



**Toll-like Rezeptor 4 als gemeinsamer Regulator von
Energistoffwechsel und Inflammation bei der
Pathogenese des Insulinmangeldiabetes im
Tiermodell der non-obese diabetic Maus**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Anna Lena Reinbeck

aus Solingen

Düsseldorf, August 2013

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

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

Referent: PD Dr. Volker Burkart
Korreferent: Prof. Dr. Eckhard Lammert

Tag der mündlichen Prüfung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst habe. Es wurden keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich und inhaltlich übernommene Gedanken wurden als solche kenntlich gemacht.

Solingen, den _____

(Anna Lena Reinbeck)

„Der Fortgang der wissenschaftlichen Entwicklung ist im Endeffekt eine ständige Flucht vor dem Staunen.“

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Diabetes mellitus	1
1.1.1	Typ 1 Diabetes	1
1.1.2	Typ 2 Diabetes	2
1.1.3	Gestationsdiabetes	2
1.2	Pathogenese des Typ 1 Diabetes	3
1.2.1	Genetische Prädisposition	3
1.2.2	Umweltfaktoren	4
1.2.3	Betazell-gerichtete Immunprozesse in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes	4
1.2.4	Störungen von metabolischen Prozessen in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes	5
1.2.5	Klinik des Typ 1 Diabetes	6
1.2.5.1	Diagnose des Typ 1 Diabetes	6
1.2.5.2	Therapie des Typ 1 Diabetes	7
1.2.5.3	Spätkomplikationen	8
1.3	Tiermodelle des Typ 1 Diabetes	9
1.3.1	Induzierter Insulinmangel-Diabetes	9
1.3.2	Biobreeding Ratte	10
1.3.3	Non-obese diabetic Maus	10
1.4	Immunsystem	11
1.4.1	Nicht-adaptives Immunsystem	12
1.4.2	Adaptives Immunsystem	12
1.5	Immunologische Mechanismen in der Diabetespathogenese	13
1.5.1	Betazellschädigende Immunzellen	13
1.5.2	Rolle der Adipozyten in der Diabetespathogenese	14
1.5.2.1	Adipozyten als immunkompetente Zellen	14
1.6	Toll-like Rezeptoren	15
1.6.1	Toll-like Rezeptor 4	16
1.6.1.1	TLR4 in der Kontrolle immunologischer Prozesse	17
1.6.1.2	TLR4 in der Kontrolle metabolischer Prozesse	18
1.7	Ziel der Arbeit	19

2	Material und Methoden	21
2.1	Material	21
2.1.1	Tiere	21
2.1.1.1	C57BL/10ScSn und C57BL/10ScCr Maus	21
2.1.1.2	Non-obese diabetic Maus	21
2.1.2	Tierfutter	21
2.1.3	Zelllinien	21
2.1.3.1	Präadipozyten Zelllinie 3T3-L1	21
2.1.3.2	Makrophagen Zelllinie J774A.1	22
2.1.4	Chemikalien	22
2.1.5	Verbrauchsmaterialien	23
2.1.6	Oligonukleotide	24
2.1.6.1	Oligonukleotide zur Bestimmung des TLR4 Expressionsstatus	24
2.1.6.2	Oligonukleotide zur Quantifizierung der mitochondrialen und nukleären DNA copy number	24
2.1.7	Antikörper	25
2.1.8	Reagenzien und Puffer für die DNA Isolation und die Durchführung der Polymerasekettenreaktion	25
2.1.9	Medien und Reagenzien für die Zellkultur	26
2.1.9.1	Medien für die Adipozytenisolation	26
2.1.9.2	Medien für die Makrophagenisolation	27
2.1.9.3	Medien und Puffer für die Isolation pankreatischer Inseln	27
2.1.10	Reagenzien für die Durchführung der FACS-Messungen	28
2.1.11	Reagenzien und Puffer für die ELISA-Durchführung	28
2.1.12	Reagenzien und Puffer für die Durchführung der hochauflösenden Respirometrie	29
2.1.13	Molekularbiologische Kits	29
2.1.14	Geräte	30
2.1.15	Software und Datenbank	31
2.2	Methoden	32
2.2.1	Tierhaltung	32
2.2.2	Genotypisierung der Tiere	32
2.2.2.1	DNA Isolation aus Gewebeproben	32

2.2.2.2	Polymerasekettenreaktion	32
2.2.2.3	Agarose Gel-Elektrophorese.....	34
2.2.3	Diabetes Diagnostik	34
2.2.4	Dokumentation von Körpergewicht und Nahrungsaufnahme	35
2.2.5	Metabolische Phänotypisierung	35
2.2.6	Kernspinresonanz	37
2.2.7	Intraperitonealer Glukosetoleranztest	37
2.2.8	Intraperitonealer Insulintoleranztest	38
2.2.9	Hochauflösende Respirometrie.....	38
2.2.10	Bestimmung von Parametern aus peripherem Blut.....	39
2.2.10.1	Bestimmung von Triglyzeriden und freien Fettsäuren im Plasma ..	39
2.2.10.2	Bestimmung von Fetuin A, Insulin und Zytokinen im Serum	39
2.2.10.3	Bestimmung des HOMA-IR.....	40
2.2.11	Zellkultur	41
2.2.11.1	Isolation von Präadipozyten aus NOD Mäusen.....	41
2.2.11.2	Prüfung der Reinheit der isolierten Präadipozyten.....	41
2.2.11.3	Kultivierung der Zellen	42
2.2.11.4	Passagieren der Zellen	42
2.2.11.4.1	Passagieren von primären Präadipozyten der NOD Maus und Zellen der Linie 3T3-L1	42
2.2.11.4.2	Passagieren von Makrophagen der Linie J774A.1.....	43
2.2.11.4.3	Zellzahlbestimmung	43
2.2.11.5	Kryokonservieren von Präadipozyten	43
2.2.11.6	Auftauen von Zellen	44
2.2.11.7	Isolation von Milzmakrophagen aus NOD Mäusen	44
2.2.12	Stimulation der kultivierten Zellen zur Freisetzung inflammatorischer Mediatoren.....	45
2.2.12.1	Behandlung mit Lipopolysaccharid	45
2.2.12.1.1	Bestimmung der inflammatorischen Mediatoren IL-6 und TNF- alpha in Zellkulturüberständen	45
2.2.12.1.2	XTT-Test zum Nachweis der Zellvitalität.....	45
2.2.12.2	Glukose-stimulierte Insulinfreisetzung kultivierter pankreatischer Inseln	46

2.2.12.2.1	Isolation und Stimulation pankreatischer Inseln	46
2.2.12.2.2	Bestimmung der Insulinkonzentrationen in Inselkulturüberständen.....	47
2.2.13	Histologische Untersuchungen von Pankreasgewebe	47
2.2.13.1	Herstellung histologischer Pankreaspräparate.....	47
2.2.13.2	Morphometrische Analysen.....	47
2.2.14	Statistische Analysen.....	48
3	Ergebnisse.....	49
3.1	Analyse des TLR4-Expressionsstatus	49
3.1.1	Analyse des TLR4-Expressionsstatus auf der Ebene genomischer DNA.....	49
3.1.2	Funktionelle Charakterisierung des TLR4-Expressionsstatus.....	50
3.1.2.1	Ausschluss einer Makrophagenkontamination der Prädipozyten	50
3.1.2.2	Freisetzung inflammatorischer Mediatoren aus primären Prädipozyten der NOD Maus	52
3.1.2.3	Freisetzung inflammatorischer Mediatoren aus primären Milzmakrophagen der NOD Maus.....	54
3.2	Diabetesmanifestation in NOD Mäusen	55
3.2.1	Alter und Blutglukosekonzentration zum Zeitpunkt der Diabetesmanifestation	55
3.3	Metabolische Phänotypisierung	56
3.3.1	Futter- und Wasseraufnahme	57
3.3.2	Physische Aktivität	59
3.3.3	Energieverbrauch.....	61
3.3.4	Respiratorischer Quotient	63
3.4	Körpergewicht.....	66
3.5	Körperfettmasse.....	67
3.6	Interleukin 6 im Serum	68
3.7	Freie Fettsäuren und Triglyzeride im Plasma.....	69
3.8	Fetuin A im Serum	70
3.9	Lebergewicht.....	71

3.10	Mitochondriale Aktivität in der Leber und im <i>m. soleus</i>	71
3.11	Insulinpositive Fläche der Langerhans`schen Inseln	75
3.12	Glukose-stimulierte Insulinfreisetzung aus isolierten pankreatischen Inseln	77
3.13	Glukosetoleranz	78
3.13.1	Insulinkonzentrationen nach ipGTT	80
3.14	Insulintoleranz.....	80
3.15	HOMA-IR	83
4	Diskussion	84
4.1	Mausmodell der NOD Maus.....	84
4.2	Einfluss des TLR4-Expressionsstatus auf die Diabetesentwicklung	86
4.3	Einfluss des TLR4-Expressionsstatus auf die Körpergewichtsentwicklung und den inflammatorischen Status.....	87
4.4	Metabolismus.....	89
4.4.1	Metabolische Parameter	89
4.4.2	Fettsäuren, Triglyzeride, Fetuin A, mitochondriale Biogenese und Sauerstoff-Flux.....	91
4.5	Insulinsekretion	93
4.6	Insulinsensitivität.....	93
4.7	Hypothetische Rolle des TLR4 in der Regulation von Inflammation und Metabolismus im Modell der NOD Maus	94
5	Zusammenfassung/Summary	96
5.1	Zusammenfassung	96
5.2	Summary	97
6	Literaturverzeichnis	98

7	Anhang	108
7.1	Abkürzungsverzeichnis	108
7.2	Abbildungsverzeichnis	110
7.3	Tabellenverzeichnis	112
8	Danksagung	113

1 Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus beschreibt eine Gruppe von Stoffwechselkrankheiten, denen Störungen im Glukosestoffwechsel zugrunde liegen. Das Hauptsymptom ist ein über die definierte Norm erhöhter Blutglukosespiegel (Hyperglykämie), der durch einen absoluten oder relativen Insulinmangel verursacht wird.

Das Krankheitsbild des Diabetes wird in vier Hauptformen eingeteilt. Unterschieden wird zwischen dem Typ 1 Diabetes (T1D), dem Typ 2 Diabetes (T2D), dem Gestationsdiabetes und einer weiteren Gruppe vorwiegend seltener auftretender Diabetesformen. Weltweit liegt bei ca. 5 % der Bevölkerung ein diagnostizierter Diabetes vor; die Zahl unentdeckter Diabetesfälle ist allerdings deutlich höher. Etwa 5 - 10 % der Erkrankten leiden an einem T1D und ca. 90 - 95 % an einem T2D (1-3).

1.1.1 Typ 1 Diabetes

Der T1D ist die am häufigsten auftretende Stoffwechselkrankheit im Kindes- und Jugendalter (4) und ist neben einer Hyperglykämie u. a. von drei klassischen Symptomen begleitet: einer vermehrten Harnausscheidung (Polyurie), die eine erhöhte Flüssigkeitsaufnahme (Polydipsie) der Erkrankten zur Folge hat und eine gesteigerte Nahrungsaufnahme (Polyphagie) als Resultat einer katabolen Stoffwechsellage (2). Die Erkrankung ist geprägt durch eine immunvermittelte und chronisch-fortschreitende Zerstörung der autologen insulinproduzierenden Betazellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas, deren Aktivität zur Aufrechterhaltung eines normalen Blutglukosespiegels dient (5, 6). Die weitgehende Betazellzerstörung hat einen absoluten Insulinmangel zur Folge, der zu einer stark verringerten Lebensqualität der betroffenen Individuen führt. Patienten mit einem T1D sind auf eine lebenslange Substitution von Insulin angewiesen. Durch das vermehrte Auftreten von Hyperglykämien haben die Betroffenen zudem ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung von Spätschäden wie kardiovaskuläre Komplikationen, die insbesondere durch Mikro- und Makro-Angiopathien verursacht werden (1, 3).

Eine Minderheit von Fällen des T1D wird dem idiopathischen Diabetes zugeordnet. Die insulinproduzierenden Betazellen der Langerhans'schen Inseln sind bei Patienten mit dieser Diabetesform ebenfalls weitgehend zerstört, jedoch vermutlich nicht durch autoimmune Prozesse. Die Ursachen sind bislang weitgehend unbekannt (1, 7).

Der Latent Autoimmune Diabetes of Adults (LADA) beschreibt eine Subgruppe des Diabetes, die phänotypisch dem T2D ähnelt, allerdings Kennzeichen von Autoimmunität aufweist und deshalb zurzeit dem T1D zugeordnet wird (8, 9).

1.1.2 Typ 2 Diabetes

Der T2D ist die häufigste Form des Diabetes und ist typischerweise assoziiert mit einer Adipositas. Eine Hyperglykämie tritt als Folge eines relativen Insulinmangels auf, der auf die Insulinresistenz in den peripheren Geweben zurückzuführen ist. Die pankreatischen Betazellen produzieren in der frühen Phase der Erkrankung vermehrt Insulin, können aber die zunehmende Insulinresistenz nur für eine gewisse Zeit kompensieren. Diese erhöhte Beanspruchung der Betazellen kann in den Betroffenen im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung neben einer Insulinresistenz auch zu einer Betazellfunktion beitragen. Patienten mit T2D sind zumeist in der Frühphase der Erkrankung nicht unbedingt auf eine Behandlung mit exogenem Insulin angewiesen. Auch in Betroffenen mit T2D steigt das Risiko zur Entwicklung diabetesassoziierter Folgeerkrankungen (1, 3).

1.1.3 Gestationsdiabetes

Der Gestationsdiabetes (gestational diabetes mellitus GDM) ist eine schwangerschaftsbegleitende Diabetesform von der ca. 7 % der schwangeren Frauen betroffen sind. Während der Schwangerschaft kommt es zur Synthese schwangerschaftsspezifischer Hormone, wie z.B. Kortisol, Plazentalaktogen, Östrogen und Progesteron, die als Antagonisten des Insulins fungieren und eine unterschiedlich stark ausgeprägte Insulinresistenz auslösen können. Kann dieser relative Insulinmangel nicht durch die Betazellen kompensiert werden, kommt es zur Manifestation des Gestationsdiabetes, der meist nach der Geburt des Kindes wieder

abklingt. Die Erkrankung wird durch zahlreiche Faktoren wie z.B. Adipositas oder einer erblichen Vorbelastung zur Entwicklung eines T2D begünstigt (1, 3, 10).

1.2 Pathogenese des Typ 1 Diabetes

Die Pathogenese des T1D wird als ein multifaktorielles Geschehen beschrieben, bei dem nicht nur eine genetische Prädisposition die Manifestation der Erkrankung begünstigen kann sondern auch Umweltfaktoren die Induktion und Progression des Krankheitsgeschehens sowohl positiv als auch negativ beeinflussen können (11, 12).

1.2.1 Genetische Prädisposition

Im Jahr 2010 lag in der Gesamtbevölkerung Deutschlands die durchschnittliche Wahrscheinlichkeit zur Entwicklung eines T1D bei ca. 0,4 %. Das Risiko für Kinder von Patienten mit T1D ebenfalls die Krankheit zu entwickeln liegt aktuell bei 5 - 10 %. Ist der Vater an einem T1D erkrankt, ist das Risiko für Nachkommen doppelt so hoch (ca. 12 %) ebenfalls einen T1D zu entwickeln, als wenn die Mutter an einem T1D erkrankt ist (ca. 6 %) (13).

Genomweite Assoziationsstudien zeigen, dass die Prädisposition zur Krankheitsentwicklung durch Variationen im Bereich bestimmter Gene determiniert wird. Diese Variationen sind überwiegend in HLA Genen (Human Leukocyte Antigen) der MHC Komplexe (Major Histocompatibility Complexes) zu finden. Aber auch zahlreiche Variationen in nicht HLA kodierenden Genen tragen zur Erhöhung des Krankheitsrisikos bei. Zu diesen Genen gehören das Gen *INS*, das Insulin kodiert, das *CTLA4*, welches das zytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Protein 4 kodiert und das *IL2RA*, das die alpha-Kette des Interleukin 2 Rezeptors kodiert (14, 15).

Studien mit Zwillingen haben allerdings gezeigt, dass die Konkordanzrate eineiiger (monozygotischer) Zwillinge zwischen 13,0 und 67,6 % liegt und die zweieiiger (dizygotischer) Zwillinge lediglich bei ca. 10 %. Dies weist auf einen wichtigen Einfluss von Umweltfaktoren auf das Risiko zur Entwicklung eines T1D hin (16, 17).

1.2.2 Umweltfaktoren

In den vergangenen 60 Jahren verdoppelte sich die Inzidenz des T1D weltweit jährlich um 3 - 5 % (18). Dieses erhöhte Auftreten des T1D insbesondere im frühen Kindesalter (< 5 Jahre) wird auf einen starken Einfluss von Umweltfaktoren auf die Krankheitsprogression zurückgeführt. So variiert z. B. die Inzidenz des T1D saisonal. Die häufigsten Neumanifestationen des T1D sind in den Herbst- und Wintermonaten zu verzeichnen; dies ist offenbar auf ein erhöhtes Auftreten von viralen Infekten zurück zu führen (19). Es hat sich außerdem gezeigt, dass die T1D Inzidenzrate starke geographische Unterschiede aufweist. Die niedrigste Inzidenzrate liegt in China bei 0,7 (pro 100.000 Einwohner) während die höchste Inzidenzrate in Finnland zu beobachten ist und dort bei 30 (pro 100.000 Einwohner) liegt (20, 21).

Als diabetes-begünstigende Umweltfaktoren werden auch frühkindliche Infektionen mit Rotaviren, Coxsackie-B-, Röteln- oder dem Cytomegalie-Virus diskutiert. Dabei wird unter anderem vermutet, dass die Betazellen direkt von einem Virus befallen und lysiert werden, oder sich eine Immunreaktion gegen die viralen Antigene in der Betazelle entwickelt (21). Desweiteren wird angenommen, dass der intensivste Kontakt mit Nahrungsmittelbestandteilen wie Gluten und Kuhmilchproteinen in den ersten Lebensjahren die Krankheitsentwicklung begünstigt (22-24). So zeigte sich zum Beispiel eine Kreuzreaktivität zwischen Antikörpern gegen bestimmte Kuhmilchproteine und einem Oberflächenprotein der Betazelle (25).

1.2.3 Betazell-gerichtete Immunprozesse in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes

Erste Hinweise für den Beginn der immunvermittelten Zerstörung der autologen Betazellen des Pankreas sind das Auftreten von Autoantikörpern gegen Inselzellen (ICA), gegen Insulin (IAA), gegen die Glutamatdecarboxylase (GAD₆₅), gegen den Zinktransporter (ZnT8) und gegen die Tyrosin Phosphatasen (IA-2, IA-2 β). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass das Auftreten steigender Konzentrationen dieser Autoantikörper das Risiko für die Manifestation eines T1D deutlich erhöht (6).

Umfassende Studien in Patienten mit T1D zeigen schon in der prädiabetischen Phase eine wichtige Rolle von Komponenten des zellulären Immunsystems,

insbesondere Makrophagen und T-Lymphozyten und deren Mediatoren, bei der Schädigung der Betazelle. Ein wichtiger morphologischer Befund der zellvermittelten Reaktion gegen Betazellen ist die „Inselentzündung“ (Insulitis). Bei diesem chronisch-progredienten inflammatorischen Prozess infiltrieren mononukleäre Immunzellen die Langerhans'schen Inseln des Pankreas (17). Erst nach einer Zerstörung von mehr als 80 % der Betazellmasse kommt es zu klinischen Symptomen, wie z.B. der durch Insulinmangel verursachten Hyperglykämie, dem Gewichtsverlust, der Polyurie und der Polydipsie (21).

Kurz nach der Manifestation der Erkrankung folgt in ca. 60 % aller Patienten mit T1D die sogenannte „Honeymoon-Phase“. In dieser Remissionsphase kann die Insulinapplikation reduziert werden oder in manchen Fällen auch ganz eingestellt werden. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind noch nicht vollständig aufgeklärt, es scheint jedoch, dass chronisch erhöhte Blutglukosespiegel und eine therapeutische Insulinverabreichung dysfunktionale Betazellen stimulieren, wieder vermehrt Insulin zu produzieren und freizusetzen (17). Zusätzlich wird auch vermutet, dass die „Honeymoon-Phase“ auf eine temporär erhöhte Insulinsensitivität zurückzuführen ist.

1.2.4 Störungen von metabolischen Prozessen in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes

Frühere Studien haben gezeigt, dass die Progression des T1D nicht nur durch zahlreiche exogene Faktoren sondern auch durch ungünstige Lebensstilfaktoren beschleunigt wird. Ein erhöhtes Körpergewicht als Folge hyperkalorischer Ernährung und reduzierter physischer Aktivität scheinen das Risiko zur Manifestation der Erkrankung zu erhöhen (26, 27). Die Entwicklung von Übergewicht ist hauptsächlich auf eine vermehrte Zunahme der Fettgewebsmasse (Adipositas) zurückzuführen, welche mit tiefgreifenden Störungen des Glukose- und Lipidmetabolismus einhergeht. Als schwere Komplikation entwickelt sich häufig eine Insulinresistenz, eine verminderte Reaktivität peripherer Gewebe, wie Leber, Muskel und Fettgewebe, auf die blutglukosesenkende Wirkung von Insulin.

Zahlreiche neuere Studien zeigen, dass eine erhöhte Fettgewebsmasse mit einer chronischen, subklinisch verlaufenden Entzündungsreaktion

(Fettgewebsinflammation) einhergeht. Diese ist charakterisiert durch eine Einwanderung von Immunzellen in das Fettgewebe (28, 29) und wird meist von nur geringfügig erhöhten systemischen Spiegeln von inflammatorischen Mediatoren wie z.B. Interleukin 6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor alpha (TNF-alpha) begleitet (30, 31). In Untersuchungen an Kindern mit T1D zeigte sich, dass ein erhöhter Body Mass Index (BMI) mit erhöhten Serumspiegeln des proinflammatorischen Zytokins Interleukin 8 (IL-8) assoziiert ist. Desweiteren konnte an diesem Kollektiv jugendlicher Patienten gezeigt werden, dass zum Zeitpunkt der Krankheitsmanifestation erhöhte Serumspiegel von IL-6 und TNF-alpha messbar waren (32). Chronisch geringgradig erhöhte Konzentrationen von Entzündungsmediatoren verstärken wiederum die Insulinresistenz (33).

In früheren Studien wurde die Entstehung einer Insulinresistenz auf eine chronische Hyperglykämie als Folge einer schlecht eingestellten Stoffwechsellage zurückgeführt (34). Die erhöhten Blutglukosekonzentrationen führen in diesen Patienten unter anderem zu einer verminderten ATP(Adenosintriphosphat)-Synthese und in der Folge zu einer Insulinresistenz (20). Inzwischen konnte jedoch gezeigt werden, dass Patienten mit T1D unabhängig von der Qualität ihrer Stoffwechseleinstellung erhöhte Spiegel proinflammatorischer Mediatoren aufweisen (35, 36). Aktuelle Befunde in Patienten mit T1D zeigen eine Verstärkung der Insulinresistenz mit steigendem Fettgewebsanteil und mit zunehmender Konzentration des proinflammatorischen Zytokins IL-6 (37).

Dies legt die Vermutung nahe, dass das Fortschreiten der (auto-)immunvermittelten Schädigung pankreatischer Betazellen im Verlauf der Pathogenese des T1D entscheidend durch den Einfluss Adipositas-assoziiierter Faktoren, wie der Insulinresistenz und erhöhter systemischer Inflammation, beschleunigt wird.

1.2.5 Klinik des Typ 1 Diabetes

1.2.5.1 Diagnose des Typ 1 Diabetes

Das Hauptsymptom des T1D ist die Hyperglykämie als Folge eines absoluten Insulinmangels, der sich nach der immunvermittelten Zerstörung eines Großteils der

autologen insulinproduzierenden Betazellen des Pankreas einstellt. Es gibt z.Z. vier verschiedene Kriterien nach denen ein Diabetes diagnostiziert wird.

Nach den Richtlinien der Amerikanischen Diabetes-Gesellschaft (American Diabetes Association, ADA) liegt ein diagnostizierter Diabetes vor wenn nach achtstündigem Fasten der Nüchternblutglukosewert bei ≥ 126 mg/dl liegt, oder wenn während eines oralen Glukosetoleranztests (OGTT) der Blutglukosewert zwei Stunden nach der Aufnahme von 75 g gelöster Glukose bei ≥ 200 mg/dl liegt. Als Maß für die Qualität der Einstellung der Stoffwechsellage eines Patienten mit Diabetes kann außerdem die Bestimmung des Anteils an glykolysiertem Hämoglobin (HbA_{1c}) im Blut verwendet werden. Der HbA_{1c} spiegelt die mittlere Glukosekonzentration der letzten 1 - 2 Monate wieder und sollte in Patienten mit Diabetes und gut eingestellter Stoffwechsellage bei $\leq 6,5$ % liegen. Liegt in einer zufällig abgenommenen Blutprobe die Glukosekonzentration bei ≥ 200 mg/dl sollten für eine weitere Diagnostik die zuvor beschriebenen Kriterien überprüft werden (1).

Die Diagnose des T1D und die Abgrenzung des Krankheitsbildes von anderen Diabetesformen erfolgt hauptsächlich durch den Nachweis von Autoantikörpern gegen Betazellantigene und durch die Bestimmung der C-Peptidspiegel zur Abschätzung der residualen Insulinsekretionskapazität.

1.2.5.2 Therapie des Typ 1 Diabetes

In einem gesunden Menschen sezernieren die Betazellen in den Langerhans'schen Inseln der Bauchspeicheldrüse Insulin ins Blut und sorgen damit für die Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase. Da die Betazellen des Pankreas in einem Patienten mit T1D weitestgehend zerstört sind und sich dadurch ein absoluter Insulinmangel einstellt, sind die Patienten mit T1D strikt auf eine lebenslange exogene Insulinsubstitution angewiesen. Die zu verabreichende Menge des Insulins ist abhängig von zahlreichen exogenen Faktoren, die individuell sehr unterschiedlich sein können, wie z.B. das Essverhalten des Patienten, seine körperliche Aktivität oder die Einnahme weiterer Medikamente.

Für Patienten mit T1D werden drei Hauptformen der Insulintherapie unterschieden.

Bei der konventionellen Insulintherapie spritzt der Patient zu festgesetzten Zeiten ein Mischinsulin subkutan. Diese Therapieform kommt bei Patienten mit T1D seltener zum Einsatz; sie ist relativ unflexibel und fordert die regelmäßige Einnahme von Haupt- und Zwischenmahlzeiten zu vorgegebenen Zeitpunkten. Eine häufige Form der Insulintherapie ist die intensiviertere konventionelle Insulintherapie, bei der die Verabreichung eines langwirkenden (Verzögerungs-)Insulins und eines schnellwirkenden Insulins zum Einsatz kommt. Die dritte Therapieform stellt die funktionelle Insulintherapie dar. Diese Therapieform ist sehr flexibel und wird sehr häufig zur Therapie des T1D eingesetzt. Sie setzt sich aus einem langwirkenden Basalinsulin, einem schnellwirkenden Insulin und aus einem schnellwirkenden Insulin, das zusätzlich zur Korrektur dient, zusammen. Das Insulin kann mit Hilfe einer Spritze oder durch eine Insulinpumpe verabreicht werden. Die Insulinpumpe ermöglicht sowohl eine flexible Nahrungsaufnahme als auch eine bedarfsabhängige Insulinversorgung.

Bei allen drei Insulintherapiemethoden muss der Patient in regelmäßigen Abständen seinen Blutglukosespiegel mit einem Blutglukosemessgerät selbstständig überprüfen (38).

Da die Insulinverabreichung keine kausale Therapie für den T1D darstellt, gibt es zurzeit verschiedene Ansätze, die sich noch im Stadium der klinischen Erprobung befinden. Es wird sowohl der dauerhafte Ersatz der Betazellen durch Transplantationen erprobt, als auch ein mögliches Reaktivieren von Stammzellen zur Bildung neuer Betazellen (39, 40).

1.2.5.3 Spätkomplikationen

Eine chronische Hyperglykämie oder häufige hyperglykämische Episoden als Folge unzureichender glykämischer Kontrolle sind im T1D assoziiert mit für den Diabetes typischen Folgeerkrankungen. Patienten mit einer schlecht eingestellten Stoffwechsellage haben ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung von Spätschäden, die insbesondere durch folgenschwere Mikro- und Makroangiopathien verursacht werden. Die am häufigsten auftretenden Spätkomplikationen sind Bluthochdruck, die diabetische Nephropathie, die zur Dialysepflicht und schließlich zur Nierentransplantation führen kann, die diabetische Retinopathie, die zum Verlust des

Sehvermögens führen kann, die diabetische Neuropathie und das damit verbundene Risiko zur Entwicklung des diabetischen Fußsyndroms bis hin zu Amputationen, sowie das erhöhte Risiko für einen Herzinfarkt oder einen Schlaganfall (1).

1.3 Tiermodelle des Typ 1 Diabetes

Grundlegende Informationen zur Pathogenese des T1D stammen aus Studien in Tiermodellen der humanen Erkrankung. In diesen Modellen des Insulinmangel-Diabetes liegen der defekten Insulinproduktion verschiedene Ursachen zu Grunde, wie z.B. die chemisch induzierte Zerstörung der Inselzellen oder die spontane Entwicklung einer betazellgerichteten Immunreaktion (21, 41).

1.3.1 Induzierter Insulinmangel-Diabetes

Der chemisch induzierte Insulinmangel-Diabetes wird am häufigsten mit dem Betazelltoxin Streptozotozin induziert. Es wird aus dem gram-positiven Bakterium *Streptomyces achromogenes* gewonnen und wird den Tieren intraperitoneal (i.p.) oder intravenös (i.v.) verabreicht (42). Über die Blutbahn gelangt das Streptozotozin zum Pankreas und wird weitgehend selektiv über den GLUT2 Transporter von den Betazellen aufgenommen. In den Zellen alkyliert es die DNA und führt u.a. zur Reduktion der zellulären Produktion von ATP sowie zur Inhibierung der Insulinproduktion.

Das Modell des chemisch induzierten Insulinmangel-Diabetes wird häufig verwendet, um Transplantationsverfahren oder neue Ansätze der Blutglukosesenkung zu testen.

Ein schwerwiegender Nachteil dieses Modells des Insulinmangel-Diabetes ist, dass durch die chemische Induktion der Erkrankung und die toxische Wirkung des Streptozotozins häufig auch andere Organe im Körper des Tieres geschädigt werden (43).

1.3.2 Biobreeding Ratte

Die erste Kolonie der Biobreeding (BB) Ratte, die spontan einen Insulinmangel-Diabetes entwickelte, wurde 1974 in Kanada identifiziert (44).

BB Ratten werden häufig für Interventionsstudien und für Studien zu diabetes-assoziierten Komplikationen wie der diabetischen Neuropathie genutzt. Sie entwickeln typischerweise einen Diabetes im Alter von ca. 8 bis 16 Wochen. Phänotypisch ist die Erkrankung dem humanen T1D sehr ähnlich. Nach der Manifestation sind die Ratten auf eine Substitution von Insulin angewiesen um zu Überleben. Im Pankreas der Tiere ist eine deutliche Insulitis nachzuweisen, bei der eine sequenzielle Einwanderung von Makrophagen, NK-Zellen und T- und B-Lymphozyten in die Inseln beobachtet wird (45). Allerdings ist in den BB Ratten nach der Diabetesmanifestation die Konzentration der Lymphozyten im peripheren Blut deutlich erniedrigt. Diese Lymphopenie ist kein klassisches Merkmal des humanen T1D, weshalb die BB Ratte nur eingeschränkt als Tiermodell für die Erkrankung gelten kann (43).

1.3.3 Non-obese diabetic Maus

Die non-obese diabetic (NOD) Maus stellt das am häufigsten verwendete Tiermodell des humanen T1D dar. Sie wurde zuerst 1974 in Japan beschrieben und mittlerweile gibt es weltweit zahlreiche Kolonien (46).

Die Pathogenese des Diabetes in diesem Mausmodell beginnt mit einer prädiabetischen Phase, in der Makrophagen, NK-Zellen sowie T- und B-Lymphozyten die Langerhans'schen Inseln des Pankreas infiltrieren (46, 47). Diese Insulitis führt im Verlauf zur Zerstörung der insulinproduzierenden Betazellen, in deren Folge die Tiere zum weiteren Überleben auf eine Substitution von exogenem Insulin angewiesen sind. Die Erkrankung ist wie beim Menschen geprägt durch eine Hypoinsulinämie und einen rapiden Gewichtsverlust. Desweiteren weisen die diabetesprädisponierenden Veränderungen der MHC Klasse II Moleküle (Major Histocompatibility Complex II) der NOD Maus große Ähnlichkeiten mit denen des Menschen auf, was auf ähnliche krankheitsauslösende Faktoren bei der NOD Maus hinweist (48).

Für Forschungsarbeiten zur Aufklärung der Pathogenese des T1D werden fast ausschließlich weibliche NOD Mäuse verwendet, da ca. 60 - 90 % der weiblichen Tiere, allerdings nur 10 - 30 % der männlichen Tiere einen Diabetes entwickeln. Dabei sind das Diabetesmanifestationsalter und die Inzidenz der Erkrankung von Kolonie zu Kolonie unterschiedlich.

Insgesamt eignet sich jedoch die NOD Maus gut als Tiermodell für den T1D, da sie im Vergleich zu anderen Modellen viele wichtige Aspekte des humanen Krankheitsgeschehens abbildet und deshalb dazu genutzt werden kann, zentrale Fragen zur Immunologie, Genetik und den Signalwegen bei der Entstehung einer betazellgerichteten Immunreaktion im Rahmen eines T1D zu beantworten (43).

1.4 Immunsystem

Wenn ein Organismus mit einem potenziellen Krankheitserreger in Kontakt kommt, sind die ersten Barrieren, welche Mikroorganismen daran hindern in den Organismus einzudringen, physikalischer und chemischer Art. Erst wenn diese Barrieren überwunden werden wird das Immunsystem aktiv (49).

Das Immunsystem dient dem Schutz höherer Lebewesen vor schädigenden, körperfremden und krankheitserregenden Strukturen sowie vor Schäden, die von veränderten körpereigenen Zellen ausgehen. Die protektive Wirkung des Immunsystems beruht auf einem komplexen Zusammenspiel verschiedener Organe, mobiler Immunzellen, löslicher Botenstoffe und spezifischer Antikörper. Das Immunsystem muss vier Hauptaufgaben bewältigen, um seine Schutzfunktion zu erfüllen. Die wichtigste Aufgabe des Immunsystems ist die Erkennung von körperfremden Strukturen, wie sie z.B. von mikrobiellen Pathogenen exprimiert werden, die im Verlauf von Infektionen in den Körper eindringen. Die zweite Funktion ist die Immuneffektorfunktion mit deren Hilfe eine Infektion eingedämmt und wenn möglich abgewehrt werden kann. Die dritte Aufgabe ist die Immunregulation. Diese dient der Kontrolle des Immunsystems, indem zum Schutz des Körpers vor einer überschießenden Immunreaktion die eingeleiteten Immunreaktionen wieder herunterreguliert werden. Die vierte Aufgabe ist die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, mit dessen Hilfe ein Individuum, das mit

Krankheitserregern in Kontakt gekommen ist, bei einem erneuten Kontakt mit diesem Erreger eine sofortige und stärkere Immunreaktion einleiten kann (3, 49).

Das Immunsystem lässt sich in zwei funktionelle Einheiten unterteilen, die aber miteinander interagieren. Es besteht aus dem nicht-adaptiven (angeborenen) und dem spezifischen, adaptiven (erworbenen) Immunsystem (49).

