoffen polarisiert und anschließend mittels qPCR, Facs-Analyse und Western Blot untersucht.

2.12 qPCR

2.12.1 Isolation von RNA

Mittels qPCR wurden Genexpressions-Analysen der polarisierten Makrophagen durchgeführt. Dazu wurde zunächst RNA aus den Zellen isoliert.

Alle in diesem Abschnitt erwähnten Zentrifugationsschritte wurden in der „Centrifuge 5402“ von Eppendorf bei 14000 rpm und 4 °C durchgeführt.

Zur Isolation von RNA aus den Zellen wurde Trizol, ein lipophiles Agens auf Phenolbasis, auf die Zellen gegeben, die sich noch auf einer 12-Well-Platte befanden, und das entstandene Gemisch aus Trizol und Zellbestandteilen in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt. Durch Zugabe von Chloroform, Durchmischen und 10 Minuten langer Zentrifugation wurde eine Phasentrennung erreicht. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 600 µl Isopropanol und 3 µl Glykogen (5 µg/µl) für 20 Minuten bei -20 °C inkubiert, um die Nukleinsäuren auszufällen. Nach einem weiteren 30-minütigen Zentrifugationsschritt setzte sich die isolierte RNA als Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes ab. Dieses RNA-Pellet wurde noch zweimal mit 70-prozentigem Ethanol gewaschen, für 10 Minuten an der Luft getrocknet und in 15 – 30 µl RNAase-freiem Wasser gelöst.

Der Begriff „Waschen“ steht hier für eine Behandlung des RNA-Pellets mit 500 µl 70-% Ethanol, 10 Minuten lange Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes.

2.12.2 Reverse Transkription

Mittels Spektralphotometer wurde die Konzentration der gewonnenen RNA bestimmt und die für qPCR vorgesehene RNA durch Nutzung des Reverse Transcription Kit von Qiagen zu intronfreier cDNA umgeschrieben. Hierbei wurde eine Zielkonzentration von 50 ng/µl in 20 µl Gesamtvolumen angestrebt.

In einem ersten Schritt wurden dazu das Volumen der umzuschreibenden RNA-Lösung, welches 1 µg RNA enthielt, und 2 µl des im Kit enthaltenen „gDNA Wipeout Buffers“, welcher dazu dient DNA-Kontaminationen aus dem Reaktionsansatz zu eliminieren, in einem „MicroAmp Fast Reaction Tube“ von Applied Biosystems zusammengegeben. Mit nukleasefreiem Wasser wurde die Mischung auf ein Gesamtvolumen von 14 µl gebracht und im Mastercycler von Eppendorf für 2 Minuten bei 42 °C inkubiert. Ein Mastermix aus den restlichen Komponenten des Kits (1 µl „RT Primer Mix“, 1 µl „RT Master Mix“ und 4 µl „RT Buffer“) wurde erstellt und zum Reaktionsansatz hinzugegeben. Dieser wurde im Mastercycler für 20 Minuten erneut bei 42 °C inkubiert, wobei die cDNA-Synthese stattfand. Dann wurde der Mastercycler für 3 Minuten auf 95 °C erhitzt, um die Reaktion zu stoppen, und anschließend wurde der Inkubationsblock bis zur weiteren Verwendung der cDNA auf 4 °C gekühlt.

Der „RT Master Mix“ enthält das Enzym Reverse Transkriptase, welches das Umschreiben von RNA zu DNA katalysiert, sowie RNase-Inhibitor. Der „RT Buffer“ ist ein für die

durchgeführte Reaktion optimierter Puffer, welcher zusätzlich dNTPs enthält, die als DNA-Bausteine benötigt werden. Der „RT Primer Mix“ enthält eine optimierte Primer-Mischung.

2.12.3 Quantitative Realtime PCR

Anschließend wurde zur Quantifizierung von Genomabschnitten eine quantitative Realtime PCR durchgeführt. Bei dieser werden wie bei einer konventionellen PCR DNA-Fragmente amplifiziert und darüber hinaus durch einen Fluoreszenzfarbstoff erkannt und nach jedem Zyklus quantifiziert.

In dieser Arbeit wurde die SYBR Green Realtime PCR Methode verwendet, bei der der fluoreszierende Farbstoff SYBR Green in die neu synthetisierten DNA-Abschnitte eingebaut wird. Die Reaktionsansätze wurden in speziellen 96-Well-Platten („MicroAmp Fast96-Well Reaction Plate“ von Applied Biosystems) angefertigt, die anschließend mit Haftfolie luftdicht verschlossen und einige Sekunden zentrifugiert wurden. Jeder Reaktionsansatz hatte ein Gesamtvolumen von 20 µl und bestand aus der jeweiligen cDNA (1 µl), dem Primerpaar (0,9 µl pro Primer), dem SYBR Green Farbstoff (10 µl) und nukleasefreiem Wasser (7,2 µl). Im Realtime PCR System „Step One Plus“ von Applied Biosystems wurden 40 Temperaturzyklen mit je 15 Sekunden auf 95 °C und 60 Sekunden auf 60 °C durchlaufen und mit der Step One Software v2.1 die Amplifikation der untersuchten Gene aufgezeichnet. Die Ergebnisse wurden auf das Referenzgen NUDC normalisiert und mit der X0-Methode ausgewertet.

Als Marker für einen M1-Phänotyp wurden TNF- α , IL12 und iNOS und als Marker für einen M2-Phänotyp MRC, Arginase und Relm- α analysiert. Die verwendeten Primer werden in Tabelle 11 aufgeführt.

Primer	Sequenz
NUDC	F AGAACTCCAAGCTATCAGAC R C TTCAGGATTTCTGTTTCTTC
TNF- α	F GCCTCTTCTCATTCTGCTTG R CTGATGAGAGGGAGGCCATT
IL 12	F TACTAGAGAGACTTCTTCCACAACAAGAG R TCTGGTACATCTTCAAGTCCTCATAGA
iNOS	F CATCACCAGTATTATGGCTC R TTTCCTTTGTTACAGCTTCC

MRC	F CTCTGTTTCAGCTATTGGACGC R CGGAATTTCTGGGATTCAGCTTC
Arginase	F CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG R AGGAGCTGTCATTAGGGACATC
Relm- α	F TCACAGGTCTGGCAATTCTTCTG R TTTGTCCTTAGGAGGGCTTCCTCG
IGF1-Rezeptor	F GTCATGGACAGATCTGTGTTCTT R GGTGATCTTCTCTCGAGCTACCTC
Insulin-Rezeptor	F CAAACAGATGCCACTAATCC R CTTTGAGACAATAATCCAGCTC
IGF1	F CTGGACCAGAGACCCTTTGC R GGACGGGGACTTCTGAGTCTT

Tabelle 11 Auflistung der Primer für die qPCR Alle Primer waren von Sigma und wurden in nucleasefreiem Wasser gelöst.

2.13 Durchflusszytometrie

Zunächst wurde das Polarisierungsmedium von den auf einer 12-Well-Platte liegenden Makrophagen abgenommen und verworfen und die Zellen dann mit 300 μ l DPBS pro Well gewaschen. Zum anschließenden Ablösen der Zellen von der Platte wurde wie bei der Makrophagen-Polarisierung vorgegangen. So wurden die Zellen für 15 Minuten bei 37 °C in 300 μ l Zelldissoziationspuffer inkubiert, durch wiederholtes Pipettieren von der Platte abgelöst und in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen gesammelt. Durch Saline EDTA und Zellschaber wurden die verbleibenden Zellen von der Platte gelöst und ebenfalls in das Reaktionsgefäß gegeben. Die Zellmischungen wurden für 10 Minuten bei 300 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um Verunreinigungen zu eliminieren, wurden die Zellpellets in 500 μ l DPBS resuspendiert und erneut für 10 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 200 μ l einer 100:1-Mischung aus Facs-Puffer und Fc-Block für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert, um unspezifische Antikörper-Bindungen zu verhindern.

Anschließend wurden aus einem zuvor vorbereiteten Master-Mix Antikörper zu den Zellen hinzugegeben und für 10 Minuten bei Dunkelheit inkubiert. Nach 3 Minuten wurde in einer 1:100-Verdünnung der Avitalfarbstoff 7-AAD (7-Aminoactinomycin) hinzugefügt, welcher tote Zellen markiert und nur 7 Minuten Inkubationszeit benötigt. Nach der Inkubationszeit der Antikörper wurden 200 μ l Facs-Puffer zu den Ansätzen hinzugegeben und diese in einer

auf 4 °C gekühlten Zentrifuge für 10 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Die Zellpellets wurden dann in 100 µl Facs-Puffer gelöst, in Facs-Röhrchen überführt und bis zur Messung im Dunkeln und auf Eis gelagert.

Die Messung erfolgte an dem Durchflusszytometer „Facs Canto II“ von BD und wurde mit der „BD FacsDiva Software“ ausgewertet. Die verwendeten Antikörper werden in Tabelle 12 aufgeführt.

Antikörper	Farbe	Verdünnung	Hersteller	Produktnummer
CD11b	BV510	1:500	BioLegend	101245
CD206	Pe-Cy7	1:500	BioLegend	141720
CD38	FITC	1:100	BioLegend	102714
F4/80	BV421	1:200	BioLegend	123132
MHC-II	APC	1:1000	BioLegend	107613

Tabelle 12 Liste der Antikörper für die Facs-Analyse Bei MHCII, Ly6C, F4/80 und CD11b handelt es sich um Makrophagen-Marker. CD38 bindet an Makrophagen vom M1-Phänotyp, CD206 an den M2-Phänotyp.

2.14 Analyse auf Proteinebene

2.14.1 Erstellen von Proteinlysaten

Zur Analyse auf Proteinebene wurden zum einen Makrophagen genutzt, die wie in Abschnitt 2.11.2 beschrieben für 48 Stunden polarisiert wurden. Zudem wurden Versuche mit M0-Makrophagen durchgeführt, die lediglich kurzzeitig mit Polarisierern behandelt wurden. Dafür wurden die Makrophagen nach der 7-tägigen Kultivierung für 48 Stunden in Makrophagen-Polarisierungssmedium ohne Zugabe von Polarisierern inkubiert. An Tag 9 wurden die Zellen für 5 Stunden in Makrophagen-Hungermedium gehungert und anschließend kurzzeitig stimuliert. Das Makrophagen-Hungermedium bestand aus VLE-Dulbecco's DMEM mit einem Zusatz von 1 % Hepes-Puffer und 1 % Penicillin/Streptomycin.

Nach erfolgter Kultivierung und Behandlung wurde das Medium von den Zellen abgenommen und 300 µl (bei einer 12-Well-Platte) oder 500 µl (bei einer 6-Well-Platte) DPBS auf die Wells gegeben und wieder abgenommen, um die Zellen zu waschen. Dann wurden je nach Konfluenz der Zellen 70 – 100 µl Lysispuffer mit zugesetztem Protease-

/Phosphatase-Inhibitor (PPI) im Verhältnis 100:1 auf die Wells gegeben und mit Hilfe von Zellschaber und wiederholtem Pipettieren die Zellbestandteile darin gelöst. Der Lysispuffer wurde dann in 1,5 ml-Eppendorfgläser überführt. Diese wurden für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfglas überführt und das Pellet verworfen.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen in den Proben wurde ein BCA-Assay durchgeführt. Das „Pierce BCA Protein Assay Kit“ von Thermo Scientific wurde verwendet und es wurde nach Anleitung des Kits vorgegangen. In einer 96-Well-Platte wurden je 2 µl der Proben in 25 µl autoklaviertem Wasser und eine BSA-Standardreihe mit Konzentrationen von 0,0625 µg/µl – 2 µg/µl angesetzt. Zu allen Wells wurde eine Mischung der Reagenzien A und B des Kits hinzugegeben. Die Platte wurde für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und im „iMark Microplate Reader“ von Bio-Rad wurde eine photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 570 durchgeführt. Anhand der Standardreihe wurden die Proteinkonzentrationen errechnet.

Zu den Proben wurde im Verhältnis 1:4 Lämmli-puffer mit 100 mM DTT (1:10) hinzugegeben und durch Zugabe von entsprechenden Volumina Lysispuffer mit zugesetztem PPI eine Konzentrationsangleichung durchgeführt. Die Proben wurden für 10 Minuten bei 99 °C aufgeköcht, um eine Denaturierung der Proteine zu erreichen und entweder sofort für eine Western-Blot-Analyse genutzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.14.2 Western Blot

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Die Polyacrylamid-Gele setzten sich wie in 2.7 (Acrylamid-Gele) beschrieben zusammen. Nach dem Gießen und Auspolymerisieren des Gels wurde dieses in eine mit Laufpuffer gefüllte Laufkammer eingespannt und in die Geltaschen der Größenmarker und die Proteinlysate gegeben. Bei 150 – 200 Volt wurde über 45 – 60 Minuten die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe durchgeführt.

Anschließend erfolgte der Transfer der Proteine von dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran. Dazu wurden ein in Kathodenpuffer getränktes Filterpapier, das Gel, ein in Anodenpuffer getränktes Filterpapier und die ebenfalls in Anodenpuffer getränkte Membran in ein Fast-Blotting-Gerät eingespannt und ein elektrisches Feld angelegt, wodurch die Proteine von dem kathodenseitig liegenden Gel in die anodenseitig liegende Membran wanderten.

Die Membran wurde für eine Stunde mit Blocking-Lösung wippend inkubiert, um unspezifische Antikörper-Bindungen zu verhindern und anschließend mit 2 ml Erstantikörpermischung über Nacht inkubiert. Die verwendeten Erstantikörper werden in Tabelle 7 aufgeführt. Nach drei 10-minütigen Waschschrritten in TBS-T und einer Stunde Inkubation mit der Zweitantikörpermischung (Tabelle 8) erfolgte ein weiterer Waschschrtritt mit TBS-T. Dann wurde die Membran im Odyssey Licor-System eingescannt. Anschließend wurde zur späteren Quantifizierung der Ergebnisse ein Total Protein Stain durchgeführt. Dafür wurde die Membran für 4 Minuten mit Total Protein Stain-Lösung inkubiert und erneut eingescannt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm ImageStudioLite (Version 5.2.5) von Li-Cor Biosciences

2.15 Zellsortierung und Sequenzierung

2.15.1 Durchflusszytometrische Zellsortierung

Zur Vorbereitung der Zellen wurden diese nach der Polarisierung zunächst von den 6-Well-Platten abgelöst. Dazu wurden wie in 2.13 (Durchflusszytometrie) beschrieben Zelldissoziationspuffer, Saline EDTA und ein Zellschaber genutzt. Zunächst erfolgte eine 15-minütige Inkubation mit Zelldissoziationspuffer. Die Zellen wurden darin durch wiederholtes Pipettieren gelöst und in einem Falcon gesammelt. Die Platten wurden mit Saline EDTA gewaschen und dieses ebenfalls in den Falcon gegeben. Zuletzt wurden zurückgebliebene Zellen mit einem Zellschaber von der Platte gelöst und dazugegeben.

Die gewonnenen Zellen wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 1500 rpm pelletiert. Um das Zellpellet zu waschen wurde dieses in 1 ml Facs-Puffer resuspendiert, 10 ml Facs-Puffer hinzugegeben und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann für 10 Minuten bei 4 °C in einer 100:1-Mischung aus Facs-Puffer und Fc-Block inkubiert, um unspezifische Antikörper-Bindungen zu verhindern. In einem 1:100-Verhältnis wurde der F4/80-Antikörper hinzugegeben.

Die durchflusszytometrische Zellsortierung wurde in der *Core Flow Cytometry Facility* des Universitätsklinikums Düsseldorf an dem Hochgeschwindigkeitssorter „MoFlo XDP“ der Firma Beckman-Coulter durchgeführt.

2.15.2 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation aus den gesorteten Zellen wurde nach einem Trizol/RNeasy-Hybrid-Protokoll durchgeführt. Die gesorteten Zellen wurden zunächst in 1 ml Trizol resuspendiert. 200 μ l Chloroform wurden hinzugegeben, die Probe wurde durchmischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 10.000 rpm, wodurch eine Phasentrennung erreicht wurde. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 500 μ l Isopropanol hinzugegeben. Die Mischung wurde in ein *spin column* des RNeasy Kits von Qiagen überführt. Das *spin column* wurde für 15 Sekunden bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dann wurden 350 μ l *Buffer RW1* aus dem RNeasy Kit zugegeben, bei voller Geschwindigkeit für 15 Sekunden zentrifugiert und erneut der Durchfluss verworfen.

Es wurde nach Anleitung des *RNase-Free DNase Sets* von Qiagen eine DNase-Behandlung durchgeführt. Dazu wurden 70 μ l *Buffer RDD* zu 10 μ l *DNase I stock solution* gegeben. Die erhaltene DNase-Mischung wurde in das *spin column* gegeben und so für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden nach Anleitung des RNeasy Kits die Waschschritte und die finale RNA-Isolation durchgeführt. Es wurde einmal mit 350 μ l *Buffer RW1* und zweimal mit 500 μ l *Buffer RPE* gewaschen. Es erfolgte ein 1-minütiger Zentrifugationsschritt bei voller Geschwindigkeit, um die Membran des *spin column* zu trocknen. Die RNA wurde in 30 μ l RNase-freiem Wasser gelöst.

