

Aus der Medizinischen Klinik I für Gastroenterologie/ Rheumatologie/
Infektiologie, CBF
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

DIE ROLLE DER ADIPOZYTEN IM ANGEBORENEN IMMUNSYSTEM

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jeannette Pietsch

aus Berlin

Gutachter: 1. Priv.- Doz. Dr. med. B. Siegmund
2. Priv.- Doz. Dr. A. Krug
3. Priv.- Doz. Dr. med. C. Maaser

Datum der Promotion: 04.02.2011

„Der erste Trunk aus dem Becher der Naturwissenschaften macht
atheistisch; aber auf dem Boden des Bechers wartet Gott.“

Werner Karl Heisenberg

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	III
I Einleitung	1
I.1 Vorbemerkung	1
I.2 Morbus Crohn	1
I.3 Fettgewebe als endokrines und immunologisches Organ	4
I.3.1 Fettgewebe als endokrines Organ	4
I.3.2 Fettgewebe als immunologisches Organ	9
I.4 Toll-like Rezeptoren	12
I.5 Herleitung der Aufgabenstellung	14
II Material und Methoden	16
II.1 Geräte	16
II.2 Labormaterial	17
II.2.1 Chemikalien	17
II.2.2 Puffer und Medien	19
II.2.3 Primer, Antikörper und Stimulanzen	21
II.2.4 Fotomaterial und Zellkultur	22
II.3 Immunologische Methoden	23
II.3.1 Zellkultur	23
II.3.2 Zytokin-Nachweis und Konzentrationsbestimmung mittels ELISA	25
II.4 Molekularbiologische Methoden	26
II.4.1 Ribonukleinsäure Isolation und Polymerasekettenreaktion	26
II.4.2 Transfer von Proteinen aus SDS-PAGE auf PVDF-Membranen (Western Blot)	28
II.5 Statistik und Abbildungen	29
III Ergebnisse	31
III.1 Einfluss des Leptin-Status auf Zellwachstum und Differenzierung	31
III.2 Nachweis von Toll-like Rezeptor mRNA und Protein	32
III.2.1 Expression von Toll-like Rezeptor mRNA	33
III.2.2 Nachweis von Toll-like Rezeptor-Protein	34
III.3 Spezifische Stimulation und Zytokinproduktion	35
III.3.1 Kinetik für IL-6	35
III.3.2 Kinetik für TNF- α	42
III.3.3 Vergleich der 72-Stundenwerte für die verschiedenen Zelllinien und TLR Liganden	44
III.3.4 Nachweis der TLR 9 Spezifität der Stimulation mit ODN 1668	48
IV Diskussion	49
IV.1 Zusammenfassung der Ergebnisse und	49
Leptin-abhängige Regulation der Toll-like Rezeptor Expression	49
IV.2 Auswirkung im Tiermodell	51
IV.3 Klinische Relevanz	55
IV.4 Fazit	56
V Zusammenfassung	58
VI Literatur	60
VII Danksagung	66

VIII	Lebenslauf	67
IX	Veröffentlichungen	68
X	Erklärung auf Eigenständigkeit	69

Abkürzungen

α -MSH	α -Melanozyten-stimulierendes Hormon
Abb.	Abbildung
AgRP	Aguti-verwandtes Peptid (agouti-related peptide)
BMI	Body Maß Index
cDNA	komplementäre DNA
CRP	C-reaktives Protein
<i>db</i>	„diabetes“
DM I	Differenzierungsmedium I
DM II	Differenzierungsmedium II
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (enzyme linked immunosorbent assay)
IL	Interleukin
JAK	Janus Kinase
LK	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid
mRNA	Boten-RNA
NF- κ B	Nukleärer Faktor- κ B
NOD	Nukleotid-Oligomerisierungsdomäne (nucleotide oligomerization domain)
NPY	Neuropeptid Y
<i>ob</i>	„obese“
Ob-Rb	Ob-Rezeptor Isoform b
ODN	Oligodeoxynukleotide
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMP	Pathogen-assoziiertes Molekülmuster (pathogen-associated molecular pattern)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PBS-T	PBS-Tween
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
POMC	Proopiomelanocortin

PPAR- γ	„peroxisome proliferator-activated receptor“
PRR	„pattern recognition receptor“
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfat)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
STAT	„signal transducer and activator of transcription“
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Th1	T-Helferzellen Typ 1
Th2	T-Helferzellen Typ 2
TIR	Toll/IL-1 Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNBS	Trinitrobenzylsulfonsäure
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRH	Thyroliberin
WT	Wildtyp

I Einleitung

I.1 Vorbemerkung

Im Körper wird überschüssig aufgenommene Energie aus der Nahrung im Fettgewebe für Hungerjahre gespeichert. Neben dieser Aufgabe zeigen Beobachtungen, dass es bei chronischen Erkrankungen wie Morbus Cushing, Typ-2 Diabetes, HIV (HARS, HIV adipose redistribution syndrome) und Morbus Crohn zu einer Umverteilung des Fettgewebes kommt. Die Ursachen für diese Umverteilung sind nicht bekannt (Pond, 2001). Jedoch scheint das Fettgewebe neben der Energiespeicherung weitere Aufgaben zu haben. In dieser Arbeit soll daher die Interaktionsmöglichkeit der Adipozyten mit dem Immunsystem und Antigenen genauer charakterisiert werden. Durch eine bessere Kenntnis der Stellung der Adipozyten im Immunsystem könnte die Rolle der Adipozyten bei chronischen Entzündungen besser verstanden werden.

I.2 Morbus Crohn

Der Morbus Crohn gehört zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Es handelt sich um eine diskontinuierlich auftretende Entzündung des gesamten Gastrointestinaltrakts, bei der charakteristischerweise gesunde und erkrankte Darmabschnitte abwechselnd nebeneinander liegen. Am Häufigsten sind das terminale Ileum und das Zökum, als regionale Ileitis oder Ileokolitis, sowie das gesamte Kolon, als Kolitis, betroffen. Histologisch zeigt sich eine transmurale Entzündung.

Schon bei den ersten Beschreibungen des Krankheitsbildes, u. a. durch Dr. B. B. Crohn im Jahre 1932, wurden die charakteristischen Ulzerationen in der Längsachse des Darms an der Grenze zum Mesenterium und die typische Klinik beschrieben. Ebenfalls beobachtet wurden eine entzündlich verdickte Darmwand und ein verdicktes, fibrotisches Mesenterium mit vermehrtem weißem Fettgewebe (B.B. Crohn, 1932). In späteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Fettgewebshypertrophie bei Beginn der Erkrankung vorhanden ist, was auf eine mögliche Beteiligung des Fettgewebes in der Pathogenese hindeutet. Dabei ist das intra-abdominale Fettgewebe bei Morbus Crohn-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen erhöht (Desreumaux, 1999).

In der chirurgischen Behandlung des Morbus Crohn werden die Fettgewebshypertrophie und die entzündlich verdickte Darmwand regelmäßig beobachtet. Auffällig ist, dass die Fettgewebshypertrophie beim Morbus Crohn häufig mit der Lokalisation der Ulzerationen, der Strikturen, der transmuralen Entzündung und mesenterialen Wanddicke korreliert (Sheehan, 1992).

In der Entstehung des Morbus Crohn scheinen die Bakterien der Darmflora eine wichtige Rolle zu spielen. Die genaue Rolle der Bakterien in der Pathogenese ist jedoch nicht bekannt. Verschiedene Hypothesen existieren, darunter die Vermutung einer erhöhten Permeabilität der Darmschleimhaut und einer damit verbundenen, erhöhten Aufnahme von Antigenen (Tamboli, 2004).

Eine Assoziation von bakterieller Translokation aus dem Darm mit konsekutiv folgender systemischer Infektion und septischem Schock ist schon lange bei polytraumatisierten Patienten bekannt. Dabei werden drei Mechanismen diskutiert, die alleine oder in Kombination zur bakteriellen Translokation führen können: 1) bakterielle Überbesiedlung durch Darmbakterien, 2) Immundefizienz des Individuums und 3) erhöhte Permeabilität oder Verletzung der Darmschleimhaut (O'Boyle, 1998; Berg, 1995).

Swidsinski et al. konnten zeigen, dass bei Morbus Crohn Patienten eine erhöhte Konzentration an Bakterien im Darm im Vergleich zu gesunden Kontrollen vorliegt. In dieser Studie wurden die höchsten Konzentrationen an Bakterien im Ileum, Sigmoid und Kolon ascendens nachgewiesen (Swidsinski, 2002). Eine weitere Studie zeigte ebenfalls, dass die Bakterienanzahl im gesamten Darm bei Morbus Crohn Patienten erhöht ist. Hier war die Bakterienkonzentration im Kolon jedoch höher als im Ileum. Die gleiche Studie wies eine erhöhte Penetration von Bakterien in das Schleimhautgewebe in Bereichen von Entzündungen nach (Kleessen, 2002). Kürzlich gelang der Nachweis, dass Bakterien nicht nur in mesenterialen Lymphknoten (LK) sondern auch im Fettgewebe direkt zu finden sind. Dabei war die Zahl der lebensfähigen Bakterien im Fettgewebe 17-fach höher als im LK (Peyrin-Biroulet, 2007).

Die häufig als kausal angenommene erhöhte Permeabilität des Epithels könnte durch einen veränderten Aufbau der Schleimschicht (Kleessen, 2002), durch Verletzungen der Schleimhaut, genetisch bedingt oder durch exogen zugeführte Substanzen

verursacht sein. Der genaue Mechanismus ist nicht bekannt. Eine veränderte und verlängerte Immunreaktion trägt ebenfalls zur Entzündung bei (Podolsky, 2002).

Dass Bakterien eine zentrale Rolle in der Krankheitsentstehung spielen könnten, wird durch die Beobachtung gestärkt, dass Morbus Crohn Patienten eine andere Darmflora als gesunde Kontrollgruppen aufweisen (Andoh, 2006; Ohkusa, 2004). So wird die bei Rindern auftretende Johne'sche Krankheit, die in ihrem Verlauf dem Morbus Crohn ähnelt, durch das *Mycobacterium paratuberculosis* verursacht. Es gibt zwar Hinweise, dass dieses Bakterium bei Morbus Crohn Patienten häufiger gefunden werden kann, jedoch ist die Datenlage bezüglich einer Beteiligung dieses Bakteriums an der Krankheitsentstehung widersprüchlich. Derzeit kann ein kausaler Zusammenhang nicht bestätigt werden (Feller, 2007). Andere Bakterien, die bei Morbus Crohn Patienten in erhöhter Anzahl auftreten und daher eingehender untersucht wurden, sind *Bacteroides vulgatus* und *Escherichia coli*. Ob diese Bakterien kausal oder sekundär vermehrt sind, ist bislang nicht eindeutig geklärt (Marteau, 2004). Dass die bakterielle Überbesiedlung eher ein sekundärer Effekt ist, wird durch den Nachweis eines veränderten Bakterienprofils bei anderen Koliden, z. B. Colitis ulcerosa, nahe gelegt (Kleessen, 2002; Andoh, 2006). Des Weiteren führt eine Antibiotikabehandlung von Morbus Crohn Patienten nur vorübergehend zu einer Verbesserung der akuten Entzündung und zeigt keine Langzeitverbesserung im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe (Andoh, 2006).

Viele Aspekte tragen zur Krankheitsentstehung des Morbus Crohn bei. Eine genetische Komponente in der Pathogenese wird durch die Beobachtung gestützt, dass Verwandte ersten Grades von Morbus Crohn Patienten ein erhöhtes Erkrankungsrisiko zeigen (Podolsky, 2002). In Zwillingsstudien konnte gezeigt werden, dass in monozygoten Zwillingspaaren häufig beide Zwillinge betroffen waren und innerhalb von zwei Jahren nach Diagnose beim ersten Zwilling der zweite Zwilling ebenfalls erkrankte (Tysk, 1988). Die „Genom-weiten Assoziations-Studien“ konnten zahlreiche Mutationen nachweisen, die mit einem erhöhten Risiko an einem Morbus Crohn zu erkranken assoziiert sind (z.B. ATG16L1, NOD2), jedoch nicht bei allen Morbus Crohn Patienten gefunden werden können (Ogura, 2001; Hugot, 2001). Des Weiteren wird angenommen, dass Lebensumstände und Umweltfaktoren eine Rolle spielen, da die Häufigkeit der Erkrankung in den Industrieländern höher ist (Karlinger, 2000). Raucher haben im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe ein

zweifach erhöhtes Risiko, an Morbus Crohn zu erkranken (Lindberg, 1988). Die Einnahme von Medikamenten (z. B. nicht-steroidale Antiphlogistika) kann den Erkrankungsbeginn herbeiführen (Evans, 1997).

Noch sind nicht alle Aspekte, die zur Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen beitragen, bekannt und ihr Zusammenspiel nicht komplett verstanden. Im Folgenden wird die Rolle des Fettgewebes als endokrines Organ und innerhalb des Immunsystems detaillierter betrachtet.

I.3 Fettgewebe als endokrines und immunologisches Organ

I.3.1 Fettgewebe als endokrines Organ

Das Fettgewebe besteht aus Fettzellen, Bindegewebszellen, Gefäßen und Immunzellen. Lange Zeit wurde es als ein inaktives, passives Bindegewebe angesehen, in dem Triglyzeride gespeichert und wieder freigesetzt werden. Neben der Aufgabe, energiehaltige Fettsäuren zu speichern, kommt dem Fettgewebe die Aufgabe zu, den Körper vor Wärmeverlust und die inneren Organe zu schützen. Diese Sichtweise veränderte sich, als man in den 1990er Jahren Leptin und nach und nach weitere Mediatoren isolierte, die im Fettgewebe produziert und frei gesetzt werden. Die Entdeckung dieser sogenannten Adipokine und deren Wirkung führte dazu, dass man das Fettgewebe als endokrines Organ definierte (Schäffler, 2005). Das Fettgewebe produziert eine Reihe klassischer Zytokine wie Interleukin (IL)-6, Tumornekrosefaktor (TNF)- α , IL-10 und Chemokine, ist aber gleichzeitig Hauptproduzent von Adipokinen wie Leptin, Adiponektin und Resistin (Peyrin-Biroulet, 2007).

Das Fettgewebe wird durch Hormone aus anderen Organen und Zytokinen zur Ausschüttung von Adipokinen stimuliert. So erhöhen Insulin, Glukokortikoide und pro-entzündliche Zytokine die Leptin-Freisetzung während Katecholamine und Testosteron die Freisetzung hemmen (Ahima, 2000). Adipositas stellt eine Dysregulation des Fettgewebes dar und kann durch seine integrative Stellung in der Energiehomöostase die verschiedenen Systeme beeinflussen (Rajala, 2003).

Adipositas ist mit einer Reihe von metabolischen und hormonellen Veränderungen, u. a. Insulinresistenz, assoziiert. Andere pathologische Veränderungen wie die Artherosklerose, der Bluthochdruck und die kardiovaskuläre Funktionsstörung

werden durch eine Insulinresistenz begünstigt. In der Entstehung der Insulinresistenz spielt TNF- α eine zentrale Rolle. TNF- α Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) wird im Fettgewebe von übergewichtigen Nagetieren und Menschen erhöht exprimiert und das Protein sezerniert. In der Zirkulation ist der Serumspiegel für TNF- α nicht erhöht, was auf eine auto- bzw. parakrine Wirkung des TNF- α hindeutet (Hotamisligil, 1995; Mohamed-Ali, 1997).

TNF- α kann seine eigene Synthese und die Produktion von IL-6 induzieren (Coppack, 2001). Dass das subkutane Fettgewebe IL-6 ausschütten kann, konnte durch Mohamed-Ali et al. gezeigt werden. Die Ausschüttung beträgt in Abhängigkeit von der Tageszeit 15 – 35 % der gesamten IL-6-Konzentration im Serum, wobei die freigesetzte Konzentration bei fettleibigen Personen höher ist (Mohamed-Ali, 1997). Eine andere Studie wies nach, dass mesenteriales Fettgewebe IL-6 in dreifach höheren Konzentrationen als subkutanes Fettgewebe freisetzt. Davon stammen 10% direkt aus Adipozyten (Fried, 1998). IL-6 ist in der Lage, die Bildung des Akutphase Proteins C-reaktives Protein (CRP) in der Leber zu induzieren. In gesunden Personen zeigt sich eine deutliche Beziehung zwischen CRP Spiegel und der Größe des Fettgewebes. Übergewichtige Personen zeigen einen erhöhten CRP Spiegel. Diese Beobachtung ist im Einklang mit der IL-6 Produktion durch Fettgewebe und mit der vermuteten konsekutiven systemischen Wirkung (Yudkin, 1999).

Die Veränderungen im Rahmen von Übergewicht führen in der Summe zu einem pro-entzündlichen Milieu, das zur Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen beiträgt und die Insulinresistenz weiter verstärken kann (Yudkin, 1999). Unter Berücksichtigung der Fettgewebssmasse ist der Beitrag der Adipozyten zum entzündlichen Milieu hoch (Rajala, 2003).

Eine Vielzahl von Mediatoren, kann durch das Fettgewebe produziert und freigesetzt werden. Durch seine Gesamtmasse ist ein systemischer Effekt anzunehmen und konnte für verschiedene Substanzen gezeigt werden (Schäffler, 2005). Ein wichtiger, u. a. im Fettgewebe freigesetzter Mediator ist das Leptin. Im Folgenden wird die Rolle von Leptin eingehender beschrieben.

Leptin

Leptin ist ein Protein, das vorwiegend in weißen Adipozyten gebildet wird und dessen Konzentration in der Zirkulation mit dem Body Mass Index (BMI) korreliert. Die Produktion von Leptin ist im subkutanen Fettgewebe höher als im viszeralen Fettgewebe. Dieses Hormon kann aber auch in anderen Geweben, z.B. Gehirn und Knochen, in geringem Umfang gebildet werden, wobei seine Konzentration in der Zirkulation von der Fettgewebsmasse abhängt. Bei Energiezufuhr steigt der Leptinspiegel im Blut und signalisiert dem Gehirn, dass die Nahrungsaufnahme beendet werden kann. Langes Fasten hingegen führt zu einem Absinken der zirkulierenden Leptinserumkonzentrationen und induziert die Nahrungsaufnahme (Mantzoros, 1999).

Erstmalig wurde über die Existenz eines Sättigungshormons in den 1950er Jahren diskutiert, als man Mäuse identifizierte, die homozygot einen Gendefekt im „*obese*“ (*ob*)-Gen aufwiesen. Diese Mäuse zeigten ein ungezügelt Essverhalten und waren übergewichtig. Sie sprachen auf die Zufuhr dieses, aus gesunden Artgenossen isolierten Faktors an. Phänotypisch ähnliche Mäuse bildeten zwar den Sättigungsfaktor, jedoch blieb die Wirkung aus. Diese Mäuse wiesen einen homozygoten Gendefekt im „*diabetes*“ (*db*)-Gen auf, dem vermutlichen Rezeptor für das *ob* Genprodukt. 1994 gelang dann die Isolierung des *ob*-Genproduktes: Leptin (Zhang, 1994).

Leptin weist eine vierfache Helixstruktur auf und gleicht darin dem Zytokin IL-6. Seine Wirkung entfaltet Leptin über die Ob–Rezeptor Isoform b (Ob-Rb), deren Stimulation zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Januskinase (JAK) und „signal transducer and activator of transcription“ (STAT) führt (Fantuzzi, 2000). Es sind sechs verschiedene Splice-Varianten des Leptinrezeptors bekannt, wobei bisher einzig für die lange Isoform, Ob-Rb, eine intrazelluläre Signaltransduktion nachgewiesen werden konnte (Sahu, 2004).

Leptin entfaltet seine Wirkung auf die Nahrungsaufnahme über die Stimulation von Ob-Rb im Nucleus arcuatus des Hypothalamus (Abb. 1). Hier wird der Rezeptor u. a. auf zwei Neuronen exprimiert. Dies ist zum einen das NPY/AgRP Neuron, welches das Neuropeptid Y (NPY) und Agouti-verwandtes Peptid (agouti-related peptide, AgRP) bildet. Zum anderen ist es das POMC Neuron, welches das

Proopiomelanocortin (POMC) bildet (Münzberg, 2005). Durch Stimulation mit Leptin wird im POMC Neuron u. a. α -Melanozyten-stimulierendes Hormon (α -MSH) gebildet, das eine Senkung des Appetits und der Nahrungsaufnahme vermittelt und gleichzeitig in den Thyroliberin (thyrotropin releasing hormon, TRH)-produzierenden Neuronen eine erhöhte TRH Expression mit konsekutiver Steigerung des Grundumsatzes anregt (Zigman, 2003; Krude, 2003). An den NPY/AgRP bildenden Neuronen wirkt Leptin inhibierend auf die Synthese dieser beiden Peptide (Münzberg, 2005). NPY stimuliert die Nahrungsaufnahme (Cowley, 1999). AgRP inhibiert die Wirkung von α -MSH (Sahu, 2004).

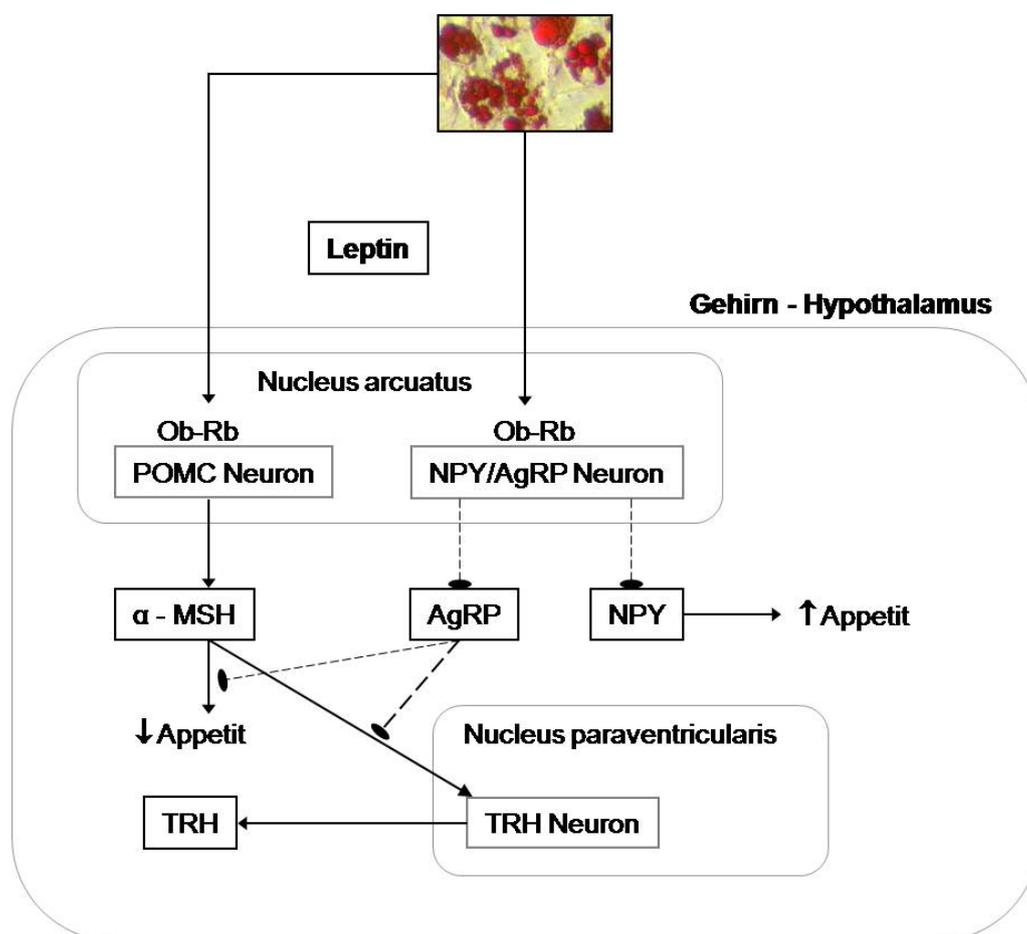


Abb. 1: Regelkreis für Leptin Leptin, vom Fettgewebe gebildet, gelangt über die Bluthirnschranke zum Hypothalamus und entfaltet dort im Nucleus arcuatus seine Wirkung auf die POMC und NPY/AgRP Neurone. Pfeile stellen Aktivierung, gestrichelt Linien Inhibierung dar.

