

Aus der
Deutschen Diabetes-Klinik
Deutsches Diabetes-Zentrum
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. Werner A. Scherbaum

**Lektine modulieren die Freisetzung der β -zellschädigenden Mediatoren
Tumor Nekrose Faktor α und Stickstoffmonoxid durch Makrophagen**

Dissertation

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

vorgelegt von

Johanna Bialas

2005

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät
der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg
Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Volker Burkart

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Suschek

Ich widme diese Arbeit meiner wunderbaren Familie

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1	Einleitung	1
1.1	Diabetes mellitus	1
1.1.1	Definition des Krankheitsbildes	1
1.2	Der Typ 1 Diabetes	2
1.2.1	Epidemiologie	2
1.2.2	Symptome der Erkrankung	2
1.2.3	Diagnosestellung	3
1.2.4	Therapie	3
1.2.5	Komplikationen	4
1.2.6	Ätiologie und Pathogenese	5
1.2.7	Genetik	6
1.2.8	Umweltfaktoren als mögliche Auslöser des Typ 1 Diabetes	7
1.3	Die Pathogenese des Typ 1 Diabetes – zelluläre und molekulare Mechanismen	8
1.3.1	Die Rolle der Makrophagen in der β -zellgerichteten Immunreaktion	9
1.3.2	Stickstoffmonoxid und die Rolle in der β -Zellschädigung	10
1.3.3	TNF α und die Rolle in der β -Zellschädigung	11
1.4	Toleranzinduktion	12
1.4.1	Toleranzinduktion gegenüber Lipopolysaccharid	12
1.4.2	Toleranzinduktion gegenüber Cholera-Toxin B	14
1.5	Lektine	16
1.5.1	Allgemeine Eigenschaften der Lektine	16
1.5.1.1	Definition	16
1.5.1.2	Vorkommen und Funktion der Lektine	16
1.5.2	Zuckerspezifitäten von Lektinen	18
1.5.2.1	Galaktose-spezifische Lektine	19
1.5.2.2	Glukose- und Mannose-spezifische Lektine	20
1.5.2.3	Fukose-spezifisches Lektin	22
1.5.2.4	Oligosaccharid-spezifisches Lektin	22
1.6	OM-89 – ein immunmodulatorischer bakterieller Extrakt	23
1.7	Ziel der Arbeit	24
2	Material und Methoden	26
2.1	Zelllinien	26
2.1.1	IC21 Makrophagen	26
2.1.2	J774A.1 Makrophagen	26

2.1.3	L929 Fibroblasten	26
2.2	Medien und Lösungen für die Zellkultur	27
2.2.1	RPMI 1640 Medium	27
2.2.2	HBSS	27
2.2.3	HBSS – Ca ²⁺ - und Mg ²⁺ -frei	27
2.2.4	Click's Medium	28
2.2.5	Lösungen zur Trypsinierung von Zellen	28
2.2.5.1	Lösung A	28
2.2.5.2	Lösung B	28
2.2.5.3	Trypsin	28
2.2.6	D-PBS	29
2.2.7	Fetales Rinderserum	29
2.2.8	Trypanblau	29
2.2.9	Kristallviolett	29
2.3	Substanzen	29
2.3.1	Bakterielle Präparate und Lektine zur Modulation der Stickstoffmonoxid- und TNF α -Freisetzung aus Makrophagen	29
2.3.1.1	Bakterielle Präparate	29
2.3.1.2	Lektine	30
2.3.2	Allgemein verwendete Substanzen	30
2.4	Methoden	30
2.4.1	Kultivierung der IC21 Makrophagen	30
2.4.2	Kultivierung der J774A.1 Makrophagen	31
2.4.3	Kultivierung der L929 Fibroblasten	31
2.4.4	Trypsinierung	31
2.4.5	Trypanblau-Vitalitätstest	32
2.5	Desensibilisierung von Makrophagen – Methode nach Ziegler-Heitbrock	32
2.6	Behandlung von Makrophagen mit Mitomycin C	35
2.6.1	Desensibilisierung von Makrophagen nach Mitomycin C Behandlung	36
2.7	Auswertungsverfahren	39
2.7.1	Nitritmessung nach Griess	39
2.7.2	TNF α -Bioassay	40
2.8	Statistik	40
3	<u>Ergebnisse</u>	41
3.1	Einleitung	41
3.2	Etablierung des experimentellen Systems	41
3.2.1	Abhängigkeit der Stickstoffmonoxid-Produktion von Zellzahl und Stimulationsdauer	41

3.2.2	Charakterisierung des experimentellen Systems zur Desensibilisierung von Mausmakrophagen	45
3.3	Untersuchungen zur desensibilisierenden Wirkung von Lektinen auf Mausmakrophagen	51
3.3.1	Untersuchung zur Makrophagen desensibilisierenden Wirkung Galaktose bindender Lektine	51
3.3.2	Untersuchung zur Makrophagen desensibilisierenden Wirkung Glukose und Mannose bindender Lektine	59
3.3.3	Untersuchung zur Makrophagen desensibilisierenden Wirkung eines Fukose bindenden Lektins	71
3.3.4	Untersuchung zur Makrophagen desensibilisierenden Wirkung eines Oligosaccharid bindenden Lektins	73
3.4	Makrophagen desensibilisierende Wirkung des bakteriellen Extrakts OM-89	75
4	<u>Diskussion</u>	77
4.1	Einleitung	77
4.2	Die desensibilisierende Wirkung von Cholera-Toxin B auf Makrophagen	77
4.3	Desensibilisierende Wirkung von Lektinen auf Makrophagen	79
4.3.1	Makrophagen-modulatorische Wirkung Galaktose- spezifischer Lektine	80
4.3.2	Makrophagen-modulierende Wirkung Glukose- und Mannose-spezifischer Lektine	81
4.3.3	Makrophagen-modulatorische Wirkung des Fukose-spezifischen Lektins von Ulex europeaus	83
4.3.4	Makrophagen-modulatorische Wirkung eines Oligosaccharid-spezifischen Lektins von Phaseolus vulgaris	83
4.3.5	Zusammenfassende Bewertung der Makrophagen- desensibilisierenden Wirkung der untersuchten Lektine	84
4.3.6	Möglicher Mechanismus der lektin-induzierten Makrophagen Desensibilisierung	85
4.4	Möglicher Mechanismus der OM-89-induzierten Makrophagen-Desensibilisierung	90
4.5	Ausblick	92
5	<u>Zusammenfassung</u>	97
6	<u>Literaturverzeichnis</u>	98
7	<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	120

1 EINLEITUNG

1.1 Diabetes mellitus

1.1.1 Definition des Krankheitsbildes

Der Diabetes mellitus ist definiert als eine durch den Leitbefund chronische Hyperglykämie charakterisierte Regulationsstörung des Stoffwechsels, der entweder eine gestörte Insulinsekretion oder eine verminderte Insulinwirkung oder auch beides zugrunde liegt. Der Diabetes mellitus ist die häufigste endokrine Störung des Menschen. Die chronische Hyperglykämie führt über die diabetesspezifische Mikroangiopathie (Früharteriosklerose) zu Folgeerkrankungen, vorwiegend an Augen (diabetische Retinopathie), Nieren (Glomerulosklerose) und Nervensystem (diabetische Polyneuropathie) und über die diabetesassoziierte Makroangiopathie (Arteriosklerose) zu Folgeerkrankungen vorwiegend an Herz, Gehirn und peripheren Arterien [Scherbaum und Landgraf, 2002]. Die durch diese Komplikationen hervorgerufenen gesundheitlichen Schäden sind beachtlich und beeinflussen deutlich die Lebensqualität und die Lebensspanne der an Diabetes mellitus erkrankten Patienten.

Die Formen des Diabetes mellitus werden aus ätiologischen Gesichtspunkten folgendermaßen eingeteilt [The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997]:

- I. Typ 1 Diabetes mellitus
(Charakterisiert durch eine β -Zell-Zerstörung, die üblicherweise zum absoluten Insulinmangel führt)
 - A) Immunologisch
 - B) Idiopathisch
- II. Typ 2 Diabetes mellitus
(Charakterisiert durch Insulinresistenz und Insulinmangel, die in Kombination in unterschiedlichen Ausprägungen vorkommen können)
- III. Andere Diabetes-Typen mit bekannter Ursache
- IV. Gestationsdiabetes

1.2 Der Typ 1 Diabetes

Der Typ 1 Diabetes, auch juveniler Diabetes genannt, ist charakterisiert durch eine chronisch-progrediente Zerstörung der Insulin-produzierenden β -Zellen der Langerhans'schen Inseln im Pankreas. Der β -Zelluntergang geht einher mit einer Infiltration der Inseln mit mononukleären Zellen (Makrophagen und T-Lymphozyten), die sich wahrscheinlich auf dem Boden einer genetischen Prädisposition unter dem Einfluss von Umweltfaktoren entwickelt. Die Phase bis zur klinischen Manifestation der Erkrankung wird als prädiabetische Phase bezeichnet [Notkins und Lernmark, 2001; Rosmalen et al., 2000; Martin und Kolb, 1998]. Eine Zerstörung von 80 - 90 % der β -Zellmasse hat zur Folge, dass die Insulinproduktion nicht mehr ausreicht und sich ein Insulinmangelsyndrom einstellt. Die Manifestation der Erkrankung wird hauptsächlich bei Kindern, Jugendlichen oder jungen Erwachsenen beobachtet.

1.2.1 Epidemiologie

Der Typ 1 Diabetes ist die häufigste endokrine Erkrankung des Kindes- und Jugendalters. Im jungen Lebensalter (unter 25 Jahren) beruhen 90 % der Diabetesfälle auf einer Typ 1 Diabetes-Erkrankung. Weltweit zeigt sich eine Zunahme der Neuerkrankungsrate [Onkamo et al., 1999]. In Europa reicht die Inzidenz von 3,2 Fällen pro 100 000 / Jahr in Jugoslawien bis zu 40,2 Fällen pro 100 000 / Jahr in zwei Regionen Finnlands. Besonders hohe Erkrankungshäufigkeiten finden sich außerdem in Norwegen und Sardinien, dagegen ist die Diabetesinzidenz in England, Dänemark und den Niederlanden außergewöhnlich niedrig [EURODIAB ACE Study Group, 2000].

Nach aktuellen Schätzungen sind in Deutschland 10 000 - 15 000 Kinder und Jugendliche im Alter von 0 bis 14 Jahren [Neu et al., 2002; Rosenbauer et al., 2002] und in der Altersgruppe 0 bis 19 Jahre 21 000 - 24 000 Kinder und Jugendliche von einem Typ 1 Diabetes betroffen [Rosenbauer et al., 2002]. Im Mittel wurden für die 1990er Jahre Inzidenzraten von 12,9 bzw. 14,2 pro 100 000 Kinder im Alter von 0 - 14 Jahren und 17 pro 100 000 Kinder im Alter von 0 - 19 Jahren berichtet [Neu et al., 2001; Rosenbauer et al., 2002]. Der Anteil der Patienten mit Typ 1 Diabetes an allen Diabetespatienten in Deutschland wird gegenwärtig auf mind. 5 - 7 % geschätzt. Die Inzidenzrate steigt mit regionalen Unterschieden um 3 - 5 % pro Jahr.

1.2.2 Symptome der Erkrankung

Die Manifestationsformen des Typ 1 Diabetes variieren von Patient zu Patient. Das Insulinmangelsyndrom ist gekennzeichnet durch die klassischen Zeichen Polyurie, Polydipsie, Keto(azido)se, Polyphagie und Gewichtsverlust. Zu beobachten sind auch

sekundäre Enuresis nocturna, Mattigkeit und Leistungsschwäche. Zur Manifestation der Erkrankung kommt es häufig im Verlauf einer fieberhaften Infektion [Gross et al., 1993]. Das Spektrum der Manifestation des Insulinmangels reicht von der gestörten Glukosetoleranz (ca. 80 %) bis hin zur abrupt einsetzenden absoluten Insulinbedürftigkeit mit ketoazidotischer Stoffwechselentgleisung und möglichem Bewusstseinsverlust (ca. 5 %) [Scherbaum und Landgraf, 2002]. Nach Beginn der Insulintherapie setzt in der Regel eine unterschiedlich lang andauernde, vorübergehende Remissionsphase ein, die durch verringerten Insulinbedarf gekennzeichnet ist. Der Niedergang der β -Zellfunktion schreitet allerdings fort und führt schließlich zu einem vollständigen Verlust der Insulinsekretionskapazität. Dies zeichnet sich durch einen erneuten Anstieg des Insulinbedarfes aus.

1.2.3 Diagnosestellung

Als diagnostische Kriterien gelten mindestens zwei unabhängig voneinander gemessene Nüchternblutzuckerwerte über 120 mg / dl oder im oralen Glukosetoleranztest 2 h-Werte über 200 mg / dl nach oraler Aufnahme von 75 g Glukose [Gross et al., 1993]. Die Hyperglykämie und Glukosurie sichern die Diagnose.

Während der langen prädiabetischen Phase werden in den meisten Fällen Autoantikörper gegen Strukturen der Inseln und der β -Zellen gebildet. Als erster Suchtest wird die Bestimmung von Autoantikörpern gegen die Glutamatdekarboxylase (GAD65) und die Tyrosinphosphatase (IA-2) empfohlen. Bei Patienten mit neu aufgetretenem Typ 1 Diabetes wurden in 60 - 80 % der Fälle GAD65-Autoantikörper und in 60 - 70 % der Fälle IA-2-Autoantikörper nachgewiesen [Notkins, 2002; Knip, 2002].

Zusammengefasst kann durch die heute verfügbaren Methoden das individuelle Risiko für die Entwicklung eines Typ 1 Diabetes nicht nur bei erstgradig Verwandten von Typ 1 Diabetikern, sondern prinzipiell auch auf der Populationsebene abgeschätzt werden. Der Nachweis von Autoantikörpern gegen Insel- oder β -Zellstrukturen in der prädiabetischen Phase erlaubt die Identifikation von Personen mit einem erhöhten Risiko zur Entwicklung eines Typ 1 Diabetes [Notkins, 2002]. Die Bedeutung der Prädiktion des Typ 1 Diabetes ist von besonderer Wichtigkeit, da sie in Zukunft die Einleitung von präventiven Maßnahmen ermöglichen könnte.

1.2.4 Therapie

Das Ziel der Langzeitbehandlung des diabetischen Patienten ist die Einstellung einer Normoglykämie. Entscheidend für eine nachhaltige Behandlung des Typ 1 Diabetes ist eine Ausbalancierung von Diät, körperlicher Aktivität, Insulinsubstitution, aber auch die Prophylaxe

und Therapie von Komplikationen. Neben der konventionellen Therapie wird in einer Vielzahl von Studien versucht, bei Personen mit serologisch oder genetisch definiertem Risiko für Typ 1 Diabetes den Krankheitsfortschritt zu verhindern oder zumindest zu verzögern. Die bei Patienten und bei diabetischen Tieren erhobenen Befunde sprechen eindeutig dafür, dass durch eine entzündungsdämpfende bzw. Immuntoleranz-vermittelnde Behandlung die Progredienz des Krankheitsverlaufs verzögert oder sogar verhindert werden kann. Bei antigen-spezifischen Immuninterventionen wird z.B. die Verabreichung von subkutanem Insulin, die orale oder nasale Gabe von Insulin (DPT-1 Studie – Diabetes Prevention Trial-Type 1) [Schatz et al., 2001; Wilson et al., 2001] oder die mehrfache Applikation von Peptiden, z.B. des DIAPep277 erprobt, einer synthetischen Form des p277-Peptids, das vom 60-kDa-Hitzeschockprotein HSP 60 abgeleitet ist [Raz et al., 2001]. Von besonderer Bedeutung hinsichtlich präventiver Maßnahmen sind die Studien, bei denen durch diätetische Intervention im Tiermodell [Karges et al., 1997] oder beim Menschen (TRIGR – Trial to Reduce IDDM (Insulin Dependent Diabetes Mellitus) in the Genetically at Risk [Wilson et al., 2001]) versucht wird, die Inzidenz des Typ 1 Diabetes zu beeinflussen. Die diätetischen Interventionen sind vor allem in dem Verdacht begründet, dass die Aufnahme von komplexen Proteinen aus Kuhmilch, Weizen (Gluten) oder Soja, an der Entwicklung des Typ 1 Diabetes beteiligt sind.

Die bisher durchgeführten Studien zur β -Zellprotektion mit Substanzen wie Nicotinamid (DENIS-Studie – Deutsche Nicotinamide Intervention Study [Lampeter et al., 1998a] und ENDIT-Studie – European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial [Schatz et al., 2001; Gale et al., 2004]) zeigten keine Reduktion in der Inzidenz des Typ 1 Diabetes. Die Anwendung von Immunsuppressiva wie Cyclosporin A konnte nach Manifestation der Erkrankung eine Verlängerung der Remissionsphase bewirken [Canadian European Diabetes Study Group, 1988]. Neuere Ergebnisse zur Insel(zell)transplantation beim Menschen sind ermutigend. Dabei bestehen allerdings Bedenken bezüglich der begrenzten Dauer der Transplantatfunktion und der Nebenwirkungen der kontinuierlich eingesetzten Immunsuppressiva [Kessler et al., 2002].

1.2.5 Komplikationen

Akute, lebensbedrohende Stoffwechsellentgleisungen im Verlauf der Erkrankung können in Form von ketoazidotischem und hypoglykämischem Koma auftreten. Auf lange Sicht spielen jedoch in Bezug auf Morbidität und Mortalität die Spätkomplikationen eine wichtigere Rolle. Diese treten meistens nach ca. 10 - 20 Jahren Diabetesdauer auf. Die diabetische Makroangiopathie kann zu Hypertonie, koronarer Herzkrankheit, peripheren arteriellen Durchblutungsstörungen und zerebralen Insulten führen. Des Weiteren kann eine Mikroangiopathie zur Nephropathie und diabetischen Retinopathie führen. Als weitere Spätkomplikation ist die Neuropathie zu nennen, die als periphere Neuropathie zu Schmerzen, trophischen Störungen, schlecht

heilenden Ulzera und Charcot-Gelenken, oder als autonome Neuropathie zu gastrointestinalen Störungen oder Herz-Kreislaufbeschwerden bis hin zum plötzlichen Herzstillstand führen kann [Gross et al., 1993].

1.2.6 Ätiologie und Pathogenese

Der Typ 1 Diabetes ist charakterisiert durch ein Insulinmangelsyndrom, das im Verlauf einer chronisch-fortschreitenden Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen im Rahmen einer Entzündung der Langerhans'schen Inseln (Insulitis) des Pankreas auftritt. Die Erkrankung wird erst nach längerem subklinischem Verlauf klinisch manifest.

Die Ätiologie und Pathogenese des Typ 1 Diabetes sind bis jetzt noch nicht sicher erschlossen. Studien beim Menschen unterstützen die Vermutung, dass der Krankheitsprozess pränatal oder schon bald nach der Geburt beginnt [Ziegler et al., 1993; Leslie und Elliott, 1994]. Es werden komplexe Vorgänge in Betracht gezogen, die zu Entstehung und Fortschreiten der Insulitis und somit der Erkrankung beitragen können. Dazu zählen die genetische Prädisposition [Badenhoop, 1996; Kimpimäki et al., 2002], der Einfluss verschiedener Umweltfaktoren wie z.B. Viren (Entero-Viren, Röteln-Virus) [Sadeharju et al., 2003; Szopa et al., 1993] und Nahrungsmittelbestandteile wie z.B. Caseinarten in der Kuhmilch [Virtanen und Knip, 2003]. Durch den Nachweis von Autoantikörpern (GAD, IA2, IAA (Insulinautoantikörper), ICA (Inselzellantikörper)) und einer gesicherten genetischen Korrelation von bestimmten Hochrisiko-HLA-Typen mit dem Auftreten von Typ 1 Diabetes wird davon ausgegangen, dass dieser Erkrankung eine immunvermittelte Zerstörung autologer, insulinproduzierender β -Zellen zu Grunde liegt [Kimpimäki et al., 2002; Kolb und Kolb-Bachofen, 2000; Freiesleben De Blasio et al., 1999]. Andere Zelltypen der Langerhans'schen Inseln sowie das exokrine Pankreas bleiben von den destruktiven inflammatorischen Prozessen weitgehend verschont. Es wird angenommen, dass die β -Zelle Stresssignale (z.B. Hitzeschockproteine) exprimiert und als Folge der daraufhin stimulierten Immunreaktion durch Makrophagen und spezifische T-Lymphozyten zerstört wird. Es kommt somit zu einem Verlust der Immuntoleranz gegen die körpereigenen β -Zellen [Notkins und Lernmark, 2001]. Zahlreiche Befunde weisen auf eine Beteiligung autoreaktiver Prozesse an der Ätiopathogenese des Typ 1 Diabetes hin.

Im Tiermodell des humanen Typ 1 Diabetes findet sich in den Inseln, bei der klinischen Manifestation des Insulinmangeldiabetes, eine floride Infiltration mit mononukleären Zellen [Rosmalen et al., 2000b; Burkart und Kolb, 1996; Kolb-Bachofen et al., 1992]. Zum Zeitpunkt der klinischen Diagnose lassen sich bei bis zu 80 % aller Patienten inselspezifische Autoantikörper nachweisen [Kimpimäki et al., 2002; Notkins und Lernmark, 2001]. Eine immunsuppressive Therapie bei frisch manifestem Typ 1 Diabetes, z.B. mit Cyclosporin A, führt zu einer Verzögerung der β -Zellzerstörung mit gehäuft auftretenden Remissionen und einer Verlängerung der Remissionsdauer [Kolb, 1994; Kolb und Gale, 2001]. Aufgrund der

nur begrenzten Therapieerfolge und der damit einhergehenden Nebenwirkungen wurde der Ansatz einer Immunsuppressivatherapie allerdings wieder weitgehend verlassen [Kolb und Gale, 2001]. Martin et al. beschrieben 2001 einen Patienten mit bekannter Störung der B-Lymphozyten-differenzierung (X-chromosomal-rezessiv erbliche Agammaglobulinämie (Bruton-Syndrom)), der an Typ 1 Diabetes erkrankte. Dieser Befund unterstreicht, dass die immunvermittelte Reaktion gegen β -Zellen eher durch T-Lymphozyten als durch B-Lymphozyten vermittelt wird. Bei dem betroffenen Patienten konnten aktive T-Zellen gegen Inselautoantigene nachgewiesen werden [Martin et al., 2001]. Eine Übertragung der Erkrankung ist sowohl bei Menschen [Lampeter et al., 1998b], als auch im Tiermodell [Wicker et al., 1988; Nakano et al., 1988] durch Knochenmarkstransplantation nachgewiesen worden. Der Typ 1 Diabetes kann mit anderen Autoimmunerkrankungen assoziiert auftreten wie z.B. mit der Hashimoto-Thyreoiditis oder der Zöliakie [Leslie et al., 2001; De Block et al., 2001].

1.2.7 Genetik

Eine familiäre Häufung des Diabetes mellitus wurde schon im Altertum beobachtet. Durch molekulargenetische Untersuchungen wurde das Auftreten von Typ 1 Diabetes mit einer besonders deutlichen Korrelation mit bestimmten Genen des Haupthistokompatibilitätskomplexes Klasse II (MHC II) auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 belegt. Zu den Hochrisiko-HLA-Typen zählen HLA DR, DP, DQ und insbesondere die HLA-Konstellation DQA1*0301-DQB1*0302 und DQA1*0501-DQB1*0201 [Badenhoop, 1996; Kimpimäki et al., 2002]. Insgesamt wird den HLA-Genen eine zentrale Rolle bei der Kontrolle der Immunantwort zugesprochen [Badenhoop, 1996; Lernmark, 1999]. Es gibt auch weitere Gene, die allerdings eine nicht so strenge Korrelation aufweisen wie z.B. das Insulin-Gen, das mit ca. 10 % zur familiären Disposition beiträgt [Badenhoop, 1996]. Bei 90 % der Patienten mit Typ 1 Diabetes liegt eine spontane Form und nur bei 10 % liegt eine familiäre Form vor. Das Diabetes-Risiko für Kinder, deren Eltern einen Typ 1 Diabetes haben, beträgt 4 %, wobei Väter mit der Erkrankung ein etwas höheres Risiko vermitteln (5 %), als Mütter (2,5 %). Bei eineiigen Zwillingspaaren sind nur in 30 - 50 % beide Zwillinge betroffen und Geschwister, die mit einem bereits erkrankten Kind HLA identisch sind, und dazu den Typ DR3/DR4-DQ2/DQ8 haben, tragen das höchste statistische Risiko von 18 - 20 % an Typ 1 Diabetes zu erkranken. Halbidentische Geschwister tragen ein Risiko von 3 - 7 %. Das Risiko der Allgemeinbevölkerung in Deutschland an Typ 1 Diabetes zu erkranken liegt bei 0,2 - 0,4 % [Badenhoop, 1996]. Anhand dieser Befunde zeigt sich, dass das Risiko an Typ 1 Diabetes zu erkranken, nicht alleine von genetischen Faktoren abhängt. Umwelteinflüsse werden als wichtige zusätzliche Faktoren in der Ätiopathogenese des Typ 1 Diabetes erachtet.

1.2.8 Umweltfaktoren als mögliche Auslöser des Typ 1 Diabetes

Die besondere Bedeutung von Umweltfaktoren bei der Pathogenese des Typ 1 Diabetes wird eindrucksvoll aus den Ergebnissen der Zwillingsforschung ersichtlich. Die Wahrscheinlichkeit, dass eineiige Zwillinge konkordant an Typ 1 Diabetes erkranken beträgt nur 13 - 33 % [Barnett et al., 1981; Kaprio et al., 1992]. Ein weiteres wesentliches Argument für die Beteiligung von exogenen Faktoren ist die Beobachtung starker geographischer Unterschiede in der Inzidenz des Typ 1 Diabetes sowie die ständig steigende Erkrankungsprävalenz [Gale, 2002]. In Finnland zeigen 20 % der Bevölkerung eine genetische Prädisposition für Typ 1 Diabetes. Davon erkranken aber nur weniger als 1 % an Typ 1 Diabetes in den ersten 20 Lebensjahren [Ilonen et al., 1996]. Alle angeführten Argumente unterstützen die Überlegung, dass neben der genetischen Prädisposition des Typ 1 Diabetes, exogene Faktoren die Krankheitsentstehung und den Krankheitsverlauf in besonderem Maße beeinflussen. Verschiedene exogene Trigger, wie z.B. Toxine (Nitrit und Nitrate), Nahrungsbestandteile (z.B. Kuhmilchprotein (Casein), Gluten-reiche Ernährung) und Viren (insbesondere Coxsackie B- und Röteln-Virus aber auch Mumps-, Ebstein-Barr und Cytomegalie Virus) [Szopa et al., 1993; Sadeharju et al., 2003; Jun und Yoon, 2003] werden als Auslöser für den immunvermittelten Prozess der β -Zellzerstörung diskutiert [Virtanen und Knip, 2003].

In einer schwedischen [Dahlquist et al., 1990] und einer finnischen Studie [Virtanen et al., 1994] wurde gezeigt, dass ein erhöhter Konsum von Nahrungsmitteln, die vermehrt Nitratprodukte enthalten, das Risiko von Kindern an Typ 1 Diabetes zu erkranken um das 2,5 bis 4,5fache erhöhen. Kuhmilchproteine gehören zu den ersten diätetischen Risikokandidaten, die eine Entstehung eines Typ 1 Diabetes begünstigen können [Åckerblom et al., 1996; Åckerblom und Knip, 1998; Harrison und Honeyman, 1999]. Die Bedeutung der Kuhmilch/Rinderserumalbuminzufuhr (Casein) bei Kindern – insbesondere bei Säuglingen in den ersten Lebensmonaten – wird hinsichtlich des erhöhten Risikos für die Entwicklung eines Typ 1 Diabetes auf Grund von widersprüchlichen epidemiologischen Daten kontrovers diskutiert [Virtanen und Knip, 2003]. In einigen Studien konnte eine Assoziation zwischen Milchkonsum und häufigerem Auftreten von Typ 1 Diabetes nachgewiesen werden [Virtanen et al., 1998; Virtanen et al., 2000], während andere Studien keinen Zusammenhang sehen [Dahlquist et al., 1990; Virtanen et al., 1994]. Bei Kindern mit frisch diagnostiziertem Typ 1 Diabetes konnte eine erhöhte Anzahl von Antikörpern gegen Kuhmilchproteine nachgewiesen werden [Savilahti et al., 1988]. In der finnischen DIPP-1 Studie (Finnish type 1 diabetes prediction and prevention project) wurde festgestellt, dass eine kurze Stillphase und ein frühzeitiger Beginn mit Formulanahrung auf Kuhmilchproteinbasis zu einem Anstieg der Titer der für einen Typ 1 Diabetes prädiagnostischen Autoantikörper führt [Kimpimäki et al., 2001]. Die Pilotstudie TRIGR zeigte, dass die Ernährung mit hydrolysiertem Formulanahrung eine Senkung der Titer, der mit Typ 1 Diabetes assoziierten Antikörper, bei Kindern unter 2 Jahren bewirkt [Åckerblom et al., 1999]. Versuche in Tiermodellen des Typ 1 Diabetes (an NOD-Maus (Nonobese Diabetic)

und BB-Ratte (BioBreeding)) haben ergeben, dass Pflanzenproteine, insbesondere Gluten aus Weizen, deutlich diabetogener sind als die Beimengung von Trockenmilchpulver zum Nagetierfutter [Scott, 1996; Scott et al., 1997; Wasmuth und Kolb, 2000]. Neue Daten aus der finnischen DIPP-1 Studie zeigen, dass eine frühe Enterovirusinfektion und kuhmilchhaltige Formulanahrung bei Kindern zu einer erhöhten Sensibilisierung gegen bovines Insulin aus der Formulanahrung führt [Vaarala et al., 2002]. Interessanterweise wurde andererseits auch eine protektive Wirkung von Getreide hinsichtlich des Risikos an Typ 1 Diabetes zu erkranken festgestellt [Muntoni et al., 2000].

1.3 Die Pathogenese des Typ 1 Diabetes – zelluläre und molekulare Mechanismen

Die Ursache der Entstehung des Typ 1 Diabetes ist bisher nicht geklärt. Die Pathogenese erscheint sehr komplex. Neben genetischen Faktoren scheinen Umweltfaktoren (v.a. Ernährung und Infektionen) eine wesentliche Rolle zu spielen. Erkenntnisse zur Pathogenese der Erkrankung können im Wesentlichen aus kinetischen Studien in Tiermodellen des Typ 1 Diabetes abgeleitet werden. Hierbei konnten klar abgrenzbare Stadien der Inselentzündung definiert werden. Aufgrund einer bisher nicht genau geklärten Immundysregulation kommt es zu einer primären Infiltration der Langerhans'schen Inseln des Pankreas durch Makrophagen [Hanenberg et al., 1989; Martin und Kolb, 1998]. Während der frühen Phase, der „Peri-Insulitis“, befinden sich die infiltrierenden Immunzellen überwiegend in der Peripherie der Insel [Burkart und Kolb, 1996; Dahlén et al., 1998]. Es gibt auch vereinzelte Befunde aus Pankreasbiopsien von Patienten mit Typ 1 Diabetes, die unmittelbar nach Diagnose der Erkrankung erhoben wurden. Diese zeigen ebenfalls eine Infiltration der Inseln mit Makrophagen und T-Lymphozyten [Itoh et al., 1993; Imagawa et al., 2001]. T-Lymphozyten können aufgrund ihrer Oberflächenstrukturen grundsätzlich in CD4⁺ (Helfer)- und CD8⁺ (Zytotoxische/Suppressor)-Lymphozyten unterschieden werden [Mosmann und Coffmann, 1987]. Anhand der unterschiedlichen sezernierten Zytokine können die CD4⁺-Lymphozyten in T-Helfer 1 (TH1) (Interferon γ (IFN γ), IL-2, TNF- β) und T-Helfer 2 (TH2) (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13) Lymphozyten unterschieden werden [Heurtier und Boitard, 1997]. Die Freisetzung der Zytokine ist von zentraler Bedeutung für die Interaktionen zwischen antigenpräsentierenden Zellen (Makrophagen, dendritischen Zellen) und T-Lymphozyten. Die TH1- und TH2-Zellen können sich durch ihre Zytokine gegenseitig in ihren Aktivitäten regulieren, indem TH1-Zytokine TH2-Zellen inhibieren und umgekehrt. Diese Vorgänge haben entscheidende Auswirkungen auf die Progression der β -Zellzerstörung und somit auch auf den Krankheitsverlauf [Mandrup-Poulsen, 2003].

Anhand immunhistochemischer Färbungen von Zytokinen im Schnitt des nativen Pankreas von NOD-Mäusen mit Cyclophosphamid-beschleunigtem Diabetes konnte gezeigt werden,

dass eine frühe nicht destruktive Peri-Insulitis durch die Expression des TH2-Zytokins IL-4 charakterisiert ist, während das TH1-Zytokin IFN γ bei der späten destruktiven intransulären Form der Insulitis dominiert [Rothe et al., 1994]. Dies weist darauf hin, dass der Krankheitsprozess zunächst durch TH2-Zellen dominiert wird und sich dann in eine destruktive TH1-abhängige Phase weiterentwickelt [Martin und Kolb, 1998].

1.3.1 Die Rolle der Makrophagen in der β -zellgerichteten Immunreaktion

Makrophagen sind mononukleäre Zellen des Monozyten-Makrophagensystems und gehören zum unspezifischen Immunsystem. Sie können Mikroorganismen (Bakterien), Fremdkörper und Zelltrümmer phagozytieren, speichern oder als antigen-präsentierende Zellen diese Antigene auf der Zelloberfläche präsentieren. Wichtige Funktionen haben die Makrophagen in der Induktion und Regulation von Entzündungsvorgängen, bei der Stimulation von Lymphozyten, und als mikrobizide, zytotoxische Zellen sind sie von zentraler Bedeutung für die zellvermittelte Immunität. Nach Ausreifung im Knochenmark zirkulieren sie 1-2 Tage im Intravasalraum als Monozyten (Blutmakrophagen), bevor sie in verschiedene Gewebe einwandern und sich dort zu ortsständigen gewebetypischen Makrophagen differenzieren [Ppsychrembel, 2002]. Dendritische Zellen und Makrophagen sind in den Tiermodellen der BB-Ratten [Kolb-Bachofen und Kolb, 1989] und der NOD-Mäuse [Lee et al., 1988] im Verlauf der Pathogenese des Insulinmangel-Diabetes als erste infiltrierende Immunzellen in den Pankreasinseln nachweisbar. Die von Ihnen produzierten Zytokine wie IL-1 und TNF α aber auch das reaktive Radikal Stickstoffmonoxid (NO) wirken schädigend auf die β -Zellen [Heurtier und Boitard, 1997; Dahlén et al., 1998]. Detaillierte Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Makrophagen und ihre Mediatoren wie NO und TNF α bei der Entwicklung einer β -zellgerichteten Immunreaktion eine bedeutende Rolle spielen [Jun et al., 1999]. Untersuchungen von Pankreasinseln aus Tieren mit Streptozotocin-induziertem Diabetes und aus spontan diabetischen BB-Ratten zeigten eine initiale Zerstörung von Inselzellen durch Makrophagen [Kolb-Bachofen und Kolb, 1989; Kolb-Bachofen et al., 1992]. Erst im späteren Verlauf der Erkrankung wurden die Langerhans'schen Inseln neben den Makrophagen mit T-Lymphozyten, natürlichen Killerzellen (NK), B-Lymphozyten und weiteren Makrophagen massiv infiltriert. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass durch die Gabe von makrophagentoxischen Silika-Partikeln die Entstehung des Diabetes in BB-Ratten [Oschilewski et al., 1985], in NOD-Mäusen [Lee et al., 1988] und in Streptozotocin-behandelten Mäusen verhindert werden kann [Oschilewski et al., 1986]. Die aktivierten Makrophagen haben eine bedeutende Rolle in der Stimulation der zytotoxischen T-Lymphozyten [Yoon et al., 1998]. Der Transfer von Milz-T-Lymphozyten aus NOD-Mäusen, in der die Makrophagen inaktiviert wurden, in NOD.scid-Mäuse führte innerhalb von 10 Wochen in keiner dieser Tiere zu Diabetes [Jun et al., 1999]. Dagegen zeigten die NOD.scid-Mäuse eine rasche Diabetesentwicklung

beim Transfer von Milz T-Lymphozyten aus der NOD-Kontrollgruppe ohne deaktivierten Makrophagen [Jun et al., 1999]. Transplantierten Inselzellen in makrophagen depletierten NOD-Mäuse blieben intakt im Vergleich zu den Inselzellen, die in der Kontrollgruppe (nicht makrophagendepletiert) transplantiert wurden.

Die antigenspezifisch aktivierten T-Lymphozyten führen zu einer Verstärkung der Inselinfiltration durch T-Lymphozyten, NK-Zellen, Makrophagen und letztendlich der B-Lymphozyten [Kolb-Bachofen und Kolb, 1989]. Im weiteren Verlauf der Inselinfiltration kommt es zu einer vollständigen Zerstörung der β -Zellen und zur Manifestation eines Insulinmangeldiabetes.

1.3.2 Stickstoffmonoxid und die Rolle in der β -Zellschädigung

NO ist ein Molekül, das aus einem Stickstoff- und einem Sauerstoffatom besteht. Unter aeroben Bedingungen bildet es ein instabiles Radikal. Aufgrund seiner Halbwertszeit von nur wenigen Sekunden wirkt es nur in unmittelbarer Nähe der Zellen, von denen es freigesetzt wird. NO ist ein wichtiger biologischer Mediator, der von NO-Synthasen (NOS) aus dem Substrat L-Arginin produziert wird [Nathan, 1992; Moncada et al., 1991]. Bisher wurden drei Isoformen der NO-Synthase beschrieben. Die neuronale Isoform (nNOS) und die endotheliale Isoform (eNOS) produzieren im Vergleich zur induzierbaren NO-Synthase-Isoform (iNOS) nur geringe Mengen NO [Newman et al., 2004]. Das von den ersten beiden NOS-Isoformen gebildete NO kann die Zytokin- und Chemokinexpression inhibieren, sowie die Leukozytenadhäsion und Transmigration hemmen [Guzik et al., 2003]. Nach einem immunologischen oder inflammatorischen Reiz zeigen durch die iNOS freigesetzte große NO-Mengen eine toxische und pro-inflammatorische Wirkung mit zytostatischen und zytotoxischen Effekten auf u.a. Parasiten, Pilze, Bakterien, Tumorzellen und Lymphozyten. Die hohen NO-Spiegel können allerdings auch gesundes Gewebe schädigen [Kröncke et al., 1995; Guzik et al., 2003]. Die iNOS wurde zuerst in murinen Makrophagen identifiziert [Lyons et al., 1992; Xie et al., 1992]. Das Enzym ist Ca^{2+} -unabhängig und wird durch IL-6, IL-1 β , IFN γ , TNF α und bakterielle Endotoxine auf transkriptioneller Ebene induziert. Die Regulation der iNOS-Induktion ist zusätzlich gewebe- und speziesabhängig [Kröncke et al., 1995].

Experimentell gewonnene Ergebnisse im Tiermodell des Typ 1 Diabetes (NOD-Mäuse und BB-Ratten) sprechen für eine Rolle der aktivierten Makrophagen als zelluläre Quelle von betazellschädigendem NO in der Initiierung der β -Zelldestruktion in vivo [Burkart und Kolb, 2000]. Immunzytochemische Untersuchungen von Pankreata diabetessusceptibler BB-Ratten zeigten eine deutliche Expression der induzierbaren iNOS im Bereich inselinfiltrierender Makrophagen und bei Untersuchungen in der NOD-Maus konnte eine erhöhte iNOS-Expression in den Makrophagen selbst nachgewiesen werden [Kleemann et al., 1993; Kolb-Bachofen 1996; Rabinovitch et al., 1996; Reddy et al., 1997]. In Kokulturen mit Inselzellen zeigten Makrophagen eine ausgeprägte zytotoxische Aktivität gegenüber mitkultivierten

Inselzellen [Appels et al., 1989]. Eine Separation der Makrophagen von den Inselzellen über kleine Strecken durch eine Membran schützte die Inselzellen vor Lyse durch die Makrophagen [Burkart und Kolb, 1996]. Diese Beobachtungen unterstützen die Vermutung, dass NO eines der wichtigsten inseltoxischen Produkte der Makrophagen ist. Ein wichtiges proinflammatorisches Zytokin, das ebenfalls von Makrophagen sezerniert wird, ist TNF α . TNF α aktiviert autokrin die induzierbare NO-Synthase der Makrophagen und somit die Produktion von NO [Cetkovic-Cvrlje und Eizirik, 1994].

1.3.3 TNF α und die Rolle in der β -Zellschädigung

TNF α wurde ursprünglich über seine zytotoxische und zytostatische Eigenschaft gegenüber murinen und humanen Tumorzellen beschrieben [Carswell et al., 1975]. Das Gen für TNF α liegt in nur einer Kopie vor und befindet sich beim Menschen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 (bei Nagern auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17) an der Grenze der MHC Klasse I und MHC Klasse III Regionen [Vilcěk und Lee, 1991]. TNF α gehört zur Familie der Typ II Membranproteine und kommt in einer membrangebundenen und in einer löslichen Form vor. Die lösliche Form wird durch Proteolyse von der zellgebundenen Form generiert [Kriegler et al., 1988]. TNF α bindet an zwei unterschiedliche Rezeptoren (TNF-R55 und TNF-R75), die auf einer Vielzahl von humanen und murinen Zellen nachgewiesen worden sind [Bazzoni und Beutler, 1995; Loetscher et al., 1990; Dembic et al., 1990]. Das Zytokin wird hauptsächlich von Makrophagen und Monozyten sezerniert, aber auch andere Zellen des peripheren Blutes wie z.B. T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Granulozyten und NK-Zellen können TNF α produzieren [Aggarwal und Natarajan, 1996]. Die TNF α -Produktion von Makrophagen ist durch verschiedene Stimuli induzierbar, insbesondere durch bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), aber auch Pilze, Viren und Zytokine wie IL-1 sowie TNF α selbst haben einen stimulierenden Effekt [Aggarwal und Natarajan, 1996]. TNF α ist ein pleiotropes Zytokin mit proinflammatorischen, immunmodulatorischen und zytotoxischen Eigenschaften. Es zeichnet sich hiermit, wie viele andere Zytokine auch, durch seine unterschiedlichen, teilweise gegensätzlichen Wirkungen aus. TNF α ist ein wichtiger Mediator des unspezifischen und spezifischen Immunsystems bei der Bekämpfung von Infektionen oder Tumoren. Es stimuliert die Proliferation von Lymphozyten und Granulozyten [Haas et al., 1999]. TNF α scheint zudem ein wichtiger Regulationsfaktor bei der Reifung und Prägung der T-Lymphozyten zu sein [Yang und McDevitt, 1994]. Andererseits führt die exzessive Sekretion von TNF α zu toxischen Effekten, die sich in Form von Gewichtsverlust, intravasaler Koagulopathie, Schock und Tod zeigen können [Tracey und Cerami, 1994]. TNF α wirkt auch als ein autokrines Zytokin auf Makrophagen. So ist es möglich sowohl in vivo als auch in vitro durch die Gabe von Antikörpern gegen TNF α die NO-Produktion von murinen Makrophagen zu reduzieren [Cunha et al., 1994]. Antikörper gegen TNF α verhindern die NO-

Produktion beim septischen Schock [Thiemermann et al., 1993]. Tierversuche haben gezeigt, dass TNF α ein wichtiger Mediator in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes darstellt. In den mit Makrophagen oder aktivierten CD4⁺-T-Lymphozyten infiltrierte Pankreasinseln des NOD-Mausmodells, wurde TNF α nachgewiesen [Dahlén et al., 1998; Ventura-Oliveira et al., 2002]. Im Zusammenspiel mit anderen Zytokinen wie IL-1 und IFN γ wirkt TNF α direkt zytotoxisch auf β -Zellen in vitro [Cetkovic-Cvrlje und Eizirik, 1994]. Es wurde gezeigt, dass die zytotoxische Wirkung von TNF α hauptsächlich durch die Induktion von NO in den β -Zellen mediiert wird [Corbett et al., 1993; Cetkovic-Cvrlje und Eizirik, 1994].

Versuche im Tiermodell zeigten, dass durch die Behandlung von Mäusen mit niedrigen Dosen von humanem TNF α , eine partielle Toleranzinduktion gegenüber TNF α , und somit gegen einige der TNF α -Wirkungen, induziert werden kann. Diese partielle Toleranzinduktion ist nicht auf eine Herunterregulierung der TNF α -Rezeptoren zurückzuführen [Takahashi et al., 1995]. Der Effekt der Toleranzinduktion kann nicht nur durch TNF α sondern auch durch LPS induziert werden. Makrophagen, die mehrmals mit LPS behandelt werden, entwickeln eine deutliche Toleranz gegenüber LPS und zeigen somit ein verändertes Reaktionsverhalten gegenüber diesem Stimulus (siehe Abschnitt 1.4.1).

Die Toleranzinduktion stellt ein zentrales Prinzip der Immunregulation dar, aufgrund dessen eine Limitation von immunregulatorischen Aktivitäten bzw. eine Desensibilisierung gegenüber bestimmten Stimulanzien erreicht werden kann.

1.4 Toleranzinduktion

1.4.1 Toleranzinduktion gegenüber Lipopolysaccharid

LPS ist ein wesentlicher Bestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien und kann über spezielle Membranrezeptoren wie CD 14 [Ziegler-Heitbrock et al., 1994] und den Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) [Hallman et al., 2001] an CD14⁺-Makrophagen [Medvedev et al., 2000] und Monozyten [Haas et al., 1990; Mirlashari und Lyberg, 2003; Dunzendorfer et al., 2004] aber auch an CD14-Zellen wie Fibroblasten und endotheliale Zellen [Vink et al., 2002; Noteboom et al., 2004] binden und diese stimulieren. Diese Rezeptoren stehen am Anfang einer Signaltransduktionskaskade, die zur Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors NF κ B führt [Raetz et al., 1991; Müller et al., 1993; Chow et al., 1999; Hallman et al., 2001]. Nach Stimulation LPS-sensitiver Zellen werden verschiedene immunmodulatorische und inflammatorische Zytokine sezerniert [Ziegler-Heitbrock, 1995]. Die Ausschüttung von TNF α , NO und anderen inflammatorischen Zytokinen (IL-1, IL-6, IL-12) führt zum klinischen Bild einer Sepsis oder eines septischen Schocks, das mit Fieber, Leukopenie, disseminierter intravasaler Gerinnung, Hypotonie und Tod einhergehen kann [Zingarelli et al., 1995; Fujihara et al., 2003].

Der Begriff der Toleranzinduktion ist aus der Pharmakologie sehr gut bekannt.

β -adrenerge Substanzen induzieren die Zunahme von intrazellulärem cAMP (zyklisches Adenosin-Monophosphat). Nach wiederholten Gaben eines β -adrenergen Medikaments stellt sich ein Zustand der Toleranz ein, der sich darin äußert, dass dieser Effekt deutlich nachlässt [Hausdorff et al., 1990]. Das Phänomen der Toleranzinduktion gegenüber LPS wurde erstmalig von Beeson et al., 1947 bei Kaninchen beschrieben, denen diese Substanz wiederholt injiziert wurde. In diesen Tieren führte die zweite LPS-Gabe zu einer Fiebersenkung. Weiterhin zeigte Beeson, dass die Toleranzinduktion zeitlich limitiert ist. So konnte gezeigt werden, dass die LPS-Toleranz für die Dauer von zwei bis drei Wochen aufrecht erhalten werden konnte [Beeson et al., 1947]. Der repetitive (zweimalige) Kontakt eines Organismus mit einem inflammatorischen Agens führte somit zu einer deutlichen Reduktion der durch den primären Kontakt ausgelösten Reaktion. Die sogenannte „LPS-Toleranz“ ist nicht das Ergebnis einer funktionellen Schädigung der Zelle, sondern eine sehr gut kontrollierte Antwort, die eine exzessive Ausschüttung inflammatorischer Zytokine im Organismus verhindert und ein protektiver Mechanismus gegen die Folgen von bakteriellen Infektionen zu sein scheint [Ziegler-Heitbrock, 1995]. Während der Toleranzinduktion finden Veränderungen auf der Transkriptionsebene statt. Nach dem ersten LPS-Kontakt wird der NF κ B-Komplex in seiner Zusammensetzung verändert (die NF κ B Untereinheit p50 wird hochreguliert), was dazu führt, dass keine weiteren Transkriptionsvorgänge induziert werden können [Ziegler-Heitbrock, 1995]. Das Phänomen der Toleranzinduktion gegenüber LPS mit Reduktion der TNF α -Produktion wurde auf Makrophagen- und Monozytenebene bestätigt [Mathison et al., 1990; Fujihara et al., 2003]. Mäuse, die eine Injektion mit LPS-vorinkubierten Makrophagen erhalten haben, zeigten bei anschließender LPS-Exposition keinen septischen Schock. Die mit LPS vorinkubierten Makrophagen zeigten keinen protektiven Effekt, wenn sie den Mäusen gleichzeitig oder nach der zweiten LPS-Exposition, verabreicht wurden [Freudenberg et al., 1988; Fitting et al., 2004]. Bei Untersuchungen von septischen Patienten wurden ähnliche Ergebnisse erzielt. Eine LPS-Stimulation von Monozyten und Leukozyten aus dem Blut der erkrankten Patienten zeigte eine erniedrigte Produktion von TNF α [Setrakian et al., 1994]. Im Zustand der LPS-Toleranz konnte auch eine Verminderung der NO-Produktion nachgewiesen werden. Murine Makrophagen, die mit LPS vorinkubiert wurden, zeigten nach der Gabe eines zweiten LPS-Stimulus eine Reduktion in der NO-Produktion [Severn et al., 1993; Zingarelli et al., 1995]. Interessanterweise wurde gezeigt, dass durch eine Vorbehandlung der Makrophagen mit anderen Substanzen, wie Cholera-Toxin B (CTB) oder Zytokinen (TNF α oder IL-1) eine Toleranzinduktion ebenfalls gegenüber LPS hervorgerufen werden kann [Ziegler-Heitbrock, 1995]. Der Mechanismus dieser als Kreuztoleranz bezeichneten Reaktion ist noch nicht vollständig geklärt.

1.4.2 Toleranzinduktion gegenüber Cholera-Toxin B

Das Cholera-Toxin wird vom gramnegativen Bakterium *Vibrio cholerae* sezerniert und führt bei Menschen zu schweren Durchfallerkrankungen [Pschyrembel, 2002]. Die B-Untereinheit des Cholera Toxins (CTB) besteht aus einem stabilen, nichtkovalent gebundenen pentamerischen Ring und bildet gemeinsam mit der toxischen Cholera-Toxin-A-Untereinheit (CTA), das Cholera-Toxin. Jedes einzelne Monomer des CTB besitzt einen Rezeptor für das G_{M1} -Gangliosid [Merritt et al., 1998], das sich in der Membran von Säugetier-Zellen befindet. CTB besitzt damit definitionsgemäß Eigenschaften eines Lektins (siehe 1.6.1.1). Durch die Bindung an die Zielzelle ermöglicht CTB das Eindringen der toxischen CTA-Untereinheit in die Zelle [Aman et al., 2001].

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass CTB neben seiner Vektorfunktion auch ein potenter Immunmodulator ist. Durch die spezifische Bindung an Galaktosylstrukturen (G_{M1} -Gangliosid) und der damit vermutlich einhergehenden sterischen Veränderungen der Membran der Zielzelle, scheint CTB eine wichtige immunmodulatorische Wirkung entfalten zu können [Aman et al., 2001; Francis et al., 1992]. Es zeigten sich Veränderungen in Zellfunktionen mit u.a. einer Steigerung der mitogenen Aktivität von humanen B-Lymphozyten [Dugas et al., 1991] und der Inhibition der Proliferation von murinen T-Lymphozyten [Woogen et al., 1993]. Eine Behandlung von humanen Monozyten [Burkart et al., 1999] aber auch murinen Makrophagen [Burkart et al., 2002] mit CTB führte zu einer deutlichen Desensibilisierung dieser Zellen gegenüber LPS und somit zur Hemmung der proinflammatorischen Antwort mit einer Reduktion der $TNF\alpha$ -, NO-, IL-6- und IL-12-Sekretion nach LPS-Stimulation. Dagegen kam es zu einer erhöhten Produktion von TH2 assoziierten Zytokinen wie IL-10 [Burkart et al., 1999]. Der beschriebene Effekt gegenüber LPS-Stimulation war reversibel. Er trat 5 h nach Beginn der Behandlung auf und dauerte ca. 48 h an. Eine Kontamination von CTB mit LPS oder Cholera-Toxin konnte ausgeschlossen werden. Die beschriebenen Experimente zeigten somit, dass CTB ein potenter Modulator der Makrophagen / Monozyten-Funktion ist. Auf der Ebene der T-Lymphozyten wurde ebenfalls die TH1-Antwort durch CTB gehemmt und die TH2-Antwort gesteigert [Sun et al., 1994; Bergerot et al., 1997]. CTB scheint auf zellulärer Ebene eine nichtinflammatorische immunmodulatorische Wirkung sowohl im Bereich des unspezifischen als auch des spezifischen Immunsystems zu induzieren [Burkart et al., 2002]. Weiterhin wurde im Tiermodell untersucht, ob die orale CTB-Substitution alleine oder als Adjuvant eine immunmodulierende Wirkung im Sinne einer oralen Toleranzinduktion bewirkt. Die orale Toleranzinduktion ist ein aktiver immunologischer Prozess, der durch die spezifische Modulation des darmassoziierten Immunsystems durch orale Gaben von Antigenen oder Autoantigenen zu einer systemischen Immunmodulation führt [Weiner, 2000]. Dabei werden die in der Darmmukosa befindlichen Lymphozyten und Makrophagen in Richtung einer TH2-gerichteten Immunantwort moduliert [Weiner, 1994]. Dies führt zur Suppression von pathologischen Reaktionen gegen autologes Gewebe

[Weiner, 2000]. Über M-Zellen (antigenbindende Zellen) im Bereich der Peyer-Plaques der Darmschleimhaut findet der Kontakt zwischen dem Antigen und den T-Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen des darmassoziierten lymphatischen Systems GALT (gut-associated lymphoid tissue) statt [Alpan et al., 2001]. Dabei werden von den anwesenden T-Lymphozyten Zytokine wie TGF β , IL-10 und IL-4 sezerniert [Weiner, 1994] und ein antiinflammatorisches Milieu generiert, das zu einer systemischen Immunsuppression führen kann. Dieser Mechanismus ist von vielen Faktoren abhängig, u.a. von der Menge des verabreichten Antigens. Eine hohe Antigendosierung führt zur Induktion einer Anergie der Zellen während niedrige Antigendosen die Stimulation von TH2-regulierenden Lymphozyten bewirkt, die aktiv eine Toleranz induzieren (sogenannte „Bystander Suppression“) [Weiner, 1994; Friedman und Weiner, 1994; Weiner, 2000].

Die orale Toleranz ist ein bedeutender biologischer Mechanismus, der zur Induktion von Toleranz gegen Autoantigene und Fremdanitigene führt, und von dem bisher nur geringe Nebeneffekte bekannt sind. Dieser Weg beinhaltet ein vielversprechendes Potenzial für die Behandlung von autoimmunen und allergischen Erkrankungen [Friedman et al., 1994].

Im Tierversuch (NOD-Maus) wurde gezeigt, dass es durch die Bindung eines Antigens an CTB zu einer Potenzierung der oralen Toleranz kommt [Sun et al., 1994]. Autoantigen-CTB-Konjugate führten zur Hemmung verschiedener autoimmuninduzierter Erkrankungen wie experimentell allergische Enzephalomyelitis [Sun et al., 1996; Sun et al., 2000], experimentelle autoimmune Arthritis [Tarkowski et al., 1999] und experimentell induzierte Colitis [Boirivant et al., 2001]. Ebenfalls wurde gezeigt, dass die orale Substitution von mit Antigen-konjugiertem CTB (z.B. mit Insulin) [Ploix et al., 1999] und nicht konjugiertem CTB [Bregenholt et al., 2003] zur Reduktion der Diabetesinzidenz im Modell der NOD-Maus führt. Parenterale Gaben von CTB alleine führten auch bei NOD-Mäusen zu einer Reduktion der Diabetesinzidenz [Sobel et al., 1998]. Die Injektion von Milzzellen der mit CTB behandelten Tiere verhinderte den Transfer von Diabetes auf andere NOD-Mäuse [Sobel et al., 1998].

CTB, das Eigenschaften eines Lektins aufweist, zeigt eine ausgeprägte immunmodulatorische Wirkung sowohl auf Makrophagen- als auch auf T-Lymphozyten-Ebene [Burkart et al., 2002; Sobel et al., 1998]. Studien im Tiermodell der NOD-Maus haben gezeigt, dass die Einnahme von CTB zur Induktion einer ausgeprägten oralen Immuntoleranz führt [Ploix et al., 1999]. Aufgrund dieser Befunde ergibt sich die interessante Fragestellung nach der Existenz von anderen Substanzen mit Lektineigenschaften, die nicht aus dem Bereich der pathogenen Mikroorganismen stammen und eine toleranzinduzierende Wirkung zeigen. Eine große Vielfalt von aus Pflanzen isolierten Lektinen sind sehr gut charakterisiert und einige von Ihnen zeigen eine modulatorische Wirkung auf Lymphozyten- und Makrophagenaktivitäten. Die durch das Mistellektin induzierten immunologischen Effekte sind im Tiermodell nachweisbar. Das Mistellektin induziert Apoptose von T-Zellen und verursacht einen Zytokin-Shift in Richtung TH2 [Gabius, 2001]. Lektinbestandteile aus Aloe vera zeigen eine potente immunstimulatorische Wirkung auf Makrophagen und T-Lymphozyten und können die Zytokin- (IL-6 und TNF α) und

NO-Produktion induzieren [1996; Pugh et al., 2001]. Polysaccharide aus *Perilla frutescens* var. *crispa*-Lektin (Schwarznessel) und des *Abrus precatorius*-Lektin (Paternostererbse) stimulieren die phagozytotische Aktivität von Makrophagen sowie deren NO-Produktion und TNF α -Sekretion [Kwon et al., 2002; Tripathi und Maiti, 2003].

