

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Rheumatologie und Infektiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die Polarisierung von naiven T-Helferzellen
unter Einfluss von Leptin**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Besir Okur

aus Berlin

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. Britta Siegmund
 2. Priv.-Doz. Dr. med. C. Maaser
 3. Priv.-Doz. Dr. med. J. Wehkamp

Datum der Promotion: 03.06.2012

1 Verzeichnisse

1.1 Inhaltsverzeichnis

1	Verzeichnisse	I
1.1	Inhaltsverzeichnis	I
1.2	Tabellenverzeichnis	V
1.3	Abbildungsverzeichnis	VI
1.4	Abkürzungen	VII
2	Einleitung und Fragestellung	1
2.1	Leptin.....	1
2.1.1	Leptin als Peptidhormon.....	3
2.1.2	Der Leptinrezeptor.....	4
2.1.3	Die Wirkung von Leptin	6
2.1.4	Leptindefizienz	8
2.2	T-Helferzellen	9
2.3	Interaktion von Leptin mit dem Immunsystem	13
2.4	Fragestellung.....	17
3	Material und Methoden.....	18
3.1	Geräte und Verbrauchsmaterial.....	18
3.2	Substanzen.....	19
3.2.1	Chemikalien.....	19
3.2.2	Zellkulturmedien	21
3.2.3	Puffer.....	22
3.2.4	Antikörper	23
3.2.5	Zytokine.....	25

Verzeichnis

3.2.6	Primer.....	25
3.2.7	Spezielle Färbungen für die Durchflusszytometrie	25
3.3	Zellulär – immunologische Methoden.....	26
3.3.1	Versuchstiere.....	26
3.3.2	Zellisolation	27
3.3.3	In vitro Zellkultur.....	28
3.3.4	Zellseparation.....	29
3.3.5	Zellseparation naiver T-Lymphozyten.....	29
3.3.6	Isolierung von antigenpräsentierenden Zellen.....	32
3.3.7	Antigenunspezifische Stimulation.....	33
3.3.8	Antigenspezifische Stimulation.....	33
3.3.9	Polarisierung	34
3.3.10	Bestimmung der Zellproliferation mittels CFSE	34
3.3.11	Bestimmung der Apoptoserate anhand von Annexin V.....	35
3.3.12	Intrazelluläre Zytokinmarkierung.....	35
3.3.13	Durchflusszytometrische Auswertung.....	36
3.4	Molekularbiologische Methoden	38
3.4.1	RNA-Isolation	38
3.4.2	Reverse Transkription	38
3.4.3	Polymerase-Kettenreaktion	40
3.4.4	Gelelektrophorese	41
3.5	Statistik.....	42
4	Ergebnisse	43
4.1	Nachweis des OB-R _b mittels PCR.....	43
4.2	Zellseparation mittels MACS	44
4.3	Antigenunspezifische Stimulation	46
4.3.1	Einfluss von Leptin auf unpolarisierte T-Lymphozyten.....	46
4.3.2	Einfluss von Leptin auf die Th1–Polarisierung.....	47
4.3.3	Einfluss von Leptin auf die Th2–Polarisierung.....	48

Verzeichnis

4.3.4	Einfluss von Leptin auf die Th2-Polarisierung nach Restimulation	49
4.4	Stimulation von ob/ob Lymphozyten	50
4.4.1	Einfluss von Leptin auf die Th1-Polarisierung von ob/ob Zellen	50
4.4.2	Einfluss von Leptin auf die Th2-Polarisierung von ob/ob Zellen	52
4.5	Zellproliferation	53
4.6	Apoptose	55
4.6.1	Einfluss von Leptin unter antigenunspezifischer Stimulation	55
4.6.2	Einfluss von Leptin bei Th1-Polarisierung	56
4.6.3	Einfluss von Leptin bei Th2-Polarisierung	57
4.7	Antigenspezifische Stimulation	58
4.7.1	Einfluss von Leptin auf die Th1-Polarisierung	58
4.7.2	Einfluss von Leptin auf die Th1-Polarisierung nach Restimulation	59
4.7.3	Einfluss von Leptin auf die Th2-Polarisierung	60
5	Diskussion	62
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	62
5.2	Bewertung der Ergebnisse im Vergleich zur Literatur	63
5.2.1	Nachweis des Leptinrezeptors	63
5.2.2	Polarisierung naiver T-Helferzellen unter Einfluss von Leptin unter antigenunspezifischer Stimulation	63
5.2.3	Proliferation	65
5.2.4	Apoptoserate	65
5.2.5	Polarisierung naiver T-Helferzellen unter Einfluss von Leptin unter antigenspezifischer Stimulation	66
5.3	Klinische Relevanz	68
6	Zusammenfassung	70
7	Literatur	72

Verzeichnis

8	Danksagung	78
9	Lebenslauf.....	79
10	Veröffentlichungen	81
11	Selbstständigkeitserklärung	82

1.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Antikörper zur Zellseparation	23
Tabelle 2 Verwendete Antikörper zur Zellcharakterisierung	23
Tabelle 3 Verwendete Antikörper zur intrazellulären Zytokinfärbung.....	24
Tabelle 4 Antikörper zur Zellstimulation sowie Zellpolarisierung	24
Tabelle 5 Übersicht der verwendeten PCR-Primer.....	25
Tabelle 6 Spezialfärbungen für die Durchflusszytometrie.....	25
Tabelle 7 Darstellung der Emissionsmaxima einzelner Fluoreszenzfarbstoffe der Durchflusszytometrie.....	37
Tabelle 8 Reverse Transkription 1	39
Tabelle 9 Reverse Transkription 2.....	39
Tabelle 10 Ansatz für die PCR	41

1.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Signaltransduktion des Leptinrezeptors Ob-R _b	5
Abbildung 2 Schematische Darstellung der Regulation der Nahrungsaufnahme durch Leptin.....	7
Abbildung 3 Polarisierung naiver T-Helferzellen	12
Abbildung 4 Schematische Darstellung einer Positivselektion durch MACS.....	31
Abbildung 5 Gelelektrophorese.....	43
Abbildung 6 Exemplarische Darstellung einer Zellseparation von CD4 ⁺ CD62L ⁺ naiven T-Helfer-Zellen.....	44
Abbildung 7 Darstellung der Reinheit naiver T-Helferzellen nach MACS im Boxplot. ...	45
Abbildung 8 Tendenz zur Th1-Polarisierung naiver T-Zellen unter antigenunspezifischen Bedingungen	46
Abbildung 9 Vermehrte IFN- γ Produktion unter Einfluss von Leptin	47
Abbildung 10 Inhibition der IL-4 Produktion durch Wirkung von Leptin.....	48
Abbildung 11 Einfluss von Leptin auf die IL-4 Produktion nach mehrmaliger antigenunspezifischer Stimulation	49
Abbildung 17 Einfluss von Leptin auf <i>ob/ob</i> Th1-Lymphozyten.....	51
Abbildung 18 Einfluss von Leptin auf die Th2 Polarisierung von <i>ob/ob</i> - Zellen.....	52
Abbildung 15 Histogrammatische Darstellung der Zellproliferation anhand von intrazellulärer CFSE-Färbung	53
Abbildung 16 Konzentrationsabhängiger Anstieg der Proliferation von naiven T-Lymphozyten durch Leptin.....	54
Abbildung 12 Apoptoserate unter antigenunspezifischer Stimulation.....	55
Abbildung 13 Konzentrationsabhängige Verringerung der Apoptoserate unter Th1-polarisierenden Bedingungen	56
Abbildung 14 Apoptoserate unter Th2 Polarisierung.....	57
Abbildung 19 Einfluss von Leptin auf die antigenspezifische Stimulation unter Th1 Polarisierung	58
Abbildung 20 Restimulation von APZ und T-Helferzellen.....	59
Abbildung 21 Effekt von Leptin auf die Polarisierung von DO11.10 T-Helferzellen bei Restimulation.....	61

1.4 Abkürzungen

α -...	Präfix der Antikörpernomenklatur zur Bezeichnung der Zielantigenes
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
BMI	<i>Body-Mass-Index</i>
BSA	Rinderserumalbumin, <i>Bovine serum albumin</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFDA-SE	5-(6)-Carboxyfluoreszein Diacetat Succinimidyl Ester
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRH	<i>Corticotropin-releasing Hormon</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
db	<i>Diabetes</i>
<i>db/db</i>	Homozygote Leptinrezeptordefizienz
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DRFZ	Deutsches Rheumaforschungszentrum
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSS	Dextran Natriumsulfat
EDTA	Ethyl diamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunoabsorbant assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>

