1	Ein	leitu	ng	1
	1.1	Vor	bemerkung	1
	1.2	Adip	positas, Inflammation und die Folgen	1
	1.3	Aufl	bau des Fettgewebes	2
	1.4	Prä	adipozyten und Adipozyten: Immunologische Betrachtung	3
	1.5	Мес	diatoren aus dem Fettgewebe	4
	1.5.	1	Leptin	4
	1.5.	2	Adiponektin	6
	1.5.	3	Morbus Crohn: Entzündung und das mesenteriale Fettgewebe	12
	1.6	Her	leitung der Fragestellung	14
2	Mat	erial	I und Methoden	16
	2.1	Mat	erialien	16
	2.1.	1	Chemikalien und Kits	16
	2.1.	2	Material und Geräte	18
	2.1.	3	Tiere und Zelllinien	18
	2.1.	4	Medien	19
	2.1.	5	Puffer und Lösungen	20
	2.1.	6	Zytokine	21
	2.1.	7	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest	22
	2.1.	8	Primer	22
	2.1.	9	Antikörper	23
	2.2	Met	hoden	24
	2.2.	1	Durchflusszytometrie	24
	2.2.	2	Zellisolation und Zellkultur	25
	2.2.	3	Nachweis der Zytokinproduktion	34
	2.2.	4	Nachweis Adiponektin-Rezeptor-spezifischer mRNS	36

	2.2.	5	Proteinnachweis durch Western Blot	.39	
3	Erg	ebni	isse	.42	
	3.1	Imn	nunologische Aktivität von Präadipozyten	.42	
	3.1.	1	Charakterisierung über Oberflächenantigene	.42	
	3.1.	2	Antigen-spezifische Stimulation von CD4 ⁺ Th-Zellen	.44	
	3.1.	3	Produktion von Adiponektin durch Präadipozyten und Adipozyten	.45	
	3.2	Olig	gomerisierungsgrad von gAd und Adiponektin	.46	
	3.3	Einf	fluss von gAd auf die Produktion von IL-6 und TNF- α durch Makrophage	n 47	
	34	Wir	kung von Adiponektin auf CD4 ⁺ Th-Zellen		
	3.4.	1	Expression der Adiponektin-Rezeptoren 1 und 2 durch CD4 ⁺ Th-Zellen	.47	
	3.4.	2	Quantifizierung der Expression der Adiponektin-Rezeptoren 1 und 2 du CD4 ⁺ Th-Zellen	ırch	
	3.4.	3	Induktion von IFN γ in CD4 ⁺ Th-Zellen durch gAd	.50	
	3.4.	4	Einfluss von gAd auf die Polarisation von CD4 ⁺ Th-Zellen	.51	
	3.4.	5	Einfluss von gAd auf die Proliferation von CD4 ⁺ Th-Zellen	.52	
4	Dis	kuss	sion	.54	
5	Zus	amr	nenfassung	.63	
6	Lite	eratu	ırverzeichnis	.65	
7	Dar	Danksagung77			
8	Leb	Lebenslauf78			
9	Ver	Veröffentlichungen79			
1(0 S	elbs	stständigkeitserklärung	.80	

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AdipoR	Adiponektin-Rezeptor
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
BMI	body mass index
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CD	cluster of differentiation
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CFSE	Carboxy-Fluorescein-Succinimidyl-Ester
CRP	C-reaktives Protein
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Da	Dalton
db/db	Leptin-Rezeptor-Defizienz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DRFZ	Deutsches Rheuma-Forschungszentrum Berlin
DSS	Dextran Natriumsulfat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym gekoppelter Immunadsorptionstest (<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>)
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiozyanat
g	Erdschwerebeschleunigung
gAd	globuläres Adiponektin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HMW	Hohes Molekulargewicht (high molecular weight)
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
IFN	Interferon
lg	Immunglobulin
IL	Interleukin
КНК	koronare Herzkrankheit
КО	knockout
LMW	Niedriges Molekulargewicht (<i>low molecular weight</i>)

LPS	Lipopolysaccharid
MACS	Magnetisch-aktivierte Zellauftrennung (magnetic activated cell separation)
M-CSF	Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
MFI	Durchschnittliche Fluoreszenzintensität (mean fluorescence intensity)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major</i> histocompatibility complex)
MMW	Mittleres Molekulargewicht (<i>medium molecular weight</i>)
MOMA-2	Monozyten/ Makrophagenmarker-2
NF-ĸB	Nukleärer Faktor-ĸB
NOD	nucleotide oligomerization domain
ob/ob	Defizienz des Leptin-Gens
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PRR	Muster-erkennende Rezeptoren (<i>pattern recognition receptors</i>)
PVM	Präadipozyten-Vollmedium
RNS	Ribonkuleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium sodecyl sulfate)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean)
TAE	Trishydroxymethylaminomethan-Acetat/ Ethylendiamintetraessigsäure
TGF	transforming growth factor
Th	T-Helfer
TLR	Toll-like Rezeptor
TNBS	Trinitrobenzensulfonsäure
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TZM	T-Zell-Medium
TZR	T-Zell-Rezeptor

1 Einleitung

1.1 Vorbemerkung

Fettleibigkeit ist in vielen Ländern mit westlichem Lebensstil zum Massenphänomen geworden. Die Ursachen dafür sind in der ständigen Verfügbarkeit und veränderten Zusammensetzung der Nahrung sowie in einer unzureichenden physischen Aktivität vieler Menschen suchen. Die Betroffenen leiden zu vermehrt unter "Zivilisationserkrankungen" wie z.B. Diabetes mellitus Typ 2, Bluthochdruck und Atherosklerose [1]. Dadurch wird deutlich, dass das Fettgewebe die Homöostase des Organismus beeinflusst, und dass seine Vermehrung bei übergewichtigen Menschen zu Fehlregulationen und Krankheit führen kann [2]. Dabei ist besonders interessant, dass eine Interaktion zwischen Fettgewebe und Immunsystem zu bestehen scheint [3]. Ziel dieser Arbeit ist es, das Zusammenspiel zwischen Fettzellen und Bestandteilen des Immunsystems genauer zu untersuchen. Im Mittelpunkt der Arbeit stehen dabei vom Fettgewebe produzierte Mediatoren, die Adipokine.

1.2 Adipositas, Inflammation und die Folgen

Die Zahl der Personen, die von Übergewicht und Adipositas betroffen sind, ist weltweit 1,1 Milliarden angestiegen. Dies stellt besonders in den westlichen auf Industrienationen ein enormes sozialökonomisches und gesundheitliches Problem dar [4]. Übergewicht (body mass index, BMI \geq 25 kg/m²) und Adipositas (BMI \geq 30 kg/m²) sind mit dem Auftreten von Bluthochdruck, Atherosklerose, Diabetes mellitus Typ 2 und koronarer Herzkrankheit (KHK) assoziiert. Auch die Inzidenz maligner Tumorerkrankungen ist bei den Betroffenen erhöht. So steigt das Risiko, an Krebs zu erkranken, um ein Drittel an und die Wahrscheinlichkeit, an den Folgen einer KHK zu versterben, liegt um 40% über der von Normalgewichtigen [1, 5]. Der genaue pathophysiologische Zusammenhang zwischen einem Übermaß an Fettgewebe und diesen Erkrankungen ist noch nicht eindeutig geklärt. Durch die Entdeckung von teilweise ausschließlich von Fettzellen produzierten Mediatoren und durch den Nachweis von im Fettgewebe produzierten Zytokinen konnte eine mögliche Ursache für die Assoziation von Adipositas mit den genannten Erkrankungen identifiziert werden [6].

Adipositas wird heute als ein Zustand chronischer Entzündung angesehen, der durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine durch Fettzellen, die Adipozyten, und durch sekundär in das Fettgewebe eingewanderte Zellen verursacht wird [7]. Diese

inflammatorische Reaktion ist durch eine erhöhte Plasmakonzentration spezifischer Entzündungsparameter, wie des C-reaktiven Proteins (*capsel reactive protein*, CRP) oder Interleukin (IL)-6, gekennzeichnet und wird für die gesteigerte Prävalenz bestimmter mit Adipositas assoziierter Erkrankungen verantwortlich gemacht [3, 8]. Mittlerweile wird das Fettgewebe somit nicht mehr als bloßes Energiespeicherorgan, sondern auch als aktives endokrines Gewebe und als eine das Immunsystem beeinflussende Größe betrachtet.

1.3 Aufbau des Fettgewebes

Rund ein Fünftel des menschlichen Körpers besteht aus Fettgewebe, das in weißes und braunes Fettgewebe unterteilt wird. Braunes Fettgewebe, dessen Farbe durch die hohe Ribosomenzahl bedingt ist, dient der Wärmegeneration vor allem bei Neugeborenen, da sie die Körpertemperatur noch nicht durch Zittern allein regulieren können. Das weiße Fettgewebe wird je nach Funktion und Lokalisation in Speicher-, Bau- und Isolierfettgewebe unterteilt [9].

Die dominierende Zelle im Fettgewebe ist der Adipozyt, der sich lichtmikroskopisch als runde, mit mehreren Fettvakuolen gefüllte Zelle darstellt. Das Volumen der Fettvakuolen ist abhängig vom Ernährungszustand des Organismus, meist jedoch nehmen sie den Großteil des Zytoplasmas ein, sodass der Zellkern exzentrisch gelagert ist. Die Vorläuferzelle des Adipozyten ist der Präadipozyt, eine lichtmikroskopisch spindelförmige, fibroblastenähnliche Zelle mit prominentem, rundem Zellkern. Charakteristische Oberflächenantigene von Präadipozyten sind der Präadipozytenfaktor-1 und das Adipozyten Enhancer Protein-1 [10]. Des Weiteren finden sich im Fettgewebe sekundär eingewanderte Zellen wie z.B. Lymphozyten und Makrophagen, aber auch Blutgefäße und Fettgewebematrix [11]. Der anatomische Aufbau des weißen Fettgewebes ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt.



Abbildung 1 Schematischer Aufbau des weißen Fettgewebes nach [11, 12]

1.4 Präadipozyten und Adipozyten: Immunologische Betrachtung

Präadipozyten besitzen Eigenschaften, die sie immunologisch in die Nähe von Makrophagen rücken lassen. So exprimieren sie teilweise das Makrophagen-typische Oberflächenantigen Monozyten/ Makrophagenmarker (MOMA)-2 und das kostimulatorische Molekül CD80 (das auch als B7.1 bezeichnet wird). Die Expression weiterer Makrophagen-typischer Oberflächenantigene auf Präadipozyten wurde nachgewiesen [13]. Ein Zell-Zell-Kontakt zwischen Makrophagen und Präadipozyten führte *in vitro* zu einer Änderung des Phänotyps der Präadipozyten in Richtung von Makrophagen [14].

Für Präadipozyten und Adipozyten wurde die Expression und Funktionalität von Toll-like-Rezeptoren (TLR) gezeigt [15, 16]. TLR gehören zu einer Familie von Rezeptoren, die Pathogene anhand von charakteristischen Antigenmustern erkennen (pattern recognition receptors, PRR) und die Aktivierung des angeborenen Sie Immunsystems bewirken können. sind typisch für Monozyten und Makrophagen [17]. Weiterhin wurden die nucleotide oligomerization domain (NOD) 1 und 2, bei denen es sich um intrazelluläre PRR handelt, bei Präadipozyten beschrieben und gezeigt, dass sie an Pathogen-induzierter Zytokinproduktion bei diesen Zellen beteiligt sind [18].

Die immunologisch interessanten Eigenschaften von Präadipozyten und Adipozyten erschöpfen sich nicht in der Expression von Makrophagen-typischen Oberflächenantigenen und PRR. Es wurde nachgewiesen, dass Stimulation von humanen Adipozyten in Kultur mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) die Expression der Boten-Ribonukleinsäure (mRNS) von IL-6, Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-α und IL-1 fördert [10]. Weiterhin konnte bei Präadipozyten- und Adipozytenkulturen Interferon (IFN)γ und IL-6 im Überstand nachgewiesen werden [15, 19]. Diese Beobachtungen weisen auf die Fähigkeit von Präadipozyten und Adipozyten hin, Zytokine produzieren zu können. Für Präadipozyten wurde zusätzlich gezeigt, dass sie zu Phagozytose in der Lage sind [14].

1.5 Mediatoren aus dem Fettgewebe

1.5.1 Leptin

Struktur und metabolische Funktion

Das 1994 entdeckte Adipokin Leptin ist ein Peptidhormon mit einer Größe von 16 kDa, das durch das *obese* (*ob*)–Gen codiert wird [20]. Es besitzt strukturelle Ähnlichkeit mit IL-6 und bindet an den in mindestens fünf Isoformen vorliegenden Leptin-Rezeptor [21]. Leptin wird hauptsächlich von Adipozyten produziert, wobei die Menge des im Blut zirkulierenden Leptins direkt mit der Masse des weißen Fettgewebes korreliert. Es reguliert die Nahrungsaufnahme und metabolische Aktivität des Organismus u.a. durch die Induktion des Appetit mindernd wirkenden Polypeptides Pro-Opiomelanocortin und durch die Suppression von Neuropeptid Y und Orexin, die Appetit steigernde Eigenschaften besitzen [22-24].

Funktion im Immunsystem

Im Bezug auf das Immunsystem ist Leptin das gegenwärtig am besten charakterisierte Adipokin. Der Leptin-Rezeptor wird von allen Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems exprimiert, wobei die Wirkung von Leptin über verschiedene Signaltransduktionswege vermittelt wird [25]. Auf mononukleäre Zellen zeigt Leptin eine proinflammatorische Wirkung im Sinne einer erhöhten Sekretion proinflammatorischer Zytokine und einer vermehrten phagozytotischen Aktivität [26, 27]. Auf Zellen des adaptiven Immunsystems scheint Leptin einen permissiven proinflammatorischen Einfluss zu haben. So fördert seine Gegenwart bei T-Zellen die Proliferation und Ausbildung proinflammatorischer Zytokinprofile, wenn diese gleichzeitig durch kostimulatorische Moleküle aktiviert werden [28].

Mäuse, denen die funktionelle lange Isoform des Leptin-Rezeptors fehlt (*db/db*), zeigen eine Atrophie der Thymusrinde. Bei Tieren, die nicht in der Lage dazu sind, Leptin zu produzieren (*ob/ob*), lässt sich neben einem extremen Übergewicht auch eine erhöhte Apoptoserate in der Thymusrinde und eine allgemeine Reduktion der Immunkompetenz feststellen [29]. So konnte nachgewiesen werden, dass *ob/ob*-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp bakterielle Pneumonien schlechter überleben [26]. Demgegenüber verläuft eine autoimmune Entzündung bei *ob/ob*- und *db/db*-Mäusen milder [30]. Tabelle 1 zeigt eine Zusammenfassung der durch Leptin-Defizienz vermittelten Modulation des Immunsystems im Tiermodell.

Tabelle 1	Leptin-Defizienz	vermittelte	Modulation	der	Immunantwort	im	Tiermodell,
nach [31].							

Funktion	Modell	Referenz
Protektion	ConA induzierte Hepatitis	[32]
	Antigen-induzierte Arthritis	[30]
	Immunkomplex-Nephritis	[33]
	Autoimmunenzephalomyelitis	[34]
	Kolitis:	
	Clostridium difficile Toxin A	[35]
	Dextran-Sulfat Sulfonsäure	[36]
	Trinitrobenzen Sulfonsäure Transfer-Modell	[37]
Erhöhte Sensibilität	Endotoxin induzierter Schock	[38]
	Klebsiella pneumoniae-Pneumonie	[26]
	Zymosan-induzierte Arthritis	[39]

Bei Menschen führt eine angeborene Leptin-Defizienz ebenso zu extremem Übergewicht und zu einer erhöhten Anfälligkeit für bakterielle Infektionen [40]. Die Verabreichung von exogenem Leptin vermindert im Tiermodell die Apoptoserate von T-Zellen in der Thymusrinde sowie deren Atrophie, und normalisiert bei Leptindefizienten Menschen die Zahl von T-Zellen [29, 40, 41].

Insgesamt deuten die experimentellen Ergebnisse auf eine proinflammatorische Rolle von Leptin bei der Regulation der Immunantwort hin [23, 30, 42].

1.5.2 Adiponektin

Struktur und Funktion

Im Jahr 1995 wurde durch mehrere Arbeitsgruppen unabhängig voneinander ein ausschließlich vom Fettgewebe produziertes Adipokin beschrieben, das Adiponektin, das ebenfalls als AdipoQ, Acrp30 und GBP28 bezeichnet wurde [43-45].

Adiponektin besteht aus 244 Aminosäureresten und besitzt eine Masse von 30 kDa, wobei Sequenzähnlichkeiten sowohl zu Kollagen VIII und Kollagen X als auch zum Komplementfaktor C1q vorhanden sind [43]. Im menschlichen Plasma liegt die Adiponektin-Konzentration bei gesunden Individuen im Bereich von 2-17 µg/ml und ist mit einem Anteil von 0,05% am Plasmaprotein der am höchsten im Blut konzentrierte Mediator des Fettgewebes. Im Gegensatz zu anderen vom Fettgewebe produzierten Mediatoren, deren Plasmakonzentration mit einer Erhöhung des BMI ansteigt, besteht zwischen Adiponektin und dem BMI eine negative Korrelation [46].

Das Adiponektin-Monomer setzt sich aus einer C-terminalen globulären Domäne (gAd), mit einem Molekulargewicht von 16 kDa und einer N-terminalen fibrillären Domäne zusammen. Es bestehen Homologien zum Komplementfaktor C1q und zu TNF-α [43, 47]. Das Adiponektin-Monomer wird auch als "Adiponektin voller Länge" bezeichnet. Rekombinant hergestellt kann sowohl gAd als auch das Adiponektin-Monomer vorliegen [48, 49].

Adiponektin hat *in vivo* die Eigenschaft, sich in Oligomeren anzuordnen. Man unterscheidet zwischen Trimeren mit niedrigem Molekulargewicht (*low molecular weight*, LMW), Hexameren mit mittlerem Molekulargewicht (*medium molecular weight*, MMW) und Multimeren mit hohem Molekulargewicht (*high molecular weight*, HMW) (Abbildung 2). Den unterschiedlichen Oligomeren wird eine unterschiedliche Wirkung und Rezeptoraffinität zugeschrieben [50, 51]. Die Struktur des Trimers wird durch intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den Monomeren hergestellt. Weitere Aggregate werden aus diesen Trimeren ebenfalls über solche kovalenten Bindungen stabilisiert [52]. Im Plasma liegt Adiponektin hauptsächlich in hexamerer und multimerer Form vor, wobei die enzymatische Spaltung von höhermolekularem Adiponektin in gAd auf zellulärer Ebene nachgewiesen werden konnte [53, 54]. Die Bedeutung von gAd ist noch nicht vollständig geklärt; es wird eine Funktion als biologisch aktive Form von höhermolekularem Adiponektin diskutiert [55-58].



Abbildung 2 Schematische Darstellung bekannter Adiponektin-Oligomere. Das Adiponektin-Monomer (A) setzt sich aus einer globulären und einer N-terminalen Domäne zusammen und bildet "Adiponektin voller Länge". Im Plasma zirkuliert Adiponektin in oligomeren Formen. Dargestellt sind das trimere LMW-Adiponektin (B), das hexamere MMW-Adiponektin (C) und das mit 12 bis 18 Adiponektin-Monomeren multimere HMW-Adiponektin (D) nach [59, 60].

Rezeptoren

Bislang wurden zwei Isoformen des Adiponektin-Rezeptors (AdipoR) beschrieben, AdipoR1 und AdipoR2 [61]. Beide Rezeptoren sind integrale Membranproteine mit sieben Transmembrandomänen, intrazellulärem N-Terminus und extrazellulärem C-Terminus. In ihrem Expressionsmuster und in ihrer Affinität zu den unterschiedlichen Adiponektin-Oligomeren unterscheiden sich die beiden Rezeptoren. Der AdipoR1 wird u.a. in der Skelettmuskulatur exprimiert, besitzt eine höhere Affinität für gAd als für die Adiponektin-Multimere und ist an der Regulation des zellulären Lipidmetabolismus beteiligt. Der AdipoR2 wurde u.a. im Lebergewebe nachgewiesen und besitzt eine größere Affinität für die Adiponektin-Multimere [59, 61]. Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2 sind sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen mit einer verminderten Expression der beiden Rezeptor-Isoformen assoziiert [62, 63].

Aktuell wird diskutiert, ob T-Cadherin, das auf Endothel- und glatten Muskelzellen exprimiert wird, eine Rolle in der Adiponektin-vermittelten Signaltransduktion spielt [64].