1.5 Lektine

1.5.1 Allgemeine Eigenschaften der Lektine

1.5.1.1 Definition

Vor mehr als 100 Jahren wurde die Stoffgruppe der Lektine in wässrigen Extrakten von *Ricinus communis* (Rizinussamen) entdeckt. Stillmark entdeckte 1888/1889 die Agglutination von Erythrozyten durch diesen Pflanzenextrakt. Aus dieser Zeit stammen die Bezeichnungen „Agglutinin“, „Hämagglutinin“ und „Phythämagglutinin“ [Radek, 1996]. Boyd und Shapleigh haben 1954 erstmalig festgestellt, dass einige dieser Proteine blutgruppenspezifisch wirken können und gaben ihnen die Bezeichnung „Lektin“. Der Begriff Lektin leitet sich ab vom lateinischen Verb *legere* = auswählen. Nach der Definition von Kocourek (1983) sind Lektine „Proteine oder Glykoproteine nicht immunglobuliner Natur mit der Fähigkeit einer spezifischen Erkennung und reversiblen Bindung an glykosidische Strukturen von komplexen Kohlenhydraten, ohne kovalente Strukturen der Zuckerliganden zu verändern“. Lektine dürfen gegenüber den Bindungspartnern keine enzymatische Aktivität aufweisen und nicht auf einen äußeren Reiz hin synthetisiert werden [Freier et al., 1985] und sind somit von Enzymen und Immunglobulinen abzugrenzen.

1.5.1.2 Vorkommen und Funktion der Lektine

Lektine sind in der Natur weit verbreitet und sie kommen nicht nur in Pflanzen sondern auch in Viren, Bakterien, Tieren und Menschen vor [Barondes, 1981]. Ashwell und Morell entdeckten 1974 membrangebundene Lektine auf Zellmembranen von Säugetierorganen. Heute sind von menschlichen Organen wie Leber, Darm, Lunge und Herz Lektine bekannt. Lektine binden als Proteine oder Glykoproteine an der komplexen Glykokalyx der Zellmembran. Weiterhin wurden zuckerspezifische Rezeptoren in der Zellmembran identifiziert, die spezielle Bindungsstellen für Lektine aufweisen können. Diese Rezeptoren können Glykoproteine, Glykolipide oder Polysaccharide sein. Die Heterogenität und die Strukturvielfalt, die sich aus den unterschiedlichen Glykosylierungsmustern ergibt, ist sehr groß [Brandley und Schnaar, 1986; Peumans et al., 1995]. Lektine sind bezüglich ihrer Bindungsfähigkeit an Zuckermoleküle

spezifisch. Bezüglich ihres Bindungsverhaltens an die Oberflächen unterschiedlicher Zellen und Organe erscheinen sie jedoch unspezifisch. Sie können zur Agglutination von Erythrozyten, malignen Zellen, Embryonalzellen, Hefezellen und Bakterien führen. Lektine können zur Zelladhäsion führen, sie können die Signaltransduktion initiieren und sie sind involviert in einer großen Vielfalt von biochemischen Prozessen u.a. dem Transport von intra- und extrazellulären Zuckerverbindungen [Rüdiger et al., 2000].

Aus medizinischer Sicht sind die verschiedenen Effekte von Lektinen auf menschliche Zellen und Mikroorganismen von besonderem Interesse. Ihre unterschiedliche Herkunft und vielfältigen chemischen Strukturen spiegeln sich in ihren zahlreichen biologischen Rollen wider [Gabius et al., 1988; Rüdiger und Gabius, 1993]. Das größte Wirkungsspektrum der Lektine ist offenbar dort zu finden, wo es zu Wechselwirkungen und Kontakten zwischen Organismen oder Zellen kommt [Radek, 1996]. So sind C-Typ Lektine Rezeptoren, die sehr gut Zuckermoleküle erkennen [Opdenakker et al., 1993] und sich häufig an der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen befinden [Higashi et al., 2002] wie z.B. an Makrophagen, T- und B-Lymphozyten [Kolb-Bachofen, 1988; Rosen, 1993]. Die spezielle Funktion dieser Lektinrezeptoren auf antigenpräsentierenden Zellen ist die Vermittlung von Zellkontakten sowie die Aufnahme und der Transport von Oberflächengebundenen Antigenen [Higashi et al., 2002]. Durch die Bindung an komplementäre Zuckerverbindungen anderer Zellen können so Lektine, durch Entstehung von interzellulären Kontakten, auch zahlreiche immunologisch relevante Prozesse in Gang setzen [Sharon und Lis, 1990; Timoshenko et al., 2000]. Pathogene Bakterien wie z.B. *Vibrio cholerae*, Salmonellen, Shigellen, *E. coli*, *Entamoeba histolytica* oder Viren benutzen membranständige Lektine als Adhäsionsmoleküle um sich an entsprechende Zuckerstrukturen (Rezeptoren) z.B. des Darmepithels anzuheften [Radek, 1996]. Eine solche Kontaktaufnahme ist häufig der erste Schritt zur Einleitung einer Infektion. Durch Endozytose werden die an der Zelloberfläche gebundenen Toxine (Cholera-Toxin, Shiga-Toxin) in die Zelle aufgenommen und dort weiter metabolisiert [Sandvig et al., 2004]. Adhäsionsrezeptoren an der Oberfläche von Leukozyten, Lymphozyten und Monozyten ermöglichen eine Kontaktaufnahme mit z.B. Endothelzellen von Blutgefäßen [Stoolman und Rosen, 1983] und können somit die Lymphozytenrekrutierung bei Infektionen und das so genannte „homing“ im lymphatischen Gewebe ermöglichen [Geng et al., 1992; Žak et al., 2000]. Lektin-vermittelte interzelluläre Kontakte ermöglichen auch die Erkennung von Mikroorganismen und von veränderten körpereigenen Zellen [Saevarsdottir et al., 2004]. In vitro werden durch eingesetzte Lektine (z.B. *Canavalia ensiformis* oder *Triticum vulgare*) Mikroorganismen vermehrt an Makrophagen gebunden. Auf der Makrophagenoberfläche lokalisierte Zuckermoleküle können als Rezeptoren für Lektine dienen und zu einer Aktivierung und Steigerung der Phagozytose-Bereitschaft von Makrophagen und Blutmonozyten beitragen [Gallily et al., 1984; Stoika et al., 2001; Moresco et al., 2002]. Weiterhin können über Lektinrezeptoren Lymphozyten stimuliert und die humorale Immunantwort aktiviert werden [Vasta et al., 1999]. In vitro-Versuche zeigten,

dass der Hefepilz *Candida albicans* durch mit Lektinen vorbehandelte Hepatozyten effektiver vernichtet werden kann [Sawyer et al., 1992]. Lektine besitzen zytotoxische Wirkung gegenüber Tumorzellen [Wang et al., 2000], zeigen eine immunmodulatorische Wirkung gegenüber T-Lymphozyten und stimulieren deren Produktion verschiedener Zytokine (z.B. TNF α) [Tabor et al., 1992; Séguin et al., 1995; Gabius, 2001]. Die mitogene Wirkung von Lektinen auf T- und B-Lymphozyten wurde auch im Tierversuch nachgewiesen [Gebauer, 1982].

Lektine können durch ihre Bindungsfähigkeit in viele komplexe immunologische Prozesse eingreifen. Inzwischen wurden in zahlreichen Studien Lektine als Therapeutika erprobt. In der Knochenmarktransplantation haben die Lektine ein probates Anwendungsgebiet gefunden. Durch spezifische Bindung von einigen Lektinen (u.a. *Phaseolus vulgaris*-Lektin, *Lens culinaris*-Lektin, *Canavalia ensiformis*-Lektin) an unreife T-Lymphozyten konnte das Risiko der „Graft-versus-host-Reaktion“ bei allogener Knochenmarktransplantation gemindert werden [Reisner et al., 1981; Wimer, 1998].

Aufgrund der vielfältigen Eigenschaften der Lektine werden weitere therapeutische Möglichkeiten untersucht, wobei hierzu allerdings zur Zeit noch zu wenige kontrollierte Studien vorliegen [Cowan, 1999]. Im Tiermodell führten die Kombinationen von Lektinen der Mistel, *Ulex europeus* oder *Triticum vulgare* mit Ovalbumin und nasale Substitution zu einer stärkeren Erhöhung von spezifischem Ovalbumin-IgG im Serum als ohne Immunadjuvant [Lavelle et al., 2001].

Die orale Verabreichung von *Canavalia ensiformis*-Lektin an NOD-Mäuse führte zur Hemmung der Diabetes-Entwicklung. In der behandelten Gruppe zeigten histologische Befunde des Pankreas eine periinsuläre Lymphozyteninfiltration aber keine intrainsuläre Inselinfiltration im Gegensatz zu der Kontrollgruppe. Es wird vermutet, dass in diesem experimentellen System die Aktivierung von T-Lymphozyten mit *Canavalia ensiformis*-Lektin zur Protektion bei der Diabetesentstehung geführt hat [Pearce und Peterson, 1991].

Die dargestellten vielfältigen Befunde zeigen, dass Lektine ein starkes immunmodulatorisches Potential besitzen.

1.5.2 Zuckerspezifitäten von Lektinen

Unter den Lektinen finden die löslichen Samenlektine der Leguminosen die umfangreichste Anwendung, da sie chemisch gut charakterisiert und verhältnismäßig leicht zugänglich sind [Goldstein und Hayes, 1978; Rüdiger, 1982; Sharon und Lis, 1990]. Die Lektine der Leguminosen sind eine breite, an homologe Zuckerstrukturen bindende Lektinfamilie, die vor allem in den Samen der Gemüsepflanzen gefunden werden [Loris et al., 1998]. Sie ähneln sich in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften, haben aber unterschiedliche Zuckerbindungsaffinitäten. Die Lektine bestehen zumeist aus zwei oder vier Untereinheiten mit jeweils einer Zuckerbindungsstelle. Zur Interaktion mit dem Zucker wird ein Metallion

(Ca²⁺ oder Mn²⁺) benötigt [Sharon und Lis, 1990]. Die pflanzlichen Lektine wurden nach ihren spezifischen Zuckerbindungseigenschaften in die nachfolgend aufgeführten Gruppen eingeteilt.

1.5.2.1 Galaktose-spezifische Lektine

Arachis hypogaea-Lektin (AH): Die *Arachis hypogaea* (Erdnuss) gehört zur Familie der Leguminosen [Gold und Balding, 1975]. Das Lektin, das aus vier Untereinheiten besteht, besitzt eine Zuckerbindungsspezifität hauptsächlich zu D-Galaktosyl- β -(1-3)-N-Acetyl-D-Galaktosamin [Lotan et al., 1975]. AH-Lektin wirkt nicht mitogen, wird jedoch zur Unterscheidung humaner Lymphozytensubtypen oder zur Zellseparation benutzt [Brown und Williams, 1982; Wu et al., 1997]. Mit AH behandelte Erythrozyten agglutinieren nur, wenn die Erythrozyten vorher mit Neuraminidase behandelt wurden [Lotan et al., 1975]. In Untersuchungen in der Maus zeigt sich nach oraler Gabe des Lektins eine Immunreaktion gegen AH-Lektin mit Nachweis erhöhter Spiegel von spezifischen Immunglobulinen im Serum [De Aizpurua und Russell-Jones, 1988]. Orale Behandlung mit AH-Extrakt führte bei diabetischen Ratten zu einer signifikanten Reduktion des Blutzuckerwertes und der Triglyzeride im Serum [Bilbis et al., 2002]. Untersuchungen am Modell der isolierten Leber zeigen, dass AH-Lektin *Candida albicans* binden kann und die Pilzzellen somit leichter von Leberzellen erkannt und inaktiviert werden können [Sawyer et al., 1992].

Bandeiraea simplicifolia-Isolektin I (BS) : *Bandeiraea simplicifolia* (Afrikanische Schwarzbohne) gehört zu der Familie der Caesalpinaceae [Gold und Balding, 1975]. Das tetramere BS-Lektin besteht aus zwei Typen von Untereinheiten A und B. Die Zuckerbindungsspezifität besteht hauptsächlich zu α -D-Galaktose [Hayes und Goldstein, 1974]. Das BS-Lektin ist Blutgruppe B spezifisch, kann aber auch Erythrozyten der Blutgruppe A1 agglutinieren [Murphy und Goldstein, 1977]. BS-I bindet an M-Zellen der nasalen Schleimhaut im Bereich des NALT (nasal-associated lymphoid tissue) von Ratten [Takata et al., 2000] und der Peyer-Plaques der Darmschleimhaut im Mausmodell [Clark et al., 1995]. BS-Lektin zeigt eine besondere Affinität zu T-Lymphozyten [Sowalsky und Fox, 1992]. In der Zellkultur führt die Bindung von BS-Lektin an Makrophagen zur Stimulation und Produktion von TNF α [Tabor et al., 1992].

Phaseolus limensis-Lektin (PL): *Phaseolus limensis* (Mondbohne) gehört zur Familie der Leguminosen [Gold und Balding, 1975]. PL besteht aus vier Untereinheiten, bindet spezifisch den N-Acetyl-D-Galaktosamin-Zucker und zeigt eine Blutgruppe A Spezifität [Galbraith und Goldstein, 1970; Galbraith und Goldstein, 1972; Roberts und Goldstein, 1983]. PL wirkt als Mitogen für normale humane Lymphozyten und leukämisch veränderte Lymphozyten [Ruddon et al., 1974].

Vicia villosa-Lektin (VV): *Vicia villosa* (Zottelwicke) gehört zur Familie der Leguminosen [Gold und Balding, 1975]. VV besteht aus drei tetramerischen VV-Isolektinen mit unterschiedlichem Molekulargewicht, die jeweils aus zwei Untereinheiten bestehen und eine Zuckerbindungsspezifität zu N-Acetyl-D-Galaktosamin haben [Tollefsen und Kornfeld, 1983a; Tollefsen und Kornfeld, 1983b]. VV-Lektin ist Blutgruppe A₁ spezifisch. Es zeigt eine besondere Bindungsaffinität zu zytotoxischen Maus-T-Lymphozyten [Kimura et al., 1979] und humanen T-Lymphozyten [Fortune und Lehner, 1988]. Im Tiermodell wurde gezeigt, dass VV-Lektin an M-Zellen der Peyer-Plaques im Darm bindet [Gebert und Posselt, 1997].

1.5.2.2 Glukose- und Mannose-spezifische Lektine

Concanavalin A = Canavalia ensiformis-Lektin (CE): *Canavalia ensiformis* (Schwertbohne) gehört zur Familie der Leguminosen [Gold und Balding, 1975]. CE hat eine tetramerische Struktur und benötigt divalente Ionen (Ca²⁺ und Mn²⁺) für die Zuckerbindung [Reeke et al., 1974]. Die Zuckerbindungsspezifität besteht zu α-D-Glukose und α-D-Mannose [Williams et al., 1992; Moresco et al., 2002]. Goldstein und Misaki zeigten 1970, dass CE an ein Polysaccharid der Zellwand des *Mycobacterium bovis* binden kann. Es ist blutgruppenunspezifisch [Reeke et al., 1974], kann jedoch an Erythrozyten und andere Zellen (z.B. virustransformierte Zellen oder maligne Zellen (Lebertumorzellen der Ratte)) [Aubery und Bourrillon, 1974; Lamont et al., 1974] binden und diese agglutinieren. Die Vorbehandlung von hepatischen Kupfferzellen mit CE-Lektin führt zu einer gesteigerten Aufnahme und in der Folge zur Zerstörung des Hefepilzes *Candida albicans* [Sawyer et al., 1992]. Die Inkubation von humanen B- und T-Lymphozyten mit CE zeigt eine deutliche mitogene Wirkung [Miller, 1983]. Die Inkubation von NOD-Maus-Milzzellen in Gegenwart von CE führt zu einer Erhöhung des T-Lymphozyten Anteils. In NOD-Mäuse reinfundierte T-Lymphozyten akkumulieren hauptsächlich im Pankreasgewebe [Mukherjee et al., 1991]. Ebenfalls im Tiermodell zeigt das CE-Lektin durch Reduktion der T-Lymphozytenaktivität eine immunsuppressive Wirkung bei Graft-versus-host-Reaktionen [Wimer, 1998]. In Untersuchungen in der Maus zeigt sich nach oraler Gabe des Lektins eine Immunreaktion gegen CE-Lektin und eine Erhöhung der Spiegel von spezifischen Immunglobulinen im Serum [De Aizpurua und Russell-Jones, 1988]. Die Behandlung von NOD-Mäusen mit CE-Lektin intraperitoneal (i.p.) führt zur Diabetesprävention [Pearce und Peterson, 1991]. In der histologischen Untersuchung der Pankreata zeigt sich in den behandelten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe keine insuläre Infiltration durch Lymphozyten [Pearce und Peterson, 1991]. Die Inzidenz des durch Streptozotocin induzierten Diabetes im Mausmodell, konnte durch Therapie mit CE-Lektin i.p. im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert werden [Kolb et al., 1986]. Eine Behandlung von Meerschweinchen mit CE-Lektin führte im Modell der experimentellen allergischen Enzephalomyelitis zur signifikanten Senkung der Erkrankungsinzidenz [Kuroda et al., 1980].

Lens culinaris-Lektin (LC): *Lens culinaris* (Linse) gehört zur Familie der Leguminosen [Gold und Balding, 1975]. Das LC-Lektin besteht aus den beiden Untereinheiten A und B [Howard und Sage, 1969]. Die Zuckerbindungsspezifität besteht zu α -D-Glukose und α -D-Mannose [Howard et al., 1971; Debray et al., 1981]. LC führt im Tiermodell zur Stimulation der T-Lymphozytenaktivität [Ozato et al., 1977; Nakano et al., 1980]. Ebenfalls im Tiermodell zeigt das LC-Lektin, allerdings durch Reduktion der T-Lymphozytenaktivität, eine immunsuppressive Wirkung bei Graft-versus-host-Reaktionen [Wimer, 1998]. In Untersuchungen in der Maus zeigt sich nach oraler Gabe des Lektins eine Immunreaktion gegen LC-Lektin und eine Erhöhung der Spiegel von spezifischen Immunglobulinen im Serum [De Aizpurua und Russell-Jones, 1988]. Eine Vorbehandlung von hepatischen Kupferzellen mit LC-Lektin führt zu einer gesteigerten Aufnahme und in der Folge zur Zerstörung des Hefepilzes *Candida albicans* [Sawyer et al., 1992].

Pisum sativum-Lektin (PS): *Pisum sativum* (Erbse) gehört zu der Familie der Leguminosen [Gold und Balding, 1975]. Das Lektin besteht aus zwei Untereinheiten (α und β -Untereinheit) und weist eine Zuckerbindungsspezifität für α -D-Glukose und α -D-Mannose auf [Trowbridge, 1974; Debray et al., 1981; Barre et al., 2001]. Die starke mitogene Wirkung auf T-Lymphozyten entspricht der des CE- und des LC-Lektins [Trowbridge, 1974]. PS-Lektin bindet stärker an B-Lymphozyten als an T-Lymphozyten [Whitehurst et al., 1994]. Eine Vorinkubation mit PS-Lektin führt in Milzlymphozyten der Maus zur Produktion von TNF α und IFN γ [Lima et al., 1999]. Die Lymphozyten von mit PS-Lektin vorbehandelten Mäusen zeigen in vitro nach 24 h eine erniedrigte Produktion von TNF α oder IFN γ wenn diese Lymphozyten erneut mit PSA oder CE-Lektin stimuliert werden [Lima et al., 1999].

Vicia faba-Lektin (VF): *Vicia faba* (Fava Bohne) gehört zu der Familie der Leguminosen [Gold und Balding, 1975]. Das VF-Lektin besteht aus vier Untereinheiten unterschiedlichen Molekulargewichts und zeigt eine besondere Zuckerbindungsaffinität zu α -D-Glukose und α -D-Mannose [Matsumoto et al., 1983].

Vicia sativa-Lektin (VS): *Vicia sativa* (Saatwicke) gehört zu der Familie der Leguminosen [Gold und Balding, 1975]. Das Lektin setzt sich aus zwei großen β -Untereinheiten und zwei kleinen α -Untereinheiten [Gebauer et al., 1979; Gebauer et al., 1981] zusammen. Das VS-Lektin hat eine besondere Zuckerbindungsspezifität zu α -D-Glukose und α -D-Mannose [Falasca et al., 1979]. Das Lektin wirkt mitogen auf periphere Blutlymphozyten des Menschen [Falasca et al., 1979] und der Maus [Gebauer et al., 1979].

Triticum vulgare-Lektin (TV): *Triticum vulgare* (Weizen) gehört zu der Familie der Gramineae (Süßgräser). Das Lektin setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen und hat eine Zuckerbindungsspezifität zu N-Acetyl- β -D-Glukosamin [Nagata und Burger, 1974;

Debray et al., 1981]. Eine Vorinkubation von B-Lymphozyten mit niedrigdosiertem TV-Lektin kann zu einer Stimulation führen während eine höhere Dosierung von TV-Lektin zu einer Hemmung der Immunglobulin-Produktion führen kann [Greene et al., 1981]. Das TV-Lektin bindet an M-Zellen der nasalen Schleimhaut im Bereich des NALT-Gewebes von Ratten [Takata et al., 2000] und Kaninchen [Jepson et al., 1995] und bindet speziell an Milz-Lymphozyten und Thymus-Lymphozyten der Ratte [Lamont et al., 1974]. Ebenfalls kann das TV-Lektin an aktivierte murine T-Lymphozyten binden [Sowalsky und Fox, 1992]. Durch seine insulinähnliche Wirkung kann es bei isolierten Fettzellen eine Steigerung der Glukoseoxidationsrate induzieren [Cuatrecasas, 1973]. TV wirkt zytotoxisch auf Tumorzellen [Wang et al., 2000]. Bindung von TV-Lektin an die Oberfläche muriner Makrophagen führt zur Steigerung der Phagozytose von verschiedenen Bakterien [Gallily et al., 1984; Stoika et al., 2001]. In der Maus führte die nasale und orale Gabe von TV-Lektin zur Erhöhung der Spiegel von spezifischen Immunglobulinen (IgG und IgA) im Serum [Lavelle et al., 2001].

1.5.2.3 Fukose-spezifisches Lektin

Ulex europaeus Isolektin I (UE): *Ulex europaeus* (Stechginster) gehört zur Familie der Leguminosen [Gold und Balding, 1975]. Das UE-Lektin besteht aus zwei Lektintypen (UE-I und UE-II) [Allen und Johnson, 1977; Debray et al., 1981]. UE-I ist anti-H blutgruppenspezifisch und hat eine Zuckerbindungsspezifität zu α -L-Fukose [Matsumoto und Osawa, 1969; Thomas und Surolia, 2000]. UE-I-Lektin bindet selektiv an M-Zellen der Peyer-Plaques vom Darm der Maus und wird durch Endozytose aufgenommen [Foster et al., 1998; Clark et al., 1995a; Clark et al., 1995b]. Untersuchungen am Modell der isolierten Leber zeigten, dass UE-Lektin *Candida albicans* binden kann und somit die Pilzzellen leichter von Kupferzellen aufgefangen und inaktiviert werden können [Sawyer et al., 1992]. In Untersuchungen in der Maus zeigt sich nach oraler Gabe des Lektins eine Immunreaktion gegen UE-Lektin sowie eine Erhöhung der Spiegel von spezifischen Immunglobulinen im Serum [De Aizpurua und Russell-Jones, 1988; Lavelle et al., 2001].

1.5.2.4 Oligosaccharid-spezifisches Lektin

Phaseolus vulgaris-Lektin (PV): *Phaseolus vulgaris* (Gartenbohne) gehört zur Familie der Leguminosen [Gold und Balding, 1975]. Das PV-Lektin besteht aus einem Komplex von fünf tetramerschen Isolektinen aus jeweils zwei Untereinheiten, mit unterschiedlichen Erythrozytenagglutinations- und mitogenen Eigenschaften [Leavitt et al., 1977; Felsted et al., 1977]. Das Lektin weist eine Zuckerbindungsspezifität zu Oligosacchariden auf. PV zeigt mitogene Eigenschaften gegenüber Lymphozyten [Allen et al., 1969] und eine immunsuppressive

Wirkung bei Graft-versus-host-Reaktionen im Tiermodell [Wimer, 1998]. Im tierexperimentellen Versuch mit diabetischen Ratten [Pari und Venkateswaran, 2004] und NOD-Mäusen [Petlevski et al., 2001] zeigt die orale Substitution von PV einen hypoglykämischen, hypolipidämischen und antioxidativen Effekt [Venkateswaran und Pari, 2002]. In Untersuchungen in der Maus zeigt sich nach oraler Gabe des Lektins eine Immunreaktion gegen PV-Lektin und eine Erhöhung der Spiegel von spezifischen Immunglobulinen im Serum [De Aizpurua und Russell-Jones, 1988]. Im experimentellen Modell der Maus führt die Behandlung mit PV-Lektin zur einer signifikanten Reduktion der autoimmun induzierten Thyreoiditis [Esquivel et al., 1982].

1.6 OM-89 – ein immunmodulatorischer bakterieller Extrakt

Neben Lektinen besitzen auch Substanzen bakteriellen Ursprungs ein starkes immunmodulatorisches Potential. Die Wirkungen von bakteriellen Substanzen werden seit längerem im Tiermodell untersucht. Sie finden aber auch schon bei der Behandlung einzelner Erkrankungen des Menschen Anwendung. So wird bei der Behandlung der Rheumatoiden Arthritis das Präparat OM-89 zur Immunmodulation eingesetzt [Rosenthal et al., 1991].

OM-89 ist ein aus Membranproteinen verschiedener E. coli Stämme gewonnener immunmodulatorischer Extrakt, der größtenteils saure Glykoproteine (10-300 kDa) enthält. Der Extrakt beinhaltet einen geringfügigen LPS-Anteil (weniger als 22 ppm) und unterschiedliche Hitzeschockproteine (z.B. HSP 65) [Polla et al., 1995; Wendling und Farine, 1998]. Die nachgewiesene immunmodulatorische Wirkung auf Makrophagen und Lymphozyten ist jedoch nicht auf eine mögliche LPS-Kontamination zurückzuführen [van Pham et al., 1990]. Die immunmodulatorischen Eigenschaften des Präparates werden in der Behandlung chronischer Harnwegsinfekte, Infektionen des oberen Respirationstraktes [Bottex et al., 1988; Hockertz, 1990] und in der Behandlung der Rheumatoiden Arthritis erfolgreich eingesetzt [Brackertz und Vischer, 1989; Hauzeur und Appelboom, 1989; Rosenthal et al., 1991; Toussiro, 2002]. Aufgrund der nachgewiesenen immunmodulatorischen Wirkung von OM-89 wurde diese Substanz auch in experimentell induzierten autoimmunen Erkrankungen zur oralen Toleranzinduktion verwendet [Krause et al., 2000]. Die orale Gabe von Insulin und OM-89 führte bei NOD-Mäusen zur Hemmung der Diabetesentwicklung [Hartmann et al., 1997]. Die Verabreichung von Myelin basischem Protein als Autoantigen führte bei Lewis-Ratten zur Hemmung der experimentellen Autoimmunenzephalitis [Khoury et al., 1990]. Mit OM-89 konnte die kollagen-induzierte Arthritis bei Mäusen effektiv behandelt werden [Nagler-Anderson et al., 1986; Willis et al., 1995]. Frühere Studien zeigten, dass OM-89 durch direkten und/oder indirekten Effekt auf Makrophagen, T-Zellen, B-Zellen und Natural Killerzellen in Tier und Mensch seine Wirkung entfaltet. Durch Beeinflussung des nicht-adaptiven aber auch des adaptiven Immunsystems kommt es zur Aktivierung metabolischer und phagozytotischer Funktionen der Makrophagen und in der Folge zur

Aktivierung von B- und T-Lymphozyten [Rosenthal, 1986; van Pham et al., 1990; Bessler et al., 1991]. Versuche zur Absorptionskinetik zeigten, dass OM-89 über den Darm, größtenteil im Bereich der Peyer-Plaques absorbiert wird. Eine vermehrte Aufnahme der Substanz wurde in Leber, Nebenniere, Schilddrüse und Pankreas sowie in lymphoiden Organen (Milz, mesenteriale Lymphknoten) gefunden [Burckhart et al., 1997; van Dijk et al., 1997]. Die Antigen-präsentierenden Zellen in der Darmmucosa (z.B. Makrophagen) stellen Zielzellen für OM-89 dar. Bei hoher Dosierung von OM-89 werden die durch Makrophagenmediatoren stimulierten T-Lymphozyten anerg oder apoptotisch während sie bei niedriger Dosierung anti-inflammatorische Zytokine wie IL-4, IL-10 und TGF β bilden [Miller et al., 1991; Phipps, 1999]. Es wird vermutet, dass die zuletzt erwähnten T-Lymphozyten den Bereich des intestinalen Immunsystems verlassen und zu inflammatorisch veränderten Organen wandern, wo sie die immunologisch induzierte Entzündungsreaktion hemmen [Miller et al., 1991]. Bei der Behandlung von prädiabetischen BB-Ratten ist OM-89 genau wie LPS in der Lage, im Pankreas die mRNA für IFN γ herunter zu regulieren. Im Gegensatz zu LPS inhibiert es aber zusätzlich die Transkription der iNOS mRNA und stimuliert gleichzeitig die Expression TH2-assoziiertes Zytokine [Kolb et al., 1996]. In der BB-Ratte führte die orale Gabe von OM-89 in Kombination mit Insulin zu einer Zunahme der Diabetesinzidenz [Bellmann et al., 1998]. Allerdings zeigten NOD-Mäuse nach wiederholter oraler Behandlung mit OM-89 und Insulin eine reduzierte Diabetesinzidenz und ebenfalls eine Herunterregulierung der mRNA von iNOS und IFN γ im Darm. Zusätzlich wurde eine Verschiebung von TH1-typischen zu TH2-typischen Zytokinen beobachtet. In der NOD-Maus konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Diabetes-protective Wirkung einer oralen Gabe von Insulin [Zhang et al., 1991] durch die zusätzliche Gabe von OM-89 potenziert werden kann [Hartmann et al., 1997].

1.7 Ziel der Arbeit

Die Ätiologie des Typ 1 Diabetes ist vielfältig und noch nicht eindeutig geklärt. Neben der genetischen Komponente nehmen Umwelteinflüsse als krankheitsauslösende Faktoren eine besondere Rolle ein. Modellsysteme zur Erforschung der Pathogenese des Typ 1 Diabetes zeigen, dass Makrophagen und ihre Mediatoren eine zentrale regulatorische Rolle bei der Entstehung der Erkrankung spielen. Die Induktion eines toleranzähnlichen Zustandes bei Makrophagen als wichtige Zellen des angeborenen Immunsystems, und der damit verbundenen Möglichkeit der Regulation der T-Zell-Reaktivität, könnte als eine bedeutende Interventionsmaßnahme zur Hemmung der autoimmunen Reaktion gegen β -Zellen bewertet werden.

Lektine sind Moleküle pflanzlichen, bakteriellen oder tierischen Ursprungs, die ubiquitär in unserer Umwelt vorkommen. Sie treten primär über das Verdauungssystem in Interaktion mit dem menschlichen Körper und sind in der Lage inflammatorische Vorgänge über die Beeinflussung von Makrophagenaktivitäten zu regulieren.

In der vorliegenden Arbeit soll die immunmodulatorische Wirkung von pflanzlichen und bakteriellen Lektinen sowie des bakteriellen Extraktes OM-89 auf Mausmakrophagen in vitro untersucht werden. Dabei soll insbesondere geklärt werden, ob diese Substanzen die Freisetzung von β -zellschädigenden Mediatoren durch Makrophagen beeinflussen können. Nach einer Vorbehandlung der Makrophagen mit den erwähnten Substanzen und anschließender Stimulation mit LPS soll die Produktion der Makrophagenmediatoren NO und TNF α untersucht werden, für die eine wichtige Rolle speziell bei der immunvermittelten Zerstörung autologer β -Zellen im Verlauf der Pathogenese des Typ 1 Diabetes nachgewiesen wurde. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Vorbehandlung von Makrophagen mit OM-89 und CTB und die anschließende Stimulation mit LPS eine deutliche Reduktion der NO- und TNF α -Produktion bewirkt. Diese starke makrophagenmodulierende Wirkung der beiden Substanzen führt zu einem ständig wachsenden Interesse hinsichtlich ihrer möglichen klinischen Anwendung. Zudem besteht das Bestreben weitere Substanzen mit immunmodulatorischem Potential zu identifizieren. Zahlreiche Versuche zeigen, dass Lektine potente Immunmodulatoren sind. Durch ihre ausgeprägte Fähigkeit an Zelloberflächen zu binden sind sie in einer Vielfalt von zellbiologischen Vorgängen eingebunden. Ihr Haupt-Wirkungsspektrum scheint offenbar in der Vermittlung von Wechselwirkungen und Kontakten zwischen Zellen (u.a. Zellen des körpereigenen Immunsystems, Mikroorganismen) zu liegen. Die erwarteten Ergebnisse sollen dazu beitragen, Strategien zu entwickeln, mit Hilfe von immunmodulatorischen Substanzen wie Lektinen die proinflammatorische Makrophagenaktivität zu modulieren und damit die Grundlagen für die Entwicklung von β -zellprotektiven Strategien voranzutreiben.

2 **MATERIAL UND METHODEN**

2.1 **Zelllinien**

2.1.1 **IC21 Makrophagen**

Die IC21 Makrophagenzelllinie wurde aus SV 40 transformierten Peritonealmakrophagen der C57BL/6 Maus entwickelt und erstmals von Mauel und Defendi 1971 beschrieben. Die Zelllinie hat grundlegende Eigenschaften der ursprünglichen peritonealen Mausmakrophagen beibehalten und eignet sich somit als Modell zur Untersuchung von Mausmakrophagenaktivitäten.

2.1.2 **J774A. 1 Makrophagen**

Bei der J774A.1 Zelllinie handelt es sich um Monozyten-Makrophagen, die in der Zellkultur als kleine, runde Zellen adhärent auf dem Boden von Zellkulturgefäßen aus Kunststoff wachsen. Sie wurde 1968 aus einem Tumor einer weiblichen BALB/c Maus gewonnen. Die J774A.1 Makrophagen produzieren neben vielen makrophagenspezifischen Mediatoren Lysozym und Interleukin-1 (IL-1). Sie besitzen u. a. Rezeptoren für Immunglobuline und Komplement [Ralph et al., 1976].

2.1.3 **L929 Fibroblasten**

Die L929 Fibroblasten sind eine TNF α sensitive Fibrosarkomzelllinie der Maus, die zum TNF α -Nachweis in dem nachfolgend beschriebenen Bio-Assay verwendet wurde (siehe 2.8). Die L929 Zellen stammen von einem Zellklon aus der ursprünglichen Zelllinie L, die erstmals von Sanford et al., 1948 beschrieben wurde. Diese Zelllinie L wurde aus normalem subkutanem Gewebe und Fettgewebe einer 100 Tage alten männlichen C3H/An Maus generiert [Earle, 1943].

2.2 Medien und Lösungen für die Zellkultur

2.2.1 RPMI 1640 Medium

1 x Pulver	RPMI 1640 Medium w/L-Glutamine, w/o NaHCO ₃	(Gibco, Eggenstein)
50 ml	Nicht-essentielle Aminosäuren (100 x)	(Gibco, Eggenstein)
50 ml	Na-Pyruvat (100 mM)	(Gibco, Eggenstein)
125 mg	Ampicillin	(Serva, Heidelberg)
600 mg	Penicillin	(Serva, Heidelberg)
1,35 g	Streptomycin	(Serva, Heidelberg)
50 ml	L-Glutamin	(Gibco, Eggenstein)
11,9 g	HEPES [N-(2-Hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethane-sulfonic-acid]	(Serva, Heidelberg)
10 g	NaHCO ₃ ad 5 l Milli-Q Wasser Einstellung des pH-Wertes auf pH 7,2 - 7,6 mit NaOH. Das Medium wurde steril filtriert und bei 4°C gelagert.	(Serva, Heidelberg)

2.2.2 HBSS

100 ml	HBSS (Hank's Balanced Salt Solution 10 x) ad 1 l Milli-Q Wasser Einstellung des pH-Wertes auf pH 7,2 - 7,4 mit NaOH. Das Medium wurde steril filtriert und bei 4°C gelagert.	(Gibco, Eggenstein)
--------	---	---------------------

2.2.3 HBSS – Ca²⁺- und Mg²⁺- frei

100 ml	HBSS Ca ²⁺ - und Mg ²⁺ - frei (10 x)	(Gibco, Eggenstein)
11,2 g	EGTA (Titriplex III)	(Merck, Darmstadt)
2,8 g	HEPES ad 1 l Milli-Q Wasser Einstellung des pH-Wertes auf pH 7,3 mit NaOH. Das Medium wurde steril filtriert und bei 4°C gelagert.	(Serva, Heidelberg)

2.2.4 Click's Medium

1 x	Stocklösung	(Biochrom, Berlin)
2,38 g	HEPES	(Serva, Heidelberg)
2,5 g	Glucose, α -D-Glucose, research grade	(Serva, Heidelberg)
1,35 g	Natriumbicarbonat, research grade	(Serva, Heidelberg)
200 mM	L-Glutamin	(Gibco, Eggenstein)
120 mg	Penicillin	(Serva, Heidelberg)
25 mg	Ampicillin	(Serva, Heidelberg)
270 mg	Streptomycin	(Serva, Heidelberg)

ad 1 l Milli-Q Wasser

Einstellung des pH-Wertes auf pH 7,2 - 7,6 mit NaOH.

Das Medium wurde steril filtriert und in 500 ml Flaschen gefüllt.

2.2.5 Lösungen zur Trypsinierung von Zellen

2.2.5.1 Lösung A

9 g	NaCl (0,9 %)	
2,38 g	HEPES	(Serva, Heidelberg)
1 ml	Phenolrot	
5 ml	KCl 1 M (74,6 g/l)	
5 ml	Glukose 10 % (100 g/l)	(Serva, Heidelberg)

ad 1 l Milli-Q Wasser

Der pH-Wert von pH 7,5 wurde mit NaOH eingestellt.

2.2.5.2 Lösung B

20 ml	Lösung A (siehe oben)
100 μ l	EDTA (40 mM)

2.2.5.3 Trypsin

20 mg	Trypsin in	(Roche, Mannheim)
10 ml	0,9 % NaCl lösen	

Die Trypsinlösung wurde steril filtriert und in Aliquots bei - 20°C eingefroren.

2.2.6 D-PBS

100 ml D-PBS (10 x) (Gibco, Eggenstein)
1 ml Phenolrot
ad 1 l Milli-Q Wasser

2.2.7 Fetales Rinderserum

Das fetale Rinderserum (FCS) (Sigma, Deisenhofen) wurde bei - 20°C gelagert. Vor Gebrauch wurde das Serum zum Auftauen 24 h im Kühlschrank (4°C) aufbewahrt. Das aufgetaute Serum wurde steril in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon, New Jersey, USA) portioniert und bei - 20°C gelagert.

2.2.8 Trypanblau

Stocklösung: Trypan blue stain (0,4 %) (Gibco, Eggenstein)

Aliquots der Stocklösung wurden steril entnommen und mit NaCl (0,9 %) 1:4 verdünnt.

2.2.9 Kristallviolett 0,5 %

0,5 g Kristallviolett (Merck, Darmstadt) wurde in 20 ml Methanol und 80 ml Aqua dest. gelöst.

Diese Lösung wurde in einer geschlossenen Glasflasche aufbewahrt (ca. 1 Monat Haltbarkeit bei Raumtemperatur).

2.3 Substanzen

2.3.1 Bakterielle Präparate und Lektine zur Modulation der NO- und TNF α -Freisetzung aus Makrophagen

2.3.1.1 Bakterielle Präparate

Lipopolysaccharid (LPS), E. coli-Stamm:026:B6 (Sigma, Deisenhofen)
OM-89, bakterieller Proteinextrakt aus E. coli (Laboratoires OM, Genf, Schweiz)

2.3.1.2 Lektine

Arachis hypogaea – AH (Erdnuß)

Bandeiraea simplicifolia Isolektin I – BS (Afrikanische Schwarzbohne)

Phaseolus limensis – PL (Mondbohne)

Vicia villosa – VV (Zottelwicke)

Canavalia ensiformis (Concanavalin A-ConA) – CE (Schwertbohne)

Lens culinaris – LC (Linse)

Pisum sativum – PS (Erbse)

Vicia faba – VF (Fava Bohne)

Vicia sativa – VS (Saatwicke)

Triticum vulgare – TV (Weizen)

Ulex europaeus Isolektin I – UE (Stechginster)

Phaseolus vulgaris (Phytohemagglutinin PHA) – PV (Gartenbohne)

Cholera Toxin-B – CTB, Extrakt aus *Vibrio Cholerae*

Alle Lektine wurden von Sigma, Deisenhofen bezogen.

2.3.2 Allgemein verwendete Substanzen

Actinomycin D	(Sigma, Deisenhofen)
Mitomycin C	(Sigma, Deisenhofen)
Tumor Nekrose Faktor α , rekombinantes Maus TNF α	(Genzyme, Rüsselsheim)
Fetales Rinderserum (FCS)	(Sigma, Deisenhofen)
N-(1-Naphthyl)ethylendiamin	(Sigma, Deisenhofen)
Sulfanilamid (p-Aminobenzensulfonamid)	(Sigma, Deisenhofen)

2.4 Methoden

2.4.1 Kultivierung der IC21 Makrophagen

Die adhärennten Zellen der IC21 Makrophagenlinie wurden in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS kultiviert (siehe 2.1.1). Die Zellen wuchsen in 10 ml Petrischalen (Falcon) und wurden 2- bis 3-mal pro Woche verdünnt. Dazu wurde das verbrauchte RPMI 1640 Medium abgesaugt und die Zellen wurden 2- bis 3-mal mit 10 ml HBSS (siehe 2.2.2) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit kaltem Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freiem HBSS (siehe 2.2.3) von der Petrischale abgelöst. Dafür wurden die Zellen für 7 min im Kühlschrank auf eine Glasplatte gestellt. Nach

dieser Zeit konnten die Zellen sehr leicht mit Hilfe einer Pipette vom Boden der Petrischale abgelöst werden. Die gewonnene Zellsuspension wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon) umgefüllt und bei 250 g für 5 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt, das Zellsediment wurde in 10 ml frischem RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS (siehe 2.2.7) resuspendiert und in einer Verdünnung von 1:10 (1 ml der resuspendierten Zellen und 9 ml frisches RPMI 1640 Medium) in Petrischalen ausgesät. Die Zellen wurden bei 37°C im Brutschrank (5 % CO₂) kultiviert.

2.4.2 Kultivierung der J774A.1 Makrophagen

Die Kultivierung der J774A.1 Makrophagen erforderte die gleichen Medien und die gleiche Handhabung wie die Kultivierung der IC21 Makrophagen (vergleiche daher Abschnitt 2.4.1).

2.4.3 Kultivierung der L929 Fibroblasten

Die adhärenenten L929 Fibroblasten wurden ähnlich der IC21 Makrophagen in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS in 10 ml Petrischalen (Falcon) kultiviert. Diese Zelllinie musste zweimal pro Woche verdünnt werden. Dazu wurden die Zellen mittels Trypsinierung von der Petrischale abgelöst (siehe 2.4.4). Ähnlich den IC21 Makrophagen konnten die L929 Fibroblasten anschließend leicht vom Boden der Petrischale abgelöst werden. Die gewonnene Zellsuspension wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon) überführt und bei 250 g für 5 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, die L929 Fibroblasten wurden in 10 ml RPMI 1640 mit 10 % FCS aufgenommen und in einer 1:10 Verdünnung (1 ml Zellsuspension und 9 ml RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS) in Petrischalen ausgesät. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C (5 % CO₂) kultiviert.

2.4.4 Trypsinierung

Um die adhärenenten Makrophagen von der Petrischale ablösen zu können, wurden die Zellen in den Petrischalen mit 5 ml Lösung A (siehe 2.2.5.1) gespült. Nach dem Absaugen der Lösung A wurden 5 ml der Lösung B (siehe 2.2.5.2) und 150 µl Trypsinlösung (2.2.5.3) hinzugegeben. Die Ablösung der Zellen wurde unter dem Mikroskop verfolgt. Unter der Wirkung von Lösung B und Trypsin verlieren die Zellen nach ca. 1 min ihre Haftung am Petrischalenboden und runden sich ab. Zur Unterbrechung der Trypsinwirkung wurde nach ca. 1 min 5 ml RPMI 1640 (siehe 2.2.1) mit 10 % FCS (siehe 2.2.7) hinzugefügt. Mit Hilfe einer Pipette und eines Zellschabers wurden die Makrophagen vom Boden der Petrischale abgelöst. Die Zellsuspension wurde dann in RPMI 1640 aufgenommen und abzentrifugiert (250 g für 5 min).

2.4.5 Trypanblau-Vitalitätstest

Um Vergleiche verschiedener Versuchsansätze zu ermöglichen, musste nicht nur die Gesamtzahl der Makrophagen, sondern vor allem bei unterschiedlichsten Vorbehandlungen der Zellen, der Anteil der lebenden Zellen bestimmt werden. Dieses wurde durch die Färbung bzw. Nicht-Färbung der Makrophagen mit Trypanblau ermittelt (siehe 2.2.8). Ein Aliquot der resuspendierten Zellen (20 µl) wurde mit 180 µl Trypanblaulösung (1:4 verdünnt in 0,9 % NaCl) gemischt. In einer Neubauer-Zählkammer wurden die ungefärbten, lebenden Zellen und die blau gefärbten toten Zellen mikroskopisch gezählt. Der Mittelwert aus vier großen Eckquadraten (X) wurde zur Berechnung der Konzentration der Makrophagen in der jeweiligen Zellsuspension eingesetzt:

$$X \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

Für den Versuchsansatz wurde eine Zellkonzentration von 10^6 Zellen/ml eingestellt. Die so verdünnten Zellen wurden für weitere Versuche verwendet. In allen für die Untersuchungen benutzten Zellsuspensionen lag der Anteil der trypanblau-positiven, toten Zellen unter 5 %.

2.5 Desensibilisierung von Makrophagen – Methode nach Ziegler-Heitbrock

Die von der Arbeitsgruppe von Ziegler-Heitbrock [Haas et al., 1990] entwickelte Methode zur Desensibilisierung einer humanen Monozytenzelllinie, wurde in der vorliegenden Arbeit mit einigen Veränderungen übernommen. Abweichend zu dem von Ziegler-Heitbrock beschriebenen Verfahren wurden die Experimente mit murinen Zellen durchgeführt. Zusätzlich zur TNF α -Produktion wurde mit diesem Verfahren in einigen Experimenten auch die NO-Produktion der Makrophagen bestimmt. Die Vorbehandlungsdauer der Makrophagen zur Desensibilisierung wurde aufgrund der Ergebnisse von Vorexperimenten von 72 h auf 24 h reduziert. Das Protokoll der Desensibilisierungsmethode erstreckt sich über vier Tage.

Am 1. Versuchstag wurden die Makrophagen in einer definierten Zellkonzentration in 5 ml Petrischalen (Falcon) ausgesät. Am 2. Versuchstag wurden sie zur Desensibilisierung mit verschiedenen Substanzen über 24 h vorbehandelt. Am 3. Versuchstag wurden die Zellen auf 96 Well-Flachbodenplatten (Falcon) verteilt und anschließend mit 1 µg/ml LPS (siehe 2.3.1.1) stimuliert. Am 4. Versuchstag wurden die Kulturüberstände abgenommen, aus denen anschließend die Konzentrationen freigesetzter Mediatoren bestimmt wurden. Nachfolgend sind die einzelnen Schritte des Verfahrens im Detail dargestellt. Siehe dazu auch die beispielhafte Darstellung des Experiments mit 6 Petrischalen in Tab. 1.

Am 1. Versuchstag wurden die Makrophagen aus 2-3 bis zu zwei Dritteln konfluent

bewachsenen 10 ml Petrischalen (Falcon) abgelöst (siehe 2.4.2). Nach Zentrifugation der Zellsuspension wurden die Zellen in 3 ml Medium RPMI 1640 (siehe 2.2.1) resuspendiert und 20 µl dieser Zellsuspension wurden mit 180 µl Trypanblau (siehe 2.2.8) vermischt. Die nach dem Trypanblau-Vitalitätstest erneut ausgezählten und verdünnten Zellen ($1 \times 10^6/\text{ml}$) (siehe 2.4.5) wurden in 5 ml Petrischalen (Falcon) ausgesät. Dazu wurden 0,5 ml der Zellsuspension und 4,5 ml RPMI 1640 (+ 10 % FCS) in die Petrischalen gegeben (Petrischalen Nr. 1-6 in Tab. 1). Die Petrischalen wurden im Brutschrank bei 37°C (5 % CO₂) für 24 h inkubiert. Die Anzahl der Petrischalen, die für ein Experiment benötigt wurden, war von der Größe des Versuchsansatzes abhängig. Im Verlauf der Experimente stellte sich heraus, dass aus Zeit- und Übersichtlichkeitsgründen ein Versuchsaufbau mit maximal sieben Petrischalen günstig war.

Tabelle 1:

Tabellarische Beschreibung des Versuchsaufbaus nach der modifizierten Methode von Ziegler-Heitbrock.

Versuchstag	Beschreibung	Versuchsaufbau									
		Petrischalen									
		1	2	3	4	5	6				
1	Aussäen der Makrophagen in Petrischalen	Medium		Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	
		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
2	Vorbehandlung der Makrophagen	Medium		CTB	Lektin 1	Lektin 2	Lektin 3	OM-89			
		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
		96 Well-Flachbodenplatte									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
3	Aussäen der Makrophagen in 96 Well-Flachbodenplatte. Behandlung mit Lektinen, OM-89 und Stimulation mit LPS.	A	Medium	CTB	Lektin 2	OM-89	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium
		B	Medium	CTB	Lektin 2	OM-89	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium
		C	Medium	CTB	Lektin 2	OM-89	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium
		D	LPS	Lektin 1	Lektin 3	-	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS
		E	LPS	Lektin 1	Lektin 3	-	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS
		F	LPS	Lektin 1	Lektin 3	-	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS
4	Entnahme der Überstände und Auswertung										

Legende: Lipopolysaccharid (LPS): 1 µg/ml; Cholera-Toxin-B (CTB): 10 µg/ml; OM-89: 1 mg/ml oder 10 mg/ml; verschiedene Lektine beispielhaft dargestellt als Lektine 1, 2 und 3 in der Konzentration von 10 µg/ml

Am 2. Versuchstag wurden die Substanzen zur Desensibilisierung in den gewünschten Konzentrationen zu den kultivierten Zellen in den Petrischalen hinzugefügt. In einem Versuchsaufbau mit z.B. sechs Petrischalen wurde die Aufteilung, wie nachfolgend beschrieben, vorgenommen (siehe dazu auch Tab. 1). Die Makrophagen in drei der sechs Petrischalen wurden bei allen Versuchen immer in gleicher Weise behandelt:

In der ersten Petrischale verblieben die Zellen unbehandelt im Medium. Die TNF α -Produktion der Makrophagen aus dieser Schale wurde bei der Auswertung als Kontrollwert angegeben. Bei der Auswertung des Versuches sollte dieser Ansatz zeigen, ob die Makrophagen eine Grundaktivität (z.B. in der TNF α -Produktion) aufwiesen oder nicht. In der zweiten Petrischale wurden die Makrophagen mit CTB (siehe 2.3.1.2) vorbehandelt. Da in Vorversuchen das Lektin CTB stets zu einer eindrucksvollen und sehr gut reproduzierbaren Desensibilisierung der Makrophagen geführt hat, wurde dieser Ansatz bei allen Experimenten als „positive Kontrolle“ mitgeführt. Er stellte eine zuverlässige Kontrolle hinsichtlich der korrekten Reaktion der Makrophagen auf die verschiedenen Stimuli und eine weitere Bestätigung der Verlässlichkeit der Versuchsaussage dar. Die Makrophagen in den weiteren Petrischalen wurden mit weiteren Lektinen und OM-89 vorbehandelt.

Am 3. Versuchstag wurde der Mediumüberstand der Petrischalen verworfen und jede Schale wurde 2- bis 3-mal mit 3 ml HBSS (siehe 2.2.2) gespült. Danach wurden die Makrophagen nach dem bereits beschriebenen Verfahren (siehe 2.4.4) von den Petrischalen abgelöst. Die Zellsuspensionen wurden abzentrifugiert und das Sediment in 1 ml RPMI 1640 resuspendiert. Von jeder Zellsuspension wurden 20 μ l entnommen und in den verschiedenen Ansätzen wurde die Zellzahl der Makrophagen, wie bereits beschrieben, mit Hilfe des Trypanblau-Vitalitätstests bestimmt. In der Inkubationsphase während des 1. und 2. Tages nahm die Anzahl der Makrophagen aufgrund der Proliferation der Zellen zu. Da für den nächsten Versuchsschritt ab Tag drei erneut gleiche Ausgangsbedingungen benötigt wurden, wurde die Zellzahl in allen Ansätzen erneut auf 10⁶/ml eingestellt. Die auf diese Weise vorbereiteten Makrophagensuspensionen wurden in die Wells von 96 Well-Flachbodenplatten (Falcon) verteilt. In jedes Well wurden 200 μ l der Zellsuspension, entsprechend einer Makrophagenzahl von 200 000 Zellen/Well, verteilt. Die Verteilung der Makrophagen der verschiedenen Teilversuche auf der 96 Well-Flachbodenplatte, die 12 senkrechte Reihen und 8 waagerechte Reihen beinhaltet, erfolgte nach individuell erdachtem Schema. Das beispielhaft in Tab. 1 dargestellte Experiment mit sechs Petrischalen umfasste sechs Teilversuche. Die Zellsuspensionen wurden folgendermaßen unterteilt (siehe dazu auch Tab. 1):

Aus der ersten Petrischale mit unbehandelten Makrophagen wurden für jeden Teilversuch jeweils drei Wells mit 200 μ l befüllt, also insgesamt sieben mal drei Wells. Die Makrophagen in den ersten drei Wells wurden unbehandelt im Medium belassen (Kontrollwert) (1 A-C). Die folgenden drei Wells (1 D-F) wurden für 24 h mit 1 μ g/ml LPS stimuliert. Die hier gemessene Mediatorenkonzentration ergab den Referenzwert, mit dem die Effekte der Makrophagenvorbehandlung mit Lektinen oder OM-89 verglichen werden konnten. Die

weiteren drei Wells (2 A-C) wurden jeweils für 24 h mit CTB behandelt. Die restlichen zu untersuchenden Lektine und OM-89 (siehe 2.3.1.1) wurden zu den nachfolgenden Wells (2 D-F bis 4 A-C) gegeben. Die zuvor im Medium unbehandelt belassenen Makrophagen aus der ersten Petrischale, die am 3. Tag für 24 h mit den verschiedenen Lektinen und OM-89 behandelt wurden, ergaben eine Aussage zur alleinigen Wirkung eines Lektins oder von OM-89 auf die untersuchten Makrophagen.

Die Zellsuspensionen aus den Petrischalen der fünf weiteren Teilversuche, bei der die Makrophagen am 2. Tag für 24 h mit verschiedenen Substanzen vorbehandelt wurden (CTB, weitere Lektine und OM-89), wurden folgendermaßen weiter unterteilt: Zellen aus jeder Petrischale wurden in jeweils sechs Wells gefüllt (200 µl Zellsuspension/Well) (5 A-F bis 9 A-F). Die Makrophagen in den ersten drei Wells dieser jeweiligen Teilversuche wurden am 3. Tag für 24 h unbehandelt im Medium belassen (5 A-C bis 9 A-C). Die aus diesen Ansätzen erhobenen Daten zeigen, ob die am 2. Tag erfolgte alleinige Vorbehandlung der Makrophagen zu einer Stimulation der Zellen geführt hat oder nicht. Die Makrophagen in den folgenden drei Wells der jeweiligen Teilversuche (5 D-F bis 9 D-F) wurden am 3. Tag über 24 h mit 1 µg/ml LPS stimuliert. Diese Daten wurden mit dem Referenzwert (3. Tag, Werte 1 D-F) verglichen. Somit konnte die Wirkung der bei der Vorbehandlung der Makrophagen eingesetzten Substanzen (Lektine und OM-89) anhand der TNF α - und NO-Produktion untersucht werden. Die Messung der TNF α - und NO-Freisetzung im Vergleich zum Referenzwert (1 D-F) erlaubte eine Aussage darüber, ob die zur Vorbehandlung eingesetzten Substanzen die Reaktivität der Makrophagen nach Stimulation mit LPS beeinflussen.

