

**Die Rolle von B-Zellen
bei der Regulation der vaskulären Funktion
und der Insulinresistenz**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doctor rerum naturalium

im Promotionsfach Biomedizinische Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften

der Johannes Gutenberg-Universität

in Mainz

Solveig Hasselwander

Geboren in Mainz

Mainz, den 14.01.2020

Meiner Mutter – immer

Happiness can be found, even in the darkest of times,
if one only remembers to turn on the light.

- Joanne K. Rowling

Zusammenfassung

Die Verbindung zwischen B-Zellen und der Entstehung von Erkrankungen des vaskulären Systems hat in den letzten Jahren zunehmend Aufmerksamkeit auf sich gezogen. Während zwar bekannt ist, welchen Effekt B-Zellen beispielsweise auf die Arterioskleroseprogression haben, ist nicht geklärt, welchen Einfluss B-Zellen unter physiologischen Bedingungen auf das vaskuläre System ausüben.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Knockout von B-Zellen in Mäusen zu einer vaskulären Dysfunktion führt. Dies ging mit einem Anstieg der neutrophilen Granulozytenzahl in Knochenmark, Blut, perivaskulären Fettgewebe und der Aorta selbst einher. Eine Depletion von Neutrophilen in B-Zell-Knockout-(JHT)-Mäusen führte zur vollständigen Wiederherstellung der vaskulären Funktion auf das Niveau der Wildtyp-(B6)-Kontrollmäuse. Derselbe Effekt konnte durch einen adoptiven Transfer von B1-Zellen aus B6-Mäusen in altersgleiche JHT-Mäuse erreicht werden. Der Transfer von B1-Zellen zog außerdem eine Senkung der Neutrophilenzahl im Blut nach sich. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die vaskuläre Dysfunktion in JHT-Mäusen Neutrophilen-vermittelt ist, und, dass unter physiologischen Bedingungen die Neutrophilenzahlen über B1-Zellen reguliert werden.

Adipositas als weit verbreitetes Krankheitsbild führt ebenfalls zu einer vaskulären Dysfunktion. Hier konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu B6-Mäusen Adipositas in JHT-Mäusen zu keiner Verschlechterung der Acetylcholin-induzierten Relaxation führt. Die Ergebnisse von Insulin- und Glukosetoleranztest sowie der Nüchtern-Glukose- beziehungsweise Insulinkonzentrationsmessung wiesen für JHT-Mäuse, welche mit einer hochkalorischen Diät (HFD) gefüttert wurden, im Vergleich zu HFD-gefütterten B6-Mäusen eine Abmilderung der Insulinresistenz auf. Auch die Makrophageninfiltration in das epididymale Fettgewebe war in HFD-JHT-Mäusen im Vergleich reduziert. Ebenso waren sogenannte IgMi-Mäuse signifikant, wenn auch nicht vollständig, vor durch HFD-Fütterung-induzierter Insulinresistenz protektiert. IgMi-Mäuse können reife B-Zellen produzieren. Diese tragen jedoch nur den IgM-Rezeptor an der Oberfläche und können keine Antikörper

sezernieren. IgG1i-Mäuse, welche nur B-Zellen vom IgG1-Typ ausbilden können, wiesen unter HFD-Fütterung sogar einen vollständigen Schutz vor Adipositas-induzierter Insulinresistenz auf. Diese Ergebnisse zeigen, dass B-Zellen bei der Pathogenese von Adipositas-induzierter Insulinresistenz eine wichtige Rolle spielen. Die Manipulation von B-Zellen oder der B-Zellfunktion könnte somit eine neue Therapiestrategie für die Behandlung von Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2 repräsentieren.

Summary

In recent years the connection between B cells and the development of vascular diseases has gained increasing attention. While the effects of B cells on e.g. arteriosclerosis progression are quite clear, it is to date unknown how B cells influence the vascular system under physiological conditions.

Within the scope of this thesis it was possible to show that the knockout of B cells in mice leads to an impairment of vascular function. The vascular dysfunction was accompanied by a higher occurrence of neutrophil granulocytes in the bone marrow, the blood, the perivascular adipose tissue and the aorta itself. A depletion of neutrophils in B cell knockout (JHT) mice led to a complete normalization of vascular function to the same level as in wildtype (B6) mice. The same effect was evident after an adoptive transfer of B1 cells from B6 mice into age-matched JHT-mice. Another consequence of this transfer experiment was the significant reduction of neutrophil numbers in the blood of the recipient mice. These results allow the conclusion that vascular dysfunction of JHT mice is caused by increased numbers of neutrophils and that under physiological conditions neutrophil number is regulated by B1 cells.

Obesity is a widely spread disease which leads to vascular dysfunction. Here it is shown that in contrast to B6 mice, obesity does not lead to an exacerbation of vascular dysfunction in JHT mice. The result of insulin and glucose tolerance tests as well as fasting insulin and glucose concentrations indicated that in JHT mice, which were fed a high-fat diet (HFD), insulin resistance was reduced compared to HFD-fed B6 mice. Furthermore, immune cell infiltration into the epididymal fat tissue was diminished in HFD-JHT mice compared to HFD-B6-mice as well. Likewise, the so called IgMi-mice were significantly but not completely protected against insulin resistance caused by HFD feeding. IgMi mice produce mature B cells of the IgM type even though they cannot secrete IgM or other antibody types. IgG1i-mice which produce only B cells of the IgG1 type demonstrated a complete protection against diet-induced obesity and insulin resistance. These results

indicate that B cells play an important role in the pathogenesis of obesity-induced insulin resistance. Manipulation of B cells or B cell function may represent a new therapeutic strategy for the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes.

Inhaltsverzeichnis

1	Theoretischer Hintergrund	1
1.1	B-Zellen.....	1
1.1.1	Entwicklung und Reifung	1
1.1.1.1	Entwicklung im Knochenmark.....	1
1.1.1.2	Reifung in Milz und Lymphknoten	6
1.1.2	Kommunikation mit weiteren Zellen des Immunsystems.....	9
1.1.2.1	Cytotoxische T-Lymphozyten	10
1.1.2.2	Makrophagen	10
1.1.2.3	Neutrophile Granulozyten	11
1.2	Insulinsensitivität.....	12
1.2.1	Insulin.....	12
1.2.2	Insulinsignaltransduktion und Glukosefreisetzung	13
1.2.3	Adipositas und das Metabolische Syndrom	15
1.3.	Die vaskuläre Funktion	17
2	Zielsetzung.....	20
3	Material und Methoden	22
3.1	Material	22
3.1.1	Chemikalien und gekaufte Puffer	22
3.1.2	Angesetzte Puffer und Lösungen.....	24
3.1.3	Antikörper	25
3.1.4	Enzyme.....	27
3.1.5	Geräte, Materialien und Software.....	27
3.2	Methoden	31
3.2.1	Mäuse	31
3.2.2	Organentnahme.....	32
3.2.3	Durchflusszytometrie.....	33
3.2.3.1	Organaufarbeitung.....	33

3.2.3.1.1	Aufarbeitung der Milz.....	34
3.2.3.1.2	Aufarbeitung der Leber	34
3.2.3.1.3	Aufarbeitung des Bluts	35
3.2.3.1.4	Aufarbeitung des EFs	35
3.2.3.1.5	Aufarbeitung der Aorta	36
3.2.3.1.6	Aufarbeitung des PVATs	37
3.2.3.1.7	Aufarbeitung des KMs	37
3.2.3.2	Antikörperfärbung.....	38
3.2.3.2.1	Antikörperfärbung von Milz, Leber, Aorta, PVAT, EF und KM	38
3.2.3.2.2	Antikörperfärbung des Bluts	38
3.2.3.2.3	Antikörperfärbung des KMs (HSC/CMP/GMP/MEP)	39
3.2.3.2.4	Antikörper-Stammlösungen	40
3.2.3.2.5	Kompensation.....	42
3.2.3.3	Gating-Strategien	43
3.2.4	Neutrophilendepletion	49
3.2.5	B-Zelltransfer	49
3.2.6	Experimentelle Fütterung.....	50
3.2.7	Blutzuckermessungen.....	51
3.2.7.1	Insulintoleranztest.....	52
3.2.7.2	Glukosetoleranztest	52
3.2.7.3	Nüchtern Glukose- und Insulinwerte	52
3.2.8	Serumlipid und -enzymprofil, Glukosespiegel	53
3.2.9	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	54
3.2.9.1	Insulin ELISA	54
3.2.9.2	Serumalbumin A ELISA	54
3.2.10	Myographie.....	55
3.3	Statistik.....	56
4	Ergebnisse.....	57

4.1 Die Rollen von B-Zellen bei der Regulation der vaskulären Funktion unter physiologischen Bedingungen.....	57
4.1.1 B-Zellen und die Vaskuläre Relaxation	57
4.1.2 Veränderungen des Immunzellprofils durch den Verlust von B-Zellen	59
4.1.3 Neutrophilen Depletion und die Folgen auf die vaskuläre Relaxation.....	67
4.1.4 Ausschluss einer chronischen Inflammation in JHT-Mäusen	70
4.1.5 B-Zell Transfer und die Folgen auf die vaskuläre Relaxation.....	71
4.1.6 IgMi- und IgG1i-Mäuse	78
4.2 B-Zellen, Insulinresistenz und das vaskuläre System	88
4.2.1 Der Einfluss von HFD auf Körper- und Organgewicht.....	88
4.2.2 Der Einfluss von HFD auf die vaskuläre Relaxation	94
4.2.3 Die Rolle von B-Zellen auf Insulinsensitivität und -resistenz.....	95
4.2.4 B-Zellen und Serumenzyme und –lipide.....	107
4.2.5 HFD-induzierte Immunzellinfiltration.....	109
4.2.6 Der Einfluss von HFD auf den BCR.....	115
5 Diskussion.....	118
5.1 B-Zellen als Hüter der vaskulären Funktion	118
5.2 B-Zellen als Vermittler von Insulinresistenz	128
6 Ausblick	140
7 Anhang	145
7.1 Abkürzungsverzeichnis	145
7.2 Abbildungsverzeichnis.....	149
7.3 Tabellenverzeichnis.....	152
8 Literaturverzeichnis.....	153

1 Theoretischer Hintergrund

1.1 B-Zellen

1.1.1 Entwicklung und Reifung

1.1.1.1 Entwicklung im Knochenmark

B-Zellen entstehen wie alle Blutzellen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSC, engl.: *hematopoietic stem cell*) im Knochenmark (KM) [1]. HSCs entwickeln sich auf einen Stimulus hin zu multipotenten Vorläuferzellen (MPP, engl.: *multipotent progenitor*), welche wiederum zwei Arten von Stammzellen erzeugen können: gemeinsame myeloide Vorläuferzellen (CMP, engl.: *common myeloid progenitor*) und gemeinsame lymphatische Vorläuferzellen (CLP, engl.: *common lymphatic progenitor*) [2].

Aus CMPs entstehen dann entweder Megakaryocyten-/Erythrozytenvorläuferzellen (MEP, engl.: *megakaryocyte-erythroid progenitor*), aus welchen sich dann später Blutplättchen und Erythrozyten entwickeln, oder Granulozyten-/Makrophagenvorläuferzellen (GMP, engl.: *granulocyte-macrophage progenitor*).[3] GMPs reifen im Blut entweder zu zirkulierenden Monozyten, zu Mastzell-Vorläuferzellen oder zu kontravalent neutrophilen, eosinophilen sowie basophilen Granulozyten. Monozyten differenzieren nach dem Eindringen in Gewebe dann zu Makrophagen. Diese Zellen werden zum angeborenen Immunsystem gezählt [4].

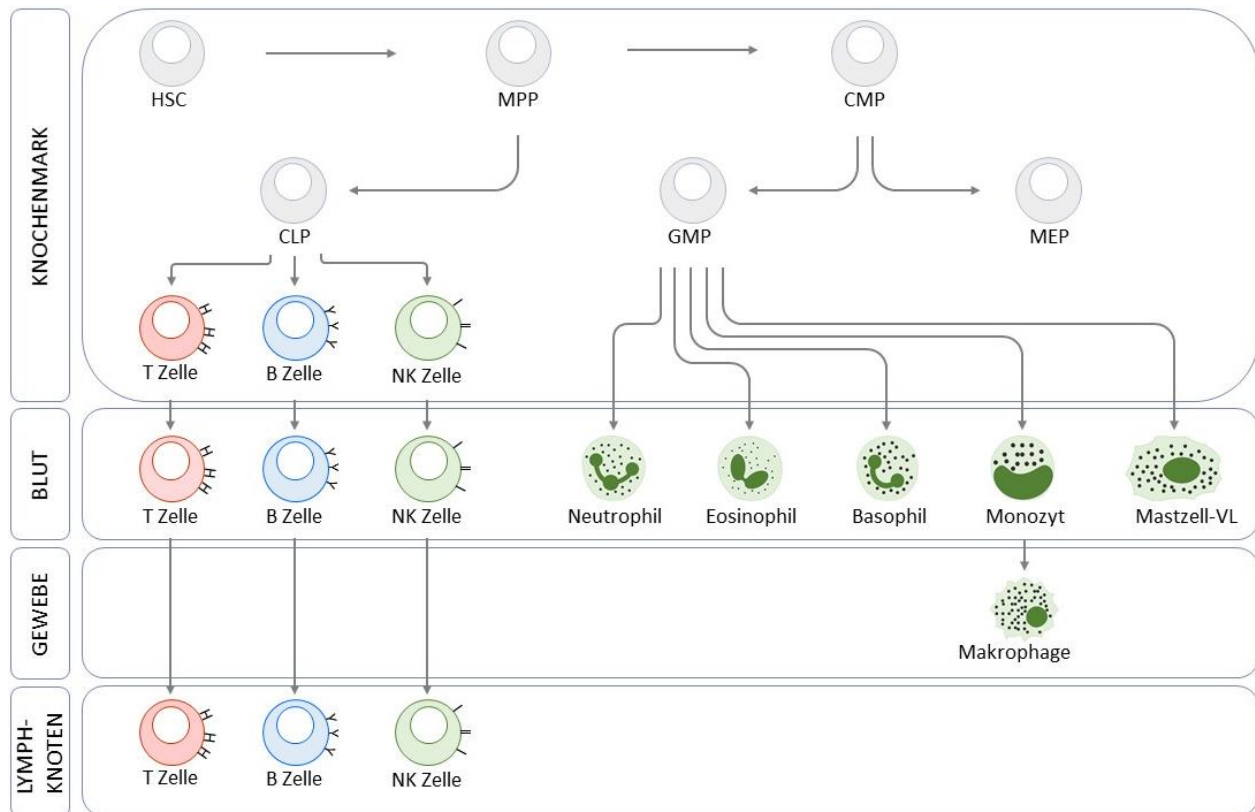


Abbildung 1: Hämatopoese der Lymphozyten und Leukozyten im Knochenmark.

Vereinfachte Darstellung nach Rieger et al. [1]. und Murphy et al. [4] HSC: Hämatopoetische Stammzelle. MPP: Multipotente Vorläuferzelle. CMP: Gemeinsame myeloide Vorläuferzelle. GMP: Granulozyten-/Makrophagen-Vorläuferzelle. MEP: Megakaryocyten-/Erythrozytenvorläuferzellen. CLP: Gemeinsame Lymphatische Vorläuferzelle.

Die lymphatische Zelllinie umfasst B-Zellen, T-Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Hierbei gehören die NK-Zellen dem angeborenen Immunsystem und die B- und T-Zellen dem adaptiven Immunsystem an. Alle drei Zellarten entwickeln sich stimulusabhängig aus CLPs. Der jeweilige Stimulus wird von spezialisierten nichtlymphatischen Stromazellen im KM gesetzt. Stromazellen bilden in diesem Zusammenhang zum einen über Zelladhäsionsmoleküle Kontaktstellen zum Lymphozyten aus und fixieren diesen somit örtlich. Zum anderen produzieren sie Cytokine und Chemokine, um die Entwicklung des Lymphozyten voranzutreiben. Im Falle der B-Zell-Entwicklung sind vor allem das lösliche Cytokin Interleukin (IL)-7, welches bei der Maus als Wachstums- und Überlebenssignal (beim Menschen unbekannt) für B-Zellen dient, und das membrangebundene

Cytokin Stammzellfaktor (SCF, engl.: *stem cell factor*), welches ebenfalls ein Wachstumssignal ist, essentiell. Aus der CLP entsteht die Pro-B-Zelle, die erste Zelle der B-Zelllinie. In ihr beginnt die sogenannte somatische Rekombination: die Umlagerung der Immunglobuline (Ig), deren Gene sich zuvor noch in den Keimbahnen befanden [4]. Immunglobuline sind Proteine [5], die an der Oberfläche von B-Zellen als Rezeptoren und sezerniert als Promotoren der Komplementaktivierung, Opsonisierung und antikörpervermittelten zellulären Zytotoxizität zur Markierung von Pathogenen vorkommen [4, 6]. Sie bestehen aus zwei schweren Ketten (H-Kette, engl.: *heavy chain*) und zwei leichten Ketten (L-Kette). Funktionell können Immunglobuline in eine variable Region, welche das Antigen (AG) bindet, und eine konstante Region, die die Effektorfunktion spezifiziert, unterteilt werden. Es gibt fünf Hauptgruppen an Immunglobulinen, deren Unterscheidung abhängig von der exprimierten H-Kette ist: IgM, IgD, IgG, IgE und IgA [5]. Struktur und Form der einzelnen Subklassen werden unter „1.1.1.2 Refiung in Milz und Lymphknoten“ genauer erläutert. Ein Schema der somatischen Rekombination ist in Abbildung 2 zu sehen. In jeder B-Zell-Entwicklungsstufe wird ein Genlocus umgelagert, beginnend mit der schweren Kette [7]. Die Umlagerungen auf DNA und RNA-Ebene sind in Abbildung 3 dargestellt. In der frühen Pro-B-Zelle wird in beiden Allelen das D-Segment an das J_H-Segment angelagert (D-J-Umlagerung). In der entstandenen späten Pro-B-Zelle werden V_H- und DJ_H-Segmente miteinander verbunden (V-DJ-Umlagerung). Diese Umordnung geschieht nur auf einem Allel [8]. Ist die Umlagerung erfolgreich, kann eine funktionstüchtige schwere μ -Kette produziert werden und die Pro-B-Zelle wird zu einer großen Prä-B-Zelle. Pro-B-Zellen, die keine μ -Kette hervorbringen können, werden eliminiert. Die Prüfung gelingt durch Einbau der schweren Kette in einen vorläufigen Rezeptor, welcher statt leichten Ketten, da diese noch nicht umgelagert sind, zwei Proteine mit ähnlicher Struktur enthält. Dieser sogenannte Prä-B-Zellrezeptor (Prä-BCR) signalisiert dann den Status der Umlagerung. Um zu verhindern, dass auf dem zweiten Allel ebenfalls eine V-DJ-Umlagerung stattfindet und somit zwei schwere Ketten mit verschiedenen Antigenespezifitäten entstehen, kommt es in der Prä-B-Zelle zu einem Allelausschluss, d. h. die diploide Zelle kann nur noch eines der beiden Allele für ein Gen exprimieren [4].

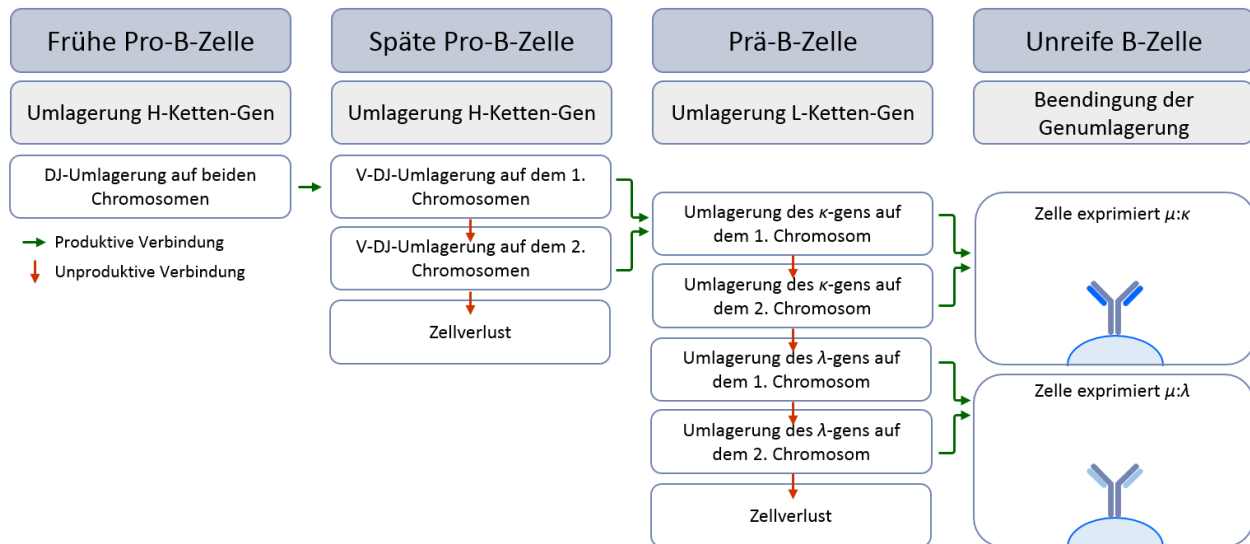


Abbildung 2: Schema der somatischen Rekombination der Gensegmente der H- und L-Ketten der B-Zellreifung im KM nach Murphy *et al.* [4].

Bevor dir Prä-B-Zelle mit der Umlagerung der leichten Kette beginnt, durchläuft mehrere Zellteilungszyklen, was die Population der Zellen mit der korrekten H-Ketten-Umlagerung erhöht [7]. Da jede Prä-B-Zelle unterschiedliche Gene für die L-Kette bilden kann, entstehen aus einer Pro-B-Zelle viele Zellen mit jeweils verschiedenen Antigenespezifitäten. Auch hier kommt es zu einem Allelausschluss. Besonders ist, dass durch das fehlende D-Segment der leichten Ketten nur eine Umlagerung nötig ist. Deshalb können nach einer fehlerhaften Umlagerung einfach andere, zuvor nicht verwendete V- und J-Segmente auf dem gleichen Allel umgeordnet werden. Da es zwei Isootypen an L-Ketten gibt, λ und κ , kommt es bei der Umlagerung der L-Kette auch zu einem Isoypenausschluss. Dies bedeutet, dass jede B-Zelle nur einen Typ L-Kette exprimieren kann. Zellen, die eine funktionstüchtige L-Kette hervorbringen, werden als unreife B-Zelle bezeichnet und können den BCR des Typs μ an der Zelloberfläche exprimieren [4]. Bevor sie das KM verlassen können, werden unreife B-Zellen noch auf ihre Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen geprüft. Bei starker Reaktion auf körpereigene Antigene, wie es bei multivalenten Liganden der Fall sein kann, kann es zu Rezeptor-Editierung oder klonaler Deletion (Apoptose) kommen. B-Zellen mit BCRs, die lösliche Moleküle binden und dadurch quervernetzen, werden anergisch [9]. Sie gelangen

zwar in die Peripherie und können sowohl IgM als auch IgD, welches durch alternatives Spleißen entsteht, exprimieren. Durch die verringerte Menge von IgM auf ihrer Oberfläche sind sie jedoch mit anderen B-Zellen nicht konkurrenzfähig. Unreife B-Zellen, deren BCRs lösliche Moleküle mit einer geringeren Affinität ohne Quervernetzung erkennen, entgehen dem System. Sie gelangen in die Peripherie und sind potentiell autoreaktiv. Diese klonal ignoranten B-Zellen können später bei der Prüfung der peripheren Toleranz jedoch noch entfernt werden. Unreife B-Zellen, die keine Interaktion mit körpereigenen Antigenen zeigen, verlassen ungehindert das KM, gelangen in die Peripherie und werden zu reifen B-Zellen, die sowohl IgM als auch IgD an der Oberfläche tragen. Der beschriebene Vorgang wird als zentrale Toleranzinduktion bezeichnet [4].

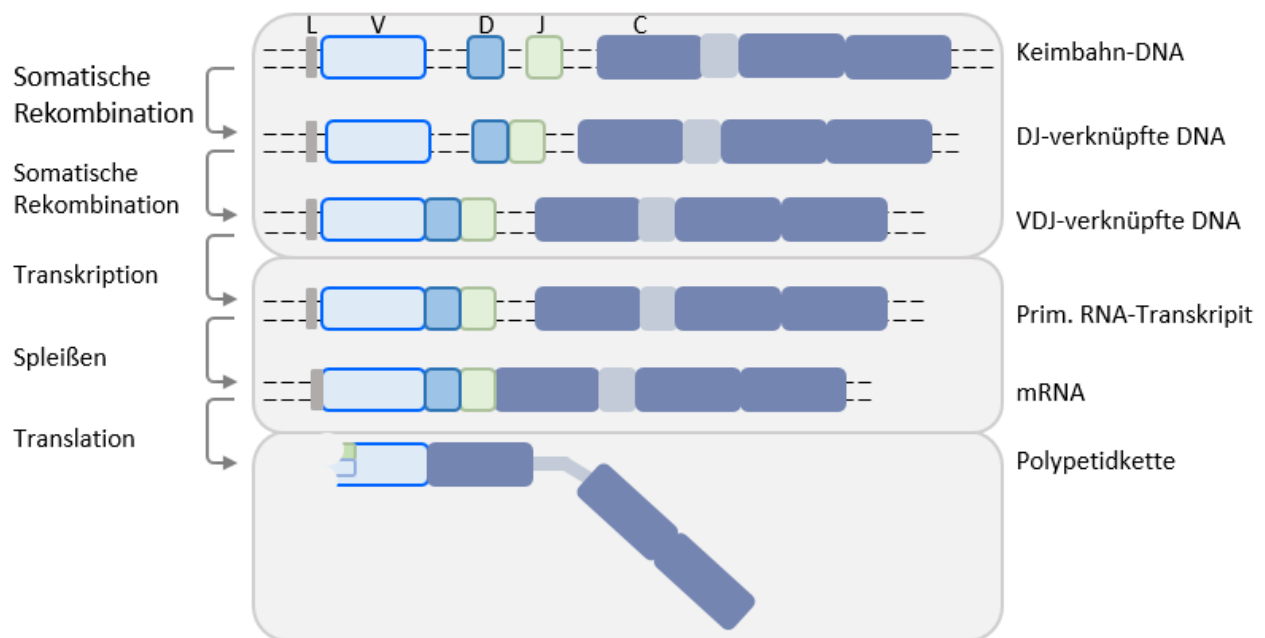


Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung der Entstehung der H-Kette von der Keimbahn zur Polypeptidkette nach Murphy et al.[4]

In der frühen Pro-B-Zelle wird das D-Segment an das J-Segment angelagert. Die zweite somatische Rekombination geschieht in der späten Pro-B-Zelle, wenn das DJ-Segment zum V-Segment geordnet wird. Nach der Transkription wird das primäre RNA-Transkript gespleißt, sodass das Gensegment der konstanten Region (C-Segment) an das der variablen Region (VDJ) anlagert. Auch das Leitpeptid (L), welches die Signalsequenz für den Transport zum Endoplasmatischen Retikulum codiert, wird durch Spleißen an die VDJ Sequenz angebracht. Nach der Translation liegt die vollständige H-Kette vor. Die Entstehung der L-Kette erfolgt nach dem gleichen Schema. Da hier kein D-Segment und keine konstante Region vorhanden sind, entfallen die zugehörigen Schritte. Nach Murphy et al. [4].

1.1.1.2 Reifung in Milz und Lymphknoten

Nach dem Verlassen des KMs werden die B-Zellen über das Blut zu den peripheren lymphatischen Geweben transportiert. Diese verlassen sie allerdings regelmäßig und zirkulieren in Blut und Lymphe bis sie entweder auf ein Antigen treffen, welches die Proliferation und Differenzierung anregt, oder apoptotisch werden. Solange sie auf kein Antigen treffen, werden sie als naive oder reife B-Zellen bezeichnet. Um zu überleben, benötigen sie regelmäßige Signale, die sie in den Follikeln von Milz und Lymphknoten erhalten. Ein essentielles Signal ist hierbei der B-Zell-aktivierende Faktor der Tumonekrosefaktor- (TNF-) Familie (BAFF), ein Cytokin, das mit dem BAFF-Rezeptor auf der Oberfläche der B-Zellen interagiert [4]. Jedoch konnte gezeigt werden, dass nicht alle B-Zellen abhängig von diesem Signal sind [10]. B-Zellen können in drei Subpopulationen unterteilt werden: B1-, B2- und regulatorische B (B_{reg})-Zellen [11]. Während der Großteil der B-Zellpopulation dem BAFF-abhängigen B2-Typ zuzuordnen sind, sind die B-Zellen des B1-Typs unabhängig von einer BAFF-BAFF-Rezeptor-Interaktion [10]. B_{reg} -Zellen, welche große Mengen an IL-10 produzieren, werden wiederum auch durch BAFF induziert [11].

Nur reife B2-Zellen können in die Follikel der Milz und der Lymphknoten eindringen und somit aktiv an der humoralen Immunantwort teilhaben [12]. Hierfür ist die Bildung von kurzlebigen Keimzentren (GC, engl.: Germinal center) innerhalb von Follikeln aus IgM^+IgD^+ B-Zellen (B-Zellzone) in Milz und Lymphknoten notwendig [13]. Diese Follikel werden durch ein Netzwerk aus follikulären dendritischen Zellen (FDC, engl.: *Follicular dendritic cell*) separiert [14]. Außerdem grenzen sie an Bereiche mit vielen T-Zellen (T-Zellzone) [13]. Die Grenze zwischen diesen beiden Zonen bildet eine kritische Synapse zur Bildung von Keimzentren [15]. Bevor sie an diese Grenze migrieren, müssen die naiven B-Zellen einem exogenen Antigen innerhalb des Follikels begegnen und über ihren BCR erkennen. An der Grenzfläche treffen sie dann auf eine T-Helfer-Zellen (T_H -Zelle), die durch Kontakt mit antigeninduzierten dendritischen Zellen (DC, engl.: *Dendritic cell*) aus naiven T-Zellen differenziert ist [4]. Der Kontakt an der Synapse führt zur vollständigen Aktivierung der B-Zelle und zu deren Proliferation [13]. Ein Teil der entstandenen B-Zellen differenziert direkt weiter zu antikörpersezernierenden Plasmazellen. Ein anderer Teil wandert zurück in die, jetzt sekundären, Follikel der B-Zellzone [13, 14].

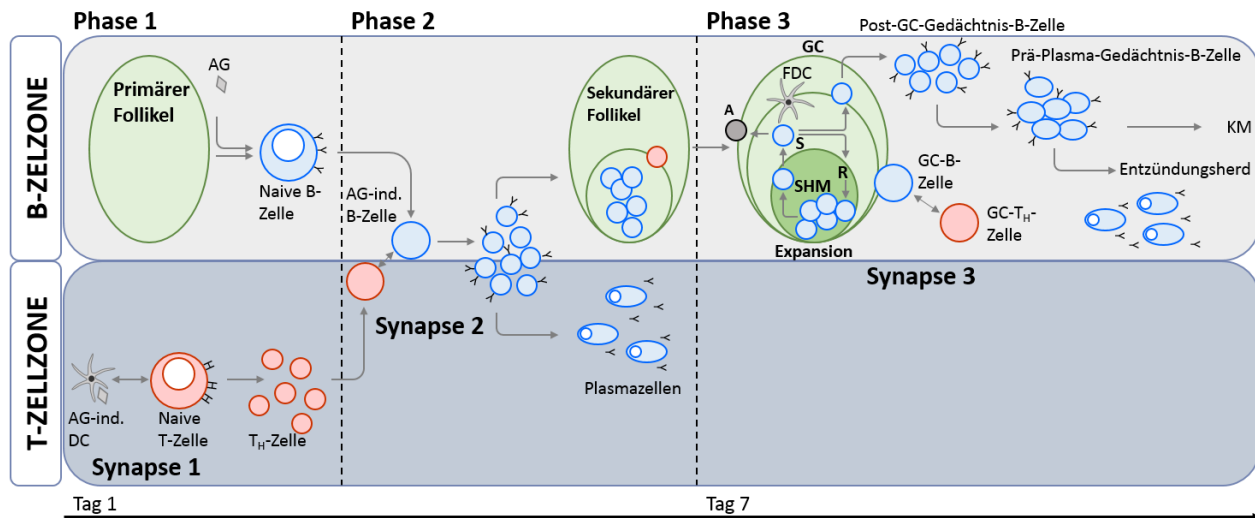


Abbildung 4: B-Zellreifung in den sekundären lymphatischen Organen.

Reife B-Zellen gelangen über Blut und Lymphe in die sekundären lymphatischen Organe. Dort werden sie zunächst in der B-Zellzone von Antigenen (AG) induziert. Am Rand zur T-Zellzone treffen sie dann auf spezialisierte TH-Zellen. Die Differenzierung naiver T-Zellen in der T-Zellzone zu TH-Zellen geschieht durch die Antigenpräsentation über eine Dendritische Zelle (DC) in der 1. Synapse. TH-Zellen und AG-induzierte B-Zellen bilden die 2. Synapse. Hierdurch werden Proliferation und die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen angeregt. Ein Teil der aktivierten B-Zellen wandert weiter in die sekundären Follikel. Es entstehen Keimzentren (GC). Hier werden die B-Zellen durch somatische Hypermutation (SHM) und Affinitätsreifung anhand von durch follikuläre Dendritische Zellen (FDC) präsentierten AG spezialisiert. In der Synapse 3, welche die Interaktion zwischen B-Zellen (GC-B-Zelle) und TH-Zelle (GC-TH-Zelle) innerhalb eines Keimzentrums bezeichnet, wird der Isotypenwechsel eingeleitet. FDC geprüfte und selektierte B-Zellen verlassen das Keimzentrum und migrieren als spezialisierte Plasmazelle zum Entzündungsherd oder als Gedächtniszelle ins KM. AG-ind. = Antigen-induziert, A = Apoptose, S = Selektion, R = Retention, KM = Knochenmark. Modifiziert nach McHeyzer-Williams et al. [15].

Dort angekommen bildet sich nun das GC, bestehend aus zwei Bereichen, der hellen und der dunklen Zone. In letzteren befinden sich fast ausschließlich stark proliferierende B-Zellen, die als Zentroblasten bezeichnet werden [14]. Hier findet die somatische Hypermutation (SHM), die Veränderung der variablen Regionen der Immunglobuline zur Verbesserung der AG-Spezifität, statt [4]. Nach der SHM gelangen die nun als Zentrozyten bezeichneten B-Zellen in die helle Zone, in der neben den GC-B-Zellen auch FDC, naive B-Zellen sowie GC-T_H-Zellen lokalisiert sind. Hier kommt es mithilfe der FDC zur Affinitätsreifung. Je nach Antigenaffinität werden die Zentrozyten selektiert und können das Keimzentrum verlassen, retiniert werden und erneut einen Zyklus der SHM durchlaufen [14] oder die Apoptose einleiten [4]. Im GC findet auch der Isotypenwechsel

statt. Durch Interaktion mit GC- T_H und in Abhängigkeit von T_H -sekretierten Cytokinen, können die B-Zellen ihren Ig-Isotyp von IgM und IgD auf IgG, IgE und IgA wechseln [4, 15]. Hierbei kann IgG noch in weitere vier (Mensch: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4; Maus: IgG1, IgG2a/c, IgG2b, IgG3) [16] und IgA beim Menschen in zwei Subklassen (IgA1 und IgA2) unterteilt werden. Während der Entwicklung im KM, können B-Zellen zunächst nur IgM exprimieren. Es liegt meist als Pentamer (selten als Hexamer) vor und wird mit der primären Immunantwort assoziiert. Da seine variable Region keiner SHM unterlag (Abbildung 4), ist es polyreaktiv und von geringer Affinität zu Antigenen.

Sobald B-Zellen das KM verlassen, können sie auch IgD exprimieren. In der Regel exprimieren IgD^+ -Zellen weiterhin auch IgM. Sezerniertes IgD kann nur in geringen Dosen im Serum gefunden werden, wobei seine Funktion unklar bleibt.

IgA ist vor allem auf Schleimhäuten und in Drüsensekreten wie Spucke und Muttermilch zu finden. Dort liegt es auch als Dimer, selten als Trimer oder Tetramer, vor. Im Serum tritt es als Monomer auf und ist nur in geringen Konzentrationen zu finden. Seine Hauptfunktion besteht im Schutz der Schleimhäute gegen Toxine, Viren und Bakterien durch direkte Neutralisation oder indem es die Bindung dieser an die Schleimhäute verhindert.

IgE, ein Monomer, hat die geringste Halbwertszeit aller Immunglobuline. Es ist bei Autoimmunkrankheiten und bei allergischen Reaktionen wichtig.

IgG ist der vorwiegend im Serum zu findende Antikörper. Seinen Subklassen sind die Plazentagängigkeit und die Teilnahme in der sekundären Immunantwort gemein. Jedoch ist ihre Funktion in Bezug auf verschiedene Krankheiten gänzlich unterschiedlich [5]. Auch weisen sie unterschiedliche Affinitäten bezüglich $Fc\gamma$ -Rezeptoren und verschiedene Effektivität bei der Aktivierung des Komplementsystems auf [17, 18].

Nach erfolgreicher SHM, Affinitätsreifung und möglichem Isotypenwechsel verlassen die B-Zellen das GC und auch das sekundäre Lymphorgan insgesamt. Sie gelangen in die Peripherie und migrieren entweder direkt als Gedächtniszellen ins KM oder bekämpfen als hochaffine, antikörpersezernierende Plasmazellen den Entzündungsherd [15].

Die oben beschriebene Entwicklung bezieht sich jedoch nur auf die prädominante Population der B-Zellen, die B2- oder konventionellen B-Zellen. Eine kleinere Population, die B1-Zellen, entsteht in der fötalen Leber [19] und dem fötalen Omentum [20] und unterscheidet sich in Lokalisation und Oberflächenmarkern von den konventionellen B-Zellen [21]. So sind B2-Zellen vor allem in Milz und den Lymphknoten zu finden und vom Phänotyp $B220^{hi}IgD^{hi}CD23^{hi}IgM^{+}$ [21]. B1-Zellen hingegen sind in der Pleura und der Peritonealhöhle lokalisiert. Sie exprimieren hohe Level an Oberflächen-IgM, aber nur geringe Mengen an B220 und Oberflächen-IgD. Außerdem sind sie $CD23^{-}$. B1-Zellen werden in zwei Subpopulationen geteilt: B1a- ($CD5^{+}$) und B1b-Zellen ($CD5^{-}$) [22]. Alle B1-Zellen werden zum angeborenen Immunsystem gezählt [20]. Sie können sich selbst erneuern und produzieren natürliches IgM [22]. Natürliche Antikörper werden ohne Antigenstimulation sezerniert. Sie sind oft polyreaktiv, aber weisen nur eine geringe Affinität auf. Durch sie können bakterielle oder virale Infekten direkt und schnell bekämpft werden [23].

1.1.2 Kommunikation mit weiteren Zellen des Immunsystems

Wie bereits im Kapitel „1.1.1.2 Reifung in Milz und Lymphknoten“ dargestellt, hat der BCR von B-Zellen zwei Funktionen. Zum einen überträgt er Signale ins Innere der Zelle und zum anderen leitet seine Bindung an ein AG dessen Endozytose ein. Im Zellinneren wird das AG degradiert, um dann an ein Haupthistokompatibilitätskomplex- (MHC, engl.: *major histocompatibility complex*) Klasse-II-Molekül-gebunden wieder an die Zelloberfläche transportiert werden zu können. Dort wird der Peptid:MHC-Klasse-II-Komplex von spezifischen T_H -Zellen ($CD4^{+}$) erkannt, was die bereits beschriebene somatische Hypermutation und den Immunglobulinsubtypenwechsel einleitet [4].

Dies ist aber nicht die einzige Kontaktaufnahme von B-Zellen mit anderen Zellen des Immunsystems. Weitere dieser für die vorliegende Arbeit interessanter Interaktionen werden im Folgenden erläutert.

1.1.2.1 Cytotoxische T-Lymphozyten

Anstelle des CD4-Corezeptors können naive T-Zellen auch den CD8-Corezeptor an ihrer Oberfläche exprimieren. Diese CD8⁺-T-Zellen differenzieren zu sogenannten cytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) und sind essentiell für die Bekämpfung intrazellulärer Krankheitserreger wie Viren. Sie erkennen Peptid:MHC-Klasse-I-Komplexe an der Oberfläche infizierter Zellen [4] und können diese durch Sezernierung von Cytokinen, wie IL-2 und INF- γ , und zytotoxischer Proteine, wie Perforinen und Granzymen, abtöten [24]. Da antigenpräsentierende Zellen (APC, engl.: antigen presenting cell) exogene Antigene auch über MHC-I-Komplexe darbieten können (engl.: *cross priming*) [25], können CTLs auch mit klassischen APCs interagieren [26]. Ob B-Zellen auch für CTL als APCs agieren können, ist allerdings umstritten und bedarf vermutlich zusätzlich der Unterstützung von T_H-Zellen [27]. Es ist jedoch bekannt, dass bei einer AG-unabhängigen Interaktion CTLs von B-Zellen über die Oberflächenproteine CD27 und CD70 Überlebens- und Proliferationssignale erhalten, was außerdem die Sezernierung von Cytokinen über CTL erhöht [26].

1.1.2.2 Makrophagen

Makrophagen sind ausdifferenzierte Zellen der myeloiden Zelllinie. Sie sind beteiligt an der Aufrechterhaltung der Homöostase und gehören zur angeborenen Immunantwort. Zusätzlich sind sie auch an langfristigen Entzündungsreaktionen beteiligt und stellen eine Verbindungsstelle zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunantwort dar. Makrophagen werden in verschiedene Klassen unterteilt. Im Zusammenhang mit dieser Arbeit sind vor allem die Unterschiede zwi-

schen den klassisch und den alternativ aktivierten Makrophagen interessant. Die klassische Aktivierung erfolgt über den Kontakt mit Interferon- γ . Die hierbei entstehenden sogenannten M1-Makrophagen (M1) verstärken Entzündungsreaktionen durch die Produktion verschiedener lytischer Proteine und reaktiver Moleküle, wie beispielsweise Interferon- γ , reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und proinflammatorischer Chemokine. Alternativ aktivierte, als M2- bezeichnete Makrophagen (M2) hingegen wirken antiinflammatorisch, indem sie entzündungshemmende und regulierende Cytokine wie TGF- β und IL-10 ausschütten und somit bei der Reparatur von geschädigtem Gewebe mitwirken [28]. Die Interaktion zwischen B-Zellen und Makrophagen ist bidirektional. Zum einen können Makrophagen AG für B-Zellen präsentieren und somit deren Differenzierung und Proliferation einleiten [29]. Zum anderen können B-Zellen AG auf Makrophagen funktionell übertragen, sodass diese CD4⁺-T-Zellen aktivieren können. Dieser Vorgang fokussiert die Immunantwort auf ein bestimmtes AG [30].

1.1.2.3 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten (Neutrophile) sind der am häufigsten vorkommende Immunzelltyp im menschlichen Blut. Sie werden frühzeitig an Entzündungsherden rekrutiert [31] und bekämpfen diese über ihre phagozytären Eigenschaften [32] und durch Sezernierung von Enzymen, Cytokinen und reaktiven Molekülen wie ROS. Außerdem können sie extrazelluläre, fibrilläre Netzwerke ausstoßen, welche als *neutrophil extracellular traps* (NETs) bezeichnet werden. Diese bestehen, neben Proteinen aus den Granula der Neutrophilen, hauptsächlich aus DNA und können Mikroorganismen gefangen halten, was die Interaktion mit Effektormolekülen erleichtert [33].

Zudem sind Neutrophile an der Aktivierung und Regulation vieler Immunzellen von sowohl angeborener als auch adaptiver Immunantwort beteiligt. Hierzu gehören neben Makrophagen, Natürlichen Killerzellen und T-Zellen auch B-Zellen [33]. Zu B-Zellen haben sie zum einen Kontakt über das Sezernieren der Moleküle BAFF und APRIL (engl.: *a proliferation-inducing ligand*), welche das Überleben, Reifen und Differenzieren von B-Zellen stimulieren [10, 33, 34]. Zum anderen konnte

eine Population von Neutrophilen mit speziellem Phänotyp in der Randzone der Milz identifiziert werden. Diese sezernieren eine besonders hohe Menge an BAFF und APRIL, was den Immunglobulinklassenwechsel, die somatische Hypermutation und die Antikörperproduktion der B-Zellen der Randzone vorantreibt [34].

1.2 Insulinsensitivität

1.2.1 Insulin

Insulin und sein Gegenspieler Glukagon kontrollieren den Blutglukosespiegel [35].

Insulin ist ein aus 51 Aminosäuren bestehendes Dipeptid, dessen Peptidketten (A- und B-Kette) über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Sein Molekulargewicht beträgt 5802 Da [36]. Der Vorläufer des Insulins ist Proinsulin, welches in den β -Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas synthetisiert wird. Proinsulin besteht aus einer einzigen Polypeptidkette von 100 Aminosäuren. Hier sind die A- und B-Kette des späteren Insulins über eine dritte Kette, dem sogenannten C-Peptid, verbunden [37]. Die Abspaltung des C-Peptids erfolgt als posttranslationale Modifikation vor der Exozytose [36]. Die Sekretion von Insulin verläuft nach Eingang eines Stimulus pulsartig, da Millionen Inselzellen gleichzeitig reagieren [38]. In einem gesunden Organismus leitet ein erhöhter Glukosespiegel im Blut die erste Phase der Glukoseinduzierten Insulinsekretion ein. Hierbei verschließt durch die Phosphorylierung von Glukose zu Glukose-6-Phosphat mittels Glukokinase freigeswordenes ATP die ATP-abhängigen K^+ -Kanäle und bedingt die folgende Membrandepolarisation. Hierdurch werden spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle aktiviert und die resultierende erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration führt zur Insulinsekretion [36]. Weitere Mechanismen der Insulinfreisetzung sind die Aktivierung von Phospholipasen und Protein C sowie die Stimulation der Adenylatcyklase. Außerdem kann die Proteinkinase A der β -Zellen involviert sein, wobei Hormone wie das vasoaktive intestinale Peptid, das glukoseabhängige insulintrope Peptid oder das *glucagone-like Peptide 1* von Bedeutung sind [39].

1.2.2 Insulinsignaltransduktion und Glukosefreisetzung

Freies Insulin erreicht schnell seine Zielgewebe: Muskeln, Fettgewebe und Leber. Hier bindet es an seinen Rezeptor [40]. Der Insulin Rezeptor (IR) liegt als Dimer vor und gehört zur Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren [41]. Er besteht aus zwei extrazellulären α -Untereinheiten (UE) und zwei transmembranen, über Disulfidbrücke verknüpften β -UE. Bindet Insulin an die α -Untereinheiten kommt es zur Autophosphorylierung der β -Untereinheiten und folgender Phosphorylierung der IR-Substrate-1,-2,-3 und -4 (IRS-1, -2, -3, -4) [40, 42]. Die IRS fungieren als Verbindungsproteine zwischen dem IR und intrazellulärer Signalmoleküle mit SH2-Domäne (engl.: *Src-homology 2*). Hierzu gehören das Grb2 (engl.: *growth factor receptor-bound protein 2*), die Phospholipase Cy, und die regulatorische UE p85 der Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) [43].

Im Zusammenhang mit Insulinsensitivität ist besonders IRS-1 und dessen Aktivierung der regulatorischen UE p85 der PI3K von Interesse. p85 enthält zwei SH2-Domänen, welche Phosphotyrosinbereiche des Musters pYXXM (pY: Phosphotyrosin, X: beliebige Aminosäure) aktivierter Rezeptoren oder ihrer Adaptermoleküle erkennen [44]. In Nagern gehören hierzu die Tyrosine Tyr⁶⁰⁸ [45] und Tyr⁶²⁸ [40]. Die Bindung von p85 löst die Inhibition der katalytischen UE p110 der PI3K auf und führt zur Rekrutierung dieser an die Zellmembran, wo ihre Substrate lokalisiert sind [44, 46]. Hierdurch kommt es zur Aktivierung des PI3K-Akt-mTOR (engl.: *mechanistic Target of Rapamycin*)-Signalwegs, welcher neben der hier beschriebenen Glukosesekretion unter anderem auch den Zellzyklus, die Zellproliferation, die Lipidsynthese und die Nukleotidsynthese beeinflusst. Dies geschieht, indem die PI3K zunächst Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃) phosphoryliert [47]. PIP₃ aktiviert dann in seiner Funktion als sekundärer Botenstoff über die *Phosphoinositide-dependent kinase 1* (PDK1) die Kinase Akt (durch deren Phosphorylierung an Threonin Thr³⁰⁸ [48] und Serin Ser⁴⁷³ (durch mTOR Komplex 2) [49]) und die atypische Protein Kinase C (aPKC, alternative Isoformnamen: PKC ζ und PKC ι) [50]. Beide Kinasen können nun die Translokation der in Speichervesikel verpackten Glu-

kosetransporter Typ 4 (GLUT4-Transporter) an die Zellmembran regulieren [51]. Dort verschmelzen die Vesikel samt Transporter mit der Membran und ermöglichen so eine Aufnahme von Glukose in die Zelle und damit eine Senkung den Blutglukosespiegels [52].

Zu den Zielstrukturen von Akt gehören AS160 (engl.: *Akt substrate of 160*) und TBC1D1 (engl.: *tre-2/USP6, BUB2, cdc16 domain family member 1*), zwei hoch homologe Rab (engl.: *Ras-related in brain*)-GTPase-aktivierende Proteine. In aktiver Form hydrolysieren diese GTPasen GTP an der Oberfläche von GLUT4-haltigen Vesikel zu GDP. GDP-gebundene Vesikel können nicht an die Zellmembran translozieren. Durch Phosphorylierung spezifischer Bindungsstellen von AS160 und TBC1D1 wird die Aktivität der Rab-GTPasen gehemmt, sodass es zur Translokation der Vesikel an die Zellmembran kommt. Zu den beschriebenen Phosphorylierungsstellen in Nagetieren gehören das Thr⁶⁴² im AS160 und das Thr⁵⁹⁰ in TBC1D1 [53].

TBC1D1 gehört ebenfalls zu den Zielstrukturen der AMP-abhängigen Kinase (AMPK). Die AMPK ist einer der Hauptregulatoren des systemischen und zellulären Energiehaushalts. Ihre Aktivierung erfolgt bei Erhöhung der intrazellulären AMP:ATP- oder ADP:ATP-Verhältnisse oder einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration [54]. Aktiviert führt sie zu einer Inhibierung ATP-verbrauchender Mechanismen, wie der Fettsäure- und Cholesterolsynthese, und einer Aktivierung ATP-generierender Mechanismen, wie der Glukoseaufnahme und der Fettsäureoxidation. Die AMPK von Säugetieren ist ein $\alpha\beta\gamma$ -heterotrimerer Komplex, bestehend aus einer katalytischen UE (α) und zwei regulatorischen UE (β,γ) [55]. Zur vollständigen Aktivierung der AMPK ist ihre Phosphorylierung am Thr¹⁷² in der α -UE notwendig [54]. Infolgedessen kann die AMPK, neben zahlloser anderer Zielstrukturen, TBC1D1 an verschiedenen Bindungsstellen wie beispielsweise dem Ser²³¹ phosphorylieren [56]. Diese kovalente Modifikation führt wiederum zur bereits dargestellten Translokation der GLUT4-Vesikel an die Zellmembran [54, 56].

Zusätzliche Effekte der Insulinfreisetzung sind außerdem die Inhibition der Glykogenolyse und Glukoneogenese sowie die Stimulierung der Glykolyse. Außerdem aktiviert es die Fettsäure- und Triglyzeridsynthese in den Adipozyten und der Leber. Dies geht mit einer Hemmung der Lipolyse einher [36].

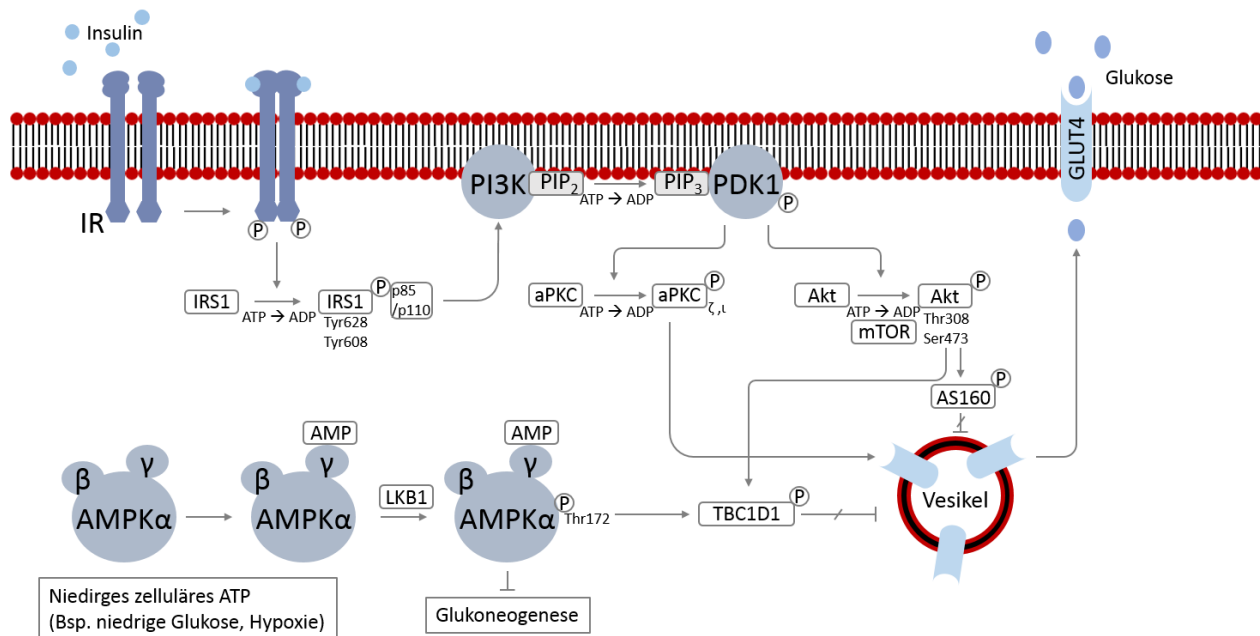


Abbildung 5: Insulinsignaltransduktion.

Freies Insulin bindet an den als Dimer-vorliegenden Insulinrezeptor, welcher daraufhin durch Autophosphorylierung aktiviert wird. Dies führt zur Aktivierung des Insulinrezeptorsubstrats 1 (IRS-1), was wiederum die PI3K-mTOR-Akt-Signalkaskade auslöst. Auf der Endstrecke des Signalwegs liegt die Inhibition der Rab-GTPasen AS160 und TBC1D1, wodurch Glukosetransporter Typ 4 (GLUT4)-haltige Vesikel an die Zellmembran migrieren und mit dieser verschmelzen können. Die GLUT4 werden in die Zellmembran eingebaut und Glukose kann in die Zellen aufgenommen werden. TBC1D1 gehört ebenfalls zu den Zielstrukturen der AMP-abhängigen Kinase (AMPK), durch deren Aktivierung die Translokation der GLUT4 ebenfalls eingeleitet werden kann. Ebenso ist eine Regulation der GLUT4-mobilisation durch die atypische Proteinkinase C (aPKC) möglich.