Intrazelluläre Signaltransduktionswege

Zentral für die von Adiponektin vermittelten intrazellulären Signale ist die Adenosinmonophosphat (AMP)-aktivierte Proteinkinase (AMPK). Sie reguliert die intrazellulären Konzentrationen von zyklischem AMP, wodurch u.a. die Aktivität des nukleären Faktors-κB (NF-κB) gesteuert wird [59]. Dies kann, abhängig vom biologischen Kontext, zu einer Aktivierung von NF-κB oder Hemmung eines entzündlichen Prozesses führen. [65, 66]. In Muskel- und Lebergewebe kommt es durch Adiponektin zu einer Aktivierung des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors (PPAR)-α [59]. Die unterschiedlichen Adiponektin-Oligomere sind weiterhin dazu in der Lage, verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege anzusteuern. So führt LMW-Adiponektin dazu nicht in der Lage sind. Für MMW- und HMW-Adiponektin, jedoch nicht für LMW-Adiponektin, wurde die Aktivierung des NF-κB nachgewiesen [67].

Metabolische Effekte

Adiponektin wird eine Rolle in der Aufrechterhaltung normoglykämischer Blutwerte und als Insulin-Sensitizer zugesprochen [68]. Adiponektin-Knockout (KO) Mäuse zeigen eine milde bis moderate Insulinresistenz, besonders wenn sie mit fettreicher Kost ernährt werden [69]. Außerdem neigen diese Tiere bei salzreicher Nahrung zu atherosklerotischen Gefäßveränderungen und Hypertension, wobei Adiponektin-Gabe diese Veränderungen rückgängig macht [70-72].

Mäuse mit Nahrungs-induzierter Adipositas werden durch Adiponektin-Gabe vor Insulinresistenz geschützt bzw. zeigen eine verbesserte Glukosetoleranz und einen Gewichtsverlust [73]. Die Glukoneogeneseaktivität der Leber wird durch die Aktivierung der Adiponektin-Rezeptoren inhibiert [59]. Weiterhin kommt es im Skelettmuskel in Gegenwart von Adiponektin zu einer vermehrten Translokation des Glukosetransporters 4 und zu einer verstärkten muskulären Fettsäureoxidation [57].

Vaskuläre Effekte

Eine entzündliche Endothelzellaktivierung, die zu einer luminalen Adhäsion und Aktivierung von zirkulierenden Makrophagen führt, ist ein Bestandteil der Entstehung von Atherosklerose. Für Adiponektin wurde nachgewiesen, dass es die Expression von Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen nach inflammatorischer Stimulation durch TNF-a vermindert und damit der Makrophagenadhäsion entgegenwirkt [74, 75]. Weiterhin wurde eine Inhibition von NF-κB nach TNF-α-vermittelter Endothelzellaktivierung durch Adiponektin beobachtet [76]. Auch scheint Adiponektin in Abhängigkeit von seinem Oligomerisierungsgrad endotheliale Wachstumsfaktoren zu binden und somit die Weiterleitung proliferativer Reize an Endothelzellen zu inhibieren [77]. Es konnte gezeigt werden, dass Adiponektin bei menschlichen Endothelzellen der Aorta zu verminderter Nachweisbarkeit von IL-8-spezifischer mRNS führt, wobei IL-8 eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose zugeschrieben wird [78]. Auch trägt Adiponektin zu einer Verminderung der Lipid-Konzentration in Schaumzellen bei [79]. Die in vitro-Beobachtungen wurden in einem Mausmodell bestätigt, in dem die Gabe von Adiponektin zu einer Verminderung der Bildung atherosklerotischer Läsionen führte und die mRNS-Konzentration endothelialer Zelladhäsionsmoleküle senkte [80]. Insgesamt kann also von antiatheromatösen Eigenschaften von Adiponektin ausgegangen werden, wobei besonders die antiinflammatorischen Effekte von Bedeutung sind.

Antikanzerogener Effekt

Eine Reihe von Tumorerkrankungen ist mit einem niedrigen Adiponektin-Spiegel assoziiert [81]. Dabei wurde bislang ein antiproliferativer Effekt von Adiponektin auf myeloische Vorläuferzellen nachgewiesen [82]. Es wird angenommen, dass die antikanzerogene Wirkung durch die Aktivierung der AMPK vermittelt wird, wobei auch Leptin und IL-6 eine Rolle zu spielen scheinen [83, 84].

Effekte in der Entzündung

Adiponektin weist *in vitro* eine Reihe antiinflammatorischer Eigenschaften auf. Bei Makrophagen inhibiert eine Präinkubation mit Adiponektin die LPS-vermittelte Produktion von TNF-α sowie IL-6 und induziert die Produktion von IL-10, einem antiinflammatorischen Zytokin [85]. Weiterhin wurde eine Suppression der über TLR vermittelten NF-κB-Aktivierung bei murinen Makrophagen beobachtet [86]. Es konnte aber auch die Induktion proinflammatorischer Zytokine bei mononukleären Zellen durch Adiponektin nachgewiesen werden [48]. Jedoch scheint sich die Auffassung durchzusetzen, dass Adiponektin eine antiinflammatorische Wirkung auf diese Zellen besitzt [48, 87, 88].

In vivo-Daten zur Auswirkung von Adiponektin auf Entzündungsreaktionen zeigen unterschiedliche Ergebnisse. So wurde beschrieben, dass Adiponektin-KO-Mäuse in einem Standardmodell intestinaler Inflammation vor der Induktion einer chemischen Kolitis durch Dextran Natriumsulfat (DSS) oder Trinitrobenzensulfonsäure (TNBS) geschützt sind und exogene Zufuhr von Adiponektin diesen Schutz aufhob [89]. Ebenfalls wurde publiziert, dass nach Induktion einer chemischen Kolitis durch DSS die Adiponektin-KO-Tiere eine stärkere intestinale Inflammation zeigten und Administration von Adiponektin protektiv wirkt. Bei einer durch TNBS induzierten chemischen Kolitis nahm Adiponektin diesmal keinen Einfluss auf den Verlauf der Entzündungsreaktion [90].

Beim Menschen besteht eine inverse Korrelation zwischen den Plasmakonzentrationen von Adiponektin und dem systemischen Entzündungsmarker CRP [91-94]. Die CRP-Plasmakonzentration wird im klinischen Alltag quantifiziert, um das Ausmaß und den Verlauf von Entzündungsreaktionen einzuschätzen [95]. Neuere Studien identifizieren erhöhte CRP-Konzentrationen als möglichen prognostischen Parameter für das Auftreten von KHK und zur Einschätzung der systemischen Inflammation bei Patienten mit Metabolischem Syndrom [91, 96].

Die *in vitro* nachgewiesene Hemmung der Adiponektin-Produktion bei Adipozyten durch die proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF-α wäre eine mögliche Erklärung für das Absinken der Adiponektin-Plasmakonzentration bei Personen mit erhöhtem BMI [97, 98]. Im Rahmen einer chronischen Entzündungsreaktion bei Adipositas sind IL-6 und TNF-α in erhöhter Konzentration im Fettgewebe nachweisbar [99]. Somit könnte es zu einem negativen Feedback durch die Unterdrückung der dort stattfindenden Adiponektin-Produktion kommen [97].

Bei chronischen Erkrankungen, die nicht mit einer Erhöhung des BMI einhergehen, wie z.B. rheumatoide Arthritis, systemischer Lupus erythematodes oder Diabetes mellitus Typ 1, findet man im Plasma der Patienten erhöhte Konzentrationen von Adiponektin [100]. Dies ist nicht zwangsläufig mit einer proinflammatorischen Rolle

dieses Adipokins gleichzusetzen, sondern könnte auf der katabolen Stoffwechsellage, die mit diesen Erkrankungen assoziiert ist, beruhen [101]. Bei Patienten mit Morbus Crohn liegt Adiponektin im viszeralen Fettgewebe, das entzündeten Darmabschnitten unmittelbar benachbart ist, in erhöhter Konzentration vor [102, 103].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass neben einer Reihe gesicherter metabolischer Effekte von Adiponektin die Datenlage zu den immunologischen Auswirkungen teilweise widersprüchlich und die genaue Funktion von Adiponektin noch ungeklärt ist. Es gibt dabei sowohl Hinweise auf proinflammatorische als auch auf antiinflammatorische Wirkungskomponenten dieses Adipokins (Abbildung 3).



Abbildung 3 Metabolische und immunologische Eigenschaften von Adiponektin nach [59].

1.5.3 Morbus Crohn: Entzündung und das mesenteriale Fettgewebe

Die Hypertrophie des mesenterialen Fettgewebes in der Nähe von erkrankten Darmabschnitten ist ein bekanntes Phänomen bei Morbus Crohn-Patienten. Es stellt sich die Frage, ob das Fettgewebe hierbei am Entzündungsprozess beteiligt ist [104].

Die Prävalenz des Morbus Crohn liegt in Deutschland bei 5,2 pro 100.000 Einwohner [105]. Symptome der Erkrankung sind Diarrhö, abdominelle Schmerzen, Gewichtsverlust, Fieber und rektale Blutungen. Intestinale Manifestationen betreffen häufig das terminale Ileum, können aber im gesamten Verdauungstrakt auftreten und bestehen in Strikturen, Fisteln und einem erhöhten Krebsrisiko [106]. Histologisch ist der Morbus Crohn durch eine transmurale Entzündung des Darmes, durch nichtverkäsende Granulome in Verbindung mit einer Migration von Lymphozyten in die entzündeten Darmabschnitte und durch eine segmentale Ausbreitung, so genannte *skip lesions*, gekennzeichnet [107]. Die Ätiologie des Morbus Crohn ist noch nicht vollständig geklärt. Jedoch deuten Forschungsergebnisse auf ein komplexes Zusammenspiel von Faktoren auf verschiedenen Ebenen hin (Abbildung 4).

Wichtige Einflüsse kommen aus der Umwelt. Auf eine Rolle luminaler Bakterien bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der Krankheit deutet eine Besserung der Symptome nach therapeutischer Modulation der Darmflora hin. Jedoch wurde bislang kein einzelnes Bakterium als Auslöser des Morbus Crohn identifiziert, sodass davon ausgegangen wird, dass die Zusammensetzung der Darmflora entscheidend ist [108, 109].

Bei der Ernährung besteht eine positive Korrelation zwischen einem erhöhten Anteil von Fett in der Nahrung und dem Auftreten der Erkrankung. Ob einzelne Nahrungsbestandteile Ursache des Morbus Crohn sind, oder ob sie eine bestehende Entzündungsreaktion verstärken können, ist offen [110].

Ein weiterer relevanter Umweltfaktor ist der Zigarettenkonsum. Raucher zeigen im Vergleich zu Nichtrauchern eine erhöhte Inzidenz und einen schwereren Verlauf des Morbus Crohn. Auch ehemalige Raucher sind davon betroffen. Da Zigarettenrauch eine große Zahl unterschiedlicher Bestandteile enthält, ist anzunehmen, dass unterschiedliche Mechanismen für die negativen Effekte des Rauchens beim Morbus Crohn verantwortlich sind; u.a. wird eine Reduktion von antioxidativ wirkenden Bestandteilen des Blutes diskutiert [111].

Neben diesen von außen wirkenden Einflüssen werden zunehmend genetische Faktoren, die sowohl die mukosale Barrierefunktion als auch Bestandteile des angeborenen und adaptiven Immunsystems betreffen, als Ursache für die Entstehung des Morbus Crohn angesehen. Die Darmepithelien von Morbus Crohn-Patienten zeigen neben den bereits beschriebenen histologischen Veränderungen molekulargenetische Auffälligkeiten. Es wurde eine verminderte Expression von Cadherinen, die zur Gruppe der Zelladhäsionsproteine gehören, bei aktivem Morbus Crohn festgestellt [112]. Ein Defekt der Barrierefunktion der intestinalen Mukosa, der die Fehlfunktion eines Prostaglandinrezeptors bedingt, geht im Mausmodell mit einer erhöhten Induzierbarkeit einer dem Morbus Crohn ähnlichen Kolitis einher [113]. Als weiteres Beispiel für die Rolle einer beeinträchtigten Funktionalität des Darmepithels in der Entstehung des Morbus Crohn ist eine die Paneth'schen Körnerzellen betreffende Mutation des ATG16L1-Gens zu nennen. Durch diese Mutation wird die Wirkung der antimikrobiellen Granula dieser Zellen erhöhte Krankheitsinzidenz vermindert und eine beobachtet [114].

Für eine Beteiligung des angeborenen Immunsystems bei der Entstehung des Morbus Crohn spricht die homozygote Mutation des intrazellullären PRR NOD 2, die mit einer bis zu 40-fachen Erhöhung des Auftretens der Erkrankung vergesellschaftet ist [115]. Auch Fehlregulationen des adaptiven Immunsystems scheinen eine Rolle in der Krankheitsentstehung zu spielen. Die Neutralisation des u.a. von T-Helfer (Th)1-Zellen produzierten Zytokins IL-12 schützt im Tiermodel vor experimentell induzierter Kolitis [116]. Weiterhin scheint eine Störung der Signalkaskade des IL-23 zu einer Fehlregulation von Th17-Zellen und einer erhöhten Erkrankungswahrscheinlichkeit zu führen [117].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Ursachen des Morbus Crohn multifaktorieller Genese sind, wobei genetisch bedingte Fehlregulationen in den Fokus der Forschung rückten. Es gibt weiterhin Hinweise, die auf eine Rolle von Adipokinen beim Krankheitsbild des Morbus Crohn deuten, wie z.B. abnorme Leptin- und Adiponektin-Konzentrationen im betroffenen Gewebe oder in dessen Nachbarschaft [102, 103, 118]. Dabei könnte die Modulation des angeborenen und adaptiven Immunsystems ein Aspekt des Wirkungsprofils von Adipokinen sein.



Abbildung 4 Pathophysiologische Faktoren in der Entstehung des Morbus Crohn nach [106]

1.6 Herleitung der Fragestellung

Bei Patienten, die an Morbus Crohn erkrankt sind, wird häufig eine Hypertrophie des Fettgewebes in der Nachbarschaft entzündeter Darmabschnitte beobachtet, deren Ursache noch ungeklärt ist [119]. Im Rahmen der Entzündung kommt es durch die eingeschränkte Barrierefunktion der intestinalen Mukosa zu einer Translokation von Bakterien und somit zu einem direkten Kontakt zwischen bakteriellen Antigenen und dem mesenterialen Fettgewebe [104]. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass sowohl Präadipozyten als auch Adipozyten Eigenschaften aufweisen, die für zelluläre Bestandteile des Immunsystems charakteristisch sind. So zeigen Präadipozyten sind Produzenten proinflammatorischer Zytokine, wie IL-6, TNF-α und Leptin [19, 120].

Um einen weiteren Einblick in die Rolle von Präadipozyten im Ablauf von Entzündungsreaktionen zu gewinnen, sollte in dieser Arbeit ein Profil immunologisch relevanter Oberflächenantigene von Präadipozyten erstellt und zusätzlich ermittelt werden, ob Leptin-Kompetenz oder die Gegenwart von TLR-Liganden dieses beeinflusst. In Anbetracht der nachgewiesenen Phagozytoseaktivität von Präadipozyten sollte außerdem festgestellt werden, ob sie T-Zellen Antigen-spezifisch stimulieren können.

Neben der Sekretion von IL-6, TNF-α und einer Reihe weiterer Zytokine sind Adipozyten die Produzenten des Adipokins Adiponektin. Die Rolle von Adiponektin in Entzündungsreaktionen, auch im Zusammenhang mit dem Morbus Crohn, sind Gegenstand der Forschung [100, 102, 103]. Dabei wurden die immunologischen Eigenschaften von Adiponektin bisher hauptsächlich im Hinblick auf die Zytokinproduktion von Makrophagen untersucht [85, 86].

In dieser Arbeit sollte der Fokus daher auf Wirkungen dieses Adipokins auf Th-Zellen liegen. Dabei wurde zunächst der Oligomerisierungsgrad von gAd sowie Adiponektin bestimmt und die Funktionalität des eingesetzten rekombinanten gAd *in vitro* überprüft. Anschließend wurde festgestellt, ob Th-Zellen Adiponektin-Rezeptoren exprimieren. Daraufhin wurde der Einfluss von gAd auf die Zytokinproduktion, Polarisation und Proliferation von CD4⁺ Th-Zellen charakterisiert.

Zusammengefasst sollten mit Hilfe dieser Arbeit folgende Fragen beantwortet werden:

- Welche immunologisch relevanten Oberflächenantigene besitzen Präadipozyten? Spielen bei der Expression von Oberflächenantigenen Leptin-Kompetenz oder die Gegenwart von TLR-Liganden eine Rolle?
- Können Präadipozyten CD4⁺ Th-Zellen Antigen-spezifisch stimulieren?
- Welchen Oligomerisierungsgrad zeigt Adiponektin und das in dieser Arbeit verwendete gAd? Besitzt es biologische Aktivität?
- Exprimieren Th-Zellen Adiponektin-Rezeptoren?
- Beeinflusst gAd die Zytokinproduktion, Polarisation oder Proliferation von CD4⁺ Th-Zellen?

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Kits

5x first strand Puffer	Qiagen (Hilden)
5x Green GoTaq Flexi Puffer	Promega (Mannheim)
Aqua dest.	Fresenius Kabi (Bad Homburg)
Agarose	Carl Roth (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich (München)
Amphotericin B	Biochrom (Berlin)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
cDNS Synthesis System	Invitrogen (Karlsruhe)
Chemolumineszenz-Substrat A und B	GE Healthcare Europe (München)
Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Leiter, 100 bp	Invitrogen
DNase I	Qiagen
Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP)	Carl Roth
Dithiothreitol	Carl Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Flagellin	InvivoGen (Toulouse, Frankreich)
Fötales Kälberserum (FCS)	Linaris (Wertheim-Betingen)
Glycerin	Merck KGaA (Darmstadt)
Glycin	Carl Roth
Go Taq-Polymerase, 5 U/ml	Promega
H ₃ PO ₄	Merck KGaA
HCI	Carl Roth
Ionomycin	Sigma-Aldrich
KCI	Merck KGaA
KH ₂ PO4	Merck KGaA
KHCO ₃	Merck KGaA
L-Glutamin	PAA Laboratories (Pasching)
LPS (ultra pure)	Sigma-Aldrich
Magnetisch-aktivierte Zellauftrennung (MACS) <i>Release</i>	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Methanol	Mallinckrodt Baker (Griesheim)
MgCl ₂ (25 mM)	Promega
Mitomycin C	Sigma-Aldrich

<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i> Reverse Transkriptase	Invitrogen
Monensin	Sigma-Aldrich
Na ₂ HPO ₄	Carl Roth
NaCl	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
NH ₄ Cl	Sigma-Aldrich
Opt EIA Substrat A	BD Biosciences (Heidelberg)
Opt EIA Substrat B	BD Biosciences
OVA ₃₂₃₋₃₃₉ -Peptid	Institut für Biochemie der Humboldt-Universität (Berlin)
Paraformaldehyd	Carl Roth
Penicillin/ Streptomycin	PAA Laboratories
Phorbol 12-Myristat 13-Acetat	Sigma-Aldrich
Platinum SYBR-Green Polymerase- Kettenreaktion (PCR) Super-Mix	Invitrogen
Rinderserumalbumin (BSA)	PAA Laboratories
RNaseOUT	Qiagen
 RNeasy Mini Kit Ribonukleinase (RNase)-/ Desoxyribonukleinase (DNase)-freies Wasser RNeasy Lysis Puffer RNeasy Mini Spin-Säule RPE-Puffer RW1-Puffer 	Qiagen
Acrylamid, 30% (Rotiphorese Gel A)	Carl Roth
Bisacrylamid, 2% (Rotiphorese Gel B)	Carl Roth
Saponin	Sigma-Aldrich
Streptavidin/ Fluorescein Isothiozyanat (FITC)- Konjugat	Dako (Hamburg)
Tetramethylbenzidin	BD Biosciences
Tetramethylethylendiamin	BioRad (München)
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)-Base	Carl Roth
TRIS-EDTA-Acetat-Puffer, 50x konzentriert	Genaxxon (Ulm)
Trypsin-EDTA (0,05%-0,02% in Phosphat- gepufferter Kochsalzlösung [PBS])	PAA Laboratories
Tween 20	Carl Roth
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	BD Biosciences
Zymosan	InvivoGen

2.1.2 Material und Geräte

Brutschrank Heracell 150 Detektionseinheit für Enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA): Opsys MR Detektor für Flüssigkeitsszintillation Durchflusszytometer FACSCanto mit Auswertesoftware Durchlichtmikroskop Entwickler X-omat 5000 RA Prozessor Feinwaage Scout II Halterung und Magnet für MACS Realtime-PCR-System Lightcycler MACS Zellauftrennungssäule LS MACS Zelltrennungsfilter Mini-Gel Elektrophoresekammer Mini-Trans *Blot* Elektrophoresekammer Polyvinylidenfluorid-Membran Sofortbildkamera DS 34 Stromguelle PowerPac Basic Thermocycler T3000 Zellkulturflaschen Zellkulturplatten Zellsiebe Zentrifuge 5810R

Heraeus (Hanau) Dynex Technologies (Chantilly, VA, USA) LKB Wallac (Turku, Finnland) **BD** Biosciences Krüss (Hamburg) Kodak (Rochester, USA) Ohaus (Pine Brook, USA) Miltenyi Biotec Roche (Mannheim) Miltenyi Biotec Miltenyi Biotec BioRad BioRad Millipore (Schwalbach) Polaroid (Waltham, USA) BioRad Biometra (Göttingen) Sarstedt (Nümbrecht) Nunc (Roskilde, Dänemark) **BD** Biosciences Eppendorf

2.1.3 Tiere und Zelllinien

Die Organentnahme aus Mäusen zu wissenschaftlichen Zwecken wurde vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (Tötungsanzeige T0186/03) bewilligt. Zur Organentnahme wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Zellen aus transgenen Tieren wurden in der gentechnischen Anlage der Medizinischen Klinik I (Aktenzeichen VC 112-5907 /1.0.0-21/91) bearbeitet. Die verwendeten Mäuse und Zelllinien sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Mäusestamm/ Zelllinie	Bezeichnung	Herkunft	Referenz
Wildtyp	C57BI6/J	Harlan Winkelmann (Borchen)	[16]
Wildtyp	C57BLKS/J	Harlan Winkelmann	[16]
Wildtyp	BALB/c	Harlan Winkelmann	[121]
db/db	BKS.Cg- m+/+Lpr ^{db} /J	Harlan Winkelmann	[16]
ob/ob	B6.V-Lep ^{ob} /J	Harlan Winkelmann	[16]
DO11.10 mit transgenem, OVA ₃₂₃₋₃₃₉ -Peptid-spezifischem T-Zell-Rezeptor (TZR)	DO11.10	Deutsches Rheuma- Forschungszentrum Berlin (DRFZ)	[122]
Präadipozytenzelllinie	3T3L1	American Type Cultur Nr.: CL-173	Collection-

 Tabelle 2
 Übersicht über die für die Experimente verwendeten Mäuse und Zelllinien.