Am 4. Versuchstag wurden die Überstände (200 µl) aus den 96 Well-Flachbodenplatten steril entnommen und unmittelbar zur Bestimmung von TNF α eingesetzt oder bei - 20°C für eine spätere Auswertung eingefroren. Für die TNF α -Bestimmung wurde der TNF α -Bio-Assay (siehe 2.8) verwendet.

2.6 Behandlung von Makrophagen mit Mitomycin C

Mitomycin C (Sigma, Deisenhofen) ist ein zytostatisch wirksames Antibiotikum aus *Streptomyces caespitosus novum species* [Karow und Lang-Roth, 2003], das die DNA-Synthese stört. Mitomycin C verursacht die Bildung kovalenter Quervernetzungen zwischen DNA-Strängen und verhindert dabei die Trennung der Stränge, die bei der Zellteilung für die Replikation notwendig ist. Da es sowohl bei Mikroorganismen als auch bei Eukaryonten als Mitosehemmstoff wirkt, hat es nur in der Tumorthherapie Bedeutung [Löffler und Petrides, 1990].

Neben der Versuchsmethode nach Ziegler-Heitbrock (siehe 2.5) wurde unter Einsatz von Mitomycin C eine alternative Methode zur Makrophagendesensibilisierung (hier nachfolgend als Standardmethode bezeichnet) verwendet.

Da die Zellen der Makrophagenlinien sich kontinuierlich vermehren und ab einer bestimmten Zelldichte in dem vorgegebenen Kulturgefäß versterben, wurde ein Versuchssystem etabliert, in dem mit einer konstanten und reproduzierbaren Makrophagenzahl gearbeitet werden konnte. Mit der Behandlung der Makrophagen mit Mitomycin C (Sigma, Deisenhofen) konnte ein solches System etabliert werden.

Die Versuchsmethode zur Desensibilisierung von Makrophagen nach Mitomycin C Behandlung (siehe 2.6.1) hatte, im Vergleich zu der Methode nach Ziegler-Heitbrock (siehe 2.5) den Vorteil, dass damit viele Substanzen effizient untersucht werden konnten. Diese Methode wurde verwendet, um die Reaktion von Makrophagen auf die Behandlung mit Lektinen (siehe 2.3.1.2) und OM-89 (siehe 2.3.1.1) in unterschiedlichen Konzentrationen zu untersuchen.

2.6.1 Desensibilisierung von Makrophagen nach Mitomycin C Behandlung

Die Versuche zur Desensibilisierung von Makrophagen nach Mitomycin C Behandlung erstrecken sich ebenfalls über 4 Tage, können aber viel mehr Teilversuche beinhalten als die Methode nach Ziegler-Heitbrock (siehe 2.5).

Am 1. Versuchstag wurden die Makrophagen für den Versuch vorbereitet, am 2. Versuchstag erfolgte die Vorinkubation (Vorbehandlung der Makrophagen mit den verschiedenen Lektinen oder OM-89) und am 3. Versuchstag erfolgte die Stimulation der Makrophagen mit LPS. Am 4. Versuchstag wurden die Kulturüberstände für die Messung des akkumulierten Nitrits abgenommen. Nachfolgend sind die einzelnen Schritte des Verfahrens im Detail dargestellt (siehe dazu auch Tab. 2). Der OM-89-Versuchsaufbau mit OM-89 (10 mg/ml) entspricht dem Lektin-Versuchsaufbau. Dieser wurde tabellarisch nicht gesondert dargestellt.

Am 1. Versuchstag wurden die Makrophagen von vier bis fünf dicht bewachsenen 10 ml-Petrischalen (Falcon) abgelöst (siehe 2.4.1) und bei 250 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, und das Zellpellet wurde in 9 ml D-PBS (siehe 2.2.6) in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon) gut resuspendiert. Mitomycin C wurde steril in 4 ml D-PBS aufgelöst. 1 ml der Mitomycin C-Lösung wurde zu 9 ml der Makrophagensuspension gegeben. Die Zellsuspension in den Zentrifugenröhrchen wurde durch Alufolie vor Licht geschützt, da die zytostatische Wirkung von Mitomycin C unter Lichteinfluss gemindert wird. Um die Mitomycin C Wirkung auf die Makrophagen zu verbessern, wurden die Zellen 20 min in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert. Zwischenzeitlich wurden die Zellen aufgewirbelt, um eine gleichmäßige Verteilung des Mitomycin C in der Zellsuspension zu erreichen. Nach 20 min wurden die Zellen erneut bei 250 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, und die sedimentierten Zellen wurden in 10 ml HBSS (siehe 2.2.2) resuspendiert. Danach wurde wieder bei gleicher Umdrehungszahl zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Makrophagen in 3 ml

Tabelle 2:

Behandlung von Makrophagen mit CTB und weiteren Lektinen (verschiedene Konzentrationen) und nachfolgende Stimulation mit LPS (1 µg/ml). Die IC21 Makrophagen wurden mit Mitomycin C vorbehandelt.

Versuchstag	Beschreibung	Versuchsaufbau													
		96 Well-Flachbodenplatte													
1	Aussäen der Makrophagen	Makrophagen in der 96 Well-Flachbodenplatte ausgesät und im Medium belassen													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
2	Vorbehandlung der Makrophagen	A	M	M	M	M	M	CTB 10	Lektin 0,01	Lektin 0,1	Lektin 1	Lektin 10	Lektin 20	Lektin 50	
		B	M	M	M	M	M	CTB 10	Lektin 0,01	Lektin 0,1	Lektin 1	Lektin 10	Lektin 20	Lektin 50	
		C	M	M	M	M	M	CTB 10	Lektin 0,01	Lektin 0,1	Lektin 1	Lektin 10	Lektin 20	Lektin 50	
		D	M	M	M	M	-	CTB 10	Lektin 0,01	Lektin 0,1	Lektin 1	Lektin 10	Lektin 20	Lektin 50	
		E	M	M	M	M	-	CTB 10	Lektin 0,01	Lektin 0,1	Lektin 1	Lektin 10	Lektin 20	Lektin 50	
		F	M	M	M	M	-	CTB 10	Lektin 0,01	Lektin 0,1	Lektin 1	Lektin 10	Lektin 20	Lektin 50	
3	Behandlung der Makrophagen mit Lektinen und Stimulation der Makrophagen mit LPS	A	M	CTB 10	Lektin 0,1	Lektin 10	Lektin 50	M	M	M	M	M	M	M	
		B	M	CTB 10	Lektin 0,1	Lektin 10	Lektin 50	M	M	M	M	M	M	M	
		C	M	CTB 10	Lektin 0,1	Lektin 10	Lektin 50	M	M	M	M	M	M	M	
		D	LPS 1	Lektin 0,01	Lektin 1	Lektin 20	-	LPS 1	LPS 1	LPS 1	LPS 1	LPS 1	LPS 1	LPS 1	LPS 1
		E	LPS 1	Lektin 0,01	Lektin 1	Lektin 20	-	LPS 1	LPS 1	LPS 1	LPS 1	LPS 1	LPS 1	LPS 1	LPS 1
		F	LPS 1	Lektin 0,01	Lektin 1	Lektin 20	-	LPS 1	LPS 1	LPS 1	LPS 1	LPS 1	LPS 1	LPS 1	LPS 1
4	Entnahme der Überstände und Auswertung														

Legende: Lipopolysaccharid (LPS): 1 µg/ml; Cholera-Toxin-B (CTB): 10 µg/ml; Lektin in unterschiedlichen Konzentrationen (0,01; 0,1; 1; 10; 20; 50 µg/ml). M: Medium

HBSS aufgenommen und, wie schon im Abschnitt 2.5 (1.Tag, Beschreibung Methode nach Ziegler-Heitbrock) dargestellt, die Zellzahl bestimmt.

Wie in den Vorexperimenten gezeigt (siehe 3.2.1), wurde bei diesem Versuchsverfahren eine höhere Makrophagenzellzahl verwendet ($1,5 \times 10^6$ Makrophagen/ml). Mit dieser erhöhten Zellzahl wurde eine annähernd gleiche NO-Freisetzung wie in den Versuchen ohne Mitomycin C mit einer Makrophagenzellzahl von 10^6 /ml erreicht (siehe Abb. 4 A / Abb. 4 B und Abb. 5). Die Makrophagensuspension wurde in die Wells von 96 Well-Flachbodenplatten (Falcon) verteilt (200 μ l/Well). Zwischendurch wurde die Zellsuspension immer wieder gut aufgewirbelt um ein Sedimentieren zu verhindern und eine konstante Zellkonzentration in den einzelnen Wells zu gewährleisten (300 000 Zellen/Well). Die Anzahl der 96 Well-Flachbodenplatten war von der Zahl und den Konzentrationsabstufungen der zu untersuchenden Lektine oder des bakteriellen Präparats (OM-89) abhängig. Die Makrophagen wurden in den 96 Well-Flachbodenplatten über 24 h bei 37°C (5 % CO₂) inkubiert.

Am 2. Versuchstag wurden die Makrophagen nach dem in Tab. 2 dargestellten Schema mit den verschiedenen Präparaten in Triplikaten vorinkubiert. Das erste Triplikat (1A-1C) wurde unbehandelt belassen. Dieser Ansatz entsprach dem Kontrollwert und zeigte die spontane NO-Freisetzung der unstimulierten Makrophagen. Die weiteren 24 Wells (1D-1F bis 5A-5C) wurden ebenfalls unbehandelt belassen. Diese wurden dann am 3. Versuchstag mit den zu untersuchenden Substanzen nachbehandelt. Die Zellen in den folgenden Wells (6A-6F bis 12A-12F) wurden, wie in der Tab. 2 gezeigt, mit den unterschiedlichen Konzentrationen der verschiedenen Lektine oder dem bakteriellen Präparat (OM-89) vorbehandelt. Die so vorbehandelten Makrophagen wurden im Brutschrank bei 37°C (5 % CO₂) über 24 h inkubiert.

Am 3. Versuchstag wurden die Makrophagen nach Mediumwechsel mit 1 μ g/ml LPS stimuliert und mit CTB (10 μ g/ml), Lektinen oder OM-89 in unterschiedlichen Konzentrationen nachbehandelt. Die Aufteilung in der 96 Well-Flachbodenplatte ist in der Tab. 2 dargestellt. Die Makrophagen in den ersten drei Wells (1A-1C) blieben weiterhin unbehandelt (Kontrollwert). Die folgenden drei Wells (1D-1F) wurden mit 1 μ g/ml LPS stimuliert; aus diesem Ansatz ergab sich der Referenzwert. Die NO-Freisetzung der am 2. Versuchstag mit Lektinen oder OM-89 vorbehandelten und am 3. Versuchstag stimulierten Makrophagen wurde mit dem Referenzwert verglichen. Anhand des Referenzwertes konnte auch sehr gut beurteilt werden, ob die kultivierten Makrophagen am 3. Versuchstag noch stimulationsfähig waren. Falls keine NO-Produktion durch die LPS-Stimulation induziert werden konnte, musste davon ausgegangen werden, dass die Funktion der Makrophagen gestört war. Eine adäquate Auswertung des Versuches wäre dann nicht mehr möglich gewesen. In den weiterfolgenden Wells wurden die Makrophagen in jeweils drei Wells mit den Lektinen in den verschiedenen Konzentrationen nachbehandelt (2A-2F bis 5A-5C). Mit diesen Ansätzen wurde geprüft, ob die Lektine alleine eine Wirkung auf die Makrophagen ausüben.

Die am 2. Versuchstag mit LPS (1 μ g/ml), CTB (10 μ g/ml) oder verschiedenen Konzentrationen

von Lektinen bzw. OM-89 vorbehandelten Makrophagen wurden am 3. Versuchstag zum Teil (jeweils 3 Wells) im Medium unbehandelt belassen (6A- 6C bis 12A-12C) und zum anderen Teil (jeweils 3 Wells) mit 1 µg/ml LPS stimuliert (6D-6F bis 12D-12F) (siehe dazu auch Tab. 2). Im Vergleich zum Referenzwert konnte auf diese Weise beurteilt werden, ob eine Vorbehandlung mit einem Präparat zu einer Veränderung der LPS-induzierten Makrophagenreaktion geführt hat.

Am 4. Versuchstag wurden die Überstände (200 µl) aus den einzelnen Wells entnommen und entweder in Eppendorfgläsern für spätere Analysen bei - 20°C aufbewahrt oder unmittelbar mit Hilfe der Nitritmessung nach Griess (siehe 2.7.1) ausgewertet.

2.7 Auswertungsverfahren

2.7.1 Nitritmessung nach Griess

Als Äquivalent des von den Makrophagen produzierten NO, wurde in den Kulturüberständen Nitrit (NO₂⁻) als stabiles Oxidationsprodukt gemessen. Für diesen quantitativen Nitritnachweis wurde eine nach Wood et al., 1990 modifizierte Methode eingesetzt. Hierbei wird die Konzentration eines Azofarbstoffs photometrisch erfasst, der durch Diazotierung eines aromatischen Amins und Kupplung mit einem zweiten Amin entsteht. Das in der Probe enthaltene NO diazotiert Sulfanilamid (Lösung A: siehe 2.3.2) in saurem Milieu. Als Kupplungsreagenz wird Naphthylethylendiamin-dihydrochlorid (Lösung B: siehe 2.3.2) eingesetzt, das im Falle einer vorausgegangenen Diazotierung einen Azofarbstoff mit dem Diazotierungsprodukt bildet. Dieser ist bei einer Wellenlänge von 540 nm messbar. Der beschriebene Test wurde wie folgt durchgeführt:

Jeweils 50 µl der Kulturüberstände wurden mit 50 µl Lösung C in einem Reaktionsgefäß einer Mikrotiterplatte mit Flachboden gemischt und gegen den Leerwert, der lediglich mit inkubiertem Medium enthielt, gemessen. Die Lösung C ist das 1:1 Gemisch der Lösung A und der Lösung B, das unmittelbar vor Testbeginn angesetzt wurde. Die Auswertung erfolgte mit dem Softwareprogramm Softmax anhand einer mitgeführten Eichgeraden, die mit definierten Konzentrationen von NaNO₂ erstellt wurde.

Lösung A	Sulfanilamid	0,1 g / 10 ml 2,5 % H ₃ PO ₄
Lösung B	Naphthylethylendiamin-dihydrochlorid	0,03 g / 10 ml 2,5 % H ₃ PO ₄
Lösung C	1:1 Gemisch der Lösung A und der Lösung B	

2.7.2 TNF α -Bioassay

Um biologisch aktives TNF α in Kulturüberständen nachzuweisen, wurde ein Bioassay eingesetzt, der auf der Empfindlichkeit von L929 Fibroblasten (siehe 2.1.3) gegenüber TNF α beruht [Koike et al., 1993]. Werden L929 Fibroblasten mit TNF α inkubiert, kommt es zur Lyse dieser Zellen, die durch eine Färbung mit Kristallviolett nachgewiesen werden kann. Der beschriebene Test wurde wie folgt durchgeführt:

Am Tag 0 wurden je 50 000 Zellen der L929 Fibroblastenlinie in je einem Well einer 96 Well-Flachbodenplatte in einem Volumen von 100 μ l Click's-Medium (siehe 2.2.4) ausgesät. Nach einer Adhärenzzeit von ca. 18 h wurden 50 μ l dieses Mediums aus jedem Well entnommen. Dann wurden in jede Reaktionskammer 100 μ l der Überstände aus den Ansätzen der Makrophagenkulturen gegeben, in denen die TNF α -Konzentration bestimmt werden sollte. Die Kulturüberstände waren verdünnt in den Verhältnissen: 1:2, 1:10, 1:100 und 1:1000. Für die anschließende Berechnung der TNF α -Konzentrationen in den eingesetzten Proben wurde ein Standard aus humanem rekombinantem TNF α mitgeführt. Dazu wurden 50 μ l TNF α in einer Konzentration von 5 ng/ml in 3 Reaktionskammern der Mikrotiterplatte gegeben und dann sequentiell 9-mal 1:2 in den nachfolgenden Kammern verdünnt. Alle Ansätze wurden mit Click's-Medium auf ein Volumen von 150 μ l aufgefüllt. Um eine weitere Proliferation der L929-Fibroblasten zu unterbinden, wurden zu jedem Ansatz 50 μ l Actinomycin D (Stammlösung: 1 mg/ml) (siehe 2.3.2) gegeben und somit die Reaktionsansätze auf ein Endvolumen von 200 μ l aufgefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 18-24 h wurden die Überstände verworfen und die adhärennten L929-Fibroblasten mit 100 μ l Kristallviolett-Lösung (siehe 2.2.9) für 10 min inkubiert. Nach gründlichem Waschen unter fließendem Leitungswasser wurden die Mikrotiterplatten getrocknet. Die Extinktion der Standardwerte und der Proben wurden bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen. Bei hohen TNF α -Konzentrationen wurden die Zellen lysiert und verloren beim Waschen die blaue Farbe. Die intakten Zellen gaben das Kristallviolett auch beim Waschen nicht ab. Auf halblogarithmischem Millimeterpapier wurde die Standardkurve aufgetragen, aus der die halbmaximale Lyse ermittelt wurde, die zur Berechnung der TNF α -Konzentration der Proben diente.

2.8 Statistik

Die NO₂⁻- und TNF α -Bestimmungen wurden in Triplikaten vorgenommen. Die Einzelwerte der unabhängigen Experimente wurden zu einem arithmetischen Mittelwert zusammengefasst und die Standardabweichung (SD) bestimmt. Die Signifikanzen wurden nach dem Student t-Test berechnet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt, d.h. der Unterschied zwischen zwei Werten wurde als signifikant bezeichnet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) kleiner als 5 % war.

3 **ERGEBNISSE**

3.1 **Einleitung**

In der vorliegenden Arbeit wurde die immunmodulatorische Wirkung von Lektinen und bakteriellen Substanzen auf Mausmakrophagen analysiert. Das Ziel der Untersuchung war die Identifikation von Substanzen, die eine desensibilisierende Wirkung auf Makrophagen ausüben. Dazu wurden die Auswirkungen von Vorinkubationen mit unterschiedlichen Substanzen auf die Produktion der inflammatorischen Makrophagenmediatoren NO_2^- und $\text{TNF}\alpha$ gemessen.

3.2 **Etablierung des experimentellen Systems**

3.2.1 **Abhängigkeit der Stickstoffmonoxid-Produktion von Zellzahl und Stimulationsdauer**

Zur Etablierung des Versuchssystems wurden zunächst die für die geplanten Untersuchungen optimale Makrophagenzellzahl und Versuchsdauer bestimmt. Im weiteren Verlauf wurden die eingesetzten Makrophagenzelllinien IC21 und J774A.1 sowie zwei experimentelle Verfahren auf ihre Vergleichbarkeit untersucht.

Zunächst wurden Makrophagen der Linie IC21 ohne und mit Mitomycin C Vorbehandlung in unterschiedlichen Zellzahlen in einem Gesamtvolumen von 200 μl pro Well einer 96 Well-Flachbodenplatte ausgesät. Die Makrophagen wurden mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS stimuliert und nach 24 h wurde in den Kulturüberständen die Konzentration des akkumulierten Nitrits gemessen. Die Abb. 1A und 1B zeigen die Nitritkonzentrationen in den Überständen von IC21 Makrophagen nach 24-stündiger Kultur in unterschiedlichen Zellkonzentrationen.

In Abb. 1A entspricht eine Zellkonzentration von 10×10^5 IC21 Makrophagen/ml einer Zellzahl von 2×10^5 Zellen/Well. Die Konzentration des akkumulierten Nitrits betrug $17,6 \pm 0,3 \mu\text{M}$, und bei einer Zellzahl von $5 \times 10^5/\text{ml}$ wurde eine Nitritkonzentration von $13,5 \pm 0,3 \mu\text{M}$ gemessen. Eine weitere Halbierung der Zellzahl ($2,5 \times 10^5/\text{ml}$) führte auch zu einer verminderten NO-Produktion auf $6,9 \pm 0,4 \mu\text{M}$. Im Bereich von $1,25 \times 10^5$ Zellen/ml und $0,75 \times 10^5$ Zellen/ml erreichte eine LPS-Behandlung über 24 h nur eine geringe Stimulation der Zellen ($1,3 \pm 1,8 \mu\text{M}$ und $1,2 \pm 1,6 \mu\text{M}$). Die Nitritkonzentration in den Überständen von nicht stimulierten IC21 Makrophagen lag bei $0,4 \pm 0,4 \mu\text{M}$.

Wie aus der Abb. 2 ersichtlich, wurde der Zeitraum von 24 h gewählt, da in dieser Zeit eine

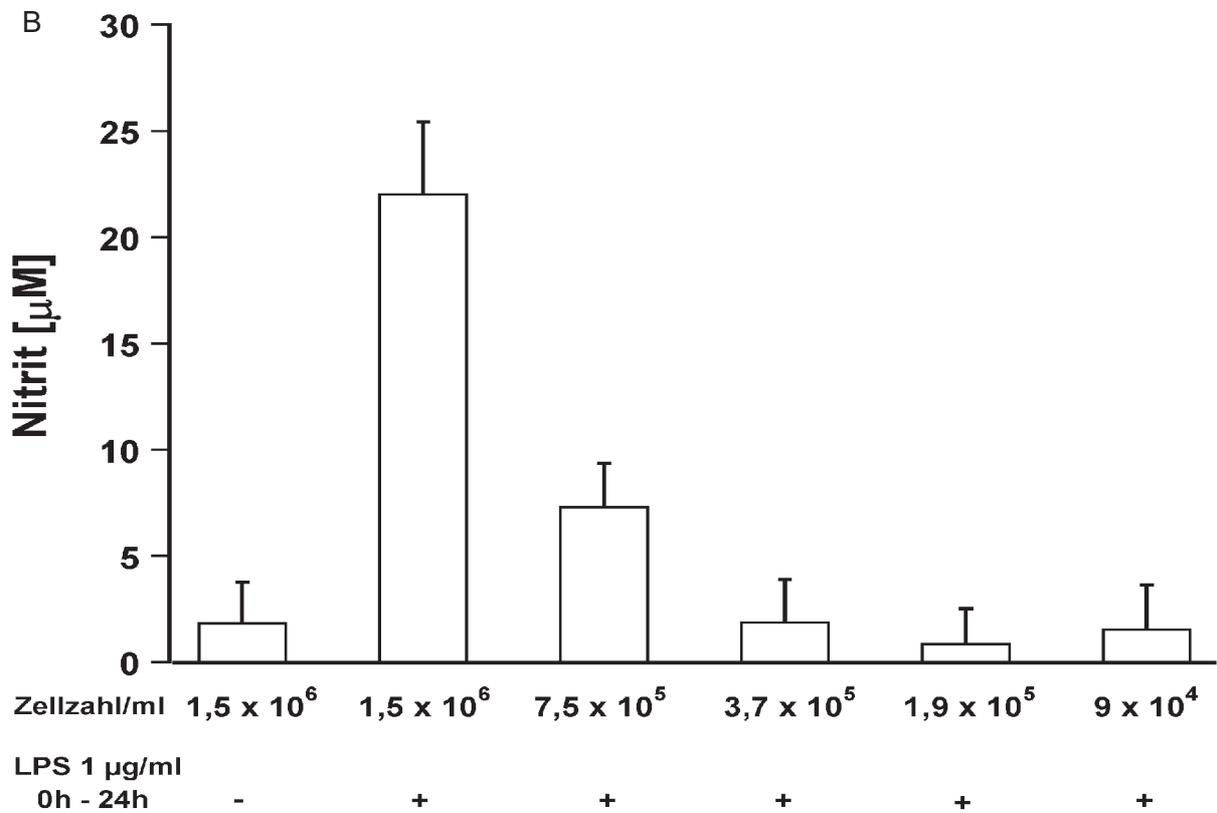
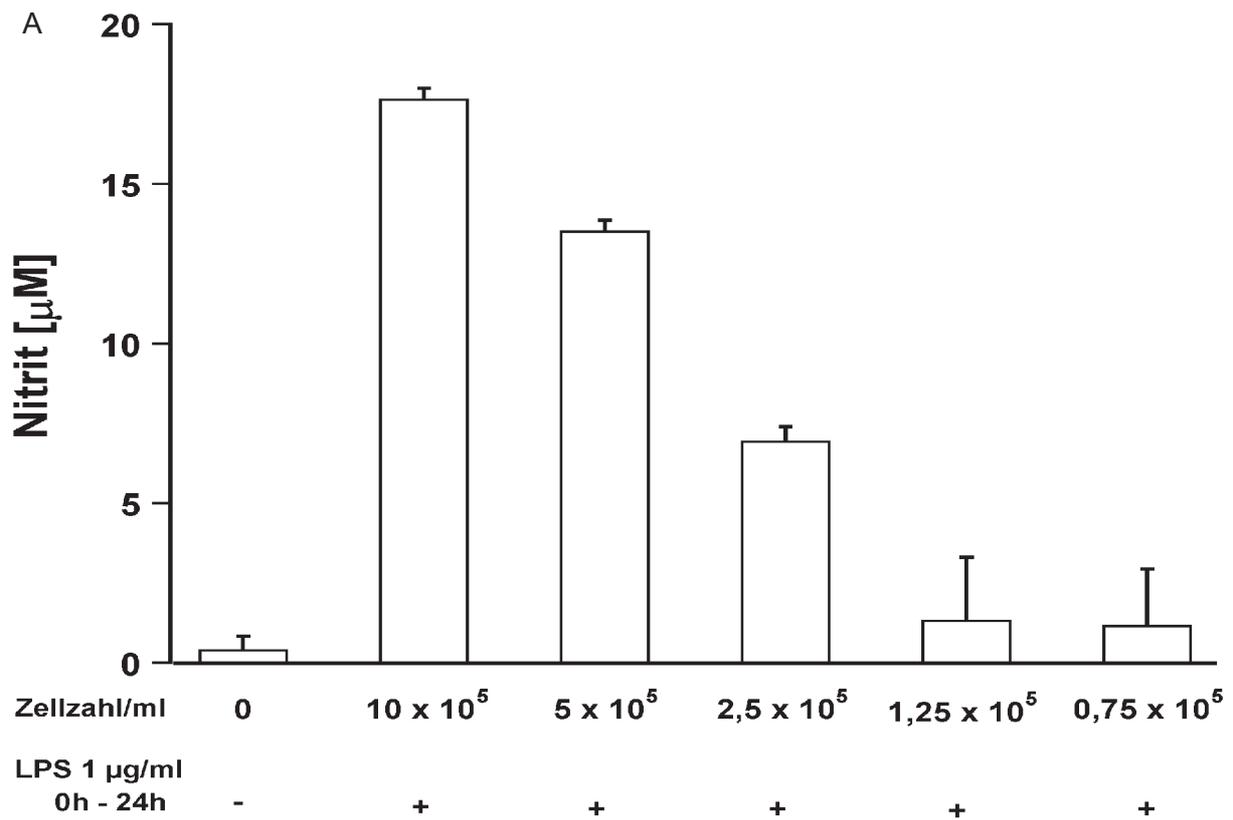


Abb. 1: Abhängigkeit der NO-Freisetzung von der Zahl inkubierter IC21 Makrophagen. Die Zellen wurden in unterschiedlichen Zellzahlen ohne Mitomycin C (A) und mit Mitomycin C-Vorbehandlung (B) mit 1 µg/ml LPS stimuliert. Nach 24 h wurde in den Überständen die Nitritkonzentration gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Nitritkonzentration +SD (in µM) aus zwei Versuchen, die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden. Zur Kontrolle wurden Zellen ohne LPS-Stimulation belassen.

deutliche Zunahme der NO-Produktion zu erwarten war. Je länger die Versuchsdauer, desto eher muss davon ausgegangen werden, dass durch Zellteilung die Zahl der kultivierten Makrophagen zunimmt. Um eine unkontrollierbare Zunahme der Zellzahlen durch möglicherweise unterschiedliche Proliferationsraten in den Ansätzen auszuschließen, wurde der Mitosehemmstoff Mitomycin C eingesetzt.

Abb. 1B zeigt die Nitritakkumulation in Kulturüberständen von IC21 Makrophagen, die mit Mitomycin C vorbehandelt wurden. Um eine äquivalente NO-Produktion dieser nicht mehr teilungsfähigen Makrophagen im Vergleich zu den nicht mit Mitomycin C vorbehandelten IC21 Makrophagen zu erreichen, wurde bei dieser Versuchsreihe eine maximale Zellkonzentration von $1,5 \times 10^6$ /ml gewählt. Hierbei wurde bei den über 24 h mit LPS stimulierten Makrophagen eine maximale Nitritakkumulation von $22,0 \pm 3,2 \mu\text{M}$ gemessen. Bei einer Zellkonzentration von $7,5 \times 10^5$ /ml zeigten die vorbehandelten IC21 Makrophagen eine Nitritakkumulation von $7,3 \pm 1,9 \mu\text{M}$. Die Nitritakkumulation der weiteren jeweils um 50 % reduzierten Makrophagenzellzahlen ($3,7 \times 10^5$; $1,9 \times 10^5$ und 9×10^4 /ml) war nach 24 h LPS-Stimulation sehr gering ($1,9 \pm 1,9 \mu\text{M}$; $0,9 \pm 1,5 \mu\text{M}$; $1,5 \pm 1,9 \mu\text{M}$) und lag im Bereich der unstimulierten Zellen ($2,0 \pm 1,8 \mu\text{M}$). Im Vergleich zu den nicht mit Mitomycin C vorbehandelten Makrophagen wurde in dieser Versuchsreihe ein schnellerer Abfall der LPS-stimulierten Nitritakkumulation in Abhängigkeit von der abnehmenden Zellzahl festgestellt. Allerdings war die Nitritkonzentration im Bereich der höchsten Zellzahl sowohl bei unbehandelten Makrophagen ($17,6 \pm 0,3 \mu\text{M}$) als auch bei den mit Mitomycin C behandelten Makrophagen ($22,0 \pm 3,2 \mu\text{M}$) vergleichbar. Bei der Durchführung von Experimenten nach der Methode von Ziegler-Heitbrock wurde die Makrophagenzahl zweimal bestimmt (siehe 2.5), so dass eine Erhöhung der Zellzahl während des Versuches auszuschließen war. Die Zellzahl dieser Versuchsreihen wurde auf 1×10^6 Zellen/ml festgelegt. In beiden experimentellen Systemen war bei den gewählten Zellkonzentrationen eine vergleichbar hohe Nitritakkumulation/Well zu beobachten. Zur weiteren Optimierung des experimentellen Systems wurde in den nachfolgenden Untersuchungen die Kinetik der NO-Freisetzung bestimmt.

Abb. 2 zeigt die zeitliche Abhängigkeit der NO-Produktion von IC21 Makrophagen (10^6 /ml) nach Stimulation mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS. Die Nitritakkumulation in den Kulturüberständen wurde nach 0, 18, 24, 48 und 72 h gemessen. Nach 18 h wurde eine Nitritkonzentration von $38,0 \pm 4,5 \mu\text{M}$ und nach 24 h eine Nitritkonzentration von $41,8 \pm 2,3 \mu\text{M}$ gemessen. Die Messung nach 48 h ergab eine, gegenüber dem 24 h Wert, signifikante Erhöhung der Nitritkonzentration ($60,0 \pm 5,1 \mu\text{M}$). Nach 72 h war ein weiterer aber nicht mehr signifikanter Anstieg der NO-Produktion auf $65,4 \pm 8,3 \mu\text{M}$ zu erkennen. Die Nitritakkumulation der nicht behandelten Makrophagen war mit $1,5 \pm 1,9 \mu\text{M}$ sehr gering.

Aus diesen Beobachtungen ergab sich als optimale Stimulationsdauer für die Makrophagenkulturen ein Zeitraum von 24 h, nachdem die NO-Produktion bereits deutlich

messbar war, aber noch nicht ihren maximalen Wert erreicht hatte. Eine vor der LPS-Exposition induzierte Modulation der Makrophagen-Aktivität (Hemmung oder weitere Stimulation) würde somit zu diesem Zeitpunkt gut erkennbar sein. Die 48 h- und 72 h-Werte zeigen zwar einen weiteren Anstieg der NO-Produktion, allerdings scheint nach 48 h das Maximum erreicht

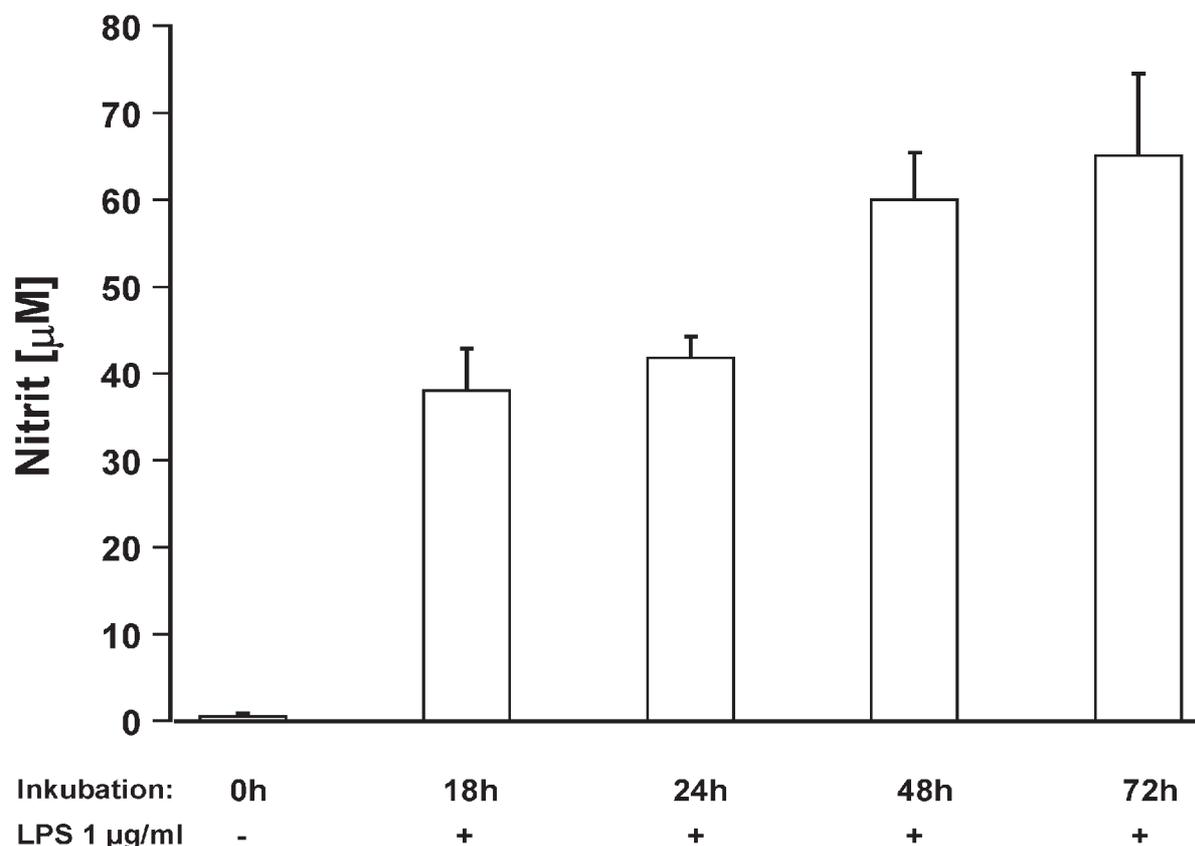


Abb. 2: Kinetik der Nitritakkumulation in Überständen von LPS-stimulierten IC21 Makrophagen. 10^6 IC21 Makrophagen/Well wurden mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS stimuliert und die Nitritkonzentration wurde jeweils nach 0, 18, 24, 48 und 72 h in den Überständen gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Nitritkonzentration +SD aus zwei Versuchen die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden. Zur Kontrolle wurden IC21 Makrophagen ohne LPS-Stimulation belassen.

zu sein, und damit wäre zu erwarten, dass die Zellen zu diesen Zeitpunkten nicht mehr so sensitiv auf eine induzierte Modulation ihrer NO-Produktion reagieren. Der weitere Anstieg der NO-Produktion nach 48 h und 72 h gibt jedoch zusätzlich Aufschluss darüber, dass die Makrophagen auch zu diesen Zeitpunkten unter den gewählten Versuchsbedingungen vital und funktionsfähig sind.

3.3.1 Charakterisierung des experimentellen Systems zur Desensibilisierung von Mausmakrophagen

Wie bereits erwähnt, wurden die Versuche zur Desensibilisierung von Makrophagen nach zwei verschiedenen, in der Literatur beschriebenen Verfahren durchgeführt. Die Gemeinsamkeit beider Methoden bestand darin, dass die Makrophagen 24 h mit bestimmten Substanzen vorinkubiert wurden und, nach Mediumwechsel, dann über 24 h mit LPS stimuliert wurden. Nach diesen 24 h wurden aus den Überständen die freigesetzten Mediatoren bestimmt. Zur Untersuchung der TNF α -Produktion wurden die Experimente nach der von Ziegler-Heitbrock beschriebenen Methode in leicht modifizierter Form durchgeführt (Haas et al., 1990). Zur Bestimmung der von Makrophagen produzierten NO-Menge wurde hauptsächlich die Methode nach Liew (Severn et al., 1993) verwendet, die im weiteren Verlauf als „Standardmethode“ bezeichnet wird. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der beiden Verfahren zu belegen, wurden zunächst Versuche parallel nach der Methode von Ziegler-Heitbrock und nach der Standardmethode mit den beiden Makrophagenzelllinien J774A.1 und IC21 durchgeführt. Das Lektin CTB wurde bei diesen Versuchsreihen verwendet. In den nachfolgend beschriebenen Voruntersuchungen zeigte CTB in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ eine Makrophagen-desensibilisierende Wirkung (siehe Abb. 3).

Die Abb. 3A zeigt die Nitritakkumulation in den Überständen von IC21 Makrophagen nach 24 h Vorbehandlung mit 0,1 und 10 $\mu\text{g/ml}$ von CTB und anschließender 24-stündiger Stimulation dieser Makrophagen mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS. Die Nitritakkumulation der nicht vorbehandelten und nach 24 h mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS stimulierten IC21 Makrophagen stellt mit $39,6 \pm 4,4 \mu\text{M}$ den Referenzwert dar. Die Nitritakkumulation der unbehandelten Makrophagen ist minimal ($0,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$). Die Nitritakkumulation der nur mit CTB behandelten Makrophagen ist ebenfalls gering ($0,4 \pm 0,2 \mu\text{M}$; $0,5 \pm 0,3 \mu\text{M}$). Eine Vorinkubation mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ CTB und anschließende Stimulation mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS zeigt eine tendentielle Abnahme der Nitritakkumulation, die aber im Vergleich zum Referenzwert ($35,7 \pm 2,4 \mu\text{M}$) nicht signifikant ist. Die Vorinkubation mit 10 $\mu\text{g/ml}$ CTB und anschließende Stimulation mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS zeigt eine desensibilisierende Wirkung ($p < 0,005$) im Vergleich zum Referenzwert um 25,3 % ($29,6 \pm 0,6 \mu\text{M}$).

Abb. 3B zeigt die Nitritakkumulation in den Überständen von IC21 Makrophagen nach 48 h Vorbehandlung mit 0,1 und 10 $\mu\text{g/ml}$ CTB und 24 h Stimulation dieser Makrophagen mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS. Die Nitritakkumulation der nicht vorbehandelten und nach 48 h mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS stimulierten IC21 Makrophagen stellt mit $18,5 \pm 5,9 \mu\text{M}$ den Referenzwert dar. Die Nitritakkumulation der unbehandelten Makrophagen ist minimal ($0,6 \pm 0,3 \mu\text{M}$). Die Nitritakkumulation der nur mit CTB behandelten Makrophagen war ebenfalls gering ($0,3 - 0,6 \pm 0,3 \mu\text{M}$). Insgesamt ist die Nitritakkumulation in allen Ansätzen niedriger ausgefallen, als in den 24 h-Versuchsreihen, deren Ergebnisse in Abb. 3A dargestellt sind.

Eine Vorinkubation mit 0,1 µg/ml CTB und anschließende Stimulation mit 1 µg/ml LPS nach 48 h zeigt tendentiell eine eher stimulierende Wirkung, die aber nicht signifikant ist im Vergleich zum Referenzwert (18,5 ± 5,9 µM). Die Vorinkubation mit 10 µg/ml CTB und anschließende Stimulation mit 1 µg/ml LPS nach 48 h zeigt im Vergleich zum Referenzwert ebenfalls keine desensibilisierende Wirkung mehr (19,6 ± 2,9 µM). Es zeigt sich hiermit, dass die Dauer der CTB-Wirkung auf die Makrophagen nach Exposition begrenzt ist. Die Stimulation der vorinkubierten IC21 Makrophagen nach 48 h ergab keinen desensibilisierenden Effekt, im Vergleich zu den mit CTB vorinkubierten Makrophagen, die nach 24 h mit LPS stimuliert wurden. Da CTB konstant die in Abb. 3A dargestellte Makrophagen modulierende Eigenschaft zeigte,

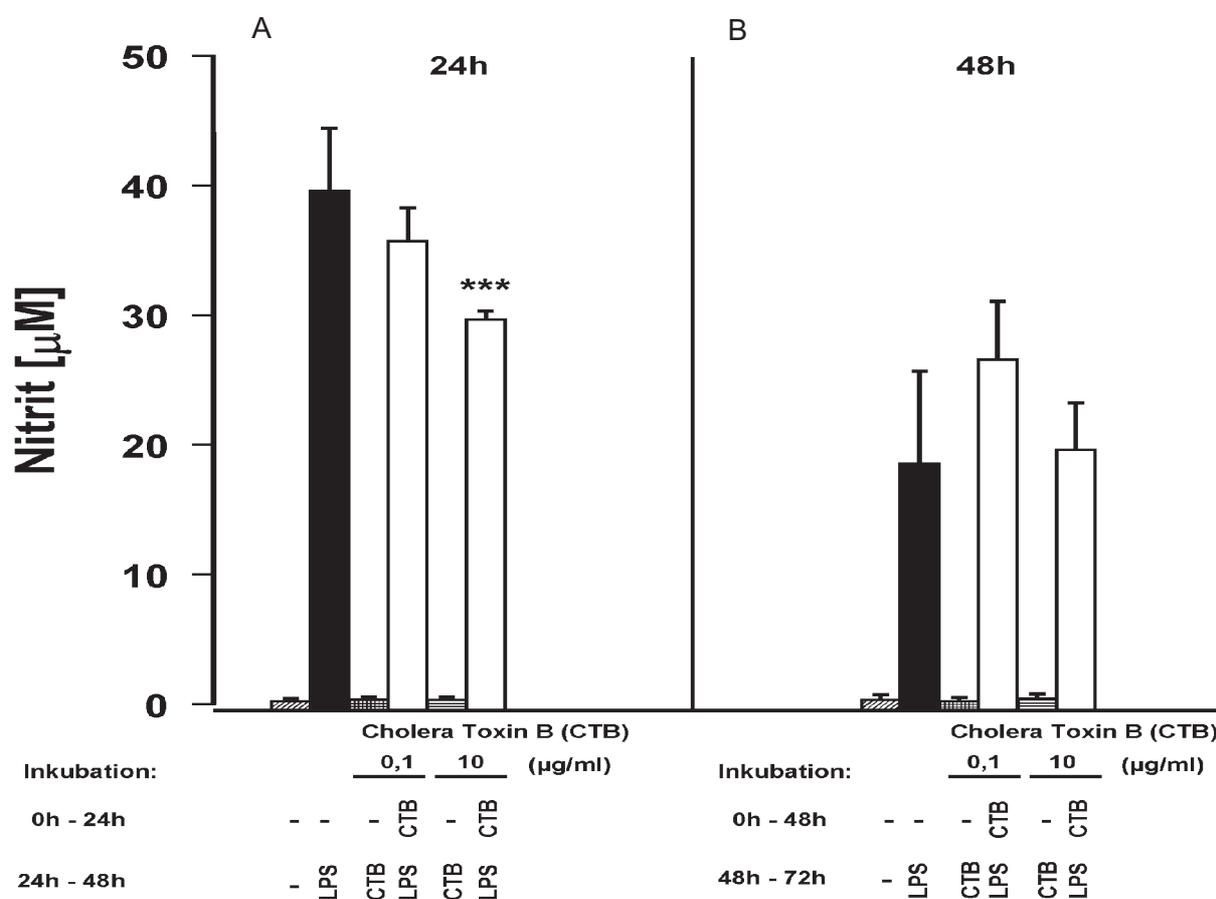


Abb. 3: LPS-induzierte Nitritakkumulation von mit CTB vorbehandelten IC21 Zellen nach 24 h (A) und 48 h (B). Die Zellen wurden in Anwesenheit oder Abwesenheit von CTB (0,1 und 10 µg/ml) inkubiert. Nach Mediumwechsel wurden Zellen mit 1 µg/ml LPS stimuliert, weitere Zellen wurden unstimuliert belassen. Nach einem weiteren Mediumwechsel wurden die bisher unstimulierten Makrophagen zum Teil mit 1 µg/ml LPS behandelt oder unbehandelt belassen. In Kontrollansätzen wurden nicht vorbehandelte Zellen mit 0,1 und 10 µg/ml CTB inkubiert. Die Nitritakkumulation wurde nach weiteren 24 h Inkubation (A, B) in den Kulturüberständen der IC21 Zellen bestimmt. Die Nitrit-Daten zeigen Mittelwerte +SD (in µM) aus zwei Experimenten, die in Triplikaten durchgeführt wurden. *** p < 0,005

wurden die nachfolgend beschriebenen Versuche zur Vergleichbarkeit der experimentellen Verfahren und der Makrophagenzelllinien mit diesem Lektin durchgeführt. Die Methode nach Ziegler-Heitbrock wurde zur Untersuchung der TNFα-Desensibilisierung etabliert und für

einzelne Versuche auch zur Messung der Nitritakkumulation benutzt. Ein wichtiger Vorteil dieser Methode besteht darin, dass der Erhalt einer konstanten Zellzahl ohne Verwendung von Mitomycin C möglich ist. Für die nachfolgend beschriebenen vergleichenden Untersuchungen wurden J774A.1 oder IC21 Makrophagen in RPMI 1640 Medium in einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml in je zwei 10 ml Petrischalen ausgesät. Für die vergleichenden Untersuchungen wurde CTB als desensibilisierendes Agens verwendet, da dessen desensibilisierende Wirkung auf Makrophagen bereits ausführlich charakterisiert wurde. In einer Petrischale wurden die Makrophagen mit CTB über 24 h vorbehandelt. Nach 24 h wurden die Makrophagen abgelöst, erneut gezählt und in einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml auf einer 96 Well-Flachbodenplatte (200 μ l/Well) verteilt. Die nicht vorbehandelten Makrophagen wurden zum einen weiter unbehandelt belassen und zum anderen mit 1 μ g/ml LPS über 24 h behandelt. Die alleinige Stimulation der Makrophagen mit LPS wurde in allen Versuchen durchgeführt und die Konzentration der in diesem Ansatz freigesetzten Mediatoren stellte den Referenzwert des jeweiligen Versuchsansatzes dar, auf den die weiteren Messwerte des jeweiligen Versuchs bezogen wurden. Der Vergleich mit diesem Wert ermöglichte somit eine Aussage, ob eine Vorbehandlung der Makrophagen (z.B. mit CTB) eine desensibilisierende Wirkung auf eine anschließende LPS-Exposition zeigt oder nicht. In weiteren Kontrollansätzen wurden mit CTB vorbehandelte Zellen weiter unbehandelt belassen bzw. mit 1 μ g/ml LPS über 24 h behandelt. Danach erfolgte die Bestimmung der Nitrit- und TNF α -Konzentrationen im Überstand der kultivierten Zellen.

Die Abb. 4A zeigt die Nitritakkumulation in den Überständen von IC21 Makrophagen nach 24 h Vorbehandlung mit CTB und 24 h Stimulation mit LPS im Vergleich zu nicht vorbehandelten und nur mit LPS stimulierten IC21 Makrophagen (Methode nach Ziegler-Heitbrock).

Unbehandelte Zellen zeigten bei diesem und auch bei allen nachfolgend dargestellten Experimenten eine sehr geringe Nitritakkumulation ($0,5 \pm 0,4 \mu$ M). Die Nitritkonzentration in Kulturüberständen von nicht vorbehandelten aber mit LPS stimulierten Makrophagen betrug $21,9 \pm 0,4 \mu$ M. Die mit CTB vorbehandelten und mit LPS stimulierten IC21 Makrophagen zeigten dagegen eine hoch signifikante ($p < 0,002$) Reduktion der Nitritakkumulation um 80,7 % auf $4,2 \pm 0,2 \mu$ M. Zur Kontrolle wurden Zellen über 24 h nur mit CTB behandelt. Diese Behandlung induzierte keine erhöhte Nitritakkumulation im Vergleich zum unbehandelten Kontrollansatz ($0,2 \pm 0,2 \mu$ M).

In der Abb. 4B sind die Ergebnisse von Experimenten dargestellt, in denen unter analogen Versuchsbedingungen J774A.1 Makrophagen jeweils mit CTB für 24 h vorbehandelt wurden oder unbehandelt blieben. Die alleinige Stimulation mit LPS induzierte eine Nitritakkumulation von $23,7 \pm 1,9 \mu$ M, die mit der von stimulierten IC21 Makrophagen induzierten Nitritakkumulation ($21,9 \pm 0,4 \mu$ M) vergleichbar war. Die CTB-Vorbehandlung führte zu einer hoch signifikanten ($p < 0,002$) Senkung der LPS-induzierten Nitritakkumulation um 26,0 % auf $17,6 \pm 1,8 \mu$ M.

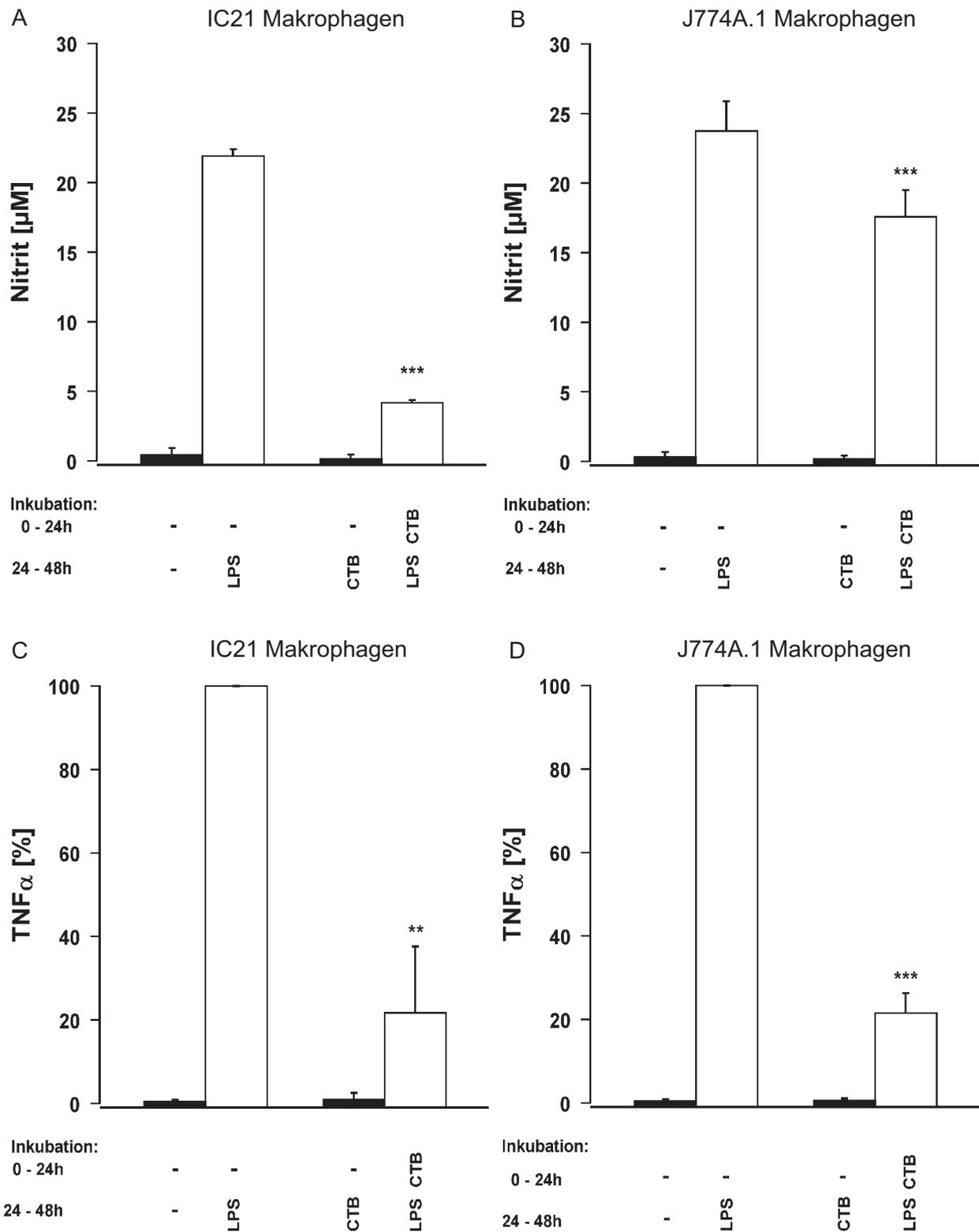


Abb. 4: Vergleich der Modulation der Mediatorenausschüttung von IC21 und J774A.1 Makrophagen nach Vorbehandlung mit CTB und anschließende Stimulation mit LPS. IC21 Makrophagen (A, C) oder J774A.1 Makrophagen (B, D) wurden 24 h mit CTB (10 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert oder im Medium unbehandelt belassen. Nach einmaligem Mediumwechsel wurden die Zellen mit LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) über 24 h stimuliert und danach in den Überständen die Nitrit- und TNF α -Konzentration bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Nitritkonzentration +SD (in μM) (A, B) und der TNF α -Konzentration +SD (in % der LPS induzierten TNF α -Freisetzung) (C, D) aus drei Versuchen (Ziegler-Heitbrock-Methode). LPS induzierte eine TNF α -Freisetzung in Höhe von 668 U/ml (C) und 652 U/ml (D). Zur Kontrolle wurden Zellen ohne CTB-Vorinkubation parallel zur LPS-Stimulation für 24 h mit CTB (10 $\mu\text{g/ml}$) behandelt. ** $p < 0,02$; *** $p < 0,002$

Auch in dieser Versuchsreihe produzierten mit CTB vorbehandelte und nicht LPS-stimulierte Makrophagen weniger als $0,2 \pm 0,2 \mu\text{M NO}_2^-$.

Die Abb. 4C zeigt die TNF α -Akkumulation in den Überständen von IC21 Makrophagen nach 24 h Vorbehandlung mit CTB und 24 h Stimulation mit LPS im Vergleich zu nicht vorbehandelten und mit LPS stimulierten IC21 Makrophagen. Aufgrund von Variationen der absoluten Werte bei den TNF α -Konzentrationsbestimmungen mittels des Bio-Assays (siehe 2.7.2) wurden die Ergebnisse dieser Untersuchungen und alle weiteren Daten zur TNF α -Freisetzung als prozentuale Werte dargestellt. Dabei wurde die durch alleinige Behandlung mit LPS induzierte TNF α -Menge als 100 % gesetzt. Die als 100 % angesetzten TNF α -Konzentrationen wurden in den jeweiligen Experimenten gesondert angegeben. Unbehandelte Zellen zeigten bei dem in Abb. 4C und bei allen nachfolgend dargestellten Experimenten eine durchschnittliche TNF α -Akkumulation von $0,5 \pm 0,4$ %. Die mit CTB vorbehandelten und mit LPS stimulierten IC21 Makrophagen zeigten eine signifikante ($p < 0,02$) Reduktion der TNF α -Akkumulation auf $21,6 \pm 13,2$ % der LPS-stimulierten TNF α -Konzentration (668 U/ml entsprechend 100 %). Zur Kontrolle wurden Zellen über 24 h nur mit CTB behandelt. Hierbei wurden nur minimale TNF α -Konzentrationen von $0,9 \pm 1,3$ % gemessen.

Die Abb. 4D zeigt die TNF α -Akkumulation in den Überständen von J774A.1 Makrophagen nach 24 h Vorbehandlung mit CTB und 24 h Stimulation mit LPS im Vergleich zu nicht vorbehandelten und nur mit LPS stimulierten J774A.1 Makrophagen.

Die mit CTB vorbehandelten und mit LPS stimulierten J774A.1 Makrophagen zeigten eine hochsignifikante ($p < 0,002$) Reduktion der TNF α -Akkumulation auf $21,5 \pm 3,9$ % der LPS-induzierten TNF α -Konzentration (652 U/ml entsprechen 100 %). Zur Kontrolle wurden Zellen über 24 h nur mit CTB behandelt. Diese Behandlung induzierte nur eine geringe TNF α -Produktion von $0,6 \pm 0,4$ % der LPS-induzierten TNF α -Freisetzung. Für CTB als desensibilisierendes Agens wurden durch diese vergleichende Versuchsreihe somit ähnliche Ergebnisse bezüglich der CTB-vermittelten Modulation der TNF α -Akkumulation in Kulturüberständen von LPS-stimulierten IC21- oder J774A.1 Makrophagen erzielt.

In weiteren vergleichenden Versuchsanordnungen wurde die NO-Produktion von mit CTB vorbehandelten IC21- und J774A.1 Makrophagen untersucht. Hierbei wurde die so genannte Standardmethode verwendet (siehe 2.7.1).