1.2.3 Adipositas und das Metabolische Syndrom

Als Metabolisches Syndrom wird nicht eine einzelne Erkrankung bezeichnet, sondern das gleichzeitige Auftreten verschiedener reversibler Pathologien, welche das Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Diabetes Mellitus Typ 2 (T2DM) erhöhen [57]. Diese sind Bluthochdruck, Adipositas (insbesondere eine Zunahme von viszeralem Fett), Insulinresistenz, Hypertriglyzeridämie und verminderte Level an *high-density lipoprotein* (HDL-) Cholesterin [58]. Die diagnostischen Kriterien sind jedoch nicht strikt definiert und variieren zwischen Organisationen, wie beispielsweise der *World Health Organisation* (WHO) und den *National Centers for Environmental Prediction*

(NCEP). Ein Schlüsselfaktor der Diagnose aller Organisationen war stets die Adipositas, charakterisiert z.B. durch den *body mass index* (BMI). Jedoch ist der BMI keine verlässliche Quelle, um Rückschlüsse auf den Körperfettanteil zu ziehen. Daher wird heute eher der Bauchumfang als Referenz genommen. Zwar muss für genaue Kenntnisse über den Körperfettanteil bei beiden Methoden dieser auf die gleiche Weise bestimmt werden (Magnetresonanztomographien, Unterwasserwiegen). Aber der Bauchumfang und der damit einhergehende viszerale Fettanteil geben genauere Hinweise auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen und können auch Risikopatienten mit niedrigem BMI identifizieren [57].

Durch diese Erklärungen wird klar, dass insbesondere Adipositas eine wichtige Rolle beim metabolischen Syndrom spielt. Bis vor einigen Jahren wurden Adipozyten lediglich als Speicherstelle von Triglyceriden (TG) gesehen. In Fasten- und Hungerzeiten oder bei übermäßiger körperlicher Aktivität können die TG über die Lipolyse freigesetzt werden und als Energieressource im Zielgewebe, vor allem der Skelettmuskulatur, dienen. Heutzutage wird den Adipozyten jedoch auch endokrine und parakrine Aktivität zugesprochen [59], da sie metabolisch und hormonell aktive Substanzen, sogenannte Adipokine, produzieren. Während viele hiervon positive Eigenschaften aufweisen [58] und beispielsweise appetitregulierend (Adiponektin, Leptin) wirken [60], zählen auch proinflammatorische Cytokine, wie TNF α , IL-1 β und IL-6 [61], und Chemokine [62] zu ihnen.

Zusätzlich können sie Angiotensinogen, das Vorläuferprotein des vasokonstriktiv wirkenden Angiotensin II, sezernieren [59]. Übersteigt die Menge an viszeralem Fett jedoch die natürliche Komposition, überwiegen auch die pro-inflammatorischen Eigenschaften der Adipozyten. Es kommt zu Immunzellinfiltration des Fettgewebes durch B- und T-zellen sowie Makrophagen. Diese sezernieren ebenfalls Cytokine und Chemokine und es entsteht lokal eine leichte chronische Entzündung, welche Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Arteriosklerose und Insulinresistenz zur Folge haben kann. Zu Beginn der Insulinresistenz kann diese noch durch eine gesteigerte Sekretion von Insulin durch die β -Zellen des Pankreas kompensiert werden. Nach einigen Jahren versagen die β -Zellen jedoch und der Diabetes Mellitus Typ 2 wird manifest. T2DM, als komplexe metabolische Krankheit, welche den Zuckerhaushalt beeinflusst, kann in Kombination mit chronischer Hyperglykämie

zum Organversagen führen [62]. Daher ist es zwingend notwendig, die zugrunde liegenden Mechanismen zu verstehen und die Therapie zu optimieren.

1.3. Die vaskuläre Funktion

Blutgefäße, zu denen Arterien, Arteriolen, Kapillaren, Venolen und Venen zählen [63], werden, mit Ausnahme der Kapillaren, welche aus einer einzigen Schicht Endothelzellen bestehen [64], aus drei Zellschichten gebildet. Ganz außen befindet sich die aus extrazellulärer Matrix, Fibroblasten und Vorläuferzellen bestehende *Tunica adventitia*. Die mittlere Schicht, *Tunica media*, ist aus mehreren Lagen glatter Muskelzellen aufgebaut. Diese sind kreisförmig um das Gefäß angeordnet und essentiell für die Aufrechterhaltung und Anpassung des Blutdrucks. Die innere Schicht wird als *Tunica intima* bezeichnet und ist die dünnste der drei Schichten [63]. Sie besteht aus einer einfachen Lage flacher, länglicher Endothelzellen - dem Endothel.

Vaskuläre Endothelzellen zeichnen sich durch ihre einzigartige Eigenschaft aus, Weibel-Palade-Körperchen zu enthalten. Diese zytoplasmatischen Organelle bilden einen Lagerort für den Von-Willebrand-Faktor und sind somit essentiell für die Aufrechterhaltung der Hämostase. Zusätzlich dienen Endothelzellen auch als Ausgangspunkt für die Bildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) und bilden eine semipermeable Barriere zwischen intravaskulärem und extravaskulärem Raum und kontrollieren somit den Austausch von Ionen, Flüssigkeit und Makromolekülen.

Außerdem können sie verschiedene vaskulär aktive Moleküle synthetisieren. Hierzu zählen Prostacyclin und Stickstoffmonoxid (NO), welche die Relaxation von glatten Muskelzellen auslösen, und Endothelin-1, welches vasokonstriktiv wirkt. Sie sind dementsprechend maßgeblich an der Regulation des Blutdrucks beteiligt [65].

Für die Kontraktion der glatten Muskelzellen muss die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöht werden. Hierfür binden Agonisten wie Norepinephrin, Angiotensin II oder Endothelin-1 an ihrem spezifischen G-Protein-gekoppelten Rezeptor. Dies führt zu einer Aktivierung der Phospholipase

C, welche PIP₂ zu Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol spaltet: IP₃ bindet in seiner Aufgabe als sekundärer Botenstoff an Rezeptoren des Sarkoplasmatischen Retikulums und Calciumkationen (Ca²⁺) werden in das Zytosol freigesetzt. Ca²⁺ kann entweder direkt an Calmodulin binden und somit die Myosin-leichte-Ketten-Kinase aktivieren oder zusammen mit Diacylglycerol die PKC aktivieren. Die PKC wiederum phosphoryliert die Ca²⁺-Kanäle des L-Typs in der Zellmembran, was das Einströmen von extrazellulärem Ca²⁺ ermöglicht und so das Ca²⁺ verstärkt. Über die Myosin-leichte-Ketten-Kinase wird die leichte Kette des Myosinfilaments aktiviert, sodass diese mit dem Aktinfilament interagieren kann: Die Muskelzellen kontrahieren.

Muskelrelaxation geschieht dann entweder durch Entfernen des kontraktiven Stimulus oder eine Substanz, die die Relaxation direkt auslöst. Hierfür muss die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration verringert und die Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase aktiviert werden, um die Phosphatgruppe am Myosinfilament, welche die Kontraktion ermöglicht, zu entfernen. Eine Senkung der Ca²⁺-Konzentration kann über verschiedene Mechanismen erreicht werden. Zum einen können die Ca²⁺-Ionen über Calcium-Magnesium-ATPasen wieder ins Sarkoplasmatische Retikulum aufgenommen oder aus der Zelle hinaus transportiert werden. Neben Calcium-Magnesium-ATPasen befinden sich auch Natrium-Calcium-Austauscher in der Zellmembran. Auch diese tragen zur Senkung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration bei [66].

Eine weitere Möglichkeit die Vasodilatation auszulösen ist NO-vermittelt [67]. NO entsteht durch die Stickstoffmonoxidsynthase (NOS, engl.: *nitric oxide synthase*)-katalysierte, NADPH-abhängige Oxidation von L-Arginin mittels Sauerstoff zu Citrullin. Es gibt drei Isoformen der NOS: Die endotheliale (eNOS), die neuronale (nNOS) und die induzierbare (iNOS) NOS.

Die eNOS wird in Endothelzellen exprimiert und ist Ca²⁺-abhängig [68]. Erhöhte Ca²⁺-Konzentrationen in Endothelzellen können durch das Binden von Agonisten, wie Acetylcholin, Bradykinin und Histamin an der Zellmembran ausgelöst werden. Unabhängig hiervon muss die eNOS zusätzlich aktivierend phosphoryliert werden, um NO freizusetzen. Hier produziertes NO migriert ins Blut und die umgebenden glatten Muskelzellen [69]. Der primäre Rezeptor von NO ist die lösliche Guanylatzyklase (sGC, engl.: *soluble guanylate cyclase*). Die sGC ist ein heterodimeres Hämprotein,

welches nach NO-Bindung vermehrt zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) bildet [70]. cGMP wiederum aktiviert die cGMP-abhängige Proteinkinase I, welche den Calciuminflux über spannungsabhängige Calciumkanäle sowie die IP₃-Rezeptor-medierte Calciumfreisetzung inhibiert. Des Weiteren induziert die cGMP-abhängige Proteinkinase I die Wiederaufnahme Calciums in das sarkoplasmatische Retikulum. Hieraus resultieren eine verringerte intrazelluläre Calciumkonzentration und die Inaktivierung Calmodulins, das nun nicht mehr die Myosin-leichte-Ketten-Kinase aktivieren kann. Zusätzlich führt die gesenkte Calciumkonzentration zur Steigerung der Aktivität der Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase, welche die Verbindung zwischen Myosin und Actinfilamenten löst. Es kommt zur Vasodilatation [71].

2 Zielsetzung

2016 waren weltweit 39% aller Erwachsenen übergewichtig ($\text{BMI} \geq 25$), 13% davon wurden sogar als fettleibig ($\text{BMI} \geq 30$) eingestuft. Definiert werden Übergewicht und Adipositas von der Weltgesundheitsorganisation (engl.: World Health Organization, WHO) als anormale Ansammlung von Fett, welche die Gesundheit beeinflussen kann. Zu den hieraus resultierenden Pathologien gehören schwerwiegende Erkrankungen aus den Bereichen Diabetes, Krebs und Herz-Kreislaufsystem [72]. Um diese Krankheiten zu bekämpfen und zu verhindern ist es essentiell die zugrunde liegenden Mechanismen zu verstehen.

In den letzten Jahren wurden B-Zellen immer wieder mit kardiovaskulären Erkrankungen in Verbindung gebracht. So konnte gezeigt werden, dass unverhältnismäßig viele mit der B-Zellen-Funktion verknüpfte Gene eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der koronaren Herzkrankheit einnehmen [73]. Zusätzlich konnten für verschiedene B-Zellsubpopulationen unterschiedliche Wirkungen auf den Verlauf von arteriosklerotischen Erkrankungen demonstriert werden. B1-Zellen wurden, wegen ihrer einzigartigen Fähigkeit natürliches IgM zu produzieren, vasoprotektive Eigenschaften zugesprochen [74, 75]. B2-Zellen scheinen hingegen den Arterioskleroseverlauf negativ zu beeinflussen. Neben der Produktion von inflammatorischen IgG-Antikörpern [76], stimulieren sie dendritische Zellen sowie T-Zellen und rufen hiermit einhergehend eine T_H1 -Zell-Polarisation hervor [77].

Um den Einfluss von B-Zellen auf das vaskuläre System weiter einschätzen zu können, war es Ziel dieser Arbeit diesen Zusammenhang zunächst unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen. Hierfür wurden in einem Vorversuch bereits Mäuse mit einem B-Zell-Knockout (JHT-Mäuse) in Bezug auf ihre vaskuläre Relaxationsfähigkeit mit B6-Kontrollmäusen verglichen. JHT-Mäuse wiesen eine eindeutige vaskuläre Dysfunktion auf. Daher sollte mittels B1- und B2-Zelltransfer diejenige B-Zellsubpopulation identifiziert werden, welche für die Aufrechterhaltung der vaskulären Funktion verantwortlich ist. Desweiteren sollte untersucht werden, auf welche Weise B-Zellen das vaskuläre System regulieren. Hierfür kamen die drei essentiellen Eigenschaften von B-Zellen

in Frage. Sie aktivieren durch ihr Wirken als APC weitere Immunzellen wie T_H-Zellen, senden Pathogen blockierende und markierende Antikörper aus und produzieren Cytokine [4]. In Vorarbeiten wurde der Einfluss von B-Zellverbundenen Cytokinen bereits ausgeschlossen, weshalb hier der Fokus auf der Antikörperproduktion und der Antigenpräsentationsfähigkeit von B-Zellen liegen sollte. Dafür sollten zwei weitere Mausstämme charakterisiert werden. Der Mausstamm IgMi kann reife B-Zellen ausbilden, jedoch nur mit dem IgM-BCR an der Zelloberfläche. Antikörper können von diesen B-Zellen nicht sekretiert werden. Die Mäuse des Typs IgG1i können reife B-Zellen mit einem IgG1-BCR entwickeln und nur IgG1-Antikörper sekretieren. Die vaskuläre Relaxationsfähigkeit von IgMi- und IgG1i-Mäusen sollte mit denen von B6- und JHT-Mäusen verglichen werden. Von allen vier Mausstämmen sollte in verschiedenen Organen Immunzellprofile erstellt werden, um mögliche durch die Veränderung der B-Zellmuster induzierte Abänderungen der Immunzellprofile zu identifizieren.

In einem weiteren Schritt sollte die Dysregulation von B-Zellen und die Folgen für das vaskuläre System unter Adipositas untersucht werden. Hierfür sollten die alle Mausstämme entweder mit einer hochkalorischen, fettreichen Diät oder mit einer Kontrolldiät gefüttert werden. Im Anschluss sollte die Auswirkung auf die Insulinsensitivität analysiert werden und für Adipositas-typische inflammatorische Immunzellen im Fettgewebe identifiziert werden. Da in Vorarbeiten beobachtet wurde, dass Adipositas in B6-Mäusen zu einer vaskulären Dysfunktion führte, in JHT-Mäusen die experimentelle Diät jedoch keine weitere Verschlechterung hervorrief, sollten diese Experimenten dazu dienen diejenige B-Zellsubpopulation und/oder -eigenschaft zu identifizieren, welche unter Adipositas dysreguliert wird.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und gekaufte Puffer

Tabelle 1: Chemikalien und gekaufte Puffer

Name	Abkürzung	Hersteller	Verwendung
Acetylcholin	<i>ACh</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Myographie
Albumin Fraktion V	<i>BSA</i>	Roth, Karlsruhe, Deutschland	Immunzellisolation Epididymales Fettgewebe (EF)
BD PharmLyse™ Lysing Buffer (10x)		BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	Erythrozyten Lyse
BD Horizon™ Brilliant Stain Buffer		BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	Durchflusszytometrie
Bromphenolblau			Lämmli-Puffer
Calciumchlorid Dihydrat	<i>CaCl₂·2H₂O</i>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Immunzellisolation Epididymales Fettgewebe (EF), Myographie
Dulbecco's Phosphate buffered Saline 10x		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Immunzellanreicherung Leber
Dulbecco's Phosphate buffered Saline 1x	<i>PBS</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Durchflusszytometrie
Ethanol, vergällt 99,8%		Roth, Karlsruhe, Deutschland	
Forene® 100% (V/V)		Abbvie, Ludwigshafen, Deutschland	Versuchstieranästhesie
Glukose Monohydrat	<i>Glukose·H₂O</i>	Roth, Karlsruhe, Deutschland	Myographie
Glukose 10%		Braun, Melsungen, Deutschland	Glukosetoleranztest
Ultra Pure™ 0,5 M Ethylendiamintetrae ssigsäure	<i>EDTA</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Puffer

Fetales Kälberserum	<i>FCS</i>		Durchflusszytometrie
Hanks' balanced Salt solution	<i>HBSS</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Immunzellenanreicherung Leber, Milz
Humininsulin® Normal 100	<i>Insulin</i>	Lilly, Gießen Deutschland	Insulintoleranztest
Kaliumchlorid	<i>KCl</i>	Roth, Karlsruhe, Deutschland	Myographie
Kaliumdihydrogenphosphat	<i>KH₂PO₄</i>		Myographie
Magnesiumsulfat Heptahydrat	<i>MgSO₄·7H₂O</i>	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland	Myographie
Dinatriumethylenediamin-tetraessigsäure Dihydrat	<i>Na₂EDTA·2H₂O</i>	AppChem GmbH, Darmstadt, Deutschland	Myographie
Natriumchlorid	<i>NaCl</i>	Roth, Karlsruhe, Deutschland	Myographie
Natriumchloridlösung 0,9%	<i>NaCl-Lösung</i>	Braun, Melsungen, Deutschland	
Natriumhydrogencarbonat	<i>NaHCO₃</i>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Myographie
L-(-)-Noradrenalin(+)-bitatrat-monohydrat	<i>Noradrenalin</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Myographie
Paraformaldehyd	<i>PFA</i>	Roth, Karlsruhe, Deutschland	
Percoll™		GE Healthcare, Uppsala, Schweden	Immunzellenanreicherung Leber
RPMI Medium 1640 (1x) + GlutaMAX		Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Immunzellisolation Aorta, Knochenmark, Bauchhöhle
Saponin		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Permeabilisierung von Zellen

3.1.2 Angesetzte Puffer und Lösungen

Tabelle 2: Hergestellte Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Abkürzung	Zusammensetzung	Verwendung
Erythrozyten Lyse Puffer	<i>EP</i>	1 x BD PharmLyse™ Lysing Buffer (10x) 9 x steriles Wasser	Erythrozyten Lyse
FACS-Puffer	<i>FP</i>	PBS 1 mM EDTA 2% FCS	Durchflusszytometrie
MACS-Puffer	<i>MP</i>	PBS, p.H. 7,2 0,5% BSA 2 mM EDTA	B-Zellisolation
Krebs-Puffer		11,1 mM Glukose·H ₂ O 0,026 mM Na ₂ EDTA 118 mM NaCl 25 mM NaHCO ₃ 4,8 mM KCl 1,2 mM MgSO ₄ ·7 H ₂ O 1,2 mM KH ₂ PO ₄ 2,5 mM CaCl ₂ ·2 H ₂ O	Myographie

3.1.3 Antikörper

Tabelle 3: Antikörper und Kompensationskügelchen

Marker	Fluorochrom	Reaktivität	Hersteller
B220	BV605	Ratte Anti-Maus	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD196 (CCR6)	BV421		
CD1d	PerCP-Cy5.5		
CD3e	APC		
CD3e	BV421		
CD3e	PE-Cy7		
CD4	APC-Cy7		
CD4	PE		
CD5	APC		
CD8	PE		
CD11b	BV421		
CD11b	FITC		
CD11c	BV605		
CD19	APC		
CD19	BV421		
CD23	FITC		
CD23	PE		
CD23	PE-Cy7		
CD25	FITC		
CD45	APC		
CD45	PE-Cy7		
CD45	PerCP		
CD90.2	BV605		
CD107a	BV421		
CD127	PE-Cy7		
CD206	Alexa Fluor 647		
CD183 (CXCR3)	APC		
F4/80	PE		
Gr1	PerCP-Cy5.5		
Ly6C	PerCP-Cy5.5		
Ly6G	FITC		
NK1.1	APC-Cy7		
NK1.1	BV605	Maus Anti-Maus	

LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit, for 633 or 635 nm excitation (VS)	750/775 (APC-Cy7)	-	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Purified Ratte Anti-Maus CD16/CD32 (Maus BD Fc Block™)	-	-	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
IgG from Ratte serum (IgG aus Rattetenserum)		-	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BD™ CompBeads Anti-Ratte and Anti-Hamster Ig, κ	-	Anti-Ratte und Anti-Hamster	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BD™ CompBeads Anti-Maus Ig, κ	-	Anti-Maus	
BD™ Negative Control	-	-	
ArC™ reactive beads	-	fixierbar	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ArC™ negative beads	-		
<i>InVivoPlus</i> anti-mouse Ly6G	-	Anti-Maus	Bio-X-Cell, West Lebanon, USA
<i>InVivoPlus</i> mouse IgG2a isotype control	-		

3.1.4 Enzyme

Tabelle 4: Enzyme

Enzym	Hersteller	Verwendung
Liberase	Roche, Mannheim, Deutschland	Aufarbeitung der Aorta
Collagenase Type I	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Aufarbeitung des PVAT
Collagenase B	Roche, Mannheim, Deutschland	Aufarbeitung des EF

3.1.5 Geräte, Materialien und Software

Tabelle 5: Geräte und Materialien

Name	Hersteller	Verwendung
96-well Platte mit konischem Boden	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Durchflusszytometrie
BD FACSCANTO II	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	Durchflusszytometrie
Binokular Mikroskop Leica DM IL LED	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland	Zellzahlbestimmung
Contour XT Blutzuckermessgerät	Bayer, Leverkusen, Deutschland	Insulin/Glukose Toleranztest
Contour® next (Blutzucker-Streifen)	Bayer, Leverkusen, Deutschland	Insulin/Glukose Toleranztest
Eppendorfgefäß	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Östereich	
15 ml Falcon™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
50 ml Falcon™		
Kanülen	Braun, Melsungen, Deutschland	
23G x ½		
Stericen®		
23G x 1		
25G x 1½		
27G x 1½		
Kopfüberrotationsgerät	Heidolph Instrument GmbH & CO. KG,	

		Schwabach, Deutschland	
Magnetic activated cell sorting beads	Pan B Cell Isolation Kit II, Maus	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	B-Zell Isolation
	CD23 MicroBeads, Maus		B1-Zell Isolation
	Anti-F4/80 MicroBeads UltraPure, Maus		B1-Zell Isolation
	CD43 (Ly-48) MicroBeads, Maus		B2-Zell Isolation
LD Column			B-Zell Isolation
LS Column			B2-Zell Isolation
MACS Multistand			B-Zell Isolation
MidiMACS™ Separator			B-Zell Isolation
Microvette® 500K3E		Starlab, Sarstedt, Deutschland	
Neumann-Kammer		Roth, Karlsruhe, Deutschland	Zellzahlbestimmung
Pipetten	10 µl	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich	
	200 µl		
	1 ml		
	5 ml		
	10 ml		
	20 ml		
Rasierklinge		Apollo-Herkenrath, Solingen, Deutschland	Aufarbeitung der Aorta
Reflotron® Plus		Roche, Mannheim, Deutschland	Serumlipid, -enzym und – Glukosekonzentrations- bestimmung
Reflotron® Plus Streifen	Reflotron® Cholesterin		
	Reflotron® Glukose		
	Reflotron® GOT		
	Reflotron® GPT		
	Reflotron® Alkalische Phosphatase		
Skalpell		Swann-Morton, Sheffield, England	Blutentnahme aus der Schwanzvene

Spritzen	1 ml	Braun, Melsungen, Deutschland	
Injekt®-F	3 ml		
Sunrise™		Tecan Trading AG, Schweiz	ELISA
Thermoschüttler pro		CellMedia, Elsteraue, Deutschland	
Waage Explorer® Pro		OHAUS, Greifensee, Schweiz	
Waage Adventurer® Pro			
Wasserbad GFL®		GFL, Burgwedel, Deutschland	
Wasserbad Gertomat® WR		Braun, Melsungen, Deutschland	
<i>Wire Myograph System</i>		Danish Myo Technology, Aarhus, Dänemark	Myographie
Zentrifuge PerfectSin 24R Refrigerated		VWR Life Science, Erlangen, Deutschland	
Zentrifuge HERAEUS Megafuge 40R		Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	
Zentrifugenröhrchen		Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich	
Zellsieb	EASYstrainer™ 100 µ EASYstrainer™ 70 µ	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich	Mechanische Gewebesaufarbeitung

Tabelle 6: Kits

Name	Hersteller	Verwendung
Mercodia Ultrasensitive Maus Insulin ELISA	Mercodia AB, Uppsala, Schweden	Insulin ELISA
Mouse SAA ELISA Kit (ab157723)	Abcam, Cambridge, Großbritannien	Serumamyloid A ELISA

Tabelle 7: Verwendete Software

Name	Hersteller	Verwendung
BD FACSDiva Software 7.0	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	Auswertung am Durchflusszytometer
GraphPad Prism 7 für Windows	GraphPad Software, La Jolla, USA	Statistische Auswertung Erstellung der Graphen
Magellan™	Tecan Trading AG, Schweiz	ELISA-Messungen
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, USA	Auswertungen
Microsoft PowerPoint		Erstellung von Abbildungen
Microsoft Word		Schreibsoftware

3.2 Methoden

3.2.1 Mäuse

Um die Rolle der B-Zellen im vaskulären System analysieren zu können wurden neben Kontroll-Mäusen drei Knockout-Mauslinien verwendet, die entweder keine B-Zellen bilden können oder deren B-Zellen eingeschränkte Eigenschaften besitzen. Alle Knockout-Mäuse besitzen den genetischen Hintergrund der als Kontrolle genutzten C57BL/6J-Mäuse (B6-Mäuse).

Die sogenannten JHT-Mäuse können keine funktionellen B-Zellen produzieren, da über das Cre/loxP System der J_H - E_μ -Locus der schweren Kette der Immunglobuline (IgH) in den embryonalen Stammzellen depletiert wurde [78]. Es können somit keine konstanten Regionen für Immunglobuline, ob zur Sekretion oder als BCR, hergestellt werden. Infolgedessen können keine B-Zellen im Knochenmark reifen und in die Peripherie gelangen [4, 78]. Die JHT-Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Ari Waisman, Institut für Molekulare Medizin, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, zur Verfügung gestellt.

Die als IgMi- und IgG1i-Mäuse bezeichneten Mäuse hingegen produzieren reife B-Zellen, wenn auch mit verschiedenen eingeschränkten Eigenschaften. Zur Generierung dieser Mausarten wurde ein IgH Locus konstruiert, dessen Gen Cluster nur aus C_μ - oder $C_{\gamma 1}$ -Segmenten bestand. Zusätzlich wurden die Gensegmente in entgegengesetzte Richtungen orientiert und von loxP-Seiten flankiert. Abhängig von der Positionierung des C_H -Segments (*upstream*) werden die IgH loci als IgH $^{\mu\gamma 1}$ oder als IgH $^{\gamma 1\mu}$ bezeichnet. Über das Cre/loxP System in embryonalen Stammzellen können somit entweder B-Zellen des IgM- oder IgG1-Typus entwickelt werden, was auch in der Bezeichnung der Mäuse als IgMi- oder IgG1i-Mäuse Ausdruck findet. Zusätzlich zur Polarisierung auf einen Immunglobulinphänotyp wurde der Poly-Adenin-Schwanz, welcher die Sekretion der Immunglobuline kontrolliert, depletiert. Während es bei IgMi-Mäusen hierdurch zu keiner Sekretion von IgM kam, konnte bei IgG1i-Mäusen IgG1 im Blut nachgewiesen werden [79]. Die IgMi- und IgG1i-Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Ari Waisman, Institut für Molekulare Medizin, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, zur Verfügung gestellt.

Somit konnten für das vorliegende Projekt vier unterschiedliche Mauslinien mit unterschiedlichen B-Zellarten und -eigenschaften verglichen werden:

Tabelle 8: Mausstämme

Mausart/Name	Modifikation	Vorhandene BCR	Produzierte Antikörper	Hersteller
B6	-	IgM, IgD, IgG, IgA, IgE	IgM, IgD, IgG, IgA, IgE	Janivier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich
JHT	J _H -E _μ -Locus von IgH (<i>knock out</i>)	-	-	Prof. Dr. Ari Waisman, Institut für Molekulare Medizin, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
IgMi	IgH ^{μV1} (konstruiert) PolyA (<i>knock out</i>)	IgM	-	
IgG1i	IgH ^{V1μ} (konstruiert) PolyA (<i>knock out</i>)	IgG1	IgG1	

Das Tierversuchsvorhaben wurde vom Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz genehmigt (23 177-07/G 17-1-020).

3.2.2 Organentnahme

Zur Analyse von Immunzellverteilung und Proteinexpression wurden die Mäuse im Alter von 7 Wochen (früher Zeitpunkt der vaskulären Dysfunktion), 17 Wochen (fortgeschrittene vaskuläre Dysfunktion) oder 21 Wochen (Insulinresistenzstudien) geopfert und ihre Organe entnommen.

Hierfür wurden die Mäuse inhalativ mit Isofluran in tiefe Narkose versetzt. Gewicht und Körperlänge wurden vermessen. Vor Beginn der Organentnahme wurde die Narkose durch Reflextestung an den Extremitäten bestätigt. Die Tiere wurden an den Beinen fixiert und mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Der Bauchraum wurde mit einer sterilen Schere geöffnet und das Zwerchfell entfernt. Über Herzpunktion wurde der Maus bis zu 1 ml Blut entnommen. Das Blut wurde entweder in EDTA-Röhrchen gegeben, um die Gerinnung zu hemmen, oder zur Generierung von Serum in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei Raumtemperatur (RT) gelagert (s. 3.2.7.3 Nüchtern Glukose- und Insulinwerte). Um den Tod des Tieres sicherzustellen, wurde das Herz entfernt. Im Anschluss wurden Milz, Leber und epididymales Fettgewebe (EF) entnommen, gewogen und entweder in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C aufbewahrt, oder in PBS (Milz, Leber) bzw. PBS mit 0,5% BSA (EF) auf Eis bis zur Aufarbeitung gelagert. Wurde die Leber eingefroren, so war dies immer der größte der fünf Leberlappen. Für die Durchflusszytometer-Messungen wurde entweder auch der größte Leberlappen (7 w- und 17 w-Experimente unter physiologischen Bedingungen) oder die drei kleineren Leberlappen (Adipositasexperimente) verwendet. Als nächstes wurde die gesamte Aorta (abdominal und thorakal) inklusive perivaskulärem Fettgewebe (PVAT, engl: *perivascular fat tissue*) entnommen und in PBS auf Eis gelagert. Zur Entnahme des Knochenmarks (KM) wurden die Hinterbeine und die Hüfte der Maus abgetrennt und direkt aufgearbeitet. Die Mausüberreste wurden gemäß Vorschrift entsorgt.

3.2.3 Durchflusszytometrie

3.2.3.1 Organaufarbeitung

Für die durchflusszytometrische Untersuchung der Immunzellen der einzelnen Mausorgane wurden diese direkt im Anschluss der Entnahme aufgearbeitet.

3.2.3.1.1 *Aufarbeitung der Milz*

Die Milz wurde mit dem Stempel einer Spritze durch ein 100 µ-Sieb in ein 50 ml-Falcon gepresst, um die Zellen zu vereinzeln. Das Sieb wurde mit 15 ml kaltem FP gespült. Im Anschluss wurden die Zellen zentrifugiert (500 g, 10', 4 °C) und der Überstand (ÜS) entfernt. Die Zellen wurden einmal mit 15 ml kaltem HBSS versetzt mit 1 mM EDTA gewaschen (500 g, 10', 4 °C), bevor die Erythrozyten lysiert wurden. Hierfür wurden die Zellen in 2 ml Erythrozyten Lysis Puffer (EP) suspendiert und fünf Minuten bei 37 °C im geschlossenen Wasserbad inkubiert. Im Anschluss wurden 2 ml FP hinzugegeben und zentrifugiert (300 g, 6', 4 °C). Dies ist das Standardverfahren, nach dem in der vorliegenden Arbeit eine Erythrozytenlyse durchgeführt wurde. Der ÜS wurde entfernt und die Zellen wurden in FP suspendiert und in einer Neumannkammer gezählt.

Durchschnittliche Zellzahl: 8×10^7 pro Milz (B6-Maus, 17 w)

3.2.3.1.2 *Aufarbeitung der Leber*

Der Leberlappen wurde mit einer sterilen Schere in einer Petrischale zerkleinert und durch ein 100 µ-Sieb in ein 50 ml-Falcon gepresst, um die Zellen zu vereinzeln. Die Petrischale und das Sieb wurden mit 15 ml kaltem FP gespült. Im Anschluss wurden die Zellen zentrifugiert (500 g, 10', 4 °C) und der ÜS entfernt. Die Zellen wurden einmal mit kaltem 15 ml HBSS gewaschen (500 g, 10', 4 °C), bevor die Immunzellen über einen Percoll™-Gradienten angereichert wurden. Für den Gradienten wurde zunächst 90 %iges Percoll™ mit 10xPBS hergestellt. Dieses wurde dann mit HBSS zu 36 %iger (40 % des 90 %igen) und 54 %iger (60 % des 90 %igen) Percoll™-Lösung verdünnt. Alle Bestandteile hatten bei RT. In einem 15 ml Falcon wurden 4 ml des 54%igen Percoll™ vorgelegt. Die Zellen wurden in 5 ml 46%igem Percoll™ suspendiert und vorsichtig auf die vorgelegte 54 %ige Percoll™-Lösung pipettiert, sodass ein Zweiphasengemisch entstand. Dieses wurde für 20 min bei 900 g und RT ohne Beschleunigung und Bremse zentrifugiert.[80] Hierdurch spalteten sich die Zellen in drei Gruppen auf. Die Hepatozyten befanden sich an der Oberfläche der oberen Phase, die Immunzellen schwebten in der Interphase beider Percoll™-Schichten und die

Erythrozyten sanken als Pellet auf den Boden des Zentrifugenröhrchens. Mit einer Wasserstrahlpumpe wurden die Hepatozyten gründlich entfernt. Da die Interphase schwer zu erkennen war, wurden hier die Immunzellen nicht von den Erythrozyten getrennt. Beide Zellpopulationen wurden gemischt und zweimal mit 10 ml warmem (RT) PBS gewaschen (900 g, 10', RT), um die Percoll™-Überreste zu entfernen. Im Anschluss wurde eine Erythrozytenlyse nach Standardverfahren durchgeführt und die Zellzahl mithilfe einer Neumann-Kammer in FP bestimmt.

Durchschnittliche Zellzahl: 2×10^4 pro Milligramm (B6-Maus, 17 w)

3.2.3.1.3 Aufarbeitung des Bluts

Zur Isolierung der Immunzellen des Blutes wurden 150 μ l davon dem EDTA-Röhrchen entnommen, in ein FACS-Röhrchen überführt und gefärbt (s. 3.2.3.2.2 Antikörperfärbung des Bluts). Im Anschluss wurde eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Hierfür wurde 1 ml EP auf das Blut gegeben und dieses für acht Minuten im Dunkeln bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde 1 ml FP hinzugefügt und zentrifugiert (300 g, 6', 4 °C). Der ÜS wurde abgenommen und das Pellet wurde dreimal mit je 1 ml FP gewaschen, bevor die Zellzahl mithilfe einer Neumann-Kammer in FP bestimmt wurde.

Durchschnittliche Zellzahl: 4×10^4 pro Milliliter (B6-Maus, 17 w)

3.2.3.1.4 Aufarbeitung des EFs

Das EF wurde mit einem Skalpell in einer Petrischale zerkleinert, in ein 15 ml Falcon mit 3 ml Collagenase B-Lösung (PBS, 0,5% BSA, 10 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2 mg/ml Collagenase B) überführt und für zwanzig Minuten bei 37 °C und 200 g im geschlossenen Wasserbad inkubiert. Im Anschluss wurde die Enzymreaktion mit 2 ml FP abgestoppt. Die Suspension wurde erst durch ein 100 μ -Sieb und dann in einem zweiten Schritt durch ein 70 μ Sieb in ein 50 ml Falcon gepresst, um die Zellen zu vereinzeln. Die Siebe wurden mit insgesamt 7 ml PBS gespült. Nach Zentrifugation

(500 g, 10', 4°C) und Verwerfen des ÜS wurde eine Erythrozytenlyse nach dem Standardverfahren durchgeführt. Hierbei wurde nach Zugabe des EP die Suspension zunächst in ein 15 ml-Falcon überführt, um am Rand befindliche Fettzellreste zu vermeiden. Außerdem wurden sämtliche Waschschriffe mit reinem PBS durchgeführt, um spätere Interaktion von FCS und dem Lebend-Tot-Farbstoff der durchflusszytomtrischen Messung auszuschließen. Im Anschluss wurde die Zellzahl mithilfe einer Neumann-Kammer in PBS bestimmt.

Durchschnittliche Zellzahl: 1×10^4 pro Milligramm (B6-Maus, 17 w)

3.2.3.1.5 *Aufarbeitung der Aorta*

Die Aorta wurde in KHP auf Eis unter dem Lichtmikroskop präpariert. Dies bedeutet, dass das PVAT um das Gefäß entfernt wurde. Hierbei wurde darauf geachtet die Adventitia intakt zu halten. Die Länge wurde vermessen und die Aorta wurde mit einem Skalpell gründlich zerkleinert. Im Anschluss wurde sie in ein 2 ml-Eppendorfgefäß mit 1 ml Liberase-Lösung (RPMI, 1 mg/ml Liberase) überführt und für zwanzig Minuten bei 37 °C und 500 g auf einem Thermoschüttler im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurde die Enzymreaktion mit 1 ml FP abgestoppt. Dann wurde die Suspension durch ein 70 µ Sieb in ein 50 ml Falcon gepresst. Zum Spülen wurden 6 ml PBS verwendet. Die Suspension wurde in ein 15 ml Flacon überführt und das 50 ml Falcon wurde mit 1 ml PBS gespült. Nach Zentrifugation (300 g, 6', 4°C) und Verwerfen des ÜS wurde die Zellzahl mithilfe einer Neumann-Kammer in PBS bestimmt.

Durchschnittliche Zellzahl: 4×10^3 pro Millimeter (B6-Maus, 17 w)

3.2.3.1.6 *Aufarbeitung des PVATs*

Das bei der Präparation der Aorta isolierte PVAT wurde gewogen und in ein 2 ml-Eppendorfgefäß mit 1 ml Collagenase I-Lösung (200 U/ml Collagenase I in HBSS) überführt und für zwanzig Minuten bei 37 °C und 500 g auf einem Thermoschüttler im Dunkeln inkubiert. Die weiteren Aufarbeitungsschritte waren analog zu jenen der Aorta. Hier wurde jedoch die Zentrifugation bei 500 g anstatt 300 g durchgeführt. Zuletzt wurde die Zellzahl mithilfe einer Neumann-Kammer in PBS bestimmt.

Durchschnittliche Zellzahl: $2 \cdot 10^3$ pro Milligramm (B6-Maus, 17 w)

3.2.3.1.7 *Aufarbeitung des KMs*

Zur Isolation der Immunzellen des KMs der Hinterbeine und Hüfte wurden mit sterilen Pinzetten zunächst Fell, Fleisch und Gewebe von den Knochen gelöst. Die Knochen wurden pro Seite an ihren Verbindungsstellen getrennt, so dass das KM von Hüftknochen, Oberschenkelknochen und Schienbein getrennt isoliert werden konnte. Hierfür wurde mit einer 23G Spritze auf jeweils einer Seite des Knochens ein Loch gebohrt, um in das Lumen vorzudringen. Das Lumen wurde dann mit 4 ml RPMI mit 2% FCS pro Maus gespült bis der Knochen weiß und leicht durchscheinend hervortrat. Hierbei wurde der bei Hüfte und Oberschenkel der Knochen gewendet und beide Seiten als Einstichstelle genutzt. Die Zellen wurden im Anschluss vorsichtig in RPMI resuspendiert und durch einen 70µm Sieb gefiltert. Nach Transfer in ein 15 ml-Falcon wurden sie zentrifugiert (900 g, 5', 4 °C) und es wurde eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen in 2 ml EP suspendiert und für fünf Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Der EP wurde über Zentrifugation (900 g, 5', 4 °C) entfernt und die Zellzahl mithilfe einer Neumannkammer in FP bestimmt.

Durchschnittliche Zellzahl: $1 \cdot 10^8$ pro Maus, Beine und Hüfte (B6-Maus, 17 w)

3.2.3.2 Antikörperfärbung

3.2.3.2.1 Antikörperfärbung von Milz, Leber, Aorta, PVAT, EF und KM

Für die Antikörperfärbung von Milz, Leber, Aorta, PVAT, EF und KM (Neutrophilen-Reifung) wurden bis zu $5 \cdot 10^6$ Zellen verwendet. Die Zellen wurden in 200 ml FP (Milz, Leber) oder PBS (Aorta, PVAT, EF) in eine 96-well Platte mit konischem Boden überführt und zentrifugiert (300 g, 6', 4 °C). Zur Blockade unspezifischer Bindungen wurden die Zellen in 20 µl Horizon Brilliant Stain Buffer mit 1 µl Maus BD Fc Block™ für zehn Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. In der Zwischenzeit wurden Antikörper-Stammlösungen (s. Tabelle 9) hergestellt. Der VS wurde separat vorbereitet, indem die 0,5 µl der Stammlösung in 250 µl PBS verdünnt wurden. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Zellsuspensionen mit der gewünschten Antikörperstammlösung versetzt, durch Pipettieren gut vermischt und für eine Stunde auf Eis im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 100 µl PBS gewaschen (300 g, 6', 4 °C), mit 200 µl FP in FACS-Röhrchen überführt und bis zur Messung auf Eis und im Dunkeln aufbewahrt. Die Messung wurde am BD FACSCANTO II durchgeführt. Die Auswertung geschah mit der BD FACSDiva Software 7.0.

3.2.3.2.2 Antikörperfärbung des Bluts

Wie bereits in „3.2.3.1.3 Aufarbeitung des Bluts“ erwähnt, wurden die Immunzellen des Blutes vor der Erythrozytenlyse gefärbt. Hierfür wurden 1,5 µl Maus BD Fc Block™ direkt zu 150 µl Blut gegeben und dieses für zehn Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Zellsuspensionen mit der gewünschten Antikörperstammlösung versetzt, durch Pipettieren gut vermischt und für eine Stunde bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurde wie in „3.2.3.1.3 Aufarbeitung des Bluts“ beschrieben fortgefahren.

Für die Färbung mit PE CD79a mussten die Zellmembranen permeabilisiert werden. Hierfür wurden die Zellen nach dem Färben mit den Oberflächenmarkern, der anschließenden Erythrozytenlyse und den Waschschritten zunächst mit 2 % PFA in PBS für 15 Minuten im Dunkeln fixiert. Die

Permeabilisierung geschah im Anschluss mittels 0,01 % Saponin in PBS (10', im Dunkeln). Die Zellen wurden einmal mit 0,01% Saponin in PBS gewaschen (300 g, 6', 4 °C), bevor der PE CD79a-Antikörper zu den Zellen gegeben wurde. Danach wurden sie für eine Stunde auf Eis im Dunkeln inkubiert und im Anschluss mit 1 ml FP gewaschen (300 g, 6', 4 °C).

Die Zellen wurden in 200 µl FP resuspendiert und bis zur Messung auf Eis und im Dunkeln aufbewahrt. Die Messung wurde am BD FACSCANTO II durchgeführt. Die Auswertung geschah mit der BD FACSDiva Software 7.0.

3.2.3.2.3 Antikörperfärbung des KMs (HSC/CMP/GMP/MEP)

Neben Neutrophilen wurden im KM die Vorläuferzellen (HSCs, CMPs, GMPs und MEPs) von Lymphozyten und Erythrozyten untersucht. Hierfür wurde das KM wie in „3.2.3.1.7 Aufarbeitung des KM“ beschrieben aufgearbeitet. Nach der Erythrozytenlyse, der Zellzahlbestimmung und der Überführung der Zellen in 1,5 ml-Eppendorfgefäße, wurden die Biotin-gekoppelten Antikörper gegen CD3, CD4, CD8, CD5, B220, Gr1, Ter119 und CD127 zum Ausschluss ausdifferenzierter Zellen in den in Tabelle 9 beschriebenen Mengen hinzugefügt. Die Zellsuspensionen wurden anschließend für dreißig Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert und dann mit 1 ml PBS gewaschen. Es wurden 4 µl Streptavidin APC-Cy7 zugegeben und weitere dreißig Minuten (4 °C/ im Dunkeln) inkubiert, bevor der Waschvorgang wiederholt wurde. Als Nächstes wurden 200 µl pro $7 \cdot 10^7$ Zellen IgG aus Rattenserum hinzugefügt, gemischt und zehn Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die restlichen Antikörper des Färbeschemas in den angegebenen Mengen (Tabelle 9) beigefügt. Die Inkubation fand bei 4 °C und im Dunkeln in einem Kopfüberrotationsgerät für dreißig Minuten statt. Nachdem die Zellen gewaschen wurden, wurden sie in FP resuspendiert und gemessen. Die Messung wurde am BD FACSCANTO II durchgeführt. Die Auswertung geschah mit der BD FACSDiva Software 7.0.

3.2.3.2.4 Antikörper-Stammlösungen

Tabelle 9: Antikörper Stammlösungen

Name	Zielstruktur	Fluorochrom/ Kopplung	Gewebe	Eingesetzte Menge (μl) pro $5 \cdot 10^6$ Zellen
Immunzell- hauptgruppen	CD45	APC	Milz, Leber,	1
	CD3e	BV421	Blut, Aorta,	1
	B220	BV605	PVAT, EF	1
	CD11b	FITC		1
	F4/80	PE		1
	Gr1	PerCP-Cy5.5		1
	VS	APC-Cy7	Aorta, PVAT, EF	20
B-Zell- Subpopulationen	CD45	PE-Cy7	Milz, Leber,	1
	CD19	BV421	Blut, Aorta,	1
	B220	BV605	PVAT, EF	1
	CD23	PE		1
	CD5	APC		1
	CD1d	PerCP-Cy5.5		0,5
	VS	APC-Cy7	Aorta, PVAT, EF	20
T-Zell- Subpopulationen	CD45	PerCP	Milz, Leber,	1
	CD90.2	BV605	Blut, Aorta, PVAT, EF	1
	CD4	APC-Cy7	Milz, Leber, Blut	1
	CD4	PE	PVAT, EF	1
	CD8	PE	Aorta	1
	CD196 (CCR6)	BV421	Milz, Leber,	1
	CD183 (CXCR3)	APC	Blut, Aorta,	1
	CD25	FITC	PVAT, EF	1
	CD127	PE-Cy7		1
	VS	APC-Cy7	Aorta, PVAT, EF	20

Myelomononocytische Zellen	CD45	APC	Milz, Leber,	1
	CD3e	PE-Cy7	Blut, Aorta,	1
	CD11b	BV421	PVAT, EF	1
	NK1.1	APC-Cy7	Milz, Leber, Blut	1
	NK1.1	BV605	Aorta, PVAT, EF	1
	F4/80	PE	Milz, Leber,	1
	Ly6G	FITC	Blut, Aorta,	1
	Ly6C	PerCP-Cy5.5	PVAT, EF	1
	VS	APC-Cy7	Aorta, PVAT, EF	20
	Fokus CTL	CD45	PerCP	EF
CD19		APC		1
CD23		FITC		1
CD3e		PE-Cy7		1
CD8		PE		1
CD107a		BV421		1
NK1.1		BV605		1
VS		APC-Cy7		20
Fokus M1-Makrophagen	CD45	PerCP	EF	1
	CD11b	BV421		1
	F4/80	PE		1
	CD11c	BV605		1
	CD206	Alexa Fluor 647		1
	CD23	PE-Cy7		1
	Ly6G	FITC		1
	VS	APC-Cy7		20
HSC/ CMP/ GMP/ MEP	CD3	Biotin	KM	7,5
	CD4	Biotin		1,25
	CD8	Biotin		2,5
	CD5	Biotin		5
	B220	Biotin		2,5
	Gr1	Biotin		2

Ter119	Biotin	3
CD127	Biotin	5
Streptavidin	APC-Cy7	4
Sca1	PE-Cy7	7,5
ckit	APC	10
CD16/32	PE	25
CD34	FITC	5

3.2.3.2.5 Kompensation

Für die Kompensation aller Antikörper mit Ausnahme des VS wurden Kompensationskügelchen (Beads) von BD Biosciences verwendet. Hierfür wurden 100 µl PBS in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß vorgelegt und mit der gleichen Menge gut gemischter positiver und negativer Beads versetzt. Die Zugabe geschah tropfenweise und wurde je nach Volumenbedarf (30 µl pro Tropfen) angepasst. Die Beads wurden im PBS suspendiert, bevor sie je 35 µl in neue 1,5 ml Eppendorfgefäße aliquotiert wurden. Pro Aliquot wurde 1 µl zu kompensierender Antikörper hinzugegeben. Eine Probe blieb als negative Kontrolle unbehandelt. Die Beads wurden dreißig Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert, mit 1 ml PBS gewaschen und zentrifugiert (300 g, 6', 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und die Beads wurden zur Messung in 500 µl PBS aufgenommen. Für die Kompensation des VS wurde 1 Tropfen gut gemischte positive Beads von Thermo Fisher Scientific in 100 µl PBS gegeben und mit 1 µl VS versetzt. Inkubationszeit und Aufreinigung glich der, der Beads von BD Biosciences. Nach Aufnahme der Beads in 500 µl PBS wurde ein Tropfen gut gemischter negativer Beads hinzugegeben. Alle Proben wurden bis zur Messung im Dunkeln aufbewahrt.

Für die Kompensation der Antikörper wurde die automatische Kompensationsfunktion des BD FACSCANTO II genutzt.

3.2.3.3 Gating-Strategien

Im Folgenden sind die *Gating*-Strategien zu Unterscheidung der verschiedenen Immunzellsubpopulationen aufgeführt. Die *Gating*-Abbildungen wurden mittels FACSCanto™ II erstellt. Für die Abbildung 6, Abbildung 7, Abbildung 8 und Abbildung 9 wurden Milzproben von 17 w alten Tieren verwendet. Für Aorten, PVAT und EF wurden zusätzlich tote Zellen über das *Gating* ausgeschlossen. Dies ist am Beispiel des EF von 27 w alten Mäusen in den Abbildung 10 und Abbildung 11 gezeigt. In Abbildung 12 wurden Knochenmarkszellen von 17 w alten Tieren vermessen. Alle Proben stammten von B6-Mäusen. Über die Verteilung in *Forward Scatter-Area* (FSC-A) und *Side Scatter-Area* (SSC-A) wurden Zelltrümmer ausgeschlossen. Die Aufspaltung in *Forward Scatter-Area* und in *Forward Scatter-Height* (FSC-H) diente zur Vermeidung von Dubletten.

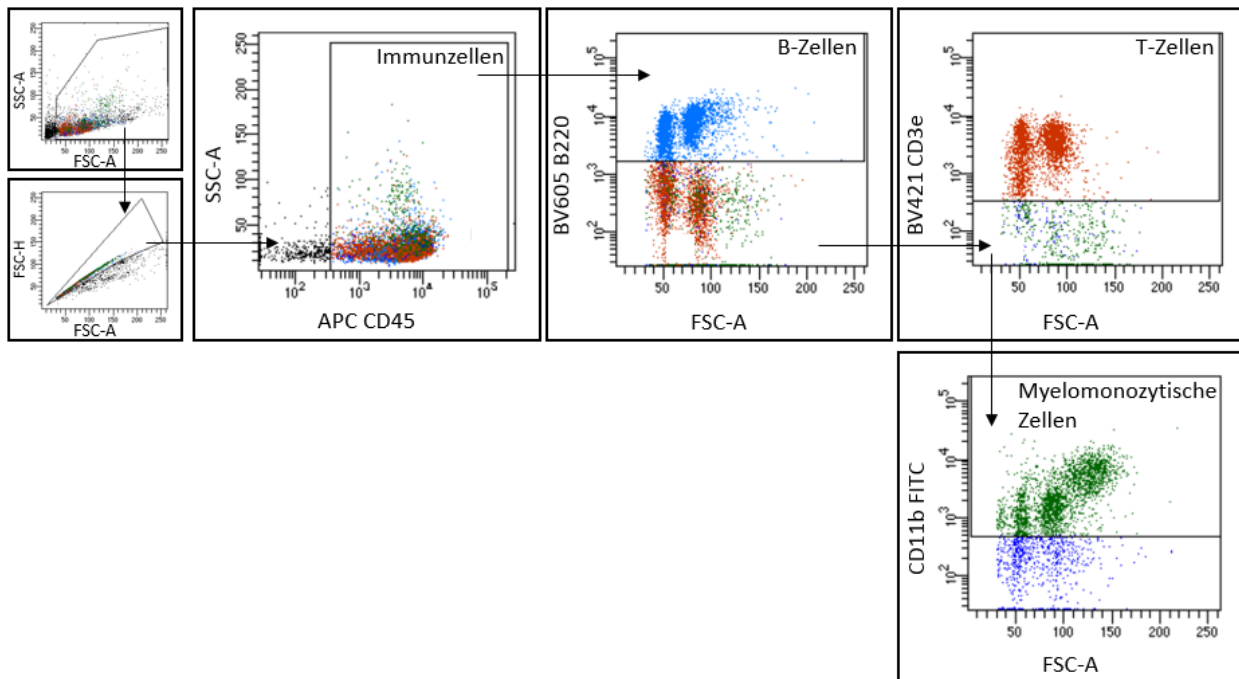


Abbildung 6: *Gating*-Strategie: Immunzell-Hauptgruppen.

Die Milz einer 17 w alten B6-Maus wurde isoliert und zur durchflusszytometrischen Bestimmung aufgearbeitet. Die Messung wurde mittels FACSCanto™ II durchgeführt. Die Abbildung wurde mit der BD FACSDiva Software 7.0 erstellt.

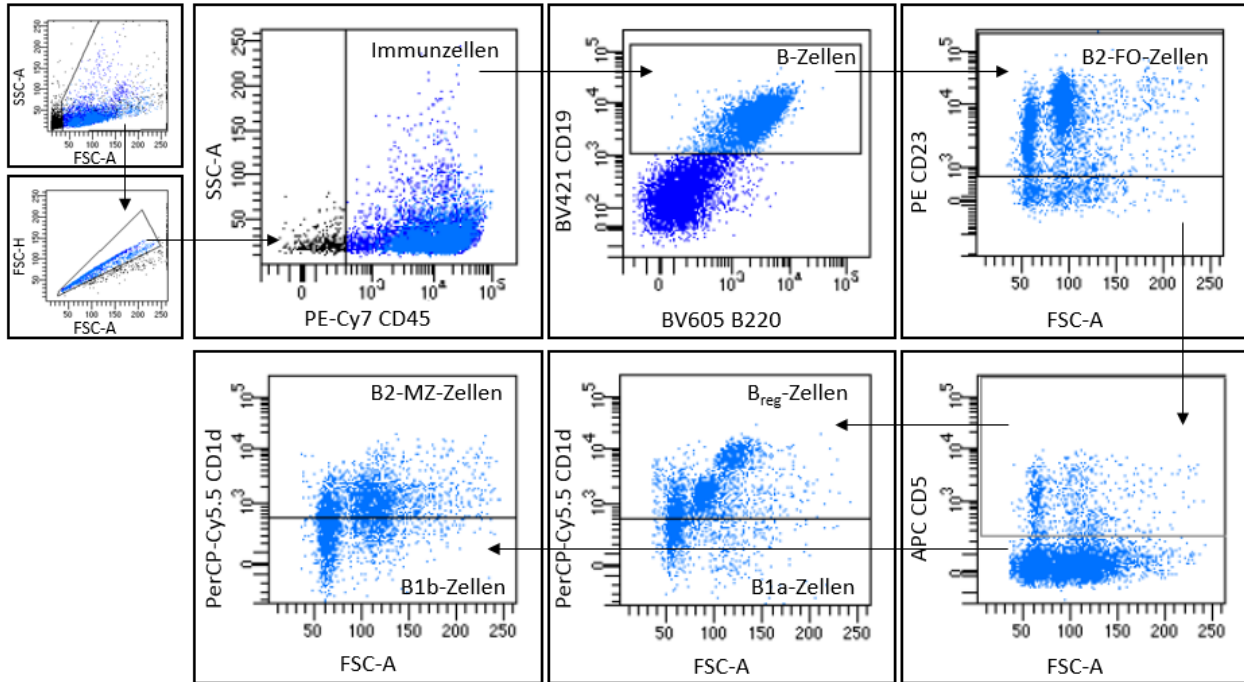


Abbildung 7: Gating-Strategie: B-Zell-Subpopulationen.