1.4.1 Nicht-adaptives Immunsystem

Das nicht-adaptive Immunsystem dient der primären Erkennung von Krankheitserregern und veränderten körpereigenen Strukturen und dient der Einleitung einer sofortigen Abwehr- oder Schutzreaktion. Es ist allerdings nicht in der Lage, eine dauerhafte Immunität gegen einen spezifischen Krankheitserreger hervorzubringen. Komponenten der natürlichen Immunabwehr sind zum einen lösliche Faktoren wie z.B. das Lysozym, die Defensine, die Akut-Phase-Proteine und das Komplement System. Die wichtigsten zellulären Bestandteile sind die neutrophilen, basophilen und eosinophilen Granulozyten, die dendritischen Zellen, die Mastzellen, die natürlichen Killerzellen, sowie die Monozyten und die Makrophagen (3, 49).

1.4.2 Adaptives Immunsystem

Das adaptive Immunsystem ist in der Lage, eine spezifische Immunantwort zu generieren. Die Reaktionszeit ist allerdings verzögert im Vergleich zum innatem Immunsystem; es reagiert bei einer Re-Infektion aufgrund seiner Fähigkeit Gedächtniszellen auszubilden aber schneller und effizienter. Die wichtigsten löslichen, humoralen Komponenten des adaptiven Immunsystems sind die Antikörper und die wichtigsten zellulären Bestandteile sind die T- und B-Lymphozyten (3, 49).

Die T-Lymphozyten werden im Knochenmark gebildet und wandern zum Ausreifen in den Thymus. Sie erkennen nur Antigene, die von körpereigenen Zellen durch MHC-Moleküle auf deren Oberfläche präsentiert werden. Es werden im Wesentlichen drei verschiedene Populationen von T-Lymphozyten unterschieden. Die zytotoxischen T-Zellen töten Zellen ab, die mit Krankheitserregern oder Viren infiziert sind. Die zweite Subpopulation ist die der T-Helferzellen; sie geben Signale ab, die

antigenstimulierte B-Zellen zur Differenzierung und Antikörperproduktion aktivieren. Die regulatorischen T-Zellen bilden die dritte Gruppe und dienen der Begrenzung von Immunreaktionen und der Verhinderung von Reaktionen gegen körpereigene (Auto-)Antigene (3, 49).

1.5 Immunologische Mechanismen in der Diabetespathogenese

1.5.1 Betazellschädigende Immunzellen

In der Pathogenese des T1D stellen die Makrophagen eine der wichtigsten Zellpopulationen dar; sie scheinen jedoch bei der Entwicklung des T2D eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Sie sind als antigenpräsentierende Zellpopulation maßgeblich an der Initiation und Progression der Immunzell-Infiltration der Langerhans'schen Inseln des Pankreas beteiligt. Die besondere Rolle von Makrophagen bei der Betazellzerstörung im Verlauf einer progressiven Immunzellinfiltration der Inseln konnte im Tiermodell des chemisch induzierten und des spontanen Insulinmangeldiabetes (45, 50) sowie im Menschen nachgewiesen werden (51, 52).

Eine der wichtigsten Funktionen der Makrophagen ist die Phagozytose. Über Pattern-recognition Rezeptoren erkennen sie eine Vielzahl mikrobieller Strukturen. Epitope von Strukturen aufgenommener und inaktivierter Mikroorganismen werden nach ihrer Prozessierung im Kontext von MHC Klasse II Molekülen auf der Makrophagenoberfläche präsentiert. Diese Antigene werden durch eine spezialisierte Subpopulation von T-Lymphozyten, den T-Helferzellen, erkannt und aktivieren eine adaptive Immunantwort. Unvollständige oder fehlerhafte Kontrolle bei der Aktivierung nicht-adaptiver und/oder adaptiver Immunprozesse kann auf bisher nur unvollständig geklärte Weise zur Entwicklung von Immunreaktionen gegen körpereigene Antigene führen.

Im Tiermodell des Insulinmangeldiabetes, der NOD Maus, sowie im Menschen konnten T-Lymphozyten mit Spezifität gegen Betazellantigene wie z.B. Insulin nachgewiesen werden (53).

1.5.2 Rolle der Adipozyten in der Diabetespathogenese

1.5.2.1 Adipozyten als immunkompetente Zellen

Adipozyten sind maßgeblich an der Bildung des Fettgewebes beteiligt. Es wird das Unterhautfettgewebe (subkutan) und das Eingeweidefettgewebe (viszeral) unterschieden. Das weiße Fettgewebe, welches den größten Anteil des Fettgewebes ausmacht, erfüllt drei Hauptfunktionen. Es dient als Speicher- und Depotfett, als Isolierfett und als Strukturfett (3, 54).

Adipozyten fungieren als wichtige zelluläre Elemente bei der Stabilisierung des Lipidmetabolismus. Sie speichern freie Fettsäuren (FFA) in Form von Triglyzeriden in ihren Fettvakuolen und können diese bei Bedarf als FFA und Glycerin abgeben. Desweiteren spielen Adipozyten eine wichtige Rolle im Glukosemetabolismus, da sie insulinabhängig GLUT-4 Transporter auf ihrer Oberfläche exprimieren, wodurch sie dazu beitragen, die postprandiale Glukoseaufnahme aus dem Blut in das Gewebe zu steuern. Außerdem haben Adipozyten wichtige endokrine Funktionen. Sie sezernieren u.a. Peptide, Hormone und auch Komplementfaktoren in die Blutbahn und die umgebenden Gewebe.

In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass Adipozyten auch wichtige Eigenschaften von immunkompetenten Zellen aufweisen. Sie sind in der Lage Zytokine und Chemokine als Antwort auf inflammatorische Signale und in Folge von Stresseinwirkung zu sezernieren (3, 54-56).

Aktuelle Untersuchungen belegen eine Aktivierung von Adipozyten, die metabolischem Stress ausgesetzt waren. Durch die Aufnahme fett- und glukosereicher Nahrung kommt es im Fettgewebe z.B. zur Sekretion des Chemokins Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) (57). Adipozyten können aber nicht nur durch metabolische Stresssignale, sondern auch durch immunologische Stressoren aktiviert werden. So sezernieren sie als Antwort auf eine Stimulation mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) oder dem Hitzeschockprotein 60 (Hsp60) proinflammatorische Mediatoren wie z.B. das Zytokin IL-6 und das MCP-1 (58, 59). Das LPS bindet auf den Adipozyten an eine definierte Struktur aus der Familie der Toll-like Rezeptoren (60).

1.6 Toll-like Rezeptoren

Die Toll-like Rezeptoren (TLR) gehören zur Gruppe der Pattern Recognition Rezeptoren (PRR), die über die Bindung molekularer Muster von Mikroorganismen die Erkennung mikrobieller Pathogene ermöglichen (61, 62). Die TLR sind benannt nach dem Gen *Toll*, das ursprünglich in der Taufliege *Drosophila melanogaster* identifiziert wurde und für einen Plasmamembranrezeptor kodiert, der eine wichtige Rolle in der dorso-ventral Entwicklung im Embryonalstadium der Fliege spielt (63). In Säugetieren wurden bislang 13, im Menschen 11 verschiedene TLR beschrieben (Tab. 1) (64), die alle unterschiedliche molekulare Muster (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) von verschiedenen mikrobiellen Pathogenen erkennen (65). Die TLR sind Typ-1-Transmembranproteine mit einer N-terminalen, extrazellulären leuzinreichen Domäne und einer C-terminalen zytoplasmatischen Domäne, die für die Signalübertragung erforderlich ist.

Tab. 1: Humane Toll-like Rezeptoren

TLR	Lokalisation	Ligand	Adaptormolekül
TLR1/2	Plasmamembran	Triacyl-Lipopeptide	TIRAP, MyD88
TLR2	Plasmamembran	Peptidoglykan, Lipopeptide, Lipoproteine von gram-negativen Bakterien	TIRAP, MyD88
TLR3	Endosom	einzelsträngige RNA	TRIF
TLR4	Plasmamembran	Lipopolysaccharid von gram-negativen Bakterien	TIRAP, MYD88, TRIF
TLR5	Plasmamembran	bakterielles Flagellin	MyD88
TLR6/2	Plasmamembran	Diacyl-Lipopeptide	TIRAP, MyD88
TLR7	Endosom	einzelsträngige RNA	MyD88
TLR8	Endosom	einzelsträngige RNA	MyD88
TLR9	Endosom	doppelsträngige DNA	MyD88
TLR10	Plasmamembran	unbekannt	unbekannt
TLR11	Plasmamembran	Moleküle uropathogener Bakterien	MyD88

Neben xenogenen Strukturen erkennen die TLR auch autologe Moleküle wie z.B. Hitzeschockproteine (HSP), die in zellulären Stresssituationen freigesetzt werden (66). Dies legt die Vermutung nahe, dass die TLR auch an der Entwicklung von

Autoimmunerkrankungen gegen körpereigene Zellen und Gewebe beteiligt sind. Die Aktivierung von TLR induziert eine pro-inflammatorische Antwort und führt zur Transkription von Genen, die u.a. immunstimulatorische Zytokine und Chemokine kodieren (67).

1.6.1 Toll-like Rezeptor 4

In Mammalia wurde der Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) ursprünglich auf der Oberfläche von innatem Immunzellen beschrieben. Er bildet die zentrale Komponente eines Rezeptorkomplexes, der u.a. für die Erkennung von LPS, einem Bestandteil der äußeren Zellwand gram-negativer Bakterien, und damit für die Induktion einer Immunantwort zur Abwehr bakterieller Infektionen verantwortlich ist (62). Der Mensch kann LPS Konzentrationen bis zu 1 ng/ml im Serum tolerieren, während höhere LPS Konzentrationen einen septischen Schock (Endotoxinschock) auslösen können (68).

Der TLR4 ist extrazellulär mit dem membrangebundenen Glykoprotein CD14 (cluster of differentiation 14) und dem Protein MD2 (myeloid differentiation factor 2) assoziiert. Das CD14 Molekül wird als das eigentliche LPS-Bindeprotein auf der Oberfläche mononukleärer Zellen beschrieben. Es bindet das LPS, das im Blut einen Komplex mit dem Akutphaseprotein LBP (LPS binding protein) eingeht, welches an der Lipiddomäne des LPS bindet (63, 69). Der CD14-LPS Komplex bindet an den TLR4. Nach der Aktivierung des TLR4 durch die Bindung eines Liganden wie z.B. das LPS gibt es zwei mögliche intrazelluläre Signalwege, die zur Transkription von Genen führen, die für (pro-)inflammatorische Zytokine und Chemokine kodieren, welche das innate Immunsystem stimulieren. Unterschieden werden der MyD88 (myeloid differentiation factor 88) abhängige und der MyD88 unabhängige Signalweg. Im MyD88 abhängigen Signalweg stellt das Molekül TIRAP (toll interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein) das intrazelluläre Bindeglied zwischen TLR4 und MyD88 dar. MyD88 interagiert u.a. mit IRAK1 (interleukin 1 receptor-associated kinase 1) und IRAK4, das wiederum TRAF6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6) aktiviert. Die Aktivierung weiterer Kinasen führt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B (nuclear transcription factor kappaB) und AP-1 (activator protein 1), welche die Transkription von Genen inflammatorischer Zytokine, Chemokine und von Interferon induzieren. Im MyD88

unabhängigen Signalweg wird intrazellulär TRAM (translocating chain-associating membrane protein) und TRIF (toll/interleukin-1 receptor-domain-containing adaptor-inducing interferon- β) aktiviert. Dieser Komplex induziert die Aktivierung von TRAF3 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 3) und einer Signalkaskade, die ebenfalls zur Produktion von Zytokinen und Chemokinen führt und somit eine proinflammatorische Reaktion induziert (63, 64, 70).

1.6.1.1 TLR4 in der Kontrolle immunologischer Prozesse

Neben LPS als xenogenem Liganden bindet der TLR4 auch autologe Strukturen wie z.B. das endogene HSP60, das als dominantes Stressprotein beschrieben wird und außerdem als putatives Betazell-(Auto-)antigen an der Pathogenese des T1D beteiligt zu sein scheint (66, 71). Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass der TLR4 nicht nur an der Abwehr bakterieller Infektionen und an der Entwicklung von Entzündungsreaktionen beteiligt ist, sondern auch zur Induktion von Immunreaktionen gegen autologe Strukturen beiträgt.

Wie bereits oben erwähnt wurde der TLR4 in Mammalia ursprünglich als Rezeptor auf Zellen des natürlichen Immunsystems beschrieben, insbesondere auf Makrophagen, die eine wichtige Rolle bei der Abwehr mikrobieller Infektionen spielen (72), aber auch an der Regulation inflammatorischer Prozesse beteiligt sind, die mit Störungen des Energie- bzw. Glukosestoffwechsels einhergehen, wie sie im T2D beobachtet werden. Im Verlaufe einer sich entwickelnden Adipositas wandern u.a. Makrophagen (73) und T-Lymphozyten in das Fettgewebe ein und tragen so zur Entwicklung einer Fettgewebsinflammation bei (74, 75).

Die Stimulation des TLR4 durch die Bindung sowohl xenogener als auch endogener Liganden führt zur NF κ B-vermittelten proinflammatorischen Aktivierung immunkompetenter Zellen, die immunstimulatorische Mediatoren wie Zytokine (IL-6, TNF-alpha) und Chemokine (MCP-1) freisetzen (76). In adipösen Individuen konnten chronisch erhöhte Konzentrationen proinflammatorischer Mediatoren nachgewiesen werden. Somit könnte vermutet werden, dass die TLR4-abhängige Erhöhung systemischer Zytokinkonzentrationen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung betazellschädigender Immunreaktionen spielten und die Entwicklung des Insulinmangeldiabetes begünstigten (77).

Erste Hinweise zur möglichen Rolle von TLR4 bei der Entwicklung des T1D und adipositas-assoziiertes Inflammation stammen aus Untersuchungen an Tiermodellen. So zeigte sich, dass eine Diät-induzierte Adipositas in TLR4-defizienten Mäusen zu einem Rückgang von inflammatorischen Prozessen führt (78).

1.6.1.2 TLR4 in der Kontrolle metabolischer Prozesse

Neuere Studien zeigen, dass der TLR4 neben seiner Rolle bei der Induktion von inflammatorischen Prozessen und seiner vermutlichen Beteiligung an (Auto-)Immunreaktionen auch in der Regulation metabolisch relevanter Prozesse involviert ist. Eine wichtige Rolle spielt dabei der endogene Ligand Fetuin A, der als Vermittler zwischen FFA und TLR4 agiert (79). Im Serum von adipösen Individuen konnten deutlich erhöhte Konzentrationen von Fetuin A nachgewiesen werden (80, 81).

Nachdem der TLR4 ursprünglich auf Zellen des innatens Immunsystems nachgewiesen wurde, konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass er auch auf Adipozyten exprimiert wird, denen ursprünglich lediglich eine Rolle im Fettstoffwechsel zugesprochen wurde, die aber inzwischen auch als immunkompetente Zellen beschrieben wurden (82). Der TLR4 beeinflusst die Insulinsensitivität von Adipozyten (83) und stimuliert nach Bindung exogener und endogener Liganden die Freisetzung von Immunmediatoren. Diese können lokal zur Fettgewebsinflammation und systemisch zur Erhöhung zirkulierender Spiegel proinflammatorischer Mediatoren beitragen (58, 59). Desweiteren konnten in Patienten mit T2D eine verbesserte TLR4 Aktivierbarkeit und erhöhte Spiegel von Liganden des Rezeptors beschrieben werden (84, 85), während Patienten mit T1D eine gesteigerte Expression von TLR4 sowie ebenfalls erhöhte Spiegel von TLR4 Liganden aufweisen (86). Diese Befunde weisen auf eine Rolle des TLR4 bei der Pathogenese des T1D hin.

In Tiermodellen mit experimentell induzierter Adipositas zeigte sich, dass der TLR4 an der Aufrechterhaltung des metabolischen Gleichgewichts beteiligt ist. In diesen Studien zeigten Tiere mit einer TLR4 Deletion oder mit einer Mutation, die zu einem Funktionsverlust des TLR4 führt, nach Verabreichung einer fettreichen Diät eine verringerte Insulinresistenz und einen partiellen Schutz vor der Entwicklung einer Adipositas (78, 87-89). Als möglicher molekularer Mechanismus der TLR4-

vermittelten Erhöhung der Insulinresistenz wird die Hemmung des Insulinsignaltransduktionsweges insbesondere durch die inhibitorisch wirkende Phosphorylierung von Serin- (und Threonin-) Resten des Insulinrezeptorsubstrates 1 (IRS-1) durch proinflammatorische Kinasen diskutiert. Diese können unmittelbar in Folge einer TLR4 Stimulation aktiviert werden bzw. durch die Einwirkung von proinflammatorischen Zytokinen aktiviert werden, die in Folge einer TLR4 Stimulation gebildet werden (90).

1.7 Ziel der Arbeit

Der T1D ist charakterisiert durch die immunvermittelte Zerstörung der autologen insulinproduzierenden Betazellen in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas. Neuere Studien weisen darauf hin, dass Störungen des Energiemetabolismus (u.a. Adipositas, Insulinresistenz) zur Beschleunigung der Krankheitsentwicklung beitragen können.

Aktuelle Arbeiten legen die Vermutung nahe, dass der TLR4, der ursprünglich als Rezeptor für bakterielles LPS auf innate Immunzellen identifiziert wurde, als Regulator Adipositas-assoziiertes systemischer Inflammation und Insulinsensitivität an der Progression des Insulinmangeldiabetes beteiligt ist und somit als molekulares Bindeglied zwischen Inflammation und Metabolismus fungiert.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb die Prüfung der Hypothese, dass der TLR4 ein gemeinsamer Regulator von Inflammation und Energiestoffwechsel bei der Pathogenese des Insulinmangeldiabetes im Tiermodell der NOD Maus ist.

Um den Effekt des TLR4 auf die Pathogenese des Insulinmangeldiabetes zu prüfen, wurde der selektive TLR4-Defekt aus der C57BL/10ScCr Maus in die spontan diabetische NOD Maus eingekreuzt.

Im Tiermodell der TLR4-defizienten NOD Maus sollte durch eine umfassende metabolische Phänotypisierung die Rolle des TLR4 als gemeinsamer Regulator von inflammatorischen Prozessen und Stoffwechselfvorgängen bei der Progression des Insulinmangeldiabetes aufgeklärt werden. Die Untersuchungen konzentrieren sich im Wesentlichen auf den Metabolismus der Mäuse, sowie auf systemische Parameter und die Insulinsensitivität.

Die zu erwartenden Ergebnisse können dazu beitragen neue Strategien zu entwickeln, um über eine gezielte Modulation von TLR4-abhängigen Prozessen, die gleichzeitig auf an der T1D Pathogenese beteiligte immunologische und metabolische Prozesse einwirken, die Erfolgsaussichten betazellprotektiver Ansätze zu verbessern.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tiere

2.1.1.1 C57BL/10ScSn und C57BL/10ScCr Maus

Die C57BL/10ScCr Maus trägt den TLR4 Defekt und wurde für die Einkreuzung des Rezeptor Defektes in die NOD Maus verwendet. Die TLR4-exprimierende C57BL/10ScSn Maus und die TLR4-defiziente C57BL/10ScCr Maus dienen als Kontrollstämme ohne Risiko einen Insulinmangeldiabetes zu entwickeln (91). Die Mäuse wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M.A. Freudenberg (Max-Planck-Institut für Immunbiologie und Epigenetik, Freiburg).

2.1.1.2 Non-obese diabetic Maus

Die NOD Maus wurde als Modell für den humanen T1D verwendet (92). Weibliche Tiere des Stammes entwickeln zu ca. 60 - 90 % einen Insulinmangeldiabetes. In den Parentalstamm der NOD Maus wurde der TLR4-Defekt der C57BL/10ScCr Maus über mehr als 15 Generationen eingekreuzt. Beide Mausstämme stammen aus der Zucht am Deutschen Diabetes-Zentrum (DDZ).

2.1.2 Tierfutter

Die Mäuse erhielten als Diät Ssniff® M-Z Alleinfuttermittel, extrudiert (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) sowie Leitungswasser ad libitum.

2.1.3 Zelllinien

2.1.3.1 Präadipozyten Zelllinie 3T3-L1

Die murine 3T3-L1 Zelllinie wurde durch klonale Isolation aus der heteroploiden 3T3-L1 Fibroblastenlinie generiert. Die Zelllinie wurde von der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) käuflich erworben und wird seit Juni 2007 am DDZ kultiviert.

2.1.3.2 Makrophagen Zelllinie J774A.1

Bei der Zelllinie handelt es sich um murine Makrophagen der Linie J774A.1 (93). Die Zellen wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) käuflich erworben.

2.1.4 Chemikalien

Adenosintriphosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agarose	Serva, Heidelberg
Albumin (bovin) Fraktion V	Serva, Heidelberg
Antimycin A	Sigma-Aldrich, Steinheim
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Cytochrom C	Sigma-Aldrich, Steinheim
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Gibco BRL, Eggenstein
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNA Größenmarker	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
FCCP	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA (Titriplex III)	Merck KGaA, Darmstadt
EGTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Glukose 20 %	Braun Melsungen AG, Melsungen
Glutamat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hämatoxylin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim
Imidazol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kalium	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumlactobionat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lipopolysaccharid (LPS) <i>Serotyp O55:B5</i>	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach
Malat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumchlorid	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt
MES (Natrium-Salz)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Methanol		Sigma-Aldrich, Steinheim
Natrium		Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumcarbonat		Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid		AppliChem, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat		Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat		Serva, Heidelberg
Natrium-phosphocreatin		Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumpyruvat		PAA Laboratories GmbH, Pasching
Natronlauge		Merck KGaA, Darmstadt
PCR Direct Ear		PeQLab Biotech GmbH, Erlangen
Paraformaldehyd (PFA)		Merck KGaA, Darmstadt
Proteinase K		PeQLab Biotech GmbH, Erlangen
Pyruvat		Sigma-Aldrich, Steinheim
Rinderserumalbumin (BSA)		Sigma-Aldrich, Steinheim
Saccharose		Sigma-Aldrich, Steinheim
Saponin		Sigma-Aldrich, Steinheim
Schwefelsäure		Merck KGaA, Darmstadt
Succinat		Sigma-Aldrich, Steinheim
Taq Polymerase		Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Taurin		Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris		Merck KGaA, Darmstadt
Triton X-100		Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween-20		AppliChem GmbH, Darmstadt
Xylencyanol		Sigma-Aldrich, Steinheim
Xylol		AppliChem GmbH, Darmstadt

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Abdeckfolie, selbstklebend		Becton Dickinson, Heidelberg
Accu-Check Diabur Test		Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Combitips plus	5 ml	Eppendorf Biopur, Hamburg
Cryoröhrchen	2 ml	Simport, Beloeil, QC, Canada
Multiwellplatten	6, 48, 96 wells	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Multiwellplatten	96 wells	Gibco, Life Technologies, Karlsruhe
Parafilm		American National Can, Chicago, IL
Pasteurpipetten	2 ml	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Petrischalen		Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen	2,5 µl, 20 µl	Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf
Pipettenspitzen	200, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Plastikpipetten	5, 10, 25 ml	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Reaktionsgefäße	2,5 ml	Eppendorf, Hamburg

Serologische Pipetten	5, 10, 25 ml	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilfilter	0,2 µm	Pall GmbH, Dreieich
Spritzen	1, 2, 5, 10 ml	Amefa, Kriftel
Wägeschalen		Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen	25, 75 cm ²	Gibco, Life Technologies, Karlsruhe
Zentrifugenröhrchen	15, 10 ml	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg

2.1.6 Oligonukleotide

2.1.6.1 Oligonukleotide zur Bestimmung des TLR4 Expressionsstatus

Tab. 2: Nukleotidsequenzen der Primer zum Nachweis des TLR4 Expressionsstatus

Gen	forward primer	reverse primer	Fragmentgröße (bp)
TLR4-Wildtyp	5' – CAG TCG GTC AGC AAA CGC CTT CTT C –3'	5' – CAA GGC AGG CTA GCA GGA AAG GGT –3'	401
TLR4-Defekt	5' – GCA AGT TTC TAT ATG CAT TCT C –3'	5' – CCT CCA TTT CCA ATA GGT AG –3'	140

Die Primer wurden käuflich erworben bei Eurofins MWG Operon, Ebersberg

2.1.6.2 Oligonukleotide zur Quantifizierung der mitochondrialen und nukleären DNA copy number

Tab. 3: Nukleotidsequenzen der Primer und Sonden zur Bestimmung der mitochondrialen und nukleären DNA copy number

Gen	forward primer	reverse primer	Sonde
ND1	5' – CTA CAA CCA TTT GCA GAC GC –3'	5' – GGA ACT CAT AGA CTT AAT GC –3'	5' – FAM CCA ATA CGC CCT TTA ACA ACC TC BHQ –3'
LPL	5' – GGT TTG GAT CCA GCT GGG CC –3'	5' – GAT TCC AAT ACT TCG ACC AGG –3'	5' – FAM CTT TGA GTA TGC AGA AGC CC BHQ –3'

Die Primer und Sonden wurden käuflich erworben bei Eurogentech, Lüttich (Belgien). Die Sonden sind am 5'- Ende markiert mit dem Reporterfluoreszenzfarbstoff FAM (6-Carboxyfluorescein) und am 3' Ende mit dem Quencher BHQ (Black Hole Quencher).

2.1.7 Antikörper

APC-markierter monoklonaler Ratte-Anti-Maus CD11b-Antikörper	Becton Dickinson, Heidelberg
APC-markierter monoklonaler Ratten-IgG _{2b} -Antikörper (Isotypenkontrolle)	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-Schweine-Insulin-Serum von Meerschweinchen	Dako, Hamburg
Normalserum (Maus)	Dianova, Hamburg

2.1.8 Reagenzien und Puffer für die DNA Isolation und die Durchführung der Polymerasekettenreaktion

DEPC-Wasser	1 ml	Diethylpyrocarbonat
	999 ml	Aqua dest.
DNA-Ladepuffer (6x)	0,25 ml	Bromphenolblau
	69,5 ml	DEPC-Wasser
	0,25 ml	Xylencyanol
	30 ml	Glycerin
PCR Puffer (10x), pH 8,3	100 mM	Tris
	500 mM	KCl
	1 %	Triton X-100
	100 ml	DNase und RNase freies Aqua dest.
TBE Puffer, pH 8,1	121,1 g	Tris
	61,8 g	Borsäure
	7,44 g	EDTA
	10,165 g	MgCl ₂ x 6H ₂ O
	1000 ml	Aqua dest.

2.1.9 Medien und Reagenzien für die Zellkultur

Accutase	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Antibiotikum- Antimykotikum Lösung	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Kälberserum (CS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Kollagenase NB4	Serva, Heidelberg
DMEM high glucose (4,5 g/l)	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Donor Calf Serum	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Dulbecco's PBS (1x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Glukose-Lösung (20 %)	Braun Melsungen AG, Melsungen
Insulin, Insuman Rapid 40 IE/ml	Sanofi Aventis GmbH, Frankfurt
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching
MEM non-essential Amino Acids	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Natriumpyruvat Lösung	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Penicillin G K-Salz	Serva, Heidelberg
Ringer-Lactat Lösung	DeltaSelect GmbH, Pfullingen
Streptomycin	Serva, Heidelberg
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim

Trypanblau Lösung	25 %	Trypanblau (0,4 %)
	75 %	PBS Dulbecco's (1x)

2.1.9.1 Medien für die Adipozytenisolation

Adipozyten-Kulturmedium	500 ml	DMEM high glucose 4,5 g/l
	10 % (v/v)	Kälberserum
	1 %	Antibiotikum-Antimykotikum Lösung
	1 mM	Natriumpyruvat
	1 %	L-Glutamin
Einfriermedium	7 ml	DMEM Adipozyten-Kulturmedium
	2 ml	Donor Calf Serum
	1 ml	DMSO

2.1.9.2 Medien für die Makrophagenisolation

Makrophagen Kulturmedium	500 ml	DMEM high glucose 4,5 g/l
	5 %	FCS
	13,75 ml	Supplement
	400 µl	β-Mercaptoethanol Stammlösung
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

2.1.9.3 Medien und Puffer für die Isolation pankreatischer Inseln

Krebs-Ringer Puffer, pH 7,35	3,45 g	NaCl
	0,179 g	KCl
	0,082 g	KH ₂ PO ₄
	0,148 g	MgSO ₄ x 7H ₂ O
	0,184 g	CaCl ₂ x 2H ₂ O
	1,191 g	HEPES
	0,25 %	BSA Fraktion 5
Insel-Kulturmedium	500 ml	DMEM 1 g/l Glukose
	5 ml	Antibiotikum-Antimykotikum
	5 ml	Natrium-Pyruvat
	5 ml	L-Glutamin
	50 ml	Donor Calf Serum
	2,5 ml	Glukose-Lösung 20 %
Kollagenase Lösung	0,5 U/ml	in PBS

2.1.10 Reagenzien für die Durchführung der FACS-Messungen

Cellwash	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-flow	Becton Dickinson, Heidelberg
Normalserum (Maus)	Dianova, Hamburg

2.1.11 Reagenzien und Puffer für die ELISA-Durchführung

OptEIA-Coatingpuffer

IL-6 ELISA

1,43 g NaHCO_3

0,14 g Na_2CO_3

Aqua dest. ad 200 ml, pH auf 9,5 einstellen, Lagerung bei 4 °C

MCP-1 ELISA

4,18 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

2,96 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

Aqua dest. ad 200 ml, pH auf 6,5 einstellen, Lagerung bei 4 °C

Assay Diluent

10 % FCS in PBS, pH 7

PBS (10x)

40,0 g NaCl

7,2 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

1,0 g KH_2PO_4

1,0 g KCl

Aqua dest. ad 400 ml, pH 7,0

PBS/Tween Waschpuffer

500 μl Tween 20

1 l PBS (1x), pH 7

TMB-Substrat Lösung

Mischung von Substrat-Reagenz A (beinhaltet Wasserstoffperoxid) und Substrat-Reagenz B (beinhaltet TMB) in gleichen Verhältnissen frisch anzusetzen

2.1.12 Reagenzien und Puffer für die Durchführung der hochauflösenden Respirometrie

BIOPS Puffer, pH 7,1	2,77 mM	CaK ₂ EGTA
	7,23 mM	K ₂ EGTA
	5,77 mM	Na ₂ ATP
	6,56 mM	MgCl ₂ x 6H ₂ O
	20 mM	Taurin
	15 mM	Na ₂ -phosphocreatinin
	20 mM	Imidazol
	0,5 mM	DTT
	50 mM	MES
Mir05 Puffer, pH 7,1	0,5 mM	EGTA
	3 mM	MgCl ₂ x 6H ₂ O
	60 mM	K-Lactobionat
	20 mM	Taurin
	10 mM	KH ₂ PO ₄
	20 mM	HEPES
	110 mM	Saccharose
	1 g/l	BSA fettfrei

2.1.13 Molekularbiologische Kits

BD OptEIA™ Mouse IL-6 ELISA Set	BD Biosciences, Heidelberg
BD OptEIA™ Mouse MCP-1 ELISA Set	BD Biosciences, Heidelberg
BD OptEIA™ Substrat Reagenz Set	BD Biosciences, Heidelberg
DNeasy Tissue & Blood	Qiagen, Hilden
Mouse Fetuin A/AHSG ELISA Set	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Mouse Insulin ELISA	Mercodia, Uppsala, Schweden
NEFA HR(2)	Wako Chemicals GmbH, Neuss
Triglyzeride (L-Type TG M Test)	Wako Chemicals GmbH, Neuss
XTT Cell Proliferation Kit	PromoKin, Heidelberg

2.1.14 Geräte

Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Autoklav	Webeco, Selmsdorf
Binokular, Nikon SMZ-10	Nikon AG, Zürich, Schweiz
Blutzuckermessgerät, Freestyle Precision	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Blutzucker-Teststreifen	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Brutschrank Cytoperm2	Heraeus, Düsseldorf
Durchflusszytometer, FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg
EchoMRI 2012	EchoMRI, Houston, TX, USA
Eismaschine	Scotsman AP 100, Mailand, Italy
Einbettungsgerät Excelsior ES	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
ELISA-Reader Synergy2	BioTek Instruments, Winooski, VT, USA
ELISA-Washer	BioTek Instruments, Winooski, VT, USA
Geldokumentationsapparatur	Biometra GmbH, Göttingen
Gelkammer	AGS GmbH, Heidelberg
Hitachi 912	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Magnetrührer mit Heizplatte	Janke & Kunkel, Staufen
Mikroskope	
Durchlicht-Mikroskop	Will, Wetzlar
Auflicht-Mikroskop	Zeiss, Jena
Mikrotom HM 369	Microm Laborgeräte GmbH, Walldorf
Minishaker MS1	Oehmen, Essen
Modular Roche/Hitachi	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Multipette	Eppendorf, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Oxygraph-2k	Oroborus Instruments, Österreich
Phenomaster 4050	TSE Systems GmbH, Bad Homburg
pH 211 Microprocessor pH Meter	Hanna Instruments, Kehl
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
PCR Cycler, PCR Express	Hybaid, Garching
Realtime PCR Cycler	Applied Biosystems, Darmstadt
Schüttelapparat, Titramax 100	Heidolph, Schwabach
Spektrophotometer, GeneQuant	GE Healthcare, München
Sterilbank LaminAir HLB 2472	Heraeus, Düsseldorf
Ultraschallbad Sonorex RK102	Bandelin, Berlin
Waage BP610	Sartorius, Göttingen
Wasseraufbereitungssystem Milli Q	Millipore, Schwalbach
Wasserbad C12	Lauda, Königshofen
Zentrifuge, centrifuge 5810	Eppendorf, Hamburg

2.1.15 Software und Datenbank

Software

Gen5

BioTek Instruments, Winooski, VT, USA

GraphPad Prism 5.0 Software

San Diego, CA, USA

Datenbank

PubMed

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

2.2 Methoden

2.2.1 Tierhaltung

Die Tiere (2.1.1) stammen aus der Zucht am DDZ und wurden unter Standardbedingungen (12 h hell/dunkel Zyklus, Futter und Wasser ad libitum) gehalten. Für alle Experimente wurden weibliche Mäuse eingesetzt.

2.2.2 Genotypisierung der Tiere

Zur Analyse des TLR4-Expressionsstatus wurde das Vorhandensein des Wildtyp TLR4-Gens bzw. der TLR4-Deletion untersucht.

2.2.2.1 DNA Isolation aus Gewebeproben

Zur Genotypisierung der Tiere wurde DNA aus Gewebeproben der Ohren isoliert. Dafür wurden die Gewebeproben in einem Reaktionsgefäß mit 100 µl Lyse Reagenz und 0,2 mg/ml Proteinase K (2.1.4) versetzt und 3 - 5 h bei 55 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 55 °C kräftig geschüttelt bevor sie für 45 min bei 85 °C im Wasserbad schwimmend inkubiert und im Anschluss kurz abzentrifugiert (1 min, 250 x g) wurden.

2.2.2.2 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient als Methode zur selektiven Amplifikation bestimmter DNA Bereiche. Dazu wandert die Taq DNA Polymerase von einem Oligonukleotid (Primer) (2.1.6.1) aus vom 5`-Ende zum 3`-Ende der denaturierten DNA und verknüpft desoxy-Nukleosid-Triphosphate zu Polymeren, die im nächsten Amplifikationsschritt wiederum als Template-Strang dienen.

Zur Amplifikation des entsprechenden DNA Fragments wurde in einem Reaktionsgefäß (1,5 ml) auf Eis ein Stammreaktionsgemisch angesetzt. Pro Ansatz wurden die in Tab. 4 aufgeführten Substanzen in Abhängigkeit von der Anzahl der durchzuführenden Reaktionen hinzugegeben.