Neben der Regulation der Nahrungsaufnahme hat Leptin weitere, sekundäre Effekte. *Ob/ob* und *db/db* Mäuse sind nicht nur dick, sondern zeigen auch ein charakteristisches, komplexes endokrinologisches Syndrom. Die *ob/ob* Mäuse

zeichnen sich durch eine erhöhte Nahrungsaufnahme, eine herabgesetzte Reproduktion, eine erhöhte Stimulation der Hypothalamus-Hypophysen-Achse mit konsekutiv erhöhten Kortisonspiegeln und einer herabgesetzten Schilddrüsenfunktion aus (Ahima, 1996). Das Übergewicht und die erhöhten Kortisonspiegel führen zu einer diabetischen Stoffwechsellaage. Durch Entfernung der Nebenniere kann die Progression des Übergewichts und des Diabetes aufgehalten werden (Leibel, 1997).

Die endokrinologischen Veränderungen in diesen Mäusen ähneln den Veränderungen, die während eines Hungerzustandes im Körper auftreten. Im Rahmen des Fastens und vergleichbar bei den *ob/ob* und *db/db* Mäusen kommt es zu Veränderungen in der Immunantwort (Fantuzzi, 2000). Im Zustand der Unterernährung ist der Organismus anfälliger für Infektionen und es kommt zu schwereren Verläufen bei Infektionen (Chandra, 1996). Für Leptin ist eine Modulation im angeborenen und erworbenen Immunsystem bekannt. So scheinen die Phagozytoseaktivität und die Ausschüttung von Zytokinen durch Makrophagen durch Leptin gesteigert zu werden (La Cava, 2004). Die Reifung von natürlichen Killerzellen wird durch Leptin ebenfalls beeinflusst, da *db/db* Mäuse ein Defizit an natürlichen Killerzellen aufweisen (Siegmond, *Eur J Immunol.* 2002). In der Proliferation der T-Lymphozyten beeinflusst Leptin die Differenzierung von T-Helferzellen vom Typ -1 (Th1) und Typ -2 (Th2). In Abwesenheit von Leptin wird die Proliferation zu Th2 begünstigt (Lord, 1998). Leptin steigert ferner die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Immunzellen, was zu einer vermehrten Aktivierung und Migration von Immunzellen zum Ort der Entzündung beitragen kann (Lord, 1998). Diese Beobachtungen zeigen, dass Leptin nicht nur in der Nahrungsaufnahme, sondern auch im Immunsystem eine wichtige regulatorische Stellung einnimmt.

Bei *ob/ob* Mäusen ist die Funktion der T-Lymphozyten herabgesetzt. Die Leptindefizienz führt zu einer verminderten Zytokinproduktion und einer erhöhten Apoptose der intestinalen Lymphozytenpopulation. Dies scheint ein Grund für den Schutz vor einer durch Natriumdextransulfat (Dextran Sulfate Sodium, DSS) oder Trinitrobenzylsulfonsäure (TNBS) induzierten Kolitis bei *ob/ob* Mäusen zu sein, da Leptinsubstitution zu einer Angleichung der Zytokinproduktion führt. Die Apoptoserate, die zur Kolitisentwicklung beiträgt, gleicht sich unter Leptinsubstitution

der Apoptoserate in Wildtypmäusen an. Leptin stellt somit einen entscheidenden Faktor in der intestinalen Entzündung dar (Siegmond, *Gastroenterology* 2002).

Während ein sinkender Leptinspiegel zu einem Entzündung verbessernden Effekt führen kann, gehen erhöhte Leptinspiegel häufig mit einer chronischen Entzündungssituation einher (LaCava, 2004). Dabei wirken exogene Substanzen wie Lipopolysaccharid (LPS) oder endogene Substanzen wie das Zytokin TNF- α als Stimuli für die Freisetzung von Leptin (Sarraf, 1997). Damit kann Leptin in der Entzündung eine pro-entzündliche Wirkung zugeschrieben werden und wirkt als Akutphase-Protein. Die pro-entzündliche Wirkung von Leptin kann allerdings nicht in allen Entzündungssituationen beobachtet werden (Koc, 2003; Yarasheski, 1997).

Beim Menschen konnten einige wenige Fälle von frühkindlich einsetzendem Übergewicht auf eine Leptindefizienz zurückgeführt werden. Das klinische Bild ähnelt den Beobachtungen in den *ob/ob* Mäusen: früh einsetzendes Übergewicht, erhöhte Nahrungsaufnahme, hypogonadotroper Hypogonadismus, erhöhte Insulinspiegel, gestörte Schilddrüsenfunktion und ein T-Zelldefekt mit verminderter T-Zellzahl (O'Rahilly, 2003). Eine erhöhte Anzahl an schwerer verlaufenden Infektionen, vor allem des Respirationstrakts, bei Kindern mit Leptindefizienz wird auf die eingeschränkte Lymphozytenzahl und -funktion zurückgeführt, da unter Leptinsubstitution die Lymphozytenzahl ansteigt und sich die Funktion verbessert (Farooqi, 2002). In einer Familie mit frühkindlichem Übergewicht konnte die Leptindefizienz auf eine homozygote Mutation im Leptin-Rezeptor zurückgeführt werden (O'Rahilly, 2003).

Zuerst für seine regulatorische Stellung in der Nahrungsaufnahme beschrieben, zeigt sich nun, dass Leptin auch eine regulatorische Funktion im Immunsystem zukommt. Dabei übt Leptin einen Einfluss auf verschiedene Zellpopulationen und damit verschiedene Arme des Immunsystems aus.

I.3.2 Fettgewebe als immunologisches Organ

Die Fruchtfliege *Drosophila* verbringt ihr Leben in einer Umgebung, die reich an Mikroorganismen ist und muss sich daher effektiv gegen Infektionen wehren können. Dies wird gewährleistet durch physikalische Barrieren (Chitinpanzer, pH-Wert), proteolytische Kaskaden, zelluläre Immunantwort (u. a. Phagozytose) und antimikrobielle Peptide (Tzou, 2002). Diese Peptide werden im Fettkörper der

Fruchtfliege bei systemischer Infektion gebildet und in die Hämolymphe abgegeben, um dort ihre bakteriolytische Aktivität zu entfalten (Hoffmann, 1997).

Zunächst wurde angenommen, dass diese Peptide bei jeder Infektion in gleichem Umfang, nicht spezifisch an die Situation angepasst, gebildet werden. Lemaitre et al. konnten jedoch zeigen, dass die Fruchtfliege in der humoralen Antwort zwischen Pilzen und Bakterien diskriminieren kann. Dabei spielen zwei Signalwege, der Spaetzle/Toll/Cactus und der IMD („immune-deficiency“) Signalweg, eine entscheidende Rolle. Der Signalweg über Spaetzle/Toll/Cactus zeigt starke Ähnlichkeit mit der in der entzündlichen Reaktion über Zytokine induzierten Nukleärer Faktor (NF)- κ B Signalkaskade (Lemaitre, 1997).

Betrachtet man die Assoziation von Fettgewebe und Lymphknoten (LK), so fällt die enge anatomische Nähe auf. Weitergehende Untersuchungen ergaben, dass die Adipozyten aus LK umgebenden Depots bei Co-Inkubation mit aktivierten Lymphozyten zu einer stark gesteigerten Lipolyse fähig sind. Je näher die Adipozyten am LK liegen, desto ausgeprägter ist dieser Effekt. Biochemisch enthalten diese Adipozyten einen höheren Anteil an von den Lymphozyten für die Proliferation benötigten mehrfach ungesättigten Fettsäuren. So sind die Fettzellen in der Lage, in kurzer Zeit die nötigen Fettsäuren für die proliferierenden Immunzellen bereitzustellen (Pond, 2001).

Klinische Daten deuten darauf hin, dass die Inzidenz und Schwere von Infektionskrankheiten bei adipösen Individuen höher ist als bei normal gewichtigen Personen. Eine Ursache könnte dadurch gegeben sein, dass das Fettgewebe u. a. eine Quelle für pro-entzündliche Zytokine und Hormone darstellt. (s. I.2.1.) Im Verlauf der Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten nimmt die Expression von NF- κ B zu und bleibt im ausgereiften Adipozyten konstitutiv erhöht. Dem folgt eine erhöhte Produktion von pro-entzündlichen Zytokinen und könnte damit einen Einfluss auf die benachbarten Makrophagen ausüben (Berg, 2004).

Ein weiteres exprimiertes pro-entzündliches Zytokin ist das Zytokin TNF- α . Bei Adipositas ist die Bildung von TNF- α mRNA und Protein im Fettgewebe erhöht (Ruan, 2002), ebenso bei Morbus Crohn (Desmeurax, 1999). TNF- α ist über eine Aktivierung von NF- κ B in der Lage, eine Vielzahl von Genen zu aktivieren oder zu supprimieren und kann darüber die Produktion von IL-6 induzieren und Immunzellen

aktivieren (Abbas, 5. Auflage, 2003). Durch die veränderte Genexpression bei Stimulation mit TNF- α verlieren Adipozyten ihre charakteristischen Merkmale und es kommt zu einer Entdifferenzierung zu Präadipozyten (Ruan, 2002). Die Untereinheit p65 von NF- κ B scheint dabei eine besondere Rolle einzunehmen. Diese Untereinheit wird wesentlich durch TNF- α induziert (Ruan, 2002) und übt einen direkten inhibierenden Einfluss auf den „peroxisome proliferator-activated receptor“ (PPAR)- γ , einen wichtigen Transkriptionsfaktor in der Differenzierung zu Adipozyten, aus. Im Weiteren werden verstärkt Zellzyklusfaktoren gebildet, die die Adipozyten wieder zur Zellteilung befähigen. Daraus resultiert eine Entdifferenzierung der Adipozyten (Ruan, 2003).

Die Hinweise für eine direkte immunologische Rolle der Adipozyten wurden durch den Nachweis bestärkt, dass Präadipozyten Eigenschaften von Makrophagen wie Phagozytose und antimikrobielle Aktivität zeigen (Cousin, 1999). Unter Entzündung nimmt die Phagozytoseaktivität der Bindegewebs-Gefäß-Fraktion des Fettgewebes zu. Diese Zunahme kann nicht allein durch eine gesteigerte Makrophagenanzahl bedingt sein, da die prozentuale Phagozytosezunahme nicht mit der gesteigerten Makrophagenanzahl korreliert. Bei übergewichtigen Individuen zeigte sich ebenfalls eine erhöhte Phagozytoseaktivität der Bindegewebs-Gefäß-Fraktion des Fettgewebes. Es wird angenommen, dass die erhöhte Phagozytoseaktivität durch die Präadipozyten erreicht wird (Cousin, 2001). Eine enge verwandtschaftliche Beziehung zwischen Präadipozyten und Makrophagen konnte durch Charrière et al. 2002 nachgewiesen werden. In dieser Studie zeigte sich, dass im Vergleich die exprimierte mRNA von Präadipozyten zu Makrophagen ähnlicher ist als im Vergleich von Präadipozyten zu Adipozyten. Präadipozyten wurden daraufhin in eine Umgebung gebracht, die die Differenzierung zu Makrophagen begünstigt. Nach Injektion von Präadipozyten in die Bauchhöhle und direkter Interaktion mit peritonealen Makrophagen wandelten sich die Präadipozyten kurze Zeit nach der Umsetzung in Zellen um, die Eigenschaften der umgebenden peritonealen Makrophagen zeigten (Charrière, 2002).

Zusammengefasst weisen diese Beobachtungen auf eine enge Beziehung zwischen Adipozyten und Zellen des Immunsystems, Makrophagen im Besonderen, hin und lassen eine funktionale Verbindung vermuten.

I.4 Toll-like Rezeptoren

Das Immunsystem kann in angeborenes und erworbenes Immunsystem unterteilt werden. Während das erworbene Immunsystem nach einigen Tagen mit einer spezifischen, durch T- und B-Lymphozyten vermittelten Reaktion auf das eingedrungene Antigen reagiert, stellt das angeborene Immunsystem die sofortige Reaktion auf das eindringende Antigen dar. Die Hauptaufgaben des angeborenen Immunsystems beinhalten die Barrierefunktion der Epithelien, Opsonierung von Bakterien, Phagozytose, Aktivierung des Komplementsystems, Aktivierung von pro-entzündlichen Signalwegen und die Beeinflussung der erworbenen Immunantwort (Janssens, 2003).

Das angeborene Immunsystem erkennt Molekülstrukturen, die für mikrobielle Pathogene charakteristisch sind und nicht in körpereigenen Zellen gefunden werden können. Diese Molekülstrukturen, auch Pathogen-assoziierte Molekülmuster (pathogen-associated molecular pattern, PAMP) genannt, sind für die jeweiligen Mikroorganismen überlebensnotwendig und unterliegen daher einer sehr geringen Mutationsrate. Erkannt werden die PAMP über die „pattern recognition receptor“ (PRR), die im Genmaterial der körpereigenen Zelle fest kodiert sind (Akira, 2001).

Der Spaetzle/Toll/Cactus Signalweg, der in der embryologischen Entwicklung der Fruchtfliege wichtig ist, ist auch für die Diskriminierung zwischen verschiedenen Pathogenen in der Immunantwort der Fruchtfliege verantwortlich (Lemaitre, 1997). Im Menschen wurden homologe Strukturen gefunden, die als PRR fungieren. Eine Gruppe der PRR, die strukturelle Ähnlichkeit zum Toll-Protein zeigt, wurde dementsprechend Toll-like Rezeptoren (TLR) genannt (Janssens, 2003). Es handelt sich um transmembranöse Proteine Typ -1, die in ihrem zytoplasmatischen Abschnitt dem IL-1 Rezeptor ähneln (Toll/IL-1 Rezeptor-ähnlich, TIR). Bis jetzt sind elf verschiedene TLRs identifiziert worden, die von verschiedenen PAMPs selektiv stimuliert werden können (Cario, 2005). Eine Übersicht über die spezifischen Liganden an den einzelnen TLRs gibt Tabelle 1. Das Erkennen der mikrobiellen Pathogene durch TLRs scheint durch die Bildung von Rezeptor-Dimeren zu erfolgen. Dabei werden vorzugsweise Homodimere gebildet, wobei TLR 2 Heterodimere mit TLR 1 oder TLR 6 formen kann (Ozinsky, 2000). Die Dimerisation führt zur Aktivierung des Signalweges über TIR. Es existieren verschiedene Signalkaskaden, die in der Bildung von NF- κ B münden. Durch NF- κ B wird eine Genexpression

induziert, die u. a. zur Bildung von pro- und anti-entzündlichen Faktoren führt (Takeda, 2005).

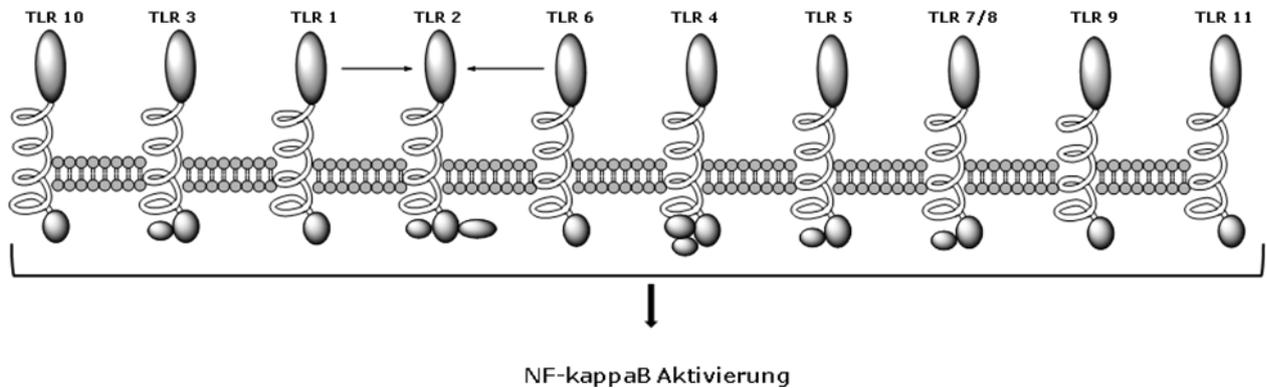


Abb. 2: Toll-like Rezeptoren

TLR werden auf unterschiedlichen Zellpopulationen, die u. a. im angeborenen Immunsystem wichtig sind, exprimiert: Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen, Epithelzellen, Leukozyten, Mikroglia (Janssen, 2003), Kardiomyozyten und Endothelzellen (Akira, 2001) und, für einige wenige TLRs gezeigt, auf Adipozyten (Lin, 2000).

Tabelle 1: TLR 1-11 mit identifizierten Liganden

Toll-like Rezeptor	Ligand	Referenz
TLR 1	Heterodimer mit TLR 2, Erkennung von bakteriellen Lipoproteinen	Wyllie, 2000; Takeuchi, 2002
TLR 2	Zymosan, LPS, andere bakterielle Zellwandbestandteile in Kooperation mit anderen Proteinen	Takeuchi, Okt. 1999 Underhill, Nature, 1999
TLR 3	zweisträge DNA (viral) Poly (I:C)	Alexopoulou, 2001
TLR 4	LPS (gram-neg.), RSV F Protein (viral)	Poltorak, 1998
TLR 5	Flagellin (bakteriell)	Gewirtz, 2001
TLR 6	Heterodimer mit TLR 2, Erkennung von bakteriellen Lipoproteinen	Takeuchi, 1999, 2001
TLR 7	Imidazoquinolin, Loxoribin, Einzelstrang RNA (viral)	Lee, 2003; Hemmi 2002
TLR 8	Einzelstrang RNA (viral) Imidazoquinolin	Heil, 2004; Jurk 2002
TLR 9	Unmethylierte Oligodeoxynukleotide (ODN) DNA (bakteriell)	Stunz,2002; Hemmi, 2000
TLR 10	?, in Maus keine Funktionalität	Hasan 2005; Takeda, 2005 Chuang, 2000
TLR 11	Uropathogene Escherichia coli, im Menschen: keine Funktionalität	Zhang, 2004

I.5 Herleitung der Aufgabenstellung

Die mesenteriale Fettgewebshypertrophie bei Morbus Crohn ist eine für diese Erkrankung charakteristische Erscheinung (Crohn, 1932), die wegen ihrer Assoziation mit entzündeten Darmabschnitten immer wieder Beachtung findet (Sheehan, 1992). Die Bedeutung für die Krankheitsentstehung bleibt bis jetzt jedoch unklar.

Neben der Energiespeicherung kommen dem Fettgewebe weitere Aufgaben zu. Es ist in der Lage, verschiedenste Mediatoren freizusetzen, die die Energiehomöostase und das Immunsystem beeinflussen (Schäffler, 2005). Durch das Fettgewebe

ausgeschüttete Zytokine wie IL-6 und die durch IL-6 induzierte Bildung von CRP in der Leber tragen zu dem pro-entzündlichem Milieu der Adipositas bei, das die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen und Insulinresistenz begünstigt (Yudkin, 1999).

Die Arbeitsgruppe um Cousin zeigte, dass Präadipozyten zu Makrophagen konvertieren und auch charakteristische Makrophagen-Aufgaben wie Phagozytose und antimikrobielle Aktivität übernehmen können (Cousin, 1999 + 2001, Charrière, 2002). Die im Rahmen der beim Morbus Crohn beobachteten Translokation von Bakterien in das Mesenterium (Peyrin-Biroulet, 2007) lässt eine Interaktion zwischen Adipozyten und eingedrungenen Antigenen vermuten. Das Immunsystem erkennt Antigene u. a. über TLRs. Bisher war bekannt, dass 3T3L1 Adipozyten TLR 4 exprimieren (Lin, 2000). Eine komplette Untersuchung des TLR-Expressionsprofils von Adipozyten ist bis jetzt jedoch nicht durchgeführt worden. In dieser Arbeit soll daher die Interaktion von Adipozyten mit Antigenen über TLR genauer charakterisiert werden.

Das vom Fettgewebe gebildete Hormon Leptin hat immunmodulatorische Wirkungen auf verschiedene Zellen im Immunsystem. Um einen möglichen Einfluss von Leptin auf das Expressionsprofil der TLR auf Adipozyten und die Reaktivität der Zellen beurteilen zu können, wurden neben Wildtyp-Zellen auch Leptin-Rezeptor defiziente und Leptin defiziente Zellen in die Untersuchung mit eingeschlossen.

II Material und Methoden

Im Folgenden sind die gebrauchten Geräte, Chemikalien, Lösungen, Primer, Antikörper und Materialien tabellarisch aufgeführt.

