



**Toll-like Rezeptor 4
als Regulator der Diabetespathogenese
im Tiermodell des humanen Typ 1 Diabetes**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Elke Gülden

aus Mechernich

Düsseldorf, November 2009

Aus dem Institut für Klinische Diabetologie
des Deutschen Diabetes-Zentrums, Leibniz-Institut an der
Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

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

Referent: PD Dr. Volker Burkart
Korreferent: Prof. Dr. Peter Proksch

Tag der mündlichen Prüfung: 14.01.2010

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Sie wurde in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 17.11.2009

Elke Gülden

„In der Wissenschaft gibt es nie ein Erreichen des Ziels. In der Wissenschaft gibt es nur Etappenziele.“

Henning M. Beier

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Diabetes mellitus	1
1.1.1	Typ 1 Diabetes	1
1.1.2	Typ 2 Diabetes	1
1.2	Klinik des Typ 1 Diabetes	2
1.2.1	Prädiabetische Phase	2
1.2.2	Manifestation	2
1.2.3	Insulintherapie und –bedarf während der Krankheitsphase	3
1.2.4	(Spät-) Komplikationen	3
1.3	Ätiologie und Pathogenese des Typ 1 Diabetes	4
1.3.1	Genetische Prädisposition	4
1.3.2	Der Einfluss von Lebensstil und Umweltfaktoren auf die Diabetespathogenese	4
1.3.3	Diabetesspezifische Autoantikörper	5
1.3.4	Mechanismen der β -Zellschädigung	5
1.4	Die Rolle des Immunsystem bei der Pathogenese des Diabetes	6
1.4.1	Grundzüge des Immunsystems	6
1.4.2	Wichtige Immunzellen für die Pathogenese des Typ 1 Diabetes	6
1.4.2.1	Makrophagen und ihre Rolle in der β -zellgerichteten Immunreaktivität	7
1.4.2.2	T-Lymphozyten als wichtige Effektorzellen in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes	7
1.4.2.3	Adipozyten und ihr mögliche Rolle in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes	9
1.5	Toll-like Rezeptoren	9
1.5.1	Toll-like Rezeptoren in der Immunantwort	9
1.5.2	Toll-like Rezeptor 4	11
1.6	Das NOD-Mausmodell - ein Tiermodell des autoimmun vermitteln Diabetes	13
1.7	Ziel der Arbeit	13
2	Material und Methoden	15
2.1	Materialien	15
2.1.1	Tiere	15
2.1.1.1	C57BL/10ScSn- und C57BL/10ScCr-Mäuse	15
2.1.1.2	NOD-Maus	15
2.1.1.3	NOD TLR4 ^{+/+} und NOD TLR4 ^{-/-} Mäuse	15
2.1.1.4	New Zealand Obese (NZO)-Maus	15

2.1.2	Tierfutter	15
2.1.3	Chemikalien	15
2.1.4	Oligonukleotide.....	17
2.1.5	Stammlösungen und Puffer	18
2.1.6	Antikörper	20
2.1.7	Zytokine	21
2.1.8	Medien und Reagenzien für die Zellkultur.....	22
2.1.9	Kit-Systeme.....	23
2.1.10	Geräte	24
2.2	Methoden.....	25
2.2.1	Tierhaltung und -zucht	25
2.2.1.1	Generierung des TLR4-defizienten Mausmodells	25
2.2.1.2	Genotypisierung der NOD-Mäuse.....	26
2.2.1.2.1	DNA-Isolation.....	26
2.2.1.2.2	Polymerasekettenreaktion	27
2.2.1.2.2.1	Polymerasekettenreaktion zum Nachweis der IDD-Loci	27
2.2.1.2.2.2	Polymerasekettenreaktion zum Nachweis des <i>tlr4</i> -Genotyps	28
2.2.1.2.2.3	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel	29
2.2.1.3	Nachweis des TLR4-Defektes auf transkriptioneller Ebene	30
2.2.1.3.1	RNA-Isolation	30
2.2.1.3.2	Reverse Transkription	31
2.2.1.3.3	RT-Polymerasekettenreaktion	31
2.2.1.4	Phänotypisierung der NOD-Mäuse	32
2.2.1.4.1	Überwachung der Diabetesentwicklung.....	32
2.2.1.4.1.1	Bestimmung der Blutglukose	32
2.2.1.4.1.2	Bestimmung des Körpergewichts.....	32
2.2.1.4.2	Intraperitonealer Glukosetoleranztest.....	32
2.2.2	Histologie von Pankreas- und Fettgewebe	33
2.2.2.1	Herstellung von histologischen Präparaten von Pankreas- und Fettgewebe	33
2.2.2.2	Morphometrische Auswertung	33
2.2.3	Isolation primärer Zellpopulationen.....	34
2.2.3.1	Isolation primärer pankreatischer Inselzellen.....	34
2.2.3.2	Isolation muriner Milzzellpopulationen	34
2.2.3.2.1	Isolation unfractionierter Milzzellen.....	34
2.2.3.2.2	Isolation von makrophagenangereicherten Milzzellpopulationen und nicht- adhärenenten Milzzellen	35

2.2.3.2.3	Anreicherung von CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Lymphozyten aus der Milz.....	35
2.2.3.3	Isolation von Adipozyten aus dem viszeralem Fettgewebe.....	36
2.2.3.3.1	Isolation von Präadipozyten	36
2.2.3.3.2	Isolation von reifen Adipozyten	36
2.2.4	Charakterisierung isolierter Zellpopulationen mittels intrazellulärer Marker und Oberflächenmarker	37
2.2.4.1	Prüfung der Reinheit von Präparationen regulatorischer T- Lymphozyten.....	37
2.2.4.2	Ausschluss einer Makrophagenkontamination mittels CD11b	38
2.2.4.3	Nachweis der Expression des TLR4-Proteins	38
2.2.5	Kultivierung von Zelllinien und primären Zellen	38
2.2.5.1	Kultivierung von Zelllinien	38
2.2.5.1.1	J774A.1-Zelllinie.....	38
2.2.5.1.2	3T3-L1-Zelllinie.....	38
2.2.5.2	Kultivierung von primären Zellen	39
2.2.5.2.1	Primäre, murine Makrophagen, unfractionierte Milzzellen und regulatorische T-Lymphozyten	39
2.2.5.2.2	Primäre, murine Präadipozyten	39
2.2.5.2.3	Primäre, murine Adipozyten	39
2.2.6	Differenzierung von Adipozyten.....	40
2.2.6.1	Differenzierung von 3T3-L1 und primären Präadipozyten	40
2.2.6.2	Differenzierung in Gegenwart von LPS.....	40
2.2.7	Prüfung des Reifegrades von Adipozyten	41
2.2.7.1	Prüfung des Reifegrades mittels Oil-Red-O-Färbung	41
2.2.7.2	Prüfung des Reifegrades mittels der Expression des Präadipozyten Faktor 1	41
2.2.7.3	Prüfung des Reifegrades mittels des Reifungsmarkers PPAR γ	41
2.2.8	Bestimmung der Zellzahl	42
2.2.9	Zytokin-induzierte Schädigung von Inselzellen.....	42
2.2.10	Stimulation von Immunzell- und Adipozytenpopulationen	42
2.2.10.1	Stimulation von primären Milzzellen.....	42
2.2.10.2	Stimulation von Adipozyten.....	43
2.2.10.3	Stimulation von primären regulatorischen T-Lymphozyten	43
2.2.11	Vitalitäts- und Proliferationstests	43
2.2.11.1	Kolorimetrischer Nachweis der Zellvitalität	43
2.2.11.1.1	MTT	43
2.2.11.1.2	WST-1 und XTT	44

2.2.11.2	Bestimmung der Zellproliferation mit Hilfe eines kolorimetrischen Verfahrens (BrdU).....	44
2.2.12	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (ELISA) zur Bestimmung inflammatorischer Mediatoren	45
2.2.13	Griess-Reaktion zur Bestimmung von Stickstoffmonoxid.....	45
2.2.14	Statistik.....	46
3	Ergebnisse	47
3.1	Charakterisierung des Tiermodells der TLR4-defizienten NOD-Maus	47
3.1.1	Charakterisierung des Tiermodells auf DNA-Ebene.....	47
3.1.1.1	Bestätigung der erfolgreichen Einkreuzung der NOD-Allele	47
3.1.1.2	Monitoring des TLR4-Defektes	48
3.1.2	Charakterisierung des Tiermodells auf RNA-Ebene	49
3.1.3	Charakterisierung des Tiermodells auf Protein-Ebene.....	49
3.1.4	Funktionelle Charakterisierung des TLR4-Defektes.....	51
3.2	Effekte der TLR4-Defizienz auf den natürlichen Verlauf der Diabetesentwicklung in der NOD-Maus	52
3.2.1	Einfluss des TLR4-Expressionsstatus auf das Diabetes-Manifestationsalter von NOD-Mäusen	52
3.2.2	Untersuchungen zum Einfluss des TLR4-Expressionsstatus auf die Glukose-Toleranz von NOD-Mäusen	53
3.3	Differentielle Gewichtsentwicklung von NOD- und C57BL/10Sc-Mäusen in Abhängigkeit vom TLR4-Expressionsstatus	54
3.3.1	Differentielle Gewichtsentwicklung von NOD-Mäusen verschiedener TLR4-Genotypen	54
3.3.2	Differentielle Gewichtsentwicklung von Mäusen des C57BL/10Sc-Parentalstammes in Abhängigkeit vom TLR4-Genotyp	55
3.4	Mononukleäre Infiltration des Pankreas TLR4-defizienter NOD-Mäuse	56
3.4.1	Auswirkungen des TLR4-Defekts auf die mononukleäre Infiltration der pankreatischen Inseln.....	56
3.4.2	Infiltrationsgrad Langerhans'scher Inseln der NOD-TLR4-Mäuse	57
3.4.3	Zytokin-Suszeptibilität von Inselzellen der NOD-TLR4-Mäuse	58
3.5	Untersuchungen zu TLR4-abhängigen Immunzellfunktionen in der NOD-Maus	59
3.5.1	Vergleich von Immunzellpopulationen aus der Milz von TLR4-exprimierenden und TLR4-defizienten Mäusen.....	59
3.5.2	Freisetzung von Zytokinen aus Milzzellpopulationen	61
3.5.2.1	Zytokinfreisetzung aus Milzzellpopulationen des C57BL/10Sc-Parentalstammes.....	61
3.5.2.2	Zytokinfreisetzung aus Milzzellpopulationen von NOD-TLR4-Mäusen	63

3.5.3	Effekt der TLR4-Expression auf die Stickstoffmonoxidfreisetzung von adhären Milzzellpopulationen der NOD-TLR4-Maus	64
3.5.4	Effekt der TLR4-Expression auf das Proliferationsverhalten von Milzzellpopulationen.....	65
3.5.4.1	Effekt des TLR4-Defektes auf die Proliferation von Milzzellpopulationen des C57BL/10Sc-Parentalstammes	65
3.5.4.2	Effekt des TLR4-Defektes auf die Proliferation von Milzzellpopulationen des NOD-Stammes.....	67
3.5.5	Analysen zur metabolischen Aktivität von Milzzellpopulationen in Abhängigkeit vom TLR4-Expressionsstatus.....	69
3.5.5.1	Vergleich der metabolischen Aktivität von Milzzellpopulationen des Parentalstammes C57BL/10Sc in Abhängigkeit vom TLR4-Expressionsstatus	69
3.5.5.2	Vergleich der metabolischen Aktivität verschiedener Milzzellpopulationen von TLR4-exprimierenden und TLR4-defizienten NOD-Mäusen	71
3.5.6	Treg – Regulatorzellen der Immunantwort	73
3.5.6.1	Anreicherung von CD4 ⁺ CD25 ⁺ Milzzellen.....	73
3.5.6.2	Nachweis der Foxp3-Expression zur Identifikation regulatorischer T-Lymphozyten.....	75
3.5.6.3	Metabolische Aktivität der Treg (CD4 ⁺ CD25 ⁺) und Responderzellen (CD4 ⁺ CD25 ⁻) in Abhängigkeit vom TLR4-Expressionsstatus.....	77
3.5.6.4	Untersuchungen zur suppressiven Potenz der regulatorischen T-Lymphozyten in Abhängigkeit vom TLR4-Expressionsstatus.....	78
3.6	Effekte der TLR4-Defizienz auf das viszerale Fettgewebe.....	79
3.6.1	Morphologie des viszeralen Fettgewebes der NZO-Maus	80
3.6.2	Vergleich der Morphologie des viszeralen Fettgewebes von NOD-TLR4-Mäusen	80
3.6.3	Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren aus dem Fettgewebe	81
3.7	Effekte von TLR4 auf Adipozyten des viszeralen Fettgewebes	82
3.7.1	Reinheitsprüfung von primären Adipozytenpopulationen der Maus	82
3.7.2	Phänotypische Charakterisierung der Adipozyten	84
3.7.2.1	Bestimmung des Differenzierungsgrades von Adipozyten	84
3.7.2.1.1	Morphologie und Fettgehalt von Adipozyten	84
3.7.2.1.2	Expression der Adipozyten-Reifungsmarker PPAR γ und Pref-1	86
3.7.2.1.3	Nachweis der TLR4-Expression verschiedener Reifungsstadien von Adipozyten	87
3.7.3	Charakterisierung der TLR4-Abhängigkeit der Adipozytenfunktionen.....	89
3.7.3.1	Kinetik der TLR4-abhängigen Freisetzung inflammatorischer Mediatoren aus Adipozyten	89
3.7.3.1.1	Kinetik der TLR4-abhängigen Freisetzung inflammatorischer Mediatoren von 3T3-L1-Präadipozyten	89

3.7.3.1.2	Kinetik der TLR4-abhängigen Freisetzung inflammatorischer Mediatoren von 3T3-L1-Adipozyten.....	90
3.7.3.2	Stress-induzierte Freisetzung inflammatorischer Mediatoren in Abhängigkeit vom Adipozytenreifungsstadium.....	91
3.7.3.3	Synergistische Effekte von LPS und Hsp60 auf die Induktion von inflammatorischen Mediatoren	94
3.7.3.4	Untersuchungen zur Freisetzung inflammatorischer Mediatoren aus Adipozyten von TLR4-defizienten Mäusen	94
3.7.3.4.1	Analysen zur LPS-Abhängigkeit der sekretorischen Aktivität von Adipozyten des Maus-Parentalstammes C57BL/10Sc	95
3.7.3.4.2	Analysen zur LPS-Abhängigkeit der sekretorischen Aktivität von Adipozyten der Linie NOD TLR4	96
3.7.4	Auswirkungen des TLR4-Defekts auf die Differenzierung von Adipozyten	98
3.7.4.1	Auswirkungen des TLR4-Defekts auf die Differenzierung von Adipozyten der Linie 3T3-L1	98
3.7.4.1.1	Effekte einer chronischen TLR4-Stimulation während der Differenzierung von 3T3-L1-Zellen.....	98
3.7.4.1.2	Vitalität von Adipozyten der Linie 3T3-L1 nach Differenzierung in Gegenwart von LPS	100
3.7.4.2	Auswirkungen des TLR4-Defekts auf die Differenzierung von Adipozyten der NOD-TLR4-Maus	100
3.7.4.2.1	Effekte einer chronischen TLR4-Stimulation während der Differenzierung von Adipozyten der NOD-TLR4-Maus	100
3.7.4.2.2	Vitalität von Adipozyten der Mauslinie NOD TLR4 nach Differenzierung in Gegenwart von LPS	102
3.8	Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse	103
4	Diskussion	104
4.1	Modell der TLR4-defizienten NOD-Maus.....	104
4.2	TLR4 und seine potentiellen exogenen und endogenen Liganden: LPS, Hsp60, FFA	105
4.3	Potentielle Kontamination der LPS-Präparation	106
4.4	Immunzellpopulationen.....	107
4.4.1	Hyperreaktivität von Immunzellen TLR4-defizienter NOD-Mäuse	107
4.4.1.1	Freisetzung inflammatorischer Mediatoren.....	107
4.4.1.2	Proliferation und metabolische Aktivität	108
4.4.2	Effekt des TLR4-Expressionsstatus auf die Frequenz und funktionelle Aktivität von Treg	109
4.4.2.1	Effekt des TLR4-Expressionsstatus auf die Treg-Frequenz.....	109
4.4.2.2	Funktionelle Charakterisierung der Treg in Abhängigkeit vom TLR4-Expressionsstatus	110

4.5	Wechselwirkungen zwischen Metabolismus und Immunsystem	111
4.6	Akzelerator-Hypothese.....	112
4.7	Einfluss der TLR4-Defizienz auf die inflammatorischen Aktivitäten des Fettgewebes.....	114
4.8	Einfluss der TLR4-Defizienz auf Adipozyten.....	114
4.9	Hypothetisches Modell zur beschleunigten Diabetesentwicklung in TLR4-defizienten NOD-Mäusen.....	116
5	Zusammenfassung / Summary	119
5.1	Zusammenfassung.....	119
5.2	Summary	120
6	Literaturverzeichnis.....	121
7	Anhang	134
7.1	Abkürzungsverzeichnis	134
7.2	Abbildungsverzeichnis	137
7.3	Tabellenverzeichnis.....	140
8	Danksagung.....	141

1 Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

Das Krankheitsbild des Diabetes mellitus beschreibt eine Gruppe von Stoffwechselkrankheiten, die mit einem erhöhten Blutglukosespiegel (Hyperglykämie) einhergehen. Der Name „Diabetes mellitus“ („Honigsüßer Durchfluss“, gr.: *διαβαίνειν* hindurchfließen“, lat.: „mellitus“ honigsüß) beschreibt das Auftreten von Glukose im Urin der Betroffenen; ein Sachverhalt, der in der Antike mittels einer Geschmacksprobe zur Diagnose des Diabetes herangezogen wurde. Die Welt-Gesundheitsorganisation (WHO) unterscheidet heute neben einigen seltener auftretenden Formen drei Hauptformen des Diabetes mellitus: den Typ 1 Diabetes (T1D), den Typ 2 Diabetes (T2D) und den Gestationsdiabetes.

1.1.1 Typ 1 Diabetes

Beim Diabetes mellitus handelt es sich um eine chronisch verlaufende Stoffwechselkrankheit, die sowohl in einer Störung des Kohlenhydrat- als auch des Fett- und Eiweißstoffwechsels resultiert.

Der insulinabhängige T1D (*insulin dependent diabetes mellitus*, IDDM) ist die häufigste Stoffwechselerkrankung im Kindes- und Jugendalter (1). Es handelt sich um eine multifaktorielle, autoimmunvermittelte Krankheit, die durch eine Zerstörung der autologen insulinproduzierenden β -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas charakterisiert ist. Diese Zerstörung führt sukzessive zu einem absoluten Insulinmangel. In Folge des Insulinmangels kann Glukose nicht mehr ausreichend metabolisiert werden und es kommt zum Anstieg der basalen und postprandialen Glukosespiegel. Unbehandelt führt diese metabolische Störung zur fortschreitenden Schädigung des zentralen Nervensystems, zu Koma und Tod. Aufgrund dessen sind Patienten mit T1D auf eine lebenslange Gabe von exogenem Insulin angewiesen. Manifestation des T1D bedeutet für die Patienten also eine deutliche Verringerung der Lebensqualität und ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung von schwerwiegenden diabetesassoziierten Folgeerkrankungen wie kardiovaskuläre und neurologische Komplikationen (2).

1.1.2 Typ 2 Diabetes

Die bei weitem häufigste Diabetesform ist der T2D (*non insulin dependent diabetes mellitus*, NIDDM), dem ca. 90 % aller Diabetesfälle zuzuordnen sind. Patienten mit dieser Erkrankung zeigen ebenfalls chronisch erhöhte Blutzuckerspiegel (Hyperglykämien) und tragen ein erhöhtes Risiko an diabetesassoziierten vaskulären und neurologischen Komplikationen zu erkranken (2). Beim T2D produzieren die β -Zellen zwar ausreichende Insulinmengen, die jedoch in den peripheren Geweben nur eine verminderte oder keine Wirkung zeigen. Um diese Insulinresistenz auszugleichen, kommt es insbesondere in der Anfangsphase der Erkrankung zu einer kompensatorischen Erhöhung der Insulinproduktion. Im Gegensatz zum T1D, dem etwa 5 % der Diabetesfälle zuzuordnen sind, liegt somit bei dieser Form der Erkrankung lediglich ein relativer Insulinmangel vor.

1.2 Klinik des Typ 1 Diabetes

1.2.1 Prädiabetische Phase

Die so genannte prädiabetische Phase oder auch Prädiabetes genannt, beschreibt einen Zeitraum (Monate bis Jahre), in dem Betroffene noch keine Symptome zeigen, die auf eine Diabeteserkrankung hindeuten. Obwohl die Individuen klinisch unauffällig sind, können bereits Autoantikörper gegen β -Zellstrukturen nachgewiesen werden. In dieser subklinischen Phase nimmt der bislang noch nicht vollständig aufgeklärte Mechanismus der fortschreitenden Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas seinen Anfang, was in einer progredienten Reduktion der Insulinsekretionskapazität resultiert (2). Die Rate der β -Zellzerstörung variiert von Patient zu Patient, tendiert aber zu einer erhöhten Aggressivität bei Babys und Kleinkindern (3). Offenkundig wird die verringerte Sekretionskapazität in einer gestörten Glukosetoleranz.

1.2.2 Manifestation

Die Pathogenese des T1D erstreckt sich in der Regel über einen relativ kurzen Zeitraum (Monate bis wenige Jahre). Bei einer 60 - 90 %igen Zerstörung der β -Zellmasse manifestiert sich die Erkrankung. Es kommt zur Hypoinsulinämie als wichtigstem Charakteristikum der Erkrankung. In der Folge kann Glukose nicht mehr ausreichend metabolisiert werden, sowohl die postprandialen als auch die basalen Glukosespiegel steigen an (Nüchternhyperglykämie; Blutzuckerwerte >120 mg/dl). Infolgedessen kommt es zur verstärkten Ausscheidung der Glukose über die Nieren (Glukosurie). Der erhöhte Harndrang (Polyurie) bewirkt einen hohen Wasserverlust, der bei den Betroffenen zu einem starken Durstgefühl und vermehrter Flüssigkeitsaufnahme (Polydipsie) führt. Das Fehlen der ausgeschiedenen Glukose als Energieträger für die Körperzellen, zieht einen beschleunigten Abbau von Glykogen und Depotfett nach sich. Der Abbau von Fetten führt zu einer Bildung von Ketonkörpern, die im Blut eine Übersäuerung verursachen (Ketoazidose). Diese Symptome bezeichnen den Beginn der absoluten Insulinabhängigkeit. Manche Patienten durchlaufen kurz nach der Diagnose und dem Beginn der Insulintherapie eine Remission. Diese Phase, in der der Bedarf an exogenem Insulin deutlich verringert ist, bezeichnet man auch als „Honeymoon“. In der Literatur werden seltene Fälle beschrieben, in denen Patienten in der Remissionsphase ganz ohne Zugabe exogenen Insulins stoffwechsellnormal bleiben. Im Allgemeinen jedoch reicht die vorübergehende Stabilisierung der endogenen Insulinsekretion zur Aufrechterhaltung einer Normoglykämie nicht aus; die Patienten sind auf geringe Insulingaben angewiesen um ihre Blutglukosespiegel annähernd normal zu halten und symptomfrei leben zu können. Die Länge der Remissionsphase ist sehr unterschiedlich. Sie kann Tage, Wochen, Monate oder sogar Jahre andauern. Je jünger der Patient zum Zeitpunkt der Diagnose ist, desto kürzer ist in der Regel die Remissionsphase (4).

1.2.3 Insulintherapie und –bedarf während der Krankheitsphase

Da die insulinproduzierenden pankreatischen β -Zellen in Patienten mit T1D weitestgehend zerstört sind, müssen Betroffene entsprechend ihres individuellen Bedarfs exogenes Insulin zufügen.

Der Insulinbedarf eines Menschen unterliegt vielen Schwankungen. Essverhalten, körperliche Aktivität, Infektionen und Medikamente sind nur einige Größen, die den Insulinbedarf beeinflussen. Die Bauchspeicheldrüse eines Nichtdiabetikers gibt kontinuierlich die Mengen Insulin ins Blut, die zur Aufrechterhaltung eines normalen Blutglukosespiegels benötigt werden. Zurzeit stehen zwei grundsätzlich verschiedene Insulin-Therapieformen zur Verfügung mit denen sich Diabetiker auf den unterschiedlichen Insulinbedarf in verschiedenen Lebenssituationen einstellen können. Mit der so genannten Basis-Bolus-Therapie (BBT) kann der Patient seine Blutglukosespiegel gut kontrollieren bzw. steuern, da er neben einer Basisinjektion mit Verzögerungsinsulin, die der Aufrechterhaltung des Stoffwechsels dient, zu jeder Mahlzeit als „Bolus“ ein kurzwirkendes Insulin verabreicht. Bei der konventionellen Therapieform verabreicht sich der Patient nur zweimal täglich Insulin in Form von Mischinsulinen (kurzwirkendes Insulin und Verzögerungsinsulin). Aufgrund der schlechten Steuerbarkeit des Blutzuckerspiegels bei der konventionellen Therapie, besteht die Notwendigkeit, Kohlenhydrate zeitlich und mengenmäßig definiert zu sich zu nehmen.

1.2.4 (Spät-) Komplikationen

Neben den Akutkomplikationen (Hypoglykämie, Ketoazidose und Koma) können wie bei anderen Diabetesformen auch beim T1D schwerwiegende Spätkomplikationen auftreten. Die Entwicklung dieser Folgeschäden hängt eng mit der Diabetesdauer und der Qualität der Stoffwechseleinstellung zusammen. Zur Beurteilung der Einstellungsgüte kann die Bestimmung des glycosylierten Hämoglobins ($\text{HbA}_{1\text{C}}$) verwendet werden. Der $\text{HbA}_{1\text{C}}$ -Wert gibt als „Blutzuckergedächtnis“ die Glukosestoffwechsellaage für die Dauer der Erythrozytenüberlebenszeit wieder. Damit ist der $\text{HbA}_{1\text{C}}$ -Wert ein Maß für die Güte der Blutzuckereinstellungen der letzten 1 - 2 Monate vor $\text{HbA}_{1\text{C}}$ -Bestimmung. Da Hyperglykämien metabolische Stresssituationen darstellen, die die Entwicklung von Spätfolgen begünstigen, sollte der $\text{HbA}_{1\text{C}}$ -Wert immer nahe dem Normbereich ($<6\%$) gehalten werden. Als Spätfolgen des Diabetes treten neben Neuropathien vor allem Gefäßveränderungen auf, die in Mikro- und Makroangiopathien unterteilt werden. In beiden Fällen handelt es sich um arteriosklerotische Veränderungen in den Gefäßwänden, die mit einer verminderten Fließgeschwindigkeit des Blutes einhergehen und zu Gefäßverengungen und -verschlüssen führen können. Etwa 80 % der Diabetiker sterben an Komplikationen des Gefäßsystems.

1.3 Ätiologie und Pathogenese des Typ 1 Diabetes

1.3.1 Genetische Prädisposition

Die Suszeptibilität zur Entwicklung eines T1D wird sowohl durch genetische als auch durch Umweltfaktoren determiniert. Die Bedeutung von genetischen Risikofaktoren zeigt sich in der familiären Häufung der Erkrankung. Verwandte ersten Grades haben ein Risiko von 5 - 6 % bis zum Alter von 15 Jahren einen Diabetes zu entwickeln, dem gegenüber stehen 0,3 % Krankheitsrisiko in der restlichen Bevölkerung Deutschlands (5). Die Konkordanzrate eineiiger (monozygoter) Zwillinge liegt mit 30 - 40 % deutlich höher als die zweieiiger (dizygoter) Zwillinge (6 %) (6, 7). Dafür verantwortlich sind so genannte Suszeptibilitätsgene. Die ersten Typ 1 Diabetes Suszeptibilitätsgene, die identifiziert wurden, waren die humanen Leukozytenantigene „*human leucocyte antigen*“ (HLA) Gene, die auf Chromosom 6p21 lokalisiert sind (8, 9). Nachfolgende Studien zeigten eine Assoziation zwischen der Erkrankung und der Insulinregion auf Chromosom 11p (10, 11). Bis zum Ende der Neunziger Jahre des 20. Jahrhunderts wurden insgesamt über 20 Gen-Loci identifiziert, die zur Diabetessuszeptibilität beitragen.

Genomweite Assoziationsstudien belegen, dass die HLA-Genregion, auch als IDDM1-Locus bezeichnet, die genetische Hauptdeterminate des Krankheitsrisikos darstellt. Sie ist verantwortlich für 42 % des Risikos bei der familiären Vererbung des T1D (12). Die HLA-Assoziationen mit dem T1D sind sehr komplex und beinhalten viele Haplotypen, die das Krankheitsrisiko beeinflussen. Zu den stärksten Risikovarianten zählen die Haplotypen DR3 und DR4; DQ6 dagegen wirkt stark protektiv. Der IDDM2-Locus (die Insulingenregion) trägt zu weiteren 10 % der genetischen Suszeptibilität bei (12). Auch IDDM12 (CTLA-4-Locus) ist ein weiteres wichtiges Suszeptibilitätsgen (13, 14).

1.3.2 Der Einfluss von Lebensstil und Umweltfaktoren auf die Diabetespathogenese

Obwohl genetische Faktoren einen sehr starken Einfluss auf das Diabetesrisiko haben (vgl. 1.3.1), zeigt die geringe Konkordanzrate zwischen eineiigen Zwillingen, dass die Suszeptibilitätsgene eine geringe Penetranz aufweisen. Nicht alle Betroffenen, die eine genetische Prädisposition besitzen, entwickeln einen T1D. Dies deutet darauf hin, dass nicht-genetischen Faktoren eine große Gewichtung beigemessen werden muss. Inzwischen wird angenommen, dass die Diabetessuszeptibilität zu 2/3 durch Umweltfaktoren determiniert wird. Die Bedeutung von Umweltfaktoren zeigt sich beispielsweise in saisonalen Unterschieden in der Häufung des Auftretens des T1D. Die meisten Diabetes-Diagnosen, den T1D betreffend, werden im Winter und Frühjahr gestellt. In dieser Zeit steigt die Anfälligkeit gegenüber Viruserkrankungen an. Pankreotoxische Viren z. B. Coxsackie-B₄-Viren (15, 16) sowie Erreger von Mumps (17, 18) und Röteln (19, 20), die zu einer Schädigung der Langerhans'schen Inseln führen, werden als Auslöser des T1D diskutiert. Auch früh im Kindesalter stattfindende Milchprotein- oder Glutenexpositionen werden als auslösende Faktoren beschrieben (21, 22) (23, 24). Zusätzlich gibt es zahlreiche Hinweise für die Gültigkeit der bislang noch kontrovers diskutierten Akzelerator-Hypothese, die besagt, dass ein erhöhtes Körpergewicht auch beim

T1D mit einer Beschleunigung der Krankheitsentwicklung assoziiert ist (25). Diese Hinweise deuten daraufhin, dass der Lebensstil ähnlich wie beim T2D, auch die Pathogenese des T1D beeinflusst.

Der in den letzten Jahren beobachtete kontinuierliche Anstieg der Diabetesinzidenz (26, 27) kann als weiteres wichtiges Indiz für die Bedeutung von Umweltfaktoren als auslösendes Moment des T1D gewertet werden, da Lebensstil und Umwelt sich in den vergangenen Jahrzehnten deutlich schneller veränderten als das für genetische Risikofaktoren zu erwarten gewesen wäre. Zudem zeigt die Inzidenzrate (Anzahl der Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und Jahr) des T1D ausgeprägte geographische Unterschiede. In Europa schwankt die Inzidenzrate zwischen 3,2 in Mazedonien und 40,2 in Finnland (28).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Verlust der Toleranz gegenüber autologen pankreatischen β -Zellen nicht nur durch genetische Faktoren, sondern ganz wesentlich durch Umweltfaktoren begünstigt wird. Daher ist davon auszugehen, dass sich ein T1D bevorzugt in einem genetisch prädisponierten Individuum manifestiert, das einem krankheitsfördernden Umwelteinfluss ausgesetzt ist.

1.3.3 Diabetesspezifische Autoantikörper

Die dem Krankheitsbild des T1D zugrunde liegende autoimmune Reaktivität spiegelt sich unter anderem in der Präsenz von zirkulierenden Autoantikörpern gegen Inselzellstrukturen (*islet cell antibodies*, ICA), Insulin (*insulin-autoantibodies*, IAA), *glutamic acid decarboxylase* (GAD65), *insulinoma-associated tyrosine phosphatase* (IA-2) (29) und Zinktransporter 8 (ZnT8) (30, 31) wieder. Bei 85 - 90 % der Patienten sind diese Autoantikörper zum Zeitpunkt der Diagnose nachweisbar (32, 33). Lange Zeit war unklar, ob die Autoantikörper direkt zur β -Zellzerstörung beitragen, oder sekundär in Folge der Freisetzung von Autoantigenen aus Inseln entstehen, die durch andere Effektormechanismen des Immunsystems geschädigt wurden. Mittlerweile gilt jedoch als gesichert, dass Autoantikörper und damit die B-Lymphozytenaktivität nicht ausschlaggebend für die β -Zelldestruktion sein kann, da Morbus Bruton (B-Lymphozyten-Defizienz) Patienten einen T1D entwickeln können (34). Autoantikörper stellen allerdings gute Marker eines sich entwickelnden β -zellgerichteten Immungeschehens dar. Das Auftreten von Autoantikörpern geht der klinischen Manifestation der Krankheit meist einige Jahre voraus und dient daher in der prädiabetischen Phase der Diagnostik und Früherkennung des T1D.

1.3.4 Mechanismen der β -Zellschädigung

Wie bereits eingangs beschrieben, resultiert der T1D aus der Zerstörung autologer pankreatischer β -Zellen. Die frühen Stadien des Krankheitsprozesses sind charakterisiert durch eine Insulitis, d. h. durch Infiltration der pankreatischen Inseln durch mononukleäre Zellen (35, 36). Obwohl eine Infiltration eine normale Reaktion auf einen Gewebeschaden, verursacht durch exogene Faktoren oder mikrobielle Infektionen, sein kann, wird vermutet, dass die Makrophagen- und Lymphozyteninfiltration direkt zur β -Zellzerstörung führt. Die Annahme, dass antigenspezifische zellvermittelte Immunprozesse zur β -Zellschädigung beitragen, wird

durch folgende Beobachtungen gestützt: T-Lymphozyten mit Spezifität gegen autologe, β -zellassozierte Antigene, wie z. B. Insulin-Peptide, finden sich während einer Insulitis in der entzündeten Insel. Zudem sind zum Zeitpunkt der Manifestation autoreaktive T-Lymphozyten auch im peripheren Blut von Patienten mit T1D nachweisbar (37). Das Fortschreiten der Krankheit kann durch Immunsuppressiva, die spezifisch gegen T-Lymphozyten gerichtet sind, verzögert werden (38). Humane Pankreasbiopsien deuten daraufhin, dass $CD8^+$ Zellen durch Erkennung von Autoantigenen in Assoziation mit hyperexprimierten MHC-Klasse-I-Molekülen, eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des T1D spielen (39, 40). Genauere Einblicke in die Immunpathogenese der Erkrankung stammen im Wesentlichen aus Tiermodellen.

1.4 Die Rolle des Immunsystems bei der Pathogenese des Diabetes

1.4.1 Grundzüge des Immunsystems

Das Immunsystem stellt das biologische Abwehrsystem höherer Lebewesen dar und umfasst ein komplexes Netzwerk aus verschiedenen Organen, Zellpopulationen und Molekülfamilien. Es übt vier sich ergänzende Grundfunktionen aus (41):

- Abwehr und Bekämpfung von Pathogenen aller Art
- Selbsttoleranz zum Schutz vor Autoimmunerkrankungen
- Durchführung von Immunreaktionen gegen veränderte Bestandteile des eigenen Organismus (infizierte, überalterte oder entartete Zellen)
- Regulation der Immunantworten zur Vermeidung von allergischen Reaktionen

Es werden zwei Arme des Immunsystems unterschieden, das innate (angeborene) und das adaptive (erworbene) Immunsystem. Das angeborene Immunsystem ist phylogenetisch sehr alt und findet sich in allen mehrzelligen Organismen. Es dient der primären Erkennung von Antigenen und stellt damit die so genannte „*first line of defence*“ dar. Wichtige Komponenten des innaten Immunsystems sind die Makrophagen, die dendritischen Zellen und das Komplementsystem.

Das adaptive Immunsystem, der phylogenetisch jüngere Arm des Immunsystems, der sich lediglich bei Wirbeltieren findet, ergänzt die Aktivitäten der angeborenen Immunität z. B. bei der Abwehr von Pathogenen. Zu den zellulären Bestandteilen des adaptiven Immunsystems zählen die B- und T-Lymphozyten, zu den humoralen die Immunglobuline. Zytokine und Chemokine fungieren als Botenstoffe in beiden Armen des Immunsystems.

1.4.2 Wichtige Immunzellen für die Pathogenese des Typ 1 Diabetes

Im Folgenden werden nur diejenigen Immunzellen näher beschrieben, denen eine besondere Relevanz bei der Pathogenese des T1D zugeschrieben wird. Bei der Krankheitsentwicklung scheinen B-Lymphozyten verglichen mit T-Lymphozyten lediglich eine untergeordnete Rolle zu spielen. Obwohl zahlreiche Autoantikörper gegen β -Zellantigene identifiziert werden konnten und zur Abschätzung des Diabetesrisikos herangezogen werden können, gibt es mittlerweile

ausreichende Hinweise dafür, dass sie nicht signifikant zur β -Zellzerstörung beitragen (34). Die Aktivitäten von B-Lymphozyten finden daher hier keine weitergehende Betrachtung.

Untersuchungen sowohl am Menschen als auch an Mausmodellen identifizierten zellvermittelte Immunreaktionen als wichtigste Effektormechanismen der progredienten β -Zellzerstörung. Dabei spielen Makrophagen und T-Lymphozyten eine bedeutende Rolle.

1.4.2.1 Makrophagen und ihre Rolle in der β -zellgerichteten Immunreaktivität

Auf Seite des innaten Immunsystems sind vor allem Makrophagen (mononukleäre Phagozyten) von besonderer Bedeutung für die Zerstörung insulinproduzierender Zellen. Aufgrund der beschriebenen Makrophagenfunktionen ist die Aufklärung der Mechanismen, die inflammatorische Makrophagenaktivitäten kontrollieren, von zentraler Bedeutung für das Verständnis der Immunpathogenese des T1D.

Als morphologischer Beleg einer β -Zellzerstörung dienen pankreatische Inseln von Tiermodellen des spontanen oder Streptozotocin-induzierten Insulinmangeldiabetes, die eine progressive Immunzellinfiltration (Insulitis) zeigen (42, 43). Neben Tiermodellen konnte auch im Menschen eine Infiltration von Inseln durch Immunzellen nachgewiesen werden (39, 40). Während dieses Prozesses spielen dendritische Zellen und Makrophagen eine entscheidende Rolle. Lee et al. 1988 belegte die Bedeutung der Makrophagen durch den Nachweis der Hemmbarkeit der Diabetesprogression mittels Anti-Makrophagenstrategien im Frühstadium der Insulitis im Tiermodell (44). Studien zur Sequenz der in die Inseln einwandernden Immunzellen haben gezeigt, dass Makrophagen die primären inselinfiltierenden Zellen sind. Dies gilt nicht nur für die NOD-Maus (vgl. 1.6), sondern auch für die Diabetesmodelle der *BioBreeding* (BB)-Ratte und des *multiple low dose streptozotocin-induced diabetes* (MLDSTZ) der Maus (42, 43, 44).

Makrophagen sind in der Lage die β -Zellen durch Freisetzung zytotoxischer Mediatoren wie Stickstoffmonoxid (NO) direkt zu schädigen (45). In vitro Studien haben gezeigt, dass reaktive Sauerstoffintermediate (*reactive oxygen intermediates*, ROI) (46) und inflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF- α (47) ebenfalls einen starken inselzellschädigenden Einfluss ausüben.

Des Weiteren spielen Makrophagen eine große Rolle in der Aktivierung des angeborenen und adaptiven Immunsystems wodurch sie weiter zu β -Zellschäden und -tod beitragen.

Aufgrund der beschriebenen Makrophagenfunktionen ist die Aufklärung der Mechanismen, die inflammatorische Makrophagenaktivitäten kontrollieren, von zentraler Bedeutung für das Verständnis der Immunpathogenese des T1D.

1.4.2.2 T-Lymphozyten als wichtige Effektorzellen in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes

Die Rolle der T-Lymphozyten bei der Pathogenese des T1D wird zum einen offenkundig durch ihre Gegenwart in den mononukleären Zellinfiltraten in den pankreatischen Inseln (48) und zum anderen durch den Befund, dass durch die Gabe der immunsuppressiven Substanz Cyclosporin A eine Verzögerung der Krankheitsentwicklung erreicht werden kann (49). Des

Weiteren legt die Beobachtung des Krankheitstransfers durch Knochenmarkstransplantation von Diabetespatienten zu immunsupprimierten nicht-diabetischen Empfängern eine Beteiligung von T-Lymphozyten an der Diabetespathogenese nahe (50). Diese Annahme wird zusätzlich gestützt durch die Beobachtung der Rückkehr einer Insulitis in Pankreastransplantaten bei T1D Patienten (51). Im Tiermodell konnte die Übertragbarkeit der Krankheit durch den Transfer von aufgereinigten $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen gezeigt werden (52), wohingegen ein Transfer von Autoantikörpern nicht zur Erkrankung und auch nicht zur Induktion einer Insulitis führte.

Histologische Untersuchungen von Pankreasgewebe haben gezeigt, dass in der prädiabetischen Phase zunächst nur wenige Immunzellen die Insel infiltrieren. Die Immunezellinfiltration weitet sich jedoch im fortgeschrittenen Stadium zu einer Peri-Insulitis aus, während der die infiltrierten Immunzellen hauptsächlich in der Peripherie der Insel lokalisiert sind. In dieser frühen Phase der so genannten „benignen“ Insulitis dominieren die T_H2 -assoziierten Zytokine Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-10 (IL-10). Das T_H1 -spezifische Zytokin Interferon- γ (INF- γ) ist lediglich in geringen Konzentrationen nachweisbar. Der Beginn der autoaggressiven Phase der Insulitis mit zunehmender Infiltration des zentralen Inselbereichs („Intra-Insulitis“) ist gekennzeichnet durch einen Übergang zu T_H1 -dominierter Immunreaktivität, die mit einer Hochregulation der T_H1 -assoziierten Zytokine Interleukin-12 (IL-12), Interleukin-18 (IL-18), IFN- γ und TNF- α einhergeht.

Aufgrund dieser Beobachtungen liegt die Vermutung nahe, dass der T1D aus einem regulatorischen Ungleichgewicht zwischen T_H1 -Helferzellen (T_H1) und T_H2 -Helferzellen (T_H2) resultiert. In therapeutischen Ansätzen versucht man daher, durch gezielte Immun-Interventionsstrategien die T_H1 -Immunantwort in Richtung T_H2 -Antwort umzulenken, um somit die autoaggressive Phase der Insulitis zu verhindern oder deren Auftreten zu verzögern.

Neben den $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten sind in den letzten Jahren vermehrt die natürlich vorkommenden professionellen regulatorischen T-Lymphozyten in den Fokus der Diabetesforschung gerückt. Diese Population von Thymus generierten T-Lymphozyten (53) ist durch die Oberflächenproteine CD4 und CD25, sowie durch die Expression des Transkriptionsfaktors *forkhead box P3* (Foxp3) charakterisiert. CD4 ist ein Glykoprotein, das auf der Oberfläche von T-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen vorkommt; beim CD25-Protein handelt es sich um die α -Kette des IL-2-Rezeptors, der unter anderem auf aktivierten T- und B-Lymphozyten exprimiert ist.

$CD4^+CD25^+$ regulatorische T-Lymphozyten (Treg) spielen eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der immunologischen Selbsttoleranz und in der negativen Kontrolle von sowohl pathologischen als auch physiologischen Immunantworten. Erblich bedingte Defizienz dieser Zellpopulation führt beim Menschen zum *Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked* (IPEX) Syndrom, das durch deutliche Beeinträchtigungen der Selbsttoleranz und Immunregulation und in der Folge durch ein vermehrtes Auftreten von Autoimmunität, Allergien und weiteren Anomalien des Immunsystems charakterisiert ist (54).

Daher hat die Erforschung der Beeinflussung der regulatorischen Kapazität der Treg-Population als mögliche Strategie zur Prävention oder Behandlung von Autoimmunkrankheiten wie T1D an Bedeutung gewonnen.

1.4.2.3 Adipozyten und ihr mögliche Rolle in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes

Adipozyten wurden lange Zeit lediglich aus Sicht ihrer Energiespeicherfunktion charakterisiert. Mittlerweile häufen sich jedoch Hinweise, dass Adipozyten auch einen entscheidenden Beitrag zu inflammatorischen Prozessen leisten. Die in Stoffwechselkrankheiten wie Insulinresistenz und Diabetes sowie der meist zugrunde liegenden Adipositas (und dem metabolischen Syndrom) häufig beobachtete chronische, subklinische Inflammation wird unter anderem von Adipozytenmediatoren hervorgerufen (55, 56, 57). Damit scheinen Adipozyten eine wichtige Verbindung zwischen dem Metabolismus und dem Immunsystem darzustellen. Adipozyten besitzen viele Eigenschaften von innate Immunzellen. Da Adipozyten und Makrophagen von gemeinsamen Vorläuferzellen abstammen, besitzen Präadipozyten noch die Potenz zu Makrophagen zu konvertieren (58), während reife Adipozyten diese Fähigkeit verloren haben. Prä- und reife Adipozyten antworten auf eine Exposition mit Lipopolysaccharid (LPS) oder Hitzeschockprotein 60 (Hsp60) durch die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-6 (IL-6) und Chemokinen wie Interleukin-8 (IL-8) und *Monocyte Chemoattractant Protein 1* (MCP-1) (59, 60). Des Weiteren konnte die Expression von Toll-like Rezeptoren (TLR) wie TLR4 auf Adipozyten nachgewiesen werden (61).

Aufgrund der bereits unter 1.3.2 erwähnten Akzelerator-Hypothese kann deshalb vermutet werden, dass auch Adipozytenfunktionen zur Diabetespathogenese beitragen.

1.5 Toll-like Rezeptoren

1.5.1 Toll-like Rezeptoren in der Immunantwort

Die Entdeckung von TLR hat unser Wissen und Verstehen von Immunantworten gegen Infektionen und deren Regulation deutlich vorangebracht. Angeborene Immunität im Allgemeinen und TLR im Besonderen spielen eine entscheidende Rolle in der ersten Abwehr von mikrobiellen Pathogenen. Die innate Immunantwort wird in Insekten und Säugetieren durch das Erkennen von konservierten molekularen Mustern (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) der mikrobiellen Pathogene ausgelöst. Die Detektion dieser PAMP wird durch eine Reihe von keimbahnkodierten Rezeptoren vermittelt, die als „*pattern-recognition receptors*“ (PRR) bekannt sind. In Säugetieren fungieren TLR als PRR, die Bestandteile mikrobieller Pathogene erkennen. Die Familie der TLR umfasst evolutionär hochkonservierte Proteine mit einer starken Homologie zur Toll-Struktur der Taufliege *Drosophila melanogaster*, die ursprünglich als wesentlicher Rezeptor für die Dorsoventralentwicklung bei Insekten charakterisiert wurde. Erst 1996 konnte das erste Mal gezeigt werden, dass Toll in Insekten auch eine Schlüsselrolle in der Immunität gegen Pilze einnimmt (62). Danach wurden zahlreiche Homologe von Toll in Säugetieren identifiziert und als TLR bezeichnet. TLR sind Typ-I-Transmembranproteine mit einer N-terminalen, extrazellulären leuzin-reichen Domäne, einer Transmembrandomäne, sowie einer C-terminalen zytoplasmatischen Domäne, die der zytoplasmatischen Region des IL-1-Rezeptors ähnelt. Diese C-terminale Domäne wird als Toll-IL-1-Rezeptor (TIR) Domäne bezeichnet und ist erforderlich für die Signalübertragung.

Bislang wurden in Säugetieren 13, im Menschen 11 verschiedene TLR beschrieben, die alle unterschiedliche PAMP von verschiedenen mikrobiellen Pathogenen wie Viren, Bakterien, Protozoen und Pilzen erkennen (63).

Als ein wichtiges Mitglied der TLR-Familie, das auch einen starken immunregulatorischen Einfluss ausübt, wurde im Jahr 1998 der TLR4 als Rezeptor für LPS beschrieben (64). Seitdem wurde eine Vielzahl von Liganden der TLR identifiziert (Tab. 1). Die TLR1, 2 und 4 sind auf der Zelloberfläche lokalisiert, wo sie bakterielle Strukturen erkennen. Die TLR3, 7, 9 hingegen sind in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert und dienen dem Erkennen von fremden Nukleinsäuren (63).

Tabelle 1: Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden

Toll-like Rezeptor	Lokalisation	Ligand
TLR1/TLR2	Zelloberfläche	Triacyl-Lipopeptide
TLR2	Zelloberfläche	Peptidoglycan, Lipopeptide, Lipoproteine von Gram-positiven Bakterien, Zymosan
TLR3	Endosom	doppelsträngige RNA
TLR4	Zelloberfläche	Lipopolysaccharid von Gram-negativen Bakterien
TLR5	Zelloberfläche	Bakterielles Flagellin
TLR2/TLR6	Zelloberfläche	Diacyl-Lipopeptide
TLR7	Endosom	einzelsträngige (ss)RNA
TLR8	Endosom	Imidazoquinolin, ssRNA
TLR9	Endosom	nichtmethylierte CpG-DNA
TLR11	Zelloberfläche	Bestandteile von uropathogenen Bakterien

Die Tabelle zeigt humane Toll-like Rezeptoren, ihre Lokalisation sowie ihre Liganden (63).

TLR erkennen neben fremden auch einige autologe Moleküle, die insbesondere in Situationen von zellulärem Stress freigesetzt werden (65). So beschreiben neuere Studien beispielsweise Hsp60 als wichtigen endogenen Liganden, der seine stimulatorische Aktivität über spezifisch gebundenes LPS ausübt (66). Aufgrund dieser besonderen Eigenschaften der TLR liegt die Vermutung nahe, dass sie auch an der Entstehung von Autoimmunität beteiligt sein könnten.

Die Signaltransduktion durch TLR initiiert eine akute inflammatorische Antwort durch Induktion von verschiedenen Genen, die inflammatorische Proteine, Zytokine und Chemokine kodieren (67, 68). Nachfolgende Ereignisse, wie die Rekrutierung von Neutrophilen und die Aktivierung von Makrophagen führen zur effizienten Inaktivierung der mikrobiellen Pathogene (67).

Neben der Funktion der TLR als primäre Sensoren von Pathogenen und als Regulatoren innater Immunfunktionen sind TLR auch wesentlich an der Aktivierung des adaptiven Immunsystems beteiligt. Neuere Befunde belegen zusätzlich eine Rolle von TLR bei der

Entwicklung des Körpergewichts (69) und damit möglicherweise auch in der Regulation metabolischer Vorgänge.

In Übereinstimmung mit ihrer wichtigen Funktion als Detektionssystem für mikrobielle Pathogene, sind TLR hauptsächlich auf Zellen des Immunsystems, vor allem des innate Immunsystems (Makrophagen und dendritische Zellen), exprimiert. Adipozyten, die, wie neue Befunde belegen, zahlreiche innate Immunzeleigenschaften aufweisen, exprimieren ebenfalls TLR (61). Mittlerweile konnten TLR auch auf Zellen des adaptiven Immunsystems wie B- und T-Lymphozyten (70) und selbst auf Herzmuskelzellen, Epithelzellen (71, 72) und Keratinozyten (73) nachgewiesen werden. Der Nachweis der Präsenz von TLR4 auf einer ständig wachsenden Zahl von Zellpopulationen lässt auf eine besondere Bedeutung dieses Rezeptors schließen (70, 73, 74, 75, 76).

1.5.2 Toll-like Rezeptor 4

LPS-Moleküle sind die Hauptkomponenten der äußeren Zellwand von Gram-negativen Bakterien und stellen die wichtigste Zielstruktur für deren Erkennung durch das innate Immunsystem dar. LPS, das durch Bakterien wie *Staphylococcus aureus* produziert wird, kann von Menschen nur in sehr geringen Konzentrationen toleriert werden (bis zu 1 ng/ml Serum). Es handelt sich um den potentesten immunstimulierenden Bestandteil innerhalb der bakteriellen Zellwandkomponenten, der im Menschen eine gravierende systemische Reaktion, den so genannten septischen Schock (Endotoxinschock) auslösen kann. Die Antwort des Wirts auf LPS umfasst die Expression einer Vielfalt von proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF- α und Interferon- β und anderer proinflammatorischer Proteine wie induzierbare NO-Synthase (iNOS).

Vor mehr als 40 Jahren wurde eine Mauslinie entdeckt, die selbst hohe, normalerweise letale LPS-Dosen weitgehend toleriert. Poltorak et al. gelang es 1998 die LPS-Toleranz dieser C3H/HeJ Maus auf eine Punktmutation im dritten Exon des *tlr4*-Gens zurückzuführen (64). Der resultierende Aminosäureaustausch von Prolin nach Histidin in der zytoplasmatischen Domäne des Proteins führt dazu, dass es trotz Vorhandenseins des TLR4 nach LPS-Bindung zu keiner intrazellulären Signalweiterleitung kommt. Eine weitere weitgehend LPS-insensitive Mauslinie ist die Linie C57BL/10ScCr, bei der eine spontane, 74723 bp umfassende Deletion auf Chromosom 4 (77) den vollständigen Verlust des *tlr4*-Gens bewirkt ohne andere Gene zu beeinträchtigen (Abb. 1).

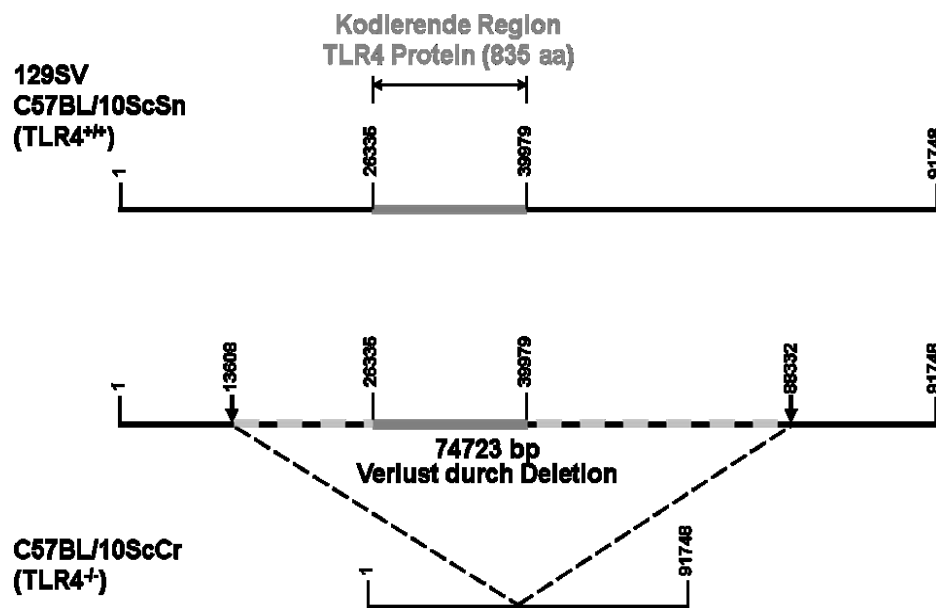


Abb. 1: TLR4-Deletion der C57BL/10ScCr-Maus. Im oberen Teil der Abbildung sind die die *tlr4*-Genregion flankierenden DNA-Abschnitte der Kontrolllinie C57BL/10ScSn dargestellt. Darunter befindet sich der gleiche DNA-Abschnitt der C57BL/10ScCr-Linie, der eine 74723 bp große Deletion umfasst, die die *tlr4*-Genregion beinhaltet.

In der LPS-TLR4-abhängigen Aktivierung von Zellen ist wahrscheinlich das *lipopolysaccharide binding protein* (LBP) das erste Wirtsprotein, das in die LPS-Erkennung involviert ist (78, 79). LBP ist ein Akutphaseprotein, das in der Leber produziert wird und im Blut zirkuliert, wo es LPS erkennt und einen hochaffinen Komplex mit dem Lipidanteil (Lipid A) des LPS bildet (80, 81). Die Rolle des LBP in der Signalweiterleitung ist die Bindung von LPS und die nachfolgende Bildung eines ternären Komplexes mit CD14, einem membrangebundenen Glykoprotein. CD14 konzentriert LPS für die Bindung an MD-2, das mit der extrazellulären Domäne von TLR4 assoziiert ist. Die nachfolgende Signalweiterleitung kann in zwei Signalwege unterteilt werden, die zeitlich versetzt ablaufen können: in frühe, *myeloid differentiation factor 88* (MyD88)-abhängige und in späte, MyD88-unabhängige, *TIR-related adaptor protein inducing interferon* (TRIF) und *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM)-abhängige (82). Erstere Signale werden durch Bindung und Aktivierung des Adaptorproteins MyD88 an den dimerisierten TLR4-MD2-Komplex initiiert. Es schließt sich eine Aktivierungskaskade an, die über verschiedene Kinasen und das Adaptorprotein *TNF receptor-associated factor* (TRAF) schließlich zur Translokation der aktivierten Form des nukleären Transkriptionsfaktors NFκB in den Zellkern und zur Transkription von Genen proinflammatorischer Mediatoren führt.

Neben diesem dargestellten frühen MyD88-abhängigen Signalweg, gibt es auch einen späten, MyD88-unabhängigen, TRIF- und TRAM-abhängigen Signalweg. In diesem Signalweg ist TRIF gemeinsam mit TRAM an der Aktivierung von Interferon-Genen durch den Transkriptionsfaktor *interferon-regulatory factor-3* (IRF-3) beteiligt.

1.6 Das NOD-Mausmodell - ein Tiermodell des autoimmun vermittelten Diabetes

Erkenntnisse zur Pathogenese des T1D sind im Wesentlichen Untersuchungen an Tiermodellen der humanen Erkrankung zu verdanken. Man unterscheidet Tiermodelle mit induziertem Diabetes in denen die Verabreichung des β -zellspezifischen Toxins Streptozotocin (SZ) einen Krankheitszustand hervorruft, der weitestgehend dem humanen T1D entspricht (83, 84, 85), und Modelle, die spontan einen Diabetes entwickeln. Zu den letztgenannten Modellen zählen die BB Ratte (86) und die *non obese diabetic* (NOD) Maus (87), bei der es sich um das zurzeit am besten charakterisierte Tiermodell des T1D handelt. Die NOD-Maus entwickelt einen spontanen autoimmunen Diabetes, der dem humanen T1D sehr ähnelt (88). Vergleichbar zur Situation im Menschen zeigt sich in diesem Tiermodell eine genetische Prädisposition; die Tiere entwickeln Antikörper und T-Lymphozyten mit Spezifitäten für autologe β -Zellantigene. Makino et al. (87) generierten die NOD-Linie vor mehr als zwanzig Jahren durch Bruder-Schwester-Verpaarung aus der Auszucht von Jcl:ICR Mäusen. Die Inzidenzrate des spontanen Diabetes in dieser Linie liegt für weibliche Tiere bei 60 - 80 % und für männliche Tiere bei 20 - 30 % (89, 90). Die Diabetesmanifestation bei weiblichen Tieren tritt typischerweise im Alter von 12 bis 14 Wochen auf; bei männlichen Tieren etwas später. Vergleichbar zur humanen Situation kontrollieren in der NOD-Maus viele Loci die Diabetessuszeptibilität. Neben dem MHC-Locus tragen ca. 20 als *Idd* bezeichnete Loci zur Krankheitsentstehung bei (91).

Tiermodelle des humanen T1D, insbesondere die NOD-Maus, sind wertvolle Untersuchungsobjekte für die Diabetesforschung, da sie entscheidend zum Erkenntnisgewinn beitragen. Invasive Methoden, wie Pankreasbiopsien, die im Menschen als ethisch bedenklich angesehen werden müssen, haben in der NOD-Maus, neben genetischen Informationen bereits mannigfaltige Einblicke in die Pathogenese geliefert.

Aufgrund der guten Vergleichbarkeit zur Situation im Menschen wurden für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen das NOD-Mausmodell gewählt. Um gezielt die Beteiligung des TLR4 an der Diabetespathogenese zu untersuchen, wurde der TLR4-Defekt der C57BL/10ScCr-Linie in die NOD-Maus eingekreuzt.

1.7 Ziel der Arbeit

Die Pathogenese des humanen (insulinabhängige) T1D ist charakterisiert durch die progressive Zerstörung autologer, insulinproduzierender pankreatischer β -Zellen im Verlauf einer inflammatorischen Reaktion. Neuere Befunde weisen darauf hin, dass die Induktion und Progression von autoimmunen Reaktionen wesentlich von inflammatorischen Prozessen bestimmt wird, deren Aktivität von TLR kontrolliert werden, insbesondere durch TLR4.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher die Hypothese geprüft werden, dass TLR4 die Mechanismen kontrolliert, die an der Immunpathogenese des Insulinmangeldiabetes beteiligt sind. Die Untersuchungen sollten durchgeführt werden an der NOD-Maus, einem Tiermodell des humanen T1D, in das selektiv ein TLR4-Defekt eingekreuzt wurde. Die Studien konzentrierten sich auf Zellen mit innatens Immuneigenschaften, insbesondere Makrophagen und Adipozyten. Ein weiterer Schwerpunkt lag auf den regulatorischen T-Lymphozyten, welche die Progression von Immunreaktionen regulieren und autoreaktive Effektorzellen supprimieren.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sollen das Verständnis der Immunpathogenese des T1D vertiefen. Da trotz ständiger Verbesserungen in der Früherkennung und Abschätzung des individuellen Krankheitsrisikos, bislang keine ursächliche Therapie oder gar Prävention der Erkrankung zur Verfügung steht, sollen die aus der Arbeit gewonnenen Erkenntnisse eine Grundlage für die Entwicklung gezielter Interventionsstrategien bilden, die zur Prävention der Erkrankung beitragen können.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Tiere

2.1.1.1 C57BL/10ScSn- und C57BL/10ScCr-Mäuse

Der TLR4-defiziente Mausstamm C57BL/10ScCr- stammte, wie der C57BL/10ScSn-Kontrollstamm (64), aus der Tierzucht des Deutschen Diabetes-Zentrums. Er wurde ursprünglich von M. Freudenberg aus dem Max-Planck-Institut für Immunbiologie in Freiburg zur Verfügung gestellt und diente der Einkreuzung des TLR4-Defektes in die NOD-Maus.