Tab. 4: Stammreaktionsgemisch für die Durchführung der Polymerasekettenreaktion

Komponente	Volumen
DEPC-Wasser	19,35 µl
10x Puffer	2,50 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1,25 µl
dNTP (jeweils 25 mM)	0,25 µl
Primer sense (20 pmol)	0,20 µl
Primer antisense (20 pmol)	0,20 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
Gesamt	24,00 µl

Zu den 24 µl des Stammreaktionsgemisches (Tab. 4) wurde jeweils 1 µl der isolierten DNA in ein PCR Reaktionsgefäß pipettiert und entsprechend der nachzuweisenden Nukleotidsequenz in einem Thermoblock (2.1.14) eines der in Tab. 5 aufgeführten Programme durchlaufen.

Tab. 5: PCR-Programm zum Nachweis des TLR4-Gens (A) und des TLR4-Defektes (B)

A			B		
Temperatur	Zeit	Zyklen	Temperatur	Zeit	Zyklen
94 °C	2 min	1	94 °C	2 min	1
94 °C	20 sek	↑	94 °C	20 sek	↑
60,4 °C	50 sek	30	48,4 °C	30 sek	30
72 °C	30 sek	↓	72 °C	30 sek	↓
72 °C	7 min	1	72 °C	7 min	1

Nach Beendigung der PCR wurden die Proben kurzzeitig bei 4 °C gelagert bis zur elektrophoretischen Auftrennung im Agarosegel.

2.2.2.3 Agarose Gel-Elektrophorese

Mit Hilfe der Agarose Gel-Elektrophorese ist es möglich, DNA Fragmente an Hand ihrer Größe aufzutrennen. Das Agarosegel wird durch das Aufkochen des Polysaccharids Agarose in TBE Puffer hergestellt, wodurch dies eine Gelmatrix bildet, deren Dichte je nach Agarosekonzentration variiert. Aufgrund der Anzahl der Basenpaare der zu erwartenden DNA Fragmente wurde ein 1 %iges Agarosegel hergestellt. Dafür wurde 0,5 g Agarose in 50 ml 0,5 x TBE Puffer aufgekocht und nach einer Abkühlung auf ca. 60 °C mit 1 µl Ethidiumbromid versetzt und in eine Gelkammer gegossen. Durch das Einsetzen eines Kammes in das noch flüssige Gel bildeten sich Taschen zum Auftragen der Proben aus. Nach ca. 30 min wurde das ausgehärtete Gel in einer Laufkammer mit Laufpuffer (0,5 x TBE Puffer) überschichtet.

Die Proben wurden mit 6 x Ladepuffer gemischt bevor diese Ansätze, sowie eine 100 kbp DNA Leiter, die als DNA Größenstandard fungierte, in die Taschen des Gels aufgetragen wurden.

Im Anschluss daran wurden die zuvor in der PCR amplifizierten DNA-Fragmente elektrophoretisch ca. 45 min bei 90 V aufgetrennt. Mit Hilfe des in die DNA interkalierenden Ethidiumbromids konnten die aufgetrennten Nukleotidsequenzen im Gel mit Hilfe von UV-Licht (320 nm) sichtbar gemacht werden. Anhand des Größenstandards konnten die Fragmentgrößen der Endprodukte der PCR und somit der TLR4-Expressionsstatus des betreffenden Tieres bestimmt werden.

2.2.3 Diabetes Diagnostik

Ca. 60 - 90 % der weiblichen NOD Mäuse aus der Kolonie am DDZ entwickeln im Laufe ihres Lebens einen Insulinmangeldiabetes. Zur Diabetes-Diagnostik wurde zum einen mit Hilfe von Harnglukose-Sticks der Gehalt an ausgeschiedener Glukose im Urin bestimmt. Zum anderen wurden Blutproben aus der Schwanzvene der Maus entnommen und darin mit Hilfe eines Blutglukosemessgerätes wurde die Konzentration an Glukose bestimmt. Ein diagnostizierter Diabetes liegt vor, wenn die Blutglukose der Mäuse im ungestauten Zustand an 3 aufeinanderfolgenden Tagen über 250 mg/dl liegt.

2.2.4 Dokumentation von Körpergewicht und Nahrungsaufnahme

Über einen Zeitraum von der 7. bis zur 22. Lebenswoche wurde das Körpergewicht und die Nahrungsaufnahme dokumentiert. Dazu wurde einmal wöchentlich das Futter gewogen und das Körpergewicht der Mäuse bestimmt und die Differenz zur Vorwoche ermittelt.

2.2.5 Metabolische Phänotypisierung

Zur umfassenden metabolischen Phänotypisierung der Tiere wurden diese in einem modularen System zur automatisierten Erfassung von basalen Stoffwechsellparametern charakterisiert. Das System dient der nicht-invasiven Langzeitbeobachtung von Mäusen in normalen Haltungskäfigen, die für die Tiere eine weitgehend stressfreie Umgebung darstellen. Die Tiere wurden in diesem System unter Standardbedingungen (12 h hell/ 12h dunkel Wechsel, Futter und Wasser ad libitum) gehalten. Eine Messperiode umfasste immer 2 Hell- und 3 Dunkel-Phasen.

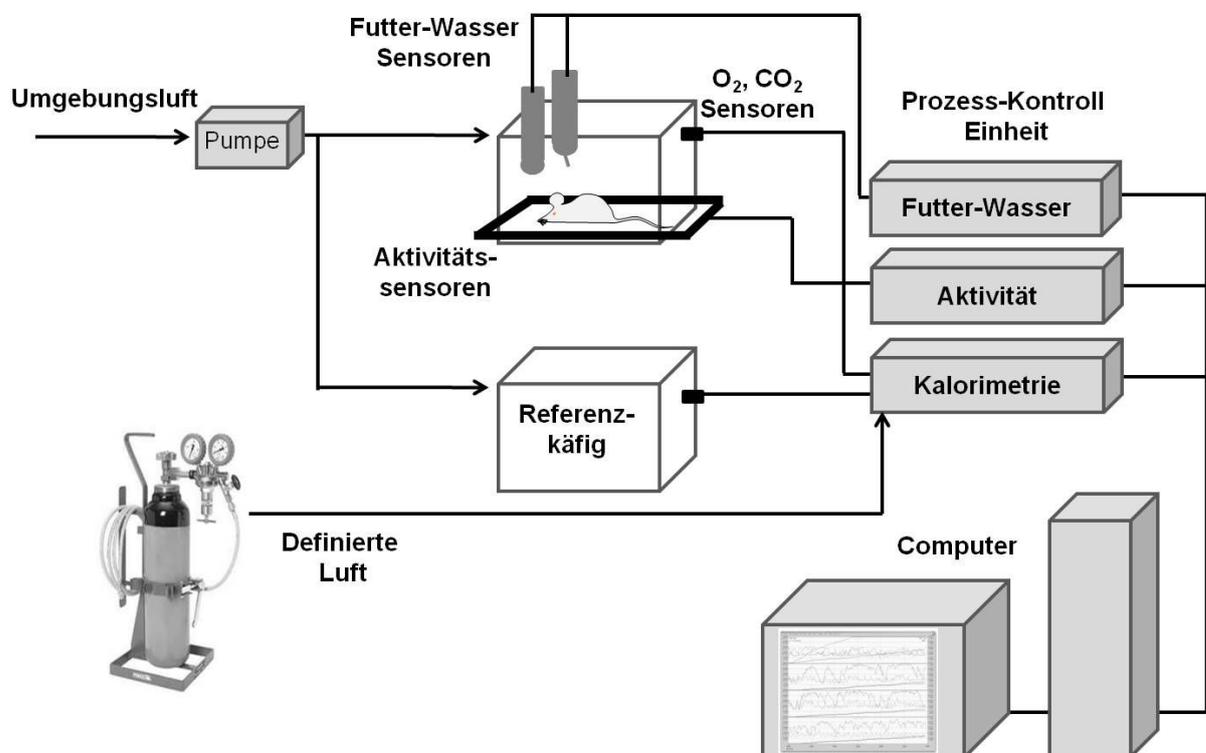


Abb. 1: Modulares System zur automatisierten Erfassung metabolischer Parameter von Mäusen.

Vor und nach den Messungen wurde das Körpergewicht und der Blutglukosespiegel der Tiere ermittelt und dokumentiert. In engen zeitlichen Intervallen wurden die Parameter Futter- und Wasseraufnahme, physische Aktivität und Parameter der indirekten Kalorimetrie (CO_2 -Abgabe, O_2 -Verbrauch) aufgezeichnet. Die Ergebnisse der indirekten Kalorimetrie wurden zur weiteren Berechnung des Kalorienverbrauchs und des respiratorischen Quotienten (RQ) (VCO_2/VO_2) herangezogen, der als Indikator des für die Energiegewinnung metabolisierten Substrates dient (94).

Die physische Aktivität der Tiere wurde durch infrarote Lichtstrahlen erfasst, die von zwei übereinander angeordneten Rahmen ausgesendet wurden, welche die Käfige in X- und Y- Achse umgeben. Wenn bei einer Bewegung der Maus ein Lichtstrahl unterbrochen wurde, registrierte die Prozess-Kontroll Einheit die Aktivität als einen Count.

Die Futter- und Wasseraufnahme wurde durch Sensoren registriert, an denen der Futterkorb und die Wasserflasche frei hingen. Die Prozess-Kontroll Einheit für die Futter- und Wasseraufnahme registrierte die Differenz des Gewichtes in den Futter- und Wasserbehältern und dokumentierte sie in regelmäßigen Zeitabständen.

Durch eine Pumpe wurde Umgebungsluft in das System gebracht. Diese Luft strömte zum einen in den Messkäfig und zum anderen in einen Referenzkäfig, in dem keine Maus saß. Durch beide Käfige strömte diese Luft mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 l/min. Die verbrauchte Luft wurde durch weitere Leitungen zur Prozess-Kontroll Einheit für Kalorimetrie geführt und dort auf ihre O_2 - und CO_2 -Konzentrationen analysiert. Desweiteren wurde die Prozess-Kontroll Einheit dauerhaft durch ein definiertes Gasgemisch auf O_2 - und CO_2 -Konzentrationen kalibriert. Mit Hilfe der Luftzusammensetzung aus dem Referenzkäfig und dem definierten Gasgemisch wurde die Luft aus dem Messkäfig auf ihre Zusammensetzung analysiert.

Alle Prozess-Kontroll Einheiten leiteten die Messergebnisse an einen Computer weiter, der mit einer geeigneten Software die Daten dokumentierte und analysierte (Abb. 1).

2.2.6 Kernspinresonanz

Die Körperzusammensetzung der Tiere wurde in einem Kernspinresonanz System (nuclear magnetic resonance, NMR) analysiert. Das Gerät erlaubt die genaue, nicht-invasive Bestimmung des Anteils der Körperfettmasse und der fettfreien Körpermasse an unbetäubten Mäusen in einem Messvorgang, der maximal 1 min dauert. Nach einer Kalibrierung mit einem mit Rapsöl gefüllten Zylinder wurden die Tiere in einen Zylinder aus Plexiglas gesetzt und an dessen Ende mit einem Stempel fixiert. Dieser Zylinder wurde in das NMR System eingeführt und einem magnetischen Feld ausgesetzt. Dabei werden die Atomkerne der Wasserstoffatome in den Geweben, die einen Eigendrehimpuls haben, entlang der Feldrichtung des magnetischen Feldes ausgerichtet. Ein weiterer Hochfrequenzimpuls wird senkrecht zum magnetischen Feld eingestrahlt und führt zur kurzzeitigen Ablenkung der ausgerichteten Kernspins der Wasserstoffatome. Durch das Zurückkehren der Kernspins in die ausgerichtete Stellung wird Energie frei, die als Signal gemessen werden kann. Durch die Analyse der Amplitude, Dauer und der räumlichen Verteilung der Signale wird das gescannte Gewebe auf seine Zusammensetzung (Fett, Muskelmasse, Wasser) analysiert (95, 96).

2.2.7 Intraperitonealer Glukosetoleranztest

Zur Bestimmung der Glukosetoleranz wurde ein intraperitonealer Glukosetoleranztest (ipGTT) durchgeführt, der zur Ermittlung einer möglicherweise gestörten Glukoseverwertung dient. Dazu wurde den Tieren nach 6 stündigem Fasten intraperitoneal ein Bolus von 2 g Glukose/kg Körpergewicht injiziert, welcher einen kurzzeitigen Anstieg der Glukosekonzentration bewirkt und gleichzeitig die Insulinsekretion aus den Betazellen stimuliert, wodurch es nachfolgend wiederum zu einem Absinken der Blutglukosekonzentration kommt. Vor der Glukoseinjektion sowie 5, 15, 30, 60, 90 und 120 min nach der Injektion wurde die Blutglukosekonzentration in Blutproben aus der Schwanzvene ermittelt. Aus den Änderungen der Blutglukosekonzentrationen über die Zeit konnte auf die Glukosetoleranz der Versuchstiere geschlossen.

2.2.8 Intraperitonealer Insulintoleranztest

Zur Abschätzung der Insulinsensitivität wurde nach 6 stündigem Fasten ein intraperitonealer Insulintoleranztest (ipITT) durchgeführt. Dazu wurde den Tieren in einem Volumen von 100 μ l pro 10 g Körpergewicht eine sterile Lösung von 0,75 Einheiten schnell wirkendes Human-Insulin pro kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Im Verlauf einer Stunde kommt es in der Folge zu einem Absinken der Blutglukosekonzentration über die Zeit. Unmittelbar vor der Injektion sowie im Abstand von jeweils 15 min über eine Zeitspanne von 2 h nach der Injektion wird die Blutglukosekonzentration in Blutproben aus der Schwanzvene bestimmt. Aus den Veränderungen der Blutglukosekonzentration über die Zeit konnten erste Aussagen zur Wirkung von Insulin in den untersuchten Tieren gemacht werden.

Da es 60 min nach der Insulininjektion aufgrund der durch das Insulin ausgelösten Hypoglykämie zur hepatischen Glukosefreisetzung kommt, wurden lediglich Daten der ersten 60 min in die Auswertung des ipITT einbezogen.

2.2.9 Hochauflösende Respirometrie

Um den Effekt des TLR4-Expressionsstatus auf die mitochondriale Aktivität als zentralem Parameter des Energiestoffwechsels zu prüfen, wurde mit Hilfe der hochauflösenden Respirometrie der Sauerstoffflux durch die verschiedenen Komplexe der Atmungskette in frischen Proben der Leber und des *m. soleus* gemessen. Dazu wurden frisch entnommene Gewebeproben (1 - 3 mg) mit Saponin (50 μ g/ml, 25 min) permeabilisiert. Die respiratorische Aktivität der Gewebeproben wurde in einem Respirometer in Mir05 Puffer (pH 7,1) und in Gegenwart von 200 - 400 μ M Sauerstoff durchgeführt, um eine Limitierung der Aktivität durch Sauerstoff zu vermeiden. Anschließend wurden die definierten respiratorischen Zustände mit Hilfe eines Substrat-Inhibitor Protokolls analysiert (Komplex I: 2 mM Malat, 10 mM Pyruvat, 10 mM Glutamat und 2,5 mM ADP; Komplex I und II: 10 mM Succinat; Membranstabilität der Mitochondrien: 10 μ M Cytochrom c; maximale respiratorische Kapazität: Carbonyl Cyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP), 2,5 μ M Antimycin A) und die Kapazität der Elektronentransportkette in den ausgewählten Gewebeproben, nach Normierung auf die Mitochondriendichte, bestimmt (97, 98).

2.2.10 Bestimmung von Parametern aus peripherem Blut

2.2.10.1 Bestimmung von Triglyzeriden und freien Fettsäuren im Plasma

Für die Bestimmung von Triglyzeriden und FFA im Blut wurden Plasmaproben gesammelt. Dafür wurden 100 µl Vollblut mit 3 µl EDTA versetzt. Für die Untersuchungen wurden die Proben 1:5 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und bis zur Analyse bei -20 °C eingefroren.

Die Konzentrationen an Triglyzeriden und FFA im Plasma wurden mit Hilfe enzymatischer Verfahren quantifiziert. Zur Bestimmung der Triglyzeridkonzentrationen wurden die Triglyzeride mittels Lipoproteinlipase zu Glycerin und FFA hydrolysiert. Das Glycerin wurde zu Dihydroxyacetonphosphat und H_2O_2 oxidiert. H_2O_2 bildete mit 4-Aminophenon 4-Chlorphenol einen roten Farbstoff, dessen Intensität direkt proportional zur Menge an Triglyzeriden war. Unveresterte FFA wurden mittels Acyl-CoA umgesetzt, das mittels Acyl-CoA Oxidase und 3-Methyl-N-Ethyl-N-Hydroxyethyl-Anilin als violetter Farbstoff quantifiziert wurde. Die Konzentrationen an Triglyzeriden und FFA wurden photometrisch mit Hilfe von Standardkurven quantifiziert.

2.2.10.2 Bestimmung von Fetuin A, Insulin und Zytokinen im Serum

Die Fetuin A-, Insulin- und Zytokin-Konzentrationen wurden im Serum von Mäusen mittels Enzyme linked immunosorbent assays (ELISA) analysiert.

Der ELISA ist ein quantitativer Immunoassay und wurde in der vorliegenden Arbeit u.a. eingesetzt als Nachweisverfahren zur Bestimmung der Konzentrationen von Fetuin A, Insulin und Zytokinen im Serum gefasteter Tiere.

Beim (Sandwich-)ELISA wird die zu detektierende Substanz zwischen einem Erstantikörper, der an der Oberfläche von Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gebunden ist, und einem Detektionsantikörper, der an ein Enzym gekoppelt ist, gebunden.

Zur Durchführung der Tests wurde zunächst der Erstantikörper, der in einem Coating-Puffer gelöst wurde, über Nacht an eine Mikrotiterplatte gebunden. Nach Waschen der Platte mit Waschpuffer, wurde sie mit Assay Diluent bei Raumtemperatur inkubiert, um potenzielle freie Bindungsstellen abzublocken und

damit unspezifische Bindungen des Antikörpers zu verhindern. Anschließend wurde die Platte wieder mit Waschpuffer gewaschen, bevor die Proben und als Referenz eine Standardreihe mit definierten Konzentrationen der entsprechenden rekombinanten Proteine bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Nach erneutem Waschen wurde der Detektionsantikörper hinzugegeben. Nach einer weiteren Inkubationsphase wurden alle überschüssigen Detektionsantikörper durch wiederholtes Waschen entfernt und die Platte mit Substratlösung bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Durch 2N H₂SO₄ wurde die Reaktion abgestoppt und die optische Dichte (OD) im ELISA-Reader photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 570 nm) erfasst und durch den Abgleich mit einer Standardkurve die Konzentration in der Probe bestimmt. Die genaue Durchführung der Tests variierte je nach Kit-System.

2.2.10.3 Bestimmung des HOMA-IR

Der HOMA-IR (homeostatic model assessment-insulin resistance) dient der Bestimmung der Insulinresistenz und wird primär im Krankheitsbild des T2D angewendet. In dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Tiermodell des Insulinmangeldiabetes wurde der HOMA-IR ebenfalls zur näherungsweisen Bestimmung der Insulinresistenz herangezogen. Zur Berechnung des HOMA-IR wird die Nüchtern-Blutglukose-Konzentration sowie die Nüchtern-Plasma-Insulin-Konzentration benötigt.

Dafür wurde die Blutglukosekonzentration in einem Blutstropfen aus der Schwanzvene nach 6 stündigem Fasten mit Hilfe eines Blutglukosemessgerätes bestimmt. Mit Hilfe eines high-sensitive ELISA Tests (2.2.10.2) wurde die Insulinkonzentration im Serum bestimmt.

Zur Kalkulation des HOMA-IR wurde folgende Formel verwendet (99):

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{Nüchtern-Blutglukose (mg/dl)} \times \text{Nüchtern-Plasma-Insulin (\mu\text{U/ml})}{405}$$

2.2.11 Zellkultur

2.2.11.1 Isolation von Präadipozyten aus NOD Mäusen

NOD Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Unter sterilen Bedingungen wurden nach Öffnung der Bauchhöhle jeweils zwei viszerale Fettlappen entnommen, in 20 ml sterile Krebs-Ringer Lösung (4 °C) gegeben und in 50 ml Zentrifugationsröhrchen auf Eis gelagert. Pro Gramm Fettgewebe wurden 5,55 mg sterile Kollagenase (0,3 Einheiten) in 1 ml PBS gelöst und dem Gewebe unter einer sterilen Werkbank hinzugefügt. Um eine zu frühe Aktivierung der Kollagenase zu verhindern, wurde das Fettgewebe auf Eis mit einer sterilen langen Schere in ca. 8 mm³ große Würfel zerkleinert. Nach der Zerkleinerung wurde das Gewebe zum Verdau für 60 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend durch ein Sieb (Porengröße: 250 µm) gegeben, um grobe Gewebereste zu entfernen. Durch 10 minütige Zentrifugation des Durchflusses bei 250 x g wurden die reifen Adipozyten von den Präadipozyten getrennt. Die reifen Adipozyten, die sich aufgrund ihres hohen Fettgehaltes im Überstand befanden, wurden mit dem gesamten Überstand verworfen. Das Zellsediment wurde in 5 ml DMEM Medium (4,5 g/l Glukose) resuspendiert, erneut durch ein Zellsieb (Porengröße: 70 µm) filtriert und anschließend in einer kleinen Petrischale (Durchmesser: 3 cm) ausgesät (3, 58).

Nachfolgend wurde im Abstand von zwei Tagen vorsichtig das Medium gewechselt, bis die Zellen eine Konfluenz von nahezu 90 % erreicht hatten. Anschließend wurden sie enzymatisch mit Accutase abgelöst und in eine 25 cm² Zellkulturflasche ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz in diesen Flaschen wurden die Zellen erneut abgelöst und in einer 75 cm² Zellkulturflasche vereint.

2.2.11.2 Prüfung der Reinheit der isolierten Präadipozyten

Zur Überprüfung des Reinheitsgrades der Präadipozytenpopulation bzw. zum Ausschluss einer Makrophagenkontamination wurde die Abwesenheit des makrophagenspezifischen Markers CD11b (cluster of differentiation molecule 11B) geprüft.

Es wurde die isolierte primäre Präadipozytenpopulation und die murine Makrophagen-Zelllinie J774A.1 als Positiv-Kontrolle für eine CD11b-exprimierende

Zellpopulation getestet. Jeweils 4×10^5 Zellen wurden in 1 ml PBS (1x) aufgenommen und mit 0,5 µg/ml Anti-CD11b-Antikörper bzw. mit 0,5 µg/ml der Isotypenkontrolle für 30 min auf Eis inkubiert. Durch einen Waschschrift (5 min, 250 x g) wurden die überschüssigen und nichtgebundenen Antikörper ausgewaschen. Anschließend wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Die Anzahl und die Größe der Zellen wurde mit Hilfe des forward scatter (FSC) und des side scatters (SSC) erfasst. Der prozentuale Anteil an CD11b positiven Zellen wurde durch die Messung der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Isotypenkontrolle bestimmt.

2.2.11.3 Kultivierung der Zellen

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Zellen in DMEM (4,5 g/l Glukose) Kulturmedium für Fettzellen bzw. in DMEM (4,5 g/l Glukose) Kulturmedium für Makrophagen im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert.

2.2.11.4 Passagieren der Zellen

2.2.11.4.1 Passagieren von primären Präadipozyten der NOD Maus und Zellen der Linie 3T3-L1

Die Zellen wurden nach Erreichen einer Subkonfluenz alle zwei Tage passagiert. Dabei wurde das über den adhärenenden Zellen stehende Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gespült. Durch Zugabe von 4 ml einer Accutaselösung wurden die Zellen vom Flaschenboden abgelöst und die Zellsuspension nach Überführung in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen 10 min bei 250 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen und das Sediment in DMEM (4,5 g/l Glukose) Kulturmedium resuspendiert. Pro Flasche wurden 1×10^2 Zellen bzw. 1×10^4 Zellen in 20 ml Kulturmedium ausgesät (3).

2.2.11.4.2 Passagieren von Makrophagen der Linie J774A.1

Die Zellen wurden routinemäßig alle 2 - 3 Tage passagiert wie in 2.2.11.4.1 für Präadipozyten beschrieben. Bei jeder Passage wurden 3×10^6 Makrophagen der Linie J774A.1 in 20 ml Kulturmedium in eine 75 cm² Zellkulturflasche ausgesät.

2.2.11.4.3 Zellzahlbestimmung

Für die Zellzahlbestimmung wurde unter sterilen Bedingungen ein Aliquot von 20 µl der Zellsuspension entnommen und mit 180 µl einer 0,1 %igen Trypanblau-Lösung versetzt. Die Trypanblaufärbung gibt Aufschluss über die Vitalität der Zellen, da der Farbstoff nur das Zytoplasma toter Zellen blau-lila färbt. Indem 4 Großquadrate einer Neubauerzählkammer ausgezählt wurden, konnte die Zellzahl mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Zellen/ ml} = \frac{\text{Zellzahl} \times 10^4 \text{ (Kammerfaktor)} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{4}$$

Der Anteil an trypan-blau positiven Zellen lag in allen Experimenten konstant unter 2 %.

2.2.11.5 Kryokonservieren von Präadipozyten

In regelmäßigen Abständen wurden Zellen zum Erhalt der Adipozyten-Populationen eingefroren.

Dazu wurden die Zellen, wie in 2.2.11.4 beschrieben, abgelöst und nach Bestimmung der Zellzahl wurde eine Zellsuspension mit 3×10^6 Zellen/ml hergestellt. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen wurde das Zellsediment in Einfriermedium resuspendiert und jeweils in Aliquots (1 ml) in Kryoröhrchen überführt. Die Aliquots wurden für drei Tage bei -80 °C eingefroren, bevor sie zur weiteren Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

2.2.11.6 Auftauen von Zellen

In flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen wurden aus dem Stickstoff entnommen und sofort auf Eis gestellt, um ein vorzeitiges Auftauen der Zellen zu verhindern. Die Zellen waren in 20 %igem DMSO eingefroren, welches beim Einfrieren die Eiskristallbildung in den Zellen und die damit verbundene Zerstörung von einzelnen Zellorganellen bis hin zu ganzen Zellen verhindert. Da es in hohen Konzentrationen jedoch auch stark zellschädigend wirkt, muss es schnell entfernt werden. Die Zellen wurden deshalb im Wasserbad bei 37 °C zügig aufgetaut, sofort unter einer sterilen Werkbank in 10 ml DMEM (4,5 g/l Glukose) überführt und 5 min bei 250 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen erneut mit 10 ml Medium gewaschen. Nach Resuspendieren des Sediments wurden die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen und in eine 25 cm² große Zellkulturflasche ausgesät.

2.2.11.7 Isolation von Milzmakrophagen aus NOD Mäusen

Zur Isolation von Milzmakrophagen wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und nach Eröffnung der Bauchhöhle die Milzen entnommen, in PBS überführt und auf Eis gelagert. Die Milzen wurden mit Hilfe eines sterilen Spritzenstempels durch ein Zellsieb (Porengröße 70 µm) passiert und die aufgefangene Milzzellsuspension wurde bei 25 x g für 5 min zentrifugiert. Das Sediment wurde anschließend in Makrophagen Kultur-Medium resuspendiert und die gewonnene Zellsuspension in eine Petrischale überführt, die zuvor über Nacht bei 37 °C mit 10 ml FBS inkubiert wurde. Während einer 2 stündigen Inkubationsphase sedimentierten die Makrophagen und adhärten am Boden der Petrischale von wo sie nach Abgießen des Überstandes mit 5 ml Accutase abgelöst wurden.

Nach einer Zellzählung wurden die Zellen in die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte in Makrophagen Kultur-Medium ausgesät und für weitere Experimente im Brutschrank unter Standardbedingungen inkubiert.

2.2.12 Stimulation der kultivierten Zellen zur Freisetzung inflammatorischer Mediatoren

2.2.12.1 Behandlung mit Lipopolysaccharid

Zur Stimulation der Fettzellen oder der Makrophagen mit LPS wurden die Zellen abgelöst und gezählt. Nach Herstellung einer Zellsuspension mit 2×10^5 Zellen/ml wurden jeweils 500 μl in eine 48-Loch-Platte ausgesät, so dass sich 1×10^5 Zellen in jeder Vertiefung befanden. Die Platte wurde über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden 50 μl Überstand pro Well abgenommen und verworfen und 50 μl Medium mit unterschiedlichen LPS-Konzentrationen hinzugegeben. Dazu wurde aus einer LPS-Stammlösung eine Verdünnungsreihe mit den Endkonzentrationen 0, 1, 10, 100 oder 1000 ng/ml LPS hergestellt. Die mit LPS stimulierten Zellen wurden für die TNF-alpha Bestimmung für 5 - 6 h und für die IL-6 Bestimmung 24 h im Brutschrank inkubiert bevor 70 μl der Überstände abgenommen wurden und in den Vertiefungen einer 96-Loch-Patte bis zur weiteren Analyse bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert wurden (3).

2.2.12.1.1 Bestimmung der inflammatorischen Mediatoren IL-6 und TNF-alpha in Zellkulturüberständen

Die freigesetzten Konzentrationen von IL-6 und TNF-alpha wurden nach der LPS-Stimulation in den Zellkulturüberständen mittels ELISA (2.2.10.2) quantifiziert.

2.2.12.1.2 XTT-Test zum Nachweis der Zellvitalität

Der XTT-Test dient als Nachweisverfahren der Zellvitalität. Der Test basiert auf der Reduktion des wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes XTT in eine Formazanverbindung durch die Aktivität von mitochondrialen Enzymen, die mit dem Zelltod inaktiviert werden. Es entsteht ein Reaktionsprodukt, dessen Farbintensität photometrisch erfasst werden kann. Die Konzentration des gebildeten Farbstoffes korreliert direkt mit der Anzahl und der metabolischen Aktivität der Zellen und dient daher als Maß für deren Vitalität.

Zur Bestimmung der Zellvitalität wurden 24 h nach Beginn der Stimulation der Zellen 400 µl der Zellüberstände bis auf 100 µl abgenommen. Pro Vertiefung der 48-Loch-Platte wurden 50 µl eines Gemisches aus 0,1 ml Aktivierungsreagenz und 5 ml XTT Reagenz hinzugegeben. Die Platte wurde bedeckt für 4 h im Brutschrank inkubiert, bevor die Absorption im Photometer bei einer Wellenlänge von 450 - 500 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 - 690 nm gemessen wurde (3).

2.2.12.2 Glukose-stimulierte Insulinfreisetzung kultivierter pankreatischer Inseln

2.2.12.2.1 Isolation und Stimulation pankreatischer Inseln

Für die Isolation von pankreatischen Inseln wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die Bauchhöhle eröffnet. Nach Freilegen des Pankreas wurde der *Ductus choledochus* an seiner Eintrittsstelle in das Duodenum im Bereich der Papilla Vateri mit einer Klemme abgeklemmt. Anschließend wurde durch den Gallengang mit einer dünnen Kanüle 2 ml einer sterilen Kollagenase-Lösung (0,5 U/ml) in den Pankreas infundiert. Der Pankreas wurde anschließend aus der Bauchhöhle herauspräpariert und zunächst in einer Petrischale auf Eis gelagert. Danach wurde der Pankreas für ca. 20 min bei 37 °C auf einer Wärmeplatte verdaut. Durch vorsichtiges Resuspendieren mit einer Pipette wurde das Gewebe weiter aufgeschlossen und anschließend zweimal gewaschen (250 x g, 5 min, 4 °C). Die Inseln wurden im Anschluss aus dem Gewebehomogenat unter einem Stereomikroskop mit einer Pipette in Insel-Kulturmedium zweimal „gepickt“ und damit vom übrigen exokrinen Pankreasgewebe weitestgehend getrennt (100, 101).

Über Nacht wurden die Inseln in Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freiem Insel-Kulturmedium im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden 8 - 12 Inseln pro Vertiefung einer half area 96-Loch-Platte in Krebs-Ringer Puffer überführt. Nach 2 stündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Inseln in Krebs-Ringer Puffer mit steigenden Glukosekonzentrationen (2,8; 5,6; 11; 22; 28 mmol/l) stimuliert. Am darauffolgenden Tag wurden die Überstände abgenommen und für die weiteren Analysen eingefroren.

2.2.12.2.2 Bestimmung der Insulinkonzentrationen in Inselkulturüberständen

Die *in vitro* Glukose-stimulierte Insulinfreisetzung der pankreatischen Langerhans'schen Inseln wurde mittels eines ELISA Tests nachgewiesen (2.2.10.2).

2.2.13 Histologische Untersuchungen von Pankreasgewebe

2.2.13.1 Herstellung histologischer Pankreaspräparate

Zur Bestimmung des Infiltrationsgrades pankreatischer Inseln mit Immunzellen sowie der residualen Masse insulinhaltiger Betazellen in den Inseln wurden Pankreata aus normoglykämischen Mäusen entnommen, in PFA (4 %) fixiert und in Paraffin eingebettet. In Dünnschnitten der Präparate (5 µm) wurden insulinhaltige Betazellen mittels immunzytochemischer Verfahren sowie infiltrierte Immunzellen mittels Hämatoxylin-Färbung nachgewiesen.

Zur Durchführung der Färbeverfahren wurden die Präparate für 1 h auf 60 °C erhitzt und anschließend für jeweils 2x 10 min in Xylol und in einer absteigenden Alkoholreihe bis zu 70 % igem Alkohol überführt. Nach 30 min in 0,3 % igem H₂O₂ wurden die Präparate in PBS gewaschen und für 20 min in Normalserum inkubiert. Der Nachweis insulinhaltiger Betazellen erfolgte durch den Einsatz eines anti-Schweine-Insulin Antikörpers aus dem Meerschweinchen als primären Antikörper und dem Vectastain Avidin Biotinylated enzyme Complex (ABC Komplex) mit anti-Meerschweinchen IgG als Detektionssystem. Es folgte eine 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) Zugabe und eine Hämatoxylinfärbung (10 - 30 sek) mit einer anschließenden 10 minütigen Inkubation der Präparate in Leitungswasser. Nach einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Präparate eingedeckt und bis zur morphometrischen Analyse gelagert.

2.2.13.2 Morphometrische Analysen

Der Anteil an insulin-positiven Betazellen, sowie der prozentuale Anteil der infiltrierten Inselfläche an der Gesamtfläche der Insel wurde mittels eines Durchlichtmikroskops und dem Softimaging System Analysis^{^D} (Olympus, Münster)

quantifiziert. Dafür wurden die Zellpräparate (2.2.13.1) mit einer 25 fachen Vergrößerung mikroskopiert und der jeweilige angefärbte Anteil bestimmt.

2.2.14 Statistische Analysen

Alle dargestellten Daten zeigen Mittelwerte \pm SEM. Beim Vergleich von zwei Datensätzen kam der Student`s t-test zur Berechnung statistischer Signifikanzen zur Anwendung. Der One way Anova mit Bonferroni Posthoc Test wurde angewendet zur Berechnung signifikanter Unterschiede zwischen mehr als zwei Datensätzen. Bei $p < 0,05$ wurde der Unterschied zwischen zwei Datensätzen als statistisch signifikant angesehen.

Alle statistischen Analysen wurden mit dem Programm GraphPad Prism Version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse des TLR4-Expressionsstatus

3.1.1 Analyse des TLR4-Expressionsstatus auf der Ebene genomischer DNA

Zur Bestimmung des TLR4-Expressionsstatus auf der Ebene der DNA wurde eine PCR durchgeführt mit Primern zur Amplifikation von DNA-Segmenten, aus den Bereichen, die für den TLR4-Wildtyp bzw. den TLR4-Defekt kodieren.

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung (Abb. 2) der DNA-Amplifikate zeigten die PCR Produkte von homozygot TLR4-exprimierenden C57BL/10 und NOD Mäusen wie erwartet eine deutliche Bande bei 401 Basenpaaren, während in Proben derselben Mäuse nach Zugabe der Primer zum Nachweis des TLR4-Defektes keine PCR-Produkte zu identifizieren waren.