II.1 Geräte

Tabelle 2: Laborgeräte in der Übersicht

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank	HeraCell 240	Heraeus, Hanau
Digitalkamera	Coolpix 4500	Nikon, Tokyo, Japan
Elisa Reader	SpectraMax 540PC	Molecular Devices GmbH, München
Feinwaage	BD 210D	Sartorius, Göttingen
Gefrierschrank	Premium (-20°) (-80°C)	Liebherr International Deutschland GmbH, Biberach an der Riss
Gelelektrophorese-Kammer	Mini-Protean 3 System	Bio Rad Laboratories GmbH, München
Heizblock	Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg
Kamera	Polaroid DS34	Polaroid Corporation, Waltham, USA
Kühlschrank	Comfort, Gastro line	Liebherr
Mehrkanalpipette	Research; 30 µl-300 µl	Eppendorf
Multikanalpipette	Multipette plus	Eppendorf
Mikroskop	MBL 3100	A. Krüss Optronic GmbH, Hamburg
Netzgerät	PowerPac Basic	Bio Rad
PCR Elektrophorese-Kammer	Wide mini-sub Cell GT	Bio Rad
Photometer	Tecanspectra Mini	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
„Pipet boy“	Easypet	Eppendorf
Pipetten	Research 0,1-1,5 µl; 0,5-10 µl; 2-20 µl; 20-200 µl; 100-1000 µl Pipet boy 0,2-2 µl; 1-10 µl; 2-20 µl; 20-100 µl; 50-200 µl; 200-100 µl Mikroliterspritze 705N 50 µl	Eppendorf Gilson Inc., Middleton, USA Hamilton, Bonaduz, Ch
Reinstwasseranlage	Milli-Q-Synthesis	Millipore GmbH, Schwalbach/Ts.
Röntgenfilm-Entwickler	Kodak X-OMat 500 RA Processor	Kodak GmbH, Stuttgart
Schüttler	Vibray VXR basic	IKA Labortechnik, Staufen
Sterilbank	HeraSafe	Heraeus
Thermocycler	T3000	Biometra GmbH, Göttingen

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
UV Kontaktlampe	Chroma 43	Kurt Migge GmbH, Heidelberg
Thermomixer	Thermomixer compact	Eppendorf
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waagen	Analytical Standard AS60S Scout II	OHAUS, Nänikon, Ch OHAUS
Wasserbad	Isotemp 210	Fisher Scientific GmbH, Hagen
Western Blot Kammer	Mini Trans-Blot Cell	Bio Rad
Zentrifugen	Centrifuge 5403 Centrifuge 5810R Biofuge pico Fresco 21 Centrifuge Megafuge 1.0R Micro-Centrifuge II	Eppendorf Eppendorf Heraeus Heraeus Heraeus Chiron Scientific Inc., Sylvania, USA

II.2 Labormaterial

II.2.1 Chemikalien

Tabelle 3: Übersicht über die Chemikalien

Chemikalie	Katalognummer	Hersteller
Acrylamid 30%	3037.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Agarose NEEO Ultra	2267.4	Carl Roth
Ammoniumpersulfat 3%	A 3678	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Amphotericin B (250 µg/ml)	A 2610	Biochrom AG, Berlin
Aqua ad injectabile	3703444	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Bisacrylamid 2%	3039.2	Carl Roth
BD Opt EIA™ Maus IL-6	555240	BD Bioscience, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
BD Opt EIA™ Maus TNF	555268	BD Bioscience
Rinderserum Albumin Fraction V	K45-001	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Rinderserum, fetal	SBF311YK	Linaris GmbH, Wertheim
Chloroform	6340.1	Carl Roth
DMEM/HAM's F-12 w/Glu	H15-813	PAA
DMEM/High Glucose w/Glu	H15-810	PAA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	D 2650	Sigma-Aldrich
DNase I, Amplification Grade	18068015	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
ECL Western Blott Nachweis Reagenz	RPN 2209	Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Ethanol	8006	J.T.Baker, Deventer, Holland
Ethidiumbromidlösung 1 %	2218.1	Carl Roth

Chemikalie	Katalognummer	Hersteller
Formaldehyd	104003	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerin	3783.1	Carl Roth
Glycin	23390	Carl Roth
GoTaq Flexi DNA Polymerase	M8306	Promega GmbH, Mannheim
Guanidinhydrochlorid 99 %	G 3272	Sigma-Aldrich
Harnstoff	3941.1	Carl Roth
Hydrocortison		Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe
Insuman Rapid (40i.E./ml)		Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt
2-Propanol (> 99,8%)	6752.3	Carl Roth
Kaliumchlorid	1049360500	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	1048729025	Merck
Magermilchpulver (nonfat dry milk)	170-6404	Bio Rad Laboratories GmbH
β -Mercaptoethanol	516732	Sigma-Aldrich
M-MLV reverse Transkriptase	28025013	Invitrogen
Methanol	4627.5	Carl Roth
3-Isobutyl-1-Methylxanthin	I 5879	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	3957.2	Carl Roth
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	4984.3	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	L3771	Sigma-Aldrich
Oil Red-O	O 0625	Sigma-Aldrich
Penicillin (10000 Units/ml) / Streptomycin (10mg/ml)	P11-010	PAA
peqGOLD TriFast	30-2020	PEQLAB GmbH, Erlangen
Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	100573	Merck
Precision Plus Protein Standards Dual Color	161-0374	Bio Rad
Protein Assay	500-0006	Bio Rad
RNAseOUT Rekombinanter Ribonuklease Inhibitor	10777019	Invitrogen
ROTI Mix 3	L785.3	Carl Roth
Salzsäure (HCl)	100317	Merck
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	100732	Merck
Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer (50x)	M 3087.1000	Genaxxon GmbH, Biberach
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	161-0800	Bio Rad
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) Substratreagenset	555214	BD Bioscience
Triton X-100	T9284	Sigma-Aldrich
Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan	4855.2	Carl Roth
Trypanblau	9359	Fluka Chemie AG, Basel, CH

	0,5 ml β -Mercaptoethanol 1,5 ml Glycerin 1 Spatelspitze Bromphenolblau	
Sammelgelpuffer	36,6 g Tris pH 6,7	ad 500 ml mit Aqua bidest
Trenngelpuffer	181,5 g Tris 240 ml 1 N HCl	ad 500 ml mit Aqua bidest
Sammelgellösung	16,5 ml Acrylamid 30% 2,5 ml Bisacrylamid 2%	
Trenngellösung	41,6 ml Acrylamid 30% 8,9 ml Bisacrylamid 2%	
Transferpuffer	3,03 g Tris 14,5 g Glycin 200 ml Methanol 20%	ad 1 l mit Aqua bidest
Strippuffer-Grundlösung	20 ml 10% SDS 3,1 ml 2M Tris	ad 100 ml mit Aqua bidest
Strippuffer	20 ml Strippuffer-Grundlösung 174,5 μ l β -Mercaptoethanol	
Blockpuffer für Western Blot	5 g Magermilch	ad 100 ml mit PBST

Kulturmedien:

Präadipozyten: (BL6, <i>ob/ob</i> , <i>db/db</i>)	500 ml DMEM/HAM's F-12 w/Glu 50 ml FCS 5 ml Penicillin/Streptomycin 500 μ l Amphotericin B
Präadipozyten: (3T3)	500 ml DMEM (1x) High Glucose w/Glu 50 ml FCS 5 ml Penicillin/Streptomycin 500 μ l Amphotericin B
Differenzierungsmedium I: Grundmedium Präadipozyten (je nach Zellart) (DM I)	Insulin (Insuman®) 100 nM (bei 40 i.E./ml) Hydrocortison 0,25 μ M (50 mg/ml) 1-Methyl-Isobutylxanthin 0,5 mM
Differenzierungsmedium II: Grundmedium Präadipozyten (je nach Zellart) (DM II)	Insulin (Insuman®) 5 μ g/ml

II.2.3 Primer, Antikörper und Stimulanzen

Tabelle 4: Primersequenzen für die PCR, alle Primer wurden von TIB MOLBIOL GmbH, Berlin hergestellt.

Primer	Sequenz
mTLR 1	forward: ggA TgT gTC CgT CAg CAC TA backward: TgT AAC TTT ggg ggA AgC Tg
mTLR 2	foward: AAA ATg TCg TTC AAg gAg Backward: TTg CTg AAg Agg ACT gTT
mTLR 3	forward: ACT TgC TAT CTT ggA TgC backward: AgT TCT TCA CTT CgC AAC
mTLR 4	forward: CCT gAT gAC ATT CCT TCT backward: AgC CAC CAg ATT CtC TAA
mTLR 5	forward: gCT TTg TTT TCT TCg CTT Cg backward :ACA CCA gCT TCT ggA Tgg TC
mTLR 6	forward: gCA ACA TgA gCC AAg ACA gA backward: gTTT TTg CAA CCg ATT gTg Tg
mTLR 7	forward: TgA CTC TCT TCT CCT CCA backward: gCT TCC Agg TCT AAT CTg
mTLR 8	forward: TCC Tgg ggA TCA AAA ATC AA backward: AAg gTg gTA gCg CAg TTC AT
mTLR 9	forward: ACC CTg gTg Tgg AAC ATC AT backward: gTT ggA CAg gTg gAC gAA gT
GAPDH	forward: ACC ACA GTC CAT GCC ATC CAC backward: TCC ACC ACC CTG TTG CTG GTA

Tabelle 5: Primäre Antikörper für Western Blot

Primär Antikörper für Westernblot	Isotyp	Katalognummer	Hersteller
Anti-TLR 2	Hase IgG	IMG-526	Imgenex, San Diego, USA
Anti-TLR 3	Hase IgG	IMG-516	Imgenex
Anti-TLR 4	Hase IgG	IMG-579	Imgenex
Anti-TLR 5	Hase IgG	IMG-580	Imgenex
Anti-TLR 7	Hase IgG	IMG-581	Imgenex
Anti-TLR 8	Maus IgG	IMG-321A	Imgenex
Anti-TLR 9	Hase IgG	IMG-431	Imgenex
Monoklonales Anti-β-Actin	Maus IgG	A 5441	Sigma-Aldrich

Tabelle 6: Sekundäre Antikörper für Western Blot

Sekundär Antikörper für Westernblot	Isotyp	Katalognummer	Hersteller
Polyklonale Ziege Anti-Hase-Avidin-Meerrettich-Peroxidase	Ziege IgG	P0448	Dako Cytomation, Glostrup, DK
Polyklonale Hase Anti-Maus-Avidin-Meerrettich-Peroxidase	Hase IgG	P0161	Dako

Tabelle 7: Übersicht über die Stimulanzen

Stimulanz	TLR	Katalognummer	Hersteller
Zymosan	TLR 2	tlrl-zyn	InvivoGen, San Diego, USA
Poly (I:C)	TLR 3	tlrl-pic	InvivoGen
LPS	TLR 4	tlrl-pelps	InvivoGen
Flagellin	TLR 5	tlrl-stfla	InvivoGen
Loxoribin	TLR 7	tlrl-lox	InvivoGen
ODN 1668	TLR 9	5' – TsCsC sAsTsg sAsCsg sTsTsC sCsTsg sAsTsg sCsT	TIB MOLBIOL GmbH
ODN 2088	TLR 9	5' – TsCsC sTsgsg sCsgsg sgsgsA sAsgsT	TIB MOLBIOL GmbH

II.2.4 Fotomaterial und Zellkultur

Tabelle 8: Labormaterial

Material	Bezeichnung	Hersteller
ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)	Nunc Immuno Module Maxisorp Loose	Nunc, Roskilde, DK
Handschuhe	Derma Clean S, M, L	
Multipette	Combitips plus 2,5 ml 10 ml	Eppendorf
Whatman Papier	GB 002 Gel-Blotting Paper	Schleicher & Schuell, Dassel
Parafilm	Parafilm M	American National Can, USA
PCR-Röhrchen	Quali-PCR-Tubes	G. Kisker Gbr, Steinfurt
Pipetten	5 ml 10 ml 25 ml	Corning Incorporates, Schiphol-Rijk, NE
Pipettenspitzen	10 µl, farblos 200 µl, gelb 1000 µl, blau	Sarstedt, Nuembrecht Sarstedt Brand GmbH+CoKG, Wertheim
Reaktionsgefäße	1,5 ml 2 ml	Sarstedt Eppendorf
Röntgenfilme	ECL-Hyperfilm	Asherham GEHealthcare,
Spritzenfilter	Rotilabo 0,22 µM 0,45 µM	Carl Roth
Transfermembran	Immobilon-P	Millipore
Zellkulturflaschen	25 cm ² 75 cm ²	Sarstedt
Zellkulturplatten	6 Näpfe 12 Näpfe 24 Näpfe 48 Näpfe	Nunc GmbH + Co. KG, Wertheim
Zellschaber	Falcon Einweg Zellschaber	BD Bioscience

Material	Bezeichnung	Hersteller
Zentrifugenröhrchen	15 ml 50 ml	Sarstedt
Zählkammer	Neubauer Tiefe 0,100 mm; 0,0025 mm	Optik Labor

II.3 Immunologische Methoden

III.3.1 Zellkultur

Kultivierung von Präadipozyten

Kultiviert wurden C57BL/6 (BL6), C57BL/6-Lep^{ob} (*ob/ob*) und C57BL/KSOlaHsLepr^{db} (*db/db*) sowie 3T3L1 Zelllinien. Die ersten drei genannten Zelllinien wurden im Labor etabliert und ursprünglich aus dem mesenterialen Fett von folgenden Mäusen isoliert: Wildtyp (WT) C57BL/6, Leptin-defizienten C57BL/6-Lep^{ob}, für die lange Isoform des Rezeptors (Ob-Rb) Leptin-Rezeptor-defizienten C57BL/KSOlaHsLepr^{db}. Die Präadipozyten der Zelllinien BL6, *ob/ob* und *db/db* wurden in DMEM/F-12 Präadipozyten Kulturmedium kultiviert. Die 3T3L1 Zelllinie wurde in DMEM High Glucose Präadipozyten Kulturmedium kultiviert. Die Zellkultur erfolgte bei 37°C, 6 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank (HERAEUS, Hanau).

Nach Aufbringen der Zellen auf die Kulturplatte konfluieren sie in der Regel nach zwei bis fünf Tagen und konnten erneut umgesetzt oder der Differenzierung (s. u.) zugeführt werden. Zum Umsetzen wurde das Medium entfernt, mit PBS gewaschen und die Zellen durch Zugabe von Trypsin aus dem Zellverband gelöst. Die vereinzelt Zellen wurden in Medium aufgenommen, in einer Neubauer Zählkammer gezählt und in geeigneter Zellzahl resuspendiert, so dass für *ob/ob* 1 x 10⁴/Napf, *db/db* 2 x 10⁴/Napf und BL6 und 3T3L1 1 x 10⁴ Zellen/Napf auf einer 12 Napf Platte aufgebracht werden konnten.

Differenzierung zu Adipozyten

Um Präadipozyten in Adipozyten zu differenzieren, wurde durch Zugabe von Differenzierungsmedium I und II die Differenzierung zu Adipozyten induziert. In Gegenwart des Differenzierungsmediums I (DM I) wurden die Zellen für vier bis sechs Tage kultiviert. Darauf erfolgte ein Wechsel von DM I auf das

Differenzierungsmedium II (DM II), das alle drei bis fünf Tage gewechselt wurde, bis mindesten 60 % der behandelten Zellen differenziert waren.

Färbung von Adipozyten

Zur optischen Darstellung von angereicherten Lipiden wurden die zu Adipozyten differenzierten Zellen mit Oil Red-O gefärbt. Für die Färbung wurde aus der Oil Red-O Stocklösung eine Gebrauchslösung (24 ml der Stammlösung, 16 ml destilliertem Wasser) hergestellt und nicht gelöste Pulverbestandteile abfiltriert. Zur Färbung wurden die Zellen gewaschen und mit 3,7 % Formaldehyd in PBS fixiert. Nach der Fixierung erfolgte die Färbung der Zellen für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT). Die gefärbten Adipozyten konnten unter dem Mikroskop ausgewertet und fotografiert werden.

Stimulation von Adipozyten

Differenzierte Adipozytenkulturen wurden in Stimulationsexperimenten eingesetzt. Dabei erfolgte eine Stimulation der Adipozyten mit TLR spezifischen Liganden, die dem DM II zugesetzt waren (Konzentrationen: siehe Tabelle 9). Die Konzentrationen wurden in Anlehnung an die aktuelle Literatur gewählt, daher resultieren auch die unterschiedlichen Einheiten bei den Konzentrationsangaben.

Tabelle 9: TLR spezifische Liganden zur Stimulation mit Angabe der eingesetzten Konzentration.

TLR	Name	Konzentration
2	Zymosan	10 µg/ml
3	Poly I:C	25 µg/ml
4	LPS	1 µg/ml
5	Flagellin	10 ng/ml
7	Loxoribin	10 µM
9	ODN 1668	0,5 µM
9	ODN 2088	0,5 µM

Die Stimulation erfolgte in einer 12 Napf Platte (zwei Nöpfe für einen Liganden) über einen Zeitraum von drei Tagen, wobei zu den Zeitpunkten acht Stunden, 24 Stunden und 72 Stunden jeweils 400 µl Mediumüberstände als Proben für eine Zytokinbestimmung im ELISA abgenommen wurden.

II.3.2 Zytokin-Nachweis und Konzentrationsbestimmung mittels ELISA

Die Mediumüberstände wurden im ELISA auf die Zytokine IL-6 und TNF- α getestet. Für den Nachweis wurden BD OptEIA™ Sets (BD Biosciences Pharmingen) verwendet. Am ersten Tag wurde der Beschichtungsantikörper in Beschichtungspuffer verdünnt. Die entsprechenden Verdünnungen sind in Tabelle 10 angegeben.

Tabelle 10: Übersicht der Verdünnungen der Primärantikörper im Zytokin ELISA.

Antikörper	Verdünnung
IL-6	1 : 250
IL-10	1 : 250
TNF- α	1 : 250

Je Napf wurden 100 μ l Beschichtungspuffergemisch auf eine 96 Napf Platte aufgebracht und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Platten mit 300 μ l PBS-T/Napf dreimal gewaschen, überschüssiges PBS-T entfernt, die Platten mit ca. 200 μ l Blockpuffer/Napf geblockt und für eine Stunde bei RT inkubiert. Es folgte erneut der oben beschriebene Waschschrift. Nach dem Waschen wurden die Proben und der Standard in Blockpuffer verdünnt und im Doppelansatz aufgetragen. Die Standards wurden in den Bereichen von 1000 bis 15,6 pg/ml für IL-6 und 1000 bis 15,6 pg/ml TNF- α eingesetzt.

Nach zweistündiger Inkubation wurde gewaschen und vom Nachweisantikörper zusammen mit Avidin-Meerrettich-Peroxidase-Reagenz (Verdünnung siehe Tabelle 10), je Napf 100 μ l aufgetragen und für eine Stunde inkubiert. Durch gründliches Waschen mit PBS-T wurde das Nachweisantikörpergemisch entfernt. Im Anschluss wurden je 100 μ l/Napf der Substratlösung aus einer 1:1 Mischung von Tetramethylbenzidin und Hydrogenperoxid auf die Platte aufgetragen. Die Reaktion wurde nach maximal 30 min mit 1 M Schwefelsäure gestoppt und die Farbintensität, und damit die Zytokinkonzentration in der Probe, mit Hilfe des ELISA-Reader Tecanspectra Mini der Firma Tecan bestimmt.

II.4 Molekularbiologische Methoden

II.4.1 Ribonukleinsäure Isolation und Polymerasekettenreaktion

RNA und Protein Isolation mit peqGold TriFast™

„peqGold TriFast™“ enthält Phenol und Guanidinisothiocyanat und ist ein Reagenz, das die Isolation von RNA, Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Proteinen ermöglicht. Zur RNA-Isolation wurden Zellen der Mediumkontrolle nach 72 Stunden in 500 µl peqGold TriFast™ homogenisiert. Diese Homogenate wurden mit 100 µl Chloroform versetzt und nach fünf minütiger Inkubation bei RT für 15 min bei 12000 g und 4° C zentrifugiert. Dabei kam es zur Auftrennung des Homogenats in drei Phasen:

1. eine obere, wässrige Phase mit RNA
2. eine Interphase mit Proteinen und DNA und
3. eine untere, organische Phase mit Proteinen und DNA

Die RNA-haltige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und nach Zugabe von 0,5 µl Glykogen und Isopropanol bei RT inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das RNA-Pellet mit 75% Ethanol gewaschen. Es folgte eine weitere Zentrifugation. Der Überstand wurde verworfen, das vorhandene Pellet nach Trocknen in RNase freiem Wasser vollständig resuspendiert.

Zur Isolation der in der Interphase und organischen Phase befindlichen Proteine wurden beide Phasen mit 100 % Ethanol versetzt und nach drei-minütiger Inkubation zentrifugiert. Der Phenol-Ethanolüberstand mit den Proteinen wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit Isopropanol versetzt und für zehn Minuten inkubiert. Bei der anschließenden Zentrifugation fielen die Proteine aus. Es folgten drei Waschschriffe des Proteinpellets mit 0,3 M Guanidinhydrochlorid (in 95 % Ethanol) und einem Waschschriff mit 100 % Ethanol. Nach jedem dieser Waschschriffe wurde zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die vom Überstand getrennten Proteine wurden in 50–300 µl 1 % SDS aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C gelagert.

Herstellung von cDNA

RNA wurde in einer reversen Transkription zu komplementärer DNA (cDNA) transkribiert. Zunächst wurde die RNA vollständig gelöst und anschließend die DNA verdaut. Dazu wurden 20 µl RNA-Lösung mit 1 µl DNase I, 2,5 µl DNase Puffer und 1,5 µl RNase freiem Wasser für 20 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 2,5 µl EDTA und Inkubation bei 65°C mit anschließender Kühlung auf Eis wurde die Reaktion gestoppt. Im nächsten Schritt wurden der Probe 2 µl Primer Oligo(dT) und 4 µl Nukleotide sowie 20,5 µl RNase/DNase freies Wasser zugegeben. Es folgte eine erneute Inkubation bei 65°C und einer anschließenden Kühlung auf Eis. Nach Zugabe von 1 µl RNase out, 8 µl DTT und 16 µl „5 x First-strand Puffer“ wurden die Proben kurz bei 37°C inkubiert. Schließlich wurde 1 µl M-MLV reverse Transkriptase zur Probe zugegeben. In einer 50-minütigen Inkubation bei 37°C erfolgte die Umschreibung. Die Reaktion wurde durch Inkubieren bei 70°C für 15 min beendet. Die cDNA wurde bei 4°C gelagert.

PCR und Trennung im Agarosegel

Die cDNA wurde einer PCR zugeführt. Zur Kontrolle der reversen Transkription wurde zunächst eine PCR für GAPDH durchgeführt. Zeigte sich eine deutliche Bande, so wurden mit den cDNA Proben weiter führende PCRs mit Primern für TLR 1 bis 9 durchgeführt. Hierzu wurde in ein PCR Reaktionsgefäß 36,8 µl RNase freies Wasser, 5 µl PCR Puffer, je 1 µl forward und backward Primer, 1 µl Nukleotide und 0,2 µl Taq Polymerase je Ansatz pipetiert. Es folgte eine PCR. Einer initialen Denaturierung für 2 min bei 94°C folgten 40 Zyklen mit 1 min bei 94°C, 1 min Annealing bei 55°C, 2 min Elongation bei 72°C und zum Abschluss 10 min Prolongation bei 72°C. Die PCR wurde auf 4°C herunter gekühlt und gelagert. Zum Bandennachweis wurde ein 2% Agarosegel mit 0,01% Ethidiumbromid hergestellt und 15 µl PCR Produkt von jedem Ansatz auf das Gel aufgetragen. An das Gel wurde in einer mit TAE gefüllten Wanne eine Spannung von 110 mV angelegt. Nach 60 min wurde das Gel unter UV Licht fotografiert und die fluoreszierenden Banden ausgewertet. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ. Die optische Intensität wurde in Vergleich zur GAPDH Bande der Probe densitometrisch bewertet. GAPDH erhielt die höchste Intensität. Die übrigen Banden wurden in relativer Intensität hierzu gewertet.