In der Abb. 5A wird die Nitritakkumulation in den Überständen von IC21 Makrophagen nach 24 h Vorbehandlung mit CTB und 24 h Stimulation mit LPS im Vergleich zu nicht vorbehandelten und nur mit LPS stimulierten IC21 Makrophagen dargestellt. Unbehandelte IC21 Makrophagen zeigten auch in diesen Experimenten eine geringe Nitritakkumulation von $0,2 \pm 0,3 \mu\text{M}$. Die Nitritkonzentration der nicht vorbehandelten aber mit LPS-stimulierten Makrophagen betrug $17,4 \pm 1,9 \mu\text{M}$. Die mit CTB vorbehandelten und anschließend mit LPS stimulierten IC21 Makrophagen zeigten eine signifikante ($p < 0,05$) Reduktion der NO-Produktion um

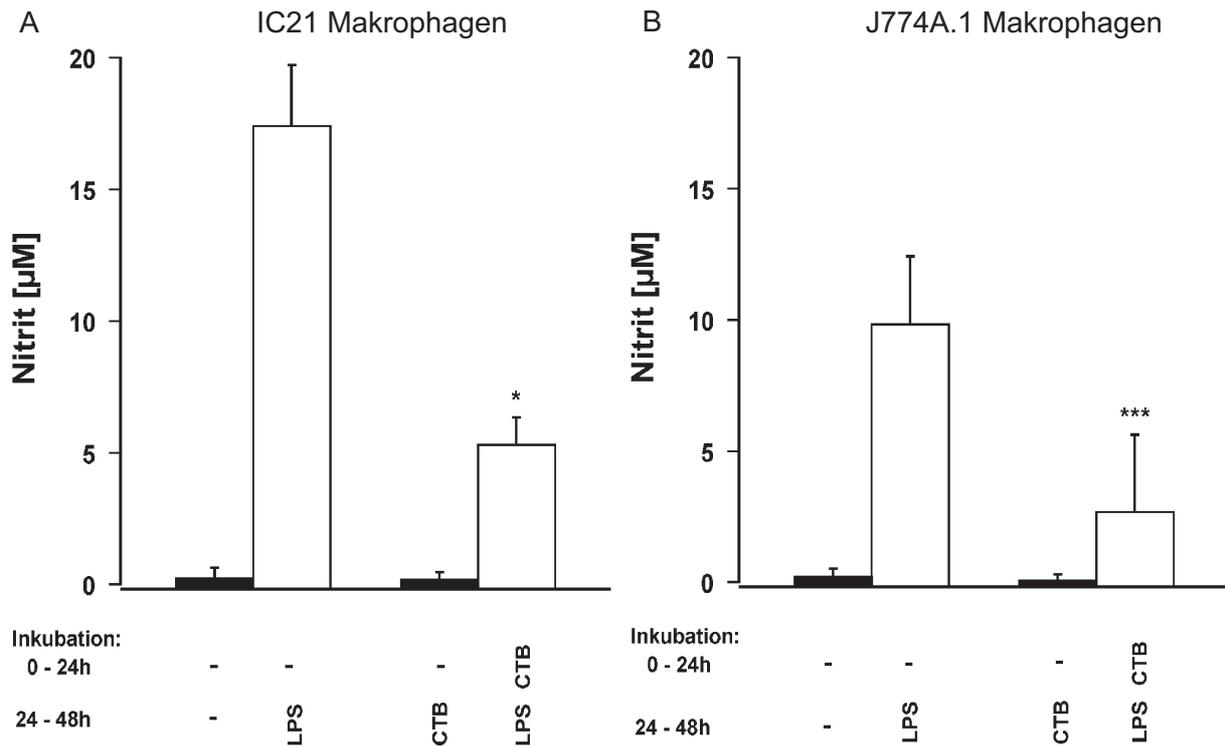


Abb. 5: Effekt der CTB-Vorbehandlung auf die LPS-induzierte Nitritakkumulation durch IC21 Zellen (A) und J774A.1 Zellen (B). IC21 Makrophagen (A) oder J774A.1 Makrophagen (B) wurden 24 h mit CTB (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert oder im Medium unbehandelt belassen. Nach einmaligem Mediumwechsel wurden die Zellen mit LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) über 24 h stimuliert. Danach wurde die Nitritkonzentration in den Überständen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Nitritkonzentration +SD (in μM) aus drei Versuchen (Standardmethode, Mitomycin C) * $p < 0,05$; *** $p < 0,002$.

69,6 % auf $5,3 \pm 0,9 \mu\text{M}$. Zur Kontrolle wurden Zellen über 24 h nur mit CTB behandelt. Diese Behandlung induzierte ebenfalls nur eine geringe NO-Produktion ($0,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$). Unter gleichen Versuchsbedingungen wurde die Nitritakkumulation in den Überständen von J774A.1 Makrophagen nach 24 h Vorbehandlung mit CTB und 24 h Stimulation mit LPS im Vergleich zu nicht vorbehandelten und nur mit LPS stimulierten J774A.1 Makrophagen gemessen (Abb. 5B). Unbehandelte Zellen zeigten auch hier eine geringe Nitritakkumulation ($0,1 \pm 0,3 \mu\text{M}$). Die Nitritkonzentration der nicht vorbehandelten aber mit LPS stimulierten Makrophagen betrug $9,8 \pm 2,4 \mu\text{M}$. Die mit CTB vorbehandelten und mit LPS stimulierten J774A.1 Makrophagen zeigten eine signifikante ($p < 0,002$) Reduktion der Nitritakkumulation um 72,8 % auf $2,7 \pm 2,7 \mu\text{M}$. Zur Kontrolle wurden Zellen über 24 h nur mit CTB behandelt. Diese Behandlung ergab ebenfalls nur eine geringe Nitritmenge ($0,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$).

Die in Abb. 5 dargestellten Befunde der mit Mitomycin C behandelten Makrophagen waren mit den Ergebnissen von Makrophagen, die nicht mit Mitomycin C vorbehandelt waren, vergleichbar (Abb. 4A, 4B). Die IC21 Makrophagen wurden für die weiteren Desensibilisierungsansätze, die nach der Standardmethode (Severn et al., 1993) durchgeführt wurden, verwendet. Für die weiteren Versuche zur $\text{TNF}\alpha$ -Akkumulationsmessung (Methode nach Ziegler-Heitbrock) wurden die J774A.1 Makrophagen verwendet.

3.3 Untersuchungen zur desensibilisierenden Wirkung von Lektinen auf Mausmakrophagen

Die desensibilisierende Wirkung von Lektinen auf Mausmakrophagen wurde durch deren Effekt auf die LPS-induzierte NO- und TNF α -Produktion geprüft. In der Einleitung wurden die Lektine nach ihrer spezifischen Zuckerbindung eingeteilt. Galaktose bindende Lektine (3.3.1) stammen von: *Phaseolus limensis*, *Bandeiraea simplicifolia*, *Arachis hypogaea* und *Vicia villosa*. Glukose und Mannose bindende Lektine (3.3.2) stammen von: *Canavalia ensiformis*, *Pisum sativum*, *Vicia faba*, *Vicia sativa*, *Lens culinaris* und *Triticum vulgare*. Das Lektin von *Ulex europaeus* (3.3.3) bindet den Zucker Fukose und das Lektin von *Phaseolus vulgaris* (3.3.4) bindet Oligosaccharide. Diese Einteilung der Lektine wird im Weiteren beibehalten.

3.3.1 Untersuchung zur Makrophagen desensibilisierenden Wirkung Galaktose bindender Lektine

In der Abb. 6A wird die Nitritakkumulation in den Überständen von IC21 Makrophagen nach 24 h Vorbehandlung mit verschiedenen Konzentrationen des Lektins von *Phaseolus limensis* (PL) (0,01; 0,1; 1; 10; 20; 50 $\mu\text{g/ml}$) und anschließender 24-stündiger Stimulation dieser Makrophagen mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS aufgezeigt. Um die grundsätzliche Desensibilisierbarkeit der Makrophagen in den jeweiligen Ansätzen zu überprüfen, wurde in diesem und in allen anschließenden Versuchen CTB als positive Kontrolle eingesetzt. In den bereits dargestellten Voruntersuchungen aber auch in früheren Studien wurde die hochsignifikante desensibilisierende Wirkung dieses Lektins bestätigt. Die Nitritakkumulation der unbehandelten Makrophagen lag bei $0,05 \pm 0,07 \mu\text{M}$. Die Nitritakkumulation der nicht vorbehandelten und nach 24 h mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS stimulierten IC21 Makrophagen entspricht dem Referenzwert, der $18,3 \pm 0,8 \mu\text{M}$ beträgt. Vergleichend dazu kann aus den Ergebnissen des experimentellen Ansatzes abgeleitet werden, ob ein zur Vorbehandlung eingesetztes Lektin eine desensibilisierende oder potenzierende Wirkung auf die Makrophagen ausübt. Die LPS-induzierte Nitritakkumulation der mit CTB vorinkubierten Makrophagen entspricht $8,6 \pm 0,9 \mu\text{M}$ und zeigt, wie bereits in den Vorexperimenten dargestellt, eine hoch signifikante ($p < 0,005$) Reduktion um 53,2 % im Vergleich zum Ansatz, der nur mit LPS behandelt wurde. Eine alleinige Vorinkubation (0 - 24 h) oder die Nachbehandlung (24 - 48 h) mit CTB führt zu einer geringen Nitritakkumulation von nur $0,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$ bzw. $0,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$, die im Bereich des unbehandelten Kontrollansatzes lag. Die alleinige Vorbehandlung (0 - 24 h) mit dem PL-Lektin bis zu einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ ohne LPS-Stimulation zeigte eine ebenfalls minimale Nitritakkumulation ($0,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$). Die IC21 Makrophagen, die nicht vorbehandelt

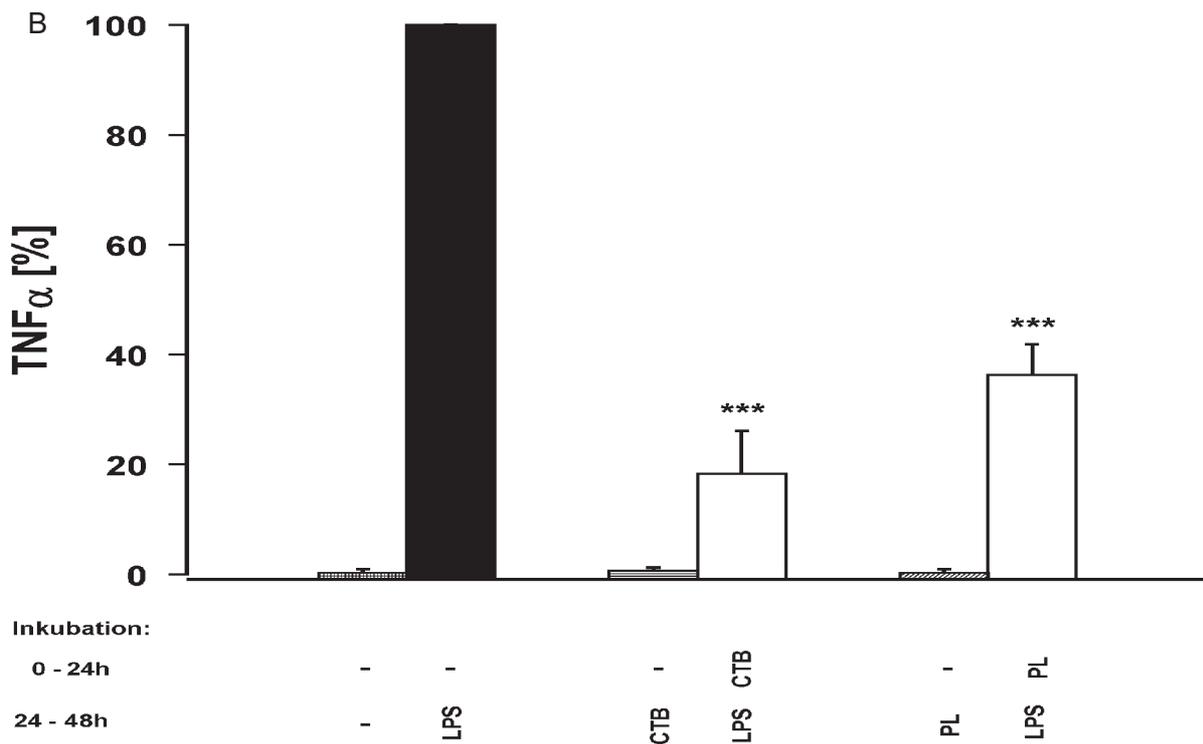
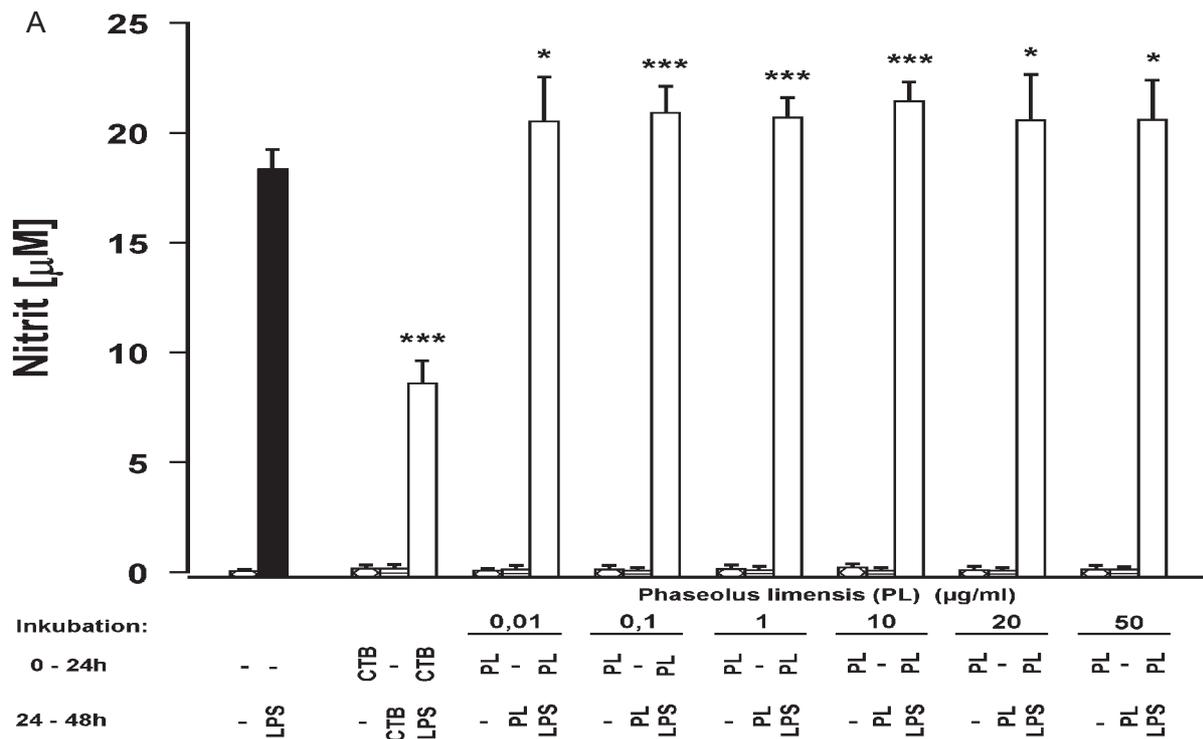


Abb. 6: Effekt einer Vorbehandlung mit dem Lektin von *Phaseolus limensis* (PL) auf die LPS-induzierte Nitritakkumulation durch IC21 Zellen (A) und die TNF α -Bildung durch J774 A.1 Zellen (B). Die Zellen wurden in Abwesenheit oder Anwesenheit von CTB 10 $\mu\text{g/ml}$ (A,B) bzw. von 0,01; 0,1; 1; 10; 20; 50 $\mu\text{g/ml}$ (A) oder nur mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Lektin von PL (B) 24 h vorinkubiert. Nach Mediumwechsel wurden die Zellen mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS stimuliert (A, B). In Kontrollansätzen wurden nicht vorbehandelte Zellen mit 10 $\mu\text{g/ml}$ CTB (A, B) bzw. mit 0,01; 0,1; 1; 10; 20; 50 $\mu\text{g/ml}$ (A) oder nur mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Lektin von PL (B) behandelt. Nach 24 h wurde die Nitritakkumulation in den Kulturüberständen der IC21 Zellen (A) und die TNF α -Konzentration in den Überständen der J774A.1 Zellen bestimmt (B). Die Nitrit-Daten (A) zeigen Mittelwerte +SD (in μM) aus zwei Experimenten, die in Triplikaten durchgeführt wurden. Die TNF α -Daten (B) zeigen Mittelwerte +SD aus drei Versuchen, dargestellt in Prozent der durch 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS induzierten TNF α -Freisetzung (100 % entsprechen 725 U/ml TNF α). * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$

waren, aber in den nächsten 24 h mit PL-Lektin behandelt wurden, zeigten auch nur einen minimalen Nitritanstieg ($0,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$). Eine 24-stündige Vorinkubation mit dem Lektin von PL in verschiedenen Konzentrationen (0,01; 0,1; 1; 10; 20; 50 $\mu\text{g/ml}$) und eine anschließende 24-stündige LPS-Stimulation zeigte über den gesamten Konzentrationsbereich eine signifikante Erhöhung der NO-Produktion der vorbehandelten Makrophagen. Die gemessenen Nitritwerte lagen im Bereich von $20,5 \pm 1,8 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$) bis $21,4 \pm 0,8 \mu\text{M}$ ($p < 0,005$).

In der Abb. 6B wird die $\text{TNF}\alpha$ -Akkumulation in den Überständen von J774A.1 Makrophagen nach 24 h Vorinkubation mit 10 $\mu\text{g/ml}$ PL-Lektin und anschließender 24-stündiger Stimulation mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS dargestellt. Bezogen auf den Referenzwert (100 % entspricht 725 U/ml $\text{TNF}\alpha$) zeigte eine Vorbehandlung mit dem Lektin von PL eine hoch signifikante Reduktion ($p < 0,005$) der LPS-induzierten $\text{TNF}\alpha$ -Produktion ($36,3 \pm 4,5 \%$). Die $\text{TNF}\alpha$ -Akkumulation im Überstand un behandelter Makrophagen betrug $0,3 \pm 0,5 \%$. Die für 24 h mit CTB (10 $\mu\text{g/ml}$) vorinkubierten und anschließend über 24 h mit LPS stimulierten Makrophagen zeigten ebenfalls eine hochsignifikante ($p < 0,005$) Reduktion der $\text{TNF}\alpha$ -Produktion auf $18,3 \pm 6,3 \%$. Eine alleinige Behandlung der Makrophagen mit CTB führte nur zu einer geringen $\text{TNF}\alpha$ -Produktion ($0,3 \pm 0,5 \%$). Die Behandlung der Makrophagen nur mit PL-Lektin in den ersten und nachfolgenden 24 h führte ebenfalls nur zu einer geringen $\text{TNF}\alpha$ -Produktion ($0,6 \pm 0,5 \%$). Insgesamt zeigte somit die Vorbehandlung der Makrophagen mit dem Lektin von PL hinsichtlich der NO-Produktion eine stimulierende Wirkung. Dagegen führte die Vorbehandlung der Makrophagen mit dem gleichen Lektin zu einer Reduktion der LPS-induzierten $\text{TNF}\alpha$ -Produktion.

In der Abb. 7A ist die Nitritakkumulation in den Überständen von IC21 Makrophagen nach 24 h Vorbehandlung mit verschiedenen Konzentrationen des Lektins von *Bandeiraea simplicifolia* (BS) (0,01; 0,1; 1; 10; 20; 50 $\mu\text{g/ml}$) und anschließender 24-stündiger Stimulation dieser Makrophagen mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS dargestellt. Die Nitritakkumulation der nicht vorbehandelten und nach 24 h mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS stimulierten IC21 Makrophagen beträgt $11,9 \pm 0,6 \mu\text{M}$ und entspricht dem Referenzwert. Die Nitritakkumulation der un behandelten Makrophagen war niedrig ($0,05 \pm 0,07 \mu\text{M}$). Eine Vorinkubation mit CTB und anschließende LPS-Stimulation zeigt eine hochsignifikante ($p < 0,005$) Reduktion der Nitritmenge um 48,4 % ($6,1 \pm 0,7 \mu\text{M}$). Die alleinige Inkubation der Zellen mit CTB von 0 - 24 h oder 24 - 48 h zeigte einen geringen Nitritanstieg ($0,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$ bzw. $0,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$). Die Vorinkubation der IC21 Makrophagen mit BS-Lektin und anschließende LPS-Stimulation zeigt, außer in der Konzentration von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ BS-Lektin, einen signifikanten Anstieg der NO-Produktion. Die Nitritakkumulation bei Vorinkubation mit 0,01 $\mu\text{g/ml}$ BS beträgt $13,9 \pm 0,8 \mu\text{M}$ ($p < 0,005$). Die weiteren Werte nach Vorinkubation mit 0,1; 1; 10; 20 und 50 $\mu\text{g/ml}$ BS-Lektin liegen im Bereich von $11,8 \pm 0,5 \mu\text{M}$ (n.s.) und $19,0 \pm 1,4 \mu\text{M}$ ($p < 0,005$). Die alleinige Vorbehandlung (0 - 24 h) mit Lektin von BS ohne nachfolgende LPS-Stimulation zeigte in den Konzentrationsbereichen

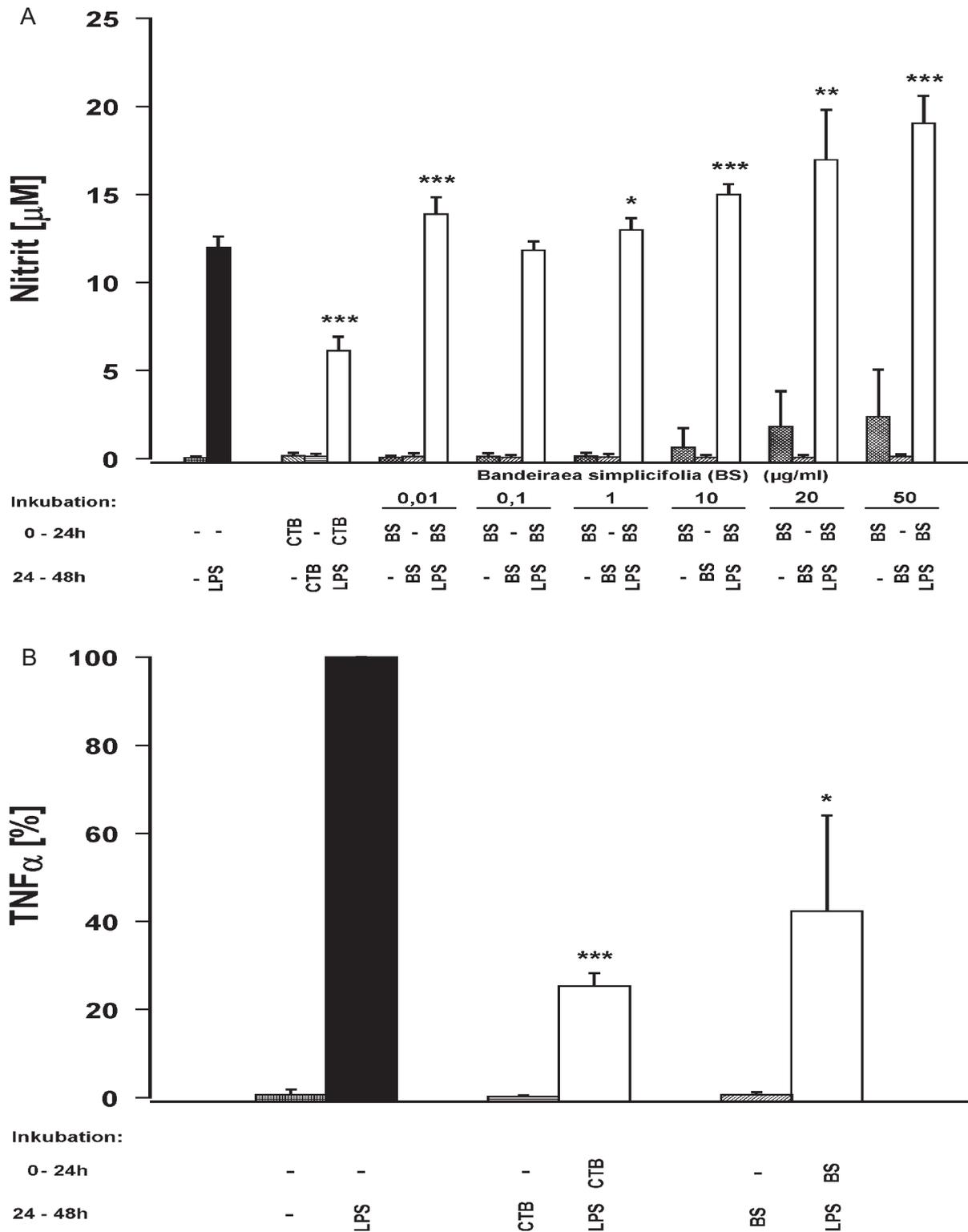


Abb. 7: Effekt einer Vorbehandlung mit dem Lektin von *Bandeiraea simplicifolia* (BS) auf die LPS-induzierte NO-Bildung durch IC21 Zellen (A) und die TNF α -Bildung durch J774A.1 Zellen (B). Die Zellen wurden in Abwesenheit oder Anwesenheit von 10 μ g/ml CTB (A, B) bzw. von 0,01; 0,1; 1; 10; 20; 50 μ g/ml (A) oder nur mit 10 μ g/ml Lektin von BS (B) 24 h vorinkubiert. Nach Mediumwechsel wurden die Zellen mit 1 μ g/ml LPS stimuliert (A, B). In Kontrollansätzen wurden nicht vorbehandelte Zellen mit 10 μ g/ml CTB (A, B) bzw. mit 0,01; 0,1; 1; 10; 20; 50 μ g/ml (A) oder nur mit 10 μ g/ml Lektin von BS (B) behandelt. Nach 24 h wurde die Nitritakkumulation in den Kulturüberständen der IC21 Zellen (A) und die TNF α -Konzentration in den Überständen der J774A.1 Zellen bestimmt (B). Die Nitrit-Daten (A) zeigen Mittelwerte +SD (in μ M) aus zwei Experimenten, die in Triplikaten durchgeführt wurden. Die TNF α -Daten (B) zeigen Mittelwerte +SD aus drei Versuchen, dargestellt in Prozent der durch 1 μ g/ml LPS induzierten TNF α -Freisetzung (100 % entsprechen 566 U/ml TNF α). * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$

0,01; 0,1 und 1 µg/ml eine sehr niedrige Nitritakkumulation ($0,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$), die im Bereich der unbehandelten Kontrolle lag. Im Bereich der 10; 20 und 50 µg/ml Konzentrationen wurde die NO-Produktion der Makrophagen durch dieses Lektin leicht stimuliert ($0,6 \pm 0,4 \mu\text{M}$; $1,8 \pm 1,8 \mu\text{M}$ und $2,4 \pm 2,4 \mu\text{M}$). IC21 Makrophagen, die nicht vorbehandelt waren, aber dann im Zeitraum von 24 - 48 h mit BS behandelt wurden, zeigten keinen Nitritanstieg ($0,08 \pm 0,05 \mu\text{M}$).

In der Abb. 7B wird die TNF α -Akkumulation in den Überständen von J774A.1 Makrophagen nach 24 h Vorinkubation mit 10 µg/ml BS-Lektin und anschließender Stimulation mit 1 µg/ml LPS dargestellt. Der Referenzwert entspricht der TNF α -Akkumulation nach alleiniger LPS-Stimulation nach 24 h (100 % entsprechen 566 U/ml TNF α). Die TNF α -Produktion der unbehandelten Makrophagen war gering ($0,6 \pm 0,9 \%$). Die mit CTB (10 µg/ml) für 24 h vorinkubierten und anschließend über 24 h mit LPS stimulierten Makrophagen zeigten eine hochsignifikante ($p < 0,005$) Reduktion der TNF α -Produktion auf $25,3 \pm 2,4 \%$. Eine alleinige Vorbehandlung der Makrophagen mit CTB führte zu einer minimalen TNF α -Produktion ($0,7 \pm 0,5 \%$). Eine Vorbehandlung mit BS-Lektin mit anschließender LPS-Stimulation zeigt eine signifikante Reduktion ($p < 0,05$) der TNF α -Produktion auf $42,3 \pm 17,7 \%$. J774A.1 Makrophagen, die nur mit 10 µg/ml BS-Lektin behandelt wurden, aber nicht mit LPS stimuliert wurden, zeigten keinen TNF α -Anstieg im Vergleich zu unbehandelten Makrophagen.

Die Vorinkubation mit BS-Lektin zeigt somit hinsichtlich der LPS-induzierten Nitritakkumulation eine stimulierende Wirkung. Die LPS-induzierte TNF α -Produktion wird durch Vorinkubation mit dem gleichen Lektin in der Konzentration von 10 µg/ml reduziert.

Die Abb. 8A zeigt die Nitritakkumulation in den Überständen von IC21 Makrophagen nach 24 h Vorbehandlung mit verschiedenen Konzentrationen des *Arachis hypogaea* (AH)-Lektins (0,01; 0,1; 1; 10 µg/ml) und anschließender 24-stündiger Stimulation mit 1 µg/ml LPS. Die Nitritakkumulation der nicht vorbehandelten und nach 24 h mit 1 µg/ml LPS stimulierten IC21 Makrophagen stellt mit $18,2 \pm 3,7 \mu\text{M}$ den Referenzwert dar. Die Nitritakkumulation der unbehandelten Makrophagen war minimal ($0,05 \pm 0,1 \mu\text{M}$). Eine Vorinkubation mit CTB zeigte eine hochsignifikante ($p < 0,005$) Reduktion der LPS-induzierten Nitritakkumulation um 77,9 % ($4,0 \pm 1,8 \mu\text{M}$). Die Nitritakkumulation der nur mit CTB behandelten Makrophagen (0 - 24 h; 24 - 48 h) war gering ($0,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$). Bei der Vorinkubation mit Lektin von AH und einer anschließenden Stimulation mit LPS zeigte sich keine desensibilisierende Wirkung des Lektins. Bei einer Vorinkubation mit 0,01; 0,1; 1 und 10 µg/ml AH-Lektin lag die LPS-induzierte Nitritakkumulation im Bereich von $16,7 \pm 1,7 \mu\text{M}$ bis $23,3 \pm 4,2 \mu\text{M}$ und zeigte damit keinen signifikanten Unterschied zum Referenzwert. Allerdings führte die alleinige Vorbehandlung (0 - 24 h) mit Lektin von AH ohne LPS-Stimulation bereits zu einer erhöhten NO-Produktion durch die Makrophagen. Im Konzentrationsbereich von 0,01 - 1 µg/ml Lektin von AH wurde nur eine sehr geringe Nitritakkumulation von $0,6 \pm 0,5 \mu\text{M}$ und $0,9 \pm 0,5 \mu\text{M}$ gemessen. Dagegen

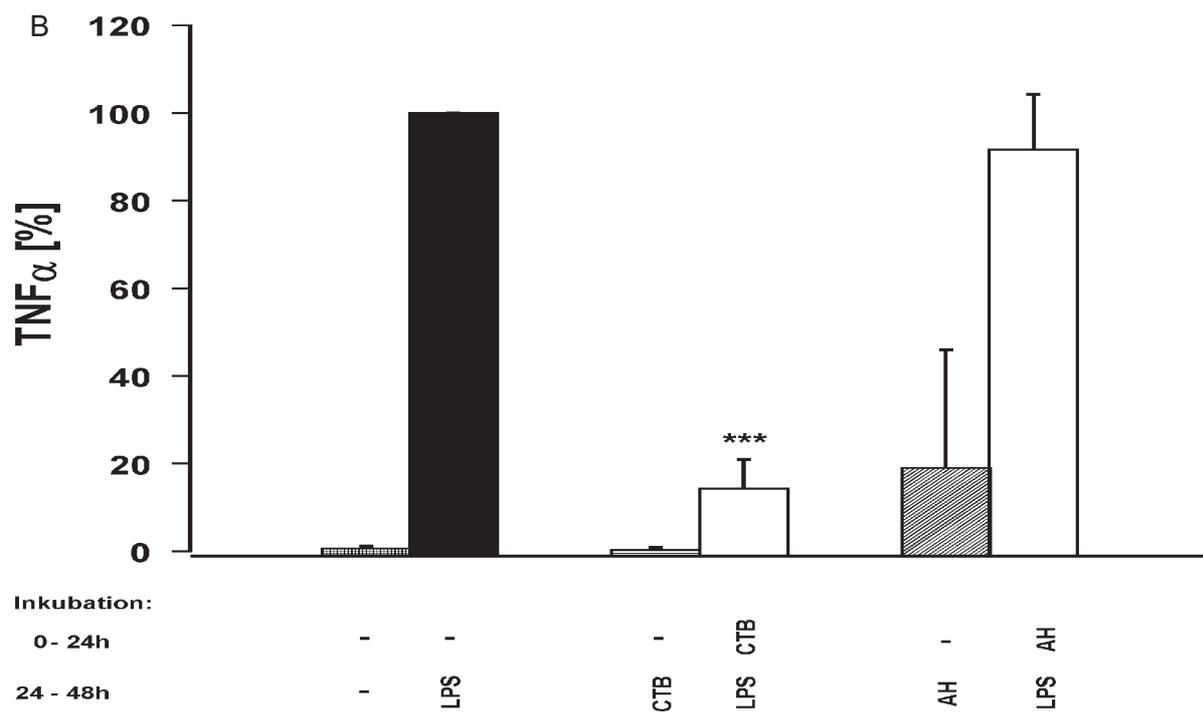
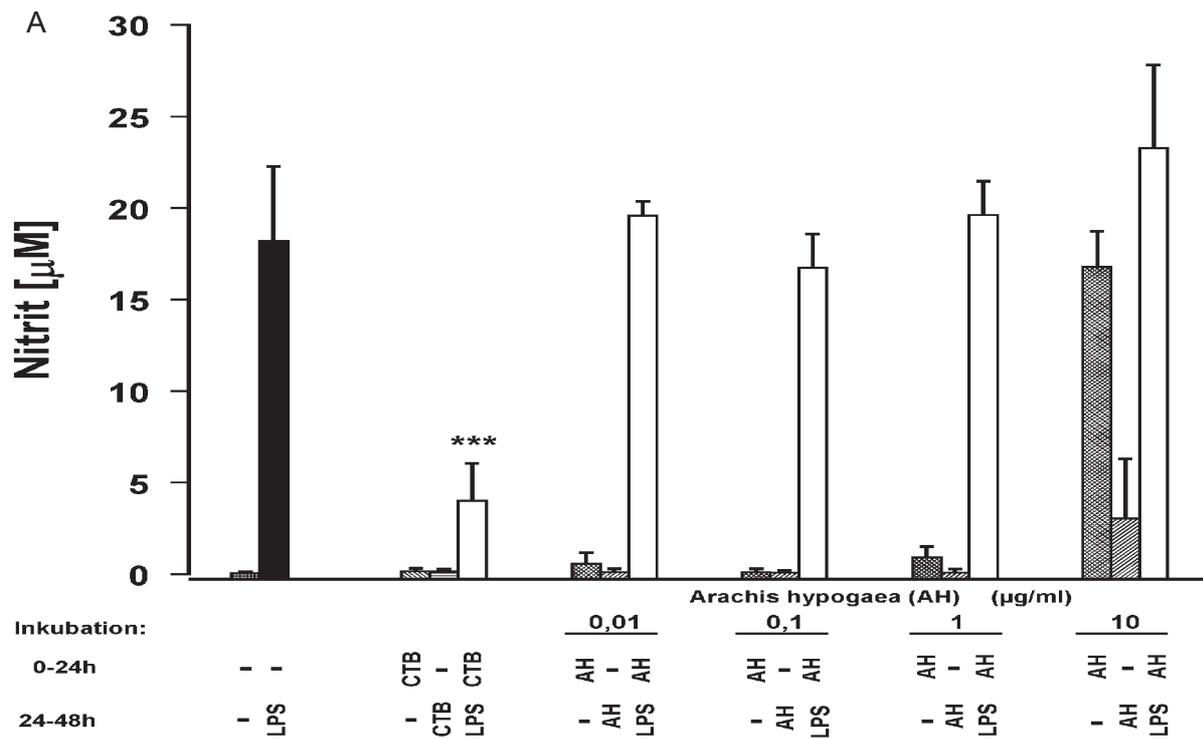


Abb. 8: Effekt einer Vorbehandlung mit dem Lektin von *Arachis hypogaea* (AH) auf die LPS-induzierte NO-Bildung durch IC21 Zellen (A) und die TNF α -Bildung durch J774A.1 Zellen (B). Die Zellen wurden in Abwesenheit oder Anwesenheit von CTB 10 $\mu\text{g/ml}$ (A, B) bzw. von 0,01; 0,1; 1; 10 $\mu\text{g/ml}$ (A) oder nur mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Lektin von AH (B) 24 h vorinkubiert. Nach Mediumwechsel wurden die Zellen mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS stimuliert (A, B). In Kontrollansätzen wurden nicht vorbehandelte Zellen mit 10 $\mu\text{g/ml}$ CTB (A, B) bzw. mit 0,01; 0,1; 1; 10 $\mu\text{g/ml}$ (A) oder nur mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Lektin von AH (B) behandelt. Nach 24 h wurde die Nitritakkumulation in den Kulturüberständen der IC21 Zellen (A) und die TNF α -Konzentration in den Überständen der J774A.1 Zellen bestimmt (B). Die Nitrit-Daten (A) zeigen Mittelwerte +SD (μM) aus zwei Experimenten, die in Triplikaten durchgeführt wurden. Die TNF α -Daten (B) zeigen Mittelwerte +SD aus drei Versuchen, dargestellt in Prozent der durch 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS induzierten TNF α -Freisetzung (100 % entsprechen 457 U/ml TNF α). *** $p < 0,005$

wurde die Nitritakkumulation der IC21 Makrophagen durch Vorbehandlung mit 10 µg/ml Lektin von AH deutlich stimuliert ($16,8 \pm 1,8 \mu\text{M}$). Auch IC21 Makrophagen, die nicht vorbehandelt waren, aber dann im Verlauf des Experiments von 24 - 48 h mit 10 µg/ml Lektin von AH behandelt wurden, zeigten einen moderaten Nitritanstieg ($3,03 \pm 3,0 \mu\text{M}$).

In der Abb. 8B wird die TNF α -Akkumulation in den Überständen von J774A.1 Makrophagen nach 24 h Vorinkubation mit 10 µg/ml Lektin von AH und anschließender Stimulation mit 1 µg/ml LPS dargestellt. Bezogen auf den Referenzwert (alleinige Stimulation mit LPS, 100 % entsprechend 457 U/ml TNF α) zeigte eine Vorbehandlung mit Lektin von AH keinen signifikanten Unterschied in der LPS-induzierten TNF α -Produktion ($91,7 \pm 10,3 \%$). Die TNF α -Akkumulation der unbehandelten Zellen war niedrig ($0,6 \pm 0,5 \%$). J774A.1 Makrophagen, die mit 10 µg/ml Lektin von AH behandelt waren, aber nicht mit LPS stimuliert wurden, zeigten eine TNF α -Produktion von $19,0 \pm 22,0 \%$. Die mit 10 µg/ml CTB für 24 h vorinkubierten und anschließend über 24 h mit LPS stimulierten Makrophagen zeigten eine hochsignifikante ($p < 0,005$) Reduktion der TNF α -Produktion auf $14,3 \pm 5,4 \%$. Insgesamt zeigte eine Vorbehandlung mit AH-Lektin sowohl hinsichtlich der LPS-induzierten NO- als auch der TNF α -Produktion keine Makrophagen desensibilisierende Wirkung. Eine Behandlung der Zellen mit dem Lektin alleine zeigte sowohl bei der NO-Produktion als auch bei der TNF α -Produktion einen stimulierenden Effekt.

In der Abb. 9A ist die Nitritakkumulation in den Überständen von IC21 Makrophagen nach 24 h Vorbehandlung mit verschiedenen Konzentrationen des Lektins von *Vicia villosa* (VV) (0,01; 0,1; 1; 10; 20 und 50 µg/ml) und anschließender 24-stündiger Stimulation mit 1 µg/ml LPS dargestellt. Die Nitritakkumulation der nicht vorbehandelten und nach 24 h mit 1 µg/ml LPS stimulierten IC21 Makrophagen entspricht dem Referenzwert und beträgt $12,9 \pm 2,7 \mu\text{M}$. Die Nitritakkumulation in den Überständen unbehandelter Makrophagen war niedrig ($0,06 \pm 0,1 \mu\text{M}$). Eine Vorinkubation mit CTB mit anschließender LPS-Stimulation zeigte eine signifikante ($p < 0,05$) Desensibilisierung um 79,9 % ($2,6 \pm 0,6 \mu\text{M}$). Die alleinige Inkubation mit CTB 0 - 24 h oder 24 - 48 h zeigte einen geringen Nitritanstieg ($0,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$ bzw. $0,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$). Die Vorinkubation der IC21 Makrophagen mit VV-Lektin und anschließender LPS-Stimulation zeigte keine signifikante Veränderung der NO-Produktion. Die gemessene Nitritakkumulation bei Vorinkubation mit 0,01 µg/ml bis einschließlich 50 µg/ml lag zwischen $7,7 \pm 1,4 \mu\text{M}$ und $12,8 \pm 1,5 \mu\text{M}$. Die alleinige Vorbehandlung (0 - 24 h) mit VV-Lektin ohne LPS-Stimulation führte über den gesamten Konzentrationsbereich zu einer sehr niedrigen Nitritakkumulation ($0,06 \pm 0,1 \mu\text{M}$), die im Bereich der unbehandelten Kontrolle lag. IC21 Makrophagen, die nicht vorbehandelt waren, aber dann im Verlauf des Experiments von 24 - 48 h mit VV-Lektin behandelt wurden, zeigten ebenfalls nur einen sehr geringen Nitritanstieg ($0,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$).

In der Abb. 9B ist die TNF α -Akkumulation in den Überständen von J774A.1 Makrophagen

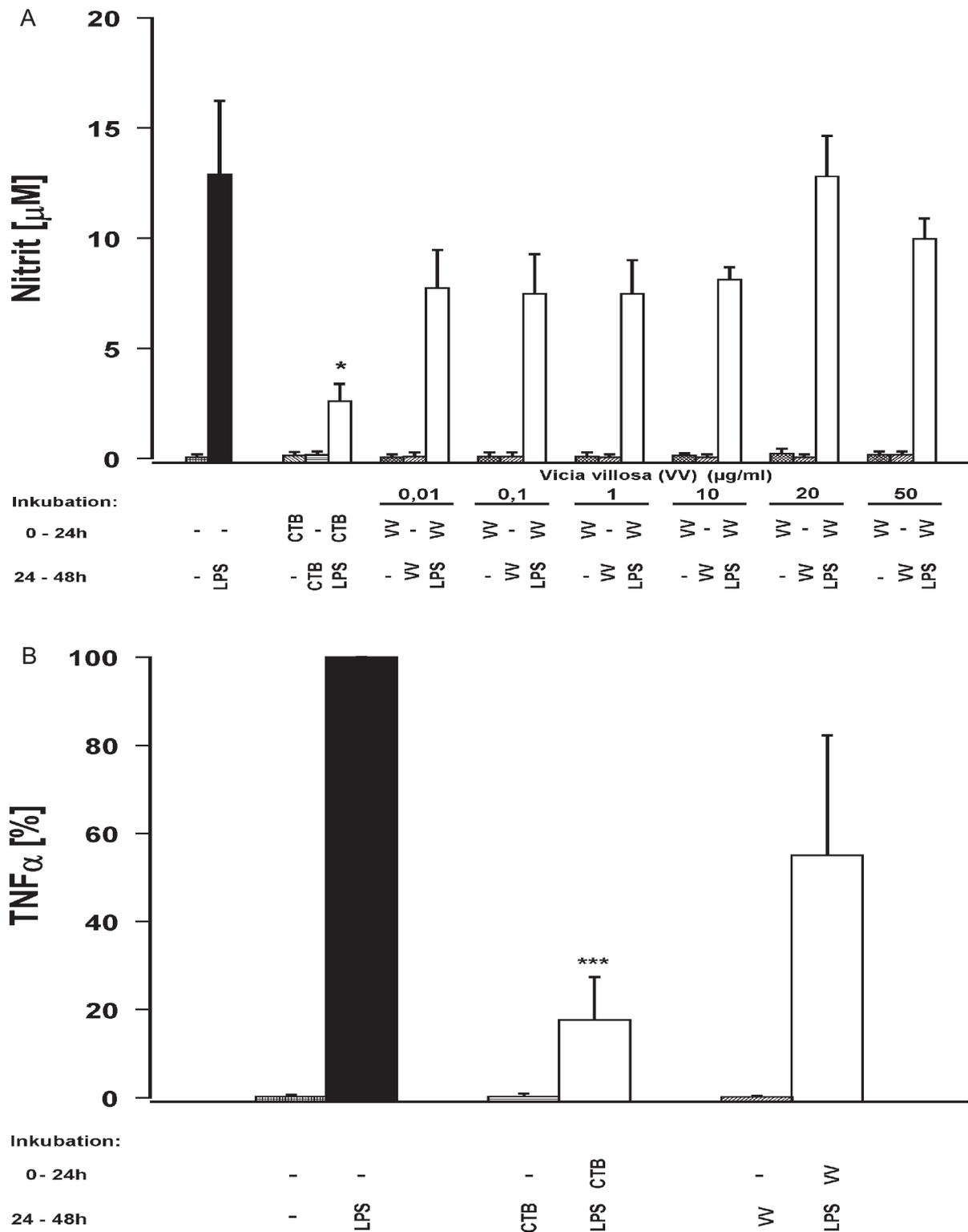


Abb. 9: Effekt einer Vorbehandlung mit dem Lektin von *Vicia villosa* (VV) auf die LPS-induzierte NO-Bildung durch IC21 Zellen (A) und die TNF α -Bildung durch J774A.1 Zellen (B). Die Zellen wurden in Abwesenheit oder Anwesenheit von CTB (10 μ g/ml) (A, B) bzw. von 0,01; 0,1; 1; 10; 20; 50 μ g/ml (A) oder nur mit 10 μ g/ml Lektin von VV (B) 24 h vorinkubiert. Nach Mediumwechsel wurden die Zellen mit 1 μ g/ml LPS stimuliert (A, B). In Kontrollansätzen wurden nicht vorbehandelte Zellen mit 10 μ g/ml CTB (A, B) bzw. mit 0,01; 0,1; 1; 10; 20; 50 μ g/ml (A) oder nur mit 10 μ g/ml Lektin von VV (B) behandelt. Nach 24 h wurde die Nitritakkumulation in den Kulturüberständen der IC21 Zellen (A) und die TNF α -Konzentration in den Überständen der J774A.1 Zellen bestimmt (B). Die Nitrit-Daten (A) zeigen Mittelwerte +SD aus drei Experimenten, die in Triplikaten durchgeführt wurden. Die TNF α -Daten (B) zeigen Mittelwerte +SD aus drei Versuchen, dargestellt in Prozent der durch 1 μ g/ml LPS induzierten TNF α -Freisetzung (100 % entsprechen 561 U/ml TNF α). * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$

nach 24 h Vorinkubation mit 10 µg/ml Lektin von VV und anschließender Stimulation mit 1 µg/ml LPS dargestellt. Der Referenzwert (100 % entsprechen 561 U/ml TNFα) entspricht der TNFα-Akkumulation nach alleiniger 24-stündiger LPS-Stimulation. Die TNFα-Produktion der unbehandelten Makrophagen war gering ($0,3 \pm 0,3$ %). Die mit 10 µg/ml CTB für 24 h vorinkubierten und anschließend über 24 h mit LPS stimulierten Makrophagen zeigten eine hochsignifikante ($p < 0,005$) Reduktion der TNFα-Produktion auf $17,6 \pm 7,9$ % im Vergleich zum Referenzwert. Eine alleinige Vorbehandlung der Makrophagen mit CTB führte zu einer minimalen TNFα-Produktion ($0,2 \pm 0,2$ %). Eine Vorbehandlung mit VV-Lektin (10 µg/ml) und anschließende LPS-Stimulation zeigte keine signifikante Reduktion oder Stimulation der TNFα-Produktion. J774A.1 Makrophagen, die mit 10 µg/ml Lektin von VV behandelt, aber nicht mit LPS stimuliert wurden, zeigten ebenfalls keinen TNFα-Anstieg ($0,3 \pm 0,5$ %) im Vergleich zu den Kontrollansätzen ohne LPS-Exposition. Zusammenfassend zeigte eine Vorbehandlung der Makrophagen mit VV-Lektin keine desensibilisierende oder potenzierende Wirkung sowohl bezüglich der LPS-induzierten NO- als auch der TNFα-Produktion.

3.3.2 Untersuchung zur Makrophagen desensibilisierenden Wirkung Glukose und Mannose bindender Lektine

Die Abb. 10A zeigt die Nitritakkumulation in den Überständen von IC21 Makrophagen nach 24 h Vorbehandlung mit verschiedenen Konzentrationen des Lektins von *Canavalia ensiformis* (CE) (Concanavalin A) (0,1; 1; 2,5; 5; 10 µg/ml) und anschließender 24-stündiger Stimulation mit 1 µg/ml LPS. Die Nitritakkumulation der nicht vorbehandelten und nach 24 h mit 1 µg/ml LPS stimulierten IC21 Makrophagen stellt mit $8,5 \pm 1,0$ µM den Referenzwert dar. Die Nitritakkumulation der unbehandelten Makrophagen war minimal ($0,1 \pm 0,1$ µM). Eine Vorinkubation mit CTB zeigte eine hoch signifikante ($p < 0,005$) Reduktion der LPS-induzierten NO-Produktion um 53,1 % ($4,0 \pm 0,2$ µM). Die Nitritakkumulation der nur mit CTB behandelten Makrophagen war gering ($0,1 \pm 0,2$ µM). Bei einer Vorinkubation mit dem Lektin von CE und einer anschließenden Stimulation mit 1 µg/ml LPS zeigte sich keine desensibilisierende Wirkung, sondern eine signifikant erhöhte Nitritakkumulation im Vergleich zum Referenzwert. Die Höhe der Nitritakkumulation war unabhängig von der zuvor verwendeten CE-Lektinkonzentration und wies keine erkennbare Konzentrationsabhängigkeit auf. Die Konzentrationen des akkumulierten Nitrits lagen zwischen $10,5 \pm 0,7$ µM (0,1 µg/ml CE-Lektin; $p < 0,01$ im Vergleich zum Referenzwert) und $12,3 \pm 1,4$ µM (10 µg/ml CE-Lektin; $p < 0,01$ im Vergleich zum Referenzwert). Eine alleinige Vorinkubation mit Lektin von CE zeigte bei allen Konzentrationen einen sehr geringen, im Vergleich zur Mediumkontrolle nicht signifikanten Anstieg der Nitritkonzentration ($0,2 \pm 0,2$ µM). Die IC21 Makrophagen, die im

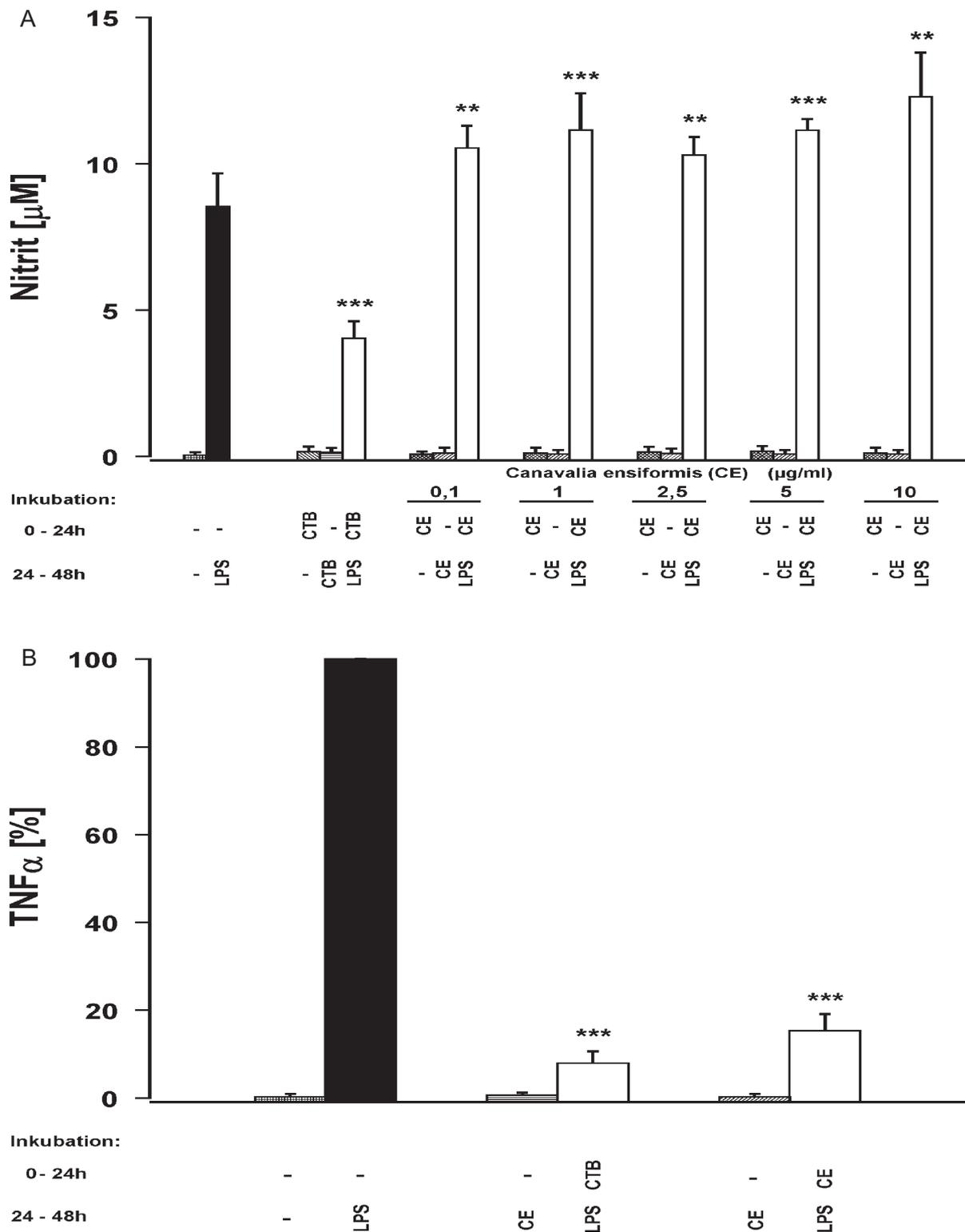


Abb. 10: Effekt einer Vorbehandlung mit dem Lektin von *Canavalia ensiformis* (CE) auf die LPS-induzierte NO-Bildung durch IC21 Zellen (A) und die TNF α -Bildung durch J774A.1 Zellen (B). Die Zellen wurden in Abwesenheit oder Anwesenheit von CTB 10 ($\mu\text{g/ml}$) (A, B) bzw. von 0,1; 1; 2,5; 5; 10 $\mu\text{g/ml}$ (A) oder nur mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Lektin von CE (B) 24 h vorinkubiert. Nach Mediumwechsel wurden die Zellen mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS stimuliert (A, B). In Kontrollansätzen wurden nicht vorbehandelte Zellen mit 10 $\mu\text{g/ml}$ CTB (A, B) bzw. mit 0,1; 1; 2,5; 5; 10 $\mu\text{g/ml}$ (A) oder nur mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Lektin von CE (B) behandelt. Nach 24 h wurde die Nitritakkumulation in den Kulturüberständen der IC21 Zellen (A) und die TNF α -Konzentration in den Überständen der J774A.1 Zellen bestimmt (B). Die Nitritdaten (A) zeigen Mittelwerte +SD aus zwei Experimenten, die in Triplicaten durchgeführt wurden. Die TNF α -Daten (B) zeigen Mittelwerte +SD aus drei Versuchen, dargestellt in Prozent der durch 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS induzierten TNF α -Freisetzung (100 % entsprechen 453 U/ml TNF α). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$

Verlauf des Experimentes von 24 - 48 h mit Lektin von CE behandelt wurden, zeigten ebenfalls eine sehr niedrige Nitritakkumulation ($0,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$).

In der Abb. 10B ist die $\text{TNF}\alpha$ -Akkumulation in den Überständen von J774A.1 Makrophagen nach 24 h Vorinkubation mit $10 \mu\text{g/ml}$ Lektin von CE und anschließender Stimulation mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS dargestellt. Bezogen auf den Referenzwert (100 % entsprechen $453 \text{ U/ml TNF}\alpha$) zeigte eine Vorbehandlung mit Lektin von CE eine hochsignifikante ($p < 0,005$) Reduktion der LPS-induzierten $\text{TNF}\alpha$ -Produktion ($15,3 \pm 3,1 \%$). Die $\text{TNF}\alpha$ -Akkumulation in den Überständen un behandelter Zellen war niedrig ($0,3 \pm 0,5 \%$). J774A.1 Makrophagen, die mit $10 \mu\text{g/ml}$ Lektin von CE behandelt, aber nicht mit LPS stimuliert wurden, zeigten einen sehr geringen $\text{TNF}\alpha$ -Anstieg auf $0,3 \pm 0,5 \%$. Die mit $10 \mu\text{g/ml}$ CTB für 24 h vorinkubierten und anschließend über 24 h mit LPS stimulierten J774A.1 Makrophagen zeigten ebenfalls eine hochsignifikante ($p < 0,005$) Reduktion der $\text{TNF}\alpha$ -Produktion auf $8,0 \pm 2,2 \%$. Insgesamt zeigte eine Vorbehandlung mit dem Lektin von CE hinsichtlich der LPS-induzierten NO- und $\text{TNF}\alpha$ -Produktion eine entgegengesetzte Wirkung. Während eine Vorinkubation der Makrophagen mit CE-Lektin und eine anschließende LPS-Stimulation eine signifikante Erhöhung der Nitritakkumulation zeigte, führte dieselbe Vorinkubation zur einer hochsignifikanten Senkung der LPS-induzierten $\text{TNF}\alpha$ -Produktion.