Die Milz einer 17 w alten B6-Maus wurde isoliert und zur durchflusszytometrischen Bestimmung aufgearbeitet. Die Messung wurde mittels FACSCanto™ II durchgeführt. Die Abbildung wurde mit der BD FACSDiva Software 7.0 erstellt.

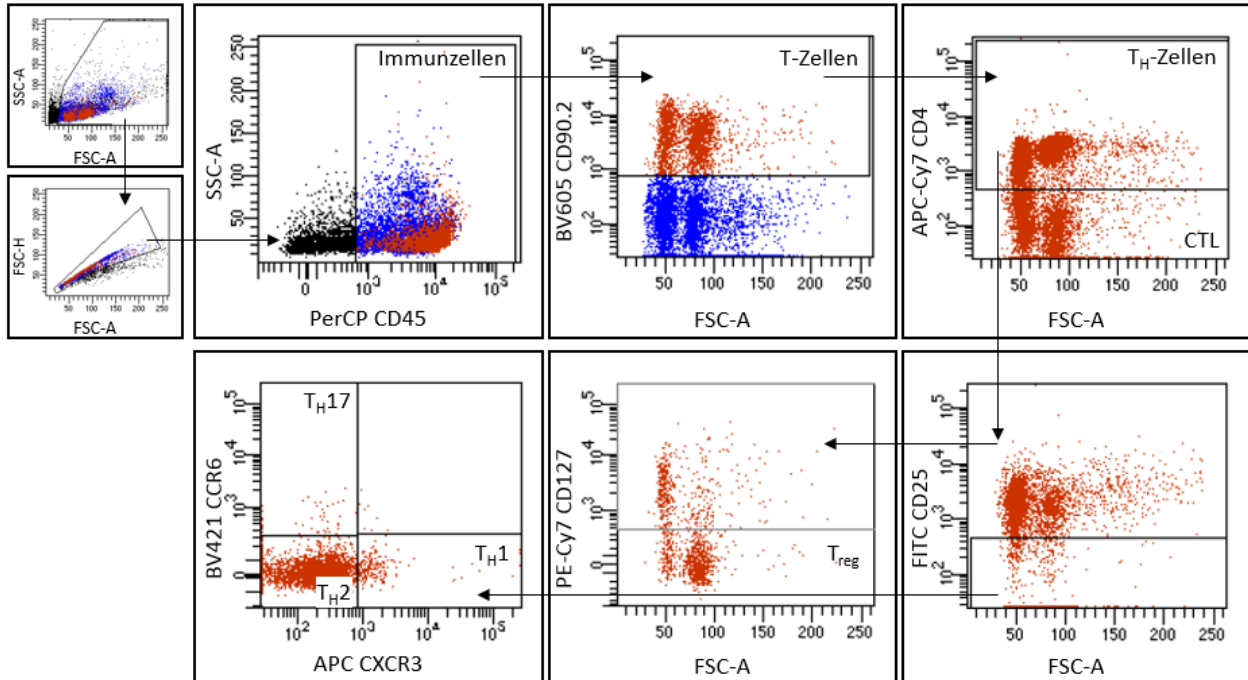


Abbildung 8: Gating-Strategie: T-Zell-Subpopulationen.

Die Milz einer 17 w alten B6-Maus wurde isoliert und zur durchflusszytometrischen Bestimmung aufgearbeitet. Die Messung wurde mittels FACSCanto™ II durchgeführt. Die Abbildung wurde mit der BD FACSDiva Software 7.0 erstellt. In Aorten wurde, wegen der Verdauung des CD4-Epitops durch Liberase, anstelle des CD4-Rezeptors der CD8-Rezeptor markiert. Hierdurch waren CTL-Zellen anstatt TH-Zellen positiv markiert. Das weitere Gating blieb unverändert.

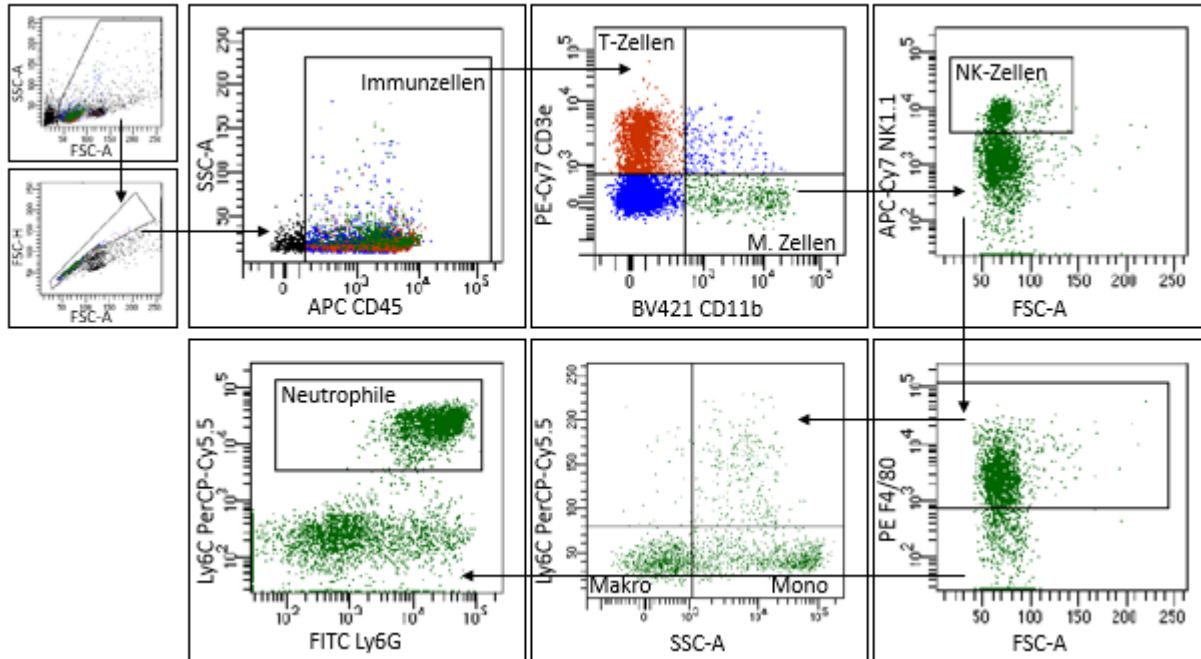


Abbildung 9: Gating-Strategie: Myelomonozytische Zellen.

Die Milz einer 17 w alten B6-Maus wurde isoliert und zur durchflusszytometrischen Bestimmung aufgearbeitet. Die Messung wurde mittels FACSCanto™ II durchgeführt. Die Abbildung wurde mit der BD FACSDiva Software 7.0 erstellt. I. Z. = Immunzellen, M. Zellen = Myelomonozytische Zellen, Makro = Makrophagen, Mono = Monozyten.

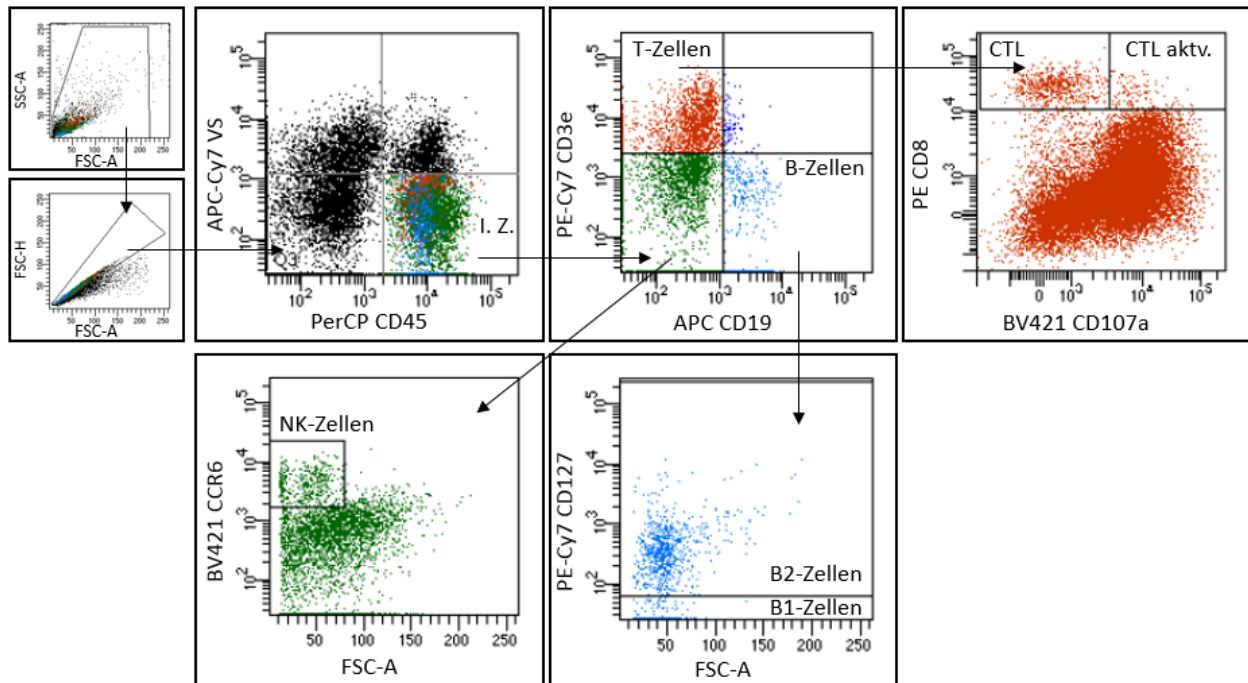


Abbildung 10: Gating-Strategie: Fokus CTL.

Das EF einer 27 w alten B6-Maus wurde isoliert und zur durchflusszytometrischen Bestimmung aufgearbeitet. Die Messung wurde mittels FACSCanto™ II durchgeführt. Die Abbildung wurde mit der BD FACSDiva Software 7.0 erstellt. I. Z. = Immunzellen, CTL aktiv. = sekretorisch aktive CTL.

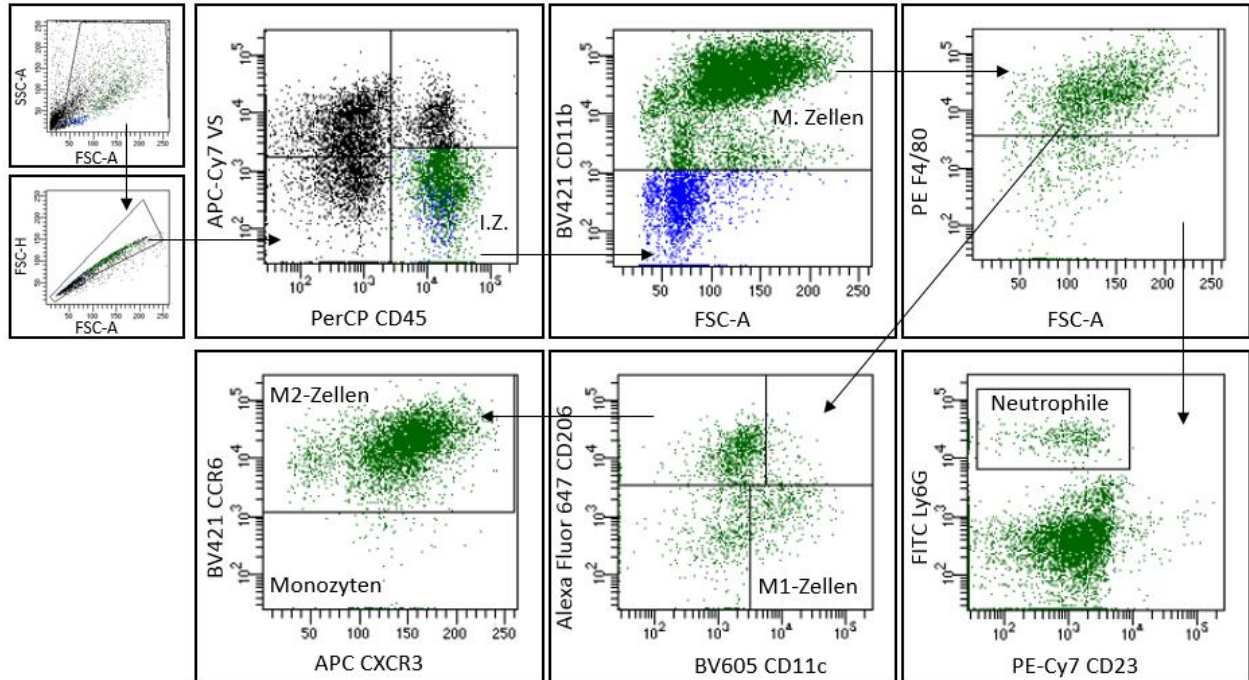


Abbildung 11: Gating-Strategie: Fokus M1-Makrophagen.

Das EF einer 27 w alten B6-Maus wurde isoliert und zur durchflusszytometrischen Bestimmung aufgearbeitet. Die Messung wurde mittels FACSCanto™ II durchgeführt. Die Abbildung wurde mit der BD FACSDiva Software 7.0 erstellt. I. Z. = Immunzellen, M. Zellen = Myelomonozytische Zellen.

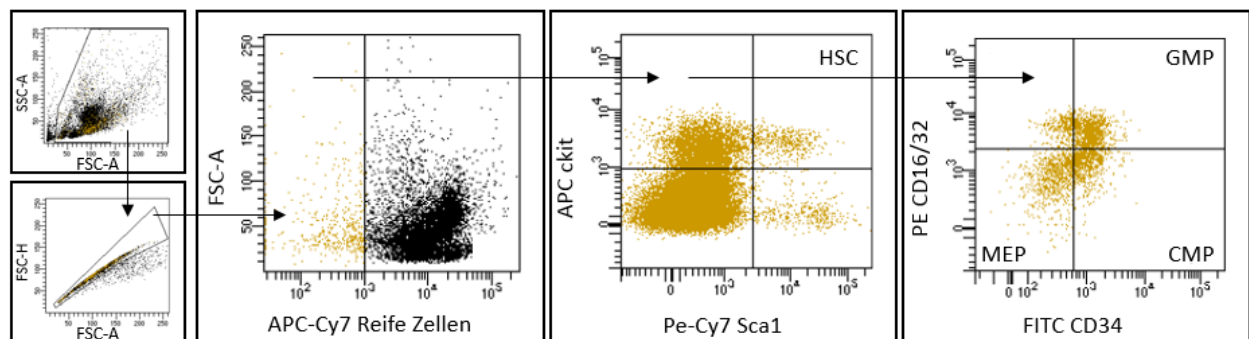


Abbildung 12: Gating-Strategie: HSC/ CMP/ GMP/ MEP.

Das KM einer 17 w alten B6-Maus wurde isoliert und zur durchflusszytometrischen Bestimmung aufgearbeitet. Die Messung wurde mittels FACSCanto™ II durchgeführt. Die Abbildung wurde mit der BD FACSDiva Software 7.0 erstellt. HSC = hämatopoetische Stammzellen, CMP = gemeinsame myeloide Vorläuferzellen, MEP = Megakaryozyten-/Erythrozytenvorläuferzellen, GMP = Granulozyten-/Makrophagenvorläuferzellen.

3.2.4 Neutrophilendepletion

Zur Untersuchung des Einflusses von neutrophilen Granulozyten auf das vaskuläre Relaxationsvermögen wurden in JHT-Mäusen die Neutrophilen deletiert. Hierfür wurde den Mäusen einmalig ein Neutrophilen-spezifischer Anti-Ly6G Antikörper (0,5 mg pro Maus) *i. p.* gespritzt. Als Kontrolle dienten JHT-Mäuse, welche eine IgG2a Isotypenkontrolle (0,5 mg pro Maus) injiziert bekamen, sowie unbehandelten B6-Mäuse. 36 Stunden nach Injektion wurden die ACh-induzierte Aortenrelaxation (s. 3.2.10 Myographie) bestimmt. Der Erfolg der Depletion wurde durchflusszytometrisch im Blut sowie gemeinsam in Aorta und PVAT bestimmt. Für die gemeinsame Messung von Aorta und PVAT wurde das PVAT nicht wie sonst von der Aorta gelöst. Die Aufarbeitung erfolgte für die Aorta typisch wie in „3.2.3.1.5 Aufarbeitung der Aorta“ beschrieben.

Die Antikörperinjektion wurde von Frau Dr. Ning Xia durchgeführt.

3.2.5 B-Zelltransfer

Für den Transfer von B-Zellsubpopulationen von B6 in JHT-Mäuse wurden die zu transferierenden Zellen zunächst aus B6-Organen isoliert und dann mittels magnetischer Trennung (MACS, engl.: *Magnetic activated cell sorting*) aufgereinigt. Hierbei stammten die B2-Zellen aus der Milz und die B1-Zellen aus dem Peritoneum (PC, engl.: *peritoneal cavity*) der Spendermäuse. Die Milz wurde wie in „3.2.3.1.1 Aufarbeitung Milz“ beschrieben aufgearbeitet. Im Anschluss erfolgte eine negative Selektion mittels MACS. Hierfür wurden die CD43 MicroBeads und das Pan B Cell isolation Kit II von Miltenyi Biotec verwendet.[81] Die Trennung erfolgte nach Angaben des Herstellers über eine LD-Säule. Für eine höhere Ausbeute wurde der Durchfluss erneut magnetisch getrennt und die Eluate vereinigt.

B1-Zellen wurden aus dem Peritoneum isoliert. Hierfür wurden die Mäuse betäubt, bevor vorsichtig ihr Bauchfell von der Haut des Peritoneums gelöst wurde. Mit einer Spritze mit 27G Kanüle

wurden 5 ml kaltes PBS mit 3 % FCS in den Bauchraum gegeben. Die Flüssigkeit wurde durch Massage des Bauches verteilt, um die Zellen von der Bauchdecke zu lösen. Im Anschluss wurde die Zellsuspension mit einer Spritze mit 25G Kanüle aus dem Bauchraum entfernt und in einem Eppendorfgeläß auf Eis gelagert. Der Vorgang wurde wiederholt bevor die Maus mittels Genickbruch schmerzfrei abgetötet wurde. Danach wurden die Zellen (1500 rpm/8'/4 °C) zentrifugiert.[82] Die Erythrozyten wurden mittels Standardverfahren entfernt. Für die negative Selektion der B1-Zellen mittels FACS wurden die CD23 MicroBeads, die F4/80 MicroBeads UltraPure und das Pan B Cell isolation Kit II von Miltenyi Biotec verwendet. Die Färbung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Bei den F4/80 MicroBeads wurde jedoch die doppelte vorgeschriebener Menge verwendet, da die Frequenz an Makrophagen im Peritoneum besonders hoch ist. Für die Trennung wurden zwei LD Säulen genutzt, um ein reineres Ergebnis zu erzielen. Die Reinheit wurde am FACSCanto™ II überprüft. Tote Zellen wurden mittels VS ausgeschlossen. B1-Zellen wurden als CD45⁺, CD19⁺, B220⁺ und CD23⁻, B2-Zellen als CD45⁺, CD19⁺, B220⁺ und CD23⁺ definiert. Verwendet wurden die Antikörper PE-Cy7 Ratte Anti-Maus CD45, BV421 Ratte Anti-Maus CD19, BV605 Ratte Anti-Maus B220 und PE Ratte Anti-Maus CD23 von BD Bioscience.

Es wurden jeweils $5 \cdot 10^6$ B1 beziehungsweise B2-Zellen in JHT-Mäuse transferiert. Spender- und Empfängermause waren zu diesem Zeitpunkt 8 Wochen alt, um ein vollständig entwickeltes Immunsystem zu gewährleisten.[83] Zwei Wochen nach dem B-Zell-Transfer wurde die endotheliale Funktion der Empfängermause vermessen. Zusätzlich wurden die Leukozyten wie bereits beschrieben (s.3.2.3.1.3 Aufarbeitung des Bluts, und 3.2.3.3 *Gating*-Strategie) mittels Durchflusssyztometrie im Blut untersucht.

3.2.6 Experimentelle Fütterung

Zur Herbeiführung von Adipositas wurde die Mäuse *ad libitum* mit Futter mit 45%igem Fettanteil (engl.: *high fat diet*, HFD, E15744-34 mod. 45 kJ% fat (LARD), ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) gefüttert. Die Diät wurde im Alter von sechs Wochen begonnen und für 21 Wochen

bis zur Organentnahme beibehalten. Durch hochkalorische Nahrung induzierte Adipositas wird im Folgenden mit DIO (engl.: *Diet induced obesity*) abgekürzt. Zur Kontrolle dienten Mäuse des gleichen Phänotyps, die normale Nahrung (engl.: *normal chow diet*, NCD, V1126, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) bekamen. Die Tiere wurden einmal die Woche gewogen. Die Zusammensetzungen der Diäten sind Tabelle 10 zu entnehmen. Futter und Wasser wurden zweimal die Woche gewechselt, sowie der Verbrauch notiert.

Tabelle 10: Zusammensetzung der NCD [84] und HFD [85]

Zusammensetzung	NCD	HFD
Fett (kJ%)	12	45
Protein (kJ%)	26	20
Kohlenhydrate (kJ%)	62	35
Bruttoenergie (MJ/Kg)	17,1	22,5
Umsetzbare Energie (MJ/kg)	14,3	19,3
Physiologischer Brennwert (kcal/kg)	3430	4615

3.2.7 Blutzuckermessungen

Für die Blutzuckermessungen wurden die Mäuse ohne Fixierung mit einem sterilen Skalpell vorsichtig an einer seitlichen Schwanzvene eingeritzt. Für die Bestimmung des Blutzuckerspiegels in mg/dl mit dem Contour XT Blutzuckermessgerät wurde der zweite sich an der Schnittwunde bildende Blutropfen verwendet.

3.2.7.1 *Insulintoleranztest*

Der Insulintoleranztest (ITT) wurde 15 Wochen nach Beginn der experimentellen Fütterung durchgeführt. Hierfür wurden die Mäuse für sechs Stunden nüchtern gesetzt und dann ihr Körpergewicht und Blutzuckerspiegel bestimmt. Im Anschluss wurde ihnen 0,75 U Insulin (in 0,9 %iger NaCl-Lösung) pro kg-Körpergewicht i. p. verabreicht. Hierfür wurde eine 23Gx0,5 Spitze verwendet. Über einen Zeitraum von zwei Stunden wurde im Folgenden nach 15, 30, 45, 60, 90 und 120 Minuten ihr Blutzuckerspiegel gemessen. Während des gesamten Versuchs hatten die Tiere Zugang zu Wasser.

3.2.7.2 *Glukosetoleranztest*

Der Glukosetoleranztest (GTT) wurde 17 Wochen nach Beginn der experimentellen Fütterung durchgeführt. Hierfür wurden die Mäuse für sechs Stunden nüchtern gesetzt und dann ihr Körpergewicht und Blutzuckerspiegel bestimmt. Im Anschluss wurde Ihnen 1 g Glukose pro Kilogramm Körpergewicht i. p. verabreicht. Hierfür wurde eine 23Gx0,5 Spritze verwendet. Über einen Zeitraum von zwei Stunden wurde im Folgenden alle 15 Minuten der Blutzuckerspiegel gemessen. Während des gesamten Versuchs hatten die Tiere Zugang zu Wasser.

3.2.7.3 *Nüchtern Glukose- und Insulinwerte*

Zur Bestimmung von Nüchtern-Blutglukose- und –insulinwerten wurden die Mäuse 19 Wochen nach Beginn der experimentellen Fütterung für 16 Stunden nüchtern gesetzt. Im Anschluss wurden ihr Gewicht und Blutzuckerspiegel ermittelt. Zur Analyse ihres Insulinspiegels mittels ELISA (engl.: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) wurde der Schwanz der Mäuse mit einer Rotlichtlampe erwärmt, um den Blutfluss anzuregen. Mit einem Skalpell wurde ein kleiner Schnitt im unteren Drittel des Schwanzes schräg über eine seitliche Schwanzvene gesetzt. Das aus der Wunde am Schwanz austretende Blut wurde in einem Eppendorfgesäß aufgefangen und für 30 Minuten

bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde das Blut zentrifugiert (10.000 g, 10', RT). Der klare Überstand (Serum) wurde vorsichtig abgenommen und langsam auf -80 °C abgekühlt und aufbewahrt.

Zur Einschätzung einer möglichen Insulinresistenz wurde ein HOMA-IR (engl.: *Homeostasis Modell Assessment Test, Insulinresistence*) durchgeführt. Es wurde die Originalformel nach Matthews *et al.*, 1985 veröffentlicht in Diabetologia, angewandt [86, 87].

In Tabelle 11 sind die Grenzwerte des HOMA-IR aufgelistet.

Tabelle 11: HOMA-Index [88]

Stadium	HOMA-INDEX	Beschreibung
1	<2,0	Insulinresistenz eher unwahrscheinlich
2	2,0-2,5	Hinweis auf eine mögliche Insulinresistenz
3	2,5-5,0	Insulinresistenz wahrscheinlich
4	>5,0	Diabetes Typ 2

3.2.8 Serumlipid und -enzymprofil, Glukosespiegel

Serumlipide und –enzyme wurden mit Hilfe des Reflotron® Plus bestimmt. Hierfür wurde das bei der Organentnahme gesammelte Blutserum aufgetaut und bei RT auf die Teststreifen gegeben (32 µl). Bei Messwerten außerhalb des Messbereichs wurden die Proben mit 0,9 %iger NaCl-Lösung verdünnt.

Tabelle 12: Serumlipide, -glukose

Serumlipide, Glukose	Verdünnung
Cholesterol	-
Glukose	1:4

Tabelle 13: Serumenzyme

Serumenzyme	Verdünnung
Aspartat-Aminotransferase (ASAT)	1:4
Alanin-Aminotransferase (ALAT)	1:4
Alkalische Phosphatase (ALP)	-

Zur Einschätzung eines möglichen Leberschadens wurde der De-Ritis-Quotient rechnerisch über die Formel (1) ermittelt [89]:

$$\text{De-Ritis-Quotient} = \frac{\text{ASAT}}{\text{ALAT}} \quad (1)$$

3.2.9 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

3.2.9.1 Insulin ELISA

Zur Bestimmung der Nüchtern-Blutinsulinwerte wurde Serum, wie unter „3.2.7.3 Nüchtern Glukos- und Insulinwerte“ beschrieben, erhalten. Die Messung wurde mittels Mercodia Ultrasensitive Maus Insulin ELISA nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 25 µl Serum eingesetzt. Die Seren der HFD-gefüttertem B6-Mäuse wurden 1:10 mit dem Calibrator 0 verdünnt. Die Messungen wurden bei 450 nm mit einem Tecan. Sunrise™ durchgeführt. Als Software wurde Magellan™ verwendet.

3.2.9.2 Serumalbumin A ELISA

Zur Bestimmung der Serumalbumin A (SAA)-Konzentration wurde Serum, wie unter „3.2.7.3 Nüchtern Glukos- und Insulinwerte“ beschrieben, erhalten. Die Messung wurde mittels Mouse SAA

ELISA Kit nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 5 µl Serum eingesetzt und 1:1000 mit 1-fach Diluent verdünnt. Die Messungen wurden bei 450 nm mit einem Tecan. Sunrise™ durchgeführt. Als Software wurde Magellan™ verwendet.

3.2.10 Myographie

Zur Messung der vaskulären Muskelrelaxation der Aorta wurde diese wie in“3.2.2 Organentnahme“ beschrieben, isoliert. Nach Entfernung des PVATs wurde sie in den Myographen, welcher zuvor mit Kohlenstoffdioxid begastem Krebs-Puffer befüllt worden war, eingespannt. Die Aorta wurde auf 5,5 mN Vorspannung gebracht, indem die angelegte Spannung alle fünf Minuten um 0,5 mN erhöht wurde. Nach Zugabe von neuem Krebs-Puffer und einer Stunde Inkubation wurde durch Hinzufügen von 2 M Kaliumchlorid (Endkonzentration 120 mM) die Maximalspannungskapazität der Aorta in Doppelbestimmung ermittelt. Im Anschluss wurde die Aorta durch Gabe von zuerst Noradrenalin bis zu 80% der Maximalspannung kontrahiert danach Acetylcholin (ACh) in steigenden Konzentrationen relaxiert. Auch dies geschah in Doppelbestimmung. Zwischen allen Messungen wurde der Puffer dreimal, jeweils nach fünf Minuten Inkubationszeit, ausgetauscht.

Die Myographmessungen wurden von Frau Dr. Ning Xia durchgeführt.

3.3 Statistik

Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (engl.: *Standard error of the mean*, SEM). Für den Vergleich von zwei Gruppen wurde *Student's t-Test* angewandt. Bei Vergleichen von drei oder mehr Gruppen wurde eine *two-way analysis of variance* (ANOVA) gefolgt von einem *Fisher's protected least significant difference test* durchgeführt. Zum Vergleich von zwei oder mehr Kurven wurde ebenfalls eine *two-way ANOVA* durchgeführt. Als *Post-Hoc*-Methode wurde hier die Bonferroni-Korrektur angewandt. Werte mit $P < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angenommen. Die verwendete Software war GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla).

4 Ergebnisse

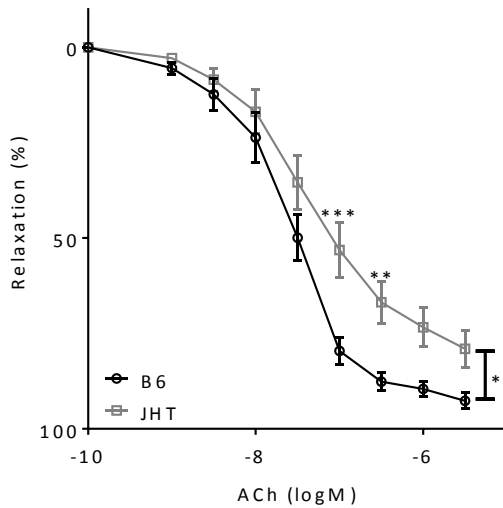
4.1 Die Rollen von B-Zellen bei der Regulation der vaskulären Funktion unter physiologischen Bedingungen

Um die Involvierung von B-Zellen in das vaskuläre System zu verstehen, wurden zunächst Experimente unter physiologischen Bedingungen durchgeführt. Hierfür wurden die vaskuläre Funktion und das Immunzellprofil von 7 Wochen bzw. 17 Wochen alten B6- und JHT-Mäusen miteinander verglichen.

4.1.1 B-Zellen und die Vaskuläre Relaxation

Um die Funktionalität des vaskulären Systems einschätzen zu können, wurden Aorten von B6- und JHT-Mäusen isoliert und von ihrem PVAT befreit, bevor in einem Myographen ihre ACh-induzierte vaskuläre Relaxation vermessen wurde. Diese ist in Abbildung 13 dargestellt. Die Erhöhung der ACh-Konzentration führte in B6-Mäusen zu der erwarteten sigmoidalen Abnahme der Spannung der Aorta bis zur fast vollständigen Relaxation. In JHT-Mäusen hingegen kam es sowohl bei 7 Wochen alten als auch bei 17 Wochen alten Tieren zu einer signifikanten Rechtsverschiebung der Relaxationskurve sowie zu einer Reduktion der maximalen Relaxation. Dies deutet auf eine vaskuläre Dysfunktion der Aorta in JHT-Mäusen und im Umkehrschluss auf eine Schutzfunktion von B-Zellen auf das vaskuläre System hin. Hierbei ist der beschriebene Effekt in 17 Wochen alten Tieren stärker ausgeprägt als in den jüngeren, 7 Wochen alten Mäusen.

7 Wochen



17 Wochen

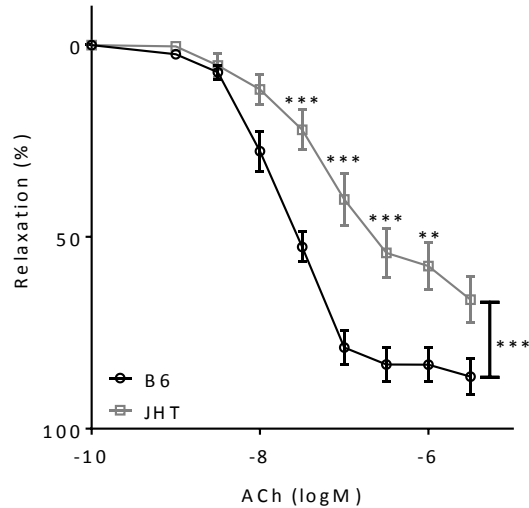


Abbildung 13: Der Einfluss von B-Zellen auf die vaskuläre Funktion.

Aorten wurden aus 7 Wochen (links) und 17 Wochen (rechts) alten B6- und JHT-Mäusen entnommen. Das PVAT wurde unter dem Mikroskop entfernt. Die Acetylcholin (ACh)-induzierte vaskuläre Relaxation wurde mittels Myograph ermittelt. Signifikanzen wurden mittels Two-way ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur über GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla) ermittelt. Die Punkte stellen den Mittelwert \pm SEM dar, 7 w: n = 12, 17 w: n = 8 (B6), 6 (JHT) (ns = nicht signifikant, *P < 0,05, ***P < 0,001). Die Myographmessung wurde von Frau Dr. Ning Xia durchgeführt.

Durch diese Ergebnisse stellte sich die Frage, wie B-Zellen die vaskuläre Funktion schützen, beziehungsweise, welcher essentielle B-Zellmechanismus durch den B-Zell-Knockout gestört ist. Daher wurde die Wirkung von B-Zellen mit anderen Immunzellen untersucht und via B1- und B2-Zelltransfer diejenige B-Zellsubpopulation identifiziert, welche die vaskuläre Funktion schützt. Außerdem wurden B-Zellen hinsichtlich ihrer Eigenschaften – Antigenpräsentation und Antikörperse-zernierung – analysiert.

4.1.2 Veränderungen des Immunzellprofils durch den Verlust von B-Zellen

Um Aufschlüsse über die Auswirkung von B-Zellen auf weitere Zellen des Immunsystems und über ein durch fehlende B-Zellen möglicherweise verändertes Immunzellprofil zu erhalten, wurden Blut, Aorta, PVAT, Milz, Leber und EF aus 17 Wochen alten B6- und JHT-Mäusen entnommen und für die Untersuchung am Durchflusszytometer zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet. Am Durchflusszytometer wurden die jeweilige Gewebsgesamtimmunzellzahl sowie die Verteilung auf T-Zellsubpopulationen und die Zellarten der myelomonozytischen Zelllinie bestimmt. In Abbildung 14 ist die Verteilung der Immunzellen in den genannten Organen auf die drei Hauptgruppen T-Zellen, B-Zellen und myelomonozytischen Zellen dargestellt.

Mit Ausnahme der Milz, kam es in keinem Organ zu einer Veränderung der Gesamtimmunzellzahl durch den B-Zell-Knockout. Alle Organe wiesen eine signifikant verringerte B-Zellzahl in JHT-Mäusen auf, was die Effektivität des Knockouts bestätigte.

In Blut, PVAT und Leber konnte in JHT-Mäusen ein signifikanter Anstieg der absoluten T-Zellzahl gezeigt werden. In Aorta und EF blieb die T-Zellzahl konstant, während es in der Milz zu einer Verringerung dieser kam.

Die absolute Zahl der myelomonozytischen Zellen nahm in Blut und Leber signifikant zu. Auch in der Milz ist dieser Trend zu sehen. Aorta und EF wiesen keine Veränderung der myelomonozytischen Zellzahl auf.

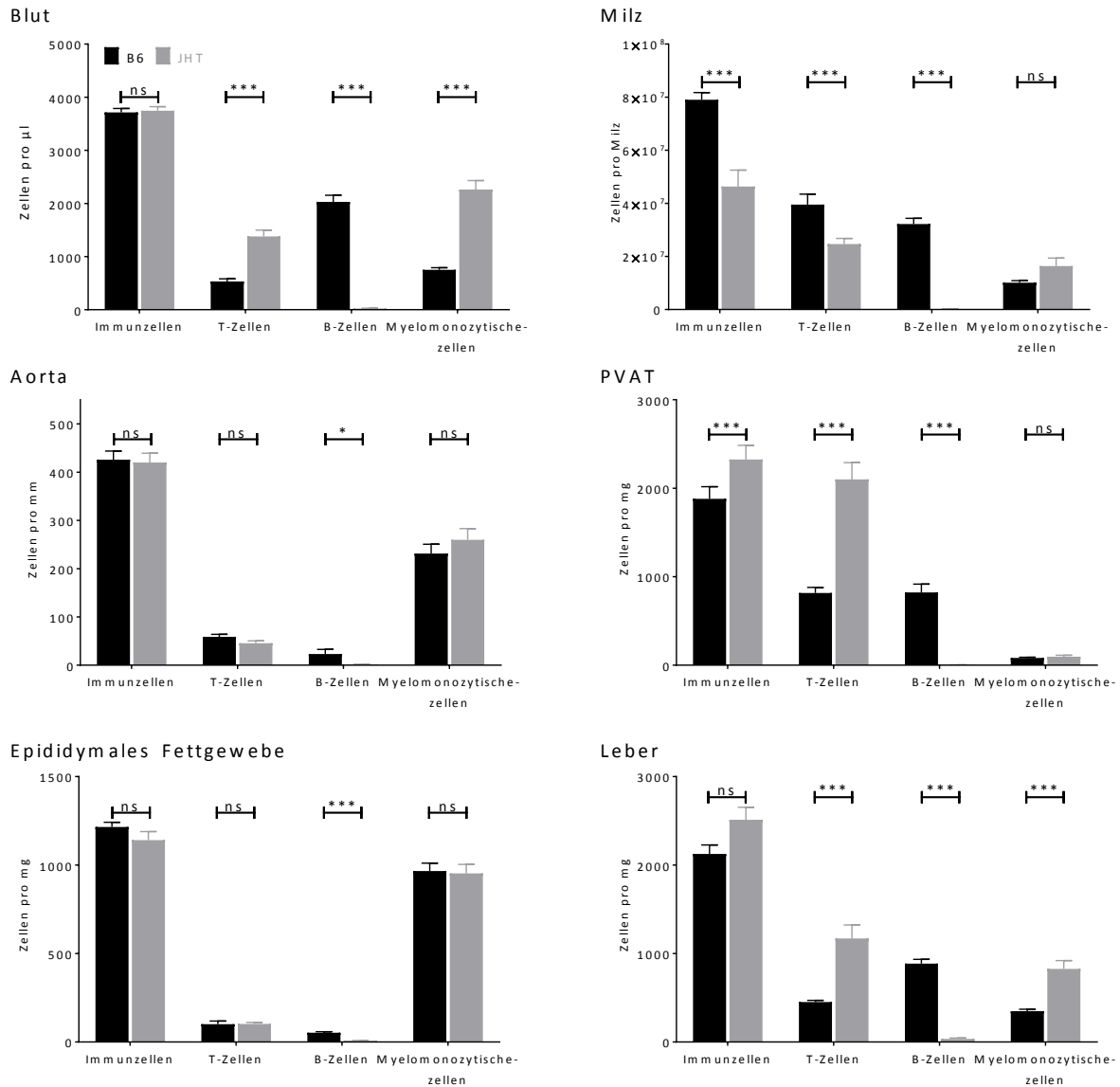


Abbildung 14: Immunzellvorkommen in 17 Wochen alten Mäusen.

Aus 17 Wochen alten B6- und JHT-Mäusen wurden Blut, Milz, Aorta mit PVAT, EF und Leber entnommen. Aorta und PVAT wurden unter dem Mikroskop von einander getrennt. Die Gewebe wurden wie in „3.2.3.1 Organaufarbeitung“ beschrieben zur durchflusszytometrischen Bestimmung aufgearbeitet. Zur Unterscheidung von T-Zellen, B-Zellen und myelomonozytischen Zellen wurden die Antikörper APC CD45, BV421 CD3e, BV605 B220, FITC CD11b und VS (Aorta, PVAT, EF) verwendet. Das *Gating*-Schema ist unter „3.2.3.3 *Gating*-Strategie“ dargestellt. Die Säulen stellen den Mittelwert \pm SEM dar, $n = 6$, (ns = nicht signifikant, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

Da es sowohl in T-Zellen als auch in myelomonozytischen Zellen in verschiedenen Organen zu einer Veränderung der Zellzahlen kam, wurden in beiden Zelllinien mittels Durchflusszytometrie die Subpopulationen bestimmt. In Abbildung 15 ist die Aufteilung auf CTL und T_H-Zellen in Blut, Aorta, PVAT, Milz, Leber und EF aus 17 Wochen alten B6- und JHT-Mäusen zu sehen. Zusätzlich wurde die Verteilung der T_H-Zellen auf T-Helferzellen Typ 1- (T_H1-Zellen), Typ 2- (T_H2-Zellen) sowie Typ 17-T-Helferzellen (T_H17-Zellen) und regulatorische T-Zellen (T_{reg}-Zellen) dargestellt. Zu erwarten war ein Anstieg der Zahlen der inflammatorischen Populationen CTL, T_H1 und T_H17 in JHT-Mäusen. Die damit einhergehende Entzündungsreaktion könnte einer der Gründe für die verminderte Relaxationskapazität der Aorten der JHT-Mäuse sein.

In Blut, PVAT und Leber waren sowohl die Zellzahlen von T_H-Zellen als auch CTL in JHT-Mäusen gegenüber den korrespondierenden Werten in B6-Mäusen erhöht. In der Milz kam es, wie nach der Verteilung in Abbildung 14 zu vermuten war, zu einer Verringerung beider Populationen in JHT-Mäusen. In Aorta und EF waren gegensätzliche Trends zu beobachten. In der Aorta stieg in JHT-Mäusen die Zahl der T_H-Zellen, während die der CTL sank. Im EF der JHT-Mäuse kam es jedoch zu einer signifikanten Minderung der T_H-Zellen verglichen mit in B6-Mäusen. Die CTL-Zahl zeigte einen ansteigenden Trend. Innerhalb der T_H-Zellen war vornehmlich eine Zunahme der anti-inflammatorischen Subpopulationen in JHT-Mäusen gegenüber B6-Mäusen zu beobachten. So kam es zu vermehrtem Auftreten von T_H2-Zellen in Blut, Aorta, PVAT und Leber. Auch T_{reg}-Zellen waren in erhöhter Zahl in Blut, Milz, PVAT und Leber der JHT-Mäuse zu finden. Der erwartete, signifikante Anstieg von T_H1-Zellen und T_H17-Zellen war lediglich in der Leber sowie Blut und Aorta zu beobachten. Da es in den JHT-Mäusen keinen klaren und konstanten Anstieg nur von inflammatorischen T-Zellsubpopulationen gibt, liegt die Vermutung nahe, dass die vaskuläre Dysfunktion in B-Zell-Knockout-Mäusen nicht T-Zell-vermittelt ist.

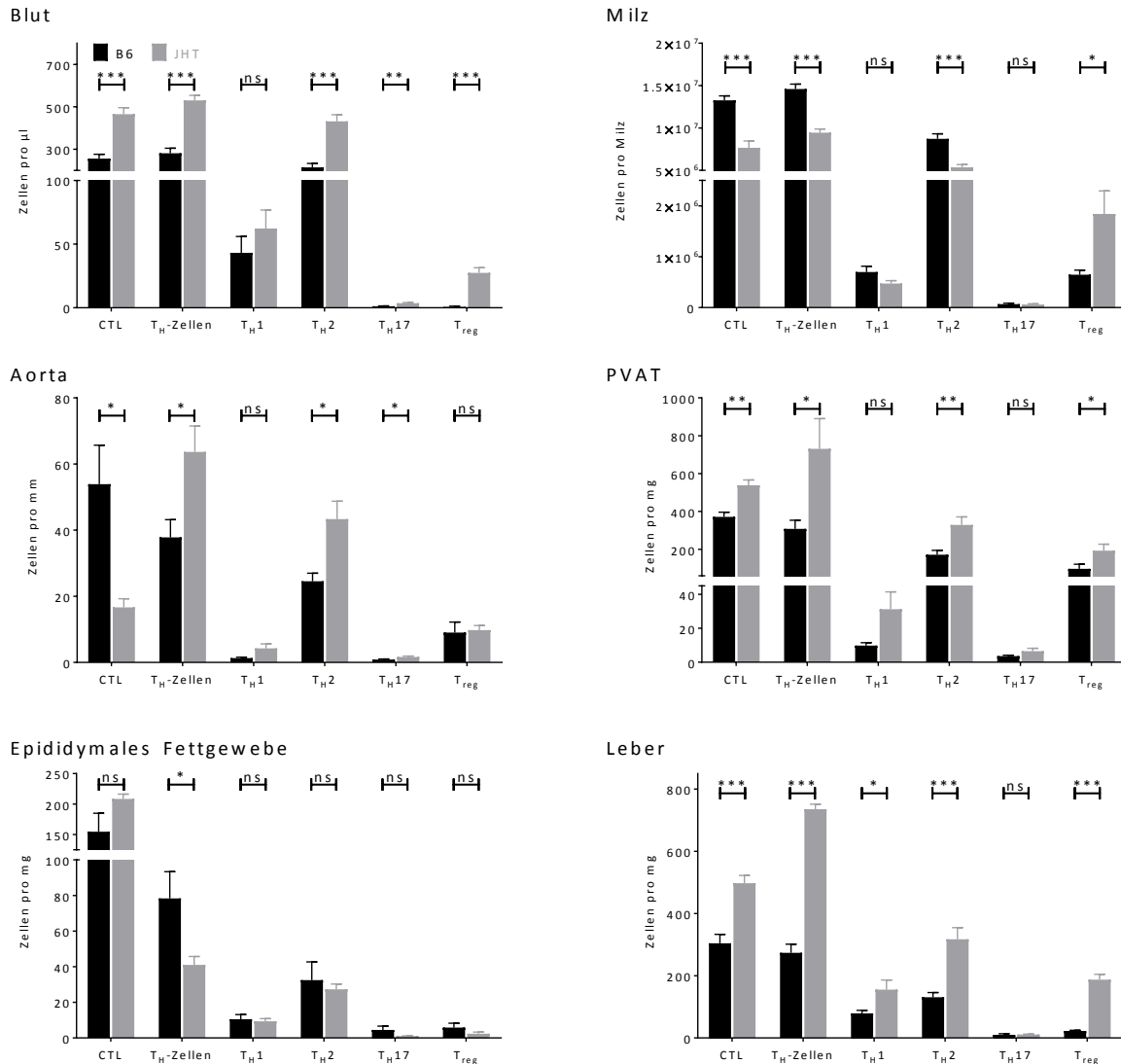


Abbildung 15: T-Zellvorkommen in 17 Wochen alten Mäusen.

Aus 17 Wochen alten B6- und JHT-Mäusen wurden Blut, Milz, Aorta mit PVAT, EF und Leber entnommen. Aorta und PVAT wurden unter dem Mikroskop von einander getrennt. Die Gewebe wurden wie in „3.2.3.1 Organaufarbeitung“ beschrieben zur durchflusszytometrischen Bestimmung aufgearbeitet. Zur Unterscheidung der T-Subpopulationen wurden die Antikörper PerCP CD45, BV605 CD90.2, APC-Cy7 CD4 (Blut, Milz, Leber), PE CD4 (PVAT, EF), PE CD8 (Aorta), BV421 CCR6, APC CXCR3, FITC CD25, PE-Cy7 CD127 und APC-Cy7 VS (Aorta, PVAT, EF) verwendet. Das *Gating*-Schema ist unter „3.2.3.3 *Gating*-Strategie“ dargestellt. Die Säulen stellen den Mittelwert \pm SEM dar, n = 6 (ns = nicht signifikant, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001).

Für die Untersuchung der Immunzellverteilung auf die Subpopulationen der myelomonozytischen Zelllinie, wurden die absoluten Zellzahlen an NK-Zellen, Makrophagen, Monozyten und Neutrophilen in Blut, Aorta, PVAT, Milz, Leber und EF aus 17 Wochen alten B6- und JHT-Mäusen durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 16). Hierbei fiel vor allem auf, dass in allen Organen die Zahl der Neutrophilen in JHT-Mäusen gegenüber B6-Mäusen signifikant erhöht war. Die weiteren Immunzellen zeigten keine konstante Erhöhung oder Absenkung. So waren in Blut und Leber von JHT-Mäusen NK-Zellen vermehrt vertreten. Die anderen vier Organe zeigten diesen Effekt nur als Trend. Im Blut waren außerdem weniger Monozyten, in der Milz weniger Makrophagen zu finden. Im PVAT kam es zu einem Anstieg der Makrophagenzahl in JHT-Mäusen.

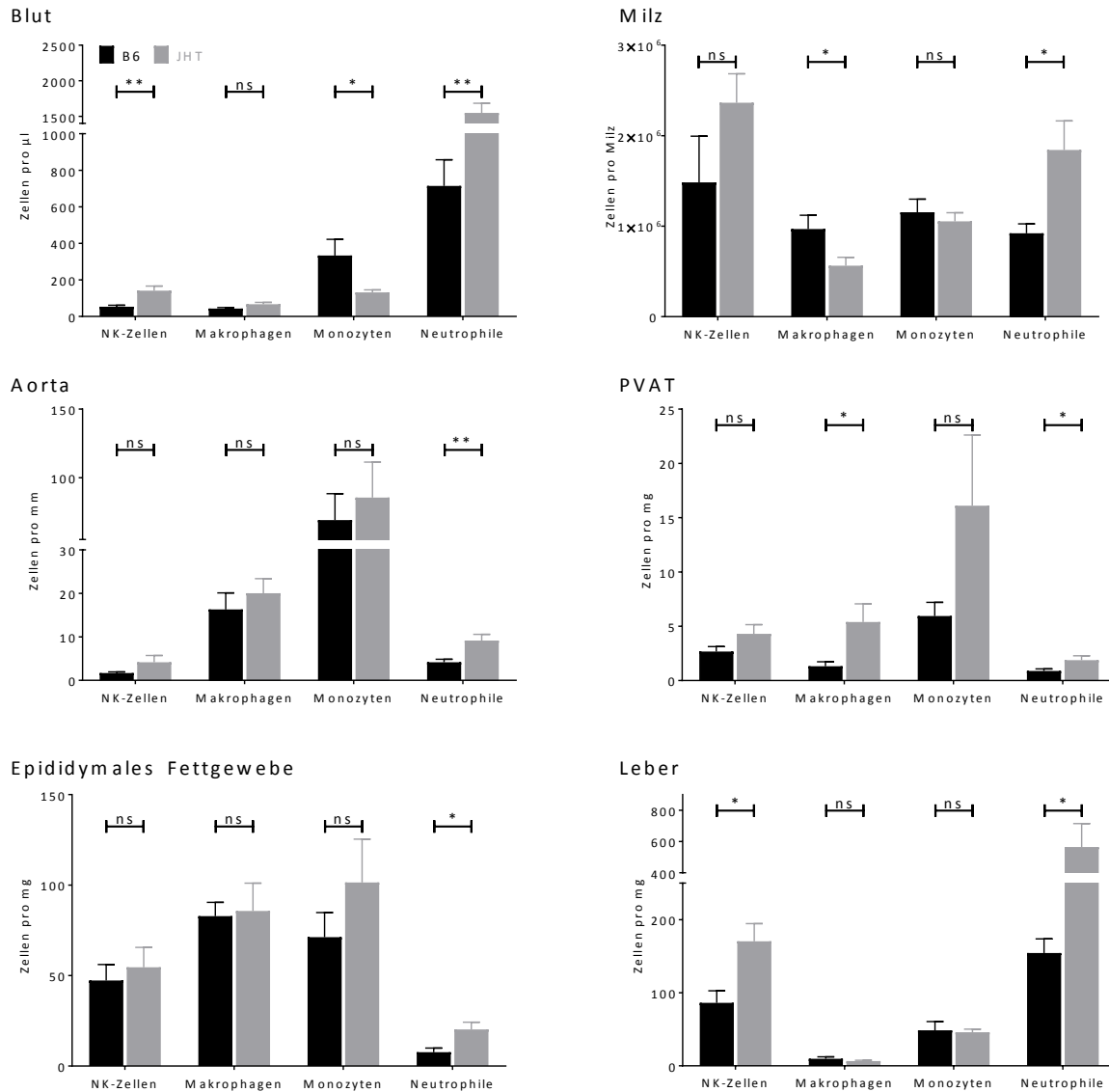


Abbildung 16: Vorkommen von myelomonozytischen Zellen in 17 Wochen alten Mäusen.

Aus 17 Wochen alten B6- und JHT-Mäusen wurden Blut, Milz, Aorta mit PVAT, EF und Leber entnommen. Aorta und PVAT wurden unter dem Mikroskop von einander getrennt. Die Gewebe wurden wie in „3.2.3.1 Organaufarbeitung“ beschrieben zur durchflusszytometrischen Bestimmung aufgearbeitet. Zur Unterscheidung von NK-Zellen, Makrophagen, Monozyten und Neutrophilen wurden die Antikörper APC CD45, PE-Cy7 CD3e, BV421 CD11b, APC-Cy7 NK1.1 (Blut, Milz, Leber), BV605 NK1.1 (PVAT, EF), PE F4/80, FITC Ly6G, PerCP-Cy5.5 Ly6C und APC-Cy7 VS (Aorta, PVAT, EF) verwendet. Das *Gating*-Schema ist unter „3.2.3.3 *Gating*-Strategie“ dargestellt. Die Säulen stellen den Mittelwert ± SEM dar, n = 6 (ns = nicht signifikant, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001).

Da die Erhöhung der Neutrophilenzahl in allen Organen in JHT-Mäusen verglichen mit B6-Mäusen die Annahme zulässt, dass Neutrophile durch B-Zellen reguliert werden, wurden diese, sowie ihre Vorläuferzellen, im KM 17 Wochen alter B6- und JHT-Mäuse mittels Durchflusszytometrie untersucht. In Abbildung 17A sind die absoluten Zahlen der Vorläuferzellen HSC, CMP, GMP und MEP an allen Zellen des Knochenmarks der Hüftknochen und der Femuroa usowie Tibiae der Hinterbeine dargestellt.

In JHT-Mäusen waren signifikant weniger HSC zu finden. Zusätzlich kam es interessanterweise in JHT-Mäusen im Trend zu mehr CMP und weniger GMP. Die MEP-Zahl blieb konstant. Grund hierfür könnte eine Kettenreaktion sein. Die Verminderung der GMP-Population könnte damit zu erklären sein, dass vermehrt reife Zellen dieser Zelllinie (Monozyten oder Neutrophile) gebildet wurden. Hieraus würde ein erhöhter Bedarf an CMPs resultieren, welche aus HSCs entstehen und somit deren Zahl verringern würden. Daher wurden hier ebenfalls die absoluten Zellzahlen der reifen Immunzellen bestimmt.