II.4.2 Transfer von Proteinen aus SDS-PAGE auf PVDF-Membranen (Western Blot)

Proteingewinnung mit Proteinlysepuffer

Zur Proteingewinnung wurden Adipozyten mit 300 – 500 µl Proteinlysepuffer pro Napf versetzt, für 10 min bei RT inkubiert und anschließend die Proteine aus dem Napf in ein Eppendorfgesäß überführt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Bradfordproteinbestimmung und Probenvorbereitung

Die in 1% SDS aufgenommenen Proteine wurden 1:10 in 0,9% NaCl verdünnt, Proteinproben aus der Proteinlyse konnten ohne weitere Verdünnung in der Bradford Proteinbestimmung getestet werden. Zur Bestimmung wurden Doppelwerte von Probe und Standard (BSA 100 µg – 50 µg/ml) gemessen. Auf 5 µl vorgelegter Probe oder Standard wurden 200 µl BioRad Protein Assay Färbung pipettiert. Nach 5 min Einwirkzeit erfolgte die Messung am Spectra Max 540PC.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) und Westernblot

Für den Westernblot wurde eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml eingesetzt, wozu das Protein in SDS Probenpuffer zu einem Endvolumen von 30 µl aufgenommen wurde. Der Proben-Puffer-Mix wurde für 5 min in heißem Wasser gekocht und die Proben anschließend auf die SDS-PAGE aufgetragen. Für die SDS-PAGE wurde ein Trenngel hergestellt und mit einem Sammelgel überschichtet.

Tabelle 11: Zusammensetzung der Gele für die SDS-Page

Trenngel	Sammelgel
2,6 ml Untergel-Lösung	300 µl Obergel-Lösung
1 ml Trenngelpuffer	150 µl Sammelgelpuffer
50 µl 10 % SDS	12,5 µl 10 % SDS
1,5 ml 8 M Harnstoff	750 µl 8 M Harnstoff
113 µl Ammoniumpersulfat	38 µl Ammoniumpersulfat
5 µl TEMED	1,3 µl TEMED

Nach der Polymerisation der Gele wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt, die Taschen mit Elektrophoresepuffer gespült und die Proben auf das Gel geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V so lange, bis der Probenpuffer am

unteren Ende auszulaufen begann. Zum Transfer wurde das Gel auf eine in Methanol und Wasser equilibrierte Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran gelegt und die Proteine für 55 min bei 250 mA transferiert. Die Folie wurde für 60 min in einer 5% Magermilch-Lösung geblockt. Über Nacht erfolgte bei 4°C die Inkubation mit dem ersten Antikörper. Die eingesetzten Antikörper sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Auflistung der WB Antikörper mit Angabe des Isotyps und der eingesetzten Konzentration bzw. Verdünnung

Antikörper	Isotyp	Konzentration
TLR2	Hase IgG	1,5 µg/ml
TLR3	Hase IgG	1,5 µg/ml
TLR4	Hase IgG	1,5 µg/ml
TLR5	Hase IgG	1:1000 Verdünnung
TLR7	Hase IgG	2 µg/ml
TLR9	Hase IgG	0,5 µg/ml
β-Aktin	Maus IgG	1:2000 Verdünnung

Am Folgetag wurde nicht gebundener Primärantikörper entfernt und als zweiter Antikörper ein Avidin-Konjugat eingesetzt. Je nach Isotyp und Spezies des ersten Antikörpers handelte es sich entweder um einen anti-Hase oder um einen anti-Maus Antikörper (Verdünnung 1:2000 in PBS-T). Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper erfolgte für 60 min. Nicht gebundenes Konjugat wurde entfernt und die Folie für 1min in ECL Reagenz getränkt. Durch einen Röntgenfilm erfolgte der Nachweis der markierten Proteine. Der Röntgenfilm wurde für Zeitintervalle von 15 sek bis 13 min aufgelegt.

Um den Blot wiederzuverwenden, wurde die Folie mit 174,5 µl β-Mercaptoethanol pro 20 ml Strippuffer für 5 min im 50 °C heißem Wasserbad inkubiert, um so den gebundenen Antikörper zu denaturieren und abzulösen. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS-T konnten weitere Western Blots durchgeführt werden.

II.5 Statistik und Abbildungen

Die dargestellten Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte durch den Mann-Whitney-Test. Die verwendete Software war SPSS[®] Version 14.0.1, SPSS Inc.. Die Abbildungen

wurden mit Microsoft® Office Excel 2003, Microsoft® Office Power Point® 2003 und CambridgeSoft® ChemBioDraw Ultra 11.0.1 erstellt.

III Ergebnisse

III.1 Einfluss des Leptin-Status auf Zellwachstum und Differenzierung

Die im Labor etablierten Präadipozyten-Zelllinien und die 3T3L1-Zelllinie wurden in Präadipozytenmedien kultiviert. Dabei zeigte sich ein unterschiedliches Wachstumsverhalten. Während die BL6- und 3T3L1-Zellen bereits nach zwei bis drei Tagen einen dichten Zellrasen bildeten und umgesetzt bzw. differenziert werden konnten, benötigten die *db/db*- und *ob/ob*-Zellen vier bis fünf Tage. Hatten die Zellen die Konfluenz erreicht, wurde die Differenzierung zu Adipozyten mit DM I und DM II induziert. Abbildung 3 zeigt die vier Zelllinien in der Differenzierung und den zeitlichen Verlauf der Lipideinlagerung. Die zugesetzten Hormone induzierten die Reifung der Präadipozyten zu Adipozyten. Die Reifung konnte durch voranschreitende Lipideinlagerungen beobachtet werden. Dabei zeigten die *db/db*- bzw. *ob/ob*-Zelllinien bereits nach einem Tag Lipideinlagerungen, wohingegen die WT-Zelllinien nach zwei Tagen (3T3L1) bzw. erst ab dem vierten Tag (BL6) Lipideinlagerungen aufwiesen.

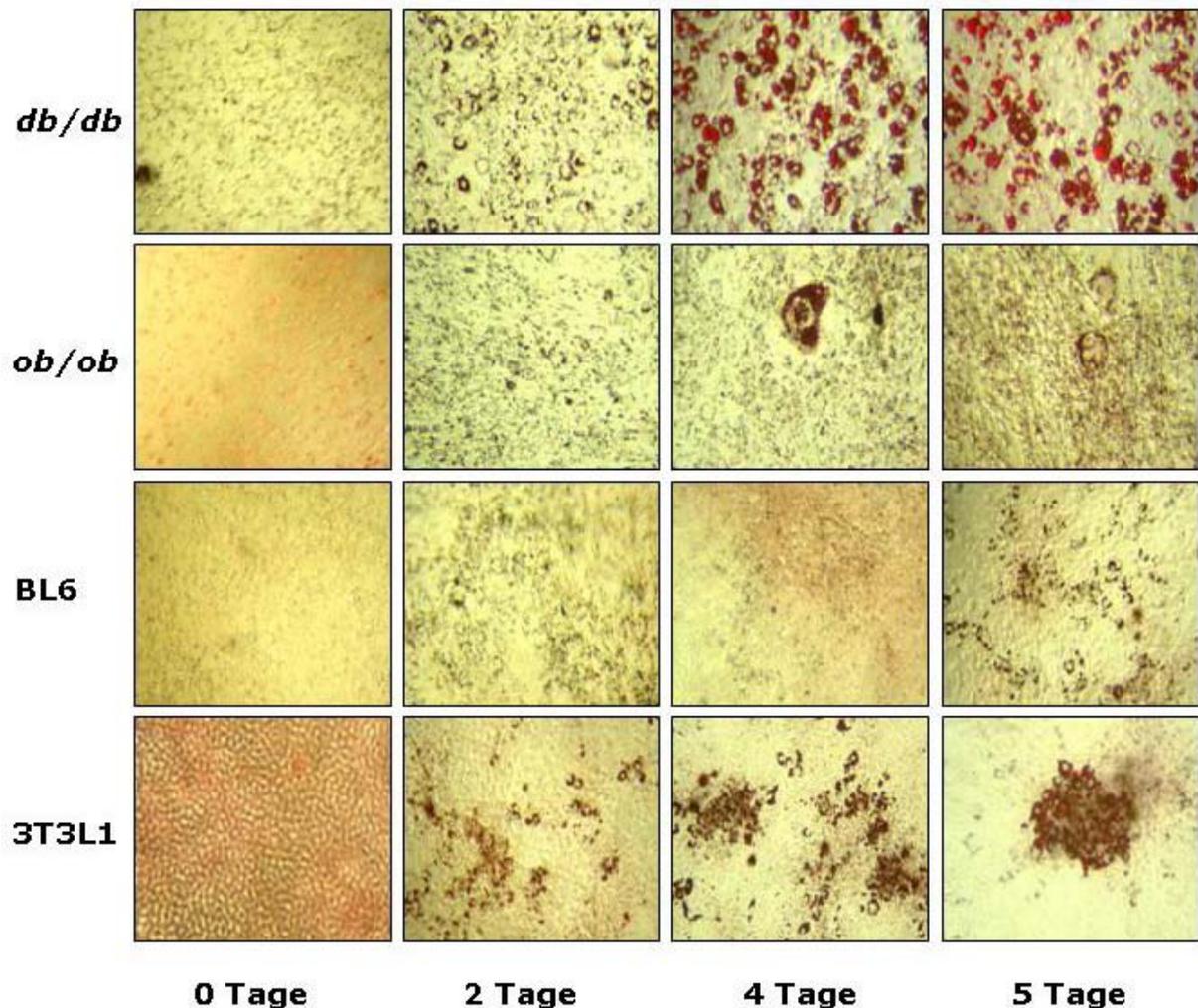


Abb. 3: Leptin beeinflusst die Differenzierungskinetik von Präadipozyten zu Adipozyten. Präadipozyten der Zelllinien *db/db* (Leptin-Rezeptor defizient, oberste Reihe), *ob/ob* (Leptin defizient, zweite Reihe), sowie die WT Zelllinien BL6 (dritte Reihe) und 3T3L1 (unterste Reihe) wurden mit DM I und DM II kultiviert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 Tage, 2 Tage, 4 Tage und 5 Tage) wurden Zellfärbungen mit Oil Red-O durchgeführt, um die induzierte Lipideinlagerung bei fortschreitender Differenzierung optisch darzustellen. Die Abbildung zeigt eine repräsentative Auswahl der gefärbten Zellkulturen. Vergrößerung 1:20.

III.2 Nachweis von Toll-like Rezeptor mRNA und Protein

Zur Überprüfung der TLR-Expression auf Adipozyten wurde mittels PCR die TLR spezifische mRNA nachgewiesen. Zur Bestätigung der Proteinexpression wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. In die Untersuchung wurden WT-, *ob/ob*- und *db/db*- Zelllinien eingeschlossen, um den Einfluss von Leptin auf die TLR-Expression zu überprüfen.

III.2.1 Expression von Toll-like Rezeptor mRNA

Zum Nachweis von TLR mRNA wurden, durch sequentielle Kultur in DM I und DM II, ausdifferenzierte Adipozyten der vier Zelllinien (*db/db*, *ob/ob*, BL6 und 3T3L1) untersucht. In den Zelllinien mit verändertem Leptin Haushalt, d.h. *db/db* und *ob/ob*, ließ sich die mRNA-Expression aller getesteten TLRs (TLR 1 bis 9) nachweisen. Dabei war das mRNA Expressionsprofil in Abwesenheit von Leptin oder des Leptin-Rezeptors breiter und stärker im Vergleich zum WT. Es wurden aber nur in Einzelfällen signifikante Unterschiede erreicht (siehe Abb. 4). Für die WT Zelllinie BL6 konnte eine Expression der TLR mRNA 1–8 gezeigt werden. Die Zelllinie 3T3L1 exprimierte mRNA für die TLR 1–4 und TLR 6. Im Vergleich für 3T3L1 zu BL6 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Abbildung 4 zeigt die Gegenüberstellung der Expressionslevel der getesteten TLR mRNAs in den vier Zelllinien (TLR 1 bis 9).

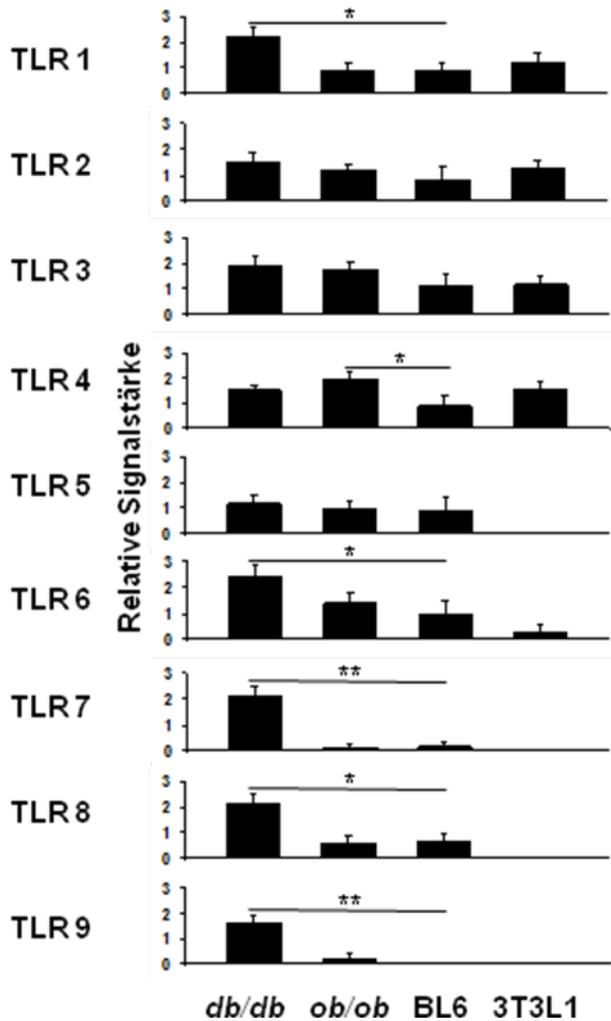


Abb. 4: TLR-mRNA Expression in Adipozyten

Vergleich der Expressionslevel von TLR 1–9 in vier verschiedenen Zelllinien. Die Werte stellen Mittelwerte von n=12 (*db/db*), n=11 (*ob/ob*), n=6 (BL6) und n=9 (3T3L1) ± Standardabweichung (SEM) dar. Die Signifikanzen beziehen sich auf die BL6-Werte: *: p < 0,05, **: p < 0,01

III.2.2 Nachweis von Toll-like Rezeptor-Protein

Im Anschluss erfolgte die Analyse auf Proteinebene via Western Blot. Für jede Zelllinie konnte TLR-Protein nachgewiesen werden. Dabei umfasste jede Zelllinie das Spektrum der getesteten TLRs. Lediglich 3T3L1 zeigte keine deutliche Bande für TLR 2. Für TLR 9 zeigten alle Zelllinien eine schwache Bande. Durch Färbung mit β -Aktin konnte das Auftragen der identischen Probenmengen garantiert werden.

Der Nachweis von TLR 4 gelang mit dem kommerziell erhältlichen Antikörper nicht (siehe Abb. 5).

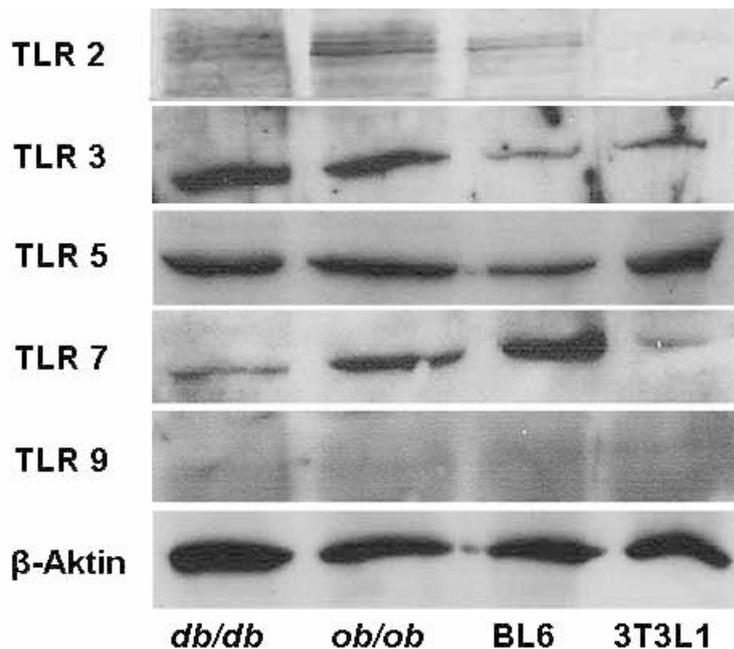


Abb. 5: TLR-Western Blot. Nachweis TLR spezifischer Proteine in Adipozyten-Lysaten mittels Westernblot. Dargestellt ist von oben nach unten der Nachweis von TLR 2, TLR 3, TLR 5, TLR 7, TLR 9 und β -Aktin in den *db/db*- und *ob/ob*-Zelllinien und WT BL6- und 3T3L1-Zelllinien (von links nach rechts). In der Abbildung sind repräsentative Western Blots gezeigt.

III.3 Spezifische Stimulation und Zytokinproduktion

Im Anschluss wurde die Funktionalität der TLRs untersucht. Hierzu wurden Stimulationen mit TLR spezifischen Liganden durchgeführt und Zellüberstände mittels ELISA auf die Produktion der Zytokine IL-6 und TNF- α als Nachweis der Reaktivität getestet.

III.3.1 Kinetik für IL-6

Die Zelllinien wurden über 72 Stunden mit TLR-Liganden stimuliert. Zu den Zeitpunkten 8, 24 und 72 Stunden wurden Mediumproben entnommen und die IL-6-Konzentration bestimmt.

Spontane IL-6-Produktion

Die untersuchten *db/db*- und *ob/ob*-Zelllinien zeigten ohne Stimulation eine deutlich höhere spontane Produktion von IL-6 als die WT Zelllinien. So bildeten *db/db*-Zellen schon nach 8 Stunden etwa 1 ng/ml IL-6 und hielten diese Konzentration über 72 Stunden annähernd konstant. *Ob/ob*-Zellen zeigten einen kontinuierlichen Anstieg der IL-6-Konzentration, die bei 72 Stunden einen Wert von ~ 3 ng/ml IL-6 erreichte. Im Gegensatz dazu erreichten die WT etwa 1/10 der IL-6-Konzentration der *ob/ob*-

Zellen. BL6-Zellen hielten einen konstanten Spiegel von etwa 0,03 ng/ml IL-6 und 3T3L1 erreichten eine Konzentration von ~ 0,4 ng/ml IL-6 nach 72 Stunden (Abb. 6).

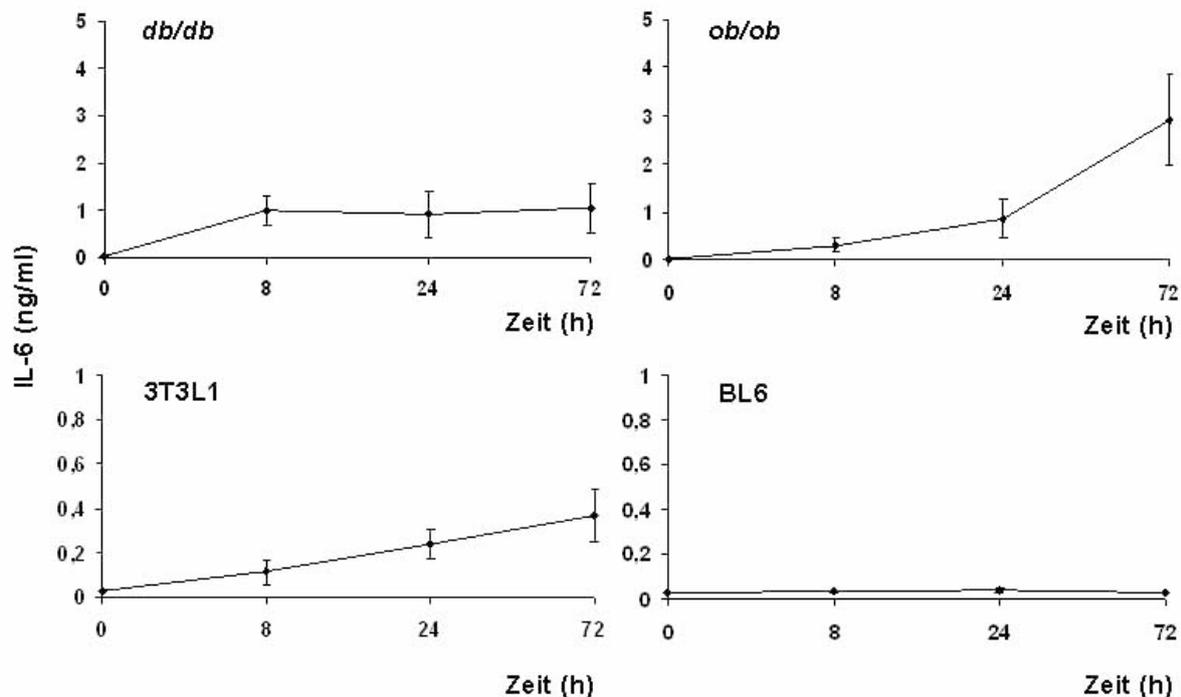


Abb. 6: Zytokinkinetik für IL-6. Darstellung der IL-6 Konzentrationen in Mediumüberständen nicht stimulierter Adipozyten über die Zeit. Gezeigt sind die zeitlichen Verläufe der Konzentrationsänderungen (Mittelwert \pm SEM), getrennt nach *db/db*- und *ob/ob*-Zelllinien (oben) und WT BL6- und 3T3L1-Zelllinien (unten).

Im Folgenden wurden die Adipozyten über 72 Stunden in der Gegenwart von TLR spezifischen Liganden inkubiert. Die Stimulation erfolgte für TLR 2 mit Zymosan (10 μ g/ml), für TLR 3 mit Poly I:C (25 μ g/ml), für TLR 4 mit LPS (1 μ g/ml), für TLR 5 mit Flagellin (10 ng/ml), für TLR 7 mit Loxoribin (10 μ M) und für TLR 9 mit ODN 1668 (0.5 μ M).

IL-6 Produktion bei TLR 2-Stimulation mit Zymosan

In dieser Stimulation zeigten die *db/db*-Zellen eine Erhöhung der IL-6 Konzentration mit einem signifikanten Anstieg auf 18,5 ng/ml IL-6 (\pm 4,57 ng/ml) nach bereits 24 Stunden in Bezug auf die Mediumkontrolle. Die Konzentration nahm weiter zu und war nach 72 Stunden (20 ng/ml IL-6, \pm 6,92 ng/ml) immer noch signifikant höher im Vergleich zur Mediumkontrolle. Die *ob/ob*-Zellen wiesen ebenfalls einen Anstieg der IL-6 Konzentration auf und erreichten mit 2 ng/ml IL-6 (\pm 0,63 ng/ml) nach 24 Stunden einen signifikant höheren Wert zur Mediumkontrolle. Eine Signifikanz gegenüber der Mediumkontrolle war auch nach 72 Stunden noch vorhanden (10

ng/ml IL-6, \pm 3,42 ng/ml). Für die Zelllinien BL6 und 3T3L1 war der Konzentrationsanstieg für IL-6 deutlich geringer als bei *db/db* und *ob/ob* und wies zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zur Mediumkontrolle auf (Abb. 7).