2.1.1.2 NOD-Maus

Beim NOD-Stamm (88) handelt es sich um den Parentalstamm des TLR4-defizienten Mausmodells, das in der vorliegenden Arbeit analysiert wurde. Der verwendete NOD-Stamm (88) wird im Deutschen Diabetes-Zentrum gezüchtet.

2.1.1.3 NOD TLR4^{+/+} und NOD TLR4^{-/-} Mäuse

Das Modell der TLR4-defizienten NOD-Maus wurde innerhalb von Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe durch das Rückkreuzen des TLR4-Defekts der C57BL/10ScCr-Maus auf den NOD-Hintergrund generiert. Als Kontrollen dienten der Parentalstamm NOD und die aus *Intercross*-Generationen von NOD TLR4^{+/+} Mäusen stammende, homozygot TLR4-exprimierende NOD-Maus (TLR4^{+/+}).

2.1.1.4 New Zealand Obese (NZO)-Maus

Bei der NZO-Maus handelt es sich um ein Tiermodell der humanen Adipositas und des metabolischen Syndroms (92). Dieses Modell wurde zur Isolation von primären Adipozyten unterschiedlichen Reifungsgrades verwendet. Die eingesetzten Tiere stammten aus der Tierzucht des Deutschen Diabetes-Zentrums.

2.1.2 Tierfutter

ssniff® M-Z Diät, Alleinfutter für Mäuse – Zucht, extrudiert, Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest

2.1.3 Chemikalien

Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
bovines Serumalbumin (BSA),	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Albumin Fraktion V	
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Concanavalin A (ConA)	Serva, Heidelberg

Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Gibco BRL, Eggenstein
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dexamethason	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Biomol, Hamburg
D(+)-Glukose-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
DNA-Größenmarker (100 bp und 1 Kb)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ficoll 400	Pharmacia GmbH, Freiburg
Glycerin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt
Hämalaun	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hämatoxylin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hitzeschockprotein 60 (Hsp60), rekombinant, human	Stressgen, Victoria, BC, Kanada
Igepal CA 630	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Insulin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Interleukin-2 (IL-2)	BD Pharmingen, Heidelberg
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Kaisers Glyceringelatine	Merck KGaA, Darmstadt
Kollagenase NB4	Serva, Heidelberg
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Escherichia coli O26:B6	
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Methylisobutylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
MgCl ₂ (PCR)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Milchpulver Blotting Grade	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Na-Desoxycholat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Naphthylethylendiamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Oil-Red-O solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Paraffin	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA, Darmstadt
ProSieve 50 Gelsolution	Lonza Cologne AG, Köln
PhosStop	Roche Applied Science, Mannheim
Proteaseinhibitor	Roche Applied Science, Mannheim
Proteinase K	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ringer-Lactat-Lösung	DeltaSelect GmbH, Pfullingen

Sulfanilamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Temed	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Tris	Merck KGaA, Darmstadt
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Trypsin	Boehringer-Ingelheim, Ingelheim am Rhein
Tween 20	AppliChem GmbH, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	Merck KGaA, Darmstadt
Xylencyanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Xylol	AppliChem, Darmstadt

2.1.4 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon, Ebersberg bezogen.

Tabelle 2: Oligonukleotidsequenzen

Gen/Genort	<i>forward primer</i>	<i>backward primer</i>	Produktlänge (bp)	
			C57BL/10	NOD
TLR4-Wildtyp	5' -CAG TCG GTC AGC AAA CGC CTT CTT C-3'	5' -CAA GGC AGG CTA GCA GGA AAG GGT G-3'	401	401
TLR4-Defekt	5' -GCA AGT TTC TAT ATG CAT TCT C-3'	5' -CCT CCA TTT CCA ATA GGT AG-3'	140	140
TLR4 (RT-PCR)	5' -CAT CCA GGA AGG CTT CCA CA-3'	5' -GGC GAT ACA ATT CCA CCT GC-3'	197	197
β-Actin	5' -GGC CCA GAG CAA GAG AGG TA-3'	5' -GGT TGG CCT TAG GGT TCA GG-3'	176	176
IDD1 (D17Mit34)	5' -TGT TGG AGC TGA ATA CAC GC-3'	5' -GGT CCT TGT TTA TTC CCA GTA CC-3'	148	126
IDD2 (D9Mit25)	5' -AAA CCC AGT CTT AAA AAC AAA ACA-3'	5' -TTC ATT TTA TTT TCT TTG GAA AGG-3'	130	136
IDD3 (D3Mit95)	5' -CTA AAA GCA CTA GCA AAG AAA ATC A-3'	5' -CCT CCA CAC ACA TGT CCT TG-3'	122	146
IDD15 (D5Mit48)	5' -GAC TAT CAT CCA AGC CAA GAC C-3'	5' -AAA AGA CAC TTT CCC TGA CAT AGC-3'	206	150

2.1.5 Stammlösungen und Puffer

<i>Assay Diluent</i>	10 %	FCS in PBS, pH 7
Blockierungspuffer	2,5 g	Milchpulver
	50 ml	TBS-T
<i>Blotting buffer</i>	3,03 g	Tris
	14,41 g	Glycin
	200 ml	Methanol
		Vor Zugabe des Methanols muss Tris/Glycin gelöst sein. Nach der Zugabe Lösung mit aqua dest. auf 1 l auffüllen; Lagerung bei 4°C
<i>Coating buffer KC</i>		PBS
<i>Coating buffer IL-6</i>	8,40 g	NaHCO ₃
(0,1 M Natriumcarbonat, pH 9,5)	3,56 g	Na ₂ CO ₃
		mit aqua dest. auf 1 l auffüllen
<i>Coating buffer</i>		
MCP-1, TNF- α , IL-10	11,8 g	Na ₂ HPO ₄
(0,2 M Natriumphosphat, pH 6,5)	16,1 g	NaH ₂ PO ₄
		mit aqua dest. auf 1 l auffüllen
DEPC-Wasser	1 ml	Diethylpyrocarbonat
		mit Millipore Wasser auf 1000 ml auffüllen, unter dem Abzug über Nacht rühren lassen und dann autoklavieren
DNA-Ladepuffer 6x	0,25 ml	Bromphenolblau
	69,5 ml	DEPC
	0,25 ml	Xylencyanol
	30 ml	Glycerin
Fixans	4 %	PFA / 2x PBS
		Zum Ansetzen der 4 % PFA-Lösung in 2x PBS wird zunächst eine 8 %ige Lösung angesetzt, die anschließend 1:2 verdünnt wird. Dazu werden 8 g PFA in 100 ml aqua dest. bei 60°C gelöst. Nach Zugabe von 2 Tropfen 1N NaOH, wird die Lösung klar. Die Lösung wird unter Rühren erkalten gelassen und kann bei 4°C maximal 2 Tage gelagert werden.

Lämmli Probenpuffer	50 mM	Tris pH 6,8
	100 mM	Mercaptoethanol
	2 %	SDS
	10 %	Glycerin
	0,001 %	Bromphenolblau
Laufpuffer	30,3 g	Tris
	144 g	Glycin
	10 g	SDS
		Vor Zugabe des SDS einen pH-Wert von 8,3 einstellen und den Puffer mit aqua dest. auf 1 l auffüllen.
Lysepuffer	50 mM	Tris-HCl
	150 mM	NaCl
	1 %	Igepal
	0,25 %	Na-Desoxycholat
	100 µl	Proteaseinhibitor (1 Tablette in 2 ml aqua dest.)
	200 µl	PhosStop (1 Tablette in 1 ml aqua dest.)
		Lösung mit aqua dest. auf 2,5 ml auffüllen
10x PBS	40 g	NaCl
	5,8 g	Na ₂ HPO ₄
	1,0 g	KH ₂ PO ₄
	1,0 g	KCl
		mit aqua dest. auf 500 ml auffüllen und pH auf 7,0 einstellen
Stammlösung		
β-Mercaptoethanol	10 µl	β-Mercaptoethanol
	10 ml	PBS
Stammlösung Oil-Red-O	0,5 g	Oil-Red-O
	100 ml	Isopropanol (99 %)
		Aus der Stammlösung wird am Vortag des Experiments eine Gebrauchslösung angesetzt. Die Stammlösung wird zu diesem Zweck 1:1,5 mit aqua dest. verdünnt und vor Gebrauch 10 min bei 1000 x g zentrifugiert.
<i>Tail buffer</i>	50 mM	Tris pH 8,0
	100 mM	EDTA
	100 mM	NaCl
	1 %	SDS

5x TBE Puffer	60,6 g	Tris Base
	30,9 g	Borsäure
	3,72 g	EDTA
	auf 1 l mit aqua dest. auffüllen und auf pH 8,3 einstellen	
TBS-T	3 M	NaCl
	1 M	Tris-HCl, pH 7,6
	50 ml der 3 M NaCl Lösung mit 20 ml 1 M Tris-HCl versetzen und mit aqua dest. auf 1 l auffüllen; anschließend 1000 µl Tween hinzufügen	
TE Puffer	1 ml	1 M Tris-HCl, pH 7,5
	0,2 ml	0,5 M EDTA, pH 8,0
	98,8 ml	aqua dest.
Treg-Anreicherungspuffer	1x	PBS, pH 7,2
	0,5 %	BSA
	2 mM	EDTA
	steril filtrieren und zur Entgasung 15 min im Ultraschallbad beschallen	
Tris-HCl	12,1 g	Tris pH 8,8
	in 1 l aqua dest. auflösen; pH-Wert mit HCl einstellen	
Waschpuffer	0,05 %	Tween in PBS

2.1.6 Antikörper

Monoklonaler Ratte-Anti-Maus-CD16/CD32 (Fcγ III/II Rezeptor)-Antikörper (BD Pharmingen, Heidelberg)

Monoklonaler Hamster-Anti-Maus-CD3ε-Antikörper (BD Pharmingen, Heidelberg)

Monoklonaler Kaninchen-Anti-Maus-PPARγ-Antikörper (Acris Antibody GmbH, Herford)

PE-markierter monoklonaler Ratte-Anti-Maus-TLR4-MD2-Komplex-Antikörper (BD Pharmingen, Heidelberg)

Isotypkontrolle: PE-markierter monoklonaler Ratten-IgG_{2a,k}-Antikörper (BD Pharmingen, Heidelberg)

FITC-markierter monoklonaler Ratte-Anti-Maus-CD4-Antikörper (BD Pharmingen, Heidelberg)

Isotypkontrolle: FITC-markierter monoklonaler Ratten-IgG_{2a,k}-Antikörper (BD Pharmingen, Heidelberg)

PE-markierter monoklonaler Ratte-Anti-Maus-CD25-Antikörper (BD Pharmingen, Heidelberg)

Isotypkontrolle: PE-markierter monoklonaler Ratten-IgG_{1,λ}-Antikörper (BD Pharmingen, Heidelberg)

PE-markierter monoklonaler Ratte-Anti-Maus/Ratte-Foxp3-Antikörper (eBioscience, San Diego, CA, USA)

Isotypkontrolle: PE-markierter monoklonaler Ratten-IgG_{2a,k}-Antikörper (BD Pharmingen, Heidelberg)

FITC-markierter monoklonaler Ratte-Anti-Maus-Dlk-Antikörper (MBL, Woburn, MA, USA)

Isotypkontrolle: FITC-markierter monoklonaler Ratten-IgG₁-Antikörper (MBL, Woburn, MA, USA)

APC-markierter monoklonaler Ratte-Anti-Maus-CD11b-Antikörper (BD Pharmingen, Heidelberg)

Isotypkontrolle: APC-markierter monoklonaler Ratten-IgG_{2b,k}-Antikörper (BD Pharmingen, Heidelberg)

Anti-Schweine-Insulin-Serum von Meerschweinchen (Dako, Hamburg)

Normalserum (Maus) (Dianova, Hamburg)

2.1.7 Zytokine

Rekombinantes, murines Interleukin-1 β (IL-1 β)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Rekombinantes, murines Interleukin-2 (IL-2)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Rekombinantes, murines Interferon- γ (IFN- γ)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Rekombinanter, muriner Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden

2.1.8 Medien und Reagenzien für die Zellkultur

Accutase	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Ampicillin	Serva, Heidelberg
Antibiotikum-Antimykotikum Lösung	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Kälberserum (CS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
DMEM high glucose (4,5 g/l) with L-glutamine	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Dulbecco's PBS (1x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
fötales bovines Serum (FBS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Serva, Heidelberg
Insulin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
L-Glutamin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
MEM non-essential Amino Acid Solution	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Natriumpyruvat Lösung	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Penicillin G K-Salz	Serva, Heidelberg
RPMI 1640 Medium	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Streptomycin	Serva, Heidelberg

Differenzierungsmedium	500 ml	DMEM high glucose 4,5 g/l
	20 % (v/v)	Kälberserum
	1 %	Antibiotikum-Antimykotikum Lösung
	0,25 µM	Dexamethason
	0,5 mM	Methylisobutylxanthin
	10 µg/ml	Insulin
Fettzellkulturmedium	500 ml	DMEM high glucose 4,5 g/l
	10 % (v/v)	Kälberserum
	1 %	Antibiotikum-Antimykotikum Lösung
	1 mM	Natriumpyruvat
Insulinmedium	500 ml	DMEM high glucose 4,5 g/l
	10 % (v/v)	Kälberserum
	1 %	Antibiotikum-Antimykotikum Lösung
	1 mM	Natriumpyruvat
	50 ng/ml	Insulin

Makrophagen Kulturmedium	500 ml	RPMI 1640 Medium
	5 %	FCS
	13,75 ml	Supplement
	400 µl	β-Mercaptoethanol Stammlösung
RPMI 1640 Kulturmedium	500 ml	RPMI 1640 Medium
	5 %	FCS
	13,75 ml	Supplement
Supplement	240 ml	L-Glutamin (100 x 200 mM)
	240 ml	MEM non-essential Amino Acids (100x)
	2,38 g/l	HEPES
	0,12 g/l	Penicillin G K-Salz (1580 U/mg)
	0,27 g/l	Streptomycin (658 U/mg)
	0,025 g/l	Ampicillin
		Lösungen zusammengeben, mit aqua dest. auf 1 l auffüllen, pH-Wert auf 7,3 einstellen und steril filtrieren

2.1.9 Kit-Systeme

Anti-Mouse/Rat Foxp3 Staining Set	eBioscience, San Diego, CA, USA
Cell Proliferation ELISA, BrdU	Roche Applied Science, Mannheim
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche Applied Science, Mannheim
PromoKine XTT Cell Proliferation Kit	PromoCell GmbH, Heidelberg
Mouse CD4 ⁺ CD25 ⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Omniscript Reverse Transcription	Qiagen, Hilden
RNeasy Plus Micro Kit	Qiagen, Hilden
SuperSignal West Femto-Kit	Pierce Thermo Scientific, Bonn
Vectastain ABC Kit mit Anti-Meerschweinchen-IgG	Camon, Wiesbaden

ELISA-KITS

BD OptEIA TM Mouse MCP-1 ELISA Set	BD Biosciences, Heidelberg
BD OptEIA TM Mouse IL-6 ELISA Set	BD Biosciences, Heidelberg
BD OptEIA TM Mouse IL-10 ELISA Set	BD Biosciences, Heidelberg
BD OptEIA TM Mouse TNF (Mono/Mono) ELISA Set	BD Biosciences, Heidelberg
DuoSet Mouse KC	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
BD OptEIA TM Substrate Reagent A	BD Biosciences, Heidelberg
BD OptEIA TM Substrate Reagent B	BD Biosciences, Heidelberg

2.1.10 Geräte

Binokular	Nicon SMZ-10	Nicon AG, Egg/ ZH, Schweiz
Blotting Kammer	Mini-Protean II	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Blutzuckermessgerät Tragbares	EPOS Analyzer 5060	Eppendorf, Hamburg
Blutzuckermessgerät	FreeStyle™	ABBOTT Diabetes Care, Wiesbaden
Brutschrank	Cytoperm2	Heraeus, Düsseldorf
Durchflusszytometer	FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg
Durchlichtmikroskop	Axioplan	Carl Zeiss AG, Jena
Durchlichtmikroskop	Leica DMRBE	Carl Zeiss AG, Jena
Einbettungsgerät	Excelsior ES	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
ELISA Reader	EMax	MDS Analytical Technologies, Ismaning
Feinwaage	analytic	Sartorius AG, Göttingen
Gel-Laufkammer	Mini-Protean	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gel-Laufkammer	Pharmacia LKB·GNA 200	Pfizer, New York, NY, USA
Geldokumentationsapparatur	Bio Doc Analyse	Biometra, Göttingen
Geldokumentationsapparatur	Lumi Imager Workingstation	Roche Applied Science, Mannheim
Gewebehomogenisator	TissueRuptor	Qiagen, Hilden
Mikrotom	Mikrotom HM 369	Microm Laborgeräte GmbH, Walldorf
PCR Cycler	PCR Express	Hybaid, Garching
pH-Meter	pH211 Microprocessor pH Meter	HANNA Instruments Deutschland GmbH, Kehl am Rhein
Schüttler	TITRAMAX 100	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
Spektralphotometer	NanoDrop ND-1000	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Sterilbank	LaminAir HLB 2472	Heraeus, Düsseldorf
Stromversorger	Model 1000/500	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Stromversorger	Pharmacia LKB-GPS 200/400	Pfizer, New York, NY, USA
Thermomixer	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	GS-15R Zentrifuge	Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA
Umkehrmikroskop	Wilovert	Will, Wetzlar
Zellseparator	VarioMACS™ Separator	Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

2.2 Methoden

2.2.1 Tierhaltung und -zucht

Die für die Experimente verwendeten Mäuse wurden unter Standardbedingungen (12 h hell/dunkel Rhythmus; Futter und Wasser *ad libitum*) im Tierbereich des Deutschen Diabetes-Zentrums gehalten. Alle für die Organentnahmen eingesetzten Mäuse waren normoglykämische (Blutglukose <220 mg/dl) Weibchen im Alter von 50 - 120 Tagen.

2.2.1.1 Generierung des TLR4-defizienten Mausmodells

Zur Generierung des TLR4-defizienten NOD-Mausmodells (TLR4^{-/-}) war im Verlauf von Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe der TLR4-Defekt der C57BL10/ScCr-Maus auf den NOD-Hintergrund zurückgekreuzt worden. Männliche C57BL10/ScCr-Mäuse (TLR4^{-/-}) waren mit weiblichen NOD-Mäusen (TLR4^{+/+}) verpaart worden. Die Nachkommen aus dieser Verpaarung bildeten die erste Rückkreuzungsgeneration (*backcross*) (Abb.2). Männliche Individuen dieser für TLR4 heterozygoten Generation (TLR4^{+/-}) wurden erneut mit weiblichen NOD-Tieren verpaart (Rückkreuzungsgeneration 2). In der Folge wurden jeweils die männlichen Nachkommen mit heterozygotem TLR4-Defekt mit weiblichen NOD-Mäusen verpaart.

Ab der 7. Rückkreuzungsgeneration waren durch Verpaarung von TLR4-heterozygoten Mäusen (*intercross*) Tiere mit homozygoter TLR4-Expression sowie Tiere mit heterozygotem und homozygotem TLR4-Defekt im Verhältnis 1:2:1 generiert worden.

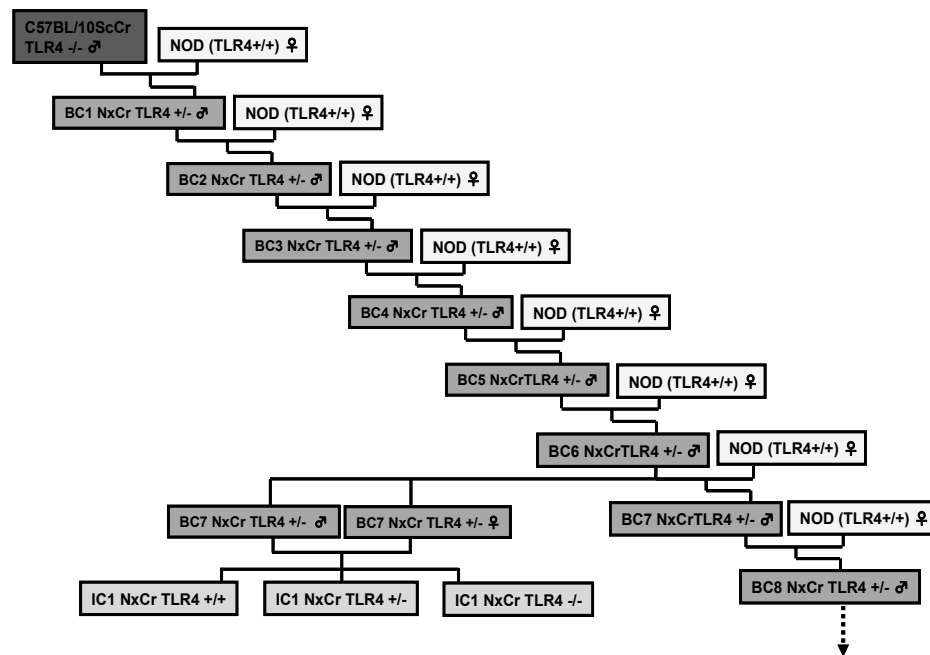


Abb. 2: Züchtungsstrategie zur Generierung von TLR4-defizienten NOD-Mäusen. TLR4-defiziente männliche C57BL/10ScCr-Mäuse ($TLR4^{-/-}$) wurden auf den NOD-Hintergrund zurückgekreuzt. Über mehrere Rückkreuzungsgenerationen (*backcross*, BC) wurden TLR4-heterozygote männliche Tiere mit weiblichen NOD-Mäusen verpaart. Ab der 7. Rückkreuzungsgeneration wurde begonnen durch Verpaarung von heterozygoten Mäusen (*intercross*, IC) Tiere mit homozygoter TLR4-Expression ($TLR4^{+/+}$) und Tiere mit heterozygotem ($TLR4^{+/-}$) oder homozygotem TLR4-Defekt ($TLR4^{-/-}$) zu generieren.

2.2.1.2 Genotypisierung der NOD-Mäuse

2.2.1.2.1 DNA-Isolation

Zur Genotypisierung wurde den Versuchstieren zunächst eine Gewebeprobe an der Ohrmuschel entnommen. Die Probe wurde in 700 μ l *tail buffer*, der mit 10 ml Proteinase K versetzt war, aufgenommen und über Nacht bei 55°C inkubiert. Nach fünfminütigem Mischen im Eppendorf Schüttler wurden die Proben zur Proteindenaturierung mit 250 μ l 5 M NaCl-Lösung versetzt und weitere 5 min unter ständigem Schütteln inkubiert. Es folgte eine siebenminütige Zentrifugation in der Tischzentrifuge bei 4°C und 13.000 x g. Anschließend wurden 750 μ l des Überstandes abgenommen und 500 μ l Isopropanol (99 %) zugefügt. Die Proben wurden vorsichtig aber gründlich gemischt und erneut 7 min bei 4°C und 13.000 x g zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden 500 μ l 70 % EtOH zugegeben und die Probe erneut zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Sediment luftgetrocknet. Nach dem Trocknen wurde die gefällte DNA in 150 μ l TE Puffer gelöst und ihre Konzentration spektralphotometrisch bestimmt.

2.2.1.2.2 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur selektiven Amplifikation eines definierten DNA-Fragmentes. Ein thermostabiles Enzym aus dem Organismus *Thermus aquaticus*, die *Taq* DNA Polymerase, wandert in 5' - 3' Richtung an der DNA entlang und verknüpft einzelne desoxy-Nukleosid-Triphosphate zu langen Polymeren, wenn zwei, zu den Randbereichen der zu vervielfältigenden Sequenz komplementäre, einzelsträngige Oligonukleotide (*Primer*) vorhanden sind.

2.2.1.2.2.1 Polymerasekettenreaktion zum Nachweis der IDD-Loci

Zum Nachweis der verschiedenen IDD-Loci wurde jeweils folgendes Reaktionsgemisch mit dem entsprechenden, spezifischen Primerpaar angesetzt:

2,50	μl	10x PCR Puffer
1,00	μl	MgCl [50 mM]
0,25	μl	dNTP Mix [jeweils 25 mM]
0,25	μl	<i>forward primer</i> [20 pmol]
0,25	μl	<i>backward primer</i> [20 pmol]
0,25	μl	<i>Taq</i> polymerase [5 U/μl]
20,50	μl	Wasser
25,00	μl	

Nach Zugabe der jeweiligen DNA (2 μl) wurde im Thermoblock je nach Primerpaar folgendes Programm gestartet:

Tabelle 3: PCR-Programm zum Nachweis von IDD-Loci

Temperatur		Zeit	Zyklenzahl
94°C		3 min	1
94°C		30 sek	↑ 30 ↓
IDD1	45°C	40 sek	
IDD2	45°C		
IDD3	55°C		
IDD15	55°C		
72°C		40 sek	
72°C		7 min	1

2.2.1.2.2.2 Polymerasekettenreaktion zum Nachweis des *tlr4*-Genotyps

Zur Genotypisierung der NOD-Mäuse muss das Vorhandensein des *tlr4*-Wildtyp-Genes und der *tlr4*-Deletion untersucht werden. Es wurden daher zwei verschiedene PCR-Ansätze durchgeführt.

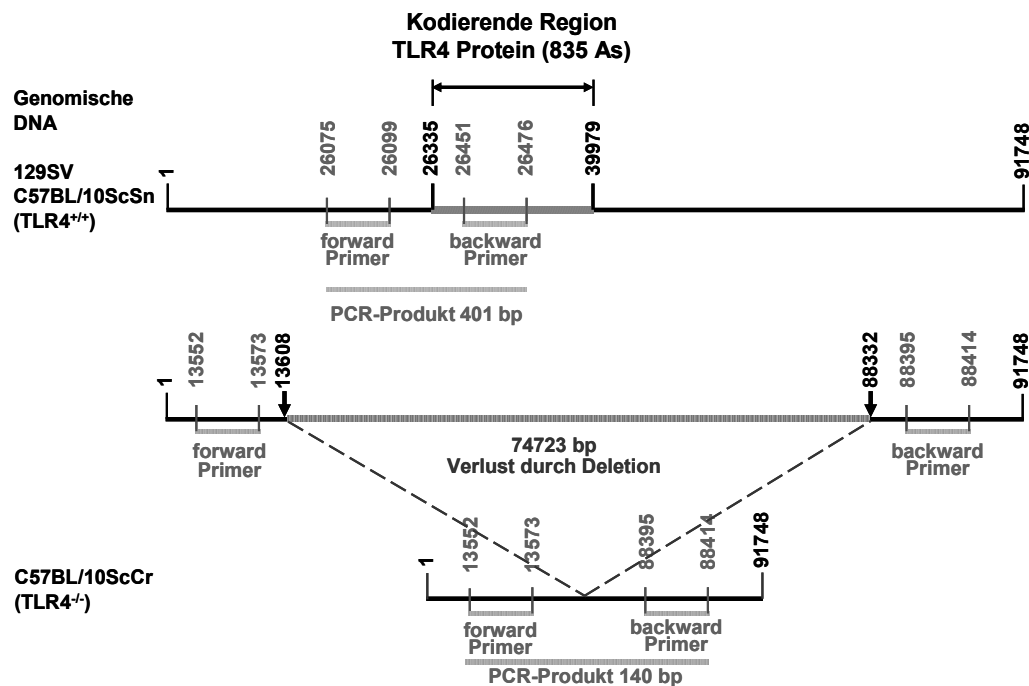


Abb. 3: Bindungsstellen für die synthetisch hergestellten, spezifischen Oligonukleotide zur Genotypisierung der Versuchstiere. Die Strategie zur Genotypisierung der Mäuse bezüglich eines TLR4-Defektes basiert auf einer 91748 bp Nukleotidsequenz der genomischen DNA der 129SV Maus (77). Der Nachweis des TLR4^{+/+} Genotyps erfolgt mittels eines Primerpaars, das ein 401 bp großes PCR-Produkt generiert. Das PCR-Produkt, das das Vorliegen eines TLR4^{-/-} Genotyps belegt, ist 140 bp groß.

Abbildung 3 zeigt sowohl den betreffenden DNA-Abschnitt des Wildtyps als auch den der *tlr4*-Mutante, die eine 74723 bp umfassende, die TLR4-kodierende Region einschließende Deletion trägt. Zum Nachweis des intakten *tlr4*-Genortes wurden ein *forward primer* 236 bp stromabwärts (*downstream*) der TLR4-kodierenden Region und ein *backward primer* innerhalb der kodierenden Region eingesetzt. Das erwartete PCR-Produkt dieser Primerkonstellation ist 401 bp groß. Zum Nachweis der *tlr4*-Deletion wurde ein *forward primer*, 35 bp von der potenziellen Deletion entfernt, verwendet und ein *backward primer*, der an die Basen 88305 bis 88414 des betreffenden DNA-Abschnitts bindet. Trägt der untersuchte DNA-Abschnitt keine Deletion liegt das Primerpaar 74821 bp auseinander und die PCR generiert kein Amplifikationsprodukt; liegt jedoch eine Deletion vor, befinden sich die Primer in geringer Distanz zueinander und ein Amplifikat der Größe 140 bp wird generiert.

Zur Durchführung der PCR wurde folgendes Stammreaktionsgemisch angesetzt:

2,50	μl	10x PCR Puffer
1,25	μl	MgCl [50 mM]
0,25	μl	dNTP Mix [jeweils 25 mM]
0,20	μl	<i>forward primer</i> [20 pmol]
0,20	μl	<i>backward primer</i> [20 pmol]
0,25	μl	<i>Taq</i> polymerase [5 U/μl]
18,85	μl	Wasser
23,50	μl	

Nach Zugabe der jeweiligen DNA (1,5 μl) wurde im Thermoblock je nach Primerpaar folgendes Programm gestartet:

Tabelle 4: PCR-Programm zum Nachweis des *tlr4*-Gens

Temperatur		Zeit	Zyklenzahl
94°C		3 min	1
94°C		20 sek	 25 
Wildtyp	57°C	40 sek	
Defekt	69°C		
72°C		30 sek	
72°C		3 min	1

Die durch die PCR amplifizierten DNA-Fragmente wurden nach Beendigung des Programms durch eine Agarose-Gelelektrophorese sichtbar gemacht (s. 2.2.1.2.2.3).

2.2.1.2.2.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Gemische bis zu einer Größe von 20 kbp aufgetrennt und deren Größe bestimmt werden.

Agarose ist ein lineares Polysaccharid, das aus Seetang extrahiert wird. Nach Aufkochen der Agarose in Pufferlösung entsteht eine homogene Gelmatrix, deren Dichte durch die Konzentration der Agarose variiert werden kann. Liegt ein Strom an, wandern negativ geladene Nukleinsäuren mit Geschwindigkeiten, die umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe sind, durch das Gel hindurch in Richtung Anode. Dabei hängt die Wandergeschwindigkeit nicht allein von der Größe, sondern zusätzlich auch von der Struktur der DNA ab. Superhelikale, doppelsträngige DNA wandert beispielsweise schneller als

doppelsträngig, relaxierte DNA, da sich erstgenannte besser durch das engmaschige Netz der Gelmatrix hindurchwinden kann.

Interkalierende Substanzen wie Ethidiumbromid bringen die DNA nach erfolgter Elektrophorese unter UV-Licht zum Leuchten.

Zur Herstellung eines 1 %igen Agarosegels wurde 1 g Agarose in 100 ml 0,5 x TBE-Puffer aufgekocht. Nach Abkühlung der Agarosesuspension auf eine Temperatur von ungefähr 60°C wurde 1 µl Ethidiumbromid hinzugegeben und gut mit der Suspension vermischt.

Anschließend wurde die Agarose in einen Gelträger gegossen. Nach dem Erstarren wurde das Gel in einer Laufkammer mit Laufpuffer (1x TBE) überschichtet.

Die Proben wurden in 6x Ladepuffer aufgenommen und in die Taschen des Gels pipettiert. Zur Größenbestimmung der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurde ein DNA-Größenmarker in die erste und in die letzte Tasche des Gels aufgetragen.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für eine Dauer von ca. 1 h bei 90 V. Nach erfolgtem Gellauf wurde das Bandenmuster unter UV-Licht (320 nm) mit einer Geldokumentationsapparatur (Bio Doc Analyse Biometra, Göttingen) photographiert.

2.2.1.3 Nachweis des TLR4-Defektes auf transkriptioneller Ebene

2.2.1.3.1 RNA-Isolation

Zur Isolation von RNA aus Milzen der NOD-TLR4-Mäuse wurde der RNeasy Plus Micro Kit von Qiagen verwendet. Jeweils 4 mg Gewebe wurden in 350 µl RLT-Puffer mit Hilfe eines TissueRuptor (Quiagen, Hilden) homogenisiert und lysiert. Im Anschluss wurden die Homogenate zusätzlich auf eine QIAshredder Säule gegeben und 2 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Die Proben wurden erneut 3 min bei 13.000 x g zentrifugiert und danach auf eine gDNA Eliminator Säule überführt. Nach Zentrifugation für 30 sek bei 8.000 x g wurde der Durchfluss mit 350 µl 70 %igem Ethanol versetzt und auf eine RNeasy MinElute Säule überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 15 sek bei 8.000 x g. Der Durchfluss wurde verworfen und 700 µl RW1 Puffer auf die Säule gegeben, bevor sich eine erneute Zentrifugation (15 sek, 8.000 x g) anschloss. Nach Verwerfen des Durchflusses wurden 500 µl RPE Puffer auf die Säule gegeben und 15 sek bei 8.000 x g zentrifugiert. Auf die Zentrifugation folgend wurden 500 µl 80%iger Ethanol auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert (2 min, 8.000 x g). Danach wurde die Säule auf ein neues 2 ml Sammelgefäß gesetzt und 5 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Zum Eluieren wurde die Säule im letzten Schritt auf ein neues 1,5 ml Sammelgefäß gesetzt. Nach Zugabe von 14 µl RNase-freiem Wasser erfolgte eine finale Zentrifugation bei 13.000 x g für 1 min.

Im Anschluss wurde die Konzentration der isolierten RNA spektralphotometrisch im NanoDrop (peqlab Biotechnologie GmbH) bestimmt.

2.2.1.3.2 Reverse Transkription

Die isolierte RNA (vgl. 2.2.1.3.1) wurde durch eine reverse Transkription mit Hilfe des Omniscript RT Kits von Qiagen in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde ein Reaktionsgemisch bestehend aus folgenden Reagenzien angesetzt:

2	μl	10x PCR Puffer
2	μl	dNTP Mix [jeweils 5 mM]
2	μl	Oligo-dT Primer [10μM]
1	μl	RNase Inhibitor [10 units/μl]
1	μl	Omniscript Reverse Transcriptase
x	μl	RNase freies Wasser (Volumen abhängig von der RNA- Präparation)
2	μg	RNA <i>template</i>
20	μl	

Dieses Reaktionsgemisch wurde 60 min bei 37°C inkubiert.

2.2.1.3.3 RT-Polymerasekettenreaktion

Im Anschluss an die reverse Transkription erfolgte eine PCR zur Amplifikation der zu den eingesetzten Oligonukleotiden (β-Actin und TLR4) komplementären cDNA-Abschnitte.

Es wurde folgendes Reaktionsgemisch mit dem jeweiligen, spezifischen Primerpaar angesetzt:

2,50	μl	10x PCR Puffer
0,75	μl	MgCl [50 mM]
0,25	μl	dNTP Mix [jeweils 25 mM]
0,25	μl	<i>forward primer</i> [20 pmol]
0,25	μl	<i>backward primer</i> [20 pmol]
0,25	μl	<i>Taq</i> polymerase [5 U/μl]
19,75	μl	Wasser
25,00	μl	

Nach Zugabe der jeweiligen DNA (1 μl) wurde im Thermoblock je nach Primerpaar folgendes Programm gestartet:

Tabelle 5: Programm zur RT-PCR

Temperatur		Zeit	Zyklenzahl
94°C		3 min	1
94°C		20 sek	 35 
TLR4	59,4°C	40 sek	
β-Actin	59,4°C		
72°C		30 sek	
72°C		7 min	1

2.2.1.4 Phänotypisierung der NOD-Mäuse

2.2.1.4.1 Überwachung der Diabetesentwicklung

2.2.1.4.1.1 Bestimmung der Blutglukose

Die Diabetesprävalenz der weiblichen NOD-Mäuse in der Tierzucht am Deutschen Diabetes-Zentrum liegt bei 60 - 80 %. Per Definition sind die Mäuse ab einem Blutzuckerspiegel von >220 mg/dl diabetisch. Waren Mäuse durch das Vorliegen von Polyurie auffällig, wurden sie auf Hyperglykämie untersucht. Ein aus der Schwanzvene gewonnener Blutstropfen wurde auf einen Teststreifen eines *FreeStyle™* Blutzuckermesssystems aufgetragen und die gemessene Glukosekonzentration abgelesen. Im Fall des Überschreitens des Messbereichs (20 mg/dl – 500 mg/dl bzw. 1,1 mmol - 27,8 mmol/l) des Gerätes wurde die Blutglukosekonzentration im Hormonanalytiklabor des Deutschen Diabetes-Zentrums mit Hilfe der Hexokinase-Methode (EPOS Analyzer 5060, Eppendorf, Hamburg) bestimmt.

2.2.1.4.1.2 Bestimmung des Körpergewichts

Um die Gewichtsentwicklung der Tiere zu untersuchen und damit Rückschlüsse auf die Körperfettmasse zu ziehen, wurden die Tiere einmal pro Woche gewogen. Ein dabei beobachteter Rückgang des Körpergewichts um mehr als 0,5 g wurde als zusätzliches Indiz für eine mögliche Diabetesmanifestation gewertet. Mäuse, die davon betroffen waren, wurden auf die Anwesenheit einer Hyperglykämie untersucht.

2.2.1.4.2 Intraperitonealer Glukosetoleranztest

Ein Glukosetoleranztest ist eine wichtige Methode zum Nachweis einer gestörten Glukoseverwertung und zur Frühdiagnostik des Diabetes mellitus. Beim intraperitonealen Glukosetoleranztest (ipGTT) wird im Gegensatz zum oralen Glukosetoleranztest (oGTT) eine definierte Glukosemenge in die Bauchhöhle der Maus injiziert. Die applizierte Glukose bewirkt zunächst einen kurzzeitigen Anstieg der Blutglukosekonzentration. Es folgt eine Stimulation der Insulinsekretion in deren Folge es zum Abfall des Blutzuckerspiegels kommt. Individuen mit

gestörter Glukosetoleranz, die auf eine verminderte Insulinsekretion oder auf eine Insulinresistenz zurückzuführen ist, zeigen einen verzögerten Abfall der Blutglukosekonzentration und nach 120 min einen Blutglukosewert, der in der Regel über dem von gesunden Individuen liegt.

Zur Durchführung des ipGTT am Tiermodell wurde den Tieren nach der aktiven Nachtphase das Futter für sechs Stunden entzogen, Wasser stand weiterhin ad libidum zur Verfügung. Nach Ablauf der Fastenzeit wurde der Nüchternglukosewert protokolliert und das Körpergewicht der Mäuse ermittelt. Zum Zeitpunkt t_0 erfolgte die intraperitoneale Injektion einer 20 % Glukoselösung (2 g Glukose / kg Körpergewicht). Nach 0, 15, 30, 60, 90, 120 und 240 min wurde der Blutzucker mit Hilfe eines *FreeStyleTM* Messgerätes aus venösem Blut des Schwanzes bestimmt.

2.2.2 Histologie von Pankreas- und Fettgewebe

2.2.2.1 Herstellung von histologischen Präparaten von Pankreas- und Fettgewebe

Zur Herstellung von histologischen Präparaten wurde zunächst das betreffende Gewebe aus dem frisch getöteten Tier entnommen und in PFA (4 %) fixiert. Anschließend wurden die Präparate in Paraffin eingebettet und 5 μ m Dünnschnitte angefertigt.

An Pankreas-Dünnschnitten wurden eine Insulin- sowie eine Hämatoxylin-Färbung durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Präparate 1 h auf 60°C erhitzt. Zum Entparaffinisieren wurden sie anschließend 2x 10 min in Xylol und nachfolgend in einer absteigenden Alkoholreihe bis zum 70 %igen Alkohol inkubiert. Auf einen PBS-Waschschritt erfolgte eine 30 minütige Inkubation in 0,3 %igem H_2O_2 . Nach erneutem Waschen wurden die Präparate für 20 min in Normalserum überführt; anschließend erfolgte eine Inkubation mit dem Insulin-Primärantikörper (über Nacht bei 4°C). Am nächsten Morgen wurden die Präparate gewaschen und 30 min mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Der frisch angesetzte *Avidin: Biotinylated enzyme Complex* (ABC-Komplex) wurde nach erneuten Waschschritten für 30 min hinzugegeben. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde eine 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) Färbung angeschlossen, auf die eine Hämatoxylin-Färbung (10-30 sek) folgte. Abschließend wurden die Präparate für 10 min in Leitungswasser überführt und nach einer aufsteigenden Alkoholreihe eingedeckt.

Die Fettgewebsschnitte wurden vor dem Einbetten lediglich einer Hämatoxylin-Färbung unterzogen.

2.2.2.2 Morphometrische Auswertung

Der prozentuale Anteil der infiltrierten Inselfläche an der Gesamtfläche der Insel sowie die Adipozytengröße und ihre Anzahl an Lipidvesikeln wurden an den Pankreas- und Fettgewebs-Dünnschnitten mittels des Softimaging Systems Analysis^{^D} (Olympus, Münster) bestimmt.

2.2.3 Isolation primärer Zellpopulationen

2.2.3.1 Isolation primärer pankreatischer Inselzellen

Die Isolation von pankreatischen Inseln erfolgte an frisch getöteten Mäusen, deren Bauchraum unter sterilen Bedingungen eröffnet wurde. Der Gallengang wurde vorsichtig freipräpariert und an der Eintrittsstelle in das Duodenum abgeklemmt. Mit einer feinen Kanüle wurde der Gallengang punktiert und mit 2 ml Kollagenaselösung (0,5 U/ml) perfundiert. Anschließend wurde nach Entfernen der Klemme am Duodenum, das Pankreas entfernt und in einer Petrischale bei 37°C 20 - 25 min verdaut.

Das angedaute Pankreasgewebe wurde anschließend in eiskaltem *Hank's Buffered Salt Solution* (HBSS) aufgenommen und nach Resuspension dreimal gewaschen (250 x g, 5 min, 4°C). Das Gewebehomogenat wurde in eine Petrischale gegeben und unter einem Binokular wurden die Inseln selektiv durch „Picken“ mit Hilfe einer Eppendorfpipette vom exokrinen Pankreasgewebe getrennt. Aus einem Versuchstier können auf diese Weise ca. 100 - 150 Inseln gewonnen werden (93).

Zur weiteren Isolation von Inseleinzellen wurden die isolierten Inseln nach einer 18 stündigen Inkubation (37°C, 5 % CO₂) in 3 ml Ca²⁺- und Mg²⁺-freiem HBSS aufgenommen. Anschließend wurde der Inseleinsuspension 100 µl Trypsinlösung zugegeben und 5 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden im nächsten Schritt durch mehrmaliges Aufziehen in eine 1 ml Spritze (Kanüle: 0,5 x 25) mechanisch in Einzelzellen zerlegt. Im Anschluss wurde das Trypsin durch zweimaliges Waschen (5 min, 250 x g) in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS entfernt. Während der folgenden 18 stündigen Inkubation (37°C, 5 % CO₂) adhärten die nicht-endokrinen Inselzellen. Die nicht-adhärten Inselzellen wurden mit kaltem Medium von der Petrischale abgespült und in den Experimenten eingesetzt.

2.2.3.2 Isolation muriner Milzzellpopulationen

2.2.3.2.1 Isolation unfractionierter Milzzellen

Nach Entnahme aus frisch getöteten Tieren wurden die Milzen in Phosphat-gepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) auf Eis gelagert. Unter sterilen Bedingungen wurden die Milzen getrennt nach Versuchstier in ein Zellsieb (Porengröße: 70 µm) gegeben, welches sich in einer kleinen Petrischale (Durchmesser: 5 cm) mit 5 ml HBSS befindet.

Die Milzen wurden mit einem sterilen Spritzenstempel einer 5 ml Einwegspritze durch das Zellsieb passiert. Die gewonnene Milzzellsuspension wurde bei 245 x g für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und die Zellen im Sediment für den weiteren Einsatz in den Experimenten in 10 ml RPMI 1640 Medium resuspendiert.

2.2.3.2.2 Isolation von makrophagenangereicherten Milzzellpopulationen und nicht-adhärenenten Milzzellen

Zur Anreicherung von Makrophagen schloss sich an die Gewinnung der Milzzellsuspension (vgl. 2.2.3.2.1) ein Adhärenzschritt an. Petrischalen (Durchmesser: 4,5 cm) wurden mit 10 ml FBS befüllt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die frisch gewonnene Milzzellsuspension wurde nach vorsichtigem Abgießen des FBS in die Petrischalen überführt und zwei Stunden im Brutschrank inkubiert (37°C, 5 % CO₂). Anschließend wurde die Zellsuspension vorsichtig abgeschüttet und aufgefangen; sie repräsentiert die nicht-adhärenente Milzzellfraktion. Die während der Inkubationszeit der Zellsuspension sedimentierten Makrophagen adhären am Boden der Petrischale. Sie wurden mit Hilfe von 5 ml Accutase abgelöst.

Die gewonnenen Zellfraktionen wurden in einer Neubauer-Kammer gezählt (s. 2.2.8) und je 2×10^5 Zellen wurden für die weiteren Experimente in RPMI 1640 Medium in eine Vertiefung einer 96-Loch-Flachbodenplatte ausgesät.

2.2.3.2.3 Anreicherung von CD4⁺ CD25⁺ T-Lymphozyten aus der Milz

Verschiedene Zelltypen lassen sich phänotypisch durch die Art und die Anzahl ihrer Oberflächenproteine unterscheiden. Diesen Sachverhalt macht sich das Verfahren der magnetischen Zellsortierung (*Magnetic-activated cell sorting*, MACS) zunutze. Verschiedene Antikörper, die an etwa 50 nm große Magnetpartikel (*MicroBeads*) gekoppelt sind, binden an spezifische Oberflächenproteine der Zellen. Beim Durchfluss durch eine MACS-Säule (*MACS-column*), die sich in einem starken Magnetfeld befindet, werden markierte Zellen in der Säule zurückgehalten, während nicht-markierte Zellen die Säule ungehindert passieren können. Die an Magnetpartikel gekoppelten Zellen, die zunächst in der Säule zurückgehalten werden, können nach Entfernen des Magnetfeldes ebenfalls aus der Säule ausgewaschen werden.

Zur Aufreinigung von regulatorischen T-Lymphozyten wurde zunächst eine Milzzellpräparation durchgeführt (vgl. 2.2.3.2.1) und daran die Anreicherung der CD4⁺ CD25⁺ T-Lymphozyten mit Hilfe des *mouse CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell Isolation Kits* (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) angeschlossen. Die Aufreinigung der Zellen erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde aus der Milzzellpopulation eine für das Oberflächenprotein CD4-positive Zellpopulation angereichert, aus der in einem zweiten Schritt CD25-Oberflächen-exprimierende Zellen positiv selektioniert wurden.

Nach Bestimmung der Gesamtzahl der aus einer Milz gewonnenen Zellen (vgl. 2.2.8) wurden für die weiteren Aufreinigungsschritte nicht mehr als 5×10^8 Lymphozyten eingesetzt. Je 10^7 Gesamtzellen wurde zunächst mit einem Biotin-Antikörpermisch, bestehend aus Antikörpern gegen die Oberflächenproteine CD8a (Ly-2), CD11b (Mac-1), CD45R (B220), CD49b (DX5) und Ter-119, inkubiert (10 min, 4°C). Auf eine weitere Inkubation der Zellen mit 20 µl *anti-Biotin-MicroBeads* und 10 µl Anti-CD25-PE-Antikörper folgend, wurde die Säule mit den Zellen beladen und das Eluat aufgefangen.

Der Depletion der ungewünschten CD4-negativen Zellen folgend, wurden aus der CD4-positiven Population des Eluats die CD25-positiven Zellen unter Verwendung von *anti-CD25-MicroBeads* angereichert.

Zu diesem Zweck wurde die Zellsuspension mit 10 µl *anti-PE-MicroBeads* 15 min im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Zur positiven Selektion wurde eine MS Säule verwendet, aus der nach Durchlaufen der Zellen, die in der Säule zurückgehaltenen CD25⁺ Zellen herausgewaschen wurden.

Um eine möglichst hohe Reinheit und Ausbeute zu erlangen, wurde das Eluat erneut über eine MS-Säule gegeben. Anschließend wurde die Zellpopulation im FACS auf ihre Reinheit hin untersucht (vgl. 2.2.4.1).

2.2.3.3 Isolation von Adipozyten aus dem viszeralen Fettgewebe

2.2.3.3.1 Isolation von Präadipozyten

Nach Tötung der Versuchstiere und Eröffnung der Bauchhöhle wurden die viszeralen Fettdepots entnommen und unmittelbar in Ringer-Lactat-Lösung (4°C) überführt.

Das Fettgewebe wurde unter der Sterilbank in ca. 2 mm³ große Würfel zerkleinert und in Kollagenaselösung (0,3 Einheiten in PBS) bei 37°C für 45 min im Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend wurde das verdaute Gewebe über einen Filter (Porengröße: 250 µm) gegeben und das Filtrat 10 min bei 245 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde resuspendiert und durch ein Zellsieb (Porengröße: 70 µm) gefiltert.

Die auf diese Weise gewonnenen Präadipozyten wurden in 500 µl Kulturmedium in eine Vertiefung einer 48-Lochplatte ausgesät.

Alle zwei Tage wurde das Fettzellkulturmedium (s. 2.1.8) vorsichtig abgesaugt und durch neues ersetzt. Erst wenn die Zelldichte in der Vertiefung zu annähernd 100 % Konfluenz erreicht hatte, wurden die Zellen mit Accutase enzymatisch abgelöst, auf zwei Vertiefungen verteilt und weiterkultiviert. Konfluente Zellen aus vier Vertiefungen einer 48-Lochplatte wurden in eine Vertiefung einer 6-Lochplatte ausgesät. Konfluente Zellen aus zwei Vertiefungen einer 6-Lochplatte wurden in eine 50 ml Zell-Kulturflasche ausgesät. Konfluente Zellen aus zwei 50 ml Kulturflaschen wurden schließlich zur dauerhaften Weiterkultivierung und zur Generierung ausreichender Zellmengen für experimentelle Ansätze in eine 250 ml Kulturflasche überführt.

2.2.3.3.2 Isolation von reifen Adipozyten

Reife Adipozyten schwammen aufgrund ihres erhöhten Fettgehaltes nach dem ersten Zentrifugationsschritt im Verlauf des Isolationsvorganges (s. 2.2.3.3.1) im Überstand. Um sie zu gewinnen, wurde eine Plastikspitze der 1 ml Pipette an der Spitze abgeschnitten, um mit ihrer Hilfe die großen Fettzellen vorsichtig vom Überstand abzunehmen und in eine 48-Lochplatte in Fettzellkulturmedium auszusäen.

2.2.4 Charakterisierung isolierter Zellpopulationen mittels intrazellulärer Marker und Oberflächenmarker

Zur Überprüfung der Reinheit der isolierten Zellpopulationen wurden die Zellsuspensionen aus Abschnitt 2.2.3.2.3 und 2.2.3.3 im Durchflusszytometer (*fluorescence-activated cell sorter*, FACS) (FACSCalibur, BD Biosciences, Heidelberg) analysiert.

Dieses Verfahren beruht auf der spezifischen Bindung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern an Oberflächen- oder intrazelluläre Antigene von Zellen. Die eingesetzten Antikörper sind mit verschiedenen Farbstoffen wie Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) oder Allophycocyanin (APC) konjugiert.

FITC weist nach Anregung durch einen Argonlaser bei 488 nm ein Emissionsmaximum bei 520 nm auf, während das Emissionsmaximum von PE bei 580 nm liegt. APC wird bei 633/635 nm angeregt; sein Emissionsmaximum liegt bei 660 nm. Aufgrund dieser unterschiedlichen Emissionsmaxima der verwendeten Farbstoffe ist eine Trennung von unmarkierten, einfach markierten oder mehrfach markierten Zellen möglich.

Die Zellen werden in einem großen Flüssigkeitsvolumen (1x PBS) durch eine Kapillare aufgezogen und vereinzelt, sodass jeweils immer nur eine Zelle von einem Laser angestrahlt wird.

Ein Laserstrahl mit der entsprechenden Extinktionswellenlänge regt die Fluoreszenzfarbstoffe zur Emission an. Ein Photodetektor misst neben der Emission auch die Lichtstreuung, die von der Größe und der Beschaffenheit der Zellen abhängt. Die Streuung des Lichtes in Vorwärtsrichtung (*forward scatter*) spiegelt die Partikelgröße wider, wobei die Signalstärke proportional zur Partikelgröße ansteigt. Die Streuung des Lichtes in Seitwärtsrichtung (*side scatter*) ist ein Maß für die Granularität der Zellen.

In einem zweidimensionalen Streudiagramm lässt sich die unterschiedliche Fluoreszenz zweier Antikörper gegeneinander auftragen. Verschiedene Zellpopulationen können somit unterschieden und ihre Anteile an der Gesamtpopulation quantifiziert werden.

2.2.4.1 Prüfung der Reinheit von Präparationen regulatorischer T-Lymphozyten

Die auf ihre Reinheit zu prüfenden, frisch angereicherten Treg wurden zunächst gezählt (vgl. 2.2.8) und auf eine Zellzahl von 1×10^6 /ml eingestellt. Anschließend wurde die Zellsuspension abzentrifugiert und das Sediment in 100 µl PBS resuspendiert.

Da die angereicherten Treg bereits durch die Verwendung des *mouse CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell Isolation Kits* CD25 PE-markiert waren, wurde lediglich die Fluoreszenzmarkierung der Proteine Foxp3 und CD4 durchgeführt. Zunächst erfolgte die Zugabe von 500 µl einer Lösung eines monoklonalen Ratte-Anti-Maus-CD4-Antikörpers (1 µg/ml). Nach 40 - 45 minütiger Inkubation wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen (5 min, 250 x g). Die Zellen wurden in 1 ml frisch vorbereiteter Fix/Perm-Gebrauchslösung resuspendiert und 2 - 18 h bei 4°C im Dunkeln zur Permeabilisation inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden 1 µl des monoklonalen Ratte-Anti-Maus-CD16/CD32 (Fcγ III/II Rezeptor)-Antikörpers zum Zellsediment hinzugefügt und 15 min bei 4°C inkubiert. An die Inkubation schloss sich die Foxp3-Färbung für 30 min bei 4°C an. Dazu wurde der Zellsuspension 1 µg eines

monoklonalen Ratte Anti-Maus-Foxp3-Antikörpers in einem Gesamtvolumen von 100 μ l zugefügt. Die Zellen wurden erneut zweimal gewaschen (5 min, 250 x g), im Durchflusszytometer gemessen und die erhaltenen Messwerte in einem zweidimensionalen Punktdiagramm analysiert.

2.2.4.2 Ausschluss einer Makrophagenkontamination mittels CD11b

Da Adipozyten innate immunzellähnliche Eigenschaften aufweisen (94), musste eine Kontamination der aus Mäusen isolierten Adipozytenpopulationen durch Makrophagen ausgeschlossen werden. Anhand einer FACS-Analyse wurde deshalb die Abwesenheit des makrophagenspezifischen Markers CD11b geprüft.

Jeweils 1×10^6 Adipozyten wurden in einem Volumen von 100 μ l mit 0,5 μ g/ml Anti-CD11b-Antikörper oder mit 0,5 μ g/ml der entsprechenden Isotypkontrolle 40 min bei 4°C inkubiert. Nach Entfernen der überschüssigen, nicht gebundenen Antikörpermoleküle durch einen Waschschriff (5 min, 250 x g), wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Als Positiv-Kontrolle dienten CD11b-exprimierende Makrophagen der murinen Linie J774.A1, die auf die gleiche Weise gefärbt wurden.

2.2.4.3 Nachweis der Expression des TLR4-Proteins

Zum Nachweis der TLR4-Expression durch verschiedene Zellpopulationen auf Proteinebene wurden jeweils 1×10^6 Zellen der zu untersuchenden Zellpopulation in einem Volumen von 100 μ l mit 1 μ g/ml eines PE-markierten monoklonalen Ratte Anti-Maus-TLR4-MD2-Komplex-Antikörpers oder mit 1 μ g/ml der PE-markierten Isotypkontrolle (monoklonaler Ratten IgG_{2a,k} Antikörper) 40 min inkubiert. Die überschüssigen, nicht gebundenen Antikörpermoleküle wurden durch einen Waschschriff (5 min, 250 x g) entfernt. Anschließend erfolgte die Analyse im Durchflusszytometer.

2.2.5 Kultivierung von Zelllinien und primären Zellen

2.2.5.1 Kultivierung von Zelllinien

2.2.5.1.1 J774A.1-Zelllinie

Makrophagen der Linie J774A.1 (95) wurden in RPMI 1640 Medium bei 37°C, 5 % CO₂ Begasung und wasserdampfgesättigter Atmosphäre in Zellkulturflaschen (Wachstumsfläche 75 cm²) kultiviert. Die Zellen wurden alle 3 Tage routinemäßig passagiert. Zum Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen wurden 3 ml Accutase verwendet.

2.2.5.1.2 3T3-L1-Zelllinie

Die Sublinie 3T3-L1 (96) wurde durch klonale Isolation aus der murinen, heteroploiden 3T3-Fibroblasten-Linie generiert. Einige Klone der 3T3-Linie durchlaufen, wenn sie unter geeigneten Bedingungen kultiviert werden, eine adipozytenähnliche Konversion. Während dieses Differenzierungsprozesses gehen die Zellen von einer lang gestreckten,

fibroblastenartigen Gestalt in eine runde oder ovale Form über und akkumulieren in ihrem Zytoplasma kleine Fetttropfen. Neben diesen morphologischen Veränderungen vollziehen sich auch wichtige biochemische Veränderungen.

In der vorliegenden Arbeit diente die 3T3-L1 Linie der Etablierung wichtiger Techniken zur Analyse von Fettzellaktivitäten. Die Linie wurde von der American Type Culture Collection (ATCC) käuflich erworben und wird seit Juni 2007 am Deutschen Diabetes-Zentrum in Fettzellkulturmedium bei 37°C und 10 % CO₂ kultiviert. Die Zellen weisen eine Verdoppelungszeit von ca. 18 h auf und werden nach Erreichen der Subkonfluenz alle zwei Tage passagiert. Vor einer experimentellen Verwendung der Zellen wurden sie durch eine kurze Inkubation in Gegenwart von Accutase vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst und in eine Einzelzellsuspension überführt.

2.2.5.2 Kultivierung von primären Zellen

Alle primären Zellen wurden bei 37°C, 5 % CO₂ Begasung und wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Brutschrank kultiviert.

2.2.5.2.1 Primäre, murine Makrophagen, unfraktionierte Milzzellen und regulatorische T-Lymphozyten

Die primären Milzzellpopulationen wurden unmittelbar nach ihrer Isolation und Aufreinigung zum experimentellen Einsatz ausgesät (2×10^5 Zellen pro Vertiefung). Makrophagen wurden in 96-Loch-Flachbodenplatten in RPMI 1640 Medium mit β -Mercaptoethanol ausgesät. Im Fall der unfraktionierten Milzzellpopulationen wurden je 2×10^5 Zellen / Vertiefung einer 96-Loch-Flachbodenplatte in RPMI 1640 Medium ohne den Zusatz β -Mercaptoethanol ausgesät. Regulatorische T-Lymphozyten wurden je nach experimentellem Ansatz zu je 1×10^4 oder 2×10^4 Zellen in 96-Loch-Rundbodenplatten in RPMI 1640 Medium ausgesät.

2.2.5.2.2 Primäre, murine Präadipozyten

Primäre Präadipozyten wurden nach Überschreiten der Subkonfluenz alle zwei Tage passagiert. Dazu wurde das Medium entfernt, einmal mit PBS gewaschen und die Zellen mit 3 ml Accutase überschichtet. Nach wenigen Minuten wurden die abgelösten Zellen in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 250 x g für 5 min abzentrifugiert. Nach Resuspendieren wurde die Hälfte des Sediments verworfen, die andere Hälfte wurde in 20 ml Fettzellkulturmedium in 75 cm² Kulturflaschen ausgesät.

2.2.5.2.3 Primäre, murine Adipozyten

Sowohl direkt isolierte, reife Adipozyten als auch in vitro differenzierte Adipozyten sind terminal differenziert und proliferieren nicht mehr. Kulturen von Adipozyten wurden deshalb nicht mehr passagiert. Es erfolgt lediglich alle zwei Tage ein Austausch des Mediums.

2.2.6 Differenzierung von Adipozyten

2.2.6.1 Differenzierung von 3T3-L1 und primären Präadipozyten

Zur Differenzierung von Adipozyten wurden 3T3-L1-Zellen und primäre Präadipozyten in kollagenbeschichteten Flaschen (75 cm²) zur Konfluenz herangezogen. Zwei Tage nach Erreichen der Konfluenz wurde das Kulturmedium gegen Differenzierungsmedium ausgetauscht. Weitere zwei Tage später wurden die Zellen für eine Dauer von sechs Tagen mit insulinhaltigem Medium behandelt, das alle zwei Tage durch frisches Medium ersetzt wurde (Abb. 4). Ab dem achten Tag wurden die Zellen bis zu ihrer experimentellen Verwendung in Kulturmedium gehalten.