In Abbildung 17B ist zu sehen, dass im KM von JHT-Mäusen vermehrt T-Zellen und myelomonocyti-sche Zellen gebildet wurden. Wie durch den B-Zell-Knockout zu erwarten war konnten weniger B-Zellen identifiziert werden. Dass dennoch B-Zellen im KM auftauchten, liegt darin begründet, dass der B-Zell-Knockout die Reifung der B-Zellrezeptoren verhindert. Ohne funktionsfähige B-Zellrezeptoren können B-Zellen das KM nicht verlassen und gehen nach einiger Zeit in die Apoptose. Bevor sie den B-Zellrezeptor ausbilden, sind B-Zellen jedoch bereits identifizierbar, weshalb der Pool an heranreifenden B-Zellen dargestellt werden konnte.

In Abbildung 17C sind die reifen Makrophagen, Monozyten und Neutrophilen im KM 17 Wochen alter B6- und JHT-Mäuse zu sehen. Hier war eine signifikante Erhöhung der Neutrophilen-, nicht aber der Monozytenzahl zu verzeichnen. Dies deutet daraufhin, dass fehlende reife B-Zellen im Knochenmark zu einer vermehrten Granulopoese neutrophiler Granulozyten führte.

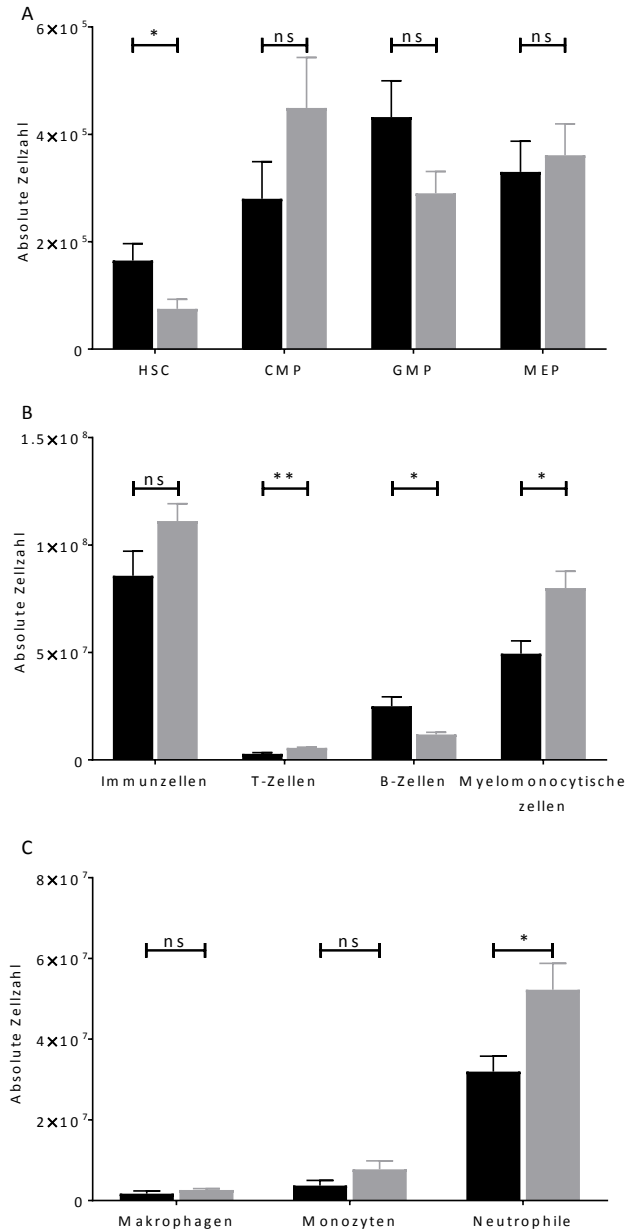


Abbildung 17: Immunzellen des Knochenmarks.

Aus 17 Wochen alten B6- und JHT-Mäusen wurde aus den Tibiae und Femora der Hinterbeine sowie aus den Hüftknochen Knochenmark isoliert und wie in „3.2.3.1 Organaufarbeitung“ beschrieben zur durchflusszytometrischen Bestimmung aufgearbeitet. Für die Unterscheidung der Vorläuferzellen wurden die Antikörper Biotin CD3, Biotin CD4, Biotin CD8, Biotin CD5, Biotin B220, Biotin Gr1, Biotin Ter119, Biotin CD127, PE-Cy7 Sca1, APC ckit, PE CD16/32 und FITC CD34 verwendet (A). T-, B- und myelomonocytische Zellen (B) sowie Makrophagen, Monozyten und Neutrophile (C) wurden über die Antikörper PE-Cy7 CD45, BV605 CD90.2, APC CD19, BV421 CD11b, PE F4/80, FITC Ly6G und PerCP-Cy5.5 Ly6C identifiziert. Das *Gating*-Schema ist unter „3.2.3.3 *Gating*-Strategie“ dargestellt. Die Säulen stellen den Mittelwert ± SEM dar, n = 9 (A), 6 (B,C) (ns = nicht signifikant, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001).

4.1.3 Neutrophilen Depletion und die Folgen auf die vaskuläre Relaxation

Um zu verifizieren, ob die erhöhte Neutrophilenzahl in JHT-Mäusen für die vaskuläre Dysfunktion verantwortlich ist, wurden in zehn Wochen alten JHT-Mäusen die Neutrophilen depletiert. Hierfür wurde JHT-Mäusen Anti-Ly6g Antikörper intraperitoneal gespritzt. Eine Kontrollgruppe an JHT-Mäusen im passenden Alter erhielt als Isotypen-Kontrolle IgG2a. Weiterhin dienten unbehandelte B6-Mäuse als Referenz. 36 Stunden nach Ly6G- bzw. IgG2a-Gabe wurde die Neutrophilendepletion in Blut sowie Aorta und PVAT überprüft. Außerdem wurden die Aorten der Mäuse isoliert und am Myographen ihre vaskuläre Relaxation bestimmt. Wie in Abbildung 18 zu sehen ist, war die antikörpervermittelte Depletion der Neutrophilen erfolgreich. In JHT-Mäusen, die Ly6G verabreicht bekamen, sank die Zahl der Neutrophilen im Blut unter das Niveau der B6-Mäuse. Die Zahl an Neutrophilen in JHT-Mäusen, welche IgG2a verabreicht bekamen, blieb erwartungsgemäß hoch (Abbildung 19 oben). Auch in Aorta und PVAT konnte die Zahl der Neutrophilen nach Ly6G-Behandlung verringert werden, sodass hier der Level der B6-Mäuse erreicht werden konnte (Abbildung 19 unten).

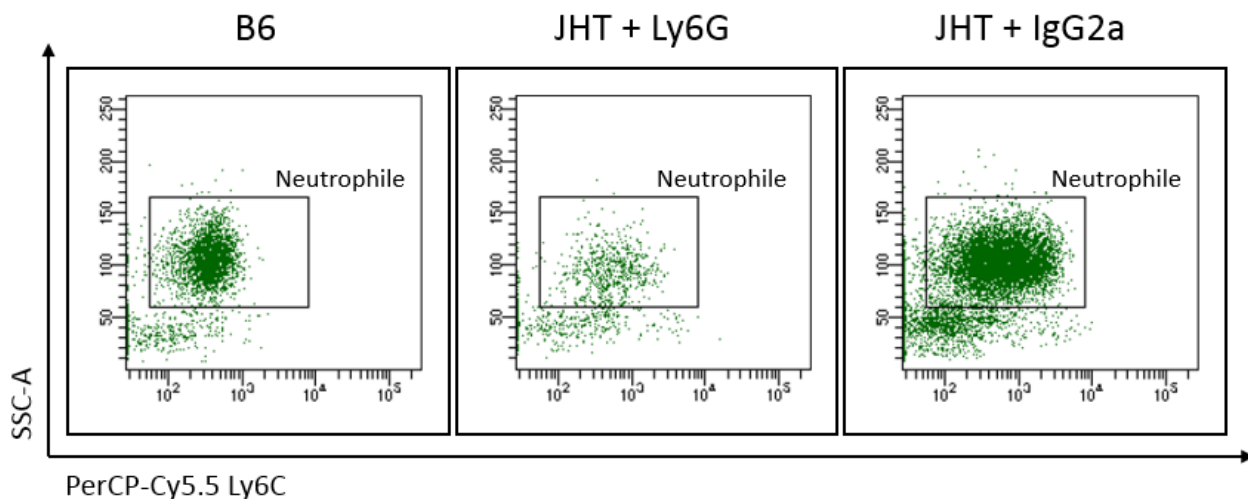


Abbildung 18: Neutrophilendepletion im Blut.

Neutrophile wurden in 10 Wochen alten JHT-Mäusen mittels Anti-Ly6G Antikörper depletiert. Zur Isotypen-Kontrolle wurden gleichaltrige JHT-Mäuse mit IgG2a Antikörper behandelt. Beide Injektionen erfolgten i. p. 36 Stunden nach der Injektion wurde im Blut die Anzahl Frequenz der Neutrophilen am FACSCanto™ II überprüft.

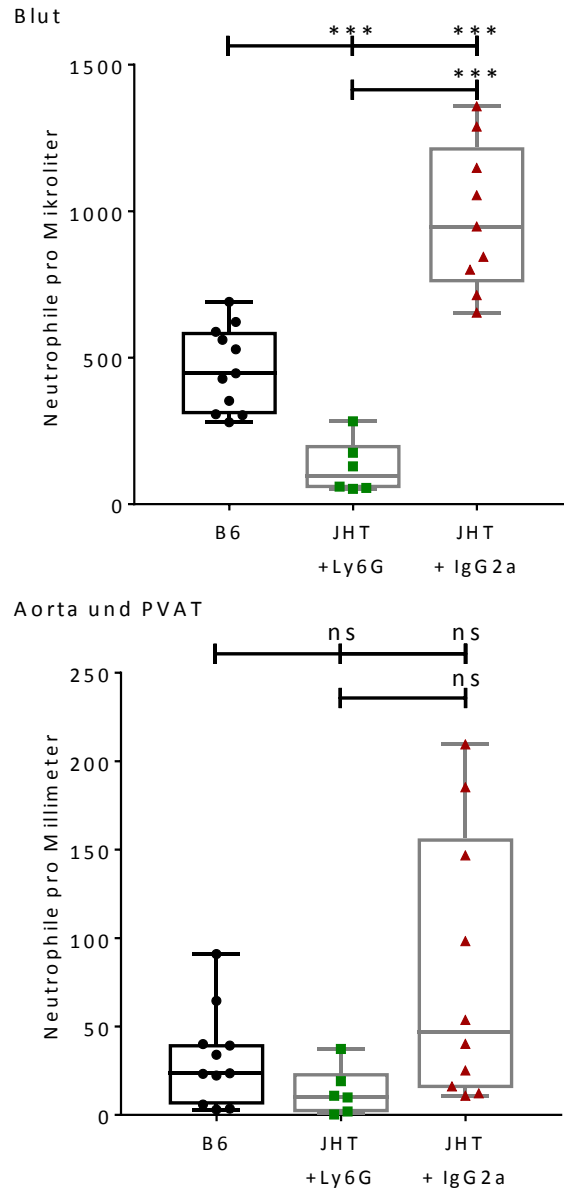


Abbildung 19: Neutrophilendepletion.

Neutrophile wurden in 10 Wochen alten JHT-Mäusen mittels Anti-Ly6G Antikörper depletiert. Zur Isotypen Kontrolle wurden gleichaltrige JHT-Mäuse mit IgG2a Antikörper behandelt. Beide Injektionen erfolgte i. p. 36 Stunden nach der Injektion wurden in Blut und Aorta mit PVAT die Frequenz der Neutrophilen durchflusszytometrisch bestimmt. Das *Gating*-Schema für die Subpopulationen der myelomonozytischen Zellen ist unter „3.2.3.3 *Gating*-Strategie“ dargestellt. Die Boxen der Box-Plots zeigen den Interquartilbereich, welcher Daten zwischen dem 25. und den 75. Perzentil abdeckt. Zusätzlich sind der Median als horizontale Linie und Antennen von Min. bis Max. dargestellt, Blut: n = 13 (B6), 6 (JHT + Ly6G), 10 (JHT + IgG2a), Aorta und PVAT: n = 12 (B6), 6 (JHT + Ly6G), 11 (JHT + IgG2a) (ns = nicht signifikant, ***P < 0,001). Die Injektion der Antikörper wurde von Frau Dr. Ning Xia durchgeführt.

In Abbildung 20 ist zu sehen, dass in JHT-Mäusen mit depletierten Neutrophilen die vaskuläre Funktion vollständig normalisiert wurde. Die Relaxationskurve überlappt mit der von B6-Mäusen. In den JHT-Mäusen, welchen die Isotypen-Kontrolle verabreicht wurde, war die ACh-vermittelte Relaxation signifikant schwächer. Die Dysfunktion blieb erhalten.

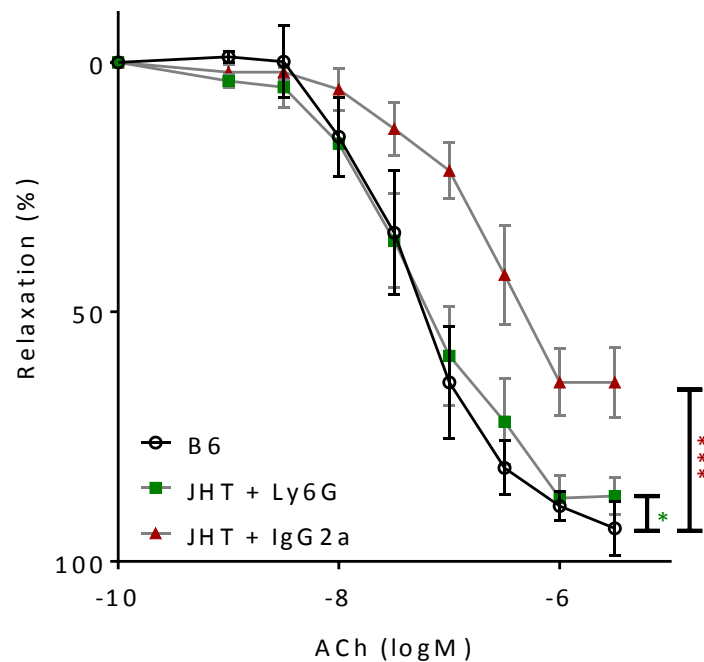


Abbildung 20: Der Einfluss von Neutrophilen auf die vaskuläre Funktion.

Neutrophile wurden in 10 Wochen alten JHT-Mäusen mittels Anti-Ly6G Antikörper depletiert. Zur Isotypen-Kontrolle wurden gleichaltrige JHT-Mäuse mit IgG2a-Antikörper behandelt. Beide Injektionen erfolgten i. p. 36 Stunden nach der Injektion wurden die Aorten entnommen und das PVAT wurde unter dem Mikroskop entfernt. Die ACh-induzierte vaskuläre Relaxation wurde mittels Myograph ermittelt. Signifikanzen wurden mittels Two-way Anova mit anschließender Bonferroni-Korrektur über GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla) ermittelt. Die Punkte stellen den Mittelwert \pm SEM dar, $n = 5$ (B6), 9 (JHT + Ly6G, JHT + IgG2a) ($ns =$ nicht signifikant, $***P < 0,001$). Die Myographmessung wurde von Frau Dr. Ning Xia durchgeführt.

Diese Daten weisen darauf hin, dass Neutrophile ausschlaggebend an der vaskulären Dysfunktion in JHT-Mäusen beteiligt sind.

4.1.4 Ausschluss einer chronischen Inflammation in JHT-Mäusen

Neutrophile werden als erste Verteidigungslinie gegen Infektionen und als eine der Hauptzellarten, welche eine Entzündungsreaktion auslösen, angesehen [90]. Um auszuschließen, dass in JHT-Mäusen durch den Verlust der B-Zellen nur eine chronische Inflammation vorliegt, wurde die SAA-Konzentration im Serum von 28 Wochen alten B6- und JHT-Mäusen bestimmt. SAA ist ein Akute-Phase-Protein, welches im Falle einer Entzündung um das 1000-fache erhöht ins Blut sezerniert wird [91]. Hier ruft es die Bindung von Cholesterin hervor, hat einen opsonierenden Effekt und eine chemotaktische Wirkung auf Leukozyten [92]. In Abbildung 21 ist zu sehen, dass es in JHT-Mäusen verglichen mit B6-Mäusen zu keinem Anstieg der SAA-Konzentration im Blut kam. Eine chronische Entzündung in B-Zell-Knockout-Mäusen ist also als Grund für die erhöhte Neutrophilenzahl auszuschließen.

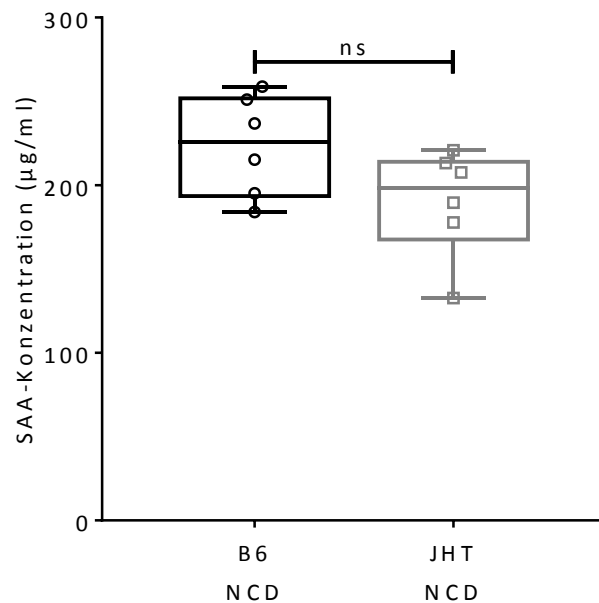
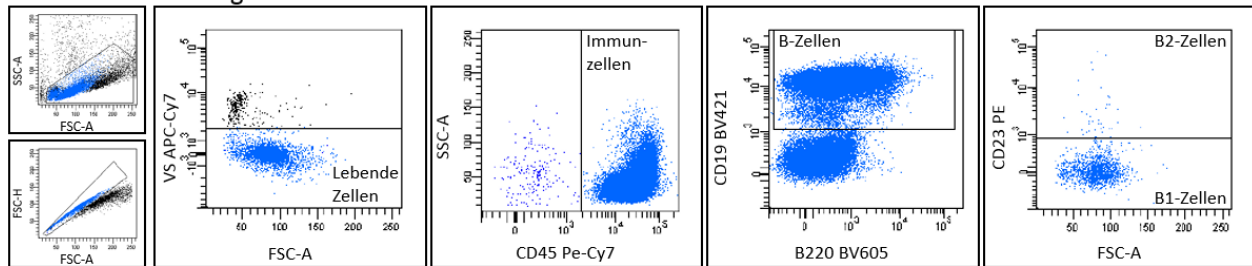
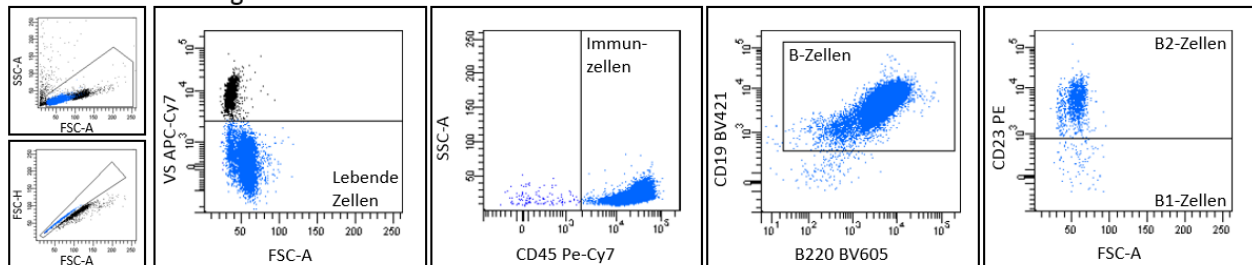


Abbildung 21: Serumalbumin A Konzentration im Blut.

28 Wochen alten B6- und JHT-Mäusen wurde Blut abgenommen und das Serum isoliert. Der SAA-Wert wurde mittels ELISA bestimmt. Die Boxen des Box-Plots zeigen den Interquartilbereich, welcher Daten zwischen dem 25. und den 75. Perzentil abdeckt. Zusätzlich sind der Median als horizontale Linie und Antennen von Min. bis Max. dargestellt, n = 6, ns = nichts signifikant).

4.1.5 B-Zell Transfer und die Folgen auf die vaskuläre Relaxation

Für die Identifikation derjenigen B-Zellsubpopulation, welche eine protektive Wirkung auf die vaskuläre Funktion ausübt, wurden B1- und B2-Zellen aus B6-Spendermäusen isoliert und in JHT-Empfängermäuse durch intravenöse Injektion transferiert. Hierfür stammten die B1-Zellen aus dem Peritonealraum und die B2-Zellen aus der Milz. Die Isolation wurde über negative Selektion mittels MACS durchgeführt und die Reinheit wurde durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 22). Bei der Anreicherung der B1-Zellen konnten nur 64,8 % der Zellen als B-Zellen identifiziert werden. Hiervon waren 97,9 % B1-Zellen und 2,1 % B2-Zellen. Die für den B2-Zelltransfer aufgereinigten Zellsuspension bestand zu 99,3 % aus B-Zellen. Hierbei waren 96,2 % B2-Zellen und 3,8 % B1-Zellen. Zwei Wochen nach dem Transfer von $5 \cdot 10^6$ B1- beziehungsweise B2-Zellen wurde die ACh-induzierte Relaxationskapazität der Aorten gemessen. Außerdem wurde am Durchflusszytometer überprüft, ob und wo transferierte B-Zellen zu finden sind. Im Blut wurde zudem das Immunzellprofil bestimmt. Als Kontrollen dienten B6-Mäuse sowie JHT-Mäuse, die PBS ohne Zellen empfangen hatten.

B1-Zellanreicherung**B2-Zellanreicherung****Abbildung 22:** B1- und B2-Zellanreicherung.

B1-Zellen wurden aus dem Peritonealraum und B2-Zellen aus der Milz von B6-Spendermäusen isoliert. Zur Anreicherung von B1-Zellen wurden die CD23 MicroBeads, die F4/80 MicroBeads UltraPure und das Pan B Cell isolation Kit II von Miltenyi Biotec verwendet. Für die Aufreinigung von B2-Zellen wurden die CD43 MicroBeads und ebenfalls das Pan B Cell isolation Kit II von Miltenyi Biotec eingesetzt. Die Reinheit wurde am FACSCanto™ II überprüft.

Zwei Wochen nach dem Transfer, wurde das Vorkommen von B-Zellen in Milz und Peritonealraum durchflusszytometrisch bestätigt (Abbildung 23 und Abbildung 24). Sowohl in der Milz als auch im Peritonealraum wurden in den B1- bzw. B2-Zellempfängermäusen zwei Wochen nach dem Transfer signifikant mehr B-Zellen detektiert als in den JHT-Mäusen, welchen reine PBS gespritzt wurden.

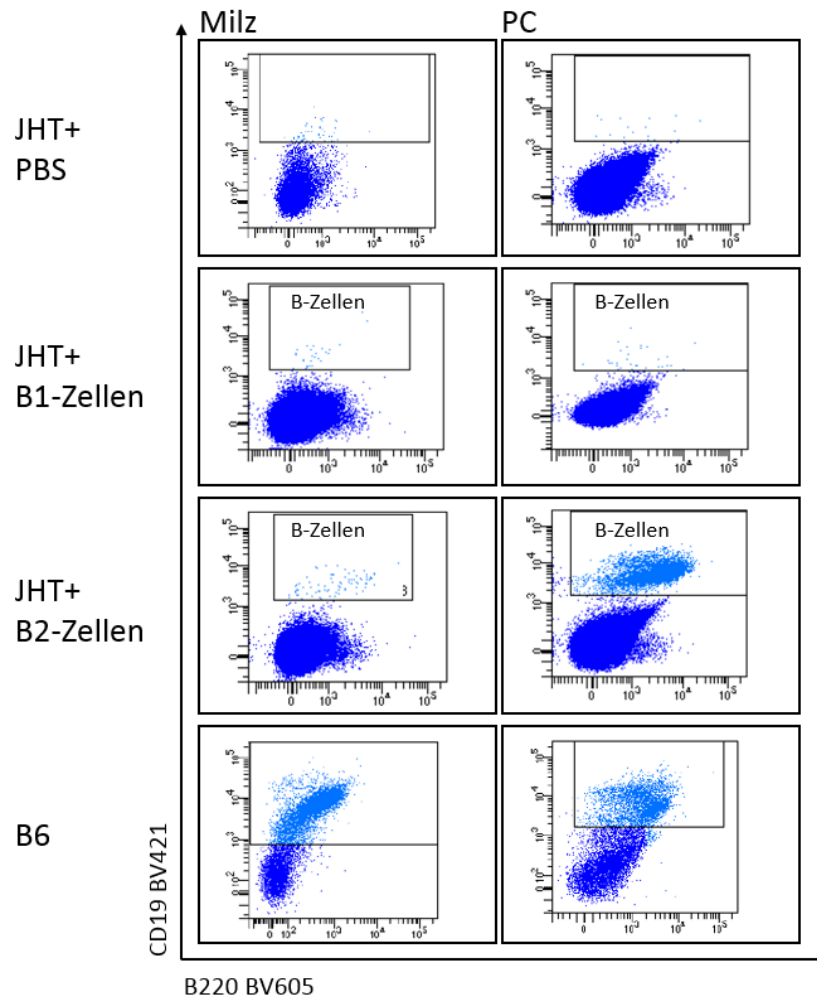
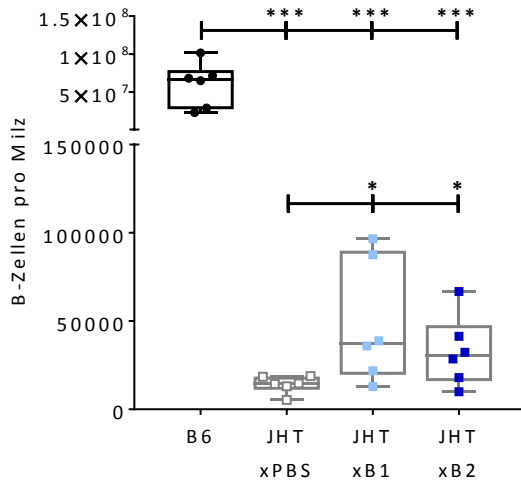


Abbildung 23: B-Zellen in Milz und Peritonealraum nach B-Zelltransfer.

B1-Zellen wurden aus dem Peritonealraum und B2-Zellen aus der Milz von B6-Spendermäusen isoliert und wie unter „3.2.5 B-Zelltransfer“ beschrieben aufgereinigt. Jeweils $5 \cdot 10^6$ -Zellen wurden i. v. in 8 Wochen alte JHT-Empfänger-mäuse transferiert. Zur Kontrolle dienten JHT-Mäuse, welche reines PBS bekamen, und B6-Mäuse. Zwei Wochen nach Transfer wurde die Frequenz der B-Zellen am FACSCanto™ II überprüft.

Milz



Peritonealraum

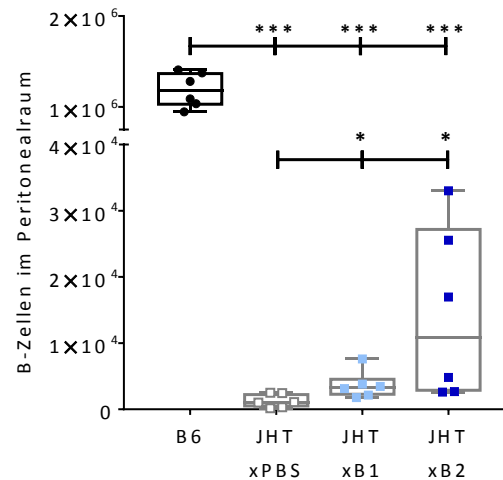


Abbildung 24: B-Zellen in Milz und Peritonealraum nach B-Zelltransfer.

B1-Zellen wurden aus dem Peritonealraum und B2-Zellen aus der Milz von B6-Spendermäusen isoliert und wie unter „3.2.5 B-Zelltransfer“ beschrieben aufgereinigt. Jeweils 5×10^6 -Zellen wurden i. v. in 8 Wochen alte JHT-Empfänger-mäuse transferiert. Zur Kontrolle dienten JHT-Mäuse, welche reines PBS bekamen, und B6-Mäuse. Zwei Wochen nach Transfer wurde die absolute B-Zellzahl mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Hierfür wurden die Antikörper PE-Cy7 CD45, APC BV421 und BV605 B220 verwendet. Das *Gating*-schema ist unter „3.2.3.3 *Gating*-Strategie“ dargestellt. Die Boxen der Box-Plots zeigen den Interquartilbereich, welcher Daten zwischen dem 25. und den 75. Perzentil abdeckt. Zusätzlich sind der Median als horizontale Linie und Antennen von Min. bis Max. dargestellt, $n = 6$ (ns = nicht signifikant, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

In Abbildung 25 ist die ACh-induzierte Relaxation des B-Zelltransferexperiments zu sehen. Die Kurven für die Aorten von B6-Mäusen und JHT-Mäusen, welche nur PBS gespritzt bekamen, verlaufen wie erwartet und bereits unter „4.1.1B-Zellen und die Vasculäre Relaxation“ beschrieben. Sowohl der Transfer von B1- als auch B2-Zellen führte zu einer Verbesserung der vaskulären Funktion. JHT-Mäuse, denen B2-Zellen verabreicht wurden, zeigten ein leicht verstärktes Relaxationsverhalten gegenüber JHT-Mäusen der PBS-Gruppe. Der Transfer von B1-Zellen jedoch führte zur vollständigen Normalisierung der vaskulären Funktion annähernd auf das Niveau der B6-Mäuse. Demzufolge haben B1-Zellen eine protektive Wirkung auf das vaskuläre System.

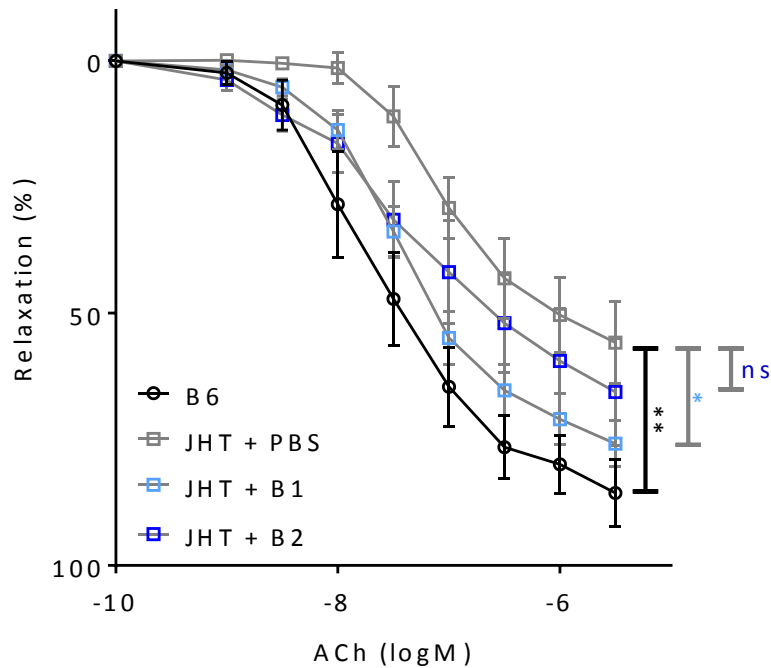


Abbildung 25: Der Einfluss von B1- und B2-Zellen auf die vaskuläre Funktion.

Aus B6-Spendermäusen isolierte B1- und B2-Zellen wurden i. v. in 8 Wochen alten JHT-Mäusen injiziert (jeweils $5 \cdot 10^6$ -Zellen in PBS). Zur Kontrolle wurden gleichaltrige JHT-Mäuse mit reinem PBS behandelt. Zwei Wochen nach der Injektion wurden die Aorten der Mäuse isoliert und vom PVAT unter dem Mikroskop getrennt. Die ACh-induzierte vaskuläre Relaxation wurde mittels Myograph ermittelt. Signifikanzen wurden mittels Two-way Anova mit anschließender Bonferroni-Korrektur über GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla) ermittelt. Die Punkte stellen den Mittelwert \pm SEM dar, $n = 7$ (B6), 8 (JHT + PBS, JHT + B1, JHT + B2), ($ns =$ nicht signifikant, $***P < 0,001$). Die Myographmessung wurde von Frau Dr. Ning Xia durchgeführt.

Um zu überprüfen, ob der Transfer von B-Zellen einen Einfluss auf das Gesamtimmunzellprofil hat, wurde diese zwei Wochen nach dem Transfer im Blut durchflusszytometrisch analysiert. Es wurden die absoluten Zellzahlen aller Immunzellen sowie der T-Zellen und myelomonozytischen Zellen und ihrer Subpopulationen bestimmt. Wie in Abbildung 26A zu sehen ist, kam die durch den Transfer von B1- oder B2-Zellen in JHT-Mäuse zu keiner signifikanten Veränderung der T-Zellsubpopulationen im Vergleich zu JHT-Mäusen, welche nur PBS verabreicht bekommen hatten. Bei Betrachtung der myelomonozytischen Zellen fällt jedoch auf, dass der Transfer von B1- oder

B2-Zellen zu einer Verminderung der absoluten Zahl führte, wobei nur der B1-Transfer ein signifikantes Ergebnis hervorrief (Abbildung 26B). Das reduzierte Auftreten von myelomonozytischen Zellen konnte durch eine herabgesenkte Anzahl von Neutrophilen nach dem B-Zelltransfer erklärt werden (Abbildung 26B). Hierbei kommt es durch den B1-Zelltransfer zu einer signifikanten Abnahme von neutrophilen Granulozyten verglichen mit ihrem Vorkommen in JHT-Mäusen, welche PBS gespritzt bekamen.

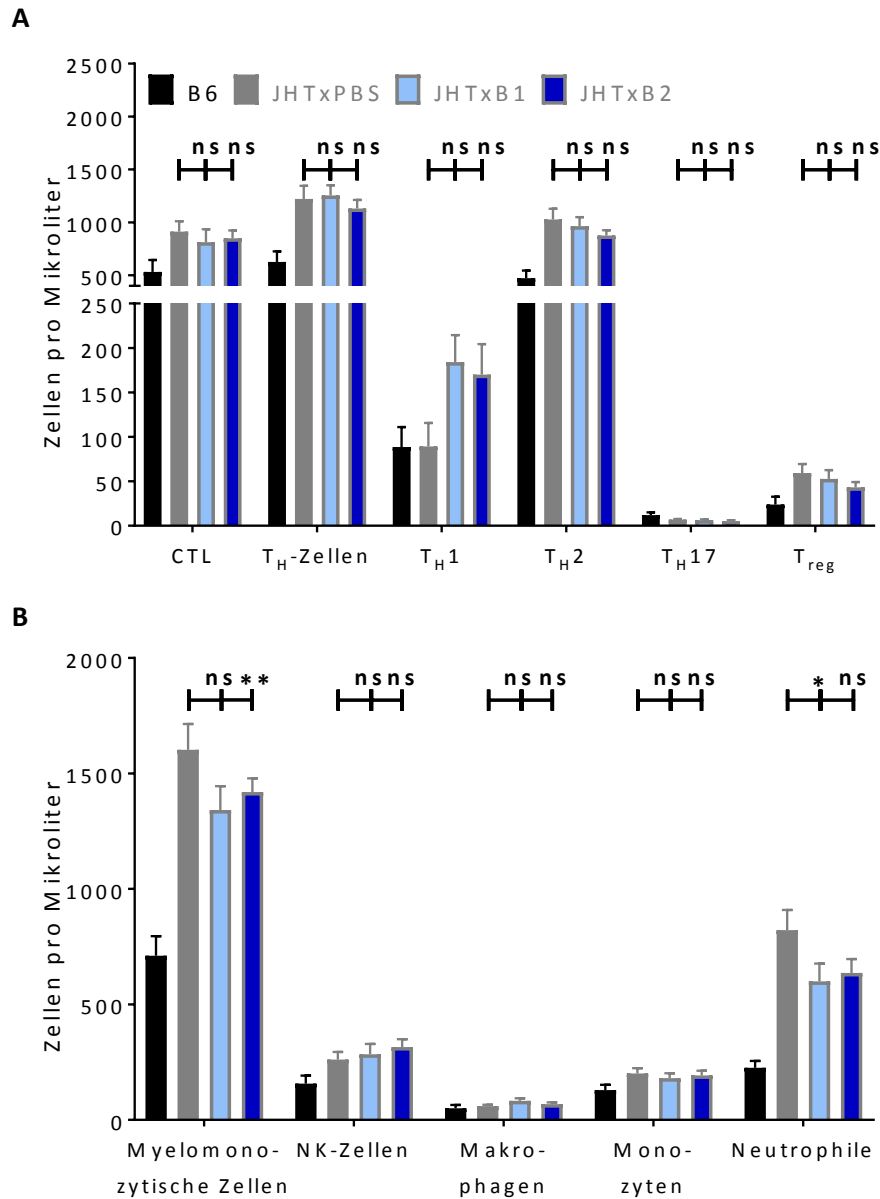


Abbildung 26: T-Zellen und myelomonocytischen Zellen im Blut von JHT-Mäusen nach B-Zelltransfer.

Zwei Wochen nach dem Transfer von 5×10^6 B1- bzw. B2-Zellen und reinem PBS wurde das Blut aus JHT-Empfängermäusen und B6-Kontrollmäusen isoliert und wie in „3.2.3.1 Organaufarbeitung“ beschrieben zur durchflusszytometrischen Bestimmung aufgearbeitet. (A) Zur Unterscheidung der T-Subpopulationen wurden die Antikörper PerCP CD45, BV605 CD90.2, APC-Cy7 CD4, BV421 CCR6, APC CXCR3, FITC CD25 und PE-Cy7 CD127 verwendet. (B) Zur Unterscheidung von NK-Zellen, Makrophagen, Monozyten und Neutrophilen wurden die Antikörper APC CD45, PE-Cy7 CD3e, BV421 CD11b, APC-Cy7 NK1.1, PE F4/80, FITC Ly6G und PerCP-Cy5.5 Ly6C verwendet. Das *Gating*-Schema ist unter „3.2.3.3 *Gating*-Strategie“ dargestellt. Die Säulen stellen den Mittelwert \pm SEM dar, $n = 6$ (ns = nicht signifikant, $*P < 0,05$, $**P < 0,01$).

4.1.6 IgMi- und IgG1i-Mäuse

Zu den Eigenschaften von B-Zellen zählen die Erkennung von Antigenen über den B-Zellrezeptor mit anschließender Präsentation dieser für andere Effektorzellen wie T-Zellen und die Produktion von Antikörpern zur Bekämpfung von Pathogenen. Um zu unterscheiden, ob eine dieser Eigenschaften einen essentiellen Einfluss auf das vaskuläre System hat, wurden zwei Mausstämme, IgMi und IgG1i, mit eingeschränkten B-Zellfunktionen hinsichtlich ihrer ACh-induzierten Relaxation und ihres Immunzellprofils analysiert und mit B6- und JHT-Mäusen verglichen. Beide Mausarten können reife B-Zellen entwickeln, IgMi-Mäuse können jedoch keine Antikörper sezernieren. An ihrer Oberfläche tragen sie den BCR des IgM-Typs. IgG1i-Mäuse hingegen haben einen IgG1-BCR. Außerdem können sie Antikörper vom IgG1-Typ sezernieren.

In Abbildung 27 sind die ACh-induzierten Relaxationskurven von aus 7 w alten B6-, JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäusen isolierten Aorten dargestellt. Wie zuvor bereits beobachtet war in JHT-Mäusen verglichen mit B6-Mäusen die Relaxation vermindert und unvollständig. Für Aorten von IgG1i-Mäusen konnte ein ähnliches Verhalten beobachtet werden. Auch hier konnte keine komplette Relaxation erreicht werden und die Kurve verläuft nah zur Kurve der JHT-Mäuse. Aorten von IgMi-Mäusen hingegen wiesen im Vergleich zu B6-Mäusen keine vaskuläre Dysfunktion auf. Die Kurven beider Mausstämme sind nahezu deckungsgleich und die vollständige Relaxation konnte erreicht werden.

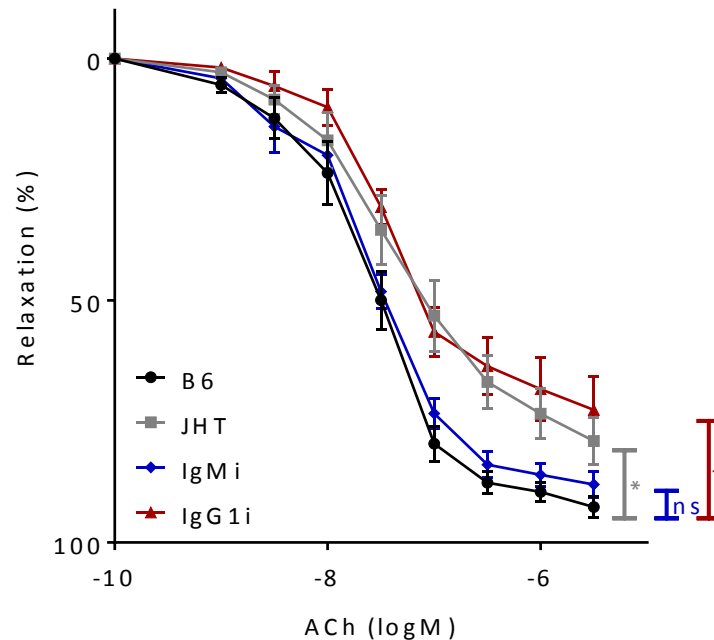


Abbildung 27: Die vaskuläre Funktion von IgMi- und IgG1i-Mäusen.

Aus 7 Wochen alten IgMi- und IgG1i-Mäusen wurden die Aorten isoliert und vom PVAT unter dem Mikroskop getrennt. Die ACh-induzierte vaskuläre Relaxation wurde mittels Myograph ermittelt. Signifikanzen wurden mittels Two-way Anova mit anschließender Bonferroni-Korrektur über GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla) ermittelt. Die Punkte stellen den Mittelwert \pm SEM dar, $n = 12$ (B6, JHT, IgMi), 11 (IgG1i) (ns = nicht signifikant, *** $P < 0,001$). Die Myographmessung wurde von Frau Dr. Ning Xia durchgeführt.

Das Immunzellprofil wurde in 7 Wochen alten Tieren untersucht. Aus B6-, JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäusen wurden jeweils Blut, Aorta, PVAT, Milz, Leber und EF entnommen und für die Untersuchung am Durchflusszytometer zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet. Am Durchflusszytometer wurden die jeweilige Gewebesgesamtimmunzellzahl und die Verteilung auf B- und T-Zellsubpopulationen sowie die Zellarten der myelomonozytischen Zelllinie bestimmt.

Während in Bezug auf Gesamtzellzahlen, B-Zellen und T-Zellen zwar in JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäusen signifikante Veränderungen im Immunzellprofil zu beobachten waren, folgten vor allem die Abänderungen in den Zahlen der myelomonozytischen Zellen einem wiederkehrenden Trend (Abbildung 28). So waren diese in 7 Wochen alten Mäusen in Blut, Milz und Leber von JHT- und

IgG1i-Mäusen verglichen mit B6-Mäusen jeweils erhöht, während die Zahlen für die IgMi-Mäuse hier auf dem Niveau der Kontrollmäuse blieben. Außerdem war in JHT-Mäusen in Blut, PVAT, EF und Leber die Anzahl der T-Zellen gegenüber den B6-Mäusen erhöht. In der Aorta konnten etwa gleich viele T-Zellen detektiert werden. Die Milz zeigte eine T-Zellzahlreduktion. Diese Ergebnisse stimmen bezüglich Trends und Zellzahlen mit den Ergebnissen für 17 Wochen überein, was den Schluss zulässt, dass der Phänotyp schon frühzeitig ausgebildet ist.

IgG1i-Mäuse zeigten verglichen mit B6-Mäusen bezüglich T-Zellen keinen durchgängigen Trend. So waren hier die absoluten Zahlen in Blut, Milz und Leber unverändert. In Aorta und PVAT waren vergleichsweise weniger T-Zellen zu finden. Im EF kam es hingegen zu einem vermehrten Aufkommen. Ein ähnliches Bild war für B-Zellen zu beobachten. Hier waren in Milz, Aorta und PVAT die B-Zellzahlen auf dem gleichen Niveau wie in B6-Mäusen. Blut und Leber offenbarten eine Reduktion und das EF war mit B-Zellen angereichert.

In IgMi-Mäusen waren sowohl bezüglich T- als auch B-Zellen kaum Zellzahlveränderungen gegenüber den B6-Mäusen zu erkennen. Lediglich die Aorta der IgMi-Mäuse wies weniger T-Zellen auf, während sich die übrigen T-Zellzahlen auf einem Niveau mit denen der B6-Mäuse bewegten. In Bezug auf B-Zellen konnten nur in der Milz ein signifikanter Anstieg in IgMi-Mäusen gegenüber B6-Mäusen beobachtet werden. Dieses Ergebnis geht mit der Tatsache einher, dass IgMi-Mäuse eine stark vergrößerte Leber zeigen. Insgesamt gesehen passen diese Ergebnisse zu den Daten der vaskulären Relaxation (Abbildung 27).

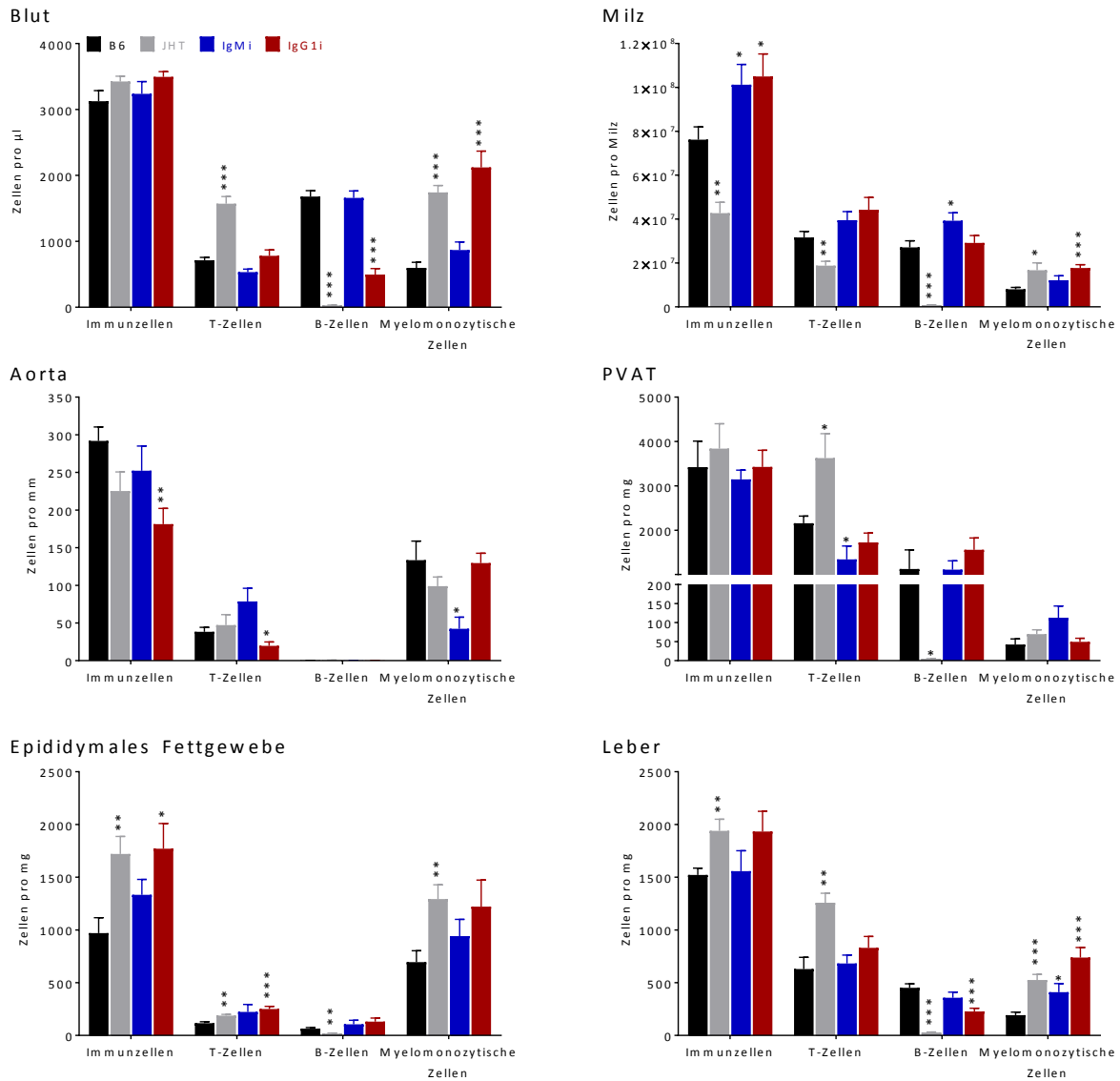


Abbildung 28: Immunzellvorkommen in 7 Wochen alten Mäusen.

Aus 7 Wochen alten B6-, JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäusen wurden Blut, Milz, Aorta mit PVAT, EF und Leber entnommen. Aorta und PVAT wurden unter dem Mikroskop von einander getrennt. Die Gewebe wurden wie in „3.2.3.1 Organaufarbeitung“ beschrieben zur durchflusszytometrischen Bestimmung aufgearbeitet. Zur Unterscheidung von T-Zellen, B-Zellen und myelomonozytischen Zellen wurden die Antikörper APC CD45, BV421 CD3e, BV605 B220, FITC CD11b und VS (Aorta, PVAT, EF) verwendet. Das *Gating*-Schema ist unter „3.2.3.3 *Gating*-Strategie“ dargestellt. Die Säulen stellen den Mittelwert \pm SEM dar, $n = 6$, Signifikanzen wurden im Vergleich zu B6-Mäusen ermittelt, nicht signifikante Ergebnisse wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

Innerhalb der T-Zellsubpopulationen (Abbildung 29) konnte im Alter von 7 Wochen für keine der drei Mausstämmen verglichen mit B6-Mäusen bezüglich aller Organe eine ausschlagende Veränderung einer Subpopulation beobachtet werden. Hier kam es sowohl zu Anstiegen von inflammatorischen als auch regulierenden T-Zellpopulationen. So waren in JHT-Mäusen gegenüber B6-Mäusen sowohl CTL (Blut, EF, Leber) und T_{H1} -Zellen (EF) als auch T_{H2} (Blut, Aorta, PVAT, EF, Leber) und T_{reg} (Blut, PVAT, EF) vermehrt vertreten.

In IgG1i-Mäusen zeigte sich ein vergleichbares Bild. Auch hier waren T-Zellsubpopulationen, welche eine Entzündungsreaktion unterstützen und solche, welche diese hemmen, hochreguliert. In Blut, Aorta und EF konnten verglichen mit B6-Mäusen mehr CTL und in Blut und EF auch mehr T_{H1} -Zellen detektiert werden. Gleichzeitig zeigten Blut, Aorta und EF aber auch mehr T_{H2} - und Blut, Milz, PVAT und Leber vermehrt T_{reg} -Zellen. Demzufolge ist, wie bereits nach der Betrachtung aller T-Zellen in Abbildung 28 zu erwartet wurde, die vaskuläre Dysfunktion von JHT- und IgG1i-Mäusen nicht auf ein vermehrtes Auftreten von inflammatorischen T-Zellen (CTL, T_{H1}) zurückzuführen.

In IgMi-Mäusen hingegen waren verglichen mit B6-Mäusen vor allem protektive T-Zellsubpopulationen hoch-, Entzündungen auslösende hingegen herab reguliert. In Aorta und EF waren vermehrt T_{H2} - und in Aorta, PVAT und EF mehr T_{reg} -Zellen zu finden. Gleichzeitig traten in Blut und PVAT weniger CTL und im PVAT weniger T_{H17} -Zellen auf. Allerdings ist auch hier der Trend nicht durchgängig. So waren in EF und Leber weiterhin vermehrt T_{H1} -Zellen und im EF auch mehr CTL zu beobachten.

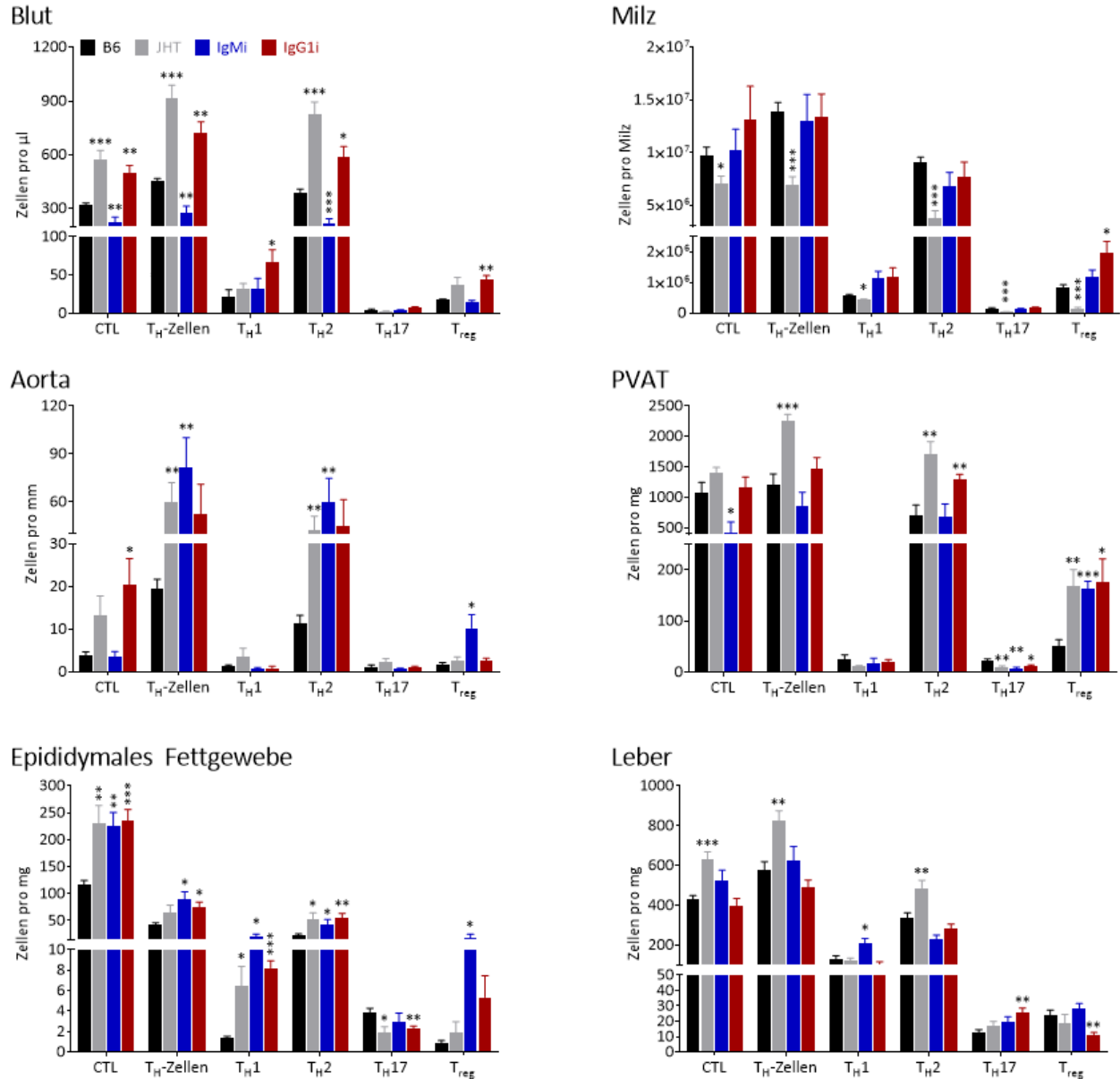


Abbildung 29: T-Zellvorkommen in 7 Wochen alten Mäusen. Aus 7 Wochen alten B6-, JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäusen wurden Blut, Milz, Aorta mit PVAT, EF und Leber entnommen.