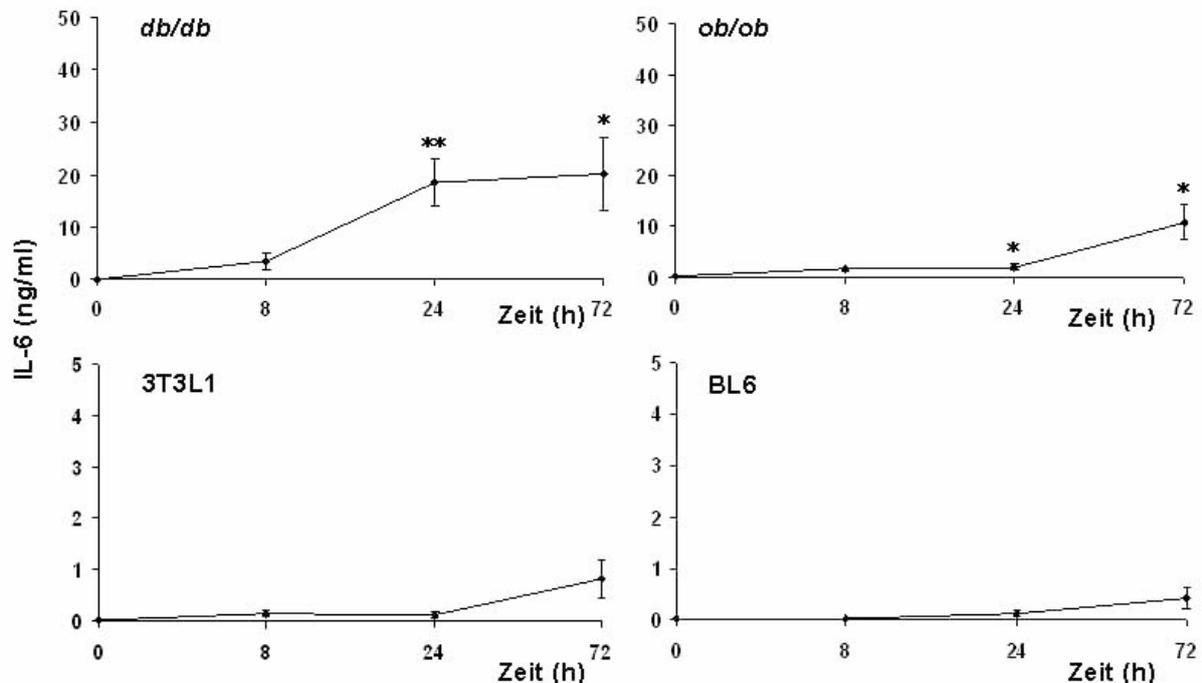


Abb. 7: Zytokinkinetik für IL-6 – TLR 2. Die Zelllinie wurden mit Zymosan für 72 h stimuliert und die Produktion des Zytokins IL-6 verfolgt. Gezeigt sind die zeitlichen Verläufe der Konzentrationsänderungen (Mittelwert \pm SEM), getrennt nach *db/db*- und *ob/ob*-Zelllinien (oben) und WT BL6- und 3T3L1-Zelllinien (unten). Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf die Mediumkontrolle (Abb. 6) zum gleichen Zeitpunkt. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

IL-6 Produktion bei TLR-3 Stimulation mit Poly I:C

In der Stimulation mit Poly I:C traten die höchsten gemessenen IL-6 Konzentrationen für die Zelllinien *db/db* und *ob/ob* auf. *Db/db*-Zellen bildeten IL-6 mit einer maximalen Konzentration von 184 ng/ml IL-6 (\pm 50,545 ng/ml) nach 72 Stunden und wiesen zu jedem Zeitpunkt der Messungen einen signifikanten Unterschied zur Mediumkontrolle auf. Für die *ob/ob*-Zelllinie war der IL-6 Anstieg (mit maximal 47 ng/ml IL-6 (\pm 20,3 ng/ml) nach 72 Stunden) ebenfalls zu jedem Zeitpunkt der Messung signifikant zur Mediumkontrolle erhöht. Der Anstieg war weniger stark ausgeprägt als für *db/db*-Zellen und erreichte nach 24 Stunden ein Plateau, dass bis zum Messzeitpunkt nach 72 Stunden gehalten wurde. Die Konzentrationsänderungen für die WT BL6 und die Zelllinie-3T3L1 entsprachen nur einem geringen Bruchteil der Konzentrationsänderungen für *db/db* und *ob/ob*-Adipozyten (maximal 1,8 ng/ml IL-6 (\pm 0,9 ng/ml) für BL6 und 1,3 ng/ml IL-6 (\pm 0,828 ng/ml) für 3T3L1) und unterschied sich nur für BL6-Zellen nach 72 Stunden signifikant zur Mediumkontrolle. (Abb. 8).

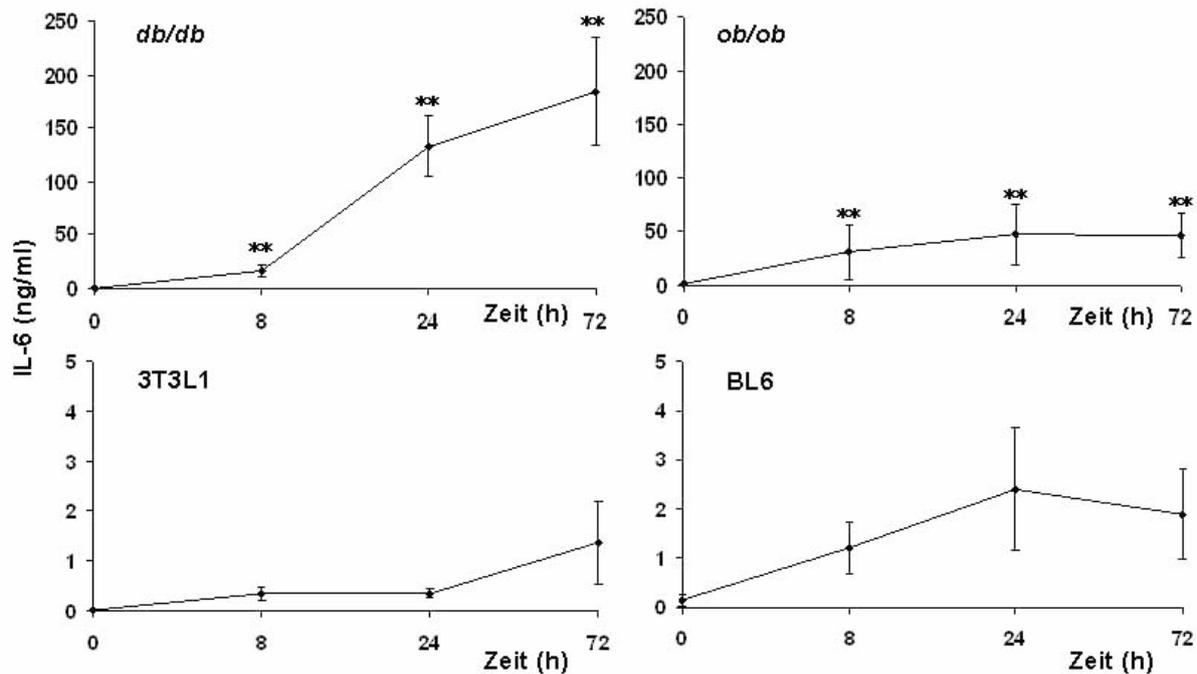


Abb. 8: Zytokinkinetik für IL-6 – TLR 3 Die Zelllinien wurden mit Poly I:C für 72 h stimuliert und die Produktion des Zytokins IL-6 verfolgt. Gezeigt sind die zeitlichen Verläufe der Konzentrationsänderung (Mittelwert \pm SEM), getrennt nach *db/db*- und *ob/ob*- Zelllinien (oben) und WT BL6- und 3T3L1-Zelllinien (unten). Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf die Mediumkontrolle zum gleichen Zeitpunkt. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

IL-6 Produktion bei TLR-4 Stimulation mit LPS

Bei der Stimulation mit LPS zeigten die *db/db*- und *ob/ob*-Zellen zu jedem Messzeitpunkt signifikant höhere Konzentrationen an IL-6 im Vergleich zur Mediumkontrolle. Dabei erreichten *db/db*-Adipozyten nach 24 Stunden eine Konzentration von 118 ng/ml IL-6 (\pm 50,64 ng/ml). Für *ob/ob*-Zellen ließ sich ein kontinuierlicher Konzentrationsanstieg nachweisen, der mit maximal 40 ng/ml IL-6 (\pm 21,92 ng/ml) nach 72 Stunden unter der Konzentration von *db/db*-Zellen nach dieser Zeit blieb. Erneut waren die erreichten IL-6 Konzentrationen für die WT BL6 und die Zelllinie 3T3L1 deutlich geringer als für *db/db*- und *ob/ob*-Zellen. Jedoch war bei beiden Zelllinien der Anstieg nach 72 Stunden signifikant im Vergleich zur Mediumkontrolle (Abb. 9).

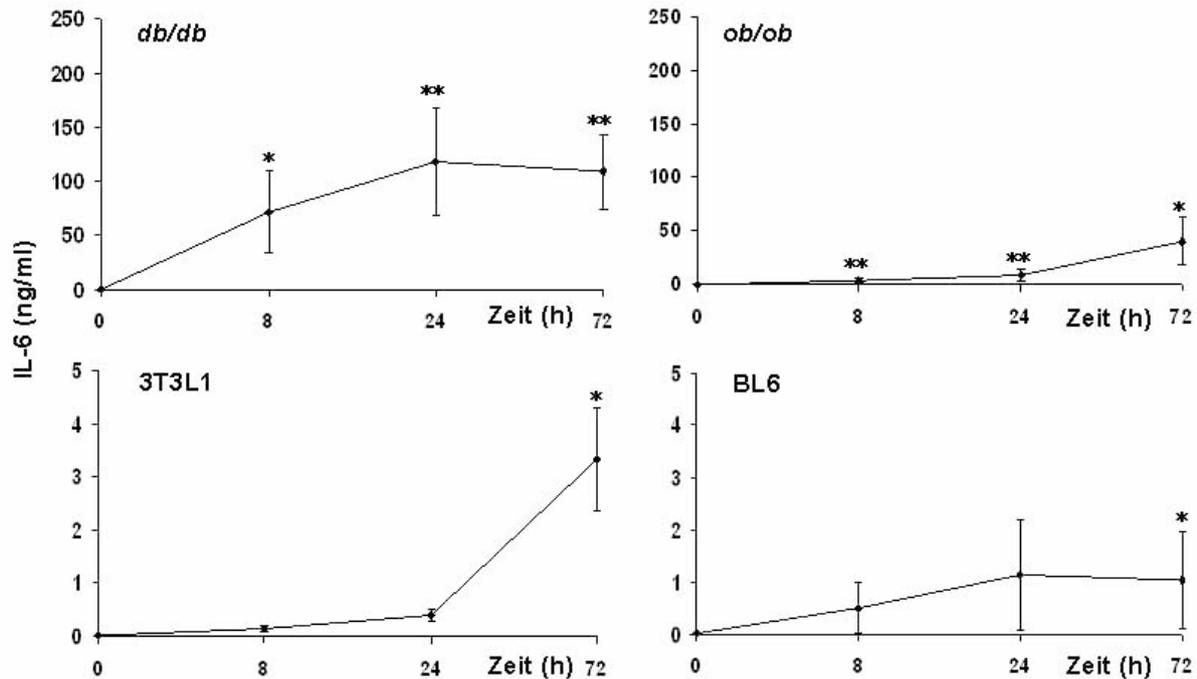


Abb. 9: Zytokinkinetik für IL-6 – TLR 4 Die Zelllinien wurden mit LPS für 72 h stimuliert und die Produktion des Zytokins IL-6 verfolgt. Gezeigt sind die zeitlichen Verläufe der Konzentrationsänderung (Mittelwert \pm SEM), getrennt nach *db/db*- und *ob/ob*-Zelllinien (oben) und WT BL6- und 3T3L1-Zelllinien (unten). Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf die Mediumkontrolle zum gleichen Zeitpunkt. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

IL-6 Produktion bei TLR-5 Stimulation mit Flagellin

Bei der Inkubation mit Flagellin wiesen die *db/db*- und *ob/ob*-Zellen abermals deutlich höhere IL-6 Konzentrationen (*db/db* maximal 20,8 ng/ml IL-6 (\pm 12 ng/ml), *ob/ob* maximal 4,6 ng/ml IL-6 (\pm 1,81 ng/ml)) als die WT (BL6 maximal 0,3 ng/ml IL-6 (\pm 0,2 ng/ml), 3T3L1 maximal 0,66 ng/ml IL-6 (\pm 0,25 ng/ml)) auf. Nach 24 Stunden zeigten die *ob/ob*-Zellen eine signifikant erhöhte Konzentration von IL-6 im Vergleich zur Mediumkontrolle. Dieser signifikante Unterschied trat nach 72 Stunden nicht mehr auf. Für die anderen Zelllinien ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zur Mediumkontrolle (Abb. 10).

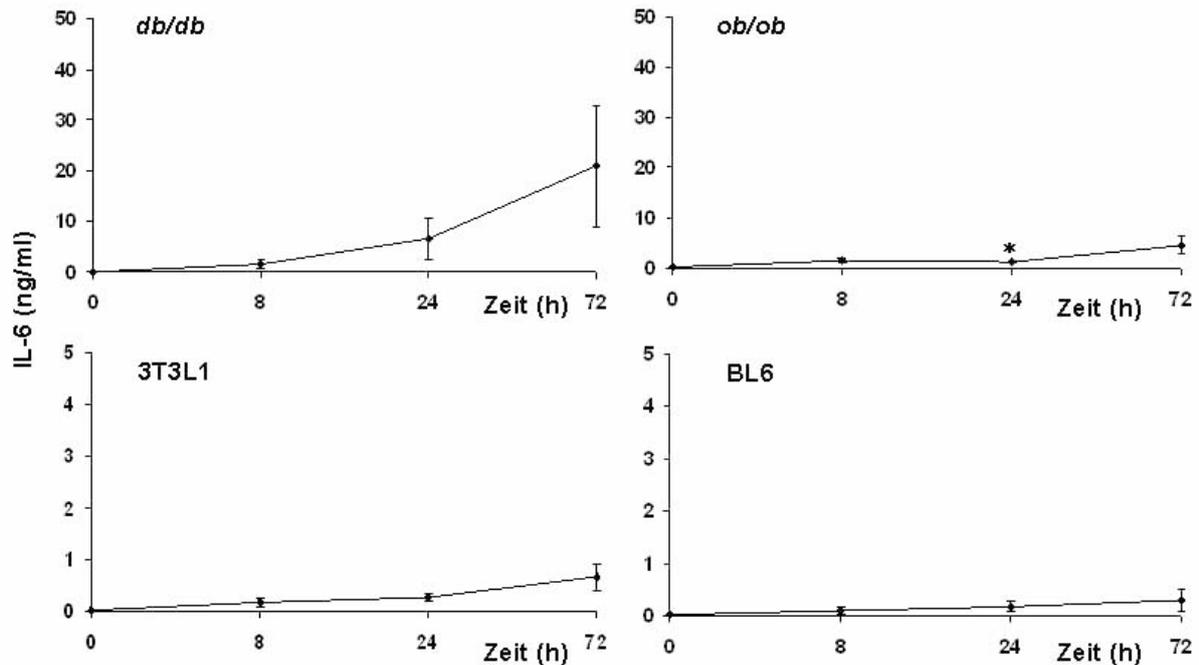


Abb. 10: Zytokinkinetik für IL-6 – TLR 5 Die Zelllinien wurden mit Flagellin für 72 h stimuliert und die Produktion des Zytokins IL-6 verfolgt. Gezeigt sind die zeitlichen Verläufe der Konzentrationsänderung (Mittelwert \pm SEM), getrennt nach *db/db*- und *ob/ob*-Zelllinien (oben) und WT BL6- und-3T3L1 Zelllinien (unten). Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf die Mediumkontrolle zum gleichen Zeitpunkt. *: $p < 0,05$.

IL-6 Produktion bei TLR-7 Stimulation mit Loxoribin

Die mit Loxoribin inkubierten Adipozyten zeigten in der Zelllinie *db/db* einen Konzentrationsanstieg für IL-6, aber keine signifikanten Unterschiede (maximal 5,5 ng/ml IL-6 (\pm 3,4 ng/ml) nach 72 Stunden) zur Mediumkontrolle. Für die Zelllinie *ob/ob*-Adipozyten ergab sich nach 8 und 24 Stunden ein signifikanter Anstieg verglichen zur Mediumkontrolle, der sich über die Zeit verlor und nach 72 Stunden nicht mehr vorhanden war. Bei WT BL6-Zellen war der IL-6-Konzentrationsanstieg nach 72 Stunden signifikant zur Mediumkontrolle erhöht (0,26 ng/ml IL-6 (\pm 0,1 ng/ml)). Die Zelllinie 3T3L1 wies im Vergleich zur Mediumkontrolle keine erhöhte IL-6-Konzentration nach Stimulation mit Loxoribin auf. Die Konzentrationen entsprachen der spontanen IL-6 Produktion (Abb. 11).

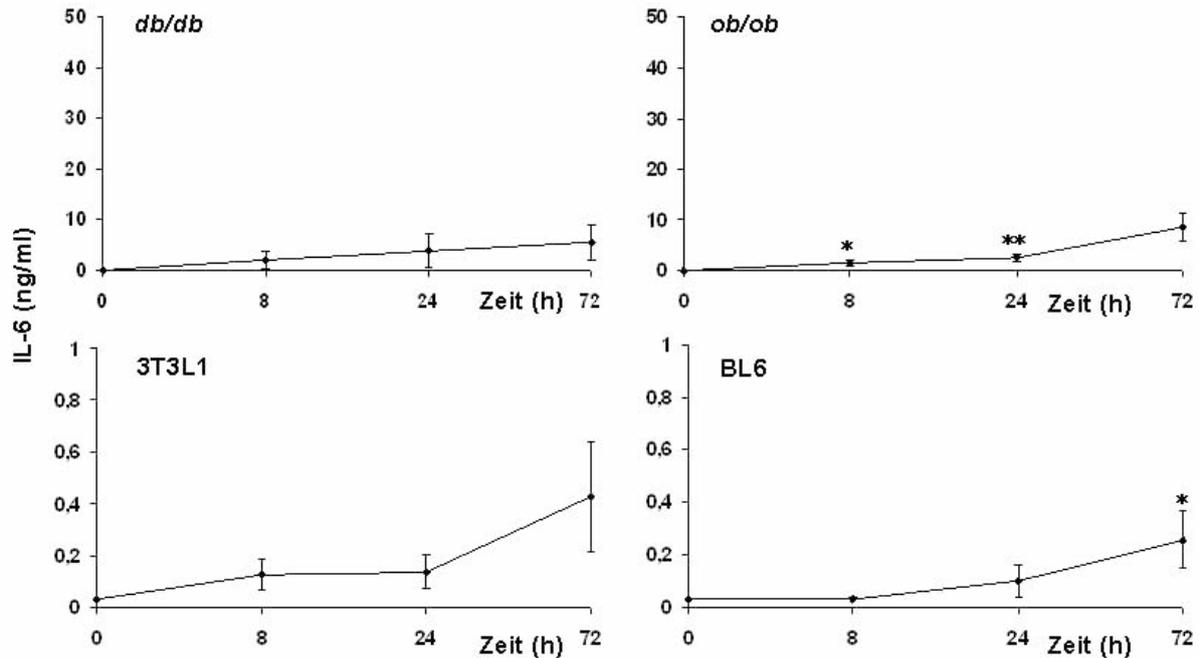


Abb. 11: Zytokinkinetik für IL-6 – TLR 7 Die Zelllinien wurden mit Loxoribin 72 h stimuliert und die Produktion des Zytokins IL-6 verfolgt. Gezeigt sind die zeitlichen Verläufe der Konzentrationsänderung (Mittelwert \pm SEM), getrennt nach *db/db*- und *ob/ob*-Zelllinien (oben) und WT BL6- und 3T3L1-Zelllinien (unten). Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf die Mediumkontrolle zum gleichen Zeitpunkt. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

IL-6 Produktion bei TLR-9 Stimulation mit ODN 1668

Bei der Stimulation mit ODN 1668 wiesen die *db/db*- und *ob/ob*-Adipozyten höhere Konzentrationen für IL-6 auf als die WT BL6- und die 3T3L1-Zellen. *db/db* zeigten nach 24 Stunden einen signifikanten Anstieg im Vergleich zur Kontrolle (9,7 ng/ml IL-6 (\pm 3,7 ng/ml)), der sich auch nach 72 Stunden fortsetzte (31,2 ng/ml IL-6, 12,3 ng/ml). Die *ob/ob*-Adipozyten erreichten eine IL-6-Konzentration von maximal 11,7 ng/ml IL-6 (\pm 0,4 ng/ml) nach 72 Stunden, aber keinen signifikanten Unterschied zur Mediumkontrolle. Die BL6-Adipozyten hielten über den gesamten Messzeitraum konstante Werte bei ungefähr 0,27 ng/ml IL-6, die der Spontanproduktion an IL-6 entsprachen. Nach 72 Stunden war der Wert allerdings signifikant zur Mediumkontrolle erhöht (0,27 ng/ml IL-6, \pm 0,1 ng/ml). 3T3L1-Zellen zeigten einen Maximalwert von 0,6 ng/ml IL-6 (\pm 0,3 ng/ml) nach 72 Stunden, der zur spontanen IL-6-Produktion der 3T3L1-Zellen keinen signifikanten Unterschied aufwies (Abb. 12).