Abkürzungen

FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FCS	Fetales Kälberserum
FSC	<i>Forward scatter</i>
Foxp3	<i>Forkhead box protein 3</i>
<i>g</i>	Zentripetalbeschleunigung der Erde
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-3-Dehydrogenase
G-CSF	Granulozyten stimulierender Faktor
h	Stunde
hGH	Humanes Wachstumshormon
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure)
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
Ig	Immunglobulin
IFN- γ	Interferon Gamma
IL	Interleukin
Jak	Janus-Tyrosinkinase
k.A.	Keine Angaben
LIF	Leukämie-inhibierender Faktor
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>Magnet-assisted cell separation</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
min	Minute
M-MLV	<i>Moloney-Murine Leukemia Virus</i>
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MSH	Melanozytenstimulierendes Hormon
n	Anzahl
NKT-Zellen	Natürliche Killer T-Zellen
NPY	Neuropeptid Y

Abkürzungen

ob	<i>Obese</i>
<i>ob/ob</i>	Homozygote Leptindefizienz
p	Statistische Wahrscheinlichkeitskonstante
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion, <i>Polymerase chain reaction</i>
POMC	Proopiomelanocortin
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumjodid
PHA	Phytohämagglutinin
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RNAse	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
ROR- γ T	<i>RAR related orphan nuclear receptor γT</i>
RT	Reverse Transkriptase
SEM	<i>Standard error of mean</i>
SSC	<i>Sideward scatter</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure
Th1/2	T-Helferzelle, Subtyp 1/2
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
TNBS	Trinitrobenzensulfonsäure
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
UV	Ultraviolett

2 Einleitung und Fragestellung

2.1 Leptin

1949 wurde in den Jackson Memorial Laboratorien (Bar Harbor, Maine, USA) erstmalig in einer Mauszucht ein adipöser Phänotyp als Spontanmutation beschrieben. Man beobachtete, dass junge Mäuse im Alter von 6 bis 8 Lebenswochen bei unveränderten Umwelteinflüssen eine exzessive Adipositas durch Hyperalimentation entwickelten. Dieser Zustand war bei Mäusen bis dahin eine Rarität gewesen.

Mit drei Lebensmonaten erreichten diese adipösen Mäuse das Dreifache von dem Gewicht der nicht adipösen Wurfgeschwister. Genetische Untersuchungen ergaben in den folgenden Jahren, dass diese Spontanmutation einem rezessiven Erbgang unterlag. Das verantwortliche Gen, das für das Übergewicht postuliert wurde, erhielt die Bezeichnung „*ob*“ (für engl. „obese“ = adipös).

Die mutierte Mauszucht erweckte Interesse für weitere Untersuchungen und es ergaben sich erste Hinweise dafür, dass die angeborene Neigung zur Fettleibigkeit bei Weitem nicht die einzige Besonderheit dieser Mäuse war. So zeigte sich beispielsweise, dass die betroffenen Mäuse steril waren.³

Lange Zeit blieb jedoch unklar, auf welchem Mechanismus die Entwicklung des *ob*-Phänotyps beruhte, bis *Hausberger* und Kollegen in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts erste Erkenntnisse darauf schlossen, dass diese bestimmte Form der Adipositas, nicht wie bis dahin vermutet, auf einer fehlerhaften Anlage des Fettgewebes basieren konnte.

Die von ihnen durchgeführten Parabiose- sowie Transplantationsuntersuchungen von subkutanem Gewebe hereditär adipöser Mäuse erlaubten zusammenfassend die Schlussfolgerung, dass die Hypertrophie des Fettgewebes allein auf endokrinen Einflüssen basierte. Als verantwortliches Hormon wurde damals allerdings das endogene Pankreashormon, Insulin, diskutiert.⁴

Bis in die 80er Jahre konnten zwei adipöse Mausphänotypen differenziert werden, die zwar einen sehr ähnlichen Phänotyp aufwiesen, deren Mutationen allerdings unterschiedlichen Chromosomen zugeordnet werden konnten: *ob* als Mutation in Chromo-

Einleitung

som 6 und *db* (von engl. „diabetes“) in Chromosom 4. Beiden gemeinsam war eine ausgeprägte Adipositas durch Hyperphagie einhergehend mit pankreatischer Inselzellhyperplasie und mildem Diabetes mellitus bei Hyperinsulinämie.⁵

Im weiteren Verlauf deckten Parabioseversuche unterschiedliche zu Grunde liegende Mechanismen der Entstehung auf: *db/db* Mäuse produzierten demnach einen Faktor für ein Sättigungsgefühl, konnten aber nicht adäquat auf diesen reagieren, da der nötige Rezeptor nicht vorhanden oder nicht funktionell aktiv wäre. Diese Mutanten wären somit vor einem Übermaß an Nahrungsaufnahme nicht geschützt.

Den *ob* defizienten Mäusen fehlte wiederum dieser Sättigungsfaktor bei jedoch vorhandenem Rezeptor; sie waren dafür in der Lage auf selbigen Faktor aus Wildtypmäusen zu reagieren. Die Folge der künstlichen Substitution dieses Faktors war Gewichtsverlust durch verminderte Nahrungsaufnahme mit konsekutiver Abnahme der Blutinsulinkonzentration. Als primär durch Mutation betroffenes Gewebe der *ob/ob* Maus wurde der Hypothalamus sowie der Adipozyt selbst verdächtigt.^{5 6}

Das Genprodukt des *ob*-Genes konnte erstmals 1994 von *Zhang et al.*⁷ kloniert werden. Nachfolgend wurde erkannt, dass das Produkt des *ob* – Genes, Leptin, als zirkulierender Faktor aus dem Fettgewebe essenziell für die Regulation der Nahrungsaufnahme durch neuroendokrine Sättigungsregulation ist.

2.1.1 Leptin als Peptidhormon

Die Bezeichnung des Transkriptionsproduktes des *ob*-Gens, „Leptin“, ist in Anlehnung an das griechische „leptos“ („dünn“) gewählt worden, um den eindrucksvollen antiadipösen Effekt auf die Regulation der Nahrungsaufnahme zu unterstreichen, nachdem festgestellt wurde, dass seine Applikation bei schon bekannt adipösen Mausstämmen mit *ob/ob* Mutation zur Gewichtsabnahme führt.⁸

Hauptbildungsort ist das weiße Fettgewebe, aber auch andere Gewebe konnten als Bildungsort für Leptin identifiziert werden, so zum Beispiel Magenepithel, Plazenta, Knochenmark und Skelettmuskel. In einzelnen Gehirnarealen kann ebenfalls Leptin mRNA nachgewiesen werden.⁹

Leptin ist ein Proteinhormon mit einer Masse von 16 kDa, welches nach Translation keiner weiteren Modifikation ausgesetzt ist. Es wird aus zwei antiparallelen Alphahelixpaaren gebildet, verbunden durch je eine lange Proteinschleife. Die Anordnung der intrahelikalen Winkel und Verbindungsschleifen verleihen dem Leptin trotz fehlender Sequenzhomologie große Gemeinsamkeiten mit anderen langkettigen Zytokinen mit Helixstruktur, z.B. mit dem Leukämie inhibierenden Faktor (LIF), dem humanen Wachstumshormon (hGH) sowie dem Granulozyten stimulierenden Faktor (G-CSF).¹⁰

Die messbaren Serumkonzentrationen verhalten sich im normalen Ernährungszustand proportional zur Gesamtkörperfettmasse und fallen zu Beginn von Fastenperioden unproportional stark ab. Dies dient vermutlich der Adaptation des Gehirns und des restlichen Systems an den neuen Ernährungszustand. Unabhängig vom Körperfettanteil finden sich bei Frauen höhere Serumkonzentrationen als bei Männern mit vergleichbarem Body-Mass-Index (BMI).