Die Abb. 11A zeigt die Nitritakkumulation in den Überständen von IC21 Makrophagen nach 24 h Vorbehandlung mit verschiedenen Konzentrationen des Lektins von *Pisum sativum* (PS) ($0,01$; $0,1$; 1 ; 10 ; 20 ; $50 \mu\text{g/ml}$) und anschließender 24 h Stimulation mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS. Die Nitritakkumulation der nicht vorbehandelten und nach 24 h mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS stimulierten IC21 Makrophagen stellt mit $20,2 \pm 1,8 \mu\text{M}$ den Referenzwert dar. Die Nitritakkumulation der un behandelten Makrophagen war minimal ($0,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$). Eine Vorinkubation mit CTB zeigte eine hoch signifikante ($p < 0,001$) Reduktion der LPS-induzierten Nitritakkumulation um $67,8 \%$ ($6,5 \pm 0,4 \mu\text{M}$). Die Nitritakkumulation der nur mit CTB behandelten Makrophagen war gering ($0,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$). Bei einer Vorinkubation mit dem Lektin von PS und einer anschließenden Stimulation mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS zeigte sich keine desensibilisierende Wirkung. Eine signifikant erhöhte Nitritakkumulation im Vergleich zum Referenzwert war nur bei einer PS-Lektinkonzentration von $20 \mu\text{g/ml}$ ($22,5 \pm 0,6 \mu\text{M}$; $p < 0,05$ im Vergleich zum Referenzwert) zu erkennen. Die Höhe der Nitritakkumulation war weitgehend unabhängig von den eingesetzten PS-Lektinkonzentrationen und wies keine Konzentrationsabhängigkeit auf. Die Konzentrationen des akkumulierten Nitrts lagen zwischen $19,2 \pm 0,5 \mu\text{M}$ und $22,5 \pm 0,6 \mu\text{M}$. Eine alleinige Vorinkubation mit Lektin von PS zeigte in allen Konzentrationen einen sehr geringen, im Vergleich zur Mediumkontrolle nicht signifikanten Anstieg der Nitritkonzentration ($0,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$). Die IC21 Makrophagen, die im Verlauf des Experimentes von 24 - 48 h mit Lektin von PS versetzt wurden, zeigten im Konzentrationsbereich von $0,01 - 1 \mu\text{g/ml}$ ebenfalls eine sehr niedrige Nitritakkumulation ($0,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$). Im

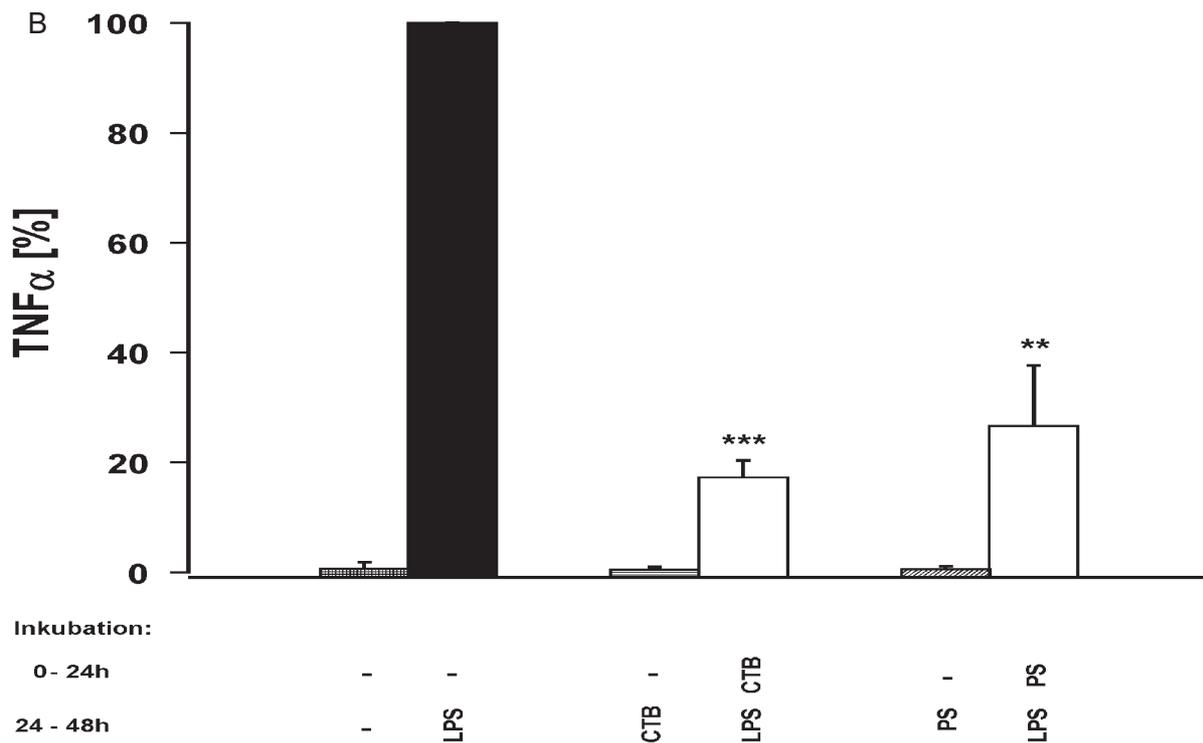
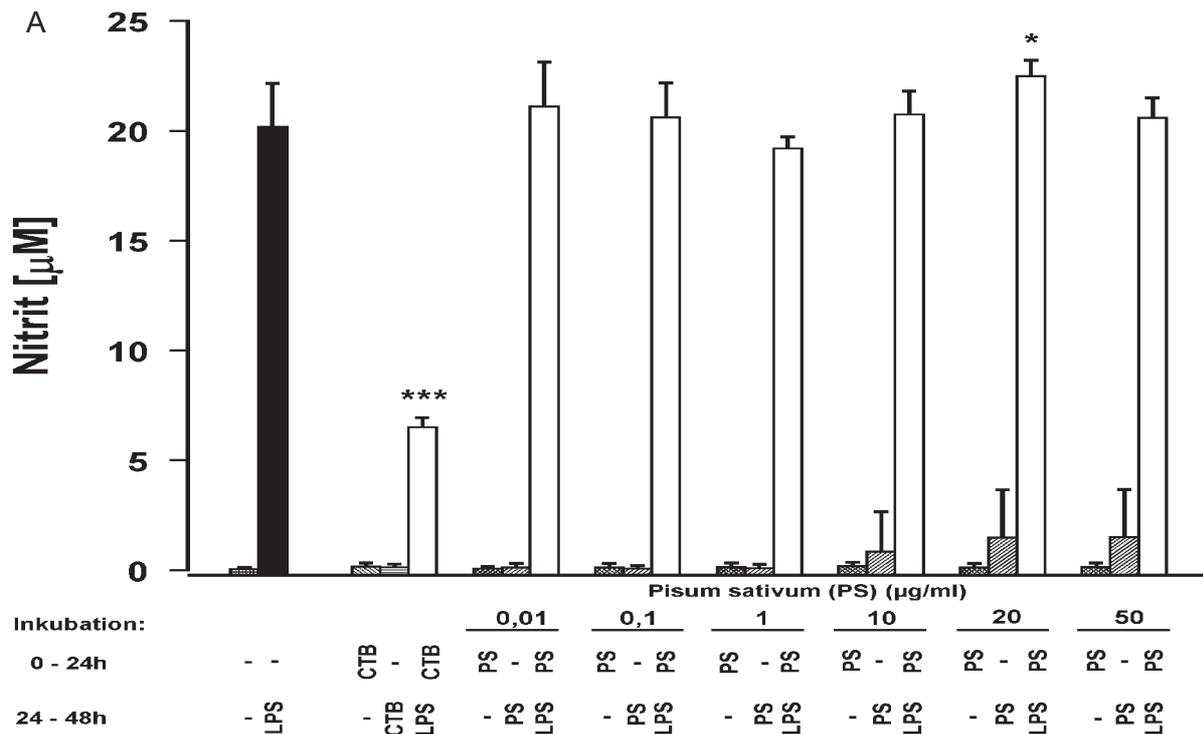


Abb. 11: Effekt einer Vorbehandlung mit dem Lektin von *Pisum sativum* (PS) auf die LPS-induzierte Nitritakkumulation durch IC21 Zellen (A) und die TNF α -Bildung durch J774A.1 Zellen (B). Die Zellen wurden in Abwesenheit oder Anwesenheit von CTB 10 μ g/ml (A, B) bzw. von 0,01; 0,1; 1; 10; 20; 50 μ g/ml (A) oder nur mit 10 μ g/ml Lektin von PS (B) 24 h vorinkubiert. Nach Mediumwechsel wurden die Zellen mit 1 μ g/ml LPS stimuliert (A, B). In Kontrollansätzen wurden nicht vorbehandelte Zellen mit 10 μ g/ml CTB (A, B) bzw. mit 0,01; 0,1; 1; 10; 20; 50 μ g/ml (A) oder nur mit 10 μ g/ml Lektin von PS (B) behandelt. Nach 24 h wurde die Nitritakkumulation in den Kulturüberständen der IC21 Zellen (A) und die TNF α -Konzentration in den Überständen der J774A.1 Zellen bestimmt (B). Die Nitrit-Daten (A) zeigen Mittelwerte +SD aus zwei Experimenten, die in Triplikaten durchgeführt wurden. Die TNF α -Daten (B) zeigen Mittelwerte +SD aus drei Versuchen, dargestellt in Prozent der durch 1 μ g/ml LPS induzierten TNF α -Freisetzung (100 % entsprechen 235 U/ml TNF α). * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

Konzentrationsbereich von 10 µg/ml ($0,8 \pm 1,6$ µM), 20 µg/ml ($0,8 \pm 1,9$ µM) und 50 µg/ml ($1,5 \pm 1,9$ µM) wurde ein geringer Nitritanstieg gemessen.

In der Abb. 11B ist die TNFα-Akkumulation in den Überständen von J774A.1 Makrophagen nach 24 h Vorinkubation mit 10 µg/ml Lektin von PS und anschließender Stimulation mit 1 µg/ml LPS dargestellt. Bezogen auf den Referenzwert (100 % entsprechen 235 U/ml TNFα) zeigte eine Vorbehandlung mit dem Lektin von PS einen signifikanten ($p < 0,01$) Unterschied in der TNFα-Produktion ($26,6 \pm 8,9$ %). Die gemessene TNFα-Akkumulation in den Überständen un behandelter Zellen war niedrig ($0,6 \pm 0,9$ %). J774A.1 Makrophagen, die mit 10 µg/ml Lektin von PS behandelt, aber nicht mit LPS stimuliert wurden, zeigten einen sehr geringen TNFα-Anstieg auf $0,6 \pm 0,4$ %. Die mit 10 µg/ml CTB für 24 h vorinkubierten und anschließend über 24 h stimulierten J774A.1 Makrophagen zeigten eine hochsignifikante ($p < 0,001$) Reduktion der TNFα-Produktion auf $17,3 \pm 2,5$ %. Insgesamt zeigte eine Vorbehandlung mit dem Lektin von PS nur eine tendentielle NO-Stimulation während dieselbe Vorinkubation zu einer hochsignifikanten Senkung der LPS induzierten TNFα-Produktion führte.

Die Abb. 12A zeigt die Nitritakkumulation in den Überständen von IC21 Makrophagen nach 24 h Vorbehandlung mit verschiedenen Konzentrationen des Lektins von Vicia faba (VF) (0,01; 0,1; 1; 10; 20; 50 µg/ml) und anschließender 24 h Stimulation dieser Makrophagen mit 1 µg/ml LPS. Die Nitritakkumulation der nicht vorbehandelten und nach 24 h mit 1 µg/ml LPS stimulierten IC21 Makrophagen entspricht dem Referenzwert und beträgt $17,6 \pm 1,4$ µM. Die Nitritakkumulation der un behandelten Makrophagen war niedrig ($0,1 \pm 0,1$ µM). Eine Vorinkubation mit CTB und anschließende LPS-Stimulation zeigt eine hochsignifikante ($p < 0,001$) Desensibilisierung um 50,0 % ($8,8 \pm 0,6$ µM). Die alleinige Inkubation (0 - 24 h oder 24 - 48 h) mit CTB zeigte einen niedrigen Nitritanstieg ($0,1 \pm 0,1$ µM; $0,2 \pm 0,1$ µM). Die Vorinkubation der IC21 Makrophagen mit VF-Lektin und anschließender LPS-Stimulation zeigt ein uneinheitliches Bild. Nach Vorinkubation mit 0,1 µg/ml VF-Lektin und anschließender LPS-Stimulation zeigt sich ein schwach signifikanter desensibilisierender Effekt ($p < 0,05$; $15,6 \pm 1,4$ µM). Die Vorinkubation mit 10 µg/ml VF-Lektin zeigt eine potenzierende Wirkung ($p < 0,02$; $20,7 \pm 1,5$ µM) hinsichtlich der NO-Produktion. Die Vorinkubation mit den anderen VF-Lektinkonzentrationen und anschließende LPS-Stimulation führte zu keinem signifikanten Unterschied im Vergleich zum Referenzwert. Die Werte lagen zwischen $15,9 \pm 1,4$ µM und $19,9 \pm 2,1$ µM. Die alleinige Vorbehandlung (0 - 24 h) mit Lektin von VF ohne LPS-Stimulation zeigte über den gesamten Konzentrationsbereich eine sehr niedrige Nitritakkumulation ($0,2 \pm 0,1$ µM). Die IC21 Makrophagen, die nicht vorbehandelt waren und nach weiteren 24 h mit VF-Lektin behandelt wurden, zeigten ebenfalls nur einen sehr geringen Nitritanstieg ($0,1 \pm 0,1$ µM).

In der Abb. 12B ist die TNFα-Akkumulation in den Überständen von J774A.1 Makrophagen nach 24 h Vorinkubation mit 10 µg/ml Lektin von VF und anschließender Stimulation mit

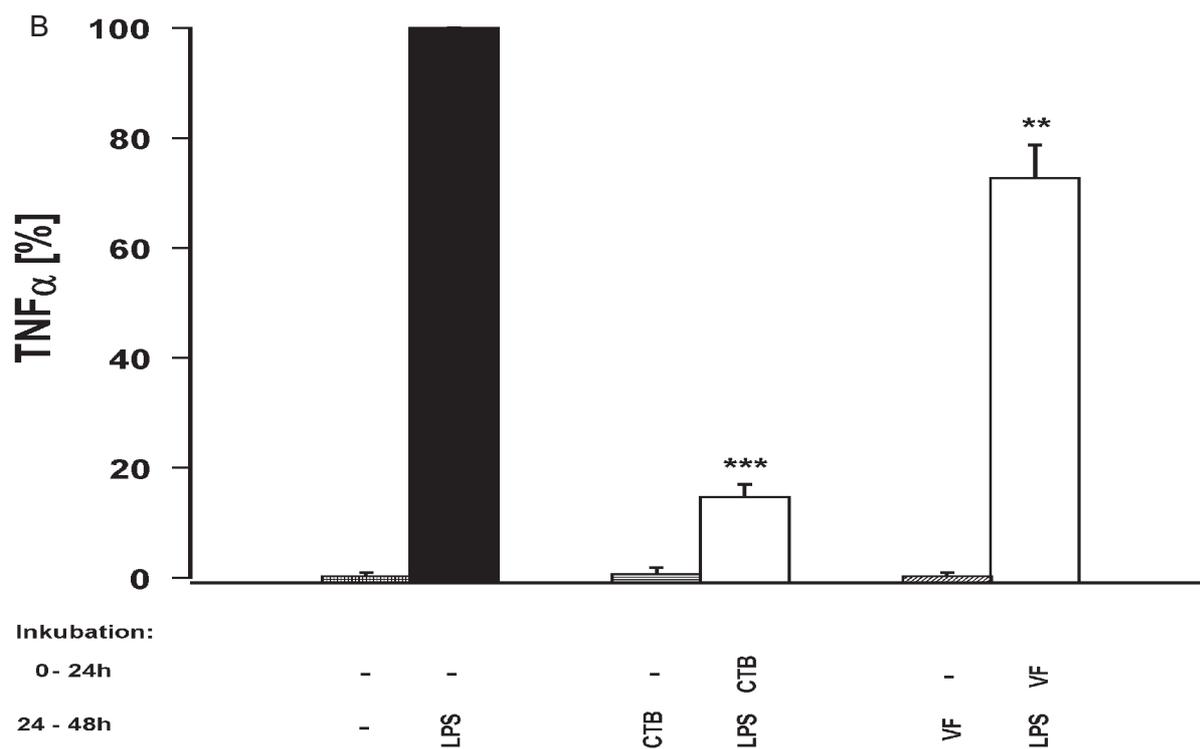
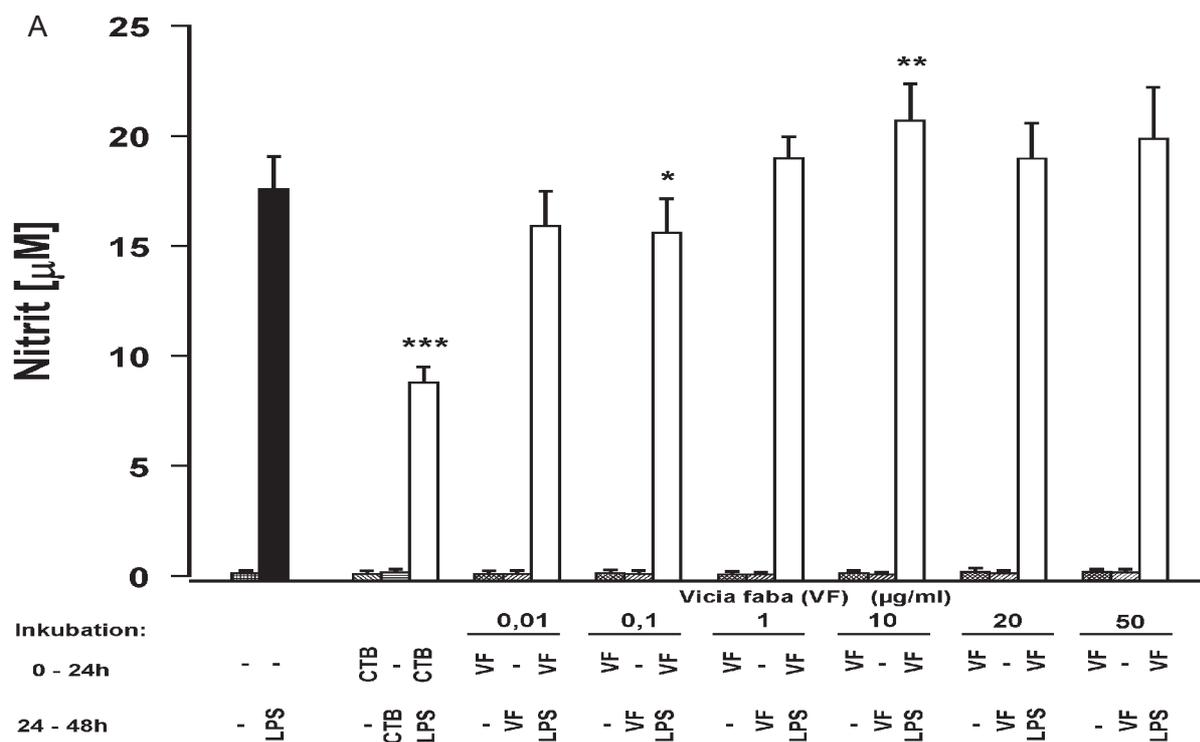


Abb. 12: Effekt einer Vorbehandlung mit dem Lektin von *Vicia faba* (VF) auf die LPS-induzierte NO-Bildung durch IC21 Zellen (A) und die TNF α -Bildung durch J774A.1 Zellen (B). Die Zellen wurden in Abwesenheit oder Anwesenheit von CTB (10 $\mu\text{g/ml}$) (A, B) bzw. von 0,01; 0,1; 1; 10; 20; 50 $\mu\text{g/ml}$ (A) oder nur mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Lektin von VF (B) 24 h vorinkubiert. Nach Mediumwechsel wurden die Zellen mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS stimuliert (A, B). In Kontrollansätzen wurden nicht vorbehandelte Zellen mit 10 $\mu\text{g/ml}$ CTB (A, B) bzw. mit 0,01; 0,1; 1; 10; 20; 50 $\mu\text{g/ml}$ (A) oder nur mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Lektin von VF (B) behandelt. Nach 24 h wurde die Nitritakkumulation in den Kulturüberständen der IC21 Zellen (A) und die TNF α -Konzentration in den Überständen der J774A.1 Zellen bestimmt (B). Die Nitrit-Daten (A) zeigen Mittelwerte +SD aus zwei Experimenten, die in Triplikaten durchgeführt wurden. Die TNF α -Daten (B) zeigen Mittelwerte +SD aus drei Versuchen, dargestellt in Prozent der durch 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS induzierten TNF α -Freisetzung (100 % entsprechen 666 U/ml TNF α). * $p < 0,05$; ** $p < 0,02$; *** $p < 0,001$

1 µg/ml LPS dargestellt. Der Referenzwert entspricht der TNFα-Akkumulation nach alleiniger 24-stündiger LPS-Stimulation (100 % entsprechen 666 U/ml TNFα). Die TNFα-Produktion der unbehandelten Makrophagen war gering ($0,3 \pm 0,5$ %). Die mit CTB (10 µg/ml) 24 h vorinkubierten und anschließend über 24 h mit LPS stimulierten Makrophagen zeigten eine hochsignifikante ($p < 0,001$) Reduktion der TNFα-Produktion auf $14,6 \pm 1,8$ % im Vergleich zum Referenzwert. Eine alleinige Behandlung der Makrophagen mit CTB führte zu einer minimalen TNFα-Produktion ($0,6 \pm 0,9$ %). Eine Vorbehandlung mit VF-Lektin (10 µg/ml) und anschließender LPS-Stimulation zeigt eine signifikante Senkung der TNFα-Produktion auf $2,6 \pm 4,9$ % . J774A.1 Makrophagen, die mit 10 µg/ml Lektin von VF behandelt, aber nicht mit LPS stimuliert wurden, zeigten keinen TNFα-Anstieg ($0,3 \pm 0,5$ %). Zusammenfassend zeigte eine Vorbehandlung der Makrophagen mit Lektin von VF tendenziell modulierende Effekte auf die LPS-induzierte NO-Produktion, während die TNFα-Produktion durch Vorinkubation mit VF-Lektin (10 µg/ml) signifikant erniedrigt wurde.

Die Abb. 13A zeigt die Nitritakkumulation in den Überständen von IC21 Makrophagen nach 24 h Vorbehandlung mit verschiedenen Konzentrationen des Lektins von *Vicia sativa* (VS) (0,01; 0,1; 1; 10; 20; 50 µg/ml) und anschließender 24-stündiger Stimulation dieser Makrophagen mit 1 µg/ml LPS. Die Nitritakkumulation der nicht vorbehandelten und nach 24 h mit 1 µg/ml stimulierten IC21 Makrophagen stellt mit $14,9 \pm 1,9$ µM den Referenzwert dar. Die Nitritakkumulation der unbehandelten Makrophagen war minimal ($0,05 \pm 0,07$ µM). Eine Vorinkubation mit CTB zeigt eine hoch signifikante ($p < 0,005$) Desensibilisierung um 69,6 % ($4,5 \pm 0,5$ µM). Die Nitritakkumulation der nur mit CTB behandelten Makrophagen war gering ($0,1 \pm 0,1$ µM). Eine Vorinkubation mit dem Lektin von VS in den unterschiedlichen Konzentrationen und anschließende Stimulation mit 1 µg/ml LPS zeigt eine eher potenzierende Wirkung im Vergleich zum Referenzwert. Die Nitritakkumulationswerte liegen zwischen $16,5 \pm 1,0$ µM und $17,6 \pm 1,5$ µM. Eine alleinige Vorinkubation mit Lektin von VS zeigte bei allen Konzentrationen in den ersten 24 h einen sehr geringen Nitritanstieg ($0,1 \pm 0,2$ µM). Die IC21 Makrophagen, die im weiteren Verlauf des Experiments von 24 - 48 h mit dem Lektin von VS in den Konzentrationen von 10; 20 und 50 µg/ml behandelt wurden, zeigten einen leichten Nitritanstieg ($1,0 \pm 2,0$ µM; $0,5 \pm 1,0$ µM; $0,7 \pm 1,4$ µM).

In der Abb. 13B wird die TNFα-Akkumulation in den Überständen von J774A.1 Makrophagen nach 24 h Vorinkubation mit 10 µg/ml Lektin von VS und anschließender Stimulation mit 1 µg/ml LPS dargestellt. Bezogen auf den Referenzwert (100 % entsprechen 457 U/ml TNFα) zeigte eine Vorbehandlung mit dem Lektin von VS einen signifikanten ($p < 0,02$) Unterschied in der TNFα-Produktion ($22,6 \pm 15,1$ %). Die gemessene TNFα-Akkumulation der unbehandelten Zellen war niedrig ($0,6 \pm 0,4$ %). J774A.1 Makrophagen, die mit 10 µg/ml Lektin von VS behandelt, aber nicht mit LPS stimuliert wurden, zeigten einen sehr geringen TNFα-Anstieg auf $0,3 \pm 0,5$ %. Die mit 10 µg/ml CTB 24 h vorinkubierten und anschließend über 24 h stimulierten

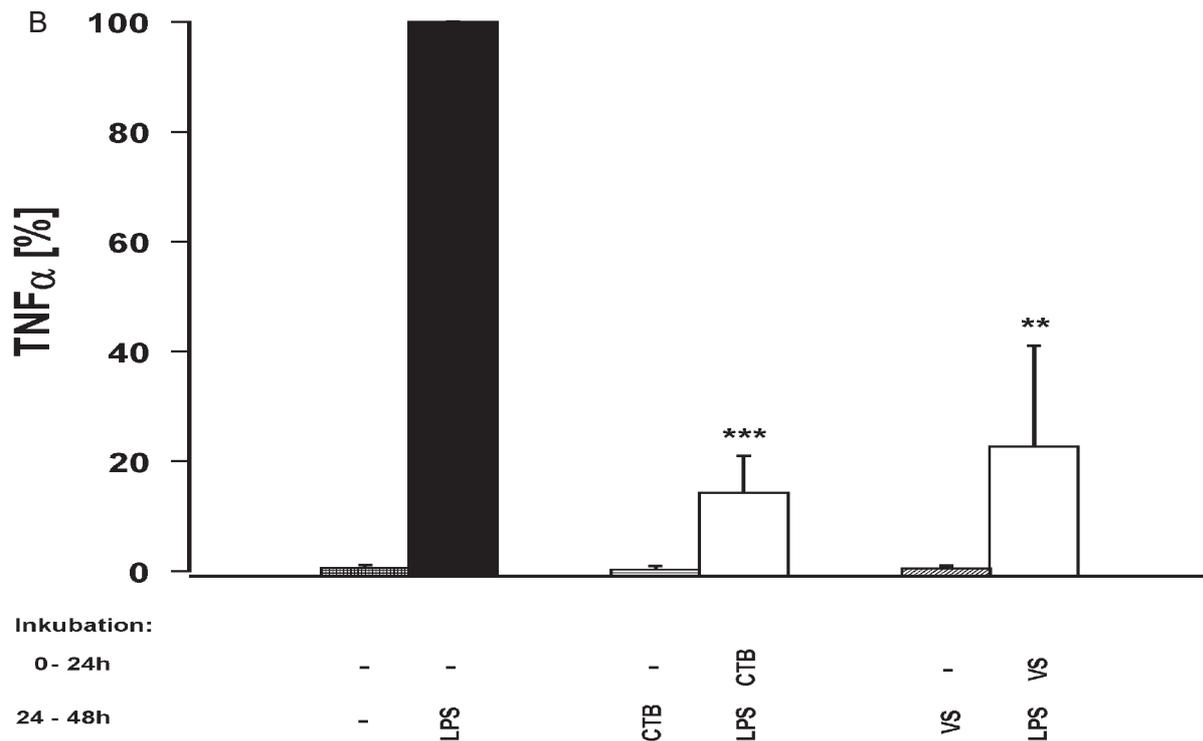
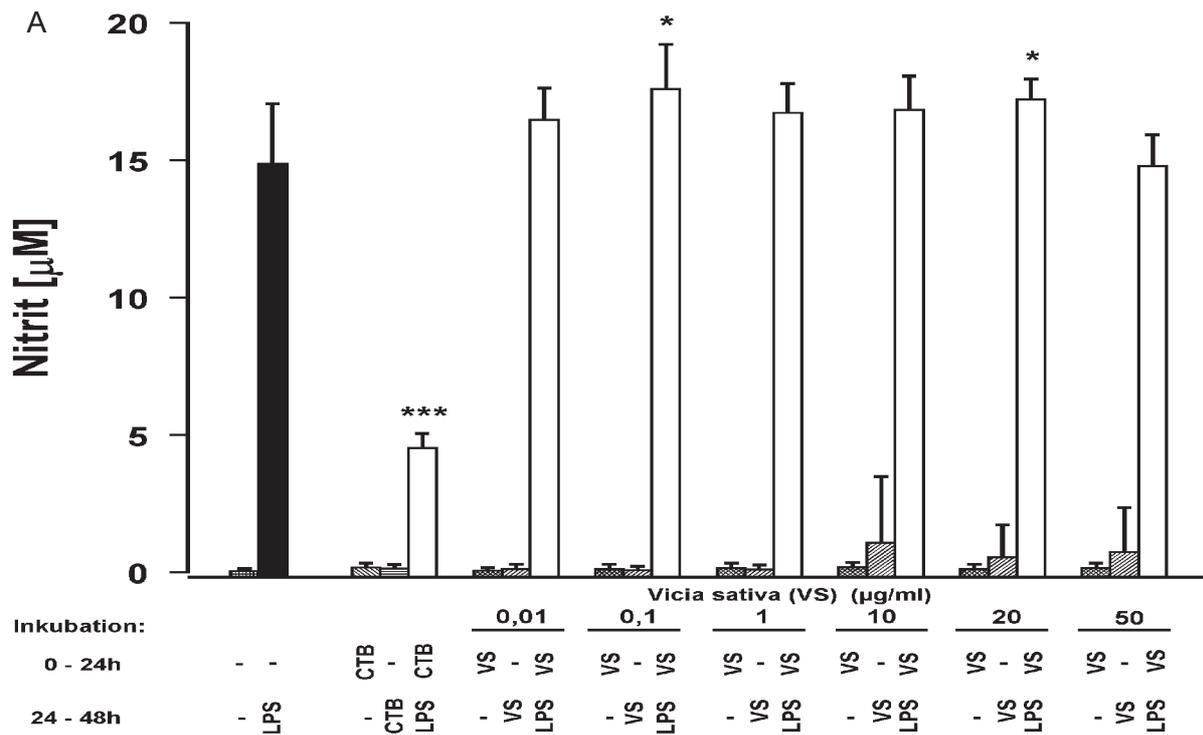


Abb. 13: Effekt einer Vorbehandlung mit dem Lektin von *Vicia sativa* (VS) auf die LPS-induzierte NO-Bildung durch IC21 Zellen (A) und die TNF α -Bildung durch J774A.1 Zellen (B). Die Zellen wurden in Abwesenheit oder Anwesenheit von CTB (10 $\mu\text{g/ml}$) (A, B) bzw. von 0,01; 0,1; 1; 10; 20; 50 $\mu\text{g/ml}$ (A) oder nur mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Lektin von VS (B) 24 h vorinkubiert. Nach Mediumwechsel wurden die Zellen mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS stimuliert (A, B). In Kontrollansätzen wurden nicht vorbehandelte Zellen mit 10 $\mu\text{g/ml}$ CTB (A, B) bzw. mit 0,01; 0,1; 1; 10; 20; 50 $\mu\text{g/ml}$ (A) oder nur mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Lektin von VS (B) behandelt. Nach 24 h wurde die Nitritakkumulation in den Kulturüberständen der IC21 Zellen (A) und die TNF α -Konzentration in den Überständen der J774A.1 Zellen bestimmt (B). Die Nitrit-Daten (A) zeigen Mittelwerte +SD aus zwei Experimenten, die in Triplikaten durchgeführt wurden. Die TNF α -Daten (B) zeigen Mittelwerte +SD aus drei Versuchen, dargestellt in Prozent der durch 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS induzierten TNF α -Freisetzung (100 % entsprechen 457 U/ml TNF α). * $p < 0,05$; ** $p < 0,02$; *** $p < 0,005$

J774A.1 Makrophagen zeigten ebenfalls eine hochsignifikante ($p < 0,005$) Reduktion der TNF α -Produktion auf $14,3 \pm 5,4$ %. Insgesamt zeigte eine Vorbehandlung mit dem Lektin von VS hinsichtlich der NO- und TNF α -Produktion eine tendentiell entgegengesetzte Wirkung. Eine Vorinkubation der Makrophagen mit VS und anschließender LPS-Stimulation zeigt eine eher verstärkende Wirkung im Vergleich zum Referenzwert hinsichtlich der Nitritakkumulation, dagegen führt die Vorinkubation mit $10 \mu\text{g/ml}$ Lektin von VS zu einer signifikanten Senkung der TNF α -Produktion.

In der Abb. 14A wird die Nitritakkumulation in den Überständen von IC21 Makrophagen nach 24 h Vorbehandlung mit verschiedenen Konzentrationen des Lektins von *Lens culinaris* (LC) ($0,01$; $0,1$; 1 ; 10 ; 20 ; $50 \mu\text{g/ml}$) und anschließender 24-stündiger Stimulation dieser Makrophagen mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS aufgezeigt. Die Nitritakkumulation der nicht vorbehandelten und nach 24 h mit $1 \mu\text{g/ml}$ stimulierten IC21 Makrophagen entspricht dem Referenzwert und beträgt $11,9 \pm 0,6 \mu\text{M}$. Die Nitritakkumulation der unbehandelten Makrophagen war niedrig ($0,05 \pm 0,07 \mu\text{M}$). Eine Vorinkubation mit CTB und anschließender LPS-Stimulation zeigt eine hochsignifikante ($p < 0,001$) Desensibilisierung um $53,6$ % ($5,5 \pm 0,9 \mu\text{M}$). Die alleinige Inkubation mit CTB ($0 - 24$ h oder $24 - 48$ h) zeigte einen geringen Nitritanstieg ($0,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$; $0,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$). Die Vorinkubation der IC21 Makrophagen mit LC-Lektin und anschließender LPS-Stimulation zeigte einen signifikanten Anstieg ($p < 0,001$) der Nitritkonzentration im Bereich aller Konzentrationen des LC-Lektins. Im Bereich bis $10 \mu\text{g/ml}$ zeigt sich eine Konzentrationsabhängigkeit ($15,7 \pm 0,2 \mu\text{M}$; $15,6 \pm 0,4 \mu\text{M}$; $18,2 \pm 0,6 \mu\text{M}$; $21,6 \pm 0,6 \mu\text{M}$). Im Bereich der höheren LC-Lektinkonzentrationen ($20 \mu\text{g/ml}$ und $50 \mu\text{g/ml}$) ist kein weiterer Anstieg der Nitritkonzentration zu verzeichnen. Die alleinige Vorbehandlung ($0 - 24$ h) mit Lektin von LC ohne LPS-Stimulation zeigte über den gesamten Konzentrationsbereich eine sehr niedrige Nitritakkumulation ($0,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$). IC21 Makrophagen, die nicht vorbehandelt waren, aber im Verlauf des Experiments von $24 - 48$ h mit LC-Lektin behandelt wurden, zeigten ebenfalls nur eine sehr geringe Nitritakkumulation ($0,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$).

In der Abb. 14B wird die TNF α -Akkumulation in den Überständen von J774A.1 Makrophagen nach 24 h Vorinkubation mit $10 \mu\text{g/ml}$ Lektin von LC und anschließender Stimulation mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS dargestellt. Der Referenzwert entspricht der TNF α -Akkumulation nach alleiniger LPS-Stimulation nach 24 h (100 % entsprechen $439 \text{ U/ml TNF}\alpha$). Die TNF α -Produktion der unbehandelten Makrophagen war gering ($0,6 \pm 0,4$ %). Die mit CTB ($10 \mu\text{g/ml}$) für 24 h vorinkubierten und anschließend über 24 h mit LPS stimulierten Makrophagen zeigten eine hochsignifikante ($p < 0,001$) Reduktion der TNF α -Produktion auf $24,3 \pm 2,1$ % im Vergleich zum Referenzwert. Eine alleinige Behandlung der Makrophagen mit CTB führte zu einer minimalen TNF α -Produktion ($0,3 \pm 0,5$ %). Eine Vorbehandlung mit LC-Lektin ($10 \mu\text{g/ml}$) und anschließende LPS-Stimulation zeigt keine signifikante Senkung der TNF α -Produktion ($58,0 \pm 22,0$ %). J774A.1 Makrophagen, die mit $10 \mu\text{g/ml}$ Lektin von LC behandelt, aber nicht

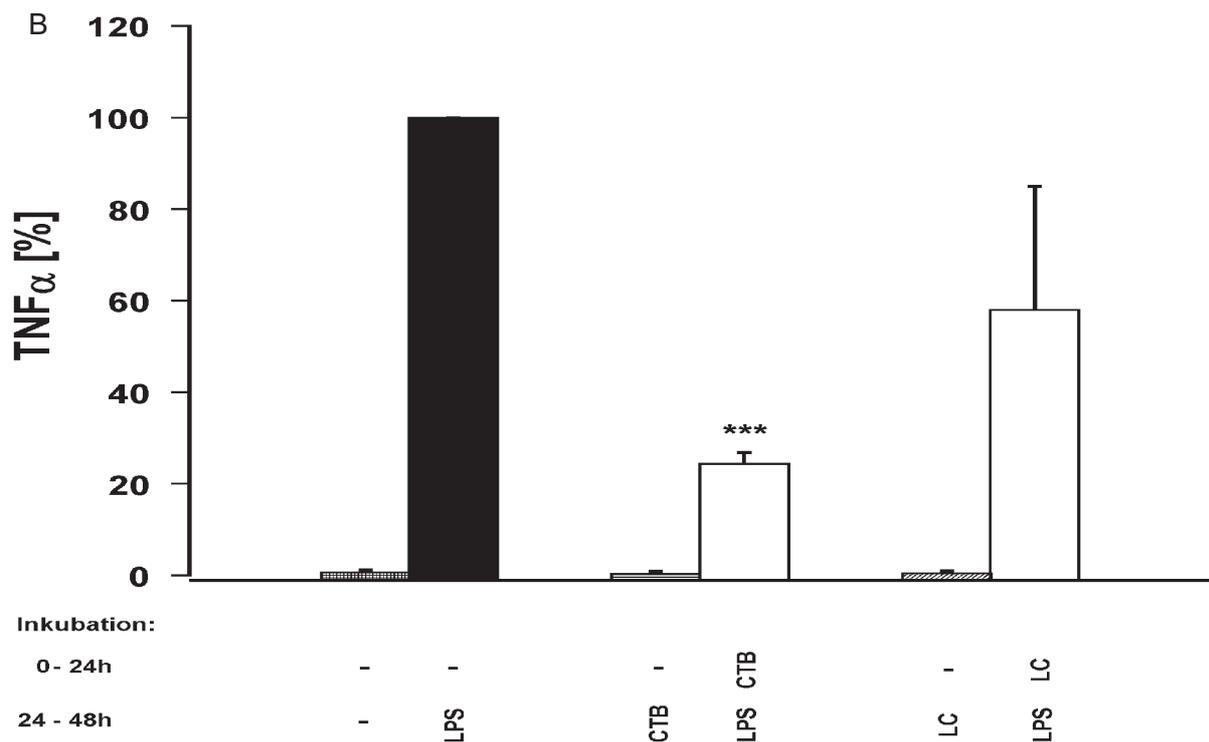
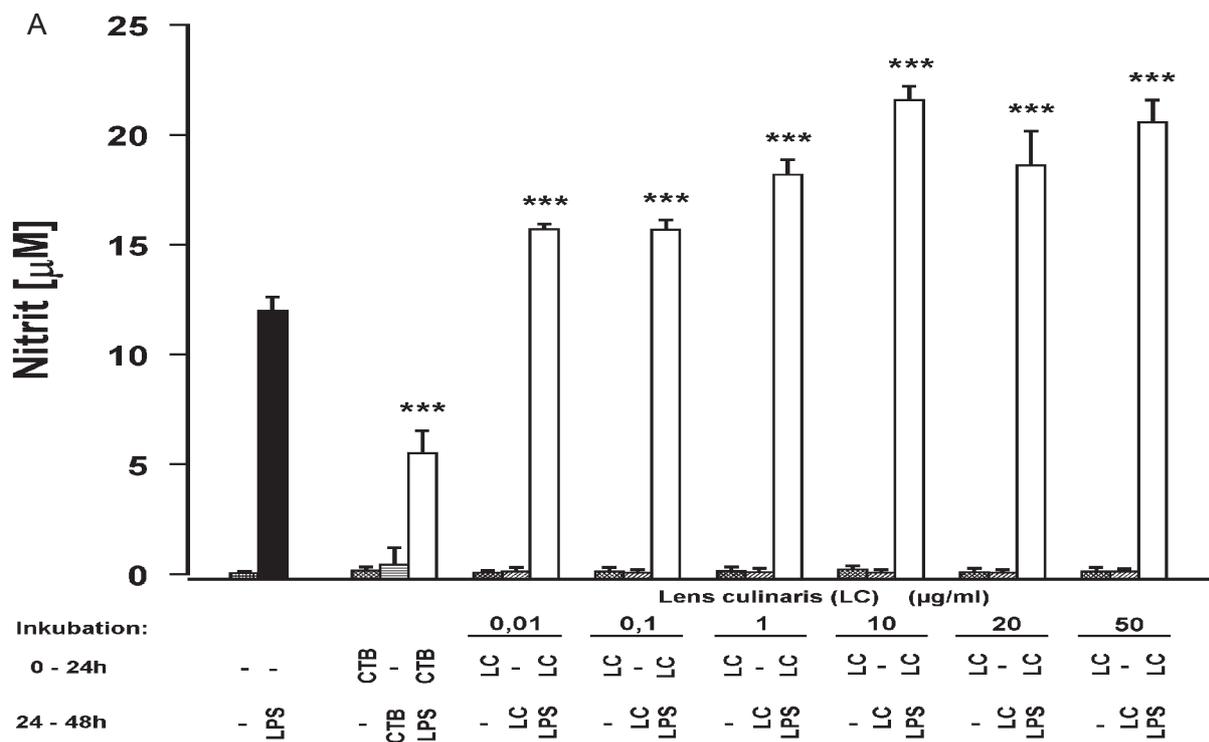


Abb. 14: Effekt einer Vorbehandlung mit dem Lektin von *Lens culinaris* (LC) auf die LPS-induzierte NO-Bildung durch IC21 Zellen (A) und die TNF α -Bildung durch J774A.1 Zellen (B). Die Zellen wurden in Abwesenheit oder Anwesenheit von CTB (10 $\mu\text{g/ml}$) (A, B) bzw. von 0,01; 0,1; 1; 10; 20; 50 $\mu\text{g/ml}$ (A) oder nur mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Lektin von LC (B) 24 h vorinkubiert. Nach Mediumwechsel wurden die Zellen mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS stimuliert (A, B). In Kontrollansätzen wurden nicht vorbehandelte Zellen mit 10 $\mu\text{g/ml}$ CTB (A, B) bzw. mit 0,01; 0,1; 1; 10; 20; 50 $\mu\text{g/ml}$ (A) oder nur mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Lektin von LC (B) behandelt. Nach 24 h wurde die Nitritakkumulation in den Kulturüberständen der IC21 Zellen (A) und die TNF α -Konzentration in den Überständen der J774A.1 Zellen bestimmt (B). Die Nitrit-Daten (A) zeigen Mittelwerte \pm SD aus zwei Experimenten, die in Triplicaten durchgeführt wurden. Die TNF α -Daten (B) zeigen Mittelwerte \pm SD aus drei Versuchen, dargestellt in Prozent der durch 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS induzierten TNF α -Freisetzung (100 % entsprechen 439 U/ml TNF α). *** $p < 0,001$

mit LPS stimuliert wurden, zeigten einen sehr geringen TNF α -Anstieg ($0,5 \pm 0,4$ %) im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Zusammenfassend zeigte eine Vorbehandlung der Makrophagen mit Lektin von LC eine Steigerung der LPS-induzierten NO-Produktion, während die TNF α -Produktion unbeeinflusst blieb. Die Untersuchung des Lektins in weiteren Konzentrationen zeigte eine deutliche konzentrationsabhängige potenzierende Wirkung bezüglich der NO-Produktion. Die LPS-induzierte TNF α -Produktion blieb durch eine Lektinkonzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ unbeeinflusst.

Die Abb. 15A zeigt die Nitritakkumulation in den Überständen von IC21 Makrophagen nach 24 h Vorbehandlung mit verschiedenen Konzentrationen des Lektins von *Triticum vulgare* (TV) ($0,01$; $0,1$; 1 ; 10 ; $20 \mu\text{g/ml}$) und anschließender 24-stündiger Stimulation dieser Makrophagen mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS. Die Nitritakkumulation der nicht vorbehandelten und nach 24 h mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS stimulierten IC21 Makrophagen stellt mit $25,2 \pm 0,9 \mu\text{M}$ den Referenzwert dar. Die Nitritakkumulation der unbehandelten Makrophagen war minimal ($0,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$). Eine Vorinkubation mit CTB zeigt eine hochsignifikante ($p < 0,005$) Desensibilisierung um $30,4$ %, ($17,5 \pm 2,9 \mu\text{M}$). Die Nitritakkumulation der nur mit CTB behandelten Makrophagen war gering ($0,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$). Eine Vorinkubation mit dem Lektin von TV in den Konzentrationen $0,1$; 1 und $10 \mu\text{g/ml}$ und anschließender Stimulation mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS zeigte eine potenzierende Wirkung ($27,1 \pm 0,5 \mu\text{M}$; $30,9 \pm 1,4 \mu\text{M}$ und $35,3 \pm 1,2 \mu\text{M}$) im Vergleich zum Referenzwert. Die Vorbehandlung der Makrophagen mit den TV-Lektinkonzentrationen $0,01$ und $20 \mu\text{g/ml}$ und anschließender Stimulation mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS zeigten auch tendenziell eine Erhöhung der Nitritakkumulation, die sich aber nicht signifikant vom Referenzwert unterscheidet ($27,2 \pm 1,6 \mu\text{M}$ und $27,1 \pm 1,2 \mu\text{M}$). Eine alleinige Inkubation mit Lektin von TV ($0 - 24$ h oder $24 - 48$ h) zeigte bei allen Konzentrationen einen sehr geringen Nitritanstieg ($0,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$).

In der Abb. 15B wird die TNF α -Akkumulation in den Überständen von J774A.1 Makrophagen nach 24 h Vorinkubation mit $10 \mu\text{g/ml}$ Lektin von TV und anschließender Stimulation mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS dargestellt. Bezogen auf den Referenzwert (100 % entspricht $503 \text{ U/ml TNF}\alpha$) zeigte eine Vorbehandlung mit Lektin von TV keine signifikante Reduktion in der TNF α -Produktion ($64,0 \pm 16,5$ %). Die gemessene TNF α -Akkumulation der unbehandelten Zellen war niedrig ($0,6 \pm 0,3$ %). J774A.1 Makrophagen, die mit $10 \mu\text{g/ml}$ Lektin von TV behandelt, aber nicht mit LPS stimuliert wurden, zeigten einen sehr geringen TNF α -Anstieg auf $0,3 \pm 0,3$ %. Die mit CTB ($10 \mu\text{g/ml}$) für 24 h vorinkubierten und anschließend über 24 h mit LPS stimulierten Makrophagen zeigten ebenfalls eine hochsignifikante ($p < 0,005$) Reduktion der TNF α -Produktion auf $14,3 \pm 3,8$ %. Insgesamt zeigte eine Vorbehandlung mit dem Lektin von TV hinsichtlich der NO-Freisetzung eine eher potenzierende Wirkung, während im Bereich der TNF α -Produktion weder eine potenzierende Wirkung noch eine Reduktion dieses Mediators festgestellt wurde.

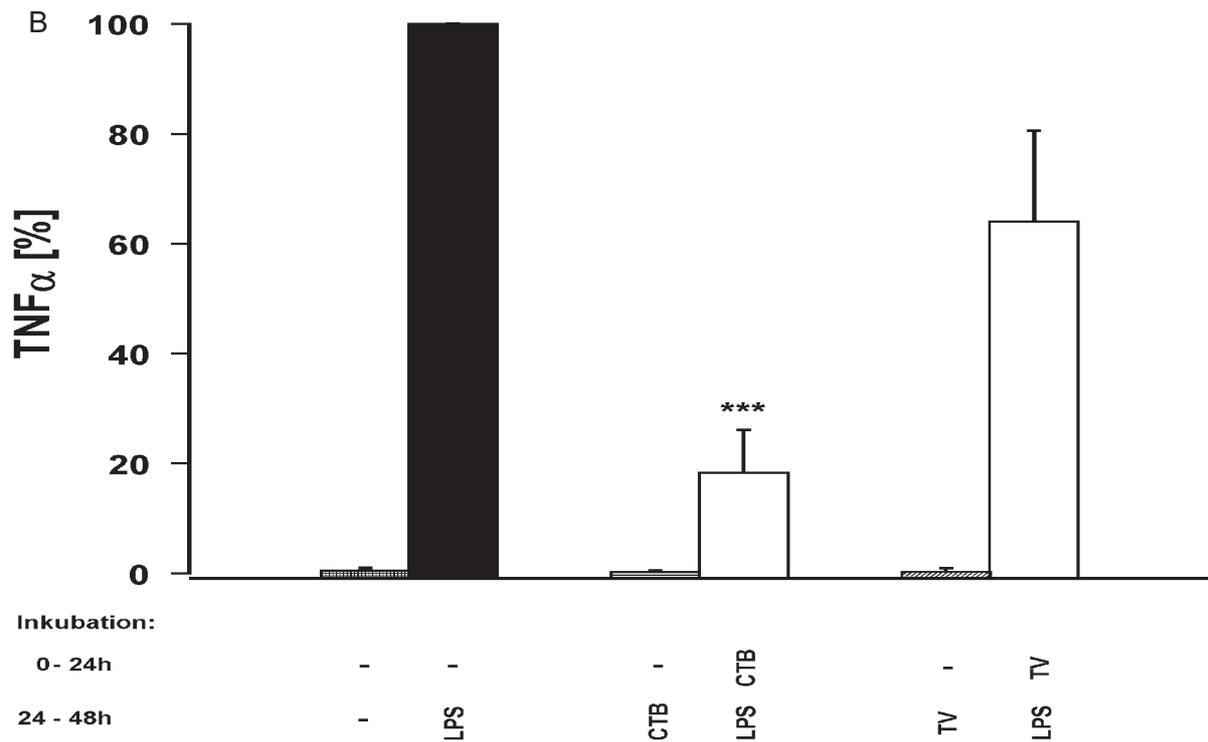
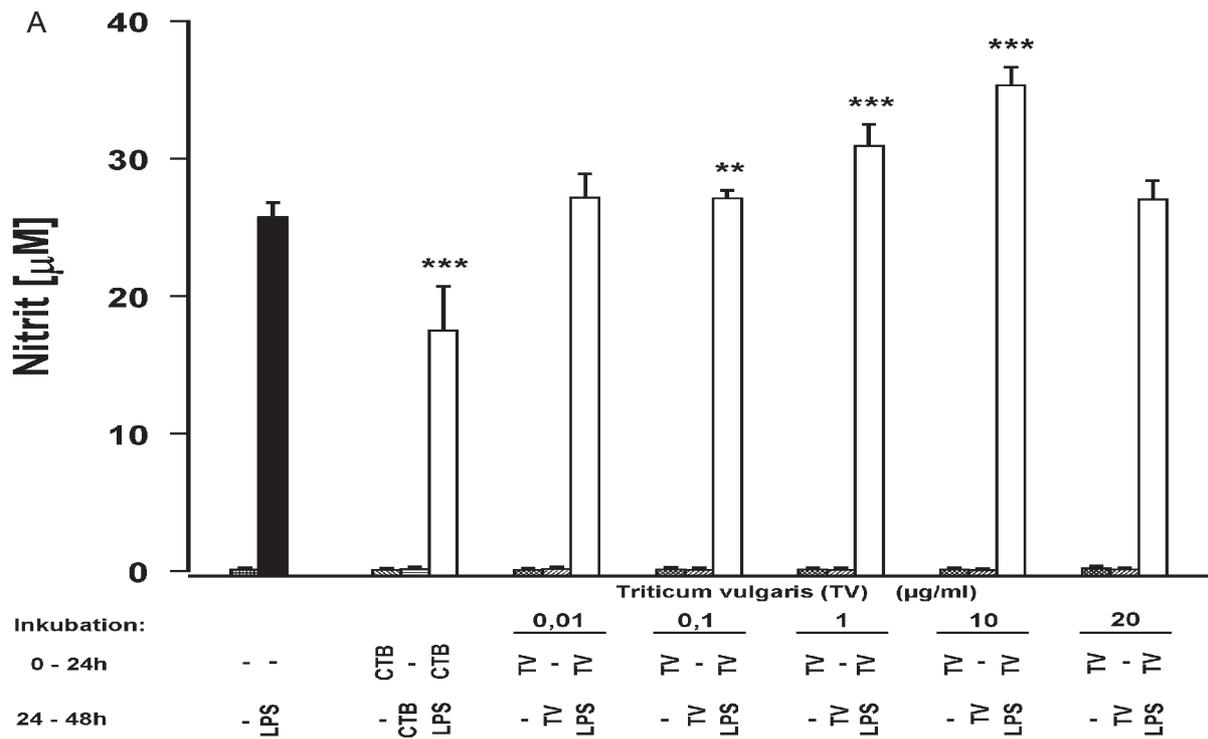


Abb. 15: Effekt einer Vorbehandlung mit dem Lektin von *Triticum vulgaris* (TV) auf die LPS-induzierte NO-Bildung durch IC21 Zellen (A) und die TNF α -Bildung durch J774A.1 Zellen (B). Die Zellen wurden in Abwesenheit oder Anwesenheit von CTB (10 $\mu\text{g/ml}$) (A, B) bzw. von 0,01; 0,1; 1; 10; 20 $\mu\text{g/ml}$ (A) oder nur mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Lektin von TV (B) 24 h vorinkubiert. Nach Mediumwechsel wurden die Zellen mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS stimuliert (A, B). In Kontrollansätzen wurden nicht vorbehandelte Zellen mit 10 $\mu\text{g/ml}$ CTB (A, B) bzw. mit 0,01; 0,1; 1; 10; 20 $\mu\text{g/ml}$ (A) oder nur mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Lektin von TV (B) behandelt. Nach 24 h wurde die Nitritakkumulation in den Kulturüberständen der IC21 Zellen (A) und die TNF α -Konzentration in den Überständen der J774A.1 Zellen bestimmt (B). Die Nitrit-Daten (A) zeigen Mittelwerte +SD aus zwei Experimenten, die in Triplikaten durchgeführt wurden. Die TNF α -Daten (B) zeigen Mittelwerte +SD aus drei Versuchen, dargestellt in Prozent der durch 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS induzierten TNF α -Freisetzung (100 % entsprechen 503 U/ml TNF α).**p < 0,02; *** p < 0,005

3.3.3 Untersuchung zur Makrophagen desensibilisierenden Wirkung eines Fukose bindenden Lektins

Die Abb. 16A zeigt die Nitritakkumulation in den Überständen von IC21 Makrophagen nach 24 h Vorbehandlung mit verschiedenen Konzentrationen des Lektins von *Ulex europaeus* (UE) (0,01; 0,1; 1; 10; 20; 50 µg/ml) und anschließender 24-stündiger Stimulation dieser Makrophagen mit LPS (1 µg/ml). Die Nitritakkumulation der nicht vorbehandelten und nach 24 h mit 1 µg/ml LPS stimulierten IC21 Makrophagen stellt mit $13,1 \pm 0,8$ µM den Referenzwert dar. Die Nitritakkumulation der unbehandelten Makrophagen war minimal ($0,1 \pm 0,1$ µM). Eine Vorinkubation mit CTB zeigt eine hochsignifikante ($p < 0,005$) Desensibilisierung um 45,7 % ($7,1 \pm 0,3$ µM). Die Nitritakkumulation der nur mit CTB behandelten Makrophagen war gering ($0,4 \pm 0,1$ µM). Eine Vorinkubation mit dem Lektin von UE in den Konzentrationen 1 und 10 µg/ml und anschließende Stimulation mit 1 µg/ml LPS zeigt eine signifikante, potenzierende Wirkung ($14,3 \pm 0,6$ µM; $14,9 \pm 0,7$ µM) im Vergleich zum Referenzwert ($p < 0,05$ und $p < 0,005$). Im Bereich der Konzentrationen 0,01; 0,1; 20 und 50 µg/ml besteht eine tendentiell potenzierende Wirkung, die aber im Vergleich zum Referenzwert nicht signifikant ist ($13,9 \pm 0,5$ µM; $13,8 \pm 0,6$ µM; $13,6 \pm 1,8$ µM; $13,6 \pm 1,1$ µM). Die alleinige Vorbehandlung der Makrophagen mit der UE-Lektinkonzentration 10; 20 und 50 µg/ml zeigte in den ersten 24 h einen Anstieg der Nitritakkumulation ($2,7 \pm 2,0$ µM; $3,9 \pm 0,4$ µM; $6,9 \pm 2,2$ µM). Im Bereich der UE-Lektinkonzentration von 0,01 und 0,1 µg/ml wurde eine sehr geringe Nitritkonzentration gemessen ($0,1 \pm 0,1$ µM; $0,1 \pm 0,2$ µM). Im Bereich der UE-Lektinkonzentration von 1; 10; 20 und 50 µg/ml wurde ein nicht signifikanter Nitritanstieg nach 48 h gemessen ($2,2 \pm 1,5$ µM; $1,5 \pm 1,4$ µM; $3,5 \pm 0,4$ µM; $2,7 \pm 1,3$ µM). Eine alleinige Inkubation mit Lektin von UE zeigte in den Konzentrationen 0,01 und 0,1 µg/ml nach einer 48-stündigen Inkubation einen sehr geringen Nitritanstieg ($0,1 \pm 0,2$ µM; $0,1 \pm 0,1$ µM).