2.2.6.2 Differenzierung in Gegenwart von LPS

Um einen potentiellen Einfluss des TLR4-Liganden LPS auf die Differenzierung sowohl der 3T3-L1 als auch der primären Präadipozyten zu untersuchen, wurden die Zellen gemäß dem Differenzierungsprotokoll (vgl. 2.2.6.1) behandelt. Zusätzlich wurden dem Medium zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0, 2, 4 und 6) verschiedene LPS-Konzentrationen beigemischt (Abb. 4).

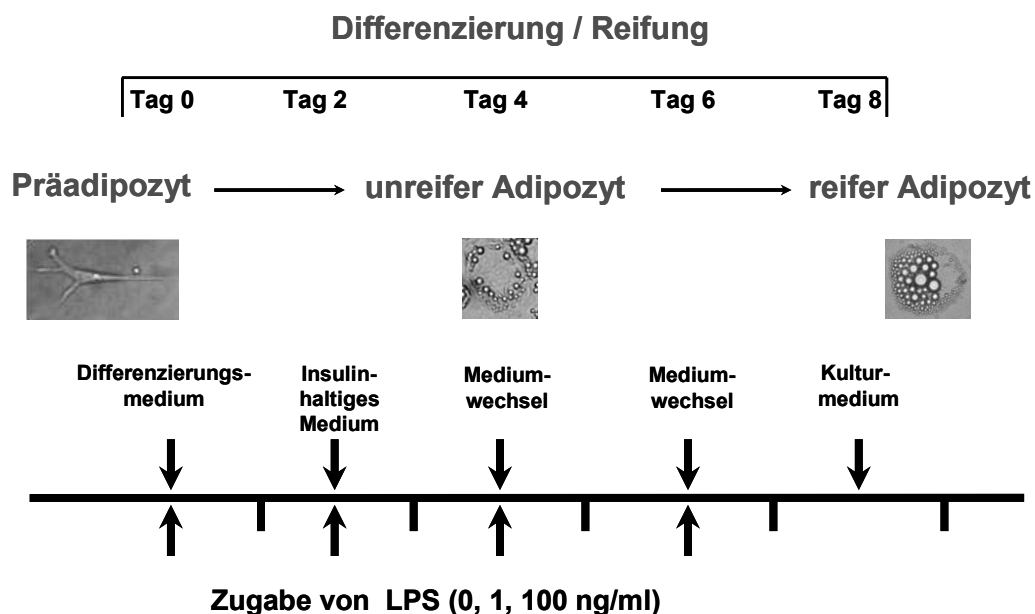


Abb. 4: Differenzierung von Präadipozyten in Gegenwart des TLR4-Liganden LPS. Präadipozyten wurden zur Konfluenz herangezogen. Zwei Tage nach Erreichen der Konfluenz wurde das Kulturmedium gegen Differenzierungsmedium ausgetauscht (Tag 0). Am Tag zwei wurde das Differenzierungsmedium durch insulinhaltiges Medium ersetzt. Insgesamt wurden die Zellen sechs Tage lang mit insulinhaltigem Medium behandelt. Alle zwei Tage wurde es ausgetauscht und durch frisches Medium ersetzt. Ab Tag acht nach Start des Differenzierungsprozesses wurden die nun reifen Adipozyten bis zu ihrer Verwendung in Kulturmedium gehalten. Zur Untersuchung eines potentiellen Effektes von LPS auf die Differenzierung wurden zusätzlich Zellen in Gegenwart von verschiedenen LPS-Konzentrationen (0, 1, 100 ng/ml) ausdifferenziert. Das LPS wurde bei jedem Mediumwechsel zugefügt.

2.2.7 Prüfung des Reifegrades von Adipozyten

2.2.7.1 Prüfung des Reifegrades mittels Oil-Red-O-Färbung

Zur Untersuchung des Fettgehaltes der Adipozyten wurde eine Färbung mit dem lipidspezifischen Farbstoff Oil-Red-O durchgeführt. Dazu wurden die Adipozyten zunächst in 0,5 ml Medium auf einem sterilen Deckgläschen ausgesät, das in einer 5 cm Petrischale liegt. Nach zweistündiger Inkubation im Brutschrank waren die Zellen adhärent und die Petrischale wurde mit Kulturmedium aufgefüllt. Am nächsten Tag wurde das Deckgläschen mit PBS gewaschen, in Fixans (4 % PFA / 2x PBS) für mindestens 15 min fixiert und anschließend erneut dreimal 5 min in PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die adhären Zellen kurz in aqua dest. geschwenkt und in 40 %igen Isopropanol überführt. Nach 5 min wurde das Deckgläschen in Oil-Red-O-Gebrauchslösung 10 min inkubiert. Es folgte ein kurzes Schwenken in 40 %igem Isopropanol und in aqua dest., bevor die Kerne der Zellen 2 min mit Hämalaun angefärbt wurden. Abschließend wurde das Präparat mindestens 10 min mit Leitungswasser gebläut und in Kaisers-Gelatine auf einen Objektträger eingebettet.

Die Präparate wurden mittels eines Durchlichtmikroskops und dem Softimaging System Analysis[^]D (Olympus, Münster) ausgewertet und dokumentiert.

2.2.7.2 Prüfung des Reifegrades mittels der Expression des Präadipozyten Faktor 1

Das Protein Pref-1, als auch *Delta like protein* (Dlk) bezeichnet, dient als wichtiger Marker zur Bestimmung des Adipozyten-Reifungsstadiums. Pref-1 ist in unreifen Präadipozyten stark exprimiert, wird jedoch im Laufe des Differenzierungsprozesses herunterreguliert (97).

Zur FACS-Analyse der Pref-1-Expression wurden je Ansatz 1×10^6 Zellen zunächst mittels PFA (2 %) 20 min fixiert und zweimal in 1x Permeabilisationspuffer gewaschen. Alle folgenden Waschschritte und Antikörperverschüttelungen wurden mit 1x Permeabilisationspuffer durchgeführt. Nach dem letzten Waschschritt wurde das Sediment in 100 μ l 1x Permeabilisierungspuffer resuspendiert und nach Zugabe von 1 μ l Fc-Block (monoklonaler Ratte-Anti-Maus-CD16/CD32 (Fc γ III/II Rezeptor)-Antikörper) und entweder 10 μ g/ml des monoklonalen, FITC-markierten Ratte-Anti-Maus-Dlk-Antikörpers oder der entsprechenden Isotypkontrolle (Ratte-Anti-Maus-IgG₁) 20 min im Dunkeln gefärbt.

2.2.7.3 Prüfung des Reifegrades mittels des Reifungsmarkers PPAR γ

Adipozyten verschiedener Differenzierungsstadien wurden mit Hilfe von Lysepuffer lysiert. Die Lysate wurden in Laemmli Puffer mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (SDS-Page, 10 %iges Gel). Nach Blotten auf eine Nitrozellulosemembran und Blocken mit TBS Puffer, der mit 5 % Trockenmilch versetzt war, wurde die Membran 1 h mit einer 1:1000 Verdünnung eines monoklonalen Kaninchen-Anti-Maus-Antikörpers inkubiert. Das resultierende Chemilumineszenzsignal wurde mit Hilfe einer Lumi-Imager Workingstation sichtbar gemacht.

2.2.8 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl und des Anteils an toten Zellen in Zellsuspensionen wurde ein Aliquot (20 µl) der jeweiligen Zellsuspension mit einer 0,1 %igen Trypanblaulösung (180 µl) versetzt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Der Farbstoff Trypanblau kann zur Vitalitätsbestimmung herangezogen werden, da er nur das Zytoplasma toter Zellen blau-lila anfärbt.

Nach Auszählung von vier Großquadraten wurde die Zellzahl wie folgt berechnet:

$$\text{Zellen/ml} = \frac{\text{Anzahl der Zellen} \times 10^4 (\text{Kammerkonstante}) \times \text{Verdünnungsfaktor}}{4}$$

2.2.9 Zytokin-induzierte Schädigung von Inselzellen

Zur Analyse der Suszeptibilität pankreatischer Inselzellen gegenüber β -schädigenden Zytokinen wurden isolierte Inselzellen (vgl. 2.2.3.1) aus NOD TLR4^{+/+} und NOD TLR4^{-/-} Mäusen mit zwei unterschiedlich dosierten Zytokingemischen (IFN- γ 10 U/ml, TNF- α 50 U/ml, IL-1 β 5 U/ml oder IFN- γ 5 U/ml, TNF- α 25 U/ml, IL-1 β 2,5 U/ml) behandelt. Nach 6 Tagen wurde der prozentuale Anteil toter Zellen mittels Trypanblaufärbung bestimmt (vgl. 2.2.8).

2.2.10 Stimulation von Immunzell- und Adipozytenpopulationen

2.2.10.1 Stimulation von primären Milzzellen

Zum Vergleich der funktionellen Aktivitäten verschiedener Zelltypen wurden entweder 2×10^5 unfractionierte, nicht-adhärenente Milzzellen oder makrophagenangereicherte, adhärenente Milzzellpopulationen aus Wildtyp- und Defekt-Tieren pro Vertiefung einer 96-Loch-Flachbodenplatten, in einem Volumen von 200 µl RPMI 1640 Kulturmedium ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ Begasung im Brutschrank inkubiert. Je nach Fragestellung wurden folgende Stimulanzen in nachstehenden Konzentrationen eingesetzt:

LPS (0, 0,1, 1, 10, 100, 1000 ng/ml)

IL-2 (0, 5, 25 ng/ml)

ConA (0, 2, 5 µg/ml)

Zur Analyse der Freisetzung verschiedener Zytokine und Chemokine wurden die Kulturüberstände 24 h nach Beginn der Stimulation abgenommen mit Ausnahme der Überstände zur Bestimmung der TNF- α -Freisetzung, die bereits 6 h nach Stimulationsbeginn abgenommen wurden. Alle Überstände wurden bis zur Analyse bei -20°C eingefroren.

2.2.10.2 Stimulation von Adipozyten

Zur Stimulation von Adipozyten wurden in eine 48-Loch-Platte 1×10^5 Zellen in 500 μl Kulturmedium ausgesät. Nach Inkubation über Nacht (37°C , 5 % CO_2) wurden die Zellen am nächsten Tag mit verschiedenen LPS- und Hsp60-Konzentrationen stimuliert. Nach 24 h wurden die Überstände abgenommen und bis zur Analyse bei -20°C eingefroren.

Zur Generierung einer Kinetik der Mediatoren-Freisetzung wurden jeweils Überstände nach 0, 3, 6, 24, 48 und 72 h abgenommen.

2.2.10.3 Stimulation von primären regulatorischen T-Lymphozyten

Zur Analyse der Suppressoreigenschaften regulatorischer T-Lymphozyten von TLR4-defizienten und TLR4-exprimierenden Mäusen wurden drei verschiedene Ansätze durchgeführt. In den ersten beiden Ansätzen wurden jeweils 1×10^4 regulatorische T-Lymphozyten bzw. $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ Responderzellen pro Vertiefung in einem Volumen von 150 μl in Halbflächen-96-Loch-Platten ausgesät. Im dritten Ansatz wurden beide Zelltypen (jeweils 1×10^4 Zellen) gemeinsam in eine Vertiefung eingebracht. Die Zellkulturplatten wurden am Vortag mit Anti-CD3-Antikörper (0,5 $\mu\text{g/ml}$) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Vor der Zellaussaat erfolgten zwei Waschschriffe zur Entfernung der nicht gebundenen Anti-CD3-Moleküle.

Die Zellen wurden anschließend mit verschiedenen Konzentrationen (0, 5 und 25 ng/ml) von rekombinantem Interleukin-2 (IL-2) für 72 h inkubiert. Anschließend erfolgte ein MTT-Test.

2.2.11 Vitalitäts- und Proliferationstests

2.2.11.1 Kolorimetrischer Nachweis der Zellvitalität

Der Nachweis der Zellaktivität wird durch ein Verfahren erbracht, das auf der Reduktion der wasserlöslichen Tetrazoliumsalze (MTT, WST-1 bzw. XTT) in ihre gefärbten Formazan-Verbindungen beruht. Die Tetrazoliumsalze werden durch die Aktivität von mitochondrialen Enzymen metabolisiert, die kurz nach dem Zelltod inaktiviert werden. Das gefärbte Reaktionsprodukt wird photometrisch detektiert. Die Menge des gebildeten Farbstoffs korreliert direkt mit der Anzahl und der metabolischen Aktivität der Zellen und dient daher als Maß für ihre Vitalität.

2.2.11.1.1 MTT

Vierundzwanzig Stunden nach Stimulation der Zellen (s. 2.2.10) wurde bis auf 80 μl der gesamte verbleibende Zellkulturüberstand abgenommen. Danach wurden 20 μl des MTT-Reagenz (5 mg/ml) zugegeben. Nach vierstündiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C , in der die Umwandlung des MTT in Formazan erfolgt war, wurde der gesamte Überstand verworfen. Zur Lyse der Zellen und zum Lösen des wasserunlöslichen (hydrophoben) Formazans wurden 200 μl organische Lösungsmittel (20 % SDS/50 % DMF) verwendet. Anschließend wurde die Extinktion im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen.

2.2.11.1.2 WST-1 und XTT

Zur Bestimmung der Zellvitalität mittels WST-1 bzw. XTT wurde 24 Stunden nach Stimulation bis auf 90 µl der gesamte Kulturüberstand in den einzelnen Vertiefungen der 96-Loch-Flachbodenplatte abgenommen. Bei der Anwendung des XTT-Reagenz wurde zunächst eine Reaktionslösung bestehend aus 0,1 ml Aktivierungsreagenz und 5 ml XTT-Reagenz angesetzt. Je Vertiefung der Zellkulturplatte wurden 10 µl der verwendeten Reaktionslösung (WST-1 oder XTT) zugefügt. Nach vierstündiger Inkubation im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂) wurde die Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von 450 – 500 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 – 690 nm gemessen.

2.2.11.2 Bestimmung der Zellproliferation mit Hilfe eines kolorimetrischen Verfahrens (BrdU)

Neben den Vitalitätstests mit den Tetrazoliumsalzen, die primär die metabolische Aktivität von Zellen erfassen, ist der so genannte BrdU-Test ein weiteres wichtiges Werkzeug, das hauptsächlich die Proliferationsrate von Zellen erfasst. Namensgebend für dieses Nachweisverfahren ist das chemische Analogon des Nukleosids Thymidin, das Bromdesoxyuridin (BrdU). Diese Substanz wird von den Zellen aufgenommen, phosphoryliert und anstelle des Desoxythymidintriphosphats (dTTP) in die DNA proliferierender Zellen eingebaut. Wird die DNA denaturiert, kann der BrdU-Einbau mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Das Produkt einer anschließenden Enzymreaktion kann photometrisch gemessen werden und korreliert mit der Anzahl der proliferierenden Zellen.

Zur Durchführung des Tests wird der *Cell Proliferation ELISA BrdU (colorimetric) Kit* (Roche Applied Science, Mannheim) verwendet. Die ausgesäten Zellen (vgl. 2.2.5.2.1) wurden fünf Tage kultiviert und anschließend mit 10 µM des *BrdU labeling Reagenz* versetzt. Zu diesem Zweck wurde das Reagenz (10 mM) zunächst mit RPMI-Medium 1:100 verdünnt und anschließend auf die kultivierten Zellen gegeben. Danach wurden die Zellen für weitere 18 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und zum vollständigen Trocknen des Sediments wurde die Kulturplatte auf einer Heizplatte (60°C) stehend mit einem herkömmlichen Haartrockner gefönt. Nach vollständiger Trocknung wurden die Zellen durch Zugabe von 200 µl *FixDenat* fixiert und denaturiert. Auf diese Weise wurde es dem Anti-BrdU-Antikörper ermöglicht, an das in die DNA der proliferierenden Zellen eingebaute BrdU zu binden. Die Zellen wurden 90 min mit 100 µl *anti BrdU POD working solution* bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nachfolgend wurde die Kulturplatte dreimal mit 200 µl *washing solution* gewaschen und nach Zugabe von 100 µl *substrate solution* 5 - 30 min bei RT inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 25 µl 1 M H₂SO₄ abgestoppt. Die Absorptionsmessung der resultierenden Farbreaktion erfolgte unmittelbar nach kurzem Schütteln im Spektralphotometer (*ELISA reader*) bei einer Wellenlänge von 450 nm.

2.2.12 *Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) zur Bestimmung inflammatorischer Mediatoren*

Der enzymgekoppelte Immunadsorptionstest ist ein immunologisches Nachweisverfahren, mit dessen Hilfe unter anderem Zytokine und Chemokine basierend auf einer Farbreaktion nachgewiesen werden können. Beim so genannten Sandwich-ELISA wird zunächst der Erstantikörper an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte gebunden. Die nachzuweisende Probe (Antigen) bindet über ein definiertes Epitop an den Erstantikörper (*capture antibody*) und wird selbst über ein anderes Epitop vom Detektionsantikörper gebunden, der an ein Enzym gekoppelt ist. Nach Substratzugabe wird der entstandene Antikörper-Antigen-Antikörperkomplex durch eine enzymabhängige Farbreaktion nachweisbar. Die Quantifizierung der gemessenen Antigene erfolgt über eine Standardkurve, für deren Generierung genau definierte Antigenkonzentrationen eingesetzt werden.

Alle Kulturüberstände der Milzzellpopulationen (vgl. 2.2.10.1) wurden auf Anwesenheit der Zytokine TNF- α und IL-6 untersucht; Adipozytenüberstände zusätzlich auf das Chemokin *Monocyte Chemoattractant Protein 1* (MCP-1) und auf das Chemokin CXCL1 (*keratinocyte-derived chemokine*, KC), dem murinen Ortholog des humanen Interleukin-8.

Zur Durchführung der TNF- α -, IL-6- und MCP-1-ELISA erfolgte zunächst die Beschichtung der Mikrotiterplatten mit dem jeweiligen *Coating buffer*, der den Erstantikörper enthält. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4°C wurden die Mikrotiterplatten dreimal mit Waschpuffer gewaschen und mit 200 μ l *Assay Diluent* für 1 h bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde nach dreimaligem Waschen jeweils 50 μ l des Standards bzw. der Proben aufgetragen und 2 h bei RT inkubiert. Vor Zugabe von 100 μ l Detektionsantikörper wurden die Platten erneut gewaschen. Nach einer einstündigen Inkubation des Detektionsantikörpers wurden die nicht gebundenen Antikörpermoleküle gewaschen und nach Zugabe der Substratlösung wurde die Platte 30 min im Dunkeln inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 50 μ l 2 N H₂SO₄ gestoppt.

Die Durchführung des KC-ELISA erfolgte nach dem gleichen Prinzip mit leichten Modifikationen betreffend der Inkubationszeiten, Waschschritte und der eingesetzten Volumina.

Der Nachweis der Chemokine KC und MCP-1 erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge von 540 nm), der Nachweis der Zytokine IL-6 und TNF- α bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 570 nm).

2.2.13 *Griess-Reaktion zur Bestimmung von Stickstoffmonoxid*

Zur Konzentrationsbestimmung des von Makrophagen produzierten NO wurde die Konzentration von Nitrit, das als Oxidationsprodukt des NO im Zellüberstand akkumuliert, mit Hilfe der Griess-Reaktion bestimmt. Die Reaktion beruht auf der Umsetzung von Sulfanilsäure/N-(1-naphthyl)ethylendiamin mit Nitrit zu einem Diazofarbstoff. Da die Absorption dieses Farbstoffs bei einer Wellenlänge von 548 nm proportional zur Nitritkonzentration ist, kann die Quantifizierung über eine Standardkurve erfolgen, die mit definierten Konzentrationen von Natriumnitrit erstellt wird (98).

2.2.14 Statistik

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Daten zeigen Mittelwerte $\pm$ SD. Zur Berechnung statistischer Signifikanzen wurde der Student's t-Test angewendet. Der Unterschied zwischen zwei Datenpunkten wurde als statistisch signifikant angesehen bei $p < 0,05$.

Die Analysen zur Diabetesentwicklung bei NOD TLR4^{+/+}, NOD TLR4^{+/-} und NOD TLR4^{-/-} Mäusen wurden mit Hilfe des Kaplan-Meyer-Verfahrens durchgeführt. Der Vergleich der Körpergewichtsentwicklung der NOD-Mäuse erfolgte durch die Analyse von nicht-linearen Regressionskurven. Alle statistischen Analysen wurden mit dem Programm GraphPad Prism Version 4.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Tiermodells der TLR4-defizienten NOD-Maus

Die NOD-Maus ist das zurzeit am besten charakterisierte Tiermodell des humanen (insulinabhängigen) T1D. Vergleichbar zur Situation im Menschen kommt es zur progressiven Zerstörung der pankreatischen β -Zellen und in der Folge zur Manifestation eines Diabetes. Hauptsächlich beteiligt an der β -zellgerichteten Immunreaktion sind Zellen des angeborenen Immunsystems, deren Aktivitäten wesentlich von TLR4 kontrolliert werden. Es ist daher anzunehmen, dass Untersuchungen zu den Auswirkungen des Fehlens des TLR4-Rezeptors wichtige Erkenntnisse für das Verständnis der Immunpathogenese des T1D und für die Entwicklung von Strategien zur Prävention der Erkrankung liefern werden. Aus diesem Grund wurde der TLR4-Defekt der C57BL/10ScCr-Maus auf den Hintergrund der NOD-Maus zurückgekreuzt, und damit ein TLR4-defizientes Mausmodell des T1D generiert. Alle Nachkommen, die im Rahmen dieses Zuchtprogrammes generiert wurden, werden in der Folge als „NOD TLR4“ Mäuse bezeichnet.

3.1.1 Charakterisierung des Tiermodells auf DNA-Ebene

3.1.1.1 Bestätigung der erfolgreichen Einkreuzung der NOD-Allele

Das NOD-Modell weist annähernd 20 Gene auf, welche die Diabetessuszeptibilität der Tiere bestimmen (14). Bevor die Auswirkungen des TLR4-Defekts auf die Diabetesentwicklung im neu generierten Modell der TLR4-defizienten NOD-Maus untersucht werden konnten, musste sichergestellt werden, dass die Diabetessuszeptibilitätsgene des NOD-Parentalstammes auch in der NOD-TLR4-Linie wieder zu finden sind. Ein Beleg kann durch die Methode der selektiven Amplifikation NOD-spezifischer DNA-Abschnitte (PCR) erbracht werden.

Alle Individuen der 11. Rückkreuzungsgeneration wurden auf das Vorhandensein von fünf wichtigen IDD-Loci (IDD1, IDD2, IDD3, IDD15) untersucht. Abbildung 5 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer repräsentativen PCR zum Nachweis des IDD1-Locus. Die Amplifikationsprodukte der untersuchten NOD-TLR4-Mäuse waren 126 bp groß und besitzen somit die erwartete Größe des nachzuweisenden NOD-spezifischen Allels. Als Kontrolle diente die Amplifikation des IDD1 einer C57BL/10ScCr-Maus. Das Amplifikat ist mit 148 bp größer als das PCR-Produkt der NOD-Maus, da das entsprechende Allel des IDD1-Locus der Kontrollmaus 22 bp mehr umfasst.

Alle getesteten Diabetessuszeptibilitätsgene konnten in der NOD-TLR4-Linie nachgewiesen werden; somit konnte ab der 11. Rückkreuzungsgeneration die erfolgreiche Einkreuzung der NOD-Allele in das neu generierte Mausmodell der NOD-TLR4-Maus bestätigt werden.

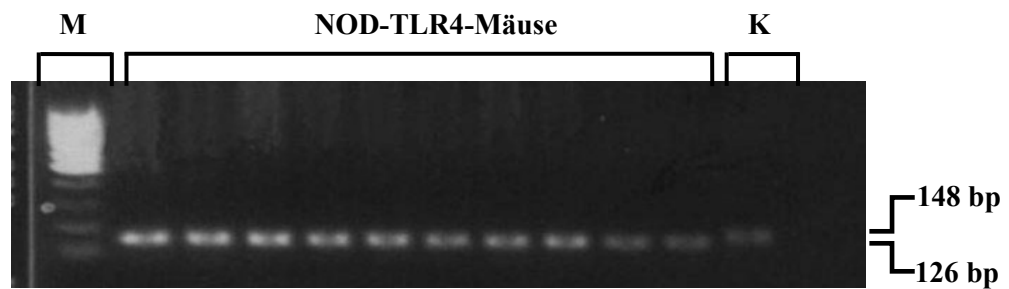


Abb. 5: Nachweis des *IDD1*-Locus in NOD-TLR4-Mäusen. Untersucht wurde die DNA von Individuen der 11. Rückkreuzungsgeneration der NOD-TLR4-Linie. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung ergeben sich Amplifikate der Größe 126 bp (NOD-TLR4-Mäuse) und 148 bp (C57BL/10ScCr-Kontrollmaus). M = DNA Marker, K = Kontrollmaus.

3.1.1.2 Monitoring des TLR4-Defektes

DNA-Analysen zur Verfolgung des TLR4-Defektes über die Rückkreuzungsgenerationen hinweg und zur Genotypisierung der Versuchstiere, belegen die stabile Integration des TLR4-Defektes in das Genom der TLR4-defizienten NOD-Linie. Anhand von zwei PCR-Analysen kann durch den Einsatz von Wildtyp- bzw. Defekt-Primerpaaren festgestellt werden, ob ein Tier homozygot für den TLR4-Wildtyp ist, oder einen homozygoten oder heterozygoten TLR4-Defekt trägt. DNA-Proben TLR4-homozygoter Mäuse erbringen ein 401 bp großes PCR-Amplifikat (Abb. 6). Zwei Amplifikationsprodukte der Größe 140 und 401 bp entsprechen einem heterozygoten Genotyp, wohingegen der alleinige Nachweis eines 140 bp Amplifikates das PCR-Produkt der genomischen DNA einer homozygoten TLR4-defizienten Maus darstellt.

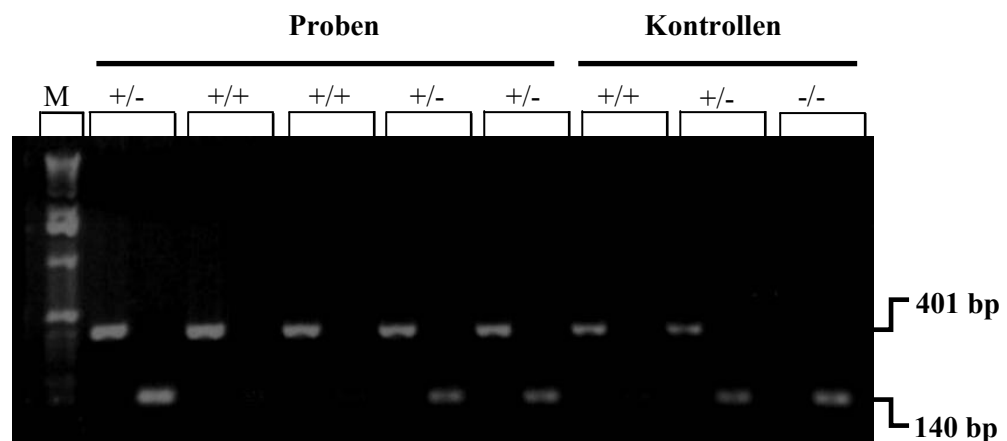


Abb. 6: Amplifikation der TLR4 Wildtyp- und Defektallele zur Genotypisierung der Mäuse. In zwei nebeneinanderliegende Geltaschen wurden jeweils Proben der Wildtyp- bzw. der Defekt-PCR eines zu genotypisierenden Tieres aufgetragen. Anhand des Bandenmusters können die jeweiligen Genotypen identifiziert werden. Das Bild zeigt exemplarisch ein Gel zur Phänotypisierung von Nachkommen von Mäusen aus der 12. Rückkreuzungsgeneration. M = DNA Marker, +/+ = TLR4 homozygot, +/- = TLR4 heterozygot, -/- = homozygot TLR4-defizient, K = Kontrollen.

3.1.2 Charakterisierung des Tiermodells auf RNA-Ebene

Nachdem unter 3.1.1.1 die erfolgreiche Einkreuzung der NOD-Allele belegt werden konnte, wurde im nächsten Schritt auf RNA-Ebene das Vorliegen der TLR4-Defizienz geprüft. Aus den Milzen von NOD TLR4^{+/+} und NOD TLR4^{-/-} Tieren wurde RNA isoliert und anschließend eine RT-PCR mit spezifischen, synthetisch hergestellten Oligonukleotiden für den Nachweis der TLR4-kodierenden cDNA durchgeführt. Eingesetzte cDNA der NOD TLR4^{+/+} Maus diente als Matritze zur Amplifikation von PCR-Produkten der Größe 176 bp (β -Actin) und 197 bp (TLR4).

Die Auftrennung durch ein Agarosegel macht das Fehlen eines TLR4-Amplifikates in NOD TLR4^{-/-} sichtbar (Abb.7). Somit konnte die TLR4-Defizienz in NOD TLR4^{-/-} Mäusen auch auf RNA-Ebene bestätigt werden.

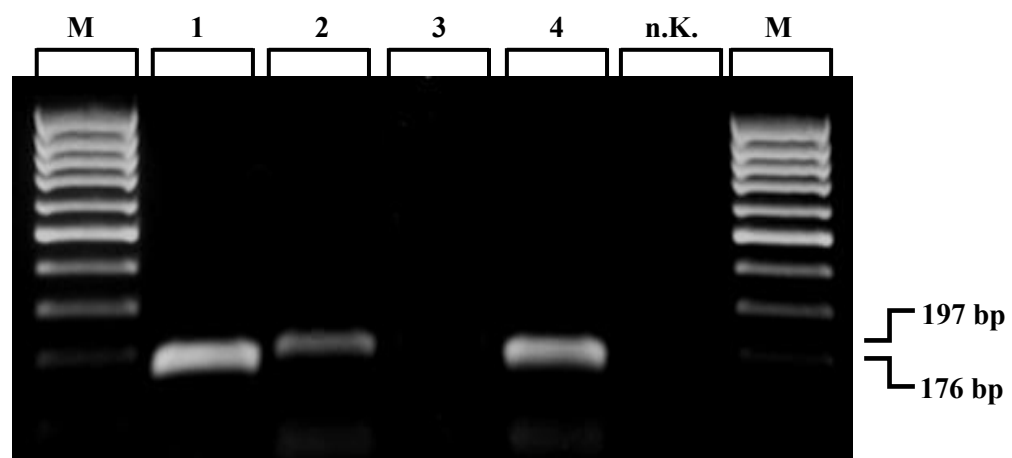


Abb. 7: RT-PCR zum Nachweis des Fehlens von TLR4-Transkripten in der NOD TLR4^{-/-} Maus. Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte ergab für den *housekeeper* β -Actin ein 176 bp großes Amplifikat (NOD TLR4^{+/+} Maus (1); NOD TLR4^{-/-} Maus(4)). Die cDNA der NOD TLR4^{+/+} Maus erbrachte ein TLR4-Amplifikat der Größe 197 bp (2), cDNA der NOD TLR4^{-/-} Maus erbrachte kein TLR4-Amplifikat (3). M = 100 bp DNA-Größenmarker, n.K. = negativ Kontrolle der PCR

3.1.3 Charakterisierung des Tiermodells auf Protein-Ebene

Nachdem DNA- und RNA-Analysen das Fehlen des TLR4-Gens sowie des TLR4-Transkripts in TLR4-defizienten NOD-Mäusen belegten (vgl. 3.1.1.2 und 3.1.2), zeigen FACS-Analysen ergänzend auch die Abwesenheit des TLR4-Genproduktes.

Zunächst wurde die Expression des TLR4-Proteins von Milzzellen des Parentalstammes C57BL/10Sc dokumentiert (Abb. 8). Die Ergebnisse zeigten, dass unfraktionierte Milzzellen der C57BL/10ScSn-Mäuse TLR4 schwach auf ihrer Zelloberfläche exprimieren (Abb. 8 A). Eine vergleichbare Expressionsstärke zeigen unfraktionierte Milzzellpopulationen (Abb. 9 A), sowie Milzmakrophagen (Abb. 9 D) der NOD TLR4^{+/+} Mäuse. Ein deutlich schwächeres Signal ist dagegen in NOD-Mäusen mit heterozygoter TLR4-Expression nachweisbar (Abb. 9 B, E). In C57BL/10ScCr- und NOD TLR4^{-/-} Mäusen kann dagegen sowohl auf unfraktionierten Milzzellen, als auch auf Milzmakrophagen kein TLR4-Protein nachgewiesen werden (Abb. 8 B, 9 C, F).

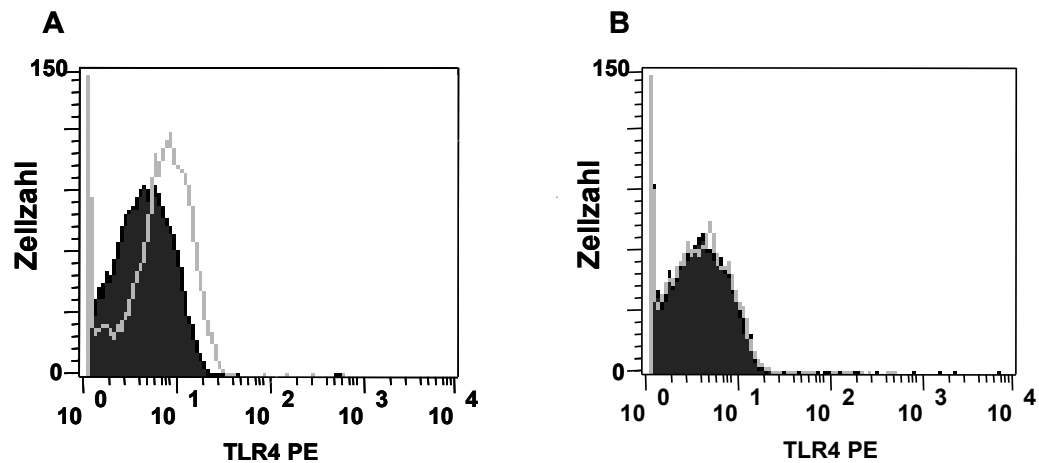


Abb. 8: FACS-Analyse zur TLR4-Expression auf Milzzellen von C57BL/10ScSn- und C57BL/10ScCr-Mäusen. Jeweils 20.000 Zellen beider Mauslinien ((A) C57BL/10ScSn, (B) C57BL/10ScCr) wurden mit einem monoklonalen PE-markierten Anti-TLR4-MD2-Komplex-Antikörper gefärbt. Die Fluoreszenzsignale der Zellen wurden im Durchflusszytometer analysiert (graue Kurve) und gegen die Isotypkontrolle (schwarze Fläche) aufgetragen.

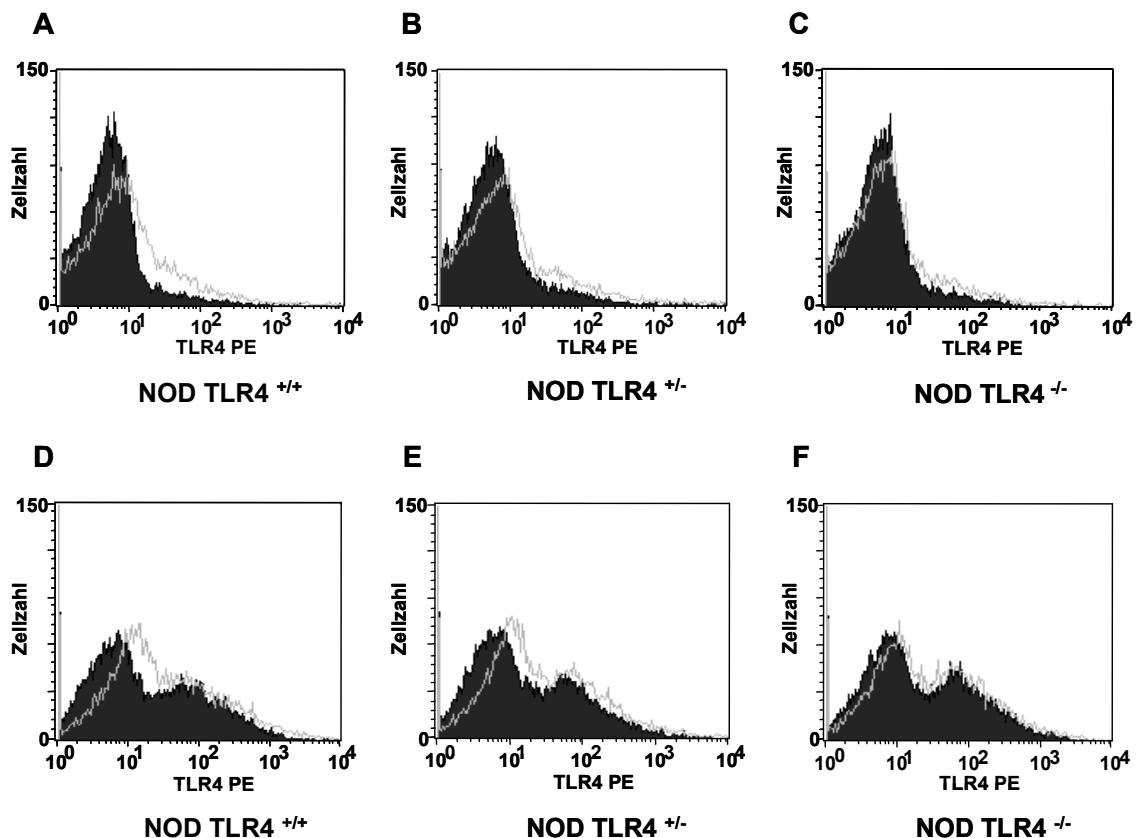


Abb. 9: FACS-Analyse zur TLR4-Expression von NOD-TLR4-Mäusen. Unfraktionierte Milzzellen (A-C), sowie angereicherte Milzmakrophagen (D-F) aus NOD-TLR4-Mäusen verschiedener Genotypen wurden im Durchflusszytometer analysiert. Die TLR4-Expression (graue Kurve) wurde gegen die Isotypkontrolle (schwarze Kurve) aufgetragen.

Das Ergebnis dieser Analyse kann somit als ein weiterer Beleg für die erfolgreiche Einkreuzung des TLR4-Defektes in die NOD-Linie gewertet werden. Da durch die dargestellten Analysen das Fehlen des TLR4 in NOD TLR4^{-/-} Mäusen als gesichert angesehen werden kann, wurden im Folgenden nur noch verschiedene Zellpopulationen der NOD TLR4^{+/+} Mäuse auf das Vorhandensein des Proteins hin untersucht.

3.1.4 Funktionelle Charakterisierung des TLR4-Defektes

Zur funktionellen Charakterisierung des generierten Tiermodells wurden makrophagenangereicherte Milzzellfraktionen der NOD-Mäuse verschiedener TLR4-Genotypen dem klassischen TLR4-Liganden LPS (1 und 10 ng/ml) ausgesetzt. Nach 6 h wurde die Freisetzung des Zytokins TNF- α im Kulturüberstand mit Hilfe eines ELISA bestimmt. Die TNF- α -Sekretion der TLR4-exprimierenden Milzzellen steigt von $4,15 \pm 1,35$ pg/ml auf $143,08 \pm 99,28$ pg/ml (1 ng/ml LPS) bzw. auf $224,87 \pm 122,44$ pg/ml (10 ng/ml LPS) an. Milzzellen der NOD TLR4^{-/-} Mäuse zeigen einen Anstieg der TNF- α -Freisetzung von $7,78 \pm 4,12$ pg/ml auf $118,28 \pm 30,35$ pg/ml (1 ng/ml LPS) bzw. auf $271,44 \pm 102,10$ pg/ml (10 ng/ml LPS), wohingegen TLR4-defiziente Milzzellen der NOD TLR4^{-/-} Maus LPS-induziert signifikant weniger TNF- α freisetzen ($p < 0,001$). Die Sekretion steigt, auf eine Stimulation mit 1 ng/ml LPS folgend, von $3,86 \pm 1,91$ pg/ml auf $4,61 \pm 1,24$ pg/ml an; 10 ng/ml LPS führen zu einer Freisetzung von $8,76 \pm 3,58$ pg/ml TNF- α .

Zusätzlich zur LPS-Exposition erfolgte eine Kultivierung der Zellen in Gegenwart von 100 ng/ml des *macrophage activating lipopeptide 2* (MALP-2). MALP-2 ist im Gegensatz zum LPS ein Ligand des TLR2 und wurde in diesem Experiment als TLR4-unabhängiger Stimulus eingesetzt. Eine Stimulation mit 100 ng/ml MALP-2 resultierte in einem Anstieg der TNF- α -Freisetzung der Zellen auf $12,34 \pm 4,21$ pg/ml (NOD TLR4^{+/+}) bzw. auf $17,06 \pm 5,39$ pg/ml (NOD TLR4^{-/-}). Auch bei Zellen der NOD TLR4^{-/-} Maus war ein vergleichbarer Anstieg der TNF- α -Sekretion auf $10,14 \pm 2,43$ pg/ml zu beobachten. Somit zeigen die Daten, dass die Makrophagen TLR4-defizienter NOD-Mäuse kein generell verändertes Sekretionsverhalten nach Stimulation mit TLR-Liganden aufweisen.

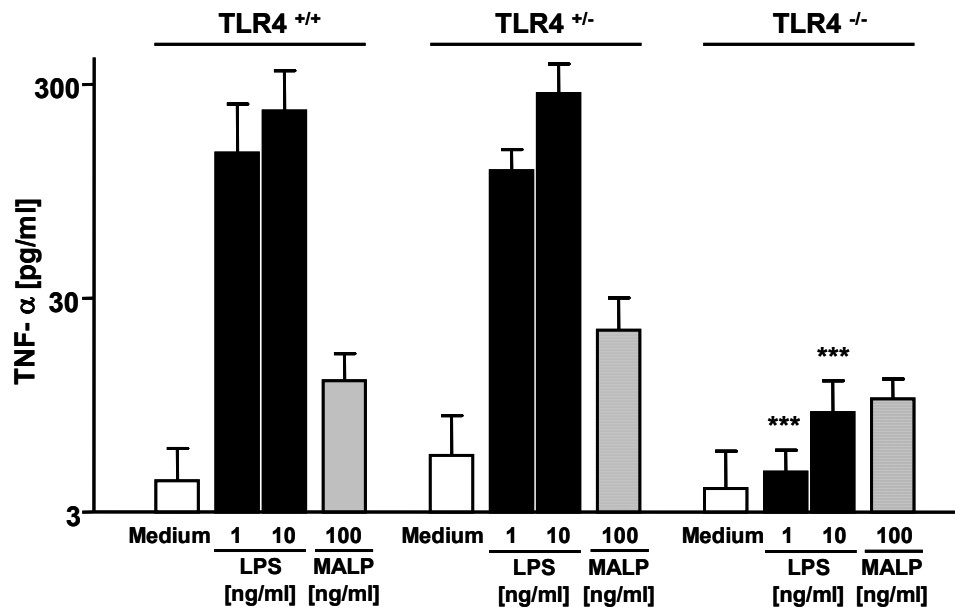


Abb. 10: Analyse zur TLR4-Abhängigkeit der TNF- α -Freisetzung von makrophagenangereicherten Milzzellfraktionen der NOD-TLR4-Maus. Makrophagenangereicherte Milzzellfraktionen von NOD TLR4^{+/+}, TLR4^{+/-} und TLR4^{-/-} Mäusen wurden in Abwesenheit (Medium, offene Balken) oder in Gegenwart von LPS (1 oder 10 ng/ml, schwarze Balken) oder MALP-2 (100 ng/ml, gestreifte Balken) kultiviert. Nach 6 h wurde die TNF- α -Konzentration im Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Die Daten zeigen Mittelwerte + SD von drei unabhängigen Analysen. ***p<0,001 im Vergleich zur Medium-Kontrolle.

3.2 Effekte der TLR4-Defizienz auf den natürlichen Verlauf der Diabetesentwicklung in der NOD-Maus

3.2.1 Einfluss des TLR4-Expressionsstatus auf das Diabetes-Manifestationsalter von NOD-Mäusen

Nachdem unter 3.1.1.1 das erfolgreiche Einkreuzen der Diabetessuszeptibilitätsgene in die NOD-TLR4-Linie nachgewiesen werden konnte, wurde durch Überwachung der Blutzuckerspiegel die Diabetesentwicklung in den NOD-Mäusen verfolgt.

Weibliche Mäuse verschiedener Genotypen der generierten NOD-TLR4-Linie wurden über die ersten 210 Tage ihres Lebens überwacht (Abb. 11 A). Weibchen mit normaler TLR4-Expression beginnen im Alter von 150 Tagen einen Diabetes zu entwickeln, nach 210 Tagen sind 75 % der Tiere diabetisch. Überraschenderweise zeichnete sich insbesondere für homozygot TLR4-defiziente, weibliche Mäuse eine signifikant beschleunigte Diabetesentwicklung ab (p<0,01). Bereits im Alter von 100 Tagen manifestiert sich bei den ersten Mäusen eine diabetische Stoffwechsellage, die nach 210 Tagen in 80 % der Tiere vorzufinden ist. Tiere mit heterozygoter TLR4-Expression zeigen einen intermediären Verlauf der Diabetesentwicklung.

Weibliche Mäuse des NOD-Parentalstammes zeigen einen ähnlichen Verlauf der Diabetesentwicklung wie NOD TLR4^{+/+} Mäuse. Im Alter von 171 Tagen liegt die Inzidenzrate

der NOD-Mäuse bei 50 %. Im Alter von 220 Tagen sind 67 % der beobachteten NOD-Mäuse diabetisch (Abb. 11 B).

Männliche Tiere wurden in die Untersuchung nicht einbezogen, da bei NOD-Mäusen eine geschlechtsspezifische Diabetessuszeptibilität vorliegt und männliche Tiere eine Diabetesinzidenz von <10 % aufweisen (88).

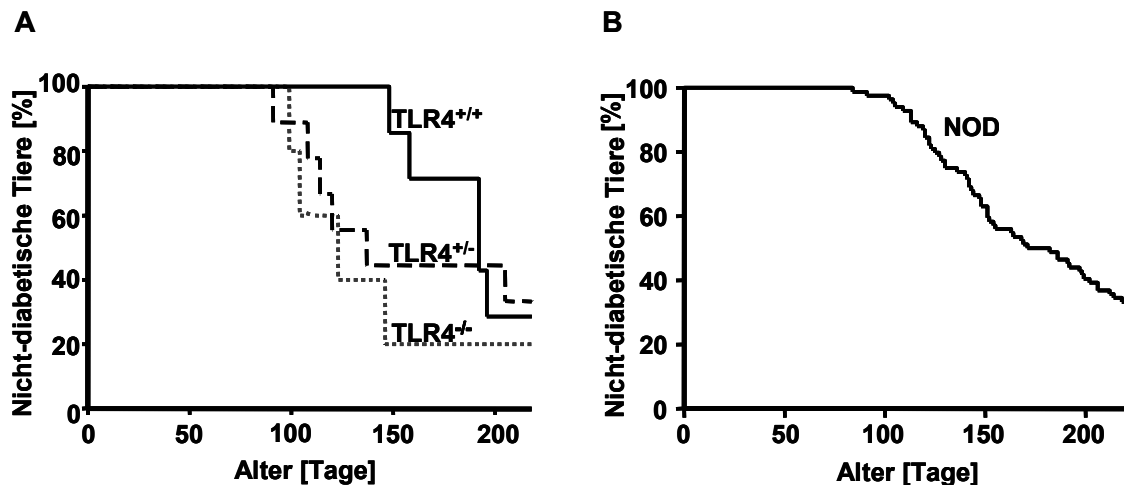


Abb. 11: Differentielle Diabetesentwicklung von NOD-Mäusen mit unterschiedlichem TLR4-Expressionsstatus und von Mäusen des NOD-Parentalstammes. (A) Diabetesentwicklung weiblicher TLR4^{+/+}, TLR4^{+/-} und TLR4^{-/-} NOD-Mäuse (n = 10 - 12). (B) Diabetesentwicklung weiblicher Mäuse (n = 84) des NOD-Parentalstammes. Die Mäuse wurden über die ersten 210 Tage ihres Lebens überwacht. Als diabetisch gelten Tiere mit einem Blutzuckerspiegel >220 mg/dl.

3.2.2 Untersuchungen zum Einfluss des TLR4-Expressionsstatus auf die Glukose-Toleranz von NOD-Mäusen

Da NOD TLR4^{-/-} Mäuse eine beschleunigte Diabetesentwicklung durchlaufen, stellt sich die Frage, ob bereits vor Diabetesmanifestation in TLR4-defizienten Mäusen eine gestörte Glukosetoleranz vorliegt bzw. ob sich ihre Glukosetoleranz von NOD TLR4^{+/+} Kontrolltieren unterscheidet.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde an 85 - 100 Tage alten, weiblichen, normoglykämischen NOD TLR4^{+/+} und NOD TLR4^{-/-} Tieren ein intraperitonealer Glukosetoleranztest (ipGTT) durchgeführt (Abb. 12). Die Blutzuckerspiegel der Mäuse mit unterschiedlichem TLR4-Expressionsstatus stiegen erwartungsgemäß nach Applikation von 10 µl einer 20 %igen Glukoselösung je Gramm Körpergewicht von 93,4 ± 14,5 mg/dl (NOD TLR4^{+/+}) bzw. 92,7 ± 6,7 mg/dl (NOD TLR4^{-/-}) zunächst nach 15 min im Mittel auf 155,75 ± 30,6 (NOD TLR4^{+/+}) bzw. 138,3 ± 30,0 mg/dl (NOD TLR4^{-/-}) an. Die Blutzuckerkurven sinken danach über die Zeit ab, bis sie 2 h nach Glukosegabe mit 79,1 ± 9,1 mg/dl (NOD TLR4^{+/+}) bzw. 87,0 ± 21,0 mg/dl (NOD TLR4^{-/-}) wieder annähernd ihre Ausgangswerte erreichen.

Die Auswertung der Messwerte zeigt sowohl im Verlauf als auch in den Flächen unter den Kurven (AUC) keine signifikanten Unterschiede in der Glukosetoleranz von NOD TLR4^{+/+} und NOD TLR4^{-/-} Mäusen.

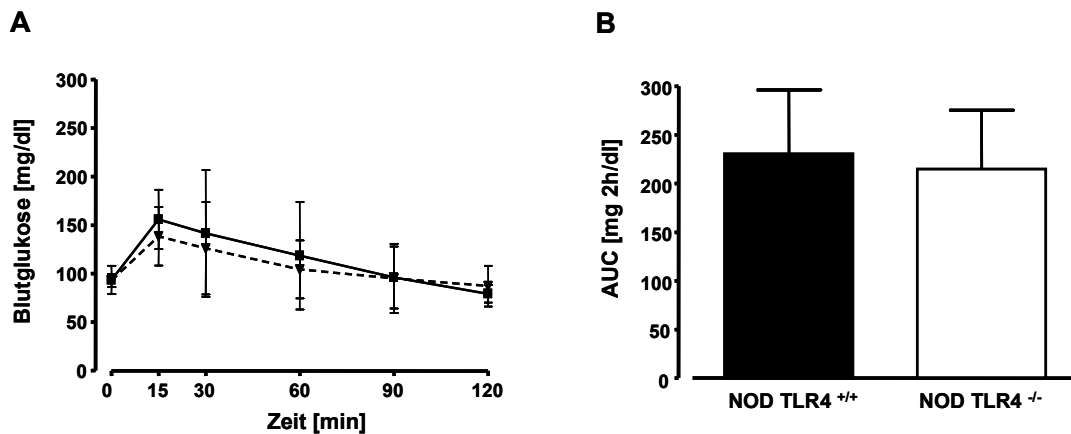


Abb. 12 : Vergleich der Glukosetoleranz von TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} NOD-Mäusen mit Hilfe eines intraperitonealer Glukosetoleranztests. NOD TLR4^{+/+} Mäusen (n = 8) sowie TLR4^{-/-} Mäusen (n = 6) im Alter von 85 - 100 Tagen wurde eine 20 %ige Glukoselösung (2 g Glukose / kg Körpergewicht) intraperitoneal gespritzt. Der zeitliche Verlauf der Blutzuckerspiegel der Mäuse wurde über einen Zeitraum von 2 h dokumentiert. (A) zeigt die Verläufe der Blutzuckerkurven in NOD TLR4^{+/+} (durchgezogene Linie) und NOD TLR4^{-/-} (gestrichelte Linie) Mäuse, (B) die Flächen unter den Blutzuckerkurven.

3.3 Differentielle Gewichtsentwicklung von NOD- und C57BL/10Sc-Mäusen in Abhängigkeit vom TLR4-Expressionsstatus

3.3.1 Differentielle Gewichtsentwicklung von NOD-Mäusen verschiedener TLR4-Genotypen

NOD-Mäuse beider TLR4-Genotypen wurden in den ersten 22 Lebenswochen in ihrer Gewichtsentwicklung überwacht. Weibliche NOD TLR4^{-/-} Mäuse zeigen im Vergleich zu weiblichen NOD TLR4^{+/+} Mäusen eine hochsignifikant ($p < 0,001$) beschleunigte Gewichtsentwicklung (Abb. 13 A) und erreichen schließlich im Alter von 21 Wochen ein um durchschnittlich 1,7 g höheres Körpergewicht (6,9 %) als TLR4-exprimierende Mäuse. Männliche NOD-Mäuse zeigen ebenfalls einen TLR4-abhängigen signifikanten Unterschied ($p < 0,001$) in der Körpergewichtsentwicklung (Abb. 13 B), jedoch liegt in diesem Fall die Gewichtskurve der TLR4-exprimierenden Mäuse über der Kurve der Defektmäuse. Männliche NOD TLR4^{+/+} Mäuse wiegen in der siebten Lebenswoche durchschnittlich 3,5 g (14,1 %) und nach 22 Wochen 1,4 g (4,3 %) mehr als männliche TLR4-defiziente NOD-Mäuse.

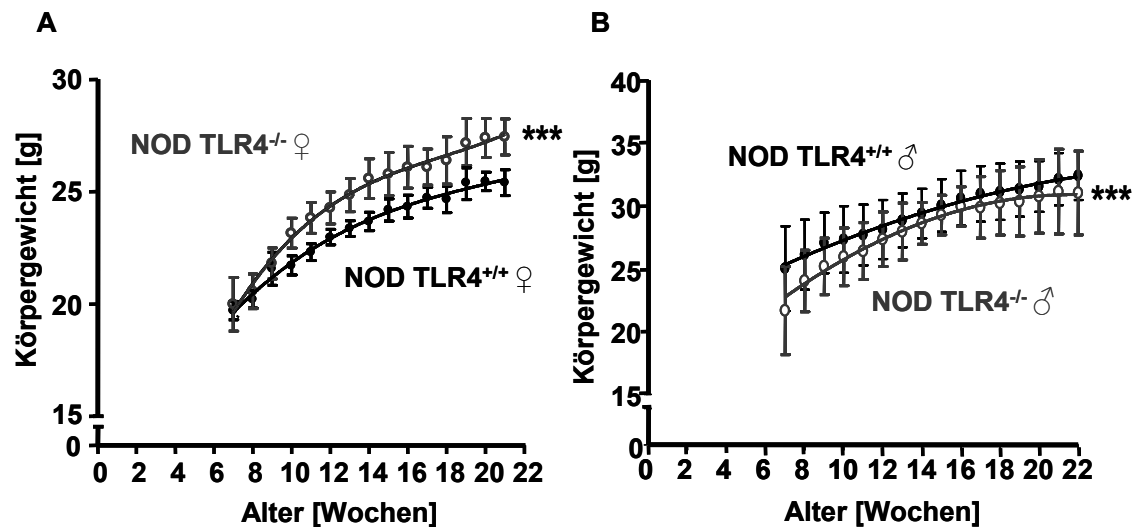


Abb. 13: Gewichtsentwicklung weiblicher und männlicher NOD TLR4^{+/+} und NOD TLR4^{-/-} Mäuse. Die Gewichtsentwicklung normoglykämischer weiblicher (A) und männlicher (B) homozygot TLR4-exprimierender und TLR4-defizienter Mäuse wurde über die ersten 22 Lebenswochen beobachtet und dokumentiert. Die Anzahl der beobachteten Tiere lag bei n = 16 - 22. ***p<0,001 im Vergleich zur Gewichtskurve der NOD TLR4^{+/+} Mäuse.

3.3.2 Differentielle Gewichtsentwicklung von Mäusen des C57BL/10Sc-Parentalstammes in Abhängigkeit vom TLR4-Genotyp

Auch die Gewichtsentwicklung der beiden Linien C57BL10/ScSn (TLR4^{+/+}) und C57BL10/ScCr (TLR4^{-/-}) des Parentalstammes C57BL/10Sc wurde überwacht. Im Gegensatz zur Situation in der NOD-TLR4-Linie zeigen weibliche Mäuse beider Linien keinen Unterschied in ihrer Gewichtsentwicklung (Abb. 14 A); männliche jedoch einen hochsignifikanten (p<0,001) (Abb. 14 B). Männliche TLR4^{+/+} Mäuse waren während des gesamten Untersuchungszeitraumes (25 Wochen) schwerer als TLR4^{-/-} Mäuse. Zu Beginn der Gewichtsüberwachung (Woche 8) wogen sie 26,1 ± 2,1 g, am Ende der Überwachung (Woche 25) 33,8 ± 2,2 g. In den Defekttieren konnte eine Gewichtszunahme von 24,6 ± 2,3 g (Woche 8) auf 32,7 ± 3,15 g (Woche 25) beobachtet werden.

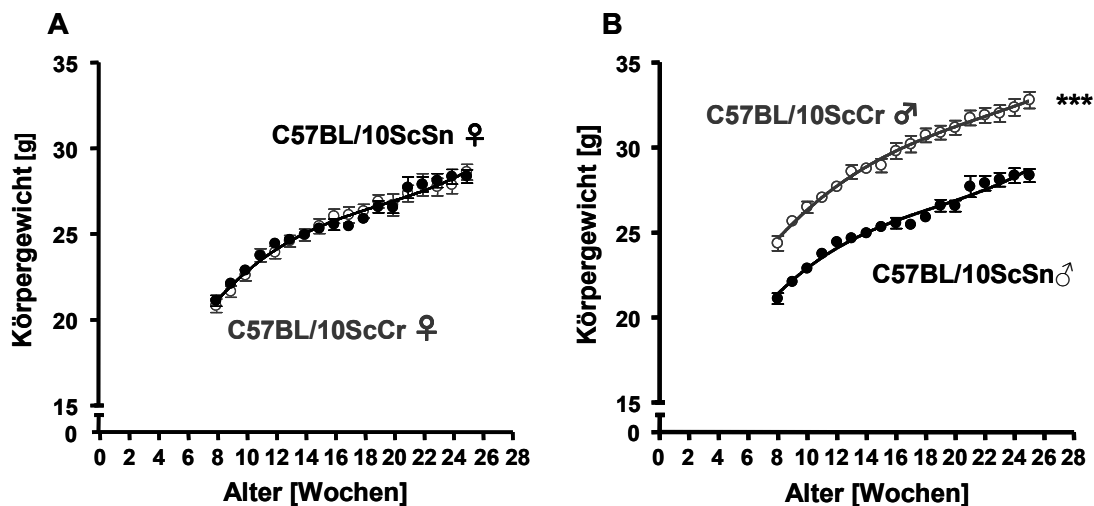


Abb. 14: Gewichtsentwicklung von Mäusen der Linien C57BL/10ScSn und C57BL/10ScCr. Weibliche C57BL/10ScSn (schwarzer Kreis) und C57BL/10ScCr (offener Kreis) Mäuse (A), sowie männliche C57BL/10ScSn (schwarzes Quadrat) und C57BL/10ScCr (offenes Quadrat) Mäuse (B) wurden während der ersten 25 Lebenswochen in ihrer Gewichtsentwicklung überwacht. *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Gewichtskurve männlicher C57BL/10ScSn-Mäuse; Anzahl der beobachteten Tiere $n = 16 - 20$.

3.4 Mononukleäre Infiltration des Pankreas TLR4-defizienter NOD-Mäuse

3.4.1 Auswirkungen des TLR4-Defekts auf die mononukleäre Infiltration der pankreatischen Inseln

Im Folgenden wurden die potentiellen Ursachen der beschleunigten Diabetesentwicklung in NOD TLR4^{-/-} Mäusen anhand histologischer Untersuchungen des Pankreasgewebes analysiert.

Zur Durchführung der Untersuchungen wurde ein Alter der Versuchstiere gewählt, in dem morphologische Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen zu erwarten sind. Zum gewählten Zeitpunkt (120 Tage) sind bereits 40 % der TLR4-defizienten Versuchstiere diabetisch (vgl. 3.2.1), während Tiere mit normalem TLR4-Expressionsstatus noch gesund sind.

Vergleichende Analysen von Pankreasdünnschnitten normoglykämischer NOD-Mäuse verschiedener TLR4-Genotypen im Alter von 120 Tagen belegen eine beschleunigte Insel-Inflammation in TLR4-defizienten Mäusen. Während NOD TLR4^{+/+} Mäuse die für dieses Alter typischen Infiltrationen vereinzelter Inselbereiche aufweisen (Abb. 15 A), zeigen TLR4-Defekt-Mäuse eine zunehmende mononukleäre Infiltration ihrer Inseln (Abb. 15 B). Zudem zeigen insbesondere homozygot TLR4-defiziente Mäuse eine völlig ausufernde Immunreaktion, die, ausgehend von den Inseln, auch weite Bereiche des umliegenden exokrinen Gewebes erfasst (Abb. 15 C).