2.1.4 Medien

 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/ Ham's F12 Roswell Park Memorial Institute (RPMI)1640 	PAA Laboratories
Präadipozyten-Vollmedium (PVM)	500 ml DMEM/ Ham's F12 10% FCS 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 μg/ml Streptomycin 250 ng/ml Amphotericin B
3T3L1-Medium	DMEM 4,6 g/l Glukose 2 mM Glutamin 10% FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 250 ng/ml Amphotericin B
T-Zell-Medium (TZM)	RPMI 1640 10% FCS 2 mM L-Glutamin 100 U/mI Penicillin 100 μg/mI Streptomycin 50 μM β-Mercaptoethanol

2.1.5 Puffer und Lösungen	
PBS	0,2 g/l KCl
	0,2 g/l KH ₂ PO4
	8,0 g/l NaCl
	1,15 g/l Na ₂ HPO ₄
PBS/ Tween (0,05%)	PBS
	0,05% Tween 20
PBS/ BSA als Zellauftrennungs-und	PBS 1x
Durchflusszytometrie-Puffer sowie Probenverdünner	5 g/I BSA
Erythrozyten-Lysepuffer	8,9 g/l NH₄Cl
	1 g/l KHCO ₃
	38 mg/I EDTA
10x Elektrophorese-Laufpuffer	144 g/l Glycin
	30 g/I TRIS-Base
	10 g/l SDS
TRIS-Puffer	18,3 g/I TRIS-Base
	pH: 6,7 (eingestellt mit H ₃ PO ₄)
TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer	4,9 g/I TRIS-Base
	370 mg/l EDTA
	1,2 g/l Acetat
DNS-Ladepuffer	1x TAE-Puffer
	30% Glycerin
	0,25% Bromphenolblau
Lösungs-Puffer (für Western Blot)	181,5 g TRIS-Base
	240 ml 1 M HCI
	500 ml A dest.

Proben-Puffer (für <i>Western Blot</i>)	5,0 ml Aqua dest. 2,0 ml Lösungs-Puffer 1,0 ml 20% SDS 1,5 ml Glycerin 1 Spatelspitze Bromphenolblau
<i>Blotting</i> -Puffer	3,03 g/l TRIS-Base 14,4 g/l Glycin 200 ml Methanol 800 ml Aqua dest.
Untergel	41,63 ml 30% Acrylamid
	8,97 ml 2% Bisacrylamid
Obergel	16,5 ml 30% Acrylamid 2,5 ml 2% Bisacrylamid
Trenngel	5,2 ml Untergel 2,0 ml Lösungs-Puffer 3,0 ml Aqua dest. 0,1 ml SDS 225 µl Ammoniumpersulfat 10 µl Tetramethylethylendiamin
Sammelgel	600 μl Obergel 250 μl TRIS-Puffer 25 μl SDS 1,5 ml Aqua dest. 75 μl Ammoniumpersulfat 25 μl Tetramethylethylendiamin

2.1.6 Zytokine

Folgende Zytokine wurden verwendet: IL-4, IL-6, IL-12, IL-23, Makrophagenkolonie-stimulierender Faktor (M-CSF), *transforming growth factor* (TGF)- β , human (alle R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt) und gAd (Biomol, Hamburg). Soweit nicht anderweitig gekennzeichnet, handelt es sich hierbei um in *E. coli* rekombinant hergestellte murine Zytokine.

2.1.7 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest

Antigen	Bezeichnung	Nachweisgrenze (pg/ml)	Hersteller
TNF-α	Opt EIA Maus TNF-α	16	BD Biosciences
IFNγ	Opt EIA Maus IFNγ	31	BD Biosciences
IL-6	Maus IL-6 EIA Set	16	BD Biosciences
Adiponektin	Maus Adiponektin	30	R&D Systems

 Tabelle 3 Übersicht über die zum Antigennachweis verwendeten ELISA-Kits.

2.1.8 Primer

Mit dem Programm Primer 3 (Version 0.4.0, Howard Hughes Medical Institute, Chavy Chase, MD; USA) wurden Primer definiert, die für das zu untersuchende Gen spezifisch waren. Mit dem Programm BLAST (National Institute of Biotechnology Information) wurde die Genspezifität der ermittelten Primer überprüft und diese anschließend durch die Firma TIB MOLBIOL (Berlin) synthetisiert (Tabelle 4).

Primer	Richtung	Primersequenz (5' – 3')	Länge des Amplifikates (bp)
AdipoR1	forward	CTT CTA CTg CTC CCC ACA gC	196
	reverse	gAC AAA gCC CTC AgC gAT Ag	
AdipoR2	forward	gCC CAg CTT AgA gAC ACC Tg	175
	reverse	gCC TTC CCA CAC CTT ACA AA	
Glycerinaldehyd- 3-Phosphat- Dehydrogenase (GAPDH)	forward	ACC ACA gTC CAT gCC ATC AC	452
	reverse	TCC ACC ACC CTg TTg CTg TA	

Tabelle 4 Übersicht der verwendeten Primer.

2.1.9 Antikörper

Tabelle 5 Übersicht der verwendeten Antikörper. Herkunft der Isotypen: Armenischer Hamster (Ar.H.), Hase (Rb), Maus (M), Ratte (R), Ziege (G).

Antigen	Klon	Markierung	Isotyp	Herkunft
Zellcharakterisierung				
CD11b	M1/70	Phycoerythrin (PE)	R. Immuglobulin (Ig)G2b, κ	BD Biosciences
CD11c	M1/70.15	PE	R. IgG2b	Caltag Laboratories (Karlsruhe)
CD80 (B7-1)	16-10A1	PE	Ar. H. IgG2b, κ	BD Biosciences
CD86 (B7-2)	3H1721	FITC	R. IgG2a	USBiological (Swampscott, USA)
F4/80	BM8	PE	R. IgG2a, к	eBioscience (San Diego, USA)
lgG2a		FITC	R. IgG2a	Caltag Laboratories
IgG2a		PE	R. IgG2a	Caltag Laboratories
MOMA-2		FITC	R. IgG2b	Serotec (Düsseldorf)
Haupthistokompa- tibilitätskomplex (MHC) II	3H2711	FITC	M. IgM	USBiological
OVA ₃₂₃₋₃₃₉ -Peptid-spezifischer TZR	KJ1 26.1	biotinyliert		DRFZ
T-Zell-Isolation				
CD4	GK1.5	FITC	R. IgG2a, к	BD Biosciences
CD62L (L-Selectin)	MEL-14	PE	R. IgG2a, к	BD Biosciences
CD90.1 (Thy-1.1)	OX-7	PE	M. IgG1, κ	BD Biosciences
Intrazelluläre Zytokinfärbung)			
IFNγ	XMG1.2	Allophycocyanin	R. IgG1, к	BD Biosciences
IL-17	TC11-18H10	PE	R. IgG1, к	BD Biosciences
IL-4	11B11	PE	R. IgG1	BD Biosciences
T-Zell-Stimulation				
CD28	37.51		Ar.H. IgG1, I	Max-Planck Institut für Infektionsbiologie
CD3	145-2C11		Ar.H. IgG1, κ	DRFZ
T-Zell-Polarisation				
IFNγ	AN18.17.24		R. IgG	DRFZ
IL-12	C17.8		R. IgG	DRFZ
IL-4	11B11		G. IgG2b, к	DRFZ
Western Blot				
Acrp30	A-13		G. IgG	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
Ziege-Ig		Meerrettich- peroxidase (HRP)	Rb. IgG	Dako
MACS				
FITC micro beads				Miltenyi Biotec
CD62L micro beads				Miltenyi Biotec
CD90 micro beads				Miltenyi Biotec

2.2 Methoden

2.2.1 Durchflusszytometrie

Prinzip

Die Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) bietet die Möglichkeit, Zellen anhand ihrer Größe, Granularität und ihres Antigenmusters zu charakterisieren und quantifizieren. Hierbei trifft ein Laserstrahl auf die zu untersuchende Zelle, wobei Zelleigenschaften den Laserstrahl streuen. Dabei führt die Zellgröße zu einer Veränderung des Vorwärtsstreulichtes (*forward scatter*) und die Zellgranularität verändert das Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*).

Durch die Laser werden gleichzeitig Fluoreszenzfarbstoffe zur Emission von Lichtquanten angeregt. Fluoreszenz-markierte spezifische Antikörper binden an definierte Antigene auf und in der Zelle. Verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe, aber auch eine Zunahme der Fluoreszenzintensität, die zur Anzahl der gebundenen Antikörper und somit des spezifischen Antigens proportional sind, werden von Photodetektoren erkannt.

Vorbereitung von Zellen

Zellen wurden aus ihren Kulturbedingungen abgelöst, mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung/ Rinderserumalbumin (PBS/ BSA) bei 400 *g* für 7 min gewaschen und der Überstand verworfen. Durch Resuspension in Volumina von 50 μ l bis 200 μ l PBS/ BSA wurden Einzelzellsuspensionen erstellt. Diese wurden mit fluoreszierenden FACS-Antikörpern unter Lichtausschluss inkubiert und anschließend in PBS/ BSA bei 400 *g* für 3 min gewaschen. Die Überstände wurden verworfen und die durchflusszytometrische Analyse der in 200 μ l PBS/ BSA aufgenommenen Zellen (maximal 1,5 x 10⁵ Präadipozyten bzw. 1 x 10⁴ Th-Zellen) erfolgte innerhalb von zwei Stunden nach dem Färben.

Durchführung der Durchflusszytometrie und Datenauswertung

Zur Analyse der Zellen wurde ein FACSCanto mit Auswertesoftware FACSDiva verwendet. Für die Datenauswertung wurden das Programm FlowJo (Tree Star Inc., Version 8.2.1) eingesetzt. Die Expression von Oberflächenantigenen auf Zellen wurde mit Hilfe von fluoreszierenden Antikörpern bestimmt und die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (*mean fluorescence intensity*, MFI) zum Vergleich der Stärke der Expression verwendet. Der Anteil der Zytokin-produzierenden Zellen wurde bestimmt.

2.2.2 Zellisolation und Zellkultur

Kulturbedingungen

Die Zellkultur erfolgte bei 37°C, 95% Luftfeuchtigk eit und 6% CO₂ im Brutschrank.

Präadipozyten

Eingesetzt wurde die Zelllinie 3T3L1, sowie im Labor in Kultur etablierte murine Präadipozyten, die ursprünglich aus mesenterialem Fettgewebe von C57Bl6/J- (Wildtyp), von *ob/ob*- und von *db/db*-Tieren isoliert worden waren [16].

Je 1,5 x 10⁵ Zellen wurden in Zellkulturflaschen in je 6 ml PVM (bei der 3T3L1-Zelllinie wurde 3T3-Medium verwendet) angesetzt und im Brutschrank inkubiert.

Um die Zellen vor der Durchflusszytometrie aus der Kultur abzulösen, wurde das Medium dekantiert, der Zellrasen mit PBS gespült und anschließend mit 1 ml Trypsin-EDTA für 10–15 min im Brutschrank inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle der Ablösung der Zellen wurden sie in 10 ml PBS/ BSA aufgenommen, bei 400 *g* für 7 min gewaschen und auf Konzentrationen von 2×10^4 bis $1,5 \times 10^5$ Zellen in 200 µl PBS/ BSA eingestellt.

Naive CD4⁺ Th-Zellen

Zellisolation

Naive CD4⁺ Th-Zellen sind durch die Oberflächenmarker CD4 und CD62L charakterisiert. Durch Inkubation einer heterogenen T-Zellsuspension mit CD4- und CD62L-spezifischen Antikörpern, die mit magnetisierbaren Nanopartikeln (*micro beads*) konjugiert sind, können die so markierten naiven CD4⁺ Th-Zellen mit Hilfe eines Magneten isoliert werden.

Aus murinen Milzen und Lymphknoten wurde durch Passage durch ein Zellsieb (70 µm) eine Einzelzellsuspension erstellt. Diese Einzelzellsuspension wurde zweimal mit RPMI 1640 gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen für 3 min mit dem Erythrozyten-Lysepuffer inkubiert und anschließend mit PBS/ BSA zweimal gewaschen.

Die so gewonnene, heterogene Zellsuspensionen wurde mit einem FITC-markiertem CD4-spezifischen Antikörper für 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Waschschritt mit PBS/ BSA wurde die Zellsuspension anschließend 12 min bei 6°C mit einem FITC-spezifischen Antikörper inkubiert, der mit *micro beads* konjugiert war.

Danach wurde die Zellsuspension auf eine MACS-Säule aufgetragen. Durch einen, die Säule umschließenden, Magneten wurde ein magnetisches Feld erzeugt, das die markierten Zellen in der Säule hielt, während die unmarkierten Zellen ungehindert die Säule passieren konnten. So konnte eine CD4-Positiv- und eine CD4-Negativfraktion gewonnen werden. Zur Ablösung der *micro beads* von den Zellen wurde die CD4-Positivfraktion anschließend mit MACS *Release* für 25 min bei 6°C inkubiert und gewaschen. Durch das Auftragen der Zellsuspension auf eine MACS-Säule konnten die nun gelösten *micro beads* in der Säule zurückgehalten werden.

Die CD4-Positivfraktion wurde anschließend für 12 min bei 6℃ mit einem CD62Lspezifischen Antikörper inkubiert, der mit *micro beads* konjugiert war. Durch erneute magnetisch-aktivierte Zellauftrennung mittels MACS-Säule konnte eine naive CD4⁺-Zellfraktion gewonnen werden. Die Reinheit der erhaltenen Zellfraktionen wurde durchflusszytometrisch überprüft. Exemplarisch für die durchgeführten Aufreinigungen ist Abbildung 5. Für die Experimente mit naiven CD4⁺ Th-Zellen war ein Anteil von mehr als 97% dieser Zellen an der gesamten Zellsuspension Bedingung.



Abbildung 5 Anreicherung von naiven, CD4⁺ Th-Zellen durch MACS. Eine aus der Milz und aus Lymphknoten gewonnene Zellpopulation ist in ungefärbtem Zustand in (A) abgebildet. Dargestellt ist Zellpopulation anschließend im Lymphozyten-*Gate* mit CD4 und CD62L-Doppelfärbung vor der Zellauftrennung (B), nach CD4-spezifischer (C) und CD62L-spezifischer (D) magnetisch-aktivierter Zellauftrennung. Um die in (D) gezeigte Zellhomogenität zu erreichen, wurden zwei konsekutive MACS-Aufreinigungen durchgeführt.

Antigen-präsentierende Zellen

Zellisolation

Zu den Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) werden u.a. dendritische Zellen, B-Lymphozyten, Makrophagen und Monozyten gezählt. Diese wurden aus Zellsuspensionen, die aus Milz und Lymphknoten gewonnen wurden, isoliert. Um zu verhindern, dass T-Zellen aus diesen Organen mit in Kultur gelangen, mussten diese zuvor depletiert werden. Da T-Zellen CD90 Thymozytenu.a. (auch Differenzierungsantigen 1, Thy1, genannt) exprimieren. können sie aus Zellsuspensionen mit Hilfe CD90-spezifischer Antikörper, die mit micro beads konjugiert sind durch die magnetisch-aktivierte Zellauftrennung entfernt werden.

Dazu wurde eine isolierte und aufgereinigte Milz- und Lymphknotenzellsuspension für 12 min bei 6°C mit einem CD90-spezifischen Antikörp er, der mit *micro beads* konjugiert war, inkubiert. Nach anschließendem Waschen wurde die Zellsuspension durch MACS in eine CD90-Positiv- und eine CD90-Negativfraktion aufgetrennt. Die Negativfraktion wurde nach durchflusszytometrischer Überprüfung der Depletion als APZ weiterverwendet.

Um eine Proliferation dieser zur Antigenpräsentation eingesetzten Zellen in den Kulturen zu unterbinden, wurden sie mit Mitomycin C behandelt. Mitomycin C verhindert durch kovalente Bindungen der beiden DNS-Stränge eine DNS-Neusynthese und somit die Zellteilung und Proliferation.

Hierzu wurden die APZ in 10 ml TZM aufgenommen und mit 1 mg Mitomycin C für 30 min im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurden sie mehrfach mit TZM gewaschen und zur Antigenpräsentation eingesetzt.

Generierung von Makrophagen zur Antigenpräsentation in vitro

Die Vorläuferzellen von Monozyten und Makrophagen finden sich im Knochenmark. Sie zeichnen sich unter anderem dadurch aus, dass sie nicht an Kunststoffoberflächen adhärieren. Unter Einfluss von M-CSF differenzieren die Vorläuferzellen in Monozyten/ Makrophagen.

Die Hinterläufe von BALB/c-Mäusen wurden präpariert und das Knochenmark mit 3T3-Medium ausgespült. Durch wiederholtes Resuspendieren mit der Pipette wurde eine Einzelzellsuspension erstellt und diese mehrfach mit 3T3-Medium gewaschen.

Die Knochenmarkszellen wurden in einer Konzentration von 5 x 10⁶/ml in 3T3-Medium mit 10 ng/ml M-CSF über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden die nicht adhärierten Zellen (Vorläuferzellen von Monozyten/ Makrophagen) nach sanftem Resuspendieren in eine Zellkulturschale (Durchmesser: 10 cm) überführt und in 3T3-Medium mit 10 ng/ml M-CSF eine Woche lang im Brutschrank inkubiert. Jeweils die Hälfte des Mediums wurde an Tag 3 und Tag 6 durch frisches 3T3-Medium mit 10 ng/ml M-CSF ersetzt.

An Tag 7 wurden die nun adhärenten Zellen mit Hilfe von kaltem PBS von der Zellkulturschale abgelöst, in eine 48 Well-Platte überführt (2,5 x 10⁵ Zellen/Well) und in 3T3-Medium über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Um die Differenzierung zu Monozyten/ Makrophagen zu kontrollieren, wurde die Expression der Makrophagenmarker F4/80 und MOMA-2 durchflusszytometrisch überprüft (Abbildung 6).



Abbildung 6 Kontrolle der Makrophagenreifung. Naive Knochenmarkszellen wurden nach 7-tägiger Kultur mit M-CSF (10 ng/ml) auf die Makrophagen-spezifischen Oberflächenantigene F4/80 und MOMA-2 durchflusszytometrisch untersucht (B), die Negativkontrolle erfolgte durch ungefärbte Zellen (A). Die Abbildung ist repräsentativ für 2 durchgeführte Experimente.