Im Gegensatz dazu war der Nachweis eines 140 Basenpaare großen DNA-Amplifikats das Ergebnis der PCR von Proben aus TLR4-defizienten C57BL/10 und NOD Mäusen, während in Proben dieser Mäuse nach Verwendung der Primer zum Nachweis des TLR4-Wildtyps wiederum keine PCR-Produkte zu erkennen waren.

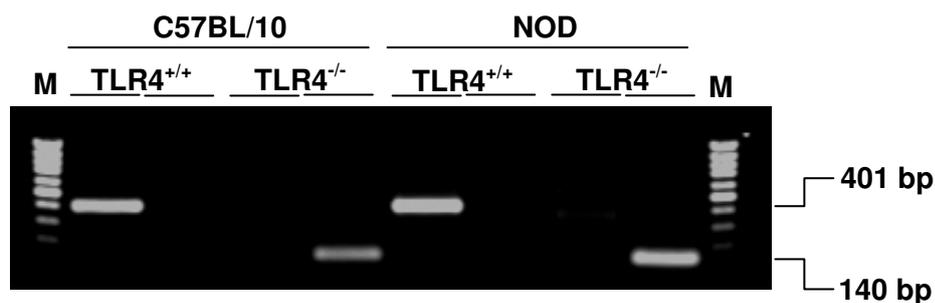


Abb. 2: Nachweis des TLR4-Expressionsstatus in C57BL/10 und NOD Mäusen. Gelbild der DNA-Amplifikate von weiblichen TLR4-exprimierenden (TLR4^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4^{-/-}) C57BL/10 und NOD Mäusen. Es wurde jeweils das PCR-Produkt nach Einsatz der Primer für die TLR4-Expression im Wildtyp neben das PCR-Produkt der Primer für die TLR4-Defizienz in zwei nebeneinanderliegende Geltaschen für jeden Genotyp (TLR4^{+/+}, TLR4^{-/-}) des jeweiligen Mausstamms (C57BL/10, NOD) aufgetragen. Zur Bestimmung der Amplifikationsprodukte diente ein Größenstandard (M).

3.1.2 Funktionelle Charakterisierung des TLR4-Expressionsstatus

Zum Nachweis des TLR4-Expressionsstatus auf funktioneller Ebene wurden primäre Präadipozyten aus TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} NOD Mäusen isoliert und nach der Prüfung des Reinheitsgrades dieser Zellpopulationen die induzierbare Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren geprüft.

3.1.2.1 Ausschluss einer Makrophagenkontamination der Präadipozyten

Da Makrophagen große funktionelle und morphologische Ähnlichkeiten mit Adipozyten aufweisen und bei der Isolation von Präadipozytenpräparationen häufig als kontaminierende Zellpopulation anfallen, wurde vor der funktionellen Charakterisierung der isolierten Präadipozytenpopulationen deren Reinheit mit Hilfe des makrophagen-spezifischen Markers CD11b im Durchflusszytometer geprüft.

Zum Ausschluss einer Makrophagenkontamination wurde eine durchschnittliche Zahl von 21.000 - 24.000 TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} primären Präadipozyten aus der NOD Maus und von Makrophagen der Linie J774A.1 als Positivkontrolle verwendet (Abb. 3 A, C, E). Mittels forward scatter (FSC) und side scatter (SSC) wurde die genaue Anzahl und die Größe der Zellen im Durchflusszytometer bestimmt.

Mit Hilfe von APC-markierten Anti-CD11b-Antikörpern konnte wie erwartet gezeigt werden, dass die Makrophagen der Zelllinie J774A.1 zu 95,3 % den Marker CD11b auf ihrer Oberfläche exprimieren, der als Komplement-Rezeptor an der Erkennung und Aufnahme opsonierter Partikel beteiligt ist (Abb. 3 A). Sowohl für TLR4^{+/+} als auch für TLR4^{-/-} primäre Präadipozyten aus der NOD Maus konnte die Abwesenheit dieses makrophagen-spezifischen Markers belegt werden (Abb. 3 D, F). Lediglich 0,3 % der geprüften Zellpopulationen zeigten während der Messung ein für CD11b positives Signal.

Die derart geprüften Zellpopulationen wurden für die nachfolgenden funktionellen Studien verwendet.

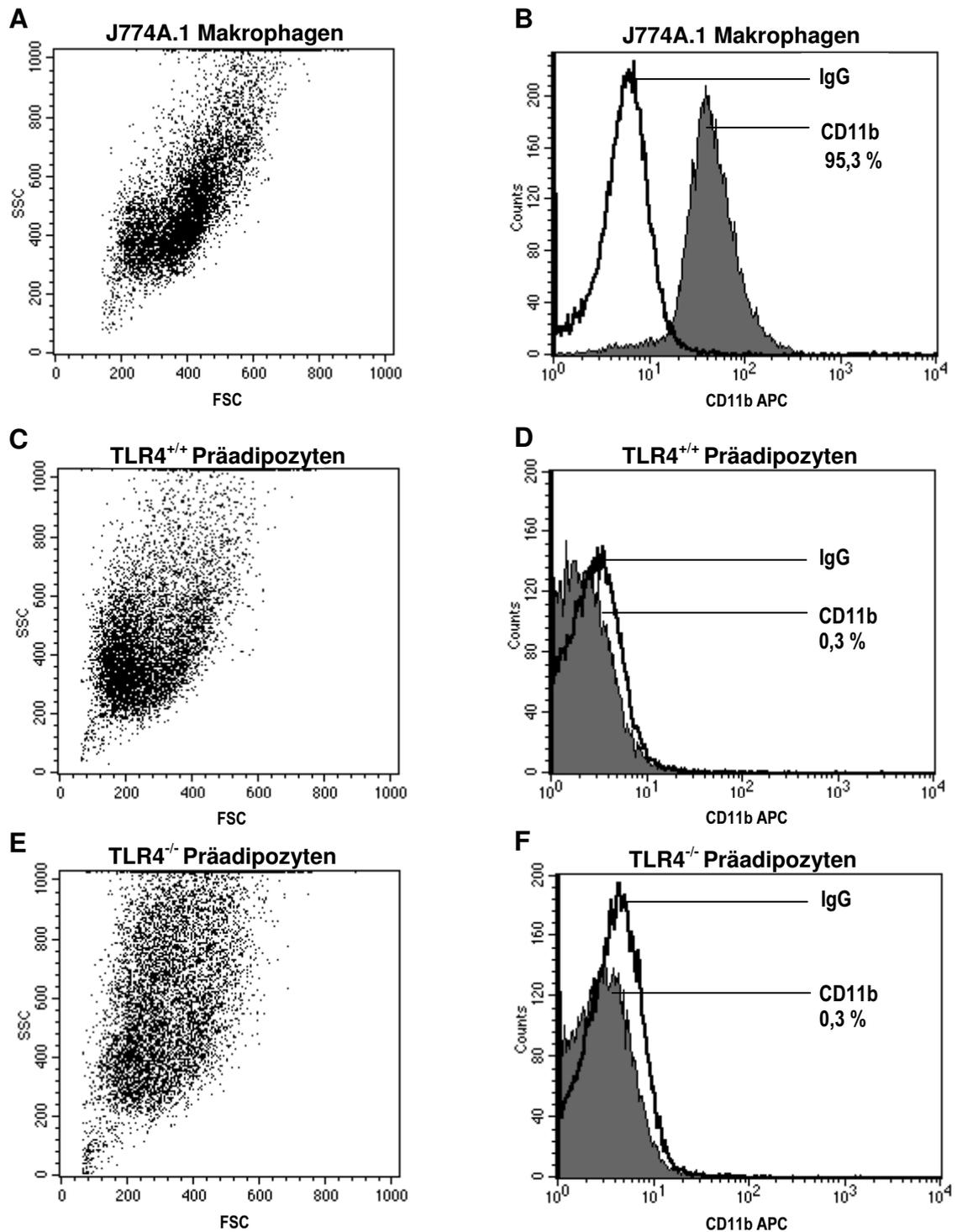


Abb. 3: Ausschluss einer Makrophagenkontamination durch Einsatz eines anti-CD11b Antikörpers in TLR4-exprimierenden (TLR4^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4^{-/-}) primären Präadipozyten der NOD Maus. Die Zellpopulationen wurden nach Markierung mit einem APC-gekoppelten anti-CD11b Antikörper zunächst mittels forward scatter (FSC) und side scatter (SSC) auf Anzahl und Größe der J774A.1 Makrophagen (A), der TLR4^{+/+} Präadipozyten (C) und der TLR4^{-/-} Präadipozyten (E) analysiert. Im Anschluss wurde die Anzahl an CD11b positiven Zellen (graue Fläche) sowie die IgG-Isotypenkontrolle (IgG) (weiße Fläche) der J774A.1 Makrophagen (B), der TLR4^{+/+} Präadipozyten (D) und der TLR4^{-/-} Präadipozyten (F) als Counts gezählt und in Prozent gegen die Fluoreszenzintensität dargestellt.

3.1.2.2 Freisetzung inflammatorischer Mediatoren aus primären Präadipozyten der NOD Maus

Um den TLR4-Expressionsstatus auf funktioneller Ebene zu bestimmen, wurde die induzierbare TLR4-abhängige Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren aus primären Präadipozyten aus TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} Mäusen durch eine Stimulation der Zellen mit bakteriellem LPS geprüft.

Primäre Präadipozyten aus TLR4^{+/+} NOD Mäusen, die für 24 h in Gegenwart ansteigender LPS-Konzentrationen (0, 1, 10, 100, 1000 ng/ml) kultiviert wurden, ließen sich konzentrationsabhängig zu einer Freisetzung von IL-6 stimulieren (Abb. 4 A). Im unstimulierten Zustand setzten diese Zellen $92,8 \pm 2,1$ pg/ml IL-6 frei und ließen sich bis zu einer maximalen Freisetzung von $806,9 \pm 20,3$ pg/ml IL-6 mit 10 ng/ml LPS stimulieren, die mit höheren LPS-Konzentrationen (100, 1000 ng/ml) nicht weiter gesteigert werden konnte. Im Vergleich zu TLR4^{+/+} Präadipozyten sezernierten TLR4^{-/-} Präadipozyten im unstimulierten Zustand ähnliche Konzentrationen von $117,4 \pm 4,6$ pg/ml IL-6 (Abb. 4 A). Allerdings ließen sich TLR4^{-/-} Präadipozyten mit steigenden LPS-Konzentrationen nicht zu einer höheren IL-6-Freisetzung stimulieren. Selbst nach einer Inkubation mit 1000 ng/ml LPS setzte diese Zellpopulation signifikant niedrigere IL-6-Konzentrationen als TLR4^{+/+} Präadipozyten frei, die sich nicht von der basalen, unstimulierten IL-6-Freisetzung unterschieden.

Die Freisetzung von TNF-alpha aus TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} Präadipozyten ließ sich nicht mit LPS stimulieren (Abb. 4 B). Die Zellen setzten sowohl basal als auch nach einer 6 stündigen Stimulation mit steigenden LPS-Konzentrationen (0 - 1000 ng/ml) vergleichbar geringe TNF-alpha-Konzentrationen von ca. 20 pg/ml in die Kulturüberstände frei.

Die metabolische Aktivität der primären Präadipozyten aus TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} NOD Mäusen wurde mittels eines XTT-Tests bewertet, um einen möglichen Einfluss der LPS-Exposition auf die Vitalität der Zellen zu prüfen (Abb. 4 C). Die mit LPS behandelten Präadipozyten wiesen alle die gleiche metabolische Aktivität auf wie die unbehandelten Zellen. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Behandlung mit ansteigenden LPS-Konzentrationen keinen Einfluss auf die metabolische Aktivität und auf die Vitalität der Zellen hat. In keinem der nachfolgenden *in vitro* Experimente

zeigte sich eine Beeinträchtigung der Zellvitalität durch die eingesetzten inflammatorischen Stimuli. Exemplarisch wurde deshalb hier nur ein repräsentatives Ergebnis für die Präadipozyten der TLR4^{+/+} NOD Maus gezeigt (Abb. 4 C).

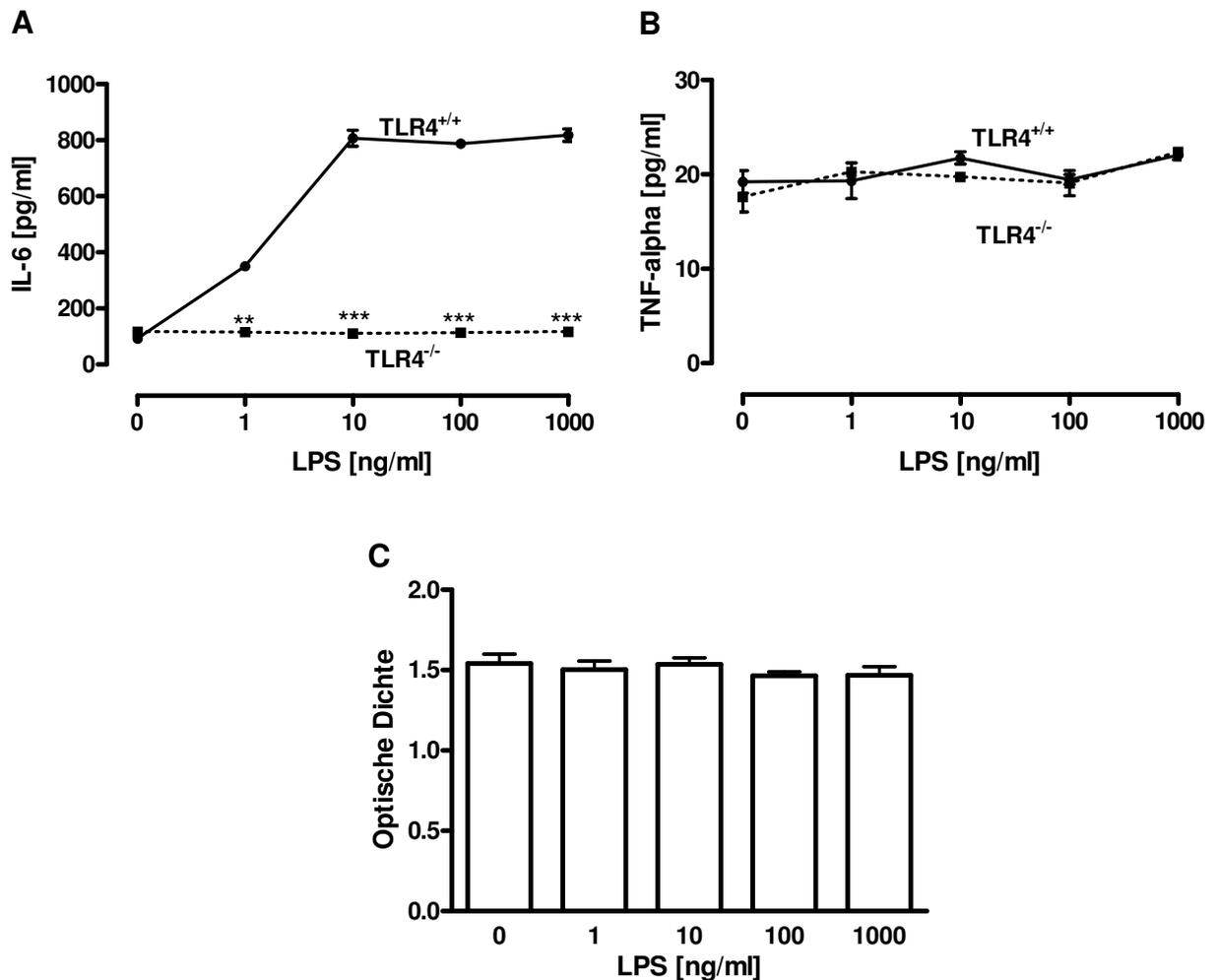


Abb. 4: LPS-induzierte IL-6- und TNF-alpha-Sekretion sowie metabolische Aktivität von TLR4-exprimierenden (TLR4^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4^{-/-}) primären Präadipozyten der NOD Maus. Die Präadipozyten wurden mit ansteigenden LPS-Konzentrationen (0, 1, 10, 100, 1000 ng/ml) stimuliert und nach 24 h wurden die IL-6- (A) und nach 6 h die TNF-alpha-Freisetzung (B) mittels Sandwich ELISA in den Kulturüberständen der Präadipozyten aus TLR4^{+/+} NOD Mäusen (durchgezogene Linie) und aus TLR4^{-/-} NOD Mäusen (unterbrochene Linie) quantifiziert. Die Vitalität der Zellen wurde mit Hilfe eines XTT-Tests bestimmt, exemplarisch dargestellt für Zellen aus TLR4^{+/+} NOD Mäusen (C). Die Daten zeigen Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden. **p<0,01 und ***p<0,001 im Vergleich zu den entsprechenden Werten der Präadipozyten der TLR4^{+/+} NOD Mäuse.

3.1.2.3 Freisetzung inflammatorischer Mediatoren aus primären Milzmakrophagen der NOD Maus

Die induzierbare Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren aus primären Milzmakrophagen aus TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} Mäusen wurde durch eine Exposition der Zellen mit steigenden Konzentrationen von bakteriellem LPS untersucht.

Makrophagen aus TLR4^{+/+} Mäusen setzten im unstimulierten Zustand kaum detektierbare Konzentrationen von $1,2 \pm 0,1$ pg/ml IL-6 frei (Abb. 5 A).

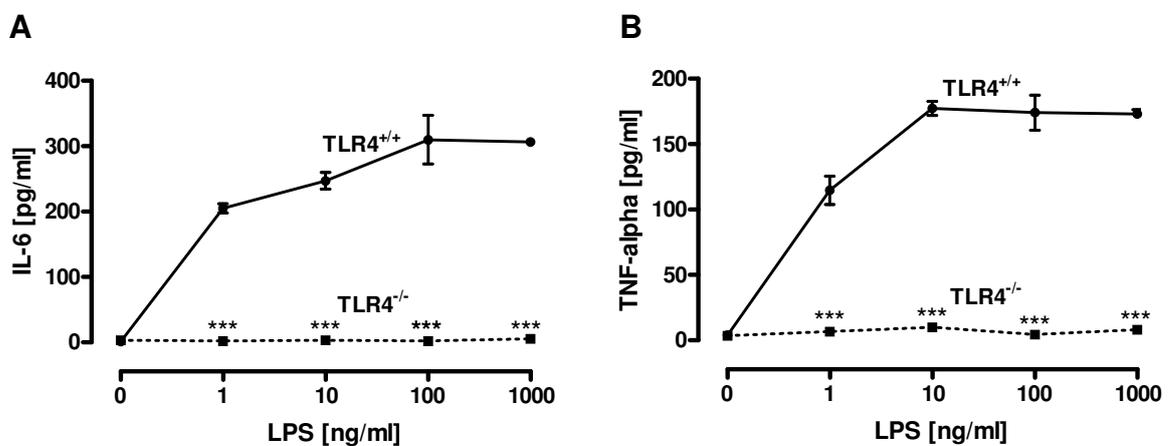


Abb. 5: LPS-induzierte IL-6- und TNF-alpha-Sekretion von TLR4-exprimierenden (TLR4^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4^{-/-}) primären Milzmakrophagen aus der NOD Maus. Die Milzmakrophagen wurden mit ansteigenden LPS-Konzentrationen (0, 1, 10, 100, 1000 ng/ml) stimuliert und nach 24 h die IL-6- (A) und nach 6 h die TNF-alpha-Freisetzung (B) mittels Sandwich ELISA in den Kulturüberständen der Makrophagen aus TLR4^{+/+} NOD Mäusen (durchgezogene Linie) und aus TLR4^{-/-} NOD Mäusen (unterbrochene Linie) quantifiziert. Die Daten zeigen Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden. **p<0,01 und ***p<0,001 im Vergleich zu den entsprechenden Werten von Milzmakrophagen aus TLR4^{+/+} NOD Mäusen.

Die Behandlung der Zellen mit 1 ng/ml LPS führte bereits zu einer deutlichen Steigerung der IL-6-Freisetzung auf $205,0 \pm 6,0$ pg/ml. Die IL-6-Sekretion war konzentrationsabhängig bis zu einem Maximum von $310,0 \pm 51,3$ pg/ml mit einer LPS-Konzentration von 100 ng/ml stimulierbar, konnte durch eine Behandlung der Zellen mit 1000 ng/ml LPS aber nicht weiter gesteigert werden. Im Gegensatz dazu ließen sich Makrophagen aus TLR4^{-/-} Mäusen durch eine LPS-Behandlung nicht zu einer IL-6-Freisetzung stimulieren (Abb. 5 A). Die Zellen sezernierten sowohl im unstimulierten als auch im stimulierten Zustand nur geringe IL-6-Konzentrationen von

ca. 3 pg/ml und unterschieden sich damit signifikant von der LPS-induzierten Freisetzung des Zytokins durch Milzmakrophagen aus TLR4^{+/+} Mäusen.

Die Freisetzung von TNF-alpha aus Milzmakrophagen aus TLR4^{+/+} Mäusen ließen sich ebenfalls konzentrationsabhängig mit LPS stimulieren (Abb. 5 B). Im basalen, unstimulierten Zustand setzten die Zellen $4,0 \pm 0,2$ pg/ml TNF-alpha frei und ließen sich mit 10 ng/ml LPS zu einer maximalen IL-6-Freisetzung von $177,4 \pm 5,7$ pg/ml stimulieren, die durch eine Behandlung mit höheren LPS-Konzentrationen (100, 1000 ng/ml) nicht weiter gesteigert werden konnte.

Milzmakrophagen aus TLR4^{-/-} Mäusen ließen sich nicht mit LPS stimulieren (Abb. 5 B). Sie setzten sowohl basal im unstimulierten Zustand, als auch im stimulierten Zustand vergleichbare Konzentrationen von ca. 9 pg/ml TNF-alpha frei und unterschieden sich somit in ihrer LPS-induzierten TNF-alpha-Freisetzung signifikant von Milzmakrophagen aus TLR4^{+/+} Mäusen.

3.2 Diabetesmanifestation in NOD Mäusen

3.2.1 Alter und Blutglukosekonzentration zum Zeitpunkt der Diabetesmanifestation

Um den Einfluss des TLR4-Expressionsstatus auf die Diabetesentwicklung in NOD Mäusen zu prüfen, wurden bei weiblichen TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} Mäusen das Alter und die Blutglukosekonzentration zum Zeitpunkt der Diabetesmanifestation dokumentiert. Ein diagnostizierter Diabetes liegt vor, wenn die Blutglukosekonzentration der Mäuse im ungestauten Zustand an 3 aufeinanderfolgenden Tagen über 250 mg/dl liegt.

Die Verlaufsstudie zeigte, dass TLR4-exprimierende NOD Mäuse im Alter von 208 ± 40 Tagen einen Diabetes entwickelten. Im Gegensatz dazu manifestierte sich der Diabetes in TLR4^{-/-} NOD Mäusen bereits in einem Alter von 152 ± 27 Tagen ($p < 0,001$) (Abb. 6 A).

Zum Zeitpunkt der Diabetesmanifestation wurde mit Hilfe eines Blutglukosemessgerätes die Glukosekonzentration in Blutproben aus der Schwanzvene der Mäuse bestimmt. TLR4^{+/+} NOD Mäuse wiesen zum Zeitpunkt der Diabetesmanifestation eine Blutglukosekonzentration von 362 ± 44 mg/dl auf

(Abb. 6 B). Im Gegensatz dazu hatten TLR4^{-/-} NOD Mäuse bei der Diabetesmanifestation eine erhöhte Blutglukosekonzentration von 457 ± 30 mg/ml (p<0,001).

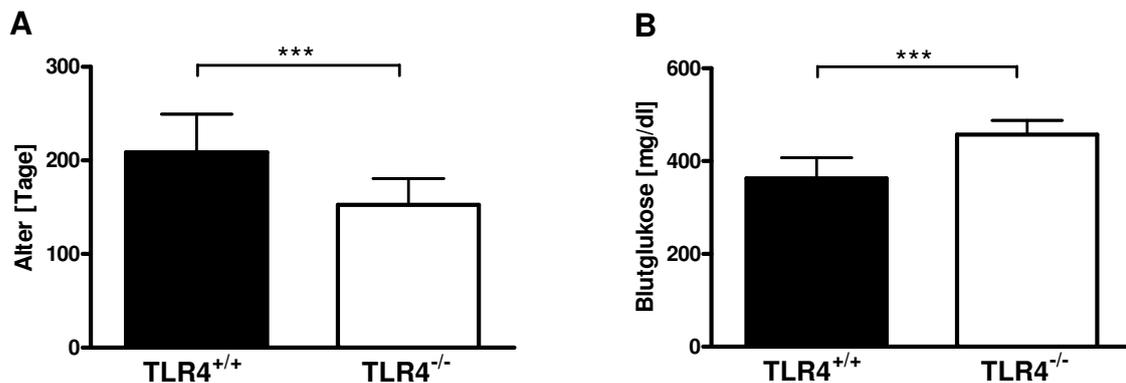


Abb. 6: Alter und Blutglukosekonzentration von TLR4-exprimierenden (TLR4^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4^{-/-}) NOD Mäusen zum Zeitpunkt der Diabetesmanifestation. Das Gewicht weiblicher Tiere wurde nach Manifestation des Diabetes bestimmt und die Blutglukosekonzentration wurde mit Hilfe eines Blutglukosemessgerätes aus venösen Blutproben bestimmt. Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM von 15 Tieren. ***p<0,001 im Vergleich zu den entsprechenden Werten der TLR4^{+/+} NOD Mäuse.

3.3 Metabolische Phänotypisierung

Zur Analyse möglicher Effekte des TLR4-Expressionsstatus auf metabolische Parameter wurden weibliche, 90 Tage alte TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} C57BL/10 Mäuse sowie nicht diabetische und diabetische Geschwistertiere der TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} NOD Mäuse in einem modularen System zur automatisierten Erfassung metabolischer Parameter über 2 Hell- und 3 Dunkel-Phasen (Standard-Zyklus 12 h hell/ 12 h dunkel) analysiert. Das System erlaubt die Erfassung von Futter- und Wasseraufnahme, der physischen Aktivität, des Energieverbrauchs sowie des Respiratorischen Quotienten (RQ) in regelmäßigen Abständen in hoher zeitlicher Auflösung.

3.3.1 Futter- und Wasseraufnahme

Während der gesamten Messperiode hatten die Tiere freien Zugang zu Futter und Wasser.

Wie erwartet war die durchschnittliche Futter- und die Wasseraufnahme der Mäuse in der Dunkel-Phase signifikant höher im Vergleich zu den entsprechenden Gruppen in der Hell-Phase ($p < 0,001$) (Abb. 7 A, B).

Es zeigten sich keine Unterschiede in der durchschnittlichen Futteraufnahme von TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} C57BL/10 und NOD Mäusen (Abb. 7 A). In der Hell-Phase lag die Futteraufnahme in allen untersuchten Gruppen im Bereich von 0,03 bis 0,05 g/g Körpergewicht. In der Dunkel-Phase schwankte die Futteraufnahme zwischen 0,09 und 0,11 g/g Körpergewicht.

Der Mittelwert der Wasseraufnahme von TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} C57BL/10 und NOD Mäusen war vergleichbar (Abb. 7 B). In der Hell-Phase schwankte die Wasseraufnahme der Mäuse im Bereich von 0,04 und 0,06 ml/g Körpergewicht, in der Dunkelphase lag die Wasseraufnahme im Bereich von 0,11 und 0,14 ml/g Körpergewicht.

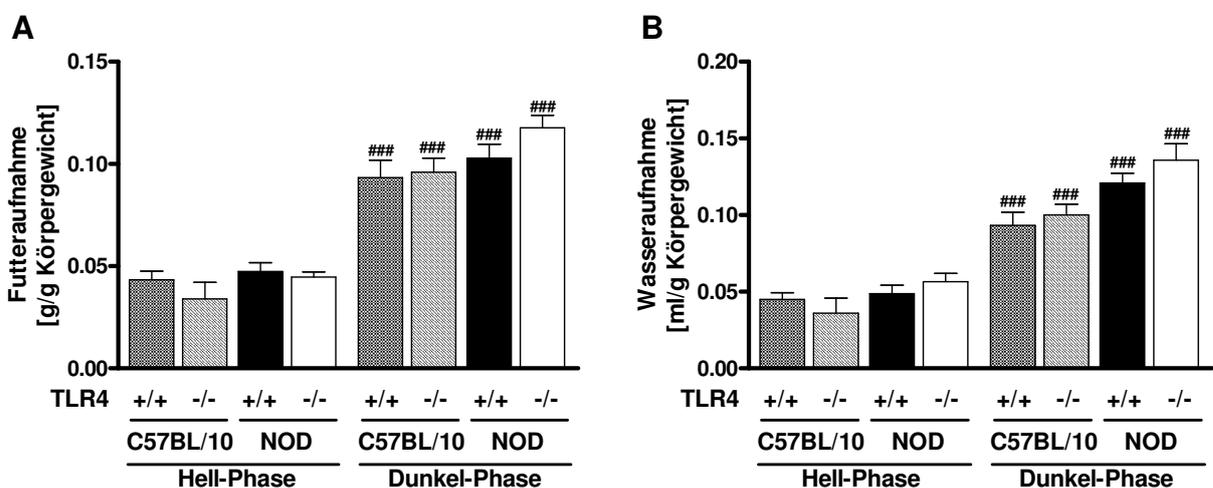


Abb. 7: Futter- und Wasseraufnahme von TLR4-exprimierenden (TLR4^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4^{-/-}) C57BL/10 und NOD Mäusen. Weibliche, nicht diabetische Tiere wurden in einem modularen System zur automatisierten Erfassung metabolischer Parameter über 2 Hell- und 3 Dunkel-Phasen analysiert, dabei wurde die Futter- (A) und die Wasseraufnahme (B) der Tiere dokumentiert. Die Daten zeigen die Futter- und Wasseraufnahme in g/g Körpergewicht bzw. in ml/g Körpergewicht in 12 h der Hell- bzw. Dunkelphase als Mittelwerte + SEM von 10 Tieren in jeder Gruppe. ### $p < 0,001$ im Vergleich zur entsprechenden Gruppe in der Hell-Phase.

In weiteren Messungen wurde die Futter- und Wasseraufnahme von diabetischen TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} NOD Mäusen analysiert und mit der Futter- und Wasseraufnahme von nicht diabetischen TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} NOD Mäusen verglichen (Tab. 6).

Die durchschnittliche Futteraufnahme von diabetischen TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} NOD Mäusen war in der Hell-Phase signifikant erhöht im Vergleich zu nicht diabetischen TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} NOD Mäusen ($p < 0,001$). Diabetische TLR4^{+/+} NOD Mäuse nahmen in der Hell-Phase $0,08 \pm 0,01$ g/g Körpergewicht auf, diabetische TLR4^{-/-} Mäuse nahmen $0,12 \pm 0,02$ g/g Körpergewicht auf (Tab. 6).

In der Dunkel-Phase war die Futteraufnahme von diabetischen TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} NOD Mäusen erhöht im Vergleich zu nicht diabetischen Tieren des entsprechenden TLR4-Genotyps. Sie erhöhte sich bei TLR4^{+/+} Mäusen auf $0,16 \pm 0,03$ g/g Körpergewicht ($p < 0,01$) und bei TLR4^{-/-} NOD Mäusen auf $0,21 \pm 0,03$ g/g Körpergewicht ($p < 0,001$) (Tab. 6).

Tab. 6: Futteraufnahme von nicht diabetischen und diabetischen TLR4-exprimierenden (TLR4^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4^{-/-}) NOD Mäusen.

	Futteraufnahme (g/g Körpergewicht)					
	Hell-Phase			Dunkel-Phase		
	NOD nicht diabetisch	NOD diabetisch	p<	NOD nicht diabetisch	NOD diabetisch	p<
TLR4 ^{+/+}	$0,04 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,01$	0,001	$0,11 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,03$	0,01
TLR4 ^{-/-}	$0,04 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,02$	0,001	$0,12 \pm 0,01$	$0,21 \pm 0,03$	0,001

Die Daten zeigen Futteraufnahme in g/g Körpergewicht als Mittelwerte \pm SEM in der Hell- und Dunkel-Phase von 10 nicht diabetischen und 6 diabetischen Tieren. $p < 0,01$ und $p < 0,001$ im Vergleich zu nicht diabetischen NOD Mäusen des entsprechenden TLR4-Genotyps.

Die Analysen der durchschnittlichen Wasseraufnahme von diabetischen TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} NOD Mäusen zeigten, dass die Mäuse im Vergleich zu nicht diabetischen TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} NOD Mäusen in der Hell-Phase signifikant erhöhte Mengen Wasser aufnahmen (Tab. 7). Die Wasseraufnahme lag bei diabetischen TLR4^{+/+} NOD Mäusen in der Hell-Phase bei $0,41 \pm 0,25$ ml/g Körpergewicht ($p < 0,01$)

und bei diabetischen TLR4^{-/-} NOD Mäusen bei $0,45 \pm 0,21$ ml/g Körpergewicht ($p < 0,001$) (Tab. 7).

In der Dunkel-Phase erhöhte sich die durchschnittliche Wasseraufnahme diabetischer TLR4^{+/+} NOD Mäuse auf $0,62 \pm 0,02$ ml/g Körpergewicht und TLR4^{-/-} NOD Mäuse auf $0,72 \pm 0,23$ ml/g Körpergewicht und unterschied sich signifikant von der Wasseraufnahme der nicht diabetischen TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} NOD Mäuse ($p < 0,001$) (Tab. 7).

Tab. 7: Wasseraufnahme von nicht diabetischen und diabetischen TLR4-exprimierenden (TLR4^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4^{-/-}) NOD Mäusen.

	Wasseraufnahme (ml/g Körpergewicht)					
	Hell-Phase			Dunkel-Phase		
	NOD nicht diabetisch	NOD diabetisch	p<	NOD nicht diabetisch	NOD diabetisch	p<
TLR4 ^{+/+}	$0,05 \pm 0,01$	$0,41 \pm 0,25$	0,01	$0,12 \pm 0,02$	$0,62 \pm 0,02$	0,001
TLR4 ^{-/-}	$0,06 \pm 0,01$	$0,45 \pm 0,21$	0,001	$0,13 \pm 0,03$	$0,72 \pm 0,23$	0,001

Die Daten zeigen die Wasseraufnahme in ml/g Körpergewicht als Mittelwerte \pm SEM in der Hell- und Dunkel-Phase von 10 nicht diabetischen und 6 diabetischen Tieren. $p < 0,01$ und $p < 0,001$ im Vergleich zu nicht diabetischen NOD Mäusen des entsprechenden TLR4-Genotyps.

3.3.2 Physische Aktivität

Die physische Aktivität der Mäuse wurde während der gesamten Messperiode von 2 Hell- und 3 Dunkel-Phasen erfasst. Die Käfige sind in x- und y-Richtung von Rahmen umgeben, die infrarote Strahlen aussenden, die durch die Bewegung der Mäuse unterbrochen werden. Jede Unterbrechung eines infraroten Lichtstrahls wird als ein Count gezählt.

Die physische Aktivität war, wie erwartet, in der Dunkel-Phase erhöht im Vergleich zu der physischen Aktivität der entsprechenden Gruppe in der Hell-Phase ($p < 0,001$) (Abb. 8).

Bei der Aufzeichnung der physischen Aktivität zeigten sich keine Unterschiede zwischen TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} C57BL/10 und NOD Mäusen in der Hell-Phase (ca. 400 Counts).

In der Dunkel-Phase war die Aktivität von TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} C57BL/10 Mäusen vergleichbar (ca. 1.300 Counts). Allerdings war die Aktivität von TLR4^{-/-} NOD Mäusen in der Dunkel-Phase signifikant erhöht im Vergleich zu TLR4^{+/+} NOD Mäusen (TLR4^{+/+}: 1.174 ± 404; TLR4^{-/-}: 1.698 ± 663 Counts; p<0,05).