2.15.3 Sequenzierung

Die Sequenz-Analysen wurden als *next generation sequencing* im BMFZ (Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

2.16 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der qPCR- und Durchflusszytometrie-Experimente erfolgte mit dem Programm Graph Pad Prism. Die statistische Signifikanz wurde mittels *one way ANOVA* gefolgt von *Tukey's post hoc test* ermittelt ($p < 0,05$).

Die statistische Analyse der Sequenzierungs-Ergebnisse wurde mittels *Qluore Omics explorer software* durchgeführt. Es wurden log₂-transformierte *RPKM*-Werte zu einem

threshold von 0,1 vorgefiltert. Entsprechend des Versuchsaufbaus wurden die Proben gruppiert und jeweils mittels zwei-Gruppen-Vergleichsfunktionen mit der Kontrollgruppe verglichen. Proben mit einem absoluten *fold change* <1.5 und $p < 0.05$ wurden als unterschiedlich exprimierter Gene angesehen. Diese unterschiedlich exprimierten Gene wurden dann in die *Ingenuity Pathway Analysis* (Qiagen Inc. 2016) - Plattform eingespeist, um mögliche *Upstream*-Regulatoren zu identifizieren.

3 Ergebnisse

3.1 Morphologie der Makrophagen

In dieser Arbeit wurden Makrophagen verwendet, die wie in 2.11.1 beschrieben aus murinem Knochenmark gewonnen wurden, welches zuvor aus Tibia- und Femur-Knochen von Wildtyp-Mäusen des Stammes C57BL6/J isoliert wurde. Nach der Isolation erfolgte unter der Zugabe von M-CSF eine 7-tägige Kultivierung der Zellen zu Makrophagen. Anschließend wurden die Makrophagen je nach Zielsetzung mit verschiedenen Agonisten behandelt.

Abb. 8 zeigt repräsentative mikroskopische Aufnahmen der kultivierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten des Kultivierungsprozesses und unter verschiedenen Bedingungen. An Tag 0, unmittelbar nach der Isolation und dem Aussäen der Knochenmarkzellen, hatten diese ein rundes, kugeliges Erscheinungsbild und schwammen frei im Nährmedium (Abb. 8 B). Im Laufe der 7-tägigen Kultivierung und Behandlung mit M-CSF setzten die Zellen sich auf dem Boden der Zellkulturschale ab und entwickelten sich zu adhärennten Makrophagen. Diese zeigten sich eher vereinzelt vorliegend mit spindelförmigen bis stark gestreckten Zellkörpern und langen Zellausläufern. (Abb. 8 C).

Nach der 7-tägigen Kultivierung wurden die Makrophagen für 48 Stunden beispielsweise mit den verschiedenen Makrophagen-Polarisierern behandelt und so zu unterschiedlichen Phänotypen polarisiert. Bei der mikroskopischen Betrachtung fiel auf, dass die Makrophagen nach der Polarisierung Unterschiede in ihrem Aussehen aufwiesen.

So hatten die Makrophagen, die mit den LPS und IFN- γ zu pro-inflammatorischen M1-Makrophagen polarisiert wurden, runde Zellkörper und zeigten eine Bildung von Zellhaufen (Abb. 8 D).

Die mit IL4 und IL13 zum M2-Phänotyp polarisierten Makrophagen hatten wie die unbehandelten M0-Makrophagen ein eher spindelförmiges Aussehen. Ihre Zellkörper waren allerdings weniger langgestreckt als die der M0-Makrophagen. Im Vergleich mit den M0-Makrophagen war außerdem eine deutliche Zunahme der Zellzahl zu beobachten. Sie lagen gleichmäßig verteilt in der Zellkulturschale (Abb. 8 E).

Auffällig war außerdem, dass die Makrophagen, die mit IGF1 und Insulin behandelt wurden, sich in ihrem Aussehen unterschieden. Hierbei ähnelten die mit IGF1 behandelten Makrophagen morphologisch stark den IL4/IL13 polarisierten M2-Makrophagen (Abb. 8 F).

Die Zellen, die mit Insulin behandelt wurden, ähnelten am ehesten den unbehandelten Makrophagen (Abb. 8 G).

Grundsätzlich war bei Polarisierung zum M1- bzw. M2-Phänotyp und bei Behandlung mit IGF1 im Vergleich mit den unbehandelten Makrophagen eine Zunahme der Zelldichte zu erkennen.

Die Ergebnisse zeigen die unterschiedlichen Phänotypen der M1- und M2-Makrophagen und deuten bereits darauf hin, dass IGF1 und Insulin unterschiedliche Effekte auf die Morphologie von Makrophagen haben.

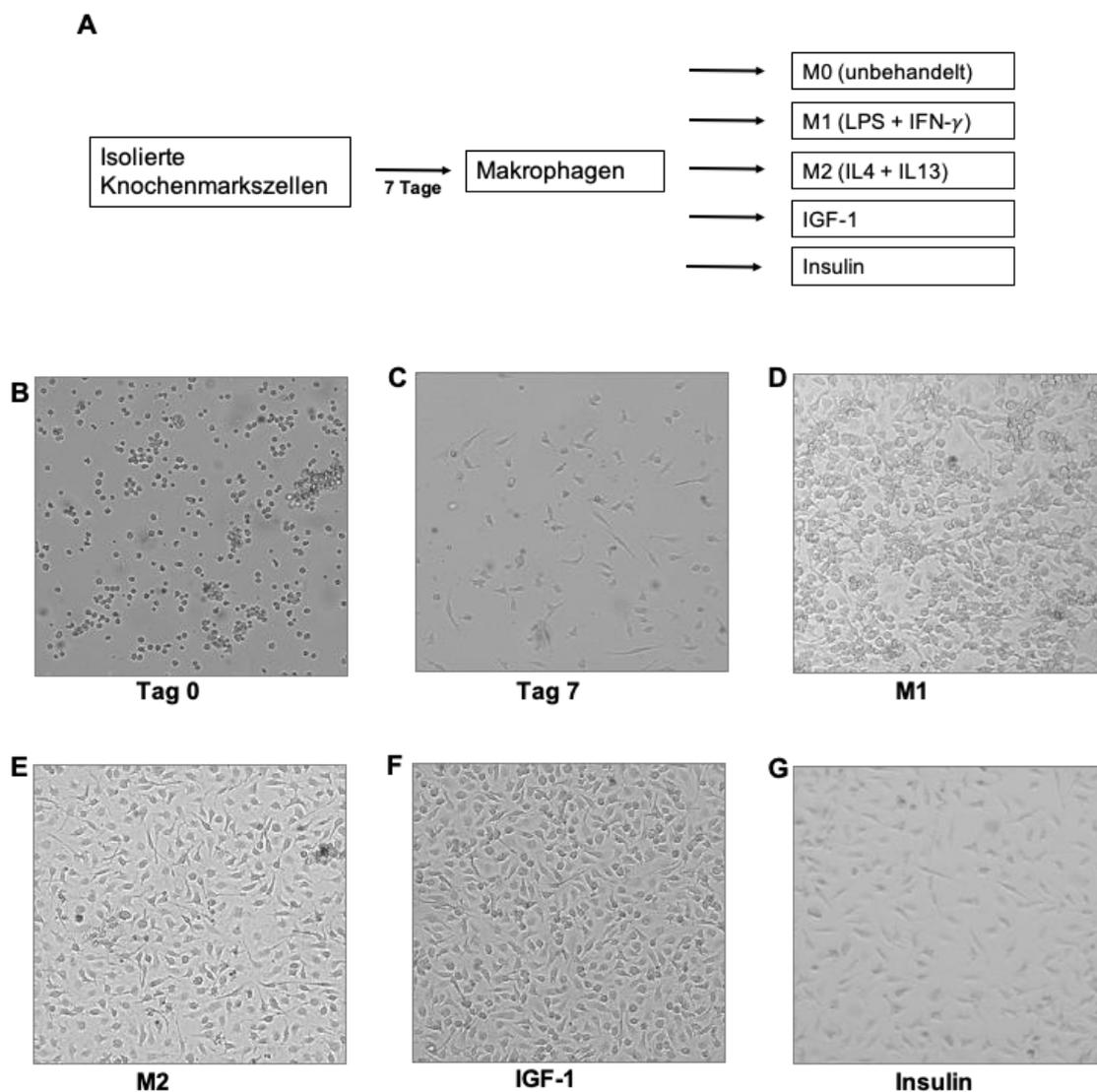


Abb. 8 Morphologie der Makrophagen In A wird der Versuchsablauf dargestellt. B – G zeigen repräsentative Aufnahmen der isolierten Zellen unmittelbar nach dem Aussäen (B), nach 7-tägiger Kultivierung (C) und nach der 48-stündigen Polarisierung. Gezeigt werden Bilder nach der Polarisierung mit LPS und IFN- γ zum M1-Phänotyp (D), mit IL4 und IL13 zum M2-Phänotyp (E), mit 10 ng/ml IGF1 (F) und mit 10 ng/ml Insulin (G).

3.2 Einfluss verschiedener Polarisierungsprotokolle auf die Genexpression

Nachdem bereits bei der mikroskopischen Betrachtung der behandelten Makrophagen Unterschiede in der Morphologie der verschiedenen Gruppen aufgefallen waren, wurden die verschiedenen Phänotypen näher auf Unterschiede in der Genexpression untersucht.

Zu diesem Zweck wurden dem Protokoll gemäß kultivierte und polarisierte Makrophagen mittels qPCR-Analyse auf die Expression verschiedener bekannter Marker-Gene für den M1- und den M2-Phänotyp von Makrophagen untersucht.

Neben einer unbehandelten M0-Gruppe erfolgte die Polarisierung für 48 Stunden mit LPS (10 ng/ml)/ IFN- γ (2 ng/ml) zum M1-Phänotyp, mit IL4 (30 ng/ml)/ IL13 (30 ng/ml) zum M2-Phänotyp, oder mit IGF1 oder Insulin in unterschiedlichen Konzentrationen (je 3, 10 und 30 ng/ml).

3.2.1 Die Expression von M1-Marker-Genen in Makrophagen ändert sich nach Behandlung mit IGF1 und Insulin nicht

Als Beispiele für bekannte Marker-Gene des klassischen M1-Makrophagen wurden *Tnf*, *Il12a* und *Nos2* herangezogen und ihre Expression unter den verschiedenen Polarisierungsbedingungen analysiert.

Abb. 9 zeigt das Ergebnis der Expressionsanalyse. Für die M1-Marker-Gene *Tnf* (Abb. 9 A), *Il12a* (Abb. 9 B) und *Nos2* (Abb. 9 C) zeigte sich wie zu erwarten ein Anstieg der Genexpression nach Behandlung mit LPS/ IFN- γ . Im Vergleich zu den unbehandelten Makrophagen zeigte sich ein ca. 20-facher Anstieg der TNF- α -Expression (*Tnf*), ein ca. 80-facher Anstieg der IL12-Expression (*Il12a*) und ein ca. 55.000-facher Anstieg der iNOS-Expression (*Nos2*). Diese M1-Marker-Gene wurden erwartungsgemäß nach M2-Polarisierung (IL4/ IL13) nicht induziert (Abb. 9). Die Behandlung mit Insulin oder IGF1 zeigte ebenfalls keine Induktion der M1-Markergene.

Um zu überprüfen, ob die verwendeten IGF1- bzw. Insulinkonzentrationen limitierend waren, wurden verschiedene Konzentrationen der Faktoren (3, 10, 30 ng/ml) eingesetzt. Dennoch war keine Induktion der M1-Markergene nachweisbar. Einmalig wurden bei der Polarisierung zusätzlich höhere Konzentrationen von IGF1 und Insulin (je 100 ng/ml) eingesetzt und die Auswirkungen auf die oben genannten M1-Marker-Gene untersucht. Wie auch für die geringeren Konzentrationen, zeigte sich unter der Behandlung mit 100 ng/ml

IGF1 und 100 ng/ml Insulin keine Steigerung der Expression der M1-Marker-Gene im Vergleich zur M0-Gruppe.

Insgesamt zeigte sich eine vermehrte Expression der drei M1-Marker TNF- α , IL12 und iNOS nur in den mit LPS und IFN- γ polarisierten Makrophagen, jedoch in keiner der anderen Gruppen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Polarisierung mit LPS und IFN- γ wie erwartet einen M1-Phänotyp in den Makrophagen induziert, während IL4 und IL13, IGF1 und Insulin diesen Effekt nicht zeigen.

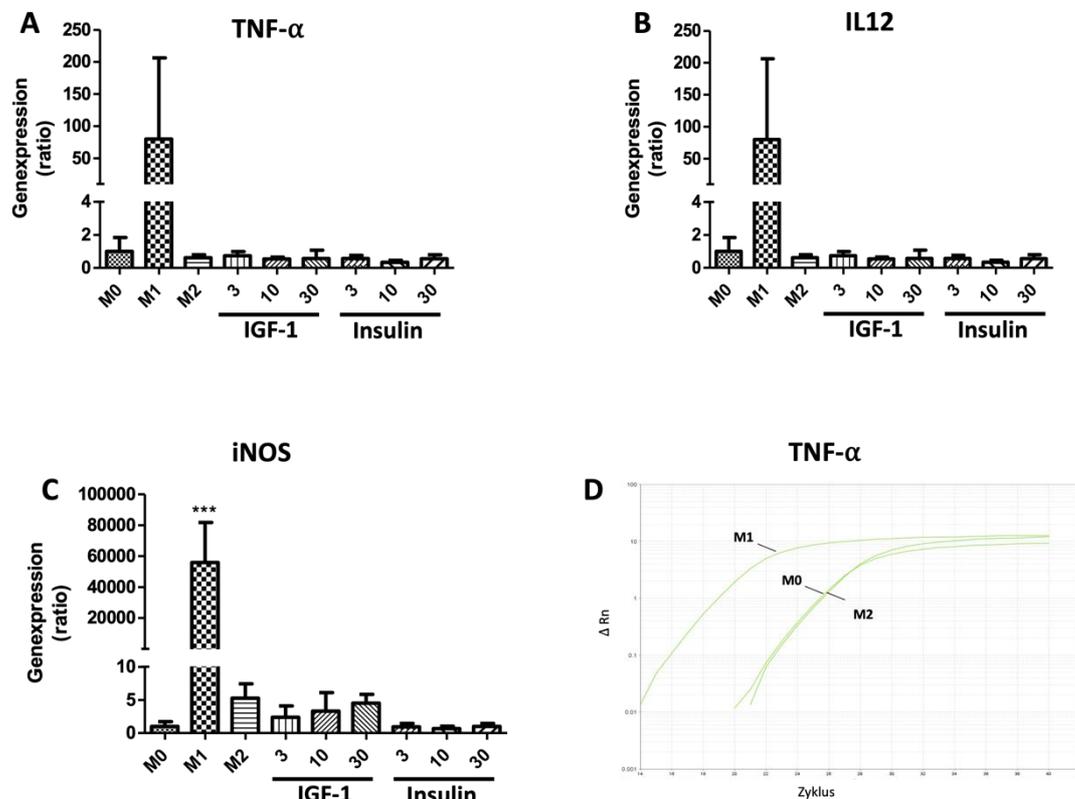


Abb. 9 qPCR-Analyse von M1-Marker-Genen in polarisierten Knochenmarkmakrophagen Neben einer unbehandelten M0-Gruppe erfolgte die Polarisierung der Makrophagen entweder mit LPS und IFN- γ zum M1-Phänotyp, mit IL4 und IL13 zum M2-Phänotyp oder mit IGF1 oder Insulin in unterschiedlichen Konzentrationen zwischen 3 und 30 ng/ml (Konzentrationsangaben von IGF1 und Insulin in ng/ml). Es wurden Genexpressions-Analysen für die M1-Marker-Gene *Tnf* (TNF- α) (A), *Il12a* (IL12) (B) und *Nos2* (iNOS) (C) durchgeführt. Die Berechnung erfolgte in Referenz zu einem housekeeping-Gen (*Nudc*) und wurde zur Expression in der M0-Gruppe normalisiert. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt und die statistische Signifikanz wurde mittels one way ANOVA gefolgt von Tukey's post hoc test ermittelt ($p < 0,05$, $n = 3$). D zeigt eine beispielhafte Amplifikationskurve der TNF- α -Expression in den Gruppen M1, M2 und M0 in logarithmischer Darstellung. Aufgetragen ist ΔRn (die auf einen passiven Referenzfarbstoff normalisierte Fluoreszenz des Rezeptor-Farbstoffs minus die baseline) gegen die Anzahl der PCR-Zyklen.

Abb. 9 D zeigt eine exemplarische Amplifikationskurve der TNF- α -Expression in der unbehandelten M0-Gruppe, der M1-polarisierten und der M2-polarisierten Gruppe in logarithmischer Darstellung. Im Laufe der qPCR-Zyklen wird ein fluoreszierender Farbstoff in die neu synthetisierten DNA-Fragmente des untersuchten Genabschnitts eingebaut. So erlaubt die Fluoreszenzintensität Rückschlüsse auf die Anzahl der vorhandenen Genkopien. Es zeigt sich üblicherweise zu einem Zeitpunkt der Amplifikationskurve ein steiler Anstieg der Fluoreszenz, der umso früher stattfindet, je mehr Genkopien zu Beginn der qPCR vorhanden waren.