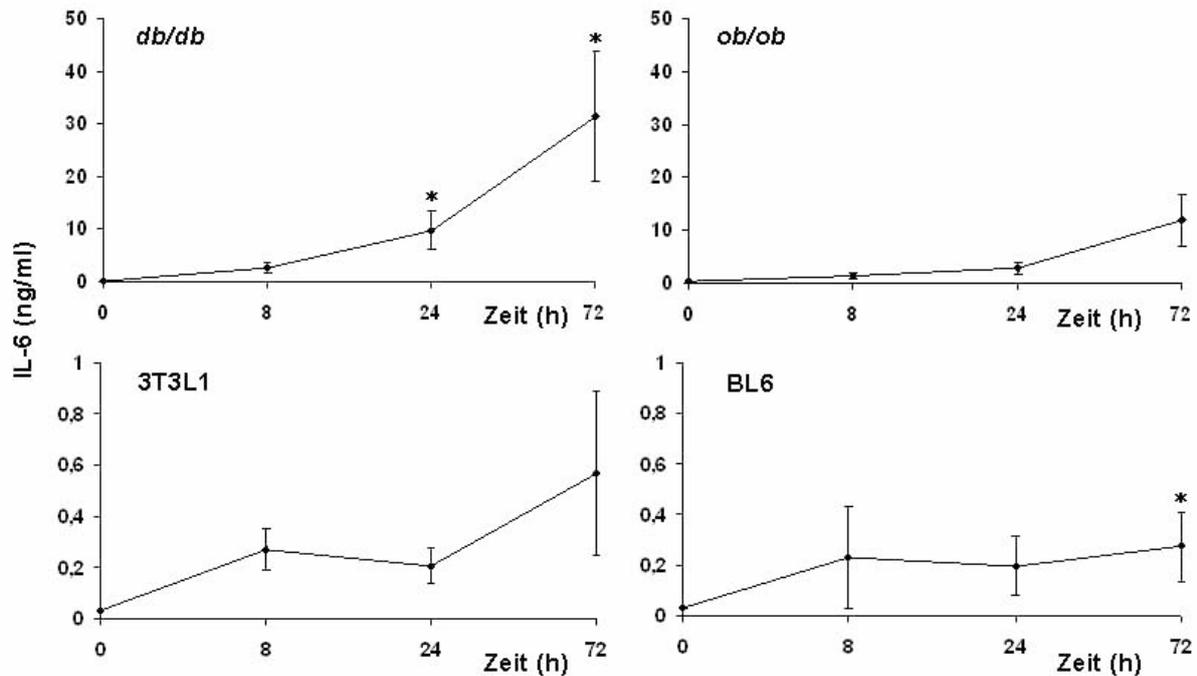


Abb. 12: Zytokinkinetik für IL-6 – TLR 9 Die Zelllinien wurden mit ODN1668 für 72 h stimuliert und die Produktion des Zytokins IL-6 verfolgt. Gezeigt sind die zeitlichen Verläufe der Konzentrationsänderung (Mittelwert \pm SEM), getrennt nach *db/db*- und *ob/ob*-Zelllinien (oben) und WT BL6- und 3T3L1-Zelllinien (unten). Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf die Mediumkontrolle zum gleichen Zeitpunkt. * : $p < 0,05$.

III.3.2 Kinetik für TNF- α

Die in der Stimulation gewonnenen Mediumproben wurden neben IL-6 auch auf TNF- α getestet.

Spontane TNF - α Produktion

Alle vier Zelllinien wiesen im Vergleich zur IL-6-Produktion nur eine geringe spontane Freisetzung an TNF- α auf. In der Mediumkontrolle blieb für alle vier Zelllinien die Konzentration an TNF- α annähernd konstant, wobei die Werte für die *db/db*- und *ob/ob*- Zelllinie um Werte von 22 pg/ml TNF- α und die Werte für die BL6- und 3T3L1-Zelllinien um 35 pg/ml TNF- α schwankten.

TNF - α Produktion bei TLR-3 Stimulation mit Poly I:C

Bei der Inkubation der Leptin-Rezeptor defizienten Zelllinie *db/db* mit Poly I:C stieg die TNF- α Konzentration nach 8 Stunden auf 64 pg/ml TNF- α . Der Anstieg setzte sich bis auf 291 pg/ml TNF- α nach 72 Stunden fort. Die Werte bei 8 Stunden und 72 Stunden waren dabei signifikant höher als in der Mediumkontrolle.

Die übrigen Zelllinien, die *ob/ob*-Zellen, die WT BL6- und die 3T3L1-Zellen, zeigten keine signifikanten Unterschiede zur Mediumkontrolle und hielten über die gesamte

Zeit annähernd konstante TNF- α Konzentrationen, die den Werten der Mediumkontrolle entsprachen.

TNF- α Produktion bei TLR-4 Stimulation mit LPS

Bei der Inkubation der Adipozyten über 72 Stunden mit LPS, dem TLR-4-Liganden, erreichten die *db/db*-Zellen nach 24 Stunden einen Wert von 253 pg/ml TNF- α (\pm 438 pg/ml), der im Vergleich zur Mediumkontrolle signifikant erhöht war. Nach 72 Stunden wurde der maximale Wert von 384 pg/ml TNF- α (\pm 159 pg/ml) erreicht und war ebenfalls signifikant zur Mediumkontrolle erhöht. Die *ob/ob*-Adipozyten zeigten nach 24 Stunden mit 31 pg/ml TNF- α (\pm 0,04 pg/ml) einen signifikant erhöhten Wert im Vergleich zur Mediumkontrolle. Der WT BL6 und die 3T3L1-Zellen hielten über den gesamten beobachteten Zeitraum TNF- α -Konzentrationen, die der spontanen Produktion gleich waren (Abb. 13).

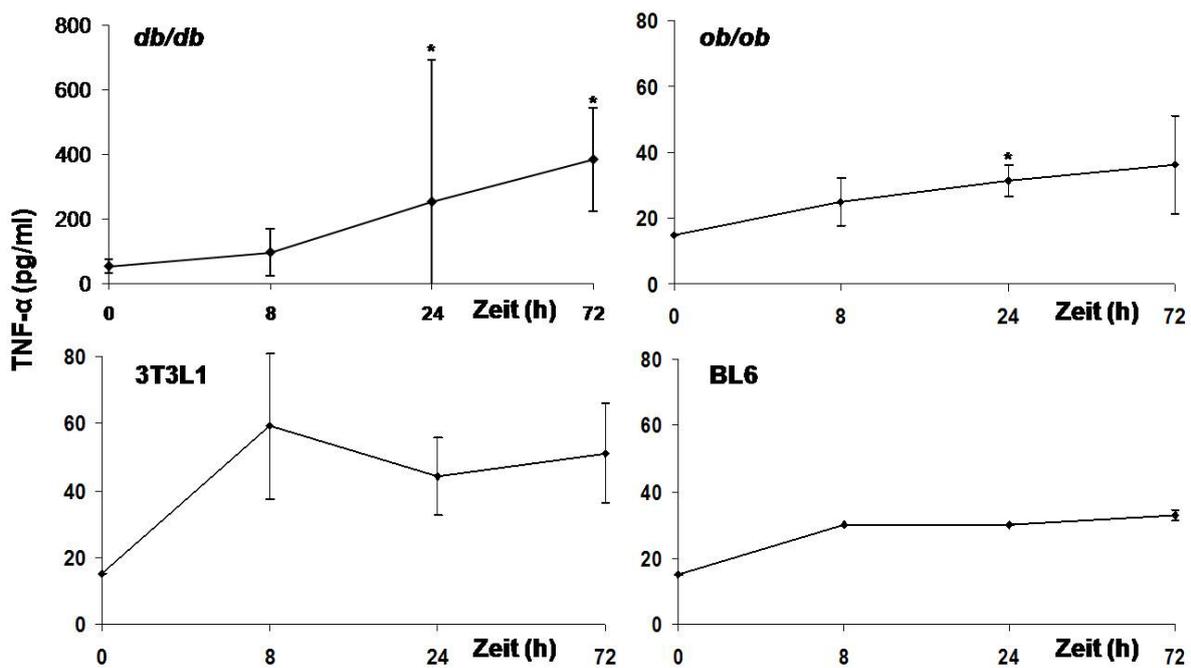


Abb. 13: Zytokinkinetik für TNF- α – TLR4 Die Zelllinien wurden mit LPS für 72 h kultiviert und die Produktion des Zytokin TNF- α verfolgt. Gezeigt sind die zeitlichen Verläufe der Konzentrationsänderungen (Mittelwerte \pm SEM), getrennt nach *db/db*- und *ob/ob*-Zelllinien (oben) und WT BL6- und 3T3L1-Zelllinien (unten). Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf die Mediumkontrolle zum gleichen Zeitpunkt. * : $p < 0,05$.

TNF- α -Produktion bei Stimulation mit Zymosan, Flagellin, Loxoribin und ODN 1668

Für die Stimulation von TLR 2 mit Zymosan, TLR 5 mit Flagellin, TLR7 mit Loxoribin und TLR 9 mit ODN 1668 zeigten sich für alle vier Zelllinien über den beobachteten Zeitraum konstante Konzentrationen von TNF- α , die der Mediumkontrolle entsprachen. Es traten keine signifikanten Unterschiede auf (Tab. 14).

Tab. 13: Zytokinkinetik für TNF- α – TLR 2, TLR 5, TLR 7 und TLR 9 Konzentrationsänderungen für TNF- α in pg/ml für die Stimulationen von TLR 2, TLR 5, TLR 7 und TLR 9 über die Zeit (Mittelwerte \pm SEM).

	[h]	TLR 2		TLR 5		TLR 7		TLR 9	
		Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM
db/db	8	32	8	16	1	44	23	19	4
	24	38	11	35	20	41	26	15	0
	72	23	4	18	3	17	2	15	0
ob/ob	8	342	9	32	11	33	9	20	3
	24	31	10	18	2	17	2	27	9
	72	19	2	17	1	15	0	19	2
BL6	8	30	0	30	0	25	4	28	10
	24	26	7	32	11	21	4	42	14
	72	24	4	34	8	32	3	35	1
3T3	8	38	5	34	9	44	11	27	7
	24	33	8	44	12	39	18	21	4
	72	43	14	51	15	29	9	20	3

III.3.3 Vergleich der 72-Stundenwerte für die verschiedenen Zelllinien und TLR Liganden

Bei der Untersuchung der Zytokinproduktion über den beobachteten Zeitraum ergaben sich signifikante Unterschiede meist erst nach 72 Stunden. Zum Vergleich der Zytokinproduktion der einzelnen Zelllinien untereinander und der einzelnen Stimuli zueinander wurden im Folgenden die zum Zeitpunkt 72 Stunden gewonnenen Mediumüberstände auf ihren Zytokingehalt untersucht.

Vergleich für IL-6

Für die *db/db*-Zelllinie führten fast alle TLR spezifischen Liganden zu einem signifikanten Anstieg der IL-6-Produktion im Vergleich zur Mediumkontrolle. Dabei induzierten die Stimulanzen Poly I:C (184 ng/ml IL-6, \pm 50,5 ng/ml, $p = 0,003$) und LPS (109 ng/ml IL-6, \pm 34,5 ng/ml, $p = 0,05$) mehr als 100-fach höhere IL-6-Konzentrationen als in der Mediumkontrolle. Auch die Stimulationen mit Zymosan und ODN 1668 führten zu einer signifikanten erhöhten IL-6-Produktion. Für Flagellin

lag die Konzentration etwa 6-fach höher als in der Mediumkontrolle. Loxoribin wies nach drei Tagen den geringsten Zytokinanstieg in der Stimulation auf. Beide zeigten keinen signifikanten Unterschied zur Mediumkontrolle. Poly I:C und LPS waren die potentesten Stimuli für diese Zelllinie.

Bei der Leptin defizienten *ob/ob* Zelllinie traten ausgeprägte IL-6 Zytokinanstiege bei der Stimulation mit den TLR Liganden Poly I:C (47 ng/ml IL-6, \pm 20 ng/ml, $p = 0,003$) und LPS (40,5 ng/ml IL-6, \pm 21,9 ng/ml, $p = 0,014$) auf. Hier wies Poly I:C einen signifikanten Unterschied mit einer ca. 16-fach höheren Konzentration im Vergleich zur spontanen IL-6-Produktion auf. Die Stimulation mit LPS führte zu einer ca. 14-fach höheren IL-6-Konzentration gegenüber der Mediumkontrolle und war damit signifikant. Die IL-6-Produktion der *ob/ob*-Zellen war geringer als bei den *db/db*-Zellen. Die übrigen Stimulanzen führten zu weniger stark ausgeprägten Zytokinproduktionen (zwei- bis vierfach erhöht). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zur Mediumkontrolle. Die geringste IL-6 Produktion ergab sich bei der Stimulation mit Flagellin. Die potentesten Stimuli waren Poly I:C und LPS.

Der WT BL6 zeigte für fast alle TLR spezifischen Liganden einen signifikanten Anstieg in der Zytokinkonzentration für IL-6 im Vergleich zur Mediumkontrolle. Für Poly I:C (1,9 ng/ml IL-6, \pm 0,9 ng/ml, $p = 0,007$) und LPS (4, 1 ng/ml IL-6, \pm 0,9 ng/ml, $p = 0,036$) war der Anstieg mehr als 30-fach höher, für Loxoribin und ODN 1668 war der Anstieg etwa 10-fach höher im Vergleich zur spontanen IL-6 Konzentration. Für Zymosan und Flagellin konnte zwar ein Anstieg gemessen werden, dieser war jedoch nicht signifikant zur Kontrolle. Die potentesten Stimuli waren erneut Poly I:C und LPS.

Für die Zelllinie 3T3L1 konnte nur bei der Stimulation mit LPS (3,3 ng/ml IL-6, \pm 0,9 ng/ml, $p = 0,037$) ein signifikanter Anstieg in der IL-6 Produktion im Vergleich zur Mediumkontrolle gemessen werden. Bei der Inkubation mit Poly I:C war der Anstieg zwar zu sehen, jedoch nicht signifikant. In den anderen Stimulationen erreichten die IL-6 Konzentrationen Werte, die der spontanen IL-6 Konzentration entsprachen.

Im Vergleich der *db/db*-Zellen und *ob/ob*-Zellen zum WT BL6- und der 3T3L1-Zelllinien wiesen die erstgenannten eine höhere spontane Produktion an IL-6 auf. Der Unterschied entsprach ungefähr 10-fach höheren IL-6 Konzentrationen in den

Leptin-Rezeptor defizienten und Leptin defizienten Zelllinien im Vergleich zur BL6-Zelllinie ($db/db \approx 1 \text{ ng/ml IL-6}$, $ob/ob \approx 3 \text{ ng IL-6/ml}$, $BL6 \approx 0,03 \text{ ng/ml IL-6}$, $3T3L1 \approx 0,4 \text{ ng/ml IL-6}$). Die Zelllinien BL6 und 3T3L1 zeigten im Vergleich untereinander einen Unterschied in der IL-6-Produktion. So erreichte die Zelllinie 3T3L1 etwa 10-fach höhere IL-6 Konzentrationen als die Zelllinie BL6.

In den Stimulationsversuchen wurde dieser Unterschied zwischen den vier Zelllinien beibehalten, wobei sich 30- bis 100-fach höhere IL-6-Konzentrationen gegenüber den WT BL6- und 3T3L1-Zelllinien zeigten. Nach 72 Stunden zeigten sich bis zu 100-fach höhere Werte für Poly I:C bei db/db im Vergleich zu BL6 (Abb. 14).

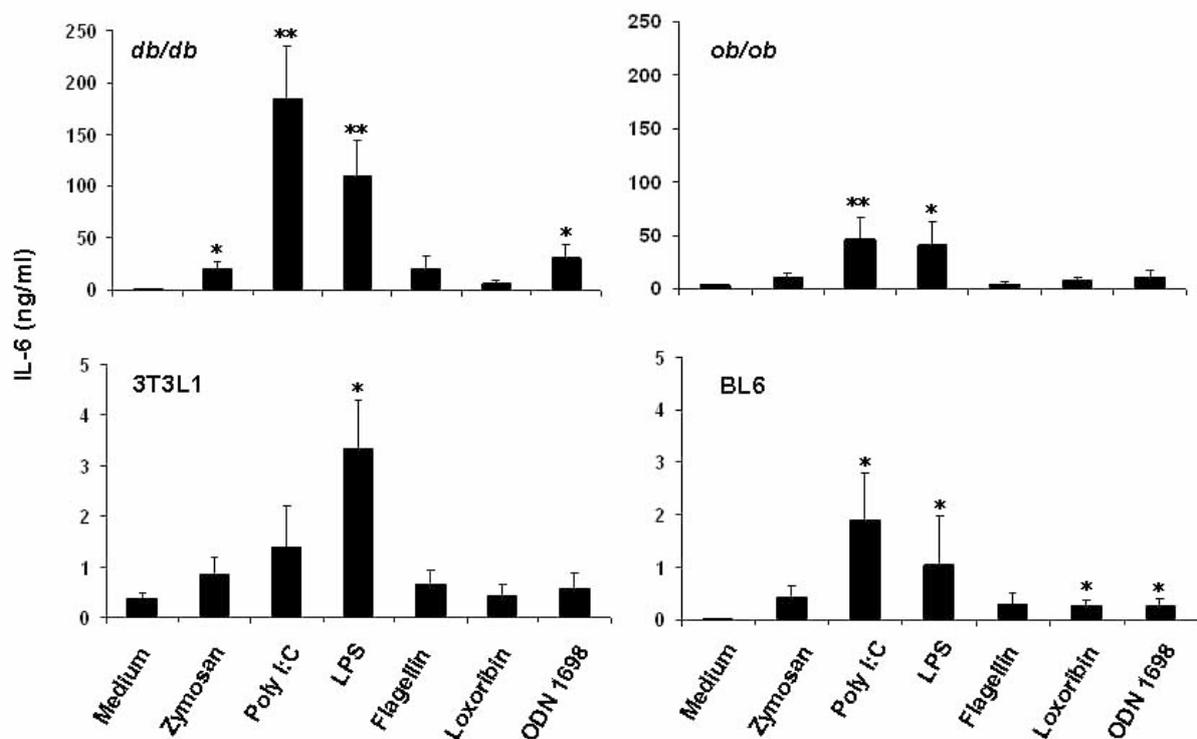


Abb. 14: Vergleich der 72 Stundenwerte für die verschiedenen Zelllinien für IL-6 Die Zelllinien wurden für die untersuchten TLRs mit spezifischen Liganden stimuliert: TLR 2 mit Zymosan, TLR 3 mit Poly I:C, TLR 4 mit LPS, TLR 5 mit Flagellin, TLR 7 mit Loxoribin und TLR 9 mit ODN 1668 für 3 Tage kultiviert und die gewonnenen Proben auf die Anwesenheit und Konzentration des Zytokins IL-6 getestet. Gezeigt sind die vier Zelllinien, getrennt nach Leptin-Rezeptor defizienten db/db und Leptin defizienten ob/ob Zelllinien (oben) und WT BL6 und 3T3L1 Zelllinien (unten). Die Werte stellen Mittelwerte (\pm SEM) für $n=6$ bis 8 dar. Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf die Mediumkontrolle der entsprechenden Zelllinie zum selben Zeitpunkt. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$.

Vergleich der 72 Stundenwerte für TNF- α

Im Vergleich der 72 Stundenwerte für die Zytokinproduktion von TNF- α traten einzig bei der Leptin-Rezeptor defizienten Zelllinie *db/db* signifikante Unterschiede bei Stimulation mit TLR spezifischen Liganden im Vergleich zur spontanen TNF- α Produktion auf. So induzierte die Stimulation mit Poly I:C und LPS eine etwa 10-fach höhere, im Vergleich zur spontanen Freisetzung signifikante TNF- α Produktion. Die anderen TLR-Liganden stimulierten die TNF- α Produktion nicht. Die erreichten Werte entsprachen der spontanen TNF- α Produktion.

Für die anderen drei Zelllinien, die *ob/ob*-, die WT BL6- und den 3T3L1-Adipozyten, wurden über die 72 Stunden in allen Stimulationen keine Konzentrationsunterschiede im Vergleich zur spontanen TNF- α -Freisetzung gemessen (Abb. 15).

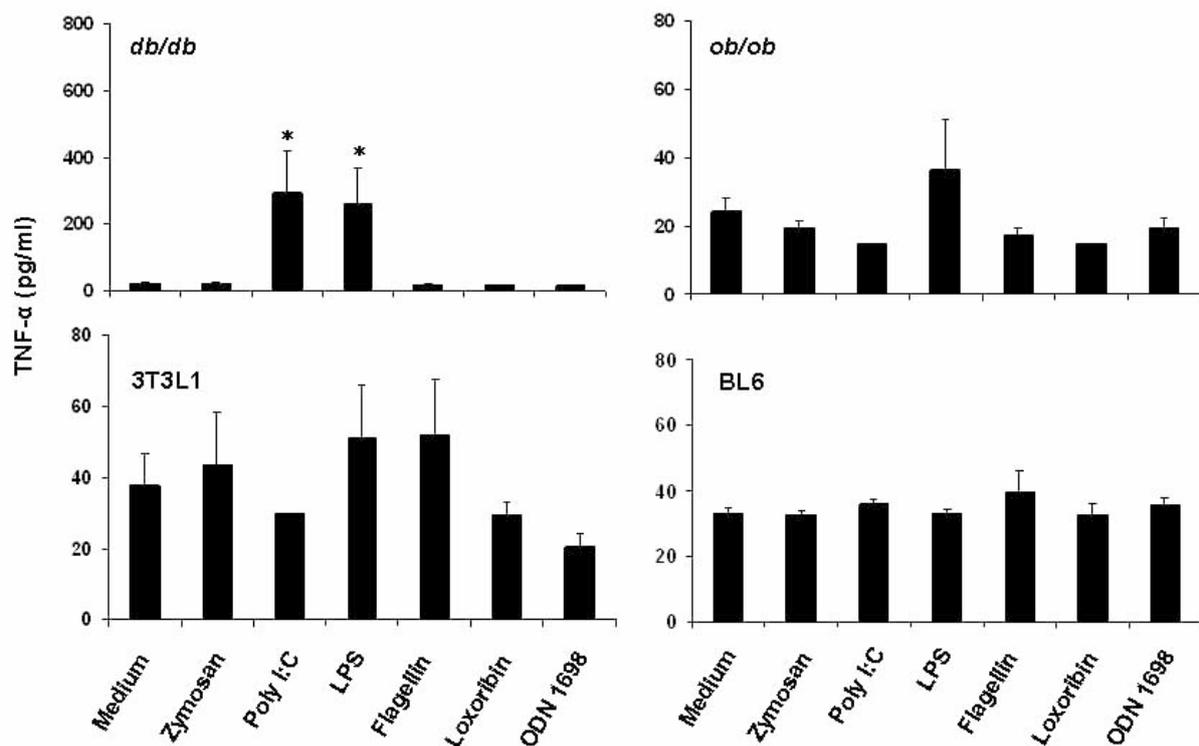


Abb. 15: Vergleich der 72 Stundenwerte aus der Zytokinstimulation für TNF- α Die Zelllinien wurden für die untersuchten TLRs mit spezifischen Liganden stimuliert: TLR 2 mit Zymosan, TLR 3 mit Poly I:C, TLR 4 mit LPS, TLR 5 mit Flagellin, TLR 7 mit Loxoribin und TLR 9 mit ODN 1668. Alle wurden für 3 Tage kultiviert und die gewonnenen Proben auf die Anwesenheit und Konzentration des Zytokins TNF- α getestet. Gezeigt sind die vier Zelllinien, getrennt nach Leptin-Rezeptor defizienten *db/db* und Leptin defizienten *ob/ob* Zelllinien (oben) und WT BL6 und 3T3L1 Zelllinien (unten). Die Werte stellen Mittelwerte (\pm SEM) für n=6 bis 8 dar. Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf die Mediumkontrolle der entsprechenden Zelllinie zum selben Zeitpunkt. *: $p < 0,05$.