In der Abb. 16B wird die TNF α -Akkumulation in den Überständen von J774A.1 Makrophagen nach 24 h Vorinkubation mit 10 µg/ml Lektin von UE und anschließender Stimulation mit 1 µg/ml LPS dargestellt. Bezogen auf den Referenzwert (100 % entsprechen 592 U/ml TNF α), zeigte eine Vorbehandlung mit dem Lektin von UE eine eher potenzierende Wirkung, aber keinen signifikanten Unterschied in der TNF α -Produktion ($109,6 \pm 4,5$ %). Die gemessene TNF α -Akkumulation der unbehandelten Zellen war niedrig ($0,6 \pm 0,9$ %). J774A.1 Makrophagen, die mit 10 µg/ml Lektin von UE behandelt, aber nicht mit LPS stimuliert wurden, zeigten einen leichten TNF α -Anstieg auf $3,6 \pm 3,7$ %. Die mit CTB (10 µg/ml) für 24 h vorinkubierten und anschließend über 24 h mit LPS stimulierten Makrophagen zeigten eine hochsignifikante ($p < 0,005$) Reduktion der TNF α -Produktion auf $25,3 \pm 2,4$ %.

Insgesamt zeigte eine Vorbehandlung mit dem Lektin von UE hinsichtlich der LPS-induzierten NO- und TNF α -Produktion eine eher stimulierende Wirkung im Vergleich zum Referenzwert.

3.3.4 Untersuchung zur Makrophagen desensibilisierenden Wirkung eines Oligosaccharid bindenden Lektins

Die Abb. 17A zeigt die Nitritakkumulation in den Überständen von IC21 Makrophagen nach 24 h Vorbehandlung mit verschiedenen Konzentrationen des Lektins von Phaseolus vulgaris (PV) (0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml) und anschließender 24 h Stimulation dieser Makrophagen mit 1 µg/ml LPS. Die Nitritakkumulation der nicht vorbehandelten und nach 24 h mit 1 µg/ml LPS stimulierten IC21 Makrophagen stellt mit $37,1 \pm 2,2$ µM den Referenzwert dar. Die Nitritakkumulation der unbehandelten Makrophagen war minimal ($0,1 \pm 0,1$ µM). Eine Vorinkubation mit CTB zeigt eine hochsignifikante ($p < 0,001$) Desensibilisierung um 61,5 % ($14,3 \pm 0,8$ µM). Die Nitritakkumulation der nur mit CTB behandelten Makrophagen war gering ($0,1 \pm 0,1$ µM). Eine Vorinkubation mit dem Lektin von PV in den unterschiedlichen Konzentrationen und anschließender Stimulation mit 1 µg/ml LPS zeigt bei den PV-Lektinkonzentrationen von 0,01; 0,1 und 1 µg/ml eine konzentrationsabhängige, desensibilisierende Wirkung im Vergleich zum Referenzwert ($34,9 \pm 1,1$ µM, $p < 0,05$; $32,9 \pm 0,5$ µM, $p < 0,05$; $29,8 \pm 2,7$ µM, $p < 0,001$). Die Nitritakkumulation bei 1 µg/ml PV-Lektin lag bei $29,8 \pm 2,9$ µM ($p < 0,001$) und war hiermit signifikant erniedrigt im Vergleich zum Referenzwert. Bei der PV-Lektinkonzentration von 5 µg/ml war die gemessene Nitritakkumulation mit $34,3 \pm 1,5$ µM ($p < 0,05$), und bei 10 µg/ml war die Nitritakkumulation mit $30,4 \pm 2,2$ µM ($p < 0,001$) gegenüber dem Referenzwert signifikant erniedrigt. Eine alleinige Vorinkubation mit Lektin von PV zeigte in allen Konzentrationen in den ersten 24 h, aber auch im Verlauf der Inkubationsphase von 24 - 48 h einen sehr geringen Nitritanstieg ($0,1 \pm 0,1$ µM).

In der Abb. 17B wird die TNF α -Akkumulation in den Überständen von J774A.1 Makrophagen nach 24 h Vorinkubation mit 10 µg/ml Lektin von PV und anschließender Stimulation mit 1 µg/ml LPS dargestellt. Bezogen auf den Referenzwert (100 % entsprechen 667 U/ml TNF α) zeigte eine Vorbehandlung mit Lektin von PV einen signifikanten ($p < 0,02$) Unterschied in der TNF α -Produktion ($27,6 \pm 7,8$ %). Die gemessene TNF α -Akkumulation der unbehandelten Zellen war niedrig ($0,3 \pm 0,5$). J774A.1 Makrophagen, die mit 10 µg/ml Lektin von PV behandelt, aber nicht mit LPS stimuliert wurden, zeigten einen sehr geringen TNF α -Anstieg auf $0,6 \pm 0,5$ %. Die mit CTB (10 µg/ml) für 24 h vorinkubierten und anschließend über 24 h mit LPS stimulierten Makrophagen zeigten ebenfalls eine hochsignifikante ($p < 0,001$) Reduktion der TNF α -Produktion auf $8,3 \pm 1,8$ %. Insgesamt zeigte eine Vorbehandlung mit dem Lektin von PV eine desensibilisierende Wirkung, die bei der LPS-induzierten TNF α -Produktion stärker ausgeprägt erscheint als bei der NO-Produktion.

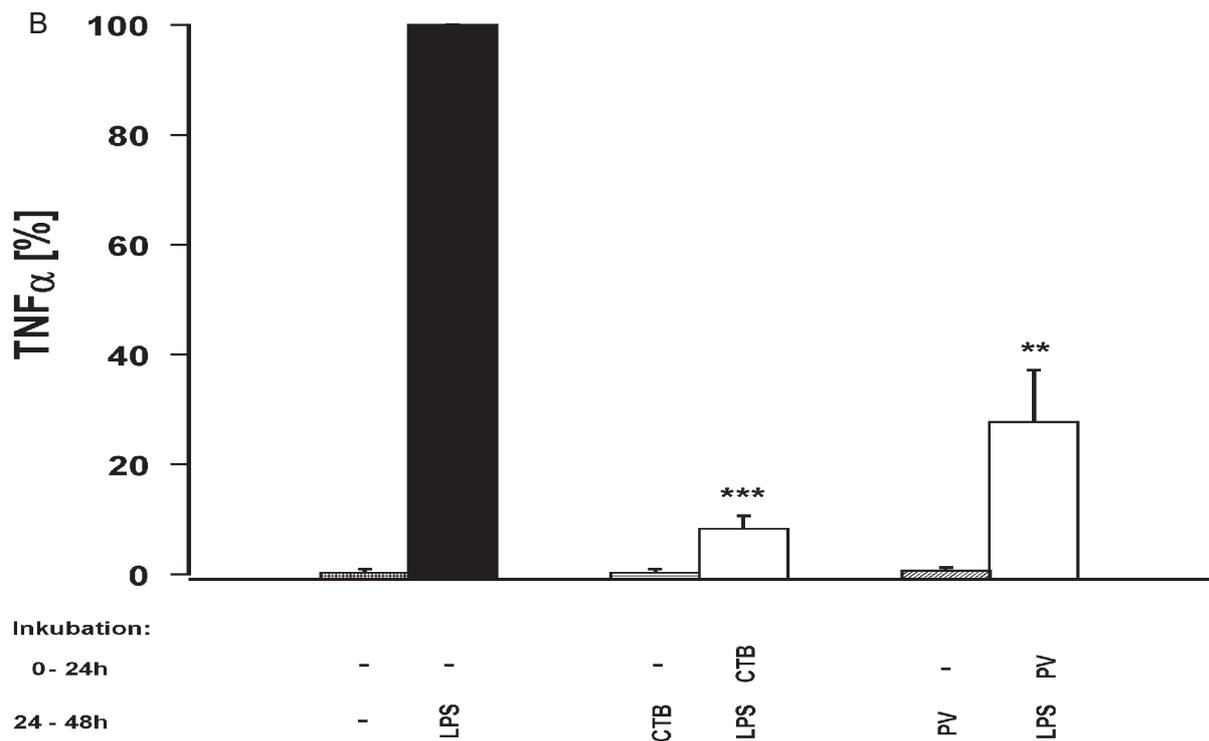
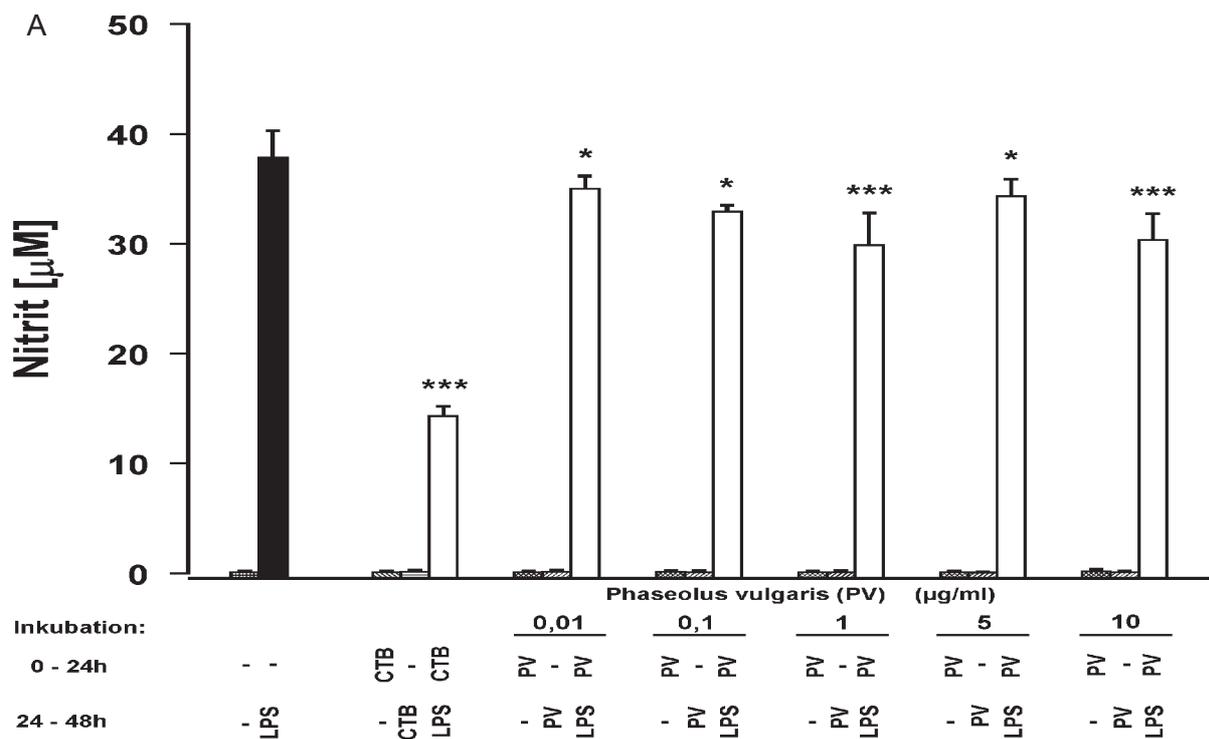


Abb. 17: Effekt einer Vorbehandlung mit dem Lektin von *Phaseolus vulgaris* (PV) auf die LPS-induzierte NO-Bildung durch IC21 Zellen (A) und die TNF α -Bildung durch J774A.1 Zellen (B). Die Zellen wurden in Abwesenheit oder Anwesenheit von CTB (10 µg/ml) (A, B) bzw. von 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml (A) oder nur mit 10 µg/ml Lektin von PV (B) 24 h vorinkubiert. Nach Mediumwechsel wurden die Zellen mit 1 µg/ml LPS stimuliert (A, B). In Kontrollansätzen wurden nicht vorbehandelte Zellen mit 10 µg/ml CTB (A, B) bzw. mit 0,01; 0,1; 1; 5; 10 µg/ml (A) oder nur mit 10 µg/ml Lektin von PV (B) behandelt. Nach 24 h wurde die Nitritakkumulation in den Kulturüberständen der IC21 Zellen (A) und die TNF α -Konzentration in den Überständen der J774A.1 Zellen bestimmt (B). Die Nitrit-Daten (A) zeigen Mittelwerte +SD aus zwei Experimenten, die in Triplikaten durchgeführt wurden. Die TNF α -Daten (B) zeigen Mittelwerte +SD aus drei Versuchen, dargestellt in Prozent der durch 1 µg/ml LPS induzierten TNF α -Freisetzung (100 % entsprechen 667 U/ml TNF α). *p < 0,05; ** p < 0,02; ***p < 0,001

3.4 Makrophagen desensibilisierende Wirkung des bakteriellen Extrakts OM-89

Die Abb. 18A zeigt die Nitritakkumulation in den Überständen von IC21 Makrophagen nach 24 h Vorbehandlung mit verschiedenen Konzentrationen des bakteriellen Extrakts OM-89 (0,1; 0,5; 1; 5; 10 mg/ml) und anschließender 24-stündiger Stimulation dieser Makrophagen mit 1 µg/ml LPS. Die Nitritakkumulation der nicht vorbehandelten und nach 24 h mit 1 µg/ml LPS stimulierten IC21 Makrophagen stellt mit $47,6 \pm 2,9$ µM den Referenzwert dar. Die Nitritakkumulation der unbehandelten Makrophagen war minimal ($2,1 \pm 1,5$ µM). Eine Vorinkubation mit CTB zeigt eine hochsignifikante ($p < 0,02$) Desensibilisierung um 69,9 % ($14,3 \pm 0,9$ µM). Die Nitritakkumulation der nur mit CTB behandelten Makrophagen war gering ($0,6 \pm 0,1$ µM). Eine Vorinkubation mit OM-89 in den unterschiedlichen Konzentrationen zeigte eine konzentrationsunabhängige, stimulierende Wirkung im Vergleich zum Referenzwert sowohl nach 24 h ($3,9 \pm 2,2$ µM bis $5,4 \pm 0,3$ µM) als auch in der Inkubationsphase von 24 - 48 h ($8,9 \pm 2,4$ µM bis $12,2 \pm 2,5$ µM). Die Vorbehandlung mit 10 mg/ml OM-89 führte zu einer Desensibilisierung der Makrophagen. Bei dieser OM-89 Konzentration ist die NO-Produktion signifikant erniedrigt im Vergleich zum Referenzwert ($24,7 \pm 5,0$ µM; $p < 0,02$). Die Vorbehandlung mit OM-89 in den Konzentrationen 0,1; 0,5; 1; 5 mg/ml führte zu keinem signifikanten Unterschied. In diesem Konzentrationsbereich lag die gemessene Nitritakkumulation zwischen $32,0 \pm 7,2$ µM und $39,5 \pm 3,5$ µM.

In der Abb. 18B wird die TNFα-Akkumulation in den Überständen von J774A.1 Makrophagen nach 24 h Vorinkubation mit 1 und 10 mg/ml OM-89 und anschließender Stimulation mit 1 µg/ml LPS dargestellt. Bezogen auf den Referenzwert (100 % entsprechen 139 U/ml TNFα) zeigte eine Vorbehandlung sowohl mit 1 mg/ml als auch mit 10 mg/ml OM-89 eine hochsignifikante ($p < 0,005$) Verringerung der TNFα-Produktion. Diese TNFα-Produktion war bei 1 mg/ml OM-89 auf $51,9 \pm 4,7$ % und bei 10 mg/ml OM-89 auf $16,4 \pm 5,1$ % reduziert. Die gemessene TNFα-Akkumulation der unbehandelten Zellen war niedrig ($0,6 \pm 0,3$ %). J774A.1 Makrophagen, die mit jeweils 1 und 10 mg/ml OM-89 behandelt, aber nicht mit LPS stimuliert wurden, zeigten allerdings eine deutlich erhöhte TNFα-Produktion ($32,7 \pm 7,5$ %; $36,1 \pm 5,8$ %). Die mit 10 µg/ml CTB für 24 h vorinkubierten und anschließend über 24 h mit LPS stimulierten Makrophagen zeigten ebenfalls eine signifikante ($p < 0,02$) Reduktion der TNFα-Produktion auf $21,8 \pm 13,2$ %. Die nur mit CTB inkubierten Makrophagen zeigten einen sehr geringen TNFα-Anstieg ($1,0 \pm 1,3$ %). Insgesamt zeigte somit eine Vorbehandlung mit OM-89 sowohl hinsichtlich der NO- als auch der TNFα-Produktion eine deutliche desensibilisierende Wirkung.

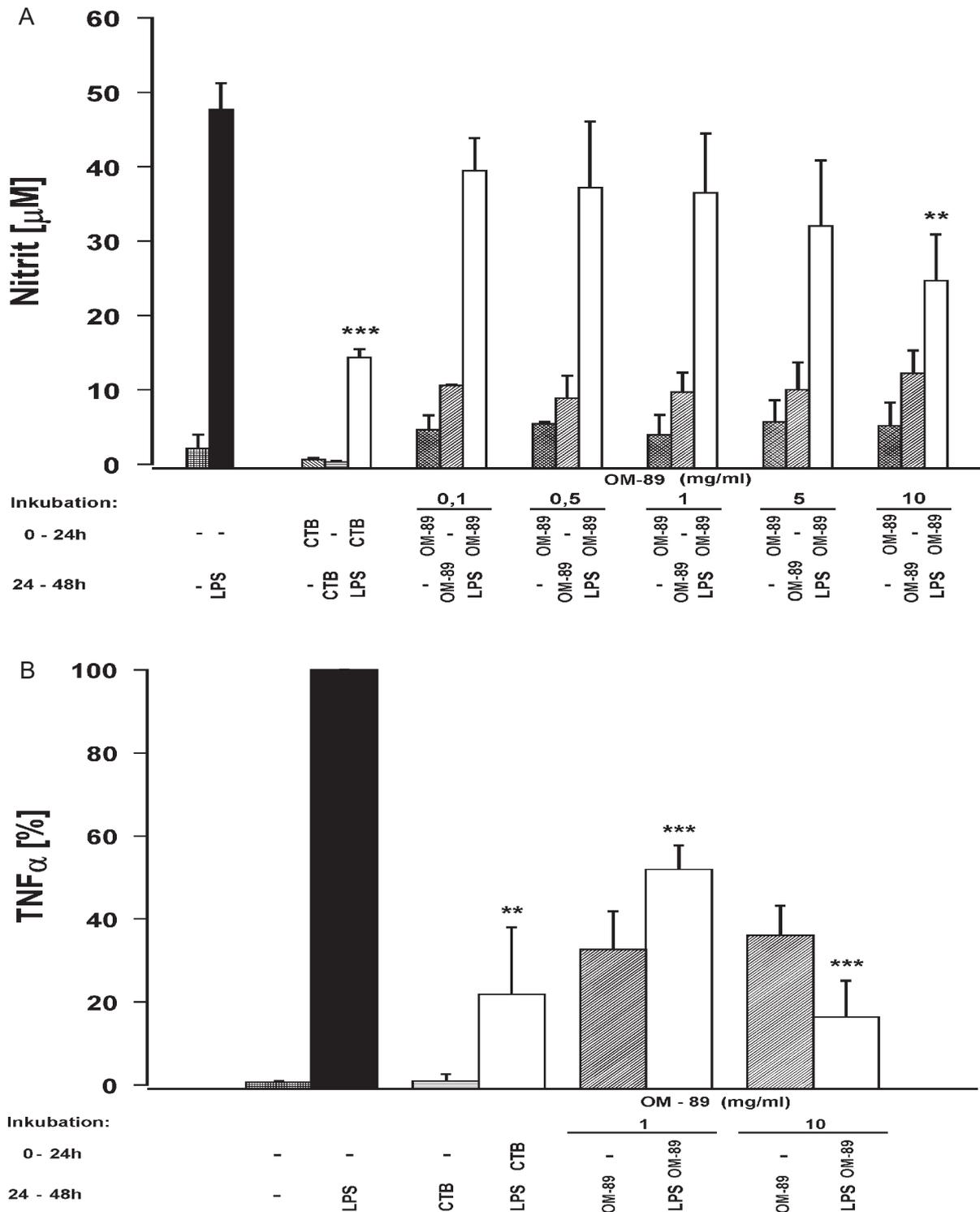


Abb. 18: Effekt einer Vorbehandlung mit dem bakteriellen Extrakt OM-89 auf die LPS-induzierte NO-Bildung durch IC21 Zellen (A) und die TNF α -Bildung durch J774A.1 Zellen (B). Die Zellen wurden in Abwesenheit oder Anwesenheit von CTB (10 μ g/ml) (A, B) bzw. von 0,1; 0,5; 1; 5; 10 mg/ml (A) oder nur mit 1 und 10 mg/ml OM-89 (B) 24 h vorinkubiert. Nach Mediumwechsel wurden die Zellen mit 1 μ g/ml LPS stimuliert (A, B). In Kontrollansätzen wurden nicht vorbehandelte Zellen mit 10 μ g/ml CTB (A, B) bzw. mit 0,1; 0,5; 1; 5; 10 mg/ml (A) oder nur mit 1 und 10 mg/ml OM-89 (B) behandelt. Nach 24 h wurde die Nitritakkumulation in den Kulturüberständen der IC21 Zellen (A) und die TNF α -Konzentration in den Überständen der J774A.1 Zellen bestimmt (B). Die Nitrit-Daten (A) zeigen Mittelwerte +SD aus drei Experimenten, die in Triplikaten durchgeführt wurden. Die TNF α -Daten (B) zeigen Mittelwerte +SD aus drei Versuchen, dargestellt in Prozent der durch 1 μ g/ml LPS induzierten TNF α -Freisetzung (100% entsprechen 139 U/ml TNF α). ** p < 0,02; ***p < 0,005

4 **DISKUSSION**

4.1 **Einleitung**

Der Typ 1 Diabetes ist eine multifaktoriell bedingte Erkrankung, die mit einem Insulinmangel einhergeht. Modellsysteme zur Erforschung der humanen Erkrankung zeigen, dass aktivierte Makrophagen und deren Mediatoren eine wichtige Rolle bei der Zerstörung autologer pankreatischer β -Zellen spielen [Burkart und Kolb, 1996]. Von besonderer Bedeutung sind die Makrophagenprodukte NO [Burkart und Kolb, 2000] und TNF α [Dahlén et al., 1998], die in großen Mengen sezerniert werden und zytotoxisch auf β -Zellen wirken können [Rabinovitch, 1994]. Aufgrund der zentralen Rolle von Makrophagen bei der Entwicklung einer β -zellgerichteten Immunantwort wurde dieser Zelltyp als mögliches Ziel für eine Intervention zur Modulation β -zellgerichteter Immunreaktivität verwendet. Es ist vorstellbar, dass durch die Wechselwirkung zwischen Makrophagen und Lymphozyten eine immunologische Imbalance hervorgerufen werden kann, die die Entwicklung des Typ 1 Diabetes begünstigt. Sowohl die orale Gabe von Insulin und OM-89 (bakterieller Extrakt) als auch die orale Gabe des Lektins CTB führte zur Reduktion der Diabetesinzidenz in NOD-Mäusen [Hartmann et al., 1997; Sobel et al., 1998]. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen deutlich, dass durch die orale Gabe von CTB und OM-89 eine Immunmodulation im Organismus möglich ist, die durch das darmassoziierte Immunsystem vermittelt werden kann.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die modulierende Wirkung verschiedener Lektine und des bakteriellen Extraktes OM-89 auf die Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren durch Makrophagen zu untersuchen.

4.2 **Die desensibilisierende Wirkung von Cholera-Toxin B auf Makrophagen**

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst mit Hilfe von CTB, eines nicht toxischen Lektins, ein experimentelles System zur Untersuchung des modulatorischen Potentials von Lektinen und OM-89 auf Makrophagenfunktionen etabliert. Die Wirkung von CTB wurde anhand der LPS-induzierten Freisetzung von NO und TNF α durch zwei Makrophagenzelllinien untersucht. Dazu wurden sowohl J774A.1 und IC21 Makrophagen über 24 h mit dem Lektin behandelt. Nach anschließender LPS-Stimulation wurde in beiden Zelllinien eine signifikante Reduktion der LPS-stimulierten Freisetzung der proinflammatorischen Mediatoren NO und TNF α (siehe Abb. 4), und somit eine deutliche desensibilisierende Wirkung von CTB festgestellt. CTB alleine führte zu keiner NO- oder TNF α -Induktion. In jeder Versuchsreihe wurde die Vitalität der Zellen mit Trypanblau untersucht. Der Anteil der toten Zellen lag bei allen Ansätzen unabhängig von der jeweiligen Behandlung der Makrophagen unter 5 % der Gesamtzellzahl (Daten nicht gezeigt).

In beiden Versuchsreihen sowohl mit IC21 und J774A.1 Makrophagen führte eine Vorinkubation mit CTB und anschließende LPS-Stimulation zu einer signifikanten Reduktion der NO- und TNF α -Produktion. Somit konnte durch den Einsatz der beiden unterschiedlichen Makrophagenzelllinien belegt werden, dass der beobachtete Desensibilisierungseffekt nicht eine Besonderheit einer bestimmten Makrophagenzelllinie darstellt, sondern offenbar eine generelle Reaktion von Makrophagen ist.

NO und TNF α stellen zwei wichtige β -zellschädigende proinflammatorische Mediatoren dar. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass durch die Wirkung von CTB die LPS-stimulierte Produktion der beiden Mediatoren in den Makrophagen gehemmt werden kann. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die desensibilisierende Wirkung von CTB dosisabhängig und reversibel ist (siehe Abb. 3). Eine signifikante NO-Reduktion wurde bei 10 μ g/ml CTB festgestellt. Die desensibilisierende Wirkung nach LPS-Stimulation hielt 48 h an. Diese Befunde wurden bestätigt durch Beobachtungen früherer Studien. So konnte in der Arbeit von Burkart et al., 2002 gezeigt werden, dass die Behandlung mit CTB bei humanen Mono Mac 6 Zellen (humane Monozytenzelllinie) zur signifikanten Reduktion der TNF α -Freisetzung führt und dass diese ebenfalls dosisabhängig und reversibel ist. Die TNF α mRNA-Expression war in diesen Zellen deutlich reduziert. Bei J774A.1 Makrophagen führte die desensibilisierende CTB-Behandlung zu einer signifikanten NO-Reduktion. Darüber hinaus war die Freisetzung weiterer proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und IL-12 ebenfalls signifikant erniedrigt [Burkart et al., 2002]. Die Bildung von IL-10, einem Zytokin, das die Aktivität von TH1-assoziierten Mediatoren wie TNF α antagonisiert, war erhöht [Burkart et al., 1999; Burkart et al., 2002]. Eine Kontamination des zur Desensibilisierung eingesetzten CTB mit Cholera Toxin A, dem Holotoxin oder LPS konnte dabei ausgeschlossen werden. Somit scheint die Behandlung mit CTB die Makrophagenaktivitäten nicht vollständig herunterzuregulieren, sondern einen differentiellen Zustand zu induzieren, der die Produktion proinflammatorischer Zytokine hemmt, aber die Produktion antagonistischer Zytokine nicht beeinflusst.

Der Effekt der reversiblen Desensibilisierung oder Toleranzinduktion von Makrophagen durch Inkubation mit geringen Mengen von LPS ist seit längerem bekannt [Freudenberg und Galanos, 1988]. Die desensibilisierende Wirkung von LPS auf humane Mono Mac 6 Zellen wurde von Haas et al., 1990 beschrieben. Durch eine initiale Behandlung mit niedrigdosiertem LPS wurde die TNF α -Produktion auf einen erneuten Stimulus mit höher dosiertem LPS weitgehend reduziert. Severn et al., 1993 zeigten anhand von Untersuchungen an J774A.1 Makrophagen, dass eine vergleichbare Behandlung zu einer Reduktion der LPS-induzierten NO-Produktion führt.

Im Gegensatz zu LPS hat die Vorbehandlung der Makrophagen mit CTB keine stimulierende Wirkung, es besteht somit keine erkennbare Reaktion auf den Desensibilisierungsreiz. Nach LPS-Stimulation setzten die mit CTB-vorbehandelten Makrophagen keine inflammatorischen Mediatoren frei. Über die Modulation der Freisetzung von Makrophagenmediatoren kann die Aktivität von T-Lymphozyten, insbesondere das TH1/TH2 Gleichgewicht, beeinflusst werden.

So könnte durch die Suppression der TH1-Immunantwort und eine Begünstigung der TH2-Immunantwort möglicherweise die Entstehung oder der Verlauf des Typ 1 Diabetes beeinflusst werden. Die Möglichkeit einer Immunmodulation in vivo ergibt sich über die orale Gabe von Antigenen. CTB gilt als ein sicheres und potentes Adjuvans [Maeyama et al., 2002], das zur Beeinflussung des Immunsystems im Bereich der Schleimhäute, aber auch zur systemischen Immunmodulation führen kann [Nashar et al., 1997]. So beugt im Tierversuch die orale Substitution von CTB [Sobel et al., 1998] oder eines Cholera-Toxoid-Insulin Konjugats [Bergerot et al., 1997] dem Insulinmangeldiabetes in der NOD-Maus vor. Der Diabetes-protective Effekt ist hierbei offenbar auf eine Toleranzinduktion gegenüber Insulin zurückzuführen. Das CTB-Insulin Konjugat mit CTB als Adjuvans führte dazu, dass der Effekt der Toleranzinduktion im Vergleich zur alleinigen oralen Gabe von Insulin verzehnfacht wurde [Bregenholt et al., 2003]. Dieser Effekt könnte durch einen effizienteren Transport des gekoppelten Antigens über die Darmmukosa erklärt werden, in dessen Verlauf es zu einer verbesserten Antigenpräsentation kommen kann [Bregenholt et al., 2003]. Der beschriebene protective Effekt konnte über aktivierte CD4⁺-Lymphozyten der Milz auf andere Mäuse übertragen werden [Aspod und Thivolet, 2002]. Der gleiche Effekt könnte ebenfalls auch nur durch die alleinige immunmodulatorische Eigenschaft von CTB erklärt werden.

Aufgrund der bisher publizierten Daten und im Hinblick auf die mögliche orale Substitution von toleranzinduzierenden Immunmodulatoren in vivo lag es nahe, weitere Substanzen zu untersuchen, die keine eigene stimulierende oder zellschädigende Wirkung auf Makrophagen aufweisen. In den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimenten zeigte die Behandlung der Makrophagen mit dem Lektin CTB eine deutliche Toleranzinduktion ohne stimulierend oder zellschädigend auf die behandelten Makrophagen zu wirken. Nach der erfolgreichen Etablierung des experimentellen Systems wurden in der Folge weitere Lektine auf ihre Eigenschaft, die proinflammatorische Aktivität der Makrophagen zu modulieren, untersucht.

4.3 Desensibilisierende Wirkung von Lektinen auf Makrophagen

Lektine sind Glykoproteine, die in Pflanzen, im Tierreich und im Menschen vorkommen und aufgrund ihrer spezifischen Zucker-Bindungsfähigkeit an Zellmembranen binden können [Radek, 1996]. In vivo und in vitro Versuche haben gezeigt, dass Lektine wie z.B. das CTB eine immunmodulatorische Wirkung auf Makrophagen und Lymphozyten aufweisen [Woogen et al., 1993; Burkart et al., 2002].

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Untersuchungen konzentrierten sich auf die makrophagen-modulatorischen Wirkungen von Lektinen unter anderem aus der heterogenen Gruppe der Leguminosen und aus Pflanzen, die als Heilmittel Verwendung finden.

Zur besseren Beurteilung der zu erwartenden Effekte wurden die Lektingruppen nach deren

spezifischen Zucker-Bindungsfähigkeiten unterteilt. Um eventuelle konzentrationsabhängige Effekte beurteilen zu können, wurden die Lektine in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen untersucht.

4.3.1 Makrophagen-modulatorische Wirkung Galaktose-spezifischer Lektine

In der Gruppe der Galaktose bindenden Lektine wurden die Lektine von PL, BS, AH und VV untersucht. Eine immunmodulierende Wirkung auf Makrophagen zeigte die Behandlung mit den Lektinen von PL und BS. Die Vorbehandlung der Makrophagen mit PL zeigte einen differentiellen Effekt hinsichtlich der LPS-induzierten NO- und TNF α -Produktion. Die Nitritakkumulation der mit unterschiedlichen Konzentrationen von PL behandelten Makrophagen war im Vergleich zum LPS-Referenzwert signifikant gesteigert. Eine Konzentrationsabhängigkeit konnte nicht festgestellt werden. Die Vorbehandlung der Makrophagen mit PL (10 μ g/ml) führte allerdings zu einer signifikanten Reduktion der TNF α -Produktion. Das PL-Lektin alleine zeigte keine stimulierende Wirkung auf die behandelten Makrophagen.

Frühere Studien mit dem PL-Lektin berichten von mitogenen Eigenschaften dieses Lektins auf humane unveränderte und leukämische Lymphozyten [Ruddon et al., 1974]. In der durchgeführten Versuchsreihe zur Messung der NO-Bildung wurden die Makrophagen mit Mitomycin C vorbehandelt; eine Proliferation war hiermit nicht mehr möglich. Die erhöhte NO-Produktion ist somit nicht mit einer Zunahme der Zellzahl sondern eher mit einem Effekt des Lektins auf die funktionelle Aktivität der Zellen zu erklären. Die TNF α -Sekretion war in der Versuchsreihe nach der Methode von Ziegler-Heitbrock deutlich erniedrigt. Die beobachteten differentiellen Effekte von PL auf die NO- und TNF α -Freisetzung werden im Abschnitt 4.3.6 näher diskutiert. Die Behandlung der Makrophagen mit BS-Lektin zeigte ebenfalls eine signifikante Steigerung der Nitritakkumulation. Im Bereich der höheren Konzentrationen (10 - 50 μ g/ml) zeigte das BS-Lektin eine geringe stimulierende Wirkung auf die behandelten Makrophagen mit einer dosisabhängigen Steigerung der NO-Produktion. Hinsichtlich der TNF α -Sekretion zeigte sich hier auch ein differentes Verhalten dieses Lektins. Die Vorbehandlung der Makrophagen mit BS-Lektin führte zu einer Reduktion der LPS stimulierten TNF α -Produktion. Das BS-Lektin alleine induzierte keine TNF α -Sekretion. Frühere Studien im Tiermodell haben gezeigt, dass eine Behandlung von Makrophagen mit BS-Lektin zu einer Stimulation dieser Zellen und zu einer gesteigerten TNF α -Produktion führt [Tabor et al., 1992]. Weiterhin wurde beschrieben, dass das BS-Lektin an die antigen-prozessierenden M-Zellen des NALT und des GALT binden kann [Takata et al., 2000; Clark et al., 1995a]. Somit liegt die Vermutung nahe, dass das BS-Lektin über seine Fähigkeit an M-Zellen zu binden auch eine modulatorische Wirkung auf Makrophagen ausübt und somit zu einer Beeinflussung des angeborenen Immunsystems führen könnte.

Die Vorbehandlung der Makrophagen mit dem Lektin AH und VV führte zu keiner

signifikanten Reduktion oder Steigerung der NO- und TNF α -Produktion. Das AH-Lektin vermittelt die Bindung von Mikroorganismen (z.B. *Candida albicans*) an Kupfferzellen der Leber und erleichtert somit die Phagozytose der Erreger [Sawyer et al., 1992]. Dagegen zeigten Studien an Peritonealmakrophagen der Maus, dass durch eine Behandlung mit AH-Lektin im Gegensatz zur Behandlung mit CE- oder PV-Lektin die Phagozytoseaktivität von Makrophagen nicht gesteigert wird [Maldonado et al., 1994]. In vitro Studien an Makrophagen zeigten, dass die Behandlung mit AH-Lektin, die durch Streptokokkenbestandteile (OK-432) induzierte H₂O₂-Produktion der Makrophagen nicht hemmen konnte, sondern eher zu einer verstärkten Induktion von H₂O₂ in diesen Makrophagen führte [Tomioka und Saito, 1980]. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass das AH-Lektin alleine eine stimulierende Wirkung auf Makrophagen ausübt. Am deutlichsten wird dies erkennbar bei der Konzentration von 10 μ g/ml, sowohl in der Produktion von NO als auch von TNF α (siehe Abb. 8). In den untersuchten Konzentrationen zeigt sich allerdings weder hinsichtlich der NO- noch der TNF α -Produktion eine desensibilisierende Wirkung des Lektins nach anschließender Stimulation der Makrophagen mit LPS.

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das VV-Lektin eine besondere Bindungsaffinität zu zytotoxischen Maus-T-Lymphozyten oder zu humanen T-Lymphozyten aufweist. Dabei konnte keine modulierende Wirkung des Lektins auf die Lymphozyten beschrieben werden [Fortune und Lehner, 1988]. In Übereinstimmung mit diesen Befunden zeigte das VV-Lektin in der vorliegenden Arbeit weder eine stimulierende Wirkung noch führte es zu einer Toleranzinduktion in den untersuchten LPS-stimulierten Makrophagen.

4.3.2 Makrophagen-modulierende Wirkung Glukose- und Mannose-spezifischer Lektine

Zu den Glukose- und Mannose-bindenden Lektinen gehören Lektine von CE, PS, VF, VS, LS und TV. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die Lektine, die Glukose- und Mannose-Spezifität besitzen, im Vergleich zu den Galaktose-spezifischen Lektinen eine ausgeprägtere modulierende Wirkung auf die behandelten Makrophagen aufweisen. Die mit CE-, PS-, VF- und VS-Lektin vorbehandelten Makrophagen zeigten nach LPS-Stimulation eine signifikante Steigerung der Nitritakkumulation während die TNF α -Produktion signifikant erniedrigt war. Das CE- und das VF-Lektin selbst zeigten jeweils keine Stimulation der Makrophagen, während das PS- und das VS-Lektin im Bereich der höheren Dosierung (10 - 50 μ g/ml) eine geringe Stimulation der NO-Produktion hervorrufen konnten. Das CTB-Lektin wurde auch in dieser Versuchsreihe mit untersucht und hierbei bestätigte sich seine Makrophagen-modulierende Wirkung mit einer Reduktion der LPS-induzierten NO- und TNF α -Sekretion.

Miller beschreibt 1983, dass das CE-Lektin eine deutliche mitogene Wirkung auf B- und

T-Lymphozyten aufweist. Da aber, wie bereits erwähnt, in den Versuchen der vorliegenden Arbeit die Zellteilung mittels Mitomycin C-Behandlung gehemmt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die Steigerung der Nitritakkumulation auf die Lektinwirkung und nicht auf eine vermehrte Zellzahl im Versuchssystem zurückzuführen ist. Weitere Befunde zeigen, dass das CE-Lektin die Phagozytosefähigkeit von Mausmakrophagen gegenüber *Candida albicans* steigert. Vermutlich führt die Behandlung mit CE-Lektin zu einer erhöhten Aktivität des Mannoserezeptors in der Makrophagenmembran und somit zu einem verstärkten Kontakt der *Candida albicans*-Erreger mit der Makrophagenoberfläche [Loyola et al., 2002]. In Versuchen mit Mäusen wurde gezeigt, dass die orale Gabe von CE-Lektin zur Entwicklung von spezifisch gegen das Lektin gerichteten Immunglobulinen führt [Aizpurua und Russell-Jones, 1988]. Insbesondere zeigten in vivo Untersuchungen an NOD-Mäusen, dass die regelmäßige Gabe von 10 µg/kg Körpergewicht CE-Lektin i.p. zu einer Prävention des Insulinmangeldiabetes im Vergleich zu den Kontrollgruppen führt [Pearce et al., 1991]. Anhand der anschließend durchgeführten histologischen Untersuchungen der Pankreasinseln, konnte gezeigt werden, dass bei mit CE-Lektin behandelten Tieren eine weitgehend benigne periinsuläre Lymphozyteninfiltration und keine β -zelldestruierende Form der Insulinitis aufgetreten ist [Pearce et al., 1991]. Diese Tiere waren vor der Entwicklung eines Diabetes weitgehend geschützt.

Wie die CE- und LC-Lektine zeigt auch das PS-Lektin eine mitogene Aktivität gegenüber T-Lymphozyten [Trowbridge, 1974]. Eine Behandlung von Milzlymphozyten mit PS-Lektin führte zur Produktion von TNF α und IFN γ [Lima et al., 1999]. Milzzellen von mit PS-Lektin vorbehandelten Mäusen zeigen nach Inkubation mit PS und CE in vitro nach 24 h eine erniedrigte Produktion von TNF α und IFN γ [Lima et al., 1999]. Zur immunmodulatorischen Wirkung von VF-Lektin liegen zur Zeit noch keine Veröffentlichungen vor. Dagegen beschreiben frühere Untersuchungen mit VS-Lektin eine deutliche mitogene Wirkung dieses Lektins gegenüber Lymphozyten vom Menschen [Falasca et al., 1979] und von der Maus [Gebauer et al., 1979]. Wie bereits in früheren Studien dargestellt, zeigen die oben beschriebenen Lektine einen modulierenden Effekt auf immunkompetente Zellen wie Makrophagen und Lymphozyten [Miller, 1983; Tabor et al., 1992; Loyola et al., 2002]. In der vorliegenden Arbeit zeigten die erwähnten Lektine ebenfalls ein deutliches Potenzial zur Modulation von Makrophagenaktivitäten, das sich zudem in differenten Effekten auf die Produktion von NO und TNF α äußerte. Die Behandlung der Makrophagen mit den Lektinen LC und TV, die ebenfalls aus der Gruppe der Glukose- und Mannose-bindenden Lektine stammen, zeigten keine Reduktion der LPS-induzierten TNF α -Produktion. Beide Lektine führten aber zu einer gesteigerten NO-Produktion, ohne dabei eine eigene stimulierende Wirkung auszuüben. Im Tiermodell belegten frühere Untersuchungen, dass die orale Substitution von LC- und TV-Lektin zur Bildung von spezifisch gegen das Lektin gerichteten Immunglobulinen führt [Aizpurua und Russell-Jones, 1988; Lavelle et al., 2000]. Darüber hinaus führt das LC-Lektin im Tiermodell zur Stimulation der T-Lymphozytenaktivität [Ozato et al., 1977; Nakano et al., 1980] und die Bindung von TV-Lektin an murine Makrophagen steigert deren Phagozytoseaktivität [Stoika et al., 2001].

Nach zusammenfassender Bewertung der bisher beschriebenen Untersuchungen zeigt sich, dass Lektine mit immunkompetenten Zellen und insbesondere auch mit Makrophagen interagieren können. Die detaillierten Analysen in der vorliegenden Studie erweitern diese Befunde um einen wesentlichen Aspekt der Lektinwirkung, indem sie zeigen, dass Lektine von CE, PS, VF und VS eine desensibilisierende Wirkung auf die Freisetzung von β -zellschädigenden Makrophagenmediatoren aufweisen.

4.3.3 Makrophagen-modulatorische Wirkung des Fukose-spezifischen Lektins von *Ulex europaeus*

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuchsreihen zeigten, dass die Behandlung von Makrophagen mit UE-Lektin zu einer dosisabhängigen (zw. 1 - 50 $\mu\text{g/ml}$) NO-Produktion der Makrophagen führt. Im Bereich der Konzentrationen 1 und 10 $\mu\text{g/ml}$ zeigte sich eine signifikante Steigerung der Nitritakkumulation. Die Lektin-vorbehandelten Makrophagen zeigten keine Reduktion der LPS-induzierten NO-Produktion. Das UE-Lektin alleine zeigte nur eine geringe Steigerung der TNF α -Produktion. Frühere Untersuchungen unterstreichen die gute Bindungsfähigkeit des UE-Lektins an M-Zellen der Darmschleimhaut [Foster et al., 1998; Clark et al., 1995a; Clark et al., 1995b] und die Verbesserung der Aufnahme von *Candida albicans* durch Kupffersche Sternzellen [Sawyer et al., 1992]. Im Mausmodell führte die orale Substitution des Lektins zur Bildung von UE-Lektin-spezifischen Immunglobulinen im Serum [Lavelle et al., 2000]. Das UE-Lektin weist eindeutige immunmodulatorische Wirkungen auf und seine Bindungsfähigkeit an M-Zellen wirft die Frage auf, ob dieses Lektin nach oraler Gabe die Entwicklung autoimmunvermittelter Erkrankungen beeinflussen könnte. In der vorliegenden Arbeit durchgeführte Untersuchungen zeigten allerdings keine desensibilisierende Wirkung von UE-Lektin auf Makrophagen hinsichtlich der LPS-induzierten Freisetzung der proinflammatorischen Mediatoren NO und TNF α .

4.3.4 Makrophagen-modulatorische Wirkung eines Oligosaccharid-spezifischen Lektins von *Phaseolus vulgaris*

Die Behandlung von Makrophagen mit PV-Lektin führte zu einer hoch signifikanten Reduktion der LPS-induzierten NO- und TNF α -Produktion. Damit konnte eine deutliche immunmodulatorische Wirkung dieses Lektins belegt werden. Frühere Arbeiten zu PV-Lektin beschreiben eine immunsuppressive Wirkung des Lektins bei Graft-versus-host-Erkrankungen [Wimer, 1998]. Im Mausmodell führte die *in vitro* Inkubation von Milzzellen mit dem PV-Lektin und der anschließende Transfer der Zellen in nierentransplantierte Mäuse zu einer deutlichen Hemmung der Abstoßungsreaktion [Wimer, 1998]. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen

wurden auch in anderen Tiermodellen bestätigt. Man vermutet, dass durch die Lektinbehandlung die Reaktivität der Spenderlymphozyten beeinflusst wird [Wimer, 1998]. Da im Tiermodell eine orale Substitution mit PV-Lektin zur Induktion von PV-spezifischen Immunglobulinen [Lavelle et al., 2000] führt, wird ebenfalls eine Beeinflussung des darmassoziierten Immunsystems durch das Lektin vermutet.

4.3.5 Zusammenfassende Bewertung der Makrophagen-desensibilisierenden Wirkung der untersuchten Lektine

Insgesamt zeigten die untersuchten Lektine von CE, PS, VF, VS aus der Gruppe der Mannose und Glukose spezifischen Lektine, die Lektine von PL und BS aus der Gruppe der Galaktose spezifischen Lektine und das Lektin von PV aus der Gruppe der Oligosaccharid spezifischen Lektine die deutlichsten modulierenden Effekte auf die LPS-induzierten inflammatorischen Makrophagenaktivitäten. Die Interaktionen dieser Lektine mit den untersuchten Makrophagen führten zur einer reproduzierbaren differentiellen Reaktion, mit Steigerung der NO-Produktion bei gleichzeitiger Herabregulation der TNF α -Produktion. Neben dem untersuchten CTB-Lektin, führte das PV-Lektin sowohl zu einer Herabregulation der LPS-induzierten NO- als auch der TNF α -Produktion.

Die Lektine von BS (Galaktosegruppe), PS und VS (Glukose-Mannosegruppe) zeigten eine geringe eigenstimulierende Wirkung auf die NO-Produktion der behandelten Makrophagen. Dabei zeigten die Lektine von UE (Fukosegruppe) und AH (Galaktosegruppe) eine ausgeprägte Wirkung auf die NO- und TNF α -Produktion. Eine desensibilisierende Wirkung war nicht zu beobachten. Das Lektin von VV (Galaktosegruppe) und die Lektine von LC und TV aus der Gruppe der Glukose-Mannose-bindenden Lektine übten ebenfalls keine desensibilisierende Wirkung auf die behandelten Makrophagen aus.

In der Literatur wird auch für die Lektine, die in dieser Arbeit keine modulierende Wirkung auf Makrophagen aufgewiesen haben, eine Beeinflussung von Zellen des Immunsystems beschrieben. Neben dem Nachweis von spezifischen Immunglobulinen nach oraler Behandlung von Mäusen, zeigen das TV-Lektin, das VV-Lektin oder das UE-Lektin eine deutliche Bindung an die M-Zellen der Darmschleimhaut wodurch sich eine Möglichkeit zur Beeinflussung des Immunsystems ergeben könnte.

Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Lektine, wurde versucht, Lektine zu identifizieren, die einen desensibilisierenden Effekt auf die Freisetzung der inflammatorischen Makrophagenmediatoren NO und TNF α ausüben, ohne selbst eine proinflammatorische Stimulation der Makrophagen zu bewirken. Neben CTB entsprachen die Lektine von CE, VF, PL und PV diesen Anforderungen. Das PS- und das VS-Lektin könnten auch in die engere Wahl genommen werden, da diese nur eine minimale NO-Steigerung im Bereich der höheren Lektin-Konzentrationen (10 - 50 μ g/ml) aufwiesen.

4.3.6 Möglicher Mechanismus der lektin-induzierten Makrophagen-Desensibilisierung

Lektine zeichnen sich, wie bereits beschrieben (1.6), durch ihre Fähigkeit aus, spezifische Bindungen zu Zuckermolekülen einzugehen und die Aktivitäten von Makrophagen, Lymphozyten und die Freisetzung deren Mediatoren zu beeinflussen. Der initiale Kontakt von Lektinen zu den Immunzellen erfolgt dabei an der Außenseite der Zellmembran. Diese ist von einem Saum von Kohlenhydratketten der Glykoproteine, Glykosaminoglykane und der Glykolipide bedeckt [Pschyrembel, 2002].

Auf Monozyten, Makrophagen und unreifen dendritischen Zellen sind bislang 19 membrangebundene Lektine (C-Typ-Lektine) nachgewiesen worden, die u.a. Mannose- oder Galaktose/N-Acetyl-D-galactosamin-bindende Rezeptoren darstellen [Higashi et al., 2002]. Zu den ubiquitär auf der Zellmembran vorkommenden Glykolipiden zählen auch die Ganglioside, die Rezeptorfunktion besitzen können. Ganglioside befinden sich in der Membran vieler Zellen des Immunsystems wie T-Lymphozyten, NK-Zellen und Monozyten [Dyatlovitskaya und Bergelson, 1987]. Bei antigenpräsentierenden Zellen sind Ganglioside als Rezeptoren wahrscheinlich in der Erkennung und Aufnahme von Antigenen [Higashi et al., 2002] und in der Zellmigration [Stoolman und Rosen, 1983] involviert. In der Makrophagen-Zellmembran wurde ein spezifisch Galaktose-(N-Acetyl-D-galactosamin) bindender Rezeptor [Kolb-Bachofen et al., 1988] und ein spezifisch Mannose-bindender Rezeptor [Zamze et al., 2002] nachgewiesen. Weiterführende Untersuchungen haben gezeigt, dass Lektinmoleküle über definierte strukturelle Bereiche an Zelloberflächen binden können, und dass die Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen die Bindungswahrscheinlichkeit erhöht [Geng et al., 1992; Varki, 1994]. Für einige Lektine, insbesondere CTB, konnten aufgrund von detaillierten Untersuchungen genauere Vorstellungen zu den Wirkungsmechanismen von Lektinen auf Immunzellen entwickelt werden. Die Bindung von CTB an das Gangliosid G_{M1} ist sehr gut untersucht und dokumentiert [Jobling und Holmes, 2002]. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass nicht nur das CTB-Lektin sondern auch andere Lektine wie die Galaktose-bindenden Lektine von AH und BS [Menezes et al., 2002], das Glukose- und Mannose-bindende Lektin von CE [Alroy et al., 1988; Alroy et al., 1986] und das Fukose-spezifische Lektin von UE [Alroy et al., 1988; Alroy et al., 1986] an das Gangliosid G_{M1} binden. Allerdings wurde auch eine Bindung von Lektinen an andere Ganglioside beschrieben. So zeigt das Glukose- und Mannose-spezifische Lektin von TV eine Bindungsaffinität zu G_{M3} und G_{M4} -Gangliosiden [Sato, 1998], während die Lektine von UE und BS zusätzlich am G_{M2} -Gangliosid binden [Alroy et al., 1988; Alroy et al., 1986].

Mit einer CTB-Mutante, die einen Aminosäuren-Austausch an der Position 57 aufweist, konnte gezeigt werden, dass die alleinige Bindung an den G_{M1} -Rezeptor nicht ausreicht, um die weitere Signalkaskade und die daraus resultierende modulierende Wirkung auf Lymphozyten auszulösen [Aman et al., 2001; Fraser et al., 2002]. Der G_{M1} -Rezeptor befindet sich in einem

cholesterinreichen Zellmembranbereich, der zahlreiche Proteine umfasst, die in der weiteren Signaltransduktion involviert sind [Fujinaga et al., 2003]. Die Bindung von CTB an G_{M1} kann zu räumlichen Veränderungen im Verteilungsmuster der Proteine der Zellmembran und somit zum Kontakt des CTB mit weiteren membranständigen Molekülen führen. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass das CTB-Lektin [Fujinaga et al., 2003] nach der Bindung an den G_{M1} -Rezeptor mittels Endozytose aufgenommen wird [George-Chandy et al., 2001]. Das aufgenommene, in Vesikel eingeschlossene, CTB wird dann weiter in Richtung des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparats transportiert [Simmons et al., 1982; Sandvig et al., 2002; Sandvig et al., 2004].

Leider gibt es zur Zeit wenige Daten über die möglichen Wirkmechanismen anderer Lektine auf Makrophagen. Allerdings sind viele Untersuchungen mit Lymphozyten durchgeführt worden, die Aufschluss über die mögliche Signalkaskade von der Membranoberfläche zur Transkriptionsebene geben könnten. So wurde gezeigt, dass der inhibierende Effekt des CTB-Lektins auf B-Lymphozyten nicht durch die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels zu erklären ist [Francis et al., 1992]. Weiterhin beschrieben Woogen et al., 1993, eine Hemmung der mitogen-induzierten T-Zellproliferation durch das CTB-Lektin, die aber nicht über das „Phosphatidylinositol second messenger system“ vermittelt wird. Das Lektin von PV stimuliert die Adenylat-Cyclase Aktivität in T-Lymphozyten [Kanda und Watanabe, 2001].

Die in der hier vorgestellten Arbeit durchgeführten Versuche haben gezeigt, dass die Behandlung von Makrophagen mit verschiedenen Lektinen (CE, VF, PL, PV, PS und VS) zur Desensibilisierung dieser Makrophagen für einen nachfolgenden Stimulus mit LPS führen.

Die hervorgerufene Toleranzinduktion von Makrophagen durch LPS impliziert zunächst eine Bindung des LPS-Moleküls an Oberflächenrezeptoren und anschließende intrazelluläre Vorgänge. Das LPS-Molekül bindet an eine komplexe Rezeptor-Struktur in der Zellmembran [Zhang et al., 1999; Fujihara et al., 2003]. Dieser Rezeptor-Komplex besteht aus dem CD14-Molekül und dem TLR4-Molekül und weiteren, bisher nur unvollständig charakterisierten membranständigen Komponenten. Das TLR4-Molekül vermittelt, nach LPS Bindung, die intrazelluläre Signaltransduktion. Die Bindung von LPS an den membranständigen CD14-Rezeptor wird durch das LPS-bindende Protein (LBP), ein weiterer Bestandteil des LPS-Rezeptor-Komplexes, gesteigert [Zhang et al., 1999]. Es wird vermutet, dass die Aktivierung von NF κ B durch die Bindung von LPS an den LPS-Rezeptorkomplex und durch Aktivierung weiterer Faktoren wie IL-1 Rezeptor aktivierende Kinase, TNF Rezeptor assoziierter Faktor 6, Proteinkinase NF κ B, I κ B-Kinasekomplex und I κ B induziert wird. Der I κ B-Kinasekomplex führt zur direkten Phosphorylierung der I κ B-Untereinheit. Diese führt zur Aktivierung von NF κ B. Der aktive NF κ B-Komplex besteht aus dem p50-p65 Heterodimer [Ziegler-Heitbrock et al., 1994]. In Mono-Mac 6 Monozyten führt eine LPS-Exposition zunächst zu einer gesteigerten TNF α -Produktion. Hierbei zeigt sich, dass die Expression der LPS-Rezeptor Komponente CD14 und des Transkriptionsfaktors NF κ B ebenfalls erhöht sind [Ziegler-Heitbrock et al., 1994]. Eine zweite Exposition dieser Zellen mit LPS führt zu einer signifikanten

Reduktion der TNF α -Produktion, die auch mit einer reduzierten TNF-Genexpression einhergeht [Ziegler-Heitbrock et al., 1994]. In den derart desensibilisierten Monozyten zeigte sich eine erhöhte Expression des CD14 Rezeptors, allerdings bestand der aktivierte NF κ B-Komplex fast ausschließlich aus p50 Homodimer. Bekannterweise führt das p50 Homodimer zur Herabregulierung der NF κ B-Expression und somit zur Hemmung der TNF α -Transkription [Ziegler-Heitbrock et al., 1994]. Zusammenfassend zeigen diese Befunde, dass der desensibilisierende Effekt des LPS auf einer Beeinflussung des Post-Rezeptor Mechanismen beruht, und auf der Ebene der Regulation der Transkription die Aktivität des NF κ B-Komplexes beeinflusst.