In-vitro-Stimulation naiver CD4⁺ Th-Zellen

Antigen-unabhängige Stimulation durch CD3 und CD28-Antikörper

Die Oberflächenantigene CD3 und CD28 können eine Aktivierung von T-Zellen vermitteln. *In vitro* kommt es durch die Inkubation von naiven T-Zellen in einer zuvor mit CD3- und CD28-spezifischen Antikörpern beschichteten Kulturplatte zu einer Antigen-unabhängigen Aktivierung und Differenzierung dieser Zellen.

Zellkulturplatten (24 oder 96 Wells) wurden mit je 10 μ g/ml CD3- und CD28-spezifischen Antikörpern über Nacht bei 6°C in kubiert, wodurch es zu einer Adsorption der Antikörper an die Kunststoffunterlage kam. Im Anschluss wurden die Kulturplatten dreimal unter sterilen Bedingungen mit PBS gewaschen und die naiven CD4⁺ Th-Zellen in Konzentrationen von 5 x 10⁵/ml bis 1 x 10⁶/ml aufgebracht.

Antigen-spezifische Stimulation mit Antigen-präsentierenden Zellen

Die T-Zellen aus DO11.10-Mäusen exprimieren einen transgenen, OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid-spezifischen TZR. Zur Antigen-spezifischen Stimulation wurden sie zusammen mit OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid entweder in Gegenwart professioneller APZ oder in Gegenwart von Präadipozyten kultiviert.

Die naiven CD4⁺ Th-Zellen und professionelle, Mitomycin C behandelte APZ wurden im Verhältnis 2:1 eingesetzt. Anschließend wurde der Kultur OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid (10 µM) zugegeben.

Um Antigenpräsentation durch Präadipozyten zu untersuchen, wurden naive CD4⁺ Th-Zellen mit Präadipozyten aus C57BLKS/J- und *db/db*-Mäusen kultiviert. Die Präadipozyten wurden 48 h zuvor auf eine 48-Well-Platte (5 x 10^4 /Well) in PVM aufgebracht. Nach 24 h wurde auf TZM umgestellt. Mit den naiven CD4⁺ Th-Zellen (1 x 10^6 /Well) wurde OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid (10 µM) in die Wells gegeben.

Die Auswertung der Zellproliferation erfolgte an Tag 3 nach Kulturbeginn der Th-Zellen, die der Zytokinproduktion an Tag 7 mittels Durchflusszytometrie.

Polarisation

Die Zellen wurden nach Isolation und Aufreinigung in TZM kultiviert. Th-Zellen sollten entweder unter nicht-polarisierenden Bedingungen (Th0) oder unter polarisierenden Bedingungen (Th1, Th2, Th17) kultiviert werden. Dafür wurden die in Tabelle 6 aufgeführten Zytokine und Antikörper für Kulturen von einer Dauer von drei bzw. sieben Tagen eingesetzt.

Polarisation	Zytokine	Antikörper
Th0	(ohne)	(ohne)
Th1	20 ng/ml IL-12	10 μg/ml anti-IL-4
Th2	10 ng/ml IL-4	10 μg/ml anti-IFNγ 10 μg/ml anti-IL-12
Th17	20 ng/ml IL-6, 10 ng/ml IL-23, 10 ng/ml TGF-β	10 μg/ml anti-IFNγ 10 μg/ml anti-IL-4

Tabelle 6 Übersicht der der Kulturzusätze der jeweiligen T-Zell-Polarisationsprotokolle

Mittels durchflusszytometrischem Nachweis der jeweiligen intrazellulär angefärbten Kennzytokine (Th0: IL-4 und IFNγ, Th1: IFNγ, Th2: IL-4, Th17: IL-17) wurde der Polarisationserfolg am Kulturende kontrolliert.

Dabei lag bei unter Th0-Bedingungen kultivierten CD4⁺ Th-Zellen der Anteil der IL-4⁺-Zellen im Durchschnitt bei 5% und der Anteil IFN γ^+ -Zellen bei 7%. Unter Th1-Bedingungen lag der Anteil IFN γ^+ -Zellen bei 30% und der Anteil IL-4⁺-Zellen unter 1%. Unter Th2-Bedingungen lag der Anteil IL-4⁺-Zellen bei 5% und der Anteil IFN γ^+ -Zellen unter 1%. Unter Th17-Bedingungen waren rund 7% der Zellen positiv für IL-17 (Abbildung 7). Dies stimmte mit den in der Literatur publizierten Polarisationsraten überein [28, 123, 124].





Abbildung 7 Polarisation von naiven CD4⁺ Th-Zellen. Nach Kultur unter polarisierenden Bedingungen wurden die Th-Zellen stimuliert, fixiert und die intrazellulären Zytokine angefärbt. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Auswertung. Dargestellt sind exemplarische Kulturbeispiele für nicht-polarisierte (Th0), Th1-, Th2- und Th17-polarisierte T-Zell-Kulturen.
Nachweis der Proliferation

Zellmarkierung mit Carboxy Fluorescein Succinimidyl Ester

Carboxyfluorescein-Succinimidylester (CFSE) diffundiert durch die Zellmembran und verteilt sich gleichmäßig im Zytoplasma. Durch Esterasen des Zytoplasmas wird die Acetat-Gruppe abgespalten, wodurch CFSE die Zellmembran nicht mehr passieren kann und zu fluoreszieren beginnt. Bei der Teilung der Zelle verteilt sich das aufgenommene CFSE gleichmäßig und die Fluoreszenzintensität nimmt in den Tochterzellen proportional zur Anzahl der Teilungen ab, was durchflusszytometrisch erfasst werden kann. In der Abbildung 8 ist dies beispielhaft für 7 Versuchsansätze dargestellt.



Abbildung 8 Proliferationsmessung mit Hilfe einer CFSE-Färbung. Nach CFSE-Färbung an Tag 0 besaß die Zellpopulation einen homogenen MFI. An Tag 3 hatte der MFI proportional zu den stattgefundenen Zellteilungen abgenommen.

Zur Markierung mit CFSE wurden naive CD4⁺ Th-Zellen in PBS gewaschen und auf 1-2 x 10⁷ Zellen/ml in PBS eingestellt. Nach Zugabe von CFSE (0,93 µg/ml) wurden sie 3 min im Brutschrank inkubiert und danach dreifach mit TZM gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen auf einer mit CD3- und CD28-spezifischen Antikörpern beschichteten 48-Well-Platte im Brutschrank kultiviert. Nach 72 h erfolgte die Messung der Fluoreszenzintensität der Kulturansätze mittels Durchflusszytometrie.

[³H]-Thymidineinbau

Während einer Zellteilung vermehrt sich die DNS-Menge der Einzellzellen und damit einer Zellpopulation. Für die Neusynthese der DNS werden Nukleoside, u.a. Thymidin, benötigt. Durch Zugabe von Thymidin, das mit dem β-Strahler Tritium [³H] markiert ist, wird dieses radioaktive Molekül stöchiometrisch in die zelluläre DNS eingebaut. Durch Umwandlung der Strahlung in messbare Szintillationen kann die Radioaktivität in Kulturen bestimmt werden. Die radioaktiven Zerfälle innerhalb eines definierten Zeitraumes sind proportional zur Menge des in den Zellen angereicherten [³H]-Thymidins und damit ein Maß für die DNS-Neusynthese oder Proliferation von Zellen [125].

Naive CD4⁺ Th-Zellen wurden auf einer mit CD3- und CD28-spezifischen Antikörpern beschichteten 96-Well-Platten in einer Konzentration von 5 x 10^4 Zellen/Well in 200 µl TZM gegeben und im Brutschrank vorinkubiert.

Nach 54 h wurde [³H]-Thymidin mit einer Aktivität von 0,5 µCi/Well zur Kultur gegeben und weitere 18 h inkubiert. Dann wurden die Kulturansätze über Nacht bei -80°C gelagert, aufgetaut und zur Messung die hochmolekulare DNS auf Glasfaserfilter fixiert, mehrfach gewaschen und mit einem Aromaten-freien Szintillationscocktail aufgenommen. Alle Proben in Detektionsgerät für wurden einem 1 min gemessen (cpm).

2.2.3 Nachweis der Zytokinproduktion Nachweis von Zytokinen im Kulturüberstand

Zytokinkonzentrationen im Zellüberstand wurde mittels ELISA bestimmt. Dabei bindet zunächst ein Antiköper an eine Kunststoffunterlage. Anschließend wird die zu untersuchende Probe hinzugegeben. Befindet darin das spezifische Antigen, wird es von dem fixierten Antikörper gebunden. Ein sekundärer Antikörper, der mit einem Enzym gekoppelt ist, wird zugegeben und bindet an andere Epitope des gleichen Antigens. Nach Zugabe des Enzymsubstrats kann die daraus resultierende Farbreaktion zur Konzentrationsbestimmung des gesuchten Antigens genutzt werden.

Eine 96-Well-Platte wurde mit dem Zytokin-spezifischen Antikörper in der vom Hersteller vorgegebenen Konzentration (verdünnt in Phosphat- [pH: 6,5] bzw. Carbonatpuffer [pH: 9,5], Volumen: 100 µl/Well) zur Adsorption bei 6℃ für 12 h inkubiert. Die folgenden Schritte fanden bei Raumtemperatur statt, wobei zwischen den

einzelnen Inkubationen jeweils mehrfach mit PBS/Tween gewaschen und die Flüssigkeit aus den Wells möglichst vollständig entfernt wurde.

Nach 1 h Inkubation mit Probenverdünner zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen wurde mit dem zu untersuchenden Überstand in austitrierter Verdünnung inkubiert. Es wurden jeweils Doppelwertbestimmungen durchgeführt. Nach 2 h wurde der HRP-konjugierte sekundäre Antikörper hinzu gegeben (Volumen: 100 µl) und für 1 h inkubiert.

Danach wurde das Peroxidasesubstrat (Verhältnis Wasserstoffperoxid zu Tetramethylbenzidin 1:2, Volumen 100 µl/Well) hinzugeben und die Farbreaktion mit 50 µl Schwefelsäure (1 M) gestoppt. Die Messung der optischen Dichte erfolgte im Vergleich zur Standardkurve innerhalb von 30 min bei Wellenlängen von 450 nm und einer Korrektur des Plattenhintergrundes bei 630 nm.

Durchflusszytometrischer Nachweis intrazellulärer Zytokine

Um Zytokine intrazellulär nachweisen zu können, wurde die Durchflusszytometrie eingesetzt. Dabei wird mit Hilfe von fluoreszierenden, nach intrazellulär transferierten Antikörpern das jeweilige Zytokin markiert. Anschließend lässt sich anhand der Fluoreszenzintensität feststellen, ob und von wie vielen Zellen das gesuchte Zytokin produziert wird. Da für die Anfärbung ein möglichst hoher intrazellulärer Zytokinspiegel erreicht werden soll, werden die Zellen am Kulturende dazu angeregt, Zytokine zu produzieren, ohne diese zu sezernieren [126].

Zur Anregung der Zytokinproduktion wurden die Th-Zellen am Kulturende mit dem Proteinkinase C-Aktivator Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (100 ng/ml) und Ionomycin (1 µg/ml), einem Zytokinproduktionsinduktor, für 2 h im Brutschrank inkubiert. Um eine intrazelluläre Anreicherung der Zytokine zu erzielen, wurden die Zellen danach für 2 h mit 3 µM Monensin, das den intrazellulären Proteintransport inhibiert, im Brutschrank inkubiert.

Anschließend wurden die Th-Zellen resuspendiert, mit PBS gewaschen und in 150 µl 4%igem Paraformaldehyd für 10 min bei 37℃ fixiert. Danach erfolgten zwei Waschschritte mit PBS/ BSA.

Zur intrazellulären Anfärbung wurden die Fluoreszenz-markierten Antikörper in PBS/BSA mit 0,5% Saponin eingesetzt, wodurch sich die Membranpermeabilität der Zelle erhöht und den Antikörpern das Eindringen ermöglicht wird. Um bei Antigen-

spezifischer Stimulation Durchflusszytometrie später in der den OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid-spezifische Th-Zellen von morphologisch ähnlichen professionellen APZ unterscheiden zu können, wurde in diesem Fall zusätzlich mit einem OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptidrezeptor-spezifischen biotinylierten Antikörper (KJ1.26.1) inkubiert.

Nach 25 min Inkubation unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur wurden die Proben einmal in PBS/ BSA mit 0,5% Saponin und zweimal mit PBS/ BSA gewaschen. Wurde der biotinylierte Antikörper zur Th-Zellmarkierung bei Antigen-spezifischer Stimulation eingesetzt, erfolge die Kennzeichnung der Th-Zellen über Zugabe eines Streptavidin-FITC-Konjugates. Anschließend wurde mit PBS/ BSA gewaschen und das Zytokinprofil der Einzelzellen durchflusszytometrisch bestimmt.

2.2.4 Nachweis Adiponektin-Rezeptor-spezifischer mRNS

Die Expression von AdipoR1 und AdipoR2 wurde auf transkriptionaler Ebene durch spezifische mRNS nachgewiesen.

RNS-Präparation

Zur RNS-Präparation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in RNeasy Lysis-Puffer lysiert. Dabei wurden 350 μ l Puffer für bis zu 1 x 10⁷ Zellen verwendet. Anschließend wurden die lysierten Zellen in diesem Puffer bei -80°C gelagert.

Nach dem Auftauen wurden dem Zelllysat 350 μ l 70% iges Ethanol hinzugefügt und zur Homogenisierung mehrmals resuspendiert. Das gesamte Volumen (700 μ l) wurde dann auf eine Säule gegeben und bei 8000 *g* für 15 s zentrifugiert. Dadurch wurde spezifisch RNS an der Säule angereichert. Der Durchlauf wurde verworfen.

Zur weiteren Aufreinigung der an der Säule präzipitierten RNS wurde mit 700 μ l RW1-Puffer gewaschen. Anschließend wurde mit DNase I 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, erneut mit RW1-Puffer und danach zweimal mit 500 μ l RPE-Puffer gewaschen und bei 8000 *g* für 15 s zentrifugiert. Der Durchlauf wurde jeweils verworfen. Zur Trocknung der Membran wurde anschließend bei 10.000 *g* für 2 min zentrifugiert.

Die RNS wurde von der Säule mit 25 μ l RNase-freiem Aqua dest. (Zentrifugation bei 8.000 *g* für 1 min) eluiert.

Reverse Transkription

Da bei der PCR DNS-abhängige Polymerase verwendet werden, wird die RNS mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in komplementäre DNS (cDNS) umgeschrieben. Die cDNS bildet mit der mRNS einen Doppelstrang, der stabiler als mRNS ist. Je Messung wurden 2 µl der präparierten RNS eingesetzt. Zum Abbau kontaminierender chromosomaler DNS wurden die RNS-Proben mit DNase I für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion anschließend mit 2 mM EDTA bei 65°C gestoppt. Nach 10 min wurde den **RNS-Proben** Oligonukleotide, Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP) und steriles Wasser zugegeben und für 5 min bei 65℃ inkubiert. Nach Abkühlung auf 4℃ erfolgte die Zugabe von 5x first strand Puffer, Dithiothreitol und RNaseOUT. Anschließend wurde für 2 min bei 37℃ inkubiert, dann die Reverse Transkriptase des Moloney Murine Leukemia Virus hinzugefügt und für 50 min bei 37℃ inkubiert. Die Reaktion wurde durch ein Erhitzen auf 70℃ für 15 min beendet. Die gewonnene cDNS wurde bei 4°C gelagert.

Amplifikation der cDNS durch Standard-PCR

Mit Hilfe der PCR lassen sich DNS-Sequenzen *in vitro* vervielfältigen. Dabei wird unter Einsatz einer thermostabilen DNS-Polymerase (*Go Taq*-Polymerase), Primern und dNTPs ein Stück DNS so stark vervielfältigt, dass es über eine Gelelektrophorese und Anfärbung mit dem DNS-interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid bei Wellenlängen um 300 nm nachgewiesen werden kann [127]. Zur Vorbereitung einer Probe für die PCR wurden die in Tabelle 7 beschriebenen Substanzen zusammengeführt.

Reagenz	Volumen (µl)
cDNS aus reverser Transkription	2,5
RNase/ DNase freies A dest.	13,4
Primer forward, 50 µM	1,0
Primer reverse, 50 μM	1,0
5x Green GoTaq Flexi Buffer	10,0
MgCl ₂ , 25 mM	1,0
dNTPs, 10 μM	1,0
Go Taq-Polymerase, 5 U/ml	0,2
Gesamtvolumen	25,0

Tabelle 7 Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes zur cDNS-Amplifikation durch die Standard-PCR

Die Amplifikation der cDNS erfolgte im Thermocyler. Begonnen wurde mit einem 5 min Schritt bei 95°C, gefolgt von 30 Zyklen mit einer D enaturierungstemperatur von 94°C für 1 min, einer Primerhybridisierung bei 60°C für 1 min und einer Verlängerungsphase bei 72°C für 1,5 min. Der finale Schritt im Anschluss an die 30 Amplifikationszyklen dauerte 10 min bei 72°C.

Gelelektrophorese

Die Auftrennung der cDNS erfolgte in einem 2%igen Agarosegel. Dazu wurden 4 g Agarose in 200 ml TAE-Elektrophoresepuffer in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Nach kurzem Abkühlen wurde es in die Gelwanne gegossen und konnte 45 min lang aushärten.

Nach Entfernung des Kammes wurde das Gel in die Elektrophoresekammer gelegt und mit TAE-Elektrophoresepuffer überschichtet. Darauf erfolgte das Auftragen der amplifizierten PCR-Produkte und des Ladepuffers in die Geltaschen (20 µl/Tasche). Zusammen mit den PCR-Produkten wurde als Vergleich ein DNS-Größenstandard (100 bis 1500 bp) und eine Negativkontrolle einer mit Aqua dest. amplifizierten Probe aufgetragen. Daraufhin wurde das elektrische Feld mit einer Spannung von 100 Volt für 45 min angelegt. Durch Wanderung im elektrischen Feld in Richtung Anode wurden die PCR-Produkte so ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt.

Gelfärbung

Es folgte eine 15 minütige Färbung in 0,02% igem Ethidiumbromid in TAE-Elektrophoresepuffer. Durch Auflegen des Gels auf eine ultraviolette Lichtquelle wurde das in die DNS-Stränge eingelagerte Ethidiumbromid sichtbar gemacht und fotografiert.

Realtime-Polymerase Kettenreaktion

Die *Realtime*-PCR ermöglicht die semiquantitative Erfassung der cDNS-Konzentration eines gewählten Gens einer Probe. Dazu wird vor dem Beginn der Amplifikation ein Cyanin-Fluoreszenzfarbstoff (SYBR-Green), der in die doppelsträngige DNS interkaliert, im Überschuss zu den Proben gegeben. Kommt es im Laufe der Amplifikation zu einer Synthese doppelsträngiger cDNS, kann das SYBR-Green darin binden. Der Komplex aus SYBR-Green und PCR-Produkt beginnt, grünes Licht zu emittieren. Die Fluoreszenzintensität der Probe steigt proportional zur Konzentration doppelsträngiger PCR-Produkte an. Die Kinetik der Fluoreszenzzunahme lässt Rückschlüsse auf die Ausgangskonzentration der vom Zielgen abgelesenen mRNS zu. Zur Vorbereitung einer Probe für die *Realtime*-PCR wurden die in Tabelle 8 beschriebenen Substanzen zusammengeführt.

Reagenz	Volumen (µl)
cDNS aus reverser Transkription	3,0
RNase/ DNase freies A dest.	6,5
Primer forward (50 µM)	1,0
Primer reverse (50 µM)	1,0
Platinum SYBR-Green qPCR Super-Mix	12,5
BSA (1mg/ml)	1,0
Gesamtvolumen	25,0

Tabelle 8 Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes zur cDNS-Amplifikation durchdie Realtime-PCR.

Das Gesamtvolumen eines Reaktionsansatzes wurde in eine Glaskapillare überführt, diese kurz anzentrifugiert und anschließend mit Hilfe der *Realtime*-PCR amplifiziert sowie quantifiziert. Begonnen wurde mit einem 2 min Denaturierungsschritt bei 95°C. Danach folgten 45 Zyklen mit einer Denaturierungstemperatur von 94°C für 5 s, einer Primerhybridisierung bei 60°C (AdipoR1 bzw. AdipoR2) oder 62°C (GAPDH), gefolgt von einer Verlängerungsphase von 10 s. Die Ergebnisse für den AdipoR1 bzw. AdipoR2 wurden gegenüber der Expression des konstitutiv exprimierten (*housekeeping*) Gens GAPDH normalisiert, um die unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen der cDNS der Proben zu berücksichtigen. Anschließend wurden die Ergebnisse für den AdipoR1 bzw. AdipoR2 im Vergleich zu einer Standardkurve, die aus einem mRNS-Pool aller Proben erstellt wurde, ausgewertet.