Aorta und PVAT wurden unter dem Mikroskop von einander getrennt. Die Gewebe wurden wie in „3.2.3.1 Organaufarbeitung“ beschrieben zur durchflusszytometrischen Bestimmung aufgearbeitet. Zur Unterscheidung der T-Subpopulationen wurden die Antikörper PerCP CD45, BV605 CD90.2, APC-Cy7 CD4 (Blut, Milz, Leber), PE CD4 (PVAT, EF), PE CD8 (Aorta), BV421 CCR6, APC CXCR3, FITC CD25, PE-Cy7 CD127 und APC-Cy7 VS (Aorta, PVAT, EF) verwendet. Das *Gating*-Schema ist unter „3.2.3.3 *Gating*-Strategie“ dargestellt. Die Säulen stellen den Mittelwert \pm SEM dar, $n = 6$, Signifikanzen wurden im Vergleich zu B6-Mäusen ermittelt, nicht signifikante Ergebnisse wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

Wie erwartet waren die Messungen der T-Zellsubpopulationen nicht aussagekräftig genug, um Rückschlüsse auf eine der vaskulären Dysfunktion zugrundeliegenden Immunzellinfiltration zuzulassen. Daher wurde wie bei 17 Wochen alten Mäusen auch in 7 Wochen alten Mäusen die Verteilung der myelomonozytischen Zellen auf NK-Zellen, Makrophagen, Monozyten und Neutrophile untersucht (Abbildung 30). Hier konnte ein klarer Trend beobachtet werden.

So zeigten JHT- und IgG1i-Mäuse verglichen mit B6-Mäusen in Blut, Milz, Aorta, EF und Leber eine stark signifikante Erhöhung der Neutrophilenzahlen. In IgMi-Mäusen hingegen war die Zahl der Neutrophilen in allen Organen auf demselben Niveau wie die der B6-Mäuse. Dieses Ergebnis spiegelt zum einen die beobachtete vaskuläre Dysfunktion von JHT- und IgG1i-Mäusen (Abbildung 27) wider. Zum anderen stärkt diese Beobachtung außerdem die zuvor erhaltenen Ergebnisse, dass in JHT-Mäusen Neutrophile ausschlaggebend für die vaskuläre Dysfunktion sind.

Die erhöhten Zahlen in IgG1i-Mäusen sprechen dafür, dass auch in diesem Phänotyp Neutrophile einflussreich sind. Neben Neutrophilen wiesen JHT-Mäuse zudem vermehrte Zahlen an Monozyten in Blut, Milz und Aorta auf. In der Leber waren weniger Makrophagen zu detektieren. IgG1i-Mäuse zeigten ein erhöhtes Aufkommen an NK-Zellen in Blut, Milz, Aorta, EF sowie Makrophagen in Blut, Milz und EF. In der Leber hingegen waren verglichen mit B6-Mäusen weniger Makrophagen zu finden. Die Monozytenzahlen waren im Blut und in der Milz erhöht, im EF allerdings verringert.

Die Werte der IgMi-Mäuse zeigten keine konsequenten Trends. So traten in Blut und Milz verstärkt Makrophagen auf, in der Aorta allerdings vermindert. Außerdem war im EF die Zahl der Monozyten reduziert. All diese Ergebnisse sprechen für eine veränderte Regulation der Neutrophilen durch fehlende (JHT) oder veränderte (IgG1i) B-Zellen und einen besonderen Einfluss dieser auf das vaskuläre System.

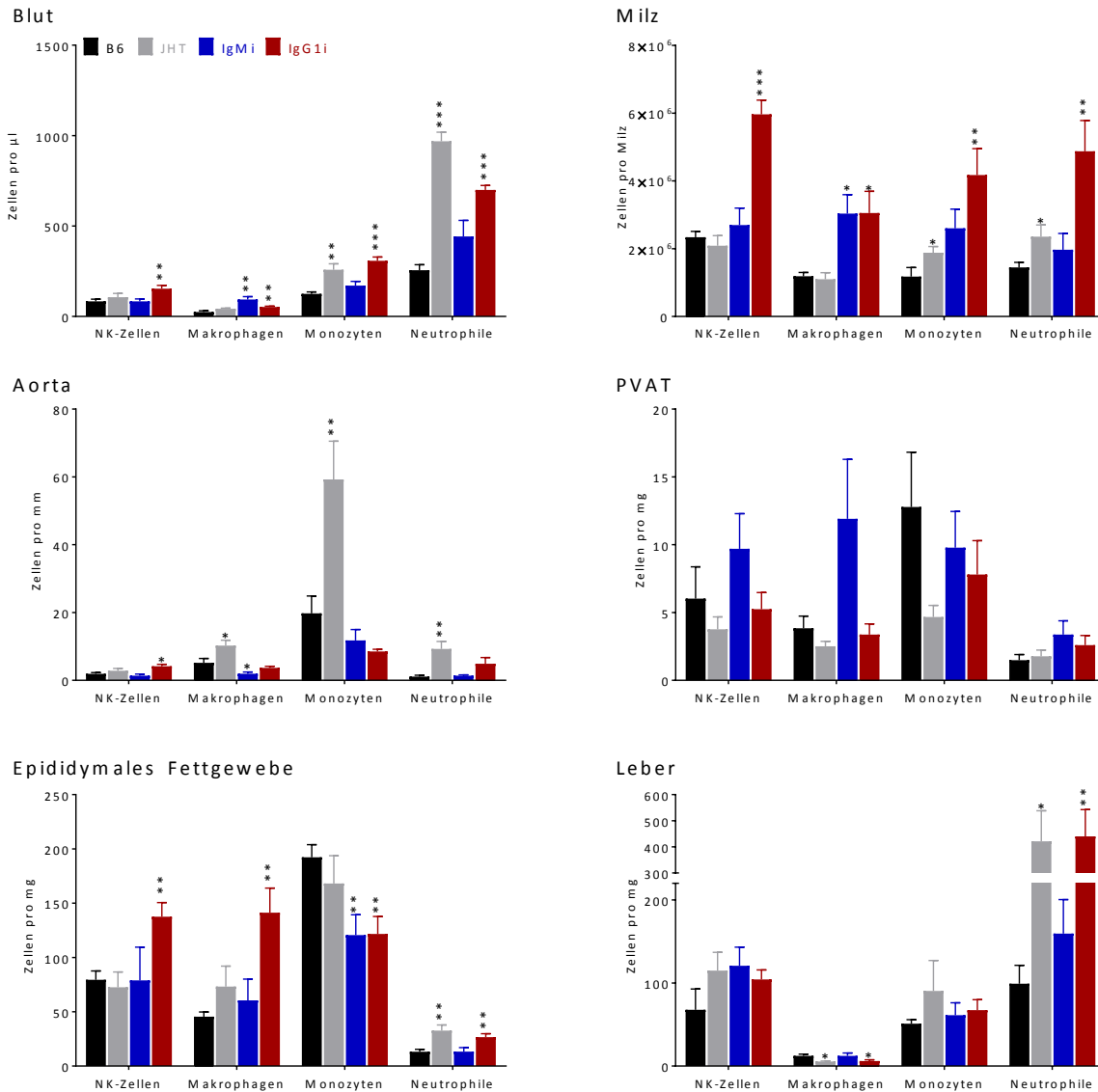


Abbildung 30: Vorkommen von myelomonozytischen Zellen in 7 Wochen alten Mäusen.

Aus 7 Wochen alten B6-, JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäusen wurden Blut, Milz, Aorta mit PVAT, EF und Leber entnommen. Aorta und PVAT wurden unter dem Mikroskop von einander getrennt. Die Gewebe wurden wie in „3.2.3.1 Organaufarbeitung“ beschrieben zur durchflusszytometrischen Bestimmung aufgearbeitet. Zur Unterscheidung von NK-Zellen, Makrophagen, Monozyten und Neutrophilen wurden die Antikörper APC CD45, PE-Cy7 CD3e, BV421 CD11b, APC-Cy7 NK1.1 (Blut, Milz, Leber), BV605 NK1.1 (PVAT, EF), PE F4/80, FITC Ly6G, PerCP-Cy5.5 Ly6C und APC-Cy7 VS (Aorta, PVAT, EF) verwendet. Das *Gating*-Schema ist unter „3.2.3.3 *Gating*-Strategie“ dargestellt. Die Säulen stellen den Mittelwert \pm SEM dar, $n = 6$, Signifikanzen wurden im Vergleich zu B6-Mäusen ermittelt, nicht signifikante Ergebnisse wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Transfer von B1-Zellen aus B6-Mäusen in JHT-Mäusen zu einer Verbesserung des vaskulären Relaxationsvermögens (Abbildung 25) und einer Minderung der Neutrophilenanzahl im Blut (Abbildung 26) führt. Nach dem Transfer von B2-Zellen konnten diese Effekte nicht beobachtet werden. Da sich IgMi- und IgG1i-Mäuse in ihrem vaskulären Relaxationsvermögen unterscheiden, obwohl in beiden Stämmen, wenn auch mit unterschiedlichem Fähigkeitenpotenzial, reife B-Zellen gebildet werden können, wurden hier auch die B-Zellsubpopulationen analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 31 dargestellt.

IgMi-Mäuse hatten im Vergleich zu B6-Mäusen mit Ausnahme der Milz in allen untersuchten Organen eine unveränderte Anzahl an B-Zellen (Abbildung 28) gezeigt. Hier konnte nur eine Verschiebung der B-Zellsubpopulationen beobachtet werden. So konnten in Blut, PVAT und Leber weniger B2-Zellen, welche Entzündungsreaktionen unterstützen, detektiert werden. Dafür wurden in Blut, Milz und Leber mehr B1-Zellen identifiziert. Außerdem waren in Blut und Milz die B_{reg} -Zellen erhöht. Das vermehrte Auftreten von B1-Zellen passt zu den Ergebnissen, dass IgMi-Mäuse weniger Neutrophile und eine normale vaskuläre Relaxation besitzen.

In IgG1i-Mäusen war keine klare Verschiebung von B2- zu B1- oder B1- zu B2-Zellen zu beobachten. Im Blut waren insgesamt, weniger B-Zellen zu beobachten. Dies wirkte sich auf alle B-Subpopulationen aus. In der Milz waren B1- und B_{reg} -Zellen erhöht. Zusätzlich kam es zu einer vermehrten Expression von B2-Zellen der Randzone der Milz (engl.: *marginal zone B2 cells*, B2-MZ) und einer Absenkung der folliculären B2-Zellen (B2-FO) gegenüber B6-Mäusen. Im PVAT waren vermindert B2-Zellen vorzufinden, im EF jedoch weniger B1-Zellen. In der Leber konnten wieder weniger B2-Zellen und vermehrt B1-Zellen nachgewiesen werden. Demensprechend ist es schwierig einen klaren B-Zelltrend in IgG1i-Mäusen zu definieren und Rückschlüsse auf das vaskuläre System zu ziehen. Insgesamt jedoch ist in IgG1i-Mäusen die absolute B-Zellzahl gesenkt (Abbildung 28), was eine Ähnlichkeit zum JHT-Typ aufweist.

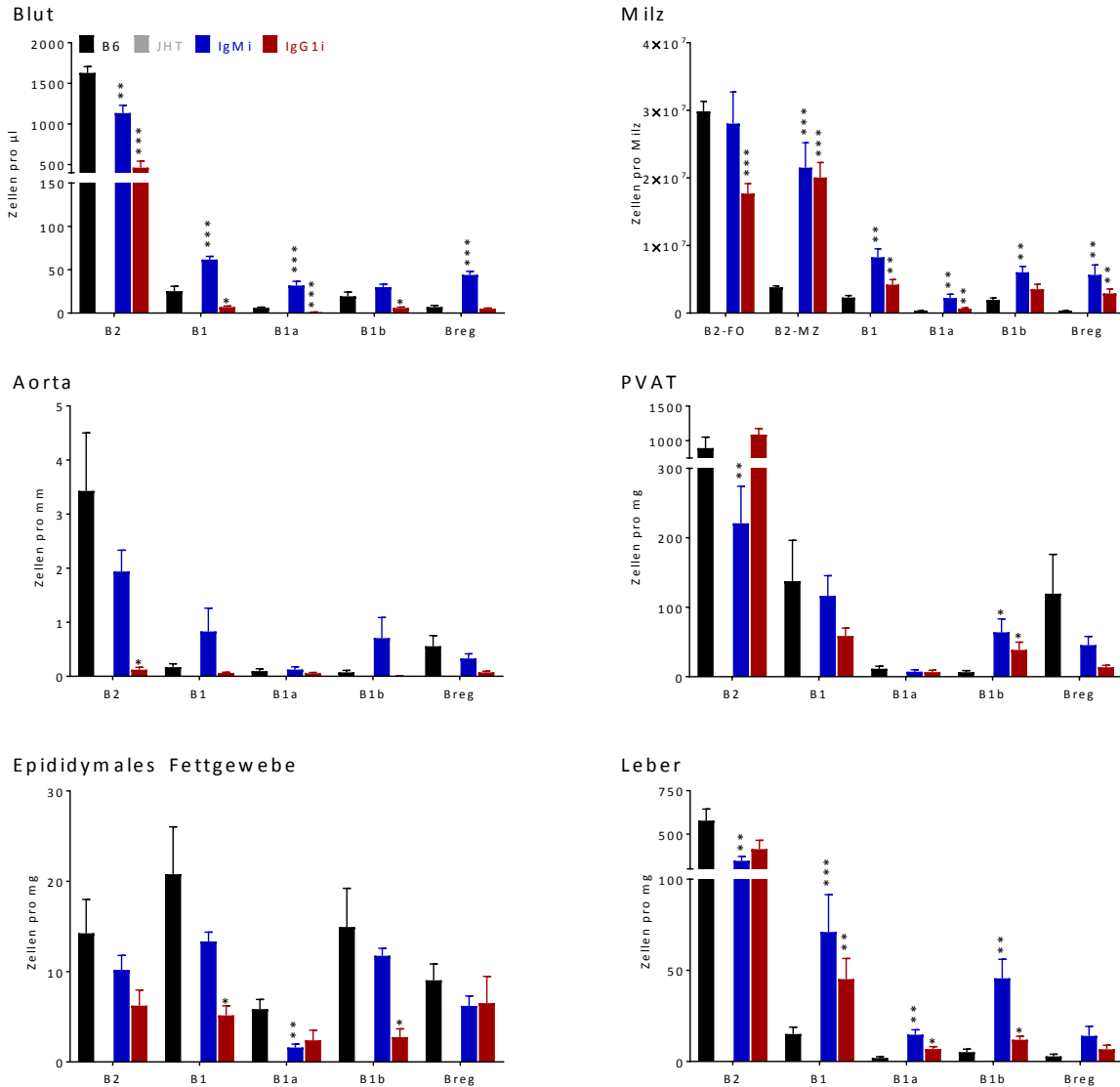


Abbildung 31: B-Zellvorkommen in 7 Wochen alten Mäusen.

Aus 7 Wochen alten B6-, JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäusen wurden Blut, Milz, Aorta mit PVAT, EF und Leber entnommen. Aorta und PVAT wurden unter dem Mikroskop von einander getrennt. Die Gewebe wurden wie in „3.2.3.1 Organaufarbeitung“ beschrieben zur durchflusszytometrischen Bestimmung aufgearbeitet. Zur Unterscheidung der B-Zellsubpopulationen wurden die Antikörper PE-Cy7 CD45, APC BV421, BV605 B220, PE CD23, APC CD5, PerCP-Cy5.5 CD1d und APC-Cy7 VS (Aorta, PVAT, EF) verwendet. Das *Gating*-Schema ist unter „3.2.3.3 *Gating*-Strategie“ dargestellt. Die Säulen stellen den Mittelwert \pm SEM dar, $n = 6$, Signifikanzen wurden im Vergleich zu B6-Mäusen ermittelt, nicht signifikante Ergebnisse wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

4.2 B-Zellen, Insulinresistenz und das vaskuläre System

Um den Zusammenhang zwischen B-Zellen, Insulinresistenz und dem vaskulären System untersuchen zu können, wurden B6-, JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäuse ab einem Alter von 6 Wochen einer hochkalorischen Diät (HFD) unterzogen. Zur Kontrolle dienten Mäuse der gleichen Stämme, die eine normale Diät (NCD) erhielten. Experimente, bei denen Blut aus der Schwanzvene abgenommen werden musste (ITT, GTT, Nüchtern Glukose- und Insulinbestimmung), wurden im Abstand von zwei Wochen durchgeführt. Die erste Messung wurde 15 Wochen nach Beginn der experimentellen Fütterung durchgeführt. Nach 21 Wochen Diät wurde den Mäusen die Leber, das EF, die Oberschenkelmuskulatur und Serum entnommen. Im Serum wurden Cholesterin- und Glukosewerte sowie leberspezifische Enzyme bestimmt. Leber und EF wurden durchflusszytometrisch auf ihr Immunzellprofil untersucht.

4.2.1 Der Einfluss von HFD auf Körper- und Organgewicht

In Abbildung 32 ist die prozentuale Gewichtszunahme von B6-, JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäusen über 21 Wochen dargestellt. Die Mäuse wurden entweder mit NCD oder HFD gefüttert. Die HFD enthielten ihre Energie zu 45 % aus Fett. Wie zu sehen ist, führte in allen Mausarten die Kontrolldiät zu einer Gewichtszunahme von 45 - 55 % über 21 Wochen. Unter HFD kam es in allen Mäusen mit Ausnahme der IgG1i zu einer signifikant schnelleren Gewichtszunahme. Allerdings kam es in die B-Zellveränderten Mausstämmen zu einer Abschwächung dieser Gewichtszunahme. HFD-B6-Mäuse wogen nach 21 Wochen mehr als doppelt so viel wie die Mäuse ihrer Kontrollgruppe. JHT-Mäuse zeigten nur noch eine 80 %ige und IgMi-Mäuse eine 60 %ige Gewichtszunahme über 21 Wochen HFD. In IgG1i-Mäusen führte die hochkalorische Diät verglichen mit IgG1i-Mäusen, die eine Kontrolldiät bekamen, zu keinem relevanten veränderten Gewichtsunterschied.

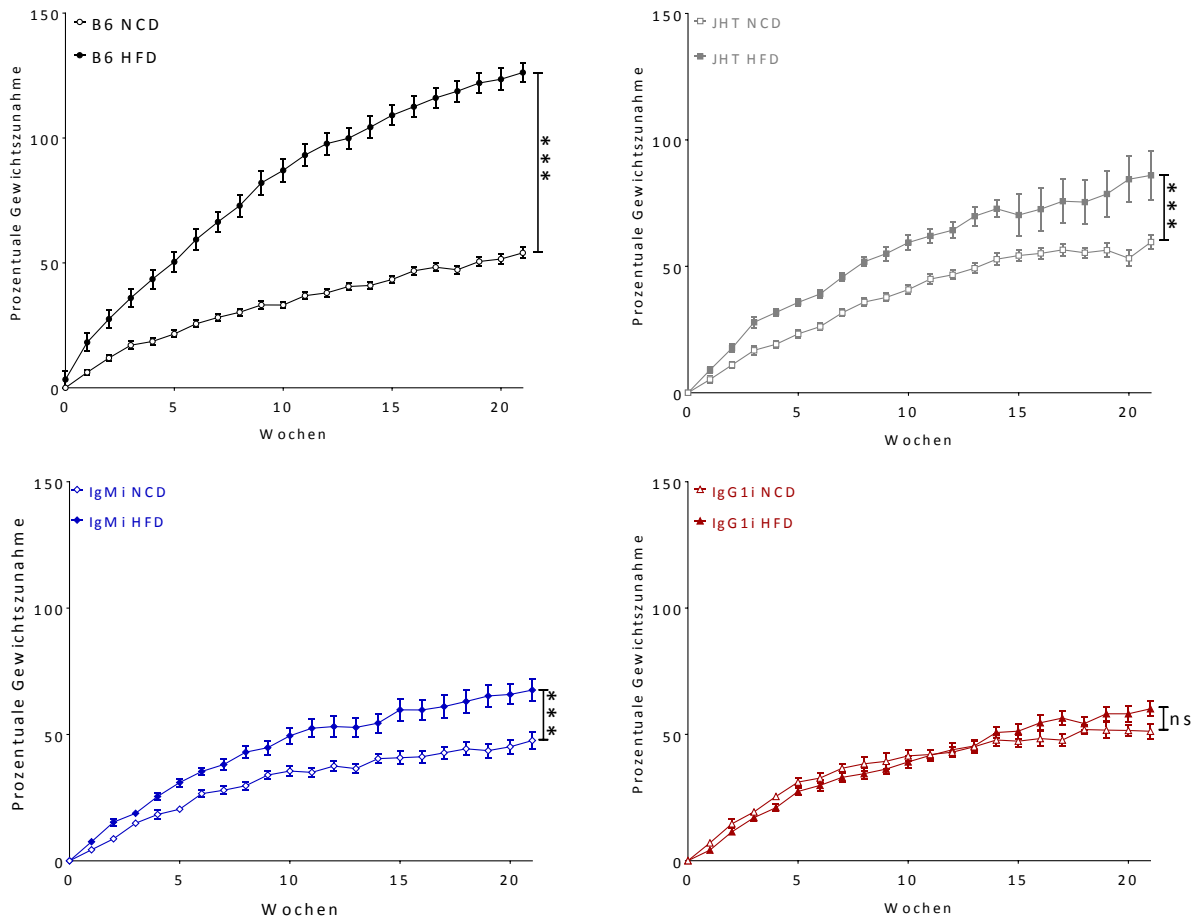


Abbildung 32: Prozentuale Gewichtszunahme von B6-, JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäusen über 21-wöchige NCD- und HFD-Fütterung.

Die Mäuse wurden einmal wöchentlich gewogen. Käfige, Futter und Wasser wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Signifikanzen wurden mittels Two-way Anova mit anschließender Bonferroni-Korrektur über GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla) ermittelt. Die Punkte stellen den Mittelwert \pm SEM dar, $n = 30$ (B6 NCD + HFD), 21 (JHT NCD), 23 (JHT HFD), 15 (IgMi NCD), 14 (IgMi HFD), 13 (IgG1i NCD + HFD) (ns = nicht signifikant, *** $P < 0,001$).

Um zu untersuchen, ob die geringere Gewichtszunahme auf eine verminderte Energiezufuhr zurückzuführen ist, wurde zweimal pro Woche die verbrauchte Futtermenge ermittelt. In Abbildung 33A ist der Futterverzehr pro Woche pro Maus dargestellt. Deutlich erkennbar ist, dass die B6-, IgMi- und IgG1i-Mäuse der HFD-Gruppe nach absoluter Futtergewichtsbeurteilung weniger zu

sich nahmen als die der NCD-Gruppe. Zwischen den JHT-Mäusen beider Gruppen gab es keine Unterschiede in der Futteraufnahme.

Da NCD- und HFD-Futter unterschiedlich viel Energie pro Gramm Futter zur Verfügung stellen, wurden die verzehrten Kilokalorien pro Woche pro Tier berechnet (Abbildung 33 B). Wie zu sehen ist, kam es in B6- und IgMi-Mäusen, trotz verminderter Futterzufuhr, zu einer signifikant höheren Kalorienaufnahme. Auch HFD-JHT-Mäuse verzehrten mehr Kalorien als ihre NCD-Kontrollgruppe. Zwischen NCD- und HFD-IgG1i-Mäuse konnte jedoch kein Unterschied in der Energieaufnahme detektiert werden, was erklärt, warum kein signifikanter Unterschied in den Endgewichten beider Gruppen zu messen war. Beim Vergleich der Energiezufuhren von HFD-JHT-, -IgMi- und -IgG1i-Mäusen mit den HFD-B6-Mäusen fällt jedoch auf, dass HFD-IgMi- und -IgG1i-Mäuse signifikant weniger Energie aufnahmen als HFD-B6-Mäuse. Dies ist eine mögliche Erklärung für die abgeschwächte Gewichtszunahme von HFD-IgMi- und -IgG1i-Mäuse. HFD-JHT- und -IgG1i-Mäuse unterscheiden sich in ihrem Kalorienhaushalt nicht von HFD-B6-Mäusen.

Zusammengefasst führte HFD in JHT-Mäusen trotz signifikant höherer Energiezufuhr als in NCD-JHT-Mäusen zu einer verlangsamten Gewichtszunahme, obwohl HFD-JHT-Mäuse gleich viele Kalorien fraßen wie mit HFD gefütterte B6-Mäuse. In IgMi- und IgG1i-Mäusen, welche mit HFD-gefüttert wurden, hingegen war eine Appetitzüglung mit einhergehender geringerer Energiezufuhr zu beobachten.

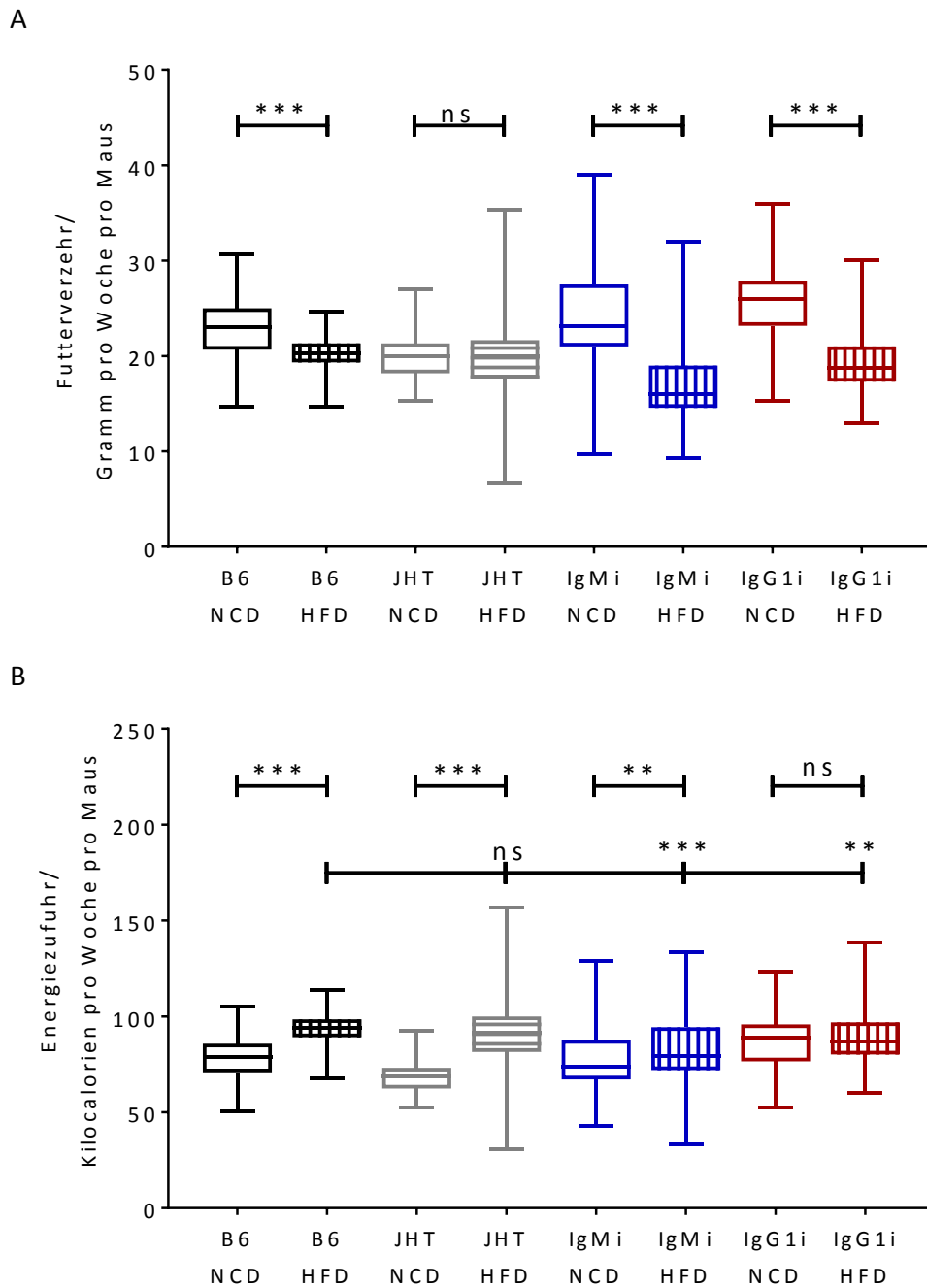


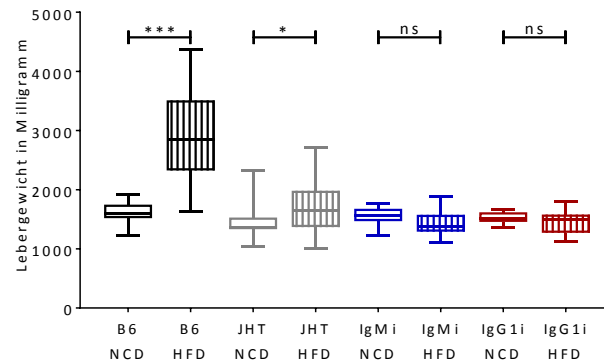
Abbildung 33: Futteraufnahme von B6-, JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäuse über 21 Wochen ad libitum Fütterung mit NCD oder HFD in Gramm (A) und Kilokalorien (B) pro Woche pro Tier.

Die Boxen der Box-Plots zeigen den Interquartilbereich, welcher Daten zwischen dem 25. und den 75. Perzentil abdeckt. Zusätzlich sind der Median als horizontale Linie und Antennen von Min. bis Max. dargestellt, $n = 30$ (B6 NCD + HFD), 21 (JHT NCD), 23 (JHT HFD), 15 (IgMi NCD), 14 (IgMi HFD), 13 (IgG1i NCD + HFD) (ns = nicht signifikant, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$).

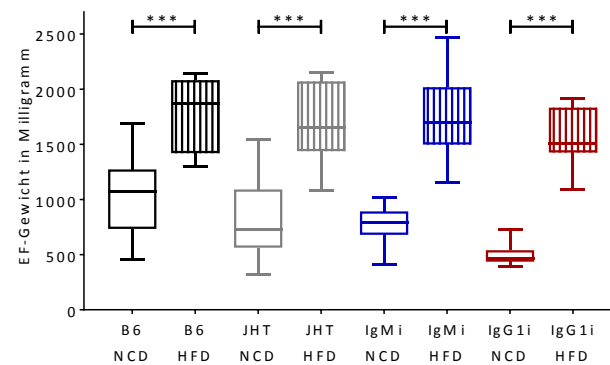
Nach 21 Wochen experimenteller Fütterung wurden Leber, EF und der *M. quadriceps femoris* beider Oberschenkel entnommen und das jeweilige Gewicht bestimmt. Die Organgewichte sind in Abbildung 34 dargestellt. Wie erwartet führte die fettreiche Nahrung in B6-Mäusen zu einer Vergrößerung der Leber und einer Erhöhung des EF-Gewichts. Auch in den drei anderen Mausstämmen kam es unter HFD zu einer Vermehrung der Fettpolster.

Das Muskelgewicht wurde prozentual auf das Gesamtkörpergewicht bezogen, um Aufschluss über eine Diät-induzierte Gesamtmuskelmassenveränderung zu erhalten. Auch hier verhielten sich die B6-Mäuse der Erwartung entsprechend. Die HFD führte zu einer Reduktion der Muskelmasse. Dieser Effekt ist ebenfalls in JHT- und IgG1i-Mäusen zu beobachten. In IgMi-Mäusen hatte die hochkalorische Diät keinen Einfluss auf die Muskelmasse. Interessanterweise kam es in JHT-Mäusen jedoch zu einer wesentlich schwächeren, allerdings noch signifikanten Vergrößerung der Leber unter HFD. In IgMi-Mäusen war in NCD- und HFD-Mäusen die Leber gleich groß. IgG1i-Mäuse zeigten unter HFD sogar verkleinerte Lebern. Diese Ergebnisse stimmen mit der jeweiligen prozentualen Gesamtgewichtszunahme der Mäuse überein, was darauf hindeutet, dass unter HFD die Veränderung der B-Zellmuster Einfluss auf die Lebergröße und konsekutiv auf die Leberfunktion hat.

Leber



Epididymale Fettgewebe



Muskeln

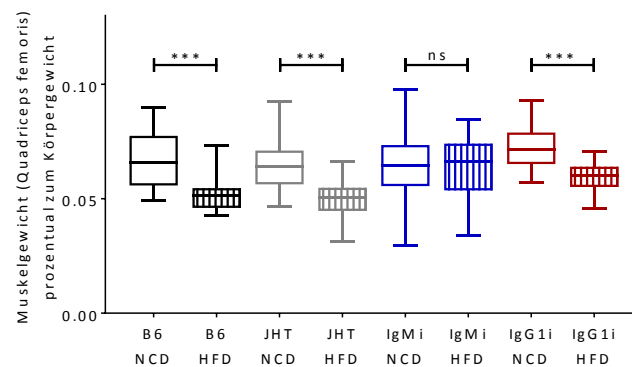


Abbildung 34: Leber, EF und Muskelgewicht von B6-, JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäuse nach 21-wöchiger *ad libitum*-Fütterung mit NCD oder HFD.

Gesamtleber und -EF-gewicht sind in Milligramm dargestellt. Als Muskelreferenz wurden beide Mm. quadriceps femoris entnommen. Ihr Gewicht ist prozentual zum Körpergewicht dargestellt. Die Boxen der Box-Plots zeigen den Interquartilbereich, welcher Daten zwischen dem 25. und den 75. Perzentil abdeckt. Zusätzlich sind der Median als horizontale Linie und Antennen von Min. bis Max. dargestellt, n = 21 (B6 NCD + HFD, JHT NCD), 22 (JHT HFD), 13 (IgMi NCD, IgG1i NCD), 14 (IgMi HFD, IgG1i HFD) (ns = nicht signifikant, **P < 0,01, ***P < 0,001).

4.2.2 Der Einfluss von HFD auf die vaskuläre Relaxation

In B6- und JHT-Mäusen, die 21 Wochen lang mit HFD oder NCD gefüttert wurden, wurde die ACh-induzierte Relaxationsfähigkeit analysiert. Die Ergebnisse sind Abbildung 35 dargestellt.

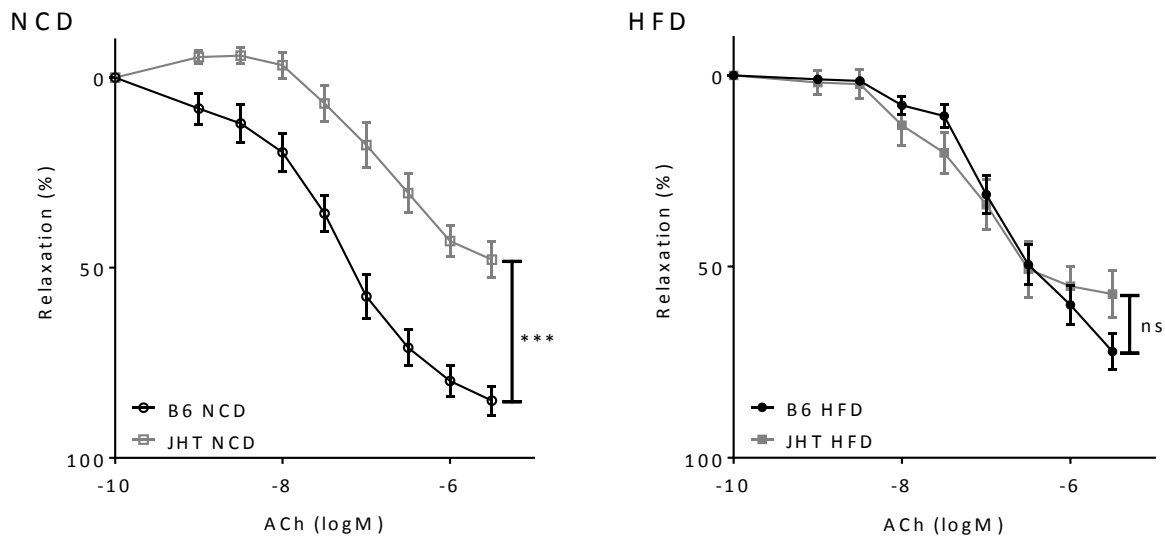


Abbildung 35: Der Einfluss von Adipositas auf die vaskuläre Funktion.

B6- und JHT-Mäuse wurden entweder für 21 Wochen mit NCD- (links) oder HFD-Futter (rechts) gefüttert. Die Aorten wurden isoliert und das PVAT wurde unter dem Mikroskop entfernt. Die ACh-induzierte vaskuläre Relaxation wurde mittels Myograph ermittelt. Signifikanzen wurden mittels Two-way Anova mit anschließender Bonferroni-Korrektur über GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla) ermittelt. Die Punkte stellen den Mittelwert \pm SEM dar, $n = 19$ (B6 NCD, JHT HFD), 23 (B6 HFD, JHT NCD) (ns = nicht signifikant, $***P < 0,001$). Die Myographmessungen wurden von Frau Dr. Ning Xia durchgeführt.

Wie erwartet führt die hochkalorische Diät in B6-Mäusen zu einer Verschlechterung der vaskulären Funktion. JHT-Mäuse zeigten bereits mit Kontrolldiät eine vaskuläre Dysfunktion. Daher war erwartet worden, dass die fettreiche Ernährung die Schädigung verstärken würden. Faszinieren-

derweise zeigten die Relaxationskurven für B6- und JHT-Mäuse unter HFD denselben Kurvenverlauf. Die HFD führte also in JHT-Mäusen verglichen mit NCD-Mäusen zu keiner Verschlechterung der ACh-induzierten vaskulären Relaxation. Demzufolge schützt der Knockout von B-Zellen vor einer HFD-induzierten Verschlechterung der vaskulären Systems. Zusätzlich zeigen diese Ergebnisse erneut, dass B-Zellen direkten Einfluss auf das vaskuläre System haben.

4.2.3 Die Rolle von B-Zellen auf Insulinsensitivität und -resistenz

Um zu analysieren, ob B-Zellen einen Einfluss auf den Insulin- und Glukosehaushalt haben, wurden in B6-, JHT-, IgMi und IgG1i-Mäusen nach HFD- oder NCD-Fütterung die Insulintoleranz (15 Wochen), die Glukosetoleranz (17 Wochen) und die Nüchtern Blutglukose- und Insulinwerte (19 Wochen) bestimmt.

Die Ergebnisse des Insulintoleranztests sind in Abbildung 36 dargestellt. Wie erwartet wiesen HFD-B6-Mäuse eine verschlechterte Insulinsensitivität nach *i. p.* Gabe von Humaninsulin auf als NCD-B6-Mäuse. In HFD-B6-Mäusen kam es zu einer signifikant schwächeren Absenkung des Blutzuckerspiegels. Außerdem stieg der Blutzuckergehalt hier bereits 30 Minuten nach Insulingabe wieder an. In den NCD-B6-Mäusen sank der Blutzucker schneller und fing erst nach 45 Minuten langsam wieder an zu steigen. Dies ist ein Indiz für eine Insulinresistenz in HFD-B6-Mäusen.

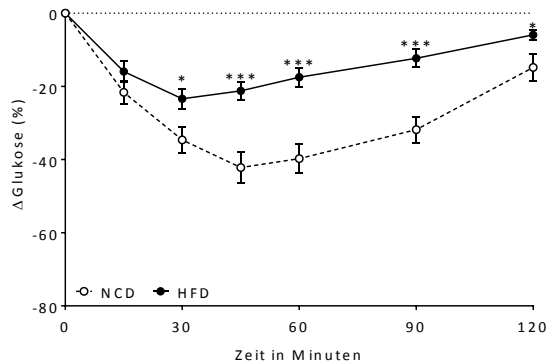
In JHT-Mäusen hingegen konnte kein solcher Unterschied gemessen werden. Zwar sank der Blutzuckerspiegel in HFD-JHT-Mäusen zunächst langsamer (15-Minuten-Wert) als in den zugehörigen Kontrollmäusen. Aber bei beiden Fütterungsmethoden war ein finaler Blutzuckeranstieg erst wieder nach 45 Minuten zu beobachten.

In IgMi-Mäusen fiel der Blutzuckerspiegelwert in NCD- und HFD-Mäusen zunächst gleich schnell bis zum Tiefpunkt nach 45 Minuten. Erstaunlicherweise stieg der Blutzuckerspiegel in den HFD-Mäusen danach jedoch signifikant schneller an als in den NCD-Mäusen. Dieses Ergebnis deutet

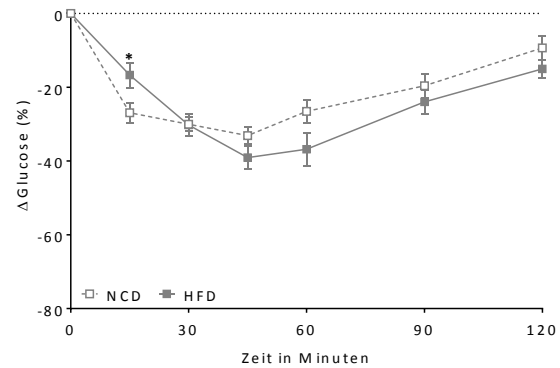
an, dass in IgMi-Mäusen unter HFD die Insulinsignaltransduktion zwar funktioniert, allerdings nicht so langlebig ist wie in NCD-Mäusen.

Ein unerwarteter Effekt war in IgG1i-Mäusen zu beobachten. Während HFD-IgG1i-Mäuse einen ITT-Kurvenverlauf wie B6-NCD-Mäuse zeigen und dementsprechend von keiner Insulinresistenz auszugehen ist, mussten die Experimente mit NCD-IgG1i-Mäusen spätestens 90 Minuten nach Insulingabe abgebrochen werden. Durch das extern zugeführte Insulin fiel der Blutzuckerspiegel so stark, dass die Mäuse lethargisch wurden und nahe am hypoglykämischen Koma waren. Da die Tiere durch das Experiment nicht leiden oder sterben sollten, wurde es zu diesem Zeitpunkt abgebrochen. NCD-IgG1i-Mäuse wiesen also eine unerwartet starke Insulinsensitivität auf.

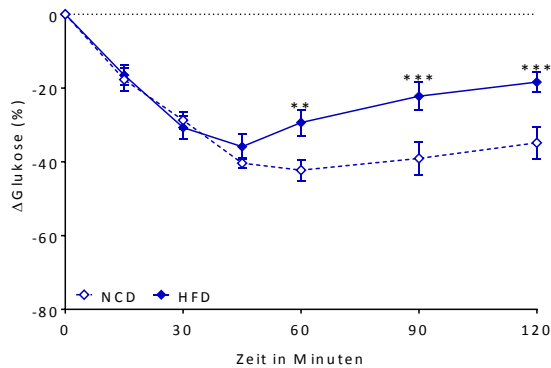
B6



JHT



IgM i



IgG 1 i

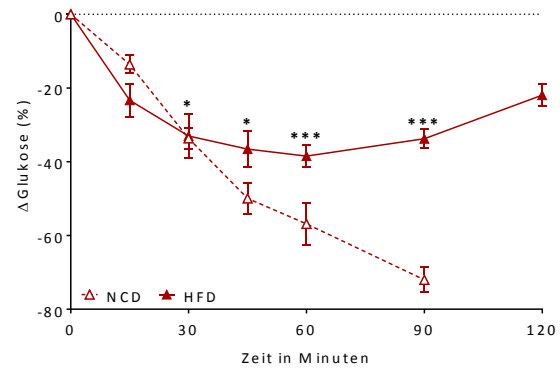


Abbildung 36: Insulintoleranztest.

B6-, JHT-, IgMi-, IgG1i-Mäuse wurden 15 Wochen lang mit NCD- oder HFD-Futter gefüttert. Sie wurden für sechs Stunden nüchtern gesetzt und bekamen dann i. p. 0,75 U Insulin (in 0,9%iger NaCl-Lösung) pro Kilogramm Körpergewicht gespritzt. Der jeweilige Blutglukosewert wurde nach 0, 15, 30, 45, 60, 90 und 120 Minuten bestimmt. Signifikanzen wurden mittels Two-way Anova mit anschließender Bonferroni-Korrektur über GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla) ermittelt. Die Punkte stellen den Mittelwert \pm SEM dar, $n = 11$ (B6 NCD + HFD), 12 (JHT NCD, IgG1i NCD), 13 (JHT HFD, IgG1i HFD), 14 (IgMi NCD), 15 (IgMi HFD), nicht signifikante Ergebnisse wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

Die Berechnung der Fläche zwischen den Kurven (Abbildung 37) untermauert die bereits beschriebenen Ergebnisse. Die Fläche zwischen den B6- und IgMi-Maus-Kurven sind verglichen mit denen der JHT- und IgG1i-Mäuse signifikant vergrößert. Dies zeigt eindeutig, die verbesserte Insulintoleranz von JHT- und IgG1i-Mäusen.

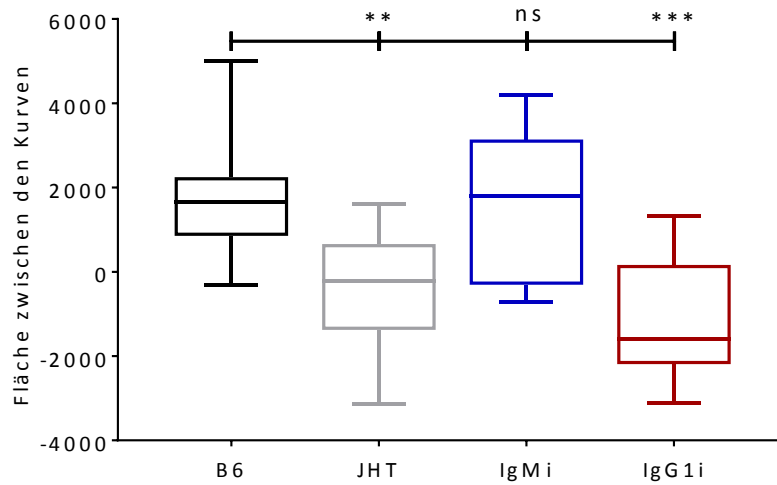


Abbildung 37: Fläche zwischen den zueinander gehörenden ITT-NCD- und -HFD-Kurven.

Die Fläche zwischen den Kurven der ITTs wurde mit Hilfe von GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla) ermittelt. Die Boxen der Box-Plots zeigen den Interquartilbereich, welcher Daten zwischen dem 25. und den 75. Perzentil abdeckt. Zusätzlich sind der Median als horizontale Linie und Antennen von Min. bis Max. dargestellt, ITT: n = 12 (B6, JHT, IgG1i), 14 (IgMi), GTT: n = 11 (B6, IgMi), 12 (JHT, IgG1i) (ns = nicht signifikant, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001).

In Abbildung 38 sind zum besseren Vergleich alle NCD- bzw. HFD-Kurven von B6, JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäusen in eigenen Graphen dargestellt. Wie zu sehen ist verlaufen die NCD-B6- und -IgMi-Kurven nahezu identisch. NCD-IgMi-Mäuse weisen sogar eine leicht verbesserte Insulinsensitivität auf, da hier der Blutzuckerspiegel für eine längere Zeit gesenkt gehalten werden konnte. Die Kurve der NCD-IgG1i-Mäuse verstärkt noch einmal das zuvor beobachtete Ergebnis, dass hier eine besondere Sensitivität vorliegt. NCD-JHT-Mäuse zeigen eine leicht verschlechterte Insulintoleranz gegenüber B6-Mäusen. Der Blutzucker konnte nicht so effektiv durch Insulin gesenkt werden und stieg auch schneller wieder an als in B6-Mäusen. Dieses Ergebnis ist insofern interessant, als JHT-Mäuse unter physiologischen Bedingungen auch eine verschlechterte vaskuläre Funktion zeigen. Allerdings kommt es in beiden Fällen durch HFD-Fütterung zu keiner weiteren Veränderung. So verlaufen die Blutzuckerkurven von HFD-JHT- und -IgMi-Mäusen nahezu identisch. HFD-B6-

Mäuse weisen eine verschlechterte Insulinsensitivität auf. HFD-IgG1i-Mäuse zeigten die beste Insulinsensitivität.

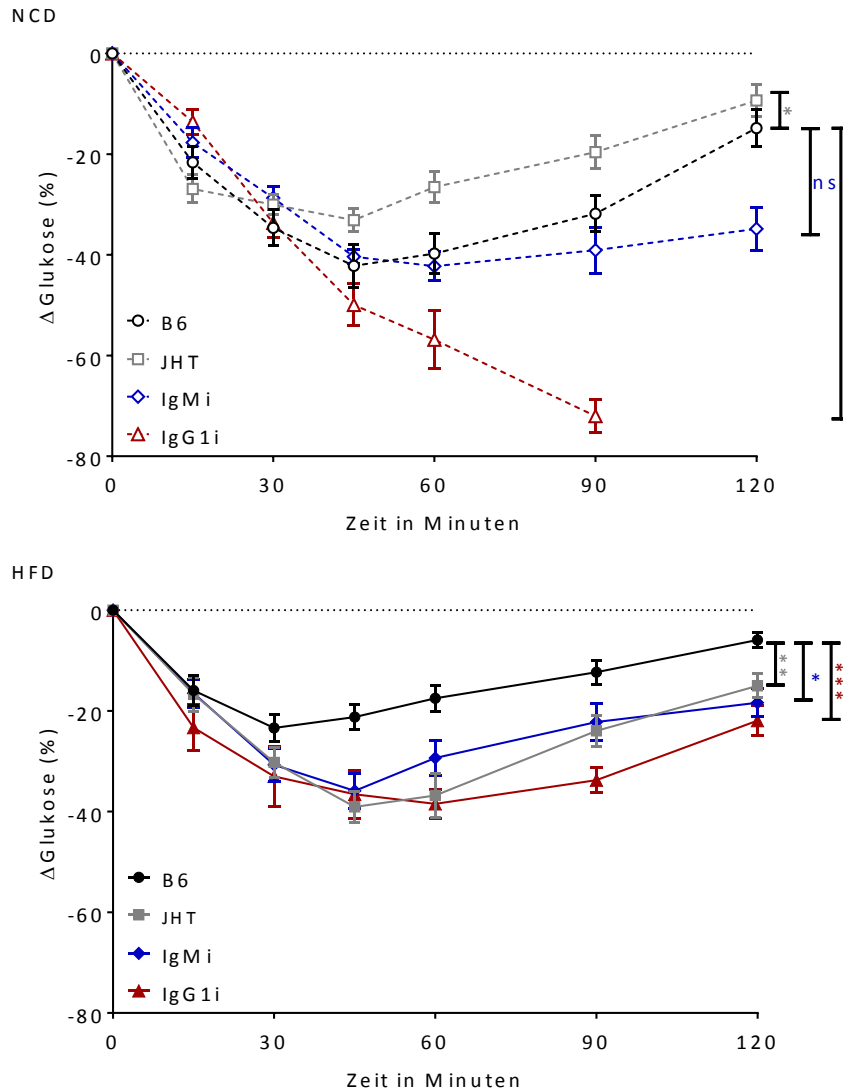


Abbildung 38: Insulintoleranztest, Darstellung nach experimenteller Diät. B6-, JHT-, IgMi-, IgG1i-Mäuse wurden 15 Wochen lang mit NCD- oder HFD-Futter gefüttert.

Sie wurden für sechs Stunden nüchtern gesetzt und bekamen dann i. p. 0,75 U Insulin (in 0,9%iger NaCl-Lösung) pro Kilogramm Körpergewicht gespritzt. Der jeweilige Blutglukosewert wurde nach 0, 15, 30, 45, 60, 90 und 120 Minuten bestimmt. Signifikanzen wurden mittels Two-way Anova mit anschließender Bonferroni-Korrektur über GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla) ermittelt. Die Punkte stellen den Mittelwert \pm SEM dar, $n = 11$ (B6 NCD + HFD), 12 (JHT NCD, IgG1i NCD), 13 (JHT HFD, IgG1i HFD), 14 (IgMi NCD), 15 (IgMi HFD), (ns = nicht signifikant, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

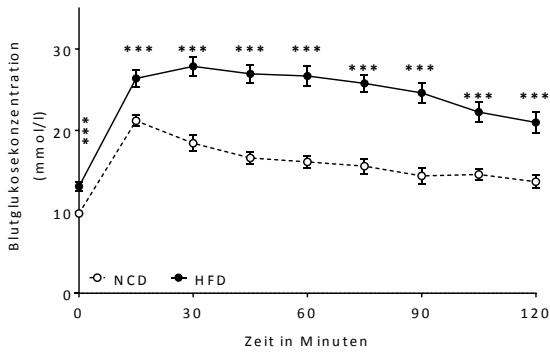
Im nächsten Schritt wurde B6-, JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäusen, welche über 17 Wochen hinweg mit HFD oder Kontrollfutter gefüttert wurden, *i. p.* Glukose injiziert und ein Glukosetoleranztest durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 39 dargestellt. Wie erwartet kam es in allen Messgruppen durch die Glukoseinjektion zu einer initialen Blutglukosekonzentrationsspitze nach 15 Minuten.

In NCD-B6-Mäusen fiel der Blutglukosespiegel danach gleichmäßig über die nächsten 105 Minuten wieder ab, was zeigt, dass hier die körpereigene Insulinproduktion und -signalgebung funktioniert. Dieses Bild war auch für die NCD-gefütterten JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäuse zu beobachten.