In früheren Studien wurde aber auch gezeigt, dass nicht nur LPS alleine eine desensibilisierende Wirkung auf Makrophagen aufweist. Die Vorbehandlung von humanen Mono-Mac 6 Monozyten mit Gangliosiden (u.a. G_{M1}, G_{M2}, G_{M3}) führt zu einer Reduktion der Aktivität des Transkriptionsfaktors NF κ B und somit zur Reduktion einer nachfolgenden LPS-induzierten TNF α -Produktion auf Transkriptionsebene [Ziegler-Heitbrock et al., 1992].

NF κ B nimmt eine wichtige Schlüsselfunktion in der Regulation der Produktion verschiedener proinflammatorischer Zytokine ein und ist damit ein zentraler Regulator von Immunreaktionen gegen exogene aber auch gegen autologe Antigene [Caldwell et al., 2003]. So zeigten Versuche an der NOD-Maus, dass eine einmalige intravenöse Gabe von dendritischen Zellen, die eine Fehlfunktion des NF κ B aufwies, zu einer deutlichen Reduktion der Diabetesinzidenz führt [Ma et al., 2003]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine durch Ganglioside hervorgerufene Reduktion der NF κ B-Aktivität in Monozyten und dendritischen Zellen nicht nur zu einer deutlichen Reduktion der TNF α -Produktion führt, sondern auch eine deutliche Abnahme der Produktion anderer proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und IL-12 bewirkt [Caldwell et al., 2003]. In dieser Versuchsreihe war hingegen die Produktion von IL-10 erhöht [Caldwell et al., 2003].

Wie für LPS wurden auch für CTB Vorstellungen zum Mechanismus seiner Desensibilisierungsaktivität beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass CTB einen starken Einfluss auf die TNF α -Produktion von Immunzellen hat. Eine Behandlung von humanen Mono-Mac 6 Monozyten mit CTB und anschließende LPS-Stimulation führt zur einer signifikanten Reduktion der TNF α -mRNA-Bildung [Burkart et al., 2002]. Die Vorbehandlung der T-Lymphozyten mit CTB führte zu einer Herunterregulation von IL-2, dessen Expression durch NF κ B reguliert wird [Woogen et al., 1993].

Bei den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimenten scheint eine kompetitive Hemmung der Bindung von CTB und LPS an Oberflächenrezeptoren unwahrscheinlich, da der zeitliche Versuchsablauf so gestaltet wurde, dass CTB ausgewaschen wurde bevor der LPS-Stimulus erfolgte. Somit kann angenommen werden, dass durch die Bindung des Lektins an das Gangliosid G_{M1} die endozytotische Aufnahme in die Zelle erfolgt [George-Chandy et al., 2001] und die hemmende Wirkung der Signaltransduktion auf der transkriptionellen Ebene ausgelöst werden kann. Ein anschließender LPS-Stimulus würde dann bei inhibiertem NF κ B keine Steigerung der Zytokinexpression mehr bewirken können.

Versuche mit CTB-Molekül-Mutanten haben gezeigt, dass die alleinige Bindung des Lektins an das Gangliosid G_{M1} nicht ausreichend ist, um die immunmodulatorische Wirkung zu entfalten [Aman et al., 2001]. Die Bindung des komplexen Moleküls CTB an das G_{M1} -Gangliosid könnte zu sterischen Veränderungen im Bereich der umgebenden Membran führen, welche die Bindung eines Rezeptorkomplexes begünstigen, der eine intrazelluläre Signaltransduktion ermöglicht. Es ist bekannt, dass Ganglioside die Proteinkinase C hemmen [Kreutter et al., 1987], und dass die Proteinkinase C eine aktivierende Wirkung auf NF κ B aufweist [Khoshnan et al., 2000]. Aus diesen Beobachtungen könnte ein anderer möglicher Mechanismus der NF κ B-Inhibition durch das CTB-Lektin abgeleitet werden. Die Bindung von CTB an das G_{M1} -Gangliosid führt zur Inhibition der Proteinkinase C und somit zur Inaktivierung des NF κ B und damit auf transkriptioneller Ebene zur Hemmung der TNF α -Produktion. Eine Herunterregulation von NF κ B-Aktivität könnte somit zu einer Herabregulierung der nachfolgend durch LPS induzierten Freisetzung von inflammatorischen Makrophagenmediatoren, TNF α und NO bewirken. Zahlreiche Befunde belegen eine stark differentielle Wirkung von NF κ B. Untersuchungen an murinen Makrophagen haben ergeben, dass die Behandlung mit LPS zur Aktivierung verschiedener Untereinheiten des NF κ B, wie z.B. p50 oder p65, führen kann [Ohmori et al., 1994]. Jeder dieser Komplexe hat die Möglichkeit auf der Transkriptionsebene verschiedene DNA-Sequenzen zu erkennen und somit unterschiedliche Funktionen zu aktivieren. NF κ B ist involviert in die Induktion der Produktion von sowohl TNF α [Ziegler-Heitbrock et al., 1992] als auch der iNOS [Mustafa und Olson, 1998]. Ebenfalls zeigt sich, dass die proinflammatorischen Mediatoren TNF α und NO selbst synergistische oder gegenregulatorische Aktivitäten aufweisen. Die beteiligten regulatorischen Mechanismen sind jedoch unklar [Zhang und Morrison, 1993]. In aktivierten Knochenmark-Makrophagen zeigt sich eine lineare Korrelation zwischen TNF α - und NO-Produktion und es scheint, dass die TNF α mRNA am Mechanismus der iNOS-Aktivierung mit beteiligt ist [Lin et al., 1994]. Endogenes NO hat bei humanen Monozyten einen starken regulatorischen Effekt auf die LPS induzierte TNF α -Produktion [Zinetti et al., 1995]. Durch die Inhibition der NO-Bildung mit L-NMMA (L-N-Monomethyl-Arginin) wurde die TNF α -Produktion deutlich inhibiert. Die Einwirkung der NO-freisetzenden Substanz Natrium-Nitroprussid auf diese Monozyten führte zur einer signifikanten Erhöhung der Produktion von TNF α [Zinetti et al., 1995].

In BALB/c Mäusen führen anti-TNF α -Antikörper zur Reduktion der NO-Produktion. Die Tiere sind vor einem LPS-induzierten Schock geschützt [Cunha et al., 1994]. Da anti-TNF Antikörper die NO-Produktion hemmen können, kann davon ausgegangen werden, dass endogen gebildetes TNF in der Induktion von NO involviert ist [Zhang und Morrison, 1993]. TNF alleine kann NO nicht induzieren. Die Inhibition der NO-Synthese führte im Sepsis-Tiermodell der Ratte zu einer deutlichen Steigerung der TNF α - und IL-6-Produktion [Tiao et al., 1994].

Weiterführende Versuche mit Lektinen zeigten auch, dass, je nach eingesetzter Dosierung oder Versuchsbedingungen differentielle Wirkungen von Lektinen auf den behandelten Zellen auftreten können [Greene et al., 1981; Esquivel et al., 1982]. So führt das Lektin von

PV in einer niedrigen Konzentration (2 - 10 µg/ml) zu einer Steigerung der IgG-Produktion der behandelten humanen B-Lymphozyten. Dagegen führt eine Behandlung mit höheren Lektin-Dosen über 15 µg/ml zu einer Hemmung der IgG-Produktion [Greene et al., 1981]. Die Vorbehandlung von murinen Knochenmark-Makrophagen mit Lektin von TV und CE führt zu einer gesteigerten Aufnahme von Bakterien (*Staphylokokkus aureus* und *E. coli*). Allerdings wird die bakterizide Wirkung dieser Makrophagen nach Behandlung mit diesen Lektin deutlich gemindert [Gallily et al., 1986].

Anhand vieler Befunde kann vermutet werden, dass die desensibilisierende Wirkungsweise von LPS und Lektinen unterschiedlich ist. So konnte gezeigt werden, dass die Gabe von polyklonalen Anti-Lektin-Antikörpern (Lektin aus der Membran von *Entamoeba histolytica*) auf Makrophagen zur Inhibition der TNF α -Produktion führt, aber nicht die LPS-induzierte TNF α -Produktion hemmt [Séguin et al., 1995]. Ebenfalls wurde gezeigt, dass das C-Typ Lektin Surfactant Protein A, die Produktion von TNF α - und NF κ B von mit LPS-stimulierten CD14-depletierten und TLR4-mutierten alveolären Makrophagen hemmen kann [Alcorn und Wright, 2003]. Hierbei wird vermutet, dass die inhibierende Wirkung der Produktion von inflammatorischen Zytokinen über einen CD14- und LPS-unabhängigen Weg verläuft [Alcorn und Wright, 2003].

Die Bindung von CTB an Ganglioside zeigt einen möglichen Mechanismus, der auch die Wirkungsweise von anderen Lektinen zur Modulation von Zytokinproduktion in verschiedenen Zellen erklären kann. In der vorliegenden Arbeit zeigten die Lektine von CE, VF, PL, PV, PS und VS eine modulierende Wirkung auf die behandelten Makrophagen. Obwohl in der vorliegenden Arbeit die Lektine von AH, BS, CE und UE keine desensibilisierende Wirkung auf den untersuchten Makrophagen hervorgerufen haben, ist durch Ihre Bindungsmöglichkeit an Ganglioside und durch das in der Literatur nachgewiesene immunmodulatorische Potential dieser Lektine, nicht auszuschließen, dass in einem anderen Versuchssystem mit u.a. Untersuchungen anderer Makrophagenmediatoren durchaus eine modulierende Wirkung auf Makrophagen nachweisbar wäre.

Insgesamt kann vermutet werden, dass durch die komplexe Bindungsfähigkeit von Lektinen an den Zellmembranen eine differentielle Beeinflussung von Signaltransduktionswegen auftritt, die zur Expression von TNF α oder NO führen kann. Einer der möglichen Wege wäre die Bindung von Lektinen an Ganglioside. In dem in dieser Arbeit beschriebenen experimentellen System scheint es, dass die in der Induktion der TNF α -Bildung involvierten Signalwege empfindlicher auf die desensibilisierende Wirkung von Lektinen reagieren. Ein Schwerpunkt nachfolgender Arbeiten wäre die Identifikation von Lektinen, die auch vermehrt einen desensibilisierenden Effekt auf die NO-Synthese aufweisen.

4.4 Möglicher Mechanismus der OM-89-induzierten Makrophagen-Desensibilisierung

Im Vergleich zu den zuvor untersuchten Lektinen zeigte sich in den durchgeführten Experimenten, dass die Vorbehandlung von Makrophagen mit OM-89 und die anschließende Stimulation mit LPS zur einer signifikanten Reduktion der beiden inflammatorischen Mediatoren NO und TNF α geführt hat.

OM-89 ist ein aus Membranproteinen verschiedener E. coli Stämme gewonnener Extrakt, der ein starkes immunmodulatorisches Potential aufweist. Dieser bakterielle Extrakt wird zur Prävention und Behandlung von rezidivierenden Harnwegsinfekten [Huber et al., 2000] und der Behandlung von Rheumatoiden Arthritis [Wendling und Farine, 1998] erfolgreich eingesetzt. OM-89 beinhaltet hauptsächlich saure Glykoproteine (10-300 kDa), unterschiedliche Hitzeschockproteine (u.a. HSP60, HSP65 und HSP70) [Polla et al., 1995; Wendling und Farine, 1998] und hat einen geringfügigen LPS-Anteil (weniger als 22 ppm). Frühere Untersuchungen weisen darauf hin, dass der HSP-Anteil den immunologischen Effekt des OM-89 ausmacht [Wendling und Farine, 1998]. OM-89 wurde in tierexperimentellen Modellen autoimmuner Erkrankungen wie der kollagen-induzierten Polyarthritits und des Typ 1 Diabetes zur Modulation der Immunreaktion eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass die orale Gabe von OM-89 zusätzlich zur Gabe von Insulin bei NOD-Mäusen zu einer Potenzierung der Diabetes-protaktiven Wirkung führt [Hartmann et al., 1997]. Weiterhin konnte mit OM-89 die Kollagen-induzierte Arthritis bei Mäusen effektiv behandelt werden [Nagler-Anderson et al., 1986; Willis et al., 1995].

Versuche zur Absorptionskinetik haben gezeigt, dass nach oraler Verabreichung OM-89 über den Darm, größtenteils im Bereich der Peyer-Plaques, aufgenommen wird. In der Folge wurde eine Anreicherung u.a. in lymphoiden Organen (Milz, mesenterialen Lymphknoten) gefunden [Burckhart et al., 1997; van Dijk et al., 1997].

Eine Behandlung mit OM-89 führt auf zellulärer Ebene zur Aktivierung metabolischer und phagozytotischer Funktionen und zu einer Steigerung der Antigenpräsentation durch die Makrophagen [van Pham et al., 1990]. In der Folge kommt es dadurch zur Aktivierung von B- und T-Lymphozyten [Rosenthal, 1986; van Pham et al., 1990; Bessler et al., 1991]. Bei der oralen Behandlung von prädiabetischen BB-Ratten ist OM-89 in der Lage, im Pankreas die mRNA für IFN γ und die iNOS herunter zu regulieren. Gleichzeitig wird die Bildung TH2-assoziiertes Zytokine stimuliert [Kolb et al., 1996]. Die Herunterregulierung von IFN γ - und iNOS-mRNA konnte auch im Darm von wiederholt mit OM-89 behandelten NOD-Mäusen nachgewiesen werden [Hartmann et al., 1997].

Wie bereits erwähnt, wird die immunmodulatorische Wirkung von OM-89 wahrscheinlich über dessen HSP-Anteil vermittelt. HSP, auch Chaperone genannt, erfüllen intrazellulär eine Vielfalt von wichtigen Funktionen u.a. in der Proteinsynthese und dem Proteintransport und verhindern somit die Entstehung von defekten Proteinen durch fehlerhafte Aggregation und Faltung [Habich et al., 2002].

HSP60 stellt ein dominantes Hitzeschockprotein dar, das in den Mitochondrien, aber auch in anderen zellulären Kompartimenten nachweisbar ist [Habich et al., 2002]. In Stresssituationen erfolgt eine erhöhte Expression von HSP60 wie auch von anderen Hitzeschockproteinen. Eine erhöhte lokale Expression von HSP60 in Zielgeweben von (Auto)Immunreaktionen wurde in verschiedenen inflammatorischen Erkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis, des Insulinmangel-Diabetes [Wendling und Farine, 1998; Horvath et al., 2002] und der Arteriosklerose festgestellt [Martin et al., 2003; Ohashi et al., 2004]. Es wurde gezeigt, dass HSP60 ein wichtiges „Dangersignal“ während der chronischen Inflammation darstellt [Chen et al., 1999]. Die Behandlung von Makrophagen mit HSP60 führt zur Ausschüttung inflammatorischer Zytokine wie IL-6, TNF α und NO [Retzlaff et al., 1994; Chen et al., 1999]. Interessanterweise wurde auch gezeigt, dass die Vorbehandlung von Monozyten mit humanem HSP60 und anschließender Stimulation mit LPS oder HSP60 zur Suppression der TNF α -Produktion geführt hat [Kilmartin und Reen, 2004].

Bei der Behandlung der experimentell induzierten Rheumatoiden Arthritis in der Ratte zeigte sich ein Unterschied im Erkrankungsverlauf, abhängig von der Lokalisation der OM-89-Applikation. Die orale Behandlung der Tiere mit OM-89 führte zu einer deutlichen Abnahme der Gelenksentzündung im Vergleich zu der Gruppe, die das Präparat i.p. erhalten hat [Willis et al., 1995]. Interessanterweise führt nur die orale Substitution des OM-89 oder von HSP zu einer Besserung des Krankheitsverlaufs. Hieraus kann abgeleitet werden, dass durch die orale Exposition mit OM-89 und dem damit folgenden Kontakt mit der Darmmukosa und dem Peyer-Plaques eine periphere Toleranz induziert wird, die durch die in Peyer-Plaques vorkommenden antigen-präsentierenden Zellen und HSP-spezifischen T-Zellen reguliert wird [Wendling et al., 1997]. Somit könnte es zu einer Toleranz gegenüber dem Target-Antigen (HSP60) und zu einer deutlichen Besserung der inflammatorischen Situation kommen. Daraus kann die Vermutung geäußert werden, dass der Wirkungsmechanismus von OM-89 dem der Hitzeschockproteine gleicht [Wendling und Farine, 1998].

Aufgrund dieser immunmodulatorischen Eigenschaften wird OM-89 zur Behandlung oder Prävention verschiedener Erkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis [Rosenthal et al., 1991] aber auch chronischer Harnwegsinfekte und Infektionen des oberen Respirationstraktes [Bottex et al., 1988; Hockertz, 1990] erfolgreich eingesetzt. Weitere Untersuchungen könnten zeigen, ob die Anwendung dieses Präparates auch bei der Prävention oder Behandlung von Typ 1 Diabetes im Kindesalter eingesetzt werden kann.

4.5 Ausblick

Die Ätiologie des Typ 1 Diabetes ist multifaktoriell. Zahlreiche neuere Untersuchungen sprechen dafür, dass das darmassoziierte Immunsystem eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes einnimmt [Wasmuth und Kolb, 2000; Vaarala, 2002]. Das darmassoziierte Immunsystem vermittelt den primären Kontakt des Körpers zu oral aufgenommenen Substanzen und besitzt deshalb eine wichtige Funktion bei der Induktion von Toleranz gegenüber körperfremden Antigenen. Da das GALT zwei Drittel des gesamten lymphatischen Gewebes ausmacht, wird vermutet, dass funktionelle Änderungen in diesem System eine systemische Wirkung haben können [Kolb und Pozzilli, 1999]. Somit könnte eine mögliche Ursache der Typ 1 Diabetes-Entwicklung in einer funktionellen Störung des GALT und insbesondere in einer Störung der Entwicklung der oralen Toleranz begründet sein [Wasmuth und Kolb, 2000].

Die Induktion oraler Toleranz ist ein relevanter biologischer Mechanismus um periphere Immuntoleranz zu bewirken. Es kann eine Toleranz gegenüber Autoantigenen und Fremdanitigenen bestehen. Diese Antigene können toleranzinduzierende „Fremd“-Epitope oder autoreaktive Epitope umfassen [Friedman et al., 1994; Weiner, 2000]. Bei einer intakten immunologischen Homeostase und einer normalen Entwicklung des Darms führt die orale Toleranz zu einer reduzierten systemischen Immunantwort auf ein spezifisches Antigen [Wasmuth und Kolb, 2000]. Andererseits kann das gleiche Antigen bei einer gestörten Funktion des GALT eine pathologische systemische Immunreaktion induzieren [Wasmuth und Kolb, 2000]. Die wiederholte orale Gabe von niedrig-dosierten Immunstimulantien führt zu einer aktiven Suppression der TH1-spezifischen Zytokine (IFN γ und TNF β) und somit zu einer Herabregulation der inflammatorischen Reaktion im Darm. Dieser Mechanismus, auch als aktive Toleranzinduktion bezeichnet, ist effektiv, wenn die Desensibilisierungsmechanismen der Makrophagen und anderer antigenpräsentierender Zellen intakt sind [Friedman et al., 1994]. Die oral induzierte immunologische Toleranz stellt eine attraktive Strategie zur Prävention oder Behandlung von Autoimmunerkrankungen dar. Durch die orale Gabe von Autoantigenen konnte das klinische Auftreten von mehreren experimentell induzierten Autoimmunerkrankungen verzögert oder verhindert werden [Bergerot, 1997].

Die regulatorischen Mechanismen, die nach Kontakt der Darmschleimhaut mit Antigenen zur oralen Toleranzinduktion beitragen, sind noch nicht gut charakterisiert und werden zur Zeit kontrovers diskutiert. Das Gleichgewicht zwischen Immuntoleranz und Immunsensibilisierung ist von vielen Faktoren wie der genetischen Prädisposition, der Art und der Dosis des Antigens, sowie des immunologischen Status abhängig.

Das Ziel beim Einsatz der oralen Toleranz als präventive oder therapeutische Strategie besteht zunächst darin, eine systemische Toleranz gegen ein oral verabreichtes Antigen zu induzieren [Krause et al., 2000]. Dabei soll die wiederholte orale Gabe von niedrig dosiertem Antigen zu einer systemischen Toleranzinduktion gegenüber einer bestimmten Struktur oder

Zelle (z.B. β -Zelle) führen, auch wenn die zur Toleranzinduktion verabreichten Substanzen nicht unbedingt den eigentlichen Zielstrukturen entsprechen [Weiner, 1997].

Durch antigenpräsentierende Zellen (Makrophagen, dendritische Zellen) werden die von M-Zellen aus dem Darmlumen aufgenommenen Antigene präsentiert. Immunfluoreszenz Untersuchungen am Darm von Mäusen und Ratten haben gezeigt, dass das oral aufgenommene Lektin CTB in den Makrophagen der Darmschleimhaut nachweisbar ist [Anderson und Edwards, 1993].

Da Makrophagen und dendritische Zellen vermehrt in der Nähe von aktivierten regulatorischen T-Lymphozyten (TH2) nachgewiesen wurden, könnte somit spekuliert werden, dass Makrophagen eine aktive zelluläre Suppression induzieren, indem sie regulatorische TH2-Lymphozyten mit ihrem spezifischen Zytokinsekretionsmuster von IL-4, IL-10 und TGF β aktivieren [Iwasaki und Kelsall, 1999; Mowat et al., 2003]. Die TH2 Reaktion führt zu einer Herabregulierung pro-inflammatorischer Zytokine (u.a. IFN γ). Somit wird eine Immunantwort gegen das oral aufgenommene Antigen verhindert [Iwasaki und Kelsall, 1999] und in der Folge eine systemische Toleranz induziert.

Anhand der in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen und der in der Literatur aufgeführten Daten, konnte gezeigt werden, dass sowohl das CTB-Lektin als auch der bakterielle Extrakt OM-89 sowohl auf zellulärer Ebene, als auch im Tiermodell ein deutliches immunmodulatorisches Potential aufweisen [Burkart et al., 2002; Hartmann et al., 1997].

Unterschiedliche Ansätze zur Induktion oraler Toleranz führten in verschiedenen tierexperimentellen Modellen zu einer beeindruckenden Suppression von Autoimmunerkrankungen wie Typ 1 Diabetes, experimentell induzierter Enzephalomyelitis oder Arthritis [Krause et al., 2000]. Die orale Behandlung von NOD-Mäusen mit CTB oder OM-89 führte zu einer Reduktion der Diabetesinzidenz [Bregenholt et al., 2003; Hartmann et al., 1997]. Bei der Behandlung der experimentell induzierten Rheumatoiden Arthritis in der Ratte zeigte sich, dass die orale Behandlung der Tiere mit OM-89 zu einer deutlichen Abnahme der Gelenkentzündung im Vergleich zu der Gruppe, die das Präparat i.p. erhalten hat, führt [Willis et al., 1995]. Eine orale Behandlung mit Konjugaten von CTB und Insulin [Sun et al., 1994, Ploix et al., 1999] oder von CTB und Insulin in nicht konjugierter Form führte im Modell der NOD-Maus ebenfalls zu einer Diabetes-Prävention. Eine ähnliche Wirkung wurde in Mäusen erzielt, die einen virus-induzierten Diabetes entwickelten [Bregenholt et al., 2003]. Diese Befunde belegen, dass durch CTB als mukosalem Adjuvans eine spezifische Toleranz gegenüber einem oral verabreichten Antigen erzielt werden kann [Bregenholt et al., 2003], auch ohne eine direkte Bindung von CTB an das Antigen. Auch im Bereich anderer Autoimmunerkrankungen, wie z.B. der experimentell induzierten Colitis führt die orale Gabe von CTB im Mausmodell zu einer Inhibition der Colitisentwicklung [Boirivant et al., 2001] und die CTB-Verbindung mit Myelin basischem Protein wirkte schützend gegenüber der experimentell induzierten Autoimmunenzephalomyelitis in Lewis Ratten [Sun et al., 2000].

Aufgrund der viel versprechenden Ergebnisse im Tiermodell, wurden u.a. klinische

Untersuchungen bei Menschen mit Rheumatoider Arthritis und Diabetes durchgeführt, die zu unterschiedlichen Ergebnissen führten. Die Behandlung der Rheumatoiden Arthritis mit OM-89 führte zu einer deutlichen Besserung der Symptomatik [Wendling und Farine, 1998; Huber et al., 2000]. Dagegen zeigte die orale Substitution von 5 mg Insulin in der DPT-1 Studie keine Auswirkung auf den Erkrankungsverlauf bei Personen mit erhöhtem Risiko zur Entwicklung eines Typ 1 Diabetes [Pozzilli et al., 2000]. Die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse dieser Studien könnten auf Unterschiede in den eingesetzten Präparaten, in der Dosierung oder Verabreichungsform begründet sein.

Trotz der zum Teil kontroversen Versuchsergebnisse nimmt das Prinzip der oralen Toleranz weiterhin eine besondere Rolle bei der Entwicklung von Strategien zur Prävention und Behandlung von Autoimmunerkrankungen ein. Es zeigt sich auch, dass CTB und OM-89 sichere und potente Adjuvantien darstellen, die einen starken Einfluss auf das systemische Immunsystem ausüben [Nashar et al., 1997; Maeyama et al., 2002; Huber et al., 2000].

Aus der klinischen Sicht ist die orale Therapie mit immunmodulatorischen Substanzen besonders attraktiv, da die Verabreichungsform unproblematisch ist und zudem ein großer Teil des Immunsystems erreicht wird [Weiner, 2000].

Viele Studien haben eindrücklich gezeigt, dass eine systemische Immunmodulation durch Beeinflussung des Darm-Immunsystems möglich ist. Durch u.a. besondere Antigenauswahl, präzisere Dosierungen und die Ermittlung von günstigen Zeitfenstern zur Verabreichung eines bestimmten Antigens erhofft man sich in Zukunft bessere Ergebnisse erzielen zu können [Krause et al., 2000]. Von besonderer Bedeutung bei diesen Ansätzen ist die Suche nach neuen Substanzen, die ein immunmodulatorisches Potential aufweisen und dabei ein Minimum an unerwünschten Nebenwirkungen besitzen.

Basierend auf schon bekannten Daten und auf den in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnissen zeigt sich, dass die Stoffgruppe der Lektine ein beachtliches immunmodulatorisches Potential aufweist. Durch ihre Fähigkeit spezifische Bindungen zu Zuckermolekülen einzugehen können Lektine an M-Zellen der Darmschleimhaut binden, die Aktivität von Makrophagen und Lymphozyten und somit die Freisetzung von immunregulatorischen Mediatoren beeinflussen. Durch die Modulation der Darm-Immunreaktivität kann ein besonderer Einfluss auf die Entwicklung des Typ 1 Diabetes erwartet werden. In BB-Ratten führte die Gabe einer auf Weizenkeimen oder auf Cerealien basierten Diät in den ersten Lebenswochen zu einer Verzögerung oder sogar Verhinderung der Diabetesentstehung in einem Drittel der behandelten Tiere [Scott et al., 2002]. Weiterhin können Lektine aufgrund ihrer speziellen Bindungsfähigkeit an Glykosid-Rezeptoren (z.B. G_{M1}) in Mund, Nase und Darm an Schleimhäute binden und diese natürliche Barriere überwinden [Bies et al., 2004]. Diese Eigenschaft qualifiziert Lektine für interessante Studienansätze.

Lektine können aufgrund ihrer Eigenschaften sowohl als spezifische Carrier als auch als immunmodulatorische Antigene fungieren. Im Tierversuch zeigt sich, dass es nach dreimaliger oraler Gabe von Lektinen (PV, TV, UE) zu einem Anstieg von lektinspezifischen IgA- und

IgG-Spiegeln im Serum kommt [Lavelle et al., 2000]. Die Lektine von UE und TV binden an die Peyer-Plaques der Darmmukosa [Chen et al., 1996]. Hiermit zeigt sich, dass Lektine das Potential für starke orale Immunadjuvanten haben.

Die Behandlung von Meerschweinchen mit dem Lektin von CE führte zur Hemmung der allergischen Enzephalomyelitis [Kuroda et al., 1980] und die Behandlung mit Lektin von PV führte zur Hemmung der in diesen Tieren induzierten autoimmun bedingten Thyreoiditis [Esquivel et al., 1982].

In der vorliegenden Arbeit zeigte die Behandlung von Makrophagen mit PL-, BS-, CE-, PS-, VF-, VS- und PV-Lektin eine deutliche Reduktion der TNF α -Produktion und auch eine Reduktion der NO-Produktion (PV- und CTB-Lektin), und hiermit die Tendenz zur Begünstigung einer TH2-gerichteten Immunreaktion. Aufgrund der differentiellen Hemmung der TNF α - und NO-Produktion muss vermutet werden, dass die orale Gabe der untersuchten Lektine eine immunologische Toleranz im Sinne einer TH2-gerichteten immunologischen Reaktion der betroffenen Zellen bewirken kann, allerdings führt dieser komplexe Vorgang offenbar nicht zu einer generellen Hemmung der Makrophagenaktivität sondern zu einer selektiven Herabregulation der Bildung proinflammatorischer Mediatoren. Zur Optimierung eines geplanten Therapieansatzes könnte deshalb bei der Behandlung mit Lektinen z.B. eine Kombination mit NO-Inhibitoren (z.B. Argininanaloge) sinnvoll erscheinen.

Der Einsatz von Lektinen kann, je nach verwendeter Konzentration, auch zu unterschiedlichen Reaktionen führen. So bewirkt die Inkubation von B-Lymphozyten mit niedrigdosiertem TV-Lektin eine Stimulation, während eine höhere Dosierung von TV-Lektin zu einer Hemmung der Immunglobulin-Produktion führt [Greene et al., 1981]. Um eine gezielte Behandlung von Autoimmunerkrankungen zu ermöglichen, wären weiterführende Untersuchungen auf dem Gebiet der Lektinwirkung auf Makrophagen hinsichtlich der Bildung anderer TH2-spezifischer Mediatoren und der Dosierung der eingesetzten Lektine wünschenswert und sinnvoll. Von besonderer Bedeutung ist es weiterhin, auf die Sicherheit der oralen Therapie mit im allgemeinen Immunmodulatoren und im speziellen mit Lektinen zu achten, und dabei auch insbesondere die mögliche Beeinflussung metabolischer Parameter z.B. des Glukosestoffwechsels durch Lektine mit z.B. insulinähnlichen Eigenschaften zu berücksichtigen [Shechter, 1983].

Es zeigt sich, dass in der oralen Immuntherapie von Autoimmunerkrankungen und hier im speziellen des Typ 1 Diabetes der Einfluss zahlreicher weiterer Faktoren zu berücksichtigen ist. Wie bereits in einigen Ansätzen gezeigt, hängt die immunregulatorische Reaktion des Darms nach oraler Exposition mit verschiedenen Antigenen vom Reifegrad des Darms, von präexisierenden immunologischen Erkrankungen und von der Art und Dosierung des betreffenden Antigens ab [Hänninen, 2000].

So sind die innovativen und reproduzierbaren Ansätze zur Erzeugung und Verabreichung von Substanzen zur oralen Toleranzinduktion wie bereits von Arakawa et al., 1998a und Jani et al., 2004 gezeigt, sehr interessant, bedürfen aber sicherlich noch weiterer Untersuchungen. Es besteht z.B. die Möglichkeit, in genetisch veränderten Pflanzen CTB oder ein CTB-Insulin

Fusionsprotein zu exprimieren. Das von Pflanzen exprimierte CTB zeigt ähnliche Eigenschaften und immunologische Wirkungsweisen wie das native Lektin [Jani et al., 2004]. Als möglicher Grund für die effektive orale Immunisierung wird die Bioverkapselung des Antigens in den pflanzlichen Zellen vermutet [Kong et al., 2001]. In der NOD-Maus führte die Ernährung mit genetisch veränderten Kartoffeln, die das CTB-Insulin Fusionsprotein beinhalten, zu einer deutlichen Reduktion der Insulitis und zu einer Verlangsamung der Krankheitsentwicklung [Arakawa et al., 1998b]. Mit diesem Verfahren könnte sich eine praktikable Modalität der einfachen und preiswerten Gabe von Immunmodulatoren ergeben. Auf ähnliche Weise könnten spezifische Lektine alleine oder in Kombination mit anderen Lektinen oder Antigenen verabreicht werden [Arakawa, et al., 1998a].

Bereits publizierte Daten und die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, dass Lektine immunmodulatorische Eigenschaften besitzen, die auch im Tiermodell hinsichtlich der oralen Toleranzinduktion eindrucksvoll bestätigt werden können.

Die weiterführende Charakterisierung der makrophagen-modulatorischen Eigenschaften von Lektinen und ein besseres Verständnis der beteiligten Faktoren in der Darmimmunität kann uns einen Schritt näher an die erfolgreiche Prävention und Therapie des Typ 1 Diabetes führen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Der Typ 1 Diabetes ist die häufigste endokrine Erkrankung des Kindes- und Jugendalters mit zunehmender jährlicher Inzidenzrate. Die Ätiologie des Typ 1 Diabetes ist vielfältig und noch nicht eindeutig geklärt. Neben der genetischen Komponente nehmen Umweltfaktoren und Nahrungsmittelbestandteile als Risikofaktoren zur Krankheitsentwicklung eine besondere Rolle ein. Experimentelle Systeme zur Erforschung der Pathogenese des Typ 1 Diabetes zeigen, dass Makrophagen und ihre Mediatoren, wie Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) und Stickstoffmonoxid (NO), wesentlich zur Initiierung der β -zellgerichteten Immunreaktion und somit zur Entstehung der Erkrankung beitragen.

Die Induktion eines Toleranzzustandes in Makrophagen über die Modulation des darmassoziierten Immunsystems und der damit möglichen Regulation der T-Zell-Reaktivität, stellt eine vielversprechende Strategie zur Prävention oder Behandlung der Immunreaktion gegen autologe β -Zellen dar. Analog zu publizierten Daten wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Vorbehandlung von Makrophagen mit dem bakteriellen Extrakt OM-89 oder mit der B-Kette des Cholera Toxins (CTB) und eine anschließende Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) zu einer deutlichen Reduktion der Produktion der β -zellschädigenden Mediatoren TNF α und NO führt. Aufgrund der experimentellen Daten besteht ein ständig wachsendes Interesse hinsichtlich der klinischen Anwendung von OM-89 und CTB sowie der Identifikation weiterer Substanzen mit immunmodulatorischem Potential.

In der vorliegenden Arbeit wurde die modulatorische Wirkung von pflanzlichen Lektinen auf Zellen der Mausmakrophagenlinien IC21 und J774A.1 analysiert. Dazu wurden die Effekte von Vorinkubationen mit Lektinen in unterschiedlichen Konzentrationen auf die LPS-induzierte Produktion von TNF α und NO gemessen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Stoffgruppe der Lektine ein beachtliches Makrophagen-modulatorisches Potential aufweist. Die Lektine von *Phaseolus limensis* (PL), *Bandeiraea simplicifolia* (BS), *Canavalia ensiformis* (CE), *Pisum sativum* (PS), *Vicia faba* (VF), *Vicia sativa* (VS) und *Phaseolus vulgaris* (PV) führen zu einer deutlichen Reduktion der LPS-induzierten TNF α -Produktion und das Lektin von PV zeigt zusätzlich eine Reduktion der NO-Produktion. Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass Lektine durch ihren modulatorischen Effekt auf Makrophagen die Entwicklung einer TH2-dominierten Immunreaktion begünstigen, die im Verlauf der Pathogenese des autoimmunen Diabetes mit einer benignen Form der β -zellgerichteten Immunreaktion assoziiert ist.

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse tragen zu einer besseren Charakterisierung der immunmodulatorischen Eigenschaften von Lektinen bei und unterstützen die Entwicklung von Strategien zur Prävention oder Therapie des Typ 1 Diabetes durch Modulation des darmassoziierten Immunsystems.

- Aggarwal** BB, Natarajan K (1996), Tumor necrosis factor: Developments during the last decade. *Eur Cytokine Netw* 7: 93-124
- Åkerblom** HK, Virtanen SM, Hämäläinen A (1999), Emergence of Diabetes associated autoantibodies in the nutritional prevention of IDDM (TRIGR) project. *Diabetes* 48 (suppl): A45
- Åkerblom** HK, Knip M (1998), Putative environmental factors in Type 1 Diabetes. *Diabetes Metab Rev* 14: 31-67
- Åkerblom** HK, Savilahti E, Vaarala O (1996), Cow's milk protein and insulin-dependent Diabetes mellitus. *Scand J Nutrition* 40: 98-103
- Alcorn** JF, Wright JR (2004), Surfactant protein A inhibits alveolar macrophage cytokine production by CD14-independent pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: 129-136
- Allen** HJ, Johnson EA (1977), A simple procedure for the isolation of L-fucose-binding lectins from *Ulex europaeus* and *Lotus tetragonolobus*. *Carbohydr Res* 58: 253-265
- Allen** LW, Svenson RH, Yachnin S (1969), Purification of mitogenic proteins derived from *Phaseolus vulgaris*: Isolation of potent and weak phytohemagglutinins possessing mitogenic activity. *Proc Natl Acad Sci* 63: 334-341
- Alpan** O, Rudomen G, Matzinger P (2001), The role of dendritic cells, B cells, and M cells in gut-oriented immune responses. *Immunology* 166: 4843-4852
- Alroy** J, Ucci AA, Goyal V, Woods W (1986), Lectin histochemistry of glycolipid storage diseases on frozen and paraffin-embedded tissue sections. *J Histochem Cytochem* 34: 501-505
- Alroy** J, Goyal V, Warren CD (1988), Lectin histochemistry of gangliosidosis. I. Neural tissue in four mammalian species. *Acta Neuropathol* 76: 109-114
- Aman** AT, Fraser S, Merritt EA, Rodighiero C, Kenny M, Ahn M, Hol WGJ, Williams NA, Lencer WI, Hirst TR (2001), A mutant Cholera-Toxin B subunit that binds G_{M1}-ganglioside but lacks immunomodulatory or toxic activity. *Proc Natl Acad Sci* 98: 8536-8541
- Anderson** CR, Edwards SL (1993), Subunit b of cholera toxin labels interstitial cells of Cajal in the gut of rat and mouse. *Histochemistry* 100: 457-464
- Appels** B, Burkart V, Kantwerk-Funke G, Funda J, Kolb-Bachofen V, Kolb H (1989), Spontaneous cytotoxicity of macrophages against pancreatic islet cells. *J Immunol* 142: 3803-3808
- Arakawa** T, Chong DK, Langridge WH (1998a), Efficacy of a food plant-based oral Cholera toxin B subunit vaccine. *Nat Biotechnol* 16: 292-297
- Arakawa** T, Yu J, Chong DK, Hough J, Engen PC, Langridge WH (1998b), A plant-based Cholera toxin B subunit-insulin fusion protein protects against the development of autoimmune Diabetes. *Nat Biotechnol* 16: 934-938

- Ashwell G, Morell AG (1974)**, The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 41: 99-128
- Aspord C, Thivolet C (2002)**, Nasal administration of CTB-insulin induces active tolerance against autoimmune Diabetes in Nonobese Diabetic (NOD) mice. *Clin Exp Immunol* 130: 204-211
- Aubery M, Bourrillon R (1974)**, Interactions of Robinia pseudo-acacia lectin and Concanavalin A with the membrane surface of normal and neoplastic hepatocytes of the rat. *Immunochemistry* 11: 565-572
- Badenhoop K (1996)**, Zur Genetik des Typ 1- und des Typ 2 Diabetes mellitus. *Diabetes Dialog* D-4014 F, Februar 1-4
- Barnett AH, Eff C, Leslie RDG, Pyke DA (1981)**, Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia* 20: 87-93
- Barondes SH (1981)**, Lectins: Their multiple endogenous cellular functions. *Annu Rev Biochem* 50: 207-231
- Barre A, Bourne Y, van Damme EJ, Peumans WJ, Rouge P (2001)**, Mannose-binding plant lectins: Different structural scaffolds for a common sugar-recognition process. *Biochimie* 83: 645-651
- Bazzoni F, Beutler B (1995)**, How do tumor necrosis factor receptors work? *J Inflamm* 45: 221-238
- Beeson PB (1947)**, Tolerance to bacterial pyrogens. I. Factors influencing its development. *J Exp Med* 86: 29-44
- Bellmann K, Kolb H, Rastegar S, Jee P, Scott FW (1998)**, Potential risk of oral insulin with adjuvant for the prevention of Type 1 Diabetes: A protocol effective in NOD mice may exacerbate disease in BB rats. *Diabetologia* 41: 844-847
- Bergerot I, Ploix C, Petersen J, Moulin V, Rask C, Fabien N, Lindblad M, Mayer A, Czerkinsky C, Holmgren J, Thivolet C (1997)**, A cholera toxoid-insulin conjugate as an oral vaccine against spontaneous autoimmune Diabetes. *Proc Natl Acad Sci* 94: 4610-4614
- Bessler WG, Beck P, Konetznick U, Loleit M, Sedelmeier E, Hoffmann P, Strecker M, Stocklin S (1991)**, Biological activity of bacterial surface components. Immunogenicity and immunomodulatory properties of a bacterial extract from *Escherichia coli*. *Arzneimittelforschung* 41: 274-279
- Bies C, Lehr CM, Woodley JF (2004)**, Lectin-mediated drug targeting: History and applications. *Adv Drug Deliv Rev* 56: 425-435
- Bilbis LS, Shehu RA, Abubakar MG (2002)**, Hypoglycemic and hypolipidemic effects of aqueous extract of *Arachis hypogaea* in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Phytomedicine* 9: 553-555
- Boirivant M, Fuss IJ, Ferroni L, De Pascale M, Strober W (2001)**, Oral administration of recombinant cholera-toxin subunit B inhibits IL-12-mediated murine experimental (trinitrobenzene sulfonic acid) colitis. *J Immunol* 166: 3522-3532

- Bottex C**, Cristau B, Corazza JL, Mouglin B, Fontanges R (1988), Effects of two bacterial extracts, OM-89 and Broncho-Vaxom, on IL-1 release and metabolic activity of a murine macrophage. *Int J Immunotherapy* 11: 203-212
- Boyd WC**, Shapleigh E (1954), Separation of individuals of any blood group into secretors and non-secretors by use of a plant agglutinin (lectin). *Blood* 9: 1194-1198
- Brackertz D**, Vischer TL (1989), OM-8980 in the rheumatoid arthritis: A 6-month double blind placebo controlled multicenter study. *J Rheumatol.* 16: 19-23
- Brandley BK**, Schnaar RL (1986), Cell-surface carbohydrates in cell recognition and response. *J Leukoc Biol* 40: 97-111
- Bregenholt S**, Wang M, Wolfe T, Hughes A, Bærentzen L, Dyrberg T, von Herrath MG, Petersen JS (2003), The Cholera-Toxin B subunit is a mucosal adjuvant for oral tolerance induction in Type 1 Diabetes. *Scand J Immunol* 57: 432-438
- Brown WR**, Williams AF (1982), Lymphocyte cell surface glycoproteins which bind to soybean and peanut lectins. *Immunology* 46: 713-726
- Burckhart MF**, Mimouni J, Fontanges R (1997), Absorption kinetics of a ¹⁴C-labelled Escherichia coli extract after oral administration in mice. *Arzneim.-Forsch./Drug.Res.* 47: 325-328
- Burkart V**, Kim Y-E, Hartmann B, Ghiea I, Syldath U, Kauer M, Fingberg W, Hanifi-Moghaddam P, Müller S, Kolb H (2002), Cholera-Toxin B pretreatment of macrophages and monocytes diminishes their proinflammatory responsiveness to lipopolysaccharide. *J Immunol* 168: 1730-1737
- Burkart V**, Kolb H (2000), Nitric oxide in the immunopathogenesis of Type 1 Diabetes. *Handbook of Experimental Pharmacology* 143: 526-544
- Burkart V**, Kim Y-E, Kauer M, Kolb H (1999), Induction of tolerance in macrophages by Cholera-Toxin B chain. *Pathobiology* 67: 314-317
- Burkart V**, Kolb H (1996), Macrophages in islet destruction in autoimmune Diabetes mellitus. *Immunobiol* 195: 601-613
- Caldwell S**, Heitger A, Shen W, Liu Y, Taylor B, Ladisch S (2003), Mechanisms of ganglioside inhibition of APC function. *J Immunol* 171: 1676-1683
- Canadian European Diabetes Study Group.** (1988), Cyclosporin-induced remission of IDDM after early intervention. Association of 1 yr of cyclosporin treatment with enhanced insulin secretion. *Diabetes* 37: 1574-1582
- Carswell EA**, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B (1975), An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci* 72: 3666-3670
- Cetkovic-Cvrlje M**, Eizirik DL (1994), TNF α and IFN γ potentiate the deleterious effects of IL1 β on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. *Cytokine* 6: 399-406
- Chen W**, Syldath U, Bellmann K, Burkart V, Kolb H (1999), Human 60-kDa heat-shock protein: A danger signal to the innate immune system. *J Immunol* 162: 3212-3219
- Chen H**, Torchilin V, Langer R (1996), Lectin-bearing polymerized liposomes as potential oral vaccine carriers. *Pharm Res* 13: 1378-1383

- Chow** JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F (1999), Toll-like Receptor 4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* 16: 10689-10692
- Clark** MA, Jepson MA, Hirst BH (1995a), Lectin binding defines and differentiates M-cells in mouse small intestine and caecum. *Histochem Cell Biol.* 104: 161-168
- Clark** MA, Jepson MA, Simmons NL, Hirst BH (1995b), Selective binding and transcytosis of *Ulex europaeus* I lectin by mouse Peyer's patch M-cells in vivo. *Cell Tissue Res* 282: 455-461
- Corbett** JA, Sweetland MA, Wang JL, Lancaster JR Jr, McDaniel ML (1993), Nitric oxide mediates cytokine-induced inhibition of insulin secretion by human islets of Langerhans. *Proc Natl Acad Sci* 90: 1731-1735
- Cowan** MM (1999), Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 12: 564-582
- Cuatrecasas** P (1973), Interaction of Concanavalin A and Wheat germ agglutinin with the insulin receptor of fat cells and liver. *J Biol Chem* 248: 3528-3534
- Cunha** FQ, Assreuy J, Moss DW, Rees D, Leal MC, Moncada S, Carrier M, Donelli CA, Liew FY (1994), Differential induction of nitric oxide synthase in various organs of the mouse during endotoxaemia: role of TNF α and IL1 β . *Immunol* 81: 211-215
- Dahlén** E, Dawe K, Ohlsson L, Hedlund G (1998), Dendritic cells and macrophages are the first and major producers of TNF α in pancreatic islets in the Nonobese Diabetic Mouse. *J Immunol* 160: 3585-3593
- Dahlquist** G, Blom LG, Persson L-Å, Sandström A, Wall S (1990), Dietary factors and the risk of developing insulin dependent Diabetes in childhood. *BMJ* 300: 1302-1306
- De Aizpurua** HJ, Russell-Jones GJ (1988), Oral vaccination. Identification of proteins that provoke an immune response upon oral feeding. *J Exp Med* 167: 440-451
- De Block** CEM, De Leeuw IH, Vertommen JJE, Rooman RPA, Du Caju MVL, van Campenhout CM, Weyler JJ, Winnock F, van Autreve J, Gorus FK, The Belgian Diabetes Registry (2001), β -cell, thyroid, gastric, adrenal and celiac autoimmunity and HLA-DQ types in Type 1 Diabetes. *Clin Exp Immunol* 126: 236-241
- Debray** H, Decout D, Strecker G, Spik G, Montreuil J (1981), Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins. *Eur J Biochem* 117: 41-55
- Dembic** Z, Loetscher H, Gubler U, Pan YC, Lahm HW, Gentz R, Brockhaus M, Lesslauer W (1990), Two human TNF receptors have similar extracellular, but distinct intracellular, domain sequences. *Cytokine* 2: 231-237
- Dugas** B, Paul-Eugène N, Génot E, Mencia-Huerta J M, Braquet P, Kolb JP (1991), Effect of bacterial toxins on human B cell activation. II. Mitogenic activity of the B subunit of Cholera-Toxin. *Eur J Immunol* 21: 495-500
- Dunzendorfer** S, Lee HK, Soldau K, Tobias PS (2004), TLR4 is the signaling but not the lipopolysaccharide uptake receptor. *J Immunol* 173: 1166-1170
- Dyatlovitskaya** EV, Bergelson LD (1987), Glycosphingolipids and antitumor immunity. *Biochim Biophys Acta* 907: 125-143

- Earle** W R (1943), Production of malignancy in vitro. IV The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. *J Natl Cancer Inst* 4: 165-212
- Esquivel** PO, Mena M, Folch H (1982), Autoimmune thyroiditis in young and old mice: Differential effect of high doses of phytohaemagglutinin (PV-Lectin). *Immunology* 47: 233-238
- EURODIAB ACE** Study Group (2000), Variation and trends in incidence of childhood Diabetes in Europe. *Lancet* 355 (9207): 873-876
- Falasca** A, Franceschi C, Rossi CA Stirpe F (1979), Purification and partial characterization of a mitogenic lectin from *Vicia sativa*. *Biochim Biophys Acta* 577: 71-81
- Felsted** RL, Egorin MJ, Leavitt RD, Bachur NR (1977), Recombinations of subunits of *Phaseolus vulgaris* Isolectins. *J Biol Chem* 252: 2967-2971
- Fitting** C, Dhawan S, Cavaillon JM (2004), Compartmentalization of tolerance to endotoxin. *J Infect Dis* 189: 1295-1303
- Fortune** F, Lehner T (1988), Phenotypic expression of *Vicia villosa* binding T cell subsets, as markers of contrasuppressor cells in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 74: 100-104
- Foster** N, Clark MA, Jepson MA, Hirst BH (1998), *Ulex europaeus* I lectin targets microspheres to mouse Peyer's patch M-cells in vivo. *Vaccine* 16: 536-541
- Francis** ML, Ryan J, Jobling MG, Holmes RK, Moss J, Mond JJ (1992), Cyclic AMP-independent effect of Cholera-Toxin on B cell activation. II. Binding of Ganglioside G_{M1} induces B cell activation. *J Immunol* 148: 1999-2005
- Fraser** SA, de Haan L, Hearn AR, Bone HK, Salmond RJ, Rivett AJ, Williams NA, Hirst TR (2002), Mutant *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunit that separates toxoid-mediated signaling and immunomodulatory action from trafficking and delivery functions. *Infect Immun* 71: 1527-1537
- Freier** T, Fleischmann G, Rudiger H (1985), Affinity chromatography on immobilized hog gastric mucin and ovomucoid. A general method for isolation of lectins. *Biol Chem Hoppe Seyler* 366: 1023-1028
- Freiesleben De Blasio** B, Bak P, Pociot F, Karlsen A E, Nerup J (1999), Onset of Type 1 Diabetes a dynamical instability. *Diabetes* 48: 1677-1685
- Freudenberg** MA, Galanos C (1988), Induction of tolerance to lipopolysaccharide (LPS)-D-Galactosamine lethality by pretreatment with LPS is mediated by macrophages. *Infect Immun* 56: 1352-1357
- Friedman** A, al-Sabbagh A, Santos LM, Fishman-Lobell J, Polanski M, Das MP, Khoury S.J., Weiner HL (1994), Oral tolerance: A biologically relevant pathway to generate peripheral tolerance against external and self antigens. *Chem Immunol* 58: 259-290
- Friedman** A, Weiner HL (1994), Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proc Natl Acad Sci* 91: 6688-6692
- Fujihara** M, Muroi M, Tanamoto K, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H (2003), Molecular mechanism of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: Roles of the receptor complex. *Pharmacol Ther* 100: 171-194

- Fujinaga** Y, Wolf AA, Rodighiero C, Wheeler H, Tsai B, Allen L, Jobling MG, Rapoport T, Holmes RK, Lencer WI (2003), Gangliosides that associate with lipid rafts mediate transport of cholera and related toxins from the plasma membrane to endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 14: 4783-4793
- Gabius** HJ (2001), Probing the cons and pros of lectin-induced immunomodulation: Case studies for the mistletoe lectin and galectin-1. *Biochimie* 83: 659-666
- Gabius** H-J, Rüdiger H, Uhlenbruck G (1988): Lektine. *Spektrum der Wissenschaften*, 11: 50-60
- Galbraith** W, Goldstein IJ (1972), Phytohemagglutinin of the lima bean (*Phaseolus lunatus*). Isolation, characterization and interaction with type A blood-group substance. *Biochemistry* 11: 3976-3984
- Galbraith** W, Goldstein IJ (1970), Phytohemagglutinins: A new class of metalloproteins. Isolation, purification and some properties of the lectin from *Phaseolus lunatus*. *FEBS Lett.* 9: 197-201
- Gale** EA, Bingley PJ, Emmett CL, Collier T, European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT) Group. (2004), European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT): A randomised controlled trial of intervention before the onset of Type 1 Diabetes. *Lancet* 363 (9413): 910
- Gale** EAM (2002), The rise of childhood Type 1 Diabetes in the 20th Century. *Diabetes* 51: 3353-3361
- Gallily** R, Stain I, Zaady O (1986), Dual effect of lectins on macrophages: Potentiation of bacterial uptake and suppression of bactericidal activity. *Immunol Lett* 13:151-158
- Gallily** R, Vray B, Stain I, Sharon N (1984), Wheat germ agglutinin potentiates uptake of bacteria by murine peritoneal macrophages. *Immunology* 52: 679-686
- Gebauer** B, Schiltz E, Schimpl A, Rudiger H (1979), Purification and characterization of a mitogenic lectin and lectin-binding protein from *Vicia sativa*. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 360: 1727-1735
- Gebauer** B, Schiltz E, Rudiger H (1981), The amino-acid sequence of the α -subunit of the mitogenic lectin from *Vicia sativa*. *Eur J Biochem* 113: 319-325
- Gebauer** G, Schimpl A, Rudiger H (1982), Lectin-binding proteins as potent mitogens for B lymphocytes from nu/nu mice. *Eur J Immunol* 12: 491-495
- Gebert** A, Posselt W (1997), Glycoconjugate expression defines the origin and differentiation pathway of intestinal M-cells. *J Histochem Cytochem* 45: 1341-1350
- Geng** JG, Heavner GA, McEver RP (1992), Lectin domain peptides from selectins interact with both cell surface ligands and Ca^{2+} ions. *J Biol Chem* 267: 19846-19853
- George-Chandy** A, Eriksson K, Lebens M, Nordström I, Schön E, Holmgren J (2001), Cholera toxin B subunit as a carrier molecule promotes antigen presentation and increases CD 40 and CD 86 expression on antigen-presenting cells. *Infect Immun* 69: 5716-5725
- Gold** ER, Balding P (1975), Receptor-specific proteins: Plant and animal lectins. *Excerpta Medica*, Amsterdam

- Goldstein IJ**, Hayes CE (1978), The lectins: Carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 35: 127-340
- Goldstein IJ**, Misaki A (1970), Interaction of Concanavalin A with an Arabinogalactan from the cell wall of *Mycobacterium bovis*. *J Bacteriol* 103: 422-425
- Greene WC**, Goldmann CK, Marshall ST, Fleisher TA, Waldmann TA (1981), Stimulation of immunoglobulin biosynthesis in human B cells by wheat germ agglutinin. I. Evidence that wheat germ agglutinin can produce both a positive and negative signal for activation of human lymphocytes. *J Immunol* 127: 799-804
- Gross R**, Schölmerich P, Gerok W (1993), *Die Innere Medizin*. Schattauer-Verlag, 8 Auflage, 896-897
- Guzik TJ**, Korb R, Adamek-Guzik T (2003), Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* 54: 469-487
- Haas JG**, Baeuerle PA, Riethmüller G, Ziegler-Heitbrock HWL (1990), Molecular mechanisms in down-regulation of tumor necrosis factor expression. *Proc Natl Acad Sci* 87: 9563-9567
- Habich C**, Baumgart K, Kolb H, Burkart V (2002), The receptor for heat shock protein 60 on macrophages is saturable, specific, and distinct from receptors for other heat shock proteins. *J Immunol* 168: 569-576
- Hallman M**, Rämert M, Ezekowitz RA (2001), Toll-like receptors as sensors of pathogens. *Pediatr Res* 50: 315-321
- Hanenberg H**, Kolb-Bachofen V, Kantwerk-Funke G, Kolb H (1989), Macrophage infiltration precedes and is a prerequisite for lymphocytic insulinitis in pancreatic islets of pre-diabetic BB rats. *Diabetologia* 32: 126-134
- Hänninen A** (2000), Prevention of autoimmune Type 1 Diabetes via mucosal tolerance: Is mucosal autoantigen administration as safe and effective as it should be? *Scand J Immunol* 52: 217-225
- Harrison LC**, Honeyman MC (1999), Cow's milk and Type 1 Diabetes: The real debate is about mucosal immune function. *Diabetes* 48: 1501-1507
- Hartmann B**, Bellmann K, Ghiea I, Kleemann R, Kolb K (1997), Oral insulin for Diabetes prevention in NOD mice: Potentiation by enhancing Th2 cytokine expression in the gut through bacterial adjuvant. *Diabetologia* 40: 902-909
- Hausdorff WP**, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990), Turning off the signal: Desensitization of β -adrenergic receptor function. *FASEB J* 4: 2881-2889
- Hauzeur JP**, Appelboom T (1989), Double-blind, placebo-controlled study of OM-8980 in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 9: 71-76
- Hayes CE**, Goldstein IJ (1974), An α -D-Galactopyranosyl-binding lectin from *Bandeiraea simplicifolia* seeds. *J Biol Chem* 249: 1904-1914
- Heurtier AH**, Boitard C (1997), T-Cell regulation in murine and human autoimmune Diabetes: The role of TH1 and TH2 cells. *Diabetes & Metabolism* 23: 377-385