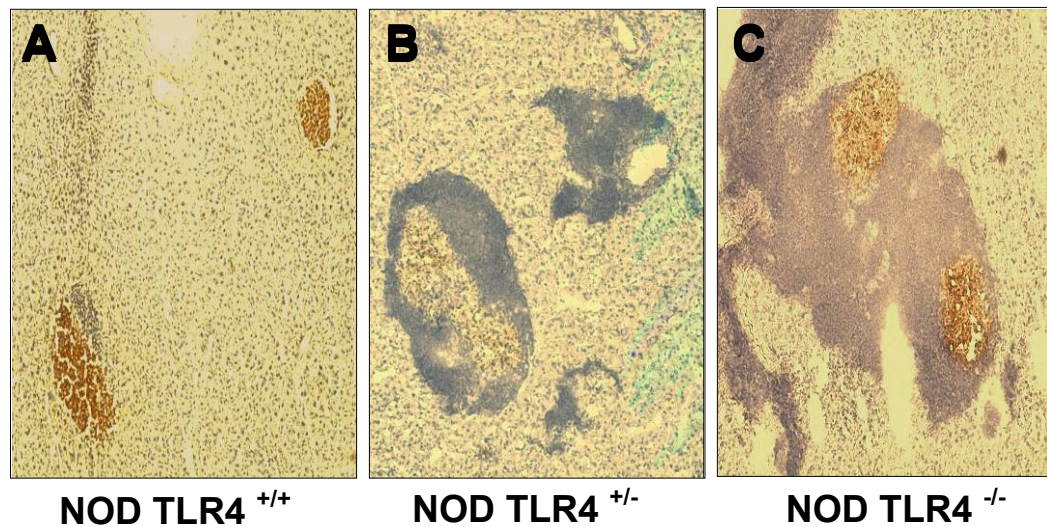


Abb. 15: Morphologie der Pankreata von NOD-Mäusen mit unterschiedlichem TLR4-Expressionsstatus. Im Alter von 120 Tagen wurden Pankreasdünnschnitte von normoglykämischen NOD-Mäusen mit unterschiedlichem TLR4-Expressionsstatus angefertigt und eine Hämatoxylin- sowie Insulinfärbung durchgeführt. Die insulinhaltigen β -Zellen in den Langerhans'schen Inseln sind braun angefärbt. Gewebereiche, die von inflammatorischen Zellen infiltriert sind, stellen sich blau dar.

3.4.2 Infiltrationsgrad Langerhans'scher Inseln der NOD-TLR4-Mäuse

In der vorliegenden histologischen Analyse zur inflammatorischen Inselinfiltration wurde die infiltrierte Fläche der Inseln quantitativ erfasst (Abb. 16). Je nach Infiltrationsgrad wurden die Inseln in sechs Kategorien (<5 - 100 % betroffene Inselfläche) eingeteilt. In NOD TLR4^{+/+} Mäusen zeigen 47,0 % der pankreatischen Inseln eine lediglich schwache Infiltration (bis 20 % infiltrierte Inselfläche). Ein geringer Anteil der Inseln (16,3 %) zeigt in diesen Mäusen eine Inflammation, die 61 - 80 % der Inselfläche betrifft. Nur 11,4 % der Inseln weisen eine Infiltration auf, die eine Fläche von 81 - 100 % der Inseln einnimmt.

In TLR4-defizienten Mäusen dagegen zeigen signifikant weniger Inseln eine Inflammation, die sich lediglich über 20 % der Inselfläche erstreckt ($p < 0,01$). Im Gegensatz dazu ist der Anteil der stark betroffenen Inseln (61 - 80 % betroffene Inselfläche) mit annähernd 27 % signifikant höher ($p < 0,05$). Eine Infiltration, die >80 % der Inselfläche einnimmt, zeigen 29 % der Inseln TLR4-defizienter NOD-Mäuse.

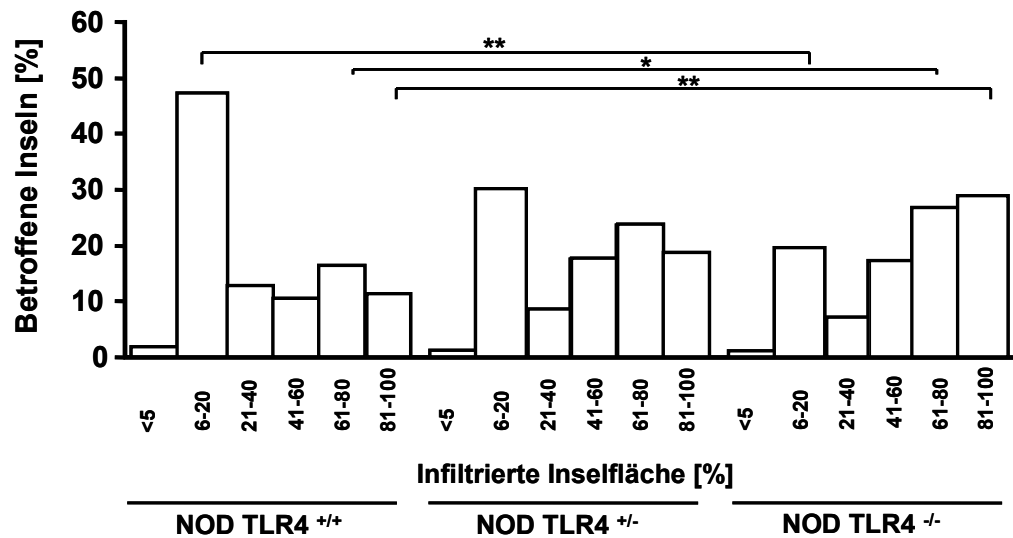


Abb. 16: Verstärkte Inselinfiltration in TLR4^{-/-} Mäusen. Pankreata von NOD-Mäusen (120 Tage alt) mit unterschiedlichem TLR4-Expressionsstatus wurden untersucht. Je nach Infiltrationsgrad wurden die Inseln in sechs Kategorien (<5 - 100 % betroffene Inselfläche) eingeteilt und der prozentuale Anteil der Inseln in jeder Kategorie bestimmt. Die Daten zeigen kumulativ die prozentualen Anteile der betroffenen Inseln in jeder Kategorie. *p<0,05; **p<0,01 im Vergleich zur infiltrierten Inselfläche der TLR4-defizienten Maus.

3.4.3 Zytokin-Suszeptibilität von Inselzellen der NOD-TLR4-Mäuse

Isolierte Inselzellen aus NOD TLR4^{+/+} und NOD TLR4^{-/-} Mäusen wurden zwei unterschiedlich dosierten Gemischen von β -zellschädigenden Zytokinen exponiert (Abb. 17). Nach 6 Tagen wurde der Anteil toter Zellen mittels Trypanblaufärbung bestimmt. In den unbehandelten Proben betrug der prozentuale Anteil toter TLR4-exprimierender Inselzellen $4,7 \pm 2,1$ %, der Anteil toter TLR4-defizienter Zellen lag bei $7,0 \pm 2,1$ %. Wurden die Inselzellen jedoch 6 Tage einem Zytokingemisch (IFN- γ 10 U/ml, TNF- α 50 U/ml, IL-1 β 5 U/ml) ausgesetzt, stieg der prozentuale Anteil der toten Zellen auf $45,9 \pm 4,7$ % (TLR4^{+/+} Inselzellen) bzw. auf $42,5 \pm 6,8$ % (TLR4^{-/-} Inselzellen). Wurden die Inselzellen einem geringer konzentrierten Zytokingemisch (IFN- γ 5 U/ml, TNF- α 25 U/ml, IL-1 β 2,5 U/ml) ausgesetzt, lag der Anteil an Trypanblau positiven Zellen bei $31,1 \pm 3,2$ % (TLR4^{+/+} Inselzellen) bzw. bei $30,4 \pm 4,0$ % (TLR4^{-/-} Inselzellen).

Die Behandlung mit den verschiedenen Zytokingemischen zeigt somit keinen Zytotoxizitätsunterschied bezüglich des Genotyps der Mäuse. Das vorliegende Experiment belegt, dass die TLR4-Defizienz keinen Einfluss auf die Suszeptibilität der Inselzellen gegenüber β -zellschädigenden inflammatorischen Zytokinen hat.

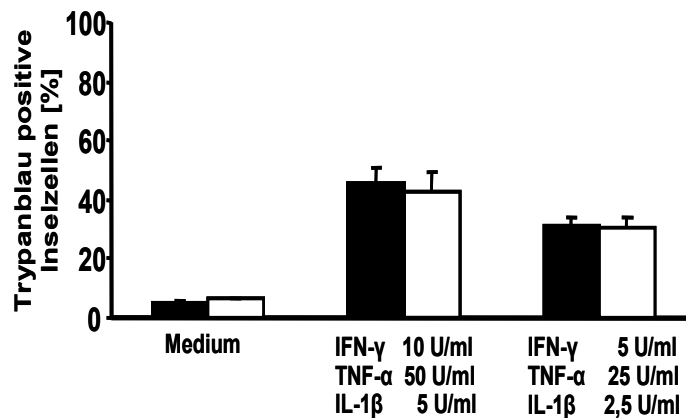


Abb. 17: Zytokin-Suszeptibilität von Inselzellen TLR4-exprimierender und TLR4-defizienter NOD-Mäuse. Inselzellen aus NOD TLR4^{+/+} (schwarze Balken) und NOD TLR4^{-/-} Mäusen (offene Balken) wurden jeweils mit Medium oder zwei unterschiedlich dosierten Zytokingemischen behandelt. Nach 6 Tagen wurde der prozentuale Anteil toter Zellen mittels Trypanblaufärbung bestimmt. Die Daten zeigen Mittelwerte + SD von drei unabhängigen Analysen.

3.5 Untersuchungen zu TLR4-abhängigen Immunzellfunktionen in der NOD-Maus

Im Abschnitt 3.4.3 konnte gezeigt werden, dass der TLR4-Expressionsstatus die Suszeptibilität von β -Zellen, der primären Zielzellen des autoimmunen Geschehens bei der Pathogenese des Insulinmangeldiabetes, gegenüber der schädigenden Wirkung von inflammatorischen Zytokinen nicht beeinflusst. Daher wurden im Folgenden auf der Ebene der immunologischen Effektormechanismen potentielle Unterschiede zwischen NOD TLR4^{+/+} und NOD TLR4^{-/-} Zellen untersucht. Neben Vitalitäts- und Proliferationstests wurde vor allem die Sekretion proinflammatorischer Mediatoren, welche die Diabetesentwicklung begünstigen, untersucht.

Da TLR4 eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle natürlicher Immunzellfunktionen einnimmt, wurden funktionelle Aktivitäten von innaten, diabetesrelevanten Immunzelltypen, wie Makrophagen, in Abhängigkeit von ihrem TLR4-Expressionsstatus untersucht. Da in den letzten Jahren TLR4 auch auf nicht-innaten Immunzellen nachgewiesen werden konnte, wurden auch funktionelle Eigenschaften von Zellpopulationen analysiert, die nicht zum angeborenen Immunsystem gezählt werden.

3.5.1 Vergleich von Immunzellpopulationen aus der Milz von TLR4-exprimierenden und TLR4-defizienten Mäusen

Sekundäre lymphatische Organe, wie Milz und Lymphknoten, sind der Sitz einer großen Anzahl von Immunzellen. Daher eignen sie sich hervorragend zur Präparation verschiedener Immunzellpopulationen. Aufgrund ihrer Größe bietet die Milz im murinen System im Vergleich zum Lymphknoten den Vorteil der besseren Handhabbarkeit und besseren Ausbeute aufgrund ihrer Größe.

Isolierte, unfractionierte Milzzellpopulationen, die sich neben retikulären Bindegewebszellen hauptsächlich aus verschiedenen Typen von Immunzellen zusammensetzen, dienen als

Ausgangspopulation zur Aufreinigung von adhärennten und nicht-adhärennten Milzzellpopulationen.

Die adhärennte Fraktion der Milzzellen repräsentiert angereicherte Makrophagen, die verbleibende nicht-adhärennte Fraktion besteht zum Großteil aus B- und T-Lymphozyten.

Abbildung 18 zeigt den Vergleich der Anzahl unfractionierter mononukleärer Milzzellen von $TLR4^{+/+}$ und $TLR4^{-/-}$ Mäusen des Parentalstammes C57BL/10Sc und der NOD-TLR4-Linie. Wildtypmäuse des Parentalstammes verfügen über signifikant mehr mononukleäre Milzzellen als Wildtypmäuse der NOD-TLR4-Linie ($p < 0,001$). Auch $TLR4$ -Defektmäuse des Parentalstammes weisen signifikant mehr Zellen im Vergleich zu NOD $TLR4^{-/-}$ Mäusen auf ($p < 0,001$). Diese Befunde bestätigen eine bereits früher beschriebene Lymphopenie in der NOD-Linie (99), die unabhängig vom $TLR4$ -Status ist.

In Tabelle 6 sind die absoluten und prozentualen Anteile der verschiedenen Zellpopulationen an der unfractionierten Gesamtmilzzellpopulation aufgeführt. Das in Tabelle 6 gegenübergestellte Verhältnis der unfractionierten Milzzellpopulationen der C57BL/10ScSn ($TLR4^{+/+}$) und C57BL/10ScCr ($TLR4^{-/-}$) Mäuse zeigt keinen signifikanten Unterschied. Es zeichnet sich lediglich ein Trend in Richtung einer geringeren Zellzahl bei $TLR4$ -defizienten Mäusen ab, der auch schon in Abb. 18 zu erkennen ist. Auf dem NOD-Hintergrund setzt sich dieser beobachtete Trend fort.

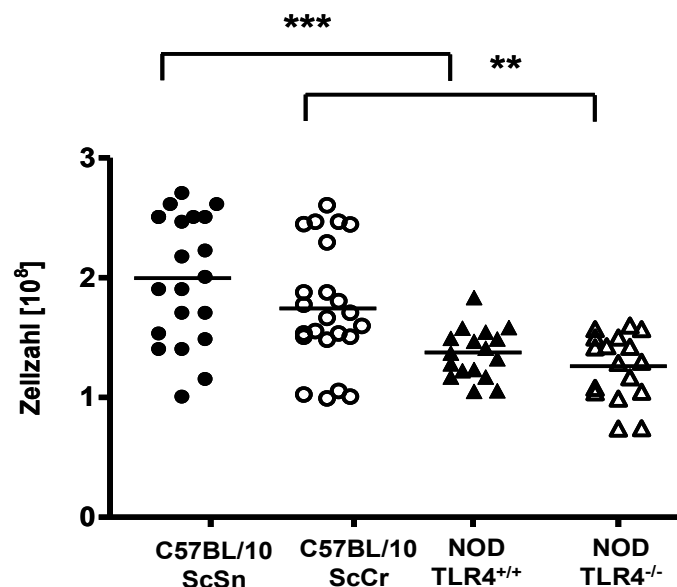


Abb. 18: Vergleich der Milzzellzahlen verschiedener Mauslinien in Abhängigkeit vom $TLR4$ -Expressionsstatus. Unfractionierte Milzzellen wurden sowohl aus dem Parentalstamm C57BL/10Sc als auch aus der generierten NOD- $TLR4$ -Linie isoliert. Die Anzahl mononukleärer Zellen $TLR4$ -exprimierender (C57BL/10ScSn) und $TLR4$ -defizienter (C57BL/10ScCr) Mäuse des Maus-Parentalstammes (jeweils $n = 23$) sowie der NOD $TLR4^{+/+}$ und NOD $TLR4^{-/-}$ Mäuse (jeweils $n = 20$) wurden durch Zählen in einer Neubauerkammer bestimmt. Im Vergleich zur Anzahl der Milzzellen in C57BL/10Sc-Mäusen ist die Zellzahl der NOD- $TLR4$ -Mäuse signifikant geringer (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Die waagerechten Linien zeigen die Mittelwerte der Zellzahlen.

Tabelle 6: Anteile adhärenter und nicht-adhärenter Milzzellpopulationen an der Gesamtmilzzellpopulation

Mauslinie	Unfraktionierte	nicht-adhärente		Adhärente	
	Milzzellen	Milzzellpopulation		Milzzellpopulation	
	Zellzahl [x10 ⁸]	Zellzahl [x10 ⁷]	[%]	Zellzahl [x10 ⁷]	[%]
C57BL/10ScSn	1,51 ± 0,04	Nicht bestimmt		Nicht bestimmt	
C57BL/10ScCr	1,29 ± 0,33	Nicht bestimmt		Nicht bestimmt	
NOD TLR4 ^{+/+}	1,49 ±	8,67 ±	58,2 ±	1,86 ±	12,5 ±
	0,70	2,00	13,5	0,86	5,8
NOD TLR4 ^{-/-}	1,05 ±	6,89 ±	65,6 ±	1,84 ±	17,5 ±
	0,02	1,36	13,0	0,48	4,6

Aus den murinen Milzen (n = 4) jeder Linie wurden verschiedene Zellpopulationen angereichert. Die unfraktionierte Population mononukleärer Milzzellen diente als Ausgangspopulation zur Anreicherung von adhärenenten Milzzellen. Nach einem zweistündigen Adhärenzschritt wurden die nicht-adhärenenten Milzzellen von den adhärenenten getrennt und die absoluten sowie prozentualen Anteile an der Gesamtmilzzellpopulation bestimmt. Die Daten zeigen Mittelwerte ± SD.

3.5.2 Freisetzung von Zytokinen aus Milzzellpopulationen

3.5.2.1 Zytokinfreisetzung aus Milzzellpopulationen des C57BL/10Sc-Parentalstammes

Der Untersuchung der Immunreaktivität der generierten NOD-TLR4-Linie vorausgehend, wurde zunächst die Zytokinfreisetzung von Milzzellen des C57BL/10Sc-Parentalstammes untersucht. Dazu wurde die LPS-induzierte Freisetzung der Zytokine TNF- α und IL-6 verschiedener Zellpopulationen TLR4-exprimierender C57BL/10ScSn- und TLR4-defizienter C57BL/10ScCr-Mäuse verglichen. Neben unfraktionierten Milzzellpopulationen wurden vor allem makrophagenangereicherte Zellpopulationen untersucht. Als innate, antigenpräsentierende Zellen exprimieren Makrophagen TLR auf ihrer Oberfläche, darunter den TLR4 (vgl. Abb. 9 D-F).

Unfraktionierte Milzzellpopulationen der Linie C57BL/10ScSn (TLR4^{+/+}), die innate und adaptive, das TLR4-Protein exprimierende Immunzellen umfassen (vgl. Abb. 9 A-C), lassen sich konzentrationsabhängig mit dem TLR4-Liganden LPS zur Freisetzung der Zytokine TNF- α und IL-6 stimulieren (Abb. 19). Die TNF- α -Sekretion von unfraktionierten Milzzellen reicht von 0,002 ± 0,001 ng/ml (0 ng/ml LPS) bis 0,050 ± 0,012 ng/ml (1000 ng/ml LPS) (Abb. 19 A). Die IL-6-Sekretion steigt von 0,003 ± 0,002 ng/ml (0 ng/ml LPS) auf 0,460 ± 0,060 ng/ml (1000 ng/ml LPS) (Abb. 19 C) an. Unfraktionierte Milzzellpopulationen von C57BL10/ScCr Mäusen

(TLR4^{-/-}) benötigen eine Mindestkonzentration von 100 ng/ml LPS zur Freisetzung nachweisbarer Konzentrationen der Zytokine TNF- α und IL-6. Mit $0,006 \pm 0,004$ ng/ml TNF- α (Abb. 19 A) und $0,063 \pm 0,029$ ng/ml IL-6 (Abb. 19 C) ist die Zytokinsekretion signifikant geringer ($p < 0,01$) als die der TLR4-exprimierenden Mäuse.

Vergleichbare Beobachtungen konnten mit adhärenen Milzzellpopulationen der C57BL10/ScCr Linie erzielt werden. Die erforderliche LPS-Konzentration zur Stimulation dieser Zellpopulationen liegt bei 100 ng/ml LPS. Dagegen reichen bereits 0,1 ng/ml LPS in Zellen von C57BL10/ScSn Mäusen aus, um eine Sekretion von $0,048 \pm 0,006$ ng/ml TNF- α zu induzieren (Abb. 19 B), die signifikant über der Freisetzungsrates der TLR4-defizienten Population liegt ($p < 0,001$). Die IL-6-Freisetzung der adhärenen Milzzellen der TLR4-exprimierenden C57BL/10ScSn-Mäuse ist bereits spontan mit $0,025 \pm 0,007$ ng/ml signifikant höher ($p < 0,05$) als die TLR4-defizienter C57BL10/ScCr-Mäuse ($0,006 \pm 0,002$ ng/ml) (Abb. 19 D). Die IL-6-Sekretion der adhärenen Milzzellen der C57BL/10ScSn-Mäuse steigt bei einer LPS-Stimulation mit 1000 ng/ml auf $0,715 \pm 0,068$ ng/ml IL-6 an, wohingegen die Sekretion der C57BL/10ScSn-Mäuse bei der gleichen LPS-Konzentration lediglich auf $0,404 \pm 0,040$ ng/ml IL-6 ansteigt ($p < 0,01$).

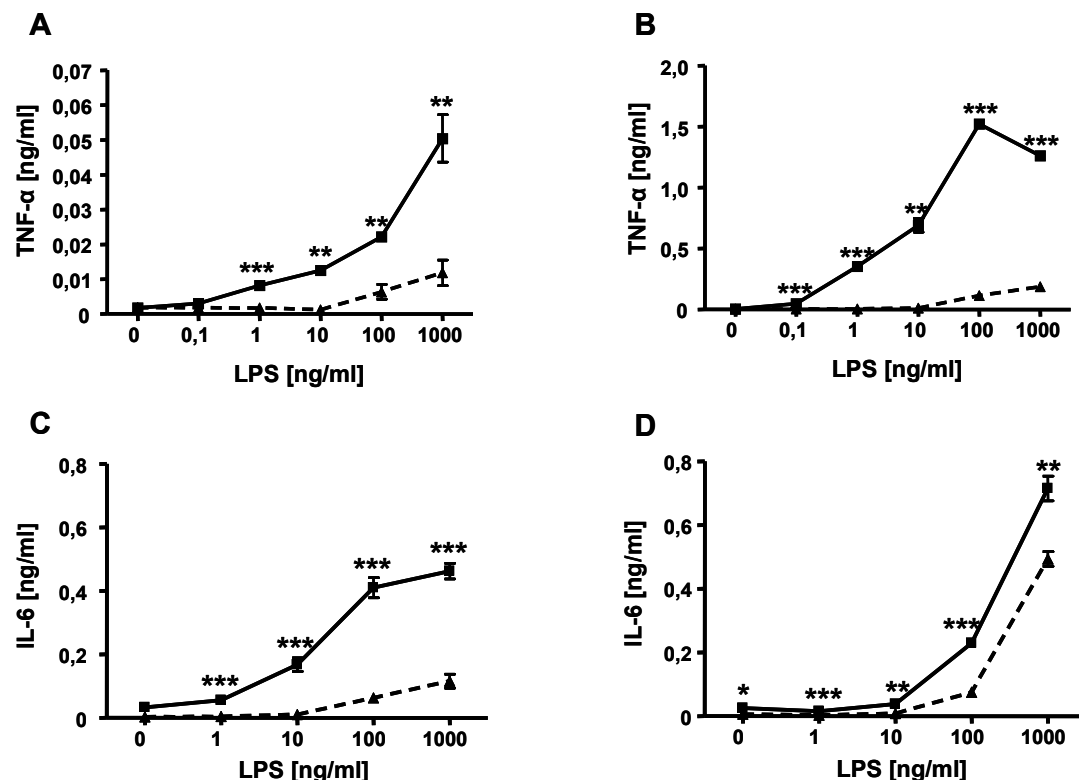


Abb. 19: LPS-induzierte Zytokinsekretion von Milzzellpopulationen der Linien C57BL/10ScSn und C57BL/10ScCr. Unfraktionierte (A, C) sowie adhärenen (B, D) Milzzellen der Linien C57BL/10ScSn (TLR4^{+/+}) (durchgezogene Linie) und C57BL/10ScCr (TLR4^{-/-}) (unterbrochene Linie) wurden mit verschiedenen LPS-Konzentrationen (0 - 1000 ng/ml) stimuliert. Nach 6 h (TNF- α ; (A, B)) bzw. 24 h (IL-6; (C, D)) wurden die Konzentrationen der im Kulturüberstand akkumulierten Zytokine gemessen. Die Daten zeigen Mittelwerte $\pm$ SD von drei unabhängigen Analysen. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$ im Vergleich zum korrespondierenden Datenpunkt der TLR4-defizienten Zellpopulation.

3.5.2.2 Zytokinfreisetzung aus Milzzellpopulationen von NOD-TLR4-Mäusen

Nachdem für Milzzellen von TLR4-defizienten C57BL/10ScCr-Mäusen eine verminderte LPS-Induzierbarkeit der Freisetzung inflammatorischer Mediatoren belegt werden konnte, wurde im Folgenden die Sekretionsleistung von Zellen des neu generierten NOD-TLR4-Modells näher beleuchtet. Neben dem klassischen TLR4-Liganden LPS wurden in diesen Analysen zusätzlich als TLR4-unabhängige Stimuli das mitogen wirkende Lektin Concanavalin A (ConA) und das primär T-Lymphozyten stimulierende Zytokin IL-2 eingesetzt.

Im Vergleich zum C57BL/10Sc-Parentalstamm lassen sich die verschiedenen Milzzellpopulationen der NOD-TLR4-Maus insgesamt deutlich schlechter stimulieren. Erst ab einer Konzentration von 100 ng/ml LPS ist eine TNF- α -Freisetzung in allen Zellpopulationen induzierbar (Abb. 20). In unfractionierten Milzzellen der NOD TLR4^{+/+} Maus, lässt sich durch LPS-Exposition die Sekretion von $27,13 \pm 5,68$ pg/ml (unstimulierte Zellen) auf $164,39 \pm 34,81$ pg/ml (1000 ng/ml LPS) steigern (Abb. 20 A). Die nicht-adhärenente Milzzellpopulation der NOD TLR4^{+/+} Maus zeigt eine Erhöhung der TNF- α -Freisetzung von $34,28 \pm 28,77$ pg/ml auf $105,58 \pm 14,40$ pg/ml (1000 ng/ml LPS) (Abb. 20 B), die adhärenente Population von $29,60 \pm 26,50$ pg/ml auf $185,48 \pm 113,81$ pg/ml (Abb. 20 C). Die TNF- α -Sekretion der unfractionierten (Abb. 20 A) und der nicht-adhärenenten Milzzellpopulation (Abb. 20 B) der TLR4-defizienten NOD-Maus steigt zunächst bei einer Gabe von 100 ng/ml LPS von $28,17 \pm 3,26$ pg/ml auf $214,20 \pm 57,74$ pg/ml an (unfractionierte Milzzellen) bzw. von $22,72 \pm 10,51$ pg/ml auf $193,21 \pm 45,32$ pg/ml (nicht-adhärenente Population) und fällt bei 1000 ng/ml LPS auf $164,98 \pm 1,80$ pg/ml (unfractionierte Milzzellen) bzw. auf $139,72 \pm 26,85$ pg/ml zurück. Die LPS-induzierte TNF- α -Sekretion der adhärenenten Population steigt konzentrationsabhängig an und erreicht ihr Maximum von $182,62 \pm 105,90$ pg/ml bei 1000 ng/ml LPS (Abb. 20 C).

Die ConA-induzierte, TLR4-unabhängige TNF- α -Sekretion zeigt mit Ausnahme der Gesamtmilzzellpopulation zunächst einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Freisetzung (Abb. 20 D, E, F). Die nicht-adhärenente Zellpopulation von NOD TLR4^{+/+} Mäusen erreicht maximale TNF- α -Konzentrationen von $52,56 \pm 26,38$ pg/ml (Abb. 20 E), die angereicherte Makrophagenpopulation Werte von $23,21 \pm 3,78$ pg/ml (Abb. 20 F). Die TLR4-defizienten Zellpopulationen sezernieren maximale TNF- α -Mengen von $68,21 \pm 15,83$ pg/ml (nicht-adhärenente Population) bzw. $20,05 \pm 3,64$ pg/ml (adhärenente Population). Mit Ausnahme der nicht-adhärenenten (TLR4^{+/+}) Population, deren TNF- α -Sekretion über die gesamte ConA-Konzentrationsreihe ansteigt, sinkt der TNF- α -Spiegel der (TLR4^{+/+}) adhärenenten Population auf $9,81 \pm 4,82$ pg/ml ab, die Spiegel der TLR4^{-/-} Populationen auf $36,6 \pm 3,4$ pg/ml (nicht-adhärenent) bzw. auf $8,69 \pm 2,01$ pg/ml (adhärenent).

Mit IL-2 lässt sich die TNF- α -Freisetzung aller drei Zellpopulationen kaum beeinflussen (Abb. 20 G, H, I). Im Fall der nicht-adhärenenten Zellpopulation ergibt sich bei einer IL-2-Konzentration von 50 pg/ml jedoch ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zwischen Zellen der NOD TLR4^{+/+} und der NOD TLR4^{-/-} Maus (Abb. 20 H). Die NOD TLR4^{-/-} Population sezerniert mit $311,33 \pm 16,51$ pg/ml signifikant mehr TNF- α als die NOD TLR4^{+/+} Population ($161,17 \pm 23,86$ pg/ml).

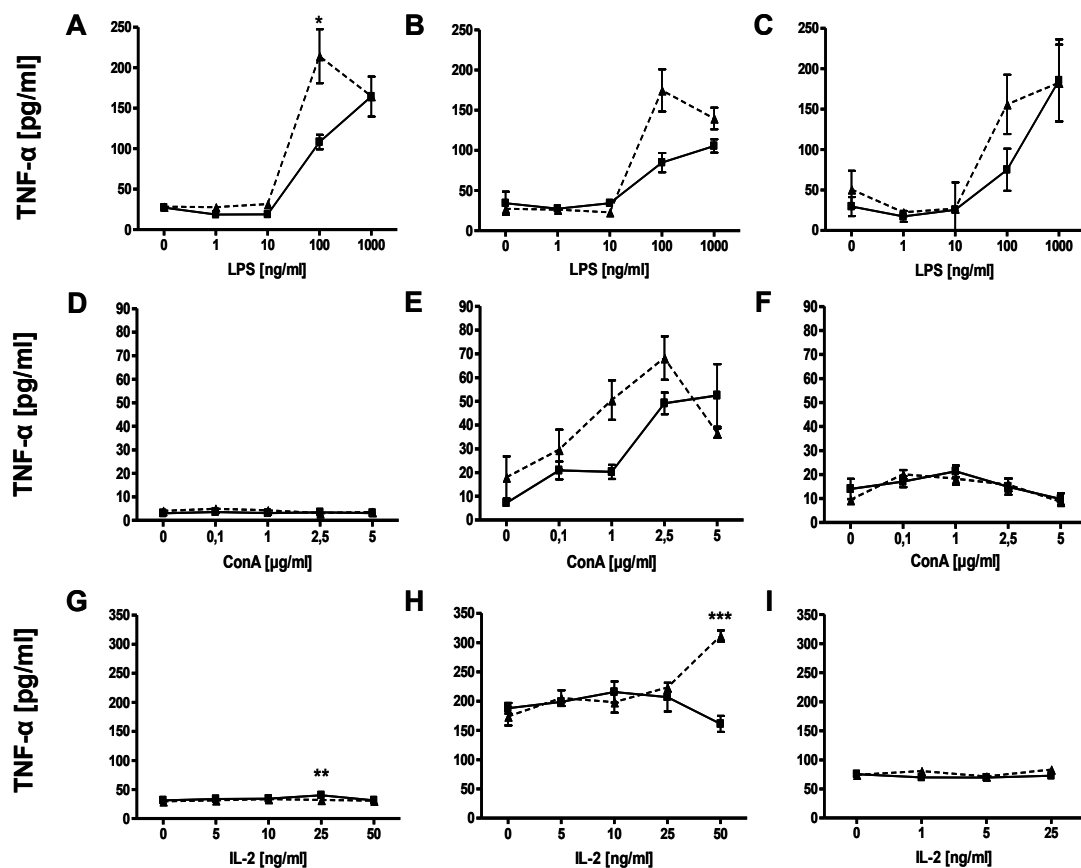


Abb. 20: Zytokinsekretion von LPS-, ConA- oder IL-2-stimulierten Milzzellpopulationen der NOD-TLR4-Linie. Unfraktionierte (A, D, G) sowie nicht-adhärenente (B, E, H) und adhärenente Milzzellen (C, F, I) von NOD TLR4^{+/+} (durchgezogene Linie) und NOD TLR4^{-/-} Mäusen (unterbrochene Linie) wurden mit steigenden LPS- (A, B, C), ConA- (D, E, F) bzw. IL-2-Konzentrationen (G, H, I) stimuliert. Nach 6 h wurde die TNF- α -Freisetzung im Kulturüberstand gemessen. Die Daten zeigen Mittelwerte $\pm$ SD dreier unabhängiger Analysen. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ im Vergleich zum korrespondierenden Datenpunkt des anderen TLR4-Expressionsstatus.

3.5.3 Effekt der TLR4-Expression auf die Stickstoffmonoxidfreisetzung von adhärenenten Milzzellpopulationen der NOD-TLR4-Maus

Das zytotoxische Radikal Stickstoffmonoxid (NO) ist ein wichtiger Mediator des Immunsystems zur Bekämpfung von Mikroorganismen und kann nach Freisetzung durch kultivierte Zellen in Form von Nitrit (NO₂⁻) in den Zellüberständen gemessen werden. Da in erster Linie Makrophagen in der Lage sind, NO zu produzieren, wurde in den nachfolgend beschriebenen Experimenten zur induzierten NO-Freisetzung lediglich die adhärenente, makrophagenangereicherte Milzzellpopulation eingesetzt. Als Stimulanzen wurden LPS, ConA und IL-2 verwendet. Die LPS-induzierte NO-Freisetzung der Zellen aus NOD TLR4^{+/+} Mäusen steigt zunächst von $3,36 \pm 0,15 \mu\text{M}$ auf $9,89 \pm 1,74 \mu\text{M}$ an (1 ng/ml LPS) und fällt dann wieder auf $0,84 \pm 0,26 \mu\text{M}$ ab (10 ng/ml LPS) (Abb. 21 A). Dieser induzierte Anstieg der NO-

Freisetzung ist signifikant höher als die maximale, mit 1 ng/ml LPS-induzierte NO-Freisetzung von Zellen der NOD TLR4^{-/-} Mäuse ($3,02 \pm 1,44 \mu\text{M}$) ($p < 0,01$).

Im Gegensatz zu LPS konnten ConA (bis zu 5 $\mu\text{g/ml}$) (Abb. 21 B) keine und IL-2 (bis zu 25 ng/ml) (Abb. 21 C) nur eine deutlich geringere NO-Freisetzung induzieren. Die Maximalwerte für die aus den Milzzellen der NOD TLR4^{+/+} Tiere angereicherten Makrophagen liegen bei $3,54 \pm 2,87 \mu\text{M}$ und im Fall der NOD TLR4^{-/-} Mäuse bei $3,02 \pm 1,44 \mu\text{M}$.

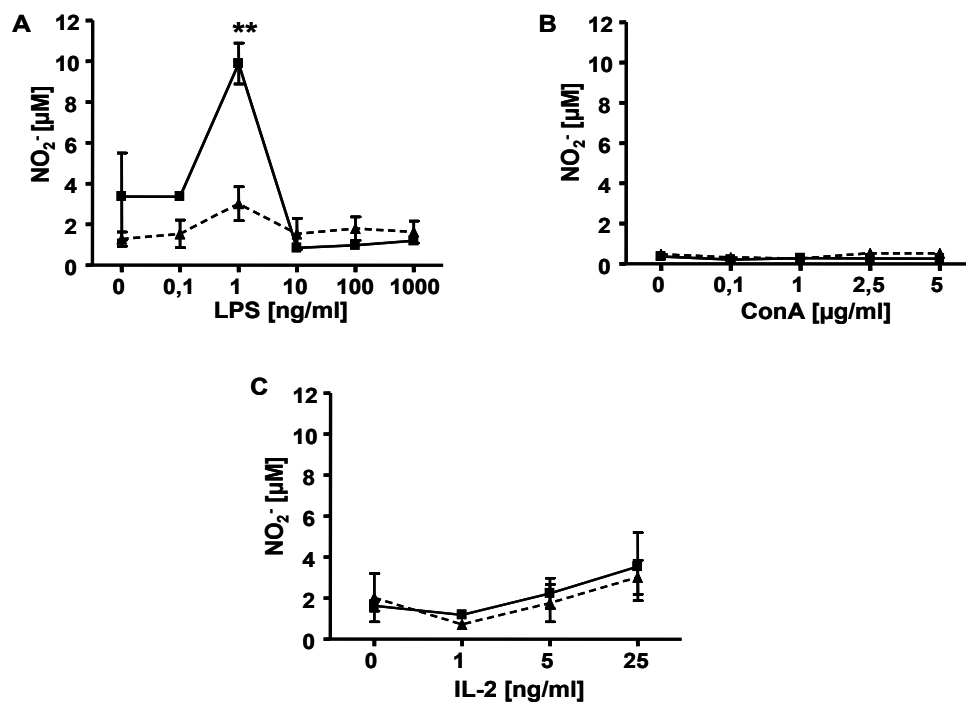


Abb. 21: Vergleich der NO₂⁻-Freisetzung aus makrophagenangereicherten Milzzellpräparationen von NOD TLR4^{+/+} und NOD TLR4^{-/-} Mäusen. Makrophagenangereicherte Milzzellpopulationen von NOD TLR4^{+/+} (durchgezogene Linie) und TLR4^{-/-} (unterbrochene Linie) Mäusen wurden 24 h steigenden Konzentrationen verschiedener Stimuli (LPS (A), ConA (B), IL-2 (C)) ausgesetzt. Mit Hilfe der Griess-Reaktion wurde die Nitrit-Akkumulation als Maß für die NO-Freisetzung photometrisch gemessen. Die Daten zeigen Mittelwerte $\pm$ SD dreier unabhängiger Analysen; ** $p < 0,01$ im Vergleich zur korrespondierenden NO₂⁻-Akkumulation der NOD TLR4^{-/-} Zellen.

3.5.4 Effekt der TLR4-Expression auf das Proliferationsverhalten von Milzzellpopulationen

3.5.4.1 Effekt des TLR4-Defektes auf die Proliferation von Milzzellpopulationen des C57BL/10Sc-Parentalstammes

Aktiviert Effektorzellen durchlaufen zunächst eine klonale Expansion um ausreichende Zellzahlen zum Beispiel zur Abwehr von Pathogenen zu generieren. In der folgenden Analyse werden die möglichen Auswirkungen der TLR4-Defizienz auf das Proliferationspotenzial von Milzzellpopulationen untersucht.

Da es sich bei Makrophagen um terminal differenzierte Zellen handelt, die nicht mehr proliferativ aktiv sind, konzentrierten sich die Untersuchungen auf die teilungsfähigen

Milzzellpopulationen. Die Proliferationsrate wurde mit Hilfe eines BrdU Inkorporationsassays bestimmt und in Form der optischen Dichte (OD) der gemessenen Probe wiedergegeben.

Abbildung 22 zeigt Daten zur Auswirkung von verschiedenen stimulatorischen Substanzen auf das Proliferationsverhalten von unfractionierten und nicht-adhärenenten Milzzellfraktionen des Parentalstammes C57BL/10Sc. Ein Vergleich der Proliferationsrate von C57BL/10ScSn (TLR4^{+/+}) und C57BL/10ScCr (TLR4^{-/-}) Mäusen nach LPS-Exposition zeigt im Fall der unfractionierten Milzzellpopulation der C57BL/10ScSn-Mäuse einen konzentrationsabhängigen Anstieg des OD von $0,16 \pm 0,03$ auf $1,19 \pm 0,02$ (1000 ng/ml LPS), wohingegen die Proliferationsrate der C57BL/10ScCr-Mäuse nicht beeinflusst wird (Abb. 22 A). Sie bleibt über die gesamte Konzentrationsreihe hinweg konstant auf ca. $0,02 \pm 0,01$. Auch TLR4-defiziente nicht-adhärenente Milzzellen lassen sich kaum mit LPS zu einer Erhöhung der Proliferationsrate anregen (Abb. 22 B). Unstimulierte nicht-adhärenente Milzzellen (TLR4^{-/-}) weisen eine spontane Proliferationsrate mit einer OD von $0,25 \pm 0,02$ auf, der sich durch eine Konzentration von 100 ng/ml auf $0,40 \pm 0,14$ steigern lässt. TLR4-exprimierende Zellen dieser Milzzellpopulation zeigen eine Zunahme der OD von $0,28 \pm 0,12$ auf $0,61 \pm 0,21$ (100 ng/ml LPS).

Der Stimulus ConA induziert sowohl in beiden untersuchten Zellpopulationen als auch in den verschiedenen TLR4-Expressionszuständen ein vergleichbares Proliferationsverhalten (Abb. 22 C, D). Die OD der unfractionierten Population steigt von $0,23 \pm 0,09$ (TLR4^{+/+}) bzw. von $0,20 \pm 0,07$ (TLR4^{-/-}) auf $1,0 \pm 0,15$ (1 µg/ml ConA; TLR4^{+/+}) bzw. auf $0,95 \pm 0,16$ (1 µg/ml ConA; TLR4^{-/-}) an und fällt dann auf $0,41 \pm 0,07$ (5 µg/ml ConA; TLR4^{+/+}) bzw. $0,46 \pm 0,15$ (5 µg/ml ConA; TLR4^{-/-}) ab (Abb. 22 C). Das Proliferationsverhalten der nicht-adhärenenten Milzzellpopulation in Gegenwart von ConA zeigt ein ähnliches Bild (Abb. 22 D). Die OD steigt von $0,26 \pm 0,06$ auf $1,57 \pm 0,12$ (1 µg/ml ConA; TLR4^{+/+}) bzw. von $0,40 \pm 0,04$ auf $1,30 \pm 0,24$ (1 µg/ml ConA; TLR4^{-/-}) an. Bei höheren ConA-Konzentrationen fällt der Index auf $0,70 \pm 0,04$ (5 µg/ml ConA; TLR4^{+/+}) bzw. auf $0,80 \pm 0,11$ (5 µg/ml ConA; TLR4^{-/-}) ab.

IL-2 (25 ng/ml) induziert eine Proliferation mit einer OD von $0,23 \pm 0,03$ (unfractionierte, TLR4-exprimierende Milzzellen; Abb. 22 E) bzw. von $1,12 \pm 0,08$ (nicht-adhärenente, TLR4-exprimierende Milzzellen; Abb. 22 F). Eine Erhöhung der IL-2-Konzentration auf 50 ng/ml führt jedoch zu einem Abfall der OD auf $0,15 \pm 0,06$ (unfractionierte, TLR4-exprimierende Milzzellen) bzw. auf $0,72 \pm 0,24$ (nicht-adhärenente, TLR4-exprimierende Milzzellen). Die gleiche IL-2 Konzentration (50 ng/ml) führt aber im Fall von TLR4-defizienten unfractionierten Milzzellen zu einem Anstieg der OD von $0,12 \pm 0,01$ auf $0,30 \pm 0,09$. Die maximale, durch IL-2 induzierte Proliferationsrate führt bei nicht-adhärenenten, TLR4-defizienten Milzzellen zu einer OD von $0,59 \pm 0,18$ (5 ng/ml IL-2).

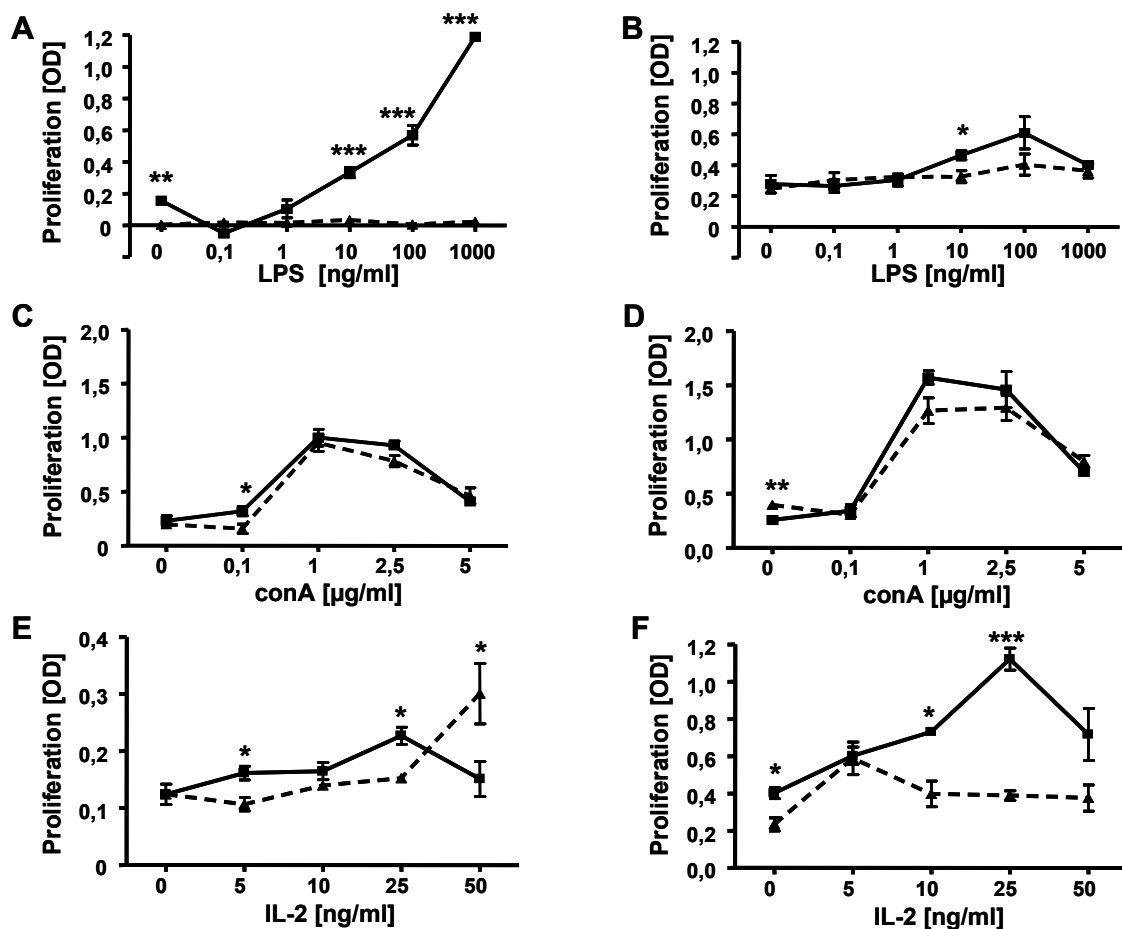


Abb. 22: LPS-, ConA- oder IL-2 stimulierte Proliferation von Milzzellpopulationen der C57BL/10ScSn (TLR4^{+/+}) und der C57BL/10ScCr (TLR4^{-/-}) Maus. Unfraktionierte (A, C, E) und nicht-adhärenente Milzzellpopulationen (B, D, F) der Mauslinien C57BL/10ScSn (durchgezogene Linie) und C57BL/10ScCr (unterbrochene Linie) wurden mit steigenden LPS- (A, B), ConA- (C, D) bzw. IL-2-Konzentrationen (E, F) stimuliert. Nach 5 d wurde die proliferative Aktivität mittels kolorimetrischer Tests bestimmt. Die Daten zeigen Mittelwerte $\pm$ SD von drei unabhängigen Analysen; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ im Vergleich zum korrespondierenden Datenpunkt von Zellen mit dem jeweils anderen TLR4-Expressionsstatus.

3.5.4.2 Effekt des TLR4-Defektes auf die Proliferation von Milzzellpopulationen des NOD-Stammes

Die Proliferationskurven der unfraktionierten Milzzellpopulationen aus NOD-Mäusen mit unterschiedlichem TLR4-Expressionsstatus verlaufen bis zu einer Konzentration von 100 ng/ml LPS sehr ähnlich (Abb. 23 A). Beide Kurven zeigen einen schwachen Anstieg der OD von $0,22 \pm 0,03$ (TLR4^{+/+}) bzw. $0,18 \pm 0,04$ (TLR4^{-/-}) auf $0,30 \pm 0,08$ (TLR4^{+/+}; 100 ng/ml LPS) bzw. $0,21 \pm 0,06$ (TLR4^{-/-}; 100 ng/ml LPS). Werden die Zellen jedoch mit 1000 ng/ml LPS-behandelt, steigt die OD der TLR4^{-/-} Zellen auf $0,35 \pm 0,08$ an, die der TLR4^{+/+} Zellen fällt jedoch auf $0,22 \pm 0,11$ ab und ist damit im Vergleich signifikant ($p < 0,01$) geringer. Die Proliferation der nicht-adhärenenten, TLR4-exprimierenden und TLR4-defizienten

Zellpopulationen unterscheiden sich bis zu einer Konzentration von 100 ng/ml LPS kaum voneinander (Abb. 23 B). Die OD der TLR4-exprimierenden Zellen steigt von $0,23 \pm 0,01$ auf $0,40 \pm 0,14$ (100 ng/ml), die OD der TLR4-defizienten Zellen von $0,31 \pm 0,03$ auf $0,33 \pm 0,04$ ng/ml. Nach einer Stimulation mit 1000 ng/ml LPS steigt die OD der TLR4-exprimierenden, nicht-adhärennten Milzpopulation auf $1,68 \pm 0,04$ und liegt damit signifikant über der OD der TLR4-defizienten, nicht-adhärennten Milzzellen, die lediglich auf $0,42 \pm 0,10$ steigt ($p < 0,01$).

Werden unfractionierte Milzzellen verschiedenen ConA-Konzentrationen exponiert, steigt die Proliferation der TLR4-exprimierenden Zellen auf eine OD von bis zu $2,22 \pm 0,12$ (2,5 µg/ml ConA) an, fällt jedoch bei einer ConA-Konzentration von 5 µg/ml unter ihren Ausgangswert auf $0,33 \pm 0,05$ ab (Abb. 23 C). Die OD der TLR4-defizienten Zellen der unfractionierten Milz steigt bei einer Konzentration von 1 µg/ml ConA auf $1,22 \pm 0,39$ an und fällt bei einer Konzentration von 5 µg/ml ConA auf $1,09 \pm 0,15$ ab. Die Proliferationskurven der nicht-adhärennten Zellen der beiden *tlr4*-Genotypen steigen im Konzentrationsbereich von 0 - 2,5 µg/ml ConA fast deckungsgleich auf $0,29 \pm 0,06$ (TLR4^{+/+}) bzw. $0,31 \pm 0,03$ (TLR4^{-/-}) an (Abb. 23 D). Die Stimulation mit 5 µg/ml ConA führt zu einem weiteren Anstieg der Proliferation der TLR4-defizienten Zellen auf eine OD von $0,34 \pm 0,06$ (5 µg/ml), jedoch zu einem Rückgang der OD der TLR4-exprimierenden Zellen auf $0,22 \pm 0,05$ (5 µg/ml) ($p < 0,05$).

Bei einer Stimulation der unfractionierten Milzpopulation mit 5 ng/ml IL-2 steigt die OD der TLR4-defizienten Zellen von $0,09 \pm 0,01$ auf $0,30 \pm 0,01$ an und liegt damit signifikant ($p < 0,05$) über der OD von $0,18 \pm 0,05$ der TLR4-exprimierenden Zellen (Abb. 23 E). Beim mit 5 ng/ml IL-2-induzierten Anstieg der Proliferation der nicht-adhärennten Zellpopulation steigt die OD von $0,10 \pm 0,01$ auf $0,13 \pm 0,01$ (TLR4^{+/+}) bzw. von $0,11 \pm 0,01$ auf $0,14 \pm 0,02$ (TLR4^{-/-}) an (Abb. 23 F). Werden die beiden Zellpopulationen höheren IL-2 Konzentrationen (10 ng/ml) ausgesetzt, kommt es zum Abfall der OD auf $0,08 \pm 0,02$ (TLR4^{+/+}; unfractionierte Milzzellen) und $0,09 \pm 0,02$ (TLR4^{-/-}; unfractionierte Milzzellen; Abb. 23 E) bzw. auf $0,09 \pm 0,01$ (TLR4^{+/+}, nicht-adhärennte Milzzellen) und auf $0,10 \pm 0,02$ (TLR4^{-/-}, nicht-adhärennte Milzzellen; Abb. 23 F).

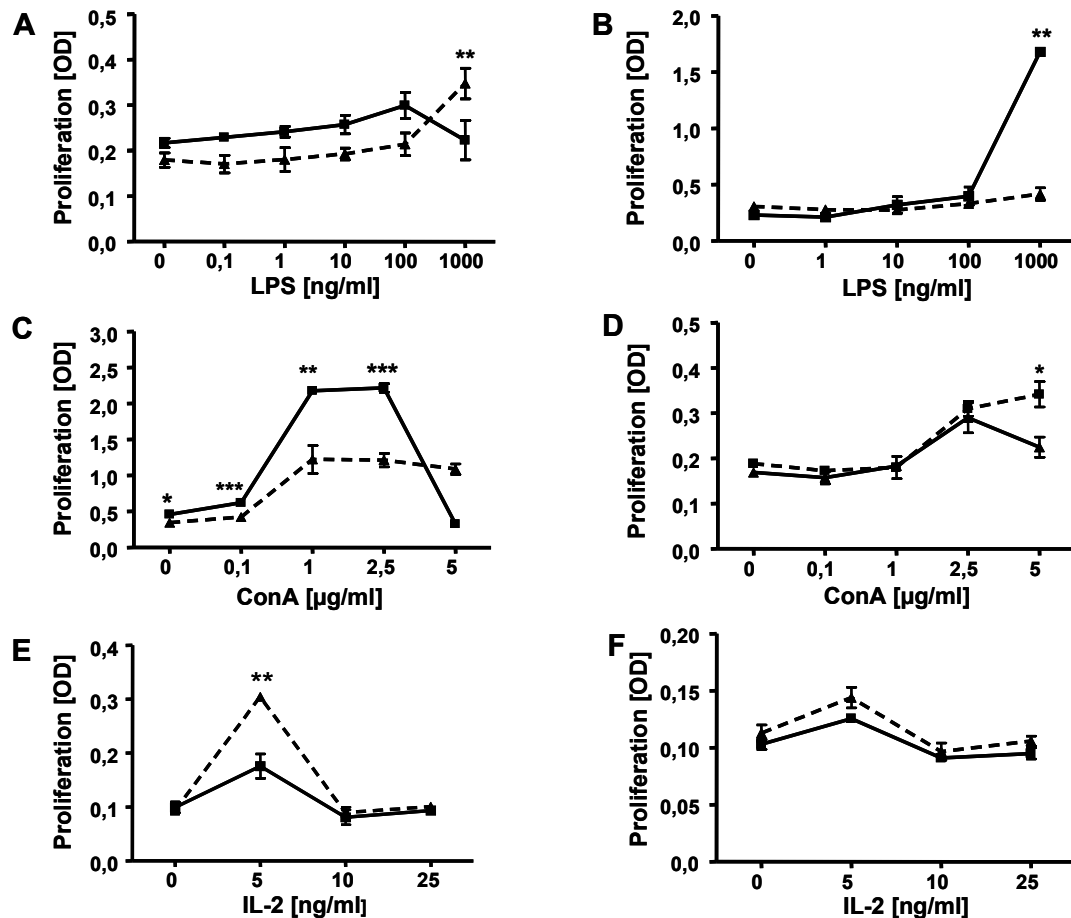


Abb. 23: LPS-, ConA- und IL-2-stimulierte Proliferation von Milzzellpopulationen aus NOD TLR4^{+/+} und NOD TLR4^{-/-} Mäusen. Unfraktionierte (A, C, E) und nicht-adhärenente Milzzellpopulationen (B, D, F) von NOD TLR4^{+/+} Mäusen (durchgezogene Linie) und NOD TLR4^{-/-} Mäusen (unterbrochene Linie) wurden mit steigenden LPS- (A, B), ConA- (C, D) bzw. IL-2-Konzentrationen (E, F) stimuliert. Nach 5 d wurde die proliferative Aktivität mittels kolorimetrischer Tests bestimmt. Die Daten zeigen Mittelwerte $\pm$ SD von drei unabhängigen Analysen; * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001 im Vergleich zum korrespondierenden Datenpunkt von Zellen mit dem jeweils anderen TLR4-Expressionsstatus.

3.5.5 Analysen zur metabolischen Aktivität von Milzzellpopulationen in Abhängigkeit vom TLR4-Expressionsstatus

3.5.5.1 Vergleich der metabolischen Aktivität von Milzzellpopulationen des Parentalstammes C57BL/10Sc in Abhängigkeit vom TLR4-Expressionsstatus

Nach der proliferativen Aktivität wurde im Folgenden die metabolische Aktivität als indirektes Maß der Vitalität der Zellen bestimmt. Zu diesem Zweck wurde den mit unterschiedlichen Stimuli behandelten Milzzellpopulationen eine Lösung von Tetrazoliumsalzen zugesetzt. Die entstehende Farbreaktion wurde im Photometer gemessen und die Ergebnisse als OD-Werte dargestellt.

Die Untersuchungen, deren Ergebnisse in Abb. 24 dargestellt sind, konzentrierten sich auf Analysen zur Vitalität der unfractionierten und der nicht-adhärennten Milzzellpopulationen, da die Vitalität der adhärennten und damit makrophagenangereicherten Zellpopulationen durch eine Stimulation mit verschiedenen Agenzien (LPS, ConA, IL-2) kaum beeinflussbar war.

LPS-induziert eine konzentrationsabhängige signifikante Steigerung der metabolischen Aktivität unfractionierter Milzzellen aus C57BL/10ScSn-Mäusen (TLR4^{+/+}) von einer OD von $0,13 \pm 0,02$ auf eine OD von $0,81 \pm 0,01$ (1000 ng/ml LPS) (Abb. 24 A). TLR4-defiziente unfractionierte Milzzellen der C57BL/10ScCr-Mäuse (TLR4^{-/-}) lassen sich mit LPS nicht stimulieren. ConA als TLR4 unabhängiger Stimulus, induziert in unfractionierten Milzzellen beider Mauslinien bei geringen Konzentrationen (1 µg/ml (TLR4^{-/-}) bzw. 2,5 µg/ml (TLR4^{+/+})) einen Anstieg der metabolischen Aktivität von einer OD von $0,56 \pm 0,01$ auf $0,66 \pm 0,04$ (TLR4^{+/+}) bzw. von $0,56 \pm 0,01$ auf $0,64 \pm 0,01$ (TLR4^{-/-}) (Abb. 24 C). In Gegenwart von hohen ConA Konzentrationen (5 µg/ml) verringert sich die metabolische Aktivität der Zellen (OD TLR4^{+/+}: $0,50 \pm 0,02$; OD TLR4^{-/-}: $0,51 \pm 0,02$).

Die metabolischen Aktivitäten der nicht-adhärennten Milzzellpopulationen beider Mausstämme lassen sich mit Hilfe von LPS kaum erhöhen. Die OD steigt von $0,62 \pm 0,09$ auf $0,71 \pm 0,03$ (1000 ng/ml LPS (TLR4^{+/+} Zellen)) bzw. von $0,70 \pm 0,04$ auf $0,80 \pm 0,01$ (1000 ng/ml LPS (TLR4^{-/-} Zellen)) (Abb. 24 B). Eine Stimulation der nicht-adhärennten Milzzellpopulationen mit ConA führt ebenfalls zu keiner Steigerung der metabolischen Aktivität, allerdings resultiert eine Behandlung mit 5 µg/ml, wie schon bei den unfractionierten Milzzellpopulationen beobachtet (Abb. 24 C), zu einem Rückgang der OD von $0,5 \pm 0,05$ auf $0,44 \pm 0,05$ (ConA TLR4^{+/+}) bzw. von $0,56 \pm 0,03$ auf $0,46 \pm 0,04$ (TLR4^{-/-}) (Abb. 24 D).

Wie aus Abbildung 24 E, F hervorgeht scheint IL-2 kein geeigneter Stimulus für die metabolische Zellaktivität beider untersuchter Zellpopulationen zu sein. Im verwendeten Konzentrationsbereich von 0 - 50 ng/ml IL-2 ist lediglich eine marginale Veränderung in der metabolischen Zellaktivität zu beobachten.

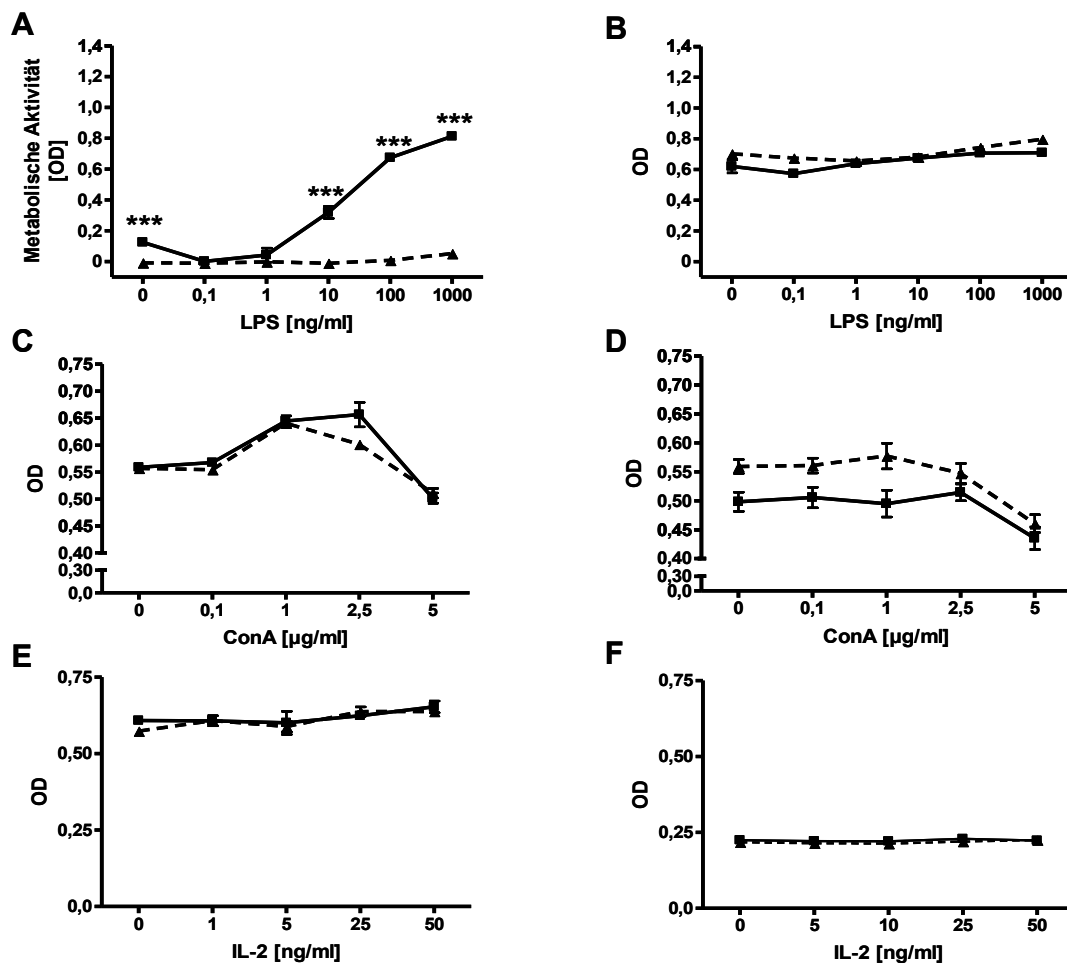


Abb. 24: Metabolische Aktivität verschiedener Milzzellpopulationen TLR4-exprimierender und TLR4-defizienter C57BL/10Sc-Mäuse nach Stimulation mit LPS, ConA oder IL-2. Unfraktionierte (A, C, E) und nicht-adhären Milzzellpopulationen (B, D, F) von C57BL/10ScSn-Mäusen (durchgezogene Linie) und C57BL/10ScCr-Mäusen (unterbrochene Linie) wurden mit steigenden LPS- (A, B), ConA- (C, D) bzw. IL-2-Konzentrationen (E, F) stimuliert. Nach 5 d wurde die metabolische Aktivität mittels kolorimetrischer Tests bestimmt und die Messergebnisse als OD-Werte dargestellt. Die Daten zeigen Mittelwerte $\pm$ SD von drei unabhängigen Analysen; *** $p < 0,001$ im Vergleich zum korrespondierenden Datenpunkt von Zellen mit dem jeweils anderen TLR4-Expressionsstatus.