Ungefähr 20% bis 50% des Leptins werden proteingebunden transportiert und sind vermutlich nicht an der endokrinen Signalvermittlung beteiligt. Bei Mäusen lassen sich tageszeitliche Schwankungen der Serumkonzentration nachweisen. Die höchste Serumkonzentration findet sich im Nachtzyklus um 4.00 Uhr. Sie ist dann stetig sinkend bis der niedrigste Wert abends um 20.00 Uhr erreicht wird. Diese periodischen Schwankungen stehen somit im antizyklischen Verhältnis zur Kortisonsekretion.^{6 11}

Einleitung

Zusammenfassend betrachtet wurde noch bis zum Ende des zwanzigsten Jahrhunderts als physiologische Wirkung des Leptins hauptsächlich die Regulation der Nahrungsaufnahme durch Appetithemmung und die Kontrolle des Energiehaushaltes angesehen.^{9,12}

2.1.2 Der Leptinrezeptor

Die Wirkung von Leptin wird über einen transmembranären Rezeptor vermittelt. Er ist das Produkt des *db*-Gens auf dem Chromosom 4. Er weist Verwandtschaft mit der Klasse I der Zytokinrezeptor-Familie auf, die unter anderem die Rezeptoren der Interleukine (IL) -2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, LIF, G-CSF, hGH, Prolactin und Erythropoietin beinhaltet.^{9 13 14}

Wie bei anderen Rezeptoren, z. B. Katecholaminrezeptoren, existieren auch hier verschiedene Isoformen des Leptinrezeptors. Sie entstehen durch alternatives Splicing der transkribierten mRNA. Allen Isoformen gemeinsam ist dieselbe extrazelluläre Domäne, sie unterscheiden sich einzig in der Länge des intrazellulären Anteils.¹⁵

Die verbreitetste Form ist der OB-R_a, welcher ubiquitär exprimiert wird und sich u. a. in Lunge, Leber, Milz, Niere und Makrophagen, aber vor allem im Plexus choroideus nachweisen lässt. OB-R_a gehört zusammen mit OB-R_c und OB-R_d zu den kurzen Isoformen mit verkürztem zytoplasmatischen Anteil. Die beiden letzteren lassen sich nur durch Polymerasekettenreaktion (PCR) nachweisen.^{1 16} Dem OB-R_e fehlen gänzlich transmembranäre und zytoplasmatische Anteile. Dieser wird am ehesten als löslicher Rezeptor betrachtet. Er konnte beim Menschen bisher nicht nachgewiesen werden. Wahrscheinlich liegt seine Funktion weniger in der Signaltransduktion als in der Internalisierung, dem intrazellulären Transport oder der intrazellulären Degradierung von Leptin.^{14 15} Die bisher aufgezählten Isotypen sind nach heutigem Forschungsstand nicht an der Signaltransduktion beteiligt. OB-R_b ist die nicht nur die längste, sondern gilt auch als einzige Isoform für die eine eindeutige Signaltransduktion nachgewiesen werden konnte.¹⁷ Der Rezeptor konnte bereits auf vielen Zellpopulationen nachgewiesen werden: Endothelzellen, CD34⁺ Stammzellen, Milzparenchym, Nierengewebe, Lungengewebe sowie in Neuronen der Hypophyse.¹⁸⁻²¹ Aufgrund der bereits beschriebenen Strukturhomologie der Leptinrezeptoren zu anderen Zytokinrezeptoren erlangt dieser Isotyp eine Sonderstellung, da dieser eine Sequenzhomologie mit den Glycoprotein gp130

Einleitung

Untereinheiten des IL-6 Rezeptors besitzt.¹³ Der Leptinrezeptor neigt zur Bildung von Homodimeren. Leptinbindung bewirkt in einem weiteren Schritt die Entstehung eines Tetrameres aus je zwei Rezeptoren und Leptinmolekülen.²² Die Signaltransduktion beginnt mit Konformationsänderungen im Rezeptor und es folgt die Phosphorylierung und Bindung von Janus-Tyrosinkinasen (Jak) und die Phosphorylierung von Rezeptordomänen (siehe Abbildung 1 - I.). Der Rezeptor bietet nun Bindungsstellen für STAT-(signal transducer and activator of transcription) Proteine. Vor allem werden abhängig vom Gewebetyp STAT-1, -3, -5 und -6 aktiviert, welche wiederum von Jak phosphoryliert werden (Abbildung 1 - II.).¹⁷ Es folgt eine STAT - Dimerenbildung. Diese Dimere translozieren in den Zellkern und dienen als Transkriptionsfaktoren (Abbildung 1, - III).¹⁴ Vom schematisch beschriebenen Jak/STAT Transduktionsweg wird angenommen, dass er am weitesten häufigsten erfolgt. Bei *in vivo* sowie *in vitro* Versuchen konnten im Hypothalamus sowie Fettgewebe auch alternative Transduktionswege nachgewiesen werden.⁹

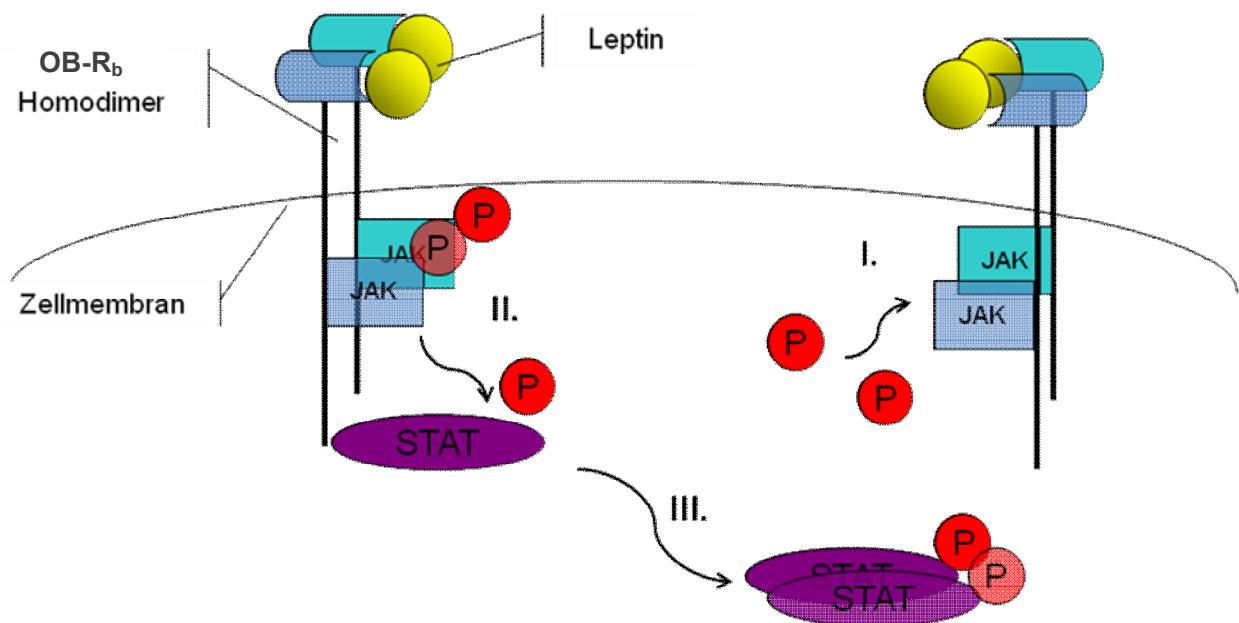


Abbildung 1 Signaltransduktion des Leptinrezeptors Ob-R_b

2.1.3 Die Wirkung von Leptin

Leptin dient einerseits der Aufrechterhaltung der Gesamtkörperfettmasse und andererseits zur Einstellung des Körpers auf Fastenperioden. Es scheint in der Energiehomöostase somit zusätzlich zum Wegfall von Insulin und dem parallelen Anstieg von Insulinantagonisten eine bedeutende Rolle zu spielen. Bei Zunahme der Fettmasse steigt auch die Sekretion von Leptin in das Blut aus den Adipozyten proportional an. Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen dem Triglyceridgehalt und der Serumkonzentration von Leptin. Aber auch die Wirkung von Insulin, Glukokortikoiden sowie verschiedene Zytokine bewirken eine vermehrte Bildung von Leptin.^{9,11} Der Wirkort von Leptin auf die Nahrungsregulation ist der Hypothalamus, wo sich vor allem im ventromedialen, arcuaten, dorsomedialen und lateralem Nucleus eine besonders dichte OB-R_b Rezeptorexpression nachweisen lässt.¹³ Wahrscheinlich wird die Blut-Hirnschranke über einen Transporter überwunden, bei dem OB-R_a eine maßgebliche Rolle spielt. Diskutiert werden auch Wege über den Liquor, da sich in seinem Produktionsort, dem Plexus choroideus, Rezeptoren nachweisen lassen. Direkte Diffusion über das gefensterte Kapillarendothel, das in den zirkumventrikulären Organen des Hypothalamus vorliegt, ist ebenfalls denkbar.¹¹ Leptinbindung an OB-R_b bewirkt die verminderte Produktion von Neuropeptidhormonen die zur Stimulation der Nahrungsaufnahme (orexigene Peptide) dienen, besonders Neuropeptid Y (NPY), dem potentesten Stimulator. Dies ist ein klassisches Beispiel der Regulation über negative Rückkopplung. Ferner wird Proopiomelanocortin (POMC), ein Vorläufer des α -melanozytenstimulierenden Hormons (MSH), im Hypothalamus direkt im Nucleus arcuatus durch Leptinwirkung vermehrt gebildet. MSH erhöht direkt den Energieverbrauch und ist ein potenter Appetithemmer (anorexigenes Protein).^{23 24} Leptin übt seine Wirkung auch im umliegenden Fettgewebe aus. Diese auto-und parakrinen Effekte zielen vermutlich darauf ab, überschüssige Energiereservoirs z. B. durch Lipolyse abzubauen. Das Resultat ist eine negative Energiebalance und gleichbedeutend mit einem höheren kalorischen Energieverbrauch. Die Elimination von Leptin erfolgt größtenteils über die Ausscheidung durch die Niere.^{25 11}