3.2.2 IGF1, aber nicht Insulin induziert die Expression von M2-Marker-Genen in Makrophagen

In weiteren Analysen wurde die Expression typischer Marker-Gene für den M2-Phänotyp von Makrophagen untersucht. Abb. 10 zeigt das Ergebnis der Expressionsanalyse der M2-Marker-Gene *Mrc1* (Mannose-Rezeptor) (Abb. 10 A), *Arg1* (Arginase) (Abb. 10 B) und *Retnla* (Relm a) (Abb. 10 C).

Für alle drei Gene zeigte sich ein ähnliches Expressionsmuster in den unterschiedlich polarisierten Makrophagen-Gruppen. In den mit IL4/ IL13 polarisierten Zellen war, wie zu erwarten, eine Heraufregulation aller drei untersuchten Gene *Mrc1*, *Arg1* und *Retnla* im Vergleich zur unbehandelten Gruppe zu beobachten.

Interessanterweise zeigte sich eine Expressionssteigerung der drei untersuchten Gene auch in allen mit IGF1 behandelten Gruppen. Dabei war hinsichtlich der Expressionsstärke kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen IGF1-Konzentrationen feststellbar. Der Expressions-Anstieg der M2-Marker-Gene war in dem untersuchten Bereich (3 ng/ml – 30 ng/ml) durchweg vorhanden. Auch hier wurde einmalig zusätzlich eine höhere IGF1-Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. Der Anstieg der Expression der M2-Marker-Gene zeigte sich unter der Behandlung mit 100 ng/ml IGF1 ebenso, wie auch unter der Behandlung mit den geringeren IGF1-Konzentrationen.

Die Höhe des Anstiegs war dabei für die 3 untersuchten Gene durchaus verschieden. So zeigte sich in den verschiedenen Gruppen für das *Mrc1*-Gen durchschnittlich lediglich ein ca. 2 – 2,5-facher, allerdings signifikanter und gut reproduzierbarer Anstieg im Vergleich zur M0-Gruppe. Für *Arg1* und *Retnla* war der Genexpressions-Anstieg in den M2- und IGF1-behandelten Gruppen im Gegensatz zur unbehandelten Gruppe deutlich ausgeprägter,

allerdings auch variabler. Die Arginase-Expression war im Mittel ca. 1.200 – 2.300-fach, die Relm- α -Expression ca. 1.200 – 2.600-fach erhöht.

Überraschenderweise zeigten die Makrophagen, die mit Insulin behandelt wurden, ein anderes Verhalten als die mit IGF1 behandelten Makrophagen. So zeigte sich in den Insulin-behandelten Gruppen für keines der untersuchten M2-Marker-Gene eine Stimulation der Genexpression. Dabei war kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen mit den verschiedenen Insulin-Konzentrationen 3, 10 und 30 ng/ml zu erkennen. Auch unter der einmalig getesteten Insulin-Konzentration von 100 ng/ml zeigte sich für keines der drei untersuchten Gene ein Anstieg der Genexpression im Vergleich zur unbehandelten Gruppe. Erwartungsgemäß zeigte sich nach M1-Polarisierung mit LPS/ IFN- γ ebenfalls keine Hochregulation der Genexpression von MRC1, Arginase1 oder Relm- α im Vergleich zur unbehandelten Gruppe. Für die basale MRC1-Genexpression zeigte sich allerdings im Vergleich mit der M0-Gruppe eine signifikante Reduktion der Genexpression in den M1-polarisierten Zellen.

Insgesamt wurden die drei M2-Marker-Gene *Mrc1*, *Arg1* und *Retnla* nach Polarisierung mit IL4/ IL13 und IGF1, jedoch nicht nach Polarisierung mit Insulin oder den M1-Polarisierern LPS und IFN- γ heraufreguliert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Wachstumsfaktor IGF1 wie die klassischen M2-Cytokine IL4/ IL13 einen M2-Phänotyp in Makrophagen induziert. Trotz der ähnlichen Funktion zu IGF1 scheint Insulin diesen Effekt nicht zu vermitteln.

Abb. 10 D zeigt beispielhaft eine Amplifikationskurve der Arginase-Expression in der unbehandelten M0-Gruppe, der M2-polarisierten (IL4/IL13) und den mit 10 ng/ml IGF1 und 10 ng/ml Insulin polarisierten Gruppen in linearer Darstellung. Es zeigt sich bei der Betrachtung der Kurven, dass der steile Fluoreszenz-Anstieg der M2-polarisierten und der IGF1-polarisierten Gruppen etwa 10 Zyklen vor dem der unbehandelten und Insulin-behandelten Gruppe auftritt. Dies deutet auf eine ca. 500-1000-fach höhere Arginase-Expression in M2-polarisierten bzw. IGF1-behandelten Makrophagen als in Kontrollzellen bzw. Insulin-behandelten Zellen hin.

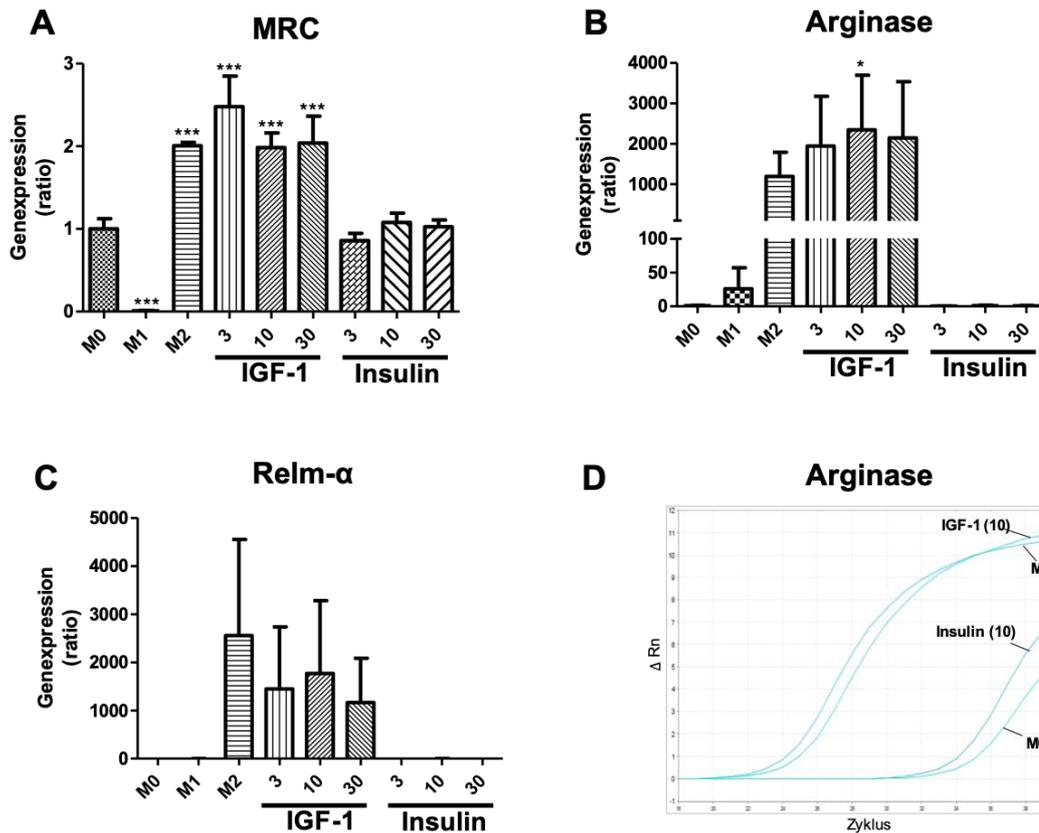


Abb. 10 qPCR-Analyse von M2-Marker-Genen in polarisierten Knochenmarkmakrophagen Neben einer unbehandelten M0-Gruppe erfolgte die Polarisierung entweder mit LPS und IFN- γ (M1), mit IL4 und IL13 (M2) oder IGF1 oder Insulin in unterschiedlichen Konzentrationen. Die Konzentrationsangaben von IGF1 und Insulin sind in ng/ml. Es wurden Genexpressions-Analysen für die M2-Marker-Gene *Mrc1* (MRC) (A), *Arg1* (Arginase) (B) und *Retnla* (Relm- α) (C) durchgeführt. Die Berechnung erfolgte in Referenz zu einem *housekeeping*-Gen (*Nude*) und wurde zur Expression in der M0-Gruppe normalisiert. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt und die statistische Signifikanz wurde mittels *one way ANOVA* gefolgt von *Tukey's post hoc test* ermittelt ($p < 0,05$), $n = 3$. D zeigt eine beispielhafte Amplifikationskurve der Arginase-Expression in den Gruppen M2, IGF1 (10 ng/ml), M0 und Insulin (10 ng/ml). Aufgetragen ist ΔR_n (die auf einen passiven Referenzfarbstoff normalisierte Fluoreszenz des Rezeptor-Farbstoffs minus die *baseline*) gegen die Anzahl der PCR-Zyklen.

3.3 Durchflusszytometrische Untersuchungen: Die Expression des M2 Markers CD206 ist auf Makrophagen nach IGF1 Behandlung nachweisbar

Nachdem in der qPCR-Analyse auf Genexpressions-Ebene erste Hinweise auf eine unterschiedliche Polarisierung von Makrophagen durch IGF1 und Insulin gesammelt werden konnten, erfolgten durchflusszytometrische Messungen, um das bisher entstandene Bild der

verschiedenen Makrophagen-Phänotypen durch die Untersuchung von Oberflächenantigenen zu ergänzen.

Dazu wurden erneut isolierte und kultivierte Knochenmarkmakrophagen 48 Stunden lang mit verschiedenen Agonisten polarisiert. Anschließend wurden durchflusszytometrische Messungen an dem Durchflusszytometer FACS Canto II von BD (Becton, Dickinson Company) durchgeführt.

Abb. 11 zeigt am Beispiel unbehandelter M0-Makrophagen die Messungen, welche für jede Probe durchgeführt wurden. Die Daten werden hier als *Dotplots* dargestellt, wobei jedes Ereignis (jede Zelle) durch einen einzelnen Punkt repräsentiert wird.

Zunächst wurde in drei Schritten die Population der vereinzelt, lebenden Zellen bestimmt.

Abb. 11 A zeigt *sideways scatter-area*, einen Parameter für die Granularität der Partikel, über *forward scatter-area*, einem Parameter für die Größe der Partikel. So wurde anhand von Größe und Granularität der Partikel die Population aller Zellen bestimmt und Zelltrümmer ausgeschlossen. In Abb. 11 B wird *forward scatter-height* gegen *forward scatter-area* aufgetragen, um durch den Vergleich von Fläche und Höhe der Partikel die Population der Einzelzellen zu identifizieren und aneinanderhaftende Zellen auszuschließen.

In Abb. 11 C ist der Nachweis toter Zellen mit dem Avitalfarbstoff 7-AAD (7-Aminoactinomycin) dargestellt, die genutzt wurde, um tote Zellen auszuschließen, sodass als zu untersuchende Zellpopulation die lebenden, einzeln liegenden Zellen übrigblieben.

Mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen F4/80, MHCII und CD11b (Abb. 11 D – F) wurden innerhalb dieser Population lebender Einzelzellen die Makrophagen markiert. Zur näheren Charakterisierung des Makrophagen-Phänotyps wurde ein CD38-Antikörper als Marker für den M1-Phänotyp (Abb. 11 G) und ein CD206-Antikörper als Marker für den M2-Phänotyp (Abb. 11 H) genutzt.

In den *Dotplots* Abb. 11 D – H wird jeweils der Parameter *sideways scatter-area* gegen die Fluoreszenzintensität im entsprechenden Kanal aufgetragen. Die Fluoreszenzintensität wird vom Durchflusszytometer für jedes einzelne Partikel gemessen und bezieht sich auf die eingesetzten fluoreszenzmarkierten Antikörper. So können anhand der gemessenen Fluoreszenzintensität quantitative Rückschlüsse auf die Menge der an eine Zelle gebundenen Antikörper und die Expression des untersuchten Oberflächenantigens gezogen werden.

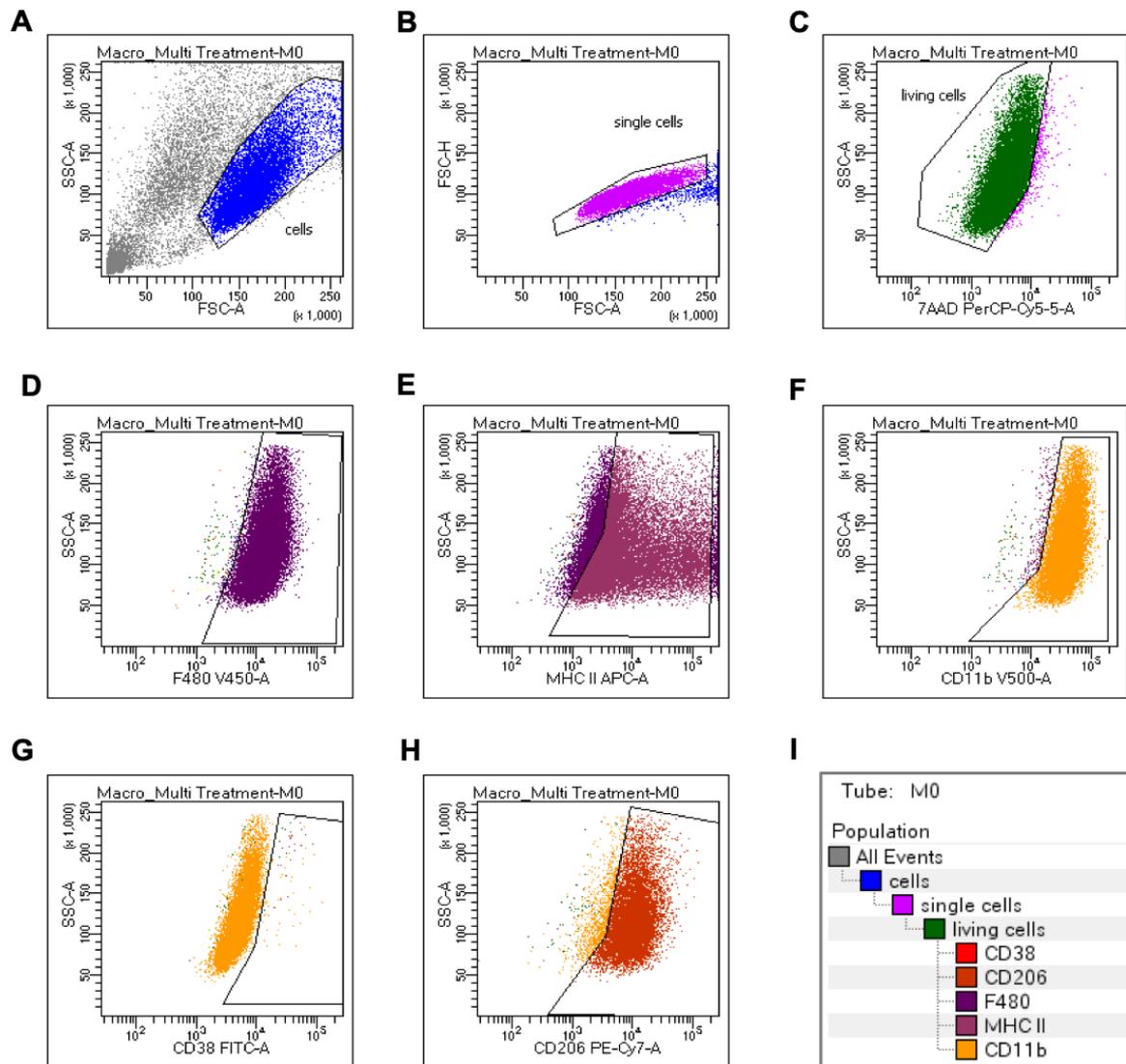


Abb. 11 Aufbau der durchflusszytometrischen Messreihen Dargestellt werden die Messungen, welche für jede einzelne Probe durchgeführt wurden. A: Bestimmung der Population aller Zellen mithilfe der Parameter *sideways scatter-area* und *forward scatter-area*. B: Bestimmung der Population der Einzelzellen mithilfe der Parameter *forward scatter-height* und *forward scatter-area*. C: Ausschluss der toten Zellen mittels des fluoreszierenden Interkalators 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) und Bestimmung der Population der lebenden Einzelzellen. D – F: Die Antikörper F4/80 (D), MHC-II (E) und CD11b (F) wurden genutzt, um Makrophagen zu markieren. G, H: CD38 wurde als Marker für den M1-Phänotyp (G), CD206 als Marker für den M2-Phänotyp (H) genutzt. I: Farblegende

Um in der Durchflusszytometrie innerhalb der Population der lebenden Einzelzellen die Makrophagen-Population zu bestimmen, wurde ein Antikörper gegen das Oberflächenantigen F4/80 genutzt. Abb. 12 zeigt die F4/80-Expression in den verschiedenen Gruppen. Eingesetzt wurden eine unbehandelte M0-Gruppe, eine zum M1-Phänotyp polarisierte und eine zum M2-Phänotyp polarisierte Gruppe, sowie eine mit 10 ng/ml IGF1 und eine mit 10 ng/ml Insulin polarisierte Gruppe.