3.5.5.2 Vergleich der metabolischen Aktivität verschiedener Milzzellpopulationen von TLR4-exprimierenden und TLR4-defizienten NOD-Mäusen

Wie unter 3.5.5.1 dokumentiert, zeigt sich für die metabolische Aktivität unfractionierter Milzzellen der TLR4-exprimierenden C57BL/10ScSn-Maus eine ausgeprägte LPS-Konzentrationsabhängigkeit, welche sich in dieser Form jedoch nicht bei Zellen der NOD-TLR4-Maus wieder findet. Unabhängig vom TLR4-Expressionsstatus zeigt sich sowohl für unfractionierte (Abb. 25 A) als auch für nicht-adhären Milzzellpopulationen dieser Linie (Abb. 25 B) bis zu einer LPS-Konzentration von 100 ng/ml keine Veränderung der metabolischen Aktivität. Erst eine Stimulation mit 1000 ng/ml LPS resultiert in einem Anstieg der metabolischen Aktivität der nicht-adhären Zellen, der sich in einer Erhöhung der OD von

$0,03 \pm 0,01$ auf $0,10 \pm 0,02$ (TLR4^{+/+}) bzw. von $0,01 \pm 0,01$ auf $0,12 \pm 0,04$ (TLR4^{-/-}) darstellt. Die OD TLR4-defizienter unfractionierter Milzzellen lässt sich von $0,02 \pm 0,02$ auf $0,18 \pm 0,04$ steigern. TLR4-exprimierende unfractionierte Milzzellen weisen jedoch bei dieser hohen LPS-Konzentration eine geringere metabolische Aktivität auf. Die OD sinkt von $0,16 \pm 0,08$ auf $0,11 \pm 0,03$.

Der TLR4-unabhängige Stimulus ConA induziert in beiden untersuchten Milzzellpopulationen und beiden TLR4-Genotypen eine weitgehend vergleichbare Veränderung in der metabolischen Aktivität (Abb. 25 C, D). Die OD-Werte aller Populationen steigen mit zunehmender ConA-Konzentration zunächst an. Maximale Werte der unfractionierten Milzzellen liegen bei $0,20 \pm 0,03$ (TLR4^{+/+}) bzw. bei $0,23 \pm 0,05$ (TLR4^{-/-}) (Abb. 25 C); nicht-adhärenente Milzzellen erreichen Werte von $0,18 \pm 0,03$ (TLR4^{+/+}) bzw. $0,14 \pm 0,03$ (TLR4^{-/-}) (Abb. 25 D). Werden die Zellen der verschiedenen Populationen jedoch ConA-Konzentrationen von 5 µg/ml ausgesetzt, sinkt die metabolische Aktivität der unfractionierten Milzzellen auf eine OD von $0,16 \pm 0,04$ (TLR4^{+/+}) bzw. von $0,08 \pm 0,04$ (TLR4^{-/-}) ab. Die Messwerte der nicht-adhärenenten Zellen liegen in Gegenwart dieser Konzentration des Stimulus bei einer OD von $0,13 \pm 0,03$ (TLR4^{+/+}) bzw. von $0,14 \pm 0,02$ (TLR4^{-/-}).

Aufgrund der in den vorangehenden Experimenten gemachten Beobachtungen, dass es sich bei IL-2 um keinen geeigneten Stimulus für die metabolische Zellaktivität handelt (vgl. 3.5.5.1), wurden in dieser experimentellen Reihe und in den anschließenden Experimenten die NOD Milzzellpopulationen nicht mit IL-2 behandelt.

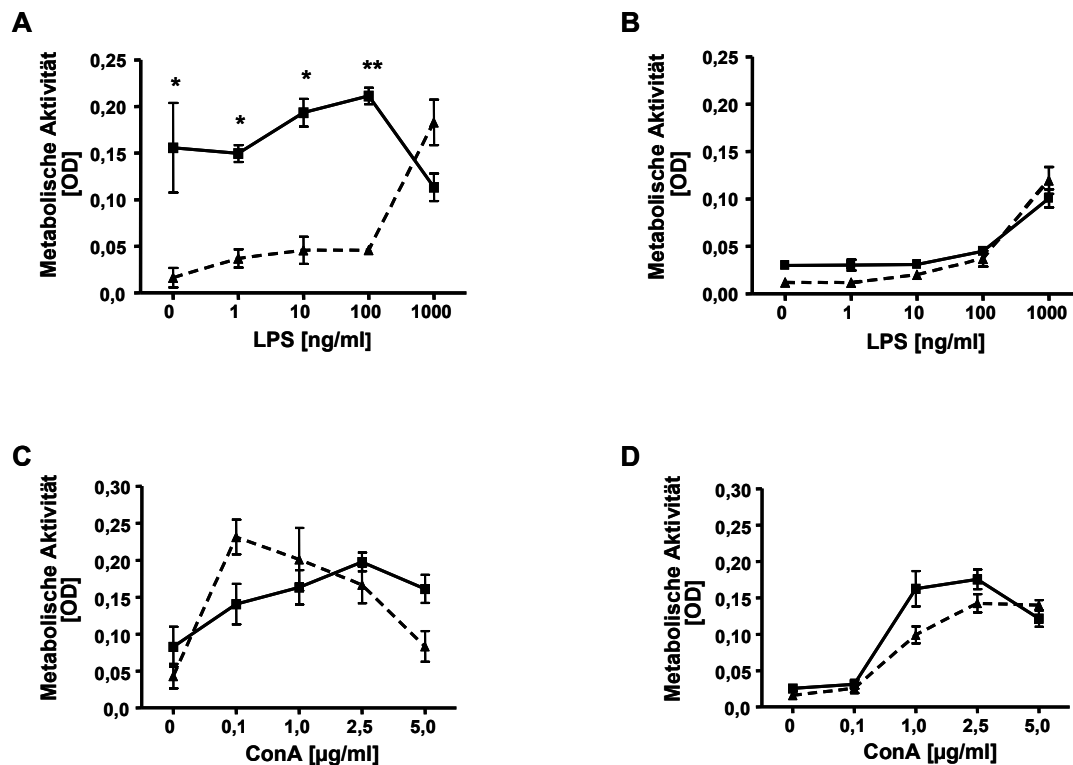


Abb. 25: Metabolische Aktivität verschiedener Milzzellpopulationen TLR4-exprimierender und TLR4-defizienter NOD-Mäuse. Unfraktionierte (A, C) und nicht-adhärente (B, D) Milzzellpopulationen von NOD TLR4^{+/+} (durchgezogene Linie) und NOD TLR4^{-/-} Mäusen (unterbrochene Linie) wurden mit steigenden LPS- (A, B) bzw. ConA-Konzentrationen (C, D) stimuliert. Nach 5 d wurde die metabolische Aktivität mittels kolorimetrischer Tests bestimmt. Die Daten zeigen Mittelwerte $\pm$ SD von drei unabhängigen Analysen; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ im Vergleich zum korrespondierenden Datenpunkt des jeweils anderen TLR4-Expressionsstatus.

3.5.6 Treg – Regulatorzellen der Immunantwort

3.5.6.1 Anreicherung von CD4⁺CD25⁺ Milzzellen

Regulatorische T-Lymphozyten nehmen wichtige Kontrollfunktionen im Immunsystem ein. Fehlen sie oder ist ihre Funktion gestört, kommt es zu einer starken Beeinträchtigung der Selbsttoleranz und Immunregulation. Aktivierte Effektorzellen müssen streng kontrolliert werden, damit ein für den Wirt schädliches Überschießen der Immunantwort bzw. die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen und Allergien verhindert wird.

Aufgrund der beobachteten ausufernden Immunreaktion gegen pankreatische Inseln aus TLR4-defizienten NOD-Mäusen, wurden regulatorische T-Lymphozyten untersucht, um einen möglichen (Treg-bedingten) Regulationsdefekt des Immunsystems in diesen Mäusen zu erkennen.

Aus Milzzellsuspensionen von NOD TLR4^{+/+} und NOD TLR4^{-/-} Mäusen wurden mit Hilfe der MACS-Technik CD4⁺ CD25⁺ Zellen angereichert (Abb. 26). Zunächst wurden aus unfraktionierten Milzzellsuspensionen CD4⁺ Zellen angereichert, die wiederum die Ausgangspopulation zur Anreicherung von CD25⁺ Zellen darstellten. Die Reinheit der

angereicherten $CD4^+ CD25^+$ Zellpopulationen lag bei 96,7 % (NOD TLR4^{+/+}) bzw. bei 96,8 % (NOD TLR4^{-/-}). Da die Milzzellen vor und nach den Anreicherungsschritten identifiziert und gezählt wurden, konnte dokumentiert werden, dass zwischen NOD-Defekt- und Wildtypmäusen kein Unterschied bezüglich der absoluten Zahl und des relativen Anteils von $CD4^+ CD25^+$ Milzzellen vorliegt (Tabelle 7). Der Anteil der $CD4^+$ Zellen an der Gesamtmilzzellpopulation liegt in NOD TLR4^{+/+} Mäusen bei $12,78 \pm 1,69$ %, der Anteil der $CD4^+ CD25^+$ Zellen bei $0,92 \pm 0,46$ %. NOD TLR4^{-/-} Mäuse weisen vergleichbare Anteile von $12,53 \pm 5,69$ % $CD4^+$ Zellen und $0,77 \pm 0,26$ % $CD4^+ CD25^+$ Zellen an der Gesamtmilzzellzahl auf.

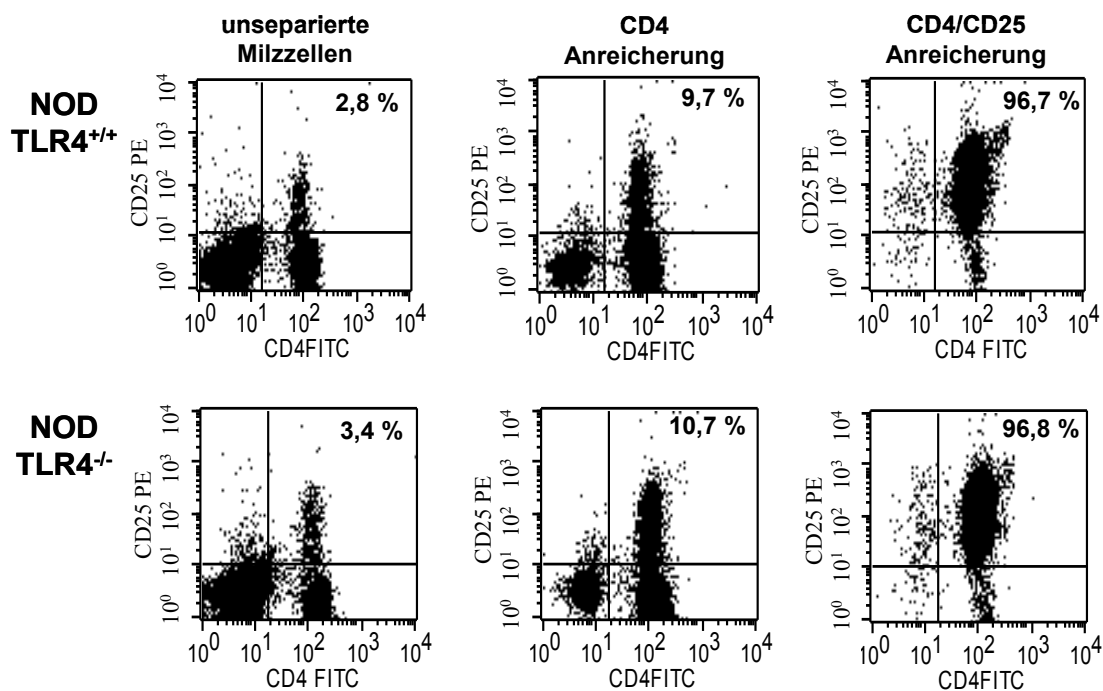


Abb. 26: Anreicherung von $CD4^+CD25^+$ Milzzellen aus NOD TLR4^{+/+} und NOD TLR4^{-/-} Mäusen. Mit Hilfe der MACS-Technik wurden aus unfraktionierten Milzzellsuspensionen zunächst $CD4^+$ Zellen angereichert, die wiederum die Ausgangspopulation zur Anreicherung von $CD25^+$ Zellen darstellten. Die Reinheit der angereicherten $CD4^+ CD25^+$ Zellpopulationen wurde in einem zweidimensionalen Punktdiagramm im Durchflusszytometer untersucht und ist jeweils im oberen rechten Quadranten angegeben.

Tabelle 7: Anteil der CD4⁺, CD4⁺CD25⁺ und CD4⁺CD25⁻ Zellen an den mononukleären Zellen der Milz

Mauslinie	Mononukleäre Milzzellen gesamt [x10 ⁸]	CD4 ⁺ Zellen [%]	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Zellen [%]	CD4 ⁺ CD25 ⁻ Zellen [%]
C57BL/10ScSn	2,11	8,60	0,84	4,01
	±	±	±	±
	0,55	4,82	0,41	1,70
C57BL/10ScCr	1,88	8,58	0,78	3,86
	±	±	±	±
	0,50	2,96	0,03	1,97
NOD TLR4 ^{+/+}	1,32	12,78	0,92	10,30
	±	±	±	±
	0,17	1,69	0,46	1,20
NOD TLR4 ^{-/-}	1,50	12,53	0,77	9,97
	±	±	±	±
	0,44	5,69	0,26	4,30

Die Tabelle zeigt Mittelwerte ± SD aus fünf unabhängigen Experimenten. Die Angaben beziehen sich auf den prozentualen Anteil der jeweiligen Zellpopulation an der Gesamtmilzzellzahl und wurden ermittelt durch Auszählen nach den jeweiligen Anreicherungsschritten während der MACS-Separation.

3.5.6.2 Nachweis der Foxp3-Expression zur Identifikation regulatorischer T-Lymphozyten

Neben der Expression der Oberflächenmarker CD4 und CD25 sind regulatorische T-Lymphozyten durch die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 charakterisiert. Mit Hilfe von FACS-Analysen wurde daher die Expression dieses Markers analysiert. Abbildung 27 zeigt eine repräsentative FACS-Analyse zur Expression von Foxp3 in Milzzellen von C57BL/10ScSn (TLR4^{+/+}; Abb. 27 A), C57BL/10ScCr (TLR4^{-/-}; Abb. 27 B) sowie NOD TLR4^{+/+} (Abb. 27 C) und NOD TLR4^{-/-} (Abb. 27 D) Mäusen. Die Analysen zeigen einen Anteil von 3,0 - 4,8 % Foxp3⁺ CD4⁺ Zellen in den Milzzellen der untersuchten Mäuse. Tabelle 8 zeigt eine Zusammenfassung der FACS-Analysen von jeweils fünf Mäusen beider TLR4-Genotypen des C57BL/10Sc-Parentalstammes bzw. von jeweils drei NOD-Mäusen beider TLR4-Genotypen. Es zeichnet sich ein gewisser Trend zu einem höheren Anteil Foxp3⁺ Zellen in TLR4-exprimierenden Tieren ab. Sowohl TLR4-exprimierende Tiere der C57BL/10ScSn-Linie, als auch NOD TLR4^{+/+} Tiere zeigen leicht, jedoch nicht signifikant, höhere Anteile von Foxp3⁺ CD4⁺ Zellen (3,45 ± 1,44 % (C57BL/10ScSn) bzw. 4,63 ± 1,42 % (NOD TLR4^{+/+})) im Vergleich zu TLR4-defizienten Tieren (3,01 ± 1,16 % (C57BL/10ScCr) bzw. 4,09 ± 1,10 % (NOD TLR4^{-/-})).

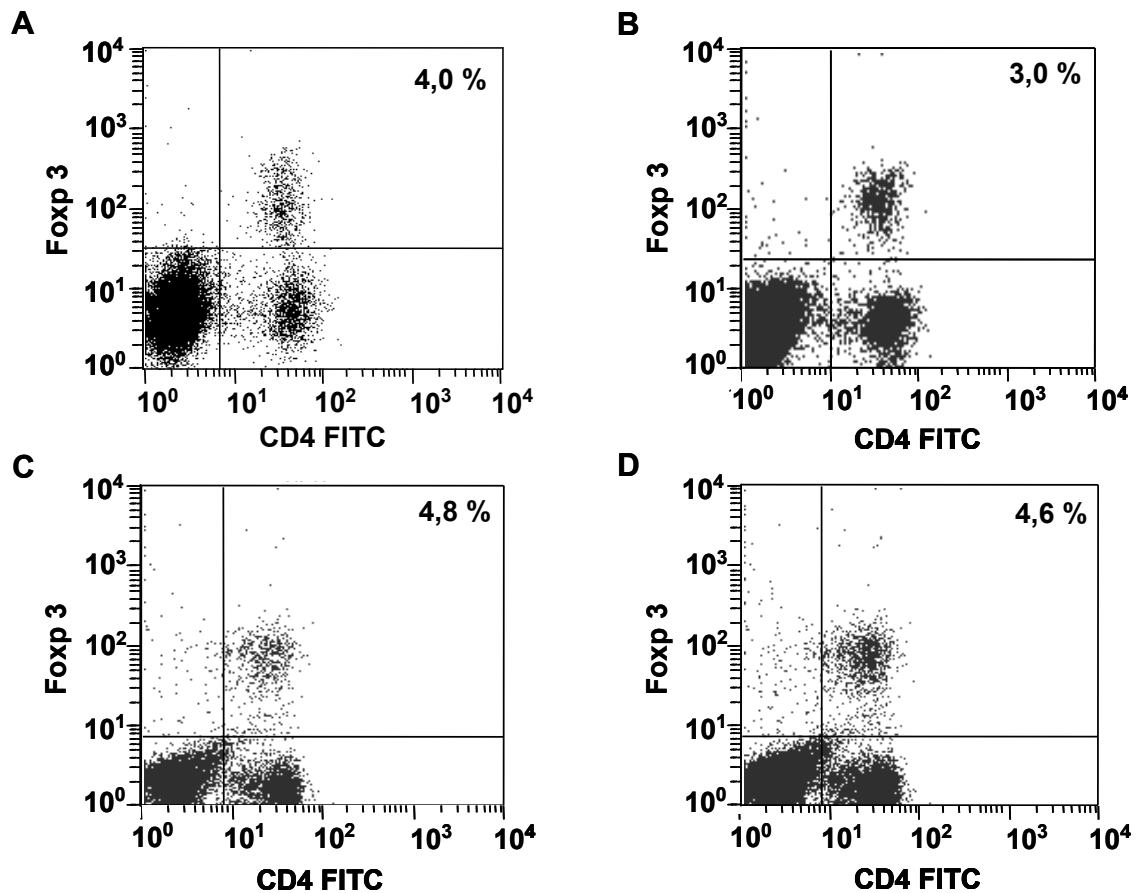


Abb. 27: Foxp3-Expression in Milzzellen von TLR4-exprimierenden und TLR4-defizienten Mäusen. Milzzellen von TLR4 Wildtyp- (A) und Defektmäusen (B) des Parentalstammes C57BL/10Sc und von NOD TLR4^{+/+} (C) und NOD TLR4^{-/-} Mäusen (D) wurden mit monoklonalen PE- (Foxp3) und FITC-markierten (CD4) Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. In den oberen rechten Quadranten sind die prozentualen Anteile Foxp3⁺CD4⁺ Zellen in Bezug auf die unfractionierten Milzzellpopulationen angegeben.

Tabelle 8: Foxp3-Expression von Milzzellen TLR4-exprimierender und TLR4-defizienter Tiere

Mauslinie	Milzzellen Gesamt [x10 ⁸]	Foxp3 ⁺ Zellen [%]	Foxp3 ⁺ CD4 ⁺ Zellen [%]	Mittlere Foxp3- Fluoreszenzintensität (Foxp3 ⁺ CD4 ⁺ Zellen)
C57BL/10ScSn TLR4 ^{+/+}	2,10	5,73	3,45	136,70
	±	±	±	±
	0,50	4,74	1,44	19,98
C57BL/10ScCr TLR4 ^{-/-}	1,93	4,15	3,01	115,48
	±	±	±	±
	0,43	1,86	1,16	9,41
NOD TLR4 ^{+/+}	1,35	5,46	4,63	85,17
	±	±	±	±
	0,24	1,52	1,42	0,91
NOD TLR4 ^{-/-}	1,26	4,64	4,09	87,95
	±	±	±	±
	0,36	0,89	1,10	12,16

FACS-Analysen zur Foxp3- und CD4-Expression in Milzzellen von C57BL/10ScSn-, C57BL/10ScCr- sowie NOD TLR4^{+/+} und NOD TLR4^{-/-} Mäusen. Die Prozentangaben der Foxp3⁺CD4⁺ Zellen wurden in einem zweidimensionalen Punktdiagramm bestimmt und beziehen sich auf den Anteil der Zellen an der Gesamtmilz. Die mittlere Fluoreszenzintensität wurde in einem Histogramm nach Abzug der mittleren Fluoreszenzintensität der Isotypkontrolle bestimmt. In die Analyse eingegangen sind jeweils fünf C57BL/10ScSn- und C57BL/10ScCr-Mäuse, sowie jeweils drei NOD TLR4^{+/+} und NOD TLR4^{-/-} Mäuse. Daten zeigen Mittelwerte ± SD.

3.5.6.3 Metabolische Aktivität der Treg (CD4⁺CD25⁺) und Responderzellen (CD4⁺CD25⁻) in Abhängigkeit vom TLR4-Expressionsstatus

Zur Bestimmung der metabolischen Aktivität der Treg wurden die aufgereinigten CD4⁺CD25⁺ Treg Zellen zunächst fünf Tage steigenden LPS-Konzentrationen (0 - 5 µg/ml) ausgesetzt und anschließend wurde den Kulturen das Tetrazoliumsalz WST-1 zugesetzt. Die photometrische Auswertung (Abb. 28 A) zeigt, auf eine Stimulation mit 5 µg/ml LPS folgend, eine signifikant höhere metabolische Aktivität in Treg aus NOD TLR4^{+/+} Mäusen (OD: 0,109 ± 0,005) als in Treg von NOD TLR4^{-/-} Mäusen (0,069 ± 0,002 OD) (p<0,001). Insgesamt lässt sich die metabolische Aktivität regulatorischer, TLR4-exprimierender T-Lymphozyten konzentrationsabhängig von 0,073 ± 0,006 OD auf 0,127 ± 0,072 OD (1 µg/ml LPS) steigern, wohingegen Treg aus NOD TLR4^{-/-} Mäusen nicht mit LPS stimulierbar sind.

Unstimulierte Responderzellen (CD4⁺CD25⁻) aus TLR4-defizienten Mäusen zeigen mit einer OD von 0,100 ± 0,068 (C57BL/10ScCr) bzw. von 0,008 ± 0,011 (NOD TLR4^{-/-}) eine spontan höhere metabolische Aktivität als die Vergleichspopulationen aus TLR4-exprimierenden Mäusen (0,010 ± 0,005 (C57BL/10ScSn); 0,004 ± 0,005 (NOD TLR4^{+/+})) (Abb. 28 B).

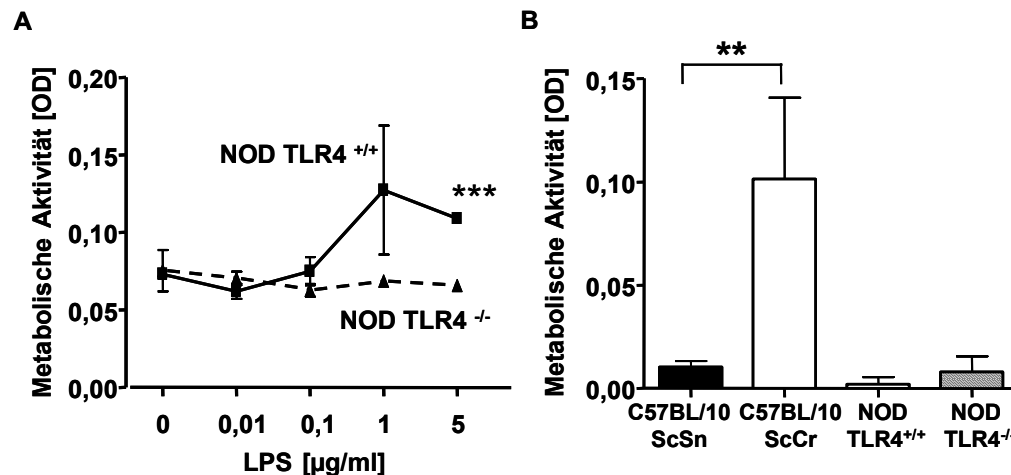


Abb. 28: Metabolische Aktivität von $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ (Treg) und $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ (Responder) Zellen aus den Milzen TLR4-defizienter und TLR4-exprimierender NOD-Mäuse. $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Zellen aus TLR4-defizienten und TLR4-exprimierenden Mäusen wurden mit steigenden LPS-Konzentrationen (0 - 5 $\mu\text{g/ml}$) behandelt (A). Nach 5 d wurde die metabolische Aktivität mittels eines WST-1 Tests bestimmt. Die Daten zeigen Mittelwerte $\pm$ SD von drei unabhängigen Analysen; *** $p < 0,001$ im Vergleich zur metabolischen Aktivität der Treg von TLR4 $^{-/-}$ Mäusen bei einer Stimulation mit 5 $\mu\text{g/ml}$ LPS. (B) zeigt die metabolische Aktivität unstimulierter $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ Zellen aus TLR4-defizienten und TLR4-exprimierenden Mäusen des Parentalstammes C57BL/10Sc und der NOD-TLR4-Linie. Die Daten zeigen Mittelwerte $\pm$ SD von drei unabhängigen Analysen. ** $p < 0,01$ im Vergleich zur metabolischen Aktivität der $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ Zellen aus C57BL/10ScSn-Mäusen.

3.5.6.4 Untersuchungen zur suppressiven Potenz der regulatorischen T-Lymphozyten in Abhängigkeit vom TLR4-Expressionsstatus

Treg haben als regulatorische Zellen des Immunsystems die Fähigkeit, Effektorzellen in ihrer Aktivität zu supprimieren. Um die Auswirkungen des TLR4-Defekts der NOD-Maus auf die suppressive Aktivität der Treg ($\text{CD4}^+\text{CD25}^+$) zu untersuchen, wurden die Treg in Gegenwart von Responderzellen ($\text{CD4}^+\text{CD25}^-$) kultiviert. In drei Ansätzen wurden die beiden Zelltypen in unterschiedlichen Verhältnissen (0:1, 1:1, 8:1; $\text{CD4}^+\text{CD25}^+/\text{CD4}^+\text{CD25}^-$) kultiviert. Als Maß für die Suppressionsaktivität der Treg wurde die metabolische Aktivität der Zellgemische bestimmt. Die metabolische Aktivität $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ TLR4-defizienter Zellen ist mit einer OD von $0,008 \pm 0,011$ höher als die von $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ TLR4-exprimierenden Zellen ($0,002 \pm 0,005$; Abb. 29). Im Mischungsverhältnis 1:1 (Treg:Responder) zeigt sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) in der metabolischen Aktivität zwischen den Zellgemischen mit unterschiedlichem TLR4-Expressionsstatus (OD TLR4 $^{+/+}$: $0,001 \pm 0,001$; OD TLR4 $^{-/-}$: $0,0125 \pm 0,004$). Somit ist im Vergleich zur OD von TLR4-exprimierenden Responderzellen ($0,002 \pm 0,005$), die metabolische Aktivität dieses Mischungsverhältnisses des gleichen TLR4-Expressionsstatus geringer, obwohl die doppelte Zellzahl zur OD von $0,001 \pm 0,001$ beiträgt.

Auch für das Mischungsverhältnis 8:1 bestätigt sich eine signifikant geringere metabolische Aktivität der Zellen aus NOD TLR4 $^{+/+}$ Mäusen ($p < 0,05$). Obwohl sich im Vergleich zum Mischungsverhältnis 0:1 achtmal mehr Zellen im Ansatz befinden, steigt die metabolische

Aktivität lediglich um das 1,625 fache auf eine OD von $0,007 \pm 0,001$ (TLR4^{+/+}) bzw. um das 2,125 fache auf eine OD von $0,017 \pm 0,001$ OD (TLR4^{-/-}) an. Diese Beobachtungen weisen auf eine geringere inhibitorische Kapazität von NOD TLR4^{-/-} im Vergleich zu NOD TLR4^{+/+} Mäusen hin.

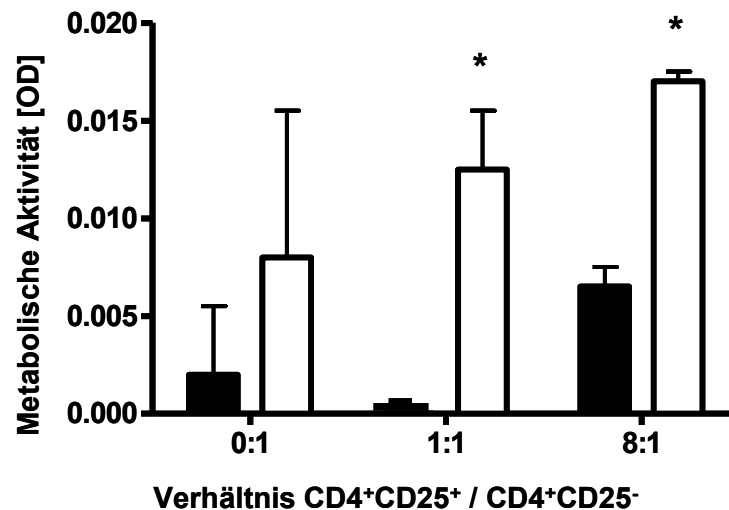


Abb. 29: Abhängigkeit der suppressiven Potenz regulatorischer T-Lymphozyten der NOD-Maus vom TLR4-Expressionsstatus. CD4⁺ CD25⁺ Treg- und CD4⁺ CD25⁻ Responderzellen aus NOD TLR4^{+/+} (schwarze Balken) und NOD TLR4^{-/-} (offene Balken) wurden in verschiedenen Mengenverhältnissen (0:1, 1:1, 8:1) ausgesät. Die metabolische Aktivität dieser Zellgemische wurde anschließend mit Hilfe eines WST-1 Tests bestimmt. *p<0,05 im Vergleich zum korrespondierenden Zellgemisch aus NOD TLR4^{+/+} Mäusen.

3.6 Effekte der TLR4-Defizienz auf das viszerale Fettgewebe

Aufgrund der beobachteten, vermutlich durch Unterschiede in der Entwicklung und/oder Funktion des Fettgewebes bedingten, unterschiedlichen Körpergewichtszunahme weiblicher NOD TLR4^{+/+} und NOD TLR4^{-/-} Mäuse (Abb. 13) (s. 3.3.1), wurden das Fettgewebe sowie Adipozyten in die Untersuchungen zur Auswirkung der TLR4-Defizienz auf die Entwicklung des Diabetes in der NOD-Maus einbezogen. Zur Etablierung von Methoden zur Analyse von Adipozytenfunktionen und -reifungsverhalten wurden Zellen der murinen Adipozytenlinie 3T3-L1 verwendet. Die Übertragung der Verfahren auf primäre, murine Adipozyten erfolgte zunächst an Adipozyten der NZO-Maus. Bei diesem Mausstamm handelt es sich um ein Modell der humanen hereditären Adipositas, aus dem leicht große Adipozytenzahlen isoliert werden können, was für die Etablierung der experimentellen Verfahren von Vorteil war.

Der Untersuchung der Adipozyten vorausgehend, wurde zunächst das intakte viszerale Fettgewebe von NZO-Mäusen sowie von NOD TLR4^{+/+} und NOD TLR4^{-/-} Mäusen analysiert.

3.6.1 Morphologie des viszeralen Fettgewebes der NZO-Maus

Die Verfahren zur morphologischen Analyse von Fettgewebe wurden zunächst am Modell der adipösen NZO-Maus etabliert. Abbildung 30 A zeigt Adipozyten des viszeralen Fettgewebes. Da die Zellen große Lipidvesikel enthalten werden die dünnen Zytoplasmasäume und die Kerne zum Zellrand gedrängt, wo sie lediglich als Verdickungen in den Zellbegrenzungen zu erkennen sind. In der Mitte der Abb. 30 A ist eine der wenigen Kapillaren des Fettgewebes zu erkennen. Aufgrund des geringen Vorkommens von Blutgefäßen, wird dieses Gewebe nur schlecht mit Sauerstoff versorgt. Das Fettgewebe adipöser Individuen schließt vermehrt Immunzellinfiltrate ein, die in Abb. 30 B dargestellt sind. Immunzellen lagern sich zwischen den Adipozyten ein und tragen vermutlich auch zu deren Untergang bei (100).

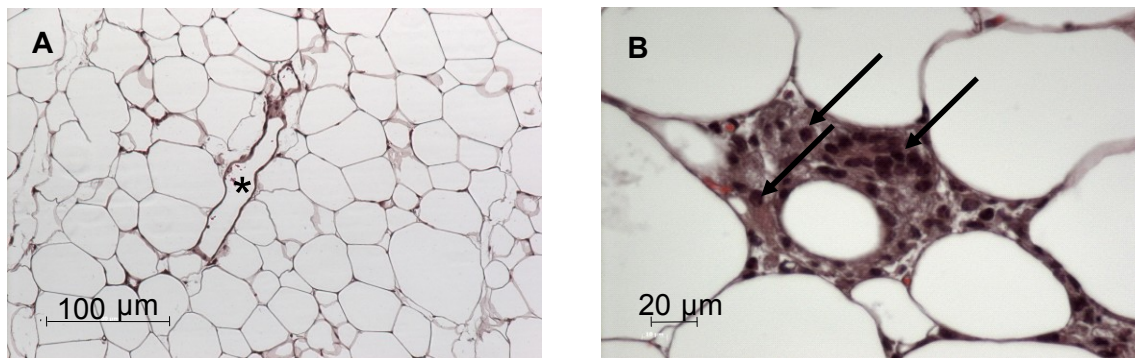


Abb. 30: Viszerale, murine Fettgewebe. Aus dem viszeralen Fettgewebe des adipösen NZO-Mausmodells wurden nach Einbettung in Paraffin Dünnschnitte (5 µm) angefertigt und mit Hämatoxylin gefärbt. Figur A zeigt eine Übersichtsaufnahme bei 400-facher Vergrößerung. Das Lumen einer Kapillare ist mit einem Stern gekennzeichnet; Adipozytenkerne sind mit Pfeilen markiert. Abb. B zeigt in das Fettgewebe infiltrierte Immunzellen (Zellkerne mit Pfeilen markiert).

3.6.2 Vergleich der Morphologie des viszeralen Fettgewebes von NOD-TLR4-Mäusen

Aufgrund der in Abschnitt 3.3.1 belegten beschleunigten Gewichtsentwicklung von TLR4-defizienten Mäusen, wurde die an NZO-Mäusen etablierte Methode zur Fettgewebsanalyse nachfolgend an NOD-TLR4-Mäusen durchgeführt, um zu prüfen, ob sich der TLR4-Defekt in morphologischen Unterschieden des Fettgewebes widerspiegelt.

Abbildung 31 zeigt das viszerale Fettgewebe von NOD TLR4^{+/+} (A) und NOD TLR4^{-/-} Mäusen (B). Die Quantifizierung der Zellgröße mittels morphometrischer Verfahren zeigt, dass Adipozyten von NOD TLR4^{-/-} Mäusen mit einer durchschnittlichen Fläche von $668 \pm 414 \mu\text{m}^2$ signifikant kleiner sind als Adipozyten von NOD TLR4^{+/+} Mäusen ($963 \pm 776 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,01$, Abb. 32 A). Ein Vergleich der Anzahl der Lipidvesikel pro Adipozyt verdeutlicht das Vorherrschen von Zellen mit singulären Lipidvesikeln in beiden untersuchten Mauslinien (Abb. 32 B). Mit 85,9 % liegt der Anteil dieser Zellen in NOD TLR4^{+/+} Mäusen jedoch deutlich über

dem in NOD TLR4^{-/-} Mäusen (60,8 %). Im Vergleich zu NOD TLR4^{+/+} Mäusen weist das Fettgewebe von NOD TLR4^{-/-} Mäusen annähernd dreimal mehr Adipozyten mit 2 - 10 Lipidvesikeln und über viermal mehr Adipozyten mit mehr als 10 Lipidvesikeln auf.

Das Fettgewebe der NOD TLR4^{-/-} Mäuse beinhaltet somit mehr Zellen mit einem durch kleinere Lipidvesikel charakterisierten, präadipozytenähnlichen Phänotyp als das Fettgewebe von NOD TLR4^{+/+} Mäusen.

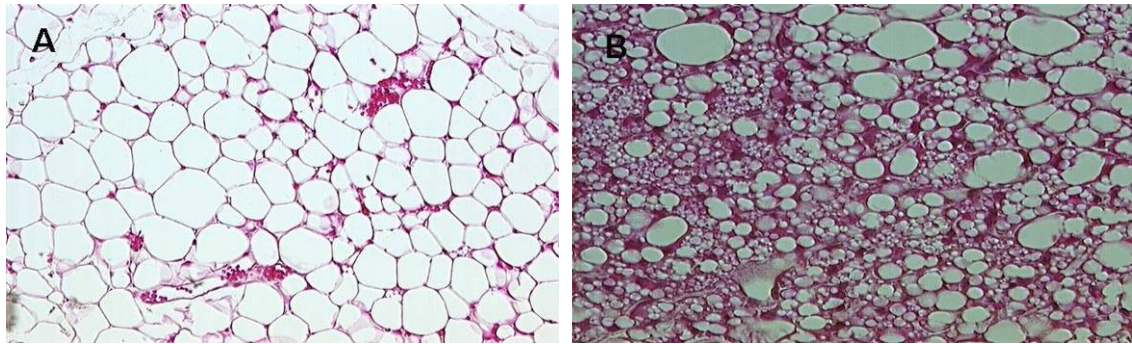


Abb. 31: Viszerales Fettgewebe von NOD TLR4^{+/+} und NOD TLR4^{-/-} Mäusen. Von Paraffin eingebetteten viszeralem Fettgewebsproben von NOD TLR4^{+/+} (A) und NOD TLR4^{-/-} Mäusen (B) wurden Dünnschnitte (5 µm) angefertigt und mit Hämatoxylin gefärbt. Beide Abbildungen zeigen Übersichtsaufnahmen bei 400 facher Vergrößerung.

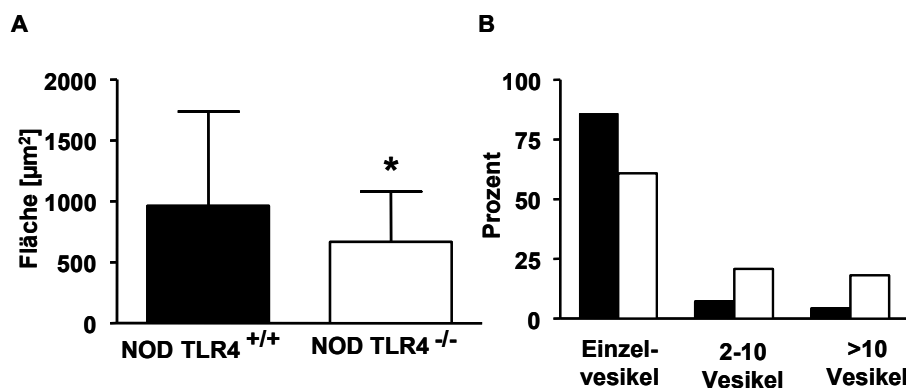


Abb. 32: Adipozytengröße und Anzahl ihrer Lipidvesikel im viszeralem Fettgewebe der NOD TLR4^{+/+} und NOD TLR4^{-/-} Maus. Anhand von Paraffinschnitten des viszeralem Fettgewebes von NOD TLR4^{+/+} und NOD TLR4^{-/-} Mäusen wurden in morphometrischen Analysen die Adipozytenflächen (A) sowie die Anzahl ihrer Lipidvesikel bestimmt (B). Vermessen wurden 870 Adipozyten der NOD TLR4^{+/+} und 532 Adipozyten der TLR4^{-/-} Maus. Die Daten in Abb. A zeigen Mittelwerte + SD, die Daten in Abb. B zeigen eine kumulative Darstellung des Anteils von Zellen mit 1, 2 - 10 oder >10 Lipidvesikeln. *p<0,05 verglichen zu den Daten des anderen TLR4-Expressionsstatus.

3.6.3 Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren aus dem Fettgewebe

In einem ersten experimentellen Ansatz zur potentiellen, induzierbaren Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren aus dem Fettgewebe, wurde ein möglicher zeit- und konzentrationsabhängiger Effekt des bakteriellen Stimulus LPS auf die Freisetzung von TNF-α und IL-6 aus Fettgewebsfragmenten von NZO-Mäusen geprüft.

Zu diesem Zweck wurden jeweils drei Fettgewebsfragmente mit einem Volumen von ca. 1 mm³ der NZO-Maus mit steigenden LPS-Konzentrationen (0 - 1000 ng/ml) stimuliert und die Akkumulation der Zytokine im Überstand der kultivierten Fragmente zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt (Abb. 33). Die TNF- α -Messung erfolgte nach 3, 6 und 24 h, die IL-6-Messung nach 24 und 48 h. Wie in Abbildung 33 ersichtlich, konnte für die Freisetzung der untersuchten Zytokine sowohl eine Konzentrations- als auch eine Zeitabhängigkeit nachgewiesen werden. Bereits nach 3 h ist TNF- α im Überstand der kultivierten Gewebsfragmente nachweisbar (Abb. 33 A). Zu diesem Zeitpunkt werden maximale TNF- α -Spiegel von $56,6 \pm 12,8$ pg/ml durch 100 ng/ml LPS-induziert. Nach 6 h steigt der TNF- α -Spiegel auf $65,8 \pm 3,3$ pg/ml (100 ng/ml LPS) an und fällt nach 24 h bei gleicher LPS-Konzentration auf $42,0 \pm 7,0$ pg/ml ab. Die IL-6-Freisetzung erreicht nach 24 h bei 10 ng/ml LPS annähernd ihr Plateau ($1804,7 \pm 18,6$ pg/ml) und fällt auch nach 48 h nicht ab (Abb. 33 B).

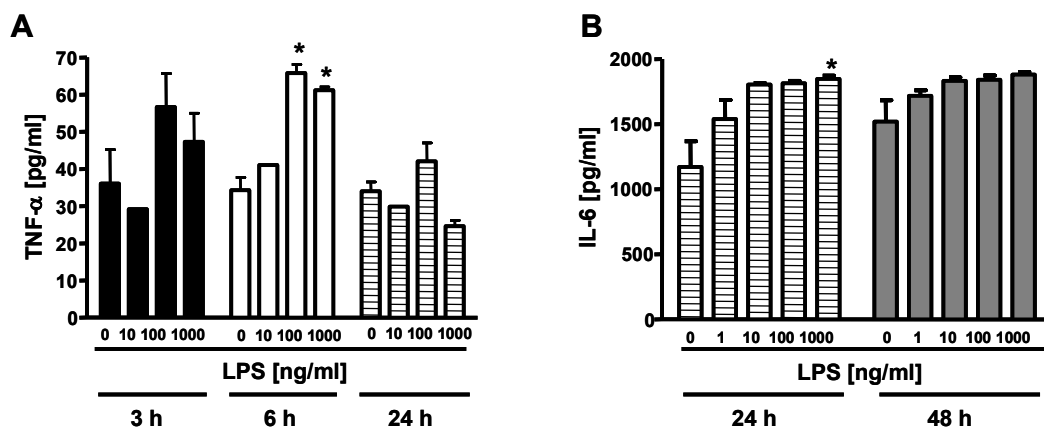


Abb. 33: LPS-induzierte Freisetzung inflammatorischer Mediatoren aus Fragmenten des viszeralen Fettgewebes der NZO-Maus. Viszerales Fettgewebe der NZO-Maus wurde in 1mm³ große Fragmente zerkleinert. Jeweils drei Fragmente wurden in eine Vertiefung einer 48-Loch-Platte gegeben und mit steigenden LPS-Konzentrationen (0 - 1000 ng/ml) stimuliert. Nach jeweils 3, 6 und 24 h (TNF- α) bzw. 24 und 48 h (IL-6) wurden die Konzentrationen der Zytokine in den Kulturüberständen bestimmt. Die Daten zeigen Mittelwerte + SD aus drei unabhängigen Analysen. *p<0,05 im Vergleich zur unbehandelten Probe.

3.7 Effekte von TLR4 auf Adipozyten des viszeralen Fettgewebes

3.7.1 Reinheitsprüfung von primären Adipozytenpopulationen der Maus

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse zur Prüfung des Reinheits- und Reifegrades der Adipozytenpopulationen sowie zur Effizienz des angewendeten Differenzierungsprotokolls beschrieben. Die Verfahren wurden an Zellen der Linie 3T3-L1 etabliert und anschließend auf primäre Fettzellen der Maus übertragen. Exemplarisch wird daher jeweils eine repräsentative Untersuchung an 3T3-L1-Zellen und eine an primären Zellen der NZO-Maus vorgestellt.

Wie unter 3.6.3 dargelegt kann Fettgewebe mit Hilfe von Stimuli wie LPS zur Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren angeregt werden. In einem nächsten Schritt wurde untersucht, welche Differenzierungsstadien der Adipozyten zur Freisetzung dieser Mediatoren

beitragen. Aus diesem Grund wurden Adipozyten verschiedener Reifestadien aus dem Fettgewebe von NZO-Mäusen präpariert und analysiert. Die isolierten, primären, murinen Adipozyten wurden zunächst auf ihre Reinheit hin untersucht. Da das Fettgewebe besonders bei adipösen Individuen von Makrophagen infiltriert ist und dieser Zelltyp ein zu Adipozyten vergleichbares Muster inflammatorischer Mediatoren sezerniert, ist ein Ausschluss von Makrophagen von besonderer Relevanz. Zur Prüfung einer Makrophagenkontamination diente der makrophagenspezifische Marker CD11b. FACS-Analysen mit APC-markierten Anti-CD11b-Antikörpern belegen die Abwesenheit des Makrophagenmarkers in über 99 % der Zellen (Abb. 34 B). Auch die Linie 3T3-L1 zeigt, wie zu erwarten, ein negatives Ergebnis für eine Makrophagenkontamination (Abb. 34 A). Als Kontrolle dienten Makrophagen der murinen Linie J774.A1, die zu über 99 % CD11b exprimieren (Abb. 34 C).

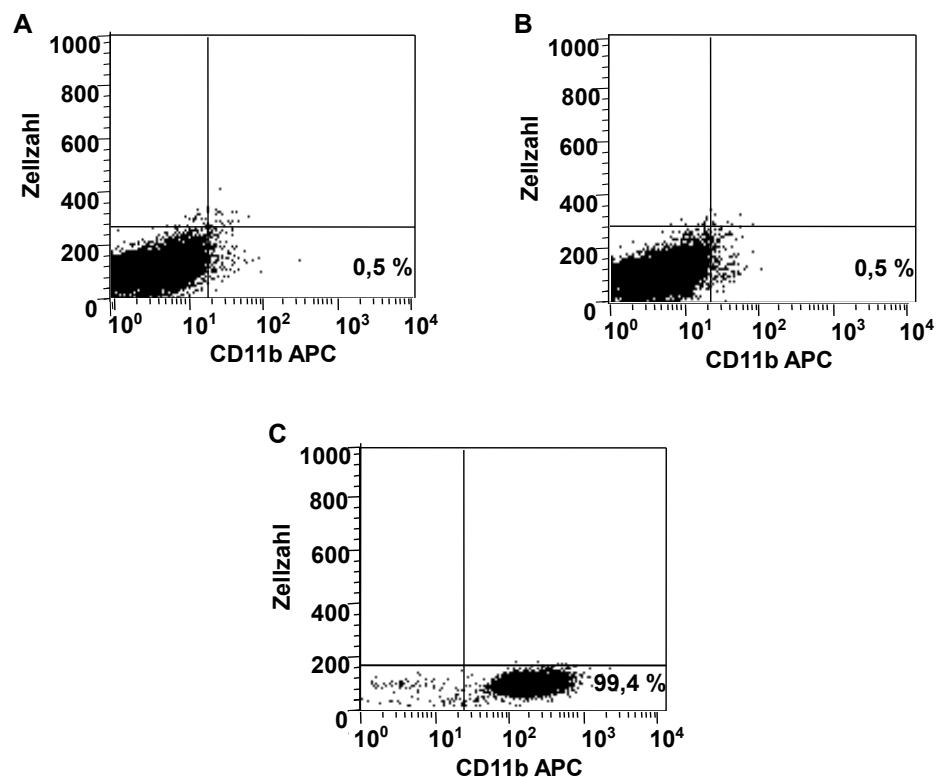


Abb. 34: FACS-Analyse zur Prüfung der Reinheit von Adipozytenpopulationen der NZO-Maus. Adipozyten der Linie 3T3-L1 (A) und primäre Adipozyten der NZO-Maus (B) wurden mit einem APC-markierten Anti-CD11b-Antikörper markiert und im Durchflusszytometer analysiert. Als CD11b-exprimierende Kontrollpopulation dienten Makrophagen der Linie J774.A1 (C). Die Prozentangaben im unteren rechten Quadranten beziehen sich auf den Anteil der CD11b-exprimierenden Zellen an der Gesamtpopulation.

3.7.2 Phänotypische Charakterisierung der Adipozyten

3.7.2.1 Bestimmung des Differenzierungsgrades von Adipozyten

3.7.2.1.1 Morphologie und Fettgehalt von Adipozyten

Alle in den Experimenten eingesetzten Fettzellpopulationen wurden bezüglich ihres Differenzierungsgrades analysiert. Da sich Präadipozyten und reife Adipozyten hinsichtlich ihrer Morphologie unterscheiden, kann diese als ein Kriterium zur Bestimmung des Differenzierungsgrades herangezogen werden. Präadipozyten sind lang gestreckte, fibroblastenähnliche Zellen, die wenige bis viele einzelne Lipidvesikel beinhalten. Reife Adipozyten haben eine kugelige, runde Gestalt. Ihr Zellkörper ist nahezu vollständig mit einem einzigen Lipidvesikel gefüllt, sodass der Zellkern in die Peripherie gedrängt wird und als deutliche Vorwölbung im Lichtmikroskop zu erkennen ist (Abb. 35). In vitro gereifte Adipozyten erreichen nur annähernd die Morphologie nativer Adipozyten (Abb. 36). Während des Differenzierungsprozesses kugeln sie sich zunehmend ab, erlangen allerdings nicht die gleiche kreisrunde Gestalt der nativen Zellen. Auch fließen in den meisten Fällen die einzelnen Fetttropfchen nicht zu einem singulären großen Lipidvesikel zusammen. Aufnahmen des viszeralen Fettgewebes zeigen, dass Adipozyten im nativen Gewebeverband keine runde Gestalt aufweisen (Abb. 30).

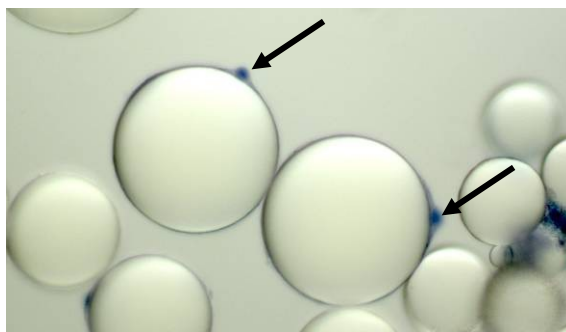


Abb. 35: Primäre, reife Adipozyten der NZO-Maus. Lichtmikroskopische Aufnahme (400 fache Vergrößerung) frisch isolierter, kultivierter Adipozyten aus dem viszeralen Fettdepot der NZO-Maus. Pfeile markieren die Zellkerne der Adipozyten.

Zur Verdeutlichung der morphologischen Unterschiede zur leichteren Bestimmung des Differenzierungsgrades der Adipozyten wurden sowohl Zellen der 3T3-L1 Linie als auch primäre Zellen mit dem lipidspezifischen Farbstoff Oil-Red-O gefärbt. Zellkerne wurden zusätzlich mit Hämalaun gefärbt.

Native, in vivo gereifte Adipozyten können keiner Oil-Red-O-Färbung unterzogen werden, da sie aufgrund ihres prall gefüllten Zellkörpers und ihres lediglich noch dünn ausgebildeten Zytoplasmasaumes während des Färbevorgangs leicht platzen (vgl. Abb. 35).

Zur Etablierung der Färbemethode wurden zunächst Zellen der Linie 3T3-L1 gefärbt (Abb. 36). Unreife Präadipozyten der Linie zeigen zunächst keine Lipidakkumulation, nach

abgeschlossener Differenzierungsphase jedoch sind deutlich anfärbbare Lipidvesikel zu erkennen. Präadipozyten der NZO-Maus zeigen eine geringe Anzahl von Fetttropfchen, die jedoch während der Differenzierung stark zunimmt. Nach abgeschlossener Differenzierungsphase weisen >99,2 % der Zellen Fettakkumulationen auf, was neben der CD11b FACS-Analyse (vgl. 3.7.1) als ein weiterer Beleg für die Reinheit der Adipozytenpopulation gewertet werden kann. Neben Zellen des adipösen Mausmodells NZO wurden auch Prä- und reife Adipozyten einer nicht-adipösen Mauslinie (C57BL/10ScSn) mit Hilfe des Oil-Red-O-Farbstoffes angefärbt. Exemplarisch wird in Abbildung 36 jeweils eine repräsentative Färbung dargestellt.

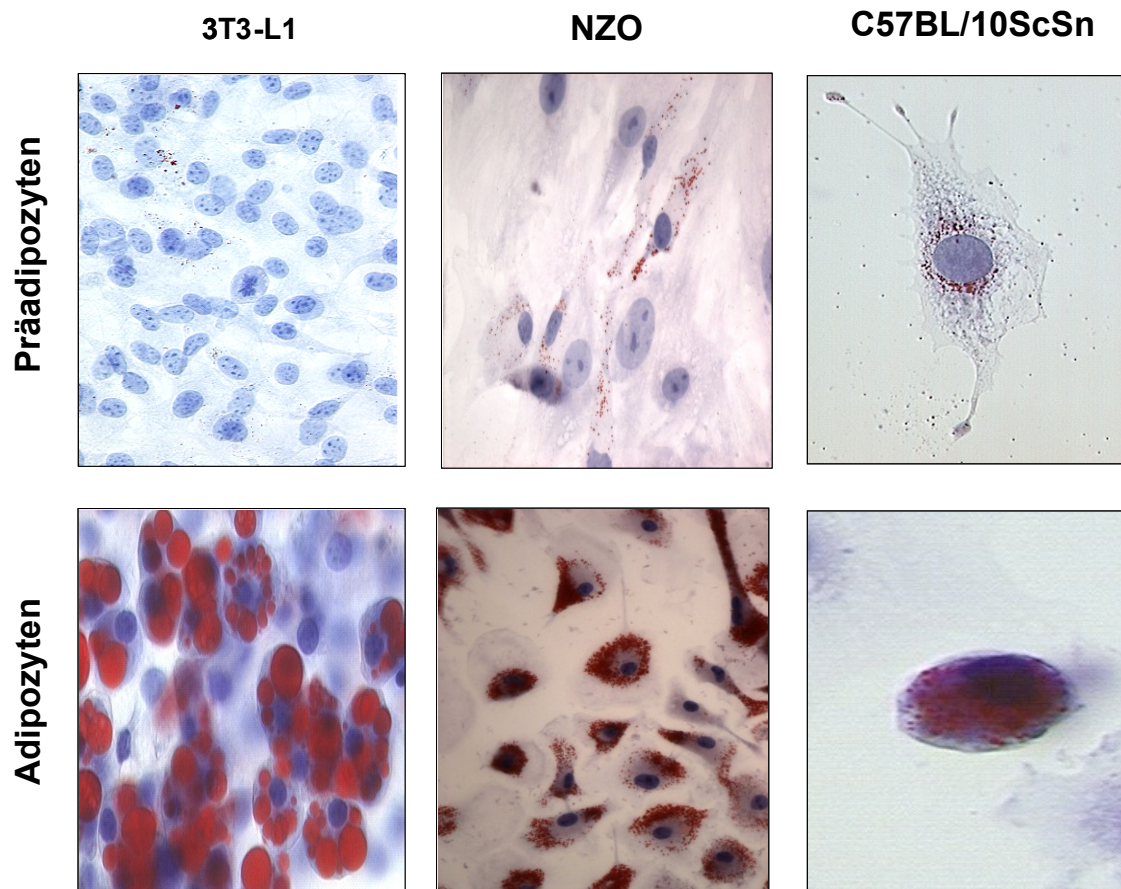


Abb. 36: Vergleich der Lipidakkumulation von Prä- und reifen Adipozyten. Beide Differenzierungsstadien verschiedener Adipozytenpopulationen wurden mit dem lipidspezifischen Farbstoff Oil-Red-O gefärbt. Die Kernfärbung erfolgte mit Hämalaun. Die obere linke Übersichtsaufnahme zeigt Präadipozyten der Linie 3T3-L1 bei 200 facher Vergrößerung; die untere linke Übersichtsaufnahme, reife Adipozyten der Linie 3T3-L1 bei 400 facher Vergrößerung. Die obere und untere Aufnahme in der Mitte zeigen Prä- bzw. reife Adipozyten der NZO Maus bei 400 facher Vergrößerung. Die beiden rechten Aufnahmen zeigen jeweils einen einzelnen Prä- bzw. reifen Adipozyten der C57BL/10ScSn-Maus bei 1000 facher Vergrößerung. Die vermehrte Lipidakkumulation in Adipozyten (untere Reihe) im Vergleich zu Präadipozyten (obere Reihe) ist deutlich zu erkennen.

3.7.2.1.2 Expression der Adipozyten-Reifungsmarker PPAR γ und Pref-1

Neben morphologischen Untersuchungen ist der Nachweis von Reifungsmarkern ein weiteres wichtiges Kriterium zur Bestimmung des Differenzierungsgrades der Fettzellen. Daher wurde im Folgenden das Expressionsniveau der beiden prominenten Reifungsmarker PPAR γ und Pref-1 bestimmt. PPAR γ reguliert als Transkriptionsfaktor die Expression von Genen, die an der Adipogenese beteiligt sind; das Transmembranprotein Pref-1 dagegen wirkt als Inhibitor der Differenzierung.

Präadipozyten sind charakterisiert durch ein geringes Expressionsniveau von PPAR γ und eine hohe Pref-1-Expression. Reife Adipozyten dagegen zeigen nur noch eine geringe Pref-1-Expression aber eine stärkere PPAR γ -Expression (97). Western-Blot Analysen von 3T3-L1-Präadipozyten zeigen kaum detektierbare Mengen des PPAR γ -Proteins (Abb. 37 A). Die Anwendung des neun-tägigen Differenzierungsprotokolls (vgl. 2.2.6.1) führt jedoch zu einem deutlichen Anstieg der Proteinmenge als Beleg für einen durchlaufenen Differenzierungsprozess. Dieses Ergebnis wird durch FACS-Analysen zur Pref-1-Expression (Abb. 37 B) bekräftigt, die eine Pref-1-Expression in über 90 % der 3T3-L1-Präadipozyten zeigen. Nach abgeschlossener Differenzierungsphase ist Pref-1 lediglich noch in 33 % der Zellen nachweisbar. Die Protein-Expressionsanalysen bestätigen somit die Effizienz des angewendeten Differenzierungsprotokolls.