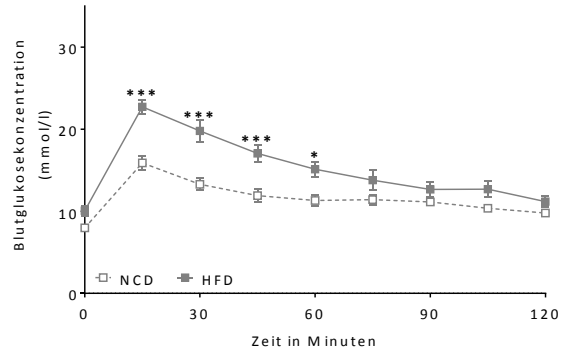
Unter HFD sank der Blutglukosespiegel der B6-Mäuse hingegen wesentlich langsamer ab und war auch nach 120 Minuten nicht zurück auf das Niveau des Ausgangswerts gefallen. In JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäusen war ein ähnliches Bild zu beobachten, verglichen mit B6-Mäusen allerdings in abgeschwächter Form. So stieg der Blutglukosespiegel in HFD-JHT-Mäusen nach 15 Minuten signifikant höher an als in den zugehörigen Kontrollmäusen, fiel dann jedoch schneller als in den HFD-B6-Mäusen und erreichte nach 75 Minuten das gleiche Niveau wie der von NCD-JHT-Mäusen.

In IgMi-Mäusen verliefen NCD- und HFD-Kurven nach 90 Minuten parallel. Unerwarteterweise, da der ITT-Test in IgG1i-Mäusen eine besondere Insulinsensitivität demonstriert hatte, zeigten IgG1i-Mäuse von allen genveränderten Mäusen die schlechteste Glukosetoleranz. Auch hier kam es nach Glukosegabe zu einem signifikant stärkeren Anstieg des Blutglukoselevels in HFD- als in NCD-Mäusen. In HFD-Mäusen fiel die Blutglukosekonzentration danach nur langsam und erreichte nach 120 Minuten nicht dasselbe Niveau wie in NCD-Mäusen.

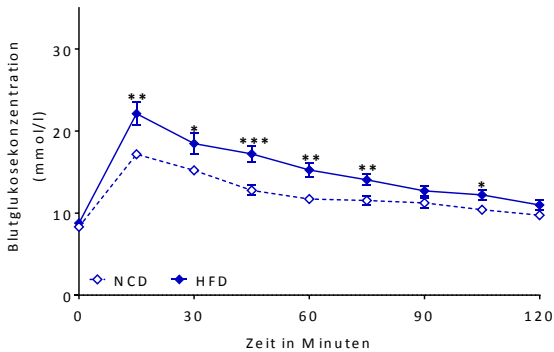
B6



JHT



IgM i



IgG 1 i

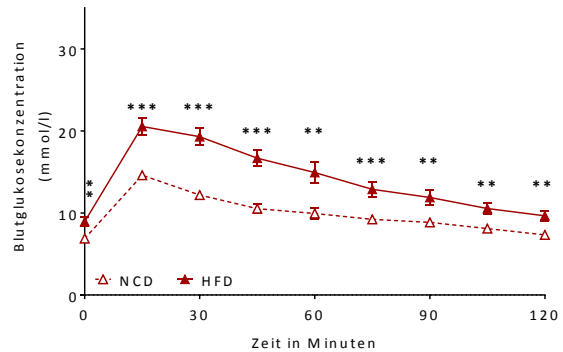


Abbildung 39: Glukosetoleranztest. B6-, JHT-, IgMi-, IgG1i-Mäuse wurden 17 Wochen lang mit NCD- oder HFD-Futter gefüttert.

Sie wurden für sechs Stunden nüchtern gesetzt und bekamen dann i. p. 1 g Glukose pro Kilogramm Körpergewicht gespritzt. Der jeweilige Blutglukosewert wurde nach 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 und 120 Minuten bestimmt. Signifikanzen wurden mittels Two-way Anova mit anschließender Bonferroni-Korrektur über GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla) ermittelt. Die Punkte stellen den Mittelwert \pm SEM dar, $n = 12$ (B6 NCD + HFD, JHT NCD, IgG1i HFD), 13 (JHT HFD, IgG1i NCD), 14 (IgMi NCD + HFD), nicht signifikante Ergebnisse wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

Diese Beobachtung wird auch durch die Berechnung der Fläche zwischen den Kurven bestätigt (Abbildung 40). Hier ist klar zu erkennen, dass diese für B6-Mäuse am größten ist. JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäuse zeigen signifikant kleinere Flächen zwischen den GTT-Kurven, was ihre verbesserte Glukosetoleranz unterstreicht.

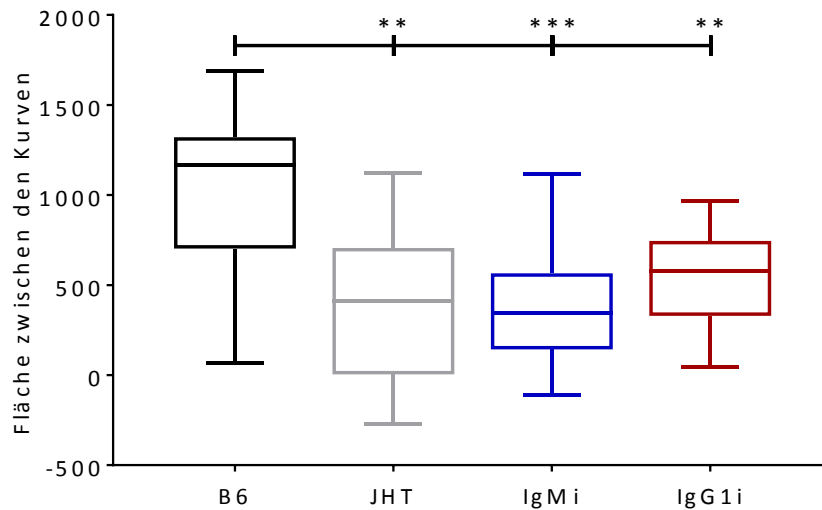


Abbildung 40: Fläche zwischen den zueinander gehörenden GTT-NCD- und -HFD-Kurven.

Die Fläche zwischen den Kurven der GTTs wurde mit Hilfe von GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla) ermittelt. Die Fläche zwischen den Kurven der GTTs wurde mit Hilfe von GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla) ermittelt. Die Boxen der Box-Plots zeigen den Interquartilbereich, welcher Daten zwischen dem 25. und den 75. Perzentil abdeckt. Zusätzlich sind der Median als horizontale Linie und Antennen von Min. bis Max. dargestellt, ITT: n = 12 (B6, JHT, IgG1i), 14 (IgMi), GTT: n = 11 (B6, IgMi), 12 (JHT, IgG1i)(ns = nicht signifikant, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001).

In Abbildung 41 sind jeweils alle NCD- beziehungsweise alle HFD-GTT-Kurven in einen Graphen aufgetragen. Hier ist zu erkennen, dass die B-Zellveränderten Mausstämmen verglichen mit B6-Mäusen bereits geringere Nüchtern-Glukosewerte hatten. Die Kurve für die NCD-IgG1i-Mäuse wies die niedrigsten Werte auf, was erklärt, wieso HFD-Fütterung hier einen so großen, unerwarteten Effekt hatte. Im Vergleich der HFD-Werte ist zu sehen, dass die Kurven für JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäuse sehr nah beieinander verliefen und sich signifikant von den stark erhöhten Werten der HFD-B6-Mäuse unterschieden. Demzufolge hatten JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäuse verglichen mit B6-Mäusen alle eine verbesserte Glukosetoleranz unter HFD und auch bereits unter NCD. Durch die fehlenden beziehungsweise funktionell veränderten B-Zellen waren Insulinsekretion und -signalgebung verbessert.

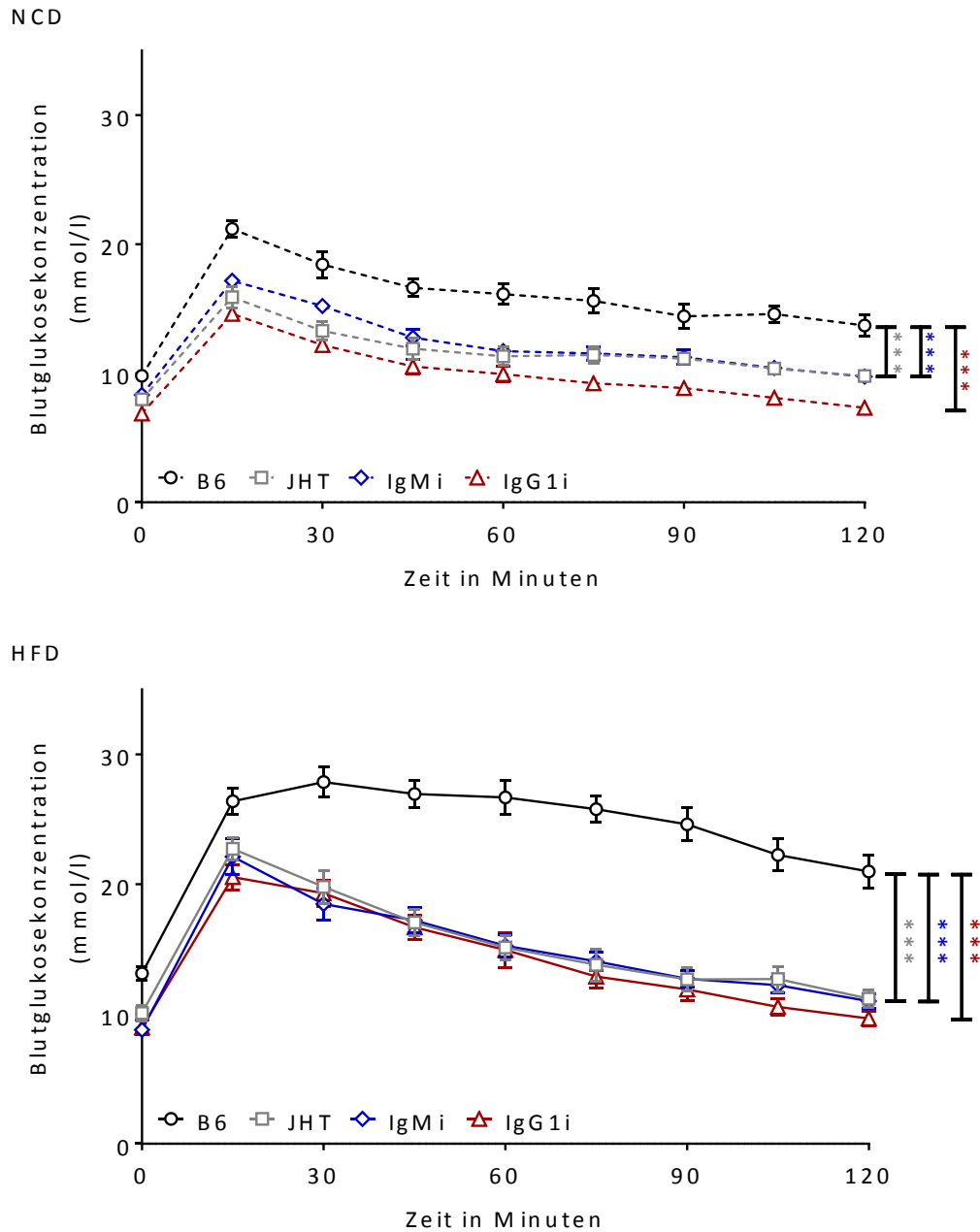


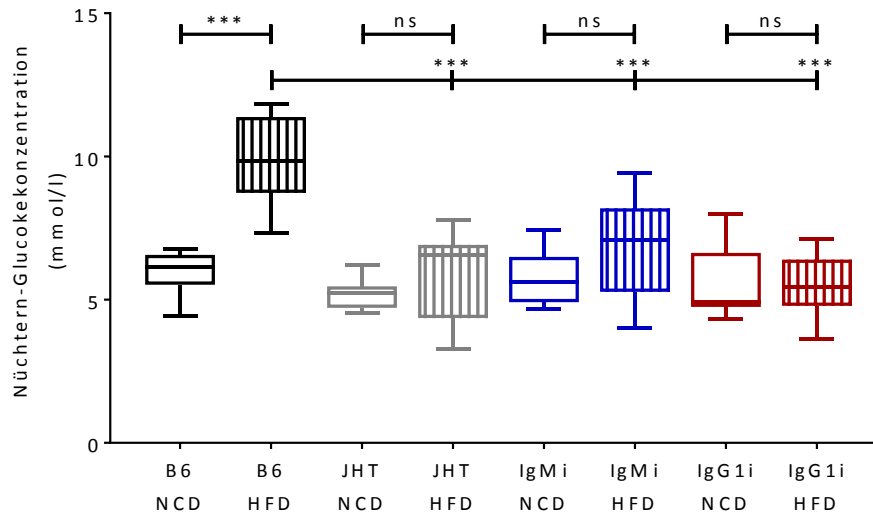
Abbildung 41: Glukosetoleranztest, Darstellung nach experimenteller Diät.

B6-, JHT-, IgMi-, IgG1i-Mäuse wurden 17 Wochen lang mit NCD- oder HFD-Futter gefüttert. Sie wurden für sechs Stunden nüchtern gesetzt und bekamen dann i. p. 1 g Glukose pro Kilogramm Körpergewicht gespritzt. Der jeweilige Blutglukosewert wurde nach 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 und 120 Minuten bestimmt. Signifikanzen wurden mittels Two-way Anova mit anschließender Bonferroni-Korrektur über GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla) ermittelt. Die Punkte stellen den Mittelwert \pm SEM dar, n = 12 (B6 NCD + HFD, JHT NCD, IgG1i HFD), 13 (JHT HFD, IgG1i NCD), 14 (IgMi NCD + HFD), (ns = nicht signifikant, ***P < 0,001).

Nach 19-wöchiger experimenteller Diät wurden alle acht Gruppen für 16 Stunden nüchtern gesetzt. Im Anschluss wurde der Nüchtern-Blutzuckerwert bestimmt und Blut entnommen, um mittels ELISA den Nüchtern-Insulinwert zu bestimmen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 42 dargestellt. Wie zu sehen ist, führte nur in B6-Mäusen die hochkalorische Diät zu einem signifikanten Anstieg der Nüchtern-Blutglukosekonzentration. In JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäusen unterschieden die sich Blutzuckerwerte für NCD- und HFD-Mäuse nicht.

Die Nüchtern-Seruminsulinwerte waren nach der fettreichen Ernährung nur in B6- und IgMi-Mäusen signifikant erhöht. Hierbei zeigten die B6-Mäuse den stärksten Anstieg. JHT- und IgG1i-Mäuse wiesen nach HFD-Fütterung unveränderte Nüchtern-Insulinwerte auf.

Nüchtern-Glukosekonzentration



Nüchtern-Insulinkonzentration

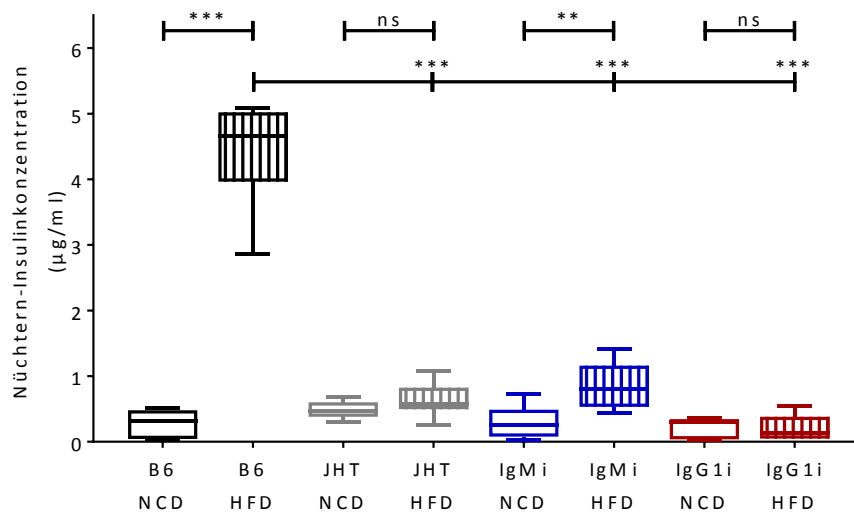


Abbildung 42: Nüchtern-Glukose- und -Insulinkonzentrationen.

B6-, JHT-, IgMi-, IgG1i-Mäuse wurden 19 Wochen lang mit NCD- oder HFD-Futter gefüttert. Sie wurden für 16 Stunden nüchtern gesetzt und im Anschluss wurde ihr Nüchtern-Blutglukosewert bestimmt. Für die Messung des Nüchtern-Seruminsulins wurde Blut abgenommen und das Serum isoliert. Der Insulinwert wurde mittels ELISA bestimmt. Die Boxen der Box-Plots zeigen den Interquartilbereich, welcher Daten zwischen dem 25. und den 75. Perzentil abdeckt. Zusätzlich sind der Median als horizontale Linie und Antennen von Min. bis Max. dargestellt, Nüchtern-Glukosekonzentration: n = 12 (B6 NCD + HFD, JHT NCD, IgG1i NCD + HFD), 13 (JHT HFD, IgMi NCD), 14 (IgMi HFD), Nüchtern-Insulinkonzentration: n = 6 (B6 NCD + HFD, JHT NCD, IgMi HFD, IgG1i NCD), 8 (JHT HFD, IgMi NCD) 7 (IgG1i NCD)(ns = nichts signifikant, $P < 0,05$, $**P < 0,01$, $***P < 0,001$).

Zur Einschätzung der Wahrscheinlichkeit einer Insulinresistenz wurde ein HOMA-IR durchgeführt. Dieser wurde über Formel (2) berechnet [93]:

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{Nüchtern-Insulinkonzentration } \left(\frac{\mu\text{U}}{\text{mL}}\right) * \text{Nüchtern-Glukosekonzentration } \left(\frac{\text{mmol}}{\text{L}}\right)}{22,5} \quad (2)$$

Für die Konvertierung des Insulins von $\mu\text{g/L}$ in $\mu\text{U/mL}$ wurde die Angabe des Herstellers (Merckodia AB, Uppsala, Schweden) verwendet, welche besagte, dass 1 μg 174 pmol entsprechen. Für die Übertragung von pmol in μU wurde der Konversionsfaktor 6,945 genutzt, welcher von analytischen Laboren verwendet wird [94].

Es ergaben sich die in Tabelle 14 aufgeführten Werte. Die Insulinresistenz wurde anhand Tabelle 11 eingestuft. Ihnen zufolge lag in HFD-B6-, aber auch in IgMi-Mäusen eine Insulinresistenz wie bei einem T2DM-Patienten vor. In HFD-JHT-Mäusen war eine Insulinresistenz wahrscheinlich. Lediglich in IgG1i-Mäusen kam es zu einem vollständigen Schutz vor HFD-induzierten Insulinresistenz.

Tabelle 14: HOMA-IR

Mausstamm		HOMA-IR-Wert	Insulinresistenzschätzung
B6	NCD	1,89	Insulinresistenz eher unwahrscheinlich
	HFD	47,22	Wert im Bereich von Typ II-Diabetikern
JHT	NCD	1,87	Insulinresistenz eher unwahrscheinlich
	HFD	4,12	Insulinresistenz wahrscheinlich
IgMi	NCD	1,89	Insulinresistenz eher unwahrscheinlich
	HFD	6,46	Wert im Bereich von Typ II-Diabetikern
IgG1i	NCD	1,42	Insulinresistenz eher unwahrscheinlich
	HFD	1,18	

4.2.4 B-Zellen und Serumenzyme und –lipide

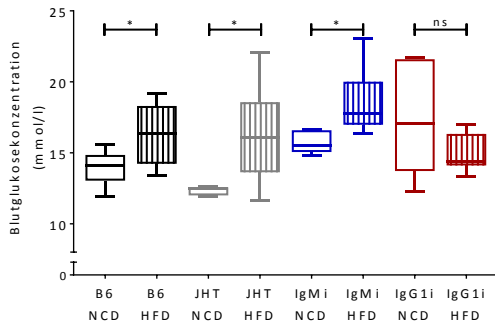
Um zu analysieren, ob HFD und B-Zellen einen Einfluss auf Serumlipide und –enzyme haben, wurden Serumcholesterin und -glukose, sowie die Enzyme ASAT, ALAT und ALP in B6-, JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäusen nach 21-wöchiger HFD- oder Kontrollfütterung bestimmt (Abbildung 43). Wie erwartet führte die hochkalorische Diät in B6-Mäusen zu einer Erhöhung der Gesamtcholesterinkonzentration im Serum. Dieser Effekt war auch in JHT- und IgMi-Mäusen zu beobachten. In IgG1i-Mäusen hatte die HFD keinen Einfluss auf den Cholesteringehalt. Nachdem der Nüchtern-Glukosespiegel bereits erstaunliche Ergebnisse gezeigt hatte, wurde nun außerdem der Blutglukosegehalt ohne vorherige Nüchternperiode bestimmt. In allen Mausstämmen war dieser in den Mäusen mit HFD-Fütterung erhöht. Allerdings kam es JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäusen zu einem geringeren Anstieg des Blutzuckerspiegels.

Da bereits beobachtet wurde, dass in Mäusen mit B-Zell-Knockout oder veränderter B-Zellfunktion, HFD zu einer geringeren Lebervergrößerung führte als in B6-Mäusen (Abbildung 34), wurden insbesondere Enzyme im Serum untersucht die Aufschluss über die Leberfunktion geben konnten. In B6-Mäusen kam es durch die fettreiche Ernährung zu einem Anstieg von ASAT, ALAT und ALP.

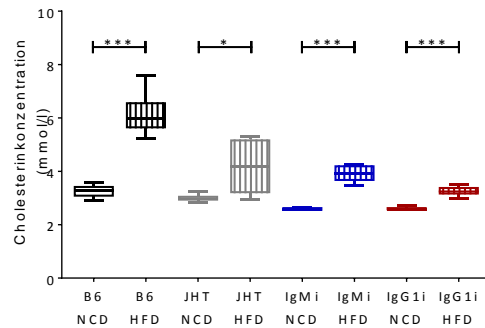
Faszinierenderweise kam es durch die HFD weder in JHT- noch in IgMi- oder IgG1i-Mäusen zu einem Anstieg der Leberenzyme im Serum. Die Serum-ALAT war in JHT- und IgG1i-Mäusen nach HFD sogar signifikant reduziert.

Für IgMi-Mäuse konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden, da die Werte für NCD- und HFD-Mäuse bereits an oder unterhalb der Bestimmungsgrenze lagen. Allerdings konnte hier das gleiche Phänomen für die ALP gezeigt werden.

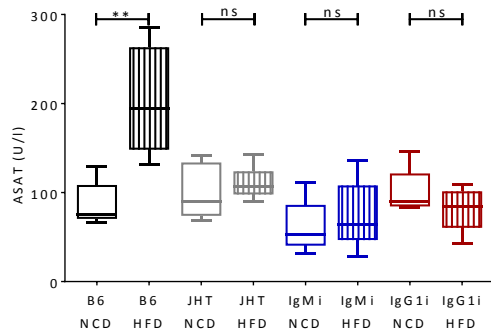
Glukose



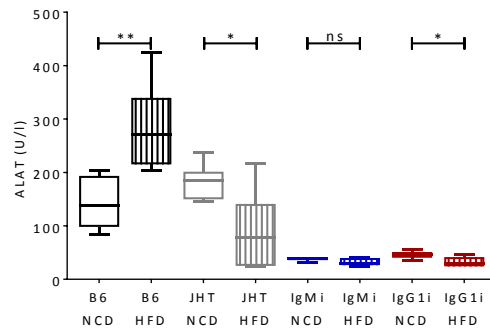
Cholesterin



ASAT



ALAT



Alkalische Phosphatase

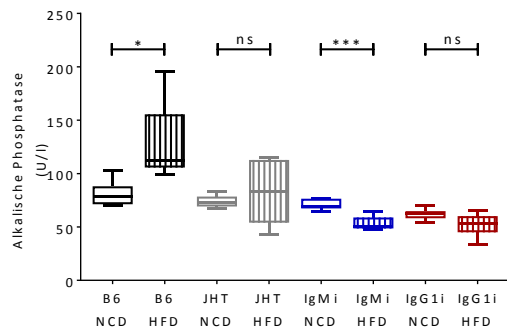


Abbildung 43: Serumlipide und -enzyme. B6-, JHT-, IgMi-, IgG1i-Mäuse wurden 21 Wochen lang mit NCD- oder HFD-Futter gefüttert.

Für die Messung der Serumlipide und -enzyme wurde ihnen Blut abgenommen und das Serum isoliert. Die Bestimmung erfolgte mittels Reflotron® Plus Streifen. Die Boxen der Box-Plots zeigen den Interquartilbereich, welcher Daten zwischen dem 25. und den 75. Perzentil abdeckt. Zusätzlich sind der Median als horizontale Linie und Antennen von Min. bis Max. dargestellt, n = 6 (ns = nichts signifikant, P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001).

4.2.5 HFD-induzierte Immunzellinfiltration

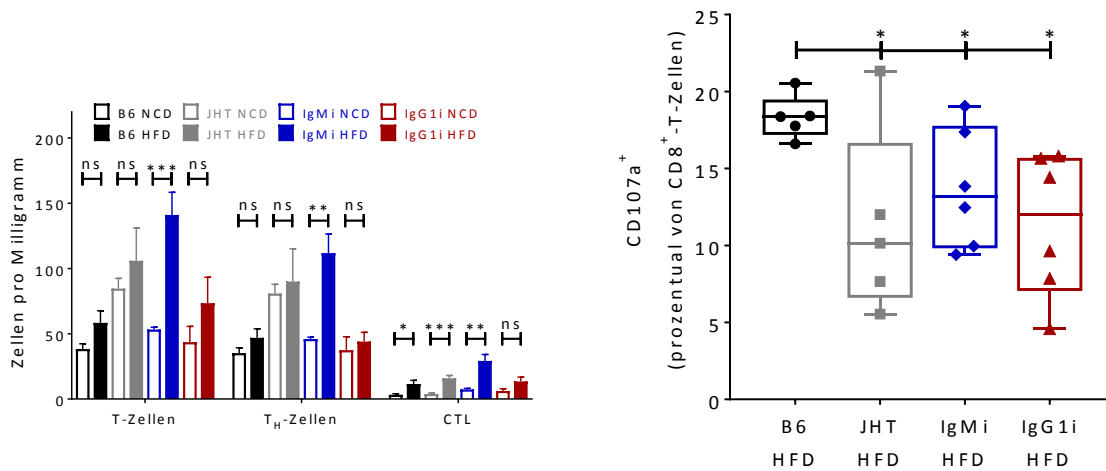
Adipositas geht in der Regel mit Immunzellinfiltration in das Fettgewebe einher [95]. Daher wurde nach 21-wöchiger experimenteller Fütterung das EF aus NCD- und HFD-B6, -JHT-, -IgMi- und IgG1i-Mäusen entnommen und durchflusszytometrisch untersucht. Da zuvor gezeigt wurde, dass HFD-Futter wenig oder keinen Einfluss auf die Lebergrößen von JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäusen hatte, wurde auch diese auf infiltrierte Immunzellen untersucht.

In Abbildung 44 sind die absoluten T_H -Zell- und CTL-Zahlen in EF und Leber dargestellt. Im EF von hochkalorischer Nahrung gefütterter B6-, JHT- und IgMi-Mäusen war ein Anstieg an CTL im Vergleich zu den NCD-gefütterten Kontrollmäusen zu beobachten.

HFD-IgMi-Mäuse zeigten ebenso eine Zunahme von T_H -Zellen und damit einhergehend einen Anstieg der Gesamt-T-Zellzahl. Innerhalb der CTL-Population wurden zudem diejenigen CTL ermittelt, welche sekretorisch aktiv waren und somit inflammatorisch wirkten. Wie zu sehen ist (Abbildung 44 rechts) waren im EF von HFD-gefütterten JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäusen von prozentual weniger CTL aktiv als in HFD-B6-Mäusen, was verglichen mit Kontrollmäusen für eine abgeschwächte HFD-induzierte Entzündungsreaktion in den genetischveränderten Mäusen spricht. HFD-IgMi-Mäusen lagen hierbei am nächsten am Wert der HFD-B6-Mäuse, was die vorherigen Beobachtungen (physiologische Untersuchungen, ITT, Nüchtern-Glukose) bekräftigt, dass IgMi-Mäuse näher am Phänotyp der B6-Mäuse sind als an dem der JHT-Mäuse.

In der Leber konnte nur für HFD-IgMi-Mäuse eine signifikante Erhöhung an CTL und T_H -Zellen detektiert werden. Bei Betrachtung der sekretorisch aktiven CTL wurden allerdings erneut prozentual die höchsten Werte für HFD-B6-Mäuse gemessen. HFD-JHT-, -IgMi- und IgG1i-Mäuse wiesen hier jeweils signifikant geringere Werte auf. Erneut zeigten HFD-IgMi-Mäuse den höchsten Prozentsatz unter den drei genveränderten Stämmen.

Epididymales Fettgewebe



Leber

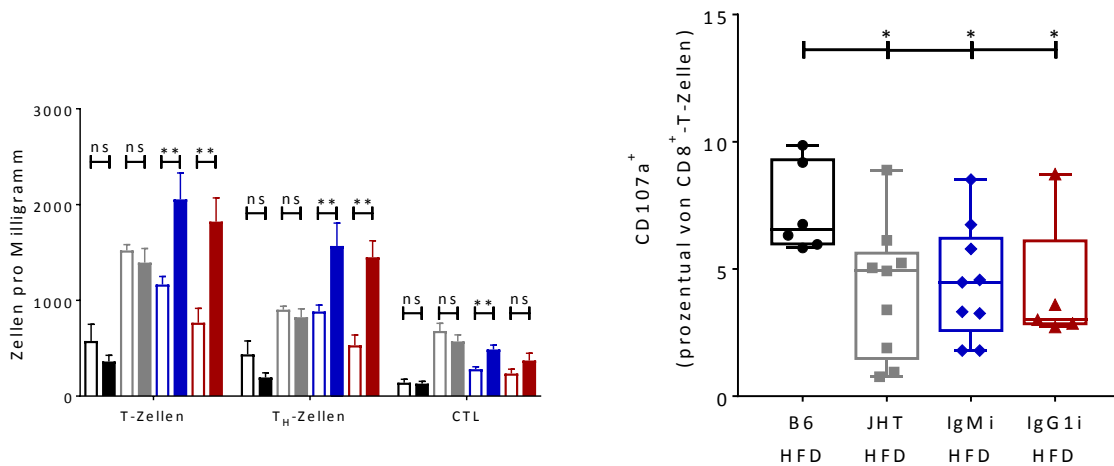


Abbildung 44: T-Zellinfiltration in EF und Leber unter HFD.

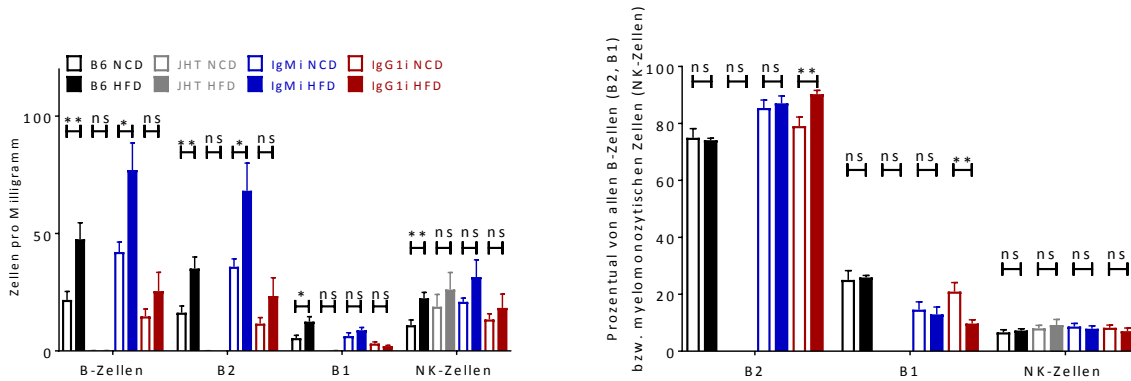
B6-, JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäusen wurden 21 Wochen lang mit NCD- oder HFD-Futter gefüttert. Es wurden Blut, Milz, Aorta mit PVAT, EF und Leber entnommen. Aorta und PVAT wurden unter dem Mikroskop voneinander getrennt. Die Gewebe wurden wie in „3.2.3.1 Organaufarbeitung“ beschrieben zur durchflusszytometrischen Bestimmung aufgearbeitet. Zur Unterscheidung der T-Zellsubpopulationen wurden die Antikörper PerCP CD45, PE-Cy7 CD3e, PE CD8, BV421 CD107a und VS (nur EF) verwendet. Das *Gating*-Schema ist unter „3.2.3.3 *Gating*-Strategie“ dargestellt. Die Boxen der Box-Plots zeigen den Interquartilbereich, welcher Daten zwischen dem 25. und den 75. Perzentil abdeckt. Zusätzlich sind der Median als horizontale Linie und Antennen von Min. bis Max. dargestellt, n = 6, Signifikanzen wurden im Vergleich zu B6-Mäusen ermittelt, nicht signifikante Ergebnisse wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt (*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001).

Als Nächstes wurden infiltrierende B1-, B2- und NK-Zellen bestimmt (Abbildung 45). Im EF kam es in HFD-B6-Mäusen zu einem signifikanten Anstieg von sowohl B2- als auch B1-Zellen. Allerdings konnte keine Verschiebung zu einer der beiden Populationen (Abbildung 45 rechts) beobachtet werden. Auch NK-Zellen waren in HFD-B6-Mäusen erhöht. Prozentual von allen myelomonocyti-schen Zellen gesehen, kam es aber auch hier zu keiner vermehrten Expression von NK-Zellen. Daher ist davon auszugehen, dass eine durch hochkalorische Nahrung hervorgerufene Entzündungsreaktion im EF von B6-Mäusen nicht B- oder NK-Zell-vermittelt war. Für JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäuse wurde für NK-Zellen im EF dasselbe Ergebnis erzielt.

Bezüglich B-Zellen verhielten sich auch hier die IgMi-Mäuse wie die B6-Mäuse. IgG1i-Mäuse hingegen zeigten neben einer absoluten B2-Zellzahlerhöhung im EF unter HFD außerdem eine Verschiebung zum B2-Zelltyp.

In der Leber kam es in keinem der Mausstämmen zu einer erhöhten B1-, B2- oder NK-Zellinfiltration und auch zu keiner Verschiebung in Richtung einer bestimmten Subpopulation.

Epididymales Fettgewebe



Leber

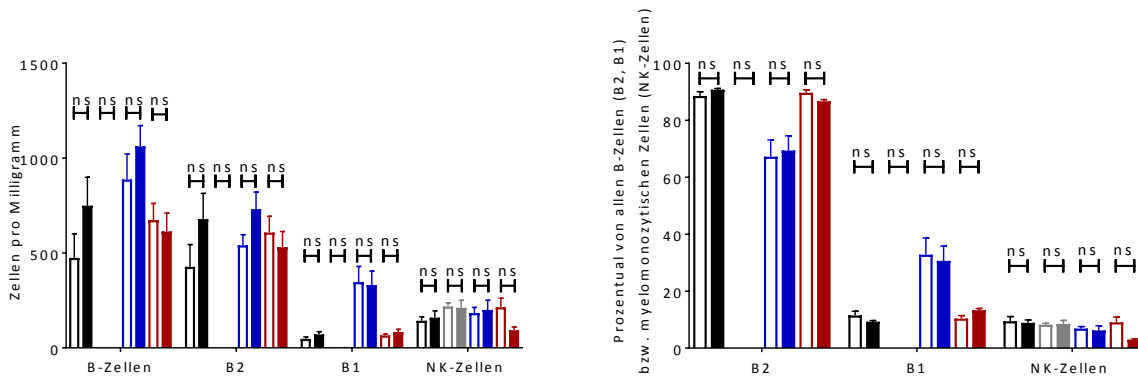


Abbildung 45: B-Zell- und NK-Zellinfiltration in EF und Leber unter HFD.

B6-, JHT-, IgMi- und IgG1-Mäusen wurden 21 Wochen lang mit NCD- oder HFD-Futter gefüttert. Es wurden Blut, Milz, Aorta mit PVAT, EF und Leber entnommen. Aorta und PVAT wurden unter dem Mikroskop von einander getrennt. Die Gewebe wurden wie in „3.2.3.1 Organaufarbeitung“ beschrieben zur durchflusszytometrischen Bestimmung aufgearbeitet. Zur Unterscheidung der T-Zellsubpopulationen wurden die Antikörper PerCP CD45, APC CD19, FITC CD23, BV605 NK1.1 und VS (nur EF) verwendet. Das *Gating*-Schema ist unter „3.2.3.3 *Gating*-Strategie“ dargestellt. Die Säulen stellen den Mittelwert ± SEM dar, n = 6, Signifikanzen wurden im Vergleich zu B6-Mäusen ermittelt, nicht signifikante Ergebnisse wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt (*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001).

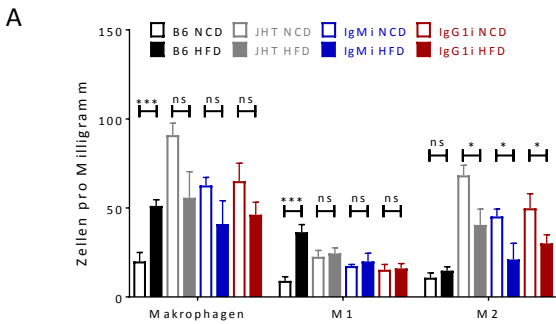
Neben sekretorischen CTL sind auch infiltrierende Makrophagen vom M1-Typ (CD11c⁺CD206⁻) ein etabliertes Zeichen für eine vorliegende Inflammation. Daher wurden auch die Zellzahlen für infiltrierende M1-Makrophagen in EF und Leber in allen vier Mausstämmen mit NCD- oder HFD-Fütterung ermittelt. Zusätzlich wurden die Zahlen an M2-Makrophagen, Monozyten und Neutrophilen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 46 dargestellt.

In B6-Mäusen kam es durch HFD-Fütterung zu einem signifikanten Anstieg von M1- Makrophagen im EF (Abbildung 46 oben). In JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäusen konnte nach hochkalorischer Ernährung keine Zunahme an M1-Makrophagen im EF detektiert werden. Die Zahl der M2-Makrophagen sank zwar in allen drei Mausstämmen signifikant. blieb aber stets über oder auf dem Level der M1-Makrophagen. Diesem Ergebnis zufolge weisen JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäuse einen Schutz vor HFD-induzierter M1-Makrophageninfiltration auf.

Neutrophile und Monozyten lagen im EF aller NCD- und HFD-Mäuse in gleichem Maß vor (Abbildung 46 unten).

In der Leber kam es in keiner der Mausstämme durch HFD zu einer vermehrten Infiltration von M1- oder M2-Makrophagen (Abbildung 46D), Neutrophilen oder Monozyten (Abbildung 46C).

Epididymales Fettgewebe



Leber

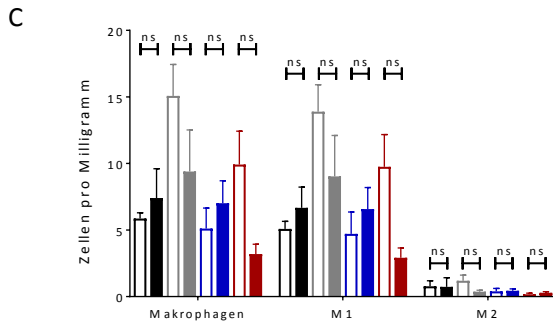
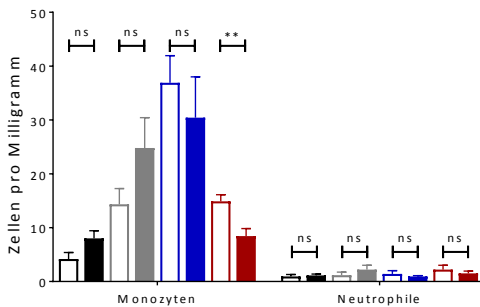
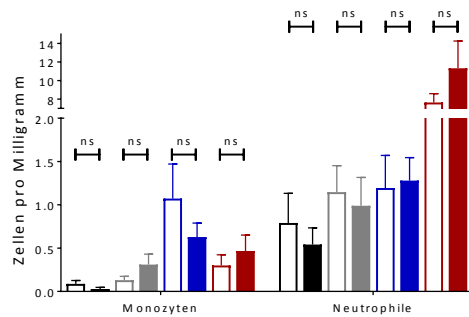
**B****D**

Abbildung 46: Makrophageninfiltration in EF und Leber unter HFD. B6-, JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäusen wurden 21 Wochen lang mit NCD- oder HFD-Futter gefüttert.

Es wurden Blut, Milz, Aorta mit PVAT, EF und Leber entnommen. Aorta und PVAT wurden unter dem Mikroskop von einander getrennt. Die Gewebe wurden wie in „3.2.3.1 Organaufarbeitung“ beschrieben zur durchflusszytometrischen Bestimmung aufgearbeitet. Zur Unterscheidung der T-Zellsubpopulationen wurden die Antikörper PerCP CD45, BV421 CD11b, PE F4/80, BV605 CD11c, Alexa Fluor 647 CD206, PE-Cy7 CD23, FITC Ly6G und VS (nur EF) verwendet. Das *Gating*-Schema ist unter „3.2.3.3 *Gating*-Strategie“ dargestellt. Die Boxen der Box-Plots zeigen den Interquartilbereich, welcher Daten zwischen dem 25. und den 75. Perzentil abdeckt. Zusätzlich sind der Median als horizontale Linie und Antennen von Min. bis Max. dargestellt, n = 6, Signifikanzen wurden im Vergleich zu B6-Mäusen ermittelt, nicht signifikante Ergebnisse wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt (*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001).

4.2.6 Der Einfluss von HFD auf den BCR

Die vorangegangenen Experimente wiesen den Trend auf, dass unter physiologischen Bedingungen und auch nach HFD-Fütterung sowohl jeweils B6- und IgMi-Mäuse als auch JHT- und IgG1i-Mäuse ein ähnliches Verhalten in Bezug auf vaskuläre Relaxation, Immunzellprofile und Blutzuckermessungen zeigten. Hierbei demonstrierten JHT- und IgG1i-Mäuse verbesserte Insulinsensitivitäten und eine geringere Anreicherung an M1-Makrophagen sowie einen tendenziell aktiveren CTL als B6- und IgMi-Mäuse.

Unter NCD-Fütterung hingegen war bei JHT- und IgG1i-Mäusen gegenüber B6- und IgMi-Mäusen die vaskuläre Relaxation verschlechtert und die absolute Zahl der Neutrophilen erhöht. Hieraus kann deduziert werden, dass die hochkalorische Nahrung bei B6- und IgMi-Mäusen zu strukturellen oder funktionellen Veränderungen führt, welche eine B-Zell-Dysregulation nach sich ziehen.

In gesunden Mäusen hingegen könnten diese nach HFD veränderten Strukturen eine protektive Funktion ausüben, welche IgG1i-Mäusen und JHT-Mäusen fehlt. Hierbei könnte es sich um den BCR vom Typ IgM handeln. Dieser wird von B6- und IgMi-Mäusen ausgebildet. IgG1i-Mäuse hingegen haben einen BCR vom Typ IgG1. BCR bestehen aus einem membrangebundenen Ig und einem Heterodimer $Ig\alpha/Ig\beta$, welches für die Signaltransduktion verantwortlich ist. Im BCR vom Typ IgM weist das membrangebundene IgM im Gegensatz zum membrangebundenen IgG1 im IgG1-BCR keinen zytoplasmatischen Schwanz auf. Es konnte gezeigt werden, dass IgG1 den Verlust von $Ig\alpha$, nicht aber $Ig\beta$ kompensieren kann [96].

Um zu überprüfen, ob die hochkalorische Diät zu einer Verringerung der Expression von IgM und zugehörig $Ig\alpha$ (CD79a) führt, wurde aus B6-Mäusen, welche 21 Wochen lang mit HFD- oder NCD-Futter gefüttert wurden, Blut entnommen und durchflusszytometrisch untersucht. B1- und B2-Zellen wurden wie in „3.2.3.3 Gating-Strategie“ dargestellt definiert. Innerhalb der Subpopulationen wurden die IgM^+CD79^+ -Zellen wie in Abbildung 47 dargestellt identifiziert.

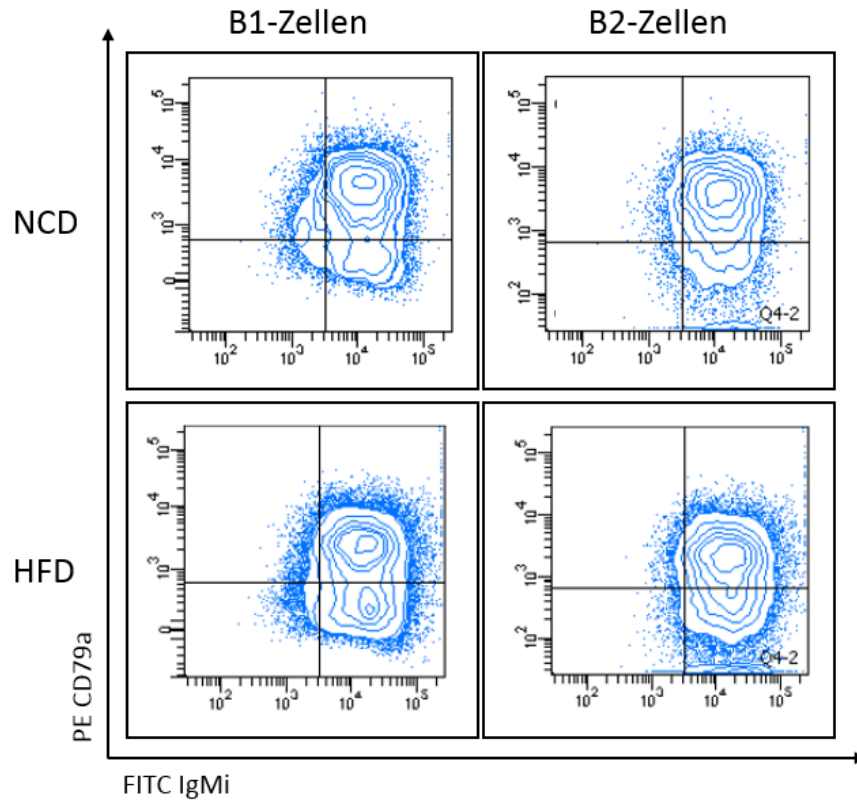
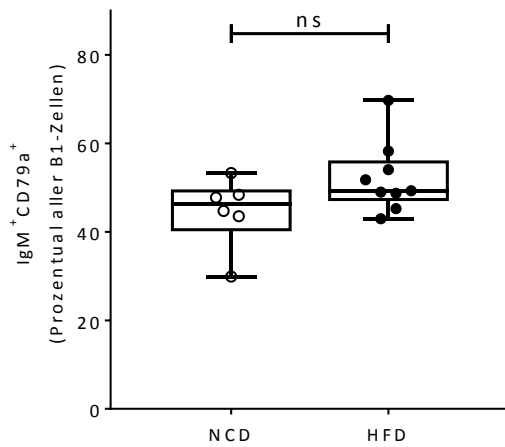


Abbildung 47: IgM⁺CD79⁺-B-Zellen. B6 -Mäusen wurden 21 Wochen lang mit NCD- oder HFD-Futter gefüttert. Ihr Blut wurde isoliert und wie in „3.2.3.1 Organaufarbeitung“ beschrieben zur durchflusszytometrischen Bestimmung aufgearbeitet. Hierfür wurden die Antikörper PerCP CD45, BV421 CD19, BV605 B220, CD23 PE-Cy7, FITC-IgM und PE CD79a verwendet. Die *Gating*-Abbildungen wurden mittels FACSCanto™ II erstellt.

In Abbildung 48 sind die Ergebnisse als prozentualer Anteil von IgM⁺CD79⁺-B-Zellen an allen B-Zellen im Blut dargestellt. Wie zu sehen ist, kam es durch die fettreiche Ernährung in B6-Mäusen zu keiner verminderten Expression von IgM⁺CD79⁺-B-Zellen, was eine Veränderung der Igα-vermittelten Signaltransduktion bei Adipositas ausschließt.

B1-Zellen



B2-Zellen

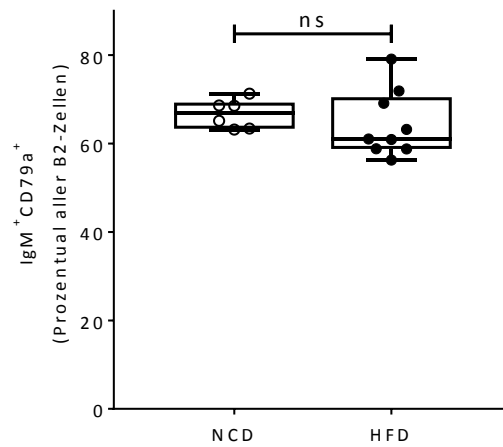


Abbildung 48. IgM⁺CD79⁺-B-Zellen in absoluten Zahlen. B6 -Mäusen wurden 21 Wochen lang mit NCD- oder HFD-Futter gefüttert.

Ihr Blut wurde isoliert und wie in „3.2.3.1 Organaufarbeitung“ beschrieben zur durchflusszytometrischen Bestimmung aufgearbeitet. Hierfür wurden die Antikörper PerCP CD45, BV421 CD19, BV605 B220, CD23 PE-Cy7, FITC-IgM und PE CD79a verwendet. Die Boxen der Box-Plots zeigen den Interquartilbereich, welcher Daten zwischen dem 25. und den 75. Perzentil abdeckt. Zusätzlich sind der Median als horizontale Linie und Antennen von Min. bis Max. dargestellt, n = 6 (ns = nicht signifikant).

5 Diskussion

5.1 B-Zellen als Hüter der vaskulären Funktion

In den vergangenen Jahren wurden B-Zellen wiederholt mit Erkrankungen des kardiovaskulären Systems in Verbindung gebracht. Insbesondere eine Netzwerk-gesteuerte integrative Analyse zu Genen, welche in Verbindung mit der koronaren Herzkrankheit (KHK) stehen, brachte B-Zellen in den Fokus der Forschung. In dieser Studie wurden Blutproben von Kontrollpatienten mit denen von an KHK erkrankten Patienten verglichen, um Gene zu identifizieren, welche durch das Krankheitsbild der KHK verändert wurden. Hierbei fiel auf, dass unter den zwanzig häufigsten bei KHK modifizierten Genen acht Gene B-Zellspezifisch sind. Die Gene waren sowohl der B-Zellaktivierung und -differenzierung als auch dem BCR-Signalweg zuzuordnen [73].

Die Ursache für die Entwicklung einer KHK ist eine Arteriosklerose- oder Thrombose-vermittelte Obstruktion der Koronargefäße [97]. Während der Zusammenhang zwischen B-Zellen und der Entstehung von Thrombosen jedoch noch gänzlich unerforscht ist, wurde der Einfluss von B-Zellen auf die Entstehung von Arteriosklerose bereits weitgehend beleuchtet [16, 77, 98].

Zwar konnten in Adventitia und PVAT von gesunden wie arteriosklerotischen Arterien, reichlich B-Zellen identifiziert werden [76]. Aber je nach B-Zellsubtyp konnten verschiedene Auswirkungen von B-Zellen auf die Arterioskleroseprogression in Mäusen beobachtet werden [16]. B1a- [74] und B1b-Zellen [75] wiesen eine Arteriosklerose-bezogene protektive Wirkung auf.

B1-Zellen können natürliches IgM (nIgM) produzieren. Dieses erkennt die oxidierten Epitope (OSE, engl.: *oxidation-specific epitopes*) an der Oberfläche von oxidiertem LDL (oxLDL), welches am Beginn der Bildung arteriosklerotischer Plaques entsteht. Makrophagen immigrieren daraufhin zur Läsionsstelle und versuchen das oxLDL zu beseitigen. Bei diesem Prozess entstehen aus den Makrophagen lipidreiche Schaumzellen [99]. Werden Schaumzellen apoptotisch, können sie nur schlecht eliminiert werden und es bilden sich nekrotische Kerne [100]. Bindet nun nIgM an

oxLDL, so wird dessen Aufnahme durch Makrophagen inhibiert und die Entstehung von Schaumzellen verlangsamt [101]. Weiterhin kann IgM OSE auf apoptotischen Zellen markieren und somit deren Elimination beschleunigen [101, 102].

Im Gegensatz zu B1-Zellen wiesen konventionelle B2-Zellen eine proarteriosklerotische Wirkung auf [98]. Dies konnte zum einen durch B2-Zelltransfer- [81], zum anderen durch B2-Zelldepletionsexperimente [103] demonstriert werden. So führte der Transfer von $5 \cdot 10^6$ B2-Zellen, nicht aber B1-Zellen von B6-Mäusen in μ MT/ApoE^{-/-}-Mäuse (μ MT: B-Zell-defiziente Mäuse, ApoE^{-/-}: Mäuse mit beeinträchtigtem Lipidstoffwechsel) zur Progression von Arteriosklerose [81]. Die Depletion von B-Zellen mittels CD20-Antikörper in ApoE^{-/-}-Mäusen, welche mit einer hochkalorischen Diät gefüttert wurden, führte kongruent zu einer Reduktion der arteriosklerotischen Plaques. Hierbei depletierte der Antikörper erfolgreich B2-Zellen, aber weniger effektiv B1-Zellen [103].

Die beschriebenen Ergebnisse passen zu den in dieser Arbeit dargestellten Daten über den Einfluss von B-Zellen auf die vaskuläre Funktion im Allgemeinen. So konnte hier gezeigt werden, dass das Fehlen von B-Zellen zu einer Verschlechterung der ACh-induzierten vaskulären Relaxation führt (Abbildung 13) und somit dass B-Zellen auch unter physiologischen Bedingungen das vaskuläre System beeinflussen.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch hier B1-Zellen einen protektiven Effekt haben. So führte der Transfer von $5 \cdot 10^6$ aus dem Peritoneum von B6-Spendermäusen isolierten B1-Zellen in JHT-Mäuse zu einer Verbesserung der vaskulären Funktion auf das Niveau der Kontrollmäuse (Abbildung 25). Der Transfer von $5 \cdot 10^6$ B2-Zellen erzielte verglichen mit JHT-Mäusen, welche PBS zur Kontrolle bekamen (Abbildung 25), keine signifikante Verbesserung der Relaxationskapazität.

Neben B-Zellen wird T-Zellen eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung von Arteriosklerose zugewiesen. So konnte in arteriosklerotischen Plaques von Menschen [104] und Mäusen [105, 106] eine erhöhte Zahl von CD3⁺-Zellen identifiziert werden. Auch in den hier dargestellten Ergebnissen konnte verglichen mit altersgleichen B6-Mäusen ein Anstieg der absoluten T-Zellzahl in

17 Wochen alten JHT-Mäusen zwar nicht in der Aorta selbst, aber in die Aorta umschließenden PVAT beobachtet werden (Abbildung 14). Dieser Effekt war sogar systematisch zu beobachten. So waren auch die T-Zellzahlen im Blut und EF erhöht (Abbildung 14), was eine Kompensation der B-Zelldefizienz durch T-Zellen andeutet. In arteriosklerotischen Plaques konnten vor allem CD4⁺-T-Zellen identifiziert werden [107].