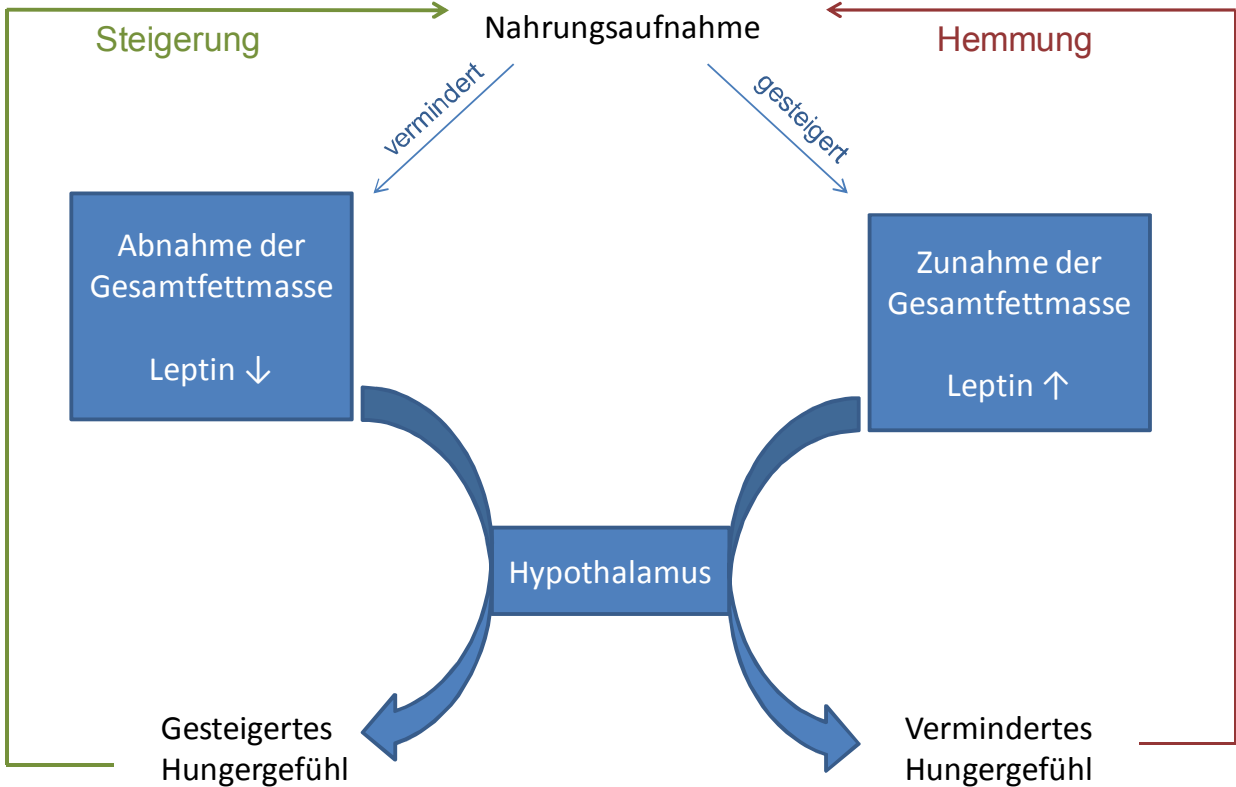


Abbildung 2 Schematische Darstellung der Regulation der Nahrungsaufnahme durch Leptin ^{1,2}

2.1.4 Leptindefizienz

Die Leptindefizienz, d. h. die mangelnde intrinsische Leptinwirkung, ist beim Menschen bisher nur äußerst selten beschrieben worden. Die beobachteten Fälle reduzieren sich auf einzelne Familien.²⁶ Untersuchungen zur Auswirkung der mangelnden Leptinwirkung konnten bisher umfangreich bei *ob/ob* oder *db/db* Mäusen durchgeführt werden, wobei sich verschiedenste Effekte feststellen ließen.

Der Pathomechanismus der Leptindefizienz lässt sich wie bereits angedeutet mit zwei grundsätzlich verschiedenen genetischen Mutationen erklären. *Zhang et al.* identifizierten 1994 u.a. bei der C57BL/6J *ob/ob* Mauszucht eine Nonsensemutation im Chromosom 6, die zu einer massiven Expression von fehlerhafter *ob* mRNA führte, der Leptindefizienz im engeren Sinne.⁷

Die Mutation des OB-R_b auf Chromosom 4 führt in der *db/db* Mauszucht ebenfalls zur frühen Adipositas und Diabetes. Hier verursacht ein Basenaustausch eine neue Splicevariante, die eine mRNA mit verfrühtem Stoppcodon zur Folge hat. Ein Rezeptor mit kurzer intrazellulärer und funktionsloser Domäne verhindert die Weiterleitung der Signaltransduktion nach der Leptinbindung.¹⁷

In beiden Fällen jedoch resultiert eine gänzlich fehlende Wirkung des Fettgewebehormons aus dem Organismus. Leptin- oder Rezeptordefiziente Mäusen zeigen Symptome wie sie nach langem Hungern auftreten: Hyperphagie, Infertilität, verminderte Körpertemperatur und Hyperkortisolismus. Gleichzeitig zeigt sich scheinbar widersprüchlich eine extreme Adipositas sowie Insulinresistenz wie beim Typ 2 Diabetes.^{5 7}

Ferner wird eine komplette anovulatorische Sterilität von weiblichen leptindefizienten Mäusen beobachtet, wohingegen bei männlichen Mäusen die Reproduktionsfähigkeit unter Diät nur vermindert ist.^{3 20} Intraperitoneale Injektion von Leptin kann die Unfruchtbarkeit wieder rückgängig machen. Als Ursache wurde ein hypogonadotroper Hypogonadismus eruiert.²⁶

Einflüsse auf die Hämatopoese wurden ebenfalls beschrieben.¹⁹ Leptinrezeptoren können in CD34⁺-Stammzellen sowie im hämatopoetischen Stroma nachgewiesen werden. Als Effekt auf Lymphopoese kann bei *db/db* Mäusen ein stark verminderter Anteil an peripheren B-Lymphozyten und CD4⁺-T-Zellen vorgefunden werden. Durch diese Beob-

Einleitung

bachtungen gewinnt das den Knochenmarkraum physiologischerweise ausfüllende Fettgewebe als potenzieller Ort der Leptinsekretion als Stimulator der Hämatopoese an großer Bedeutung.

Zusammenfassend beobachtet man bei Individuen mit Leptindefizienz durch fehlende Rückkopplung eine Art Fastenstatus. Die Nahrungsaufnahme wird vom Bedarf entkoppelt und steigt massiv an. Des Weiteren werden kurzzeitig entbehrliche Körperfunktionen, wie z. B. Fortpflanzung, Wundheilung sowie Immunfunktionen zur Energieeinsparung heruntergefahren.

2.2 T-Helferzellen

T-Lymphozyten spielen eine zentrale regulatorische Rolle im adaptiven Immunsystem. Ein Versagen ihres Einflusses auf Immunprozesse sowie ihre Defizienz hat fatale Folgen. Nach Infektion mit HIV (human immunodeficiency virus) im fortgeschrittenen AIDS-Stadium (acquired immunodeficiency syndrome) oder angeborener Thymusaplasie oder fehlender T-Zellkompetenz unter SCID-Syndromen (severe combined immunodeficiency) erliegt das Individuum meist Infektionen des opportunistischen Spektrums wie Candida, Cryptosporidien, Pneumocystis carinii oder dem Zytomegalievirus. Diese Erreger stellen typischerweise beim Immunkompetenten keine Gefahr dar.²⁷

Die Entwicklung naiver T-Lymphozyten beginnt im Thymus, dort findet die Selektion eines kompetenten Repertoires an T-Lymphozyten anhand ihres T-Zellrezeptors CD3 (Cluster of differentiation 3) statt. Den naiven T-Zellen werden über den MHC-Komplex (major histocompatibility complex) körpereigene Antigene präsentiert, wobei nur Lymphozyten, die nicht zu stark aber auch nicht zu schwach an körpereigene Antigene binden, überleben und aus dem Thymus in sekundär lymphatische Organe migrieren können. Die restlichen T-Lymphozyten erliegen der Überaktivierung bzw. der mangelnden Stimulation und folgender Apoptose. Dieses Prinzip bildet einen Grundpfeiler des Immunsystems zur Erkennung von „Selbst- und Nichtselbst“ und wird als zentrale Immuntoleranz bezeichnet.^{28 24}

Die peripheren T-Lymphozyten lassen sich anhand ihrer Oberflächenantigene in CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen einteilen. Naive CD4⁺ Zellen reagieren auf spezifische Antigene, die

Einleitung

vorher von professionellen, antigenpräsentierenden Zellen (APZ) phagozytiert und anschließend über MHC-Klasse-II Proteine präsentiert werden. Im Gegensatz dazu erkennen die zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen über MHC-Klasse-I Moleküle, die auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert werden, zytosolische Proteine, somit beispielsweise auch Fremdproteine die nach viraler Infektion einer Zelle gebildet werden.