Abb. 12A zeigt beispielhaft einen *Dotplot* der unbehandelten M0-Gruppe, wobei die F4/80-positiven Zellen in lila dargestellt werden. Bei der Betrachtung aller Gruppen exprimierten durchschnittlich zwischen 95,3 % und 99,7 % der lebenden Einzelzellen F4/80. Dies entspricht dem Anteil der Makrophagen an der Population der lebenden Einzelzellen. Zwischen den verschiedenen Gruppen gab es dabei keinen signifikanten Unterschied in der F4/80-Expression. Diese Ergebnisse zeigen, dass die verwendeten Zellpopulationen sehr hoch angereicherte Makrophagenpopulationen darstellten und sich als Grundlage für Messungen von M1- und M2-Markern eignen.

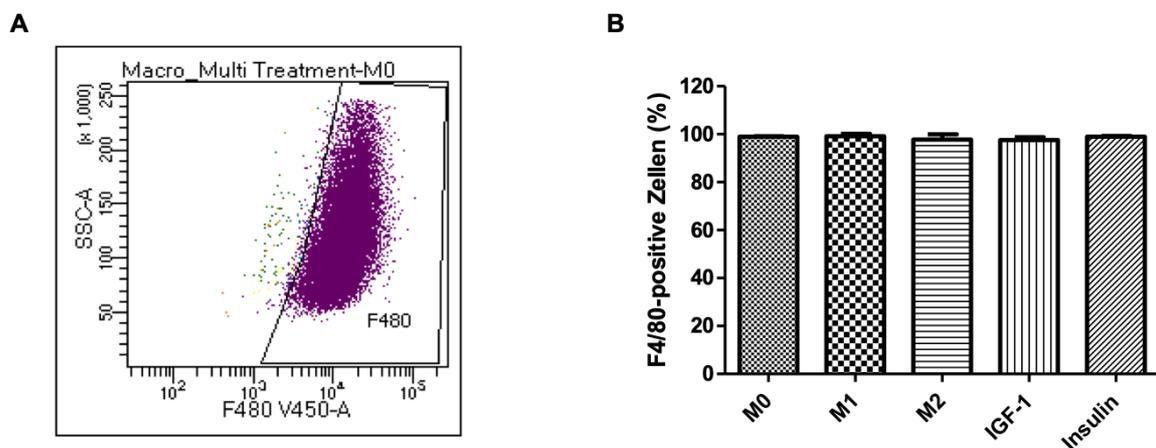


Abb. 12 F4/80-Expression der Knochenmarkmakrophagen in der Durchflusszytometrie
 Knochenmarkmakrophagen wurden für 48 Stunden mit LPS und IFN- γ zu M1-Makrophagen, mit IL4 und IL13 zu M2-Makrophagen, mit 10 ng/ml IGF1 oder 10 ng/ml Insulin polarisiert. Zusätzlich gab es eine unbehandelte Gruppe (M0). A: Darstellung der F4/80-Expression anhand eines beispielhaften *Dotplots* der M0-Gruppe. Die F4/80-positiven Zellen werden in lila dargestellt. B: Anteil der F4/80-positiven Zellen an der Population aller lebenden Einzelzellen in den verschiedenen Gruppen. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt (n = 3).

3.3.1 Expression von CD38

Als Marker für den M1-Phänotyp wurde ein CD38-Antikörper eingesetzt. Abb. 13 zeigt die CD38 Expression in den verschiedenen Gruppen.

In Abb. 13 A – E werden *Dotplots* der unterschiedlich polarisierten Makrophagen gezeigt. Dabei sind die CD38-positiven Zellen in lila dargestellt. Bereits bei der Betrachtung der *Dotplots* fällt auf, dass in der M1-polarisierten Gruppe deutlich mehr CD38-positive Zellen vorhanden waren als in den anderen Gruppen.

Bei der rechnerischen Auswertung der Fluoreszenzintensität war die Fluoreszenz in den M1-polarisierten Makrophagen im Vergleich zur unbehandelten Gruppe etwa 6-fach höher (Abb. 13 F). Weder für die M2-polarisierten noch für die mit IGF1 oder Insulin behandelten Makrophagen war ein solcher Effekt zu beobachten.

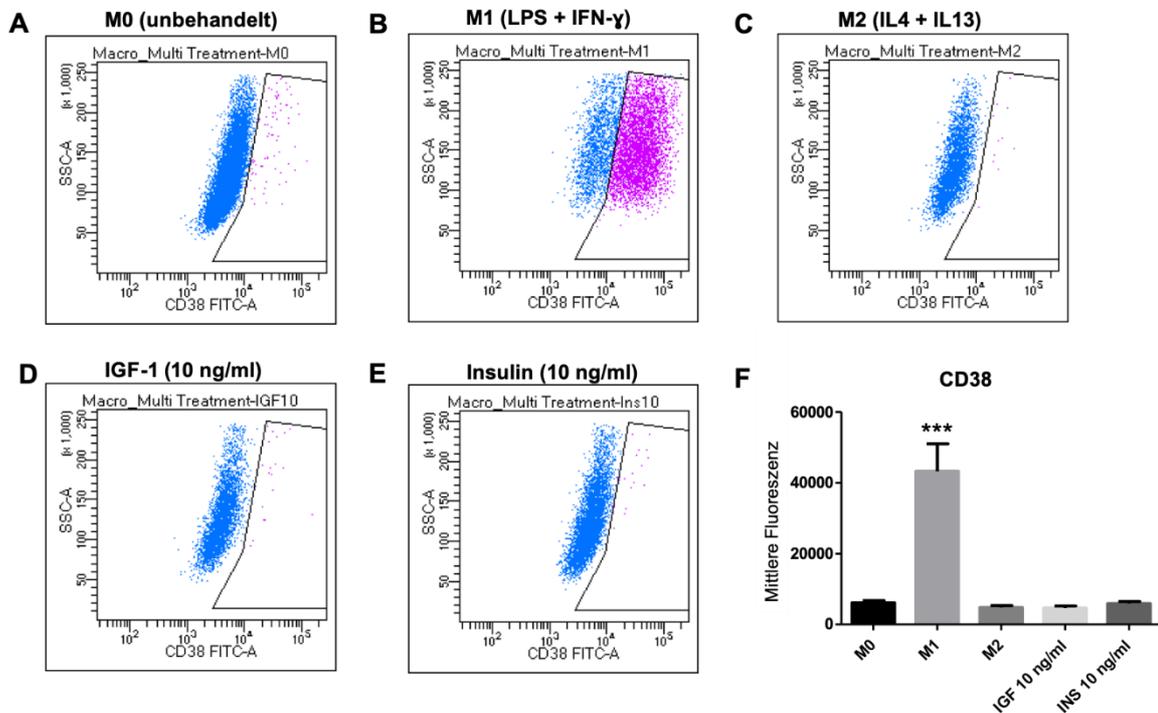


Abb. 13 Facs-Analyse der CD38-Expression Knochenmarkmakrophagen wurden für 48 Stunden mit LPS und IFN- γ zu M1-Makrophagen (B), mit IL4 und IL13 zu M2-Makrophagen (C) oder mit 10 ng/ml IGF1 (D) oder Insulin (E) polarisiert. Zusätzlich gab es eine unbehandelte Gruppe (A). Die Zellen wurden mit einem CD38-Antikörper gefärbt und im Durchflusszytometer Facs-Canto II von BD gemessen. In lila sind die CD38-positiven Zellen markiert. F zeigt die mittlere CD38-Fluoreszenz in den verschiedenen Gruppen. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt und die statistische Signifikanz wurde mittels *one way ANOVA* gefolgt von *Tukey's post hoc test* ermittelt ($p < 0,05$), $n = 3$.

3.3.2 Expression von CD206

Ein Antikörper gegen CD206 (Mannose-Rezeptor) wurde als Marker für den M2-Phänotyp verwendet (Abb. 14).

Die *Dotplots* der unterschiedlich polarisierten Makrophagen (Abb. 14 A – E) zeigen die CD206-positiven Zellen in hellblau. Die *Dotplots* weisen darauf hin, dass in der M2-polarisierten Gruppe und der IGF1-polarisierten Gruppe mehr CD206-positive Zellen

vorhanden waren als in der M0-Gruppe. In Übereinstimmung mit den qPCR-Daten verhalten sich die beiden Gruppen hier also gleich und zeigen ein Merkmal des M2-Phänotyps.

In der M1-polarisierten Gruppe hingegen erscheinen eher weniger CD206-positive Zellen und in der Insulin-behandelten Gruppe ähnlich viele wie in der M0-Gruppe. Diese Effekte sind anhand der *Dotplots* nicht ganz eindeutig auszumachen, werden aber durch die rechnerische Auswertung der Fluoreszenzintensität unterstützt (Abb. 14 F).

Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zeigte sich in der IL4/IL13- und IGF1-behandelten Gruppe eine signifikant erhöhte CD206-abhängige Fluoreszenz. Die Fluoreszenz war in beiden Gruppen etwa doppelt so hoch wie in der M0-Gruppe. In der LPS/IFN- γ -behandelten Gruppe war die CD206-abhängige Fluoreszenz auf ca. 50 % im Vergleich zu der unbehandelten Gruppe reduziert. Die Insulin-behandelten Zellen verhielten sich anders als die IGF1-behandelten Zellen und zeigten in der CD206-Fluoreszenz keinen signifikanten Unterschied zur M0-Gruppe.

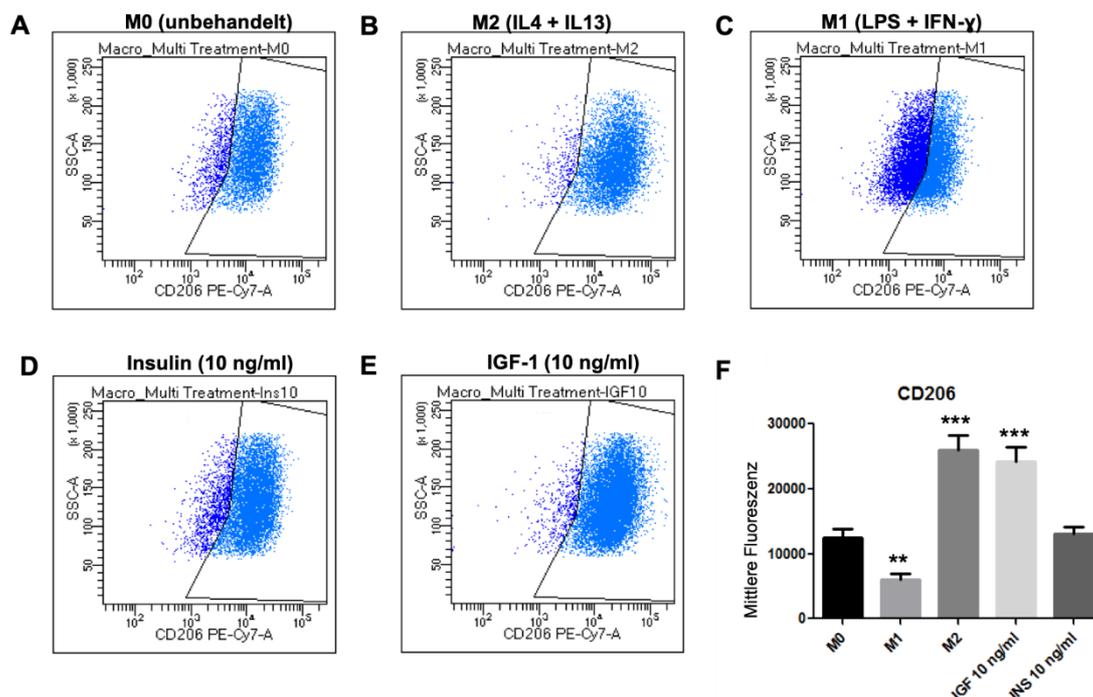


Abb. 14 Facs-Analyse der CD206-Expression Knochenmarkmakrophagen wurden für 48 Stunden mit IL4 und IL13 zu M2-Makrophagen (B), mit LPS und IFN- γ zu M1-Makrophagen (C) oder mit 10 ng/ml Insulin (D) oder IGF1 (E) polarisiert. Es gab eine unbehandelte Gruppe (A). Die Zellen wurden mit einem CD206-Antikörper gefärbt und im Durchflusszytometer Facs-Canto II von BD gemessen. In hellblau sind die CD206-positiven Zellen dargestellt. F zeigt die mittlere CD206-Fluoreszenz in den verschiedenen Gruppen. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt und die statistische Signifikanz wurde mittels *one way ANOVA* gefolgt von *Tukey's post hoc test* ermittelt ($p < 0,05$), $n = 3$.

In Abb. 15 werden zur Veranschaulichung dieser Ergebnisse repräsentative Histogramme der CD206-Messungen gezeigt. Zu sehen ist, dass in der unbehandelten, sowie der Insulin-behandelten Gruppe die höchste Zellzahl bei einer Fluoreszenz-Intensität von ca. 10^4 lag. In der M1-polarisierten Gruppe lag die Fluoreszenzintensität der meisten Zellen bei einem geringeren, in der M2-polarisierten und der IGF1-behandelten Gruppe bei einem höheren Wert.

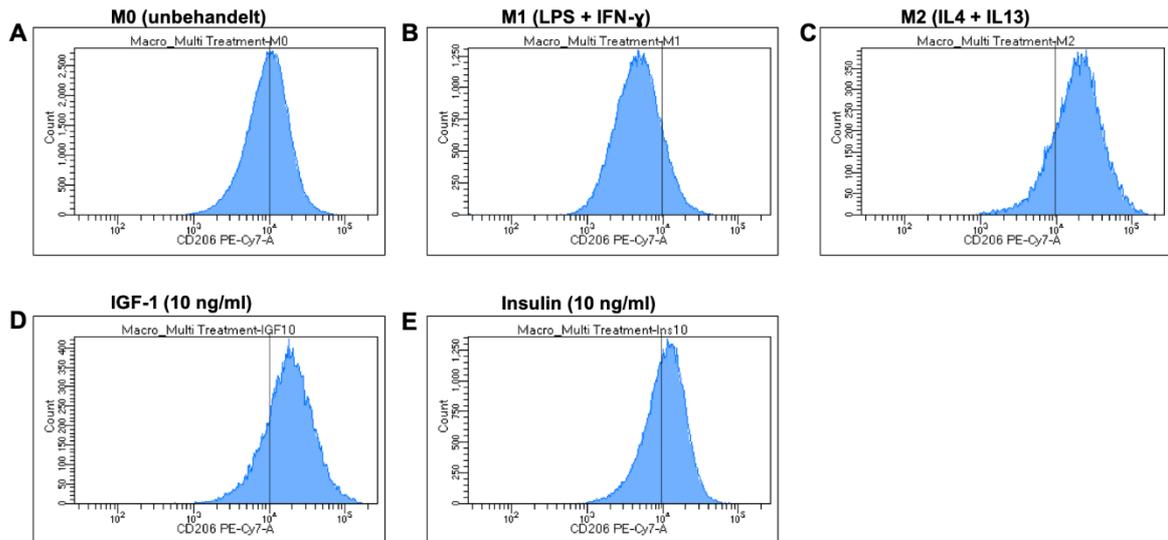


Abb. 15 Facs-Analyse der CD206-Expression Repräsentative Histogramme der Facs-Analyse aus Abb. 14. Aufgetragen wird die Zellzahl gegen die Fluoreszenz-Intensität. Die Zellen waren entweder unbehandelt (A), zum M1-Phänotyp polarisiert (B), zum M2-Phänotyp polarisiert (C) oder mit 10 ng/ml IGF1 (D) oder 10 ng/ml Insulin (E) polarisiert. Zur besseren Veranschaulichung ist bei einer Fluoreszenz-Intensität von 10^4 durch alle Graphen eine Referenz-Linie gezogen.

Um die Auswirkung der Konzentrationen von IGF1- und Insulin genauer zu untersuchen, wurde einmalig eine Messung mit verschiedenen Konzentrationen der beiden Hormone zwischen 3 und 100 ng/ml durchgeführt. In allen IGF1-behandelten Gruppen zeigte sich im Gegensatz zur M0-Gruppe eine ähnlich stark erhöhte CD206-Expression. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die CD206-Expression nach IGF1-Behandlung in dem untersuchten Bereich konzentrationsunabhängig erhöht ist.

In den Gruppen, die mit Insulin behandelt wurden, war im Vergleich zur M0-Gruppe kein Unterschied in der CD206-Expression zu erkennen. Es war also auch bei einer Polarisierung mit 100 ng/ml Insulin keine Erhöhung der CD206-Expression zu sehen.

3.4 Western Blots: Die Behandlung mit IGF1 induziert phosphoSTAT6

Nachdem die bisher gesammelten Ergebnisse eine Induktion des M2-Phänotyps durch IGF1 zeigten, sollten die Mechanismen der IGF1-abhängigen M2-Polarisierung näher untersucht werden. Wie in 1.1.2 beschrieben, ist in der Literatur bekannt, dass STAT6 ein Schlüsselprotein in dem Aktivierungsweg von M2-Makrophagen durch IL4 ist. Um den Fragen nachzugehen, ob IGF1 in Makrophagen wie IL4 STAT6 aktiviert, ob klassische Downstream-Ziele der IGF1-Signaltransduktion wie die Proteinkinase B (AKT) aktiviert werden und wie sich Insulin in dieser Hinsicht verhält, wurden Western-Blot-Experimente durchgeführt.