Die Frequenz von CTL hingegen war in Mensch [107] und Maus [105] unauffällig. Auch dieser Effekt konnte im Vergleich zwischen JHT- und B6-Mäusen beobachtet werden (Abbildung 15). Während CTL in manchen Geweben signifikant erhöht (Blut, PVAT, Leber), in anderen aber unverändert (EF) oder verringert (Aorta) auftraten, konnten in JHT-Mäuse weitgehend gestiegenen Zahlen an T_H-Zellen (Blut, Aorta, PVAT, Leber) detektiert werden.

Bezüglich Arteriosklerose zeigt die Studienlage klar eine T_H1-Zell-vermittelte Progression [77]. Zum einen konnten T_H1-Zellen vermehrt in humanen Plaques nachgewiesen werden [108]. Zum anderen konnte durch externe Zufuhr des Zytokins Interferon- γ (INF- γ), welches vor allem T_H1-Zellen zuzuordnen ist, in Mäusen zu einer Verschlimmerung von Arteriosklerose verursacht werden [109]: T_H1-Zellen leiten durch die Produktion von INF- γ einen Teufelskreis ein [99]. INF- γ rekrutiert Makrophagen und DCs zum Entzündungsherd. Diese wiederum sekretieren Zytokine, welche eine T_H1-Zellpolarisation unterstützen [110].

T_H2-Zellen hingegen werden in der Regel als protektiv in Bezug auf Arteriosklerose angesehen. Allerdings lassen sich die Zytokine, welche diesen Effekt vermitteln (IL-5, IL-13), nicht eindeutig T_H2-Zellen zuordnen, weshalb für den T_H2-Zell-vermittelten Schutz vornehmlich der Wechsel vom T_H1- zum T_H2-Typ und damit einhergehend die verminderte Frequenz an T_H1-Zellen verantwortlich gemacht wird [77].

Begründet durch die beschriebenen T-Zellpolarisationen in Arteriosklerose, wurde erwartet, dass im Vergleich zu B6-Mäusen auch in JHT-Mäusen, welche eine vaskuläre Dysfunktion aufweisen, vermehrt T_H1-Zellen zu finden sein würden. Dies konnte allerdings weder in den vaskulär-relevanten

ten Geweben Aorta und PVAT, noch auf systemischer Ebene (mit Ausnahme der Leber) beobachtet werden (Abbildung 14). Stattdessen wurden vermehrt T_H2 -Zellen gemessen (Blut, Aorta, PVAT, Leber).

Auch die Zahl der T_{reg} -Zellen war in Blut, Milz, PVAT und Leber von JHT-Mäusen angestiegen. Wie T_H2 -Zellen werden T_{reg} -Zellen protektive Eigenschaften in Arteriosklerose zugeschrieben [77], weshalb die hier erhaltenen Ergebnisse zu Verteilung der T-Zellen auf die verschiedenen Subpopulationen verglichen mit der Literatur keine klare Interpretation über eine T-Zellvermittelte Beeinflussung der vaskulären Funktion bei B-Zelldefizienz zulassen.

Die T_H17 -Zellzahlen waren bei JHT-Mäusen in Blut und Aorta (Abbildung 14) erhöht, in den übrigen Geweben war keine Veränderung zu beobachten. Im Kontext von Arteriosklerose sind die bisherigen Studienergebnisse kontrovers. So konnte keine Übereinstimmung erzielt werden, ob hier T_H17 -Zellen eine schützende oder eine die Arteriosklerose vorantreibende Wirkung haben [111]. Dementsprechend sind sowohl in Bezug auf Arteriosklerose als auch auf eine Verbindung zwischen B-Zellen, T_H17 -Zellen und dem vaskulären System im Allgemeinen weitere Experimente vonnöten.

Neben T-Zellen konnten in 17 Wochen alten JHT-Mäusen auch vermehrt myelomonozytischen Zellen detektiert werden (Abbildung 14). Erwartet wurde, dass insbesondere Makrophagen, welche bei der Entstehung von Arteriosklerose eine entscheidende Rolle spielen [99], auch hier in erhöhter Frequenz zu identifizieren wären. Allerdings blieb die Makrophagenzahl bei JHT-Mäusen verglichen mit B6-Mäusen in Blut, Aorta, EF und Leber unverändert (Abbildung 16). Im PVAT war ein leichter Anstieg zu beobachten. In der Milz eine Reduktion. Somit ist eine Beteiligung der Makrophagen an der vaskulären Dysfunktion in JHT-Mäusen unwahrscheinlich.

NK-Zellen, welche wie T_H1 -Zellen $INF-\gamma$ produzieren [112], wurde lange Zeit eine proateriogene Wirkung nachgesagt [113]. Jedoch konnte mittlerweile gezeigt werden, dass in den jeweiligen Studien Tiermodelle verwendet wurden, die keine eindeutigen Rückschlüsse auf NK-Zellen zulassen.

sen [113]. Neuere Ergebnisse demonstrieren nun, dass NK-Zellen keinen Einfluss auf die Entwicklung von Arteriosklerose haben [114]. Dies steht im Einklang mit den hier dargestellten Ergebnissen. So konnte beim Vergleich von B6- und JHT-Mäusen kein klarer Trend bezüglich der NK-Zellzahlen beobachtet werden (Abbildung 16). Insbesondere in den vaskulär relevanten Geweben, Aorta und PVAT, war die NK-Zellzahl in B6- und JHT-Mäusen gleich.

Die einzige Subpopulation der myelomonozytischen Zellen, die eine veränderte Frequenz in Aorten von JHT-Mäusen gegenüber B6-Mäusen aufweist, sind die neutrophilen Granulozyten (Abbildung 16). Interessanterweise ist auch in den anderen untersuchten Geweben (Blut, Milz, PVAT, EF und Leber) die Neutrophilenzahl signifikant erhöht. Auch in arteriosklerotischen Plaques konnten bereits Neutrophile detektiert werden [115].

Während ihre Rolle in der Arteriogenese, Arterioskleroseprogression und Plaqueruptur des Menschen noch nicht genau erklärt werden konnte [115], konnten bei Mäusen bereits einige Mechanismen aufgeklärt werden [116]. So produzieren Neutrophile in Mäusen ROS und proteolytische Enzyme, welche zur Gewebszerstörung beitragen [117]. Weiterhin können sie mit geschädigtem Endothel interagieren, indem sie Proteine aus ihren Granula sezernieren, welche Leukozyten zum Entzündungsherd locken, was final zu einer Verstärkung der Inflammation und der Schaumzellbildung führt [118].

Nachdem mittels SAA-Konzentrationsbestimmung (Abbildung 21) ausgeschlossen wurde, dass die Neutrophilenzahl in JHT-Mäusen aufgrund einer chronischen Inflammation erhöht war, wurde untersucht, ob neutrophile Granulozyten tatsächlich an der Entstehung einer vaskulären Dysfunktion bei JHT-Mäusen beteiligt sind. Hierfür wurden die Neutrophilen mittels Ly6G-Antikörper depletiert. Dies hatte eine vollständig Normalisierung der vaskulären Funktion nach 36 Stunden (Abbildung 19) zur Folge, was bestätigt, dass bei JHT-Mäusen die Neutrophilen für die vaskuläre Dysfunktion verantwortlich sind.

Interessanterweise konnte nach dem Transfer von B1-Zellen, welcher ebenfalls zu einer Normalisierung der vaskulären Funktion führte, eine Verminderung der Neutrophilenzahl im Blut der JHT-

Mäuse (Abbildung 26) beobachtet werden. Dieser Trend war auch nach dem Transfer von B2-Zellen zu erkennen, jedoch nicht signifikant messbar. Diesen Ergebnissen zufolge regulieren B-Zellen, genauer gesagt B1-Zellen, Neutrophile.

Bisher ist die Kommunikation zwischen B-Zellen und Neutrophilen kaum erforscht. Als einziger direkter Kontaktpunkt werden in der Literatur die B2-MZ-Zellen genannt. IL-10 kann in Neutrophilen die Differenzierung zu B-Helfer-Neutrophilen auslösen. Als solche sezernieren sie B-Zellaktivierende Faktoren wie BAFF und APRIL und unterstützen den Immunglobulinklassenwechsel, die somatische Hypermutation und die Antikörperproduktion von B2-MZ-Zellen [34, 119].

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen jedoch klar, dass eine weitere Kommunikation stattfinden muss. Da die Neutrophilen nicht in den für das vaskuläre System entscheidenden Organen, sondern systemisch erhöht waren, wurde untersucht, ob durch das Fehlen der B-Zellen bereits im KM eine veränderte Granulopoese stattfindet. Tatsächlich konnte ein Trend beobachtet werden, der zeigte, dass weniger GMP in JHT-Mäusen als in B6-Mäusen vorlagen (Abbildung 17 oben). Dies legt die Vermutung nahe, dass diese Vorläuferpopulation vermindert war, da die Vorläufer auf Grund eines fehlenden Regulators schnell zu reifen Zellen ausreifen.

GMP sind Vorläuferzellen für Monozyten und neutrophile Granulozyten [4]. Daher wurde in einem nächsten Schritt die Anzahl dieser beiden Populationen analysiert (Abbildung 17 unten). Hier konnte beobachtet werden, dass bei B6- und JHT-Mäusen gleich viele Monozyten im KM heranreifen. In JHT-Mäusen waren aber erneut vermehrt Neutrophile zu finden. Dieses Ergebnis bestätigt, dass neutrophile Granulozyten sowohl im KM als auch im System über B-Zellen reguliert werden.

Auch sezernierte Antikörper konnten bereits in Zusammenhang mit Atheroskleroseprotektion oder -progression gebracht werden. Wie bereits beschrieben, wird IgM, insbesondere dem von B1-Zellen produziertem nIgM, eine protektive Wirkung in Bezug auf Arteriosklerose zugeschrieben [16]. Der Transfer von B1a-Zellen aus $slgMi^{-/-}$ -Mäusen, welche IgM exprimieren, aber nicht

sekretieren können, führte im Gegensatz zum Transfer aus Wildtyp-B1a-Zellen zu keiner Verbesserung von Arteriosklerose [74].

Da IgG-Antikörper in vier Subtypen auftreten [120], muss der vaskuläre Effekt gesondert betrachtet werden. IgG-Antikörper werden von B2-Zellen in Abhängigkeit von T_H-Zellen sekretiert. Hierbei sorgen in Mäusen T_H2-Zellen mittels IL-4 für die Produktion von IgG1 [120]. T_H1-Zellen lenken die Sekretion in Richtung IgG2a und IgG3 über INF- γ [121]. Im Kontext der Arteriosklerose konnte bis heute keine eindeutige Unterscheidung bezüglich des Einflusses der unterschiedlichen Subtypen getroffen werden.

IgG-Antikörper insgesamt konnten in arteriosklerotischen Läsionen detektiert werden und wiesen eine Spezifität für OxLDL auf [122]. Hierbei konnte aber nicht geklärt werden, ob diese eine protektive oder schädigende Wirkung haben [16]. So zeigen Studien, dass der passive Transfer von IgG1-Antikörpern mit einer Spezifität für Malonaldehyd-modifiziertes LDL, einer Form des oxLDL [123], in Apo^e^{-/-}-Mäusen zur Inhibition der Läsionsbildung führt. Gleichzeitig resultiert dies aber auch in der vermehrten Aufnahme von oxLDL durch Makrophagen und subsequent in der Schaumzellbildung [124].

Um den Effekt von Antikörpern auf das vaskuläre System genauer untersuchen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit die Mausstämme IgMi, deren B-Zellen IgM exprimieren, aber nicht sezernieren können, und IgG1i, deren B-Zellen nur IgG1i sezernieren können, untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass es in IgMi-Mäusen zu keiner Schädigung der vaskulären Funktion kam (Abbildung 27).

Dieses Ergebnis widerspricht der Literatur im Kontext der Arteriosklerose, wo beschrieben wird, dass IgM nur in sezernierter Form eine Protektion aufweist [74]. Jedoch ist zu beachten, dass hier kein ausgeprägtes Krankheitsbild beobachtet wurde, sondern die beginnenden Mechanismen für die mögliche Entwicklung einer Pathologie. Daher kann angenommen werden, dass zum Schutz der vaskulären Funktion zunächst kein sekretiertes IgM notwendig ist.

Dieses Ergebnis konnte auch durch die Ermittlung der Immunzellverteilung in sieben Wochen alten IgMi-Mäusen bestätigt werden. Hier konnten kaum Abweichungen zu dem Profil in B6-Mäusen detektiert werden. Zwar konnte in PVAT und Aorta eine erhöhte T_{reg}-Zellenzahl identifiziert werden (Abbildung 29). Aber insbesondere in Bezug auf Neutrophile kam es zu keiner Veränderung der Zellzahlen in allen sechs untersuchten Geweben. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Kontrolle von Neutrophilen nun B1-Zellen nicht über sekretiertes IgM vermittelt ist. Eine Möglichkeit jedoch wäre eine Kontaktaufnahme über den BCR des μ -Typs.

Unterschiede zwischen IgMi- und B6-Mäusen waren vor allem im B-Zellprofil zu erkennen (Abbildung 31). Dies war zu erwarten, da die genetische Modifikation der IgMi-Mäuse, die B-Zellen betrifft ist. So waren bei IgMi-Mäusen in Blut, PVAT und Leber signifikant weniger B2-Zellen zu finden als bei B6-Mäusen. Dieser Trend deutete sich auch in Aorta und EF an. B1-Zellen konnten hingegen in stark erhöhten Mengen in Blut, Milz und Leber und auch als Trend in der Aorta detektiert werden. Hierbei waren B1b-Zellen die überwiegende Subpopulation. Der Wechsel von B2- auf B1-Zellen war zu erwarten, da in IgMi-Mäusen nur BCR vom μ -Typ exprimiert werden können und somit die Reifung von B2-Zellen gestört ist [79]. Das erhöhte Aufkommen von B1-Zellen zusammen mit der gesunden vaskulären Relaxation stärkt die Theorie, dass B1-Zellen die vaskuläre Funktion schützen.

In IgG1i-Mäusen hingegen konnte eine verminderte ACh-induzierte vaskuläre Relaxation auf dem Niveau des vollen B-Zell-Knockouts (JHT-Mäuse) beobachtet werden (Abbildung 27). Dieses Ergebnis unterstützt die Studien, welche IgG1 oder IgG im Allgemeinen als schädigend für das vaskuläre System beschrieben [16, 77]. Bei Betrachtung des Immunzellprofils von sieben Wochen alten IgG1i-Mäusen fielen wie bei JHT-Mäusen allem die Veränderungen in den Subpopulationen der myelomonozytischen Zellen auf (Abbildung 30).

Auch hier war kein klares Bild für Makrophagen zu beobachten, da diese verglichen mit B6-Mäusen in verschiedenen Organen einmal in erhöhten (Blut, EF, Milz) und einmal in verringerten (Leber) Zellzahlen auftraten. In den vaskulär relevanten Geweben Aorta und PVAT gab es keine Ab-

weichung von der Makrophagenzahl der B6-Mäuse. Dieses Ergebnis bestätigt die zuvor getroffene Aussage, dass die Makrophagen nicht ausschlaggebend bei der B-Zelldefizienz-verursachten vaskulären Dysfunktion sind.

Hingegen war auch bei IgG1i-Mäusen ein signifikant gesteigertes Aufkommen an Neutrophilen in Milz, Blut, Leber, EF und der Aorta (Tendenz) zu beobachten, was eine Erklärung für die verschlechterte ACh-induzierte vaskuläre Relaxation sein könnte. Außerdem lässt sich aus diesem Ergebnis ableiten, dass die Regulation von Neutrophilen über B-Zellen weder mittels sekretiertem IgG1 noch über den BCR des γ -Typs verläuft. Dies war erwartet worden, da der Transfer von B2-Zellen zu keiner Senkung der Neutrophilenzahl im Blut führte (Abbildung 26).

Weiterhin konnten im PVAT, Blut und EF von IgG1i-Mäusen signifikant mehr T_H2 -Zellen als bei B6-Mäusen detektiert werden (Abbildung 29). Dies war als Trend auch in der Aorta zu erkennen. Dieses Ergebnis entspricht der Erwartung, da T_H2 -Zellen durch IL-4 die Sekretion von IgG1 vor anderen IgG-Subtypen durch B2-Zellen vermitteln [120] und in IgG1i-Mäusen nur IgG1i sekretiert werden kann. Auch im B-Zellprofil der IgG1i-Mäuse konnten erwartete Abweichung von den Zellzahlen bei B6-Mäusen beobachtet werden (Abbildung 31). So waren in den Fettgeweben, Aorta und Blut weniger B1-Zellen zu detektieren als bei B6-Mäusen wie auch bei IgMi-Mäusen. Dies war zu erwarten, da wegen der Restriktion auf B-Zellen vom IgG1-Typ die B1-Zellentwicklung gehemmt sein sollte. Die Milz von IgG1i-Mäusen war wie die der IgMi-Mäuse jedoch stark vergrößert. Hier konnten mehr B1-Zellen identifiziert werden als bei B6-Mäusen. Außerdem kam es zu einer Verschiebung innerhalb der B2-Population. In B6-Mäusen waren noch weitaus mehr B2-FO-Zellen zu beobachten als B2-MZ-Zellen. In IgG1i-Mäusen sind beide Populationen nahezu gleich groß. Dieses Phänomen ist bereits in der Literatur bekannt [79]. Auch IgMi-Mäuse zeigten eine Verschiebung zu B2-MZ-Zellen in der Milz, wenn auch nicht so ausgeprägt wie bei IgG1i-Mäusen. Dieses Ergebnis bestätigt, dass bei den Messungen keine Fehler unterlaufen sind, da sie mit der Literatur übereinstimmen [79].

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass B-Zellen eine schützende Funktion auf das vaskuläre Relaxationsvermögen haben. Ohne B-Zellen kam es lokal und im System zu einem starken Anstieg an Neutrophilen. Der Transfer von B1-Zellen führte zu einer Senkung der systemischen Neutrophilenzahl und zur vollständigen Regeneration der vaskulären Funktion. Wie die Neutrophilenzahlen im KM und im Blut von B6- und JHT-Mäusen zeigen, ist eine Regulation von Neutrophilen über B1-Zellen wahrscheinlich. Zusätzlich konnte die vaskuläre Funktion durch die Depletion von Neutrophilen wiederhergestellt werden, was zeigt, dass die durch den B-Zell-Knockout hervorgerufene vaskuläre Dysfunktion Neutrophilen-vermittelt ist. Die Daten der IgMi- und IgG1i-Mäuse unterstützen zum einen die Theorie der schützenden Funktion von B1-Zellen, zum anderen zeigen sie, dass die Kontrolle der Neutrophilen durch B-Zellen vermutlich weder IgM- noch IgG-vermittelt ist. Eine Kommunikation über den BCR μ ist möglich.

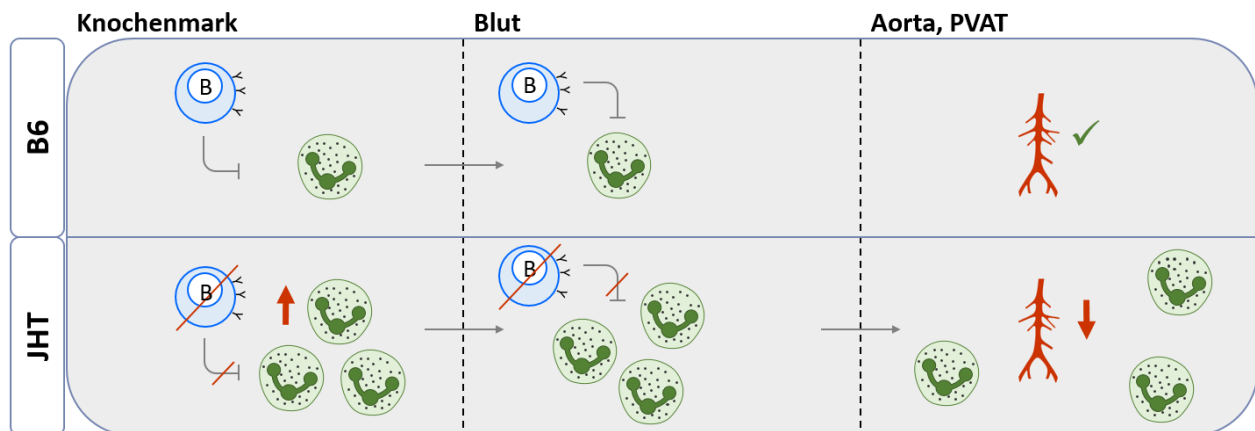


Abbildung 49: B-Zellvermittelter Schutz der vaskulären Funktion. Schematische Darstellung.

5.2 B-Zellen als Vermittler von Insulinresistenz

Diabetes mellitus Typ 2 weist ein vielschichtiges Krankheitsbild auf, welches durch Veränderungen im Glukose-, Fett- und Proteinstoffwechsel charakterisiert ist [125]. Geradezu schockierend ist, dass die Verbreitung von T2DM in der westlichen Welt, aber auch in vielen Entwicklungsländern, mittlerweile epidemische Ausmaße angenommen hat [126]. Das metabolische Syndrom, welches eine Vorstufe auf dem Weg zum T2DM ist, tritt sogar noch zwei- bis dreimal häufiger noch als T2DM selbst auf [127]. Hyperglykämie sowie Insulinresistenz, welche als die dominantesten Kennzeichen von T2DM zu nennen sind [125], sind auch die Ursache für Spätkomplikationen wie kardiovaskuläre Ereignisse [128].

Um zu untersuchen, ob DIO die durch den Verlust von B-Zellen hervorgerufene vaskuläre Dysfunktion verstärkt, wurde die ACh-vermittelte vaskuläre Relaxation von HFD-B6- und HFD-JHT-Mäusen vermessen (Abbildung 35). Wie erwartet führte DIO in B6-Mäusen zu einer Verminderung der vaskulären Funktion [129]. In JHT-Mäusen hatte die HFD-Fütterung jedoch keinen weiteren Einfluss auf die vaskuläre Funktion.

Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass durch das Fehlen von B-Zellen die vaskuläre Funktion bereits so geschädigt wurde, dass eine weitere Absenkung dieser nicht möglich ist. Eine andere Erklärung aber wäre, dass durch HFD-Fütterung in B6-Mäusen die B-Zellpopulation oder -funktion, welche die vaskuläre Funktion schützen, nach unten reguliert oder eine schädigende Population oder Funktion nach oben reguliert werden.

Insulin kann über NO eine Vasodilatation hervorrufen. Die vasoaktiven und metabolischen Aufgaben und Eigenschaften von Insulin sind stark miteinander verbunden. Dadurch kommt es bei Insulinresistenz auch zu einer Beeinträchtigung der Insulin-vermittelten Vasodilatation [130]. Aus diesem Grund wurde im Weiteren auch der Zusammenhang zwischen DIO, B-Zellen und Insulinresistenz untersucht.

Auslöser für die Entwicklung von chronisch überhöhter Blutzuckerwerten und sinkender Insulinsensitivität ist häufig pathologisches Übergewicht [131]. Eine typische Komorbidität von Adipositas-induzierter Insulinresistenz und Glukoseintoleranz ist die chronische Entzündung von Fettgewebe [126]. Denn wachsendes Fettgewebe führt zur vermehrten Freisetzung freier Fettsäuren und inflammatorischer Adipokine, welche die Insulinsignalkaskade stören und somit die Insulinsensitivität senken [132]. Neben hypertrophen Adipozyten können auch infiltrierende Immunzellen für die erhöhte Zahl von Entzündungsmediatoren verantwortlich sein [133]. Hierbei ist vor allem die Infiltration von Makrophagen in Fettgewebe ein Schlüsselereignis [134]. So konnte eine erhöhte Anzahl von M1-Makrophagen sowie eine erhöhte Konzentration an von M1-Makrophagen sekretierten Zytokinen (TNF- α , IL-1 β und IL-6) im Fettgewebe von Mäusen, welche mit einer hochkalorischen Diät gefüttert wurden, nachgewiesen werden [95]. Auch ein vermehrtes Auftreten von proinflammatorischen CTL und INF- γ -sezernierenden CD4⁺-T-Zellen konnte in adipösen Mäusen gemessen werden, sodass auch hier ein Zusammenhang mit Glukoseintoleranz und Insulinresistenz deutlich zu erkennen ist [135-137].

Im Jahr 2011 konnten B-Zellen schließlich auch mit einem durch Adipositas veränderten Zucker- und Insulinstoffwechsel in Verbindung gebracht werden. Winer *et al.* zeigten, dass bei B6-Mäusen, welche eine hochkalorische Diät bekamen, bereits nach vier Wochen infiltrierende B-Zellen im EF zu detektieren sind. Die erhöhte Zahl von B-Zellen konnte bis zu zwölf Wochen nach Beginn der Fütterung nachgewiesen werden [95]. Dieses Ergebnis konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit reproduziert werden. So konnten in HFD-gefütterten B6-Mäusen 21 Wochen nach Beginn der Fütterung vermehrt B-Zellen detektiert werden (Abbildung 45 oben). Hierbei waren sowohl signifikant mehr B2-Zellen als auch B1-Zellen als in den NCD-B6-Mäusen zu beobachten. Es kam zu keiner Verschiebung in Richtung eines der beiden Subtypen. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von Winer *et al.*, die ebenfalls keine Änderung in den Subtypenanteilen beobachten konnten [95]. In einer anderen Veröffentlichung hingegen wurde gezeigt, dass nach neunwöchiger HFD-Fütterung weniger B1a-Zellen und mehr B2-Zellen in EF und im Peritonealraum zu finden waren [138].

Im Gegensatz zu den Mäusen von Winer *et al.*, welche eine Diät mit 60 kJ% Fettanteil bekamen, wurden die Tiere dieser Arbeit mit einer Diät mit nur 45 kJ% Fettanteil gefüttert. Viele Studien nutzen 60 kJ%iges Fettfutter [95, 126, 138], um zu garantieren, dass ihre Nagetiere Adipositas entwickeln. Jedoch sind 60 kJ% Fettanteil wesentlich höher als die Menge an Fett, die Menschen in westlichen Ländern zu sich nehmen. So enthalten synthetische Diäten für Nagetiere, welche genutzt werden, um einen westlichen Lebensstil zu imitieren („*Western Diet*“) in der Regel 42-43 kJ% Fett [139]. Auch Nagetiere, welche eine sogenannte „*Cafeteria Diät*“, bei der zusätzlich zu NCD-Futter auch für Menschen produzierte, hochkalorische, besonders gut schmeckende Snacks *ad libitum* [140] verabreicht werden, bekamen, erhielten ihre Energie aus vergleichsweise nur 45-53 kJ% Fett [140, 141]. Daher, und um eine bessere Translation zu ermöglichen, wurde in der vorliegenden Arbeit HFD-Futter mit 45 kJ% Fett verwendet. Trotz dieser geringeren kalorischen Belastung konnte bei den HFD-B6-Mäusen ebenfalls das zuvor beschriebene, mit DIO zusammenhängende Immunzellinfiltrationsmuster beobachtet werden. So konnten im EF von HFD-B6-Mäusen verglichen mit NCD-B6-Mäusen vermehrt CTL (Abbildung 44 oben), M1-Makrophagen (Abbildung 46 oben) und B-Zellen (Abbildung 45 oben) beobachtet werden. Auch die Anzahl von NK-Zellen (Abbildung 45 oben) stieg durch HFD-Fütterung im EF an, was so auch für Mäuse auf einer 60 kJ%-HFD beschrieben wurde [142].

Um die weitere Rolle von B-Zellen bei der Entwicklung von Insulinresistenz untersuchen zu können, nutzten Winer *et al.* B-Zell-Knockout-Mäuse und unterzogen diese ebenfalls einer HFD-Fütterung. Nach acht Wochen Fütterung konnten sie zwar beobachten, dass die B-Zell-Knockout-Mäuse in gleichem Maße wie die HFD-B6-Mäuse an Gewicht zunahmen, jedoch verbesserte Werte im GTT und ITT zeigten. Auch waren die Nüchtern-Insulin- und -Glukosekonzentrationen nicht so stark erhöht wie bei den HFD-Kontrollmäusen [95]. Im Unterschied hierzu nahmen die HFD-JHT-Mäuse der hier dargestellten Experimente über die 21-wöchige experimentelle Fütterung hinweg signifikant weniger an Gewicht zu als die HFD-B6-Mäuse (Abbildung 32). Dies bei den HFD-IgMi- und HFD-IgG1i-Mäusen war ebenso der Fall.

Während es bei HFD-JHT- und HFD-IgMi-Mäuse verglichen mit den jeweiligen NCD-Kontrollmäusen zu einer messbaren Gewichtszunahme kam, zeigte die HFD-Fütterung bei IgG1i-Mäusen keinen Einfluss auf das Gewicht. Ein naheliegender Grund hierfür ist, dass HFD-IgG1i-Mäuse durch verminderten Futtermittelverzehr die gleiche Menge an Kalorien zu sich nahmen wie NCD-IgG1i-Mäuse (Abbildung 33). Jedoch war die Kalorienzufuhr der HFD-IgG1i-Mäuse, wie auch bei HFD-JHT-Mäusen, nicht geringer als die der HFD-B6-Mäuse. Die hier gezeigten Ergebnisse belegen, dass sowohl der Verlust von B-Zellen (JHT) als auch die Einschränkung des Fähigkeitenrepertoires (IgG1i) von B-Zellen vor Adipositas schützt.

Trotzdem kam es verglichen mit NCD-Tieren bei allen vier Mausstämmen zu einer Erhöhung des Serumcholesterinwertes durch HFD-Fütterung (Abbildung 43, rechts oben).

Für B6-Mäuse kann diese Beobachtung durch die Literatur bestätigt werden, wo B6-Mäusen, welche 14 Wochen mit HFD gefüttert worden waren, im Vergleich zu ihren NCD-Kontrollmäusen ebenfalls erhöhte Serumcholesterinwerte aufwiesen [143]. Da ein veränderter Lipidstoffwechsel zu den ursächlichen Mechanismen zwischen Adipositas und metabolischen Erkrankungen zählt [143], kann aus den erhöhten Serumcholesterinwerten von HFD-JHT-, -IgMi- und -IgG1i-Mäusen gefolgert werden, dass hier trotz der verminderten (JHT, IgMi) beziehungsweise nicht messbaren (IgG1i) Gewichtszunahme durch HFD-Fütterung verglichen mit HFD-B6-Mäusen metabolische Veränderungen möglich sind.

Bei genauerer Betrachtung der Umstände, unter denen HFD-Fütterung zu einer Gewichtszunahme führte, war auffällig, dass zwar wie erwartet [144, 145] alle HFD-gefütterten Mäuse signifikant an EF-Gewicht zulegten (Abbildung 34 Mitte) und, mit Ausnahme der IgMi-Mäuse, im Verhältnis zu ihrem Körpergewicht ihre Muskelmasse verringert wurde. Aber nur die HFD-B6-Mäuse entwickelten eine Fettleber. Bei HFD-JHT-Mäusen kam es verglichen mit den NCD-JHT-Mäusen auch zu einer signifikanten Gewichtserhöhung. Der Anstieg war jedoch im Vergleich zur Gewichtsveränderung bei B6-Mäusen minimal. Auf IgMi-Mäuse hatte die HFD-Fütterung keinen Einfluss bezüglich des Lebergewichts. IgG1i-Mäuse wiesen nach der Diät sogar ein geringeres Lebergewicht auf.

Passenderweise konnten im Serum der HFD-JHT-, -IgMi-, und IgG1i-Mäuse verglichen mit ihren NCD-Kontrollmäusen keine erhöhten Werte für die Leberenzyme ASAT und ALAT nachgewiesen werden. Adipositas geht in der Regel nicht nur mit einer veränderten Lebermorphologie, sondern auch erhöhten Leberbiomarkern einher. Hierzu gehören die Aminotransferasen ASAT und ALAT [146]. Die ALAT ist ein zytoplasmatisches Enzym, welches in großen Konzentrationen in der Leber vorkommt. Bei der ASAT werden zwei Isoformen unterschieden, eine zytoplasmatische (20%) und eine mitochondriale (80%). Lokalisiert sind beide Isoformen vor allem in Leber und Herz [147]. Das Auftreten beider Enzyme in erhöhten Konzentrationen im Blut weist auf einen Leberschaden hin, wobei ihr Verhältnis zu einander, der sogenannte De-Ritis-Quotient, aufschlussreicher bezüglich der Leberfunktion ist, als die isolierte Betrachtung der einzelnen Werte [89, 147]. Der De-Ritis-Quotient für B6-Mäuse belief sich in NCD-Mäusen auf 0,6 und in HFD-Mäusen auf 0,9 (Abbildung 43). Der De-Ritis-Quotient für eine gesunde Leber beträgt 0,6-0,8. Werte < 1 sprechen für einen geringen Leberschaden. Ein De-Ritis-Quotient > 1 weist auf einen schweren Leberschaden hin [89]. Demzufolge war in HFD-B6-Mäusen bereits ein kleiner Leberschaden zu sehen. Diese Beobachtung wurde durch die für Adipositas typische [148], signifikante Erhöhung der Konzentration der ALP bestätigt (Abbildung 43). Die ALP ist unter anderem in der Niere, den Knochen, der Leber und der Plazenta zu finden. Serum-ALP stammt zu 50 % aus den Knochen und zu 50 % aus der Leber, wobei Anstiege der Serumwerte hauptsächlich Leber-assoziiert sind [147].

Bei JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäusen kam es durch die hochkalorische Diät zu keinem Anstieg der Leberenzyme im Serum (Abbildung 43). HFD-JHT- und -IgG1i-Mäuse wiesen sogar geringere Serumkonzentrationen der ALAT auf als ihre NCD-Kontrollmäuse. Derselbe Effekt war für HFD-IgMi-Mäuse und die ALP zu beobachten. Somit führte der Verlust von B-Zellen (JHT) sowie die Einschränkung der B-Zellen auf IgM (IgMi) und IgG1i (IgG1i) zu einem Schutz von HFD-induzierter Leberfunktionsstörung. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Studien zur Entstehung der nichtalkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) [149, 150]. So weisen Patienten mit NAFLD hohe Level an zirkulierenden Antikörpern gegen oxidativ veränderte Epitope (OSE, engl.: *oxidation-specific epitopes*), welche beispielsweise auch auf oxLDL oder apoptotischen Zellen zu finden sind [151],

sowie eine korrelierende B/-T-Zellinfiltration in die Leber auf [150]. Die selektive Depletion von B2-Zellen in Mäusen führte zu einer Verminderung der Steatohepatitis und der Fibroseprogression [150]. Des Weiteren konnten im EF adipöser BAFF^{-/-}-Mäuse verglichen mit Kontrolltieren verminderte Zahlen an M1-Makrophagen beobachtet werden. Zusätzlich zeigten diese Tiere eine Verbesserung der Leberfibrose [149].

Auch bei der Durchführung von ITT und GTT konnten signifikante Unterschiede zwischen den B6-Kontrollmäusen und den Knockout-Tieren beobachtet. Wie bereits beschrieben [95] führte die HFD-Fütterung bei Wildtyp-Mäusen zu einer Verschlechterung der Insulin- und der Glukosetoleranz. HFD-JHT-Mäuse hingegen zeigten keine verschlechterten Werte im GTT und ITT und blieben im GTT sogar auf dem gleichen Niveau wie ihre NCD-Kontrollmäuse (Abbildung 36, Abbildung 39). Verschiedene Publikationen haben diesen Effekt bereits gezeigt [95, 126], jedoch kam es bei Winer *et al.* beispielsweise nicht zu einem vollständigen Schutz vor Insulinresistenz wie er hier im ITT zu sehen ist. Dies könnte zum einen am unterschiedlichen Fettanteil im Futter der untersuchten Mäuse der beiden Experimente liegen. Zum anderen wurden die Mäuse bei Winer *et al.* wie in vielen anderen Metabolismusstudien für 16 Stunden nüchtern gesetzt. In der vorliegenden Arbeit hingegen waren die Mäuse immer nur für sechs Stunden nüchtern. Verlängerte Fastenperioden haben zur Folge, dass die Mäuse währenddessen bis zu 15 % Körpermasse abbauen und fast gänzlich die Glykogenspeicher der Leber leeren. Dies stabilisiert zwar die Basislinie des Blutzuckers und erleichtert somit die Interpretation von Glukosemetabolismusexperimenten. Aber Mäuse und Menschen unterscheiden sich in ihrer Reaktion auf lange Fastenperioden. In Menschen führt Fasten zu einer Beeinträchtigung der Insulin-stimulierten Glukosenutzung. In Mäusen hingegen wird diese durch Fasten angeregt. Außerdem sind Mäuse nachtaktiv. Fastenzeiten länger als acht Stunden werden jedoch in der Regel über Nacht durchgeführt [152]. Daher ist das Nüchternsetzen von Mäusen tagsüber für 6 Stunden physiologischer und erleichtert den Vergleich zum Menschen [153].

In IgMi-Mäusen kam es bei beiden Gruppen im ITT nach Insulininjektion zunächst zu einer gleichmäßigen Absenkung des Blutzuckerspiegels (Abbildung 36). Die Blutzuckerkonzentration von

HFD-IgMi-Mäusen stieg danach noch sechzig Minuten signifikant schneller an als die der NCD-Mäuse, was für eine abgeschwächte Insulinsensitivität durch die hochkalorische Diät spricht. Im GTT stieg die Blutzuckerkonzentration von HFD-IgMi-Mäusen auf einen höheren Wert an und blieb signifikant länger erhöht als die der zugehörigen NCD-Tiere. Das gleiche Verhalten war für JHT- und IgG1i-Mäuse zu beobachten (Abbildung 39). Jedoch war der Anstieg in allen drei Mausstämmen nach HFD-Fütterung signifikant geringer als in den HFD-B6-Mäusen (Abbildung 41), was auf eine verbesserte Glukosetoleranz und somit eine geringer beeinträchtigte Insulinsekretion in den B-Zell-Knockout-Tieren verglichen mit den B6-Mäusen schließen lässt. Dies wird noch verdeutlicht durch die signifikant kleineren Flächen unter den Kurven der GTTs (Abbildung 40).

Die Fläche zwischen den Kurven der ITTs (Abbildung 37) zeigt jedoch keinen Unterschied für B6- und IgMi-Mäuse, sondern nur eine Reduktion für JHT- und IG1i-Mäuse verglichen mit B6-Mäusen. Dies bekräftigt die zuvor beschriebene Beobachtung einer abgeschwächten Insulinsensitivität in HFD-IgMi-Mäusen. Hierfür könnte eine Erklärung sein, dass IgMi-Mäuse kein IgM sezernieren können. In B-Zell-Knockout-Mäusen, welche neun Wochen mit HFD (60 kJ%) gefüttert worden waren, konnte gezeigt werden, dass der Transfer von $5 \cdot 10^6$ B1a-Zellen aus gesunden Wildtyp-Mäusen zu einer verbesserten Glukose- und Insulintoleranz führt [138]. B1a-Zellen haben, wie beschrieben, die besondere Eigenschaft große Mengen an nIgM zu sekretieren [22]. Der Transfer von $3 \cdot 10^6$ B1a-Zellen aus sIgM^{null}-Mäusen, welche kein IgM sezernieren können und an der Oberfläche BCR vom Typ IgM und IgD tragen, hingegen führte nur zu einer leichten Verbesserung der Glukosetoleranz [138]. Da sIgM^{null}-Mäuse den in dieser Arbeit verwendeten IgMi-Mäusen sehr ähneln, könnte dieses Ergebnis, dass nämlich sezerniertes IgM eine schützende Funktion vor DIO-induzierter Insulinresistenz hat, die oben beschriebene Verschlechterung in der Insulinsensitivität verglichen mit dem vollen B-Zell-Knockout (JHT) erklären. Ein bestätigendes Ergebnis konnte in Id3^{BcellKO}-Mäusen, einer Mauslinie, deren B-Zellen signifikant mehr B1b-Zellen besitzen und deshalb mehr IgM sezernieren als B6-Kontrollmäuse, erzielt werden. So wiesen Id3^{BcellKO}-Mäuse nach zwölfwöchiger HFD-Fütterung (60 kJ%) eine bessere Glukosetoleranz als HFD-B6-Mäuse auf. Die Kurven für die NCD-Kontrolltiere zeigten keine Unterschiede. In einem Transferexperiment konnte die Bedeutsamkeit von sekretiertem IgM noch einmal unterstrichen werden. In B- und T-

Zell-defiziente Rag1^{-/-}-Mäuse wurden entweder $8 \cdot 10^4$ B1b-Zellen aus Wildtyp-, aus Id3^{BcellKO}- oder aus slgM^{-/-}-Mäusen transferiert, bevor die Mäuse zwölf Wochen einer HFD-Fütterung unterzogen wurden. slgM^{-/-}-Mäuse exprimieren den BCR des IgM-Typs und sezernieren IgG. Lediglich der Transfer von B1b-Zellen aus Id3^{BcellKO}-Mäusen führte zu einer Verbesserung der Glukosetoleranz gegenüber HFD-Rag1^{-/-}-Mäusen [154].

Die ITT-Kurven von IgG1i-Mäusen zeigten ein überraschendes Ergebnis. So wiesen die NCD-IgG1i-Mäuse eine stark ausgeprägte Insulinsensitivität auf. Nach der Insulininjektion fiel der Blutzuckerspiegel so stark ab, dass die Tiere lethargisch wurden und das Experiment frühzeitig abgebrochen werden musste. HFD-IgG1i-Mäuse hingegen zeigten eine ITT-Kurve, wie sie für NCD-B6-Kontrolltiere zu erwarten gewesen wäre (Abbildung 36). Dieses Ergebnis ist insbesondere in der Hinsicht unerwartet, dass in der Literatur ein negativer Einfluss von IgG und von B2-Zellen, welche IgG produzieren, auf Insulin- und Glukosetoleranz in DIO beschrieben wird [5, 95, 126, 138]. So führte der Transfer von $5 \cdot 10^6$ B2-Zellen aus der Milz von HFD-Wildtyp-Mäusen in HFD-B-Zell-Knockout-Mäuse zu einer verschlechterten Glukose- und Insulintoleranz gegenüber HFD-B-Zell-Knockout-Mäusen [138]. In einem anderen Experiment negierte der Transfer von $4 \cdot 10^6$ B2-Zellen aus dem Fettgewebe von HFD-Wildtyp-Mäusen (60 kJ%) in HFD-B-Zell-Knockout-Mäuse den zuvor beschriebenen Schutz der B-Zell-Knockout-Mäuse bezüglich DIO-induzierter Insulinresistenz. So verschlechterten sich auch hier GTT- und ITT-Werte durch den Transfer [126]. Dabei ist es jedoch wichtig zu bemerken, dass nur der Transfer von B2-Zellen aus adipösen Spendern zu einer Verschlechterung der Insulinsensitivität und Glukosetoleranz führte. So blieb der Transfer von $1 \cdot 10^7$ B-Zellen aus NCD-B6-Mäusen in HFD-B-Zell-Knockout-Mäuse ohne Effekt, während der von $1 \cdot 10^7$ HFD-B6-Mäusen in HFD-B-Zell-Knockout-Mäuse die zuvor beschriebenen pathologischen Veränderungen mit sich brachte [95]. Bezüglich der Wirkung von IgG unabhängig von B2-Zellen beschränkt sich in der Literatur auf Publikationen über den Effekt des Gesamt-IgGs ohne Unterscheidung der einzelnen Subtypen. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten IgG1i-Mäuse produzieren jedoch nur IgG1. Daher ist es möglich, dass der Schutz vor Insulinresistenz hier IgG1-vermittelt ist. Dass IgG1 keine schädigende Wirkung aufweist ist naheliegend, da es in HFD-B6-Mäusen (60 %kJ) zu keinem Anstieg von IgG1-Antikörpern, sondern nur von IgG2c-Antikörpern kam.

Der Transfer von Gesamt-IgG aus NCD-B6-Mäusen in HFD-B-Zell-Knockout-Mäuse führte zu keiner Veränderung der GTT- und ITT-Werte sowie der Nüchtern-Insulinkonzentration [95]. Der Transfer von Gesamt-IgG aus HFD-B6-Mäusen in HFD-B-Zell-Knockout-Mäuse jedoch beeinflusste diese drei Werte negativ. Hierbei war der Effekt umso stärker, je länger die Spender-Mäuse mit HFD-gefüttert worden waren. IgG hat dementsprechend in DIO einen direkten und schädigenden Einfluss auf den Insulinmetabolismus [95].

Bei Betrachtung der Nüchtern-Glukose- und -Insulinkonzentrationen (Abbildung 42) fällt auf, dass verglichen mit HFD-B6-Mäusen sowohl der Verlust von B-Zellen als auch die Veränderung des B-Zellrepertoires zu einer Absenkung dieser beiden Werte nach HFD-Fütterung führte. Im Vergleich mit den jeweils zugehörigen NCD-Kontrollmäusen zeigte sich neben HFD-B6-Mäusen auch bei HFD-JHT- und -IgMi-Mäusen ein leichter, nicht signifikanter Anstieg der Nüchtern-Glukosekonzentrationen, aber nur bei HFD-IgMi-Mäusen eine leichte Erhöhung der Nüchtern-Insulinkonzentration. Dies steht im Einklang mit der Literatur, wo dieser Effekt für B-Zell-Knockout-Mäuse, welche 16 Wochen mit HFD (60 kJ%) gefüttert wurden, beschrieben wurde [95]. Aufgrund der erhöhten Nüchtern-Glukosekonzentration führte die Errechnung des HOMA-IRs (Tabelle 14) für HFD-JHT-Mäuse, trotz einer unveränderten Nüchtern-Insulinkonzentration, zu einem Ergebnis, welches eine erhöhte Wahrscheinlichkeit von Insulinresistenz nahelegt. Diese konnte noch nicht im ITT oder GTT beobachtet werden. Der Verlust von B-Zellen demonstrierte hier also eine starke, wenn auch nicht vollständige, schützende Wirkung vor der Entwicklung von Insulinresistenz. HFD-IgMi-Mäuse zeigten jedoch einen HOMA-IR-Wert wie er für T2DM-Patienten typisch wäre. Es liegt sehr wahrscheinlich eine Insulinresistenz vor, was auch mit den Beobachtungen im ITT konform geht. Allerdings ist es hier notwendig zu erwähnen, dass der HOMA-IR-Wert von HFD-B6-Mäuse mehr als dem 7-fachen Wert der HFD-IgMi-Mäuse entspricht und HFD-IgMi-Mäuse somit ebenfalls einen partiellen Schutz vor Adipositas-induzierter Insulinresistenz aufweisen. Dass kein vollständiger Schutz auftritt ist, wie zuvor beschrieben, vermutlich durch die fehlende Fähigkeit von IgMi-Mäusen IgM zu sezernieren zu erklären [138, 154]. Nur in IgG1-Mäusen konnte über den HOMA-IR eine Insulinresistenz gänzlich ausgeschlossen werden.

Wie bereits erwähnt gehen Insulinresistenz und T2DM mit der Inflammation von Fettgewebe einher [133]. Nachdem hier bereits für B6-Mäuse gezeigt werden konnte, dass durch HFD-Fütterung vermehrt CTL und M1-Makrophagen im EF zu finden waren, wurden diese Experimente auch für JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäuse wiederholt. In JHT- und IgMi-Mäusen kam es nach 21-wöchiger HFD-Fütterung ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der CTL verglichen mit ihren NCD-Kontrollmäusen (Abbildung 44, linke Spalte). Der Anstieg von sekretorisch aktiver CTL in HFD-B6-Mäusen war jedoch signifikant höher als der in HFD-JHT- und -IgMi-Mäusen. Dieses Ergebnis ist zum einen in Übereinstimmung mit der Literatur, wo beschrieben wird, dass nach zwölfwöchiger HFD-Fütterung (60 kJ%) im Fettgewebe von B-Zell-Knockout-Mäusen erhöhte Mengen an sekretierenden CTL zu finden sind, diese wie hier jedoch seltener auftreten als in HFD-B6-Mäusen [95]. Zum anderen passen sie zu den Ergebnissen zur Insulinresistenz, welche zeigten, dass diese in HFD-JHT-wahrscheinlich und in HFD-IgMi-Mäusen sicher ist. In HFD-IgG1i-Mäusen kam es zu keinem Anstieg von CTL im EF, was erneut ihren Schutz vor Insulinresistenz bestätigt.

Auch M1-Makrophagen konnten im EF von HFD-IgG1i-Mäusen verglichen mit NCD-IgG1i-Mäusen nicht vermehrt beobachtet werden (Abbildung 46, linke Spalte). Das gleiche gilt für HFD-JHT- und -IgMi-Mäuse, auch wenn hier ein leichter Trend zu beobachten ist. Dieses Ergebnis zeigt erneut, den Schutz von HFD-JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäusen vor DIO-induzierter Insulinresistenz. Die verringerte Infiltration von M1-Makrophagen nach HFD-Fütterung (60 kJ%, zwölf Wochen) in B-Zell-Knockout-Mäusen wurde so auch von Winer *et al.* beschrieben [95].

In Bezug auf B-Zell-Subpopulationen kam es bei HFD-IgMi-Mäusen genauso wie bei HFD-B6-Mäusen zu keiner fütterungsbedingten Verschiebung zugunsten einer bestimmten B-Zell-Subpopulation (Abbildung 45, oben), wenn auch zu einem Anstieg der Gesamt-B-Zellzahl im Fettgewebe. Auch in IgG1i-Mäusen war die B-Zellinfiltration nach HFD-Gabe im Trend zu beobachten. Die vermehrt auftretenden B-Zellen waren alle vom Typ B2, wodurch auch eine prozentuale Verschiebung der B-Zell-Subpopulationen stattfand. Dadurch aber, dass IgG1i-Mäuse beinahe keine B1-Zellen entwickeln können (Abbildung 31), da sie durch ihre Veränderungen auf den Keimbahnen

keine B-Zellen mit IgM als BCR ausbilden können, deutet diese Verschiebung keineswegs eine Insulinresistenz-typische Inflammation an.

Da bei JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäusen der Schutz der vor DIO-induzierter Leberdysfunktion beobachtet werden konnte, wurde auch die Immuzellinfiltration in die Leber nach HFD untersucht. Hierbei kam es in keinem der vier Mausstämmen zu einem vermehrten oder verringerten Auftreten von Neutrophilen, Monozyten, M1- oder M2-Makrophagen (Abbildung 46, rechte Spalte) und B1-, B2- oder NK-Zellen (Abbildung 45 unten). Auch die Zahl der T-Zellen, ob T_H-Zellen oder CTL, blieben nach HFD-Fütterung für B6-, JHT- und IgG1i-Mäuse unverändert (Abbildung 44, rechte Spalte). Lediglich HFD-IgMi-Mäuse zeigten einen Anstieg von T_H-Zellen und CTL. Um hieraus jedoch auf einen Einfluss auf die Leberfunktion zu schließen, bedarf es weiterer Experimente.

Aus den oben dargestellten Ergebnissen wird klar, dass IgG1i-Mäuse im Gegensatz zu IgMi-Mäusen bezüglich DIO-vermittelter Insulinresistenz geschützt sind. Beide Maustypen können B-Zellen produzieren, die sich jedoch in ihrem Fähigkeitspotential unterscheiden. So ist es möglich, dass das sezernierte IgG1 der IgG1i-Mäuse eine schützende Funktion hat und das Fehlen des sezernierten IgM in den IgMi-Mäusen wie in der Literatur beschrieben [138, 154] zur Entwicklung von Insulinresistenz führt. Eine weitere Möglichkeit wäre jedoch auch, dass es durch HFD-Fütterung zu einer Schädigung der BCR-Signalweitergabe kommt. Jeder BCR besteht aus einem Membran-gebundenen Immunglobulin und einem Heterodimer Ig α /Ig β , welches für die Signaltransduktion verantwortlich ist [155, 156]. Das Ig α /Ig β -Dimer ragt bis ins Zytoplasma hinein und enthält dort tyrosinreiche Bereiche, die sogenannten *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs* (ITAMs) [157], welche bei Antigenbindung an den BCR phosphoryliert werden [96]. Während das Ig α /Ig β -Dimer für die Signaltransduktion des IgM-BCR unentbehrlich ist [96], haben die BCR des Typs IgA, IgE und IgG selbst zytoplasmatische Schwänze, welche an der Signaltransduktion beteiligt sind [79, 158, 159]. Für den IgG1-BCR konnte sogar gezeigt werden, dass die γ 1-Kette das Ig α /Ig β -Dimer teilweise ersetzen kann [79]. Hierbei konnte in IgG1i-Mäusen, welche eine Deletion im zytoplasmatischen Schwanz von Ig α oder Ig β hatten, gezeigt werden, dass Ig β für die IgG1-

Signaltransduktion zwingen notwendig ist, die Funktion von Ig α aber durch die γ 1-Kette kompensiert werden kann [96]. Aus diesem Grund wäre es möglich, dass eine HFD-Fütterung die Ig α -Kette schädigt und so die Entstehung einer Insulinresistenz ermöglicht, weil die Signaltransduktion in IgMi-Mäuse gestört wird. In IgG1i-Mäusen würde eine DIO-vermittelte Schädigung von Ig α wegen der einzigartigen Eigenschaft der γ 1-Kette nicht diese Folge bedingen, was den Schutz vor Insulinresistenz erklären würde. Um die Folgen von HFD-Fütterung auf Ig α zu untersuchen, wurde die Expression von Ig α (CD79) in B6-Mäusen nach 21-wöchiger HFD-Fütterung verglichen mit NCD-B6-Mäusen im Blut der Tiere untersucht. Es kam durch HFD-Fütterung zu keiner veränderten Expressionsrate von Ig α (Abbildung 49). Schlussfolgernd ist die DIO-induzierte Insulinresistenz nicht durch eine Schädigung von Ig α - beziehungsweise des IgM-BCR vermittelt.

Bis dato sind demzufolge die B-Zell-vermittelten Mechanismen, welche zu DIO-induzierter Insulinresistenz führen, nicht vollständig aufgeklärt. Klar ist, dass sie die T-Zell-vermittelte Sekretion von inflammatorischen Zytokinen wie INF- γ induzieren. Dies führt zur beschriebenen M1-Makrophagen-Polarisation. Außerdem können sie selbst Zytokine produzieren, welche die Inflammation verstärken und Insulinresistenz fördern. Wie Antikörper, insbesondere IgG, Insulinresistenz vermitteln ist nicht geklärt [95]. Bekannt ist nur, dass dieser Mechanismus weder über das Komplementsystem abläuft noch über den Fc-Rezeptor von IgG vermittelt wird [160].

Zusammengefasst wiesen JHT- und IgG1i-Mäuse einen Schutz vor DIO-induzierter Insulinresistenz auf. IgMi-Mäuse entwickelten eine Insulinresistenz, was anhand der verschlechterten Werte im ITT, der erhöhten Nüchtern-Insulin- und -Glukosekonzentrationen und daraus resultierendem HOMA-IR-Wert im Bereich von T2DM-Patienten sowie der verstärkten Immunzellinfiltration zu sehen ist. B-Zell-vermittelte Insulinresistenz erscheint weder über den IgM-BCR noch über IgG1-Antikörper induziert.

6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass B-Zellen eine schützende Funktion bezüglich des vaskulären Relaxationsvermögens haben. Sie regulieren die Neutrophilenzahlen im Knochenmark und der Peripherie und verhindern somit die Schädigung der vaskulären Funktion durch Neutrophile. Es ist jedoch noch nicht klar, wie Neutrophile ihren Effekt auf die Gefäßfunktion ausüben.