III.3.4 Nachweis der TLR 9 Spezifität der Stimulation mit ODN 1668

Der für die TLR 9-spezifische Stimulation eingesetzte Ligand ODN 1668 führte für alle vier Zelllinien zu einem Anstieg der IL-6 Konzentrationen. Die TLR 9 Spezifität des Liganden war zuvor einzig an Makrophagen gezeigt worden (Hemmi, 2000). Zur Überprüfung, ob die induzierte Zytokinproduktion auf eine spezifische Stimulation des TLR 9 zurückzuführen ist, wurde in einer zweiten Stimulation ODN 1668 gleichzeitig mit ODN 2088 dem Medium zugesetzt. ODN 2088 hat einen bekannten inhibierenden Effekt am TLR 9 (Stunz, 2002). Exemplarisch ist die Konzentrationsänderung für die Zelllinie *db/db* in Abb. 16 gezeigt. Wurden beide ODN Motive dem Medium zugesetzt, sah man keinen bzw. nur einen geringen Anstieg der IL-6 Konzentration über 72 Stunden (für *db/db*: Mediumkontrolle 1 ng/ml IL-6 ($\pm 0,5$ ng/ml), ODN 1668 31 ng/ml IL-6 (± 12 ng/ml), ODN 1668 + 2088 6 ng/ml IL-6 ($\pm 2,4$ ng/ml)), was die Spezifität des ODN 1668 am TLR 9 auch bei der Stimulation von Adipozyten bestätigt (Abb. 16).

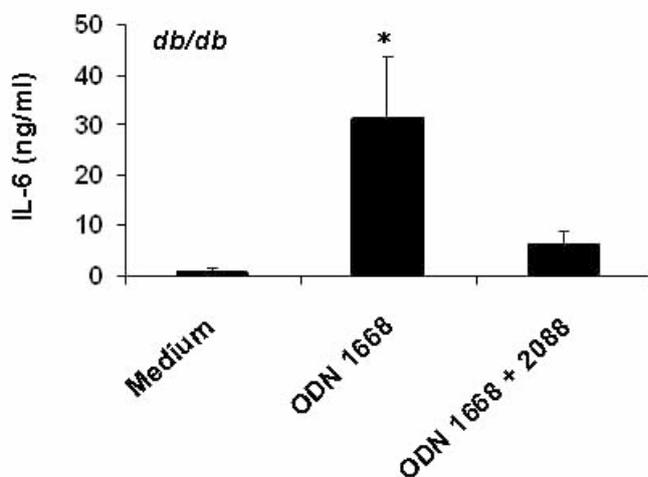


Abb. 16: Stimulation von *db/db* Zellen mit ODN 1668 und ODN 2088 Nachweis von IL-6 in Mediumproben bei Stimulation von *db/db* Zellen mit ODN 1668 und ODN 1668 plus ODN 2088 für die Dauer von 72 Stunden. Die dargestellten Werte stellen Mittelwerte (\pm SEM) aus $n=6$ dar. Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf die Mediumkontrolle zum gleichen Zeitpunkt. *: $p < 0,05$.

IV Diskussion

In den letzten Jahren hat intensive Forschung dazu geführt, dass das Fettgewebe als ein endokrines Organ betrachtet wird und zusätzlich neben der Energiehomöostase wichtige Aufgaben in der immunologischen Regulation übernimmt. Zu den im Fettgewebe gebildeten Mediatoren werden Adipokine wie Leptin, Adiponektin und Resistin, aber auch Zytokine wie IL-6 und TNF- α gezählt. Die Adipokine entfalten immun-modulatorische Effekte und haben regulatorische Funktionen im erworbenen Immunsystem (Schäffler, 2007). Durch die Versuche der Arbeitsgruppe um Charrière ist bekannt, dass sich Präadipozyten in Makrophagen umwandeln können (Charrière, 2002). Des Weiteren sind Adipozyten in der Lage, durch LPS stimuliert zu werden und sekretorisch darauf reagieren zu können (Lin, 2000). Diese Arbeit sollte die direkte Interaktion von Adipozyten mit Antigenen untersuchen. LPS wird über TLR 4 von der Zelle erkannt. Daher lag der Schwerpunkt der Untersuchung auf der Überprüfung der Expression von TLRs auf Adipozyten und deren Funktionalität. Ein weiteres Augenmerk lag auf dem Einfluss der Leptin-abhängigen Regulation der TLR-Funktion und -Reaktivität.

IV.1 Zusammenfassung der Ergebnisse und

Leptin-abhängige Regulation der Toll-like Rezeptor Expression

Um die Expression der TLRs auf Adipozyten zu testen, mussten Präadipozyten differenziert werden. Die Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten zeigte für 3T3L1 die bereits bekannte Differenzierungsgeschwindigkeit (Student, 1980). Etwas langsamer in der Differenzierung war die WT-Zelllinie BL6, deren Zellen erst ab dem vierten Tag Lipideinlagerungen zeigten. Auffällig, und in dieser Studie erstmals beschrieben, war die schnelle Lipideinlagerung der Leptin-Rezeptor defizienten und Leptin defizienten Zelllinien, die schon ab dem ersten Tag Lipideinlagerungen zeigten. Dies steht im Einklang mit den klinischen Beobachtungen bei *db/db* und *ob/ob* Mäusen, die nach der Geburt eine schnelle Gewichtszunahme zeigen (Fantuzzi, 2000). Des Weiteren konnte in früheren Studien ein auto- bzw. parakriner Effekt von Leptin auf Adipozyten gezeigt werden, welches diese zur Lipolyse anregt. Bei fehlendem Signalweg über Ob-Rb und fehlendem Leptin entfällt dieses Signal und die Lipolyse bleibt aus, mehr Fettsäuren werden gespeichert (Siegrist-Kaiser, 1997). Leptin beeinflusst somit die Geschwindigkeit der Differenzierung von

Präadipozyten zu Adipozyten. Dieser theoretische Effekt konnte in dieser Studie während der Differenzierung bildlich festgehalten werden.

Eine TLR Expression für TLR 2 und TLR 4 auf 3T3L1 Adipozyten ist bekannt (Lin, 2000). In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass sich neben diesen TLRs auch die TLRs 1, 3 und 6 auf mRNA-Ebene und TLR 3, 5, 7 und 9 auf Protein-Ebene in dieser Zelllinie nachweisen lassen. Hierzu weiterführend, und so zuvor nicht beschrieben, konnte auf der WT-Zelllinie eine mRNA Expression für alle TLRs außer TLR 9 gezeigt werden. Auf der Protein-Ebene entsprach das Expressionsprofil dem der 3T3L1 Zelllinie. Zusammengenommen zeigten beide Zelllinien ein vollständiges Expressionsprofil für die getesteten TLRs.

In weiteren Versuchen zeigte sich für die Leptin-defizienten (*ob/ob*) und Leptin-Rezeptor defizienten (*db/db*) Zelllinien ein Expressionsprofil auf mRNA- und Protein-Ebene für alle getesteten TLRs. Die relative Signalintensität war hier stärker als für die Zelllinien 3T3L1 und WT.

Im Vergleich zwischen *ob/ob* Zellen und *db/db* Zellen zeigt sich eine deutlich erhöhte Signalintensität für die mRNA der TLRs 6-8 in der *db/db* Zelllinie.

Zum Nachweis der Funktionalität der exprimierten TLRs erfolgten Stimulationsversuche mit TLR spezifischen Liganden. Bei der Bestimmung der spontanen Zytokinfreisetzung für IL-6 und TNF- α in den vier zu Adipozyten differenzierten Zelllinien ergab sich interessanterweise eine 10-fach höhere Grundproduktion für IL-6 in den Leptin-Rezeptor defizienten bzw. Leptin defizienten Zelllinien im Vergleich zum WT und 3T3L1. Damit im Einklang steht, dass direkt aus dem Fettgewebe isolierte *ob/ob* Adipozyten eine höhere Grundproduktion an IL-6 im Vergleich zu WT Adipozyten zeigen (Harkins, 2004).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen für die *db/db* Adipozyten zeigten wie bereits erwähnt eine erhöhte Grundproduktion für IL-6. Einige Arbeiten zeigen eine erhöhte IL-6 Produktion für endotheliale Zellen (Srinivasan, 2004) und Makrophagen (Li, 2006), die aus *db/db* Mäusen gewonnen wurden. Die *db/db* Adipozyten können mit dieser Studie in diese Aufzählung eingeschlossen werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Stimulationsversuche bestätigen die von Lin et al. gezeigten Ergebnisse bezüglich einer Stimulation von 3T3L1 Adipozyten über TLR 2 und TLR 4 (Lin, 2000). Es kommt zu einer leicht erhöhten Ausschüttung des Zytokins IL-6. Zusätzlich konnte eine Stimulation der 3T3L1 Adipozyten durch Poly I:C gezeigt werden. Im Unterschied zu 3T3L1 wurden WT Adipozyten außer durch Poly I:C und LPS auch deutlich durch Loxoribin und ODN 1668 stimuliert.

In den Zelllinien *ob/ob* und *db/db* zeigten sich in allen Stimulationsversuchen Konzentrationsanstiege mit bis zu 10-fach höheren IL-6 Konzentrationen. Für direkt aus dem Fettgewebe isolierte *ob/ob* Adipozyten ist bekannt, dass sie eine erhöhte Basisexpression von IL-6 mRNA aufweisen und auf eine Stimulation mit LPS mit einer erhöhten IL-6 Freisetzung reagieren (Harkins, 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte diese Beobachtung für die Zytokinfreisetzung bestätigt und erweitert werden. Dabei wurde der Faktor zehn in den meisten Stimulationen beibehalten. In den durchgeführten Versuchen zeigte sich Poly I:C als potentester Stimulus für beide Zelllinien.

IV.2 Auswirkung im Tiermodell

Nach seiner Entdeckung ist die Rolle von Leptin im Körper stetig weiter charakterisiert worden. In diesem Zusammenhang zeigte sich bald eine enge Korrelation zwischen der Energiehomöostase und dem Immunsystem. Verschiedene Studien bzw. Beschreibungen des Fastens zeigten einen deutlichen Einfluss von Leptin auf das Immunsystem (Fantuzzi, 2000; Chandra, 1996).

Es ist schon lange bekannt, dass untergewichtige Individuen anfälliger für Infektionen sind. Lord et al. konnten zeigen, dass unter Leptin-Abwesenheit die Immunantwort in Richtung T-Helfer Zellen Typ 2 verschoben ist und somit die pro-entzündliche Funktion über T-Helfer Zellen Typ 1 nur vermindert abläuft. Wird Leptin der T-Zell-Kultur zugesetzt, verschiebt sich die T-Zell Immunantwort in Richtung T-Helfer Zellen Typ 1 (Lord 1998).

Gleichzeitig zeigen *ob/ob* Mäuse eine reduzierte Anzahl an natürlichen Killerzellen und konsekutiv eine herabgesetzte Empfindlichkeit gegenüber einer T-Zell getragenen, durch Con A induzierten Leberentzündung (Siegmund, *Eur J Immunol.* 2002). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Leptin einen regulatorischen Einfluss

auf die Entwicklung und Proliferation der natürlichen Killerzellpopulation hat. Unter Abwesenheit von Leptin ist die Anzahl an natürlichen Killerzellen vermindert (Tian, 2002).

Des Weiteren konnte eine herabgesetzte Phagozytoseaktivität für Alveolarmakrophagen in *ob/ob* Mäusen beschrieben werden, die die Mäuse für eine *Klebsiella pneumoniae* Infektion empfänglicher macht. Durch exogen zugeführtes Leptin in *in vitro* Versuchen war dieser Effekt reversibel (Mancuso, 2002). So scheint Leptin im angeborenen Immunsystem die Phagozytose durch Monozyten bzw. Makrophagen zu aktivieren und möglicherweise auch die TLR Aktivierung zu beeinflussen.

Dies lässt sich auch in Tiermodellen zeigen. Es existieren verschiedene Modelle für Entzündungen oder Autoimmunerkrankungen, so auch für die Kolitis. Durch Natriumdextransulfat (dextran sulfat sodium – DSS) wird eine akute Entzündung durch direkte Wirkung auf die Schleimhaut im Kolon ausgelöst. Im Verlauf kann sich eine chronische Entzündung entwickeln, vermutlich wegen einer verzögerten Regeneration der Schleimhaut. In diesem Zusammenhang scheinen Lymphozyten eine Rolle zu spielen. Insgesamt handelt es sich um ein Modell, das primär zu einer Barrierestörung führt, die in diesem Modell u. a. durch Immunzellen vermittelt wird (Dieleman, 1998). Ein weiteres Kolitis Modell, welches eher eine Kolitis im distalen Kolonabschnitt vermittelt, ist die TNBS Kolitis (Siegmund, *Gastroenterology* 2002).

Es wurden Versuche mit Mäusen, die kein Leptin bilden können (*ob/ob*), und Wildtyp Mäusen durchgeführt. Hier zeigte sich, dass *ob/ob* Mäuse in beiden Kolitis Modellen resistent gegenüber einer akuten oder chronischen Entzündung waren (Siegmund, *Gastroenterology* 2002).

Eine Übersicht über weitere Tiermodelle, für die ein modulierender Effekt durch Leptin beschrieben wurde, gibt Tabelle 14.

Tabelle 14: Leptin–Defizienz und Verhalten im Tiermodell (LaCava, 2004; Batra, 2005)

Protektion
Autoimmunenenzephalitis (Matarese, 2001; Sanna, 2003)
Antigen induzierte Arthritis (Busso, 2002)
Immunkomplex-Nephritis (Tarzi, 2004)
ConA induzierte Hepatitis (Faggioni, 2000; Siegmund, <i>Eur J Immunol</i> 2002)
Colitis
<i>Clostridium difficile</i> Toxin A (Mykoniatis, 2003)
DSS (Siegmund, <i>Gastroenterology</i> 2002)
TNBS (Siegmund, <i>Gastroenterology</i> 2002)
Transfer-Modell (Siegmund, 2004)
Erhöhte Sensibilität
Endotoxin induzierter Schock (Yang, 1997)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> -Pneumonie (Mancuso, 2002)
Zymosan induzierte Arthritis (Bernotiene, 2004)

In Bezug auf Adipozyten zeigte Leptin ebenfalls einen starken regulatorischen Einfluss. Bezogen auf das Expressionsprofil der TLRs zeigten die 3T3L1 und WT Zellen, bei Anwesenheit von Leptin, eine geringere TLR Expression. Dem gegenüber zeigten die *ob/ob* und *db/db* Zellen, unter Abwesenheit von Leptin, ein breiteres TLR Expressionsprofil. Gleichzeitig belegten die Stimulationsversuche zusätzlich eine verstärkte Stimulation unter Abwesenheit von Leptin.

Erstmalig wird ein vollständiges TLR Expressionsprofil für Adipozyten präsentiert. Dabei konnten die in der Literatur beschriebenen TLRs auf 3T3L1 Adipozyten (siehe IV.1) bestätigt und erweitert werden. Unter Einschluss zweier Zelllinien, *ob/ob* und *db/db*, konnte gleichzeitig der immunmodulierende Effekt für Leptin weiter charakterisiert werden.

Bereits bekannt ist, dass *ob/ob* Mäuse anfälliger für eine über LPS induzierte, und damit über TLR 4 vermittelte, Entzündung und einer darüber induzierten Sterblichkeit sind (Faggioni, 1999). Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche deuten auf einen möglichen Erklärungsansatz hin.

Bei der nachgewiesenen nahen Verwandtschaft von Präadipozyten und Monozyten (Charrière, 2002) könnte man annehmen, dass Leptin auch auf Monozyten das TLR-Expressionsprofil beeinflussen kann. Es wurde beschrieben, dass *ob/ob* Mäuse ebenfalls eine erhöhte Sterblichkeit auf z. B. eine *Klebsiella pneumoniae* Infektion zeigen (Mancuso, 2002). Dieses Bakterium stimuliert, als gram-negatives Bakterium mit Kapsel (in dieser Kapsel ist Kapsel-Polysaccharid enthalten), seine Immunantwort über TLR 4 und kann gleichzeitig die Expression von TLR 4 und TLR 2 auf Bronchialepithel anregen (Regueiro, 2009). Mancuso et al. konnten eine gesteigerte TNF- α Produktion der Alveolarmakrophagen bei *ob/ob* Mäusen während einer Klebsiellen Infektion nachweisen (Mancuso, 2002). Auch in den vorliegenden Stimulationsversuchen war eine TNF- α Konzentrationserhöhung unter Stimulation mit LPS in Adipozyten der *ob/ob* Zelllinien zu messen. Dies ist ein weiteres Indiz für die Annahme, dass die erhöhte Mortalität in Leptin-defizienten Mäusen über eine LPS – TLR 4 Interaktion vermittelt werden könnte.

Ob sich das TLR Expressionsprofil von Monozyten/Makrophagen in *ob/ob* bzw. *db/db* Mäusen wie das der Adipozyten verhält, bleibt offen.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Leptin abhängige Regulation der TLR-Expression in den Adipozyten gezeigt werden. Dies bestätigt einmal mehr die modulatorische Funktion von Leptin auf die angeborene Immunantwort.

Interessanterweise wirkt Leptin in der zellvermittelten Immunantwort herabregulierend und kann so vor einer Entzündung schützen. Auf TLR Ebene wiederum erhöht es das Expressionsprofil der TLRs und steigert die Stimulation über diese Rezeptoren bei Adipozyten. Darüber könnte, bei erhöhter Anwesenheit von Bakterien und gleichzeitig verminderter Aktivität der die Bakterien eliminierenden Zellen, eine verstärkte Stimulation im Organismus stattfinden und eine verstärkte Entzündung hervorgerufen werden (siehe Abb. 17).

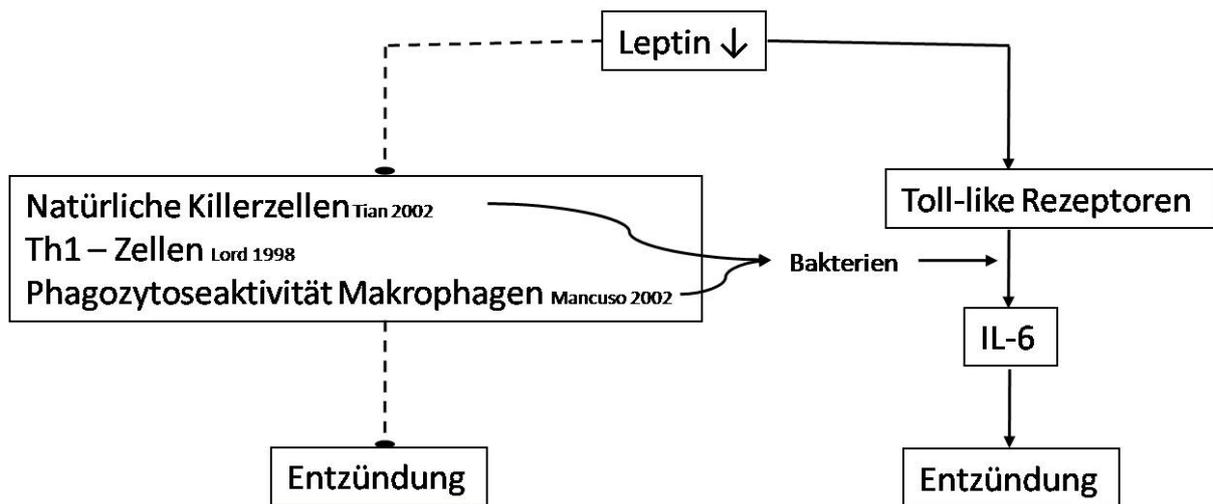


Abb. 17: Modulation der Immunantwort durch Leptin Die Abbildung zeigt den Einfluss von Leptin auf die Immunantwort bei Abwesenheit bzw. verminderter Leptinkonzentration. Dabei stellen Pfeile eine Aktivierung bzw. vermehrte Anzahl, gestrichelte Linien eine Inhibierung bzw. verminderte Anzahl oder Aktivität/Wirkung dar.

Eine hochregulierte TLR Expression könnte somit eine natürliche Reaktion des Körpers sein, ganz im Sinne eines negativen Feedback Mechanismus, um eine Restimmunität zu gewährleisten.

IV.3 Klinische Relevanz

Leptin zeigt in seiner Funktion im Körper eine integrative Stellung, die sowohl der hormonellen Wirkung als auch der Wirkung als Zytokin einen großen Einflussbereich darbietet (siehe Einleitung I.3).

In dieser Arbeit sollten die Adipozyten hinsichtlich ihrer Interaktionsmöglichkeit mit Antigenen charakterisiert werden. Für eine Interaktion müssen Antigene, also Bakterien oder Teile von ihnen, in unmittelbarer Nähe zu Adipozyten des mesenterialen Fettgewebes zu finden sein. Bei Morbus Crohn ist eine Translokation von Bakterien aus dem Darmlumen ins Mesenterium bekannt, wobei der Bakteriengehalt im Fettgewebe höher ist als im mesenterialen Lymphknotengewebe (Peyrin-Biroulet, 2007). Morbus Crohn Patienten weisen im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen eine erhöhte bakterielle Besiedlung auf (Swidsinski, 2002). In erhöhter Konzentration werden dabei u. a. *Escherichia coli*, *Bacteroides vulgatus* (Marteau, 2004) und *Mycobacterium paratuberculosis* (Ohkusa, 2004) gefunden. *E. coli* und *Bacteroides vulgatus* sind gram-negative Bakterien und zeichnen sich durch eine Zellwand aus, die z. T. Ähnlichkeiten zur Zellwand von gram-positiven Bakterien

zeigt. Der Zellwandbestandteil LPS von gram-negativen Bakterien wird über den TLR 4 erkannt, *Mycobacterium paratuberculosis* wird über den TLR 2 erkannt (Ferwerda, 2007). Beide TLR werden auf Adipozyten exprimiert und könnten durch die Bakterien stimuliert werden. Dadurch könnte die aufrecht erhaltene Entzündung bei Morbus Crohn Patienten erklärt werden (Peyrin-Biroulet, 2007; Podolsky, 2002).

Interessant in diesem Zusammenhang ist zusätzlich die beschriebene erhöhte Lipolyse des den LK umgebenden Fettgewebes bei Stimulation des LK mit LPS (Pond, 2001). Bei wiederholter Stimulation werden auch weiter entfernt liegende Adipozyten durch das Lymphgewebe aktiviert und zur Fettsäurebereitstellung herangezogen. Diese Adipozyten unterliegen dann der lokalen Kontrolle durch das LK-Gewebe und beteiligen sich nicht mehr an der Energiehomöostase des Körpers. Die gespeicherten Fettsäuren führen zu einer Vergrößerung des perinodalen Fettgewebes. Dies könnte eine Erklärung für die Fettgewebshypertrophie bei Morbus Crohn Patienten sein, da die chronische Entzündung einen Stimulus für eine Vergrößerung des Fettgewebsdepots darstellt (Pond, 2001).

Obwohl die Interaktion der LK mit dem umliegenden Fettgewebe gut beschrieben ist, könnte auch das übrige Fettgewebe in die Interaktion eingebunden sein, da dort die Bakteriendichte höher ist als im LK selbst (Peyrin-Biroulet, 2007). Durch die gesamte Masse des mesenterialen Fettgewebes wäre die fortwährende Aktivierung der Adipozyten mit Ausschüttung von Zytokinen ein permanenter Entzündungsreiz.

Der Nachweis von TLR auf Adipozyten gewichtet die Bedeutung der bakteriellen Translokation neu.

IV.4 Fazit

Ziel dieser Arbeit war es, die Stellung der Adipozyten im angeborenen Immunsystem genauer zu beschreiben. Erstmals konnte ein gesamtes TLR Expressionsprofil für Adipozyten nachgewiesen werden. Dies ist ein weiterer Baustein in der Charakterisierung des Fettgewebes in seiner integrativen Stellung in der Energiehomöostase und zum Immunsystem.