Abb. 16 zeigt exemplarisch eine Western Blot Analyse, in der die Phosphorylierung von STAT6, AKT und STAT1 untersucht wurde. STAT1 ist dabei ein bekanntes Schlüsselprotein in dem Aktivierungsweg zu M1-Makrophagen. Es zeigt sich, dass STAT1 nur in LPS/IFN γ stimulierten (M1-) Makrophagen vermehrt phosphoryliert wird. Weder IL4 noch IGF1 oder Insulin führten zu einer Phosphorylierung von STAT1.

Die Phosphorylierung von STAT6 wurde, wie in der Literatur beschrieben in den IL4-abhängig zum M2-Phänotyp polarisierten Makrophagen nachgewiesen. Interessanterweise führte die Behandlung mit IGF1 ebenfalls zu einer STAT6-Phosphorylierung. In den Insulin-behandelten Zellen zeigte sich hingegen keine Phosphorylierung von STAT6. Ebenso wurde in den M0- und M1-behandelten Gruppen kein phosphoryliertes STAT6 detektiert.

Gesamt-AKT und phosphoryliertes AKT wurde unter allen Kultivierungsbedingungen nachgewiesen. Dabei zeigte sich in den IGF1- und Insulin-behandelten Gruppen kein quantitativer Anstieg an phosphoryliertem AKT in Gegensatz zu den anderen Gruppen.

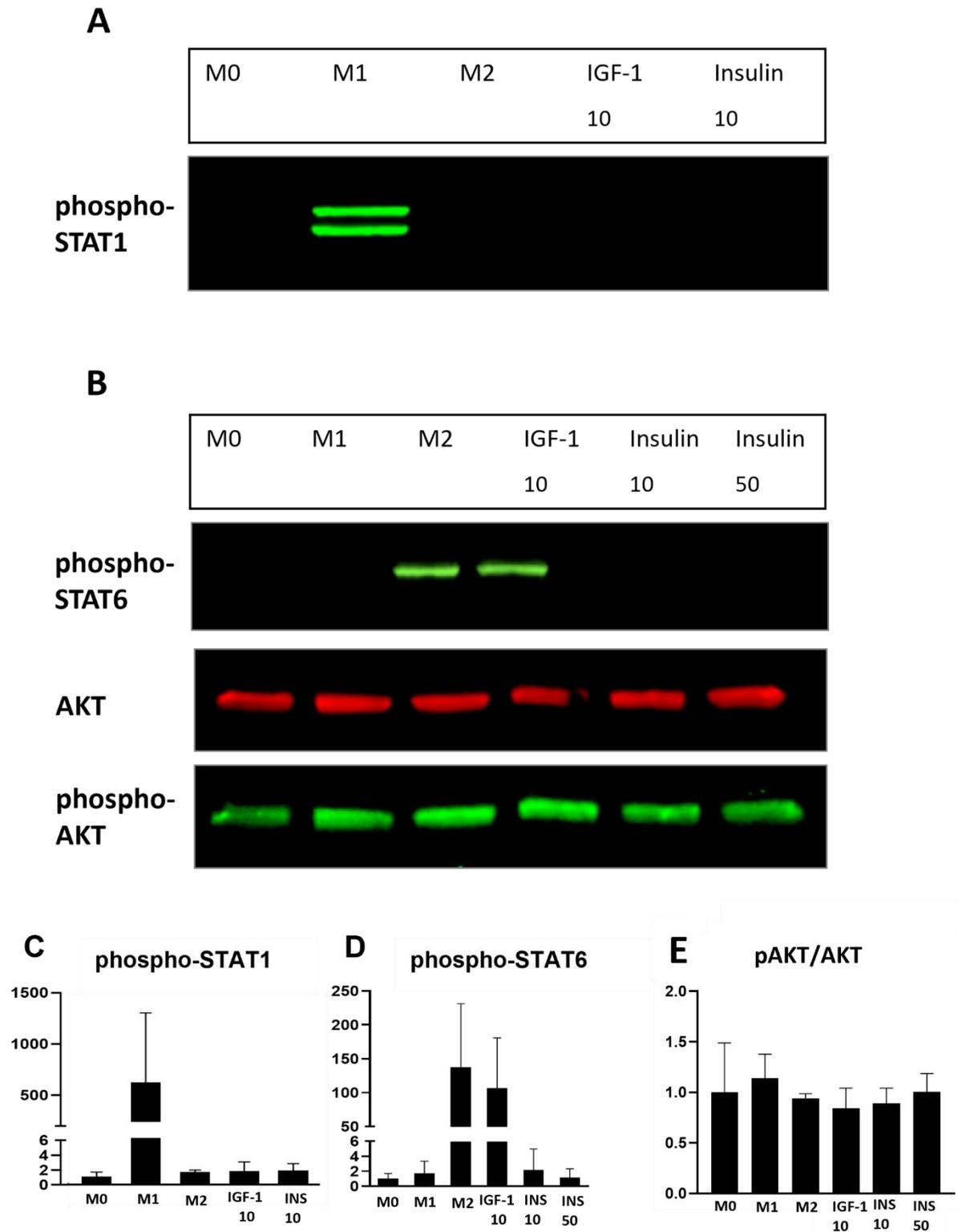


Abb. 16 Western Blot-Analyse der Phosphorylierung von STAT1, STAT6 und AKT
 Knochenmarkmakrophagen wurden für 48 Stunden mit LPS/IFN- γ („M1“), mit IL4/IL13 („M2“) oder mit IGF1 oder Insulin behandelt. Es gab eine unbehandelte Gruppe. Die Konzentrationen von IGF1 und Insulin werden in ng/ml angegeben. Proteinlysate wurden erstellt und Western Blots mit den angegebenen Antikörpern durchgeführt. Hier wird ein repräsentativer Western Blot von n = 3 durchgeführten Experimenten gezeigt. C - E: Quantitative Auswertung, die Daten werden als Mittelwert +- Standardabweichung dargestellt.

In weiteren Untersuchungen wurde die Kinetik der IGF1-stimulierten STAT6-Phosphorylierung untersucht. Zu diesem Zweck wurden Knochenmarkmakrophagen über Nacht unter Serum-Entzug (Hungermedium, s. 2.5.3) inkubiert, um Signaltransduktionsprozesse in den Zellen und vor allem Proteinphosphorylierungen zu reduzieren. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ng/ml IGF1 für Zeiträume zwischen 2 min und 30 min stimuliert (Abb. 17). Die Analyse der STAT6-Phosphorylierung im Western Blot zeigte phosphoryliertes STAT6 in allen mit IGF1 behandelten Gruppen. STAT6 lag also bereits nach einer zweiminütigen IGF1-Stimulation in phosphorylierter Form vor.

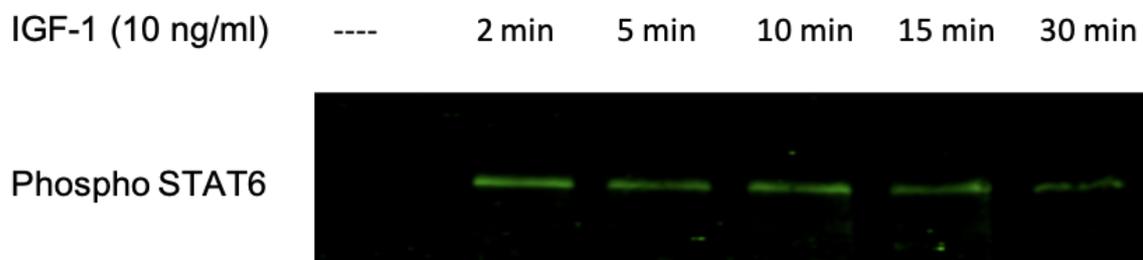


Abb. 17 STAT6-Phosphorylierung nach kurzzeitiger IGF1-Stimulation Knochenmarkmakrophagen wurden über Nacht im Makrophagen-Hungermedium gehungert und anschließend unterschiedlich lange mit 10 ng/ml IGF1 stimuliert. Proteinlysate wurden erstellt und in der Western Blot-Analyse die Phosphorylierung von STAT6 untersucht.

Bis hierher zeigen die Untersuchungen insgesamt einen Einfluss von IGF1, aber nicht von Insulin auf die Polarisierung von Makrophagen, da nach Behandlung mit IGF1 (1) die Genexpression von M2-Markern induziert wird, (2) die Expression des M2-Markers CD206 auf der Oberfläche von Makrophagen nachweisbar ist und (3) die Phosphorylierung von STAT6 induziert wird.

3.5 Zellsortierung und Sequenzierung: IL4- und IGF1 zeigen auf Transkriptions-Ebene identische Effekte

Nachdem die Western Blot-Experimente eine Aktivierung von STAT6 durch IGF1, sowie durch IL4, aber nicht durch Insulin zeigten, wurden mittels *next generation sequencing* Sequenzanalysen polarisierter Makrophagen durchgeführt, um die entstandenen Phänotypen genauer zu analysieren und die mit der Polarisierung verbundenen Signaltransduktionswege

zu verstehen, sowie aus dem Genexpressionsmuster Schlüsse auf die Funktion der Makrophagen-Typen zu ziehen.

Wie in Abschnitt 2.15 beschrieben, wurden nach der Stimulation mit verschiedenen Agonisten mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung die Makrophagen aus der gesamten Zellpopulation isoliert. Anschließend wurde aus den gereinigten Zellen die RNA isoliert und Sequenzanalysen durchgeführt. Untersucht wurden Makrophagen, die entweder mit IL4 (10 ng/ml) zum M2-Phänotyp, bzw. mit 10 ng/ml IGF1, 10 ng/ml Insulin oder 100 ng/ml Insulin polarisiert wurden. Außerdem wurden M-CSF-behandelte Makrophagen als Kontrollgruppe analysiert.

Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse der Sequenzierungs-Experimente. Die Auswertung der Transcriptomdaten erfolgte mittels Principal Component Analyse (Abb. 18 A) und hierarchischer Clusteranalyse (Abb. 18 B). Dabei ergab sich, dass die unterschiedlichen Insulin-Konzentrationen keinen unterschiedlichen Einfluss auf die veränderte Genexpression hatten, so dass in der Darstellung nicht zwischen den 10 und 100 ng/ml Insulin-Proben unterschieden wurde. Es zeigt sich, dass die einzelnen Behandlungen prinzipiell zu 4 Subgruppen mit ähnlichem Expressionsprofil führen, die sich deutlich voneinander abgrenzen lassen (Abb. 18 A). Die erste Gruppe beinhaltet die M-CSF Kontrollgruppe und spiegelt das Genexpressionsprofil der Makrophagen am Ende der Kultivierung wider. IL4-, Insulin- und IGF1-Behandlung führen zu einem stark veränderten Expressionsprofil. Mittels hierarchischem Clustering (Abb.18 B) lässt sich das Genexpressionsprofil der IL4-behandelten, zu M2-Makrophagen polarisierten Zellen deutlich von den M-CSF-behandelten Makrophagen abgrenzen. Hierbei fällt auf, dass es über viele Gene zu einer gegenläufigen Expression beim direkten Vergleich von M-CSF und IL4-behandelten Zellen kommt. Betrachtet man nun die Daten von mit Insulin und IGF1-polarisierten Zellen, findet man Gengruppen, die im Vergleich zu M-CSF durch Insulin oder IGF1 gleichsinnig herauf- oder herunterreguliert werden (grüne Boxen, Abb. 18 B). Zusätzlich lassen sich Gene nachweisen, die durch IGF1 und IL4 in ähnlicher Weise reguliert werden und die sich in ihrer Expression von M-CSF- und Insulin-behandelten Zellen unterscheiden (rote Boxen, Abb. 18 B).

Diese Daten legen nahe, dass IGF1 und Insulin trotz ihrer normalerweise sehr ähnlichen Signaltransduktion über den PI3-Kinase/Akt-Weg bzw. den Erk-Signalweg zum Teil unterschiedliche Expressionsmuster induzieren. Insbesondere zeigte sich, dass IGF1 zu

Abb. 18 Ergebnisse der Sequenzierungs-Experimente. Die Auswertung der Sequenzierungs-Ergebnisse mittels *principal component analysis* (A) und hierarchischer Clusteranalyse (B) ergab vier Subgruppen mit jeweils ähnlichem Expressionsprofil. Rote Boxen: Gleichsinnig veränderte Geneexpression in IL4- und IGF1-polarisierten Makrophagen. Grüne Boxen: Gleichsinnig veränderte Geneexpression in Insulin- und IGF1-polarisierten Makrophagen.

In weiteren Analysen wurde mittels Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Qiagen) untersucht, welche bekannten Signalwege die beobachteten Veränderungen im Genexpressionsprofil verursacht haben könnten. Zu diesem Zweck wurden die signifikant unterschiedlich exprimierten Gene (Expressionsunterschied ± 1.5 -fach, $p < 0.05$ vs. M-CSF) mit dem „Upstream-Regulator“ Werkzeug in IPA untersucht. Abb. 19 zeigt das Ergebnis dieser Analysen für IL4, IGF1, und Insulin, jeweils vs. M-CSF. Als Balken sind die jeweiligen P-Werte dargestellt, die die Wahrscheinlichkeit kennzeichnen, dass der jeweils genannte Signalweg an der Regulation des Genexpressionsprofils beteiligt ist. Zusätzlich sind als Punkte die Aktivierungs-Z-Scores dargestellt, mit denen überprüft wird, ob sich in den beobachteten Genexpressionsveränderungen eine konsistente Richtung der von einem Regulator kontrollierten Gene findet. Bei einem Z-score > 2 geht man von einer Aktivierung des Regulators, bei einem Z-score < -2 von einer Hemmung des Regulators aus.

Diese Analyse zeigt, dass für IL4-behandelte Makrophagen (Abb. 19 A) mit $P < 10^{-55}$ und einem Z-Score > 5 IL4 selbst der am stärksten heraufregulierte Regulator ist, der die Genexpressionsveränderungen nach IL4 verursacht haben könnte, gefolgt von STAT6 ($P < 10^{-35}$, $Z > 5$). Wie zu erwarten, findet die IPA-Analyse also für die IL4-Behandlung IL4- und STAT6-Aktivierung als Ursache für die beobachteten Genexpressionsveränderungen. Ebenso ist CITED2 ein bekannter Regulator, der die Polarisierung von Makrophagen zum M2-Phänotyp vermittelt. Interessanterweise sind IL4 und STAT6 bei den IGF1-polarisierten Makrophagen ebenfalls die Signalwege, die mit den niedrigsten P-Werten und Z-scores > 4 als mögliche Aktivatoren der beobachteten Genexpressionsveränderungen identifiziert wurden. Diese Signalwege wurden nach Insulin-Behandlung nicht identifiziert. Sowohl bei IGF1 als auch bei Insulin-behandelten Zellen erschien Mek unter den aktivierten Regulatoren, welches Teil der kanonischen Signaltransduktion über den InsR/IGFR-Ras-Mek-Erk Signalweg ist.

Im Gegensatz zu den IL4/IGF1-polarisierten Zellen zeigte sich nach Insulin-Behandlung auch Tgf- β unter den aktivierten Faktoren. Insulin induzierte dabei einige Markergene, die auch in aktivierten Fibroblasten zu finden sind, wie z.B. *Acta2*, *Postn*, *Tgln* und *Col1A2*. Die

übrigen gelisteten Aktivatoren fanden sich in allen drei Gruppen, zum Teil mit niedrigeren Z-scores, so dass sie hier in der Darstellung nicht berücksichtigt wurden.

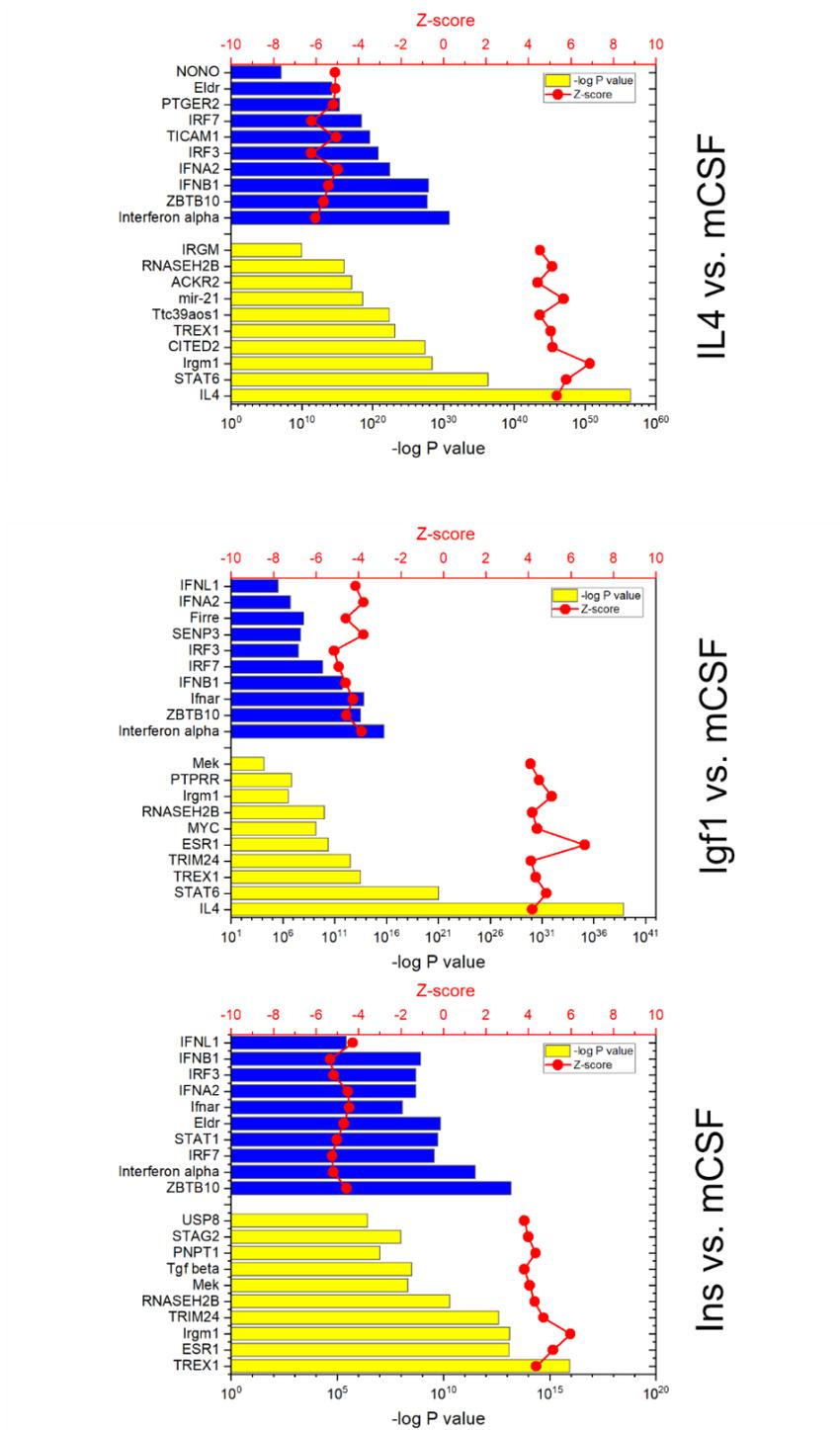


Abb. 19: Ergebnis der Upstream Regulator Analyse mit Hilfe der IPA software. Die Balken geben den P-Wert für die Aktivierung (gelb) bzw. Hemmung (blau) des jeweiligen Aktivators wieder. Die roten Punkte kennzeichnen den Z-score für die Aktivierung. Gezeigt werden jeweils die Aktivatoren mit dem höchsten bzw. niedrigsten Z-score für die jeweilige Polarisierungsbedingung.