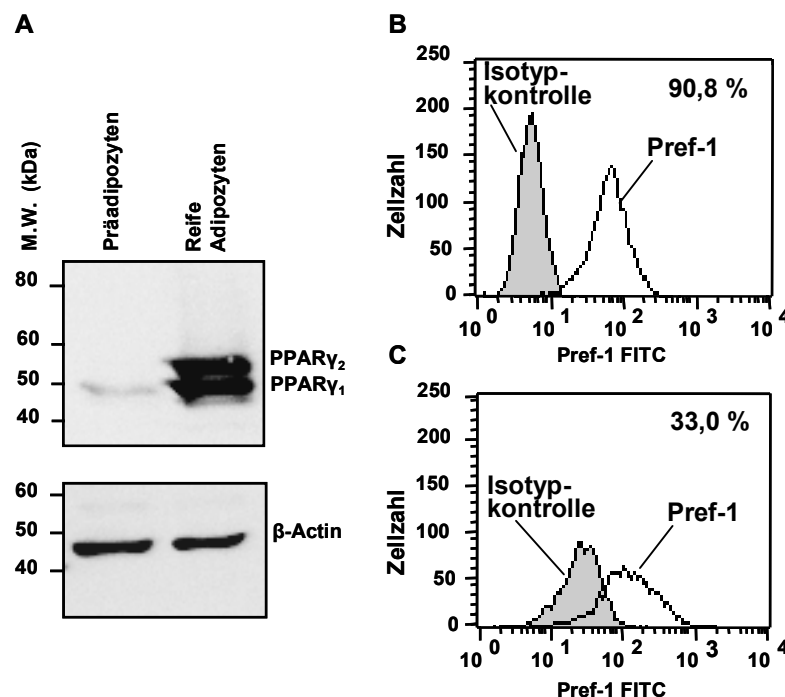


Abb. 37: Expression von Reifungsmarkern in 3T3-L1-Adipozyten. Präadipozyten wurden in vitro entsprechend dem Differenzierungsprotokoll (vgl. 2.2.6.1) ausdifferenziert. Von unreifen Präadipozyten und reifen Adipozyten wurden Zelllysate hergestellt und die Stärke der PPAR γ -Expression im Western-Blot bestimmt (A). Als Referenz diente die Expression von β -Actin. Zur Untersuchung der Pref-1-Expression in beiden Differenzierungsstadien (Präadipozyten (B), Adipozyten (C)) wurden FACS-Analysen durchgeführt. Die Fluoreszenzintensität wurde gegen die Zellzahl aufgetragen. Die graue Fläche entspricht dem Signal der Isotypkontrolle, die schwarze Linie zeigt das Fluoreszenzsignal des FITC-markierten, gegen Pref-1 gerichteten Antikörpers. Die angegebene Prozentzahl Pref-1-positiver Zellen wurde anhand der mittleren Fluoreszenzintensität der Isotypkontrolle und der Pref-1-markierten Probe berechnet.

Um die Wirksamkeit des angewendeten Differenzierungsprotokolls auch an Primärzellen zu verifizieren, wurden FACS-Analysen an Präadipozyten (Abb. 38 A), in vitro ausdifferenzierten (Abb. 38 B) und frisch isolierten, reifen Adipozyten (Abb. 38 C) der NZO-Maus durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Pref-1-Expression (76,7 %) der Adipozyten während des Differenzierungsprozesses auf ein annähernd vergleichbar geringes Niveau (27,5 %) wie bei in situ gereiften Adipozyten (12,8 %) reduziert.

Der prozentuale Rückgang Pref-1-exprimierender, primärer Zellen nach abgeschlossener Differenzierungsphase stimmt weitgehend mit dem der 3T3-L1-Zellen (Abb. 37 C) überein. Alle in den nachfolgenden Experimenten eingesetzten Adipozyten wurden im Folgenden dieser Expressionsanalyse zur Verifizierung ihres Differenzierungsgrades unterzogen. Auf weitere Darstellung der einzelnen FACS-Auswertungen wird im Folgenden verzichtet.

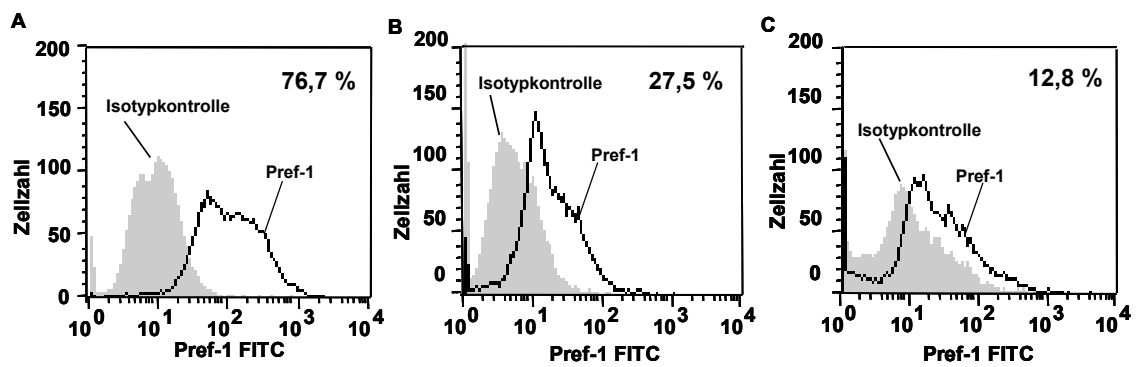


Abb. 38: FACS-Analysen zur Pref-1-Expression primärer Adipozyten in verschiedenen Differenzierungsstadien. Primäre, kultivierte Präadipozyten (A), in vitro differenzierte, primäre Adipozyten (B), sowie frisch isolierte, reife Adipozyten (C) der NZO-Maus wurden mit einem FITC markierten, gegen Pref-1 gerichteten Antikörper bzw. der entsprechenden Isotypkontrolle markiert. Die Histogramme zeigen die gegen die Zellzahl aufgetragene Fluoreszenzintensität der Zellen. Die graue Fläche entspricht dem Signal der Isotypkontrolle, die schwarze Linie zeigt das Fluoreszenzsignal des FITC-markierten gegen Pref-1 gerichteten Antikörpers. Die jeweils oben rechts angegebene Prozentzahl Pref-1-positiver Zellen wurde anhand der mittleren Fluoreszenzintensität der Isotypkontrolle und der Pref-1-markierten Probe berechnet.

3.7.2.1.3 Nachweis der TLR4-Expression verschiedener Reifungsstadien von Adipozyten

Die Befunde der beschleunigten Diabetesentwicklung und des erhöhten Körpergewichts TLR4-defizienter NOD-Mäuse, legen die Vermutung nahe, dass das Fettgewebe dieser Tiere neben den beschriebenen morphologischen Veränderungen auch funktionelle Veränderungen aufweist. Neuere Studien zeigen, dass das Fettgewebe adipöser Individuen von Immunzellen wie Makrophagen infiltriert ist, die für eine vom Fettgewebe ausgehende, chronische, subklinische Inflammation verantwortlich sind (55, 100, 101, 102). Die frühere Diabetesmanifestation der schwereren NOD TLR4^{-/-} Mäuse könnte daher möglicherweise auf ein erhöhtes Entzündungsgeschehen durch die vergrößerte Fettgewebssmasse dieser Mäuse

zurückzuführen sein. Um dieser Vermutung nachzugehen wurde zunächst untersucht, ob Adipozyten, die nicht primär den Immunzellen zugeordnet werden, TLR4 auf ihrer Oberfläche exprimieren.

FACS-Analysen zur TLR4-Expression belegen, dass Adipozyten unabhängig von ihrem Differenzierungsstadium das TLR4-Protein schwach exprimieren (Abb. 39). Eine TLR4-Expression ist sowohl bei Zellen der Linie 3T3-L1 (Abb. 39 A, B) als auch bei primären, murinen Adipozyten (Abb. 39 C, D) nachweisbar.

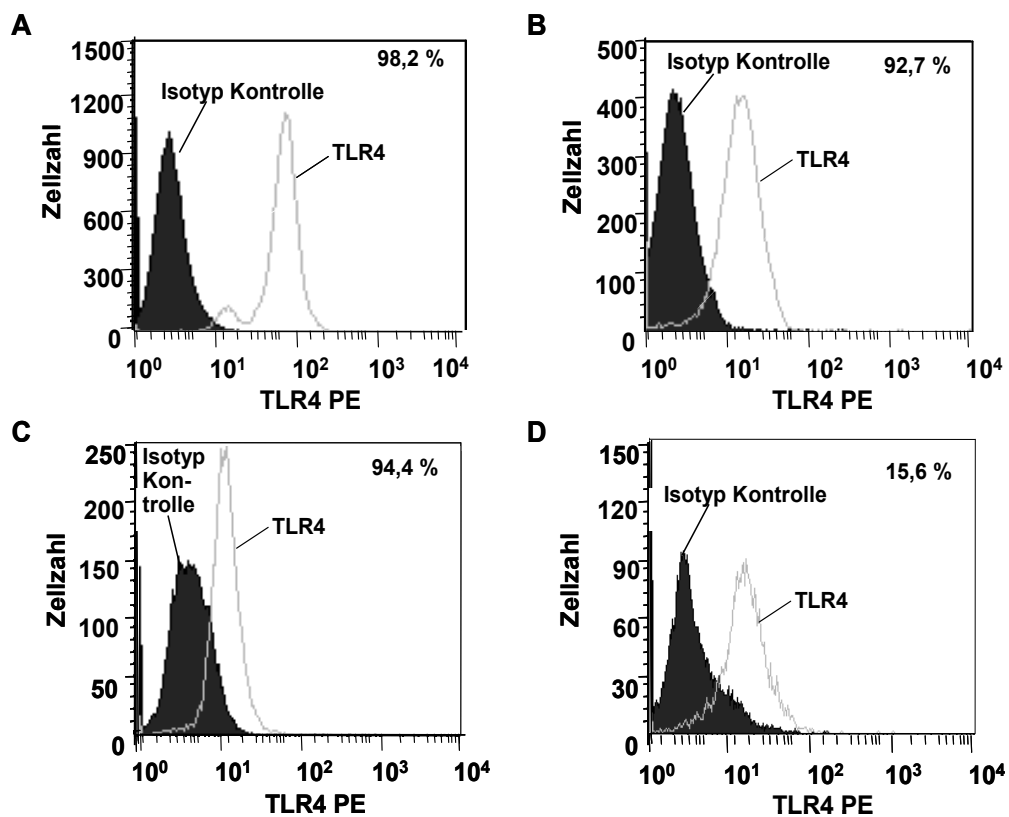


Abb. 39: FACS-Analysen zur TLR4-Expression von Adipozyten. Präadipozyten der Linie 3T3-L1 (A) und primäre Präadipozyten der NZO-Maus (C) sowie ausdifferenzierte Adipozyten (3T3-L1 (B), NZO (D)) wurden mit einem PE-markierten, gegen das TLR4-Protein gerichteten Antikörper markiert und im Durchflusszytometer analysiert. In den dargestellten Histogrammen wurde die Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl aufgetragen. Die schwarze Fläche entspricht dem Signal der Isotypkontrolle, die graue Linie zeigt das Fluoreszenzsignal der PE-markierten TLR4-positiven Zellen. Die angegebene Prozentzahl TLR4-positiver Zellen wurde anhand der mittleren Fluoreszenzintensität der Isotypkontrolle und der TLR4-markierten Probe berechnet.

3.7.3 Charakterisierung der TLR4-Abhängigkeit der Adipozytenfunktionen

3.7.3.1 Kinetik der TLR4-abhängigen Freisetzung inflammatorischer Mediatoren aus Adipozyten

Nachdem die TLR4-Expression von Adipozyten nachgewiesen werden konnte, wurde im Folgenden die Stimulierbarkeit der Zellen durch TLR4-Liganden analysiert. Als klassischer TLR4-Ligand wurde, wie auch schon in den vorangegangenen Experimenten, LPS eingesetzt. Da jedoch LPS als exogener Ligand normalerweise im Fettgewebe und auch anderen Körpergeweben nicht in hohen Konzentrationen vorliegt, wird an dieser Stelle exemplarisch zusätzlich ein endogener TLR4-Ligand, das Hitzeschockprotein 60 (Hsp60) (66) eingesetzt.

In einem Vorexperiment stellte sich heraus, dass zwar im intakten Fettgewebe eine TNF- α -Freisetzung durch LPS-Exposition induziert werden kann (vgl. 3.6.3), dass jedoch aufgereinigte, murine Adipozyten kein TNF- α sezernieren (Daten nicht gezeigt). Dieser Befund stimmt mit Literaturdaten überein, die postulieren, dass eine beobachtete TNF- α -Freisetzung von Adipozytenpräparationen auf eine Kontamination der Zellpopulation mit Makrophagen zurückzuführen ist (103). Aus diesem Grund wird im Folgenden die Bestimmung der TNF- α -Bildung nicht in die Untersuchungen eingeschlossen.

3.7.3.1.1 Kinetik der TLR4-abhängigen Freisetzung inflammatorischer Mediatoren von 3T3-L1-Prädipozyten

Untersuchungen zur Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Mediatorenfreisetzung von Adipozyten wurden an der Linie 3T3-L1 durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden Prädipozyten mit verschiedenen Konzentrationen der Stimuli LPS und Hsp60 behandelt und in einer Zeitreihe mit den Zeitpunkten 0, 3, 6, 24, 48 und 72 h die Akkumulation der inflammatorischen Mediatoren IL-6, KC und MCP-1 in den Überständen der Zellen bestimmt (Abb. 40). LPS induziert eine signifikante Freisetzung aller untersuchter Mediatoren bereits nach 3 - 6 h. Höchste Freisetzungsraten von $1,37 \pm 0,17$ ng/ml IL-6 (Abb. 40 A), $42,85 \pm 0,41$ ng/ml KC (Abb. 40 B) und $36,21 \pm 2,63$ ng/ml MCP-1 (Abb. 40 C) werden durch 1000 ng/ml LPS nach 24 - 48 h erzielt. Hsp60 (20 μ g/ml) induziert Höchstwerte von $0,46 \pm 0,04$ ng/ml IL-6 (Abb. 40 D), $41,46 \pm 3,72$ ng/ml KC (Abb. E) und $64,61 \pm 7,24$ ng/ml MCP-1 (Abb. 40 F).

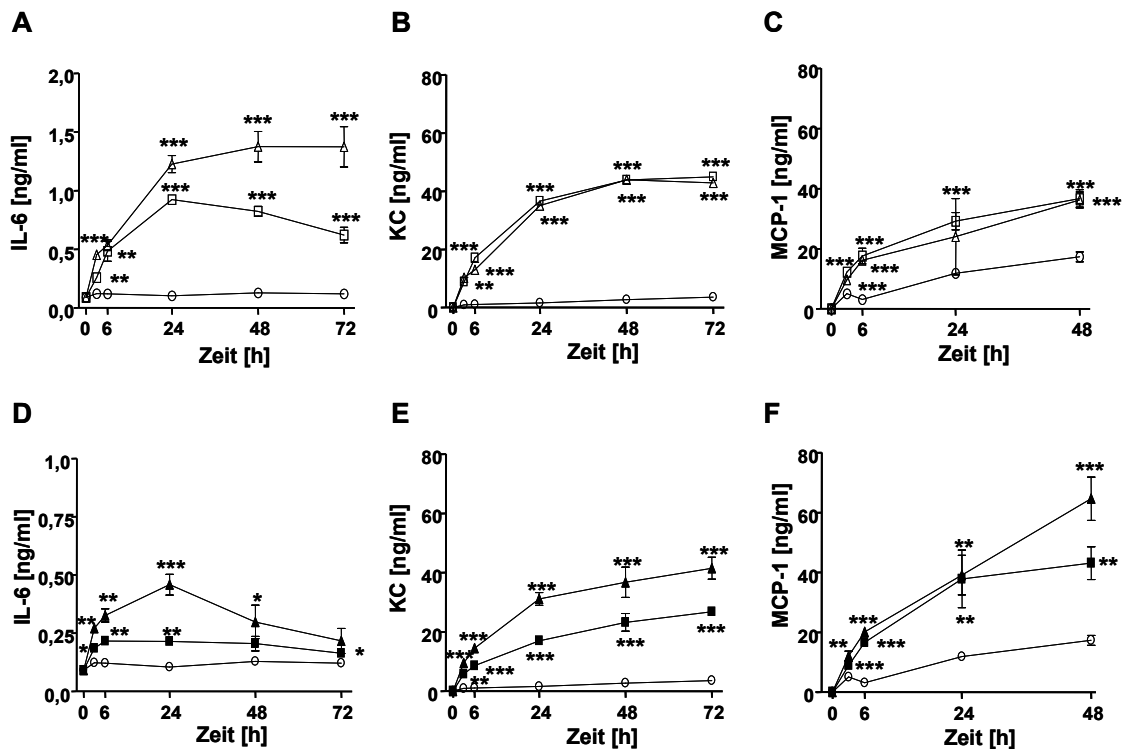


Abb. 40: Kinetik der LPS- bzw. Hsp60-induzierten Freisetzung inflammatorischer Mediatoren durch Präadipozyten. Präadipozyten der Linie 3T3-L1 wurden in Abwesenheit (offene Kreise) oder Anwesenheit von 10 ng/ml (offene Quadrate) oder 1000 ng/ml (offene Dreiecke) LPS (A - C) bzw. 10 µg/ml (schwarze Quadrate) oder 20 µg/ml (schwarze Dreiecke) Hsp60 (D - F) kultiviert. Die Konzentrationen von IL-6 (A, D), KC (B, E) und MCP-1 (C, F) wurden im Kulturüberstand zu verschiedenen Zeitpunkten mit Hilfe des ELISA-Verfahrens bestimmt. Die Daten zeigen Mittelwerte $\pm$ SD von drei unabhängigen Bestimmungen. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ im Vergleich zum korrespondierenden Datenpunkt der jeweiligen Mediumkontrolle.

3.7.3.1.2 Kinetik der TLR4-abhängigen Freisetzung inflammatorischer Mediatoren von 3T3-L1-Adipozyten

Die LPS-induzierte Freisetzung inflammatorischer Mediatoren durch reife Adipozyten der 3T3-L1-Linie steigt zunächst für alle untersuchten Mediatoren (IL-6, KC und MCP-1) bis 24 h nach Beginn der Stimulation schnell an und nimmt im weiteren zeitlichen Verlauf dann nur noch gering zu oder fällt wieder ab (Abb. 41). Maximale Konzentrationen von $2,55 \pm 0,10$ ng/ml IL-6 (Abb. 41 A), $53,17 \pm 1,68$ ng/ml KC (Abb. 41 B) und $84,40 \pm 17,53$ ng/ml MCP-1 (Abb. 41 C) wurden 24 - 48 h nach LPS-Gabe mit 10 oder 1000 ng/ml erreicht. Wie schon bei Präadipozyten beobachtet, induziert auch Hsp60 die Zytokin- und Chemokinsekretion. Bereits 3 h nach Zugabe von 20 µg/ml Hsp60 sezernieren reife Adipozyten signifikante Konzentrationen von $1,41 \pm 0,42$ ng/ml an IL-6 (Abb. 41 D), von $14,00 \pm 2,71$ ng/ml an KC (Abb. 41 E) und von $24,33 \pm 3,30$ ng/ml an MCP-1 (Abb. 41 F) ($p < 0,01$). Diese Konzentrationen steigen nach 24 - 48 h auf $2,21 \pm 0,20$ ng/ml IL-6, $51,30 \pm 7,65$ ng/ml KC und $109,98 \pm 17,21$ ng/ml MCP-1 an.

Zusammengenommen identifizieren diese, zunächst an Zellen der Linie 3T3-L1 gewonnenen Resultate, Hsp60 neben LPS als potenten Induktor der Freisetzung inflammatorischer Mediatoren durch unreife Prä- sowie durch reife Adipozyten.

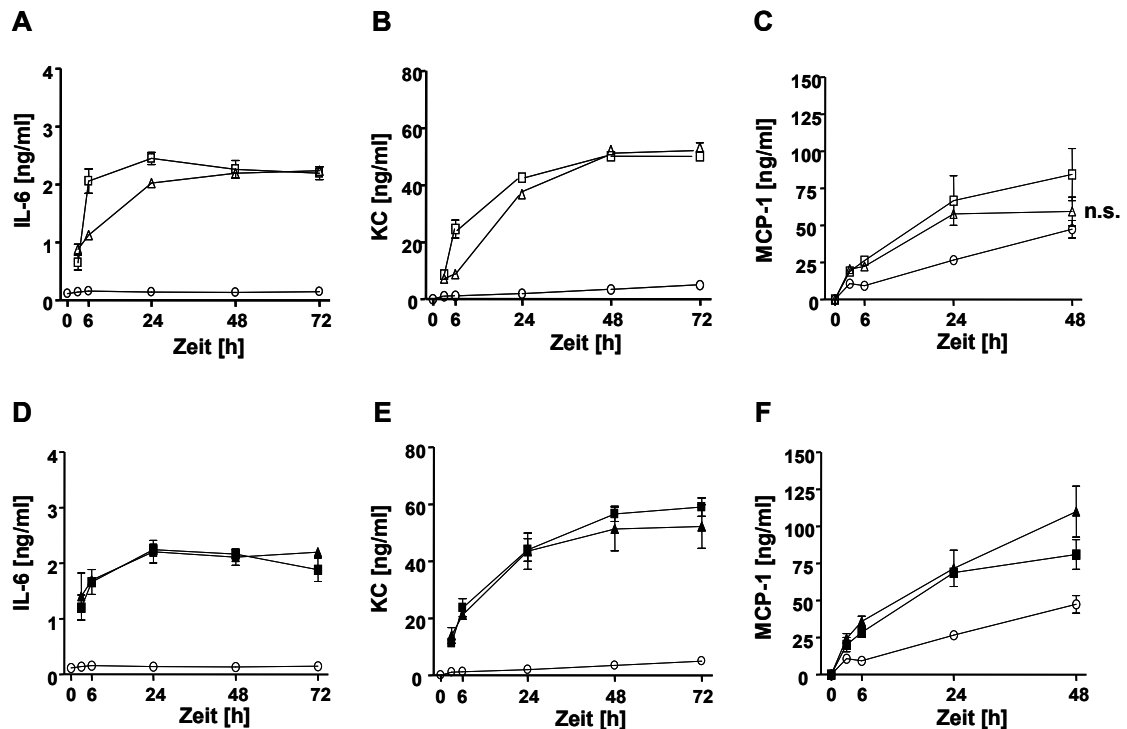


Abb. 41: Kinetik der LPS- bzw. Hsp60-induzierten Sekretion inflammatorischer Mediatoren durch reife Adipozyten. Reife Adipozyten der Linie 3T3-L1 wurden in Abwesenheit (offene Kreise) oder Anwesenheit von 10 ng/ml (offene Quadrate) oder 1000 ng/ml (offene Dreiecke) LPS (A - C) bzw. 10 µg/ml (schwarze Quadrate) oder 20 µg/ml (schwarze Dreiecke) Hsp60 (D - F) kultiviert. Die Konzentration von IL-6 (A, D), KC (B, E) und MCP-1 (C, F) wurden im Kulturüberstand zu verschiedenen Zeitpunkten mit Hilfe des ELISA-Verfahrens bestimmt. Die Daten zeigen Mittelwerte $\pm$ SD von drei unabhängigen Bestimmungen. Mit Ausnahme des markierten Datenpunktes (n. s.) liegen alle Datenpunkte der LPS- bzw. Hsp60-stimulierten Zellen signifikant ($p < 0,01$) über der Mediumkontrolle.

3.7.3.2 Stress-induzierte Freisetzung inflammatorischer Mediatoren in Abhängigkeit vom Adipozytenreifungsstadium

Da der Reifungsgrad metabolische Grundeigenschaften wie die Fettspeicherkapazität der Adipozyten beeinflusst, ist die Annahme naheliegend, dass auch die Reaktivität gegenüber Stresssignalen vom Reifungszustand der Adipozyten abhängig ist.

Zur Untersuchung dieser Annahme wurde zunächst die LPS- und Hsp60-induzierte Mediatorenfreisetzung von primären Prä- und reifen Adipozyten der NZO-Maus verglichen, um die an diesem Mausmodell gewonnenen Erkenntnisse in der Folge auf das Modell der NOD-Maus zu übertragen. Die Stimulation der Präadipozyten und der in vitro differenzierten reifen Adipozyten mit endogenen oder exogenen Stresssignalen, wie Hsp60 und LPS, führt zu einer

konzentrationsabhängigen Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins IL-6 und der Chemokine KC und MCP-1 (Abb. 42). LPS-behandelte Präadipozyten akkumulieren Konzentrationen von bis zu $13,3 \pm 0,3$ ng/ml IL-6, $108,7 \pm 49,1$ ng/ml KC und $17,5 \pm 0,4$ ng/ml MCP-1 in ihren Kulturüberständen (Abb. 42 A-C). Werden die Präadipozyten mit Hsp60 behandelt, können Konzentrationen bis zu $3,3 \pm 0,2$ ng/ml IL-6, $33,1 \pm 1,3$ ng/ml KC und $11,0 \pm 0,3$ ng/ml MCP-1 nachgewiesen werden.

Ein vergleichbares Sekretionsmuster zeigt sich für reife Adipozyten der NZO-Maus. Wird diese Zellpopulation LPS ausgesetzt, resultiert dies in einer Freisetzung von bis zu $4,2 \pm 0,1$ ng/ml IL-6, $79,6 \pm 5,4$ ng/ml KC und $19,4 \pm 1,4$ ng/ml MCP-1. Hsp60 induziert eine maximale Mediatorenausschüttung von $1,8 \pm 0,1$ ng/ml IL-6, $32,2 \pm 2,3$ ng/ml KC und $12,4 \pm 0,9$ ng/ml MCP-1.

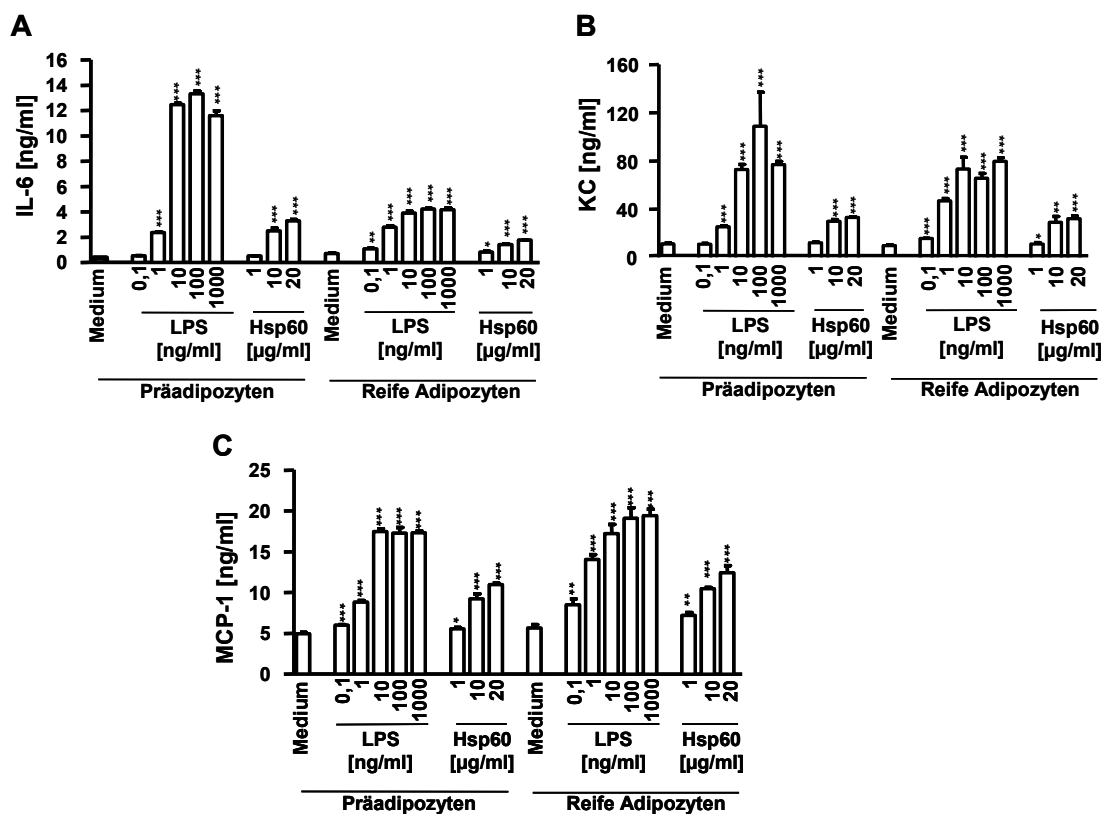


Abb. 42: Stresssignal-induzierte Sekretion von Mediatoren aus primären Adipozyten der NZO-Maus. Prä- und in vitro ausdifferenzierte Adipozyten der NZO-Maus wurden mit steigenden LPS (0 - 1000 ng/ml) bzw. Hsp60 (0 - 20 µg/ml) Konzentrationen stimuliert. Nach 24 h wurden die Konzentrationen von IL-6 (A), KC (B) und MCP-1 (C) im Zellüberstand mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte + SD von drei unabhängigen Experimenten; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ im Vergleich zur korrespondierenden Mediumkontrolle.

Um auszuschließen, dass der in Abbildung 42 dargestellte Stimulationseffekt der reifen Adipozyten lediglich auf die Anwendung des *in vitro* Differenzierungsprotokolls zurückzuführen ist, wurden reife Adipozyten direkt aus dem viszeralem Fettgewebe von NZO-Mäusen isoliert und anschließend mit den gleichen LPS- und Hsp60-Konzentrationen stimuliert, wie die *in vitro* differenzierten Zellen. Der Differenzierungsgrad dieser Population war zunächst, wie unter 3.7.2.1.2 beschrieben, anhand eines geringen Pref-1-Expressionsniveaus bestätigt worden.

Werden die frisch isolierten, reifen Adipozyten steigenden LPS- oder Hsp60-Konzentrationen ausgesetzt, kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Freisetzung von IL-6, KC und MCP-1 (Abb. 43). Die LPS-Stimulation resultiert in einer maximalen Sekretion von $61,3 \pm 1,1$ ng/ml IL-6, $68,7 \pm 1,4$ ng/ml KC und $68,0 \pm 8,0$ ng/ml MCP-1. Hsp60 behandelte Zellen sezernieren maximale Werte von $26,5 \pm 3,4$ ng/ml IL-6, $30,8 \pm 2,3$ ng/ml KC und $38,4 \pm 2,8$ ng/ml MCP-1 (Abb. 43 A-C).

Zusammengefasst deuten diese Daten daraufhin, dass die Reaktion der Adipozyten der NZO-Maus auf Stresssignale weitgehend unabhängig von ihrem Differenzierungsgrad ist.

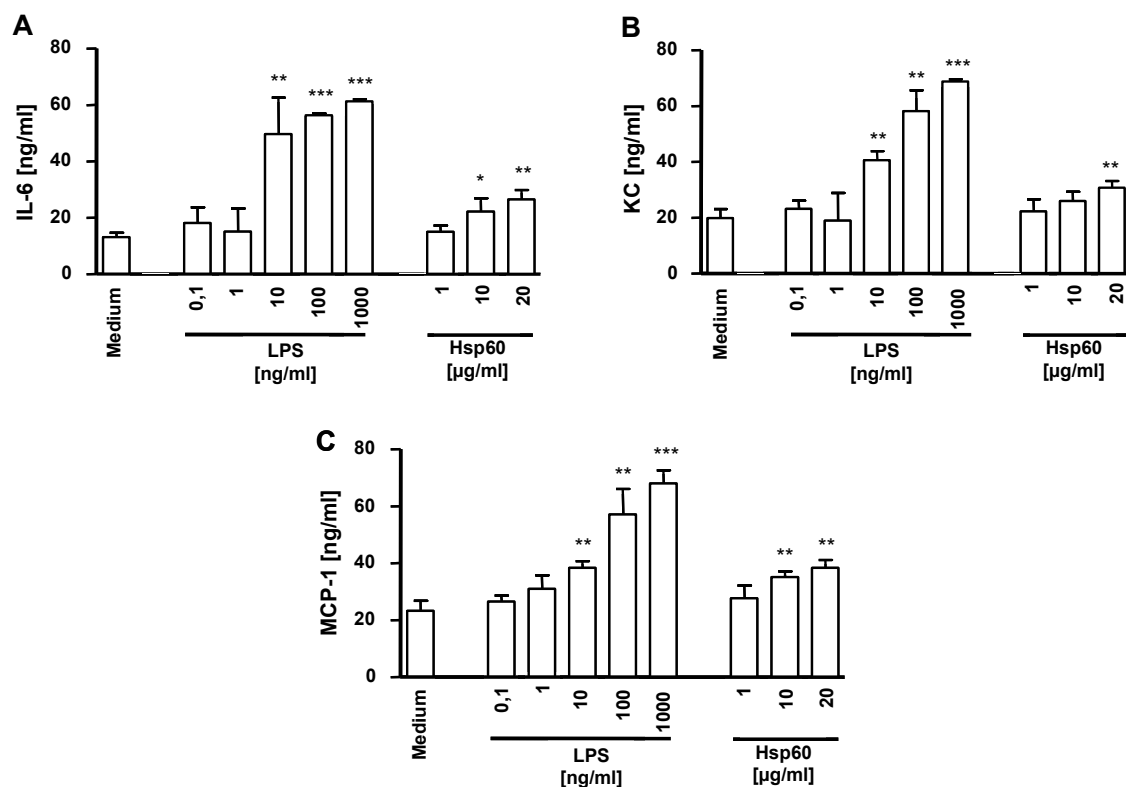


Abb. 43: LPS- bzw. Hsp60-induzierte Freisetzung inflammatorischer Mediatoren durch primäre, reife Adipozyten der NZO-Maus. Frisch aus dem viszeralem Fettgewebe der NZO-Maus isolierte, reife Adipozyten wurden 24 h steigenden LPS- bzw. Hsp60-Konzentrationen ausgesetzt. Anschließend wurde die Akkumulation von IL-6 (A), KC (B) und MCP-1 (C) im Zellüberstand mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte + SD von drei unabhängigen Messungen; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ im Vergleich zur entsprechenden Mediumkontrolle.

3.7.3.3 Synergistische Effekte von LPS und Hsp60 auf die Induktion von inflammatorischen Mediatoren

In Stresssituationen wie z. B. systemischen Infektionen können gleichzeitig endogene und exogene Stresssignale auftreten. Aus diesem Grund wurden zur Aufdeckung potentieller Synergieeffekte von LPS und Hsp60 auf die Induktion inflammatorischer Mediatoren durch Adipozyten, 3T3-L1 Präadipozyten 24 h in Gegenwart von Kombinationen dieser Stresssignale in suboptimalen, stimulatorischen Konzentrationen kultiviert (Abb. 44).

Signifikante, synergistische Effekte auf die Sekretion von IL-6 und KC wurden bei Kombinationen von 10 µg/ml Hsp60 mit 1 oder 3 ng/ml LPS beobachtet (Abb. 44 A, B). Synergieeffekte auf die MCP-1-Freisetzung dagegen wurden bei Kombinationen von 10 µg/ml Hsp60 mit 3 oder 10 ng/ml LPS erzielt (Abb. 44 C).

Die durch Kombinationen von LPS- und Hsp60-induzierte Zytokinsekretion liegt generell signifikant über der Sekretion, die durch die Einzelstimuli induziert wurde. Dies deutet auf einen additiven Effekt der beiden Stresssignale hin.

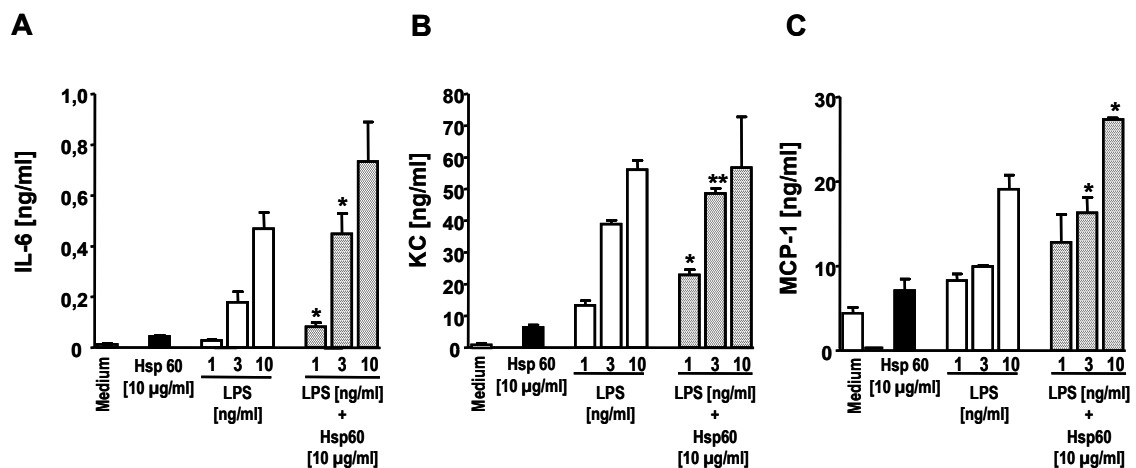


Abb. 44: Stimulatorische Aktivität der Stresssignale LPS und Hsp60. Präadipozyten der Linie 3T3-L1 wurden 24 h verschiedenen Hsp60- (schwarze Balken) oder LPS-Konzentrationen (offene Balken) bzw. Kombinationen von beiden Agenzien (schraffierte Balken) ausgesetzt. Die induzierte Freisetzung von IL-6 (A), KC (B) und MCP-1 (C) wurde mittels ELISA quantifiziert. Die Daten zeigen Mittelwerte + SD von 3 - 6 unabhängigen Messungen. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ im Vergleich zu den entsprechenden Proben, die nur mit LPS oder Hsp60 behandelt wurden.

3.7.3.4 Untersuchungen zur Freisetzung inflammatorischer Mediatoren aus Adipozyten von TLR4-defizienten Mäusen

Nachdem für 3T3-L1-Adipozyten und Adipozyten der NZO-Maus eine konzentrations- und zeitabhängige Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren durch TLR4-spezifische Liganden beschrieben werden konnte, soll in der Folge die TLR4-Abhängigkeit der Stimulation durch den Einsatz von Adipozyten aus TLR4-defizienten Tieren bestätigt werden. Dazu werden zunächst TLR4-exprimierende und TLR4-defiziente Adipozyten des Maus-Parentalstammes C57BL/10Sc ohne Diabetesrisiko vergleichend untersucht und daran anschließend Adipozyten der NOD-TLR4-Linie.

3.7.3.4.1 Analysen zur LPS-Abhängigkeit der sekretorischen Aktivität von Adipozyten des Maus-Parentalstammes C57BL/10Sc

Prä- und reife Adipozyten aus TLR4-exprimierenden C57BL/10ScSn- und TLR4-defizienten C57BL/10ScCr-Mäusen wurden steigenden LPS-Konzentrationen (0-1000 ng/ml) ausgesetzt. Nach 24 h wurden die akkumulierten IL-6-Konzentrationen im Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Präadipozyten der C57BL/10ScSn-Maus zeigen einen konzentrationsabhängigen Anstieg der IL-6-Freisetzung von $0,35 \pm 0,03$ auf $1,38 \pm 0,01$ ng/ml (100 ng/ml LPS) (Abb. 45 A). Präadipozyten der C57BL/10ScCr-Maus sezernieren über den gesamten Konzentrationsbereich signifikant weniger IL-6 ($p < 0,01$). Die Zytokinkonzentrationen steigen zunächst von $0,14 \pm 0,06$ ng/ml auf $0,38 \pm 0,09$ ng/ml (10 ng/ml LPS) an und fallen dann auf $0,17 \pm 0,02$ ng/ml ab (1000 ng/ml LPS). Auch im Fall der reifen Adipozyten liegt die IL-6-Sekretion von TLR4-exprimierenden Zellen über den gesamten Konzentrationsbereich (0 - 1000 ng/ml LPS) hinweg signifikant über der Sekretion der TLR4-defizienten Zellen ($p < 0,001$) (Abb. 45 B). Die IL-6-Freisetzung der TLR4-exprimierenden Adipozyten der C57BL/10ScSn-Maus steigt zunächst stark von $0,38 \pm 0,02$ ng/ml (0,1 ng/ml LPS) auf $1,57 \pm 0,07$ ng/ml (1 ng/ml LPS) an und bleibt dann annähernd konstant hoch ($1,65 \pm 0,03$ ng/ml; 1000 ng/ml LPS). Dagegen steigt die Sekretion der TLR4-defizienten reifen Adipozyten nur geringfügig von $0,04 \pm 0,01$ ng/ml auf $0,19 \pm 0,01$ ng/ml (1000 ng/ml LPS) an.

Im Unterschied zu Adipozyten aus NZO-Mäusen (Abb. 42) übersteigt die LPS-induzierte IL-6-Sekretion reifer Adipozyten von TLR4-exprimierenden C57BL/10ScSn-Mäusen ab einer LPS-Konzentration von 1 ng/ml mit $1,57 \pm 0,07$ ng/ml signifikant die Sekretionsrate der Präadipozyten der NZO-Maus ($1,21 \pm 0,05$ ng/ml; $p < 0,01$). Reife Adipozyten aus TLR4-defizienten C57BL/10ScCr-Mäusen sezernieren jedoch bereits ab einer LPS-Konzentration von 0,1 ng/ml LPS signifikant geringere IL-6-Mengen ($0,08 \pm 0,01$ ng/ml) (Abb. 45 B) im Vergleich zu TLR4-defizienten Präadipozyten ($0,16 \pm 0,03$ ng/ml; $p < 0,01$) (Abb. 45 A).

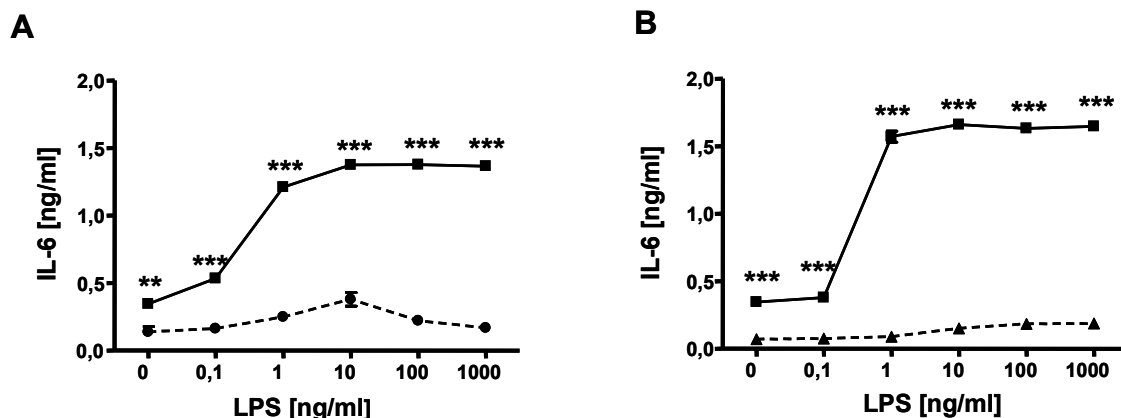


Abb. 45: Vergleich der LPS-induzierten IL-6-Freisetzung von C57BL/10ScSn- und C57BL/10ScCr-Mäusen. Präadipozyten (A) und reife Adipozyten (B) der beiden Mauslinien C57BL/10ScSn (durchgezogene Linie) und C57BL/10ScCr (unterbrochene Linie) wurden steigenden LPS-Konzentrationen ausgesetzt. Nach 24 h wurde die IL-6-Akkumulation im Zellüberstand mittels ELISA gemessen. Die Daten zeigen Mittelwerte $\pm$ SD von drei unabhängigen Bestimmungen. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ im Vergleich zum korrespondierenden Datenpunkt der TLR4-defizienten Zellen.

3.7.3.4.2 Analysen zur LPS-Abhängigkeit der sekretorischen Aktivität von Adipozyten der Linie NOD TLR4

An die Analyse der TLR4-abhängigen Mediatorenfreisetzung aus Adipozyten des Maus-Parentalstammes C57BL/10Sc anschließend, folgte die Untersuchung des Sekretionsverhaltens von Adipozyten der NOD-TLR4-Linie. Die LPS-induzierte Freisetzung von IL-6 durch TLR4-exprimierende Präadipozyten steigt von $0,39 \pm 0,03$ ng/ml auf $11,93 \pm 0,08$ ng/ml (10 ng/ml LPS) an und sinkt bei LPS-Konzentrationen von 1000 ng/ml auf $7,36 \pm 0,32$ ng/ml ab (Abb. 46 A). Die IL-6-Freisetzung von Präadipozyten TLR4-defizienter NOD-Mäuse dagegen steigt kontinuierlich von $0,11 \pm 0,01$ ng/ml auf $4,05 \pm 0,64$ ng/ml (1000 ng/ml LPS) an, liegt jedoch mit Ausnahme eines Datenpunktes (1 ng/ml LPS) signifikant unter der IL-6-Sekretion TLR4-exprimierender Präadipozyten ($p < 0,01$). Reife Adipozyten von NOD TLR4^{+/+} Mäusen zeigen eine konzentrationsabhängige IL-6-Freisetzung, die von $0,19 \pm 0,01$ ng/ml auf $7,58 \pm 0,41$ ng/ml (10 ng/ml LPS) ansteigt, bei höheren LPS-Konzentrationen jedoch auf $5,62 \pm 0,22$ ng/ml (1000 ng/ml LPS) abfällt (Abb. 46 B). Die IL-6-Sekretion TLR4-defizienter Adipozyten steigt von $0,03 \pm 0,01$ ng/ml auf $3,93 \pm 0,64$ ng/ml (1000 ng/ml LPS) an und ist somit über einen Konzentrationsbereich von 0 – 100 ng/ml LPS signifikant geringer als die der TLR4-exprimierenden Adipozyten ($p < 0,05$).

Reife TLR4-exprimierende Adipozyten (Abb. 46 B) sezernieren signifikant geringere maximale IL-6 Konzentrationen als TLR4-exprimierende Präadipozyten (Abb. 46 A) ($p < 0,01$).

Zwischen den verschiedenen Differenzierungsstadien TLR4-defizienter Adipozyten ist kein signifikanter Unterschied in der LPS-induzierten IL-6-Freisetzung zu erkennen.

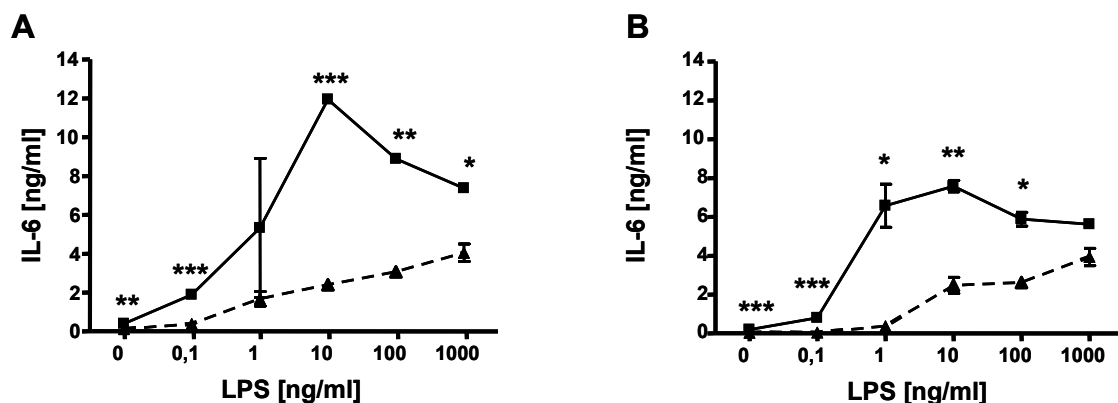


Abb. 46: Vergleich der LPS-induzierten IL-6-Freisetzung von Adipozyten der NOD TLR4^{+/+} und NOD TLR4^{-/-} Maus. Präadipozyten (A) und reife Adipozyten (B) der NOD TLR4^{+/+} (durchgezogene Linie) und NOD TLR4^{-/-} (unterbrochene Linie) Maus wurden steigenden LPS-Konzentrationen ausgesetzt. Nach 24 h wurde die IL-6-Akkumulation im Zellüberstand gemessen. Die Daten zeigen Mittelwerte $\pm$ SD von drei unabhängigen Bestimmungen. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ im Vergleich zum korrespondierenden Datenpunkt der TLR4-defizienten Zellen.

Neben der IL-6-Freisetzung wurde auch die Freisetzung der Chemokine MCP-1 und KC von Präadipozyten und Adipozyten aus NOD-TLR4-Mäusen untersucht. LPS-induziert steigt die MCP-1-Freisetzung TLR4-exprimierender Präadipozyten zunächst von $15,70 \pm 0,41$ ng/ml auf $63,67 \pm 6,87$ ng/ml (1 ng/ml LPS) an und fällt bei 1000 ng/ml LPS auf $57,62 \pm 8,53$ ng/ml ab (Abb. 47 A). Die MCP-1-Freisetzung TLR4-defizienter Präadipozyten steigt kontinuierlich von $12,55 \pm 0,08$ ng/ml auf $35,85 \pm 7,82$ ng/ml (1000 ng/ml LPS) an. Im Vergleich liegt somit die MCP-1-Sekretion der Präadipozyten der NOD TLR4^{+/+} Maus im LPS-Konzentrationsbereich bis 10 ng/ml signifikant über der der Präadipozyten von NOD TLR4^{-/-} Mäusen ($p < 0,05$). Auch reife Adipozyten von NOD TLR4^{+/+} Mäusen sezernieren im Vergleich zu Adipozyten von NOD TLR4^{-/-} Mäusen signifikant mehr MCP-1 nach LPS-Exposition ($p < 0,05$) (Abb. 47 B). Die MCP-1-Freisetzung der reifen Adipozyten steigt von $10,41 \pm 0,23$ ng/ml bis zu einer LPS-Konzentration von 1 ng/ml steil an ($34,08 \pm 9,36$ ng/ml) und verläuft dann auf einem Plateau bis zu einer LPS-Konzentration von 1000 ng/ml ($36,04 \pm 0,70$ ng/ml). Die MCP-1-Sekretion der TLR4-defizienten reifen Adipozyten steigt von $6,56 \pm 0,19$ ng/ml auf $23,06 \pm 1,85$ ng/ml (1000 ng/ml LPS) kontinuierlich an.

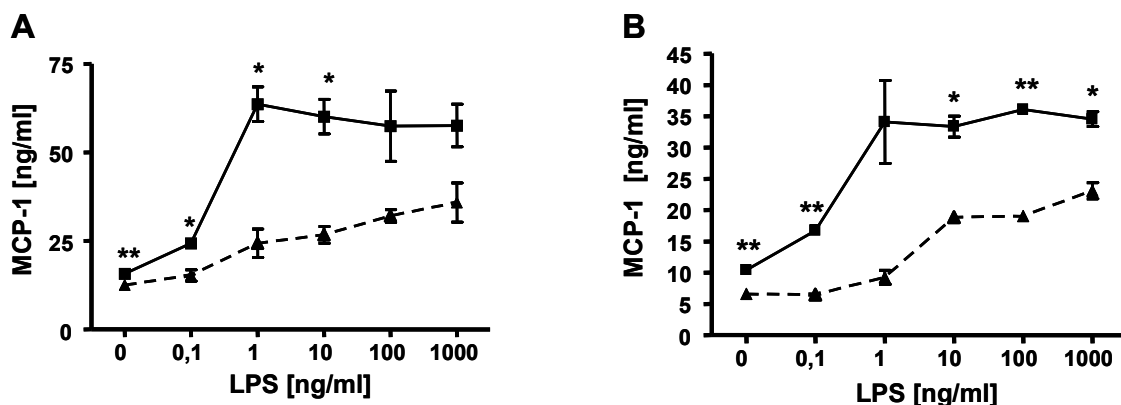


Abb. 47: Vergleich der LPS-induzierten MCP-1-Freisetzung von Adipozyten der NOD TLR4^{+/+} und NOD TLR4^{-/-} Maus. Präadipozyten (A) und reife Adipozyten (B) der NOD TLR4^{+/+} (durchgezogene Linie) und der NOD TLR4^{-/-} Maus (unterbrochene Linie) wurden steigenden LPS-Konzentrationen ausgesetzt. Nach 24 h wurde die MCP-1-Akkumulation im Zellüberstand gemessen. Die Daten zeigen Mittelwerte $\pm$ SD von drei unabhängigen Bestimmungen. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ im Vergleich zum korrespondierenden Datenpunkt der TLR4-defizienten Zellen.

Abbildung 48 zeigt Analysen zur TLR4-abhängigen Sekretion des Chemokins KC von Adipozyten der NOD-TLR4-Mäuse. Die KC-Freisetzung TLR4-exprimierender Präadipozyten steigt von $17,34 \pm 1,25$ ng/ml auf $79,44 \pm 0,88$ ng/ml (1 ng/ml LPS) an und ist damit sowohl signifikant höher als die der TLR4-defizienten Präadipozyten ($p < 0,001$) als auch signifikant höher als die von reifen TLR4-exprimierenden Adipozyten ($p < 0,01$) (Abb. 48 A). Im Konzentrationsbereich von 1 - 1000 ng/ml LPS sinkt die Sekretion der TLR4-exprimierenden Präadipozyten leicht auf $77,63 \pm 0,39$ ng/ml ab. Die KC-Freisetzungsrates der Präadipozyten von NOD TLR4^{-/-} Mäusen steigt kontinuierlich von $8,03 \pm 0,03$ ng/ml auf $58,60 \pm 3,08$ ng/ml (1000 ng/ml LPS) an. Die Sekretion der TLR4-exprimierenden reifen Adipozyten steigt von $5,41 \pm 2,24$ ng/ml auf $73,85 \pm 9,89$ ng/ml (10 ng/ml LPS) an und fällt dann leicht auf $70,64 \pm 5,50$

ng/ml (1000 ng/ml LPS) ab (Abb. 48 B). Reife Adipozyten der NOD TLR4^{-/-} Maus sezernieren spontan wenig KC (3,25 ± 0,47 ng/ml). Die KC-Sekretion steigt bis zu einer Konzentration von 1000 ng/ml LPS kontinuierlich auf 45,05 ± 0,14 ng/ml an, liegt damit jedoch signifikant unter dem korrespondierenden Datenpunkt der TLR4-exprimierenden reifen Adipozyten (p<0,05).

Präadipozyten der TLR4-exprimierenden NOD-Maus (Abb. 48 A) sezernieren im Vergleich zu TLR4-exprimierenden reifen Adipozyten (Abb. 48 B) bis zu einer Konzentration von 1 ng/ml LPS signifikant mehr KC (p<0,01). Auch TLR4-defiziente Präadipozyten (Abb. 48 A) sezernieren bis zu einer Konzentration von 1 ng/ml LPS signifikant mehr KC als reife TLR4-defiziente Adipozyten (Abb.48 B) (p<0,05).

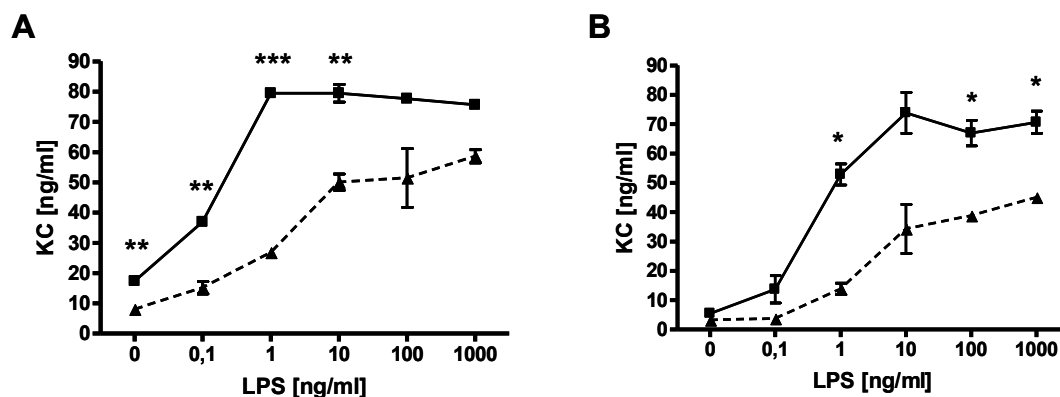


Abb. 48: Vergleich der LPS-induzierten KC-Freisetzung von Adipozyten der NOD TLR4^{+/+} und NOD TLR4^{-/-} Maus. Präadipozyten (A) und reife Adipozyten (B) der NOD TLR4^{+/+} (durchgezogene Linie) und der NOD TLR4^{-/-} Maus (unterbrochene Linie) wurden steigenden LPS-Konzentrationen ausgesetzt. Nach 24 h wurde die KC-Akkumulation im Zellüberstand gemessen. Die Daten zeigen Mittelwerte ± SD von drei unabhängigen Bestimmungen. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 im Vergleich zum korrespondierenden Datenpunkt der TLR4-defizienten Zellen.

3.7.4 Auswirkungen des TLR4-Defekts auf die Differenzierung von Adipozyten

3.7.4.1 Auswirkungen des TLR4-Defekts auf die Differenzierung von Adipozyten der Linie 3T3-L1

3.7.4.1.1 Effekte einer chronischen TLR4-Stimulation während der Differenzierung von 3T3-L1-Zellen

In den vorangegangenen Experimenten konnte sowohl die Expression von TLR4 (vgl. 3.7.2.1.3), als auch die Aktivierbarkeit von Adipozyten durch TLR4-Liganden nachgewiesen werden (vgl. 3.7.3). Des Weiteren weisen morphologische Untersuchungen des Fettgewebes auf eine veränderte Adipozytenreifung in TLR4-defizienten NOD-Mäusen hin (vgl. 3.6.2). Es stellt sich daher die Frage nach einem möglichen Einfluss von TLR4 auf die Differenzierung der Adipozyten. In einem ersten experimentellen Ansatz wurden deshalb 3T3-L1-Zellen in Abwesenheit oder in Gegenwart von verschiedenen LPS-Konzentrationen (0, 1, 100 ng/ml) differenziert. Nach Abschluss des Differenzierungsprozesses (Tag neun) wurden die Zellen

erneut für 24 h steigenden LPS-Konzentrationen (0, 0,1, 1, 10 ng/ml) ausgesetzt. Anschließend wurde die Sekretion der inflammatorischen Mediatoren IL-6 und MCP-1 im Zellüberstand gemessen.

Adipozyten, die in Abwesenheit von LPS differenziert wurden, zeigen eine konzentrationsabhängige LPS-induzierte Freisetzung von MCP-1 und IL-6 (Abb. 49). Eine Stimulation mit 10 ng/ml LPS führt zu einem Anstieg der MCP-1-Freisetzung von $13,70 \pm 3,05$ ng/ml auf $58,02 \pm 12,27$ ng/ml und zu einem Anstieg der IL-6-Freisetzung von $0,14 \pm 0,01$ ng/ml auf $2,75 \pm 0,09$ ng/ml. Adipozyten, die jedoch während der Differenzierungsphase mit LPS (1 bzw. 100 ng/ml) behandelt wurden, zeigen nach Stimulation mit 1 ng/ml LPS eine signifikant geringere Sekretion beider Mediatoren ($p < 0,01$). Bei Adipozyten, die in Gegenwart von 100 ng/ml LPS differenziert wurden, kann zunächst nach Stimulation mit 0,1 ng/ml LPS eine deutlich verringerte Freisetzung des Chemokins MCP-1 auf $13,04 \pm 1,94$ ng/ml beobachtet werden. Erfolgt jedoch eine Stimulation dieser Zellen mit 10 ng/ml LPS, erreicht das Sekretionsniveau vergleichbare Werte ($53,89 \pm 5,23$ ng/ml) zu Zellen, die den Differenzierungsprozess in Abwesenheit von LPS durchlaufen haben ($58,02 \pm 12,27$ ng/ml) (Abb. 49 A). Im Fall von IL-6 steigt die Freisetzungsrates von Adipozyten, die in Gegenwart von 1 ng/ml LPS differenziert wurden, von $0,12 \pm 0,03$ ng/ml auf $1,56 \pm 0,22$ ng/ml an und ist damit signifikant geringer als der korrespondierende Datenpunkt der Zellen, die in Abwesenheit von LPS differenziert wurden (Abb. 49 B). Ebenfalls signifikant geringer ist die IL-6-Sekretion von Adipozyten, die in Gegenwart von 100 ng/ml differenziert wurden bei den LPS-Konzentrationen 1 und 10 ng/ml ($p < 0,01$).

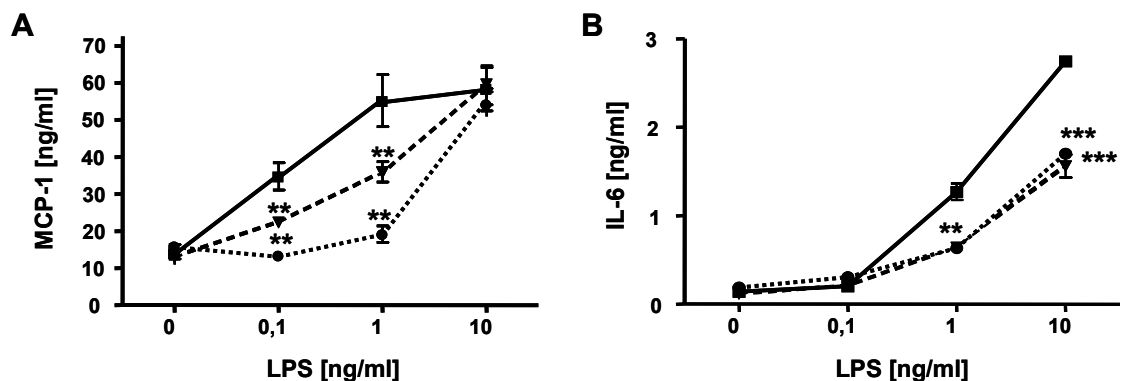


Abb. 49: Freisetzung inflammatorischer Mediatoren durch in LPS-Gegenwart gereifte Adipozyten der Linie 3T3-L1. Nach Durchlaufen des Differenzierungsprozesses in Gegenwart von 0 (durchgezogene Linie), 1 (unterbrochene Linie) oder 100 ng/ml (gepunktete Linie) LPS wurden die reifen Adipozyten am Tag neun nach Einleiten der Differenzierung mit 0, 0,1, 1 und 10 ng/ml LPS stimuliert. Nach 24 h wurde die Akkumulation des Chemokins MCP-1 (A) und des Zytokins IL-6 (B) im Zellüberstand durch ELISA gemessen. Die Daten zeigen Mittelwerte $\pm$ SD aus drei unabhängigen Experimenten. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ im Vergleich zum korrespondierenden Datenpunkt der Zellen, die in Abwesenheit von LPS differenziert wurden.