Durch Einschluss von Leptin-defizienten und Leptin-Rezeptor defizienten Zelllinien konnte zusätzlich eine deutliche Abhängigkeit der TLR Expression von der

Anwesenheit von Leptin gezeigt werden. Die immunmodulatorische Wirkung von Leptin konnte damit weiter charakterisiert werden.

V Zusammenfassung

Das Fettgewebe wurde bisher überwiegend als Energiespeicher beachtet. In den vergangenen Jahren sind jedoch zunehmend Daten veröffentlicht worden, die eine enge Verbindung zwischen dem Fettgewebe und dem Immunsystem nahe legen. So ist das Fettgewebe in der Lage, pro-entzündliche Zytokine, wie IL-6 und TNF- α , zu bilden (Coppack, 2001). Desweiteren wird das Hormon Leptin, ein Adipokin mit stimulierendem Effekt auf verschiedene Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems, hauptsächlich im Fettgewebe gebildet (Rajala, 2003). Eine kürzlich von Charrière et al veröffentlichte Arbeit zeigt, dass sich Präadipozyten, die Vorläuferzellen von Adipozyten, in Zellen umwandeln können, die Eigenschaften von peritonealen Makrophagen aufweisen (Charrière, 2002).

Zur weiterführenden Charakterisierung der Vernetzung des Fettgewebes mit dem Immunsystem wurden für diese Arbeit Versuche mit Adipozyten durchgeführt. Untersucht wurde das Expressionsmuster für Toll-like Rezeptoren auf Adipozyten, welche als „pattern recognition receptors“ auf den verschiedenen Zellen des angeborenen Immunsystems zu finden sind. Darüber hinaus wurden die Adipozyten mit verschiedenen Toll-like Rezeptor spezifischen Liganden stimuliert. In die Versuche wurden Leptin defiziente Zelllinien (*ob/ob* und *db/db*) eingeschlossen, um einen möglichen regulatorischen Effekt von Leptin zu identifizieren.

Adipozyten Zelllinien von 3T3L1, BL6, *ob/ob* und *db/db* wurden zunächst auf mRNA Ebene mittels PCR charakterisiert. Die verschiedenen Zelllinien zeigten unterschiedliche Spektren an Toll-like Rezeptoren. Dabei war das größte Spektrum in Abwesenheit des Leptin (*ob/ob*) und des Leptin Signalweges (*db/db*) vorhanden. Hier konnten alle untersuchten Toll-like Rezeptoren nachgewiesen werden. Die Zelllinie 3T3L1 exprimiert mRNA für die Toll-like Rezeptoren 1 bis 4 und 6. Die Zelllinie BL6 zeigte eine mRNA Expression für die Toll-like Rezeptoren 1 bis 8.

Auf Proteinebene konnten in Western Blot Analysen in allen Zelllinien die getesteten Toll-like Rezeptoren 2, 3, 5, 7 und 9 detektiert werden.

Die Funktionalität wurde in Stimulationsversuchen überprüft. Die Zellen wurden dazu mit spezifischen Liganden für drei Tage kultiviert und in den Überständen wurden die Zytokine IL-6 und TNF- α mittels ELISA bestimmt.

Eine signifikante TNF- α Produktion war nur für die *ob/ob* Zelllinie bei Stimulation des Toll-like Rezeptors 4 nachzuweisen.

Alle Zelllinien produzierten bei Stimulation IL-6, wobei die IL-6 Ausschüttung in den *ob/ob* und *db/db* Zelllinien etwa 10mal höher war als in den 3T3L1 und BL6 Zelllinien. Insgesamt wurden die *ob/ob* und *db/db* Zelllinien durch mehr Toll-like Rezeptor spezifische Liganden stimuliert, wie die Versuche auf mRNA und Proteinebene schon hatten vermuten lassen.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Daten, dass Adipozyten nicht nur Toll-like Rezeptoren exprimieren, sondern dass diese auch funktionell sind, da es nach spezifischer Stimulation zu einer Zytokinausschüttung kam. Sowohl das Toll-like Rezeptor Expressionsprofil als auch die Stimulation zeigen Leptinabhängigkeit, wobei die Abwesenheit von Leptin mit einer höheren Toll-like Rezeptor Expression und auch Zytokinantwort assoziiert war. Die Expression funktioneller Toll-like Rezeptoren auf Adipozyten erlaubt somit die Einordnung dieser Zellen in das angeborene Immunsystem.

VI Literatur

- Abbas A, Lichtman A.** *Cellular and molecular Immunology*. Fifth Edition ed Saunders - An Imprint of Elsevier Science (USA); 2003.
- Ahima RS, Flier JS.** Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab.* 2000;11(8):327-32.
- Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, et al.** Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature.* 1996;382(6588):250-2.
- Akira S, Takeda K, Kaisho T.** Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* 2001;2(8):675-80.
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA.** Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature.* 2001;413(6857):732-8.
- Andoh A, Fujiyama Y.** Therapeutic approaches targeting intestinal microflora in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2006;12(28):4452-60.
- Batra A, Zeitz M, Siegmund B.** [The role of leptin in the immune system--a linking of endocrinology and immunology]. *Dtsch Med Wochenschr.* 2005;130(5):226-9.
- Berg AH, Lin Y, Lisanti MP, Scherer PE.** Adipocyte differentiation induces dynamic changes in NF-kappaB expression and activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004;287(6):E1178-88.
- Berg RD.** Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends Microbiol.* 1995;3(4):149-54.
- Bernotiene E, Palmer G, Talabot-Ayer D, Szalay-Quinodoz I, Aubert ML, Gabay C.** Delayed resolution of acute inflammation during zymosan-induced arthritis in leptin-deficient mice. *Arthritis Res Ther.* 2004;6(3):R256-63.
- Busso N, So A, Chobaz-Peclat V, et al.** Leptin signaling deficiency impairs humoral and cellular immune responses and attenuates experimental arthritis. *J Immunol.* 2002;168(2):875-82.
- Cario E.** Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut.* 2005;54(8):1182-93.
- Chandra RK.** Nutrition, immunity and infection: from basic knowledge of dietary manipulation of immune responses to practical application of ameliorating suffering and improving survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(25):14304-7.
- Charriere G, Cousin B, Arnaud E, et al.** Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J Biol Chem.* 2003;278(11):9850-5.
- Chuang T, Ulevitch RJ.** Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1518(1-2):157-61.
- Coppack SW.** Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc.* 2001;60(3):349-56.
- Cousin B, Andre M, Casteilla L, Penicaud L.** Altered macrophage-like functions of preadipocytes in inflammation and genetic obesity. *J Cell Physiol.* 2001;186(3):380-6.
- Cousin B, Munoz O, Andre M, et al.** A role for preadipocytes as macrophage-like cells. *Faseb J.* 1999;13(2):305-12.

- Cowley MA, Pronchuk N, Fan W, Dinulescu DM, Colmers WF, Cone RD.** Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. *Neuron*. 1999;24(1):155-63.
- Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD.** Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. 1932. *Mt Sinai J Med*. 2000;67(3):263-8.
- Desreumaux P, Ernst O, Geboes K, et al.** Inflammatory alterations in mesenteric adipose tissue in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1999;117(1):73-81.
- Evans JM, McMahon AD, Murray FE, McDevitt DG, MacDonald TM.** Non-steroidal anti-inflammatory drugs are associated with emergency admission to hospital for colitis due to inflammatory bowel disease. *Gut*. 1997;40(5):619-22.
- Faggioni R, Fantuzzi G, Gabay C, et al.** Leptin deficiency enhances sensitivity to endotoxin-induced lethality. *Am J Physiol*. 1999;276(1 Pt 2):R136-42.
- Faggioni R, Jones-Carson J, Reed DA, et al.** Leptin-deficient (ob/ob) mice are protected from T cell-mediated hepatotoxicity: role of tumor necrosis factor alpha and IL-18. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(5):2367-72.
- Fantuzzi G, Faggioni R.** Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol*. 2000;68(4):437-46.
- Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, et al.** Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest*. 2002;110(8):1093-103.
- Feller M, Huwiler K, Stephan R, et al.** Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2007;7(9):607-13.
- Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS.** Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(3):847-50.
- Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL.** Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol*. 2001;167(4):1882-5.
- Harkins JM, Moustaid-Moussa N, Chung YJ, et al.** Expression of interleukin-6 is greater in preadipocytes than in adipocytes of 3T3-L1 cells and C57BL/6J and ob/ob mice. *J Nutr*. 2004;134(10):2673-7.
- Hasan U, Chaffois C, Gaillard C, et al.** Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol*. 2005;174(5):2942-50.
- Heil F, Hemmi H, Hochrein H, et al.** Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*. 2004;303(5663):1526-9.
- Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, et al.** Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol*. 2002;3(2):196-200.
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al.** A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 2000;408(6813):740-5.
- Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM.** Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. 1995;95(5):2409-15.
- Janssens S, Beyaert R.** Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16(4):637-46.

- Karlinger K, Gyorke T, Mako E, Mester A, Tarjan Z.** The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur J Radiol.* 2000;35(3):154-67.
- Kleessen B, Kroesen AJ, Buhr HJ, Blaut M.** Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls. *Scand J Gastroenterol.* 2002;37(9):1034-41.
- Koc E, Ustundag G, Aliefendioglu D, Ergenekon E, Bideci A, Atalay Y.** Serum leptin levels and their relationship to tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in neonatal sepsis. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2003;16(9):1283-7.
- Krude H, Biebermann H, Schnabel D, et al.** Obesity due to proopiomelanocortin deficiency: three new cases and treatment trials with thyroid hormone and ACTH4-10. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(10):4633-40.
- La Cava A, Matarese G.** The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(5):371-9.
- Lee J, Chuang TH, Redecke V, et al.** Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(11):6646-51.
- Leibel RL, Chung WK, Chua SC, Jr.** The molecular genetics of rodent single gene obesities. *J Biol Chem.* 1997;272(51):31937-40.
- Lemaitre B, Reichhart JM, Hoffmann JA.** Drosophila host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(26):14614-9.
- Lin Y, Lee H, Berg AH, Lisanti MP, Shapiro L, Scherer PE.** The lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes. *J Biol Chem.* 2000;275(32):24255-63.
- Lindberg E, Tysk C, Andersson K, Jarnerot G.** Smoking and inflammatory bowel disease. A case control study. *Gut.* 1988;29(3):352-7.
- Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI.** Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature.* 1998;394(6696):897-901.
- Lyon CJ, Law RE, Hsueh WA.** Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. *Endocrinology.* 2003;144(6):2195-200.
- Mancuso P, Gottschalk A, Phare SM, Peters-Golden M, Lukacs NW, Huffnagle GB.** Leptin-deficient mice exhibit impaired host defense in Gram-negative pneumonia. *J Immunol.* 2002;168(8):4018-24.
- Marteau P, Lepage P, Mangin I, et al.** Review article: gut flora and inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004;20 Suppl 4:18-23.
- Marti A, Marcos A, Martinez JA.** Obesity and immune function relationships. *Obes Rev.* 2001;2(2):131-40.
- Matarese G, Di Giacomo A, Sanna V, et al.** Requirement for leptin in the induction and progression of autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2001;166(10):5909-16.
- Mizel SB, Snipes JA.** Gram-negative flagellin-induced self-tolerance is associated with a block in interleukin-1 receptor-associated kinase release from toll-like receptor 5. *J Biol Chem.* 2002;277(25):22414-20.

- Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, et al.** Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(12):4196-200.
- Munzberg H, Myers MG, Jr.** Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat Neurosci.* 2005;8(5):566-70.
- Mykoniatis A, Anton PM, Wik M, et al.** Leptin mediates *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis in mice. *Gastroenterology.* 2003;124(3):683-91.
- O'Boyle CJ, MacFie J, Mitchell CJ, Johnstone D, Sagar PM, Sedman PC.** Microbiology of bacterial translocation in humans. *Gut.* 1998;42(1):29-35.
- Ohkusa T, Nomura T, Sato N.** The role of bacterial infection in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Intern Med.* 2004;43(7):534-9.
- O'Rahilly S, Farooqi IS, Yeo GS, Challis BG.** Minireview: human obesity-lessons from monogenic disorders. *Endocrinology.* 2003;144(9):3757-64.
- Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, et al.** The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(25):13766-71.
- Park HS, Park JY, Yu R.** Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF-alpha and IL-6. *Diabetes Res Clin Pract.* 2005;69(1):29-35.
- Peyrin-Biroulet L, Chamailard M, Gonzalez F, et al.** Mesenteric fat in Crohn's disease: a pathogenetic hallmark or an innocent bystander? *Gut.* 2007;56(4):577-83.
- Podolsky DK.** Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med.* 2002;347(6):417-29.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, et al.** Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* 1998;282(5396):2085-8.
- Pond CM.** Long-term changes in adipose tissue in human disease. *Proc Nutr Soc.* 2001;60(3):365-74.
- Rajala MW, Scherer PE.** Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology.* 2003;144(9):3765-73.
- Regueiro V, Moranta D, Campos MA, Margareto J, Garmendia J, Bengoechea JA.** *Klebsiella pneumoniae* increases the levels of Toll-like receptors 2 and 4 in human airway epithelial cells. *Infect Immun.* 2009;77(2):714-24.
- Ruan H, Hacoheh N, Golub TR, Van Parijs L, Lodish HF.** Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory. *Diabetes.* 2002;51(5):1319-36.
- Ruan H, Pownall HJ, Lodish HF.** Troglitazone antagonizes tumor necrosis factor-alpha-induced reprogramming of adipocyte gene expression by inhibiting the transcriptional regulatory functions of NF-kappaB. *J Biol Chem.* 2003;278(30):28181-92.
- Sahu A.** Minireview: A hypothalamic role in energy balance with special emphasis on leptin. *Endocrinology.* 2004;145(6):2613-20.
- Sanna V, Di Giacomo A, La Cava A, et al.** Leptin surge precedes onset of autoimmune encephalomyelitis and correlates with development of pathogenic T cell responses. *J Clin Invest.* 2003;111(2):241-50.

- Sarraf P, Frederich RC, Turner EM, et al.** Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia. *J Exp Med.* 1997;185(1):171-5.
- Schaffler A, Herfarth H.** Creeping fat in Crohn's disease: travelling in a creeper lane of research? *Gut.* 2005;54(6):742-4.
- Schaffler A, Scholmerich J, Buchler C.** Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue--emerging role in intestinal and mesenteric diseases. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2005;2(2):103-11.
- Schaffler A, Scholmerich J, Salzberger B.** Adipose tissue as an immunological organ: Toll-like receptors, C1q/TNFs and CTRPs. *Trends Immunol.* 2007;28(9):393-9.
- Sheehan AL, Warren BF, Gear MW, Shepherd NA.** Fat-wrapping in Crohn's disease: pathological basis and relevance to surgical practice. *Br J Surg.* 1992;79(9):955-8.
- Siegmund B, Lear-Kaul KC, Faggioni R, Fantuzzi G.** Leptin deficiency, not obesity, protects mice from Con A-induced hepatitis. *Eur J Immunol.* 2002;32(2):552-60.
- Siegmund B, Lehr HA, Fantuzzi G.** Leptin: a pivotal mediator of intestinal inflammation in mice. *Gastroenterology.* 2002;122(7):2011-25.
- Siegmund B, Sennello JA, Jones-Carson J, et al.** Leptin receptor expression on T lymphocytes modulates chronic intestinal inflammation in mice. *Gut.* 2004;53(7):965-72.
- Siegmund B, Sennello JA, Lehr HA, et al.** Development of intestinal inflammation in double IL-10- and leptin-deficient mice. *J Leukoc Biol.* 2004;76(4):782-6.
- Siegrist-Kaiser CA, Pauli V, Juge-Aubry CE, et al.** Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue. *J Clin Invest.* 1997;100(11):2858-64.
- Stunz LL, Lenert P, Peckham D, et al.** Inhibitory oligonucleotides specifically block effects of stimulatory CpG oligonucleotides in B cells. *Eur J Immunol.* 2002;32(5):1212-22.
- Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, et al.** Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2002;122(1):44-54.
- Takeda K, Akira S.** Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.* 2005;17(1):1-14.
- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, et al.** Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity.* 1999;11(4):443-51.
- Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, et al.** Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol.* 2001;13(7):933-40.
- Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, et al.** Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol.* 2002;169(1):10-4.
- Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, Colombel JF.** Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2004;53(1):1-4.
- Tarzi RM, Cook HT, Jackson I, Pusey CD, Lord GM.** Leptin-deficient mice are protected from accelerated nephrotoxic nephritis. *Am J Pathol.* 2004;164(2):385-90.

- Tian Z, Sun R, Wei H, Gao B.** Impaired natural killer (NK) cell activity in leptin receptor deficient mice: leptin as a critical regulator in NK cell development and activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;298(3):297-302.
- Tysk C, Lindberg E, Järnerot G, Floderus-Myrhed B.** Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut.* 1988;29(7):990-6.
- Tzou P, De Gregorio E, Lemaitre B.** How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol.* 2002;5(1):102-10.
- Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, et al.** The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature.* 1999;401(6755):811-5.
- Wyllie DH, Kiss-Toth E, Visintin A, et al.** Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. *J Immunol.* 2000;165(12):7125-32.
- Yamamoto K, Kiyohara T, Murayama Y, et al.** Production of adiponectin, an anti-inflammatory protein, in mesenteric adipose tissue in Crohn's disease. *Gut.* 2005;54(6):789-96.
- Yamamoto-Furusho JK.** Genetic factors associated with the development of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2007;13(42):5594-7.
- Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Clemens M, Diehl AM.** Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(6):2557-62.
- Yarasheski KE, Zachwieja JJ, Horgan MM, Powderly WG, Santiago JV, Landt M.** Serum leptin concentrations in human immunodeficiency virus-infected men with low adiposity. *Metabolism.* 1997;46(3):303-5.
- Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW.** C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(4):972-8.
- Zhang D, Zhang G, Hayden MS, et al.** A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1522-6.
- Zigman JM, Elmquist JK.** Minireview: From anorexia to obesity--the yin and yang of body weight control. *Endocrinology.* 2003;144(9):3749-56.

VII Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei PD Dr. Britta Siegmund für die Vergabe dieses interessanten Promotionsthemas und für die Möglichkeit, in ihrer Arbeitsgruppe die Arbeit anzufertigen, bedanken. Ihre fortwährende Unterstützung in allen Phasen der Arbeit bedeutet mir sehr viel.

Ebenfalls danke ich Dr. Arvind Batra für die unermüdliche Unterstützung bei meinen ersten Schritten in der Laborarbeit, die hilfreichen Anregungen und Diskussionen sowie für seine vielen Anmerkungen bei der schriftlichen Zusammenfassung der Arbeit.

Ein besonderer Dank geht an Inka Freise, die mir bei meinen vielen Fragen in der praktischen Laborarbeit immer mit einer helfenden Hand und unendlicher Geduld zur Seite stand. Die Zusammenarbeit in der angenehmen Atmosphäre hat mir viel Freude bereitet.

Auch der übrigen Arbeitsgruppe gilt mein Dank für eine unvergessliche Zeit in meinem Leben.

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung meiner Familie und Freunde undenkbar gewesen. Ich danke euch: meiner Mutter, Jessica, Vanessa, Familie Lim, Britta; v.a. Jessica, die hautnah den Prozess begleitet und gelitten hat.

Nicht zuletzt möchte ich Gott dafür danken, dass er mich in meinem Leben sicher geleitet hat und dies alles möglich wurde. Er war und ist mir ein immer treuer Begleiter. Danke.

VIII Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

IX Veröffentlichungen

Artikel

Batra A, **Pietsch J**, Fedke I, Glauben R, Okur B, Stroh T, Zeitz M, Siegmund B., Leptin-dependent toll-like receptor expression and responsiveness in preadipocytes and adipocytes. *Am J Pathol.* 2007 Jun;170(6):1931-41.

Poster

Batra A., **Pietsch J.**, Glauben R., Stroh T., Okur B., Fedke I., Zeitz M., Siegmund B. Leptin: Ein wichtiger Mediator bei intestinaler Entzündung – Rolle von Adipozyten und Präadipozyten im angeborenen Immunsystem. *Z Gastroenterol* (2005) 43:P095

Arvind Batra, **Jeannette Pietsch**, Thorsten Stroh, Rainer Glauben, Besir Okur, Inka Fedke, Martin Zeitz, Britta Siegmund. Preadipocytes and adipocytes are sensitive to TLR-specific stimulation – possible contributors to innate immunity? *Immunobiology* (2005) 210:p582 W.22

Thorsten Stroh, Arvind Batra, Rainer Glauben, Inka Fedke, **Jeannette Pietsch**, Besir Okur, Martin Zeitz, Britta Siegmund. NOD1, NOD2, NALP3: Expression and function in preadipocytes as new members of the innate immunessystem. *Immunobiology* (2005) 210:p582 W.22

Batra A, Glauben R, **Pietsch J**, Fedke I, Zeitz M, Siegmund B, Preadipocyte and adipocytes as critical regulators of intestinal inflammation?

Pietsch J, Batra A, Stroh T, Fedke I, Glauben R, Okur B, Zeitz M, Siegmund B. Toll-like receptor expression and response to specific stimulation in adipocytes and preadipocytes: on the role of fat in inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Aug;1072:407-9.

Arvind Batra, **Jeannette Pietsch**, Rainer Glauben, Thorsten Stroh, Besir Okur, Inka Fedke, Martin Zeitz, Britta Siegmund. Adipozyten und Präadipozyten: Proinflammatorische Zellen im mesenterialen Fettgewebe. *Z Gastroenterol* (2006) 44:V21

Arvind Batra, **Jeannette Pietsch**, Thorsten Stroh, Rainer Glauben, Besir Okur, Inka Fedke, Martin Zeitz, Britta Siegmund. TLR-specific cytokine production by preadipocytes and adipocytes – further evidence that adipose tissue is linked to innate immunity, DDW 2006

Arvind Batra, Markus M. Heimesaat, Stefan Bereswill, **Jeannette Pietsch**, Thorsten Stroh, Rainer Glauben, Inka Fedke, Martin Zeitz, Britta Siegmund. TLR – expression in cells from adipose tissue – a contribution to chronic inflammation? DGFI 2007:

Arvind Batra, Markus M. Heimesaat, Stefan Bereswill, Inka Fedke, **Jeannette Pietsch**, Thorsten Stroh, Rainer Glauben, Martin Zeitz, Britta Siegmund. TLR-vermittelte Zytokinproduktion durch Zellen des Fettgewebes – ein Beitrag zur chronischen Entzündung?, DGVS 2007

Arvind Batra, Markus M. Heimesaat, Stefan Bereswill, **Jeannette Pietsch**, Thorsten Stroh, Rainer Glauben, Inka Fedke, Martin Zeitz, Britta Siegmund. TLR - responsiveness of cells in adipose tissue – a possible contribution to chronic inflammation?, DDW 2007:

X Erklärung auf Eigenständigkeit

„Ich, Jeannette Pietsch, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Die Rolle der Adipozyten im angeborenen Immunsystem“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, 15.06.2010