Bei den herunterregulierten Aktivatoren ergab sich ein relativ einheitliches Bild. Alle drei Behandlungen deuteten hinsichtlich einer Hemmung von Aktivatoren auf eine anti-inflammatorische Wirkung hin, da die beobachteten Veränderungen in den Genexpressionsprofilen zu einem großen Teil durch eine verminderte Interferon-Wirkung, bzw. gehemmte Aktivität von IRF Genen (**I**nterferon-**r**egulatory **f**actor) erklärt werden kann. Insgesamt induzieren IL4, IGF1 und Insulin eher anti-inflammatorische Makrophagen, wobei IL4 und IGF1 M2- bzw. M2-ähnliche Makrophagen induzieren, während die Insulin-behandelten Makrophagen durch die Heraufregulation mesenchymaler Gene gekennzeichnet sind.

1 Diskussion

1.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden Knochenmarkzellen aus Tibia- und Femur-Knochen isoliert, zu Makrophagen kultiviert und mit verschiedenen Cytokinen, Hormonen und LPS polarisiert. Die entstandenen Phänotypen wurden anschließend mittels qPCR, Western Blot, Durchflusszytometrie und *next generation sequencing* analysiert.

Zunächst sollte der Effekt von IGF1 auf die Makrophagen-Polarisierung näher untersucht werden. Dazu wurden Makrophagen mit verschiedenen Konzentrationen IGF1 behandelt und anschließend die entstandenen Phänotypen untersucht. Die IGF1-vermittelte Heraufregulation klassischer Markergene wie *Arg1*, *Retnla* und *Mrc1* führte zu der Annahme, dass IGF1 in Makrophagen einen M2-ähnlichen Phänotyp hervorruft.

Zusätzlich wurde der Effekt von Insulin auf die Makrophagen-Polarisierung untersucht. Dazu wurden die Phänotypen von Insulin-polarisierten Knochenmarkmakrophagen analysiert. Es sollte der Frage nachgegangen werden, ob der beobachtete Effekt von IGF1 auf die Makrophagen-Polarisierung spezifisch für IGF1 ist, oder es sich um einen gemeinsamen Effekt von IGF1 und Insulin handelt. Wie in der Einleitung beschrieben, gibt es große Ähnlichkeiten von Insulin und IGF1 hinsichtlich der Struktur der Hormone und ihrer Rezeptoren, sowie der nachgeschalteten Signaltransduktion. Die Tatsache, dass beide Peptide in der Lage sind mit niedrigerer Affinität an den Rezeptor des jeweils anderen Hormons zu binden, führte zu der Ausgangshypothese, dass Insulin und IGF1 zumindest ähnliche oder überlappende, wenn nicht sogar gleiche Effekte auf die Makrophagen haben würden.

Diese Hypothese wird durch die vorliegenden Ergebnisse nur teilweise bestätigt und die Frage, ob Insulin wie IGF1 Makrophagen zu einen M2-ähnlichen Phänotyp verändert, kann insofern verneint werden, als dass nur IGF1, nicht aber Insulin klassische M2-Markergene induziert. Dennoch zeigt sich auch eine teilweise Übereinstimmung in den differentiell exprimierten Genen, die im Vergleich zu mit mCSF kultivierten Makrophagen durch beide Hormone in ähnlicher Weise reguliert werden.

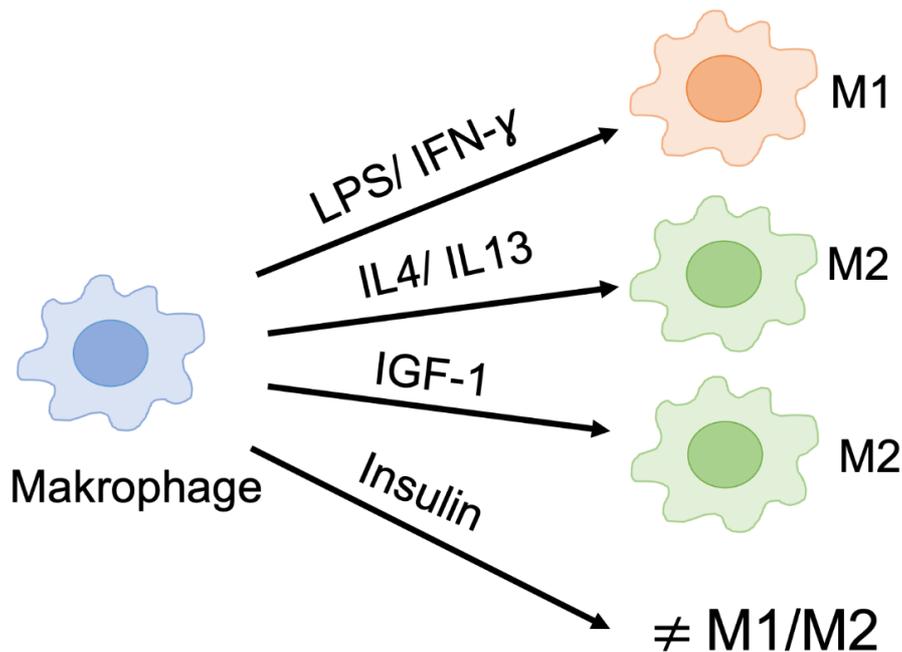


Abb. 20 Zusammenfassung der Ergebnisse IGF1 polarisiert Makrophagen zu einem M2-Phänotyp. Insulin induziert weder einen M1- noch einen M2-Phänotyp.

1.2 Der Effekt von IGF1 auf die Makrophagen-Polarisierung

1.2.1 IGF1 induziert in Makrophagen einen M2-Phänotyp

Auf verschiedene Weise zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass IGF1 in Makrophagen einen M2-ähnlichen Phänotyp induziert.

So zeigte nach der 48-stündigen Polarisierung mit IGF1 bereits das mikroskopische Bild der Makrophagen eine Veränderung des Phänotyps im Gegensatz zur unbehandelten Gruppe. Die Zellmorphologie ähnelte am ehesten der von Makrophagen, die mit IL4 und IL13 behandelt wurden, die typischerweise den alternativen Weg der Polarisierung zum M2-Typ aktivieren. Mittels qPCR-Analyse konnte nach IGF1-Behandlung eine erhöhte Expression der M2-Marker Mannose-Rezeptor (*Mrc1*, CD206), Arginase (*Arg1*) und Resistin-like α (*Retnla*) gezeigt werden. Dieses Expressionsmuster wurde auch bei den mit IL4 und IL13 behandelten Makrophagen nachgewiesen. Die RNA-Expressionsdaten wurden mithilfe durchflusszytometrischer Untersuchungen bestätigt. Als M2-Marker wurde der Mannose-Rezeptor (CD 206) untersucht. Auch hier zeigte sich eine erhöhte Mannose-Rezeptor-Expression nach IGF1 sowie nach IL4/ IL13-Behandlung. Sowohl auf Genexpressionsebene

als auch in der Untersuchung der Oberflächenantigene und der Zellmorphologie induzierte IGF1 Makrophagen vom M2-Phänotyp.

Dieser Effekt wurde unter der Behandlung mit verschiedenen IGF1-Konzentrationen (3, 10, 30 und 100 ng/ml) beobachtet. Alle getesteten Konzentrationen riefen den beschriebenen M2-Phänotyp hervor. Hierbei konnten keine quantitativen Unterschiede hinsichtlich der Expressionsstärke festgestellt werden, so dass in vitro bereits die geringe Konzentration von 3 ng/ml IGF1 die Polarisierung der Makrophagen zu einem M2-ähnlichen Phänotyp auslöst. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Vorarbeiten (s. 1.4), in denen unter der Polarisierung mit 10 und 20 ng/ml IGF1 eine Induktion von M2-Markern gesehen wurde (Heinen et al., 2019). Auch durch andere Autoren wurde bereits die Hypothese aufgestellt, dass IGF1 eine Induktion des alternativ aktivierten M2-Makrophagen bewirkt. Hinweise darauf, dass IGF1 an der Polarisierung von Makrophagen zum M2-Phänotyp beteiligt ist, lieferten bereits Experimente mit Mäusen mit einem IGF1-Rezeptor-*Knockout* in der myeloiden Zellreihe. So zeigen Fettgewebismakrophagen mit einem solchen IGF1-Rezeptor-*Knockout* eine reduzierte Expression von M2-Marker-Genen im Vergleich mit wildtypischen Fettgewebismakrophagen (Spadaro et al., 2017). Auch Knochenmarkmakrophagen mit einem IGF1-Rezeptor-*Knockout* zeigen eine reduzierte Expression von M2-Marker-Genen im Vergleich zu wildtypischen Knochenmarkmakrophagen (Tonkin et al., 2015). Nach 12-stündiger Stimulation von Knochenmarkmakrophagen mit 50 ng/ml IGF1 sahen Tonkin et al. eine Induktion der M2-Marker-Gene *Il4*, *VEGF α* und *TGF β 1*.

1.2.2 Mechanismen der IGF1-abhängigen Makrophagen-Polarisierung: Die Rolle von STAT6

Die Expression einiger M2-typischer Gene nach IGF1- bzw. IL4-Behandlung führte zu der Frage, ob IGF1 in Makrophagen über eine STAT6-Aktivierung die Polarisierung zum M2-Typ auslöst. Dass die Phosphorylierung von STAT6 ein Schlüsselschritt in dem IL4-abhängigen Aktivierungsweg des M2-Makrophagen ist, ist hinreichend bekannt (Murray, 2017) und deckt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit, denn es erfolgte eine Phosphorylierung von STAT6 in Knochenmarkmakrophagen nach 48-stündiger Stimulation mit IL4 und IL13.

Allerdings zeigte sich auch nach der Stimulation mit 10 ng/ml IGF1 eine Phosphorylierung von STAT6. Auch andere Autoren beschreiben eine Aktivierung von STAT6 in Makrophagen nach IGF1-Stimulation. So sahen Osoria et al. eine gesteigerte

Phosphorylierung von STAT6 in Knochenmarkmakrophagen nach einer Stimulation mit 100 ng/ml IGF1 für 20 Minuten, sowie einen additiven Effekt von IL4 und IGF1 auf die STAT6-Phosphorylierung und postulierten ein Zusammenlaufen der Signaltransduktionswege von IL4 und IGF1 bei STAT6 (Osorio et al., 2014).

Insgesamt zeigte sich eine Phosphorylierung von STAT6 nach IGF1-Stimulation, ähnlich wie nach der Stimulation mit IL4 und IL13. Dies deutet darauf hin, dass die Polarisierung von Makrophagen durch IGF1 nicht nur im Ergebnis einen ähnlichen Phänotyp hervorbringt wie die Polarisierung mit IL4 und IL13, sondern auch ähnliche Mechanismen und Signaltransduktionswege nutzt.

1.2.3 Die IGF1-abhängige Makrophagen-Polarisierung als sich selbst verstärkender Effekt

Die Untersuchung des Zeitverlaufs der IGF1-induzierten STAT6-Aktivierung ergab, dass bereits nach 2-minütiger IGF1-Stimulation eine Phosphorylierung von STAT6 nachweisbar war, ebenso wie nach einer IGF1-Stimulation von 48 Stunden.

Nachdem lange davon ausgegangen wurde, dass IGF1-Synthese ausschließlich in der Leber stattfindet, weiß man inzwischen, dass es auch in Geweben eine lokale IGF1-Synthese geben kann. Auch M2-Makrophagen sind dazu in der Lage IGF1 zu produzieren (Roszer, 2015). So sahen Wynes und Riches eine Induktion der *Igf1*-Expression in Knochenmarkmakrophagen nach Behandlung mit IL4 oder IL13 und ein Fehlen dieses Effektes in Makrophagen mit einem *Stat6-knock out* (Wynes and Riches, 2003). In den Vorarbeiten dieser Arbeit wurde auch nach IGF1-Polarisierung eine erhöhte IGF1-Expression in Makrophagen gesehen (Heinen et al., 2019). Tonkin et al. zeigten ebenfalls eine erhöhte Expression von IGF1 in CD206-positiven Makrophagen, sowie Phänotyp-Veränderungen von Makrophagen zu einem reparativen Phänotyp durch diese erhöhte IGF1-Expression. Sie postulierten eine autokrine Funktion von IGF1 in Makrophagen im Sinne eines autokrinen Loops, der Makrophagen zu einem reparativen Phänotyp verändert (Tonkin et al., 2015).

Die Tatsache, dass die Phosphorylierung von STAT6 durch IGF1 bereits nach 2 Minuten stattfindet und nach 48 Stunden immer noch nachweisbar ist, passt zu der Vorstellung, dass M2-Makrophagen selbst IGF1 produzieren und so in einem sich selbst verstärkenden Prozess weiter den Makrophagen-Phänotyp im Sinne eines autokrinen Loops in Richtung eines proregenerativen, antiinflammatorischen Phänotyps hin verändern.

Ebenfalls zu dieser Vorstellung passend ist, dass die eingesetzten IGF1-Konzentrationen zwischen 3 – 100 ng/ml alle im selben Ausmaß den M2-Phänotyp induzierten. Man kann sich vorstellen, dass zum Beobachtungszeitpunkt nach 48 Stunden bereits die eigene Produktion von IGF1 durch die Makrophagen eingesetzt hat und so die initial eingesetzte Konzentration im Zeitverlauf zunehmend an Bedeutung verliert. In diesem Zusammenhang ist die Frage interessant, wie viel IGF1 initial notwendig ist, um diesen Prozess in Gang zu bringen und ob sich im Zeitverlauf eine Zunahme der IGF1-Konzentration darstellen lässt.

1.2.4 Mechanismen der IGF1-abhängigen Makrophagen-Polarisierung: Transkriptionsanalysen

Die Expression M2-typischer Gene, sowie die STAT6-Aktivierung nach IGF1- bzw. IL4-Behandlung führte zu der Frage, inwieweit das gesamte Expressionsprofil der Makrophagen nach IL4- und IGF1-Stimulation überlappte, bzw. ob es größere Unterschiede gab. Ebenso stellte sich die Frage, ob Insulin keine Wirkung an Makrophagen hat oder einen anderen Makrophagentyp induziert, der die wenigen durch qPCR untersuchten M1- bzw. M2-Marker nicht exprimiert. So haben Xue et al. nachgewiesen, dass sich die Polarisierung von Makrophagen nicht auf ein bipolares Modell von pro-inflammatorischen M1- und anti-inflammatorischen M2-Makrophagen beschränkt. Vielmehr untersuchten sie die Expressionsprofile humaner Makrophagen, die mit 28 verschiedenen Stimuli behandelt wurden. Dabei stellte sich heraus, dass pro- bzw. anti-inflammatorische Cytokine (z.B. TNF α , IL13) das bipolare M1/M2-Muster zwar modulierten, den Gegensatz der beiden Zelltypen insgesamt aber nicht veränderten. Im Gegensatz dazu wurden durch Fettsäuren Makrophagen mit einem von M1- und M2-Makrophagen deutlich unterschiedlichen Genexpressionsmuster induziert. Dies führte die Autoren zu der Aussage, dass Makrophagen eine viel höhere Plastizität besitzen, die über die klassische, bipolare M1-M2-Achse hinausgeht. Basierend auf ihren Ergebnissen postulierten sie daher das „Spektrum-Modell“ der Makrophagenpolarisierung (Xue et al., 2014).