3.7.4.1.2 Vitalität von Adipozyten der Linie 3T3-L1 nach Differenzierung in Gegenwart von LPS

Zur Klärung der Frage, ob die chronische LPS-Behandlung der Adipozyten während der Differenzierungsphase von neun Tagen und die anschließende LPS-Behandlung Einfluss auf die Vitalität der Zellen nimmt, wurde ihre metabolische Aktivität mit Hilfe eines MTT-Tests bewertet (Abb.50). Überraschenderweise zeigt sich dabei, dass in Gegenwart von 100 ng/ml LPS gereifte Zellen nach anschließender LPS-Stimulation eine signifikant höhere metabolische Aktivität aufweisen als die Zellen, die in Abwesenheit von LPS gereift sind ($p < 0,05$). Aus den vorliegenden Daten lässt sich somit schließen, dass der experimentelle Ansatz keinen negativen Einfluss auf die Zellvitalität hat. Die reduzierte Bildung von Mediatoren durch Adipozyten, die in LPS-Gegenwart differenziert wurden, ist nicht auf eine verminderte Vitalität dieser Zellen zurückzuführen. Somit muss eine funktionelle Veränderung postuliert werden.

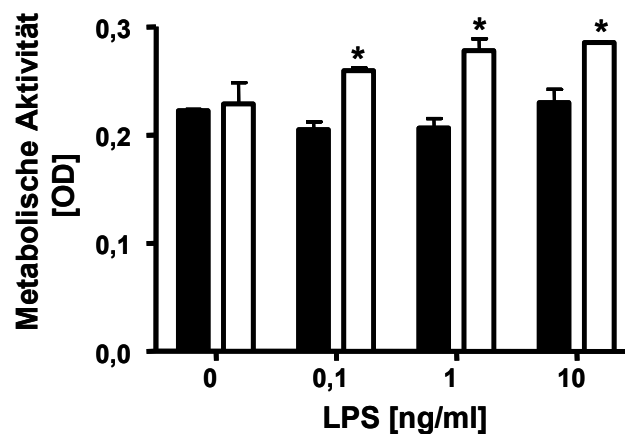


Abb. 50: MTT-Test zur Bestimmung der Vitalität reifer Adipozyten der Linie 3T3-L1 nach Durchlaufen des Differenzierungsprozesses in Gegenwart von LPS und anschließender LPS-Stimulation. Präadipozyten der Linie 3T3-L1 wurden in vitro mit Hilfe des in 2.2.6.2 beschriebenen Differenzierungsprotokolls in Gegenwart von 0 (schwarze Balken) oder 100 ng/ml LPS (offene Balken) differenziert. Neun Tage nach Beginn des Differenzierungsprozesses wurden die Zellen mit steigenden LPS-Konzentrationen (0 - 10 ng/ml) behandelt und ihre Vitalität durch einen MTT-Test bestimmt. * $p < 0,05$ im Vergleich zu den Proben, die in Abwesenheit von LPS differenziert wurden.

3.7.4.2 Auswirkungen des TLR4-Defekts auf die Differenzierung von Adipozyten der NOD-TLR4-Maus

3.7.4.2.1 Effekte einer chronischen TLR4-Stimulation während der Differenzierung von Adipozyten der NOD-TLR4-Maus

Nachdem der Einfluss einer chronischen TLR4-Aktivierung an 3T3-L1-Zellen demonstriert wurde, wird im Folgenden das Sekretionsverhalten von primären Adipozyten der NOD TLR4^{+/+} Maus unter vergleichbaren Bedingungen untersucht. Um der Frage nachzugehen, ob der beobachtete Effekt einer Reduktion der Mediatorenfreisetzung nur ein vorübergehendes Phänomen ist oder ob es sich um eine bleibende Veränderung des Sekretionsverhaltens handelt,

werden die NOD TLR4^{+/+} Adipozyten zusätzlich fünf Tage nach der letzten LPS-Zugabe erneut analysiert.

Am Tag neun nach Initiation der Differenzierung steigt die IL-6-Sekretion von Adipozyten der NOD TLR4^{+/+} Maus, die in Abwesenheit von LPS differenziert wurden, auf eine Exposition mit 10 ng/ml LPS folgend, von $0,27 \pm 0,04$ ng/ml auf $2,02 \pm 0,05$ ng/ml an (Abb. 51 A). Adipozyten, die während des Differenzierungsprozesses 1 ng/ml LPS ausgesetzt waren, sezernieren unstimuliert $0,21 \pm 0,03$ ng/ml IL-6. Nach Stimulation mit 10 ng/ml LPS steigt die Zytokinfreisetzung auf $1,69 \pm 0,09$ ng/ml an. Somit setzen diese Zellen über den gesamten Konzentrationsbereich hinweg weniger IL-6 frei als die unbehandelten Adipozyten. Adipozyten, die jedoch in Anwesenheit von 100 ng/ml LPS differenziert wurden, sezernieren spontan signifikant mehr IL-6 ($1,49 \pm 0,22$ ng/ml) als die beiden anderen Adipozytenpopulationen ($p < 0,001$). LPS-induziert (10 ng/ml) setzen diese Zellen allerdings vergleichbar hohe IL-6 Mengen ($2,00 \pm 0,03$ ng/ml) frei, wie Zellen, die in LPS-Abwesenheit differenziert wurden.

Am Tag 14 nach Beginn der Differenzierungsphase sezernieren die Zellen, die zunächst am Tag 9 desensibilisiert waren und eine verringerte IL-6-Freisetzung zeigten (Adipozyten, die in Gegenwart von 1 ng/ml LPS differenziert wurden) (Abb. 47 A) mehr IL-6 als die Zellen, die in Abwesenheit des Stimulus gereift sind (Abb. 51 B). Die IL-6-Freisetzung steigt von $1,5 \pm 0,26$ ng/ml auf $6,25 \pm 3,58$ ng/ml an, wohingegen die Sekretion der in LPS-Abwesenheit gereiften Adipozyten von $0,38 \pm 0,09$ ng/ml auf $1,77 \pm 0,22$ ng/ml ansteigt. Adipozyten, die in Gegenwart von 100 ng/ml LPS gereift sind, ließen sich am Tag 14 nach Beginn der Differenzierung durch LPS jedoch nicht mehr stimulieren.

Bei der Analyse der MCP-1-Freisetzung zeigt sich ein ähnliches Muster wie bei der IL-6-Sekretion (Abb. 51 C, D). Adipozyten, die in Abwesenheit von LPS differenziert wurden, sezernieren nach Ende des Differenzierungsprozesses am Tag neun $12,15 \pm 5,37$ ng/ml bis $61,06 \pm 16,44$ ng/ml MCP-1 (10 ng/ml LPS) (Abb. 51 C). Adipozyten, die in der Differenzierungsphase 1 ng/ml LPS ausgesetzt waren, sezernieren $14,83 \pm 4,5$ ng/ml bis $55,55 \pm 17,18$ ng/ml MCP-1. Somit zeigen diese Zellen über den untersuchten Konzentrationsbereich hinweg neben einer reduzierten IL-6-Freisetzung auch eine geringere MCP-1-Freisetzung. Eine Differenzierung in Gegenwart von 100 ng/ml LPS führt, wie bei der IL-6-Sekretion, zu einer spontan erhöhten Mediatorenfreisetzung von $29,18 \pm 7,18$ ng/ml. Stimuliert (10 ng/ml LPS) sezernieren diese Zellen, wie bereits im Fall des Zytokins IL-6 beobachtet, vergleichbare Mengen ($58,87 \pm 32,05$ ng/ml) wie die beiden unter den anderen Bedingungen gereiften Adipozytenpopulationen.

Abbildung 51 D zeigt das Sekretionsverhalten der untersuchten Adipozyten 14 Tage nach Beginn der Differenzierung und somit nach fünf Tagen in einer LPS-freien Umgebung. Die in Abwesenheit von LPS gereiften Adipozyten sezernieren $11,11 \pm 1,25$ ng/ml bis $41,47 \pm 13,80$ ng/ml MCP-1 (10 ng/ml). Vergleichbar zum beobachteten IL-6-Freisetzungsmuster (Abb. 51 B), sezernieren Adipozyten, die in Gegenwart von 1 ng/ml LPS differenziert wurden, am Tag 14 (Abb. 51 D) größere MCP-1-Mengen als am Tag neun (Abb. 51 C). Die beobachtete Sekretion steigt bei diesen Zellen von $15,61 \pm 2,4$ ng/ml auf $51,42 \pm 2,07$ ng/ml (10 ng/ml LPS) an. Adipozyten, die in Anwesenheit von 100 ng/ml LPS gereift sind, lassen sich am Tag 14 nicht mehr stimulieren. Die spontane MCP-1-Freisetzung sinkt von $28,68 \pm 2,61$ ng/ml bereits bei

einer LPS-Exposition von 0,1 ng/ml auf $0,63 \pm 0,12$ ng/ml ab und steigt auch bei höheren LPS-Konzentrationen nicht wieder an.

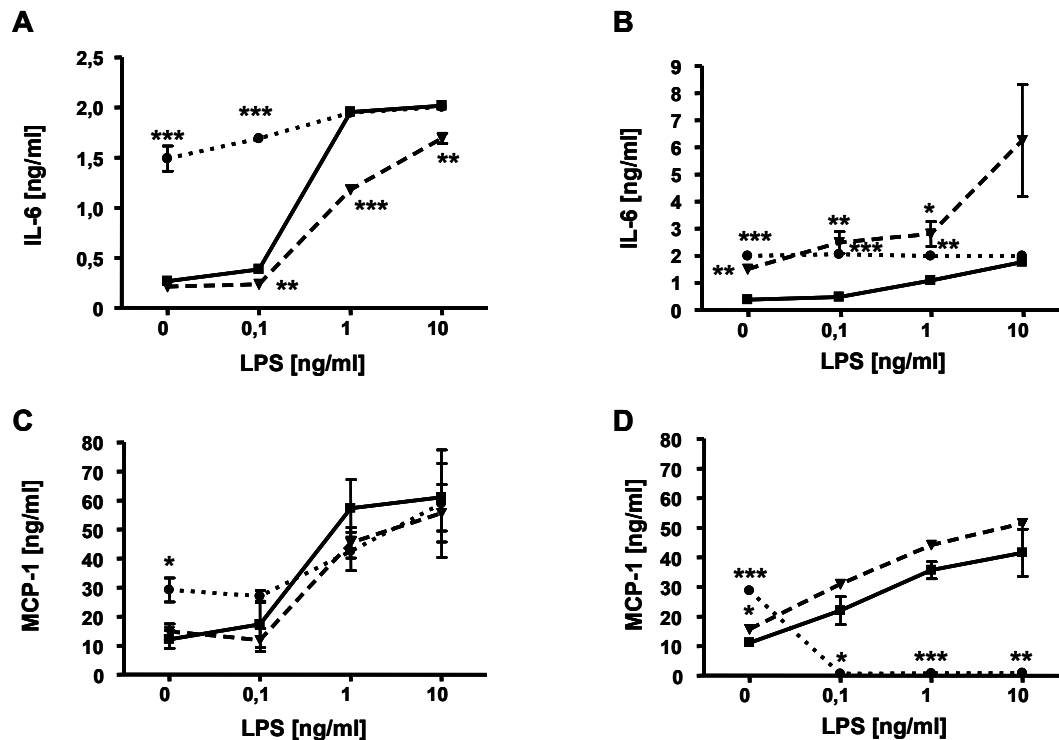


Abb. 51: Freisetzung inflammatorischer Mediatoren durch in LPS-Gegenwart gereifte Adipozyten der Mauslinie NOD TLR4. Nach Durchlaufen des Differenzierungsprozesses in Gegenwart von 0 (durchgezogene Linie), 1 (unterbrochene Linie) oder 100 ng/ml (gepunktete Linie) LPS wurden die reifen Adipozyten am Tag neun (A, C) und 14 (B, D) nach Einleiten der Differenzierung mit 0, 0,1, 1 und 10 ng/ml LPS stimuliert. Nach 24 h Stunden wurde die Akkumulation des Zytokins IL-6 (A, B) und des Chemokins MCP-1 (C, D) im Zellüberstand durch ELISA gemessen. Die Daten zeigen Mittelwerte $\pm$ SD aus drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ im Vergleich zum korrespondierenden Datenpunkt der Zellen, die in Abwesenheit von LPS differenziert wurden.

3.7.4.2.2 Vitalität von Adipozyten der Mauslinie NOD TLR4 nach Differenzierung in Gegenwart von LPS

Analog zur Analyse der 3T3-L1-Zellen (vgl. 3.7.4.1.2) wurden auch die Adipozyten der NOD-TLR4-Mauslinie nach Durchlaufen des experimentellen Ansatzes bezüglich ihrer Vitalität untersucht. Abbildung 52 A zeigt die metabolische Aktivität der Adipozyten am Tag neun nach Differenzierungsbeginn in Gegenwart von LPS. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die Kontrollen und die LPS-behandelten Proben keinen Unterschied bezüglich ihrer metabolischen Aktivität (Abb. 52 A). Wurden die neun Tage chronisch aktivierten Zellen jedoch weitere fünf Tage in Abwesenheit von LPS kultiviert, zeigten sie eine signifikant höhere metabolische Aktivität verglichen zur Kontrollgruppe (Abb. 52 B). Damit bestätigt sich der Befund mit den 3T3-L1-Zellen. Die chronische Aktivierung von Adipozyten mit LPS scheint deren Vitalität nicht zu

beeinflussen. Die nach neun Tagen im Ansatz mit 3T3-L1-Zellen beobachtete, im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte metabolische Aktivität, zeigt sich bei den primären Adipozyten allerdings erst am Tag 14.

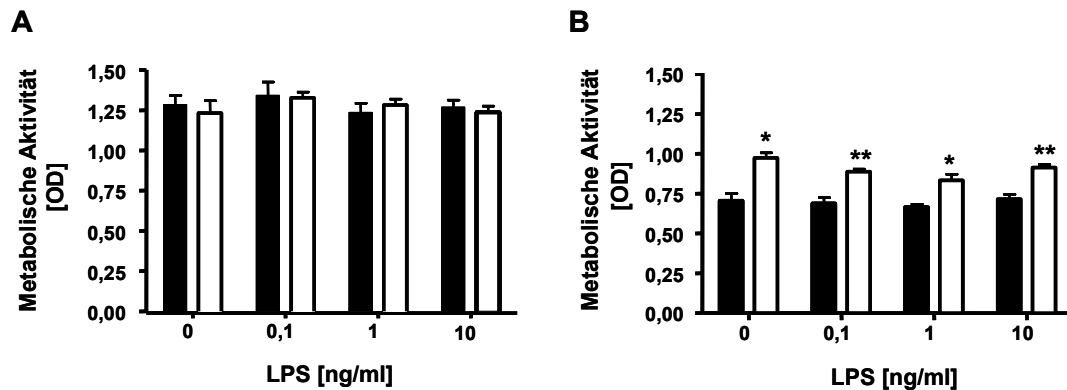


Abb. 52: MTT-Test zur Bestimmung der Vitalität reifer Adipozyten der NOD TLR4^{+/+} Maus nach Durchlaufen des Differenzierungsprozesses in Gegenwart von LPS und anschließender LPS-Stimulation. Präadipozyten von NOD TLR4^{+/+} Mäusen wurden in vitro mit Hilfe des in 2.2.6.2 beschriebenen Differenzierungsprotokolls in Gegenwart von 0 (schwarze Balken) oder 100 ng/ml LPS (offene Balken) ausdifferenziert. Neun (A) und vierzehn Tage (B) nach Beginn des Differenzierungsprozesses wurden die Zellen mit steigenden LPS-Konzentrationen (0 - 10 ng/ml) behandelt und ihre Vitalität bestimmt. *p<0,05; **p<0,01 im Vergleich zu den Proben, die in Abwesenheit von LPS differenziert wurden.

3.8 Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse

Zusammenfassend weisen die dargestellten Ergebnisse daraufhin, dass TLR4-abhängige Mechanismen wesentlich die Entwicklung des autoimmunvermittelten Diabetes in der NOD-Maus beeinflussen. Die Kontrolle der beteiligten Pathomechanismen durch TLR4 erfolgt dabei offenbar nicht nur über die Beeinflussung regulatorischer Immunzellfunktionen, sondern auch über die Regulation der inflammatorischen Aktivitäten und des Differenzierungsverhaltens von Adipozyten.

4 Diskussion

Der insulinabhängige Diabetes mellitus ist die Folge einer progressiven Zerstörung autologer insulinproduzierender β -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas durch zellvermittelte Immunreaktionen. Eine zentrale Rolle bei der Initiation und Progression der β -zellgerichteten Immunreaktion kommt dabei Zellen des angeborenen Immunsystems zu. Makrophagen sind die ersten Immunzellen, die die pankreatischen Inseln infiltrieren. Diese Infiltration resultiert in einer Insulitis und führt im weiteren Verlauf schließlich zum Verlust der β -Zellmasse. Die Aktivitäten von Makrophagen werden im Wesentlichen durch TLR kontrolliert, insbesondere durch TLR4. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen sollten daher die Frage klären, inwieweit TLR4 das Immungeschehen um die Zerstörung der pankreatischen β -Zellen und damit die Pathogenese des Insulinmangeldiabetes kontrolliert.

4.1 Modell der TLR4-defizienten NOD-Maus

Für die Untersuchungen zur Rolle des TLR4 in der Immunpathogenese des Insulinmangeldiabetes wurde auf der Grundlage eines Tiermodells des humanen Typ 1 Diabetes eine Mauslinie mit selektivem TLR4-Defekt generiert. Da es sich bei der NOD-Maus um das zurzeit am besten charakterisierte Modell des (auto-)immunvermittelten Typ 1 Diabetes handelt (88), wurde in diesen Stamm der TLR4-Defekt der C57BL/10ScCr-Maus eingekreuzt. Der genetische Defekt der C57BL/10ScCr-Maus ist in einer 74723 bp umfassenden spontanen Deletion begründet, die die gesamte TLR4-kodierende Region beinhaltet (77). Weitere betroffene Gene konnten innerhalb der Deletion nicht identifiziert werden und auch keine korrespondierende Insertion an anderen Stellen des Genoms (77). Freudenberg et al. beobachtete dennoch in einer bestimmten Kolonie dieser Mauslinie einen weiteren Immundefekt (104). Auf Infektionen folgend, sind Tiere dieser Kolonie nicht in der Lage IFN- γ zu produzieren. Müller et al. konnte des Weiteren zeigen, dass bestimmte Kolonien einen Phänotyp mit einem gestörten Heilungsvorgang nach *Leishmania*-Infektionen aufweisen (105). Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Kolonie der Linie C57BL/10ScCr zeigt diese beiden Phänotypen jedoch nicht, sondern weist lediglich die TLR4-Defizienz auf.

Aufgrund des Vorliegens einer geschlechtsspezifischen Diabetesprävalenz im NOD-Modell, wurden lediglich weibliche Tiere in die Untersuchung einbezogen. PCR-Analysen der genomischen DNA belegen das erfolgreiche Einkreuzen der NOD-spezifischen Diabetessuszeptibilitätsgene sowie des TLR4-Defekts. Vergleichende Analysen der Lymphozytenzahlen in der generierten NOD-TLR4-Maus und der Kontrollmaus C57BL10/Sc dokumentieren das bereits früher beschriebene Vorliegen einer Lymphopenie in der NOD-Maus (99). Lymphopenie wird als fördernder Faktor für die Ausbildung von Autoimmunität diskutiert (106). Da der TLR4-Defekt per se jedoch in der NOD-TLR4-Maus lediglich zu einer geringfügigen aber nicht signifikanten Reduktion in der Lymphozytenzahl führt, erscheint es eher unwahrscheinlich, dass eine Verstärkung der Lymphopenie für die beobachtete beschleunigte Diabetesentwicklung in TLR4-defizienten Mäusen verantwortlich ist.

Grundsätzlich wird das Vorliegen einer Lymphopenie im NOD-Parentalstamm in der Literatur kontrovers diskutiert. King et al. sowie Kataoka et al. berichten von einer verringerten Lymphozytenzahl in ihren NOD-Kolonien (99, 106), wohingegen Berzins et al. sowie Satoh et al. einige Jahre später keinen Unterschied in der Lymphozytenzahl in NOD-Mäusen finden konnten (107, 108). Diese Beobachtungen deuten daraufhin, dass verschiedene genetische Varianten der NOD-Mäuse in verschiedenen Kolonien vorliegen und dass eine Lymphopenie nicht unabdingbar mit einer Diabetesentwicklung in NOD-Mäusen einhergeht.

4.2 TLR4 und seine potentiellen exogenen und endogenen Liganden: LPS, Hsp60, FFA

Vor etwas mehr als zwanzig Jahren gelang es Poltorak et al. durch Untersuchungen an LPS-hyposensitiven Mausmutanten das TLR4-Protein als LPS-Rezeptor zu identifizieren (64). Da LPS, ein Hauptbestandteil der äußeren Zellwand Gram-negativer Bakterien, kein strukturelles Homolog unter den vielzelligen Organismen aufweist, repräsentiert es eine ideale Zielstruktur für die Erkennung von Bakterien durch das angeborene Immunsystem, zu dessen primären Aufgaben die Unterscheidung zwischen Selbst und Nicht-Selbst zählt (109). Die Erkennung von Nicht-Selbst erfolgt vor allem mit Hilfe so genannter *pattern recognition* Rezeptoren wie TLR, die konservierte molekulare Muster mikrobieller Pathogene erkennen, die in höheren Organismen nicht vorkommen. Im Fall des bakteriellen LPS dient Lipid A als spezifisches, mikrobielles Muster (PAMP), das die Bindung an TLR4 vermittelt. Aufgrund dieses Sachverhaltes wird zurzeit diskutiert, ob freie Fettsäuren (*free fatty acids*, FFA) ebenfalls als TLR4-Liganden fungieren können. Bislang wurde jedoch lediglich die Fähigkeit von FFA nachgewiesen, die Signaltransduktion von TLR4 zu aktivieren (69, 110).

Im Gegensatz zur ursprünglichen „*self-nonself, immune-surveillance* (Selbst-Nicht-Selbst, Immunüberwachung) Hypothese“ (109), geht die „*Danger* Theorie“ davon aus, dass die primäre Aufgabe des Immunsystems nicht in der Unterscheidung von Selbst und Nicht-Selbst, sondern in der Erkennung von Gefahrensignalen liegt (111). So können beispielsweise Hitzeschockproteine als Dangersignale fungieren, wenn sie von gestressten oder apoptotischen Zellen freigesetzt werden (112, 113).

In den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen zu den Auswirkungen der TLR4-Defizienz wurde als Stresssignal bakterielles LPS eingesetzt, da es sich um den klassischen TLR4-Liganden handelt und allgegenwärtig ist. LPS findet sich auch bis zu einer Konzentration von ca. 1 ng/ml in der Zirkulation von gesunden Individuen (114, 115), da es im Darm kontinuierlich durch den Tod von Gram-negativen Bakterien freigesetzt und über die intestinalen Kapillaren in die generelle Zirkulation transportiert wird (116), wo es periphere Gewebe erreichen und lokale inflammatorische Reaktionen auslösen kann.

Der endogene TLR4-Ligand Hsp60 gehört zu einer Reihe von β -zell-assoziierten Autoantigenen, gegen die in der prädiabetischen Phase (Auto-) Antikörper nachgewiesen werden können (117). Aus diesem Grund wurde neben LPS zusätzlich Hsp60 exemplarisch als endogener Ligand bei den Analysen inflammatorischer Adipozytenaktivitäten eingesetzt. Hsp60 findet sich in Konzentrationen bis zu 14 μ g/ml im Serum (118); seine Konzentration könnte

jedoch lokal an Stellen von Gewebsverletzungen noch deutlich höher liegen. Als potentielle Hsp60-Quelle im Fettgewebe wäre die Freisetzung durch Adipozyten denkbar, die Hypoxie oder metabolischem Stress ausgesetzt sind.

4.3 Potentielle Kontamination der LPS-Präparation

In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass Zellen der NOD TLR4^{-/-} Maus ebenfalls auf eine LPS-Stimulation reagieren. Da die Existenz eines weiteren Rezeptors für LPS jedoch ausgeschlossen wird (80), muss eine potentielle Verunreinigung der LPS-Präparation, die eine TLR4-unabhängige Stimulation von Zellen bewirken kann, als Ursache für diesen Effekt in Betracht gezogen werden.

TLR4-defiziente Milzzellen des C57BL/10Sc-Mausstammes antworten auf eine Stimulation mit LPS-Konzentrationen von ≥ 100 ng/ml mit einer Zytokinfreisetzung. Bei diesen LPS-Konzentrationen würde bereits eine 1 %ige Verunreinigung eine Konzentration von ≥ 1 ng/ml Fremdschubstanz je Ansatz bedingen. Diese Konzentration könnte wiederum ausreichend sein, eine signifikante Freisetzung inflammatorischer Mediatoren zu induzieren. Bei der für die Experimente zur Verfügung stehenden LPS-Präparation ist nach Herstellerangaben trotz intensiver Aufreinigung mit einer bis zu 5 %igen Verunreinigung zu rechnen. Allerdings finden sich in der Literatur vergleichbare Daten zu LPS-Stimulationsexperimenten in C57BL/10ScCr-Mäusen, die keine absolute Resistenz, sondern lediglich eine Hyposensitivität gegenüber LPS zeigen. NOD TLR4^{-/-} Mäuse weisen jedoch LPS-induzierte Reaktionen auf, die die erwartete deutlich verringerte Ansprechbarkeit überschreiten. Um die Vermutung zu prüfen, dass eine Verunreinigung des LPS für die relativ erhöhte Aktivierung der TLR4-defizienten Zellen verantwortlich ist, könnte ein synthetischer TLR4-Agonist (z.B. synthetisch hergestelltes Lipid A) eingesetzt werden. Obwohl nicht auszuschließen ist, dass selbst synthetisch hergestellte TLR4-Agonisten einen gewissen Anteil von Verunreinigungen enthalten, könnte das Ausbleiben einer Stimulation von TLR4-defizienten Zellen durch diese Substanz als ein erster Hinweis für eine LPS-Verunreinigung als Stimulanz von TLR4-defizienten Zellen gewertet werden. Die noch vor einigen Jahren häufig angewendete Methode der Hitzebehandlung der verwendeten LPS-Präparation zur Deaktivierung hitzelabiler Verunreinigungen ist nach Untersuchungen von Gao et al. nur bedingt einsetzbar (119, 120), da die Endotoxin-Aktivität des LPS nicht, wie bislang angenommen, vollständig hitzeresistent ist (121, 122, 123).

Als potentielle verunreinigende Substanzen kämen aufgrund des Aufreinigungsverfahrens Lipoproteine sowie Nukleinsäuren in Frage. Damit könnten verunreinigende Lipoproteine in den LPS-Präparationen über den TLR2 auch in TLR4-defizienten Zellen eine Antwort induzieren. So war eine Kontamination mit Lipoproteinen (124) auch für die ursprüngliche, fälschliche Annahme verantwortlich, dass TLR2 der langgesuchte LPS-Rezeptor sei (125).

In der Literatur finden sich zahlreiche Belege, dass sich TLR4 und TLR2 durch ihre Signaltransduktion gegenseitig in ihrer Expression beeinflussen (125, 126, 127, 128, 129, 130). Zusätzlich wäre daher denkbar, dass TLR4^{-/-} Mäuse zur Kompensation der TLR4-Defizienz die Expression des TLR2 hochregulieren, da die Signaltransduktionswege ähnlich verlaufen und in beiden Fällen NF κ B aktivieren (131). Diese Vermutung wird auch von Lorenz diskutiert (129),

der beschreibt, dass die Abwesenheit des TLR4-Proteins möglicherweise eine Veränderung hin zu einer TLR2 induzierten Immunantwort verstärkt. Auch Nagai et al. stellt die These auf, dass TLR2 und TLR4 das Fehlen des jeweils anderen Rezeptors kompensieren könnten (132).

Um diese Annahme zu prüfen, wurde zur Stimulation von isolierten Milzzellen aus NOD-Mäusen beider *tlr4*-Genotypen der TLR2-Ligand MALP-2 eingesetzt. Der Befund, dass sich die MALP-2-induzierte Zytokinfreisetzung in den adhären Milzzellfraktionen beider Mäuse nicht unterscheidet, weist daraufhin, dass die TLR2-abhängige Reaktivität in den TLR4-defizienten Mäusen nicht hochreguliert ist.

Um oben genannte Theorie jedoch bei der Entwicklung eines komplexen Krankheitsgeschehens wie dem insulinabhängigen Diabetes vertiefend zu untersuchen, wäre es angebracht, in weiterführenden Experimenten eine TLR2/TLR4-defiziente Mutante einzusetzen. Wenn nach LPS-Stimulation in Zellen dieser Mutante eine Antwort ausbleiben würde, könnte dies als Beleg für die Beteiligung von TLR2 an der Aktivierung und Zytokinfreisetzung von TLR4-defizienten Zellen gewertet werden.

4.4 Immunzellpopulationen

Während des Krankheitsverlaufes des Typ 1 Diabetes kommt es zur progressiven Zerstörung der pankreatischen β -Zellen durch Immunzellen und deren Mediatoren. Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Makrophagen, bei denen es sich um die initialen inselinfiltrierenden Immunzellen handelt, werden in ihrer inflammatorischen Aktivität wesentlich durch TLR4 kontrolliert. Überraschenderweise zeigt sich aufgrund der TLR4-Defizienz eine beschleunigte Diabetesentwicklung bei NOD TLR4^{-/-} Mäusen, die sich bereits in der prädiabetischen Phase in einer ausufernden Immunreaktion gegen die Langerhans'schen Inseln und das umliegende exokrine Pankreasgewebe widerspiegelt. Eine erhöhte Suszeptibilität der Inselzellen TLR4-defizienter NOD-Mäuse gegenüber β -zellschädigenden inflammatorischen Zytokinen konnte allerdings ausgeschlossen werden. TLR4-Defektmäuse zeigen auch keine Anzeichen für eine in der TLR4-Defizienz begründete Immunschwäche. Sie haben keine vergrößerte Milz und weisen vergleichbare Anteile an nicht-adhären und adhären Milzzellpopulationen auf wie ihre TLR4-exprimierenden Geschwister.

Als Ursache für die beschleunigte Diabetesentwicklung sind zwei verschiedene Szenarien denkbar: die Existenz von aggressiveren oder leichter stimulierbaren Immunzellen (vgl. 4.4.1), sowie das Vorliegen einer defekten Regulation der Immunantwort (vgl. 4.4.2).

4.4.1 Hyperreaktivität von Immunzellen TLR4-defizienter NOD-Mäuse

4.4.1.1 Freisetzung inflammatorischer Mediatoren

LPS induziert sowohl in TLR4^{+/+} Immunzellpopulationen aus Milzen des C57BL/10Sc-Parentalstammes als auch in den Populationen der NOD-TLR4-Linie eine Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen. Jedoch zeigen sich offenbar aufgrund der unterschiedlichen genetischen Hintergründe, verschiedene Ausprägungen der LPS-induzierten Zytokinfreisetzung. Setzen die verschiedenen TLR4-exprimierenden Immunzellpopulationen des Parentalstammes

bereits ab Konzentrationen von 1 ng/ml LPS signifikant mehr Zytokine frei als die TLR4-defizienten, zeigen Zellen der NOD-Maus eine deutlich geringere LPS-Sensitivität. Erst ab Konzentrationen von 10 ng/ml LPS ist ein Anstieg in der Zytokinsekretion zu beobachten. Da jedoch die TLR4-defizienten Immunzellpopulationen sowohl des Parentalstammes als auch der NOD-Linie ebenfalls auf diese LPS-Konzentration reagieren, liegt die Vermutung nahe, dass diese Effekte durch die bereits diskutierten möglichen Verunreinigungen der eingesetzten LPS-Präparation und die Aktivierung anderer Rezeptoren aus der TLR Familie verursacht werden (vgl.4.3). Festzuhalten ist jedoch, dass die Zytokinfreisetzung von TLR4-defizienten Zellen aus Mäusen mit NOD-Hintergrund leichter zu induzieren ist als die Sekretion durch TLR4-exprimierende Zellen. Unabhängig von der Identität der beteiligten Rezeptoren scheinen somit die Immunzellpopulationen der NOD TLR4^{-/-} Maus im Hinblick auf eine Stimulation durch LPS-Präparationen reaktiver zu sein. ConA und IL-2, die als TLR4-unabhängige Agenzien eingesetzt wurden, bewirken entweder eine vergleichbare Stimulation der Zellen mit unterschiedlichem TLR4-Expressionsstatus, oder im Fall der nicht-adhären, IL-2-exponierten Milzzellen eine Hyperreaktivität der TLR4-defizienten NOD-Zellen bei hohen Konzentrationen des Stimulus (50 ng/ml).

Die Befunde deuten insgesamt auf eine höhere Aktivierungsschwelle der NOD-TLR4-Mäuse hin. Gelingt es jedoch nach Überschreitung dieser Schwelle eine Antwort zu induzieren, scheinen TLR4-defiziente Zellen der NOD-Maus proinflammatorisch aktiver zu sein als Zellen der C57BL/10Sc-Maus.

4.4.1.2 Proliferation und metabolische Aktivität

Neben der LPS-induzierten Freisetzung inflammatorischer Mediatoren spiegeln sich auch bei der Stimulus-induzierten Proliferation der verschiedenen Milzzellpopulationen die verschiedenen genetischen Hintergründe des Parental- und des NOD-Stammes wieder. Wie erwartet steigt die Proliferation LPS-exponierter, TLR4-exprimierender Milzzellen des Parentalstammes konzentrationsabhängig an, während TLR4-defiziente Zellen auf den LPS-Stimulus hin keine Veränderung ihrer Proliferationsrate zeigen. Auf dem NOD-Hintergrund dagegen zeigt sich bei hohen LPS-Konzentrationen eine gesteigerte Proliferation TLR4-defizienter unfractionierter Milzzellen. Diese verstärkte Proliferation (Hyperreaktivität) zeigt sich auch bei Verwendung anderer, TLR4-unabhängiger Stimuli, in beiden untersuchten Milzzellfraktionen. Ein ähnlicher Trend zeichnet sich auch bezüglich der metabolischen Aktivität ab. Bei hohen Konzentrationen der Stimuli übersteigt die metabolische Aktivität von NOD TLR4^{-/-} Milzzellen die Aktivität der NOD TLR4^{+/+} Zellen. Die vorliegenden Daten implizieren somit eine generelle Hyperreaktivität TLR4-defizienter Milzzellen aus Mäusen mit NOD-Hintergrund im Vergleich zu Milzzellen auf TLR4-exprimierenden Mäusen.

4.4.2 Effekt des TLR4-Expressionsstatus auf die Frequenz und funktionelle Aktivität von Treg

4.4.2.1 Effekt des TLR4-Expressionsstatus auf die Treg-Frequenz

Krankheiten mit autoimmunem Charakter, wie der T1D sind Ausdruck einer gestörten Immuntoleranz gegenüber körpereigenen Strukturen (Selbst). Die Unterscheidung zwischen Selbst und Nicht-Selbst erfordert eine fein kontrollierte Balance zwischen der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz gegenüber Autoantigenen und der Fähigkeit eine protektive Immunantwort gegen Pathogene auszuführen und zu limitieren.

Eine CD4- und CD25-koexprimierende T-Zellpopulation mit regulatorischem Potenzial, die Treg, ist in der Lage, autoreaktive Effektorzellen in ihrer Aktivität zu supprimieren und dadurch die Entwicklung von Auto-Immunreaktionen zu verhindern.

Die Befunde zur Pankreashistologie der NOD-Mäuse mit unterschiedlichem TLR4-Expressionsstatus zeigen ein deutliches Überschießen der primär gegen Inselstrukturen gerichteten Immunreaktion in TLR4-defizienten NOD-Mäusen. Diese unkontrollierte Immunantwort in den TLR4-Defektmäusen deutet auf eine Störung in der Regulation der Effektorzellen hin. Eine verminderte Frequenz der Treg als Ursache dieser Störung, konnte durch Zellzahlbestimmungen während der Anreicherung der Treg-Population aus der Milz ausgeschlossen werden. Das für die Treg-Anreicherung eingesetzte Verfahren basiert auf der Selektion von CD4 CD25 doppelt positiven T-Lymphozyten mit Hilfe antikörpergekoppelter magnetischer *beads* (MACS). Da die CD25-Struktur als Teil des IL-2-Rezeptors aber auch von nicht regulatorischen, aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird, stellt dieses Molekül keinen spezifischen Marker für Zellen mit regulatorischem Potenzial dar (133). Bisher ist es jedoch noch nicht gelungen, einen Oberflächenmarker zu identifizieren, der hochselektiv für regulatorisch aktive Zellen innerhalb der CD4⁺ CD25⁺ Population ist. Allerdings konnte als spezifischer intrazellulärer Marker für Treg in Mäusen das Foxp3-Protein identifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Frequenz der Treg in NOD-Mäusen mit verschiedenem TLR4-Expressionsstatus zusätzlich in vergleichenden FACS-Analysen anhand von CD4/Foxp3-Doppelfärbungen ermittelt. Auf diese Weise konnte der auch schon bei der MACS-Aufreinigung erhobene Befund bezüglich der vergleichbaren Frequenz regulatorischer T-Lymphozyten in den Mäusen verschiedener NOD-TLR4-Genotypen bestätigt werden. Die Ergebnisse beider Verfahren lassen lediglich einen Trend in Hinblick auf eine leicht geringere Treg Zahl in TLR4-Defekttieren sowohl des Parentalstammes als auch des NOD-Stammes erkennen. Die im Vergleich zu den FACS-Messungen nach der MACS-Aufreinigung stark verminderten prozentualen Anteile der Treg an der Gesamtmilzpopulation sind auf Zellverluste während der einzelnen Anreicherungsschritte zurückzuführen.

Die allgemeine Frequenz regulatorischer T-Lymphozyten entspricht in naiven Wildtypmäusen sowie im Menschen 5 - 10% der peripheren CD4⁺ T-Lymphozyten (134, 135). Zurzeit wird jedoch kontrovers diskutiert, ob im NOD-Mausmodell, vergleichbar zur Situation in Patienten mit T1D (136), die Frequenz der Treg verringert ist (108, 137, 138). Wie bereits unter 4.1 diskutiert, weisen die in der vorliegenden Arbeit verwendeten NOD-Mäuse aus der Kolonie am DDZ eine Lymphopenie auf. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die absolute Zahl

an Treg in diesen Tieren geringer ist als in Tieren ohne NOD-Hintergrund, dass jedoch der prozentuale Anteil der Treg an der Gesamtlymphozytenzahl unverändert bleibt. Aufgrund dieser Beobachtung liegt die Vermutung nahe, dass in NOD TLR4^{-/-} Mäusen kein Ungleichgewicht zwischen Effektor T-Lymphozyten und Treg vorliegt, das zu einer ungehemmten Aktivierung von inselzellspezifischen T-Lymphozyten führen könnte.

Neben der Treg-Frequenz wurde innerhalb der FACS-Analysen, die mittlere Foxp3-Fluoreszenzintensität innerhalb der verschiedenen TLR4-Genotypen verglichen. Der Transkriptionsfaktor Foxp3 ist ein Schlüsselregulator für die Entwicklung und Funktion der natürlichen CD4⁺ CD25⁺ Treg (139). Daher bietet die Analyse zur Expressionsstärke dieses wichtigen Transkriptionsfaktors Aufschluss über die Funktionalität der Treg. Unterschiede in der Foxp3-Expressionsstärke könnten als Indiz für einen funktionalen Treg-Defekt in TLR4^{-/-} Mäusen gewertet werden. Es konnten jedoch innerhalb der NOD-TLR4-Linie keine Unterschiede bezüglich der Foxp3-Expressionsstärke festgestellt werden; signifikant geringere Foxp3-Expressionsstärken von CD4⁺ NOD-Milzzellen konnten aber im Vergleich zum TLR4-exprimierenden C57BL/10Sc-Parentalstamm dokumentiert werden. Dieser Befund stützt die generelle Auffassung, dass NOD-Mäuse einen Treg-Defekt aufweisen, der zur Diabetessuszeptibilität dieses Stammes beitragen könnte (138, 140).

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten zeigen somit, dass die TLR4-Defizienz weder die Frequenz noch die Foxp3-Expressionsstärke der Treg signifikant beeinflusst.

4.4.2.2 Funktionelle Charakterisierung der Treg in Abhängigkeit vom TLR4-Expressionsstatus

Während Caramalho et al. die TLR4-Expression von Treg hauptsächlich durch den Nachweis von TLR4 mRNA belegten (141), stützte sich die vorliegende Arbeit auf den Nachweis von funktionell aktivem TLR4 durch Untersuchungen zur Reaktivität von Treg auf den TLR4-spezifischen Liganden LPS. Da nicht unbedingt davon ausgegangen werden kann, dass die proliferative und die metabolische/regulatorische Aktivität von Treg parallel verlaufen, wurde als primärer Parameter in dieser Arbeit die metabolische Aktivität untersucht, da vermutlich durch diesen Parameter eher das suppressive Potenzial der Zellpopulation erfasst werden kann. Die Stimulation mit LPS zeigt, dass die metabolische Aktivität TLR4-exprimierender Treg konzentrationsabhängig ansteigt, wohingegen TLR4-defiziente Treg in Gegenwart von LPS ihre metabolische Aktivität nicht verändern. Die metabolische Aktivität TLR4-defizienter Responderzellen ist sowohl im Parentalstamm als auch im NOD-Stamm per se erhöht. Die Hyperreaktivität verschiedener TLR4-defizienter Milzzellpopulationen wird dagegen, wie bereits unter 4.4.1 diskutiert, meist erst bei der Antwort auf einen Stimulus hin offenkundig.

Um eine mögliche TLR4-Abhängigkeit der suppressiven Aktivität von Treg zu belegen, wurden CD4⁺ CD25⁺ Treg und CD4⁺ CD25⁻ Responderzellen von NOD TLR4^{+/+} und NOD TLR4^{-/-} Mäusen kokultiviert. Während in der TLR4-exprimierenden Kokultur die metabolische Aktivität erwartungsgemäß absank, verblieb die metabolische Aktivität der TLR4-defizienten Kokultur auf einem signifikant höheren Niveau. Diese Beobachtung dokumentiert eine deutlich verringerte suppressive Kapazität von Treg TLR4-defizienter NOD-Mäuse.

Zusammengefasst weisen die Befunde somit daraufhin, dass in TLR4-defizienten NOD-Mäusen metabolisch aktivere Responderzellen auf Treg mit geschwächtem Suppressorpotenzial treffen.

4.5 Wechselwirkungen zwischen Metabolismus und Immunsystem

Die Aufrechterhaltung der strukturellen und funktionellen Integrität eines Organismus hängt zum einen von der Fähigkeit ab, mikrobielle Infektionen zu bekämpfen und Schäden zu heilen, und zum anderen von der Fähigkeit Energie für Zeiten eines geringeren Nahrungsangebotes oder Zeiten eines erhöhten Bedarfs zu speichern. Damit zählen ein intaktes Immunsystem sowie ein funktionierendes metabolisches System zu den Basiserfordernissen im Tierreich (55). Hotamisligil und seine Gruppe propagieren folgerichtig Wechselwirkungen zwischen diesen beiden wichtigen Systemen, unter anderem aufgrund der überlappenden Biologie und Funktion von Makrophagen und Fettzellen im pathologischen Zustand der Adipositas (55). Das Genexpressionsprofil der beiden Zelltypen ist sehr ähnlich. Genprodukte, die sich in den Profilen beider Zelltypen wieder finden sind sowohl Marker wie *fatty acid binding protein* aP2 (FABP aP2) (142) und PPAR γ (143), als auch Zytokine wie IL-6 (144, 145) und Metalloproteinasen (146). Funktionelle Eigenschaften dieser Zelltypen überlappen ebenfalls. Die Fähigkeit Fett aufzunehmen und zu speichern beschränkt sich nicht nur auf Adipozyten. Auch Makrophagen sind in der Lage, während der Entwicklung von atherosklerotischen Gefäßveränderungen Schaum-Zellen zu bilden, die Lipide aufnehmen und speichern können (147). Präadipozyten weisen im Gegenzug auch einige makrophagentypische Eigenschaften auf, wie die Fähigkeit zu Phagozytieren. In einer entsprechenden Umgebung sind sie sogar in der Lage, zu Makrophagen zu differenzieren (58, 94). Dieser Sachverhalt, zusammen mit der Fähigkeit inflammatorische Mediatoren freizusetzen, deutet daraufhin, dass Präadipozyten auch eine Rolle als immunologisch aktive Zellen spielen können.

Mit zunehmender Adipositas kann eine vermehrte Einwanderung von Makrophagen in das Fettgewebe beobachtet werden. Da Makrophagen im Fettgewebe zur Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren beitragen und die Hauptquelle von TNF- α , einem sowohl proinflammatorisch aktiven als auch insulinresistenzfördernden Zytokin (56, 57) sind, wäre es denkbar, dass Makrophagen einen wesentlichen Einfluss auf die Förderung von Insulinresistenz haben.

Insulinresistenz, im Krankheitsbild des T2D stark assoziiert mit Adipositas, konnte mittlerweile auch in Patienten mit T1D nachgewiesen werden (148). Kürzlich konnte zudem bei Patienten mit subklinischer Immunreaktivität gegen autologe Inselstrukturen gezeigt werden, dass Insulinresistenz einen unabhängigen Risikofaktor für die Progression zum manifesten Diabetes darstellt (149).

Zurzeit wird davon ausgegangen, dass eine erworbene Adipositas einer Insulinresistenz vorangeht und somit die Entwicklung eines T2D begünstigt. Neuere Befunde lassen jedoch vermuten, dass auch im T1D eine Insulinresistenz vorliegen kann (149, 150). Eine alternative, aber nicht widersprüchliche Auffassung ist daher, dass Insulinresistenz Aktivitäten von

angeborenen und erworbenen Immunantworten widerspiegelt, die zur β -Zellzerstörung und schließlich zur Manifestation des T1D führen (150).

Somit scheint es auch bei der Pathogenese des T1D eine Verbindung zwischen dem Immunsystem und dem metabolischen System zu geben.

4.6 Akzelerator-Hypothese

Der Befund des Vorliegens von Insulinresistenz in T1D stützt die so genannte Akzelerator-Hypothese. Diese Hypothese postuliert, dass dem T1D und T2D die gleiche Funktionsstörung (Insulinresistenz) zugrunde liegt, die lediglich auf einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund trifft. Allein die Geschwindigkeit der Diabetesentwicklung soll die beiden Diabetesformen unterscheiden. Die Akzelerator-Hypothese fordert drei Bedingungen, die variabel den β -Zellverlust durch Apoptose beschleunigen: Konstitution, Insulinresistenz und Autoimmunität. Keiner dieser drei beschleunigenden Faktoren führt jedoch ohne eine deutliche Körpergewichtszunahme zur Diabetesentwicklung (25). Diesen Sachverhalt erachtet die Akzelerator-Hypothese als verantwortlich für die steigende Inzidenzrate beider Diabetestypen in den Industrienationen. Gewichtszunahme führt zu einem Anstieg der Insulinresistenz, die in einer Schwächung der Glukosekontrolle resultiert. Die steigende Blutglukose führt in den gestressten β -Zellen zu einer beschleunigten Apoptose. Die in der Folge von apoptotischen Zellen freigesetzten autologen Antigene werden von dendritischen Zellen präsentiert und lösen eine Immunreaktion aus, welche die Diabetesentwicklung in genetisch autoimmunprädisponierten Personen weiter beschleunigt.

In den letzten Jahren wurde die Akzelerator-Hypothese mehrfach mit unterschiedlichen Ergebnissen geprüft (151, 152, 153, 154, 155, 156, 157).

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Befunde zur beschleunigten Körpergewichtsentwicklung in TLR4-defizienten NOD-Mäusen bei gleichzeitig beschleunigter Diabetesentwicklung stützen die Akzelerator-Hypothese, die weiterhin kontrovers diskutiert wird.

Über die Ursache des beobachteten erhöhten Körpergewichts kann nur spekuliert werden. Ein abschließender Beweis für ein vermehrtes Fettgewebe in den TLR4-defizienten Mäusen mit erhöhtem Körpergewicht könnte mit Hilfe der Magnet-Resonanz-Spektrographie erbracht werden. Diese Analysen sind jedoch mit einem hohen zeitlichen und apparativen Aufwand verbunden, der den Rahmen dieser Arbeit gesprengt hätte. In der Literatur finden sich jedoch Belege, dass ein erhöhtes Körpergewicht aufgrund von TLR4-Defizienz auf eine vermehrte Fettmasse zurückzuführen ist.

Die Beobachtung, dass der TLR4 das Körpergewicht beeinflusst, wird von anderen Studien gestützt. Shi et al., sowie Divanovic et al. sehen ebenfalls eine Zunahme des Körpergewichts in TLR4-defizienten Mausmodellen (69, 158); Shi et al. erbringen zudem den Beweis, dass das erhöhte Körpergewicht aufgrund der TLR4-Defizienz auf eine vermehrte Fettmasse zurückzuführen ist. Lediglich Johnson et al. beschreibt in Mausmodellen einen durch TLR4-Defizienz bedingten, schlanken „Adonisphänotyp“ (159). Shi et al. beschreibt einen TLR4-abhängigen Einfluss auf die Körpergewichtsentwicklung weiblicher C57BL/6J-Mäuse, der auch

in den in dieser Arbeit eingesetzten NOD-TLR4-Mäusen beobachtet wurde (69). Dies ist ein Hinweis darauf, dass der Einfluss des TLR4 auf die Körpergewichtsentwicklung nicht nur auf die NOD-Maus beschränkt ist, sondern sich auch in anderen Mausstämmen ausprägt.

Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde und der Hinweise von anderen Arbeitsgruppen wäre von Bedeutung, in zukünftigen Analysen zu untersuchen, ob unterschiedliche Diäten (z. B. Hochfettdiät) einen beschleunigenden Einfluss auf die Entwicklung eines erhöhten Körpergewichts in NOD TLR4^{-/-} Mäusen haben. In weiterführenden Untersuchungen sollte zudem z. B. durch indirekte Kalorimetrie der Frage nachgegangen werden, ob TLR4-defiziente Mäuse mehr Nahrung zu sich nehmen, diese besser verwerten als ihre TLR4-exprimierenden Geschwister oder diese infolge reduzierter körperlicher Aktivität in geringerem Maße verbrauchen. Shi et al. konnten in einem TLR4-defizienten Mausmodell ohne Diabetessuszeptibilität nachweisen, dass das erhöhte Körpergewicht auf eine erhöhte Futteraufnahme zurückzuführen ist (69). Ob dies auch auf das NOD-TLR4-Modell zutrifft, bedarf weiterer Untersuchungen. Inwieweit TLR4 möglicherweise in die Regulation des Appetits involviert ist, ist derzeit unbekannt. Die Expression von TLR4 konnte jedoch in einigen Gehirnregionen nachgewiesen werden (160), so dass vermutet werden kann, dass TLR4 auch an der Regulation neuronaler Funktionen beteiligt ist.

In einer ersten Annäherung an die Frage nach einem möglichen Einfluss des TLR4 auf metabolische Parameter wurde in dieser Arbeit innerhalb eines ipGTT der Effekt von TLR4 auf die Glukosetoleranz untersucht. Da für diese Studie nur eine begrenzte Tierzahl zur Verfügung stand, konnte diese Fragestellung nicht abschließend beantwortet werden. Es zeichnete sich lediglich ein Trend zu einer verbesserten Glukosetoleranz in NOD TLR4^{-/-} Mäusen ab.

Die Beobachtung, dass sich die Glukosetoleranz der NOD-Mäuse verschiedener Genotypen unter Standard-Diät nicht signifikant unterscheidet, und sich lediglich ein gewisser Trend zu einer besseren Glukosetoleranz in TLR4-defizienten NOD-Mäusen abzeichnet, stimmt mit Beobachtungen von Shi et al. überein (69), die in TLR4-exprimierenden und TLR4-defizienten C57BL/6J-Mäusen hinsichtlich einer Insulinresistenz erst dann einen signifikanten Unterschied finden, wenn die Mäuse mit einer Hochfettdiät behandelt wurden. Unter Standard-Diät ist lediglich ein Trend in Richtung geringerer Insulinresistenz in TLR4-defizienten Mäusen zu erkennen, der sich unter hochkalorischer Diät zu einem signifikanten Unterschied ausweitet.

Shi et al. postulieren, dass TLR4 eine molekulare Verbindung zwischen Ernährung, Lipiden und Inflammation darstellt (69). Demnach trägt das angeborene Immunsystem zur Regulation der Energiebalance und der Insulinresistenz bei. Diese Vorstellung unterstützt die Auffassung von Hotamisligil und Wellen (55), dass es sich beim metabolischen System und dem Immunsystem nicht um zwei völlig unabhängige Systeme handelt, sondern beide das jeweils andere System beeinflussen. Insgesamt deuten die im Rahmen dieser Dissertation beschriebenen Daten ebenfalls auf Interaktionen zwischen den beiden Systemen hin. Eine potenzielle Interaktion spiegelt sich allein schon in der Expression des ursprünglich nur auf angeborenen Immunzellen nachgewiesenen TLR4 auf Adipozyten wieder.

4.7 Einfluss der TLR4-Defizienz auf die inflammatorischen Aktivitäten des Fettgewebes

Weibliche TLR4-defiziente NOD-Mäuse zeigen neben einer beschleunigten Diabetesentwicklung auch eine signifikant beschleunigte Entwicklung ihres Körpergewichts und bleiben auch im adulten Zustand schwerer als ihre TLR4-exprimierenden Geschwister. Aufgrund dieses Sachverhaltes, der vermutlich auf eine erhöhte Körperfettmasse zurückzuführen ist, wurde das Fettgewebe in die Untersuchung zu den Auswirkungen des TLR4-Defektes im NOD-Modell mit einbezogen. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen konzentrieren sich dabei auf das viszerale Fettgewebe, da insbesondere für dieses Fettdepot eine erhöhte inflammatorische Aktivität und verstärkte Immunzellinfiltration nachgewiesen werden konnte (100).

Histologische Präparate des viszeralen Fettgewebes von NOD-TLR4-Mäusen zeigen deutliche morphologische Unterschiede zwischen NOD TLR4^{+/+} und NOD TLR4^{-/-} Mäusen. Im Vergleich zum viszeralen Fettgewebe TLR4-exprimierender Mäuse besteht das Fettgewebe TLR4-defizienter Mäuse größtenteils aus Zellen mit präadipozytenähnlicher Morphologie. Aufgereinigte Präadipozyten aus diesem Gewebe sezernieren auf LPS-Stimulation hin signifikant höhere Mengen des Zytokins IL-6 und der Chemokine KC und MCP-1 als reife Adipozyten. Da diese Chemokine Makrophagen anlocken und ein vermehrtes Fettgewebe per se mit einer erhöhten Infiltration durch Makrophagen und dadurch bedingt mit erhöhter inflammatorischer Aktivität assoziiert ist (100), deuten die Befunde insgesamt auf ein verstärktes inflammatorisches Geschehen im Fettgewebe der NOD TLR4^{-/-} Maus hin. In ersten Experimenten konnte die Infiltration des Fettgewebes durch Makrophagen auch indirekt durch die LPS-induzierte TNF- α -Freisetzung aus Fettgewebsfragmenten bestätigt werden. Da aufgereinigte Prä- und reife Adipozyten kein TNF- α sezernieren (Daten nicht gezeigt), muss davon ausgegangen werden, dass die TNF- α -Sekretion des intakten Fettgewebes auf infiltrierte Immunzellen, höchstwahrscheinlich Makrophagen, zurückzuführen ist. Die TNF- α -Freisetzung durch Adipozyten wurde in der Literatur kontrovers diskutiert, mittlerweile setzt sich jedoch die Auffassung durch, dass gemessene TNF- α -Spiegel in Adipozytenkulturen auf Kontaminationen durch Makrophagen zurückzuführen sind (103).

Zusammenfassend implizieren die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Befunde somit, dass das vermehrte Fettgewebe in NOD TLR4^{-/-} Mäusen nicht hauptsächlich auf Hypertrophie von reifen Adipozyten, sondern vielmehr auf Hyperplasie der Präadipozyten zurückzuführen ist. Diese Annahme stützt sich insbesondere auch auf Studien, die zeigen, dass Adipozyten in einem inflammatorischen Milieu zwar proliferieren, aber nicht differenzieren können (161, 162).

4.8 Einfluss der TLR4-Defizienz auf Adipozyten

Um den Effekt von TLR4 auf die Induktion des inflammatorischen Potenzials von Adipozyten zu analysieren, wurden Prä- und reife Adipozyten aus dem viszeralen Fettgewebe von NOD TLR4^{+/+} und NOD TLR4^{-/-} Mäusen isoliert. Die Identität der aufgereinigten Adipozyten konnte durch die Morphologie, durch den Fettgehalt und durch den Ausschluss des Makrophagenmarkers CD11b mittels FACS-Analysen bestätigt werden. In allen untersuchten

Adipozytenpopulationen erwiesen sich die beiden Stresssignale LPS und Hsp60 als potente Stimuli für die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen. Inflammatorische Bedingungen, die in der Regel durch das simultane Auftreten mehrerer Stresssignale charakterisiert sind, wurden nachgeahmt in dem Adipozyten gleichzeitig LPS und Hsp60 exponiert wurden. Die Kombination der beiden Stimuli führte in Zellen der Linie 3T3-L1 zu einem synergistischen Effekt.

LPS-Stimulation führte bei Adipozyten von NOD-Mäusen beider TLR4-Genotypen zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren. Adipozyten sowohl der NOD TLR4^{+/+} als auch der NOD TLR4^{-/-} Maus antworten bereits auf sehr geringe LPS-Konzentrationen, was auf eine niedrige Aktivierungsschwelle hindeutet. Im Fall des Chemokins KC reichen bereits Konzentrationen von 0,1 ng/ml LPS aus, einen deutlichen Anstieg der Sekretion hervorzurufen. Da vermutlich, wie bereits unter 4.3 diskutiert, eine Kontamination der LPS-Präparation für die Induzierbarkeit der Zytokin- und Chemokinsekretion von Adipozyten der NOD TLR4^{-/-} Maus mit verantwortlich sein könnte, liegt die Aktivierungsschwelle der TLR4-defizienten Adipozyten möglicherweise deutlich unterhalb der von Zellen der NOD TLR4^{+/+} Maus. In einigen experimentellen Ansätzen reagierten TLR4-defiziente Prä- und Adipozyten auf LPS-Konzentrationen ab 1 ng/ml mit einer deutlich erhöhten Freisetzung von IL-6, MCP-1 bzw. KC. Da diese Zellen jedoch nicht in der Lage sein sollten, LPS zu erkennen, muss vermutet werden, dass die stimulatorische Aktivität von einer kontaminierenden Substanz in der LPS-Präparation ausgeht. Bei einer angenommenen LPS-Verunreinigung von 5 % hieße das, dass von den 1 ng/ml LPS, die zur Stimulation der TLR4-defizienten Adipozyten eingesetzt wurden, nur 0,05 ng/ml der kontaminierenden Substanz ausreichen, um eine Sekretion von inflammatorischen Mediatoren durch TLR4^{-/-} Zellen zu induzieren.

Im Gegensatz zu Präadipozyten benötigen reife Adipozyten eine 10 fach höhere Konzentration zur Induktion einer Antwort. Diese verzögerte Aktivierbarkeit der reifen Adipozyten, zusammen mit der geringeren Zytokinproduktion im Vergleich zu Präadipozyten, sind neben dem Vorkommen von Zellen mit einer mehr präadipozytenähnlichen Morphologie im Fettgewebe TLR4-defizienter Mäuse, weitere Indizien für eine erhöhte Neigung zu proinflammatorischer Aktivität in TLR4-Defektmäusen.

Erste Hinweise deuten daraufhin, dass eine Aktivierung von Toll-like Rezeptoren während der Differenzierung das inflammatorische Potenzial der reifen Adipozyten beeinflusst. Bei einer Reifung in Gegenwart von LPS zeigen Adipozyten der TLR4^{+/+} Maus zwei Tage nach Abschluss des Differenzierungsprotokolls zunächst eine LPS-Desensibilisierung, nach 15 Tagen jedoch eine erhöhte LPS-Reaktivität. Die LPS-Reaktivität von Adipozyten, die in Gegenwart von 100 ng/ml LPS differenziert wurden, zeigt am Tag 15 nach Differenzierungsbeginn keine Konzentrationsabhängigkeit. Im Gegensatz zur Induzierbarkeit der IL-6-Freisetzung, konnte am Tag 15 keine MCP-1-Freisetzung dieser Zellen stimuliert werden. Da bekannt ist, dass die Gegenwart von Stresssignalen die Differenzierung von Adipozyten beeinflusst (161, 162, 163), könnte die beobachtete veränderte LPS-Reaktivität der in Gegenwart von hohen LPS-Konzentration differenzierten Adipozyten auf einen gestörten Reifungsprozess zurückzuführen sein.

Zusammenfassend zeigt sich in NOD TLR4^{-/-} Mäusen im Hinblick auf das Fettgewebe folgendes Bild. Aufgrund der erhöhten Fettmasse im Vergleich zu Wildtypmäusen, besitzen TLR4-defiziente Mäuse mehr Adipozyten. Morphologische Analysen deuten daraufhin, dass der Differenzierungsgrad dieser Zellen eher dem unreifer Präadipozyten entspricht. Stimulationsexperimente zeigen, dass Präadipozyten eine geringere Aktivierungsschwelle aufweisen und mehr Mediatoren freisetzen als reife Adipozyten. Zusammengenommen deuten diese Befunde daraufhin, dass das viszerale Fettgewebe der TLR4-defizienten Mäuse ein höheres inflammatorisches Milieu aufweist.

4.9 Hypothetisches Modell zur beschleunigten Diabetesentwicklung in TLR4-defizienten NOD-Mäusen

Der natürliche Verlauf der Diabetespathogenese in der NOD-Maus wird dominiert von einer progressiven immunzellvermittelten Zerstörung insulinproduzierender β -Zellen in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas. Als grundlegender Mechanismus der Erkrankung wird eine mangelnde Suppression autoreaktiver Immunprozesse diskutiert.