Zur Differenzierung von naiven T-Lymphozyten zu Effektorzellen ist neben der Antigenpräsentation auch eine Kostimulation erforderlich. Das erste Signal der Zellaktivierung ist die Bildung eines Komplexes zwischen CD3, MHC II und dem Antigen mithilfe von CD4. Erst eine Kostimulation von dem B7-Protein der APZ mit CD28 der T-Helferzelle ermöglicht in einer Umgebung proinflammatorischer Zytokine den Beginn der klonalen Zellexpansion.^{29 2} Ohne zusätzliche Kostimulation verharrt das System im Zustand der peripheren Immuntoleranz in Anergie. Dies wird analog zum vorherigen Selektionsprozess als periphere Immuntoleranz bezeichnet.

Ab dem folgenden Zeitpunkt ist die weitere Entwicklung der Helferzellen streng vom umgebenden Zytokinmilieu abhängig und bestimmt die weitere Immunantwort. Dies ist der Vorgang der Polarisierung: Man unterscheidet klassischerweise eine IL-12 und IL-2 abhängige Polarisierung zu Th1-Zellen von der IL-4 bedingten Polarisierung zu Th2-Zellen. Diese Effektorzellpopulationen unterscheiden sich in per definitionem in ihrem sezerniertem Zytokinmuster.³⁰

Das zur Polarisierung von Th1-Zellen benötigte IL-12 stammt typischerweise aus aktivierten Makrophagen oder dendritischen Zellen, die in Kontakt mit Endotoxin oder intrazellulären Pathogenen (Mykobakterien, Listerien, Viren) gekommen sind. Eine Schlüsselrolle in der Polarisierung zu Th1 spielt der Transkriptionsfaktor T-bet, der durch IL-12 abhängige STAT-4 Mobilisierung in den Helferzellen aktiviert wird. T-bet kontrolliert nun die Produktion von Interferon- γ (IFN- γ) und bestimmt somit bei T-Zellen die Th1-Polarisierung. Th1-Lymphozyten aktivieren über IFN- γ Makrophagen und bewirken die Bildung von komplementbindenden und opsonisierenden Immunglobulinen (Ig) IgG2a und IgG3. Eine parallel stattfindende para- und autokrine IL-2 Sekretion unterstützt die Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen. Immunreaktionen die auf Th1 Polarisierung beruhen sind typischerweise bei intrazellulären Erregern wie Protozoen, vor allem Viren, aber auch bakteriellen Erregern zu beobachten. Ferner lassen sie sich häufig in

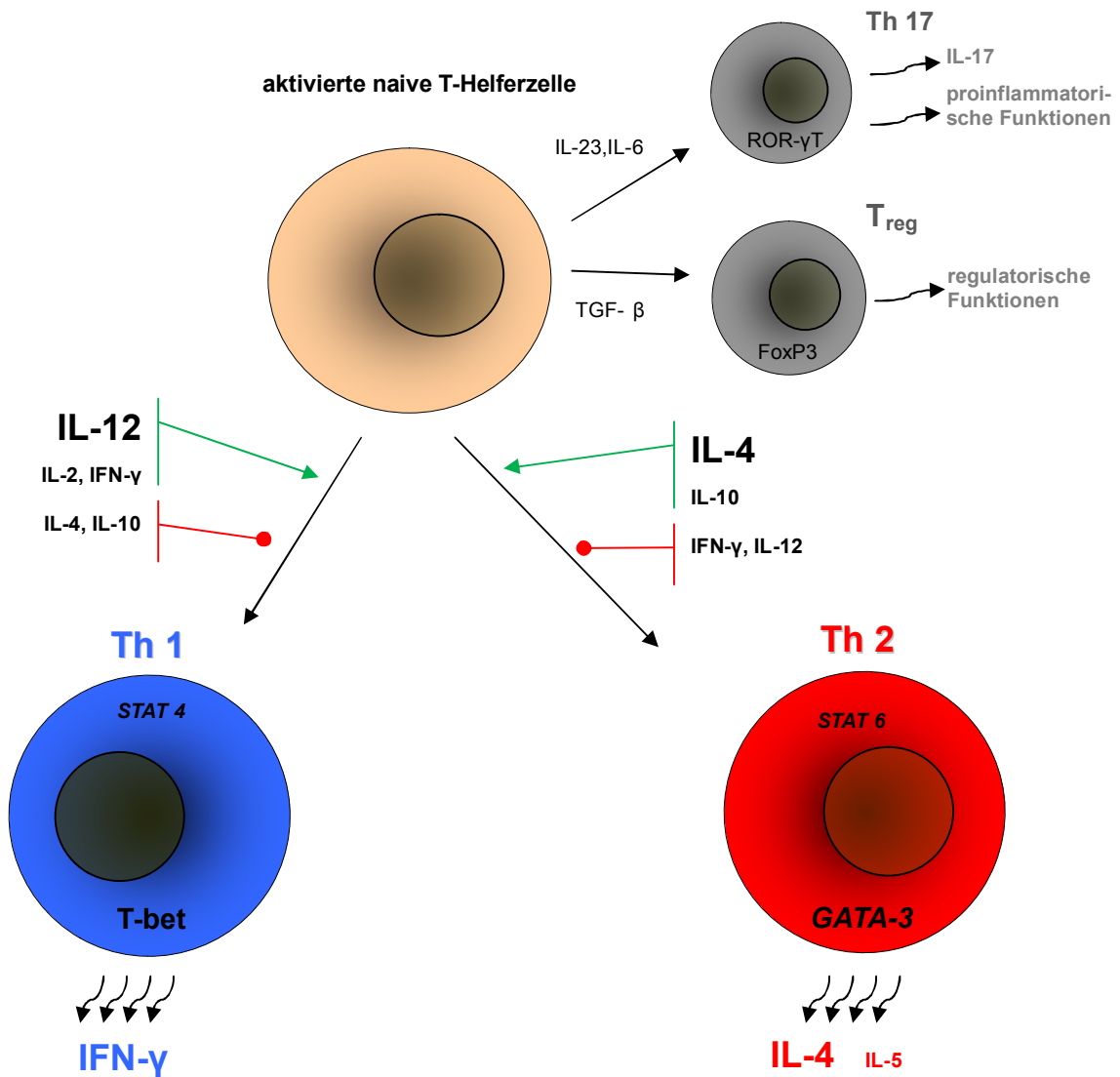
autoaggressiven Krankheitsmodellen wie granulomatösen Entzündungen auffinden.^{29 31}
32

Das entscheidende Transkriptionsfaktor zur Th2-Polarisierung ist GATA-3, welcher durch die IL-4 induzierte STAT-6 Wirkung aktiviert wird.

Es wird vermutet, dass T-Zellen selbst zu einem geringen Ausmaß das nötige IL-4 bereitstellen und durch die Polarisierung autokrin unter positiver Rückkopplung die Th2-Polarisierung unterstützen. IL-4 produzierende Th2-Lymphozyten bewirken eine Produktion von IgE, IgM und neutralisierenden Antikörpern IgG₁ in B-Lymphozyten. IgE Antikörper sind essenziell für die Mastzelldegranulation. Über ein weiteres typisches Th2-Zytokin, IL-5, werden typischerweise eosinophile Granulozyten stimuliert. Der Immunphänotyp der Th2-Polarisierung entspricht der Antwort auf extrazelluläre Erreger wie Helminthen oder Bakterien, aber auch dem der allergischen Erkrankungen. Da IL-4 und IL-10 in der Lage sind, Makrophagen in Ihrer Aktion zu hemmen, werden Th2-Zellen eine regulatorische und sogar inhibitorische Wirkung zugesprochen.^{29 33}

Die T-Zellsubpopulationen Th1 und Th2 hemmen sich gegenseitig in der Polarisierung, so dass zumindest *in vitro* meist nur ein Immunphänotyp vorherrschend ist. *In vivo* werden jedoch auch gemischte Immunantworten beobachtet. Ist erst die Richtung der Polarisierung festgelegt, wird klassischerweise eine „Umpolarisierung“ nur noch in der Frühphase der Proliferation als möglich beschrieben. Nach Langzeitstimulation geht diese Eigenschaft gänzlich verloren.^{28 34}