2.2.5 Proteinnachweis durch Western Blot

Bei der *Western Blot*-Analyse werden Proteine nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf eine Membran übertragen und mit Antikörpern angefärbt. Dadurch ist es möglich, einzelne Proteine nachzuweisen [128].

Die Auftrennung der Proteine wird nach der Methode von Laemmli mittels nicht-reduzierender, denaturierender Gelelektrophorese durchgeführt [129]. Da Proteine uneinheitliche elektrische Ladungen besitzen und diese die Gelelektrophorese beeinflussen könnten, wird ihnen SDS zugesetzt. SDS lagert sich proportional zu ihrer Größe an Proteine an und verleiht ihnen eine einheitliche negative elektrische Ladung.

Dadurch wird eine gerichtete Bewegung im elektrischen Feld ermöglicht, die im Wesentlichen vom Molekulargewicht der Proteine abhängig ist.

Nach der Auftrennung werden die Proteine elektrophoretisch auf eine stark Protein-bindende Membran transferiert. Nun können sie durch spezifische Antikörper näher charakterisiert und über Chemolumineszenz sichtbar gemacht werden.

Proteinauftrennung

Zuerst wurde aus Sammel- und Trenngel ein Trägermedium erstellt. Die Proben wurden nach Zusatz von Probenpuffer in einem Volumen von 20 µl zusammen mit einem Molekulargewichtsstandard auf das Gel aufgetragen und für 60 min bei 200 V elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer diente Elektrophorese-Laufpuffer.

Transfer auf Polyvinylidenfluorid-Membran (blotting)

Die Membran wurde 1 min in Methanol vorbehandelt, mit Wasser gespült und anschließend mit den weiteren *Blot*-Materialien (Gel, Schaumstofffiltern, Filterpapier) in *Blotting*-Puffer 10 min equilibriert. Danach wurde der *Blot* in folgender Reihenfolge zusammengesetzt: Schaumstofffilter, Filterpapier, Membran, Gel, Filterpapier, Schaumstofffilter. Anschließend wurde der *Blot* in die *Blot*-Kammer gestellt, mit Transferpuffer aufgefüllt und bei 4°C für 1 h ein senkrecht zum *Blot* stehendes elektrisches Feld mit einer Stromstärke von 250 mA angelegt. Durch die Bewegung der elektrisch negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld zur Anode wurden sie vom Gel auf die Membran transferiert. Um freie Proteinbindungsstellen der Membran zu blockieren, wurde sie anschließend 1 h in PBS mit 5% Magermilchpulver bei Raumtemperatur geschüttelt.

Bindung spezifischer Antikörper

Nach fünfmaligem Waschen mit PBS/Tween für jeweils 10 min wurde die Membran über Nacht mit dem ersten Antigen-spezifischen Antikörper inkubiert. Dabei wurde der Antikörper in PBS mit 1% Magermilchpulver verdünnt. Danach wurde erneut mehrmals mit PBS/Tween gewaschen. Der zweite, HRP-konjugierte Spezies-Antikörper wurde in PBS/Tween verdünnt und anschließend die Membran 1 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Membran erneut mehrmals mit PBS/Tween gewaschen.

Visualisierung der Proteinbanden

Die Membran wurde mit einem 1:2 Gemisch aus Chemolumineszenz-Substrat A und B vollständig bedeckt und 1 min lang inkubiert. Durch Peroxidase und Wasserstoffperoxid kommt es hierbei zu einer Oxidation von Luminol. Dadurch beginnt Luminol Licht zu emittieren. Da die HRP Proteinbanden-spezifisch auf der Membran fixiert war, kam es zu einer Banden-spezifischen Lumineszenz. Um die Lumineszenz sichtbar zu machen, wurde der *Blot* in eine Folie eingeschlagen und in der Dunkelkammer zusammen mit dem Röntgenfilm in eine Fotokassette mit Verstärkerfolie eingelegt. Nach 1-2 min Belichtung wurde der Film entwickelt. Nach der Entwicklung wurde der Film eingescannt und die Schwärze der Banden im Vergleich zur Kontrolle bewertet.

Statistik

Die Ergebnisse sind als arithmetisches Mittel angegeben. Die Streuung wurde als Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*, SEM) berechnet. Zur Ermittlung einer statistischen Signifikanz wurde bei zwei Vergleichsgruppen der zweiseitige Student-t-Test durchgeführt. Bei mehren Vergleichsgruppen wurde der nicht-parametrische Anova-Test verwendet. Statistische Signifikanz wurde bei p-Werten von <0,05 angenommen. Alle statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism (Version 4.00, GraphPad Software, La Jolla, USA) vorgenommen. Die grafische Darstellung erfolgte mittels der Programme Excel (Edition 2003) und PowerPoint (Edition 2003) (beide: Microsoft, Redmond, USA).

3 Ergebnisse

3.1 Immunologische Aktivität von Präadipozyten

3.1.1 Charakterisierung über Oberflächenantigene

Aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe war bekannt, dass Präadipozyten funktionelle TLR exprimieren [16]. Außerdem wurde gezeigt, dass Präadipozyten das Oberflächenantigen MOMA-2 aufweisen und eine phagozytotische Aktivität gegenüber Mikroorganismen und Partikeln besitzen [14]. Im Folgenden sollte sowohl die Expression von Makrophagenmarkern und kostimulatorischen Molekülen als auch eine eventuelle Antigenpräsentation durch Präadipozyten untersucht werden.

Auf Präadipozyten aus C57BI6/J-, *ob/ob-* und *db/db-*Mäusen, sowie auf Präadipozyten der Zelllinie 3T3L1, wurde nach 72 h Kultur die Expression der Oberflächenantigene MOMA-2, CD80, CD86, MHC II, CD11b und CD11c durchflusszytometrisch untersucht. Diese Antigene sind typische Marker für Monozyten/ Makrophagen und dendritische Zellen. Dabei lag die Expression von CD86, MHC II, CD11b und CD11c bei allen Präadipozyten unter der Nachweisgrenze (Daten nicht gezeigt).

Die Oberflächenmarker MOMA-2 und CD80 konnten auf allen Präadipozyten nachgewiesen werden, wobei ab einem Δ MFI von >0,8 von einer Präsenz des Antigens auf der Zelloberfläche ausgegangen wurde (Tabelle 9). Die Expression von MOMA-2 war bei *ob/ob*- und *db/db*-Präadipozyten signifikant höher als bei Wildtyp- und bei 3T3L1-Präadipozyten. Bei der Expression von CD80 lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und Leptin-defizienten Präadipozyten vor (Tabelle 9 und Abbildung 9).

Präadipozyten	ΜΟΜΑ-2 (ΔΜϜΙ)	CD80 (∆MFI)	
3T3L1	0,89 ± 0,23 (n=8)	2,43 ± 1,04 (n=6)	
C57BI6/J	1,71 ± 0,54 (n=10)	5,17 ± 1,87 (n=8)	
ob/ob	5,63 ± 1,47 (n=10)	4,85 ± 1,28 (n=7)	
db/db	3,54 ± 0,27 (n=5)	4,30 ± 0,09 (n=3)	

Tabelle 9 Oberflächenexpression von MOMA-2 und CD80 auf unstimulierten Präadipozyten, Werte nach Bereinigung durch Kontrolle (Δ MFI). Mittelwerte ± SEM.

Um festzustellen, ob die TLR-Liganden LPS, Zymosan oder Flagellin die Expression von MOMA-2 oder CD80 modulieren, wurden Präadipozyten in Gegenwart dieser Substanzen kultiviert und ihr Oberflächenantigenprofil anschließend durchflusszytometrisch ausgewertet. Dabei veränderte sich die Expression der untersuchten Oberflächenantigene nicht signifikant im Vergleich zu der unstimulierten Kontrollgruppe (Abbildung 9).



Abbildung 9 Nachweis von MOMA-2 und CD80 bei Präadipozyten unter verschiedenen Stimulationsbedingungen. Dargestellt ist die Δ MFI der Oberflächenantigene MOMA-2 (A) und CD80 (B) bei 3T3L1-, C57Bl6/J-, *ob/ob*- und *db/db*-Präadipozyten 72 h nach Kulturbeginn. Ergebnisse unter nicht-stimulierenden Bedingungen und in Gegenwart von 1 µg/ml LPS, 10 µg/ml Zymosan oder 10 ng/ml Flagellin. Mittelwerte ± SEM, n: siehe Tabelle 9; *p<0,05; **p<0,01. Für die statistische Auswertung wurde der Anova-Test angewandt.

3.1.2 Antigen-spezifische Stimulation von CD4⁺ Th-Zellen

Da Präadipozyten durch Phagozytose Antigene aufnehmen können, sollte untersucht werden, ob sie auch dazu in der Lage sind, diese Antigen-spezifischen CD4⁺ Th-Zellen zu präsentieren.

Naive CD4⁺ OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid-spezifische DO11.10 Th-Zellen wurden zusammen mit C57Bl6/J- oder *db/db*-Präadipozyten in Gegenwart von OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid (10 μ M) kultiviert. Parallel wurden Kulturen angelegt, bei denen an Stelle der Präadipozyten professionelle APZ aus Milz und Lymphknoten zur Antigenpräsentation eingesetzt wurden. Nach 7 Tagen erfolgte die durchflusszytometrische Auswertung.

In der Kokultur von Th-Zellen mit professionellen APZ kam es zu einer Proliferation der Th-Zellen. Dabei wurden Zellen durchflusszytometrisch nachgewiesen, die ihrer Größe und Granularität nach vitalen Th-Zellen entsprachen. In den Kulturen, bei denen Präadipozyten an Stelle von professionellen APZ eingesetzt wurden, konnten durchflusszytometrisch keine lebenden Th-Zellen festgestellt werden. Wegen ihrer geringen Größe konnten weiterhin bei allen Versuchsansätzen Zelltrümmer festgestellt werden. Diese Zelltrümmer stellten bei den mit Präadipozyten inkubierten Versuchsansätzen den überwiegenden Teil der Signale dar (Abbildung 10).



Abbildung 10 Kokultur von Präadipozyten und Th-Zellen. Durchflusszytometrische Analyse OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid-spezifischer Th-Zellen nach 7-tägiger Kokultur von *db/db*und C57BI6/J-Präadipozyten in Gegenwart von 10 μ M OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid. Als Kontrolle wurden die Th-Zellen mit professionellen APZ in Gegenwart von 10 μ M OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid inkubiert. Im dargestellten *Gate* wurden vitale Th-Zellen erwartet. Die Abbildung ist repräsentativ für zwei Versuchsreihen.

3.1.3 Produktion von Adiponektin durch Präadipozyten und Adipozyten

Auf Grund des Nachweises von Makrophagen-typischen Oberflächenantigenen auf Präadipozyten sollte trotz der fehlenden Fähigkeit, Antigene *in vitro* zu präsentieren, die immunologische Relevanz dieser Zellen weiter untersucht werden. Hierbei war das Adipokin Adiponektin von besonderem Interesse, da es immunologisch relevante Eigenschaften besitzen könnte [100]. Daher sollte seine Produktion durch Präadipozyten und Adipozyten *in vitro* charakterisiert werden.

Dazu wurden C57BI6/J-, 3T3L1- und ob/ob-Präadipozyten 72 h kultiviert und die Adiponektin anschließend Konzentration von mittels ELISA aus dem Kulturüberstand bestimmt. Dabei konnte Adiponektin nur in äußerst geringer Konzentration im Überstand von Präadipozyten nachgewiesen werden. Dabei wurde kein Unterschied zwischen den Versuchsansätzen der Präadipozyten in Abhängigkeit der Zelllinie oder Leptin-Kompetenz festgestellt und sie deswegen zusammengefasst (0,13 \pm 0,04 pg/ml, n = 36). Im Vergleich dazu lag Adiponektin im Überstand von Adipozytenkulturen [16] in einer um das ca. 16.000 fache $(2,13 \pm 0,05)$ ng/ml, n = 8) und in murinem Serum von Wildtyp-Mäusen in einer um das ca. 10.000 fache $(1,24 \pm 0.09 \text{ ng/ml}, n = 6)$ höheren Konzentration vor (Abbildung 11).



Abbildung 11 Nachweis von Adiponektin. Mittels ELISA wurde untersucht, ob Adiponektin im Überstand von Präadipozytenkulturen nachweisbar ist. Als Kontrollen wurden der Kulturüberstand von 3T3L1-Adipozyten und murines Serum (C57BI6/J) verwendet. Mittelwerte ± SEM **p<0,01; ***p<0,001. Für die statistische Auswertung wurde der Anova-Test angewandt.

3.2 Oligomerisierungsgrad von gAd und Adiponektin

Adiponektin liegt im Plasma in unterschiedlichen Oligomerisierungsgraden vor, wobei eine Korrelation zur biologischen Aktivität zu bestehen scheint [50, 51]. Der Oligomerisierungsgrad des bei den Experimenten eingesetzten rekombinanten gAd wurde mit der *Western Blot*-Methode untersucht. Zum Vergleich wurden der Oligomerisierungsgrad von Adiponektin aus dem Überstand von 3T3L1-Adipozyten sowie aus murinem und humanem Serum bestimmt. Dabei wurde deutlich, dass das in den weiteren Experimenten verwendete rekombinante gAd zum Großteil in monomerer Form (Molekulargewicht: 16 kDa), aber auch als gAd-Dimer und gAd-Quadrimer vorlag (Abbildung 12 A). Im Überstand von 3T3L1-Adipozyten war gAd ebenfalls nachweisbar, obwohl hier, wie auch bei murinem und humanem Serum, die multimeren Formen des "Adiponektins voller Länge" den Großteil des oligomerisierten Adiponektins (Adiponektin-Hexamere mit einem Molekulargewicht von 180 kDa und Multimere mit einem Molekulargewicht von >180 kDa) darstellten (Abbildung 12 B-D).



Abbildung 12 Oligomerisierungsgrad von rekombinantem gAd im Vergleich zu nativem Adiponektin. Mittels nicht-reduzierender SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Adiponektin-spezifischem *Western Blot* wurde untersucht, in welchen Oligomerisierungsgraden gAd und Adiponektin vorliegen. Dabei wurde neben dem rekombinanten, für die Experimente genutzten gAd (A) auch der Überstand von 3T3L1-Adipozyten (B), murines Serum (C) und humanes Serum (D) untersucht. Für die Gelelektrophorese wurde ein Gradientengel mit einem 5 bis 20%igem Acrylamidanteil verwendet.

3.3 Einfluss von gAd auf die Produktion von IL-6 und TNF- α durch Makrophagen

Um die Funktionalität des eingesetzten rekombinanten gAd zu überprüfen, wurden aus murinen Knochenmarkszellen Makrophagen generiert und 48 h mit gAd (10 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden die IL-6- und TNF-α-Konzentration im Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Dabei lag die TNF-a-Konzentration im Kulturüberstand bei allen Versuchen unter der Nachweisgrenze (Daten nicht gezeigt). Die **IL-6-Konzentration** bei unstimulierten Makrophagen ebenfalls lag unter Nachweisgrenze. In Gegenwart von gAd war IL-6 im Überstand nachweisbar n = 10). dies publizierten $(911 \pm 83 \text{ pg/ml})$ Da mit bereits Beobachtungen übereinstimmte, konnte davon ausgegangen werden, dass das verwendete rekombinante gAd funktionell war [48].

3.4 Wirkung von Adiponektin auf CD4⁺ Th-Zellen

3.4.1 Expression der Adiponektin-Rezeptoren 1 und 2 durch CD4⁺ Th-Zellen

Der Einfluss von Adiponektin auf Makrophagen wurde in der Literatur schon mehrfach beschrieben [48, 85, 86]. Ob sich Adiponektin auch auf weitere Bestandteile des Immunsystems, z.B. auf Th-Zellen auswirkt, war nicht bekannt. In dieser Arbeit sollte daher der Einfluss von gAd auf Th-Zellen genauer charakterisiert werden. Da die Existenz der entsprechenden Rezeptoren auf diesen Zellen einen wesentlichen Hinweis auf eine mögliche Beeinflussbarkeit liefern würde, wurde zunächst die Expression der AdipoR1 und AdipoR2 auf Th-Zellen untersucht.

Dazu wurde mRNS sowohl aus naiven CD4+-Th-Zellen als auch aus Th1- und Th2-polarisierten Zellen isoliert. Nach dem Umschreiben zu cDNS erfolgte die Amplifikation definierter Fragmente mittels PCR. Hierbei wurden spezifische Primer für charakteristische Nukleotidsequenzen des AdipoR1, AdipoR2 und der GAPDH verwendet. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Positivkontrolle wurde cDNS aus einem Pool von Präadipozyten verwendet. Dabei ließ sich in allen untersuchten Proben aus den unterschiedlich differenzierten CD4⁺ T-Zellpopulationen cDNS des AdipoR1 (Fragmentgröße: 196 bp) und des AdipoR2 (Fragmentgröße: 175 bp) nachweisen. Die Amplifikate aus dem Housekeeping-Gen GAPDH (Fragmentgröße: 452 bp) bestätigten, dass in den Proben vergleichbare Mengen cDNS eingesetzt waren.

Dies erlaubt den Schluss, dass beide Rezeptorisoformen durch CD4⁺ Th-Zellen exprimiert werden und die Expression nicht qualitativ durch die Linien-spezifische Polarisation beeinflusst wurde (Abbildung 13).



Abbildung 13 Nachweis der Expression von AdipoR1 und AdipoR2 durch CD4+ Th-Zellen. Nach Amplifikation spezifischer Nukleotidsequenzen des AdipoR1 und AdipoR2 mittels PCR erfolgte eine gelelektrophoretische Auftrennung und Anfärbung der PCR-Produkte. Als Kontrolle wurde GAPDH verwendet. Untersucht wurden naive CD4+ Th-Zellen (naiv), Th1- und Th2-polarisierte Th-Zellen (Th1 und Th2) sowie Präadipozyten (Pool von cDNS aus C57BI6/J-, 3T3L1-, ob/ob- und db/db-Präadipozyten). Es wurden jeweils Dreifachwerte (Th-Zellen) bzw. Vierfachwerte (Präadipozyten) bestimmt.

3.4.2 Quantifizierung der Expression der Adiponektin-Rezeptoren 1 und 2 durch CD4⁺ Th-Zellen

Um die Expression des AdipoR1 und AdipoR2 in unterschiedlich differenzierten Th-Zellen quantifizieren zu können, wurde mit entsprechenden Primern eine *Realtime*-PCR mit cDNS sowohl von naiven CD4⁺ Th-Zellen als auch von unter Th1- und Th2-Bedingungen polarisierten Th-Zellen durchgeführt. Die Expressionslevel von AdipoR1 und AdipoR2 wurden anschließend gegen die konstitutiv exprimierte GAPDH normalisiert. Dabei war bei naiven Th-Zellen die Expression des AdipoR1 ($6,3 \pm 0,9$; n=3) signifikant höher als bei Th1-polarisierten Zellen ($1,6 \pm 0,2$; n=3) und als bei Th2-polarisierten Zellen ($2,4 \pm 0,5$; n=3) (Abbildung 14 A). In allen untersuchten CD4⁺ Th-Zellen wurde ebenfalls die Expression des AdipoR2 nachgewiesen.

Bei der Quantifizierung des AdipoR2 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der relativen Expression zwischen naiven und polarisierten CD4⁺ Th-Zellen (Abbildung 14 B).



Abbildung 14 Quantifizierung der Expression von AdipoR1- und AdipoR2-spezifischer mRNS bei naiven CD4⁺ und polarisierten Th-Zellen. cDNS von naiven CD4⁺ sowie Th1- und Th2-polarisierten Th-Zellen wurde mit für den AdipoR1 und AdipoR2 spezifischen Primern einer *Realtime*-PCR unterzogen. Die Ergebnisse wurden anschließend gegenüber der Expression der GAPDH normalisiert. Mittelwerte ± SEM dargestellt; n=3; *p<0,05; **p<0,01. Für die statistische Auswertung wurde der Anova-Test angewandt.

Da beide Adiponektin-Rezeptorisoformen auf naiven sowie auf polarisierten CD4⁺ Th-Zellen nachweisbar waren, sollten im Folgenden funktionelle Effekte von gAd auf CD4⁺ Th-Zellen eingehender untersucht werden.