Angesichts der ähnlichen bzw. unterschiedlichen Effekte von IL4, Insulin und IGF1 wurden die Transkriptome entsprechender polarisierter Makrophagen analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass sich die große Ähnlichkeit der IL4- und IGF1-polarisierten Zellen nicht nur auf die Expression der in der qPCR verwendeten M2-Markergene beschränkte. Vielmehr ergab die hierarchische Clusteranalyse, dass die Genexpressionsmuster von IGF1- und IL4-stimulierten Makrophagen größere Blöcke von ähnlich differentiell exprimierten Genen

aufwiesen. Die große Ähnlichkeit der Expressionsmuster spiegelte sich auch bei der bioinformatischen Identifizierung der möglichen Regulatoren wider, die die beobachteten Veränderungen im Genexpressionsprofil bei der Polarisierung ausgelöst haben könnten. Sowohl für IGF1 als auch für IL4 führte die Verwendung des „Upstream Regulator“-Werkzeugs des Programmpakets „Ingenuity Pathway Analyse“ zur Identifizierung von IL4 und STAT6, als Regulatoren, die mit höchster Wahrscheinlichkeit für die beobachteten Veränderungen verantwortlich waren. Während dies für die IL4-behandelten Zellen nicht unerwartet war und nur zeigt, dass das Programm die durchgeführte Polarisierung korrekt erkannte, war dieses Ergebnis für IGF1 völlig unerwartet, da die Daten implizieren, dass IGF1 hier ebenfalls über STAT6 die M2-Polarisierung in ähnlicher Weise wie IL4 auslöst. Die kanonischen PI3-Kinase/AKT- bzw. Ras/Ras/Erk-Signalwege, die normalerweise durch den aktivierten IGF1-Rezeptor aktiviert werden, fanden sich in Form von Mek (Ras-Raf-Mek-Erk Signalweg) erst an untergeordneter Position unter den identifizierten Regulatoren. Der zweite unerwartete Befund betraf die Insulin-behandelten Makrophagen. Während in der qPCR eine veränderte Expression der ausgewählten M1/M2-Markergene nicht nachgewiesen wurde, zeigt die Transkriptomanalyse, dass Insulin offensichtlich einen Makrophagentyp induziert, der sich sowohl von der basalen M-CSF-behandelten Kontrollgruppe, als auch von den IL4/IGF1-behandelten M2-Makrophagen unterscheidet. Dies wurde sowohl in der Clusteranalyse, als auch bei der Identifizierung der Regulatoren deutlich. Auffällig war, dass bei der Ermittlung möglicher herunter regulierter Aktivatoren eine große Übereinstimmung bei Insulin, IGF1 und IL4 feststellbar war. Da hier insbesondere Interferone und Interferon-regulierende Faktoren ermittelt wurden, kann man davon ausgehen, dass auch Insulin einen eher anti-inflammatorischen Makrophagen Typ induziert, der aber nicht die Expression der klassischen M2-Markergene beinhaltet.

1.3 Der Effekt von Insulin auf die Makrophagen-Polarisierung

Entgegen der Ausgangshypothese zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit keine Induktion eines typischen M2-Phänotyps in Makrophagen durch Insulin.

So zeigte nach 48-stündiger Polarisierung mit Insulin bereits das mikroskopische Bild der Makrophagen keine große Veränderung des Phänotyps im Gegensatz zur unbehandelten Gruppe. Ganz im Gegensatz zu den Ergebnissen nach IGF1-Polarisierung, zeigte sich in der qPCR-Analyse nach Insulin-Behandlung keine erhöhte Expression der M2-Marker-Gene *Mrc1*, *Arg1* und *Retnla*. In der durchflusszytometrischen Untersuchung zeigte sich auch

keine erhöhte Mannose-Rezeptor-Expression. Wie oben bereits ausgeführt, ergab auch die Sequenzanalyse Insulin-polarisierter Makrophagen ein weitgehend anderes Ergebnis als die Analysen der mit IGF1 oder IL4 polarisierten Makrophagen.

Um Konzentrationseffekte auszuschließen, wurden verschiedene Insulin-Konzentrationen zwischen 3 und 100 ng/ml getestet. Unter keiner der getesteten Bedingungen zeigte sich eine Induktion der typischen M2-Markergene, sodass es sich bei der IGF1-Wirkung um einen sehr sensitiven Prozess handelt.

Der Effekt von Insulin auf Makrophagen wurde auch von anderen Autoren untersucht. Dabei kann man feststellen, dass die Ergebnisse bisher ein heterogenes Bild mit teils unterschiedlichen Effekten auf die Makrophagen-Polarisierung wiedergeben.

Yu et al. untersuchten unter anderem die Effekte von Insulin auf Veränderungen des Makrophagen-Phänotyps und sahen nach Insulin-Behandlung von THP-1-Zellen, einer humanen monozytischen Zelllinie, eine Induktion der M2-Marker Arginase und CD206, sowie des M1-Markers iNOS. In THP-1-Zellen, die mit Glucose vorbehandelt wurden, hingegen sahen sie eine verringerte iNOS-Produktion nach Insulin-Behandlung und folgerten, dass Makrophagen in einem Glucose-reichen Umfeld einen M1-Phänotyp annehmen, während Insulin diesen Effekt unterdrückt und unter Glucose-reichen Bedingungen Makrophagen in Richtung eines M2-Phänotyps verändert. Schließlich untersuchten sie die Wundheilung in einem diabetischen Rattenmodell und den Effekt von Insulin auf die Immunzellen im Bereich der Wunde. Sie sahen nach Insulin-Behandlung in frühen Phasen der Wundheilung ein vermehrtes Vorkommen von M1-Makrophagen und nach Insulin-Behandlung in späten Phasen ein vermehrtes Vorkommen von M2-Makrophagen im Bereich der Wunde und schrieben Insulin unterschiedliche Effekte auf die Makrophagen-Polarisierung zu den verschiedenen Zeitpunkten der Wundheilung zu. Die Insulin-Stimulation in den durchgeführten Experimenten erfolgte immer mit 10^{-6} M Insulin, entsprechend etwa 5808 ng/ml (Yu et al., 2019), sodass die eingesetzten Konzentrationen weit über physiologischen Insulinspiegeln und weit über den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen lagen.

Ieronymaki et al. beschäftigten sich mit chronischen Einflüssen von Insulin auf die Makrophagen-Polarisierung und Makrophagen-Phänotypen unter Insulin-Resistenz. In diesem Zuge zeigten sie eine Phosphorylierung des typischen Insulin-Ziels AKT nach Insulin-Stimulation von TEPMs (*thioglycolate-elicited peritoneal macrophages*), einem primären Makrophagentyp, der nach Thioglycolat-Behandlung als peritoneale Makrophagen aus Mäusen isoliert wird. Die Stimulation mit Insulin erfolgte hier für 30 Minuten mit

100nM Insulin, entsprechend etwa 580 ng/ml. In verschiedenen Insulin-Resistenz-Modellen zeigte sich außerdem grundsätzlich ein vermehrtes Vorkommen des M2-Phänotyps (Ieronymaki et al., 2019).

Tessaro et al. untersuchten den Effekt von Insulin auf Knochenmarkmakrophagen aus diabetischen Mäusen und sahen unter anderem eine vermehrte Phosphorylierung der klassischen Insulin-Ziele ERK, PI3K und AKT nach Insulin-Stimulation mit 1 mU/ml Insulin, entsprechend etwa 42 ng/ml. In LPS-stimulierten Knochenmarkmakrophagen sahen sie eine vermehrte Sekretion von TNF- α und IL-6 nach Insulin-Stimulation, während alveoläre und peritoneale Makrophagen bei demselben Experiment eine verminderte Sekretion von TNF- α und IL-6 zeigten. LPS-stimulierte Knochenmarkmakrophagen nicht-diabetischer Mäuse zeigten nach Insulin-Behandlung keine Veränderung der Zytokin-Ausschüttung. Insgesamt folgerten die Autoren, dass Insulin je nach Umgebungsbedingungen und Makrophagentyp unterschiedliche Wirkungen auf Makrophagen haben kann, was die Plastizität von Makrophagen unterstreicht (Tessaro et al., 2017).

Insgesamt zeigt sich ein inhomogenes Bild bezüglich der Frage, welche Auswirkung Insulin auf die Makrophagen-Polarisierung hat. Unterschiedliche Konzentrationen, Zelltypen und Stimulations-Zeiträume machen es schwer eine einheitliche Aussage zu treffen. Insbesondere bei hohen Insulin-Konzentrationen, unter denen eine Stimulation klassischer Insulin-Ziele gesehen wird, gilt es zu bedenken, dass eine Aktivierung des IGF1-Rezeptors oder eines Hybrid-Rezeptors mit steigender Insulin-Konzentration wahrscheinlicher wird und ähnliche Signalwege ansprechen würde. Insgesamt wird vermutet, dass Insulin auf die Makrophagen-Polarisierung in Abhängigkeit der jeweiligen Umgebungsbedingungen und Makrophagen-Typen unterschiedliche Wirkungen auf Makrophagen ausüben kann. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit ließ sich eine eindeutige Induktion des M2-Phänotyps durch Insulin im Gegensatz zu IGF1 nicht erreichen.

1.4 Bedeutung

Insgesamt zeigt diese Arbeit einen Unterschied in der Wirkung von Insulin und IGF1 auf die Polarisierung von Makrophagen. Dies widerlegt die ursprüngliche Hypothese, dass die beiden Proteine zumindest ähnliche, wenn nicht sogar gleiche Wirkung zeigen würden. IGF1 und Insulin übernehmen im menschlichen Organismus durchaus unterschiedliche Funktionen, wobei Insulin eher metabolische und IGF1 eher wachstumsstimulierende

Wirkung hat. In *in vitro*-Experimenten zeigen die beiden Hormone jedoch in der Regel überlappende Wirkungen, was unter anderem durch die Fähigkeit an den Rezeptor des jeweils anderen Proteins zu binden bedingt sein mag. Es wurden bislang lediglich einige wenige unterschiedliche Wirkungen gezeigt, bei denen es sich um die Aktivierung oder nicht-Aktivierung einzelner Proteine handelt (s. 1.3.2). Diese Diskrepanz zwischen sehr ähnlichem *in vitro*-Verhalten und durchaus verschiedenen physiologischen Funktionen konnte bislang nicht hinreichend erklärt werden. Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen klar, dass die Polarisierung von Makrophagen durch IGF1 zur Induktion M2-spezifischer Markergene führt, die ein tatsächlich durch IGF1 hervorgerufener Effekt ist und keine maskierte Insulin-Wirkung. Dabei scheint IGF1 auch den JAK-STAT Signalweg zu aktivieren und somit einen anti-inflammatorischen Makrophagentyp zu induzieren, der sich deutlich von Insulin-behandelten Makrophagen unterscheidet.

1.5 Ausblick

Diese Arbeit zeigte, dass IGF1 Makrophagen zu einem alternativ aktivierten M2-Phänotyp polarisiert und liefert erste Ergebnisse zu den zugrundeliegenden Mechanismen. Da bereits die geringste in dieser Arbeit verwendete IGF1-Menge (3 ng/ml) den M2-Phänotyp in Makrophagen hervorruft, wäre es interessant noch geringere Konzentrationen zu testen, um zu sehen wie viel IGF1 nötig ist, um den M2-Phänotyp zu induzieren.

Tonkin et al. stellten bereits die Vermutung auf, dass es sich bei der IGF1 abhängigen Makrophagen-Polarisierung um einen sich selbst verstärkenden Effekt im Sinne eines autokrinen Loops handeln könnte (Tonkin et al., 2015). Diese Vorstellung passt zu den Ergebnissen dieser Arbeit. Um diese These zu untermauern wäre es interessant, kürzere Stimulationszeiträume zu testen und zu beobachten, ob eine eigene IGF1-Produktion durch die Makrophagen einsetzt. Unsere Arbeitsgruppe hat ebenfalls eine Induktion der IGF1 Expression in M2 Makrophagen nach Behandlung mit IGF1 oder IL4 nachgewiesen (Heinen et al. 2019). Daher würde es sich anbieten herauszufinden, ab wann die autokrine IGF1-Freisetzung die Polarisierung von Makrophagen zum M2-Typ nach einem initialen „IGF1-Puls“ unterhält.

Schließlich sollte man sich die Vorarbeiten dieser Arbeit in Erinnerung rufen. Initial wurden im Mausmodell positive Effekte durch IGF1 nach Myokardinfarkt gesehen und diese durch die IGF1 Wirkung auf die Makrophagen-Polarisierung erklärt (Heinen et al., 2019). Um die in dieser Arbeit gesehenen Unterschiede in dem Verhalten von IGF1 und Insulin zu

vervollständigen, könnte man die Insulin-Wirkung nach Myokardinfarkt im Mausmodell testen.

Letztlich stellt sich auch die Frage, ob IGF1 als Medikament nach Myokardinfarkt in Betracht gezogen werden sollte. Die Ergebnisse des Mausmodells sind in dieser Hinsicht vielversprechend und da rekombinantes humanes IGF1 (Mecasermin) zur Therapie von Wachstumsstörungen von der EMA (European Medicines Agency) zugelassen ist, wäre es spannend dieser Frage weiter nachzugehen.

2 Literatur- und Quellenverzeichnis

- ACCILI, D., DRAGO, J., LEE, E. J., JOHNSON, M. D., COOL, M. H., SALVATORE, P., ASICO, L. D., JOSE, P. A., TAYLOR, S. I. & WESTPHAL, H. 1996. Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat Genet*, 12, 106-9.
- ALBRECHT, R. M. & HONG, R. 1976. Basic and clinical considerations of the monocyte-macrophage system in man. *J Pediatr*, 88, 751-65.
- AUSTYN, J. M. & GORDON, S. 1981. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol*, 11, 805-15.
- BAILYES, E. M., NAVE, B. T., SOOS, M. A., ORR, S. R., HAYWARD, A. C. & SIDDLE, K. 1997. Insulin receptor/IGF-I receptor hybrids are widely distributed in mammalian tissues: quantification of individual receptor species by selective immunoprecipitation and immunoblotting. *Biochem J*, 327 (Pt 1), 209-15.
- BAKER, J., HARDY, M. P., ZHOU, J., BONDY, C., LUPU, F., BELLVE, A. R. & EFSTRATIADIS, A. 1996. Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction. *Mol Endocrinol*, 10, 903-18.
- BAKER, J., LIU, J. P., ROBERTSON, E. J. & EFSTRATIADIS, A. 1993. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*, 75, 73-82.
- BANTING, F. G., BEST, C. H., COLLIP, J. B., CAMPBELL, W. R. & FLETCHER, A. A. 1922. Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Can Med Assoc J*, 12, 141-6.
- BASERGA, R., PERUZZI, F. & REISS, K. 2003. The IGF1 receptor in cancer biology. *Int J Cancer*, 107, 873-7.
- BAXTER, R. C. 2000. Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 278, E967-76.
- BELL, G. I., PICTET, R. L., RUTTER, W. J., CORDELL, B., TISCHER, E. & GOODMAN, H. M. 1980. Sequence of the human insulin gene. *Nature*, 284, 26-32.
- BELL, G. I., SWAIN, W. F., PICTET, R., CORDELL, B., GOODMAN, H. M. & RUTTER, W. J. 1979. Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding human preproinsulin. *Nature*, 282, 525-7.
- BEN-MORDECHAI, T., HOLBOVA, R., LANDA-ROUBEN, N., HAREL-ADAR, T., FEINBERG, M. S., ABD ELRAHMAN, I., BLUM, G., EPSTEIN, F. H., SILMAN, Z., COHEN, S. & LEOR, J. 2013. Macrophage subpopulations are essential for infarct repair with and without stem cell therapy. *J Am Coll Cardiol*, 62, 1890-901.
- BENOIT, M., DESNUES, B. & MEGE, J. L. 2008. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol*, 181, 3733-9.
- BOURRON, O., LE BOUC, Y., BERARD, L., KOTTI, S., BRUNEL, N., RITZ, B., LECLERCQ, F., TABONE, X., DROUET, E., MULAK, G., DANCHIN, N. & SIMON, T. 2015. Impact of age-adjusted insulin-like growth factor 1 on major cardiovascular events after acute myocardial infarction: results from the fast-MI registry. *J Clin Endocrinol Metab*, 100, 1879-86.