Der Fokus in dieser Arbeit liegt in der klassischen, dichotomen Polarisierung von naiven T-Helferzellen in Th1- und Th2-Subpopulationen, der Vollständigkeit halber soll aber erwähnt werden, dass aktuelle Studien mindestens zwei weitere Subpopulationen postulieren. Regulatorische T-Helferzellen T_{reg} sollen durch den Einfluss des transforming growth factor β (TGF- β) im Thymus das forkhead box protein P3 (Foxp3) exprimieren. Die genaue Aktionsweise dieser Helferzellpopulation ist nicht bekannt, allerdings werden ihm Eigenschaften zugesprochen, die die Transplantatabstoßung sowie Hemmung autoimmuner Prozesse betreffen.³¹ Th17-Zellen sollen durch Wirkung von IL-6 und TGF- β entstehen und den RAR related orphan nuclear receptor γ T (ROR- γ T) exprimieren. Dieser Zellreihe werden zusammen mit Th1 proinflammatorische und ferner autoaggressive Eigenschaften zugeschrieben.³¹



Makrophagenaktivierung

Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen

Bildung von IgG2a und IgG3

Bekämpfung intrazellulärer Erreger

Bildung von IgE, IgM und IgG₁

Stimulation eosinophiler Granulozyten

Mastzelldegranulation

Bekämpfung extrazellulärer Erreger

Abbildung 3 Polarisierung naiver T-Helferzellen

Nach Präsentation von Antigenen sowie Kostimulation erfolgt die Polarisierung der aktivierten T-Helferzellen in Abhängigkeit vom Zytokinmilieu in die verschiedenen Subpopulationen Th1, Th2, Th17, T_{reg}. Nach intrazellulärer Aktivierung unterschiedlicher STAT-Proteine, werden Transkriptionsfaktoren aktiviert. T-bet reguliert bei Th1-Zellen die Produktion von spezifischem IFN- γ , während GATA-3 bei Th2-Zellen die Produktion von IL-4 steuert.

2.3 Interaktion von Leptin mit dem Immunsystem

In früheren Arbeiten wurde bereits mehrfach beschrieben, dass zelluläre Immunreaktionen bei hungernden und abgemagerten Menschen abgeschwächt ablaufen. Die Abgeschwächte Immunreaktion wurde als Reduktion der Körperfunktionen auf ein Minimum des Nötigen interpretiert.³⁵ Leptin scheint dabei eine entscheidende Rolle zu spielen. Beispielsweise leiden leptindefiziente Kinder häufiger an unspezifischen Atemwegsinfektionen als ihre gesunden Geschwister.²⁶ Ein ähnliches klinisches Bild zeigen leptinkompetente Jugendliche, die an Anorexia nervosa leiden. Krankheitsbedingt wird durch fehlende Nahrungsaufnahme die Gesamtfettmasse reduziert und wie oben beschrieben die Leptinsekretion gehemmt. Dies äußert sich in verminderter Fähigkeit zur DNA-Synthese peripherer mononukleärer Zellen im Blut und vergleichsweise verminderter Sekretion von IFN- γ .³⁵

Wie bereits beschrieben, spielen CD4⁺ T-Helferzellen eine zentrale Rolle in der Immunregulation. Ein vermindertes Ansprechen des zellulären Immunsystems bei *db/db* Mäusen ist schon seit den 70er Jahren, lange vor der Aufklärung der eigentlichen Mutation, bekannt gewesen. Bewiesen wurde dies in Untersuchungen allogener Hauttransplantate bei *db/db* Mäusen im Vergleich zu Gesunden. Sie zeigen deutlich verspätete Abstoßungsreaktionen.³⁶

Leptindefizienz, aber auch Hungern für länger als 48 Stunden bewirkt eine Abnahme des Volumens sowie der Zellzahl des Thymus. Verabreichtes Leptin wirkt unter diesen Bedingungen als Schutz vor der Thymusatrophie. Ein Anteil der geschützten CD4⁺CD8⁺ Thymozyten in kortikalen Thymusanteilen werden als T-Zellvorläufer angesehen.³⁷

Leptin scheint in der Zusammenschau seine Wirkung auf das Immunsystem auf verschiedene Weisen zu vermitteln. Zum einen können die Effekte indirekt über hormonelle und neuroendokrine Regulationen stattfinden: *ob/ob* Mäuse weisen neben der extremen Adipositas und Insulinresistenz einen Hyperkortisolismus auf, hervorgerufen durch Störungen der hypothalamisch-hypophysitär-thyreoidalen Achse.^{26 38} Dies bedingt eine verminderte Sezernierung von Schilddrüsenhormonen und dem Wachstumshormon.²³ Diese Auswirkungen in der Gesamtheit betrachtet hat Leptin eine durchaus diffizile Wirkung auf die körpereigene Immunregulation über die neuroendokrine Achse.

Einleitung

Eine weitere Möglichkeit ist die direkte Wirkungsentfaltung auf das Immunsystem über den membrangebundenen Rezeptor, der wie schon beschrieben auf vielen Geweben eindeutig identifiziert werden konnte. Am eindrücklichsten lässt sich der Einfluss des Leptins auf Immunvorgänge verdeutlichen, wenn die Folgen hervorgehoben werden, die durch Defizienz des Hormones entstehen:

Leptindefiziente Mäuse weisen eine verminderte Anzahl an naiven aber proliferationsfähigen T-Lymphozyten auf. Die Situation stellt sich durch Applikation von Leptin als reversibel dar. Ohne Leptin wird eine verminderte Sekretion von IL-2, IFN- γ , Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und IL-18 beobachtet, wohingegen die Sekretion von IL-4 und IL-10 vermehrt ist. Aus diesem Zytokinprofil auf die mögliche Bevorzugung von T-Helferzellen rückgeschlossen, ergibt dies erste Hinweise auf eine Verschiebung zur Th2-Immundominanz bei Leptindefizienz.^{26,39}

Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen ist beispielsweise die experimentelle durch Rindersebumalbumin (BSA) - induzierte Autoimmunarthritiden bei *ob/ob* Mäusen histologisch weniger ausgeprägt und die synoviale Konzentration von proinflammatorischen IL-1 β und TNF- α sowie die Serumkonzentration von antigenspezifischen Antikörpern drastisch vermindert. Ferner ist die *in vitro* Proliferation von T-Zellen abgeschwächt und von verminderter IFN- γ Produktion und gesteigerter IL-10 Sekretion begleitet. Wahrscheinlich sind diese Effekte auch auf eine vermehrte Polarisierung der Immunantwort in Richtung Th2 zurückzuführen.⁴⁰

Leptindefiziente Mäuse erweisen sich als resistent gegen die experimentelle Autoimmunenzephalitis, ein Tiermodell der Multiplen Sklerose. Dieses Modell basiert auf der Induktion von autoreaktiven T-Zellen gegen Myelin mit dem bevorzugten Auftreten von Th1-typischen Zytokinen in lädiertem Gewebe, wohingegen Th2-Zytokine fehlen. Die Gabe von Leptin stellt die Empfänglichkeit für diese Erkrankung wieder her und hat einen Wechsel von IL-4 hin zur IFN- γ Produktion zur Folge. Leptinsubstitution an Wildtypmäusen bewirkt eine Eskalation der Krankheitssymptomatik sowie der krankheitsspezifischen Mortalität. Als weiterer Effekt der Gabe von Leptin ist - unabhängig von der Leptinkompetenz - ein Anstieg von antigenspezifischen Immunglobulinen im Serum zu beobachten.^{38,41}

Die Concanavalin A induzierte Hepatitis ist ein experimentelles Modell für die Autoimmunhepatitis. Ein wichtiger Faktor ist auch hier die proapoptotische Wirkung von TNF- α

Einleitung

auf Hepatozyten. Eine Leptindefizienz übt eine Schutzwirkung wahrscheinlich über die verminderte Serum- und Gewebekonzentration an TNF- α und IL-18 aus. Die *ex vivo* Produktion von IFN- γ aus hepatischen mononukleären Zellen, die zu gut einem Drittel aus CD3⁺/NK1.1⁺ natürlichen Killer T-Zellen (NKT) bestehen, ist vermindert. Nachweislich ist hier die Leptindefizienz Verursacher der abgeschwächten Krankheitsverlaufes. Das Verabreichen von Leptin hebt diesen Schutz auf.^{42,43}

Die akute und chronische Kolitis ausgelöst durch Dextran Natriumsulfat (DSS) respektive Trinitrobenzensulfonsäure (TNBS) ist bei *ob/ob* Mäusen im Vergleich zum Wildtyp nur abgeschwächt auslösbar. Dies zeigt sich durch geringere Neutrophileninvasion in das Gewebe sowie niedrigere histologische Krankheits-Scores im Vergleich zum Wildtyp. Die Gabe von Leptin macht *ob/ob* Mäuse wieder empfänglich und stimuliert direkt mononukleäre Zellen der Lamina propria sowie intraepitheliale Lymphozyten. Diese Lymphozyten sind bei *ob/ob* Mäusen in Bezug auf Gesamtzahl und Sekretionsvermögen von IFN- γ , IL-1 β und TNF- α supprimiert. Auch die typischen makroskopischen Koli-tiszeichen (Verkürzung der Kolonlänge, rektale Blutung) fehlen bei Leptindefizienz. Folglich wird bereits die Bedeutung Leptins als ein wichtiger Mediator einer intestinalen Entzündungsreaktion diskutiert.^{44,45}