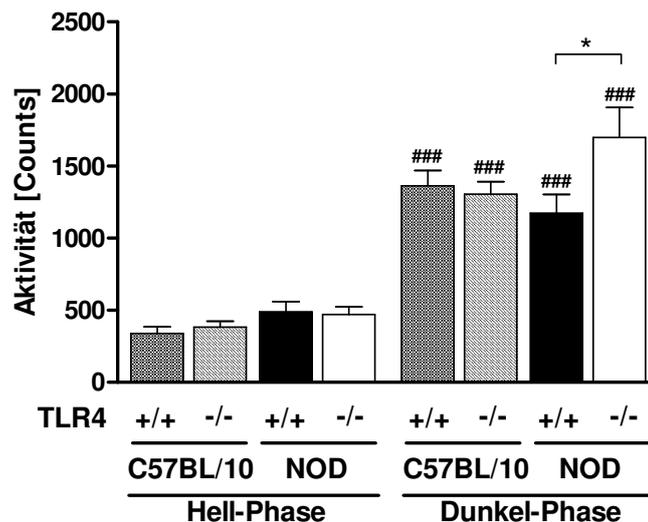


Abb. 8: Physische Aktivität von TLR4-exprimierenden (TLR4^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4^{-/-}) C57BL/10 und NOD Mäusen. Die Aktivität weiblicher, nicht diabetischer Tiere wurde in einem modularen System zur automatisierten Erfassung metabolischer Parameter über 2 Hell- und 3 Dunkel-Phasen erfasst und als Counts registriert. Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM in der Hell- und Dunkel-Phase von 10 Tieren je Gruppe. *p<0,05 im Vergleich zu TLR4^{+/+} NOD Mäusen. ###p<0,001 im Vergleich zur entsprechenden Gruppe in der Hell-Phase.

Ergänzend wurde die physische Aktivität von nicht diabetischen und diabetischen TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} NOD Mäusen analysiert (Tab. 8).

In der Hell-Phase war die physische Aktivität von nicht diabetischen und diabetischen NOD Mäusen unabhängig vom TLR4-Expressionsstatus vergleichbar und lag im Bereich von 400 - 500 Counts. In der Dunkel-Phase unterschied sich die physische Aktivität von nicht diabetischen und diabetischen TLR4^{+/+} NOD Mäusen nicht, allerdings zeichnete sich eine Tendenz zu einer verminderten Aktivität in diabetischen TLR4^{+/+} NOD Mäusen (760 ± 225 Counts) ab im Vergleich zu nicht diabetischen TLR4^{+/+} NOD Mäusen (1.074 ± 349 Counts). Die physische Aktivität von diabetischen TLR4^{-/-} NOD Mäusen war in der Dunkel-Phase signifikant

erniedrigt im Vergleich zu nicht diabetischen NOD Mäusen (nicht diabetische TLR4^{-/-} NOD: 1.918 ± 539 Counts, diabetische TLR4^{-/-} NOD: 620 ± 216 Counts; p<0,001).

Tab. 8: Physische Aktivität von nicht diabetischen und diabetischen TLR4-exprimierenden (TLR4^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4^{-/-}) NOD Mäusen.

	Physische Aktivität (Counts)					
	Hell-Phase			Dunkel-Phase		
	NOD	NOD	p<	NOD	NOD	p<
	nicht diabetisch	diabetisch		nicht diabetisch	diabetisch	
TLR4 ^{+/+}	489 ± 225	469 ± 218	n.s.	1.074 ± 349	760 ± 225	n.s.
TLR4 ^{-/-}	469 ± 172	396 ± 128	n.s.	1.918 ± 539	620 ± 216	0,001

Die Daten zeigen Mittelwerte ± SEM der physischen Aktivität (Counts) in der Hell- und Dunkel-Phase von 10 nicht diabetischen und 6 diabetischen Tieren. p<0,001 und n.s. (nicht signifikant) im Vergleich zu nicht diabetischen NOD Mäusen.

3.3.3 Energieverbrauch

Der Energieverbrauch wurde aus Parametern (VO₂, VCO₂) kalkuliert, die während der gesamten Messdauer von 2 Hell- und 3 Dunkel-Phasen aufgezeichnet wurden.

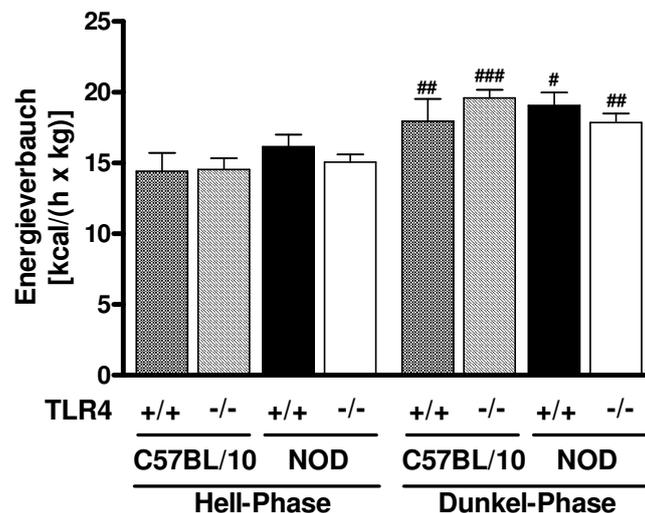


Abb. 9: Energieverbrauch von TLR4-exprimierenden (TLR4^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4^{-/-}) C57BL/10 und NOD Mäusen. Weibliche, nicht diabetische Tiere wurden in einem modularen System zur automatisierten Erfassung metabolischer Parameter über 2 Hell- und 3 Dunkel-Phasen analysiert und dabei wurde der Energieverbrauch (kcal/(h x kg)) der Tiere dokumentiert. Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM in der Hell- und Dunkel-Phase von 10 Tieren je Gruppe. #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 im Vergleich zur entsprechenden Gruppe in der Hell-Phase.

Zwischen TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} C57BL/10 und NOD Mäusen unterschied sich der durchschnittliche Energieverbrauch in der Hell-Phase nicht und liegt im Bereich von 14 - 16 kcal/(h x kg) (Abb. 9).

Wie erwartet war der Energieverbrauch jeder Gruppe in der Dunkel-Phase signifikant erhöht im Vergleich zum Energieverbrauch der entsprechenden Gruppe in der Hell-Phase. In der Dunkel-Phase war der Energieverbrauch von TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} C57BL/10 und NOD Mäusen ebenfalls vergleichbar und lag im Bereich von 17 - 20 kcal/(h x kg).

Ergänzend wurde der Energieverbrauch von nicht diabetischen und diabetischen TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} NOD Mäusen vergleichend analysiert (Tab. 9).

In der Hell- und in der Dunkel-Phase war der durchschnittliche Energieverbrauch von nicht diabetischen und diabetischen TLR4^{+/+} NOD Mäusen vergleichbar und lag in der Hell-Phase im Bereich von 16 - 18 kcal/(h x kg) und in der Dunkel-Phase im Bereich von 19 - 20 kcal/(h x kg).

Der durchschnittliche Energieverbrauch von diabetischen TLR4^{-/-} NOD Mäusen war in der Hell-Phase signifikant erhöht im Vergleich zu nicht diabetischen TLR4^{-/-} NOD Mäusen (TLR4^{-/-} nicht diabetisch: 15,1 ± 1,7; TLR4^{-/-} diabetisch: 17,8 ± 1,7 kcal/(h x kg), p<0,01). Dieser Unterschied zeichnete sich auch in der Dunkel-Phase ab. Während nicht diabetische TLR4^{-/-} NOD Mäuse einen durchschnittlichen Energieverbrauch von 17,8 ± 2,1 kcal/(h x kg) hatten, war der Energieverbrauch von diabetischen TLR4^{-/-} Mäusen signifikant erhöht und lag bei 21,6 ± 2,7 kcal/(h x kg) (p<0,05).

Tab. 9: Energieverbrauch von nicht diabetischen und diabetischen TLR4-exprimierenden (TLR4^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4^{-/-}) NOD Mäusen.

	Energieverbrauch (kcal/(h x kg))					
	Hell-Phase			Dunkel-Phase		
	NOD nicht diabetisch	NOD diabetisch	p<	NOD nicht diabetisch	NOD diabetisch	p<
TLR4 ^{+/+}	16,1 ± 2,6	17,8 ± 2,4	n.s.	19,1 ± 2,9	19,6 ± 4,3	n.s.
TLR4 ^{-/-}	15,1 ± 1,7	17,8 ± 1,7	0,01	17,8 ± 2,1	21,6 ± 2,7	0,05

Die Daten zeigen Mittelwerte ± SEM des Energieverbrauchs (kcal/(h x kg)) in der Hell- und Dunkel-Phase von 10 nicht diabetischen und 6 diabetischen Tieren. p<0,05, p<0,01 und n.s. (nicht signifikant) im Vergleich zu nicht diabetischen NOD Mäusen.

3.3.4 Respiratorischer Quotient

Der RQ wurde aus der gemessenen Kohlenstoffdioxidproduktion und dem Sauerstoffverbrauch ermittelt (VCO_2/VO_2). Der RQ dient als Indikator des verstoffwechselten Substrates. Bei einer Energiegewinnung ausschließlich aus Kohlenhydraten liegt der RQ bei 1, werden hingegen ausschließlich Proteine verstoffwechselt liegt der RQ bei 0,81 und wird ausschließlich Fett verstoffwechselt liegt der RQ bei 0,7. Die Fütterung der Mäuse mit einer Standarddiät führt zu einem RQ, der zwischen 0,85 und 0,97 liegt.

Die Höhe des RQ von weiblichen, nicht diabetischen $TLR4^{+/+}$ und $TLR4^{-/-}$ NOD Mäusen über 2 Hell- und 3 Dunkel-Phasen zeigte den typischen zirkadianen Rhythmus der Mäuse (Abb. 10 A). In den Dunkel-Phasen erreichte der RQ sein Maximum und in den Hell-Phasen erreichte der RQ sein Minimum. Jedoch zeigte sich, dass der RQ von $TLR4^{-/-}$ NOD Mäusen konstant niedriger war im Vergleich zum RQ von $TLR4^{+/+}$ Mäusen.

Der durchschnittliche RQ von weiblichen $TLR4^{+/+}$ und $TLR4^{-/-}$ C57BL/10 und weiblichen nicht diabetischen $TLR4^{+/+}$ NOD Mäusen war in der Hell-Phase vergleichbar und lag in einem Bereich von 0,92 - 0,95 (Abb. 10 B). Allerdings hatten $TLR4^{-/-}$ NOD Mäuse (RQ $0,84 \pm 0,05$) im Vergleich zu $TLR4^{+/+}$ NOD Mäusen (RQ $0,93 \pm 0,04$; $p < 0,001$) und im Vergleich zu $TLR4^{-/-}$ C57BL/10 Mäusen (RQ $0,94 \pm 0,03$; $p < 0,001$) einen signifikant erniedrigten RQ in der Hell-Phase.

Auch in der Dunkel-Phase war der RQ von $TLR4^{+/+}$ und $TLR4^{-/-}$ C57BL/10 und $TLR4^{+/+}$ NOD Mäusen vergleichbar und lag im Bereich von 0,97 - 0,98. Im Gegensatz dazu war der RQ von $TLR4^{-/-}$ Mäusen mit einem Wert von $0,90 \pm 0,04$ in der Dunkel-Phase signifikant reduziert im Vergleich zum RQ von $TLR4^{+/+}$ NOD Mäusen (RQ $0,97 \pm 0,05$) und von $TLR4^{-/-}$ C57BL/10 Mäusen (RQ $0,98 \pm 0,03$ ($p < 0,01$)).

Wie erwartet lag der durchschnittliche RQ von $TLR4^{+/+}$ und $TLR4^{-/-}$ C57BL/10 und NOD Mäusen in der Dunkel-Phase signifikant über dem RQ der entsprechenden Gruppe in der Hell-Phase.

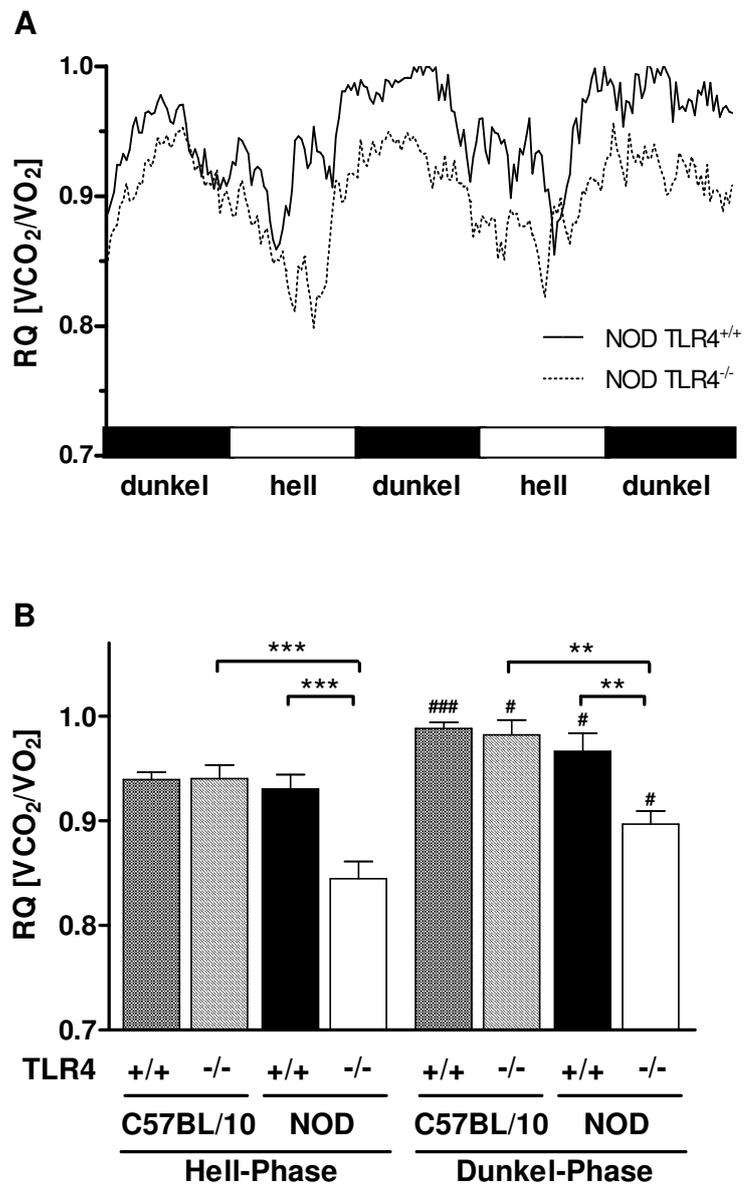


Abb. 10: RQ von TLR4-exprimierenden (TLR4^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4^{-/-}) C57BL/10 und NOD Mäusen. Weibliche, nicht diabetische Tiere wurden in einem modularen System zur automatisierten Erfassung metabolischer Parameter über 2 Hell- und 3 Dunkel-Phasen analysiert, dabei wurde der RQ (VCO_2/VO_2) der Tiere dokumentiert. Die Daten sind dargestellt im Verlauf (A) von TLR4^{+/+} NOD Mäusen (durchgezogene Linie) und von TLR4^{-/-} NOD Mäusen (unterbrochene Linie) über die gesamte Messperiode und als Mittelwerte + SEM (B) in der Hell- und Dunkel-Phase von 10 Tieren pro Gruppe. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ im Vergleich zu C57BL/10 und NOD Mäusen innerhalb der Hell- oder Dunkel-Phase. # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ im Vergleich zur entsprechenden Gruppe in der Hell-Phase.

Tab. 10: RQ von nicht diabetischen und diabetischen TLR4-exprimierenden (TLR4^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4^{-/-}) NOD Mäusen.

	Respiratorischer Quotient (VCO ₂ /VO ₂)					
	Hell-Phase			Dunkel-Phase		
	NOD nicht diabetisch	NOD diabetisch	p<	NOD nicht diabetisch	NOD diabetisch	p<
TLR4 ^{+/+}	0,93 ± 0,04	0,87 ± 0,01	0,05	0,98 ± 0,06	0,88 ± 0,01	0,01
TLR4 ^{-/-}	0,84 ± 0,05	0,83 ± 0,01	n.s.	0,89 ± 0,04	0,83 ± 0,01	0,01

Die Daten zeigen Mittelwerte ± SEM des RQ (VCO₂/VO₂) in der Hell- und Dunkel-Phase von 10 nicht diabetischen und 6 diabetischen Tieren. p<0,05, p<0,01 und n.s. (nicht signifikant) im Vergleich zu nicht diabetischen NOD Mäusen.

Beim Vergleich von nicht diabetischen und diabetischen TLR4^{+/+} NOD Mäusen in der Hell-Phase zeigte sich, dass diabetische Tiere einen reduzierten RQ aufwiesen (RQ nicht diabetisch: 0,93 ± 0,04; RQ diabetisch: 0,87 ± 0,01; p<0,05) (Tab. 10). In der Hell-Phase unterschied sich der ohnehin geringe RQ von nicht diabetischen TLR4^{-/-} NOD Mäusen (0,84 ± 0,05) nicht vom RQ diabetischer TLR4^{-/-} Tiere. In der Dunkel-Phase hatten diabetische TLR4^{+/+} NOD Mäuse (RQ 0,88 ± 0,01) ebenfalls einen signifikant geringeren RQ im Vergleich zu nicht diabetischen TLR4^{+/+} Mäusen (RQ 0,98 ± 0,06) (p<0,01). Auch diabetische TLR4^{-/-} NOD Mäuse hatten einen reduzierten RQ in der Dunkel-Phase im Vergleich zu nicht diabetischen TLR4^{+/+} NOD Mäusen (RQ nicht diabetisch: 0,89 ± 0,04; RQ diabetisch: 0,83 ± 0,01; p<0,01).

3.4 Körpergewicht

Im Alter von 90 Tagen wurde das Körpergewicht weiblicher, nicht diabetischer Mäuse bestimmt, um einen möglichen Einfluss des TLR4-Expressionsstatus auf die Körpergewichtsentwicklung der Mäuse zu prüfen.

Das durchschnittliche Körpergewicht von TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} C57BL/10 Mäusen war vergleichbar und lag im Bereich zwischen 26,4 und 27,4 g (Abb. 11). Das Körpergewicht von TLR4^{+/+} NOD Mäusen lag in einem ähnlichen Bereich wie das Gewicht der C57BL/10 Mäuse. TLR4^{-/-} NOD Mäuse wiesen jedoch ein höheres Körpergewicht auf als TLR4^{+/+} Tiere (TLR4^{+/+}: 25,4 ± 1,3 g, TLR4^{-/-}: 28,1 ± 1,7 g; p<0,01).

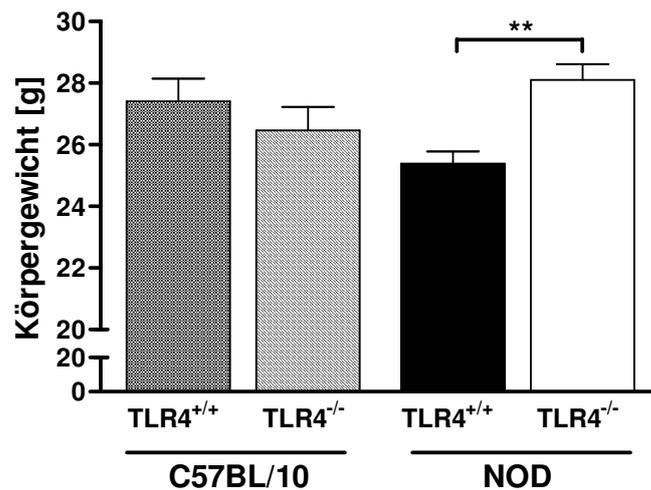


Abb. 11: Körpergewicht von TLR4-exprimierenden (TLR4^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4^{-/-}) C57BL/10 und NOD Mäusen. Im Alter von 90 Tagen wurde das Körpergewicht von weiblichen, nicht diabetischen TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} C57BL/10 und NOD Mäusen dokumentiert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte + SEM von jeweils 15 Tieren pro Gruppe. **p<0,01 im Vergleich zu TLR4^{+/+} NOD Mäusen.

3.5 Körperfettmasse

Um den potenziellen Effekt des TLR4-Expressionsstatus auf die Entwicklung der Fettmasse zu prüfen, wurde von weiblichen, nicht diabetischen Mäusen die Körperzusammensetzung mit Hilfe der NMR Methode analysiert.

Der prozentuale Anteil an fettfreier Körpermasse war in TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} C57BL/10 und NOD Mäusen vergleichbar und lag bei ca. 83 % (Abb. 12).

Der Anteil der Fettmasse an der gesamten Körpermasse unterschied sich nicht zwischen TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} C57BL/10 und TLR4^{+/+} NOD Mäusen und lag bei ca. 11,5 %. Im Vergleich zu TLR4^{+/+} NOD Mäusen war jedoch die Körperfettmasse in TLR4^{-/-} NOD Mäusen signifikant erhöht und entsprach in diesen Tieren $13,0 \pm 1,8$ % der gesamten Körpermasse ($p < 0,05$).

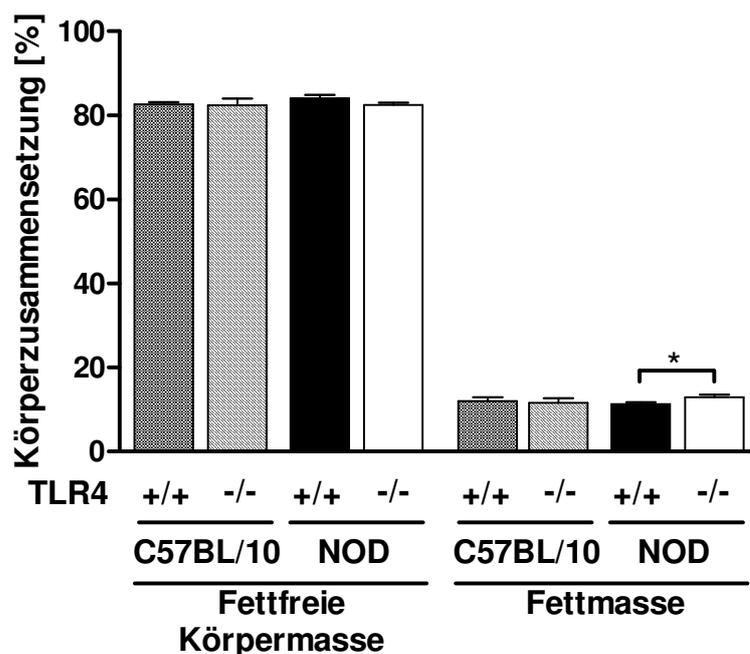


Abb. 12: Körperzusammensetzung von TLR4-exprimierenden (TLR4^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4^{-/-}) C57BL/10 und NOD Mäusen. Die Körperzusammensetzung von 90 Tage alten, weiblichen Tieren wurde mittels der NMR Methode analysiert. Die Daten zeigen die prozentualen Anteile der fettfreien Körpermasse und der Körperfettmasse von TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} Mäusen als Mittelwerte + SEM von jeweils 15 Tieren pro Gruppe. * $p < 0,05$ im Vergleich zu TLR4^{+/+} NOD Mäusen.

3.6 Interleukin 6 im Serum

Um den immunologischen Status der Tiere zu charakterisieren, wurde die Konzentration des proinflammatorischen Zytokins IL-6 im Serum von TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} C57BL/10 und NOD Mäusen nach 6 stündigem Fasten mittels Sandwich ELISA quantifiziert.

Die IL-6-Konzentrationen im Serum von TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} C57BL/10 und von TLR4^{+/+} NOD Mäusen waren vergleichbar und lagen im Bereich von 2,7 - 3,0 pg/ml (Abb. 13). Im Gegensatz dazu waren die IL-6-Konzentrationen in TLR4^{-/-} NOD Mäusen signifikant erhöht im Vergleich zu TLR4^{+/+} NOD Mäusen (TLR4^{+/+}: $2,8 \pm 1,1$, TLR4^{-/-}: $4,7 \pm 1,3$ pg/ml; $p < 0,05$).

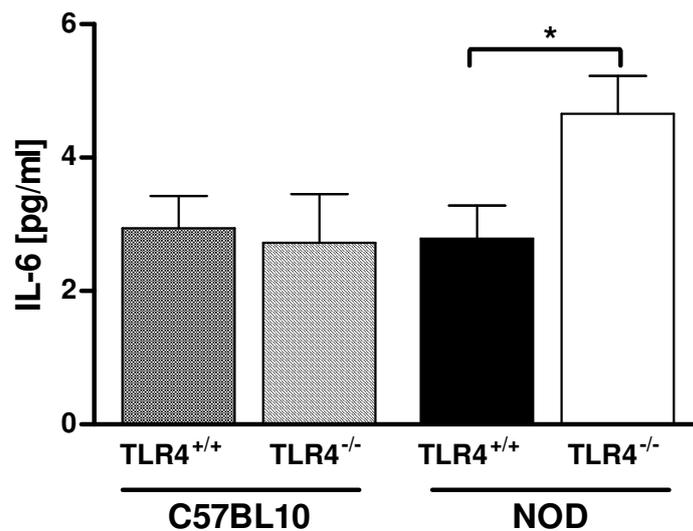


Abb. 13: IL-6-Konzentrationen im Serum von TLR4-exprimierenden (TLR4^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4^{-/-}) C57BL/10 und NOD Mäusen. Im Serum weiblicher, nicht diabetischer Tiere im Alter von 90 Tagen wurden nach 6 stündigem Fasten die Konzentrationen von IL-6 mittels ELISA quantifiziert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte + SEM von jeweils 5 Tieren je Gruppe. * $p < 0,05$ im Vergleich zu TLR4^{+/+} NOD Mäusen.

3.7 Freie Fettsäuren und Triglyzeride im Plasma

Im Plasma 90 Tage alter TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} C57BL/10 und nicht diabetischer NOD Mäuse gleichen Alters wurden nach 6 stündigem Fasten die Konzentrationen von FFA und Triglyzeriden mittels enzymatischer Tests bestimmt.

Die Konzentrationen von FFA im Plasma von C57BL/10 Mäusen lagen unabhängig vom TLR4-Expressionsstatus im Bereich von 0,6 - 0,7 mMol/l wobei sich jedoch ein Trend zu erhöhten Konzentrationen von FFA im Plasma von TLR4^{-/-} C57BL/10 Mäusen abzeichnete (Abb. 14 A). TLR4^{-/-} NOD Mäuse wiesen im Plasma signifikant erhöhte Konzentrationen von FFA ($0,75 \pm 0,11$ mMol/l) auf im Vergleich zu TLR4^{+/+} Tieren ($0,53 \pm 0,13$ mMol/l) ($p < 0,01$).

Nach 6 stündigem Fasten waren im Plasma von TLR4^{+/+} C57BL/10 Mäusen $78,0 \pm 10,4$ mg/dl Triglyzeride nachweisbar und im Plasma von TLR4^{-/-} C57BL/10 Mäusen vergleichbare Konzentrationen von $83,3 \pm 7,6$ mg/dl (Abb. 14 B). Die Konzentrationen von Triglyzeriden im Plasma von TLR4^{-/-} NOD Mäusen ($78,4 \pm 5,2$ mg/dl) waren jedoch signifikant erhöht im Vergleich zu TLR4^{+/+} NOD Mäusen ($65,9 \pm 5,2$ mg/dl) ($p < 0,01$).

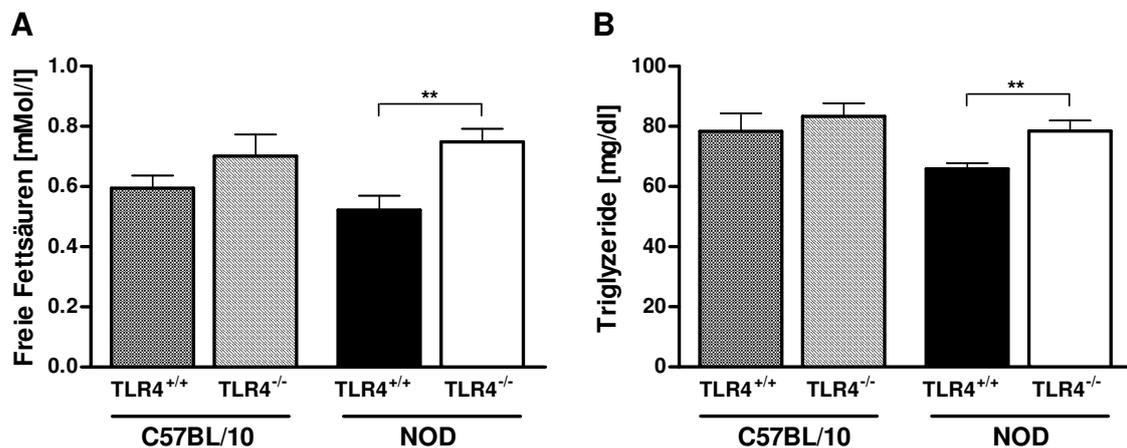


Abb. 14: Konzentrationen von FFA und Triglyzeriden im Plasma TLR4-exprimierender (TLR4^{+/+}) und TLR4-defizienter (TLR4^{-/-}) C57BL/10 und nicht diabetischer NOD Mäuse. Im Plasma von weiblichen Tieren im Alter von 90 Tagen wurden nach 6 stündigem Fasten die Konzentrationen von FFA (A) und Triglyzeriden (B) bestimmt. Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM von jeweils 5 Tieren jeder Gruppe. ** $p < 0,01$ im Vergleich zu TLR4^{+/+} NOD Mäusen.

3.8 Fetuin A im Serum

Zur Prüfung des Effekts des TLR4-Expressionsstatus auf die Konzentrationen von Fetuin A im Blut der Mäuse, wurden die Fetuin A-Konzentrationen im Serum gefasteter TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} C57BL/10 und NOD Mäuse mittels Sandwich ELISA quantifiziert.

Die Fetuin A-Konzentrationen im Serum von TLR4^{-/-} C57BL/10 Mäusen ($77,1 \pm 17,5 \mu\text{g/ml}$) waren erhöht im Vergleich zu den Fetuin A-Konzentrationen im Serum von TLR4^{+/+} C57BL/10 Mäusen ($45,6 \pm 25,8 \mu\text{g/ml}$) ($p < 0,05$) (Abb. 15).

Im Vergleich zu C57BL/10 Mäusen wiesen NOD Mäuse höhere Fetuin A-Konzentrationen im Serum auf. Im Vergleich zu TLR4^{+/+} C57BL/10 Mäusen ($45,6 \pm 25,8 \mu\text{g/ml}$) zeigten TLR4^{+/+} NOD Mäuse ($110,3 \pm 7,1 \mu\text{g/ml}$) signifikant erhöhte Fetuin A-Spiegel ($p < 0,05$). Die Fetuin A-Konzentrationen im Serum von TLR4^{+/+} NOD Mäusen und TLR4^{-/-} NOD Mäusen unterschieden sich nicht.

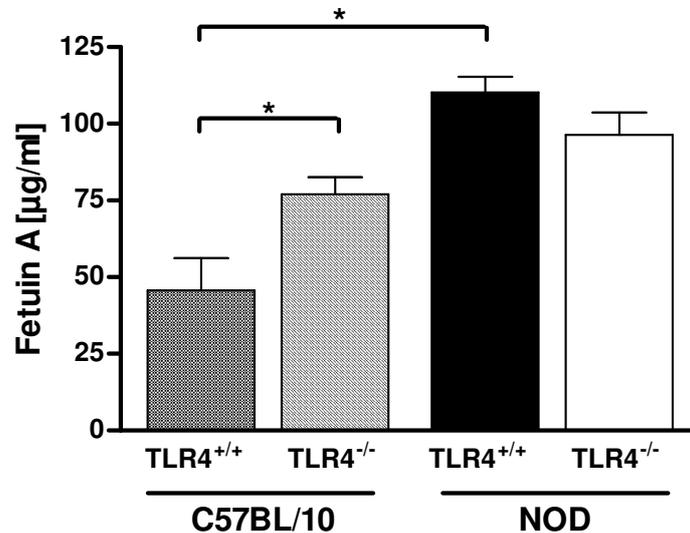


Abb. 15: Fetuin A-Konzentrationen im Serum TLR4-exprimierender (TLR4^{+/+}) und TLR4-defizienter (TLR4^{-/-}) C57BL/10 und NOD Mäuse. Im Serum weiblicher, nicht diabetischer Tiere im Alter von 90 Tagen wurden nach 6 stündigem Fasten die Konzentrationen von Fetuin A mittels ELISA quantifiziert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte + SEM von jeweils 3-10 Tieren pro Gruppe. * $p < 0,05$ im Vergleich zu TLR4^{+/+} C57BL/10 Mäusen.

3.9 Lebergewicht

Ergänzend zu der vorherigen Analyse der Fetuin A-Konzentrationen wurde im Anschluss an die Blutentnahme zur Fetuin A-Bestimmung die Leber der Tiere, als Syntheseort des Fetuin A, entnommen und das Gewicht des Organs bestimmt.

Das Lebergewicht von TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} C57BL/10 Mäusen unterschied sich nicht und lag im Bereich von ca. 0,04 g/g Körpergewicht (Abb. 16).

Das Gewicht der Leber von TLR4^{-/-} NOD (0,05 ± 0,01 g/g Körpergewicht) hingegen war signifikant erhöht im Vergleich zu TLR4^{+/+} NOD Mäusen (0,04 ± 0,05 g/g Körpergewicht) (p<0,05), deren Lebergewicht im Bereich der C57BL/10 Tiere lag.

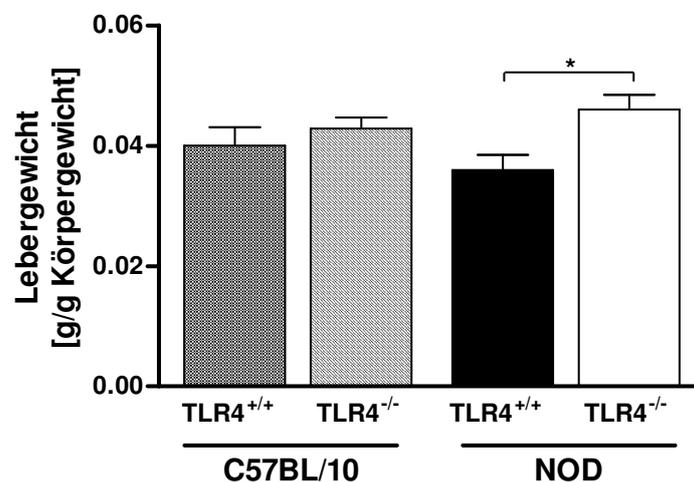


Abb. 16: Lebergewicht von TLR4-exprimierenden (TLR4^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4^{-/-}) C57BL/10 und NOD Mäusen. Das Gewicht der Leber von weiblichen, nicht diabetischen Tieren im Alter von 90 Tagen wurde unmittelbar nach Entnahme des Organs bestimmt. Die Werte zeigen das Gewicht der Leber bezogen auf das Gesamtgewicht der Tiere in g/g Körpergewicht als Mittelwerte + SEM von jeweils 7 Tieren pro Gruppe. *p<0,05 im Vergleich zu TLR4^{+/+} NOD Mäusen.

3.10 Mitochondriale Aktivität in der Leber und im *m. soleus*

Um einen möglichen Effekt des TLR4-Expressionsstatus auf die mitochondriale Aktivität in der Leber und im *m. soleus* zu prüfen, wurde der Sauerstoff-Flux über die mitochondriale Membran in isolierten Gewebeproben gemessen.

Der gemessene Sauerstoff-Flux wurde für die Mitochondrienzahl in den isolierten Gewebeproben korrigiert. Dazu wurde mittels PCR das Verhältnis von nukleärer vs.

mitochondrialer DNA-Kopienzahl bestimmt und in die Berechnungen mit einbezogen (2.1.6.2).