3.4.3 Induktion von IFNγ in CD4⁺ Th-Zellen durch gAd

Es wurde überprüft, ob gAd die Produktion des Th1-Effektorzytokins IFN γ bei polarisierenden Th-Zellen beeinflusst. Dazu wurden naive CD4⁺ Th-Zellen *in vitro* in Gegenwart von 0,3 und 10 µg/ml gAd unter Th0- und Th1-polarisierenden Bedingungen Antigen-unabhängig und Antigen-spezifisch stimuliert. Diese gAd-Konzentrationen wurden in einer vorherigen Arbeit mit Makrophagen eingesetzt und Effekte beobachtet [48]. Nach 7 Tagen wurde die IFN γ -Konzentration im Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Dabei zeigte sich in Gegenwart von gAd weder bei den verschiedenen Stimulationsmethoden (Antigen-unabhängig und Antigen-spezifisch) noch bei den Polarisationsrichtungen (Th0 und Th1) eine signifikante Veränderung der IFN γ -Produktion (Tabelle 10).

Tabelle 10 IFN γ -Konzentration im Überstand von polarisierenden CD4⁺ Th-Zellen in Gegenwart von gAd. Nach 7 Tagen wurde die IFN γ -Konzentration im Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Mittelwerte ± SEM.

Polarisation	gAd	IFNγ (μg/ml)		
(μg/ml)		Antigen-unabhängig	Antigen-spezifisch	
Th0	0	8,1 ± 3,8 (n=6)	9,4 ± 4,5 (n=6)	
	0,3	5,7 ± 2,5 (n=6)	12,7 ± 7,1 (n=4)	
	10	6,2 ± 2,4 (n=6)	9,7 ± 5,7 (n=6)	
Th1	0	23,2 ± 13,7 (n=6)	111,8 ± 11,1 (n=2)	
	0,3	25,2 ± 22,8 (n=6)	107,3 ± 7,8 (n=2)	
	10	19,1 ± 13,7 (n=6)	117,7 ± 3,9 (n=2)	

3.4.4 Einfluss von gAd auf die Polarisation von CD4⁺ Th-Zellen

Um zu überprüfen, ob gAd die Effizienz der Polarisation von Th-Zellen beeinflusst, wurden naive CD4⁺ Th-Zellen isoliert und Antigen-unabhängig stimuliert. Die Zellen wurden in Gegenwart von gAd unter Th0-, Th1-, Th2- und Th17-polarisierenden Bedingungen 7 Tage lang kultiviert. Danach erfolgte eine intrazelluläre Zytokinanfärbung. Die Werte wurden im Vergleich zu einer Kontrolle, d.h. zu CD4⁺ Th-Zellen, die ohne Zusatz von gAd polarisiert wurden, normalisiert. Dabei konnte kein signifikanter Einfluss gAd auf die Polarisationseffizienz von festgestellt werden (Tabelle 11).

Polarisation	Kennzytokin	gAd (µg/ml)	Zunahme Kennzytokin- positiver Zellen auf (%)+SEM	n
Th0	IFNγ	0	100 ± 17	13
		0,3	189 ± 38	13
		3	184 ± 35	9
		10	126 ± 32	12
Th1	IFNγ	0	100 ± 3	12
		0,3	111 ± 5	13
		3	109 ± 6	9
		10	116 ± 8	13
Th2	IL-4	0	100 ± 10	13
		0,3	129 ± 11	13
		3	133 ± 10	9
		10	107 ± 5	13
Th17	IL-17	0	100 ± 11	13
		0,3	114 ± 16	12
		3	114 ± 15	9
		10	128 ± 12	13

Tabelle 11 Th-Zell-Polarisation in Gegenwart von gAd. Die Ergebnisse wurden anhand der Kontrolle ohne gAd (=100%) normalisiert. Mittelwerte ± SEM.

3.4.5 Einfluss von gAd auf die Proliferation von CD4⁺Th-Zellen

Um den Einfluss von gAd auf die Proliferation von CD4⁺ Th-Zellen unter unterschiedlichen Polarisationsbedinungen zu untersuchen, wurden naive Th-Zellen in Gegenwart von gAd unter Th0-, Th1-, Th2- und Th17-polarisierenden Bedingungen kultiviert. Dabei wurden sie Antigen-unabhängig stimuliert.

Die Proliferation wurde zunächst anhand des Anteils sich geteilter Zellen durch Markierung der polarisierenden Th-Zellen mit CFSE untersucht. Mit CFSE markierte Th-Zellen wurden mit 10 µg/ml gAd unter Antigen-unabhängiger Stimulation in Kultur gebracht und der prozentuale Anteil geteilter Zellen an der Gesamtpopulation mittels durchflusszytometrischer Fluoreszenzmessung nach 72 h bestimmt. Dieser veränderte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant (Tabelle 12).

Tabelle 12Anteil geteilterZellen an der GesamtpopulationAntigen-unabhängigstimulierter $CD4^+$ Th-ZellenunterverschiedenenPolarisationsbedingungeninGegenwart von gAd.Mittelwerte ± SEM.

Polarisation	Anteil sich geteilter Zellen an der Gesamtpopulation (%)		
	Kontrolle	10 μg/ml gAd	
Th0	77,6 ± 2,0 (n=7)	80,9 ± 3,2 (n=6)	
Th1	75,3 ± 3,9 (n=7)	70,8 ± 3,2 (n=6)	
Th2	79,5 ± 4,4 (n=7)	73,4 ± 4,7 (n=6)	
Th17	74,0 ± 3,9 (n=5)	73,8 ± 1,7 (n=5)	

Zusätzlich wurde die Proliferation anhand der DNS-Neusyntheserate über den Einbau von [³H]-Thymidin untersucht. Dazu wurden naive CD4⁺ Th-Zellen Antigen-unabhängig stimuliert und gAd in den Konzentrationen 0,3; 3 und 10 µg/ml hinzugegeben. Bei unter Th0- und Th2-Bedingungen kultivierten Th-Zellen zeigten sich keine signifikante Veränderung der DNS-Neusyntheserate im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 15). Bei unter Th1-Bedingungen kultivierten Th-Zellen kam es zu einer signifikanten Hemmung **DNS-Neusyntheserate** der durch $10 \,\mu g/ml$ qAd im Vergleich zur Kontrolle (-10,8 ± 1,7%). In Gegenwart geringerer gAd-Konzentrationen, stieg die DNS-Neusyntheserate wieder signifikant an und näherte sich dem Kontrollwert (DNS-Neusyntheserate unter 0,3 μ g/ml Adiponektin: 98,4 ± 1,3% im Vergleich zur Kontrolle, Anstieg um 9,2% im Vergleich zu 10 μ g/ml Adiponektin, p<0,01).



Abbildung 15 Effekt von gAd auf die DNS-Neusyntheserate bei polarisierenden Th-Zellen. Th-Zellen wurden in Gegenwart von gAd (0,3; 3 und 10 μ g/ml) unter Th0-, Th1und Th2-Bedingungen Antigen-unabhängig stimuliert. Nach 58 h erfolgte die Zugabe von [³H]-Thymidin, nach insgesamt 72 h wurde die emittierte β -Strahlung gemessen. Dargestellt ist die DNS-Neusyntheserate in (%), wobei Werte auf die entsprechende Kontrolle ohne gAd normalisiert wurden. Mittelwerte ± SEM aus n=12 in allen Ansätzen; **p<0,01 Für die statistische Auswertung wurde der Anova-Test angewandt.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte zum einen festgestellt werden, ob Präadipozyten zur Rekrutierung von Th-Zellen in der Lage sind und ob Leptin-Kompetenz oder die Gegenwart von TLR-Liganden dabei von Bedeutung ist. Zum anderen sollte der Einfluss der globulären Domäne von Adiponektin auf die Zytokinproduktion, Polarisation und Proliferation von CD4⁺Th-Zellen untersucht werden.

Dazu wurde bei Präadipozyten zunächst die Leptin-unabhängige und Leptin-abhängige Expression immunologisch relevanter Oberflächenantigene untersucht. Hierbei konnte die Expression von MOMA-2 und CD80 sowohl bei Wildtyp- als auch bei Leptin- bzw. Leptin-Rezeptor-defizienten (*ob/ob-* und *db/db-*) Präadipozyten nachgewiesen werden. Die Gegenwart der TLR-Liganden LPS, Zymosan oder Flagellin bewirkte keine signifikanten Expressionveränderungen. MOMA-2 ist ein für adulte Makrophagen charakteristisches Oberflächenantigen. CD80 (auch als B7.1 bezeichnet) dient u.a. der Kostimulation von T-Zellen [130, 131]. Die Expression von MOMA-2 war weiterhin bei *ob/ob-* und *db/db*-Präadipozyten im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht. Trotz der nachgewiesenen Oberflächenantigene waren Präadipozyten, unabhängig von ihrer Leptin-Kompetenz, *in vitro* nicht zu einer Antigen-vermittelten T-Zell-Stimulation fähig.

Weiterhin wurde bestätigt, dass adulte Adipozyten das Adipokin Adiponektin sezernieren, wobei Präadipozyten *in vitro* dazu nicht in der Lage waren. Anschließend wurden die Auswirkungen von rekombinantem gAd auf die Zytokinproduktion, Polarisation und Proliferation von CD4⁺ Th-Zellen untersucht. Das verwendete gAd lag dabei größtenteils in monomerer Form vor und führte zu einer zuvor beschriebenen Sekretion von IL-6 bei Makrophagen. Daher konnte von seiner Funktionalität *in vitro* ausgegangen werden [48]. Da untersucht werden sollte, ob gAd eine Wirkung auf Th-Zellen besitzt, wurde initial die Expression der Adiponektin-Rezeptorisoformen bei unterschiedlich polarisierten Th-Zellen untersucht. Dabei konnten auf mRNS-Ebene beide Varianten des Adiponektin-Rezeptors, AdipoR1 und AdipoR2, nachgewiesen werden. Naive Th-Zellen zeigten eine signifikant höhere Expression des AdipoR1 als Th1- und Th2-polarisierte Th-Zellen. Die IFN γ -Produktion von nicht-polarisierenden und polarisierenden Th-Zellen wurde durch gAd nicht beeinflusst.

In weiteren Polarisationsversuchen (Th0, Th1, Th2 und Th17) zeigte keine der getesteten gAd-Konzentration (0,3; 3 und 10 µg/ml) eine signifikante Veränderung der

Konzentration des intrazellulär angefärbten Kennzytokins. Daher ist von einem Einfluss auf die Polarisation von gAd *in vitro* nicht auszugehen.

Die Proliferation von Th-Zellen in Gegenwart von gAd wurde zum einen anhand des Anteils geteilter Zellen an einer Gesamtpopulation untersucht. Unter Verwendung einer CFSE-Markierung bei Th-Zellen in Gegenwart von gAd in Konzentrationen bis zu 10 µg/ml konnte keine Veränderung des Anteils geteilter Zellen der an Gesamtpopulation festgestellt werden. Zum anderen wurde die Proliferation mit Hilfe der Messung der DNS-Neusyntheserate beurteilt. Hierzu wurde der Einbau von [³H]-Thymidin in Gegenwart von 10 µg/ml gAd untersucht. Unter Th0und Th2-Bedingungen bestanden keine signifikanten Veränderungen. Unter Th1-Bedingungen konnte eine signifikante Abnahme der DNS-Neusyntheserate gemessen werden. Bei geringeren gAd-Konzentration nährte sich die DNS-Neusyntheserate wieder dem Kontrollwert an. Daraus lässt sich schließen, dass gAd einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation der Th1-Zell-Subpopulation besitzt.

Präadipozyten exprimieren MOMA-2 und CD80. Präadipozyten sind dazu in der Lage, Antigene zu phagozytieren und besitzen einen Makrophagen-ähnlichen Phänotyp. Weiterhin wurden bisher der Monozyten/ Makrophagenmarker MOMA-2 und das kostimulatorische Molekül CD80 auf 3T3L1-Präadipozyten nachgewiesen [13, 14]. Um zu überprüfen, inwieweit sich diese Aussagen auf Wildtyp-Präadipozyten und auf Praädipozyten, die im Leptin-System verändert sind, übertragen lassen, wurde ein Profil immunologisch relevanter Oberflächenantigene von Wildtyp-, *ob/ob-* und *db/db-*Präadipozyten erstellt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigten dabei die Expression von MOMA-2 und CD80 auf 3T3L1-Präadipozyten, die als Kontrolle in den Experimenten mitgeführt wurden. Es wurde weiterhin gezeigt, dass sowohl murine Wildtyp- als auch ob/ob- und db/db-Präadipozyten MOMA-2 und CD80 exprimieren. In Abwesenheit von Leptin (ob/ob) oder des Leptin-Rezeptors (db/db) war die Expression des Makrophagenmarker MOMA-2 signifikant im Vergleich zu Präadipozyten von Wildtyp-Mäusen erhöht. Dadurch wurde Einfluss Leptin auf die Expression immunologisch der von relevanter Oberflächenantigene bei Präadipozyten, der aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe bereits durch eine erhöhte Expression funktioneller TLR bei Präadipozyten aus Leptindefizienten Mäusen aufgefallen war, bestätigt [16].

dass Praädipozyten dem angeborenen Immunsystem Geht man davon aus, zuzurechnen sind, so lassen sich mehrere Beispiele für einen Einfluss von Leptin auf dieses System, insbesondere auf Monozyten/ Makrophagen, feststellen. So ist in ob/ob-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp die Zahl zirkulierender Monozyten und Makrophagen erhöht [32]. Weiterhin zeigen sie eine größere Sensibilität für Monozyten/ Makrophagen betreffende Stimuli. So weisen ob/ob-Mäuse eine stärkere Mortalität nach Gabe von LPS als Wildtyp-Tiere auf, wobei die exogene Zufuhr von Leptin diesen Effekt aufhebt [132]. Auch in vitro zeigen Makrophagen von Leptin-defizienten Tieren eine vermehrte Aktivität. So ist bei ihnen sowohl vor als auch nach LPS-Gabe die Produktion von Superoxid und H₂O₂ sowie von Prostaglandin E₂ im Vergleich zu Makrophagen, die aus Wildtyp-Mäusen isoliert wurden, erhöht [133]. Dies spricht zusammenfassend für eine erhöhte Aktivität von Monozyten/ Makrophagen bei Leptin-Defizienz, womit die vermehrte Expression von MOMA-2 auf ob/ob- und db/db-Präadipozyten als Makrophagen-ähnlichen Zellen erklärbar wäre. Damit würden die sich immunmodulatorischen Effekte von Leptin nicht auf die klassischen Bestandteile des angeborenen Immunsystems beschränken.

Präadipozyten exprimieren Makrophagen-typische Oberflächenmarker und zeigen phagozytotische Aktivität, können aber CD4+ Th-Zellen nicht aktivieren. Präadipozyten waren trotz phagozytotischer Aktivität und der Expression von MOMA-2 sowie CD80 *in vitro* nicht zu einer Antigen-spezifischen Rekrutierung von CD4⁺ Th-Zellen in der Lage. Auch wenn für nicht-professionelle APZ wie Keratinozyten und Chondrozyten nachgewiesen wurde, dass sie T-Zellen rekrutieren können, so ist dies möglicherweise eine fakultative Eigenschaft [134, 135]. Außerdem könnte der fehlende Nachweis von MHC II *in vitro* bei Präadipozyten ein entscheidender Grund für die fehlende Rekrutierung von Th-Zellen sein [136]. Hierbei wäre es interessant, das Oberflächenantigenprofil von Präadipozyten *in vivo* zu bestimmen. Dadurch könnte festgestellt werden, ob Unterschiede in der Expression immunologisch relevanter Antigene im Vergleich zu *in vitro* Ergebnissen bestehen.

Im Gegensatz zu ausdifferenzierten Adipozyten produzieren Präadipozyten als deren Vorläufer kein Adiponektin. Die in dieser Arbeit ermittelten Konzentrationen im Überstand Präadipozyten von Adiponektin von lagen unter der Zuverlässigkeitsgrenze des ELISA. Deswegen ist davon auszugehen, dass Präadipozyten kein Adiponektin sezernieren. Dahingegen konnte Adiponektin sowohl im

Überstand von Adipozyten als auch in murinem und humanem Serum nachgewiesen werden, was mit den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen übereinstimmt [43].

Eine mögliche Ursache für die ausschließliche Produktion von Adiponektin durch Adipozyten könnte in ihrer Einbindung in metabolische Feedback-Mechanismen liegen. Wie die Sekretion von Leptin, die hauptsächlich durch Adipozyten stattfindet und Bestandteil eines negativen Feedback-Mechanismus mit dem zentral erzeugten Appetitgefühl ist, so könnte auch Adiponektin Bestandteil eines solchen metabolisch beeinflussten Regelkreises sein und deswegen nur von Adipozyten sezerniert werden [21]. Interessant ist weiterhin die Abhängigkeit der Adiponektin-Sekretion vom Differenzierungsgrad der Adipozyten. Dies stärkt die Rolle adulter Adipozyten als endokrin aktive Zellen und unterscheidet sie von ihren Makrophagen-ähnlichen Vorläufern.

Induktion der IL-6-Produktion bei Makrophagen *in vitro* **durch gAd.** Tsatsanis et al. konnten nachweisen, dass gAd bei Makrophagen aus dem peripheren Blut die Produktion von IL-6 und TNF-α induziert [48]. Um die Funktionalität des verwendeten rekombinanten gAd zu überprüfen, wurde die Sekretion von IL-6 und TNF-α bei aus murinem Knochenmark generierten Makrophagen in Gegenwart von gAd bestimmt. Dabei wurde IL-6 im Kulturüberstand nach Inkubation mit gAd nachgewiesen. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass das eingesetzte gAd funktionell war.

Durch dieses Ergebnis wird die immunologische Relevanz von gAd unterstrichen, da IL-6 ein für die Auslösung und Kontrolle inflammatorischer Prozesse bedeutsames Zytokin ist. Es zählt zu den Entzündungsmediatoren, die in Gegenwart eines Entzündungsreizes u.a. von Makrophagen und Monozyten sezerniert werden [137]. Dadurch kommt es in der Leber zur Produktion von Akute-Phase-Proteinen, die an einer Lokalisation und Kontrolle der Entzündung beteiligt sind [138]. Zusätzlich zu seiner Ausschüttung zusammen mit proinflammatorischen Zytokinen wie TNF-a und IL-1, sowie Hinweisen auf proinflammatorische Aktivitäten, gehören auch antiinflammatorische Eigenschaften zum Wirkungsspektrum von IL-6 [139, 140]. Die Produktion des pleiotropen Zytokins IL-6 durch Makrophagen in Gegenwart von gAd bietet eine Erklärungsmöglichkeit für die in der Literatur beschrieben sowohl pro- als auch antiinflammatorischen Eigenschaften dieses Adipokins.

Rekombinantes gAd liegt überwiegend in monomerer Form vor, während natives Adiponektin einen höheren Oligomerisierungsgrad besitzt. Die Ergebnisse eines Adipokin-spezifischen Western Blots zeigten, dass Adiponektin in vivo vor allem in höhermolekularen Oligomeren vorliegt und bestätigt damit frühere Beobachtungen [59]. angenommen, dass die verschiedenen Adiponektin-Oligomere Es wird eine unterschiedliche biologische Funktion besitzen [52, 141]. So ist HMW-Adiponektin sowohl bei Hyperinsulinämie als auch bei Hyperglukosämie reduziert und das Fehlen von HMW-Adiponektin mit einem vermehrten Auftreten von Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert [52, 142]. Außerdem geht die Bestimmung des Anteils von HMW-Adiponektin am gesamten Adiponektin mit einer verbesserten Aussagekraft im Bezug auf die Insulinsensitivität einher, als die Bestimmung der gesamten Adiponektin-Konzentration [143, 144]. Daher kann davon ausgegangen werden, dass besonders HMW-Adiponektin in den Glukosestoffwechsel eingebunden ist.

In der hier vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass das verwendete rekombinante gAd größtenteils als Monomer vorliegt, sich aber auch zu Dimeren zusammenlagern kann. Im Vergleich dazu liegt natives zirkulierendes Adiponektin *in vivo* größtenteils als HMWbzw. MMW-Adiponektin vor und nicht als LMW-Variante oder als gAd, wie es in *in vitro* Experimenten verwendet wird [59]. Daher stellt sich die Frage nach der funktionellen Relevanz von gAd *in vivo*. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass höhermolekulare Adiponektine mit Hilfe des Enzyms Leukozyten-Elastase aus aktivierten Monozyten und neutrophilen Granulozyten in gAd aufgespalten werden können [54]. Daher kann davon ausgegangen werden, dass gAd zumindest für Monozyten/ Makrophagen eine aktive Wirkungsform von Adiponektin darstellt, was u.a. in dieser Arbeit bestätigt wurde. Weiterhin wurde für rekombinantes gAd eine biologische Aktivität im Rahmen seiner antidiabetogenen Eigenschaften *in vivo* nachgewiesen [145]. Diese Resultate sprechen dafür, dass gAd *in vivo* funktionell ist. **Präadipozyten und CD4⁺ Th-Zellen exprimieren beide bekannten Adiponektin-Rezeptorisoformen AdipoR1 und AdipoR2.** Adiponektin-Rezeptoren konnten bisher in vielen Gewebe- und Zelltypen unterschiedlicher Progenie nachgewiesen werden (Tabelle 13).