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde an TLR4-defizienten NOD-Mäusen belegen nun erstmals eine wichtige regulatorische Rolle von TLR4 bei der Entwicklung des immunvermittelten Insulinmangeldiabetes der NOD-Maus. Aus den neu gewonnenen Erkenntnissen lässt sich, unter Einbeziehung bisheriger Befunde aus der NOD-Maus und anderen Tiermodellen des T1D, das nachfolgend ausgeführte hypothetische Modell zur Beteiligung des TLR4 an der Immunpathogenese des Diabetes in der NOD-Maus entwickeln (Abb. 53).

Die in der TLR4-defizienten NOD-Maus nachgewiesene reduzierte inhibitorische Aktivität der regulatorischen T-Zellpopulation resultiert in einer verminderten Hemmung autoreaktiver Immunprozesse. Dies führt zu einer weiteren Reduktion der in der NOD-Maus ohnehin verminderten Toleranz gegenüber autologen β -Zellen und trägt in der Folge zu der beobachteten Beschleunigung der Inselinfiltration und der Diabetesentwicklung bei.

Gleichzeitig führt die erhöhte Fettgewebssmasse, die als wesentliche Ursache für die beobachtete beschleunigte Körpergewichtszunahme TLR4-defizienter NOD-Mäuse angesehen werden muss, zu einer vermehrten Einwanderung von Makrophagen in das Fettgewebe. Das fortschreitende inflammatorische Geschehen im Fettgewebe, das zusätzlich durch die beobachtete Hyperreaktivität der Lymphozyten TLR4-defizienter Mäuse begünstigt wird, ist gekennzeichnet durch die Bildung von Immunmediatoren mit proinflammatorischen (TNF- α) und chemotaktischen (MCP-1) Eigenschaften. Da diesen Mediatoren eine hemmende Wirkung auf die Adipozytendifferenzierung zugeschrieben wird, kann ihre vermehrte lokale Freisetzung zu dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen erhöhten Anteil von Zellen mit präadipozytenähnlicher Morphologie im viszeralen Fettgewebe TLR4-defizienter NOD-Mäuse beitragen. Die beobachtete erleichterte Induktion inflammatorischer Mediatoren in Präadipozyten könnte zu einer weiteren Verstärkung des Entzündungsgeschehens im Fettgewebe und in der Folge zu systemisch erhöhten Spiegeln von proinflammatorischen Mediatoren führen. Neben dem verstärkten lokalen Entzündungsgeschehen in der Insel könnte

sich dadurch der auf die β -Zelle einwirkende inflammatorische Stress weiter erhöhen und den Betazelluntergang in TLR4-defizienten NOD-Mäusen zusätzlich beschleunigen.

Obwohl in der vorliegenden Arbeit nicht alle Aspekte möglicher TLR4-abhängiger Prozesse der Diabetesentwicklung lückenlos überprüft werden konnten, weist dieses, auf den erhobenen Daten beruhende, hypothetische Modell doch deutlich darauf hin, dass TLR4 über die Kontrolle autoreaktiver immunologischer Effektormechanismen und der Entwicklung des Fettgewebes ganz wesentlich zur Regulation der Pathogenese des Insulinmangeldiabetes in der NOD-Maus beiträgt.

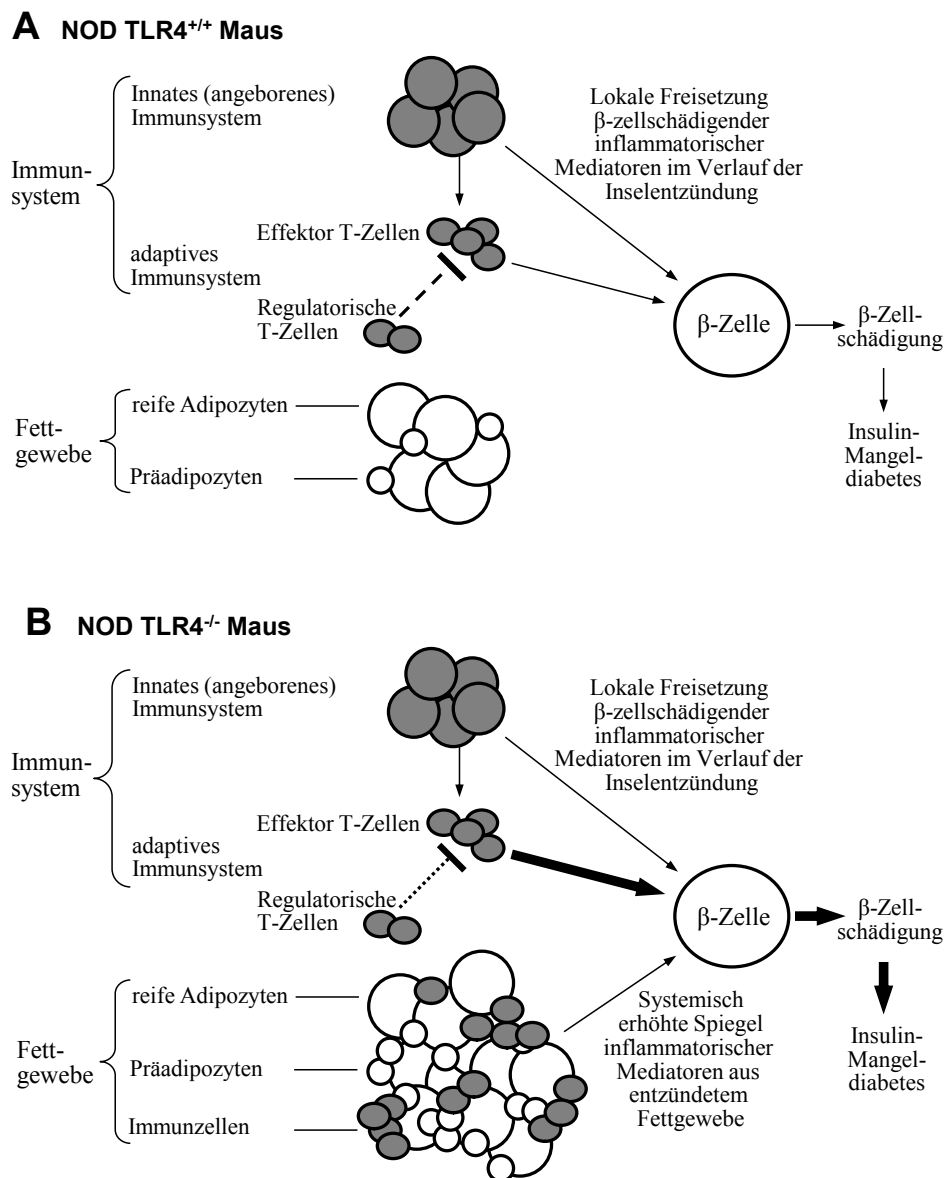


Abb. 53: Hypothetisches Modell zur regulatorischen Rolle von TLR4 bei der Diabetespathogenese der NOD-Maus. In der TLR4-exprimierenden NOD-Maus (A) erfolgt die Zerstörung autologer β -Zellen im Verlauf einer lokalen Entzündungsreaktion in der Insel hauptsächlich durch Zellen und Mediatoren des natürlichen Immunsystems sowie durch autoaggressive Effektormechanismen des adaptiven Immunsystems, die sich aufgrund unzureichender Inhibition durch regulatorische T-Zellen (gestrichelte Linie) entwickeln. TLR4-defiziente NOD-Mäuse weisen eine beschleunigte Diabetesentwicklung auf (B). Eine mögliche Ursache kann in der stark verringerten inhibitorischen Kapazität der regulatorischen T-Zellpopulation liegen (gepunktete Linie), die zur weitgehend ungehinderten Aktivierung von betazellgerichteten autoreaktiven Effektormechanismen des adaptiven Immunsystems führen kann. Neben Störungen von immunregulatorischen Mechanismen weist der erhöhte Anteil von Zellen mit präadipozytenähnlicher Morphologie in TLR4-defizienten Mäusen auch auf eine veränderte Fettgewebsentwicklung in diesen Tieren hin. Diese Störung kann auch zur beobachteten beschleunigten Zunahme des Körpergewichts beitragen, das wesentlich von der Masse des adipösen Gewebes bestimmt wird. Fortschreitende Adipositas führt zu einer zunehmenden Infiltration des Fettgewebes mit Immunzellen, der lokalen Aktivierung dieser Zellen und in der Folge zu erhöhten systemischen Spiegeln von proinflammatorischen Immunmediatoren. Diese Mediatoren könnten den auf die β -Zellen einwirkenden inflammatorischen Stress weiter verstärken und somit deren Untergang zusätzlich beschleunigen.

5 Zusammenfassung / Summary

5.1 Zusammenfassung

Der humane (insulinabhängige) Typ 1 Diabetes (T1D) manifestiert sich als Folge einer weitgehenden Zerstörung autologer insulinproduzierender β -Zellen durch zelluläre Effektormechanismen des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Induktion und Progression autoimmuner Reaktionen durch den Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) kontrolliert wird, der ursprünglich als Rezeptor für bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) beschrieben wurde. Um eine mögliche Rolle von TLR4 in der Pathogenese des Insulinmangeldiabetes zu identifizieren wurde der selektive TLR4-Defekt der C57BL/10ScCr-Maus auf den Hintergrund der *non-obese diabetic* (NOD)-Maus zurückgekreuzt, die das zur Zeit am besten charakterisierte Tiermodell des humanen T1D darstellt.

Im Vergleich zu weiblichen TLR4-exprimierenden NOD-Mäusen (TLR4^{+/+}) zeigten Tiere mit einem homozygoten TLR4-Defekt (TLR4^{-/-}) interessanterweise eine signifikant beschleunigte Diabetesentwicklung, die mit einer verstärkten Immunzellinfiltration der Langerhans'schen Inseln einherging. Die beschleunigte Krankheitsentwicklung war nicht auf eine erhöhte Suszeptibilität von Inselzellen gegenüber den Einflüssen β -zellschädigender Immunmediatoren zurückzuführen. Analysen zu möglichen Auswirkungen einer TLR4-Defizienz auf immunregulatorische Prozesse zeigten eine Hyperreaktivität der Immunzellen in NOD TLR4^{-/-} Mäusen. Der TLR4-Defekt hatte keinen Einfluss auf die Frequenz regulatorischer T-Zellen (Treg), war aber mit einem signifikant geringeren inhibitorischen Potenzial dieser Zellpopulation assoziiert.

TLR4-defiziente weibliche NOD-Mäuse wiesen neben der beschleunigten Diabetesentwicklung auch eine beschleunigte Zunahme des Körpergewichtes auf. Da das Körpergewicht wesentlich von der Fettgewebsmasse bestimmt wird, fokussierten zusätzliche Analysen auf die TLR4-Abhängigkeit des Differenzierungsverhaltens und der inflammatorischen Aktivitäten von Adipozyten, die zahlreiche grundlegende Eigenschaften von natürlichen Immunzellen aufweisen. Der Befund, dass das viszerale Fettgewebe von NOD TLR4^{-/-} Mäusen im Vergleich zu TLR4-exprimierenden Tieren einen erhöhten Anteil von Zellen mit präadipozytenähnlicher Morphologie enthält, weist auf einen Adipozyten-Reifungsdefekt in TLR4-defizienten Tieren hin. Die TLR4-vermittelte Stimulation induziert die Freisetzung von Entzündungsmediatoren durch Präadipozyten und reife Adipozyten und beeinflusst entscheidend die Entwicklung der proinflammatorischen Reaktivität der Fettzellen während der Differenzierungsphase.

Zusammenfassend weisen die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde darauf hin, dass der TLR4 über die Kontrolle autoreaktiver immunologischer Effektormechanismen und der inflammatorischen Aktivität von Adipozyten ganz wesentlich zur Regulation der Pathogenese des Insulinmangeldiabetes in der NOD-Maus beiträgt. Die Ergebnisse der Studien identifizierten somit TLR4-abhängige Prozesse als mögliches Ziel von Strategien zur Hemmung von inflammatorischen Aktivitäten zum Schutz vor β -Zellschädigung und der Entwicklung des Insulinmangeldiabetes.

5.2 Summary

Human (insulin-dependent) type 1 diabetes (T1D) manifests as the consequence of a progressive destruction of autologous insulin producing pancreatic β -cells by cellular effector mechanisms of the innate and adaptive immune system. Recent investigations implicate, that the induction and progression of autoimmune reactivity are controlled by the toll-like receptor 4 (TLR4), originally described as the receptor for bacterial lipopolysaccharide (LPS). To identify a potential role of TLR4 in the pathogenesis of insulin-deficiency diabetes, the selective TLR4 defect of the C57BL/10ScCr mouse was backcrossed on the background of the non-obese diabetic (NOD) mouse, which currently represents the best characterized animal model of human T1D.

Interestingly, female NOD mice with a homozygous TLR4 defect (TLR4^{-/-}) showed a significantly accelerated diabetes development associated with an enhanced immune cell infiltration of the islets of Langerhans when compared to female TLR4 expressing NOD mice (TLR4^{+/+}). Accelerated disease development was not attributable to an increased susceptibility of islet cells to the effects of β -cell damaging immune mediators. However, analyses of the potential effects of TLR4 deficiency on immunoregulatory processes revealed a hyperreactivity of immune cells of NOD TLR4^{-/-} mice. TLR4-deficiency did not affect the frequency of regulatory T-cells, but was associated with a significant decrease of the inhibitory potential of this cell population.

Besides an accelerated diabetes development TLR4 deficient female mice exhibited an accelerated increase of their body weight. As body weight is largely determined by the adipose tissue mass, additional analyses focussed on the TLR4 dependency of the differentiation and the inflammatory activity of adipocytes which share many basic features with innate immune cells. Compared to TLR4 expressing animals the visceral adipose tissue of NOD TLR4^{-/-} mice had a larger proportion of cells with preadipocyte-like morphology. This finding points to an adipocyte maturation defect in TLR4 deficient animals. TLR4-mediated stimulation was found to induce the release of inflammatory mediators from preadipocytes and mature adipocytes and to affect the development of proinflammatory reactivity of adipocytes during the differentiation process.

Taken together, the findings of the present investigations demonstrate that TLR4 contributes to the regulation of the pathogenesis of insulin deficiency diabetes in the NOD mouse by controlling autoreactive immunologic effector mechanisms and inflammatory activities of adipocytes. Therefore, the results of the study identify TLR4-dependent processes as potential targets for strategies to inhibit inflammatory activities and to protect from β -cell damage and the development of insulin deficiency diabetes.

6 Literaturverzeichnis

1. Gale,EA: The rise of childhood type 1 diabetes in the 20th century. *Diabetes* 51:3353-3361, 2002
2. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 26 Suppl 1:S5-20, 2003
3. Couper,JJ, Hudson,I, Werther,GA, Warne,GL, Court JM, Harrison,LC: Factors predicting residual beta-cell function in the first year after diagnosis of childhood type 1 diabetes. *Diabetes Res.Clin.Pract.* 11:9-16, 1991
4. Abdul-Rasoul,M, Habib,H, Al Khouly,M: 'The honeymoon phase' in children with type 1 diabetes mellitus: frequency, duration, and influential factors. *Pediatr.Diabetes* 7:101-107, 2006
5. Neu,A, Ehehalt,S, Willasch,A, Kehrner,M, Hub,R, Ranke,MB: Rising incidence of type 1 diabetes in Germany: 12-year trend analysis in children 0-14 years of age. *Diabetes Care* 24:785-786, 2001
6. Olmos,P, A'Hern,R, Heaton,DA, Millward,BA, Risley,D, Pyke,DA, Leslie,RD: The significance of the concordance rate for type 1 (insulin-dependent) diabetes in identical twins. *Diabetologia* 31:747-750, 1988
7. Redondo,MJ, Yu,L, Hawa,M, Mackenzie,T, Pyke,DA, Eisenbarth,GS, Leslie,RD: Heterogeneity of type I diabetes: analysis of monozygotic twins in Great Britain and the United States. *Diabetologia* 44:354-362, 2001
8. Nerup,J, Platz,P, Andersen,OO, Christy,M, Lyngsoe,J, Poulsen,JE, Ryder,LP, Nielsen,LS, Thomsen,M, Svejgaard,A: HL-A antigens and diabetes mellitus. *Lancet* 2:864-866, 1974
9. Cudworth,AG, Woodrow,JC: Letter: HL-A antigens and diabetes mellitus. *Lancet* 2:1153, 1974
10. Bell,GI, Horita,S, Karam,JH: A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 33:176-183, 1984
11. Bain,SC, Prins,JB, Hearne,CM, Rodrigues,NR, Rowe,BR, Pritchard,LE, Ritchie,RJ, Hall,JR, Undlien,DE, Ronningen,KS, .: Insulin gene region-encoded susceptibility to type 1 diabetes is not restricted to HLA-DR4-positive individuals. *Nat.Genet.* 2:212-215, 1992
12. Davies,JL, Kawaguchi,Y, Bennett,ST, Copeman,JB, Cordell,HJ, Pritchard,LE, Reed,PW, Gough,SC, Jenkins,SC, Palmer,SM, .: A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature* 371:130-136, 1994

13. Hill,NJ, Lyons,PA, Armitage,N, Todd,JA, Wicker,LS, Peterson,LB: NOD Idd5 locus controls insulinitis and diabetes and overlaps the orthologous CTLA4/IDDM12 and NRAMP1 loci in humans. *Diabetes* 49:1744-1747, 2000
14. Ueda,H, Howson,JM, Esposito,L, Heward,J, Snook,H, Chamberlain,G, Rainbow,DB, Hunter,KM, Smith,AN, Di Genova,G, Herr,MH, Dahlman,I, Payne,F, Smyth,D, Lowe,C, Twells,RC, Howlett,S, Healy,B, Nutland,S, Rance,HE, Everett,V, Smink,LJ, Lam,AC, Cordell,HJ, Walker,NM, Bordin,C, Hulme,J, Motzo,C, Cucca,F, Hess,JF, Metzker,ML, Rogers,J, Gregory,S, Allahabadia,A, Nithiyananthan,R, Tuomilehto-Wolf,E, Tuomilehto,J, Bingley,P, Gillespie,KM, Undlien,DE, Ronningen,KS, Guja,C, Ionescu-Tirgoviste,C, Savage,DA, Maxwell,AP, Carson,DJ, Patterson,CC, Franklyn,JA, Clayton,DG, Peterson,LB, Wicker,LS, Todd,JA, Gough,SC: Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 423:506-511, 2003
15. Yoon,JW, Austin,M, Onodera,T, Notkins,AL: Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. *N.Engl.J.Med.* 300:1173-1179, 1979
16. Yoon,JW, Onodera,T, Notkins,AL: Virus-induced diabetes mellitus. XV. Beta cell damage and insulin-dependent hyperglycemia in mice infected with coxsackie virus B4. *J.Exp.Med.* 148:1068-1080, 1978
17. Helmke,K, Otten,A, Willems,W: Islet cell antibodies in children with mumps infection. *Lancet* 2:211-212, 1980
18. Hyoty,H, Leinikki,P, Reunanen,A, Ilonen,J, Surcel,HM, Rilla,A, Kaar,ML, Huupponen,T, Hakulinen,A, Makela,AL, .: Mumps infections in the etiology of type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetes Res.* 9:111-116, 1988
19. Menser,MA, Forrest,JM, Bransby,RD: Rubella infection and diabetes mellitus. *Lancet* 1:57-60, 1978
20. Ginsberg-Fellner,F, Witt,ME, Yagihashi,S, Dobersen,MJ, Taub,F, Fedun,B, McEvoy,RC, Roman,SH, Davies,RG, Cooper,LZ, .: Congenital rubella syndrome as a model for type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: increased prevalence of islet cell surface antibodies. *Diabetologia* 27 Suppl:87-89, 1984
21. Wasmuth,HE, Kolb,H: Cow's milk and immune-mediated diabetes. *Proc.Nutr.Soc.* 59:573-579, 2000
22. Saukkonen,T, Virtanen,SM, Karppinen,M, Reijonen,H, Ilonen,J, Rasanen,L, Akerblom,HK, Savilahti,E: Significance of cow's milk protein antibodies as risk factor for childhood IDDM: interactions with dietary cow's milk intake and HLA-DQB1 genotype. Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Diabetologia* 41:72-78, 1998
23. Ludvigsson,J: Why diabetes incidence increases--a unifying theory. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1079:374-382, 2006

24. Ziegler,AG, Schmid,S, Huber,D, Hummel,M, Bonifacio,E: Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies. *JAMA* 290:1721-1728, 2003
25. Wilkin,TJ: The accelerator hypothesis: weight gain as the missing link between Type I and Type II diabetes. *Diabetologia* 44:914-922, 2001
26. Chong,JW, Craig,ME, Cameron,FJ, Clarke,CF, Rodda,CP, Donath,SM, Werther,GA: Marked increase in type 1 diabetes mellitus incidence in children aged 0-14 yr in Victoria, Australia, from 1999 to 2002. *Pediatr.Diabetes* 8:67-73, 2007
27. Schober,E, Rami,B, Waldhoer,T: Steep increase of incidence of childhood diabetes since 1999 in Austria. Time trend analysis 1979-2005. A nationwide study. *Eur.J.Pediatr.* 167:293-297, 2008
28. Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. EURODIAB ACE Study Group. *Lancet* 355:873-876, 2000
29. Taplin,CE, Barker,JM: Autoantibodies in type 1 diabetes. *Autoimmunity* 41:11-18, 2008
30. Wenzlau,JM, Juhl,K, Yu,L, Moua,O, Sarkar,SA, Gottlieb,P, Rewers,M, Eisenbarth,GS, Jensen,J, Davidson,HW, Hutton,JC: The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 104:17040-17045, 2007
31. Wenzlau,JM, Frisch,LM, Gardner,TJ, Sarkar,S, Hutton,JC, Davidson,HW: Novel antigens in type 1 diabetes: the importance of ZnT8. *Curr.Diab.Rep.* 9:105-112, 2009
32. Leslie,RD, Atkinson,MA, Notkins,AL: Autoantigens IA-2 and GAD in Type I (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 42:3-14, 1999
33. Palmer,JP, Asplin,CM, Clemons,P, Lyen,K, Tatpati,O, Raghu,PK, Paquette,TL: Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science* 222:1337-1339, 1983
34. Martin,S, Wolf-Eichbaum,D, Duinkerken,G, Scherbaum,WA, Kolb,H, Noordzij,JG, Roep,BO: Development of type 1 diabetes despite severe hereditary B-lymphocyte deficiency. *N.Engl.J.Med.* 345:1036-1040, 2001
35. Gepts,W, De Mey,J: Islet cell survival determined by morphology. An immunocytochemical study of the islets of Langerhans in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes* 27 Suppl 1:251-261, 1978
36. Gepts,W: Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes* 14:619-633, 1965
37. Roep,BO: The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: from cause to cure. *Diabetologia* 46:305-321, 2003
38. Wilson,K, Eisenbarth,GS: Immunopathogenesis and immunotherapy of type 1 diabetes. *Annu.Rev.Med.* 41:497-508, 1990

39. Itoh,N, Hanafusa,T, Miyazaki,A, Miyagawa,J, Yamagata,K, Yamamoto,K, Waguri,M, Imagawa,A, Tamura,S, Inada,M, .: Mononuclear cell infiltration and its relation to the expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in pancreas biopsy specimens from newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J.Clin.Invest* 92:2313-2322, 1993
40. Imagawa,A, Hanafusa,T, Tamura,S, Moriwaki,M, Itoh,N, Yamamoto,K, Iwahashi,H, Yamagata,K, Waguri,M, Nanmo,T, Uno,S, Nakajima,H, Namba,M, Kawata,S, Miyagawa,JI, Matsuzawa,Y: Pancreatic biopsy as a procedure for detecting in situ autoimmune phenomena in type 1 diabetes: close correlation between serological markers and histological evidence of cellular autoimmunity. *Diabetes* 50:1269-1273, 2001
41. Murphy K, Travers P, Walport M: Janeway, Immunologie. 2009,
42. Hanenberg,H, Kolb-Bachofen,V, Kantwerk-Funke,G, Kolb,H: Macrophage infiltration precedes and is a prerequisite for lymphocytic insulitis in pancreatic islets of pre-diabetic BB rats. *Diabetologia* 32:126-134, 1989
43. Kolb-Bachofen,V, Epstein,S, Kiesel,U, Kolb,H: Low-dose streptozocin-induced diabetes in mice. Electron microscopy reveals single-cell insulitis before diabetes onset. *Diabetes* 37:21-27, 1988
44. Lee,KU, Pak,CY, Amano,K, Yoon,JW: Prevention of lymphocytic thyroiditis and insulitis in diabetes-prone BB rats by the depletion of macrophages. *Diabetologia* 31:400-402, 1988
45. Kröncke,KD, Kolb-Bachofen,V, Berschick,B, Burkart,V, Kolb,H: Activated macrophages kill pancreatic syngeneic islet cells via arginine-dependent nitric oxide generation. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 175:752-758, 1991
46. Burkart,V, Koike,T, Brenner,HH, Kolb,H: Oxygen radicals generated by the enzyme xanthine oxidase lyse rat pancreatic islet cells in vitro. *Diabetologia* 35:1028-1034, 1992
47. Nerup,J, Mandrup-Poulsen,T, Molvig,J, Helqvist,S, Wogensén,L, Egeberg,J: Mechanisms of pancreatic beta-cell destruction in type I diabetes. *Diabetes Care* 11 Suppl 1:16-23, 1988
48. Huang,GC, Tremble,J, Bailyes,E, Arden,SD, Kaye,T, McGregor,AM, Banga,JP: HLA-DR-restricted T cell lines from newly diagnosed type 1 diabetic patients specific for insulinoma and normal islet beta cell proteins: lack of reactivity to glutamic acid decarboxylase. *Clin.Exp.Immunol.* 102:152-158, 1995
49. Bougneres,PF, Carel,JC, Castano,L, Boitard,C, Gardin,JP, Landais,P, Hors,J, Mihatsch,MJ, Paillard,M, Chaussain,JL, .: Factors associated with early remission of type I diabetes in children treated with cyclosporine. *N.Engl.J.Med.* 318:663-670, 1988

50. Lampeter,EF, Homberg,M, Quabeck,K, Schaefer,UW, Wernet,P, Bertrams,J, Grosse-Wilde,H, Gries,FA, Kolb,H: Transfer of insulin-dependent diabetes between HLA-identical siblings by bone marrow transplantation. *Lancet* 341:1243-1244, 1993
51. Sibley,RK, Sutherland,DE, Goetz,F, Michael,AF: Recurrent diabetes mellitus in the pancreas iso- and allograft. A light and electron microscopic and immunohistochemical analysis of four cases. *Lab Invest* 53:132-144, 1985
52. Wong,FS, Visintin,I, Wen,L, Flavell,RA, Janeway,CA, Jr.: CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islets can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells. *J.Exp.Med.* 183:67-76, 1996
53. Sakaguchi,S: Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 101:455-458, 2000
54. Gambineri,E, Torgerson,TR, Ochs,HD: Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr.Opin.Rheumatol.* 15:430-435, 2003
55. Wellen,KE, Hotamisligil,GS: Inflammation, stress, and diabetes. *J.Clin.Invest* 115:1111-1119, 2005
56. Hotamisligil,GS, Shargill,NS, Spiegelman,BM: Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87-91, 1993
57. Hotamisligil,GS, Spiegelman,BM: Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 43:1271-1278, 1994
58. Charrière,G, Cousin,B, Arnaud,E, André,M, Bacou,F, Penicaud,L, Casteilla,L: Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J.Biol.Chem.* 278:9850-9855, 2003
59. Gülden,E, Mollérus,S, Brüggemann,J, Burkart,V, Habich,C: Heat shock protein 60 induces inflammatory mediators in mouse adipocytes. *FEBS Lett.* 582:2731-2736, 2008
60. Gülden,E, Marker,T, Kriebel,J, Kolb-Bachofen,V, Burkart,V, Habich,C: Heat shock protein 60: evidence for receptor-mediated induction of proinflammatory mediators during adipocyte differentiation. *FEBS Lett.* 583:2877-2881, 2009
61. Bès-Houtmann,S, Roche,R, Hoareau,L, Gonthier,MP, Festy,F, Caillens,H, Gasque,P, d'Hellencourt,CL, Cesari,M: Presence of functional TLR2 and TLR4 on human adipocytes. *Histochemistry and Cell Biology* 127:131-137, 2007
62. Lemaitre,B, Nicolas,E, Michaut,L, Reichhart,JM, Hoffmann,JA: The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-983, 1996
63. Akira,S, Uematsu,S, Takeuchi,O: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801, 2006

64. Poltorak,A, He,X, Smirnova,I, Liu,MY, Van Huffel,C, Du,X, Birdwell,D, Alejos,E, Silva,M, Galanos,C, Freudenberg,M, Ricciardi-Castagnoli,P, Layton,B, Beutler,B: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282:2085-2088, 1998
65. Ohashi,K, Burkart,V, Flohé,S, Kolb,H: Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J.Immunol.* 164:558-561, 2000
66. Habich,C, Kempe,K, van der,ZR, Rumenapf,R, Akiyama,H, Kolb,H, Burkart,V: Heat shock protein 60: specific binding of lipopolysaccharide. *J.Immunol.* 174:1298-1305, 2005
67. Takeda,K, Kaisho,T, Akira,S: Toll-like receptors. *Annu.Rev.Immunol.* 21:335-376, 2003
68. Janeway,CA, Jr., Medzhitov,R: Innate immune recognition. *Annu.Rev.Immunol.* 20:197-216, 2002
69. Shi,H, Kokoeva,MV, Inouye,K, Tzameli,I, Yin,H, Flier,JS: TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J.Clin.Invest* 116:3015-3025, 2006
70. Bauer,S, Müller,T, Hamm,S: Pattern recognition by Toll-like receptors. *Adv.Exp.Med.Biol.* 653:15-34, 2009
71. Zhan,H, Towler,HM, Calder,VL: The immunomodulatory role of human conjunctival epithelial cells. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 44:3906-3910, 2003
72. Akira,S, Takeda,K, Kaisho,T: Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat.Immunol.* 2:675-680, 2001
73. Wolk,K, Witte,K, Witte,E, Proesch,S, Schulze-Tanzil,G, Nasilowska,K, Thilo,J, Asadullah,K, Sterry,W, Volk,HD, Sabat,R: Maturing dendritic cells are an important source of IL-29 and IL-20 that may cooperatively increase the innate immunity of keratinocytes. *J.Leukoc.Biol.* 83:1181-1193, 2008
74. Ishikado,A, Nishio,Y, Yamane,K, Mukose,A, Morino,K, Murakami,Y, Sekine,O, Makino,T, Maegawa,H, Kashiwagi,A: Soy phosphatidylcholine inhibited TLR4-mediated MCP-1 expression in vascular cells. *Atherosclerosis* 205:404-412, 2009
75. Kim,F, Pham,M, Luttrell,I, Bannerman,DD, Tupper,J, Thaler,J, Hawn,TR, Raines,EW, Schwartz,MW: Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. *Circ.Res.* 100:1589-1596, 2007
76. Hijiya,N, Miyake,K, Akashi,S, Matsuura,K, Higuchi,Y, Yamamoto,S: Possible involvement of toll-like receptor 4 in endothelial cell activation of larger vessels in response to lipopolysaccharide. *Pathobiology* 70:18-25, 2002
77. Poltorak,A, Smirnova,I, Clisch,R, Beutler,B: Limits of a deletion spanning Tlr4 in C57BL/10ScCr mice. *J.Endotoxin.Res.* 6:51-56, 2000

78. Schumann,RR, Leong,SR, Flaggs,GW, Gray,PW, Wright,SD, Mathison,JC, Tobias,PS, Ulevitch,RJ: Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249:1429-1431, 1990
79. Ulevitch,RJ, Mathison,JC, Schumann,RR, Tobias,PS: A new model of macrophage stimulation by bacterial lipopolysaccharide. *J.Trauma* 30:S189-S192, 1990
80. Beutler,B: Endotoxin, toll-like receptor 4, and the afferent limb of innate immunity. *Curr.Opin.Microbiol.* 3:23-28, 2000
81. Godowski,PJ: A smooth operator for LPS responses. *Nat.Immunol.* 6:544-546, 2005
82. Kawai,T, Akira,S: TLR signaling. *Semin.Immunol.* 19:24-32, 2007
83. Rossini,AA, Like,AA, Chick,WL, Appel,MC, Cahill,GF, Jr.: Studies of streptozotocin-induced insulinitis and diabetes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 74:2485-2489, 1977
84. Like,AA, Rossini,AA: Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science* 193:415-417, 1976
85. Kolb,H: Mouse models of insulin dependent diabetes: low-dose streptozocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes Metab Rev.* 3:751-778, 1987
86. Mordes,JP, Desemone,J, Rossini,AA: The BB rat. *Diabetes Metab Rev.* 3:725-750, 1987
87. Makino,S, Kunitomo,K, Muraoka,Y, Mizushima,Y, Katagiri,K, Tochino,Y: Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu* 29:1-13, 1980
88. Anderson,MS, Bluestone,JA: The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu.Rev.Immunol.* 23:447-485, 2005
89. Kikutani,H, Makino,S: The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. *Adv.Immunol.* 51:285-322, 1992
90. Bach,JF: Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr.Rev.* 15:516-542, 1994
91. Todd,JA, Wicker,LS: Genetic protection from the inflammatory disease type 1 diabetes in humans and animal models. *Immunity.* 15:387-395, 2001
92. Ortlepp,JR, Kluge,R, Giesen,K, Plum,L, Radke,P, Hanrath,P, Joost,HG: A metabolic syndrome of hypertension, hyperinsulinaemia and hypercholesterolaemia in the New Zealand obese mouse. *Eur.J.Clin.Invest* 30:195-202, 2000
93. Appels,B, Burkart,V, Kantwerk-Funke,G, Funda,J, Kolb-Bachofen,V, Kolb,H: Spontaneous cytotoxicity of macrophages against pancreatic islet cells. *J.Immunol.* 142:3803-3808, 1989
94. Cousin,B, Munoz,O, Andre,M, Fontanilles,AM, Dani,C, Cousin,JL, Laharrague,P, Casteilla,L, Pénicaud,L: A role for preadipocytes as macrophage-like cells. *FASEB J.* 13:305-312, 1999

95. Ralph,P, Moore,MA, Nilsson,K: Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *J.Exp.Med.* 143:1528-1533, 1976
96. Green,H, Meuth,M: An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* 3:127-133, 1974
97. Avram,MM, Avram,AS, James,WD: Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: from stem cell to fat cell. *J.Am.Acad.Dermatol.* 56:472-492, 2007
98. Kröncke,KD, Rodriguez,ML, Kolb,H, Kolb-Bachofen,V: Cytotoxicity of activated rat macrophages against syngeneic islet cells is arginine-dependent, correlates with citrulline and nitrite concentrations and is identical to lysis by the nitric oxide donor nitroprusside. *Diabetologia* 36:17-24, 1993
99. Kataoka,S, Satoh,J, Fujiya,H, Toyota,T, Suzuki,R, Itoh,K, Kumagai,K: Immunologic aspects of the nonobese diabetic (NOD) mouse. Abnormalities of cellular immunity. *Diabetes* 32:247-253, 1983
100. Weisberg,SP, McCann,D, Desai,M, Rosenbaum,M, Leibel,RL, Ferrante,AW, Jr.: Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J.Clin.Invest* 112:1796-1808, 2003
101. Xu,H, Barnes,GT, Yang,Q, Tan,G, Yang,D, Chou,CJ, Sole,J, Nichols,A, Ross,JS, Tartaglia,LA, Chen,H: Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J.Clin.Invest* 112:1821-1830, 2003
102. Hotamisligil,GS: Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444:860-867, 2006
103. Hoch,M, Eberle,AN, Peterli,R, Peters,T, Seboek,D, Keller,U, Muller,B, Linscheid,P: LPS induces interleukin-6 and interleukin-8 but not tumor necrosis factor-alpha in human adipocytes. *Cytokine* 41:29-37, 2008
104. Freudenberg,MA, Kumazawa,Y, Meding,S, Langhorne,J, Galanos,C: Gamma interferon production in endotoxin-responder and -nonresponder mice during infection. *Infect.Immun.* 59:3484-3491, 1991
105. Müller,I, Freudenberg,M, Kropf,P, Kiderlen,AF, Galanos,C: Leishmania major infection in C57BL/10 mice differing at the Lps locus: a new non-healing phenotype. *Med.Microbiol.Immunol.* 186:75-81, 1997
106. King,C, Ilic,A, Koelsch,K, Sarvetnick,N: Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity. *Cell* 117:265-277, 2004
107. Satoh,J, Shintani,S, Nobunaga,T, Sugawara,S, Makino,S, Toyota,T, Goto,Y: NOD mice with high incidence of type 1 diabetes are not T lymphocytopenic. *Tohoku J.Exp.Med.* 155:151-158, 1988
108. Berzins,SP, Venanzi,ES, Benoist,C, Mathis,D: T-cell compartments of prediabetic NOD mice. *Diabetes* 52:327-334, 2003

109. Janeway,CA, Jr.: The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol.Today* 13:11-16, 1992
110. Nguyen,MT, Favelyukis,S, Nguyen,AK, Reichart,D, Scott,PA, Jenn,A, Liu-Bryan,R, Glass,CK, Neels,JG, Olefsky,JM: A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J.Biol.Chem.* 282:35279-35292, 2007
111. Matzinger,P: The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296:301-305, 2002
112. Chen,W, Syldath,U, Bellmann,K, Burkart,V, Kolb,H: Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *J.Immunol.* 162:3212-3219, 1999
113. Wallin,RP, Lundqvist,A, Moré,SH, von Bonin,A, Kiessling,R, Ljunggren,HG: Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol.* 23:130-135, 2002
114. Knolle,PA, Germann,T, Treichel,U, Uhrig,A, Schmitt,E, Hegenbarth,S, Lohse,AW, Gerken,G: Endotoxin down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells. *J.Immunol.* 162:1401-1407, 1999
115. Lumsden,AB, Henderson,JM, Kutner,MH: Endotoxin levels measured by a chromogenic assay in portal, hepatic and peripheral venous blood in patients with cirrhosis. *Hepatology* 8:232-236, 1988
116. Nolan,JP, Hare,DK, McDevitt,JJ, Ali,MV: In vitro studies of intestinal endotoxin absorption. I. Kinetics of absorption in the isolated everted gut sac. *Gastroenterology* 72:434-439, 1977
117. Lieberman,SM, DiLorenzo,TP: A comprehensive guide to antibody and T-cell responses in type 1 diabetes. *Tissue Antigens* 62:359-377, 2003
118. Pockley,AG, Bulmer,J, Hanks,BM, Wright,BH: Identification of human heat shock protein 60 (Hsp60) and anti-Hsp60 antibodies in the peripheral circulation of normal individuals. *Cell Stress.Chaperones.* 4:29-35, 1999
119. Gao,B, Wang,Y, Tsan,MF: The heat sensitivity of cytokine-inducing effect of lipopolysaccharide. *J.Leukoc.Biol.* 80:359-366, 2006
120. Gao,B, Tsan,MF: Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor alpha release by murine macrophages. *J.Biol.Chem.* 278:174-179, 2003
121. Morrison,DC, Ryan,JL: Bacterial endotoxins and host immune responses. *Adv.Immunol.* 28:293-450, 1979
122. Rietschel,ET, Brade,H: Bacterial endotoxins. *Sci.Am.* 267:54-61, 1992

123. Rietschel,ET, Kirikae,T, Schade,FU, Ulmer,AJ, Holst,O, Brade,H, Schmidt,G, Mamat,U, Grimmecke,HD, Kusumoto,S, .: The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity. *Immunobiology* 187:169-190, 1993
124. Lee,HK, Lee,J, Tobias,PS: Two lipoproteins extracted from Escherichia coli K-12 LCD25 lipopolysaccharide are the major components responsible for Toll-like receptor 2-mediated signaling. *J.Immunol.* 168:4012-4017, 2002
125. Yang,RB, Mark,MR, Gray,A, Huang,A, Xie,MH, Zhang,M, Goddard,A, Wood,WI, Gurney,AL, Godowski,PJ: Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* 395:284-288, 1998
126. Uno,K, Kato,K, Atsumi,T, Suzuki,T, Yoshitake,J, Morita,H, Ohara,S, Kotake,Y, Shimosegawa,T, Yoshimura,T: Toll-like receptor (TLR) 2 induced through TLR4 signaling initiated by Helicobacter pylori cooperatively amplifies iNOS induction in gastric epithelial cells. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 293:G1004-G1012, 2007
127. Fan,J, Frey,RS, Malik,AB: TLR4 signaling induces TLR2 expression in endothelial cells via neutrophil NADPH oxidase. *J.Clin.Invest* 112:1234-1243, 2003
128. Lorenz,E: TLR2 and TLR4 expression during bacterial infections. *Curr.Pharm.Des* 12:4185-4193, 2006
129. Lorenz,E, Chemotti,DC, Jiang,AL, McDougal,LD: Differential involvement of toll-like receptors 2 and 4 in the host response to acute respiratory infections with wild-type and mutant Haemophilus influenzae strains. *Infect.Immun.* 73:2075-2082, 2005
130. Lin,Y, Lee,H, Berg,AH, Lisanti,MP, Shapiro,L, Scherer,PE: The lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes. *J.Biol.Chem.* 275:24255-24263, 2000
131. Zhang,G, Ghosh,S: Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J.Clin.Invest* 107:13-19, 2001
132. Nagai,Y, Kobayashi,T, Motoi,Y, Ishiguro,K, Akashi,S, Saitoh,S, Kusumoto,Y, Kaisho,T, Akira,S, Matsumoto,M, Takatsu,K, Miyake,K: The radioprotective 105/MD-1 complex links TLR2 and TLR4/MD-2 in antibody response to microbial membranes. *J.Immunol.* 174:7043-7049, 2005
133. Sakaguchi,S, Sakaguchi,N, Asano,M, Itoh,M, Toda,M: Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J.Immunol.* 155:1151-1164, 1995
134. Sakaguchi,S: Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu.Rev.Immunol.* 22:531-562, 2004

135. Levings,MK, Sangregorio,R, Roncarolo,MG: Human cd25(+)/cd4(+) regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J.Exp.Med.* 193:1295-1302, 2001
136. Kukreja,A, Cost,G, Marker,J, Zhang,C, Sun,Z, Lin-Su,K, Ten,S, Sanz,M, Exley,M, Wilson,B, Porcelli,S, Maclaren,N: Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J.Clin.Invest* 109:131-140, 2002
137. Wu,AJ, Hua,H, Munson,SH, McDevitt,HO: Tumor necrosis factor- α regulation of CD4+CD25+ T cell levels in NOD mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:12287-12292, 2002
138. Salomon,B, Lenschow,DJ, Rhee,L, Ashourian,N, Singh,B, Sharpe,A, Bluestone,JA: B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity.* 12:431-440, 2000
139. Fehervari,Z, Sakaguchi,S: CD4+ Tregs and immune control. *J.Clin.Invest* 114:1209-1217, 2004
140. Gregori,S, Giarratana,N, Smiroldo,S, Adorini,L: Dynamics of pathogenic and suppressor T cells in autoimmune diabetes development. *J.Immunol.* 171:4040-4047, 2003
141. Caramalho,I, Lopes-Carvalho,T, Ostler,D, Zelenay,S, Haury,M, Demengeot,J: Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J.Exp.Med.* 197:403-411, 2003
142. Makowski,L, Boord,JB, Maeda,K, Babaev,VR, Uysal,KT, Morgan,MA, Parker,RA, Suttles,J, Fazio,S, Hotamisligil,GS, Linton,MF: Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nat.Med.* 7:699-705, 2001
143. Tontonoz,P, Nagy,L, Alvarez,JG, Thomazy,VA, Evans,RM: PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93:241-252, 1998
144. Kishimoto,T: Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. *Annu.Rev.Immunol.* 23:1-21, 2005
145. Alexaki,VI, Notas,G, Pelekanou,V, Kampa,M, Valkanou,M, Theodoropoulos,P, Stathopoulos,EN, Tsapis,A, Castanas,E: Adipocytes as Immune Cells: Differential Expression of TWEAK, BAFF, and APRIL and Their Receptors (Fn14, BAFF-R, TACI, and BCMA) at Different Stages of Normal and Pathological Adipose Tissue Development. *J.Immunol.* 183:5948-5956, 2009

146. Bouloumié,A, Sengenès,C, Portolan,G, Galitzky,J, Lafontan,M: Adipocyte produces matrix metalloproteinases 2 and 9: involvement in adipose differentiation. *Diabetes* 50:2080-2086, 2001
147. Ghosh,S, Zhao,B, Bie,J, Song,J: Macrophage cholesteryl ester mobilization and atherosclerosis. *Vascul.Pharmacol.* 2009
148. Greenbaum,CJ: Insulin resistance in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res.Rev.* 18:192-200, 2002
149. Fourlanos,S, Narendran,P, Byrnes,GB, Colman,PG, Harrison,LC: Insulin resistance is a risk factor for progression to type 1 diabetes. *Diabetologia* 47:1661-1667, 2004
150. Fourlanos,S: Insulin resistance in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus: relation to obesity. *Pediatr.Diabetes* 6:3-4, 2005
151. Lammi,N, Moltchanova,E, Blomstedt,PA, Tuomilehto,J, Eriksson,JG, Karvonen,M: Childhood BMI trajectories and the risk of developing young adult-onset diabetes. *Diabetologia* 52:408-414, 2009
152. Knerr,I, Wolf,J, Reinehr,T, Stachow,R, Grabert,M, Schober,E, Rascher,W, Holl,RW: The 'accelerator hypothesis': relationship between weight, height, body mass index and age at diagnosis in a large cohort of 9,248 German and Austrian children with type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia* 48:2501-2504, 2005
153. Betts,P, Mulligan,J, Ward,P, Smith,B, Wilkin,T: Increasing body weight predicts the earlier onset of insulin-dependant diabetes in childhood: testing the 'accelerator hypothesis' (2). *Diabet.Med.* 22:144-151, 2005
154. O'Connell,MA, Donath,S, Cameron,FJ: Major increase in Type 1 diabetes: no support for the Accelerator Hypothesis. *Diabet.Med.* 24:920-923, 2007
155. Kordonouri,O, Hartmann,R: Higher body weight is associated with earlier onset of Type 1 diabetes in children: confirming the 'Accelerator Hypothesis'. *Diabet.Med.* 22:1783-1784, 2005
156. Porter,JR, Barrett,TG: Braking the accelerator hypothesis? *Diabetologia* 47:352-353, 2004
157. Kibirige,M, Metcalf,B, Renuka,R, Wilkin,TJ: Testing the accelerator hypothesis: the relationship between body mass and age at diagnosis of type 1 diabetes. *Diabetes Care* 26:2865-2870, 2003
158. Divanovic,S, Trompette,A, Weisberg,SP, Tschoep,MH, Clegg,DJ, Karp,CL: Regulation of Energy Metabolism by the RP105/TLR Axis. *Keystone Symposium: Obesity: Novel Aspects of the Regulation of Body Weight*196, 2009
159. Johnson,GB, Riggs,BL, Platt,JL: A genetic basis for the "Adonis" phenotype of low adiposity and strong bones. *FASEB J.* 18:1282-1284, 2004

160. Laflamme,N, Rivest,S: Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *FASEB J.* 15:155-163, 2001
161. Lu,B, Lu,Y, Moser,AH, Shigenaga,JK, Grunfeld,C, Feingold,KR: LPS and proinflammatory cytokines decrease lipin-1 in mouse adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 295:E1502-E1509, 2008
162. Guilherme,A, Tesz,GJ, Guntur,KV, Czech,MP: Tumor necrosis factor-alpha induces caspase-mediated cleavage of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in adipocytes. *J.Biol.Chem.* 284:17082-17091, 2009
163. Tejerina,S, De Pauw,A, Vankoningsloo,S, Houbion,A, Renard,P, De Longueville,F, Raes,M, Arnould,T: Mild mitochondrial uncoupling induces 3T3-L1 adipocyte de-differentiation by a PPARgamma-independent mechanism, whereas TNFalpha-induced de-differentiation is PPARgamma dependent. *J.Cell Sci.* 122:145-155, 2009

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

ABC	<i>Avidin: Biotinylated enzyme Complex</i>
APC	Allophycocyanin
APC	Antigenpräsentierende Zelle
aqua dest.	destilliertes Wasser
AUC	<i>area under the curve</i>
BC	<i>backcross</i>
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinderserum-Albumin
bp	Basenpaare
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
ConA	Concanavalin A
CS	Kälberserum
CD	Differenzierungscluster
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dlk	<i>delta like protein</i>
DMEM-Medium	Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP(s)	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
EtOH	Ethanol
FACS	fluorescence activated cell sorting

FBS	fötales bovines Serum
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Foxp3	<i>forkhead box P3</i>
g	Erdbeschleunigung
HBSS	<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hsp60	Hitzeschockprotein 60
IC	<i>intercross</i>
IDDM	Insulin dependent diabetes mellitus
Ig	Immunglobulin
IL-2	Interleukin-2
IL-6	Interleukin-6
iNOS	induzierbare NO Synthase
ipGTT	intraperitonealer Glukosetoleranztest
IPEX	<i>Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked</i>
IRF-3	<i>interferon-regulatory factor-3</i>
KC	keratinocyte-derived chemokine (Chemokin CXCL1)
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
MALP	<i>Macrophage activating lipopeptide</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MyD88	<i>myeloid differentiation factor 88</i>
NFκB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NIDDM	<i>non insulin dependent diabetes mellitus</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	<i>Non obese diabetic</i>
NZO	<i>New Zealand obese</i>
OD	optische Dichte

oGTT	oraler Glukosetoleranztest
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	Posphat-gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PI	Proliferationsindex
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
Pref-1	Präadipozyten Faktor 1
POD	Peroxidase
PPAR γ	<i>peroxisome proliferator activated receptor</i>
PRR	<i>pattern-recognition receptors</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TE	Tris-EDTA
T _H 1/T _H 2	T1-Helferzellen/T2-Helferzellen
TLR	Toll like Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Treg	regulatorische T-Lymphozyten
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR-related adaptor protein inducing interferon</i>
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
WST-1	<i>water soluble tetrazolium</i>
XTT	2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: TLR4-Deletion der C57BL/10ScCr-Maus	12
Abb. 2: Züchtungsstrategie zur Generierung von TLR4-defizienten NOD-Mäusen.	26
Abb. 3: Bindungsstellen für die synthetisch hergestellten, spezifischen Oligonukleotide zur Genotypisierung der Versuchstiere.	28
Abb. 4: Differenzierung von Präadipozyten in Gegenwart des TLR4-Liganden LPS	40
Abb. 5: Nachweis des IDD1-Locus in NOD-TLR4-Mäusen	48
Abb. 6: Amplifikation der TLR4-Wildtyp- und Defektallele zur Genotypisierung der Mäuse.....	48
Abb. 7: RT-PCR zum Nachweis des Fehlens von TLR4-Transkripten in der NOD TLR4 ^{-/-} Maus.....	49
Abb. 8: FACS-Analyse zur TLR4-Expression auf Milzzellen von C57BL/10ScSn- und C57BL/10ScCr-Mäusen	50
Abb. 9: FACS-Analyse zur TLR4-Expression von NOD-TLR4-Mäusen	50
Abb. 10: Analyse zur TLR4-Abhängigkeit der TNF- α -Freisetzung von makrophagenangereicherten Milzzellfraktionen der NOD-TLR4-Maus.....	52
Abb. 11: Differentielle Diabetesentwicklung von NOD-Mäusen mit unterschiedlichem TLR4-Expressionsstatus und von Mäusen des NOD-Parentalstammes	53
Abb. 12 : Vergleich der Glukosetoleranz von TLR4 ^{+/+} und TLR4 ^{-/-} NOD-Mäusen mit Hilfe eines intraperitonealer Glukosetoleranztests	54
Abb. 13: Gewichtsentwicklung weiblicher und männlicher NOD TLR4 ^{+/+} und NOD TLR4 ^{-/-} Mäuse	55
Abb. 14: Gewichtsentwicklung von Mäusen der Linien C57BL/10ScSn und C57BL/10ScCr	56
Abb. 15: Morphologie der Pankreata von NOD-Mäusen mit unterschiedlichem TLR4-Expressionsstatus.	57
Abb. 16: Verstärkte Inselinfiltration in TLR4 ^{-/-} Mäusen.....	58
Abb. 17: Zytokin-Suszeptibilität von Inselzellen TLR4-exprimierender und TLR4- defizienter NOD-Mäuse.....	59
Abb. 18: Vergleich der Milzzellzahlen verschiedener Mauslinien in Abhängigkeit vom TLR4-Expressionsstatus	60
Abb. 19: LPS-induzierte Zytokinsekretion von Milzzellpopulationen der Linien C57BL/10ScSn und C57BL/10ScCr	62

Abb. 20: Zytokinsekretion von LPS-, ConA- oder IL-2 stimulierten Milzzellpopulationen der NOD-TLR4-Linie.....	64
Abb. 21: Vergleich der NO ₂ ⁻ -Freisetzung aus Makrophagen angereicherten Milzzellpräparationen von NOD TLR4 ^{+/+} und NOD TLR4 ^{-/-} Mäusen	65
Abb. 22: LPS-, ConA- oder IL-2 stimulierte Proliferation von Milzzellpopulationen der C57BL/10ScSn (TLR4 ^{+/+}) und der C57BL/10ScCr (TLR4 ^{-/-}) Maus	67
Abb. 23: LPS-, ConA- und IL-2 stimulierte Proliferation von Milzzellpopulationen aus NOD TLR4 ^{+/+} und NOD TLR4 ^{-/-} Mäusen.....	69
Abb. 24: Metabolische Aktivität verschiedener Milzzellpopulationen TLR4-exprimierender und TLR4-defizienter C57BL/10Sc-Mäuse nach Stimulation mit LPS, ConA oder IL-2	71
Abb. 25: Metabolische Aktivität verschiedener Milzzellpopulationen TLR4-exprimierender und TLR4-defizienter NOD-Mäuse.	73
Abb. 26: Anreicherung von CD4 ⁺ CD25 ⁺ Milzzellen aus NOD TLR4 ^{+/+} und NOD TLR4 ^{-/-} Mäusen	74
Abb. 27: Foxp3-Expression in Milzzellen von TLR4-exprimierenden und TLR4-defizienten Mäusen.....	76
Abb. 28: Metabolische Aktivität von CD4 ⁺ CD25 ⁺ (Treg) und CD4 ⁺ CD25 ⁻ (Responder) Zellen aus den Milzen TLR4-defizienter und TLR4-exprimierender NOD-Mäuse.....	78
Abb. 29: Abhängigkeit der suppressiven Potenz regulatorischer T-Lymphozyten der NOD-Maus vom TLR4-Expressionsstatus	79
Abb. 30: Viszerale, murines Fettgewebe.....	80
Abb. 31: Viszerale Fettgewebe von NOD TLR4 ^{+/+} und NOD TLR4 ^{-/-} Mäusen.....	81
Abb. 32: Adipozytengröße und Anzahl ihrer Lipidvesikel im viszeralen Fettgewebe der NOD TLR4 ^{+/+} und NOD TLR4 ^{-/-} Maus	81
Abb. 33: LPS-induzierte Freisetzung inflammatorischer Mediatoren aus Fragmenten des viszeralen Fettgewebes der NZO-Maus.....	82
Abb. 34: FACS-Analyse zur Prüfung der Reinheit von Adipozytenpopulationen der NZO-Maus.....	83
Abb. 35: Primäre, reife Adipozyten der NZO-Maus.....	84
Abb. 36: Vergleich der Lipidakkumulation von Prä- und reifen Adipozyten.....	85
Abb. 37: Expression von Reifungsmarkern in 3T3-L1-Adipozyten	86
Abb. 38: FACS-Analysen zur Pref-1-Expression primärer Adipozyten in verschiedenen Differenzierungsstadien.....	87

Abb. 39: FACS-Analysen zur TLR4-Expression von Adipozyten	88
Abb. 40: Kinetik der LPS- bzw. Hsp60-induzierten Freisetzung inflammatorischer Mediatoren durch Präadipozyten	90
Abb. 41: Kinetik der LPS- bzw. Hsp60-induzierten Sekretion inflammatorischer Mediatoren durch reife Adipozyten	91
Abb. 42: Stresssignal-induzierte Sekretion von Mediatoren aus primären Adipozyten der NZO-Maus	92
Abb. 43: LPS- bzw. Hsp60-induzierte Freisetzung inflammatorischer Mediatoren durch primäre, reife Adipozyten der NZO-Maus	93
Abb. 44: Stimulatorische Aktivität der Stresssignale LPS und Hsp60	94
Abb. 45: Vergleich der LPS-induzierten IL-6-Freisetzung von C57BL/10ScSn- und C57BL/10ScCr-Mäusen	95
Abb. 46: Vergleich der LPS-induzierten IL-6-Freisetzung von Adipozyten der NOD TLR4 ^{+/+} und NOD TLR4 ^{-/-} Maus	96
Abb. 47: Vergleich der LPS-induzierten MCP-1-Freisetzung von Adipozyten der NOD TLR4 ^{+/+} und NOD TLR4 ^{-/-} Maus	97
Abb. 48: Vergleich der LPS-induzierten KC-Freisetzung von Adipozyten der NOD TLR4 ^{+/+} und NOD TLR4 ^{-/-} Maus	98
Abb. 49: Freisetzung inflammatorischer Mediatoren durch in LPS-Gegenwart gereifte Adipozyten der Linie 3T3-L1	99
Abb. 50: MTT-Test zur Bestimmung der Vitalität reifer Adipozyten der Linie 3T3-L1 nach Durchlaufen des Differenzierungsprozesses in Gegenwart von LPS und anschließender LPS-Stimulation	100
Abb. 51: Freisetzung inflammatorischer Mediatoren durch in LPS-Gegenwart gereifte Adipozyten der Mauslinie NOD TLR4	102
Abb. 52: MTT-Test zur Bestimmung der Vitalität reifer Adipozyten der NOD TLR4 ^{+/+} Maus nach Durchlaufen des Differenzierungsprozesses in Gegenwart von LPS und anschließender LPS-Stimulation	103
Abb. 53: Hypothetisches Modell zur regulatorischen Rolle von TLR4 bei der Diabetespathogenese der NOD-Maus.....	118

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden	10
Tabelle 2: Oligonukleotidsequenzen.....	17
Tabelle 3: PCR-Programm zum Nachweis von IDD-Loci.....	27
Tabelle 4: PCR-Programm zum Nachweis des <i>tlr4</i> -Gens.....	29
Tabelle 5: Programm zur RT-PCR.....	32
Tabelle 6: Anteile adhärenter und nicht-adhärenter Milzzellpopulationen an der Gesamtmilzzellpopulation.....	61
Tabelle 7: Anteil der CD4 ⁺ , CD4 ⁺ CD25 ⁺ und CD4 ⁺ CD25 ⁻ Zellen an den mononukleären Zellen der Milz.....	75
Tabelle 8: Foxp3-Expression von Milzzellen TLR4-exprimierender und TLR4-defizienter Tiere	77

8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich ganz herzlich Herrn PD Dr. Burkart danken, der mich hervorragend betreut hat, stets ein offenes Ohr hatte und mich immer tatkräftig unterstützt hat. Er ermöglichte mir den Besuch zahlreicher Tagungen und war immer eine fürsorgliche Begleitung. Seine ruhige Art hat mir stets geholfen meine Nervosität vor Vorträgen unter Kontrolle zu halten. Für all das möchte ich mich bedanken!

Herrn Prof. Dr. Proksch möchte ich herzlich danken für die spontane und unkomplizierte Übernahme des Korreferats.

Herrn Prof. Dr. Scherbaum und Herrn Prof. Dr. Roden danke ich für die Möglichkeit der Durchführung der Promotion am Deutschen Diabetes-Zentrum.

Der gesamten AG Burkart möchte ich danken für die wissenschaftliche, aber vor allem auch für die freundschaftliche Unterstützung in allen beruflichen und privaten Belangen. Waltraud möchte ich danken, dass sie einfach immer da war; Fariba für die lustigen Stunden gemeinsam an der Bank und die Freundschaft, die mir viel bedeutet. Bei Lena möchte ich mich bedanken, dass sie mir in allen Lebenslagen ohne zu zögern geholfen hat. Obwohl sie erst kurz in dieser Arbeitsgruppe ist, ist sie mir doch sehr ans Herz gewachsen. Auch allen ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe sei Dank für die vielen zahlreichen, netten Erinnerungen und die gute, freundschaftliche Atmosphäre.

Der gesamten 4. Etage (Neubau) vielen Dank für die kollegiale Zusammenarbeit!

Allen Doktoranden möchte ich danken für die Ablenkung vom Arbeitsalltag und die vielen Gespräche auf dem grünen Sofa.

Frau Prof. Dr. Janzik möchte ich danken für die Übernahme des Mentoriats und die vielen hilfreichen und netten Gespräche im Scottis. „Vielen, vielen Dank, Ingar, dass Du Dir immer Zeit genommen hast.“

Frau Demming-Pälmer möchte ich danken für die Aufnahme im Selma-Meyer-Mentoring-Programm und die tatkräftige Unterstützung auch noch nach dessen Abschluss.

Bei meiner Familie möchte ich mich bedanken, dass sie mich mit viel Liebe auf dem langen, steinigen Weg begleitet hat.

„Heiner, Dir ein besonderes Dankeschön! Du warst großartig! Vielen Dank für die Hilfe beim Formatieren!“ Birgit, möchte ich danken, dass sie Heiner solange entbehrt hat.

Anja, Annika und Olli vielen Dank für das Korrekturlesen und die Ablenkung vom wissenschaftlichen Alltag! All meinen Freunden sei gedankt, dass sie immer noch da sind und mich nicht völlig vergessen haben.

Allen, die mich auf meinem Weg begleitet haben, ein herzlicher Dank! „Ihr wart prima! Schön, dass es Euch gibt und dass ich das Glück hatte, auf Euch zählen zu können!“

Danke!