In den Gewebeproben der Leber von TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} C57BL/10 Mäusen war die Ratio von nukleärer vs. mitochondrialer DNA-Kopienzahl vergleichbar und lag im Bereich von 1,57 (Abb. 17). Die Ratio von nukleärer vs. mitochondrialer DNA-Kopienzahl war in Gewebeproben der Leber von TLR4^{+/+} (1,65 ± 0,06; p<0,05) und TLR4^{-/-} NOD Mäusen (1,62 ± 0,02; p<0,001) signifikant erhöht im Vergleich zu den entsprechenden Gruppen der C57BL/10 Mäuse.

In den Gewebeproben des *m. soleus* war die durchschnittliche Ratio von nukleärer vs. mitochondrialer DNA Kopienzahl in allen Gruppen vergleichbar und lag in einem Bereich von ca. 1,66 - 1,75.

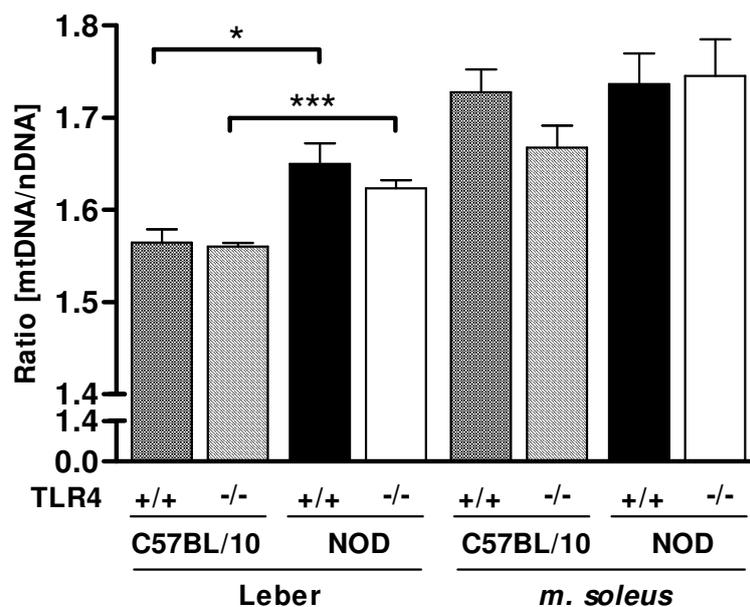


Abb. 17: Ratio der mitochondrialen vs. der nukleären DNA-Kopienzahl von TLR4-exprimierenden (TLR4^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4^{-/-}) C57BL/10 und NOD Mäusen. Mittels PCR wurde aus isolierten Proben der Leber und des *m. soleus* aus weiblichen, nicht diabetischen Mäusen im Alter von 90 Tagen die Ratio der mitochondrialen vs. der nukleären DNA-Kopienzahl bestimmt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte + SEM von jeweils 7 Tieren pro Gruppe. *p<0,05 und ***p<0,001 im Vergleich zu C57BL/10 Mäusen.

In den isolierten und permeabilisierten Gewebeproben der Leber und des *m. soleus* wurde mittels eines Substrat-Inhibitor-Protokolls der Sauerstoff-Flux durch den Komplex I und die Komplexe I und II der Atmungskette in den Mitochondrien gemessen und die maximale respiratorische Kapazität bestimmt.

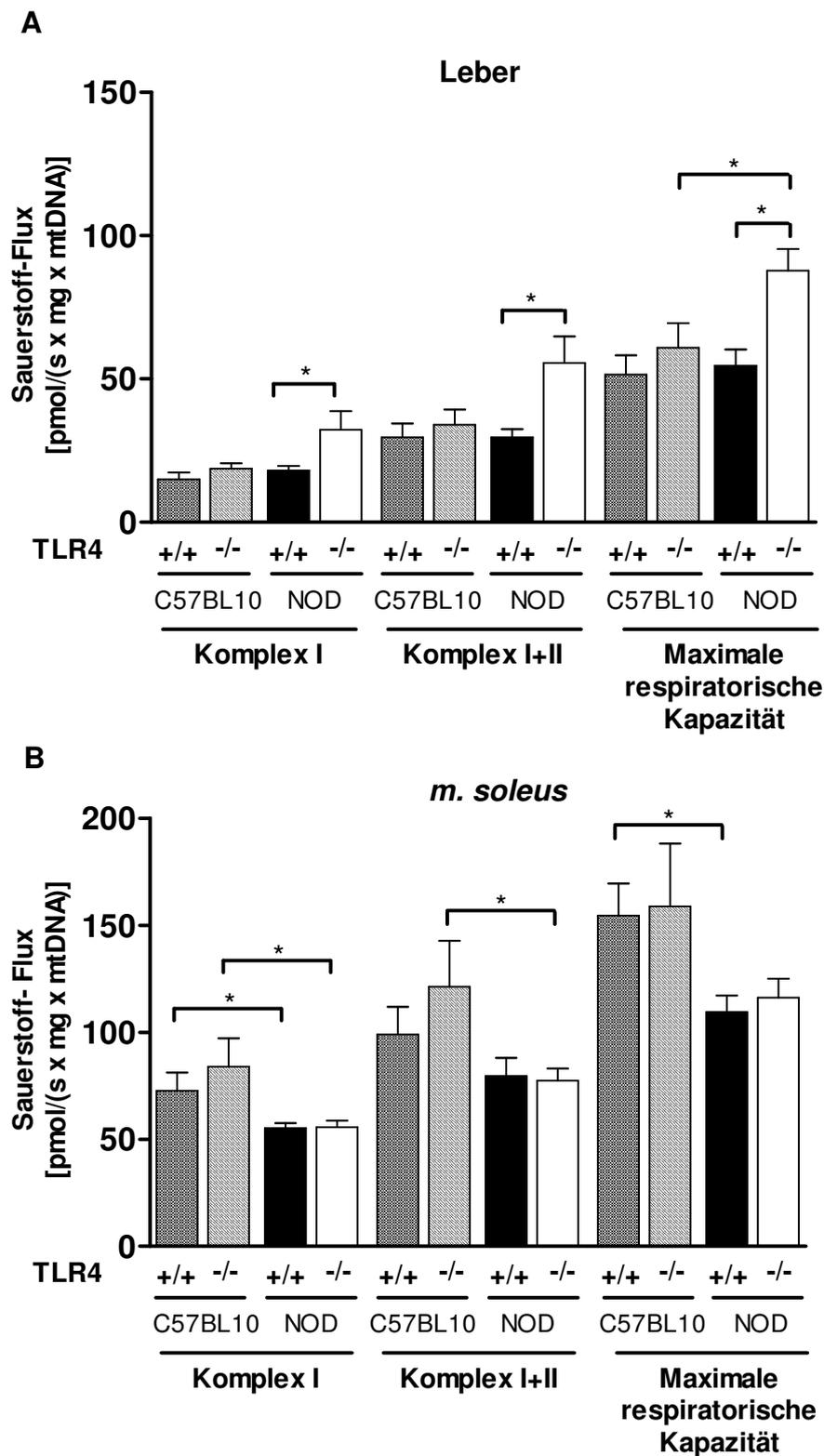


Abb. 18: Mitochondrialer Sauerstoff-Flux in der Leber und im *m. soleus* von TLR4-exprimierenden (TLR4^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4^{-/-}) C57BL/10 und NOD Mäusen. In isolierten Gewebeprobe der Leber (A) und des *m. soleus* (B) aus weiblichen TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} C57BL/10 und nicht diabetischen NOD Mäusen wurde mit Hilfe eines Substrat-Inhibitor-Protokolls der Sauerstoff-Flux (pmol/(s x mg x mtDNA)) in den Mitochondrien bestimmt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte + SEM von jeweils 7 Tieren pro Gruppe. (A) *p<0,05 im Vergleich zu TLR4^{+/+} NOD Mäusen und (B) *p<0,05 im Vergleich zu C57BL/10 Mäusen.

Der durchschnittliche Sauerstoff-Flux durch den Komplex I und die Komplexe I und II, sowie die maximale respiratorische Kapazität in Gewebeproben der Leber war bei TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} C57BL/10 und TLR4^{+/+} NOD Mäusen jeweils vergleichbar bezogen auf die Menge mitochondrialer DNA (Komplex I: 15 - 18 pmol/(s x mg x mtDNA), Komplex I und II: 29 - 34 pmol/(s x mg x mtDNA), maximale respiratorische Kapazität: 52 - 60 pmol/(s x mg x mtDNA)) (Abb. 18 A).

Im Gegensatz dazu hatten TLR4^{-/-} NOD Mäuse einen signifikant erhöhten Sauerstoff-Flux durch den Komplex I und die Komplexe I und II und eine signifikant erhöhte maximale respiratorische Kapazität in Proben der Leber im Vergleich zu TLR4^{+/+} NOD Mäusen (Komplex I: TLR4^{+/+}: 18,1 ± 4,1; TLR4^{-/-}: 31,2 ± 16,3 pmol/(s x mg x mtDNA) (p<0,05); Komplex I und II: TLR4^{+/+}: 29,6 ± 7,4; TLR4^{-/-}: 55,6 ± 16,7 pmol/(s x mg x mtDNA) (p<0,05); maximale respiratorische Kapazität: TLR4^{+/+}: 54,6 ± 14,9; TLR4^{-/-}: 87,8 ± 18,6 pmol/(s x mg x mtDNA) (p<0,01)). Die maximale respiratorische Kapazität war in Proben der Leber von TLR4^{-/-} NOD Mäusen ebenfalls signifikant erhöht im Vergleich zu Proben von TLR4^{-/-} C57BL/10 Mäusen (TLR4^{-/-} C57BL/10: 60,9 ± 17,0; TLR4^{-/-} NOD: 87,8 ± 18,6 pmol/(s x mg x mtDNA) (p<0,05)) (Abb. 18 A).

In Gewebeproben des *m. soleus* war der durchschnittliche Sauerstoff-Flux durch den Komplex I und die Komplexe I und II, sowie die maximale respiratorische Kapazität jeweils innerhalb der Gruppen der TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} C57BL/10 Mäuse vergleichbar (Komplex I: 72 - 83 pmol/(s x mg x mtDNA); Komplex I und II: 99 - 121 pmol/(s x mg x mtDNA); maximale respiratorische Kapazität: 154 - 158 pmol/(s x mg x mtDNA)) (Abb. 18 B).

Der durchschnittliche Sauerstoff-Flux durch den Komplex I und die Komplexe I und II, sowie die maximale respiratorische Kapazität der Atmungskette waren in Gewebeproben des *m. soleus* der TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} NOD Mäuse vergleichbar (Komplex I: 55 - 56 pmol/(s x mg x mtDNA); Komplex I und II: 77 - 79 pmol/(s x mg x mtDNA); maximale respiratorische Kapazität: 109 - 116 pmol/(s x mg x mtDNA)). Jedoch war der Sauerstoff-Flux durch den Komplex I von TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} NOD Mäusen signifikant reduziert im Vergleich zu den entsprechenden Gruppen der C57BL/10 Mäuse (C57BL/10: TLR4^{+/+}: 72,8 ± 16,9; TLR4^{-/-}: 84,0 ± 26,5 (p<0,05); NOD: TLR4^{+/+}: 55,1 ± 6,5; TLR4^{-/-}: 55,7 ± 7,9 pmol/(s x mg x mtDNA) (p<0,05)). Der durchschnittliche Sauerstoff-Flux durch die Komplexe I und II war in Proben von

TLR4^{-/-} NOD Mäusen ebenfalls signifikant vermindert im Vergleich zu TLR4^{-/-} C57BL/10 Mäusen (C57BL/10: 121,4 ± 42,7; NOD: 77,4 ± 15,3 pmol/(s x mg x mtDNA) (p<0,05)). In Gewebeproben von TLR4^{+/+} NOD Mäusen war die maximale respiratorische Kapazität signifikant reduziert im Vergleich zu TLR4^{+/+} C57BL/10 Mäusen (C57BL/10: 154,5 ± 30,0; NOD: 109,5 ± 20,3 pmol/(s x mg x mtDNA) (p<0,05)).

3.11 Insulinpositive Fläche der Langerhans'schen Inseln

Der Einfluss des TLR4-Expressionsstatus auf die immunvermittelte Zerstörung der insulinproduzierenden Betazellen wurde mittels immunhistochemischer Untersuchungen des Pankreas geprüft. Der Anteil funktionell aktiver insulinhaltiger Betazellen an den Langerhans'schen Inseln wurde durch die Bestimmung der insulinpositiven Fläche in Pankreasgeweben von TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} NOD Mäusen im Alter von 80 und 120 Tagen bestimmt.

Die durchschnittliche insulinpositive Fläche der Inseln in Pankreata von TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} NOD Mäusen im Alter von 80 Tagen war vergleichbar und lag im Bereich von 18.500 - 20.000 µm² (Abb. 19 A, C, E). Im Alter von 80 Tagen waren diese Befunde zu erwarten, da zu diesem Zeitpunkt die Inseln noch überwiegend intakt sind, die Betazellen noch Insulin produzieren und die Immunzellen erst langsam beginnen, die Insel zu infiltrieren.

Im Gegensatz dazu wurde erwartet, dass die Pankreata aus Tieren im Alter von 120 Tagen deutlich stärker von Immunzellen infiltriert sind und die insulinpositive Fläche reduziert ist aufgrund der Annäherung an das Diabetesmanifestationsalter. Tatsächlich war die durchschnittliche insulinpositive Inselfläche des Pankreas von TLR4^{-/-} NOD Mäusen im Alter von 120 Tagen signifikant reduziert im Vergleich zu TLR4^{+/+} NOD Mäusen (TLR4^{+/+}: 20.592 ± 3.187, TLR4^{-/-}: 14.248 ± 3.150 µm²; p<0,05) (Abb. 19 B, D, F).

Gestützt wurden diese Ergebnisse durch eine deutlich erkennbare Infiltration der Inseln durch Immunzellen (Insulinitis) wie sie exemplarisch im Präparat einer 120 Tage alten TLR4^{-/-} NOD Maus dargestellt ist. In dieser Insel war schon ca. ein Drittel der Fläche von infiltrierten Immunzellen besetzt (Abb. 19 F).

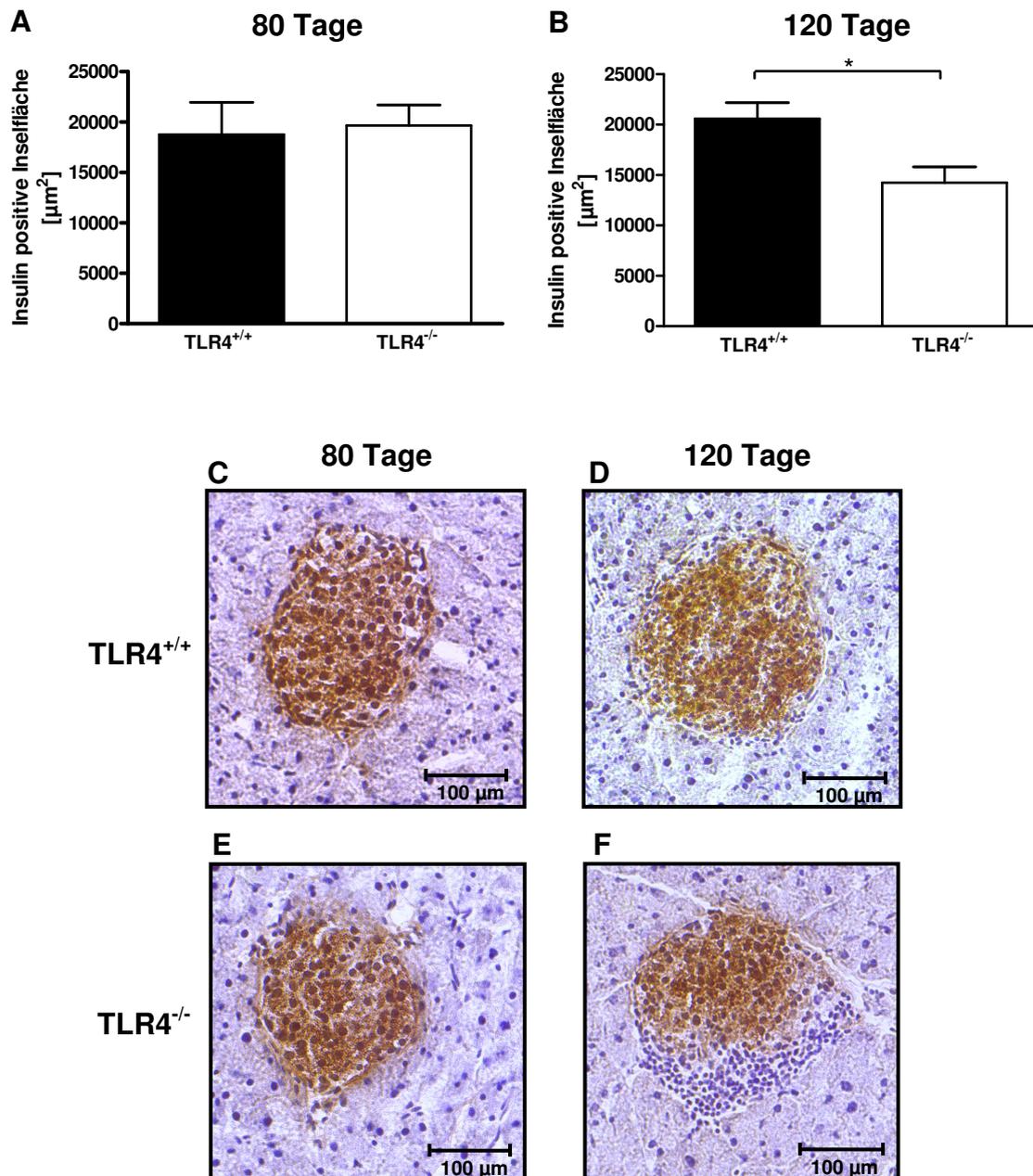


Abb. 19: Insulinpositive Inselfläche und Infiltrationsgrad der Betazellen der Langerhans'schen Inseln von TLR4-exprimierenden (TLR4^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4^{-/-}) NOD Mäusen. Mittels Immunhistochemie wurden Präparate von 80 Tage alten, weiblichen TLR4^{+/+} (A, C) und TLR4^{-/-} (A, E) NOD Mäusen und von 120 Tage alten, weiblichen und nicht diabetischen TLR4^{+/+} (B, D) und TLR4^{-/-} (B, F) NOD Mäusen angefertigt und die insulinpositive Inselfläche morphometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM der insulinpositiven Inselfläche (A, B) von 80 und 120 Tage alten Mäusen und jeweils ein exemplarisches histologisches Bild einer Insel. Es wurden für die Analysen pro Genotyp und Alter 140 - 200 Inseln von je 6 Tieren ausgewertet. * $p < 0,05$ im Vergleich zu TLR4^{+/+} NOD Mäusen.

3.12 Glukose-stimulierte Insulinfreisetzung aus isolierten pankreatischen Inseln

Ergänzend zu den vorangehenden Untersuchungen wurde der Effekt des TLR4-Expressionsstatus auf die Glukose-stimulierte Insulinfreisetzung aus isolierten pankreatischen Inseln von nicht diabetischen TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} NOD Mäusen bestimmt.

Wie in Abb. 20 dargestellt, ließ sich die Insulinfreisetzung aus pankreatischen TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} NOD Mäusen konzentrationsabhängig mit Glukose stimulieren. Die Behandlung von Inseln aus TLR4^{+/+} Mäusen mit 2,8 mmol/l Glukose für 24 h führte bereits zu einer Freisetzung von $32,2 \pm 5,7$ ng/ml Insulin (Abb. 20). Die Insulinsekretion ließ sich mit einer Glukosekonzentration von 11 mmol/l bis zu einem Maximum von $459,3 \pm 192,8$ ng/ml stimulieren. Die Insulinfreisetzung der Inseln aus TLR4^{+/+} Mäusen ließ sich jedoch mit höheren Glukosekonzentrationen nicht weiter stimulieren und es kam zu einer Reduktion der Insulinfreisetzung nach einer Behandlung mit 22 mmol/l Glukose ($348,9 \pm 84,0$ ng/ml Insulin) und 28 mmol/l Glukose ($238,2 \pm 15,6$ ng/ml Insulin).

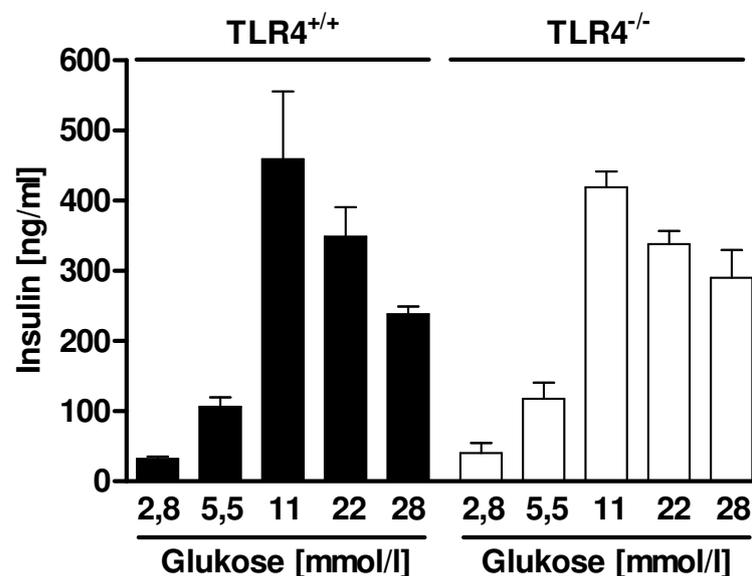


Abb. 20: Glukose-stimulierte Insulinfreisetzung aus isolierten Inseln TLR4-exprimierender (TLR4^{+/+}) und TLR4-defizienter (TLR4^{-/-}) NOD Mäuse. Nach Isolation pankreatischer Inseln aus weiblichen, nicht diabetischen TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} NOD Mäusen im Alter von 90 Tagen wurden diese *in vitro* für 24 h mit steigenden Glukosekonzentrationen (2,8 - 28 mmol/l) stimuliert und die Glukose-stimulierte Insulinfreisetzung mittels ELISA quantifiziert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte + SEM der Ergebnisse von 6 Mäusen pro Gruppe.

Die Glukose-stimulierte Insulinfreisetzung aus Inseln von TLR4^{-/-} NOD Mäusen war vergleichbar mit der Insulinsekretion aus Inseln von TLR4^{+/+} NOD Mäusen (Abb. 20). Die Behandlung von Inseln aus TLR4^{-/-} NOD Mäusen mit 2,8 mmol/l Glukose führte zu einer Sekretion von 40,1 ± 29,3 ng/ml Insulin. Eine maximale Insulinfreisetzung von 419,0 ± 50,5 ng/ml wurde mit 11 mmol/l Glukose erreicht.

3.13 Glukosetoleranz

Zur Analyse der Glukosetoleranz wurde in TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} NOD Mäuse ein intraperitonealer Glukosetoleranztest (ipGTT) durchgeführt. Nach 6 stündigem Fasten wurde den Tieren ip 2 g pro kg Körpergewicht Glukose appliziert und die Blutglukosekonzentration über 120 min dokumentiert.

Die Nüchtern-Blutglukosekonzentration lag in TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} NOD Mäusen in einem vergleichbaren Bereich von 98 - 105 mg/dl (Abb. 21 A). Während TLR4^{+/+} NOD Mäuse eine maximale Blutglukosekonzentration von 229,2 ± 47,7 mg/dl schon 5 min nach der Glukoseinjektion erreichten, stellte sich bei TLR4^{-/-} NOD Mäuse eine maximale Blutglukosekonzentration von 349,2 ± 12,4 mg/dl erst 30 min nach der Glukoseinjektion ein. In TLR4^{+/+} NOD Mäusen nahm die Blutglukosekonzentration nach Erreichen des Maximums schnell wieder ab und lag 60 min nach der Glukoseinjektion bei 139,4 ± 13,0 mg/dl. Nach 120 min hatten TLR4^{+/+} NOD Mäuse eine durchschnittliche Blutglukosekonzentration von 127,0 ± 8,4 mg/dl erreicht, die nur noch leicht erhöht war im Vergleich zur Nüchtern-Blutglukosekonzentration vor der Glukoseinjektion (TLR4^{+/+}: 98,4 ± 8,9 mg/dl). Im Gegensatz dazu war die Blutglukosekonzentration von TLR4^{-/-} NOD Mäusen 60 min nach Beginn des ipGTT immer noch signifikant erhöht im Vergleich zu TLR4^{+/+} NOD Mäusen (TLR4^{+/+}: 139,4 ± 13,0; TLR4^{-/-}: 258,6 ± 46,9 mg/dl; p<0,001). Die Blutglukosekonzentrationen von TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} Mäusen waren 120 Minuten nach der Glukoseinjektion wieder vergleichbar und lagen bei ca. 130 mg/dl.

Die Berechnungen der Fläche unter der Kurve (incremental Area under the curve, iAUC) zeigten, dass TLR4^{-/-} NOD Mäuse während des ipGTT signifikant erhöhte Blutglukosekonzentrationen aufwiesen im Vergleich zu TLR4^{+/+} NOD Mäusen (iAUC: TLR4^{+/+}: 4.076 ± 1.178; TLR4^{-/-}: 11.073 ± 1.552 mg/(dl x 2 h); p<0,001) (Abb. 21 B).

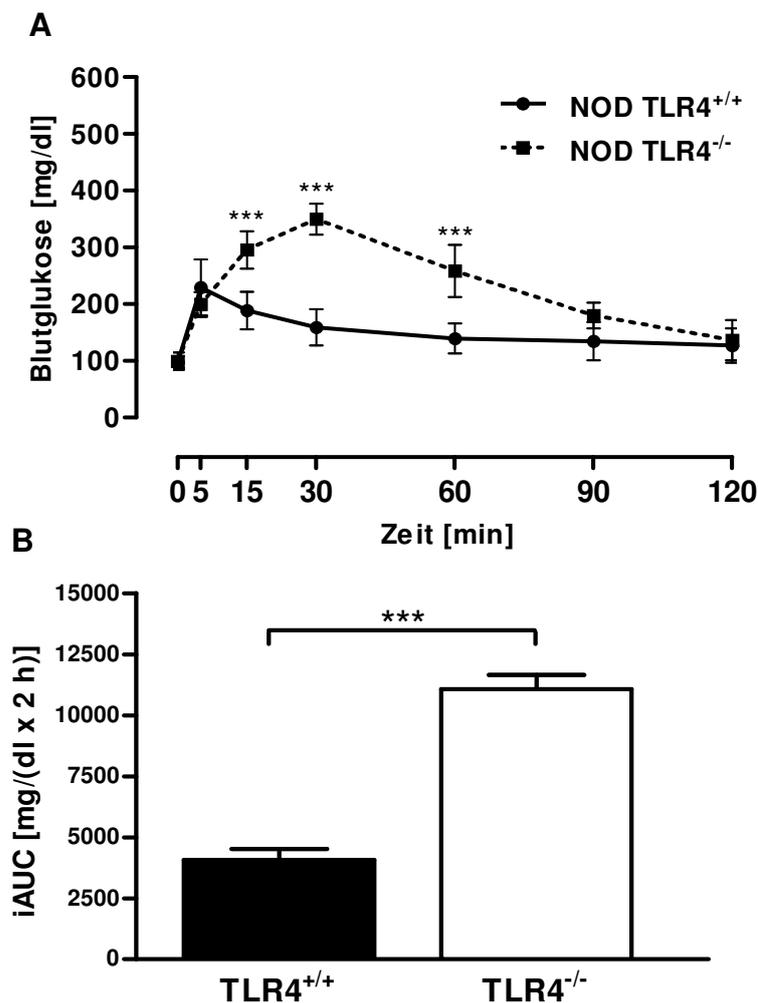


Abb. 21: Verlauf der Blutglukosekonzentration und die incremental area under the curve (iAUC) während eines intraperitonealen Glukosetoleranztestes bei TLR4-exprimierenden (TLR4^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4^{-/-}) NOD Mäusen. Nach 6 stündigem Fasten erhielten weibliche, nicht diabetische Tiere im Alter von 90 Tagen eine intraperitoneale Glukoseinjektion von 2 g/kg Körpergewicht. Die Blutglukosekonzentration wurde im Verlauf (A) in TLR4^{+/+} NOD Mäusen (durchgezogene Linie) und in TLR4^{-/-} NOD Mäusen (unterbrochene Linie) über 120 min dokumentiert und die incremental Area under the curve (mg/(dl x 2 h)) (B) ermittelt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte + SEM von 8 Tieren pro Gruppe. ***p < 0,001 im Vergleich zu TLR4^{+/+} NOD Mäusen.

3.13.1 Insulinkonzentrationen nach ipGTT

Am Ende des unter 3.13 beschriebenen ipGTT wurde den Tieren Blut entnommen und darin mittels eines Sandwich ELISA die Insulinkonzentrationen bestimmt.

Nach dem ipGTT hatten TLR4^{+/+} NOD Mäuse $1,4 \pm 0,5$ ng/ml Insulin im Blut (Abb. 22), während TLR4^{-/-} NOD Mäuse eine Tendenz zu einer erhöhten Insulinkonzentration im Blut von $2,9 \pm 2,3$ ng/ml nach Beendigung des ipGTT aufwiesen.

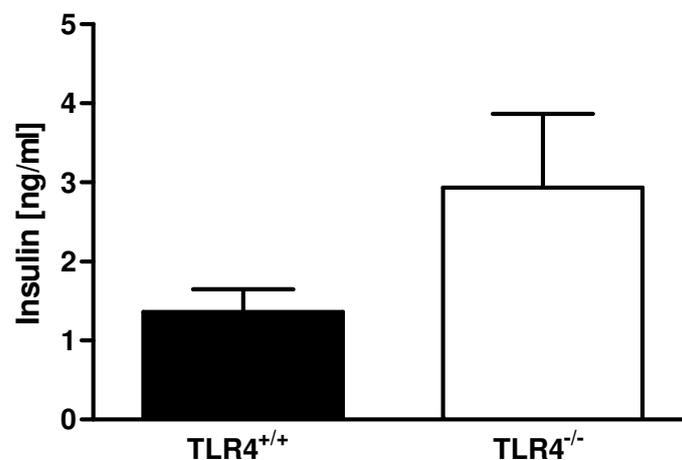


Abb. 22: Insulinkonzentrationen im Blut von TLR4-exprimierenden (TLR4^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4^{-/-}) NOD Mäusen 120 min nach Glukoseinjektion. 120 min nach der Glukoseinjektion wurde im Rahmen eines ipGTT weiblichen, nicht diabetischen, 90 Tage alten Mäusen Blut aus der Schwanzvene entnommen zur Bestimmung der Insulinkonzentration mittels eines ELISA. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte + SEM von 8 Tieren pro Gruppe.

3.14 Insulintoleranz

Um einen möglichen Effekt des TLR4-Expressionsstatus auf die Insulintoleranz von TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} C57BL/10 und NOD Mäusen zu prüfen, wurde ein intraperitonealer Insulintoleranztest (ipITT) durchgeführt. Den Tieren wurden nach 6 stündigem Fasten 0,75 Einheiten eines schnellwirkenden Insulins pro kg Körpergewicht ip appliziert und die prozentuale Abnahme der Blutglukosekonzentration über 120 min dokumentiert, wobei zum besseren Vergleich der Verläufe die Nüchtern-Blutglukosekonzentrationen auf 100 % gesetzt wurden.

Die Veränderungen der durchschnittlichen prozentualen Blutglukosekonzentration waren bei TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} C57BL/10 Mäusen während eines ipITT vergleichbar

(Abb. 23 A). Schon 15 min nach der Insulininjektion war die Blutglukosekonzentration der Mäuse um ca. 30 % gesunken. Nach 45 min erreichte die Blutglukosekonzentration ein Minimum, das bei ca. 57 % der Nüchtern-Blutglukosekonzentration lag. Mit Einsetzen der hepatischen Glukoseproduktion stieg die durchschnittliche Blutglukosekonzentration nach ca. 60 min wieder langsam und stetig an, bis sie nach 120 min bei ca. 73 % der Nüchtern-Blutglukosekonzentration lag.

In TLR4^{+/+} NOD Mäusen war die prozentuale Blutglukosekonzentration 30 min nach der Insulininjektion auf 67 % gesunken und erreichte ein Minimum von ca. 50 % nach 60 - 75 min (Abb. 23 B). Anschließend stieg die prozentuale Blutglukosekonzentration wieder kontinuierlich an, bis sie nach 120 min wieder bei ca. 70 % des Ausgangswertes lag. In TLR4^{-/-} NOD Mäusen sank die prozentuale Blutglukosekonzentration nach der Insulininjektion jedoch deutlich langsamer als in TLR4^{+/+} NOD Mäusen. Schon nach 30 min zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} NOD Mäusen (TLR4^{+/+}: 67,3 ± 5,6 %; TLR4^{-/-}: 77,7 ± 3,7 %; p<0,01). Nach 60 min erreichte die prozentuale Blutglukosekonzentration von TLR4^{-/-} NOD Mäusen ein Minimum, das sich signifikant von der Blutglukosekonzentration von TLR4^{+/+} NOD Mäusen unterschied (TLR4^{+/+}: 50,3 ± 5,6 %; TLR4^{-/-}: 71,8 ± 6,4 %; p<0,001). Anschließend stieg die prozentuale Blutglukosekonzentration in TLR4^{-/-} NOD Mäusen wieder kontinuierlich bis zu 83,3 ± 2,5 % des Ausgangswertes an, unterschied sich jedoch weiterhin zu jedem Messzeitpunkt signifikant von der Blutglukosekonzentration von TLR4^{+/+} Mäusen (p<0,001).

Um einen direkten Vergleich der Blutglukosekonzentrationen zu ermöglichen wurde die mittlere prozentuale Blutglukosekonzentration der ersten 60 min des ipITT ermittelt. Diese unterschied sich nicht zwischen C57BL/10 TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} Mäusen, sowie zwischen TLR4^{+/+} NOD Mäusen. TLR4^{-/-} NOD Mäuse wiesen jedoch eine signifikant geringere Veränderung ihrer Blutglukosekonzentration auf als TLR4^{-/-} C57BL/10 Mäuse (iAUC: C57BL/10 TLR4^{-/-}: 3.673 ± 631; NOD TLR4^{-/-}: 2.550 ± 502 (%/1h); p<0,05) und als TLR4^{+/+} NOD Mäuse (iAUC: NOD TLR4^{+/+} 3.973 ± 505 (%/1h); p<0,01) (Abb. 23 C).