Tabelle 13 Übersicht über die Expression von Adiponektin-Rezeptoren in verschiedenen Geweben und Zelltypen.

AdipoR1	AdipoR2
Herz, Niere, Lunge, Skelettmuskulatur, Milz [61]	Leber [61]
Pankreas [146]	Pankreas [146]
Adipozyten [147]	Adipozyten [147]
Monozyten [148]	Monozyten [148]
Adipozyten [147] Monozyten [148]	Adipozyten [146] Monozyten [148]

Für beide Varianten des Adiponektin-Rezeptors wurde eine antidiabetogene Beteiligung am Glukosemetabolismus und in der Fettsäureoxidation gezeigt [62, 63, 149].

Die Regulation der Expression des Adiponektin-Rezeptors scheint u.a. bedeutsam für die Entstehung von Krankheiten mit metabolischer Komponente zu sein. So führen bestimmte Umweltfaktoren, wie z.B. Alkohol, zu einer verminderten Expression von Adiponektin-Rezeptoren in der Leber, was mit der Pathogenese der Steatohepatitis bei Alkoholabusus in Verbindung gebracht wird [150]. Auch körpereigene Hormone regulieren das Expressionsniveau der Adiponektin-Rezeptoren; so besitzt z.B. Insulin einen inhibitorischen Effekt auf die Expression des AdipoR1 [151].

Auch auf Monozyten, als Bestandteil des angeborenen Immunsystems, und auf CD3⁺ Lymphozyten wurden der AdipoR1 und der AdipoR2 nachgewiesen [148]. Um die Wirkung von Adiponektin auf das adaptive Immunsystem eingehender zu charakterisieren, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob und in welchem Maß CD4⁺ Th-Zellen naive verschieden polarisierte Adiponektin-Rezeptoren und exprimieren. Dabei konnte mRNS beider Adiponektin-Rezeptorisoformen bei naiven und bei Th1- und Th2-polarisierten T-Zellen nachgewiesen werden. Dadurch wurde die Expression von Adiponektin-Rezeptoren auf CD4⁺ Th-Zellen, als Bestandteile des adaptiven Immunsystems, ausgedehnt. Der Nachweis von mRNS der Adiponektin-Rezeptorisoformen bei Th-Zellen macht einen Einfluss von Adiponektin auf diese Zellen, ähnlich wie bei Leptin, wahrscheinlich [120]. Zu klären bleibt, welche Form von Adiponektin (gAd, Adiponektin-Monomer, unterschiedliche Adiponektin-Oligomere) welche Effekte auf die unterschiedlichen Zellen (Monozyten/ Makrophagen und Th-Zellen) besitzt. Besonders interessant wäre eine eingehende Untersuchung naiver Th-Zellen, da diese Adiponektin-Rezeptoren vergleichsweise verstärkt exprimieren.

Adiponektin beeinflusst die Proliferation von CD4⁺ Th-Zellen. Leptin ist in der Lage, die Polarisation von CD4⁺ Th-Zellen in Richtung des durch die Sekretion von IFNγ gekennzeichneten Th1-Phänotyps zu lenken [152]. Die Expression des AdipoR1 und AdipoR2 bei Th-Zellen ließ vermuten, dass auch das Adipokin Adiponektin diese Zellen funktionell beeinflussen kann. Zunächst wurde deshalb die Polarisation von CD4⁺ Th-Zellen in Gegenwart von gAd charakterisiert. Dabei konnte keine signifikante Veränderung der Polarisationseffektivität von Th0-, Th1-, Th2- und Th17-polarisierenden T-Zellen durch gAd festgestellt werden.

Um die Eigenschaft von Adiponektin als möglichem pro- oder antiinflammatorisch wirkenden Stimulus eindeutiger zu charakterisieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Zellteilungsrate von CD4⁺ Th-Zellen und die DNS-Neusyntheserate während der Polarisation in Gegenwart von gAd untersucht. Dabei ließ sich feststellen, dass gAd *in vitro* eine antiproliferative Wirkung durch eine verminderte DNS-Neusyntheserate auf unter Th1-Bedingungen polarisierende T-Zellen besitzt. Auch bei Th2-polarisierenden T-Zellen ließ sich dies tendenziell erkennen, wobei die Ergebnisse hier nicht signifikant waren. Dahingegen zeigte gAd bei nicht-polarisierenden Th-Zellen keinen Einfluss. Daraus lässt sich schließen, dass sich gAd selektiv auf die Differenzierung spezifischer T-Zell-Subpopulationen auswirkt.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob die erhöhte Adiponektin-Konzentration im mesenterialen Fettgewebe von Morbus Crohn-Patienten ein Kofaktor für die Entstehung der Krankheit ist [102]. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass sie einen Versuch des Organismus darstellt, die Entzündungsreaktion einzudämmen [102, 103]. In der Literatur wird die Rolle von Adiponektin bei CED dabei kontrovers diskutiert, wobei diesem Adipokin teils antiinflammatorische, teils proinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben werden [89, 103].

Bislang wurde vor allem die Wirkung von Adiponektin auf mononukleäre Zellen beschrieben. Dabei wurde die u.a. die Sekretion von IL-6 und TNF-α in Gegenwart von gAd beobachtet [48]. Trotz eines primär proinflammatorischen Effekts vor allem von

TNF-α, wird für gAd von mehreren Autoren eine insgesamt antiinflammatorische Wirkung vermutet [79, 99]. Das wird dadurch begründet, dass mononukleäre Zellen eine verminderte Kontakt mit gAd nach primärem Reaktivität gegenüber proinflammatorischen Stimuli aufweisen [48]. Verantwortlich für diese verminderte Reaktivität ist u.a. die Induktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 durch TNF-α [87]. Weiterhin wird eine Modifikation der NF-κB-Aktivität durch gAd und HMW-Adiponektin diskutiert, obwohl noch nicht abschließend geklärt ist, ob dies eine Inhibition oder Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors zur Folge hat [51, 87]. Letztendlich scheinen jedoch die antiinflammatorischen Effekte von Adiponektin bei mononukleären Zellen zu überwiegen [87].

Als ubiquitär vorkommender, zentraler Transkriptionsfaktor für die Induktion proinflammatorischer Signalkaskaden spielt NF-κB auch bei der Aktivierung und Proliferation von Th-Zellen eine entscheidende Rolle [153]. Dabei liegt die Vermutung nahe, dass ähnlich wie bei Monozyten und Makrophagen die Modulation dieses Transkriptionsfaktors zu der verminderten DNS-Neusynthese bei polarisierten Th-Zellen beitragen könnte [87].

Der NF-κB ist essenziell für die Differenzierung des durch die Produktion von IFNγ gekennzeichneten Th1-Zelltyps [154-156]. Da in dieser Arbeit eine signifikante Hemmung der DNS-Neusyntheserate bei unter Th1-Bedingungen stimulierten Th-Zellen beobachtet wurde, ist dies ein Hinweis dafür, dass NF-κB einen der Angriffspunkte von gAd bei CD4⁺ Th-Zellen darstellen könnte. Inwieweit diese Beobachtungen auch für CD8⁺ T-Zellen zutreffen, für die gezeigt wurde, dass sie eine bedeutende Rolle in der Initiation einer Antigen-spezifischen Kolitis besitzen, könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein [121]. Sollten CD8⁺ T-Zellen ebenfalls eine Modifikation ihrer Proliferation in Gegenwart von Adiponektin zeigen, würde das die Rolle dieses Adipokins in der Kontrolle inflammatorischer Prozesse unterstreichen.

Eine Charakterisierung von Adiponektin als Entzündungs-hemmendes Adipokin wird durch seine antiproliferative Wirkung auf weitere Zellpopulationen zusätzlich gerechtfertigt. So zeigen hepatische Sternzellen eine verminderte Proliferation nach Stimulation in Gegenwart von HMW-Adiponektin [65]. In murinen Makrophagen wirkt Adiponektin antiinflammatorisch durch Unterdrückung der TLR-vermittelten NF-ĸB Aktivität [86]. Weiterhin wurde eine antiproliferative Wirkung von Adiponektin auf myeloische Vorläuferzellen nachgewiesen [82]. Auch die Inhibition der Proliferation von Endothelzellen durch Interaktion mit verschiedenen Wachstumsfaktoren durch Adiponektin wurde gezeigt [77].

Zusammenfassend konnte durch Ergebnisse dieser Arbeit die antiproliferative Wirkung von gAd auf sich polarisierende Th1-Zellen ausgedehnt werden, indem eine Verminderung der DNS-Neusyntheserate gezeigt wurde. Interessant ist, dass die antiproliferative Wirkung auf polarisierende Th1-Zellen begrenzt war, obwohl alle untersuchten Th-Zellen (naiv, Th1 und Th2) beide Adiponektin-Rezeptorisoformen exprimierten. Möglicherweise ist die Anwesenheit von oligomerisiertem Adiponektin oder zumindest von Adiponektin-Monomeren für die Vermittlung des gesamten Wirkungsspektrums dieses Adipokins auf CD4⁺ Th-Zellen nötig. Weiterhin wurde hier ein antiproliferativer Effekt von gAd auf sich in der Differenzierung befindende Th1-Zellen nachgewiesen. Davon abgegrenzt werden muss ein möglicherweise unterschiedlicher Effekt auf differenzierte, adulte Th1-Zellen. Es wäre zusätzlich interessant festzustellen, ob sich der antiproliferative Effekt von gAd auf weitere Bestanteile des adaptiven Immunsystems ausdehnen lässt. Im Hinblick auf CED sind hier CD8⁺ T-Zellen von Bedeutung. Auch würde der direkte durchflusszytometrische Nachweis von Adiponektin-Rezeptorisoformen die Funktionalität der in dieser Arbeit nachgewiesenen mRNS des Adiponektin-Rezeptors bestätigen.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle der Adipokine Leptin und Adiponektin in der Regulation ausgewählter Zellen des adaptiven Immunsystems *in vitro* zu charakterisieren. Dazu wurden murine naive CD4⁺ Th-Zellen isoliert und in Gegenwart von rekombinantem globulärem Adiponektin (gAd) unter Th0-, Th1-, Th2- und Th17-polarisierenden Bedingungen stimuliert. Hintergrund dieser Versuche war die antiinflammatorische Wirkung von Adiponektin auf Makrophagen und Endothelzellen.

Weiterhin sollte festgestellt werden, ob Wildtyp- und Leptin-defiziente Präadipozyten kostimulatorische Fähigkeiten für Antigen-spezifische CD4⁺ Th-Zellen besitzen, da sie Makrophagen-typische Oberflächenantigene aufweisen und phagozytotische Aktivität zeigen.

Die Fähigkeit von Präadipozyten zur Rekrutierung von Th-Zellen wurde durch eine durchflusszytometrische Bestimmung des Oberflächenantigenprofils von Wildtyp- und Leptin-defizienten Präadipozyten sowie durch Kokultur mit Th-Zellen charakterisiert. Weiterhin wurde untersucht, ob Präadipozyten und Adipozyten zur Produktion von Adiponektin in der Lage sind.

Zur Charakterisierung der Rolle von Adiponektin in der Regulation von CD4⁺ Th-Zellen wurde zunächst festgestellt, ob und in welchem Maße die Adiponektin-Rezeptoren 1 und 2 von unterschiedlich polarisierten (naiv, Th1- und Th2-polarisiert) CD4⁺ Th-Zellen auf mRNS-Ebene exprimiert werden. Die Wirkung von gAd auf diese Zellen wurde anschließend mit Hilfe der Bestimmung der Produktion von IFNγ, der Polarisationseffizienz unter polarisierenden Bedingungen und der Proliferation untersucht.

Es zeigte sich, dass Wildtyp-, 3T3L1-, *ob/ob-* und *db/db-*Präadipozyten neben dem Makrophagenmarker Monozyten/ Makrophagenmarker (MOMA)-2 auch das für die Antigen-spezifische Stimulation von T-Zellen bedeutsame kostimulatorische Molekül CD80 exprimierten. Die Expression von CD86, MHC II, CD11b und CD11c lag bei allen Präadipozyten unter der Nachweisgrenze. Die Expression von MOMA-2 war bei *ob/ob*- und *db/db-*Präadipozyten im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht. *In vitro* waren Präadipozyten trotz des Nachweises von MOMA-2 und CD80 sowie phagozytotischer Aktivität nicht zu einer Kostimulation von Th-Zellen im Sinne Antigen-präsentierender Zellen fähig.

Das Adipokin Adiponektin war sowohl im Überstand von 3T3L1-Adipozyten als auch in murinem und humanem Serum, jedoch nicht im Überstand von Präadipozyten nachweisbar. Adiponektin lag *in vivo* in hochmolekularer, oligomerer Form vor. Im Überstand von 3T3L1-Adipozyten war es zusätzlich als gAd nachweisbar. Das für die Experimente verwendete rekombinante gAd lag überwiegend in monomerer und dimerer Form vor. Es induzierte reproduzierbar die Produktion von Interleukin-6 durch Makrophagen.

Die mRNS der Adiponektin-Rezeptorisoformen 1 und 2 konnte bei CD4⁺ Th-Zellen nachgewiesen werden. Von naiven Th-Zellen wurde die Variante 1 im Vergleich zu Th1und Th2-polarisierten CD4⁺ Th-Zellen verstärkt exprimiert.

Die Produktion von IFN γ durch unter nicht-polarisierenden und unter Th1polarisierenden Bedingungen kultivierten CD4⁺ Th-Zellen wurde von gAd nicht beeinflusst.

Die Polarisation von CD4⁺ Th-Zellen in Richtung des Th0-, Th1-, Th2- und Th17-Phänotyps wurde durch gAd nicht beeinflusst.

Die DNS-Neusyntheserate von unter Th1- jedoch nicht von unter Th0- oder unter Th2-polarisierenden Bedingungen kultivierten CD4⁺ Th-Zellen wurde durch gAd inhibiert.

Auf Grund der Expression Makrophagen-typischer Oberflächenantigene durch Präadipozyten unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit die Zuordnung dieser Zellen zum angeborenen Immunsystem. Da eine Abhängigkeit der Expressionslevel der Oberflächenantigene von Leptin bestand, bestärkt dies die regulatorischen Eigenschaften dieses Adipokins.

Die bekannten antiinflammatorischen Charakteristika von Adiponektin konnten auf Bestandteile des adaptiven Immunsystems ausgedehnt werden, da der Beweis für eine antiproliferative Wirkung auf Th1-Zellen geliefert wurde.

6 Literaturverzeichnis

- 1. WHO, Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. 2000.
- 2. Hajer, G.R., T.W. van Haeften, and F.L. Visseren, *Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases.* Eur Heart J, 2008. **29**(24): p. 2959-71.
- 3. Lago, F., et al., *Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation.* Nat Clin Pract Rheumatol, 2007. **3**(12): p. 716-24.
- 4. Kouris-Blazos, A. and M.L. Wahlqvist, *Health economics of weight management: evidence and cost.* Asia Pac J Clin Nutr, 2007. **16 Suppl 1**: p. 329-38.
- 5. Wolk, A., et al., *A prospective study of obesity and cancer risk (Sweden).* Cancer Causes Control, 2001. **12**(1): p. 13-21.
- 6. de Ferranti, S. and D. Mozaffarian, *The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences.* Clin Chem, 2008. **54**(6): p. 945-55.
- Shoelson, S.E., L. Herrero, and A. Naaz, *Obesity, inflammation, and insulin resistance.* Gastroenterology, 2007. 132(6): p. 2169-80.
- 8. Wellen, K.E. and G.S. Hotamisligil, *Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue.* J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1785-8.
- 9. Fruhbeck, G., Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. Methods Mol Biol, 2008. **456**: p. 1-22.
- Chung, S., et al., Preadipocytes mediate lipopolysaccharide-induced inflammation and insulin resistance in primary cultures of newly differentiated human adipocytes. Endocrinology, 2006. 147(11): p. 5340-51.
- Weisberg, S.P., et al., Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J Clin Invest, 2003. 112(12): p. 1796-808.
- 12. Luiz Carlos U. Junqueira, J.C.u.M.G., *Histologie.* 2006(6): p. 75-80.
- Charriere, G., et al., *Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity.* J Biol Chem, 2003. 278(11): p. 9850-5.
- 14. Cousin, B., et al., A role for preadipocytes as macrophage-like cells. Faseb J, 1999. 13(2): p. 305-12.
- 15. Khazen, W., et al., *Differentiation-dependent expression of interferon gamma and toll-like receptor 9 in 3T3-F442A adipocytes.* Biochimie, 2007. **89**(5): p. 669-75.

- Batra, A., et al., Leptin-dependent toll-like receptor expression and responsiveness in preadipocytes and adipocytes. Am J Pathol, 2007. 170(6): p. 1931-41.
- Areschoug, T. and S. Gordon, *Pattern recognition receptors and their role in innate immunity: focus on microbial protein ligands.* Contrib Microbiol, 2008. 15: p. 45-60.
- Stroh, T., et al., Nucleotide oligomerization domains 1 and 2: regulation of expression and function in preadipocytes. J Immunol, 2008. 181(5): p. 3620-7.
- Coppack, S.W., *Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue*. Proc Nutr Soc, 2001. 60(3): p. 349-56.
- 20. Frederich, R.C., et al., *Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents. Impact of nutrition and obesity.* J Clin Invest, 1995. **96**(3): p. 1658-63.
- 21. Friedman, J.M. and J.L. Halaas, *Leptin and the regulation of body weight in mammals.* Nature, 1998. **395**(6704): p. 763-70.
- 22. Badman, M.K. and J.S. Flier, *The adipocyte as an active participant in energy balance and metabolism.* Gastroenterology, 2007. **132**(6): p. 2103-15.
- 23. Matarese, G., E.H. Leiter, and A. La Cava, *Leptin in autoimmunity: many questions, some answers.* Tissue Antigens, 2007. **70**(2): p. 87-95.
- 24. Zhang, F., et al., *Crystal structure of the obese protein leptin-E100*. Nature, 1997.
 387(6629): p. 206-9.
- 25. Sanchez-Margalet, V., et al., *Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action.* Clin Exp Immunol, 2003. 133(1): p. 11-9.
- 26. Mancuso, P., et al., *Leptin-deficient mice exhibit impaired host defense in Gramnegative pneumonia.* J Immunol, 2002. **168**(8): p. 4018-24.
- Loffreda, S., et al., Leptin regulates proinflammatory immune responses. Faseb J, 1998. 12(1): p. 57-65.
- 28. Martin-Romero, C., et al., *Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes.* Cell Immunol, 2000. **199**(1): p. 15-24.
- 29. Howard, J.K., et al., Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice. J Clin Invest, 1999.
 104(8): p. 1051-9.

- Busso, N., et al., Leptin signaling deficiency impairs humoral and cellular immune responses and attenuates experimental arthritis. J Immunol, 2002. 168(2): p. 875-82.
- Batra, A., M. Zeitz, and B. Siegmund, [The role of leptin in the immune system--a linking of endocrinology and immunology]. Dtsch Med Wochenschr, 2005.
 130(5): p. 226-9.
- Faggioni, R., et al., Leptin-deficient (ob/ob) mice are protected from T cellmediated hepatotoxicity: role of tumor necrosis factor alpha and IL-18. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(5): p. 2367-72.
- 33. Tarzi, R.M., et al., *Leptin-deficient mice are protected from accelerated nephrotoxic nephritis.* Am J Pathol, 2004. **164**(2): p. 385-90.
- 34. Matarese, G., et al., *Requirement for leptin in the induction and progression of autoimmune encephalomyelitis.* J Immunol, 2001. **166**(10): p. 5909-16.
- 35. Mykoniatis, A., et al., *Leptin mediates Clostridium difficile toxin A-induced enteritis in mice.* Gastroenterology, 2003. **124**(3): p. 683-91.
- 36. Siegmund, B., H.A. Lehr, and G. Fantuzzi, *Leptin: a pivotal mediator of intestinal inflammation in mice.* Gastroenterology, 2002. **122**(7): p. 2011-25.
- 37. Siegmund, B., et al., *Leptin receptor expression on T lymphocytes modulates chronic intestinal inflammation in mice.* Gut, 2004. **53**(7): p. 965-72.
- Yang, S.Q., et al., Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(6): p. 2557-62.
- Bernotiene, E., et al., *Delayed resolution of acute inflammation during zymosaninduced arthritis in leptin-deficient mice.* Arthritis Res Ther, 2004. 6(3): p. R256-63.
- 40. Ozata, M., I.C. Ozdemir, and J. Licinio, Human leptin deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of leptin-mediated defects. J Clin Endocrinol Metab, 1999. 84(10): p. 3686-95.
- Farooqi, I.S., 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): p. 1093-103.