- BUERKE, M., MUROHARA, T., SKURK, C., NUSS, C., TOMASELLI, K. & LEFER, A. M. 1995. Cardioprotective effect of insulin-like growth factor I in myocardial ischemia followed by reperfusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 8031-5.
- CHEN, B. & FRANGOIANNIS, N. G. 2017. Immune cells in repair of the infarcted myocardium. *Microcirculation*, 24.
- CHERNAUSEK, S. D., JACOBS, S. & VAN WYK, J. J. 1981. Structural similarities between human receptors for somatomedin C and insulin: analysis by affinity labeling. *Biochemistry*, 20, 7345-50.
- CORRALIZA, I. M., SOLER, G., EICHMANN, K. & MODOLELL, M. 1995. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 206, 667-73.
- CUSHMAN, S. W. & WARDZALA, L. J. 1980. Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J Biol Chem*, 255, 4758-62.
- CZECH, M. P. 1989. Signal transmission by the insulin-like growth factors. *Cell*, 59, 235-8.
- DAUGHADAY, W. H. & ROTWEIN, P. 1989. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev*, 10, 68-91.
- DE MEYTS, P. 2002. Insulin and insulin-like growth factors: the paradox of signaling specificity. *Growth Horm IGF Res*, 12, 81-3.
- DE MEYTS, P., CHRISTOFFERSEN, C. T., URSO, B., WALLACH, B., GRONSKOV, K., YAKUSHIJI, F. & SHYMKO, R. M. 1995. Role of the time factor in signaling specificity: application to mitogenic and metabolic signaling by the insulin and insulin-like growth factor-I receptor tyrosine kinases. *Metabolism*, 44, 2-11.
- DEFIFE, K. M., JENNEY, C. R., MCNALLY, A. K., COLTON, E. & ANDERSON, J. M. 1997. Interleukin-13 induces human monocyte/macrophage fusion and macrophage mannose receptor expression. *J Immunol*, 158, 3385-90.
- DOYLE, A. G., HERBEIN, G., MONTANER, L. J., MINTY, A. J., CAPUT, D., FERRARA, P. & GORDON, S. 1994. Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: comparison with interleukin-4 and interferon-gamma. *Eur J Immunol*, 24, 1441-5.
- GINHOUX, F., SCHULTZE, J. L., MURRAY, P. J., OCHANDO, J. & BISWAS, S. K. 2016. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. *Nat Immunol*, 17, 34-40.
- HEINEN, A., NEDERLOF, R., PANJWANI, P., SPYCHALA, A., TSCHAIIDSE, T., REFFELT, H., BOY, J., RAUPACH, A., GODECKE, S., PETZSCH, P., KOHRER, K., GRANDOCH, M., PETZ, A., FISCHER, J. W., ALTER, C., VASILEVSKA, J., LANG, P. & GODECKE, A. 2019. IGF1 Treatment Improves Cardiac Remodeling after Infarction by Targeting Myeloid Cells. *Mol Ther*, 27, 46-58.
- HESKETH, M., SAHIN, K. B., WEST, Z. E. & MURRAY, R. Z. 2017. Macrophage Phenotypes Regulate Scar Formation and Chronic Wound Healing. *Int J Mol Sci*, 18.
- HUMBEL, R. E. 1990. Insulin-like growth factors I and II. *Eur J Biochem*, 190, 445-62.
- IERONYMAKI, E., THEODORAKIS, E. M., LYRONI, K., VERGADI, E., LAGOUDAKI, E., AL-QAHTANI, A., AZNAOUROVA, M., NEOFOTISTOU-THEMELI, E.,

- ELIOPOULOS, A. G., VAPORIDI, K. & TSATSANIS, C. 2019. Insulin Resistance in Macrophages Alters Their Metabolism and Promotes an M2-Like Phenotype. *J Immunol*, 202, 1786-1797.
- JACOBS, S., KULL, F. C., JR., EARP, H. S., SVOBODA, M. E., VAN WYK, J. J. & CUATRECASAS, P. 1983. Somatomedin-C stimulates the phosphorylation of the beta-subunit of its own receptor. *J Biol Chem*, 258, 9581-4.
- JONES, J. I. & CLEMMONS, D. R. 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev*, 16, 3-34.
- JOSHI, R. L., LAMOTHE, B., CORDONNIER, N., MESBAH, K., MONTHIOUX, E., JAMI, J. & BUCCHINI, D. 1996. Targeted disruption of the insulin receptor gene in the mouse results in neonatal lethality. *EMBO J*, 15, 1542-7.
- JUUL, A., SCHEIKE, T., DAVIDSEN, M., GYLLENBORG, J. & JORGENSEN, T. 2002. Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease: a population-based case-control study. *Circulation*, 106, 939-44.
- KASUYA, J., PAZ, I. B., MADDUX, B. A., GOLDFINE, I. D., HEFTA, S. A. & FUJITA-YAMAGUCHI, Y. 1993. Characterization of human placental insulin-like growth factor-I/insulin hybrid receptors by protein microsequencing and purification. *Biochemistry*, 32, 13531-6.
- KHANDWALA, H. M., MCCUTCHEON, I. E., FLYVBJERG, A. & FRIEND, K. E. 2000. The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr Rev*, 21, 215-44.
- KIM, J. J. & ACCILI, D. 2002. Signalling through IGF-I and insulin receptors: where is the specificity? *Growth Horm IGF Res*, 12, 84-90.
- LAVIOLA, L., GIORGINO, F., CHOW, J. C., BAQUERO, J. A., HANSEN, H., OOI, J., ZHU, J., RIEDEL, H. & SMITH, R. J. 1997. The adapter protein Grb10 associates preferentially with the insulin receptor as compared with the IGF-I receptor in mouse fibroblasts. *J Clin Invest*, 99, 830-7.
- LEROITH, D., WERNER, H., BEITNER-JOHNSON, D. & ROBERTS, C. T., JR. 1995. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev*, 16, 143-63.
- LOKE, P., NAIR, M. G., PARKINSON, J., GIULIANO, D., BLAXTER, M. & ALLEN, J. E. 2002. IL-4 dependent alternatively-activated macrophages have a distinctive in vivo gene expression phenotype. *BMC Immunol*, 3, 7.
- MA, Y., YABLUCHANSKIY, A., IYER, R. P., CANNON, P. L., FLYNN, E. R., JUNG, M., HENRY, J., CATES, C. A., DELEON-PENNELL, K. Y. & LINDSEY, M. L. 2016. Temporal neutrophil polarization following myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, 110, 51-61.
- MARTINEZ, F. O. & GORDON, S. 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*, 6, 13.
- MICHAEL, M. D., KULKARNI, R. N., POSTIC, C., PREVIS, S. F., SHULMAN, G. I., MAGNUSON, M. A. & KAHN, C. R. 2000. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell*, 6, 87-97.
- MOSSER, D. M. & EDWARDS, J. P. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, 8, 958-69.

- MOXHAM, C. P., DURONIO, V. & JACOBS, S. 1989. Insulin-like growth factor I receptor beta-subunit heterogeneity. Evidence for hybrid tetramers composed of insulin-like growth factor I and insulin receptor heterodimers. *J Biol Chem*, 264, 13238-44.
- MUNDER, M., EICHMANN, K. & MODOLELL, M. 1998. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J Immunol*, 160, 5347-54.
- MURRAY, P. J. 2017. Macrophage Polarization. *Annu Rev Physiol*, 79, 541-566.
- MYERS, M. G., JR., BACKER, J. M., SUN, X. J., SHOELSON, S., HU, P., SCHLESSINGER, J., YOAKIM, M., SCHAFFHAUSEN, B. & WHITE, M. F. 1992. IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 10350-4.
- NAJJAR, S. M., BLAKESLEY, V. A., LI CALZI, S., KATO, H., LEROITH, D. & CHOICE, C. V. 1997. Differential phosphorylation of pp120 by insulin and insulin-like growth factor-1 receptors: role for the C-terminal domain of the beta-subunit. *Biochemistry*, 36, 6827-34.
- NATHAN, C. F., MURRAY, H. W., WIEBE, M. E. & RUBIN, B. Y. 1983. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med*, 158, 670-89.
- O'SULLIVAN, J. F., LEBLOND, A. L., KELLY, G., KUMAR, A. H., METHAROM, P., BUNEKER, C. K., ALIZADEH-VIKALI, N., HRISTOVA, I., HYNES, B. G., O'CONNOR, R. & CAPLICE, N. M. 2011. Potent long-term cardioprotective effects of single low-dose insulin-like growth factor-1 treatment postmyocardial infarction. *Circ Cardiovasc Interv*, 4, 327-35.
- OSORIO, E. Y., TRAVI, B. L., DA CRUZ, A. M., SALDARRIAGA, O. A., MEDINA, A. A. & MELBY, P. C. 2014. Growth factor and Th2 cytokine signaling pathways converge at STAT6 to promote arginase expression in progressive experimental visceral leishmaniasis. *PLoS Pathog*, 10, e1004165.
- PANDINI, G., VIGNERI, R., COSTANTINO, A., FRASCA, F., IPPOLITO, A., FUJITA-YAMAGUCHI, Y., SIDDLE, K., GOLDFINE, I. D. & BELFIORE, A. 1999. Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor overexpression in breast cancers leads to insulin/IGF-I hybrid receptor overexpression: evidence for a second mechanism of IGF-I signaling. *Clin Cancer Res*, 5, 1935-44.
- POLLAK, M. N., SCHERNHAMMER, E. S. & HANKINSON, S. E. 2004. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer*, 4, 505-18.
- PRONK, G. J., MCGLADE, J., PELICCI, G., PAWSON, T. & BOS, J. L. 1993. Insulin-induced phosphorylation of the 46- and 52-kDa Shc proteins. *J Biol Chem*, 268, 5748-53.
- RAES, G., DE BAETSELIER, P., NOEL, W., BESCHIN, A., BROMBACHER, F. & HASSANZADEH GH, G. 2002. Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. *J Leukoc Biol*, 71, 597-602.
- RIEDEMANN, J. & MACAULAY, V. M. 2006. IGF1R signalling and its inhibition. *Endocr Relat Cancer*, 13 Suppl 1, S33-43.
- RINDERKNECHT, E. & HUMBEL, R. E. 1978. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem*, 253, 2769-76.

- ROSZER, T. 2015. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm*, 2015, 816460.
- ROZAKIS-ADCOCK, M., MCGLADE, J., MBAMALU, G., PELICCI, G., DALY, R., LI, W., BATZER, A., THOMAS, S., BRUGGE, J., PELICCI, P. G., SCHLESSINGER, J., PAWSON, T. & ET AL. 1992. Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature*, 360, 689-92.
- RUTSCHMAN, R., LANG, R., HESSE, M., IHLE, J. N., WYNN, T. A. & MURRAY, P. J. 2001. Cutting edge: Stat6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production. *J Immunol*, 166, 2173-7.
- SALTIEL, A. R. & KAHN, C. R. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414, 799-806.
- SCHUMACHER, R., MOSTHAF, L., SCHLESSINGER, J., BRANDENBURG, D. & ULLRICH, A. 1991. Insulin and insulin-like growth factor-1 binding specificity is determined by distinct regions of their cognate receptors. *J Biol Chem*, 266, 19288-95.
- SLAABY, R., SCHAFFER, L., LAUTRUP-LARSEN, I., ANDERSEN, A. S., SHAW, A. C., MATHIASSEN, I. S. & BRANDT, J. 2006. Hybrid receptors formed by insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) have low insulin and high IGF1 affinity irrespective of the IR splice variant. *J Biol Chem*, 281, 25869-74.
- SOOS, M. A., WHITTAKER, J., LAMMERS, R., ULLRICH, A. & SIDDLE, K. 1990. Receptors for insulin and insulin-like growth factor-I can form hybrid dimers. Characterisation of hybrid receptors in transfected cells. *Biochem J*, 270, 383-90.
- SPADARO, O., CAMELL, C. D., BOSURGI, L., NGUYEN, K. Y., YOUM, Y. H., ROTHLIN, C. V. & DIXIT, V. D. 2017. IGF1 Shapes Macrophage Activation in Response to Immunometabolic Challenge. *Cell Rep*, 19, 225-234.
- STEIN, M., KESHAV, S., HARRIS, N. & GORDON, S. 1992. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med*, 176, 287-92.
- STEINER, D. F. & OYER, P. E. 1967. The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 57, 473-80.
- SUN, X. J., ROTHENBERG, P., KAHN, C. R., BACKER, J. M., ARAKI, E., WILDEN, P. A., CAHILL, D. A., GOLDSTEIN, B. J. & WHITE, M. F. 1991. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature*, 352, 73-7.
- SUZUKI, K. & KONO, T. 1980. Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 2542-5.
- TAKEDA, K., TANAKA, T., SHI, W., MATSUMOTO, M., MINAMI, M., KASHIWAMURA, S., NAKANISHI, K., YOSHIDA, N., KISHIMOTO, T. & AKIRA, S. 1996. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature*, 380, 627-30.
- TESSARO, F. H. G., AYALA, T. S., NOLASCO, E. L., BELLA, L. M. & MARTINS, J. O. 2017. Insulin Influences LPS-Induced TNF-alpha and IL-6 Release Through Distinct Pathways in Mouse Macrophages from Different Compartments. *Cell Physiol Biochem*, 42, 2093-2104.

- TONKIN, J., TEMMERMAN, L., SAMPSON, R. D., GALLEGO-COLON, E., BARBERI, L., BILBAO, D., SCHNEIDER, M. D., MUSARO, A. & ROSENTHAL, N. 2015. Monocyte/Macrophage-derived IGF1 Orchestrates Murine Skeletal Muscle Regeneration and Modulates Autocrine Polarization. *Mol Ther*, 23, 1189-1200.
- TROIDL, C., MOLLMANN, H., NEF, H., MASSELI, F., VOSS, S., SZARDIEN, S., WILLMER, M., ROLF, A., RIXE, J., TROIDL, K., KOSTIN, S., HAMM, C. & ELSASSER, A. 2009. Classically and alternatively activated macrophages contribute to tissue remodelling after myocardial infarction. *J Cell Mol Med*, 13, 3485-96.
- ULLRICH, A., BELL, J. R., CHEN, E. Y., HERRERA, R., PETRUZZELLI, L. M., DULL, T. J., GRAY, A., COUSSENS, L., LIAO, Y. C., TSUBOKAWA, M. & ET AL. 1985. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature*, 313, 756-61.
- ULLRICH, A., GRAY, A., TAM, A. W., YANG-FENG, T., TSUBOKAWA, M., COLLINS, C., HENZEL, W., LE BON, T., KATHURIA, S., CHEN, E. & ET AL. 1986. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J*, 5, 2503-12.
- VAN FURTH, R. & COHN, Z. A. 1968. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med*, 128, 415-35.
- VAN FURTH, R., COHN, Z. A., HIRSCH, J. G., HUMPHREY, J. H., SPECTOR, W. G. & LANGEVOORT, H. L. 1972. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ*, 46, 845-52.
- VAN FURTH, R., DIESSELHOFF-DEN DULK, M. C. & MATTIE, H. 1973. Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during an acute inflammatory reaction. *J Exp Med*, 138, 1314-30.
- VOLKMAN, A. & GOWANS, J. L. 1965. The Origin of Macrophages from Bone Marrow in the Rat. *Br J Exp Pathol*, 46, 62-70.
- WHITE, M. F., SHOELSON, S. E., KEUTMANN, H. & KAHN, C. R. 1988. A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor. *J Biol Chem*, 263, 2969-80.
- WOODS, K. A., CAMACHO-HUBNER, C., SAVAGE, M. O. & CLARK, A. J. 1996. Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N Engl J Med*, 335, 1363-7.
- WYNES, M. W. & RICHES, D. W. 2003. Induction of macrophage insulin-like growth factor-I expression by the Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *J Immunol*, 171, 3550-9.
- XUE, J., SCHMIDT, S. V., SANDER, J., DRAFFEHN, A., KREBS, W., QUESTER, I., DE NARDO, D., GOHEL, T. D., EMDE, M., SCHMIDLEITHNER, L., GANESAN, H., NINO-CASTRO, A., MALLMANN, M. R., LABZIN, L., THEIS, H., KRAUT, M., BEYER, M., LATZ, E., FREEMAN, T. C., ULAS, T. & SCHULTZE, J. L. 2014. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity*, 40, 274-88.
- YAKAR, S., LIU, J. L., STANNARD, B., BUTLER, A., ACCILI, D., SAUER, B. & LEROITH, D. 1999. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 7324-9.

- YAN, X., ANZAI, A., KATSUMATA, Y., MATSUHASHI, T., ITO, K., ENDO, J., YAMAMOTO, T., TAKESHIMA, A., SHINMURA, K., SHEN, W., FUKUDA, K. & SANO, M. 2013. Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, 62, 24-35.
- YU, T., GAO, M., YANG, P., LIU, D., WANG, D., SONG, F., ZHANG, X. & LIU, Y. 2019. Insulin promotes macrophage phenotype transition through PI3K/Akt and PPAR-gamma signaling during diabetic wound healing. *J Cell Physiol*, 234, 4217-4231.

3 Danksagung

Ich möchte zunächst selbstverständlich meinem Doktorvater Prof. Dr. Axel Gödecke danken. Danke für die Möglichkeit an diesem Thema und in diesem Institut zu arbeiten, für die häufig direkte Betreuung meiner Arbeit und das viele Zusammensitzen, sowie für die Möglichkeit meine Promotion im Rahmen eines IRTG-Stipendiums durchzuführen und an einem Kongress teilzunehmen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Norbert Gerdes für das Korreferat dieser Dissertation.

Zudem danke ich natürlich auch allen Mitarbeitern des Instituts. Hier geht ein besonderer Dank an Dr. Rianne Nederlof für die tatkräftige Hilfe und das wesentliche Voranbringen meiner Arbeit und auch an Dr. André Spsychala für die stetige Hilfsbereitschaft. Danke an Julia Albrecht für gutes Zureden und die nette Atmosphäre im Büro.

Zu guter Letzt danke ich auch meinen Eltern, die für mich die Möglichkeit geschaffen haben zu studieren und zu promovieren. Und auch meinen Freund Benjamin Roth möchte ich nicht vergessen. Danke für hartnäckiges und unerschrockenes Nachhaken, ohne das diese Arbeit wohl auch noch nicht abgeschlossen wäre.