Die Arbeitsgruppe um *G.M. Lord* versuchte 1994 die Rolle von Leptin im Zusammenhang mit der Beeinflussung der Th1/Th2-Immunantwort zu charakterisieren: Der Versuchsansatz sah vor, in einer gemischten Lymphozytenreaktion T-Lymphozyten mit allogenen MCH-inkompetenten Stimulatorzellen zu kultivieren. Leptin wurde in bei Menschen zu erwartenden Serumkonzentrationen verabreicht. Hierbei ließ sich eine dosisabhängige Proliferationssteigerung von leptinkompetenten sowie -defizienten Blutlymphozyten verzeichnen. Selbiger Effekt bestand bei aufgereinigten CD4⁺ Lymphozyten. Naive Lymphozyten reagieren stärker als Memoryzellen. Die T-Helferzellen zeigten unter Leptinwirkung einen eindeutigen Anstieg der IFN- γ Produktion. Leptindefiziente *ob/ob* Zellen zeigten eine dosisabhängige vermehrte Sekretion von IFN- γ und eine reziprok verminderte Sezernierung von IL-4 in der alloproliferativen Reaktion unter Leptin. Es konnte auch gezeigt werden, dass Leptin die Expression von bestimmten Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 (CD54), VLA-2 (CD49b) auf naiven Zellen induziert.³⁹

Einleitung

Nicht zuletzt konnte in weiteren Untersuchungen gezeigt werden, dass im Umkehrschritt auch Immunprozesse einen Einfluss auf die Leptinsekretion haben. Somit scheint eine gegenseitige Interaktion von Immunfunktion und Fettgewebe wahrscheinlich. Zytokine wie TNF- α , IL-1 und LIF aber auch Lipopolysaccharid (LPS) erhöhen die Sekretion von Leptin in Adipozyten *in vivo*. Für die Interleukine IL-4, IL-2 und IL-10 konnte dieser Effekt hingegen nicht nachgewiesen werden. Bei dauerhafter Zufuhr führen diese Zytokine zur Anorexie.⁴⁶

Die im Immunsystem vor allem para- und autokrin wirkenden Hormone wie Interleukine, Interferone und Chemotaxine werden als Klasse der Zytokine zusammengefasst. Da Leptin zahlreiche immunologische Einflüsse auf zellulärer Basis aufweist und in diesem System einen für die physiologische Funktion unentbehrlichen Bestandteil darstellt, wird mit dem Leptin bereits eine neue Substanzkategorie der Adipokine eingeführt.

2.4 Fragestellung

Verschiedene Untersuchungen beschrieben bereits einen direkten Effekt von Leptin auf immunologische Vorgänge. Insbesondere scheint Leptin eine entscheidende Rolle in der T-Helferzellantwort zu spielen. Vielfach wurde bei Leptindefizienz eine trägere Immunantwort sowie bevorzugtes Auftreten von Th2-typischem Zytokinprofil beschrieben. Nach Leptinsubstitution zeigt sich eine Tendenz zur dominierenden Th1-Immunreaktion mit überwiegender IFN- γ Sekretion.^{26,38-41} Bisher blieb allerdings die Charakterisierung des Polarisierungsvorganges naiver T-Lymphozyten unter Einfluss von Leptin offen. Ferner blieb bisher nicht eindeutig geklärt, ob der Wandel von Th2- zu Th1-Antwort auch als leptinbedingte Th2-Suppression zu interpretieren sei, oder ob dies ein durch gegenseitigen Polarisierungshemmung zu beobachtendes Phänomen ist.^{40 47} Das Ziel dieser Arbeit ist, den Einfluss von Leptin auf die *in vitro* Polarisierung muriner, naiver T-Helferzellen im antigenspezifischen sowie antigenunspezifischen System zu bestimmen. Folgende Fragen sind dabei zu beantworten:

- Lässt sich der bereits beschriebene Th1-stimulierende Effekt von Leptin auch unter Polarisierungsbedingungen naiver T-Helferzellen nachweisen?
- Lässt sich eine direkte Th2-Supprimierung durch Leptin unter Polarisierungsbedingungen nachweisen?
- Existiert ein Unterschied zwischen antigenspezifischer sowie -unspezifischer Stimulation von naiven T-Helferzellen unter Leptineinfluss?
- Beeinflusst die Leptinkompetenz der T-Helferzellen oder sogar der Antigen präsentierenden Zellen die Polarisierung?
- Wie verhält sich die Zellproliferation und die Apoptoserate naiver T-Lymphozyten unter Polarisierungsbedingungen in Abhängigkeit von Leptin?

3 Material und Methoden

3.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Begasungsbrutschrank Heracell 150	Heraeus (Hanau)
Cellstrainer	BD Biosciences (Heidelberg)
Durchlichtmikroskop	Krüss (Hamburg)
FACS Calibur und Auswertungssoftware	Becton Dickinson (San Jose, USA)
FACS Auswertungssoftware FlowJo	Tree Star (<i>Ashland, USA</i>)
Feinwaage Scout II	Ohaus (Pine Brook, USA)
MACS Zellauftrennungssäule Typ LD	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
MACS ZellauftrennungsfILTER 70 µm	Miltenyi Biotec
Sofortbildkamera DS 34	Polaroid (Waltham, USA)
Statistiksoftware Prism 4	GraphPad Software (La Jolla, USA)
Stromquelle PowerPac Basic	BioRad (Hercules, USA)
Thermocycler T3000	Biometra (Göttingen)
Vortex Mixer VX-200	Labnet (Edison, USA)
Zellkulturplatten	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Zentrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg)

3.2 Substanzen

3.2.1 Chemikalien

5x First-strand Buffer	Invitrogen (Karlsruhe)
5x Green GoTaq Flexi Puffer	Promega (Mannheim)
Agarose	Carl Roth (Karlsruhe)
Annexin V Binding-Buffer	BD Pharmingen (San Jose, USA)
Aqua dest.	Fresenius Kabi (Bad Homburg)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Merck (Darmstadt)
Carboxyfluoreszein Diazetat - Succinimidyl Ester (CFDA-SE)	Invitrogen
cDNS Synthesis System	Invitrogen
Chloroform	Sigma-Aldrich (München)
Desoxyribonukleinsäure	Invitrogen
Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP)	Carl Roth
Dithiothreitol	Invitrogen
DNase I	Invitrogen
DNase Puffer	Invitrogen
Ethanol	Carl Roth
Ethidiumbromid	Carl Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Formalin 4%	AppliChem (Darmstadt)
Fötale Kälberserum (FCS)	Linaris (Wertheim-Betingen)
Go Taq-Polymerase	Promega
Glycerin	Merck
Glycin	Carl Roth

Material und Methoden

Glykogen	Sigma-Aldrich
HCl	Carl Roth
H ₃ PO ₄	Merck
Ionomycin	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Carl Roth
KCl	Merck
KHCO ₃	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
Leptin	Peprtech (Hamburg)
L-Glutamin	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
MACS MicroBeads	Miltenyi Biotech
MACS Release	Miltenyi Biotech
Magnesiumchlorid	Promega
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Methanol	Mallinckrodt Baker (Griesheim)
Moloney Murine Leukemia Virus- Reverse Transkriptase	Invitrogen
Monensin	Sigma-Aldrich
NaCl	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich
Na ₂ HPO ₄	Carl Roth
NH ₄ Cl	Sigma-Aldrich
Oligo (dT) ₁₂₋₁₈	Invitrogen
Ovalbumin	Sigma-Aldrich
OVA ₍₃₂₃₋₃₃₉₎ -Peptid	Institut für Biochemie der Humboldt- Universität (Berlin)
pegGold TriFast	Peqlab (Erlangen)

Material und Methoden

Penicillin	PAA Laboratories
Phorbol 12-Myristat 13-Acetat	Sigma-Aldrich
Rinderserumalbumin (BSA)	PAA Laboratories
RNaseOUT	Qiagen (Hilden)
Saponin	Sigma-Aldrich
Streptomycin	PAA Laboratories
TRIS-EDTA-Acetat-Puffer, 50x	Genaxxon (Ulm)
Trypanblau	AppliChem

3.2.2 Zellkulturmedien

Roswell Park Memorial Institute

RPMI 1640 PAA Laboratories

T-Zell-Medium

RPMI 1640

10 % FCS

2 mM L-Glutamin

50 μ M β -Mercaptoethanol

100 U/ml Penicillin

100 μ g/ml Streptomycin

3.2.3 Puffer

Erythrozytenlysepuffer	8,9 g/l NH_4Cl
	38 mg/l EDTA
	1 g/l KHCO_3
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	8,0 g/l NaCl
	0,2 g/l KCl
	1,15 g/l Na_2HPO_4
	0,2 g/l KH_2PO_4
PBS / BSA, MACS-/FACS- -Pufferlösung	5 g/l Rinderserumalbumin (BSA) gelöst in PBS