- 42. Bernotiene, E., G. Palmer, and C. Gabay, *The role of leptin in innate and adaptive immune responses.* Arthritis Res Ther, 2006. **8**(5): p. 217.
- 43. Scherer, P.E., et al., *A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes.* J Biol Chem, 1995. **270**(45): p. 26746-9.
- 44. Hu, E., P. Liang, and B.M. Spiegelman, *AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity.* J Biol Chem, 1996. **271**(18): p. 10697-703.
- 45. Nakano, Y., et al., *Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatinbinding protein purified from human plasma.* J Biochem, 1996. **120**(4): p. 803-12.
- 46. Arita, Y., et al., *Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity.* Biochem Biophys Res Commun, 1999. **257**(1): p. 79-83.
- 47. Shapiro, L. and P.E. Scherer, *The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor.* Curr Biol, 1998.
 8(6): p. 335-8.
- Tsatsanis, C., et al., Adiponectin induces TNF-alpha and IL-6 in macrophages and promotes tolerance to itself and other pro-inflammatory stimuli. Biochem Biophys Res Commun, 2005. 335(4): p. 1254-63.
- Fukushima, J., et al., Adiponectin prevents progression of steatohepatitis in mice by regulating oxidative stress and Kupffer cell phenotype polarization. Hepatol Res, 2009. 39(7): p. 724-38.
- 50. Tsao, T.S., et al., Oligomerization state-dependent activation of NF-kappa B signaling pathway by adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30).
 J Biol Chem, 2002. 277(33): p. 29359-62.
- 51. Neumeier, M., et al., *Different effects of adiponectin isoforms in human monocytic cells.* J Leukoc Biol, 2006. **79**(4): p. 803-8.
- Pajvani, U.B., et al., Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications fpr metabolic regulation and bioactivity. J Biol Chem, 2003. 278(11): p. 9073-85.
- 53. Fang, X. and G. Sweeney, *Mechanisms regulating energy metabolism by* adiponectin in obesity and diabetes. Biochem Soc Trans, 2006. 34(Pt 5): p. 798-801.
- 54. Waki, H., et al., Generation of globular fragment of adiponectin by leukocyte elastase secreted by monocytic cell line THP-1. Endocrinology, 2005. 146(2): p. 790-6.
- 55. Innamorati, G., E. Bianchi, and M.I. Whang, *An intracellular role for the C1q-globular domain.* Cell Signal, 2006. **18**(6): p. 761-70.
- 56. Yamauchi, T., et al., Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. J Biol Chem, 2003. 278(4): p. 2461-8.
- 57. Ceddia, R.B., et al., Globular adiponectin increases GLUT4 translocation and glucose uptake but reduces glycogen synthesis in rat skeletal muscle cells.
 Diabetologia, 2005. 48(1): p. 132-9.
- 58. Fruebis, J., et al., Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complementrelated protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(4): p. 2005-10.
- 59. Kadowaki, T. and T. Yamauchi, *Adiponectin and adiponectin receptors.* Endocr Rev, 2005. **26**(3): p. 439-51.
- 60. Okamoto, Y., et al., *Adiponectin: a key adipocytokine in metabolic syndrome.* Clin Sci (Lond), 2006. **110**(3): p. 267-78.
- 61. Yamauchi, T., et al., *Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects.* Nature, 2003. **423**(6941): p. 762-9.
- Tsuchida, A., et al., Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. J Biol Chem, 2004. 279(29): p. 30817-22.
- 63. Debard, C., et al., *Expression of key genes of fatty acid oxidation, including adiponectin receptors, in skeletal muscle of Type 2 diabetic patients.*Diabetologia, 2004. 47(5): p. 917-25.
- 64. Hug, C., et al., *T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(28): p. 10308-13.
- 65. Adachi, M. and D.A. Brenner, *High molecular weight adiponectin inhibits* proliferation of hepatic stellate cells via activation of adenosine monophosphateactivated protein kinase. Hepatology, 2008. **47**(2): p. 677-85.
- Haugen, F. and C.A. Drevon, Activation of nuclear factor-kappaB by high molecular weight and globular adiponectin. Endocrinology, 2007. 148(11): p. 5478-86.

- Tsao, T.S., et al., Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways. J Biol Chem, 2003. 278(50): p. 50810-7.
- 68. Stefan, N., et al., *Plasma adiponectin and endogenous glucose production in humans.* Diabetes Care, 2003. **26**(12): p. 3315-9.
- Trujillo, M.E. and P.E. Scherer, Adiponectin--journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. J Intern Med, 2005. 257(2): p. 167-75.
- 70. Kubota, N., et al., *Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation.* J Biol Chem, 2002. **277**(29): p. 25863-6.
- 71. Ouchi, N., et al., Association of hypoadiponectinemia with impaired vasoreactivity. Hypertension, 2003. **42**(3): p. 231-4.
- 72. Maeda, N., et al., *Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30.* Nat Med, 2002. **8**(7): p. 731-7.
- Yamauchi, T., et al., *The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity.* Nat Med, 2001. 7(8): p. 941-6.
- 74. Ouchi, N., et al., *Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocytederived plasma protein adiponectin.* Circulation, 1999. **100**(25): p. 2473-6.
- 75. Arita, Y., et al., Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a plateletderived growth factor-BB-binding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell. Circulation, 2002.
 105(24): p. 2893-8.
- 76. Ouchi, N., et al., Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway.
 Circulation, 2000. 102(11): p. 1296-301.
- 77. Wang, Y., et al., Adiponectin inhibits cell proliferation by interacting with several growth factors in an oligomerization-dependent manner. J Biol Chem, 2005.
 280(18): p. 18341-7.
- Kobashi, C., et al., Adiponectin inhibits endothelial synthesis of interleukin-8. Circ Res, 2005. 97(12): p. 1245-52.
- 79. Tian, L., et al., *Adiponectin reduces lipid accumulation in macrophage foam cells.* Atherosclerosis, 2008.

- 80. Okamoto, Y., et al., *Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein Edeficient mice.* Circulation, 2002. **106**(22): p. 2767-70.
- 81. Kelesidis, I., T. Kelesidis, and C.S. Mantzoros, *Adiponectin and cancer: a systematic review.* Br J Cancer, 2006. **94**(9): p. 1221-5.
- 82. Yokota, T., et al., Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. Blood, 2000. **96**(5): p. 1723-32.
- Yamauchi, T., et al., Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. Nat Med, 2002. 8(11): p. 1288-95.
- 84. Kelly, M., et al., *AMPK activity is diminished in tissues of IL-6 knockout mice: the effect of exercise.* Biochem Biophys Res Commun, 2004. **320**(2): p. 449-54.
- 85. Wulster-Radcliffe, M.C., et al., *Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages.* Biochem Biophys Res Commun, 2004. **316**(3): p. 924-9.
- 86. Yamaguchi, N., et al., *Adiponectin inhibits Toll-like receptor family-induced signaling.* FEBS Lett, 2005. **579**(30): p. 6821-6.
- 87. Huang, H., et al., *Mechanisms for the anti-inflammatory effects of adiponectin in macrophages.* J Gastroenterol Hepatol, 2008. **23 Suppl 1**: p. S50-3.
- 88. Tsatsanis, C., et al., *Peripheral factors in the metabolic syndrome: the pivotal role of adiponectin.* Ann N Y Acad Sci, 2006. **1083**: p. 185-95.
- 89. Fayad, R., et al., *Adiponectin deficiency protects mice from chemically induced colonic inflammation.* Gastroenterology, 2007. **132**(2): p. 601-14.
- 90. Nishihara, T., et al., *Effect of adiponectin on murine colitis induced by dextran sulfate sodium.* Gastroenterology, 2006. **131**(3): p. 853-61.
- 91. Laaksonen, D.E., et al., *C-reactive protein and the development of the metabolic syndrome and diabetes in middle-aged men.* Diabetologia, 2004. 47(8): p. 1403-10.
- Matsubara, M., K. Namioka, and S. Katayose, Decreased plasma adiponectin concentrations in women with low-grade C-reactive protein elevation. Eur J Endocrinol, 2003. 148(6): p. 657-62.
- Matsushita, K., et al., Inverse association between adiponectin and C-reactive protein in substantially healthy Japanese men. Atherosclerosis, 2006. 188(1): p. 184-9.

- 94. Ouchi, N., et al., *Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue.* Circulation, 2003. **107**(5): p. 671-4.
- 95. Gabay, C. and I. Kushner, *Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation.* N Engl J Med, 1999. **340**(6): p. 448-54.
- 96. Danesh, J., et al., *C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease.* N Engl J Med, 2004.
 350(14): p. 1387-97.
- Bruun, J.M., et al., Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. 285(3): p. E527-33.
- 98. Fasshauer, M., et al., Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. Biochem Biophys Res Commun, 2003.
 301(4): p. 1045-50.
- 99. Ouchi, N. and K. Walsh, *Adiponectin as an anti-inflammatory factor.* Clin Chim Acta, 2007. **380**(1-2): p. 24-30.
- Fantuzzi, G., Adiponectin and inflammation: consensus and controversy. J Allergy Clin Immunol, 2008. 121(2): p. 326-30.
- 101. Behre, C.J., Adiponectin: saving the starved and the overfed. Med Hypotheses, 2007. 69(6): p. 1290-2.
- 102. Paul, G., et al., *Profiling adipocytokine secretion from creeping fat in Crohn's disease.* Inflamm Bowel Dis, 2006. **12**(6): p. 471-7.
- 103. Yamamoto, K., et al., *Production of adiponectin, an anti-inflammatory protein, in mesenteric adipose tissue in Crohn's disease.* Gut, 2005. **54**(6): p. 789-96.
- 104. Peyrin-Biroulet, L., et al., *Mesenteric fat in Crohn's disease: a pathogenetic hallmark or an innocent bystander?* Gut, 2007. **56**(4): p. 577-83.
- 105. Stange, E.F., et al., [Diagnostics and treatment of Crohn's disease -- results of an evidence-based consensus conference of the German Society for Digestive and Metabolic Diseases]. Z Gastroenterol, 2003. 41(1): p. 19-20.
- 106. Podolsky, D.K., *Inflammatory bowel disease*. N Engl J Med, 2002. **347**(6): p. 417-29.
- 107. Xavier, R.J. and D.K. Podolsky, *Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease.* Nature, 2007. **448**(7152): p. 427-34.
- 108. Elliott, D.E., R.W. Summers, and J.V. Weinstock, *Helminths and the modulation of mucosal inflammation.* Curr Opin Gastroenterol, 2005. **21**(1): p. 51-8.

- 109. Kruis, W., *Review article: antibiotics and probiotics in inflammatory bowel disease.* Aliment Pharmacol Ther, 2004. **20 Suppl 4**: p. 75-8.
- Razack, R. and D.L. Seidner, *Nutrition in inflammatory bowel disease*. Curr Opin Gastroenterol, 2007. 23(4): p. 400-5.
- 111. Lakatos, P.L., T. Szamosi, and L. Lakatos, *Smoking in inflammatory bowel diseases: good, bad or ugly?* World J Gastroenterol, 2007. **13**(46): p. 6134-9.
- Gassler, N., et al., Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. 281(1): p. G216-28.
- 113. Kabashima, K., et al., *The prostaglandin receptor EP4 suppresses colitis, mucosal damage and CD4 cell activation in the gut.* J Clin Invest, 2002. **109**(7): p. 883-93.
- 114. Cadwell, K., et al., A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. Nature, 2008. **456**(7219): p. 259-63.
- Bonen, D.K. and J.H. Cho, *The genetics of inflammatory bowel disease.* Gastroenterology, 2003. **124**(2): p. 521-36.
- 116. Mannon, P.J., et al., Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. N Engl J Med, 2004. 351(20): p. 2069-79.
- 117. Abraham, C. and J. Cho, *Interleukin-23/Th17 pathways and inflammatory bowel disease.* Inflamm Bowel Dis, 2009.
- 118. Karmiris, K., I.E. Koutroubakis, and E.A. Kouroumalis, Leptin, adiponectin, resistin, and ghrelin - Implications for inflammatory bowel disease. Mol Nutr Food Res, 2008.
- 119. Sheehan, A.L., et al., *Fat-wrapping in Crohn's disease: pathological basis and relevance to surgical practice.* Br J Surg, 1992. **79**(9): p. 955-8.
- Matarese, G., S. Moschos, and C.S. Mantzoros, *Leptin in immunology.* J Immunol, 2005. **174**(6): p. 3137-42.
- 121. Nancey, S., et al., *CD8+ cytotoxic T cells induce relapsing colitis in normal mice.* Gastroenterology, 2006. **131**(2): p. 485-96.
- 122. Blankson, J.N. and S.S. Morse, The CD28/B7 pathway costimulates the response of primary murine T cells to superantigens as well as to conventional antigens. Cell Immunol, 1994. 157(1): p. 306-12.
- Cameron, S.B., et al., *T helper cell polarisation as a measure of the maturation of the immune response.* Mediators Inflamm, 2003. **12**(5): p. 285-92.

- 124. Lexberg, M.H., et al., *Th memory for interleukin-17 expression is stable in vivo.* Eur J Immunol, 2008. **38**(10): p. 2654-64.
- 125. Sondak, V.K., et al., *Clinical correlations with chemosensitivities measured in a rapid thymidine incorporation assay.* Cancer Res, 1984. **44**(4): p. 1725-8.
- 126. Foster, B., et al., *Detection of intracellular cytokines by flow cytometry*. CurrProtoc Immunol, 2007. Chapter 6: p. Unit 6 24.
- 127. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.* Science, 1988. **239**(4839): p. 487-91.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.* 1979. Biotechnology, 1992. 24: p. 145-9.
- 129. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
- 130. Leenen, P.J., et al., *Markers of mouse macrophage development detected by monoclonal antibodies.* J Immunol Methods, 1994. **174**(1-2): p. 5-19.
- 131. Azuma, M., et al., *B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28.* Nature, 1993. 366(6450): p. 76-9.
- Faggioni, R., et al., Leptin deficiency enhances sensitivity to endotoxin-induced lethality. Am J Physiol, 1999. 276(1 Pt 2): p. R136-42.
- 133. Lee, F.Y., et al., *Phenotypic abnormalities in macrophages from leptin-deficient,* obese mice. Am J Physiol, 1999. **276**(2 Pt 1): p. C386-94.
- Albanesi, C., et al., *Keratinocytes in inflammatory skin diseases.* Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2005. 4(3): p. 329-34.
- Cohen, E.S. and H.C. Bodmer, *Cytotoxic T lymphocytes recognize and lyse chondrocytes under inflammatory, but not non-inflammatory conditions.* Immunology, 2003. **109**(1): p. 8-14.
- 136. Viville, S., et al., *Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain.* Cell, 1993. **72**(4): p. 635-48.
- Kishimoto, T., S. Akira, and T. Taga, Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. Science, 1992. 258(5082): p. 593-7.
- 138. Baumann, H. and J. Gauldie, *The acute phase response.* Immunol Today, 1994.**15**(2): p. 74-80.
- 139. Xing, Z., et al., *IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses.* J Clin Invest, 1998. **101**(2): p. 311-20.

- 140. Tilg, H., C.A. Dinarello, and J.W. Mier, *IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators.* Immunol Today, 1997. **18**(9): p. 428-32.
- 141. Schraw, T., et al., *Plasma adiponectin complexes have distinct biochemical characteristics.* Endocrinology, 2008. **149**(5): p. 2270-82.
- 142. Waki, H., et al., Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. J Biol Chem, 2003. 278(41): p. 40352-63.
- 143. Pajvani, U.B., et al., Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. J Biol Chem, 2004. 279(13): p. 12152-62.
- 144. Hara, K., et al., Measurement of the high-molecular weight form of adiponectin in plasma is useful for the prediction of insulin resistance and metabolic syndrome. Diabetes Care, 2006. 29(6): p. 1357-62.
- 145. Hu, X.B., et al., Cloning and expression of adiponectin and its globular domain, and measurement of the biological activity in vivo. Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai), 2003. 35(11): p. 1023-8.
- 146. Kharroubi, I., et al., *Expression of adiponectin receptors in pancreatic beta cells.*Biochem Biophys Res Commun, 2003. **312**(4): p. 1118-22.
- Bluher, M., et al., Regulation of adiponectin receptor R1 and R2 gene expression in adipocytes of C57BL/6 mice. Biochem Biophys Res Commun, 2005. 329(3): p. 1127-32.
- 148. Pang, T.T. and P. Narendran, *The distribution of adiponectin receptors on human peripheral blood mononuclear cells.* Ann N Y Acad Sci, 2008. **1150**: p. 143-5.
- 149. Yamauchi, T., et al., Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. Nat Med, 2007. 13(3): p. 332-9.
- 150. Rogers, C.Q., J.M. Ajmo, and M. You, *Adiponectin and alcoholic fatty liver disease.* IUBMB Life, 2008. **60**(12): p. 790-7.
- 151. Sun, X., et al., Negative regulation of adiponectin receptor 1 promoter by insulin via a repressive nuclear inhibitory protein element. FEBS Lett, 2008. 582(23-24): p. 3401-7.
- 152. Lord, G.M., et al., *Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression*. Nature, 1998. **394**(6696): p. 897-901.

- 153. Weil, R. and A. Israel, *Deciphering the pathway from the TCR to NF-kappaB.* Cell Death Differ, 2006. **13**(5): p. 826-33.
- 154. Yang, J., et al., *IL-18-stimulated GADD45 beta required in cytokine-induced, but not TCR-induced, IFN-gamma production.* Nat Immunol, 2001. **2**(2): p. 157-64.
- 155. Sica, A., et al., Interaction of NF-kappaB and NFAT with the interferon-gamma promoter. J Biol Chem, 1997. **272**(48): p. 30412-20.
- 156. Hilliard, B., et al., Experimental autoimmune encephalomyelitis in NF-kappa Bdeficient mice:roles of NF-kappa B in the activation and differentiation of autoreactive T cells. J Immunol, 1999. 163(5): p. 2937-43.

7 Danksagung

Bei Frau PD Dr. Siegmund möchte ich mich für die Überlassung des Themas, für die Aufnahme in eine Arbeitsgruppe, die durch eine sehr gute Arbeitsatmosphäre und eine große Hilfsbereitschaft gekennzeichnet ist, sowie für das unermüdliche Feedback beim Verfassen der Arbeit bedanken.

Für das geduldige Beantworten unzähliger Fragen, die Anleitung zu Experimenten sowie die kritische Diskussion von Ergebnissen und Ideen geht mein Dank an meinen Betreuer Dr. Arvind Batra.

Bei Dr. Rainer Glauben, Dr. Thorsten Stroh und Inka Fedke möchte ich mich für die stete Hilfe bei der Lösung von Problemen des Laboralltags bedanken.

Für die sehr konstruktive Kritik beim Verfassen der Arbeit danke ich Dr. Ulrike Erben.

Mein besonderer Dank geht an meine Familie, die mich immer unterstützt hat.

8 Lebenslauf

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

9 Veröffentlichungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in Teilen auf folgendem Kongress vorgestellt und als *Abstract* veröffentlich worden:

Ihbe J, Batra A, Glauben R, Stroh T, Fedke I, Zeitz M, Siegmund B

Adipocytes and preadipocytes – phagocytes within mesenteric fat?

II Falk Gastro Konferenz, Dresden, 9. – 10. Oktober 2007

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen in folgender internationaler Fachzeitschrift veröffentlicht:

Batra A, Okur B, Glauben R, Erben U, **Ihbe J**, Stroh T, Fedke I, Chang HD, Zeitz M, Siegmund B

Leptin: A Critical Regulator of CD4+ T-cell Polarization in Vitro and in Vivo.

Endocrinology 2010 Januar; 151 (1): 56-62

10 Selbstständigkeitserklärung

"Ich, Jakob Ihbe, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Regulation der CD4⁺ T-Zell-Antwort durch Adipokine: Am Beispiel von Leptin und Adiponektin" 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."

Datum

Unterschrift