Eine Möglichkeit wäre die Katalyse der Entstehung von oxidativem Stress durch ihre Fähigkeit ROS zu produzieren [33]. ROS sind Sauerstoffverbindungen, die freie Radikale tragen. Aufgrund ihres Elektronenmangels sind sie extrem instabil [161]. Unter physiologischen Bedingungen tragen sie zur Kontrolle der vaskulären Funktion durch die Regulation verschiedener redoxsensitiver Signalwege bei [162]. Übersteigt der ROS-Level jedoch das Kompensationsniveau der zellulären Abwehrmechanismen, entsteht oxidativer Stress. Als Folge können nicht detoxifizierte ROS Lipide, DNA und Proteine angreifen [163, 164]. Außerdem initiiert oxidativer Stress endotheliale Dysfunktion und Inflammation in vielen Zellen der Gefäßwand [162]. Die Inflammation in der Gefäßwand kann dann zu einem vaskulären Schaden führen, welcher die Vasokonstriktion und den Umbau der Blutgefäße unterstützt [165, 166].

Daher wäre es interessant die ROS-Produktion in JHT-Mäusen zu messen und mit der in B6-Mäusen zu vergleichen. Eine Möglichkeit hierfür wäre es, die Zellen der Aorta zu vereinzeln und auf eine Zellkulturschale auszusäen. Mithilfe des Markers CM-H₂DCFDA könnte dann durchflusszytometrisch die intrazelluläre ROS-Konzentration bestimmt werden. CM-H₂DCFDA wird nach seiner passiven Diffusion ins Zellinnere metabolisiert. Esterasen spalten die Acetatgruppen des Markers ab und seine Chlormethylgruppe reagiert mit intrazellulären Thiolen, sodass CM-H₂DCFDA durch ROS oxidiert werden kann. Das oxidierte Produkt fluoresziert und kann das Zellinnere nicht mehr verlassen [167].

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die von Neutrophilen produzierten NETs zur Schädigung der vaskulären Funktion führen [33]. Nach Aktivierung können Neutrophile NETs produzieren, indem

sie den Weg des programmierten Zelltods, der in diesem Fall NETose genannt wird, einschlagen [168]. Es konnte gezeigt werden, dass NETs die Progression von Arteriosklerose, Thrombose und anderen vaskulären Komplikationen vorantreiben [169]. Um zu untersuchen, ob die Neutrophilendysregulation bei B-Zellverlust über NETose zur vaskulären Dysfunktion führt, könnte diejenige von JHT-PAD4-Doppelknockout-Mäusen analysiert werden. Peptidylarginin-Deiminasen (PAD) katalysieren durch Deiminierung oder Demethyliminierung die posttranslationale Modifikation von Argininresten von Proteinen zu Citrullin [170]. PAD4 wird in Granulozyten exprimiert und ist aufgrund seiner Katalyse der Histon-Citrullinierung essentiell für die NET-Bildung [171]. Wären NETs für die vaskuläre Dysfunktion in JHT-Mäusen verantwortlich, müssten JHT-PAD4-Doppelknockout-Mäuse dementsprechend vor vaskulärer Schädigung durch Neutrophile geschützt sein.

Auch ist noch ungeklärt wie B-Zellen mit Neutrophilen kommunizieren, beziehungsweise wie B-Zellen die Neutrophilenzahl regulieren. Eine Möglichkeit hierfür wäre das durch B1-Zellen sezernierte IgM. Um dies zu untersuchen, könnte die vaskuläre Funktion von JHT-Mäusen gemessen werden, nachdem sie IgM aus B6-Mäusen erhalten haben.

Außerdem wissenswert wäre die durchflusszytometrisch bestimmbare Zahl der Neutrophilen im Blut im Anschluss an dieses Transferexperiment.

Dass der Insulinstoffwechsel in HFD-JHT-, -IgMi- und -IgG1i-Mäusen verglichen mit HFD-B6-Mäusen verändert ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit demonstriert werden. Es ist jedoch nicht klar, wie diese Unterschiede mechanistisch hervorgerufen werden. Daher sollte dies in zukünftigen Experimenten untersucht werden. Welche Folgen Adipositas auf den Insulinstoffwechsel im Allgemeinen hat, konnte bereits weitgehend beschrieben werden.

So konnte in Nagetieren beispielsweise gezeigt werden, dass unter Adipositas eine Phosphorylierung von IRS-1 am Ser³⁰⁷ zu einer Inhibition der Signaltransduktion führt. IRS-1 wird vom IR entkoppelt und die Tyrosinphosphorylierung vermindert. Es kommt zu vermehrter Degradierung.

Dieser Effekt konnte im Fettgewebe von HFD-gefütterten Mäusen beobachtet werden. Die Phosphorylierung an Ser⁶¹² und Ser⁶³² wiederum reduziert die Assoziation der PI3K. Erhöhter Level von pSer⁶³² wurden ebenfalls im Fettgewebe von Mäusen mit HFD-induzierter Adipositas beschrieben [40].

Fernerhin kann es bei Insulinresistenz und T2DM zu verminderter aPKC-Aktivierung in Muskel- und Fettgewebe und damit einhergehender Blockade der Translokation der GLUT4-Transporter kommen. Zusätzlich ist bei Adipositas eine vermehrte Phosphorylierung der Diacylglycerol-abhängigen Proteinkinase C (PKC)-Untergruppe nPKC (engl.: *novel protein kinase C*, alternative Isoformnamen: PKC δ , ϵ θ) zu beobachten. Wegen eines erhöhten Angebots bei der HFD-Fütterung kommt es durch die vermehrte Aufnahme von ungesättigten Fettsäuren in die Zelle es zu vermehrtem Auftreten von Diacylglycerol [50]. Dieses aktiviert die nPKC und führt so zu einer Blockade der Signaltransduktion auf Ebene des IR und des IRS-1 [50] (PKC θ : Phosphorylierung an Ser³⁰⁷ von IRS-1 [40]).

Auch die Signaltransduktion des Insulinimpulses über Akt und seine Zielstruktur AS160 kann bei T2DM und Adipositas blockiert sein. So konnte gezeigt werden, dass Patienten mit T2DM eine verminderte Phosphorylierungen am Tyr⁶⁴² des AS160 in der Skelettmuskulatur aufwiesen [53]. Auch zeigten HFD-gefütterte Mäuse im Fettgewebe eine geringere Phosphorylierungsrate am Ser⁴⁷³ der Akt [129].

Auf Ebene der AMPK führt Adipositas gleich an zwei Stellen zu einer Behinderung der Signalkaskade. Zum einen konnte gezeigt werden, dass in HFD-gefütterten Ratten die Gesamtaktivität der AMPK in der Leber und im weißen Fettgewebe verringert ist [172]. Zum anderen wiesen adipöse Mäuse im Fettgewebe weniger pThr¹⁷² im Vergleich zu gesunden Kontrollmäusen auf [129].

Die Folge aller beschriebenen Veränderungen ist eine verringerte Glukoseaufnahme in die Zellen und damit einhergehend ein erhöhter Blutglukosespiegel. In zukünftigen Experimenten wäre es interessant zu untersuchen, ob diese Abänderungen der Insulinsignalkaskade auch in HFD-JHT-, -

IgMi- und IgG1i-Mäusen zu beobachten sind. Hierfür könnten Western-Blot-Analysen von Aorta, PVAT oder Muskelgewebe durchgeführt werden.

Obwohl in der Literatur beschrieben wurde, dass der Transfer von IgG aus HFD-B6-Mäusen in HFD-B-Zell-Knockout-Mäuse zu einer Verschlechterung der Insulinsensitivität führte [95], konnte dieser Effekt nicht für HFD-IgG1i-Mäuse beobachtet werden. Daher kann angenommen werden, dass IgG von IgG1-Typ in DIO nicht für die Entstehung von Insulinresistenz verantwortlich ist. Um zu untersuchen, ob IgG1 sogar einen Schutz vor DIO-induzierter Insulinsensitivität darstellt, könnte ein IgG1-Transfer von HFD-B6-Mäusen in HFD-JHT-Mäuse durchgeführt werden und anschließend der Insulinmetabolismus über GTT, ITT und Bestimmung der Nüchtern-Glukose- und Insulinkonzentrationen untersucht werden. Um diejenige IgG-Subpopulation zu identifizieren, welche für die Senkung der Insulinsensitivität durch hochkalorische Diät verantwortlich ist, wäre auch eine Isolierung der übrigen IgG-Subpopulationen (IgG2a/c, IgG2b, IgG3) aus HFD-B6-Mäusen mit anschließendem Transfer in HFD-JHT-Mäuse sinnvoll.

Weiterhin konnte in der Literatur die Wirkung von B1- und B2-Zellen auf Progression von Adipositas-induzierte Insulinresistenz gezeigt werden [126, 138]. Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit durch die Analysen der Werte bei IgMi-Mäusen und IgG1i-Mäusen ergänzt wurden. Hierbei wurden durch die Literatur und diese Arbeit B2-Zellen [126] und IgG [95] schädigende und B1a- und B1b-Zellen sowie sekretiertem IgM schützende Eigenschaften zugewiesen [138, 154]. Insgesamt wurden jedoch zwei Subpopulationen von B-Zellen bei diesen Untersuchungen vernachlässigt.

So ist bisher unklar, ob und wie B_{reg} -Zellen bei der Entstehung von DIO-induzierter Insulinresistenz wirken. Bisher konnte zwar in gesunden Mäusen gezeigt werden, dass die Depletion von B_{reg} -Zellen zu Insulinresistenz führt [173]. Wie B_{reg} -Zellen in DIO wirken ist bisher jedoch nicht bekannt. Daher wäre auch hier der Transfer von B_{reg} -Zellen aus HFD-B6-Mäusen in HFD-JHT-Mäuse mit anschließender Messung der einschlägigen Insulinmetabolismuskennwerte (ITT, GTT, Nüchtern-Insulin- und -Glukosekonzentration) von Interesse. Da in adipösen Mäusen gezeigt werden konnte,

dass B_{reg}-Zellen die Inflammation im Fettgewebe der Tiere senkten [174], ist ein Schutz vor DIO-vermittelter Insulinresistenz durch B_{reg}-Zellen wahrscheinlich.

Die Rolle von sogenannten *innate response activator* (IRA)-B-Zellen bei der Entstehung von DIO-induzierter Insulinresistenz ist noch komplett ungeklärt. IRA-B-Zellen sind eine Subpopulation von B1a-Zellen, welche entstehen, wenn B1a-Zellen mit Lipopolysacchariden in Kontakt kommen [175]. Lipopolysaccharide werden von Gram-negativ Bakterien im Verdauungstrakt oder während bakterieller Infekte produziert. Vom Darm gelangen Lipopolysaccharide entweder innerhalb von Chylomikronen oder über Lücken zwischen den Epithelzellen der Darmwand, welche durch Bakteriensekrete geschädigt wurde, in den Blutstrom. Dort werden sie über *pattern recognition*-Rezeptoren wie dem *toll-like*-Rezeptor 4 auf der Oberfläche von Immunzellen erkannt und lösen eine Entzündungsreaktion aus. Fettreiche Nahrung erleichtert die Chylomikronenbildung und führt so zu einer erhöhten Menge an Lipopolysacchariden im Blut [176].

Das vermehrte Aufkommen von IRA-B-Zellen in sekundären Lymphorganen konnte bereits in Nagetieren, welche eine fettreiche Diät verabreicht bekommen hatten, nachgewiesen werden. Durch ihre Fähigkeit den Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor zu produzieren, konnten IRA-B-Zellen außerdem bereits mit der Progression von Arteriosklerose in Verbindung gebracht werden [177]. Daher wäre es möglich, dass durch HFD-Fütterung IRA-B-Zellen an der resultierenden vaskulären Dysfunktion in B6-Mäusen beteiligt sind und dass durch ihr Fehlen HFD-JHT-Mäuse geschützt sind. Um dies untersuchen zu können, könnte zunächst durchflusszytometrisch untersucht werden, ob in HFD-B6-Mäusen mehr IRA-B-Zellen auftreten als in NCD-B6-Mäusen. Hierbei wären vor allem die Zahlen im Blut, der Aorta und dem PVAT von Interesse. Weiterhin könnte im Serum der Tiere der Konzentrationsspiegel des Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktors bestimmt werden. Für eine Analyse der Verwicklung von IRA-B-Zellen in die Entstehung von DIO-induzierter Insulinresistenz könnten IRA-B-Zellen aus HFD-B6-Mäusen isoliert werden und in HFD-JHT-Mäuse transferiert werden. Im Anschluss sollten ITT, GTT und die Nüchtern-Insulin- und Glukosekonzentrationen gemessen werden.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

ACh	<i>Acetylcholin</i>
AG	<i>Antigen</i>
ALAT	<i>Alanin-Aminotransferase</i>
ALP	<i>Alkalische Phosphatase</i>
AMPK	<i>AMP-abhängigen Kinase</i>
APC	<i>Antigenpräsentierende Zellen</i>
aPKC	<i>Atypische Protein Kinase C</i>
APRIL	<i>A proliferation-inducing ligand</i>
ASAT	<i>Aspartat-Aminotransferase</i>
B2-FO	<i>Follikuläre B2-Zellen</i>
B2-MZ	<i>B2-Zellen der Randzone</i>
B6	<i>C57BL/6J-Maus, Kontroll Maus</i>
BAFF	<i>B-Zell-aktivierende Faktor der TNF-Familie</i>
BCR	<i>B-Zellrezeptor</i>
Beads	<i>Kompensationskügelchen</i>
B _{reg} -Zellen	<i>Regulatorische B-Zellen</i>
BSA	<i>Albumin Fraktion V</i>
cGMP	<i>Cyclisches Guanosinmonophosphat</i>
CLP	<i>Gemeinsame lymphatische Vorläuferzellen</i>
CMP	<i>Gemeinsame myeloide Vorläuferzellen</i>
CTL	<i>Cytotoxische T-Lymphozyten</i>
DC	<i>Dendritische Zelle</i>
DIO	<i>Diet induced obesity</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>
EF	<i>Epididymales Fettgewebe</i>

ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EP	<i>Erythrozyten Lyse Puffer</i>
FCS	<i>Fötales Kälberserum</i>
FDC	<i>Follicular dendritic cell</i>
FSC-A	<i>Forward Scatter-Area</i>
FSC-H	<i>Forward Scatter-Height</i>
GC	<i>Keimzentrum</i>
GLUT4-Transporter	<i>Glukosetransporter Typ 4</i>
GMP	<i>Granulozyten-/Makrophagen-Vorläuferzellen</i>
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GTT	<i>Glukosetoleranztest</i>
HBSS	<i>Hancs' balanced Salt solution</i>
HFD	<i>High fat diet</i>
H-Kette	<i>Schwere Kette</i>
HOMA-IR	<i>Homeostasis Modell Assessment Test, Insulinresistence</i>
HSC	<i>Hämatopoetischen Stammezellen</i>
Ig	<i>Immunglobulin</i>
IgG1i	<i>Maus vom IgG1-Typ, IgG1-Sezernierung möglich</i>
IgH	<i>Schwere Kette der Immunglobuline</i>
IgMi	<i>C57BL/6J-Maus mit nur B-Zellen vom IgM-Typ, keine Antikörpersezernierung</i>
IL	<i>Interleukin</i>
IL-7	<i>Interleukin-7</i>
INF- γ	<i>Interferon-γ</i>
IP ₃	<i>Inositoltriphosphat</i>
IR	<i>Insulinrezeptor</i>
IRS	<i>Insulinrezeptorsubstrat</i>
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITT	<i>Insulintoleranztest</i>
JHT	<i>B-Zell-Knockoutmaus mit C57BL/6JRj-Hintergrund</i>
KHK	<i>Koronare Herzkrankheit</i>

KM	<i>Knochenmark, Knochenmark</i>
MEP	<i>Megakaryocyten-/Erythrozytenvorläuferzellen</i>
MHC	<i>Haupthistokompatibilitätskomplex</i>
MP	<i>MACS-Puffer</i>
MPP	<i>Multipotenten Vorläuferzellen</i>
mTOR	<i>Mechanistic Target for Rapamycin</i>
NAFLD	<i>Nichtalkoholische Fettlebererkrankung</i>
NCD	<i>Normal chow diet</i>
NETs	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
Neutrophile	<i>Neutrophile Granulozyten</i>
nIgM	<i>Natürliches IgM</i>
NK-Zellen	<i>Natürliche Killerzellen</i>
NO	<i>Stickstoffmonoxid</i>
NOS	<i>Stickstoffmonoxidsynthase</i>
nPKC	<i>Novel protein kinase C</i>
OSE	<i>Oxidativ veränderte Epitope, Oxidiertes Epitop</i>
oxLDL	<i>Oxidiertes LDL</i>
PAD	<i>Peptidylarginin-Deiminiase</i>
PBS	<i>Dulbecco's Phosphate buffered Saline</i>
PDK1	<i>Phosphoinositide-dependent kinase 1</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i>
PIP ₂	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat</i>
PIP ₃	<i>Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat</i>
PKC	<i>Proteinkinase C</i>
PVAT	<i>Perivaskuläres Fettgewebe</i>
pY	<i>Phosphotyrosin</i>
ROS	<i>Reaktive Sauerstoffspezies</i>
SAA	<i>Serumalbumin A</i>
SCF	<i>Stammzellofaktor</i>
SEM	<i>Standardfehler des Mittelwerts</i>

sGC	<i>Lösliche Guanylatzyklase</i>
SH2	<i>Src-homology 2</i>
SHM	<i>Somatische Hypermutation</i>
SSC-A	<i>Side Scatter-Area</i>
T2DM	<i>Diabetes Mellitus Typ 2</i>
T _H 17-Zelle	<i>Typ 17-T-Helferzelle</i>
T _H 1-Zelle	<i>Typ 1-T-Helferzelle</i>
T _H 2-Zelle	<i>Typ 2- T-Helferzelle</i>
T _H -Zelle	<i>T-Helfer-Zelle</i>
T _{reg} -Zelle	<i>Regulatorische T-Zelle</i>
UE	<i>Untereinheit</i>
VS	<i>Viabilitätsfarbstoff</i>
WHO	<i>Weltgesundheitsorganisation</i>
X	<i>Beliebige Aminosäure</i>

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hämatopoese der Lymphozyten und Leukozyten im Knochenmark.	2
Abbildung 2: Schema der somatischen Rekombination der Gensegmente der H- und L-Ketten der B-Zellreifung im KM nach Murphy et al.[4].	4
Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung der Entstehung der H-Kette von der Keimbahn zur Polypeptidkette nach Murphy et al.[4].	5
Abbildung 4: B-Zellreifung in den sekundären lymphatischen Organen.	7
Abbildung 5: Insulinsignaltransduktion.	15
Abbildung 6: Gating-Strategie: Immunzell-Hauptgruppen.	43
Abbildung 7: Gating-Strategie: B-Zell-Subpopulationen.	44
Abbildung 8: Gating-Strategie: T-Zell-Subpopulationen.	45
Abbildung 9: Gating-Strategie: Myelomonozytische Zellen.	46
Abbildung 10: Gating-Strategie: Fokus CTL.	47
Abbildung 11: Gating-Strategie: Fokus M1-Makrophagen.	48
Abbildung 12: Gating-Strategie: HSC/ CMP/ GMP/ MEP.	48
Abbildung 13: Der Einfluss von B-Zellen auf die vaskuläre Funktion.	58
Abbildung 14: Immunzellvorkommen in 17 Wochen alten Mäusen.	60
Abbildung 15: T-Zellvorkommen in 17 Wochen alten Mäusen.	62
Abbildung 16: Vorkommen von myelomonozytischen Zellen in 17 Wochen alten Mäusen.	64
Abbildung 17: Immunzellen des Knochenmarks.	66
Abbildung 18: Neutrophilendepletion im Blut.	67
Abbildung 19: Neutrophilendepletion.	68
Abbildung 20: Der Einfluss von Neutrophilen auf die vaskuläre Funktion.	69
Abbildung 21: Serumalbumin A Konzentration im Blut.	70
Abbildung 22: B1- und B2-Zellanreicherung.	72
Abbildung 23: B-Zellen in Milz und Peritonealraum nach B-Zelltransfer.	73
Abbildung 24: B-Zellen in Milz und Peritonealraum nach B-Zelltransfer.	74

Abbildung 25: Der Einfluss von B1- und B2-Zellen auf die vaskuläre Funktion.....	75
Abbildung 26: T-Zellen und myelomonozytischen Zellen im Blut von JHT-Mäusen nach B-Zelltransfer.	77
Abbildung 27: Die vaskuläre Funktion von IgMi- und IgG1i-Mäusen.....	79
Abbildung 28: Immunzellvorkommen in 7 Wochen alten Mäusen.....	81
Abbildung 29: T-Zellvorkommen in 7 Wochen alten Mäusen. Aus 7 Wochen alten B6-, JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäusen wurden Blut, Milz, Aorta mit PVAT, EF und Leber entnommen.	83
Abbildung 30: Vorkommen von myelomonozytischen Zellen in 7 Wochen alten Mäusen.	85
Abbildung 31: B-Zellvorkommen in 7 Wochen alten Mäusen.....	87
Abbildung 32: Prozentuale Gewichtszunahme von B6-, JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäusen über 21-wöchige NCD- und HFD-Fütterung.	89
Abbildung 33: Futteraufnahme von B6-, JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäuse über 21 Wochen ad libitum Fütterung mit NCD oder HFD in Gramm (A) und Kilokalorien (B) pro Woche pro Tier.	91
Abbildung 34: Leber, EF und Muskelgewicht von B6-, JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäuse nach 21-wöchiger ad libitum-Fütterung mit NCD oder HFD.	93
Abbildung 35: Der Einfluss von Adipositas auf die vaskuläre Funktion.....	94
Abbildung 36: Insulintoleranztest.....	97
Abbildung 37: Fläche zwischen den zueinander gehörenden ITT-NCD- und -HFD-Kurven.....	98
Abbildung 38: Insulintoleranztest, Darstellung nach experimenteller Diät. B6-, JHT-, IgMi-, IgG1i-Mäuse wurden 15 Wochen lang mit NCD- oder HFD-Futter gefüttert.	99
Abbildung 39: Glukosetoleranztest. B6-, JHT-, IgMi-, IgG1i-Mäuse wurden 17 Wochen lang mit NCD- oder HFD-Futter gefüttert.	101
Abbildung 40: Fläche zwischen den zueinander gehörenden GTT-NCD- und -HFD-Kurven.	102
Abbildung 41: Glukosetoleranztest, Darstellung nach experimenteller Diät.....	103
Abbildung 42: Nüchtern-Glukose- und -Insulinkonzentrationen.	105
Abbildung 43: Serumlipide und -enzyme. B6-, JHT-, IgMi-, IgG1i-Mäuse wurden 21 Wochen lang mit NCD- oder HFD-Futter gefüttert.....	108
Abbildung 44: T-Zellinfiltration in EF und Leber unter HFD.	110

Abbildung 45: B-Zell- und NK-Zellinfiltration in EF und Leber unter HFD.	112
Abbildung 46: Makrophageninfiltration in EF und Leber unter HFD. B6-, JHT-, IgMi- und IgG1i-Mäusen wurden 21 Wochen lang mit NCD- oder HFD-Futter gefüttert.	114
Abbildung 47: IgM ⁺ CD79 ⁺ -B-Zellen. B6 -Mäusen wurden 21 Wochen lang mit NCD- oder HFD-Futter gefüttert.	116
Abbildung 48. IgM ⁺ CD79 ⁺ -B-Zellen in absoluten Zahlen. B6 -Mäusen wurden 21 Wochen lang mit NCD- oder HFD-Futter gefüttert.	117
Abbildung 49: B-Zellvermittelter Schutz der vaskulären Funktion. Schematische Darstellung. .	127

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien und gekaufte Puffer.....	22
Tabelle 2: Hergestellte Puffer und Lösungen.....	24
Tabelle 3: Antikörper und Kompensationskügelchen.....	25
Tabelle 4: Enzyme	27
Tabelle 5: Geräte und Materialien.....	27
Tabelle 6: Kits	29
Tabelle 7: Verwendete Software	30
Tabelle 8: Mausstämme.....	32
Tabelle 9: Antikörper Stammlösungen	40
Tabelle 10: Zusammensetzung der NCD [84] und HFD [85]	51
Tabelle 11: HOMA-Index [88]	53
Tabelle 12: Serumlipide, -glukose.....	53
Tabelle 13: Serumenzyme.....	54
Tabelle 14: HOMA-IR.....	106

8 Literaturverzeichnis

1. Rieger, M.A. and T. Schroeder, *Hematopoiesis*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2012. **4**(12).
2. Rolink, A.G., et al., *Early lymphocyte development in bone marrow and thymus*. Swiss Med Wkly, 2006. **136**(43-44): p. 679-83.
3. Lu, R., et al., *Clonal Stability of Murine Hematopoietic Stem Cells in Vivo*. Experimental Hematology, 2011. **39**(8): p. S51-S52.
4. Murphy, K.T., P.; Walport, M., *Janeway Immunologie*, ed. S.A. Verlag. Vol. 7. 2009.
5. Schroeder, H.W., Jr. and L. Cavacini, *Structure and function of immunoglobulins*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S41-52.
6. Casadevall, A. and L.A. Pirofski, *A new synthesis for antibody-mediated immunity*. Nat Immunol, 2011. **13**(1): p. 21-8.
7. Carsetti, R., *The development of B cells in the bone marrow is controlled by the balance between cell-autonomous mechanisms and signals from the microenvironment*. J Exp Med, 2000. **191**(1): p. 5-8.
8. Watanabe, N., et al., *Expression levels of B cell surface immunoglobulin regulate efficiency of allelic exclusion and size of autoreactive B-1 cell compartment*. J Exp Med, 1999. **190**(4): p. 461-69.
9. Heltemes, L.M. and T. Manser, *Level of B cell antigen receptor surface expression influences both positive and negative selection of B cells during primary development*. J Immunol, 2002. **169**(3): p. 1283-92.
10. Rauch, M., et al., *Crucial role for BAFF-BAFF-R signaling in the survival and maintenance of mature B cells*. PLoS One, 2009. **4**(5): p. e5456.
11. Soares, R.R., et al., *What do we know about the role of regulatory B cells (Breg) during the course of infection of two major parasitic diseases, malaria and leishmaniasis?* Pathog Glob Health, 2017. **111**(3): p. 107-115.
12. Loder, F., et al., *B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals*. J Exp Med, 1999. **190**(1): p. 75-89.
13. De Silva, N.S. and U. Klein, *Dynamics of B cells in germinal centres*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(3): p. 137-48.
14. Mesin, L., J. Ersching, and G.D. Victora, *Germinal Center B Cell Dynamics*. Immunity, 2016. **45**(3): p. 471-482.

15. McHeyzer-Williams, L.J. and M.G. McHeyzer-Williams, *Analysis of antigen-specific B-cell memory directly ex vivo*. *Methods Mol Biol*, 2004. **271**: p. 173-88.
16. Tsiantoulas, D., et al., *B cells and humoral immunity in atherosclerosis*. *Circ Res*, 2014. **114**(11): p. 1743-56.
17. Frank, M.M., V.D. Miletic, and H. Jiang, *Immunoglobulin in the control of complement action*. *Immunol Res*, 2000. **22**(2-3): p. 137-46.
18. Nimmerjahn, F. and J.V. Ravetch, *Fcγ receptors as regulators of immune responses*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(1): p. 34-47.
19. Hardy, R.R., *B-1 B cell development*. *J Immunol*, 2006. **177**(5): p. 2749-54.
20. Montecino-Rodriguez, E. and K. Dorshkind, *B-1 B cell development in the fetus and adult*. *Immunity*, 2012. **36**(1): p. 13-21.
21. Lam, K.P. and K. Rajewsky, *B cell antigen receptor specificity and surface density together determine B-1 versus B-2 cell development*. *J Exp Med*, 1999. **190**(4): p. 471-7.
22. Haas, K.M., et al., *B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to S. pneumoniae*. *Immunity*, 2005. **23**(1): p. 7-18.
23. Choi, Y.S., et al., *B-1 cells in the bone marrow are a significant source of natural IgM*. *Eur J Immunol*, 2012. **42**(1): p. 120-9.
24. Andersen, M.H., et al., *Cytotoxic T Cells*. *Journal of Investigative Dermatology*, 2006. **126**(1): p. 32-41.
25. Wang, W. and B. Golding, *The cytotoxic T lymphocyte response against a protein antigen does not decrease the antibody response to that antigen although antigen-pulsed B cells can be targets*. *Immunol Lett*, 2005. **100**(2): p. 195-201.
26. Deola, S., et al., *Helper B cells promote cytotoxic T cell survival and proliferation independently of antigen presentation through CD27/CD70 interactions*. *J Immunol*, 2008. **180**(3): p. 1362-72.
27. Castiglioni, P., et al., *CD8 T cell priming by B lymphocytes is CD4 help dependent*. *Eur J Immunol*, 2005. **35**(5): p. 1360-70.
28. Pham, T.A.V. and T.T.P. Tran, *The interaction among obesity, Type 2 diabetes mellitus, and periodontitis in Vietnamese patients*. *Clin Exp Dent Res*, 2018. **4**(3): p. 63-71.
29. Harwood, N.E. and F.D. Batista, *Antigen presentation to B cells*. *F1000 Biol Rep*, 2010. **2**: p. 87.

30. Harvey, B.P., et al., *Antigen presentation and transfer between B cells and macrophages*. Eur J Immunol, 2007. **37**(7): p. 1739-51.
31. Kruger, P., et al., *Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury*. PLoS Pathog, 2015. **11**(3): p. e1004651.
32. Tecchio, C., A. Micheletti, and M.A. Cassatella, *Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 508.
33. Mantovani, A., et al., *Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(8): p. 519-31.
34. Jaillon, S., et al., *Neutrophils in innate and adaptive immunity*. Semin Immunopathol, 2013. **35**(4): p. 377-94.
35. Henquin, J.C., M.M. Ibrahim, and J. Rahier, *Insulin, glucagon and somatostatin stores in the pancreas of subjects with type-2 diabetes and their lean and obese non-diabetic controls*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 11015.
36. Wilcox, G., *Insulin and Insulin Resistance*. Clinical Biochemist Reviews, 2005. **26**(2): p. 19-39.
37. Dodson, G.S., D. , *The role of assembly in insulin's biosynthesis*. Curr Opin Struct Biol., 1998. **8**: p. 189-94.
38. Porksen, N.H., M.; Juhl, C.; Butler, P.; Veldhuis, J.D.; Schmitz, O., *Pulsatile insulin secretion: detection, regulation, and role in diabetes*. Diabetes, 2002. **51**(1): p. 245-54.
39. Bratanova-Tochkova, T.K., et al., *Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion*. Diabetes, 2002. **51 Suppl 1**: p. S83-90.
40. Gual, P., Y. Le Marchand-Brustel, and J.F. Tanti, *Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation*. Biochimie, 2005. **87**(1): p. 99-109.
41. Maruyama, I.N., *Mechanisms of activation of receptor tyrosine kinases: monomers or dimers*. Cells, 2014. **3**(2): p. 304-30.
42. Pederson, T.M.K., D. L.; Rondinone, C. M., *Serine,Threonine Phosphorylation of IRS-1 Triggers Its Degradation*. Diabetes, 2001. **50**: p. 24-31.
43. Khamzina, L., P.A. Gruppuso, and J.R. Wands, *Insulin signaling through insulin receptor substrate 1 and 2 in normal liver development*. Gastroenterology, 2003. **125**(2): p. 572-585.
44. Luo, J., et al., *The p85 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase down-regulates IRS-1 signaling via the formation of a sequestration complex*. J Cell Biol, 2005. **170**(3): p. 455-64.

45. Whelan, S.A., et al., *Regulation of insulin receptor substrate 1 (IRS-1)/AKT kinase-mediated insulin signaling by O-Linked beta-N-acetylglucosamine in 3T3-L1 adipocytes*. J Biol Chem, 2010. **285**(8): p. 5204-11.
46. Shepherd, P.R.W., Dominic J.; Siddle, Kenneth, *Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling*. Biochem. J., 1998. **333**: p. 471-490.
47. Filip Janku, T.A.Y., Funda Meric-Bernstam, *Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway?* Nature Reviews Clinical Oncology, 2018. **15**: p. 273-291.
48. Vanhaesebroeck, B. and D.R. Alessi, *The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB*. Biochem J, 2000. **346 Pt 3**: p. 561-76.
49. Schultze, S.M., et al., *PI3K/AKT, MAPK and AMPK signalling: protein kinases in glucose homeostasis*. Expert Reviews in Molecular Medicine, 2012. **14**.
50. Schmitz-Peiffer, C. and T.J. Biden, *Protein kinase C function in muscle, liver, and beta-cells and its therapeutic implications for type 2 diabetes*. Diabetes, 2008. **57**(7): p. 1774-83.
51. Farese, R.S., M.; Standaert, L., *Insulin-sensitive protein kinases (atypical protein kinase C and protein kinase B), actions and defects in obesity and type II diabetes*. Exp Biol Med, 2005. **230**(9): p. 593-605.
52. Huang, S. and M.P. Czech, *The GLUT4 glucose transporter*. Cell Metab, 2007. **5**(4): p. 237-52.
53. Middelbeek, R.J., et al., *Insulin stimulation regulates AS160 and TBC1D1 phosphorylation sites in human skeletal muscle*. Nutr Diabetes, 2013. **3**: p. e74.
54. Thomas, E.C., et al., *Isoform-specific AMPK association with TBC1D1 is reduced by a mutation associated with severe obesity*. Biochem J, 2018. **475**(18): p. 2969-2983.
55. O'Neill, H.M., *AMPK and Exercise: Glucose Uptake and Insulin Sensitivity*. Diabetes Metab J, 2013. **37**(1): p. 1-21.
56. Jessen, N., et al., *Exercise increases TBC1D1 phosphorylation in human skeletal muscle*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011. **301**(1): p. E164-71.
57. Han, T.S. and M.E. Lean, *A clinical perspective of obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease*. JRSM Cardiovasc Dis, 2016. **5**: p. 2048004016633371.
58. Ordovas, J.M. and D. Corella, *Metabolic syndrome pathophysiology: the role of adipose tissue*. Kidney Int Suppl, 2008(111): p. S10-4.
59. Engeli, S., et al., *The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome?* Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(6): p. 807-25.

60. Austin, J. and D. Marks, *Hormonal regulators of appetite*. Int J Pediatr Endocrinol, 2009. **2009**: p. 141753.
61. Coppack, S.W., *Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue*. Proc Nutr Soc, 2001. **60**(3): p. 349-56.
62. Tsalamandris, S., et al., *The Role of Inflammation in Diabetes: Current Concepts and Future Perspectives*. Eur Cardiol, 2019. **14**(1): p. 50-59.
63. Mazurek, R., et al., *Vascular Cells in Blood Vessel Wall Development and Disease*. Adv Pharmacol, 2017. **78**: p. 323-350.
64. Godwin, L. and J.S. Crane, *Histology, Capillary*, in *StatPearls*. 2019: Treasure Island (FL).
65. Nicholson, S.K., G.A. Tucker, and J.M. Brameld, *Effects of dietary polyphenols on gene expression in human vascular endothelial cells*. Proc Nutr Soc, 2008. **67**(1): p. 42-7.
66. Webb, R.C., *Smooth muscle contraction and relaxation*. Adv Physiol Educ, 2003. **27**(1-4): p. 201-6.
67. Wanstall, J.C., et al., *Vascular smooth muscle relaxation mediated by nitric oxide donors: a comparison with acetylcholine, nitric oxide and nitroxyl ion*. Br J Pharmacol, 2001. **134**(3): p. 463-72.
68. Sperelakis, N., *Properties of Calcium Channels in Cardiac-Muscle and Vascular Smooth-Muscle*. Molecular and Cellular Biochemistry, 1990. **99**(2): p. 97-109.
69. Potter, L.R., *Guanylyl cyclase structure, function and regulation*. Cellular Signalling, 2011. **23**(12): p. 1921-1926.
70. Montfort, W.R., J.A. Wales, and A. Weichsel, *Structure and Activation of Soluble Guanylyl Cyclase, the Nitric Oxide Sensor*. Antioxid Redox Signal, 2017. **26**(3): p. 107-121.
71. Zhao, Y., P.M. Vanhoutte, and S.W. Leung, *Vascular nitric oxide: Beyond eNOS*. J Pharmacol Sci, 2015. **129**(2): p. 83-94.
72. WHO. *Obesity and overweight*. 2019 16.02.2018 [cited 2019 19.06.2019]; Available from: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
73. Huan, T., et al., *A systems biology framework identifies molecular underpinnings of coronary heart disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(6): p. 1427-34.
74. Kyaw, T., et al., *B1a B lymphocytes are atheroprotective by secreting natural IgM that increases IgM deposits and reduces necrotic cores in atherosclerotic lesions*. Circ Res, 2011. **109**(8): p. 830-40.

75. Rosenfeld, S.M., et al., *B-1b Cells Secrete Atheroprotective IgM and Attenuate Atherosclerosis*. Circ Res, 2015. **117**(3): p. e28-39.
76. Perry, H.M., T.P. Bender, and C.A. McNamara, *B cell subsets in atherosclerosis*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 373.
77. Ait-Oufella, H., et al., *Adaptive (T and B cells) immunity and control by dendritic cells in atherosclerosis*. Circ Res, 2014. **114**(10): p. 1640-60.
78. Gu, H.Z., Y.-R.; Rajewsky, K., *Independent Control of Immunglobulin Switch Recombination at Individual Switch Regions Evidenced through Cre-loxP-mediated Gene Targeting*. Cell, 1993. **73**: p. 1155-1164.
79. Waisman, A., et al., *IgG1 B cell receptor signaling is inhibited by CD22 and promotes the development of B cells whose survival is less dependent on Ig alpha/beta*. J Exp Med, 2007. **204**(4): p. 747-58.
80. Ayata, C.K., et al., *Purinergic P2Y(2) receptors promote neutrophil infiltration and hepatocyte death in mice with acute liver injury*. Gastroenterology, 2012. **143**(6): p. 1620-1629 e4.
81. Kyaw, T., et al., *Conventional B2 B cell depletion ameliorates whereas its adoptive transfer aggravates atherosclerosis*. J Immunol, 2010. **185**(7): p. 4410-9.
82. Ray, A. and B.N. Dittel, *Isolation of mouse peritoneal cavity cells*. J Vis Exp, 2010(35).
83. Jackson, S.J., et al., *Does age matter? The impact of rodent age on study outcomes*. Lab Anim, 2017. **51**(2): p. 160-169.
84. ssniff, S.G. *Standardfuttermittel (Ratte/Maus &R/M phyt-arm)*. 2006 2006 [cited 2019 07.08.2019]; Available from: <http://www.ssniff.de/index.php?pcid=9&pdid=15>.
85. ssniff, S.G. *Gereinigte Diäten, DIO & Control*. 2006 2006 [cited 2019 07.08.2019]; Available from: <http://www.ssniff.de/index.php>.
86. Matthews, D.R., et al., *Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance and Beta-Cell Function from Fasting Plasma-Glucose and Insulin Concentrations in Man*. Diabetologia, 1985. **28**(7): p. 412-419.
87. Labor Dr. Limbach, K. *HOMA-Rechner*. 2011 [cited 2019 06.08.2019]; Available from: <https://www.labor-clotten.de/HOMA-Rechner.468.0.html>.
88. Bioscientia Institut für Medizinische Diagnostik GmbH, B. *HOMA-Index*. 2019 [cited 2019 06.08.2019]; Available from: <https://www.bioscientia.de/de/service/medizinische-formeln/homa-index-2/>.

89. Erni, S.B., Uwe. *Leberenzyme*. 2016 01.2016 [cited 2019 26.09.2019]; Available from: <https://www.medix.ch/wissen/guidelines/leberkrankheiten/leberenzyme.html>.
90. Rosales, C., et al., *Neutrophils: Their Role in Innate and Adaptive Immunity 2017*. J Immunol Res, 2017. **2017**: p. 9748345.
91. Yu, J., et al., *Serum Amyloid A-Mediated Inflammasome Activation of Microglial Cells in Cerebral Ischemia*. J Neurosci, 2019. **39**(47): p. 9465-9476.
92. Juul-Madsen, H.R., et al., *Avian Immunology*. 2014.
93. DocMedicus. *Nüchterninsulin*. 2016 [cited 2019 1.10.2019]; Available from: <http://www.gesundheits-lexikon.com/Vorsorge-Diagnostik/Vorsorge-Mann/Nuechterninsulin.html>.
94. Heinemann, L., *Insulin assay standardization: leading to measures of insulin sensitivity and secretion for practical clinical care: response to Staten et al*. Diabetes Care, 2010. **33**(6): p. e83; author reply e84.
95. Winer, D.A., et al., *B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies*. Nat Med, 2011. **17**(5): p. 610-7.
96. Song, J., et al., *The IgG1 B-cell receptor provides survival and proliferative signals analogue to the Igalpha but not the Igbeta co-receptor*. Eur J Immunol, 2016. **46**(8): p. 1878-86.
97. Ulbricht, T.L. and D.A. Southgate, *Coronary heart disease: seven dietary factors*. Lancet, 1991. **338**(8773): p. 985-92.
98. Morris-Rosenfeld, S.L., M.; McNamara, C., *Understanding the role of B cells in Atherosclerosis, Potential Clinical Implications.pdf*. Expert Rev. Clin. Immunol., 2014. **10**(1): p. 77-89.
99. Hansson, G.K. and A. Hermansson, *The immune system in atherosclerosis*. Nat Immunol, 2011. **12**(3): p. 204-12.
100. Libby, P., A.H. Lichtman, and G.K. Hansson, *Immune effector mechanisms implicated in atherosclerosis: from mice to humans*. Immunity, 2013. **38**(6): p. 1092-104.
101. Chou, M.Y., et al., *Oxidation-specific epitopes are dominant targets of innate natural antibodies in mice and humans*. J Clin Invest, 2009. **119**(5): p. 1335-49.
102. Binder, C.J., et al., *The role of natural antibodies in atherogenesis*. J Lipid Res, 2005. **46**(7): p. 1353-63.
103. Ait-Oufella, H., et al., *B cell depletion reduces the development of atherosclerosis in mice*. J Exp Med, 2010. **207**(8): p. 1579-87.

104. Jonasson, L., et al., *Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque*. *Arteriosclerosis*, 1986. **6**(2): p. 131-8.
105. Zhou, X., S. Stemme, and G.K. Hansson, *Evidence for a local immune response in atherosclerosis. CD4+ T cells infiltrate lesions of apolipoprotein-E-deficient mice*. *Am J Pathol*, 1996. **149**(2): p. 359-66.
106. Roselaar, S.E., P.X. Kakkanathu, and A. Daugherty, *Lymphocyte populations in atherosclerotic lesions of apoE -/- and LDL receptor -/- mice. Decreasing density with disease progression*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996. **16**(8): p. 1013-8.
107. Boyle, J.J., *Association of coronary plaque rupture and atherosclerotic inflammation*. *J Pathol*, 1997. **181**(1): p. 93-9.
108. Frostegard, J., et al., *Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines*. *Atherosclerosis*, 1999. **145**(1): p. 33-43.
109. Whitman, S.C., et al., *Exogenous interferon-gamma enhances atherosclerosis in apolipoprotein E-/- mice*. *Am J Pathol*, 2000. **157**(6): p. 1819-24.
110. Gupta, S., et al., *IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice*. *J Clin Invest*, 1997. **99**(11): p. 2752-61.
111. Taleb, S., A. Tedgui, and Z. Mallat, *Interleukin-17: friend or foe in atherosclerosis?* *Curr Opin Lipidol*, 2010. **21**(5): p. 404-8.
112. Gistera, A. and G.K. Hansson, *The immunology of atherosclerosis*. *Nat Rev Nephrol*, 2017. **13**(6): p. 368-380.
113. Winkels, H. and K. Ley, *Natural Killer Cells at Ease: Atherosclerosis Is Not Affected by Genetic Depletion or Hyperactivation of Natural Killer Cells*. *Circ Res*, 2018. **122**(1): p. 6-7.
114. Nour-Eldine, W., et al., *Genetic Depletion or Hyperresponsiveness of Natural Killer Cells Do Not Affect Atherosclerosis Development*. *Circ Res*, 2018. **122**(1): p. 47-57.
115. Doring, Y., et al., *Neutrophils in atherosclerosis: from mice to man*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015. **35**(2): p. 288-95.
116. Sanda, G.E., et al., *Emerging Associations Between Neutrophils, Atherosclerosis, and Psoriasis*. *Curr Atheroscler Rep*, 2017. **19**(12): p. 53.
117. Weber, C., A. Zernecke, and P. Libby, *The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(10): p. 802-15.
118. Soehnlein, O., *Multiple roles for neutrophils in atherosclerosis*. *Circ Res*, 2012. **110**(6): p. 875-88.

119. Mocsai, A., *Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond*. J Exp Med, 2013. **210**(7): p. 1283-99.
120. Stevens, T.L., et al., *Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells*. Nature, 1988. **334**(6179): p. 255-8.
121. Snapper, C.M., et al., *Induction of IgG3 secretion by interferon gamma: a model for T cell-independent class switching in response to T cell-independent type 2 antigens*. J Exp Med, 1992. **175**(5): p. 1367-71.
122. Yla-Herttuala, S., et al., *Rabbit and human atherosclerotic lesions contain IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL*. Arterioscler Thromb, 1994. **14**(1): p. 32-40.
123. Institut für Medizinische Diagnostik Berlin-Potsdam GbR, I., *Malondialdehyd-modifiziertes LDL (MDA-LDL) bei oxidativem Stress*. 2019, IMD Labor Berlin.
124. Schiopu, A., et al., *Recombinant human antibodies against aldehyde-modified apolipoprotein B-100 peptide sequences inhibit atherosclerosis*. Circulation, 2004. **110**(14): p. 2047-52.
125. Sladek, R., *The many faces of diabetes: addressing heterogeneity of a complex disease*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2018. **6**(5): p. 348-349.
126. Ying, W., et al., *Adipose tissue B2 cells promote insulin resistance through leukotriene LTB4/LTB4R1 signaling*. J Clin Invest, 2017. **127**(3): p. 1019-1030.
127. Wilson, P.W., et al., *Metabolic syndrome as a precursor of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus*. Circulation, 2005. **112**(20): p. 3066-72.
128. Rawshani, A., A. Rawshani, and S. Gudbjornsdottir, *Mortality and Cardiovascular Disease in Type 1 and Type 2 Diabetes*. N Engl J Med, 2017. **377**(3): p. 300-301.
129. Xia, N., et al., *Restoration of perivascular adipose tissue function in diet-induced obese mice without changing bodyweight*. Br J Pharmacol, 2017. **174**(20): p. 3443-3453.
130. Baron, A.D., *Insulin resistance and vascular function*. J Diabetes Complications, 2002. **16**(1): p. 92-102.
131. Ye, J., *Mechanisms of insulin resistance in obesity*. Front Med, 2013. **7**(1): p. 14-24.
132. Arkan, M.C., et al., *IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance*. Nat Med, 2005. **11**(2): p. 191-8.
133. Ouchi, N., et al., *Adipokines in inflammation and metabolic disease*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(2): p. 85-97.

134. Cinti, S., et al., *Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans*. Journal of Lipid Research, 2005. **46**(11): p. 2347-2355.
135. Feuerer, M., et al., *Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 930-9.
136. Duffaut, C., et al., *Unexpected trafficking of immune cells within the adipose tissue during the onset of obesity*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009. **384**(4): p. 482-485.
137. Falorni, A., et al., *Autoantibody recognition of COOH-terminal epitopes of GAD65 marks the risk for insulin requirement in adult-onset diabetes mellitus*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2000. **85**(1): p. 309-316.
138. Shen, L., et al., *B-1a lymphocytes attenuate insulin resistance*. Diabetes, 2015. **64**(2): p. 593-603.
139. ssniff, S.G. *Western & Control*. 2006 2006 [cited 2019 26.09.2019]; Available from: <http://www.ssniff.de/index.php?pcid=9&pdid=15>.
140. Sampey, B.P., et al., *Cafeteria Diet Is a Robust Model of Human Metabolic Syndrome With Liver and Adipose Inflammation: Comparison to High-Fat Diet*. Obesity, 2011. **19**(6): p. 1109-1117.
141. Buyukdere, Y., A. Gulec, and A. Akyol, *Cafeteria diet increased adiposity in comparison to high fat diet in young male rats*. PeerJ, 2019. **7**: p. e6656.
142. Behan, J.W., et al., *Activation of adipose tissue macrophages in obese mice does not require lymphocytes*. Obesity (Silver Spring), 2013. **21**(7): p. 1380-8.
143. Eisinger, K., et al., *Lipidomic analysis of serum from high fat diet induced obese mice*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(2): p. 2991-3002.
144. Ramalho, L., et al., *Metabolic disturbances due to a high-fat diet in a non-insulin-resistant animal model*. Nutr Diabetes, 2017. **7**(3): p. e245.
145. Matsakas, A., et al., *Investigating mechanisms underpinning the detrimental impact of a high-fat diet in the developing and adult hypermuscular myostatin null mouse*. Skelet Muscle, 2015. **5**: p. 38.
146. Torgerson, J.S., et al., *Are elevated aminotransferases and decreased bilirubin additional characteristics of the metabolic syndrome?* Obes Res, 1997. **5**(2): p. 105-14.
147. Gowda, S., et al., *A review on laboratory liver function tests*. Pan Afr Med J, 2009. **3**: p. 17.
148. Khan, A.R., et al., *Elevated serum level of human alkaline phosphatase in obesity*. J Pak Med Assoc, 2015. **65**(11): p. 1182-5.

-
149. Nakamura, Y., et al., *Depletion of B cell-activating factor attenuates hepatic fat accumulation in a murine model of nonalcoholic fatty liver disease*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 977.
150. Bruzzi, S., et al., *B2-Lymphocyte responses to oxidative stress-derived antigens contribute to the evolution of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)*. Free Radic Biol Med, 2018. **124**: p. 249-259.
151. Leibundgut, G., J.L. Witztum, and S. Tsimikas, *Oxidation-specific epitopes and immunological responses: Translational biotheranostic implications for atherosclerosis*. Curr Opin Pharmacol, 2013. **13**(2): p. 168-79.
152. Ayala, J.E., et al., *Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice*. Dis Model Mech, 2010. **3**(9-10): p. 525-34.
153. Wang, C.Y. and J.K. Liao, *A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance*. Methods Mol Biol, 2012. **821**: p. 421-33.
154. Harmon, D.B., et al., *Protective Role for B-1b B Cells and IgM in Obesity-Associated Inflammation, Glucose Intolerance, and Insulin Resistance*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2016. **36**(4): p. 682-91.
155. Reth, M. and J. Wienands, *Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 453-79.
156. Kurosaki, T., *Regulation of B cell fates by BCR signaling components*. Curr Opin Immunol, 2002. **14**(3): p. 341-7.
157. Reth, M., *Antigen receptor tail clue*. Nature, 1989. **338**(6214): p. 383-4.
158. Engels, N., et al., *Recruitment of the cytoplasmic adaptor Grb2 to surface IgG and IgE provides antigen receptor-intrinsic costimulation to class-switched B cells*. Nat Immunol, 2009. **10**(9): p. 1018-25.
159. Liu, W., et al., *Intrinsic properties of immunoglobulin IgG1 isotype-switched B cell receptors promote microclustering and the initiation of signaling*. Immunity, 2010. **32**(6): p. 778-89.
160. van Dam, A.D., et al., *IgG is elevated in obese white adipose tissue but does not induce glucose intolerance via Fcγ-receptor or complement*. Int J Obes (Lond), 2018. **42**(2): p. 260-269.
161. Mortimer, C.E.M., U.; Beck, J. , *Chemie: Das Basiswissen der Chemie*. Vol. 11. Auflage. 2014: Thieme.
162. Sena, C.M., et al., *Vascular Oxidative Stress: Impact and Therapeutic Approaches*. Front Physiol, 2018. **9**: p. 1668.
163. Augusto, O.M., S., *Principles of Free Radicals Biomedicine: Oxygen Radicals and Related Species*. Vol. 1. 2011: Nova Science Publishers, Inc.

164. Angeli, J.P., et al., *Lipid hydroperoxide-induced and hemoglobin-enhanced oxidative damage to colon cancer cells*. *Free Radic Biol Med*, 2011. **51**(2): p. 503-15.
165. Norlander, A.E., M.S. Madhur, and D.G. Harrison, *The immunology of hypertension*. *J Exp Med*, 2018. **215**(1): p. 21-33.
166. Zhou, N., et al., *Rho Kinase Regulates Aortic Vascular Smooth Muscle Cell Stiffness Via Actin/SRF/Myocardin in Hypertension*. *Cell Physiol Biochem*, 2017. **44**(2): p. 701-715.
167. ThermoFisherScientific. *CM-H2DCFDA (General Oxidative Stress Indicator)*, Katalognummer: C6827. 2019 [cited 2019 02.10.2019]; Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C6827#/C6827>.
168. Folco, E.J., et al., *Neutrophil Extracellular Traps Induce Endothelial Cell Activation and Tissue Factor Production Through Interleukin-1alpha and Cathepsin G*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018. **38**(8): p. 1901-1912.
169. Kaplan, M.J. and M. Radic, *Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity*. *J Immunol*, 2012. **189**(6): p. 2689-95.
170. Wang, S. and Y. Wang, *Peptidylarginine deiminases in citrullination, gene regulation, health and pathogenesis*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1829**(10): p. 1126-35.
171. Rohrbach, A.S., et al., *Activation of PAD4 in NET formation*. *Front Immunol*, 2012. **3**: p. 360.
172. Lindholm, C.R., et al., *A high-fat diet decreases AMPK activity in multiple tissues in the absence of hyperglycemia or systemic inflammation in rats*. *J Physiol Biochem*, 2013. **69**(2): p. 165-75.
173. Shaikh, S.R., et al., *The effects of diet-induced obesity on B cell function*. *Clin Exp Immunol*, 2015. **179**(1): p. 90-9.
174. Nishimura, S., et al., *Adipose Natural Regulatory B Cells Negatively Control Adipose Tissue Inflammation*. *Cell Metab*, 2013. **18**(5): p. 759-766.
175. Chousterman, B.G. and F.K. Swirski, *Innate response activator B cells: origins and functions*. *Int Immunol*, 2015. **27**(10): p. 537-41.
176. Lawrence, G.D., *Dietary Fats and Inflammation*. *Handbook of Lipids in Human Function: Fatty Acids*, 2016: p. 635-665.
177. Hilgendorf, I., et al., *Innate response activator B cells aggravate atherosclerosis by stimulating T helper-1 adaptive immunity*. *Circulation*, 2014. **129**(16): p. 1677-87.

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit versichere ich gemäß § 10 Abs. 3d der Promotionsordnung vom 24.07.2007

a) Ich habe die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel (Literatur, Apparaturen, Material) in der Arbeit angegeben.

b) Ich habe oder hatte die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit nicht als Prüfungsarbeit für eine

staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.

c) Ich hatte weder die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit noch Teile davon bei einer anderen Fakultät bzw. einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht

Ort, Datum

Unterschrift