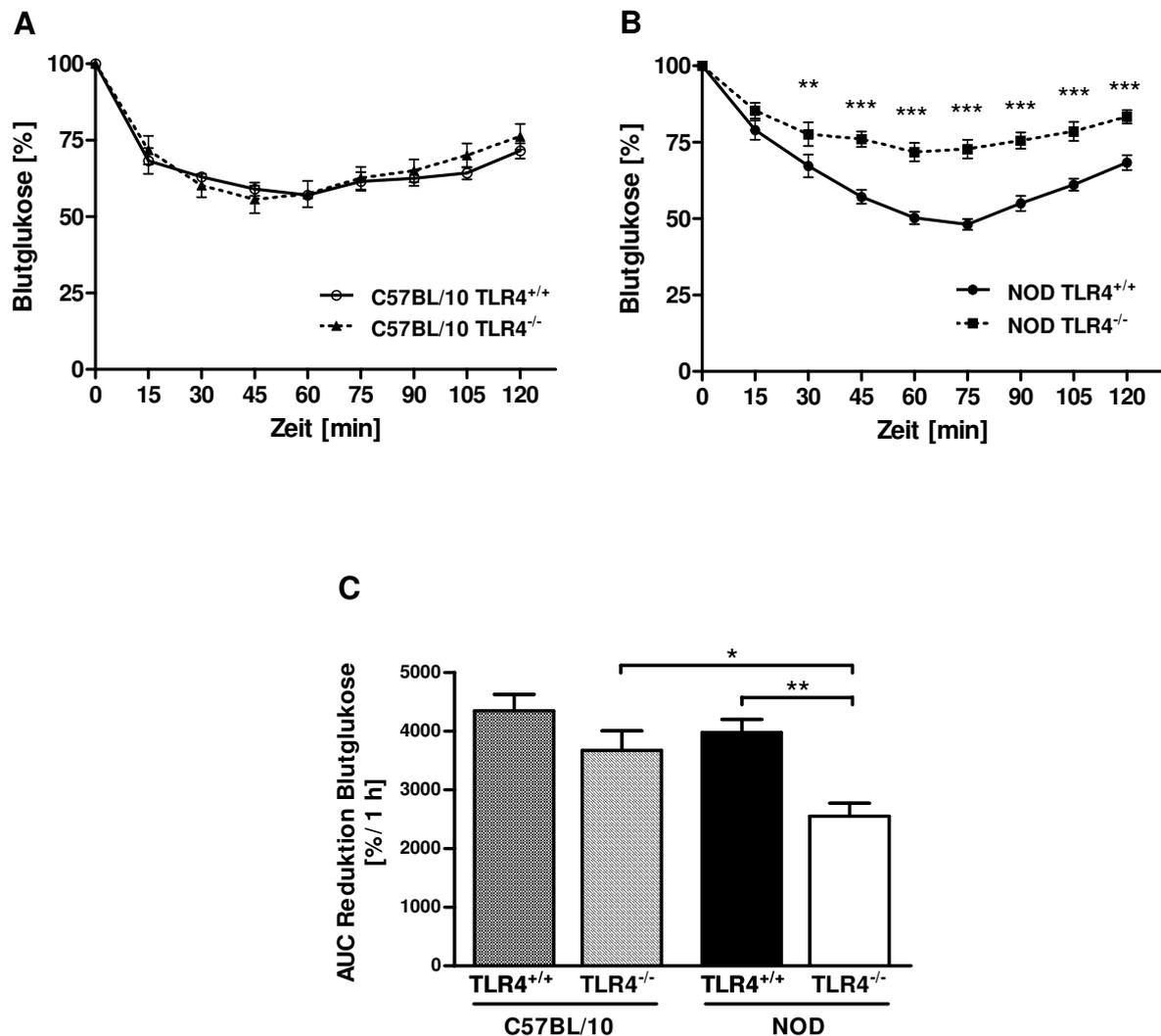


Abb. 23: Prozentuale Veränderung der Blutglukosespiegel nach intraperitonealer Insulininjektion während eines Insulintoleranztests (ipITT) und Area under the curve von TLR4-exprimierenden (TLR4^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4^{-/-}) C57BL/10 und NOD Mäusen. Weibliche, nicht diabetische Tiere im Alter von 90 Tagen erhielten nach 6 stündigem Fasten eine intraperitoneale Insulininjektion von 0,75 IE/kg Körpergewicht und die Veränderung der Blutglukosekonzentration wurde über 120 min sowohl in Blutproben aus TLR4^{+/+} C57BL/10 Mäusen (durchgezogene Linie) und TLR4^{-/-} C57BL/10 Mäusen (unterbrochene Linie) als auch aus TLR4^{+/+} NOD Mäusen (durchgezogene Linie) und TLR4^{-/-} NOD Mäusen (unterbrochene Linie) (B) bestimmt. Die Daten sind dargestellt als prozentuale Abnahme der Blutglukosekonzentration im Vergleich zum Beginn der Messung, die auf 100 % gesetzt wurde (Mittelwert \pm SEM) (A, B). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ im Vergleich zu TLR4^{+/+} NOD Mäusen.

Die Reduktion der Blutglukose über 60 min ist dargestellt als AUC + SEM der ersten 60 min des ipITT von TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} C57BL/10 und NOD Mäusen (C). * $p < 0,05$ im Vergleich zu TLR4^{-/-} C57BL/10 Mäusen und ** $p < 0,01$ im Vergleich zu TLR4^{+/+} NOD Mäusen.

3.15 HOMA-IR

Die Ermittlung des HOMA-IR dient der näherungsweise Bestimmung der Insulinsensitivität. Dafür wurde nach 6 stündigem Fasten die Nüchtern-Glukosekonzentration und die Nüchtern-Insulinkonzentration im Blut von TLR4^{+/+} und TLR4^{-/-} NOD Mäusen bestimmt.

In TLR4^{+/+} NOD Mäusen lag der HOMA-IR Wert bei $4,4 \pm 1,2$ (Abb. 24). Der HOMA-IR von TLR4^{-/-} NOD Mäusen lag bei $10,6 \pm 2,0$ und ist signifikant erhöht im Vergleich zum HOMA-IR von TLR4^{+/+} NOD Mäusen ($p < 0,001$).

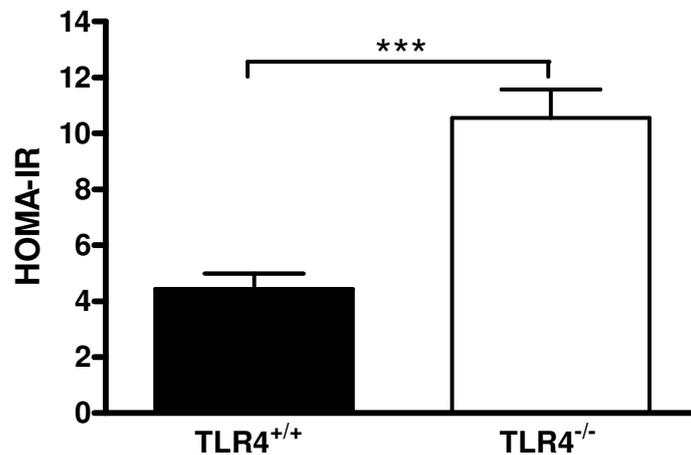


Abb. 24: HOMA-Insulin-Resistenz (IR) von TLR4-exprimierenden (TLR4^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4^{-/-}) NOD Mäusen. Nach 6 stündigem Fasten wurde weiblichen, nicht diabetischen Tieren im Alter von 90 Tagen Blut abgenommen und die Nüchtern-Blutzuckerkonzentration sowie die Nüchtern-Insulinkonzentration bestimmt und daraus der HOMA-IR berechnet. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte + SEM von 5 Tieren pro Gruppe. *** $p < 0,001$ im Vergleich zu TLR4^{+/+} NOD Mäusen.

4 Diskussion

Der T1D ist charakterisiert durch die progressive immunvermittelte Zerstörung autologer insulinproduzierender Beta-Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas. Die Folge ist ein absoluter Insulinmangel (102).

Das Krankheitsgeschehen ist geprägt von inflammatorischen Prozessen, die durch eine Infiltration der Inseln mit mononukleären Immunzellen, insbesondere Makrophagen und T-Lymphozyten, dominiert wird (17). Neuere Studien weisen darauf hin, dass die Progression der Pathogenese des T1D durch metabolische Störungen wie Adipositas und Insulinresistenz begünstigt wird. Aktuelle Beobachtungen zeigen, dass sowohl inflammatorische, als auch metabolische Prozesse vom TLR4 reguliert werden und legen deshalb die Vermutung nahe, dass der TLR4 wesentlich an der Kontrolle der Pathogenese der Erkrankung beteiligt ist (79).

Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Hypothese geprüft, dass TLR4 ein zentraler Regulator von Energiestoffwechsel und Inflammation bei der Pathogenese des Insulinmangeldiabetes im Tiermodell der NOD Maus ist.

4.1 Mausmodell der NOD Maus

Um einen möglichen Effekt des TLR4-Expressionsstatus auf inflammatorische und metabolische Prozesse bei der Pathogenese des Insulinmangeldiabetes zu prüfen, wurde für die Untersuchungen das Tiermodell der spontan diabetischen NOD Maus genutzt. Es wurden NOD Mäuse verwendet, die den TLR4 homozygot exprimieren oder homozygot einen selektiven TLR4-Defekt tragen, der aus dem Stamm der C57BL/10ScCr Maus über mehr als 15 Generationen in die spontan diabetische NOD Maus eingekreuzt wurde. Die TLR4-defiziente C57BL/10ScCr Maus weist im Chromosom 4 eine Deletion von 74723 Basenpaaren auf, die spontan aufgetreten ist; dieser Bereich kodiert ausschließlich für den TLR4 (91). Für die vergleichenden Untersuchungen an stoffwechselgesunden Tieren, die kein Risiko zur Entwicklung eines Diabetes tragen, dienten TLR4-exprimierende C57BL/10ScSn und TLR4-defiziente C57BL/10ScCr Mäuse als Kontrollstämme.

Die Diabetesinzidenz der NOD Maus variiert und ist abhängig von der jeweiligen Kolonie. Bis zu einem Lebensalter von 200 Tagen entwickeln ca. 60 - 90 % der weiblichen NOD Mäuse und 10 - 30 % der männlichen NOD Mäuse einen Insulinmangeldiabetes (43, 103, 104). Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden ausschließlich weibliche NOD Mäuse verwendet. Zur Prüfung des TLR4-Expressionsstatus und zur Bestätigung der Abwesenheit des TLR4 in Mäusen aus der Rückkreuzung von NOD und C57BL/10ScCr wurden Analysen auf DNA- und auf funktioneller Ebene durchgeführt.

Die Analysen des TLR4-Expressionsstatus in TLR4-exprimierenden und TLR4-defizienten C57BL/10 und NOD Mäusen auf DNA Ebene zeigten, dass homozygot TLR4-exprimierende Mäuse die für den TLR4-kodierende Sequenz in ihrem Genom tragen. Im Gegensatz dazu konnte in TLR4-defizienten Mäusen keine DNA Sequenz nachgewiesen werden, die aus dem für den TLR4-kodierenden Bereich stammt.

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass der TLR4 als LPS-Rezeptor fungiert (91) und in hohem Maße von Makrophagen und von den mit Makrophagen eng verwandten (Prä-)Adipozyten exprimiert wird (58, 82). Deshalb wurden funktionelle Analysen zum Nachweis der TLR4-abhängigen Stimulierbarkeit von primären Milzmakrophagen und Präadipozyten aus TLR4-exprimierenden und TLR4-defizienten NOD Mäusen mit dem TLR4-Liganden LPS durchgeführt. Nach dem Ausschluss einer Makrophagenkontamination der Präadipozytenpopulation mittels FACS-Analysen wurde die Freisetzung von IL-6 und TNF-alpha, als zwei repräsentative (pro-)inflammatorische Mediatoren, aus diesen Zellpopulationen bestimmt. Die LPS-induzierte Freisetzung dieser Mediatoren ist strikt von der Anwesenheit eines funktionellen TLR4 abhängig (58, 59).

Es konnte gezeigt werden, dass TLR4-exprimierende primäre Präadipozyten und Milzmakrophagen nach einer Stimulation mit hochgereinigtem bakteriellen LPS konzentrationsabhängig IL-6 und TNF-alpha freisetzen. Im Gegensatz dazu zeigten Zellen aus TLR4-defizienten NOD Mäusen keine Reaktion auf eine Behandlung mit LPS und setzten sowohl im unstimulierten Zustand als auch nach LPS-Exposition kaum detektierbare IL-6 Konzentrationen frei. Diese Ergebnisse bestätigen die sichere und stabile Einführung des TLR4-Defektes in die NOD Maus und somit die Eignung des Tiermodells für die Untersuchungen zur Rolle des TLR4 bei der Pathogenese des Insulinmangeldiabetes in der NOD Maus.

4.2 Einfluss des TLR4-Expressionsstatus auf die Diabetesentwicklung

Die Dokumentation des Alters der Diabetesmanifestation in TLR4-exprimierenden und TLR4-defizienten NOD Mäusen zeigte, dass TLR4-defiziente NOD Mäuse deutlich früher einen Diabetes entwickeln als TLR4-exprimierende NOD Mäuse. Desweiteren zeigen die Analysen der Blutglukosekonzentrationen zum Zeitpunkt der Diabetesmanifestation, dass diese in TLR4-defizienten NOD Mäusen um ca. 30 % erhöht sind im Vergleich zu TLR4-exprimierenden NOD Mäusen.

Frühere Studien an Tiermodellen der BB Ratte und der NOD Maus haben gezeigt, dass die Inzidenz des Insulinmangeldiabetes in direktem Zusammenhang steht mit den hygienischen Bedingungen unter denen die Tiere gehalten werden (105). So liegt die Diabetesinzidenz in weiblichen NOD Mäusen, die unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gehalten werden, nahe bei 100 %. Im Gegensatz dazu sind NOD Mäuse, die mit verschiedenen Bakterien, Viren und Parasiten infiziert wurden, weitgehend vor der Entwicklung eines Insulinmangeldiabetes geschützt (106).

Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass eine frühzeitige Stimulation des Immunsystems über den TLR4 durch mikrobielle Pathogene notwendig ist für die Ausbildung eines funktionierenden Immunsystems und einer immunologischen Toleranz zur Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden antigenen Strukturen. Die Stimulation des Immunsystems über den TLR4 ist in Mäusen mit fehlender TLR4-Expression nicht möglich. In weiterführenden Studien konnte zudem gezeigt werden, dass regulatorische T-Zellen nach einer geeigneten Stimulation Immunreaktionen limitieren und die Entwicklung von Autoreaktivität verhindern können. Die regulatorischen T-Zellen werden über den TLR4, den sie auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, aktiviert (107) und neuere Arbeiten zeigen, dass eine TLR4-Defizienz zu einer Verminderung der suppressiven Fähigkeiten dieser Zellpopulation führt. Dies könnte zu einer verminderten Funktionalität des Immunsystems und damit zu einer reduzierten Suppression autoimmuner Reaktionen, sowie zu einer beschleunigten Entwicklung des Insulinmangeldiabetes in diabetes-prädisponierten NOD Mäusen führen.

4.3 Einfluss des TLR4-Expressionsstatus auf die Körpergewichtsentwicklung und den inflammatorischen Status

Da frühere Befunde in Mausmodellen einen deutlichen Einfluss des TLR4-Expressionsstatus auf die Körpergewichtsentwicklung zeigten (108) und vermutet wird, dass die Entwicklung des Körpergewichts die Progression des T1D beeinflusst, wurde das Körpergewicht von 80 Tage alten TLR4-exprimierenden und TLR4-defizienten C57BL/10 und NOD Mäusen dokumentiert und der Anteil der Fettgewebsmasse mittels NMR-Methode bestimmt.

Dabei zeigten sich keine Unterschiede in der Körpergewichtsentwicklung und in der Körperzusammensetzung von TLR4-exprimierenden und TLR4-defizienten C57BL/10 Mäusen. TLR4-defiziente NOD Mäuse wiesen jedoch ein höheres Körpergewicht und eine höhere Körperfettmasse im Vergleich zu TLR4-exprimierenden NOD Mäusen auf. Diese Beobachtungen werden bestätigt durch Befunde aus dem Modell der C57BL/6J Maus, in der eine TLR4-Defizienz unter Verabreichung einer Hochfettdiät eine beschleunigte Zunahme des Körpergewichts bewirkte (108). In anderen Studien hingegen waren TLR4-defiziente Tiere nach Gabe einer Hochfettdiät partiell vor der Entwicklung einer Adipositas geschützt (87, 89). Diese gegenteiligen Befunde stammen jedoch aus unterschiedlichen Mausmodellen, die alle immunologisch und metabolisch unauffällig sind und keine genetische Prädisposition zur Entwicklung eines (auto-)immunvermittelten Diabetes aufweisen. Trotz dieser widersprüchlichen Beobachtungen in anderen Mausstämmen lassen die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde vermuten, dass der TLR4-Expressionsstatus auch im Modell der NOD Maus die Entwicklung des Körpergewichts kontrolliert. Da das erhöhte Körpergewicht und die erhöhte Körperfettmasse in TLR4-defizienten Tieren nach Verabreichung einer Standarddiät beobachtet wurde, könnte vermutet werden, dass die beobachteten Effekte unter Verabreichung einer Hochfettdiät noch zusätzlich verstärkt werden.

Die vermehrte Gewichtszunahme in TLR4-defizienten NOD Mäusen ist assoziiert mit einer erhöhten Körperfettmasse. Die Entwicklung einer Adipositas geht häufig mit einer subklinischen systemischen Inflammation einher, ausgelöst durch Makrophagen und Lymphozyten, die das Fettgewebe infiltrieren und eine inflammatorische Reaktion induzieren, die wiederum Störungen des

Glukosestoffwechsels bewirken (109) und zu einer Insulinresistenz führen kann (28, 29).

Um eine mögliche inflammatorische Reaktion und deren Abhängigkeit vom TLR4-Expressionsstatus zu erfassen, wurden im Serum von gefasteten TLR4-exprimierenden und TLR4-defizienten NOD Mäusen die Konzentrationen des (pro-)inflammatorischen Zytokins IL-6 gemessen. Es zeigte sich, dass TLR4-defiziente NOD Mäuse doppelt so hohe IL-6-Konzentrationen im Serum aufweisen wie TLR4-exprimierende NOD Mäuse. Dieser Befund lässt vermuten, dass TLR4-defiziente Tiere einer erhöhten, systemischen Inflammation ausgesetzt sind und dass der TLR4 bei der Entwicklung einer Adipositas und einer systemischen Inflammation eine wichtige Rolle spielt. Widersprüchliche Beobachtungen zur Abschwächung des inflammatorischen Geschehens in Abwesenheit des TLR4 im Modell der C3H/HeJ Maus (110) weisen erneut darauf hin, dass der Befund einer erhöhten, systemischen Inflammation in TLR4-defizienten NOD Mäusen auf den genetischen Hintergrund der spontan diabetischen NOD Maus zurückzuführen ist.

Der Nachweis erhöhter IL-6-Spiegel als Zeichen einer vermehrten systemischen Inflammation in TLR4-defizienten Mäusen wird ergänzt durch die Ergebnisse histologischer Analysen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas. Die Bestimmung des Anteils funktionell aktiver, insulinhaltiger Betazellen des Pankreas zeigt, dass in TLR4-exprimierenden und TLR4-defizienten NOD Mäusen im Alter von 80 Tagen die Inseln noch fast vollständig intakt sind und insulinproduzierende Betazellen enthalten. Die Inseln von TLR4-defizienten NOD Mäusen im Alter von 120 Tagen hingegen sind gekennzeichnet durch eine verstärkte Infiltration von Immunzellen und durch eine Reduktion insulinhaltiger Betazellen des Pankreas um ca. 30 % im Vergleich zu den Inseln TLR4-exprimierender NOD Mäuse, die einen Rückgang der Betazellmasse und einen Immunezellinfiltrationsgrad aufweisen, der dem natürlichen Verlauf des Insulinmangeldiabetes in diesen Tieren entspricht.

Die Befunde des erhöhten Körpergewichts, einer erhöhten systemischen Inflammation und einer beschleunigten Insulinitis in TLR4-defizienten NOD Mäusen lassen vermuten, dass der TLR4 in der NOD Maus sowohl immunologische als auch metabolische Prozesse kontrolliert, die an der Pathogenese des Insulinmangeldiabetes beteiligt sind.

4.4 Metabolismus

4.4.1 Metabolische Parameter

Aufgrund der zuvor beschriebenen Befunde, dass eine vermehrte Gewichtszunahme und die häufig damit einhergehende Entwicklung einer Adipositas mit Störungen des Energiehaushalts verbunden sind, wurde eine umfassende metabolische Charakterisierung TLR4-exprimierender und TLR4-defizienter C57BL/10 Mäuse, sowie TLR4-exprimierender und TLR4-defizienter, nicht diabetischer und diabetischer NOD Mäuse über 2 Hell- und 3 Dunkel-Phasen durchgeführt, die insbesondere darauf abzielte, die Futter- und Wasseraufnahme, die physische Aktivität und respiratorische Parameter zu erfassen.

Die Futter- und Wasseraufnahme von TLR4-defizienten und TLR4-exprimierenden C57BL/10 und NOD Mäusen ist vergleichbar in der Hell-Phase und in der Dunkel-Phase. Die signifikante Steigerung der Futter- und Wasseraufnahme in der Dunkel-Phase ist bedingt durch den circadianen Rhythmus dieser nachtaktiven Tiere (111).

Die Futter- und Wasseraufnahme von diabetischen NOD Mäusen hingegen ist signifikant erhöht in der Hell-Phase und in der Dunkel-Phase im Vergleich zu nicht diabetischen NOD Mäusen. Diese Beobachtungen entsprechen den klassischen Symptomen der Polydipsie und Polyphagie wie sie bei der Manifestation des T1D beschrieben werden (1.1.1) (2). In diabetischen Tieren ist jedoch sowohl die Futter- als auch die Wasseraufnahme unabhängig vom TLR4-Expressionsstatus.

Die Analysen der physischen Aktivität der Tiere zeigen, dass TLR4-exprimierende und TLR4-defiziente C57BL/10 und nicht diabetische NOD Mäuse in der Hell-Phase vergleichbare Aktivitätsmuster haben. In der Dunkel-Phase sind TLR4-defiziente NOD Mäuse jedoch um ca. 30 % weniger aktiv als TLR4-exprimierende NOD Mäuse. Diese verminderte Aktivität ist auch in diabetischen TLR4-defizienten NOD Mäusen in der Dunkel-Phase zu finden. Es kann vermutet werden, dass dies auf die Entgleisung des Glukosemetabolismus in diabetischen TLR4-defizienten Tieren und die damit verbundene schlechte körperliche Verfassung der Tiere zurückzuführen ist. Frühere Studien konnten bereits zeigen, dass die Manifestation des Insulinmangeldiabetes mit einer Hyperglykämie, einer raschen Gewichtsreduktion (112) und der Umstellung auf einen katabolen Stoffwechsel einhergeht (2).

Der Energieverbrauch von TLR4-exprimierenden und TLR4-defizienten C57BL/10 und NOD Mäusen ist vergleichbar und wie erwartet in der Dunkel-Phase um etwa 20 % erhöht im Vergleich zur Hell-Phase. Beim Vergleich des Energieverbrauchs von TLR4-exprimierenden, nicht diabetischen und diabetischen NOD Mäusen zeigen sich ebenfalls keine Unterschiede. Im Gegensatz dazu ist aber der Energieverbrauch in diabetischen TLR4-defizienten NOD Mäusen in der Hell-Phase und in der Dunkel-Phase um ca. 15 % erhöht im Vergleich zu nicht diabetischen NOD Mäusen.

Der RQ ist ein Indikator für die Art des Substrats, das zur Energieproduktion benutzt wird. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen haben gezeigt, dass TLR4-defiziente NOD Mäuse einen um ca. 0,1 verminderten RQ haben im Vergleich zu TLR4-exprimierenden NOD und C57BL/10 Mäusen in der Hell- und in der Dunkel-Phase. Die Bestimmung des Energieverbrauchs und des RQ lassen darauf schließen, dass TLR4-defiziente NOD Mäuse eine verringerte Glukose-Utilisation aufweisen und zur Energiegewinnung vermehrt Proteine und Fette nutzen, deren Oxidation deutlich mehr Energie benötigt als die Nutzung von Kohlenhydraten. Frühere Studien an Mäusen haben gezeigt, dass nach der Verabreichung einer fettreichen Diät der Energieverbrauch in diesen Tieren erhöht und der RQ deutlich vermindert ist (113). Ähnliche Befunde stammen aus Studien, in denen Patienten mit einem T1D eine veränderte Substrat-Utilisation aufwiesen, die vermutlich durch eine erhöhte metabolische Inflexibilität zustande kommt. Die Folge dieser Inflexibilität ist u.a. ein verminderter RQ aufgrund einer reduzierten Oxidation von Kohlenhydraten (114, 115). Diese Befunde werden durch die Analysen an diabetischen NOD Mäusen gestützt, deren RQ unabhängig vom TLR4-Expressionsstatus um ca. 0,06 - 0,10 niedriger ist im Vergleich zu nicht diabetischen NOD Mäusen. Ein erniedrigter RQ wurde in Patienten mit T2D als Folge einer gestörten Glukoseoxidation beobachtet. Diese Störung wurde als Folge einer Insulinresistenz diskutiert (116). Klinische Studien der vergangenen Jahre weisen vermehrt darauf hin, dass Insulinresistenz auch bei der Entwicklung des T1D eine wichtige Rolle spielen könnte (114, 117).

Aufgrund dieser Beobachtungen kann vermutet werden, dass die in TLR4-defizienten NOD Mäusen gefundene erniedrigte Glukose-Utilisation durch eine Insulinresistenz verursacht wird, die in diesen Tieren auch zu der beobachteten beschleunigten Diabetesentwicklung beitragen könnte.

4.4.2 Fettsäuren, Triglyzeride, Fetuin A, mitochondriale Biogenese und Sauerstoff-Flux

Um der Vermutung einer verminderten metabolischen Flexibilität in TLR4-defizienten NOD Mäusen weiter nachzugehen, wurden die Konzentrationen von FFA und Triglyzeriden im Plasma der Tiere bestimmt. In TLR4-defizienten NOD Mäusen wurden um 20 - 30 % höhere Konzentrationen von FFA und Triglyzeriden gefunden als in TLR4-exprimierenden NOD Mäusen. Diese Beobachtungen sind übereinstimmend mit Befunden aus Studien an Patienten mit T1D und Tiermodellen der humanen Erkrankung, in denen erhöhte Konzentrationen von FFA und Triglyzeriden im Plasma beschrieben wurden, die offenbar aufgrund einer verstärkten Lipolyse, in Folge einer reduzierten Insulin-Sensitivität auftreten (114, 118, 119).

Neuere Studien haben gezeigt, dass FFA über die Bindung des Adaptormoleküls Fetuin A an den TLR4 binden und inflammatorische Antworten induzieren und eine Insulinresistenz verstärken können (80). Die Messungen der Fetuin A Konzentrationen im Serum gefasteter TLR4-exprimierender und TLR4-defizienter C57BL/10 und NOD Mäuse zeigen, dass die Fetuin A Konzentrationen im Serum von TLR4-defizienten C57BL/10 Mäusen um 40 % erhöht sind im Vergleich zu TLR4-exprimierenden C57BL/10 Mäusen. Dies lässt auf eine mögliche Regulation des TLR4 auf die Fetuin A-Bildung schließen. Die erhöhten Fetuin A-Konzentrationen in der Zirkulation von TLR4-defizienten C57BL/10 Mäusen könnten möglicherweise aber auch bedingt sein durch die Abwesenheit des TLR4, der in diesen Tieren nicht mehr als Fetuin A-Rezeptor zur Verfügung steht.

Der Vergleich der Fetuin A Konzentrationen im Serum von C57BL710 mit NOD Mäusen zeigt, dass NOD Mäuse um 60 % höhere Fetuin A Konzentrationen im Serum aufweisen, allerdings unabhängig von ihrem TLR4-Expressionsstatus. Diese Befunde lassen auf eine erhöhte Fetuin A Produktion in der Leber von NOD Mäusen schließen, möglicherweise beeinflusst durch die genetische Prädisposition dieses Tiermodells einen Insulinmangeldiabetes zu entwickeln. Neuere Studien konnten interessanterweise zeigen, dass erhöhte Fetuin A Konzentrationen positiv mit dem Grad von Hyperglykämie (120) und negativ mit der Insulin-Sensitivität korrelieren (121). Eine verminderte Insulinsensitivität bedingt eine erhöhte (kompensatorische) Sekretion von Insulin aus den Betazellen. Die erhöhte Sekretionsleistung führt zu

einer vermehrten Belastung der Betazellen wodurch ihr Niedergang und damit die Progression des T1D beschleunigt wird.

Die Faktoren, welche die Höhe der Fetuin A-Spiegel kontrollieren, sowie die Rolle des Fetuin A als mögliches Bindeglied zwischen FFA-induzierter Insulinresistenz und Inflammation sind derzeit Gegenstand intensiver Forschungsarbeiten.

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass das Fetuin A nicht nur als Adaptormolekül zwischen FFA und dem TLR4 fungiert, sondern auch direkt den Insulinsignalweg beeinflussen kann und somit zur Entwicklung einer Insulinresistenz beitragen kann (79, 122). Dabei bindet das Fetuin A an die extrazelluläre fibronectin type 3 (Fn3) Domäne der Beta-Untereinheit des Insulinrezeptors und inhibiert damit die intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität des Insulinsignalweges (123).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Abwesenheit des TLR4 mit erhöhten Konzentrationen von FFA und Fetuin A im Serum assoziiert ist. Eine mögliche Erklärung für diesen Zusammenhang könnte sein, dass aufgrund des fehlenden TLR4 in TLR4-defizienten Tieren, möglicherweise vermehrt Fetuin A am Insulinrezeptor bindet und damit eine verstärkte Insulinresistenz induziert. Die Folge einer Insulinresistenz ist häufig ein veränderter Stoffwechsel bedingt durch ein verändertes Substratangebot. Um mögliche Folgen des veränderten Substratangebots, insbesondere der erhöhten FFA-Spiegel, auf subzellulärer Ebene zu prüfen wurde die mitochondriale Aktivität im Skelettmuskel und der Leber analysiert.

Es zeigte sich, dass die mitochondriale Aktivität im *m. soleus* von NOD Mäusen um ca. 30 % vermindert ist im Vergleich zu C57BL/10 Mäusen unabhängig vom TLR4-Expressionsstatus.

Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit früheren Studien, die zeigen konnten, dass Gluko- und Lipotoxizität zu einer verminderten mitochondrialen Aktivität in Skelettmuskelzellen von Patienten mit T2D führen und mit einer Insulin-Resistenz assoziiert sind (124-126).

Im Gegensatz dazu ist in der Leber der Sauerstoff-Flux über die mitochondrialen Komplexe I, I und II sowie die maximale respiratorische Kapazität von TLR4-defizienten NOD Mäusen um 40 % erhöht im Vergleich zu TLR4-exprimierenden NOD Mäusen. Diese erhöhte mitochondriale Aktivität ist verbunden mit einem um ca. 20 % erhöhten Gewicht der Leber und einer erhöhten mitochondrialen Biogenese.

Diese erhöhte mitochondriale Aktivität in der Leber TLR4-defizienter Tiere resultiert möglicherweise aus einer Adaptation an das veränderte Substratangebot und könnte eine Konsequenz der veränderten Substratutilisation der peripheren Gewebe sein.

4.5 Insulinsekretion

Die Betazellen der pankreatischen Inseln stellen das primäre Ziel der Immunreaktion im Insulinmangeldiabetes dar. Da TLR4-defiziente NOD Mäuse erhöhte inflammatorische Aktivitäten aufweisen, liegt die Vermutung nahe, dass ihre Betazellen auch einen beschleunigten Funktionsverlust aufweisen und vermindert Insulin freisetzen.

Die zuvor beschriebenen Befunde erhöhter Blutglukosespiegel zum Zeitpunkt der Diabetesmanifestation in TLR4-defizienten NOD Mäusen legen die Vermutung nahe, dass die Insulinsekretion aus pankreatischen Inseln vermindert ist. Deshalb wurde die Glukose-stimulierte Insulinfreisetzung aus isolierten Inseln von 90 Tage alten TLR4-exprimierenden und TLR4-defizienten NOD Mäusen geprüft.

Die Glukose-stimulierte Insulinsekretionskapazität der Inseln war jedoch unabhängig von deren TLR4-Expressionsstatus. Die Ergebnisse belegen, dass die zuvor beschriebenen Befunde erhöhter Blutglukosekonzentrationen in TLR4-defizienten NOD Mäusen nicht durch eine verringerte Insulinsekretionsleistung in diesen Tieren erklärbar sind, sondern vermutlich das Resultat einer gestörten Insulinsensitivität darstellen.

4.6 Insulinsensitivität

Um der Vermutung einer gestörten Insulinsensitivität in TLR4-defizienten NOD Mäusen weiter nachzugehen, wurde ein ipGTT und ipITT durchgeführt.

Frühere Studien haben gezeigt, dass im Tiermodell der NOD Maus, die eine genetische Prädisposition zur Entwicklung eines Insulinmangeldiabetes aufweist, das Krankheitsgeschehen nicht nur mit einer Zerstörung der insulinproduzierenden Betazellen, sondern auch mit der Entwicklung einer Insulinresistenz in Verbindung gebracht werden kann (127).

Die Ergebnisse des ipGTT zeigen, dass TLR4-defiziente NOD Mäuse im Vergleich zu TLR4-exprimierenden NOD Mäusen eine um 65 % verminderte Glukosetoleranz aufweisen. Die reduzierte Glukosetoleranz ist wiederum ein möglicher Hinweis auf eine gestörte Insulinsensitivität, da die Glukose-stimulierte Insulinfreisetzung aus pankreatischen Inseln zuvor gezeigt hat, dass die Inseln der Tiere weiterhin in der Lage sind, Insulin zu sezernieren. Die Ergebnisse der verminderten Glukosetoleranz werden gestützt durch die Bestimmung der Insulinkonzentrationen im Blut von TLR4-defizienten NOD Mäusen, die nach der Durchführung des Glukosetoleranztests um ca. 30 % erhöht sind im Vergleich zu TLR4-exprimierenden NOD Mäusen.

Um den Effekt einer möglichen gestörten Insulinsensitivität weiter zu prüfen, wurde in TLR4-exprimierenden und TLR4-defizienten C57BL/10 und NOD Mäusen ein intraperitonealer Insulintoleranztest durchgeführt und aus den Nüchtern-Blutglukosekonzentrationen und den Nüchtern-Insulinkonzentrationen der HOMA-IR als Maß für die Insulinsensitivität bestimmt.

Die Insulinsensitivität von TLR4-exprimierenden und TLR4-defizienten C57BL/10 und von TLR4-exprimierenden NOD Mäusen ist vergleichbar. Die Mäuse reagieren auf eine Insulininjektion mit einer Reduktion der Blutglukosekonzentration, die nach 60 min wieder langsam ansteigt bedingt durch die einsetzende hepatische Glukoseproduktion (128). Wie nach den vorherigen Befunden erwartet, sinkt die Blutglukosekonzentration in TLR4-defizienten NOD Mäusen während des Insulintoleranztests um ca. 30 % weniger, d.h. dass die Insulinsensitivität in diesen Mäusen gestört scheint. Diese Ergebnisse werden durch die Berechnung des HOMA-IR weiter bestätigt. Der HOMA-IR ist in TLR4-defizienten NOD Mäusen um 60 % erhöht im Vergleich zu TLR4-exprimierenden NOD Mäusen und zeigt deutlich, dass TLR4-defiziente NOD Mäuse eine gestörte Insulinsensitivität aufweisen.

4.7 Hypothetische Rolle des TLR4 in der Regulation von Inflammation und Metabolismus im Modell der NOD Maus

In der vorliegenden Arbeit zur Aufklärung der Rolle des TLR4 in der Pathogenese des Insulinmangeldiabetes in der NOD Maus konnte gezeigt werden, dass eine TLR4-Defizienz zu hohen Konzentrationen von Fetuin A im Serum von NOD Mäusen führt. Aufgrund dieser Befunde und im Kontext mit der aktuellen Literatur kann

vermutet werden, dass Fetuin A in diesen Tieren vermehrt an den Insulinrezeptor bindet und damit, durch die Blockade der intrinsischen Tyrosinkinase des Insulinsignalweges, eine Insulinresistenz induziert. Die erhöhte Insulinresistenz führt wiederum zu einer metabolischen Inflexibilität der Tiere und damit sowohl zu einer verminderten Glukose-Utilisation, als auch zu einer vermehrten Oxidation von Proteinen und Fetten zur Energiegewinnung. Eine mögliche Konsequenz der Veränderungen des Energiemetabolismus könnten die erhöhten Spiegel der FFA und der Triglyzeride im Blut der Tiere sein. Diese vermehrten metabolischen Belastungen, vermutlich ausgelöst durch eine gestörte Insulinsensitivität, stellen neben der (auto-)immunen Attacke einen zusätzlichen Stressfaktor für die Betazellen dar, der in diabetes-prädisponierten Tieren zu einer beschleunigten Diabetesprogression beitragen kann.