- Higashi N**, Fujioka K, Denda-Nagai K, Hashimoto S, Nagai S, Sato T, Fujita Y, Morikawa A, Tsujii M, Miyata-Takeuchi M, Sano Y, Suzuki N, Yamamoto K, Matsushima K, Irimura T (2002), The macrophage C-type lectin specific for Galactose/N-Acetylgalactosamine is an endocytic receptor expressed on monocyte-derived immature dendritic cells. *J Biol Chem* 277: 20686-20693
- Hockertz S** (1990), Immunomodulating effect of lysed immunoactive fractions of selected *Escherichia coli* strains on the macrophage system. An in vitro study. *Arzneimittelforschung* 40: 1068-1072
- Horvath L**, Cervenak L, Oroszlan M, Prohaszka Z, Uray K, Hudecz F, Baranyi E, Madacsy L, Singh M, Romics L, Fust G, Panczel P (2002), Antibodies against different epitopes of heat-shock protein 60 in children with Type 1 Diabetes mellitus. *Immunol Lett* 80: 155-162
- Howard IK**, Sage HJ (1969), Isolation and characterization of a phytohemagglutinin from the lentil. *Biochemistry* 8: 2436-2441
- Howard IK**, Sage HJ, Stein MD (1971), Studies on a phytohemagglutinin from the lentil. *J Biol Chem* 246: 1590-1595
- Huber M**, Baier W, Serr A, Bessler WG (2000), Immunogenicity of an *E. coli* extract after oral or intraperitoneal administration: Induction of antibodies against pathogenic bacterial strains. *Int J Immunopharmacol* 22: 57-68
- Ilonen J**, Reijonen H, Herva E, et al. (1996), Rapid HLA-DQB1 genotyping for four alleles in the assessment of risk for IDDM in the Finnish population. *Diabetes Care* 19: 795-800
- 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 J, Matsuzawa Y (2001), Pancreatic biopsy as a procedure for detecting in situ autoimmune phenomena in Type 1 Diabetes. *Diabetes* 50: 1269-1273
- Itoh N**, Hanafusa T, Miyazaki A, Miyagawa J, Yamagata K, Yamamoto K, Waguri M, Imagawa A, Tamura S, Inada M, Kawata S, Tarui S, Kono N, Matsuzawa Y (1993), 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
- Iwasaki A**, Kelsall BL (1999), Mucosal dendritic cells: Their specialized role in initiating T cell responses. *Am J Physiol* 276: 1074-1078
- Jani D**, Singh NK, Bhattacharya S, Meena LS, Singh Y, Upadhyay SN, Sharma AK, Tyagi AK (2004), Studies on the immunogenic potential of plant-expressed Cholera toxin B subunit. *Plant Cell Rep* 22: 471-477
- Jepson MA**, Mason CM, Clark MA, Simmons NL, Hirst BH (1995), Variations in lectin binding properties of intestinal M cells. *J Drug Target* 3: 75-77
- Jobling MG**, Holmes RK (2002), Mutational analysis of ganglioside G_{M1} -binding ability, pentamer formation, and epitopes of Cholera toxin B (CTB) subunits and CTB / heat-labile enterotoxin B subunit chimeras. *Infect Immun* 70: 1260-1271
- Jun HS**, Yoon JW (2003), A new look at viruses in Type 1 Diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 19: 8-31

- Jun H-S, Yoon C-S, Zbytniuk L, van Rooijen N, Yoon J-W (1999)**, The Role of macrophages in T cell-mediated autoimmune Diabetes in Nonobese Diabetic Mice. *J Exp Med* 18: 347-358
- Kanda N, Watanabe S (2001)**, Gangliosides GD1b, GT1b and GQ1b enhance IL-2 and IFN γ production and suppress IL-4 and IL-5 production in phytohemagglutinin-stimulated human T cells. *J Immunol* 166: 72-80
- Kaprio J, Tuomilehto J, Koskenvuo M, Romanov K, Reunanen A, Eriksson J, Stengard J, Kesaniemi YA (1992)**, Concordance for Type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) Diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland. *Diabetologia* 35: 1060-1067
- Karges W, Hammond-McKibben D, Cheung RK, Visconti M, Shibuya N, Kemp D, Dosch HM (1997)**, Immunological aspects of nutritional Diabetes prevention in NOD mice: A pilot study for the cow's milk-based IDDM prevention trial. *Diabetes* 46: 557-564
- Karow T, Lang-Roth R (2003)**, Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 1. Auflage: 669
- Kessler L, Passemard R, Oberholzer J, Benhamou PY, Bucher P, Toso C, Meyer P, Penfornis A, Badet L, Wolf P, Colin C, Morel P, Pinget M, GRACIL Group. (2002)**, Reduction of blood glucose variability in the Type 1 diabetic patients treated by pancreatic islet transplantation. *Diabetes Care* 25: 2256-2262
- Khoshnan A, Bae D, Tindell CA, Nel AE (2000)**, The physical association of protein kinase C θ with a lipid raft-associated inhibitor of kappa B factor kinase (IKK) complex plays a role in the activation of the NF-kappa B cascade by TCR and CD28. *J Immunol* 165: 6933-6940
- Khoury SJ, Lider O, al-Sabbagh A, Weiner HL (1990)**, Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein. III. Synergistic effect of lipopolysaccharide. *Cell Immunol* 131: 302-310
- Kilmartin B, Reen DJ (2004)**, HSP60 induces self-tolerance to repeated HSP60 stimulation and cross-tolerance to other pro-inflammatory stimuli. *Eur J Immunol* 34: 2041-2051
- Kimpimäki T, Kulmala P, Savola K, Pupila A, Korhonen S, Simell T, Ilonen J, Simell O, Knip M (2002)**, Natural history of β -cell autoimmunity in young children with increased genetics susceptibility to Type 1 Diabetes recruited from the general population. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 4572-4579
- Kimpimäki T, Erkkola M, Korhonen S, Kupila A, Virtanen SM, Ilonen J, Simell O, Knip M (2001)**, Short-term exclusive breast feeding predisposes to progressive β -cell autoimmunity in young children at increased risk for Type 1 Diabetes. *Diabetologia* 44: 63-69
- Kimura A, Wigzell H, Holmquist G, Ersson B, Carlsson P (1979)**, Selective affinity fractionation of murine cytotoxic T lymphocytes (CTL). Unique lectin specific binding of the CTL associated surface glycoprotein. *J Exp Med* 149: 473-484
- Kleemann R, Rothe H, Kolb-Bachofen V, Xie Q, Nathan C, Martin S, Kolb H (1993)**, Transcription and translation of inducible nitric oxide synthase in the pancreas of prediabetic BB rats. *FEBS Lett* 328: 9-12
- Knip M (2002)**, Can we predict Type 1 Diabetes in the general population? *Diabetes Care* 25: 623-625

- Kocourek J, Horejsi V (1983)**, A note on the recent discussion on definition of the term "lectin". Bøg Hansen TC, Spengler GA (eds) *Lectins. Clin Biochem* 3-6
- Koike T, Fehsel K, Zielasek J, Kolb H, Burkart V (1993)**, Gangliosides protect from TNF α -induced apoptosis. *Immunol Lett* 35: 207-212
- Kolb H (2001)**, Kuhmilch und Diabetes. *Monatsschr Kinderheilkd (Suppl 1)* 149: 62-65
- Kolb H (1995)**, Diabetes Typ I: Immunologische Aspekte. Sonderdruck aus „Die gelben Hefte“ Jg. XXXV, Heft 1: 38-43
- Kolb H (1994)**, Immune intervention in the Type 1 Diabetes mellitus-current clinical and experimental approaches. *Exp Clin Endocrinol* 102: 269-272
- Kolb H, Gale EAM (2001)**, Does partial preservation of residual β -cell function justify immune intervention in recent onset Type I Diabetes? *Diabetologia* 44: 1349-1353
- Kolb H, Pozzilli P (1999)**, Cow's milk and Type 1 Diabetes: the gut immune system deserves attention. *Immunol Today* 20: 108-110
- Kolb H, Wörz-Pagenstert U, Kleemann R, Rothe H, Rowsell P, Scott FW (1996)**, Cytokine gene expression in the BB rat pancreas: natural course and impact of bacterial vaccines. *Diabetologia*. 39: 1448-1454
- Kolb H, Oschilewski M, Schwab E, Greulich B, Roos P, Kiesel U (1986)**, Suppression of low-dose streptozotocin-induced Diabetes by immunomodulatory lectins. *Diabetes Res* 3: 183-186
- Kolb-Bachofen V (1996)**, Intra-islet expression of inducible nitric oxide synthase and islet cell death. *Biochem Soc Trans* 24: 233-234
- Kolb-Bachofen V, Schraermeyer U, Hoppe T, Hanenberg H, Kolb H (1992)**, Diabetes manifestation in BB rats is preceded by pan-pancreatic presence of activated inflammatory macrophages. *Pancreas* 7: 578-584
- Kolb-Bachofen V, Kolb H (1989)**, A role for macrophages in the pathogenesis of Type 1 Diabetes. *Autoimmunity* 3: 145-155
- Kolb-Bachofen V, Schlepper-Schäfer J, Kolb H (1988)**, A lectin-like receptor on rat macrophage membranes: Colloidal gold probes for detection, localization and description of biological function. *Acta Histochem Suppl* 36: 153-157
- Kong Q, Richter L, Yang YF, Arntzen CJ, Mason HS, Thanavala Y (2001)**, Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci* 98: 11539-11544
- Krause I, Blank M, Shoenfeld Y (2000)**, Immunomodulation of experimental autoimmune diseases via oral tolerance. *Crit Rev Immunol* 20: 1-16
- Kreutter D, Kim JYH, Goldenring JR, Rasmussen H, Ukomadu C, DeLorenzo RJ, Yu RK (1987)**, Regulation of protein kinase C activity by gangliosides. *J Biol Chem* 262: 1633-1637
- Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD (1988)**, A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: Ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 53: 45-53

- Kröncke** KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V (1995), Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small Molecule with complex biological activities. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 376: 327-343
- Kuroda** Y, Mori R, Aoki T (1980), Concanavalin A inhibits the development of experimental allergic encephalomyelitis in guinea pigs. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 61: 308:320
- Kwon** KH, Kim KI, Jun WJ, Shin DH, Cho HY, Hong BS (2002), In vitro and in vivo effects of macrophage-stimulatory polysaccharide from leaves of *Perilla frutescens* var. *crispa*. *Biol Pharm Bull* 25: 367-371
- Lamont** J, Perrotto JL, Weiser MM, Isselbacher KJ (1974), Cell surface galactosyltransferase and lectin agglutination of thymus and spleen lymphocytes. *Proc Nat Acad Sci* 71: 3726-3730
- Lampeter** EF, Klinghammer A, Scherbaum WA, Heinze E, Haastert B, Giani G, Kolb H (1998a), The Deutsche Nicotinamide Intervention Study: An attempt to prevent Type 1 Diabetes. DENIS Group. *Diabetes* 47: 980-984
- Lampeter** EF, Mc Cann SR, Kolb H (1998b), Transfer of Type 1 Diabetes by bone-marrow transplantation. *The Lancet* 351: 568-569
- Lavelle** EC, Grant G, Puzstai A, Pfuller U, O'Hagan DT (2001), The identification of plant lectins with mucosal adjuvant activity. *Immunology* 102: 77-86
- Lavelle** EC, Grant G, Puzstai A, Pfuller U, O'Hagan DT (2000), Mucosal immunogenicity of plant lectins in mice. *Immunology* 99: 30-37
- Leavitt** RD, Felsted RL, Bachur NR (1977), Biological and biochemical properties of Phaseolus vulgaris Isolectins. *J Biol Chem* 252: 2961-2966
- Lee** K-U, Amano K, Yoon J-W (1988), Evidence for initial involvement of macrophage in development of insulinitis in NOD mice. *Diabetes* 37: 989-991
- Leslie** D, Lipsky P, Notkins AL (2001), Autoantibodies as predictors of disease. *J Clin Invest* 108: 1417-1422
- Leslie** RD, Elliott RB (1994), Early environmental events as a cause of IDDM. Evidence and implications. *Diabetes* 43: 843-850
- Lima** JE, Sampaio AL, Henriques MG, Barja-Fidalgo C (1999), Lymphocyte activation and cytokine production by Pisum sativum agglutinin (PSA) in vivo and in vitro. *Immunopharmacology* 41: 147-155
- Lin** JY, Seguin R, Keller K, Chadee K (1994), Tumor necrosis factor alpha augments nitric oxide-dependent macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* by enhanced expression of the nitric oxide synthase gene. *Infect Immun* 62: 1534-1541
- Loetscher** H, Schlaeger EJ, Lahm HW, Pan YC, Lesslauer W, Brockhaus M (1990), Purification and partial amino acid sequence analysis of two distinct tumor necrosis factor receptors from HL60 cells. *J Biol Chem* 265: 20131-38
- Loris** R, Hamelryck T, Bouckaert J, Wyns L (1998), Legume lectin structure. *Biochim Biophys Acta* 1383: 9-36
- Lotan** R, Skutelsky E, Danon D, Sharon N (1975), The purification, composition and specificity of the Anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). *J Biol Chem* 250: 8518-8523

- Loyola W**, Gaziri DA, Gaziri LC, Felipe I (2002), Concanavalin A enhances phagocytosis and killing of *Candida albicans* by mice peritoneal neutrophils and macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol* 33: 201-208
- Löffler G**, Petrides PE (1990), *Physiologische Chemie*. 4. Auflage: 210
- Lyons CR**, Orloff GJ, Cunningham JM (1992), Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J Biol Chem* 267: 6370-6374
- Ma L**, Qian S, Liang X, Wang L, Woodward JE, Giannoukakis N, Robbins PD, Bertera S, Trucco M, Fung JJ, Lu L (2003), Prevention of Diabetes in NOD mice by administration of dendritic cells deficient in nuclear transcription factor- κ B activity. *Diabetes* 52: 1976-1985
- Maeyama J**, Isaka M, Yasuda Y, Matano K, Taniguchi T, Morokuma K, Ohkuma K, Tochikuba K, Goto N (2002), Effects of recombinant Cholera toxin B subunit on IL-1 β production by macrophages in vitro. *Microbiol Immunol* 46: 593-599
- Maldonado G**, Porras F, Fernandez L, Zenteno E (1994), Effect of lectins on mouse peritoneal macrophage phagocytic activity. *Immunol Invest* 23: 429-436
- Mandrup-Poulsen T** (2003), β -cell death and protection. *Ann N Y Acad Sci* 1005: 32-42
- Martin CA**, Carsons SE, Kowalewski R, Bernstein D, Valentino M, Santiago-Schwarz F (2003), Aberrant extracellular and dendritic cell (DC) surface expression of heat shock protein (hsp) 70 in the rheumatoid joint: possible mechanism of hsp/DC-mediated cross-priming. *J Immunol* 171: 5736-5742
- Martin S**, Kolb H (1998), Pathogenese und Immuntherapie des Typ 1 Diabetes mellitus. *Diabetes und Stoffwechsel* 7: 17-24
- Martin S**, Wolf-Eichbaum D, Duinkerken G, Scherbaum WA, Kolb H, Noordzij JG, Roep BO (2001), Development of Type 1 Diabetes despite severe hereditary β -cell deficiency. *N Engl J Med* 345: 1036-1040
- Mathison JC**, Virca GD, Wolfson E, Tobias PS, Glaser K, Ulevitch RJ (1990), Adaptation to bacterial lipopolysaccharide controls lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in rabbit macrophages. *J Clin Invest* 85: 1108-1118
- Matsumoto I**, Uehara Y, Jimbo A, Seno N (1983), Immunochemical and spectral studies on *Vicia faba* agglutinin. *J Biochem* 93: 763-769
- Matsumoto I**, Osawa T (1969), Purification and characterization of an anti-H(0) phytohemagglutinin of *Ulex europaeus*. *Biochim Biophys Acta* 194: 180-189
- Mauel J**, Defendi V (1971), Infection and transformation of mouse peritoneal macrophages by simian virus 40. *J Exp Med* 134:335-350
- Medvedev AE**, Kopydlowski KM, Vogel SN (2000), Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: Dysregulation of cytokine, chemokine, and Toll-like Receptor 2 and 4 gene expression. *J Immunol* 164: 5564-5574
- Menezes CA**, Amianti J, Harayama HS, Koga PC, Trabulsi LR, Piazza RM (2002), Inhibition of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin by neoglycoprotein and anti-lectin antibodies which mimic G_{M1} receptor. *FEMS Microbiol Lett* 216: 67-70

- Merritt** E A, Kuhn P, Sarfaty S, Erbe JL, Holmes RK, Hol WGJ (1998), The 1.25 Å resolution refinement of the Cholera-Toxin B pentamer: evidence of peptide backbone strain at the receptor-binding site. *J Mol Biol* 282: 1043-1059
- Miller** A., Lider O, Weiner HL (1991), Antigen-driven bystander suppression after oral administration of antigens. *J Exp Med* 791-798
- Miller** K (1983), The stimulation of human B and T lymphocytes by various lectins. *Immunobiology* 165: 132-146
- Mirlashari** MR, Lyberg T (2003), Expression and involvement of Toll-like receptors (TLR)2, TLR4, and CD14 in monocyte TNF α production induced by lipopolysaccharides from *Neisseria meningitidis*. *Med Sci Monit* 9: BR 316-324
- Moncada** S, Palmer RMJ, Higgs EA (1991), Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142
- Moresco** TR, Gaziri LC, Yasumoto Y, Felipe I (2002), Phagocytic and candidacidal activities of macrophages from suckling and adult mice pretreated with Concanavalin A. *Med Mycol* 40: 393-397
- Mosmann** TR, Coffman RL (1987), Two types of mouse helper T cell clone: Implications for immune regulation. *Immunol today* 8 :223-227
- Mowat** AM, Donachie AM, Parker LA, Robson NC, Beacock-Sharp H, McIntyre LJ, Millington O, Chirido F (2003), The role of dendritic cells in regulating mucosal immunity and tolerance. *Novartis Found Symp* 252: 291-302
- Mukherjee** B, Pearce RB, Formby B, Peterson CM (1991), Studies of concanavalin A in Nonobese Diabetic Mice. II. Lymphocyte tracking and phenotype responses. *J Pharmacol Exp Ther* 258: 716-721
- Müller** JM, Ziegler-Heitbrock HWL, Baeuerle P (1993), Nuclear factor κ B, a mediator of lipopolysaccharide effects. *Immunobiol* 187: 233-256
- Muntoni** S, Cocco P, Aru G, Cucca F (2000), Nutritional factors and worldwide incidence of childhood Type 1 Diabetes. *Am J Clin Nutr* 71: 1525-1529
- Murphy** LA, Goldstein IJ (1977), Five α -D-Galactopyranosyl-binding isolectins from *Bandeiraea simplicifolia* seeds. *J Biol Chem* 252: 4739-4742
- Mustafa** SB, Olson MS (1998), Expression of nitric-oxide synthase in rat Kupffer cells is regulated by cAMP. *J Biol Chem* 273: 5073-5080
- Nagata** Y, Burger MM (1974), Wheat germ agglutinin. *J Biol Chem* 249: 3116-3122
- Nagler-Anderson** C, Bober LA, Robinson ME, Siskind GW, Thorbecke GJ (1986), Suppression of type II collagen-induced arthritis by intragastric administration of soluble type II collagen. *Proc Natl Acad Sci* 83: 7443-7446
- Nakano** K, Mordes JP, Handler ES, Greiner DL, Rossini AA (1988), Role of host immune system in BB/Wor rat. Predisposition to Diabetes resides in bone marrow. *Diabetes* 37: 520-525
- Nakano** T, Oguchi Y, Imai Y, Osawa T (1980), Induction and separation of mouse helper T cells by lectins. *Immunology* 40: 217-222

- Nashar TO, Hirst TR, Williams NA (1997)**, Modulation of B-cell activation by the B subunit of *E. coli* enterotoxin: Receptor interaction up-regulates MHC class II, B7, CD40, CD25 and ICAM-1. *Immunology* 91: 572-578
- Nathan C (1992)**, Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Fed Am Soc Exp Biol J* 6: 3051
- Neu A, Eehalt S, Willasch A, Kehrer M, Hub R, Ranke M (2001)**, Rising incidence of Type 1 Diabetes in Germany. *Diabetes Care* 24: 785-786
- Neu A, Willasch A, Eehalt S, Kehrer M, Hub R, Schwarze CP, Ranke MB (2002)**, Prävalenz und Altersverteilung des Diabetes mellitus im Kindesalter in Deutschland. *Monatsschr Kinderheilk* 2: 196-200
- Newman E, Spratt DE, Mosher J, Cheyne B, Montgomery HJ, Wilson DL, Weinberg JB, Smith SM, Salerno JC, Ghosh DK, Guillemette JG (2004)**, Differential activation of nitric-oxide synthase isozymes by calmodulin-troponin C chimeras. *J Biol Chem* 279: 33547-33557
- Nooteboom A, van der Linden CJ, Hendriks T (2004)**, Modulation of adhesion molecule expression on endothelial cells after induction by lipopolysaccharide-stimulated whole blood. *Scand J Immunol.* 59: 440-448
- Notkins AL (2002)**, Immunologic and genetic factors in Type 1 Diabetes. *J Biol Chem* 277 Issue 46: 43545-43548
- Notkins AL, Lernmark A (2001)**, Autoimmune Type 1 Diabetes: Resolved and unresolved issues. *J Clin Invest* 108: 1247-1252
- Ohmori Y, Tebo J, Nedospasov S, Hamilton TA (1994)**, Kappa B binding activity in a murine macrophage-like cell line. Sequence-specific differences in kappa B binding and transcriptional activation functions. *Biol Chem* 26: 17684-17690
- Onkamo P, Vaananen S, Karvonen M, Tuomiehto J (1999)**, Worldwide increase in incidence of Type 1 Diabetes – the analysis of the data published incidence trends. *Diabetologia* 42: 1395-1403
- Ohashi R, Mu H, Yao Q, Chen C (2004)**, Atherosclerosis: Immunopathogenesis and immunotherapy. *Med Sci Monit* 10: 255-260
- Opdenakker G, Rudd PM, Ponting CP, Dwek RA (1993)**, Concepts and principles of glycobiology. *Fed Am Soc Exp Biol J* 7: 1330-1337
- Oschilewski M, Schwab E, Kiesel U, Opitz U, Stünkel K, Kolb-Bachofen V, Kolb H (1986)**, Administration of silica or monoclonal antibody to Thy-1 prevents low-dose streptozotocin induced Diabetes in mice. *Immunol Lett* 12: 289-295
- Oschilewski U, Kiesel U, Kolb H (1985)**, Administration of silica prevents Diabetes in BB-rats. *Diabetes* 34: 197-199
- Ozato K, Cebra J, Ebert JD (1977)**, Cell-mediated mitogenic response induced by leukoagglutinin and lens culinaris lectin in mouse lymphocytes. *J Exp Med* 146: 779-791
- Pari L, Venkateswaran S (2004)**, Protective role of *Phaseolus vulgaris* on changes in the fatty acid composition in experimental Diabetes. *J Med Food* 7: 204-209
- Pearce RB, Peterson CM (1991)**, Studies of concanavalin A in Nonobese Diabetic Mice. I. Prevention of insulin-dependent Diabetes. *J Pharmacol Exp Ther* 258: 710-715

- Petlevski R**, Hadzija M, Slijepcevic M, Juretic D (2001), Effect of 'antidiabetic' herbal preparation on serum glucose and fructosamine in NOD mice. *J Ethnopharmacol* 75: 181-184
- Peumans WJ**, van Damme EJM (1995), Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol* 109: 347-352
- Phipps PA** (1999), Induction of Tr1 cells: A possible mechanism in the therapeutic action of OM-89. *Inflamm Res* 48: 138-139
- Ploix C**, Bergerot I, Durand A, Czerkinsky C, Holmgren J, Thivolet C (1999), Oral administration of Cholera-Toxin B-Insulin conjugates protects NOD mice from autoimmune Diabetes by inducing CD4⁺ regulatory T-cells. *Diabetes* 48: 2150-2156
- Polla BS**, Baladi S, Fuller K, Rook G (1995), Presence of hsp65 in bacterial extracts (OM-89): A possible mediator of orally-induced tolerance ? *Experientia*. 51: 775-779
- Pozzilli P**, Pitocco D, Visalli N, Cavallo MG, Buzzetti R, Crino A, Spera S, Suraci C, Multari G, Cervoni M, Manca Bitti ML, Matteoli MC, Marietti G, Ferrazzoli F, Cassone Faldetta MR, Giordano C, Sbriglia M, Sarugeri E, Ghirlanda G (2000), No effect of oral insulin on residual β -cell function in recent-onset Type 1 Diabetes (the IMDIAB VII). *IMDIAB Group. Diabetologia* 43: 1000-1004
- Pschyrembel**, (2002), *Klinisches Wörterbuch*. 259. Auflage
- Pugh N**, Ross SA, ElSohly MA, Pasco DS (2001), Characterization of Aloeride, a new high-molecular-weight polysaccharide from Aloe vera with potent immunostimulatory activity. *J Agric Food Chem* 49: 1030-1034
- Rabinovitch A**, Suarez-Pinzon WL, Sorensen O, Bleackley RC (1996), Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in pancreatic islets of Nonobese Diabetic Mice: Identification of iNOS-expressing cells and relationships to cytokines expressed in the islets. *Endocrinology* 137: 2093-2099
- Rabinovitch A** (1994), Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation? *Diabetes* 43: 613-621
- Radek R** (1996), Lectine. *Mikrokosmos* 85/2: 93-99
- Raetz CR**, Ulevitch R J, Wright SD, Sibley CH, Ding A, Nathan CF (1991), Gram-negative endotoxin: An extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. *Fed Am Soc Exp Biol J* 5: 2654-2660
- Ralph P**, Moore MA, Nilsson K (1976), Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *J Exp Med* 143: 1528-1533
- Raz I** (2001), β -cell function in new-onset Type 1 Diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): A randomised double-blind, phase II trial. *Lancet* 358, 9295: 1749-1753
- Reddy S**, Kaill S, Poole CA, Ross J (1997), Inducible nitric oxide synthase in pancreatic islets of the Nonobese Diabetic Mouse: A light and confocal microscopical study of its ontogeny, co-localization and up-regulation following cytokine administration. *Histochem J* 29: 53-64
- Reeke GN Jr.**, Becker JW, Cunningham BA, Gunther GR, Wang JL, Edelman GM

- (1974), Relationships between the structure and activities of Concanavalin A. *Ann N Y Acad Sci* 234: 369-382
- Reisner** Y, Kapoor N, Kirkpatrick D, Pollack MS, Dupont B, Good RA, O'Reilly RJ (1981), Transplantation for acute leukaemia with HLA-A and B nonidentical parental marrow cells fractionated with soybean agglutinin and sheep red blood cells. *Lancet* 2: 327-331
- Retzlaff** C, Yamamoto Y, Hoffman PS, Friedman H, Klein TW (1994), Bacterial heat shock proteins directly induce cytokine mRNA and interleukin 1 secretion in macrophage cultures. *Infect Immun* 62: 5689-5693
- Roberts** DD, Goldstein IJ (1983), Adenine binding sites of the lectin from Lima beans (*Phaseolus lunatus*). *J Biol Chem* 258: 13820-13824
- Rosen** SD (1993), Cell surface lectins in the immune system. *Semin Immun* 5: 237-247
- Rosenbauer** J, Icks A, Giani G (2002), Incidence and prevalence of childhood Type 1 Diabetes in Germany-model-based national estimates. *J Pediatr Endocrinol Metab* 15: 1497-1504
- Rosenthal** M, Bahous I, Ambrosini G (1991), Longterm treatment of rheumatoid arthritis with OM-8980. A retrospective study. *J Rheumatol* 18: 1790-1793
- Rosenthal** M (1986), Effect of a bacterial extract on cellular and humoral immune responses in humans. *J Immunopharmacol* 8: 315-325
- Rosmalen** GMJ, Martin T, Dobbs C, Voerman JSA, Drexhage AH, Haskins K, Leenen PJM (2000a), Subsets of macrophages and dendritic cells in Nonobese Diabetic Mouse pancreatic inflammatory infiltrates: Correlation with the development of Diabetes. *Lab Invest* 80: 23-30
- Rosmalen** JGM, Homo-Delarche F, Durant S, Kap M, Leenen PJM, Drexhage HA (2000b), Islet abnormalities associated with an early influx of dendritic cells and macrophages in NOD and NODscid mice. *Lab Invest* 80: 769-777
- Rothe** H, Faust A, Schade U, Kleemann R, Bosse G, Hibino T, Martin S, Kolb H (1994), Cyclophosphamide treatment of female Nonobese Diabetic Mice causes enhanced expression of inducible nitric oxide synthase and interferon-gamma, but not of interleukin-4. *Diabetologia* 37: 1154-1158
- Ruddon** RW, Weisenthal LM, Lundeen DE, Bessler W, Goldstein IJ (1974), Stimulation of mitogenesis in normal and leukemic human lymphocytes by divalent and tetravalent lima bean lectins. *Proc Nat Acad Sci* 71: 1848-1851
- Rüdiger** H, Siebert HC, Solis D, Jimenez-Barbero J, Romero A, von der Lieth CW, Diaz-Marino T, Gabius HJ (2000), Medicinal chemistry based on the sugar code: Fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectins as targets. *Curr Med Chem* 7: 389-416
- Rüdiger** H, Gabius H-J (1993), Lectinologie. Geschichte, Konzepte und pharmazeutische Bedeutung. *Deutsche Apotheker Zeitung* 133: 15-25
- Rüdiger** H (1982), Phythemagglutinins. *Planta Med* 46: 3-9
- Sadeharju** K, Hämäläinen A-M, Knip M, Lönnrot M, Koskela P, Virtanen SM, Ilonen J, Åkerblom HK, Hyöty H, & The Finnish TRIGR Study Group (2003), Enterovirus infections as a risk factor for Type I Diabetes: Virus analyses in a dietary intervention trial. *Clin Exp Immunol* 132: 271-277

- Saevarsdottir S**, Vikingsdottir T, Valdimarsson H (2004), The potential role of mannan-binding lectin in the clearance of self-components including immune complexes. *Scand J Immunol* 60: 23-29
- Sandvig K**, Spilsberg B, Lauvrak SU, Torgersen ML, Iversen TG, van Deurs B (2004), Pathways followed by protein toxins into cells. *Int J Med Microbiol* 293: 483-490
- Sandvig K**, van Deurs B (2002), Transport of protein toxins into cells: Pathways used by ricin, cholera toxin and shiga toxin. *FEBS Lett* 529: 49-53
- Sanford KK**, Earle WR, Lihely GD (1948), The growth in vitro of single isolated tissue cells. *J Natl Cancer Inst* 9:229-246
- Savilahti E**, Åkerblom HK, Tainio V-M, Koskimies S (1988), Children with newly diagnosed insulin dependent Diabetes mellitus have increased levels of cow's milk antibodies. *Diabetes Res* 7: 137-140
- Sawyer RT**, Garner RE, Hudson JA (1992), Effect of lectins on hepatic clearance and killing of *Candida albicans* by the isolated perfused mouse liver. *Infect Immun* 60: 1041-1046
- Sato T**, Serizawa T, Ohtake F, Nakamura M, Terabayashi T, Kawanishi Y, Okahata Y (1998), Quantitative measurements of the interaction between monosialoganglioside monolayers and wheat germ agglutinin (WGA) by a quartz-crystal microbalance. *Biochim Biophys Acta* 1380: 82-92
- Schatz DA**, Bingley PJ (2001), Update on major trials for the prevention of Type 1 Diabetes mellitus: The American Diabetes Prevention Trial (DPT-1) and the European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT). *J Pediatr Endocrinol Metab* 14 Suppl 1: 619-622
- Scherbaum WA**, Landgraf R (2002), Praxis-Leitlinien der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (DDG). Band 11, Supplement-Heft 2
- Scott FW**, Rowsell P, Wang GS, Burghardt K, Kolb H, Flohé S (2002), Oral exposure to diabetes-promoting food or immunomodulators in neonates alters gut cytokines and Diabetes. *Diabetes* 51: 73-78
- Scott FW**, Cloutier HE, Kleemann R, Woerz-Pagenstert U, Rowsell P, Modler HW, Kolb H (1997), Potential mechanisms by which certain foods promote or inhibit the development of spontaneous Diabetes in BB rats: Dose, timing, early effect on islet area, and switch in infiltrate from TH1 to TH2 cells. *Diabetes* 46: 589-598
- Scott FW** (1996), Food-induced Type 1 Diabetes in the BB rat. *Diabetes Metab Rev* 12: 341-359
- Séguin R**, Mann BJ, Keller K, Chadee K (1995), Identification of the galactose-adherence lectin epitopes of *Entamoeba histolytica* that stimulate tumor necrosis factor α production by macrophages. *Proc Natl Acad Sci* 92: 12175-12179
- Setrakian JC**, Yee J, Christou NV (1994), Reduced tumor necrosis factor alpha production in lipopolysaccharide-treated whole blood from patients in the intensive care unit. *Arch Surg* 129: 187-192
- Severn A**, Xu D, Doyle J, Leal LMC, O'Donnell CA, Brett SJ, Moss DW, Liew FY (1993), Pre-exposure of murine macrophages to lipopolysaccharide inhibits the induction of nitric oxide synthase and reduces leishmanicidal activity. *Eur J Immunol* 23: 1711-1714

- Sharon N, Lis H (1990)**, Legume lectins – a large family of homologous proteins. *FASEB J* 4: 3198-3208
- Shechter Y (1983)**, Bound lectins that mimic insulin produce persistent insulin-like activities. *Endocrinology* 113: 1921-1926
- Simmons BM, Philip DS, Russel JH (1986)**, Mannose receptor-mediated uptake of ricin toxin and ricin A chain by macrophages. *J Biol Chem* 261: 7912-7920
- Sobel DO, Yankelevich B, Goyal D, Nelson D, Mazumder A (1998)**, The B subunit of Cholera-Toxin induces immunoregulatory cells and prevents Diabetes in the NOD mouse. *Diabetes* 47: 186-191
- Sowalsky RA, Fox BS (1992)**, Pattern of lectin binding to murine T lymphocytes. *Immunology* 75: 92-98
- Stillmark H (1888)**, Über Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus communis L. und einigen anderen Euphorbiaceen. Thesis, Dorpat
- Stillmark H (1889)**, Über Ricin. *Arb Pharmakol Inst Dorpat* 3: 59-64
- Stoika R, Kashchak N, Lutsik-Kordovsky M, Boyko M, Tsyrunyk A (2001)**, In vitro response of phagocytic cells to immunomodulating agents. *Med Sci Monit* 7: 652-658
- Stoolman LM, Rosen SD (1983)**, Possible role for cell-surface carbohydrate-binding molecules in lymphocyte recirculation. *J Cell Biol* 96: 722-729
- Sun J-B, Xiao B-G, Lindblad M, Li B-L, Link H, Czerkinsky C, Holmgren J (2000)**, Oral administration of Cholera-Toxin B subunit conjugated to myelin basic protein protects against experimental autoimmune encephalomyelitis by inducing transforming growth factor- β -secreting cells and suppressing chemokine expression. *Int Immunol* 12: 1449-1457
- Sun J-B, Holmgren J, Czerkinsky C (1994)**, Cholera-Toxin B subunit: An efficient transmucosal carrier-delivery system for induction of peripheral immunological tolerance. *Proc Natl Acad Sci* 91: 10795-10799
- Szopa TM, Titchener PA, Portwood ND, Taylor KW (1993)**, Diabetes mellitus due to viruses-some recent developments. *Diabetologia* 36: 687-695
- Tabor DR, Theus SA, Barnett JB, Jacobs RF (1992)** Macrophage membrane glycoprotein binding of Griffonia simplicifolia I-B4 induces TNF α production and a tumoricidal response. *J Cell Physiol* 152: 500-506
- Takahashi N, Brouckaert P, Walter F (1995)**, Mechanism of tolerance to tumor necrosis factor: Receptor-specific pathway and selectivity. *Am J Physiol* 29: R398-R405
- Takata S, Ohtani O, Watanabe Y (2000)**, Lectin binding patterns in rat nasal-associated lymphoid tissue (NALT) and the influence of various types of lectin on particle uptake in NALT. *Arch Histol Cytol* 63: 305-312
- Tarkowski A, Sun J-B, Holmdahl R, Holmgren J, Czerkinsky C (1999)**, Treatment of experimental autoimmune arthritis by nasal administration of a type II collagen-cholera toxoid conjugate vaccine. *Arthritis Rheum* 42: 1628-1634
- The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (1997)**, Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 20:1183-1197

- Thiemermann C**, Wu CC, Szabo C, Peretti M, Vane JR (1993) Role of tumor necrosis factor in the induction of nitric oxide synthase in a rat model of endotoxin shock. *Brit J Pharmacol* 110: 177-182
- Thomas CJ**, Surolija A (2000), Mode of molecular recognition of L-fucose by fucose-binding legume lectins. *Biochem Biophys Res Commun* 268: 262-267
- Tiao G**, Rafferty J, Ogle C, Fischer JE, Hasselgren PO (1994), Detrimental effect of nitric oxide synthase inhibition during endotoxemia may be caused by high levels of tumor necrosis factor and interleukin-6. *Surgery* 116: 332-338
- Timoshenko AV**, Gorudko IV, Andre S, Gabius HJ (2000), Cell-type dependence of stability modulation of lectin-initiated contacts by impairment of multivalent carbohydrate binding and intracellular signaling. *Biosci Rep* 20: 199-209
- Tollefsen SE**, Kornfeld R (1983a), Isolation and characterization of lectins from *Vicia villosa*. Two distinct carbohydrate binding activities are present in seed extracts. *J Biol Chem* 258: 5165-5171
- Tollefsen SE**, Kornfeld R (1983b), The B₄ Lectin from *Vicia villosa* seeds interacts with N-Acetylgalactosamine residues α -linked to serine or threonine residues in cell surface glycoproteins. *J Biol Chem* 258: 5172-5176
- Tomioka H**, Saito H (1980), Effects of some plant lectins on hydrogen peroxide release from macrophages induced with streptococcal preparation OK-432. *Infect Immun* 28: 336-343
- Toussirot EA** (2002), Oral tolerance in the treatment of rheumatoid arthritis. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 1: 45-52
- Tracey KJ**, Cerami A (1994), Tumor necrosis factor: A pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med* 45: 491-503
- Tripathi S**, Maiti TK (2003), Stimulation of murine macrophages by native and heat-denatured lectin from *Abrus precatorius*. *Int Immunopharmacol* 3: 375-381
- Trowbridge IS** (1974), Isolation and chemical characterization of mitogenic lectin from *Pisum sativum*. *J Biol Chem* 249: 6004-6012
- Vaarala O**, Klemetti P, Juhela S, Simell O, Hyöty H, Ilonen J (2002), Effect of coincident enterovirus infection and cow's milk exposure on immunisation to insulin in early infancy. *Diabetologia* 45: 531-534
- van Dijk A**, Bauer J, Sedelmeier EA, Bessler WG (1997), Absorption, kinetics, antibody-bound and free serum determination of a ¹⁴C-labeled *Escherichia coli* extract after single oral administration in rats. *Arzneim Forsch Drug Res* 47: 329-334
- van Pham T**, Kreis B, Corradin-Betz S, Bauer J, Mauël J (1990), Metabolic and functional stimulation of lymphocytes and macrophages by an *Escherichia coli* extract (OM-89): in vitro studies. *J Biol Res Mod* 9: 231-240
- Varki**, Ajit (1994), Selectin ligands. *Proc Natl Acad Sci* 91: 7390-7397
- Vasta GR**, Quesenberry M, Ahmed H, O'Leary N (1999), C-type lectins and galectins mediate innate and adaptive immune functions: Their roles in the complement activation pathway. *Dev Comp Immunol* 23: 401-420

- Venkateswaran S, Pari L (2002)**, Antioxidant effect of Phaseolus vulgaris in streptozotocin-induced diabetic rats. *Asia Pac J Clin Nutr* 11: 206-209
- Ventura-Oliveira D, Vitella CA, Zanin ME, Castro GM, Moreira Filho DC, Zollner I (2002)**, Kinetics of TNF α and IFN γ mRNA expression in islets and spleen of NOD mice. *Braz J Med Biol Res* 35: 1347-1355
- Vilcěk J, Lee Tae H (1991)**, Tumor necrosis factor. *J Biol Chem* 266: 7313-7316
- Vink A, Schoneveld AH, van der Meer JJ, van Middelaar BJ, Sluijter JPG, Smeets MB, Quax PHA, Lim SK, Borst C, Pasterkamp G, de Kleijn DPV (2002)**, In vivo evidence for a role of Toll-like Receptor 4 in the development of intimal lesions. *Circulation* 106: 1985-1990
- Virtanen SM, Knip M (2003)**, Nutritional risk predictors of β -cell autoimmunity and Type 1 Diabetes at a young age. *Am J Clin Nutr* 78: 1053-1067
- Virtanen SM, Läärä E, Hyppönen E, Hyppönen E, Reijonen H, Räsänen L, Aro A, Knip M, Ilonen J, Åkerblom HK and the Childhood Diabetes in Finland Study Group (2000)**, Cow's milk consumption, HLA-DQB1 genotype and IDDM: A nested case-control study of siblings of children with Diabetes. *Diabetes* 49: 912-917
- Virtanen SM, Hyppönen E, Läärä E, Vahasalo P, Kulmala P, Savola K, Räsänen L, Aro A, Knip M, Åkerblom HK (1998)**, Cow's milk consumption, disease associated autoantibodies and IDDM: A follow-up study in siblings of children with Diabetes. *Diabet Med* 15: 730-738
- Virtanen SM, Jaakkola L, Räsänen L, Ylonen K, Aro A, Lounamaa R, Åkerblom HK, Tuomilehto J (1994)**, Nitrate and nitrite intake and the risk for Type 1 Diabetes in Finnish children. *Diabet Med* 11: 656-662
- Wang H, Ng TB, Ooi VE, Liu WK (2000)**, Effects of lectins with different carbohydrate-binding specificities on hepatoma, choriocarcinoma, melanoma and osteosarcoma cell lines. *Int J Biochem Cell Biol* 32: 365-372
- Wasmuth HE, Kolb H (2000)**, Cow's milk and immune-mediated Diabetes. *Proc Nutr Soc* 59: 573-579
- Weiner HL (2000)**, Oral tolerance, an active immunologic process mediated by multiple mechanisms. *J Clin Invest* 106: 935-937
- Weiner HL (1997)**, Oral tolerance for the treatment of autoimmune diseases. *Annu Rev Med* 48: 341-351
- Weiner HL (1994)**, Oral tolerance. *Proc Natl Acad Sci* 91: 10762-10765
- Wendling U, Farine JC (1998)**, Oral administration of hsp-containing E. coli extract OM-89 has suppressive effects in autoimmunity. Regulation of autoimmune processes by modulating peripheral immunity towards HSP's? *Biotherapy* 10: 223-227
- Wendling U, Bloemendal A, van Der Zee R, Rutten VP, van Kooten PJ, Farine JC, van Eden W (1997)**, Antirheumatic E. coli extract OM-89 induces T cell responses to HSP60 and 70. *Int J Immunopharmacol* 19: 565-568
- Whitehurst CE, Day NK, Gengozian N. (1994)**, A method of purifying feline T lymphocytes from peripheral blood using the plant lectin from Pisum sativum. *J Immunol Methods* 175: 189-199

- Wicker** LS, Miller BJ, Chai A, Terada M, Mullen Y (1988), Expression of genetically determined Diabetes and insulinitis in the Nonobese Diabetic (NOD) Mouse at the level of bone marrow-derived cells. Transfer of Diabetes and insulinitis to nondiabetic (NOD x B10) F1 mice with bone marrow cells from NOD mice. *J Exp Med* 167: 1801-1810
- Williams** BA, Chervenak MC, Toone EJ (1992), Energetics of lectin-carbohydrate binding. *J Biol Chem* 267: 22907-22911
- Willis** D, Moore AR, Gowland G, Willoughby DA (1995), OM-89 modulation of chronic inflammation: Relevance to clinical use. *Br J Rheumatol.* 34: 525-528
- Wilson** DM, Buckingham B (2001), Prevention of type 1a Diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes* 2: 17-24
- Wimer** BM (1998), Immunosuppressive applications of PHA and other plant mitogens. *Cancer Biother Radiopharm* 13: 99-107
- Wood** KS, Buga RE, Ignarro LJ (1990), Vascular smooth muscle-derived relaxing factor (MDRF) and its similarity to nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 170: 80-88
- Woogen** SD, Turo K, Dieleman LA, Beagley KW, Elson CO (1993), Inhibition of murine T cell activation by Cholera-Toxin B subunit is not mediated through the Phosphatidylinositol Second Messenger System. *J Immunol* 150: 3274-3283
- Wu** W, Punt JA, Granger L, Sharrow SO, Kearse KP (1997), Developmentally regulated expression of peanut agglutinin (PNA)-specific glycans on murine thymocytes. *Glycobiology* 7: 349-356
- Xie** QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C (1992), Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256: 225-228
- Yang** XD, McDevitt HO (1994), Role of TNF α in the development of autoimmunity and the pathogenesis of insulin-dependent Diabetes mellitus in NOD Mice. *Circ Shock* 43: 198-201
- Yoon** JW, Jun HS, Santamaria P (1998), Cellular and molecular mechanisms for the initiation and progression of β -cell destruction resulting from the collaboration between macrophages and T cells. *Autoimmunity* 27: 109-122
- Żak** I, Lewandowska E, Gnyp W (2000), Selectin glycoprotein ligands. *Acta Biochim Pol* 47: 393-412
- Zamze** S, Martinez-Pomares L, Jones H, Taylor PR, Stillion RJ, Gordon S, Wong SYC (2002), Recognition of bacterial capsular polysaccharides and lipopolysaccharides by the macrophage mannose receptor. *J Biol Chem* 277: 41613-41623
- Zhang** FX, Kirschning CJ, Mancinelli R, Xu XP, Jin Y, Faure E, Mantovani A, Rothe M, Muzio M, Arditi M (1999), Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor- κ B through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes. *J Biol Chem* 274: 7611-7614
- Zhang** X, Morrison DC (1993), Lipopolysaccharide-induced selective priming effects on tumor necrosis factor α and nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages. *J Exp Med* 177: 511-516

- Zhang ZJ**, Davidson L, Eisenbarth G, Weiner HL (1991), Suppression of Diabetes in Nonobese Diabetic Mice by oral administration of porcine insulin. *Proc Natl Acad Sci* 10252-10256
- Ziegler-Heitbrock** HWL (1995), Molecular mechanism in tolerance to lipopolysaccharide. *J Inflamm* 45: 13-26
- Ziegler-Heitbrock** HWL, Wedel A, Schraut W, Ströbel M, Wendelgass P, Sternsdorf T, Bäuerle PA, Haas JG, Riethmüller G (1994), Tolerance to lipopolysaccharide involves mobilization of nuclear factor κ B with predominance of p50 homodimers. *J Biol Chem* 269: 17001-17004
- Ziegler** AG, Hillebrand B, Rabl W, Mayrhofer M, Hummel M, Mollenhauer U, Vordemann J, Lenz A, Standl E (1993), On the appearance of islet associated autoimmunity in offspring of diabetic mothers: A prospective study from birth. *Diabetologia* 36: 402-408
- Ziegler-Heitbrock** HWL, Käfferlein E, Haas JG, Meyer N, Ströbel M, Weber C, Flieger D (1992), Gangliosides suppress tumor necrosis factor production in human monocytes. *J Immunol* 148: 1753-1758
- Zinetti** M, Fantuzzi G, Delgado R, Di Santo E, Ghezzi P, Fratelli M (1995), Endogenous nitric oxide production by human monocytic cells regulates LPS-induced TNF α production. *Eur Cytokine Netw* 6: 45-48
- Zingarelli** B, Chen H, Caputi AP, Halushka PV, Cook JA (1995), Reorientation of macrophage mediator production in endotoxin tolerance. *Prog Clin Biol Res* 392: 529-537

AH	Arachis hypogaea (Erdnuss)
BB-Ratten	BioBreeding Ratten
BS	Bandeiraea simplicifolia (Afrikanische Schwarzbohne) Isolektin I
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
CD4 ⁺	T-Lymphozyten Helfer-Zellen
CD8 ⁺	Zytotoxische /Suppressor-Lymphozyten
CE	Canavalia ensiformis (Schwertbohne)
CTA	Cholera-Toxin A
CTB	Cholera-Toxin B
DENIS-Studie	Deutsche Nicotinamide Intervention Study
DIPP-1 Studie	Finnish type 1 diabetes prediction and prevention project
dl	Deziliter
DPT-1 Studie	Diabetes Prevention Trial of type 1 diabetes
ecNOS	endotheliale Isoform der NO-Synthase
ENDIT-Studie	European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial
FCS	Fetales Rinderserum
g	Gramm
g	Gravitationskraft
GAD65	Glutamatdekarboxylase
GALT	gut-associated lymphoid tissue
G _{M1}	Gangliosid _{M1}
h	Stunde
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HLA	Humanes Lymphozyten Antigen
HSP	Hitzeschockprotein
IA-2	Tyrosinphosphatase
IAA	Insulinautoantikörper
ICA	Inselzellantikörper
IDDM	Insulin Dependent Diabetes Mellitus
IL	Interleukin
IFN γ	Interferon gamma (γ)
iNOS	induzierbare Isoform der NO-Synthase
i.p.	intraperitoneal
kDa	kilo Dalton
LC	Lens culinaris (Linse)

LPB	LPS-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
M-Zellen	Antigenbindende Zellen in der Darmschleimhaut
n.s.	nicht signifikant
NALT	nasal-associated lymphoid tissue
NFκB	nukleärer Transkriptionsfaktor κB
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
nNOS	neuronale Isoform der NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOD-Maus	Nonobese Diabetic-Maus
NOS	NO-Synthase
OM-89	Bakterieller Proteinextrakt aus E. coli
PL	Phaseolus limensis (Mondbohne)
ppm	parts per million
PS	Pisum sativum (Erbse)
PV	Phaseolus vulgaris (Gartenbohne)
scid	severe combined immunodeficiency
TH1	T-Helfer 1 Lymphozyten
TH2	T-Helfer 2 Lymphozyten
TLR4	Toll-like Rezeptor 4
TNFα	Tumor Nekrose Faktor α
TRIGR	Trial to Reduce IDDM in the Genetically at Risk
TV	Triticum vulgare (Weizen)
UE	Ulex europaeus (Stechginster) Isolektin I
v.a.	vor allem
VF	Vicia faba (Fava Bohne)
VS	Vicia sativa (Saatwicke)
VV	Vicia villosa (Zottelwicke)
%	Prozent
μl	Mikroliter
μM	MikroMol

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. W. A. Scherbaum danke ich für die Möglichkeit der Durchführung der Promotion in der Deutschen Diabetes-Klinik am Deutschen Diabetes-Zentrum an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.

Herrn Prof. H. Kolb danke ich nicht allein für die Überlassung des Themas, sondern auch für die zahlreichen, interessanten Anregungen, die zur erfolgreichen Fertigstellung meiner Dissertationsarbeit beigetragen haben.

Bei der Fertigstellung meiner Arbeit bin ich von vielen lieben Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. H. Kolb unterstützt worden.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Priv. Doz. Dr. V. Burkart für die unschätzbare und unentbehrliche Hilfe bei der Fertigstellung meiner Arbeit, für die immer freundlichen und aufmunternden Worte, für die zahlreichen interessanten Gespräche, woraus ich nicht nur für meine Dissertationsarbeit vieles gelernt habe. Lieber Volker, ich danke Dir!

Frau Dr. B. Hartmann für die hervorragende Betreuung und die ständige Diskussionsbereitschaft während meiner Labortätigkeit im Deutschen Diabetes-Zentrum.

Ute Vollrath und Melanie Welbers für die unermüdlichen Stunden, in denen sie meine Arbeit akribisch korrigiert haben und mir somit sehr geholfen haben.

Allen meinen Freundinnen und Freunden, die mich verstehen, und die trotz meiner oft auch beruflich bedingten Abwesenheit, in ihrem Herzen ein Plätzchen für mich freigehalten haben.

Meinen Eltern, meiner Schwester Catinca und meinem Bruder Peter, die mich immer unterstützt haben meine Ziele zu erreichen und mich darin bestärkt haben, diejenige zu sein, die ich bin.

Meinem liebevollen und starken Mann an meiner Seite, Albrecht Bialas.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Johanna Bialas (geb. Ghiea)
Geburtsdatum	11.06.1972
Geburtsort	Bukarest, Rumänien
Familienstand	verheiratet

Schul Ausbildung

1978 - 1983	Grundschule und Gymnasium, Bukarest, Rumänien
1984 - 1985	Agnes-Bernauer-Realschule, Augsburg, Deutschland
1985 - 1991	Geschwister-Scholl-Gymnasium, Ratingen
1991	Abitur

Hochschulausbildung

1992 - 1998	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
1994	Ärztliche Vorprüfung
1995	I. Staatsexamen
1997	II. Staatsexamen
1998	III. Staatsexamen

Praktische Ausbildung

Famulaturen

1994	Innere Medizin, Marien-Krankenhaus, Ratingen
1995	Pädiatrie, Shaare-Zedech-Hospital, Jerusalem, Israel
1996	Pädiatrie, IOMC-Alfred Rusescu-Krankenhaus, Bukarest, Rumänien
1996	Innere Medizin, Pennsylvania Hospital, Philadelphia, U.S.A

Praktisches Jahr

1997 - 1998	Chirurgie – Hôpital cantonal Fribourg, Schweiz Pädiatrie – Universitätskinderklinik Düsseldorf Innere Medizin – Universitätsklinik Düsseldorf
-------------	---

Berufliche Ausbildung

seit 1999	Ärztin im Praktikum und Assistenzärztin in der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Essen
2004	Anerkennung als Fachärztin für Kinder- und Jugendmedizin

Lektine modulieren die Freisetzung der β -zellschädigenden Mediatoren Tumor Nekrose Faktor α und Stickstoffmonoxid durch Makrophagen

Johanna Bialas

ZUSAMMENFASSUNG

Der Typ 1 Diabetes ist die häufigste endokrine Erkrankung des Kindes- und Jugendalters mit zunehmender jährlicher Inzidenzrate. Die Ätiologie des Typ 1 Diabetes ist vielfältig und noch nicht eindeutig geklärt. Neben der genetischen Komponente nehmen Umweltfaktoren und Nahrungsmittelbestandteile als Risikofaktoren zur Krankheitsentwicklung eine besondere Rolle ein. Experimentelle Systeme zur Erforschung der Pathogenese des Typ 1 Diabetes zeigen, dass Makrophagen und ihre Mediatoren, wie Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) und Stickstoffmonoxid (NO), wesentlich zur Initiierung der β -zellgerichteten Immunreaktion und somit zur Entstehung der Erkrankung beitragen.

Die Induktion eines Toleranzzustandes in Makrophagen über die Modulation des darmassoziierten Immunsystems und der damit möglichen Regulation der T-Zell-Reaktivität, stellt eine vielversprechende Strategie zur Prävention oder Behandlung der Immunreaktion gegen autologe β -Zellen dar. Analog zu publizierten Daten wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Vorbehandlung von Makrophagen mit dem bakteriellen Extrakt OM-89 oder mit der B-Kette des Cholera Toxins (CTB) und eine anschließende Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) zu einer deutlichen Reduktion der Produktion der β -zellschädigenden Mediatoren TNF α und NO führt. Aufgrund der experimentellen Daten besteht ein ständig wachsendes Interesse hinsichtlich der klinischen Anwendung von OM-89 und CTB sowie der Identifikation weiterer Substanzen mit immunmodulatorischem Potential.

In der vorliegenden Arbeit wurde die modulatorische Wirkung von pflanzlichen Lektinen auf Zellen der Mausmakrophagenlinien IC21 und J774A.1 analysiert. Dazu wurden die Effekte von Vorinkubationen mit Lektinen in unterschiedlichen Konzentrationen auf die LPS-induzierte Produktion von TNF α und NO gemessen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Stoffgruppe der Lektine ein beachtliches Makrophagen-modulatorisches Potential aufweist. Die Lektine von *Phaseolus limensis* (PL), *Bandeiraea simplicifolia* (BS), *Canavalia ensiformis* (CE), *Pisum sativum* (PS), *Vicia faba* (VF), *Vicia sativa* (VS) und *Phaseolus vulgaris* (PV) führen zu einer deutlichen Reduktion der LPS-induzierten TNF α -Produktion und das Lektin von PV zeigt zusätzlich eine Reduktion der NO-Produktion. Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass Lektine durch ihren modulatorischen Effekt auf Makrophagen die Entwicklung einer TH2-dominierten Immunreaktion begünstigen, die im Verlauf der Pathogenese des autoimmunen Diabetes mit einer benignen Form der β -zellgerichteten Immunreaktion assoziiert ist.

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse tragen zu einer besseren Charakterisierung der immunmodulatorischen Eigenschaften von Lektinen bei und unterstützen die Entwicklung von Strategien zur Prävention oder Therapie des Typ 1 Diabetes durch Modulation des darmassoziierten Immunsystems.

Referent: PD Dr. rer. nat. Volker Burkart