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde sowie aktuelle Daten aus der Literatur lassen vermuten, dass der TLR4 ein zentraler Regulator des Energiestoffwechsels und der Inflammation bei der Pathogenese des Insulinmangeldiabetes im Tiermodell der NOD Maus ist.

5 Zusammenfassung/Summary

5.1 Zusammenfassung

Der Typ 1 Diabetes (T1D) ist charakterisiert durch die immunvermittelte Zerstörung der autologen insulinproduzierenden Betazellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas. Neuere Studien weisen darauf hin, dass Störungen des Energiemetabolismus zu einer Beschleunigung der Diabetesentwicklung beitragen können. Aktuelle Untersuchungen identifizierten den Toll-like Rezeptor 4 (TLR4), der ursprünglich als Rezeptor für bakterielles Lipopolysaccharid auf natürlichen Immunzellen beschrieben wurde, als gemeinsamen Regulator von immunologischen und metabolischen Prozessen. Um einen möglichen Einfluss des TLR4 auf die Pathogenese des T1D zu prüfen, wurde der selektive TLR4-Defekt aus der C57BL/10ScCr Maus in die spontan diabetische non-obese diabetic Maus (NOD), einem Modell des humanen T1D, eingekreuzt und eine umfassende metabolische Charakterisierung durchgeführt.

Im Vergleich zu TLR4-exprimierenden NOD Mäusen zeigten TLR4-defiziente NOD Mäuse eine beschleunigte Diabetesentwicklung, die mit erhöhten Serumkonzentrationen des pro-inflammatorischen Zytokins Interleukin 6 und einer vermehrten Infiltration von Immunzellen in die pankreatischen Inseln einherging. Das Körpergewicht und der Körperfettanteil TLR4-defizienter NOD Mäuse waren erhöht und assoziiert mit erhöhten Konzentrationen von freien Fettsäuren, Triglyzeriden und Fetuin A. Als Konsequenz dieses erhöhten Substratangebotes war die mitochondriale Aktivität in der Leber TLR4-defizienter NOD Mäuse erhöht. Im Vergleich zu TLR4-exprimierenden NOD Mäusen wiesen TLR4-defiziente NOD Mäuse eine reduzierte Glukosetoleranz und eine gestörte Insulinsensitivität auf. Diese Befunde wurden durch die Analysen des HOMA-IR weiter gestützt und weisen auf eine Insulinresistenz in TLR4-defizienten NOD Mäusen hin.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass der TLR4 ein zentraler Regulator der (Auto-)Immunität und des Energiestoffwechsels bei der Pathogenese des Insulinmangeldiabetes im Tiermodell der NOD Maus ist und somit einen möglichen Ansatzpunkt für neue Interventionsstrategien darstellt, um über die Modulation von TLR4-abhängigen immunologischen und metabolischen Prozessen, der Entwicklung des T1D entgegenzuwirken.

5.2 Summary

Type 1 diabetes (T1D) is characterized by the immune-mediated destruction of the autologous insulin producing pancreatic betacells. Earlier studies suggest that disturbances of energy metabolism contribute to an accelerated diabetes progression. Recent observations identified the toll-like receptor 4 (TLR4), originally described as receptor for bacterial lipopolysaccharide on innate immune cells, as a common regulator of immunological and metabolic processes. To assess a potential impact of TLR4 on the pathogenesis of T1D, the selective TLR4-defect of the C57BL/10ScCr mouse was backcrossed on the background of the spontaneously diabetic non-obese diabetic mouse (NOD), an animal model of human T1D, and an intensive metabolic characterization was performed.

In comparison to TLR4-expressing NOD mice, TLR4-deficient NOD mice had an accelerated diabetes manifestation, elevated serum concentrations of the proinflammatory cytokine interleukin 6 and an increased immune-cell infiltration in pancreatic islets. Body weight and the body fat mass of TLR4-deficient animals were increased and associated with higher levels of free fatty acids, triglycerides and fetuin A. The mitochondrial activity was increased in the liver as a consequence of the increased substrate availability. TLR4-deficient NOD mice had a reduced glucose tolerance and a disturbed insulin sensitivity when compared to TLR4-expressing NOD mice. The determination of the HOMA-IR further points to an impairment of insulin sensitivity in NOD mice lacking TLR4.

Taken together, the results indicate that TLR4 is a central regulator of (auto-)immunity and energy metabolism in the pathogenesis of insulin-deficient diabetes in the NOD mouse model. Therefore, TLR4-dependent immunological and metabolic processes may serve as potential targets for intervention strategies to influence the development of T1D.

6 Literaturverzeichnis

1. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 35 Suppl 1:S64-S71, 2012
2. Atkinson,MA: The pathogenesis and natural history of type 1 diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: 2012
3. Reinbeck,AL: Effekte von metabolischen und immunologischen Stressfaktoren auf die inflammatorischen Aktivitäten von Adipozyten. *Diplomarbeit*, 2010
4. Eehalt,S, Blumenstock,G, Willasch,AM, Hub,R, Ranke,MB, Neu,A: Continuous rise in incidence of childhood Type 1 diabetes in Germany. *Diabet Med* 25:755-757, 2008
5. Jahromi,MM, Eisenbarth,GS: Cellular and molecular pathogenesis of type 1A diabetes. *Cell Mol Life Sci* 64:865-872, 2007
6. Knip,M, Siljander,H: Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes. *Autoimmun.Rev.* 7:550-557, 2008
7. Imagawa,A, Hanafusa,T, Miyagawa,J, Matsuzawa,Y: A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized by a rapid onset and an absence of diabetes-related antibodies. Osaka IDDM Study Group. *N Engl J Med* 342:301-307, 2000
8. Rolandsson,O, Palmer,JP: Latent autoimmune diabetes in adults (LADA) is dead: long live autoimmune diabetes! *Diabetologia* 53:1250-1253, 2010
9. Leslie,RD, Kolb,H, Schloot,NC, Buzzetti,R, Mauricio,D, De Leiva,A, Yderstraede,K, Sarti,C, Thivolet,C, Hadden,D, Hunter,S, Scherthner,G, Scherbaum,W, Williams,R, Pozzilli,P: Diabetes classification: grey zones, sound and smoke: Action LADA 1. *Diabetes Metab Res Rev* 24:511-519, 2008
10. Philips,JC, Scheen,AJ: [Diagnosis of gestational diabetes]. *Rev Med Liege* 68:201-207, 2013
11. Todd,JA: From genome to aetiology in a multifactorial disease, type 1 diabetes. *Bioessays* 21:164-174, 1999
12. Eringsmark,RS, Lernmark,A: The environment and the origins of islet autoimmunity and Type 1 diabetes. *Diabet Med* 30:155-160, 2013
13. Steck,AK, Rewers,MJ: Genetics of type 1 diabetes. *Clin Chem* 57:176-185, 2011
14. Barrett,JC, Clayton,DG, Concannon,P, Akolkar,B, Cooper,JD, Erlich,HA, Julier,C, Morahan,G, Nerup,J, Nierras,C, Plagnol,V, Pociot,F, Schuilenburg,H, Smyth,DJ, Stevens,H, Todd,JA, Walker,NM, Rich,SS: Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nat Genet* 41:703-707, 2009

15. Polychronakos,C, Li,Q: Understanding type 1 diabetes through genetics: advances and prospects. *Nat Rev Genet* 12:781-792, 2011
16. Dang,MN, Buzzetti,R, Pozzilli,P: Epigenetics in autoimmune diseases with focus on type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 29:8-18, 2013
17. van Belle,TL, Coppieters,KT, von Herrath,MG: Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev* 91:79-118, 2011
18. Maahs,DM, West,NA, Lawrence,JM, Mayer-Davis,EJ: Epidemiology of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 39:481-497, 2010
19. Moltchanova,EV, Schreier,N, Lammi,N, Karvonen,M: Seasonal variation of diagnosis of Type 1 diabetes mellitus in children worldwide. *Diabet Med* 26:673-678, 2009
20. Kacerovsky,M, Brehm,A, Chmelik,M, Schmid,Al, Szendroedi,J, Kacerovsky-Bielez,G, Nowotny,P, Lettner,A, Wolzt,M, Jones,JG, Roden,M: Impaired insulin stimulation of muscular ATP production in patients with type 1 diabetes. *J Intern Med* 269:189-199, 2011
21. van der Werf,N, Kroese,FG, Rozing,J, Hillebrands,JL: Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 23:169-183, 2007
22. The Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY) Study. *Ann N Y Acad Sci* 1150:1-13, 2008
23. Ilonen,J, Vaarala,O, Akerblom,HK, Knip,M: Environmental factors and primary prevention in type 1 diabetes. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab* 15:227-232, 2009
24. Akerblom,HK, Vaarala,O, Hyoty,H, Ilonen,J, Knip,M: Environmental factors in the etiology of type 1 diabetes. *Am J Med Genet* 115:18-29, 2002
25. Karjalainen,J, Martin,JM, Knip,M, Ilonen,J, Robinson,BH, Savilahti,E, Akerblom,HK, Dosch,HM: A bovine albumin peptide as a possible trigger of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 327:302-307, 1992
26. Furlanos,S, Harrison,LC, Colman,PG: The accelerator hypothesis and increasing incidence of type 1 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 15:321-325, 2008
27. Wilkin,TJ: The accelerator hypothesis: a review of the evidence for insulin resistance as the basis for type I as well as type II diabetes. *Int J Obes (Lond)* 33:716-726, 2009
28. 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
29. Wellen,KE, Hotamisligil,GS: Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1785-1788, 2003

30. Gregor,MF, Hotamisligil,GS: Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol* 29:415-445, 2011
31. Kolb,H, Mandrup-Poulsen,T: The global diabetes epidemic as a consequence of lifestyle-induced low-grade inflammation. *Diabetologia* 53:10-20, 2010
32. Erbagci,AB, Tarakcioglu,M, Coskun,Y, Sivasli,E, Sibel,NE: Mediators of inflammation in children with type I diabetes mellitus: cytokines in type I diabetic children. *Clin Biochem* 34:645-650, 2001
33. Zeyda,M, Stulnig,TM: Obesity, inflammation, and insulin resistance--a mini-review. *Gerontology* 55:379-386, 2009
34. Yki-Jarvinen,H: Acute and chronic effects of hyperglycaemia on glucose metabolism. *Diabetologia* 33:579-585, 1990
35. Scholin,A, Siegbahn,A, Lind,L, Berne,C, Sundkvist,G, Bjork,E, Karlsson,FA: CRP and IL-6 concentrations are associated with poor glycemic control despite preserved beta-cell function during the first year after diagnosis of type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 20:205-210, 2004
36. Snell-Bergeon,JK, West,NA, Mayer-Davis,EJ, Liese,AD, Marcovina,SM, D'Agostino,RB, Jr., Hamman,RF, Dabelea,D: Inflammatory markers are increased in youth with type 1 diabetes: the SEARCH Case-Control study. *J Clin Endocrinol Metab* 95:2868-2876, 2010
37. Svensson,MK, Eriksson,JW: Change in the amount of body fat and IL-6 levels is related to altered insulin sensitivity in type 1 diabetes patients with or without diabetic nephropathy. *Horm Metab Res* 43:209-215, 2011
38. Böhm,BO: Rationale und rationelle Insulintherapie für Patienten mit Typ-1-Diabetes. *Diabetologie und Stoffwechsel* 6:R41-R52, 2011
39. Ricordi,C, Inverardi,L, Dominguez-Bendala,J: From cellular therapies to tissue reprogramming and regenerative strategies in the treatment of diabetes. *Regen Med* 7:41-48, 2012
40. Mayhew,CN, Wells,JM: Converting human pluripotent stem cells into beta-cells: recent advances and future challenges. *Curr Opin Organ Transplant* 15:54-60, 2010
41. von Herrath,M, Nepom,GT: Animal models of human type 1 diabetes. *Nat Immunol* 10:129-132, 2009
42. Leiter,EH: Multiple low-dose streptozotocin-induced hyperglycemia and insulinitis in C57BL mice: influence of inbred background, sex, and thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:630-634, 1982
43. King,AJ: The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol* 166:877-894, 2012

44. Nakhoda,AF, Wei,CN, Like,AA, Marliss,EB: The spontaneously diabetic Wistar rat (the "BB" rat): the significance of transient glycosuria. *Diabetes Metab* 4:255-259, 1978
45. Hanenberg,H, Kolb-Bachofen,V, Kantwerk-Funke,G, Kolb,H: Macrophage infiltration precedes and is a prerequisite for lymphocytic insulinitis in pancreatic islets of pre-diabetic BB rats. *Diabetologia* 32:126-134, 1989
46. Ikehara,S, Ohtsuki,H, Good,RA, Asamoto,H, Nakamura,T, Sekita,K, Muso,E, Tochino,Y, Ida,T, Kuzuya,H: Prevention of type I diabetes in nonobese diabetic mice by allogenic bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:7743-7747, 1985
47. 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
48. Wucherpfennig,KW: MHC-linked susceptibility to type 1 diabetes: a structural perspective. *Ann N Y Acad Sci* 1005:119-127, 2003
49. Murphy,K, Travers,P, Walport,M: Janeway`s Immuno Biology. *Garland Science*, 2008
50. Kolb-Bachofen,V, Epstein,S, Kiesel,U, Kolb,H: Low-dose streptozocin-induced diabetes in mice. Electron microscopy reveals single-cell insulinitis before diabetes onset. *Diabetes* 37:21-27, 1988
51. 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
52. 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
53. Simone,E, Daniel,D, Schloot,N, Gottlieb,P, Babu,S, Kawasaki,E, Wegmann,D, Eisenbarth,GS: T cell receptor restriction of diabetogenic autoimmune NOD T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2518-2521, 1997
54. Avram,AS, Avram,MM, James,WD: Subcutaneous fat in normal and diseased states: 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue. *J Am Acad Dermatol* 53:671-683, 2005
55. 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

56. Charriere,G, Cousin,B, Arnaud,E, Andre,M, Bacou,F, Penicaud,L, Casteilla,L: Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J Biol Chem* 278:9850-9855, 2003
57. Schaeffler,A, Gross,P, Buettner,R, Bollheimer,C, Buechler,C, Neumeier,M, Kopp,A, Schoelmerich,J, Falk,W: Fatty acid-induced induction of Toll-like receptor-4/nuclear factor-kappaB pathway in adipocytes links nutritional signalling with innate immunity. *Immunology* 126:233-245, 2009
58. Gülden,E, Mollerus,S, Bruggemann,J, Burkart,V, Habich,C: Heat shock protein 60 induces inflammatory mediators in mouse adipocytes. *FEBS Lett* 582:2731-2736, 2008
59. 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
60. Vitseva,OI, Tanriverdi,K, Tchkonja,TT, Kirkland,JL, McDonnell,ME, Apovian,CM, Freedman,J, Gokce,N: Inducible Toll-like receptor and NF-kappaB regulatory pathway expression in human adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)* 16:932-937, 2008
61. Kawai,T, Akira,S: The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11:373-384, 2010
62. Beutler,B: TLR4 as the mammalian endotoxin sensor. *Curr Top Microbiol Immunol* 270:109-120, 2002
63. Beutler,B: Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr Opin Immunol* 12:20-26, 2000
64. Kumar,H, Kawai,T, Akira,S: Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun* 388:621-625, 2009
65. Akira,S, Uematsu,S, Takeuchi,O: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801, 2006
66. Ohashi,K, Burkart,V, Flohe,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
67. Takeda,K, Kaisho,T, Akira,S: Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21:335-376, 2003
68. 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
69. Schumann,RR, Leong,SR, Flagg,GW, Gray,PW, Wright,SD, Mathison,JC, Tobias,PS, Ulevitch,RJ: Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249:1429-1431, 1990

70. Beutler,B: Microbe sensing, positive feedback loops, and the pathogenesis of inflammatory diseases. *Immunol Rev* 227:248-263, 2009
71. Huurman,VA, Decochez,K, Mathieu,C, Cohen,IR, Roep,BO: Therapy with the hsp60 peptide DiaPep277 in C-peptide positive type 1 diabetes patients. *Diabetes Metab Res Rev* 23:269-275, 2007
72. Rossol,M, Heine,H, Meusch,U, Quandt,D, Klein,C, Sweet,MJ, Hauschildt,S: LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Crit Rev Immunol* 31:379-446, 2011
73. 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
74. Sell,H, Eckel,J: Adipose tissue inflammation: novel insight into the role of macrophages and lymphocytes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 13:366-370, 2010
75. Harford,KA, Reynolds,CM, McGillicuddy,FC, Roche,HM: Fats, inflammation and insulin resistance: insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue. *Proc Nutr Soc* 70:408-417, 2011
76. Kawai,T, Akira,S: Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 13:460-469, 2007
77. Donath,MY, Storling,J, Berchtold,LA, Billestrup,N, Mandrup-Poulsen,T: Cytokines and beta-cell biology: from concept to clinical translation. *Endocr Rev* 29:334-350, 2008
78. 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
79. Heinrichsdorff,J, Olefsky,JM: Fetuin A: the missing link in lipid-induced inflammation. *Nat Med* 18:1182-1183, 2012
80. Pal,D, Dasgupta,S, Kundu,R, Maitra,S, Das,G, Mukhopadhyay,S, Ray,S, Majumdar,SS, Bhattacharya,S: Fetuin A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nat Med* 2012
81. Kahn,BB, Flier,JS: Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 106:473-481, 2000
82. Bes-Houtmann,S, Roche,R, Hoareau,L, Gonthier,MP, Festy,F, Caillens,H, Gasque,P, Lefebvre,dC, Cesari,M: Presence of functional TLR2 and TLR4 on human adipocytes. *Histochem Cell Biol.* 127:131-137, 2007
83. Song,MJ, Kim,KH, Yoon,JM, Kim,JB: Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 346:739-745, 2006

84. Dasu,MR, Devaraj,S, Park,S, Jialal,I: Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 33:861-868, 2010
85. Jialal,I, Huet,BA, Kaur,H, Chien,A, Devaraj,S: Increased toll-like receptor activity in patients with metabolic syndrome. *Diabetes Care* 35:900-904, 2012
86. Devaraj,S, Dasu,MR, Park,SH, Jialal,I: Increased levels of ligands of Toll-like receptors 2 and 4 in type 1 diabetes. *Diabetologia* 52:1665-1668, 2009
87. Davis,JE, Gabler,NK, Walker-Daniels,J, Spurlock,ME: Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat. *Obesity (Silver Spring)* 16:1248-1255, 2008
88. Poggi,M, Bastelica,D, Gual,P, Iglesias,MA, Gremeaux,T, Knauf,C, Peiretti,F, Verdier,M, Juhan-Vague,I, Tanti,JF, Burcelin,R, Alessi,MC: C3H/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet. *Diabetologia* 50:1267-1276, 2007
89. Tsukumo,DM, Carvalho-Filho,MA, Carvalheira,JB, Prada,PO, Hirabara,SM, Schenka,AA, Araujo,EP, Vassallo,J, Curi,R, Velloso,LA, Saad,MJ: Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56:1986-1998, 2007
90. Kim,JJ, Sears,DD: TLR4 and Insulin Resistance. *Gastroenterol Res Pract* 2010: 2010
91. 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
92. Anderson,MS, Bluestone,JA: The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol* 23:447-485, 2005
93. Ralph,P, Moore,MA, Nilsson,K: Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *J Exp Med* 143:1528-1533, 1976
94. Fischer,J, Koch,L, Emmerling,C, Vierkotten,J, Peters,T, Bruning,JC, Ruther,U: Inactivation of the Fto gene protects from obesity. *Nature* 458:894-898, 2009
95. Chadt,A, Leicht,K, Deshmukh,A, Jiang,LQ, Scherneck,S, Bernhardt,U, Dreja,T, Vogel,H, Schmolz,K, Kluge,R, Zierath,JR, Hultschig,C, Hoeben,RC, Schurmann,A, Joost,HG, Al Hasani,H: Tbc1d1 mutation in lean mouse strain confers leanness and protects from diet-induced obesity. *Nat Genet* 40:1354-1359, 2008
96. Davis,RC, van Nas,A, Castellani,LW, Zhao,Y, Zhou,Z, Wen,P, Yu,S, Qi,H, Rosales,M, Schadt,EE, Broman,KW, Peterfy,M, Lusis,AJ: Systems genetics of susceptibility to obesity-induced diabetes in mice. *Physiol Genomics* 44:1-13, 2012

97. Szendroedi,J, Zwiertler,E, Schmid,AI, Chmelik,M, Pacini,G, Kacerovsky,G, Smekal,G, Nowotny,P, Wagner,O, Schnack,C, Scherthaner,G, Klaushofer,K, Roden,M: Reduced basal ATP synthetic flux of skeletal muscle in patients with previous acromegaly. *PLoS One* 3:e3958, 2008
98. Phielix,E, Schrauwen-Hinderling,VB, Mensink,M, Lenaers,E, Meex,R, Hoeks,J, Kooi,ME, Moonen-Kornips,E, Sels,JP, Hesselink,MK, Schrauwen,P: Lower intrinsic ADP-stimulated mitochondrial respiration underlies in vivo mitochondrial dysfunction in muscle of male type 2 diabetic patients. *Diabetes* 57:2943-2949, 2008
99. Matthews,DR, Hosker,JP, Rudenski,AS, Naylor,BA, Treacher,DF, Turner,RC: Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28:412-419, 1985
100. Burkart,V, Wang,ZQ, Radons,J, Heller,B, Herceg,Z, Stingl,L, Wagner,EF, Kolb,H: Mice lacking the poly(ADP-ribose) polymerase gene are resistant to pancreatic beta-cell destruction and diabetes development induced by streptozocin. *Nat Med* 5:314-319, 1999
101. Imai,Y, Patel,HR, Hawkins,EJ, Doliba,NM, Matschinsky,FM, Ahima,RS: Insulin secretion is increased in pancreatic islets of neuropeptide Y-deficient mice. *Endocrinology* 148:5716-5723, 2007
102. Eisenbarth,GS: Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med* 314:1360-1368, 1986
103. Pozzilli,P, Signore,A, Williams,AJ, Beales,PE: NOD mouse colonies around the world--recent facts and figures. *Immunol Today* 14:193-196, 1993
104. Hanafusa,T, Miyagawa,J, Nakajima,H, Tomita,K, Kuwajima,M, Matsuzawa,Y, Tarui,S: The NOD mouse. *Diabetes Res Clin Pract* 24 Suppl:S307-S311, 1994
105. Okada,H, Kuhn,C, Feillet,H, Bach,JF: The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin Exp Immunol* 160:1-9, 2010
106. Bach,JF: The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 347:911-920, 2002
107. Bauer,S, Muller,T, Hamm,S: Pattern recognition by Toll-like receptors. *Adv Exp Med Biol* 653:15-34, 2009
108. 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
109. Fantuzzi,G: Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 115:911-919, 2005
110. Suganami,T, Mieda,T, Itoh,M, Shimoda,Y, Kamei,Y, Ogawa,Y: Attenuation of obesity-induced adipose tissue inflammation in C3H/HeJ mice carrying a Toll-like receptor 4 mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 354:45-49, 2007

111. Stephan,FK, Zucker,I: Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:1583-1586, 1972
112. Kawakami,K, Ago,A, Gonda,T: [Behavioral characteristics of open-field activities in NOD mice]. *Exp Anim* 43:765-768, 1995
113. Choi,CS, Savage,DB, Abu-Elheiga,L, Liu,ZX, Kim,S, Kulkarni,A, Distefano,A, Hwang,YJ, Reznick,RM, Codella,R, Zhang,D, Cline,GW, Wakil,SJ, Shulman,GI: Continuous fat oxidation in acetyl-CoA carboxylase 2 knockout mice increases total energy expenditure, reduces fat mass, and improves insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:16480-16485, 2007
114. Wohl,P, Wohl,P, Girman,P, Pelikanova,T: Inflexibility of energy substrate oxidation in type 1 diabetic patients. *Metabolism* 53:655-659, 2004
115. Corpeleijn,E, Saris,WH, Blaak,EE: Metabolic flexibility in the development of insulin resistance and type 2 diabetes: effects of lifestyle. *Obes Rev* 10:178-193, 2009
116. Reaven,GM: Insulin resistance and human disease: a short history. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 9:387-406, 1998
117. Bulum,T, Duvnjak,L: Insulin resistance in patients with type 1 diabetes: relationship with metabolic and inflammatory parameters. *Acta Clin.Croat.* 52:43-51, 2013
118. Bergman,BC, Howard,D, Schauer,IE, Maahs,DM, Snell-Bergeon,JK, Clement,TW, Eckel,RH, Perreault,L, Rewers,M: The importance of palmitoleic acid to adipocyte insulin resistance and whole-body insulin sensitivity in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 98:E40-E50, 2013
119. Heptulla,RA, Stewart,A, Enocksson,S, Rife,F, Ma,TY, Sherwin,RS, Tamborlane,WV, Caprio,S: In situ evidence that peripheral insulin resistance in adolescents with poorly controlled type 1 diabetes is associated with impaired suppression of lipolysis: a microdialysis study. *Pediatr Res* 53:830-835, 2003
120. Liu,Y, Xu,M, Xu,Y, Li,M, Wang,T, Chen,Y, Bi,Y: Positive correlation between chronic hyperglycemia and serum Fetuin A levels in middle-aged and elderly Chinese. *J Diabetes* 4:351-358, 2012
121. Stefan,N, Haring,HU: Circulating Fetuin A and free fatty acids interact to predict insulin resistance in humans. *Nat Med* 19:394-395, 2013
122. Mathews,ST, Srinivas,PR, Leon,MA, Grunberger,G: Bovine fetuin is an inhibitor of insulin receptor tyrosine kinase. *Life Sci* 61:1583-1592, 1997
123. Goustin,AS, Abou-Samra,AB: The "thrifty" gene encoding Ahsg/Fetuin A meets the insulin receptor: Insights into the mechanism of insulin resistance. *Cell Signal* 23:980-990, 2011
124. Kelley,DE, He,J, Menshikova,EV, Ritov,VB: Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 51:2944-2950, 2002

125. Simoneau,JA, Kelley,DE: Altered glycolytic and oxidative capacities of skeletal muscle contribute to insulin resistance in NIDDM. *J Appl Physiol* 83:166-171, 1997
126. Stump,CS, Short,KR, Bigelow,ML, Schimke,JM, Nair,KS: Effect of insulin on human skeletal muscle mitochondrial ATP production, protein synthesis, and mRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7996-8001, 2003
127. Chaparro,RJ, Konigshofer,Y, Beilhack,GF, Shizuru,JA, McDevitt,HO, Chien,YH: Nonobese diabetic mice express aspects of both type 1 and type 2 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12475-12480, 2006
128. Akinmokun,A, Selby,PL, Ramaiya,K, Alberti,KG: The short insulin tolerance test for determination of insulin sensitivity: a comparison with the euglycaemic clamp. *Diabet Med* 9:432-437, 1992

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	body mass index
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD11b	cluster of differentiation molecule 11B
CS	Kälberserum
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
et al.	et alii (und andere)
FBS	Fetal Bovine Serum
FCS	Fetal Calf Serum
FFA	free fatty acids
GDM	gestational diabetes mellitus
h	Stunde
HOMA-IR	homeostatic model assessment of insulin resistance
HSP	Hitzeschockprotein
IL-6	Interleukin-6
ipGTT	intraperitonealer Glukosetoleranztest
ipITT	intraperitonealer Insulintoleranztest
LADA	latent autoimmune diabetes of adults
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1

min	Minuten
NMR	nuclear magnetic resonance
NOD	Non obese diabetic
OD	optische Dichte
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PCR	polymerase chain reaction
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
RQ	Respiratorischer Quotient
rpm	rounds per minute
s.	siehe
sek	Sekunde
SEM	standard error of the mean
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor- α
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
T1D	Typ 1 Diabetes
T2D	Typ 2 Diabetes
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
vs.	versus
xg	Gravitation
XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Modulares System zur automatisierten Erfassung metabolischer Parameter von Mäusen.	35
Abb. 2: Nachweis des TLR4-Expressionsstatus in C57BL/10 und NOD Mäusen ...	49
Abb. 3: Ausschluss einer Makrophagenkontamination durch Einsatz eines anti-CD11b Antikörpers in TLR4-exprimierenden (TLR4 ^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4 ^{-/-}) primären Präadipozyten der NOD Maus.	51
Abb. 4: LPS-induzierte IL-6- und TNF-alpha-Sekretion sowie metabolische Aktivität von TLR4-exprimierenden (TLR4 ^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4 ^{-/-}) primären Präadipozyten der NOD Maus.	53
Abb. 5: LPS-induzierte IL-6- und TNF-alpha-Sekretion von TLR4-exprimierenden (TLR4 ^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4 ^{-/-}) primären Milzmakrophagen aus der NOD Maus.	54
Abb. 6: Alter und Blutglukosekonzentration von TLR4-exprimierenden (TLR4 ^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4 ^{-/-}) NOD Mäusen zum Zeitpunkt der Diabetesmanifestation.	56
Abb. 7: Futter- und Wasseraufnahme von TLR4-exprimierenden (TLR4 ^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4 ^{-/-}) C57BL/10 und NOD Mäusen	57
Abb. 8: Physische Aktivität von TLR4-exprimierenden (TLR4 ^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4 ^{-/-}) C57BL/10 und NOD Mäusen.	60
Abb. 9: Energieverbrauch von TLR4-exprimierenden (TLR4 ^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4 ^{-/-}) C57BL/10 und NOD Mäusen.	61
Abb. 10: RQ von TLR4-exprimierenden (TLR4 ^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4 ^{-/-}) C57BL/10 und NOD Mäusen.	64
Abb. 11: Körpergewicht von TLR4-exprimierenden (TLR4 ^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4 ^{-/-}) C57BL/10 und NOD Mäusen.	66
Abb. 12: Körperzusammensetzung von TLR4-exprimierenden (TLR4 ^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4 ^{-/-}) C57BL/10 und NOD Mäusen	67
Abb. 13: IL-6-Konzentrationen im Serum von TLR4-exprimierenden (TLR4 ^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4 ^{-/-}) C57BL/10 und NOD Mäusen.	68

Abb. 14: Konzentrationen von FFA und Triglyzeriden im Plasma TLR4-exprimierender (TLR4 ^{+/+}) und TLR4-defizienter (TLR4 ^{-/-}) C57BL/10 und nicht diabetischer NOD Mäuse	69
Abb. 15: Fetuin A-Konzentrationen im Serum TLR4-exprimierender (TLR4 ^{+/+}) und TLR4-defizienter (TLR4 ^{-/-}) C57BL/10 und NOD Mäuse	70
Abb. 16: Lebergewicht von TLR4-exprimierenden (TLR4 ^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4 ^{-/-}) C57BL/10 und NOD Mäusen.....	71
Abb. 17: Ratio der mitochondrialen vs. der nukleären DNA-Kopienzahl von TLR4-exprimierenden (TLR4 ^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4 ^{-/-}) C57BL/10 und NOD Mäusen.....	72
Abb. 18: Mitochondrialer Sauerstoff-Flux in der Leber und im <i>m. soleus</i> von TLR4-exprimierenden (TLR4 ^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4 ^{-/-}) C57BL/10 und NOD Mäusen	73
Abb. 19: Insulinpositive Inselfläche und Infiltrationsgrad der Betazellen der Langerhans'schen Inseln von TLR4-exprimierenden (TLR4 ^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4 ^{-/-}) NOD Mäusen	76
Abb. 20: Glukose-stimulierte Insulinfreisetzung aus isolierten Inseln TLR4-exprimierender (TLR4 ^{+/+}) und TLR4-defizienter (TLR4 ^{-/-}) NOD Mäuse.....	77
Abb. 21: Verlauf der Blutglukosekonzentration und die incremental area under the curve (iAUC) während eines intraperitonealen Glukosetoleranztestes bei TLR4-exprimierenden (TLR4 ^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4 ^{-/-}) NOD Mäusen.....	79
Abb. 22: Insulinkonzentrationen im Blut von TLR4-exprimierenden (TLR4 ^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4 ^{-/-}) NOD Mäusen 120 min nach Glukoseinjektion..	80
Abb. 23: Prozentuale Veränderung der Blutglukosespiegel nach intraperitonealer Insulininjektion während eines Insulintoleranztests (ipITT) und Area under the curve von TLR4-exprimierenden (TLR4 ^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4 ^{-/-}) C57BL/10 und NOD Mäusen.	82
Abb. 24: HOMA-Insulin-Resistenz (IR) von TLR4-exprimierenden (TLR4 ^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4 ^{-/-}) NOD Mäusen.	83

7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Humane Toll-like Rezeptoren	15
Tab. 2: Nukleotidsequenzen der Primer zum Nachweis des TLR4- Expressionsstatus	24
Tab. 3: Nukleotidsequenzen der Primer und Sonden zur Bestimmung der mitochondrialen und nukleären DNA copy number	24
Tab. 4: Stammreaktionsgemisch für die Durchführung der Polymerasekettenreaktion	33
Tab. 5: PCR-Programm zum Nachweis des TLR4-Gens (A) und des TLR4- Defektes (B).....	33
Tab. 6: Futteraufnahme von nicht diabetischen und diabetischen TLR4- exprimierenden (TLR4 ^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4 ^{-/-}) NOD Mäusen. ...	58
Tab. 7: Wasseraufnahme von nicht diabetischen und diabetischen TLR4- exprimierenden (TLR4 ^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4 ^{-/-}) NOD Mäusen. ...	59
Tab. 8: Physische Aktivität von nicht diabetischen und diabetischen TLR4- exprimierenden (TLR4 ^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4 ^{-/-}) NOD Mäusen. ...	61
Tab. 9: Energieverbrauch von nicht diabetischen und diabetischen TLR4- exprimierenden (TLR4 ^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4 ^{-/-}) NOD Mäusen. ...	62
Tab. 10: RQ von nicht diabetischen und diabetischen TLR4-exprimierenden (TLR4 ^{+/+}) und TLR4-defizienten (TLR4 ^{-/-}) NOD Mäusen.....	65

8 Danksagung

Zum Abschluss möchte ich mich bei Herrn Universitätsprofessor Dr. Michael Roden bedanken für die Möglichkeit der Durchführung meiner Dissertation im Institut für Klinische Diabetologie am Deutschen Diabetes-Zentrum in Düsseldorf.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Volker Burkart für die hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit. Er hat mir die Möglichkeit gegeben, ein sehr interessantes Thema intensiv zu bearbeiten und hat mir dabei stets die Freiheit gegeben selbstständig Fragestellungen zu entwickeln und diese zu bearbeiten. Dabei stand er mir mit wertvollen Ratschlägen zur Seite und hat damit sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Universitätsprofessor Dr. Eckhard Lammert danke ich für die Übernahme des Korreferats an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Besonders möchte ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Immunmodulation im besonderen Waltraud Fingberg sowie Ulrike und Hajo Partke für die liebe und tatkräftige Unterstützung danken.

All meinen Freunden danke ich für ihre Geduld und Unterstützung und dass sie nie von meiner Seite gewichen sind. Ein ganz besonderer Dank gilt dabei meiner so lieb gewonnenen Kollegin und Freundin Maren Carstensen für viele ereignisreiche, lustige und wertvolle Stunden und Melania Akköse die mich mein ganzes Studium lang durch alles Hochs und Tiefs begleitet hat.

Zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie bedanken. Meinen Großeltern möchte ich sehr dafür danken, dass sie mich stets moralisch und finanziell unterstützt haben und mir so die Durchführung meiner Promotion ermöglicht haben. Ein besonderer Dank gilt meiner Mama Ulrike Reinbeck, meinem Bruder Benjamin Reinbeck und Samuela Martino für die liebevolle Unterstützung, dass sie mir stets Mut gemacht haben, mir den Rücken freigehalten haben und einfach immer für mich da sind.