3.2.4 Antikörper

Die Zellseparation erfolgte durch die Magnet-assisted Cell Separation (MACS, Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach). Hierzu mussten die aufzureinigenden Zellen mit Antikörpern präpariert werden. Folgende Antikörper fanden während der Versuche Anwendung:

Antigen	Klon	Isotyp	Hersteller
CD4	k. A.	k. A., Fluoreszinoisothiocyanat (FITC) konjugiert	DRFZ (Deutsches Rheumafor- schungszentrum) Berlin
FITC	k. A.	Maus, IgG1, MicroBead konjugiert	Miltenyi Biotech
CD62L	k. A.	Ratte, IgG2a MicroBead konjugiert	Miltenyi Biotech
CD90.2 (Thy-1.2)	k. A.	Ratte, IgG2b MicroBead konjugiert	Miltenyi Biotech

Tabelle 1 Antikörper zur Zellseparation

Nach Aufreinigung der gesuchten Zellpopulationen erfolgte die Bestimmung der Zellreinheit über die Durchflusszytometrie. Hierzu wurden folgende Antikörper angewandt:

Antigen	Markierung	Klon	Isotyp	Hersteller
CD62L	PE	MEL-14	Ratte, IgG2a, κ	BD Pharmingen
OVA₃₂₃₋₃₃₉-TZR	biotinyliert	KJ1 26.1	k. A.	DRFZ

Tabelle 2 Verwendete Antikörper zur Zellcharakterisierung

Zur Identifizierung der T-Zellsubpopulation wurden die Zellen intrazellulär angefärbt, um später durchflusszytometrisch ausgewertet werden zu können. Die folgende Tabelle listet die verwendeten Antikörper auf:

Antigen	Markierung	Klon	Isotyp	Hersteller
IFN-γ	APC	XMG1.2	Ratte, IgG2, κ	BD Pharmingen
IL-4	PE	11B11	Ratte, IgG1	BD Pharmingen

Tabelle 3 Verwendete Antikörper zur intrazellulären Zytokinfärbung

Zur T-Zellstimulation sowie Einleitung des Polarisierungsvorganges wurde folgende Antikörper verwendet:

Antigen	Klon	Isotyp	Hersteller
CD28	37.51	Armenischer Hamster, IgG1, I	Max-Planck Institut für Infektionsbiologie, Berlin
CD3	145-2C11	Armenischer Hamster, IgG1, κ	DRFZ
IFN-γ	AN18.17.24	Ratte, IgG	DRFZ
IL-4	C11B11	Ziege, IgG	DRFZ
IL-12	C17.8	Ratte, IgG	DRFZ

Tabelle 4 Antikörper zur Zellstimulation sowie Zellpolarisierung

3.2.5 Zytokine

Alle angewandten Zytokine, IL-4 und IL-12, sind rekombinant hergestellt und wurden von der Firma R&D Systems aus Wiesbaden-Nordenstadt bezogen.

3.2.6 Primer

Die Synthese der gewünschten Primer erfolgte durch die Firma TIP MOLBIOL (Berlin).

Primer	Richtung	Sequenz (5'-3')
OB-R_b	<i>forward</i>	TgA AgA gCA Agg gTT TAT CCA
	<i>reverse</i>	TCC CAC ATC CAC AAC AAT AA
GAPDH	<i>forward</i>	ACC ACA gTC CAT gCC ATC AC
	<i>reverse</i>	TCC ACC ACC CTg TTg CTg TA

Tabelle 5 Übersicht der verwendeten PCR-Primer

3.2.7 Spezielle Färbungen für die Durchflusszytometrie

Farbstoff	Markierung / Emissionsmaximum	Hersteller
Annexin V	FITC (Emissionsmaximum 495 nm)	BD Biosciences
CFDA-SE	CFSE nach intrazellulärer Prozeption (Emissionsmaximum 517 nm)	BD Biosciences
PI	Emissionsmaximum 617 nm	AppliChem

Tabelle 6 Spezialfärbungen für die Durchflusszytometrie

3.3 Zellulär – immunologische Methoden

3.3.1 Versuchstiere

Die Mäuse wurden im tierexperimentellen Labor der Charité Berlin unter pathogenfreien Bedingungen gehalten. Es bestand die gesamte Zeit ein freier Zugang zu Nahrung sowie Wasser bei einem konstanten Tag-Nacht-Zyklus und gleichbleibenden klimatischen Bedingungen. Folgende Mausstämme wurden für die Fragestellungen untersucht:

BALB/c (Harlan Winkelmann, Borcheln)

Ein verbreiteter Inzucht-Albino-Stamm, dessen Zellen für alle antigenunspezifischen Stimulationen mit anschließender Proliferation, Apoptose- sowie Proliferationsbestimmungen und weiterhin für die OB-R_b-PCR verwandt wurde.

DO11.10 (DRFZ, Berlin)

Diese Mäuse basieren auf BALB/c - Hintergrund. Sie zeichnen sich durch Transgenität für einen T-Zellrezeptor aus, der spezifisch für das OVA₍₃₂₃₋₃₂₉₎-Peptid ist. Das Peptid ist ein Bestandteil des Ovalbumins. Diese Zellen fanden für antigenspezifische T-Zellstimulationen mit anschließender Polarisierung Anwendung.

C57BL/6^{ob/ob} (Harlan Winkelmann)

Diese Mauspopulation ist homozygot für eine Nonsense-Mutation im Codon 105 des Leptin-Gens. Die Mauszucht exprimiert von Geburt an kein Leptin. Die T-Lymphozyten dieser Zellreihe wurden unter antigenunspezifischer Stimulation sowie in An- und Abwesenheit von Leptin unterschiedlichen Polarisierungsbedingungen ausgesetzt.

C57BL/6 (Harlan Winkelmann)

Ein Inzuchtstamm, der häufig die Basis für genetisch modifizierte Mäuse bildet. Dieser Wildtyp diente dem direkten Vergleich der Polarisierung von *ob/ob* T-Lymphozyten. Ferner diente Lebergewebe dieses Stammes als Positivkontrolle für die OB-R_b-PCR.

3.3.2 Zellisolation

Vier bis sechs Wochen alte Mäuse wurden durch CO₂-Inhalation in Narkose versetzt und anschließend durch zervikale Dislokation geopfert (Tötungsanzeige T 0037/05). Die Milz sowie Lymphknotenstationen des Halses, der Axilla, der Inguinalregion, sowie große mesenteriale Lymphknoten wurden entnommen und in PBS unter externer Kühlung bis zur zügig erfolgten weiteren Zellisolation gelagert.

Anschließend wurde das Gewebe makroskopisch aufgeschlossen. Hierzu wurde das gewonnene lymphatische Gewebe durch einen Cellstrainer (BD Biosciences, Heidelberg) mit 70 µm Gitterweite unter Zuhilfenahme eines Spritzenstempels befördert. Durch dieses Prozedere blieb das Bindegewebe im Cellstrainer hängen, während weitestgehend vereinzelte Zellen mit PBS durch den Filter gespült werden konnten. Die nun gewonnene Zellsuspension wurde für 7 Minuten bei 400 g bei 4 °C zentrifugiert und im Anschluss der Überstand verworfen. Das verbliebene Zellpellet wurde nun vorsichtig in 5 ml Erythrozytenlysepuffer gelöst. Die Zellen wurden für 2 min unter Raumtemperatur im Puffer belassen. Um die Lysereaktion zu stoppen wurde die Zellsuspension auf 20 ml mit RPMI 1640 (PAA Laboratories) aufgefüllt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt inklusive Verwerfen des restlichen Überstandes. Das inzwischen erythrozytenfreie Zellpellet wurde in 5 ml PBS gelöst.

Vor der nun folgenden Separation von naiven T-Lymphozyten wurde die Gesamtzahl der gewonnenen Lymphozyten mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Durch die Verwendung von Trypanblau bei der Zählung konnten lebende von abgestorbenen Zellen unterschieden werden. Zur Zählung wurde eine 20 µl Probe der Zellsuspension entnommen und mit 80 µl von 10% Trypanblau verdünnt. Von dieser Suspension wiederum wurden 20 µl zum Zählen verwendet. Es wurden lichtmikroskopisch die Anzahl der lebenden Zellen n in einem großen Quadranten des Objektträgers bestimmt und anschließend mit folgender Formel die Zellzahl pro Milliliter Lösung hochgerechnet: Zellzahl [./ml] = $n \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$.

3.3.3 *In vitro* Zellkultur

Unabhängig vom Versuchsansatz erfolgte bei allen Versuchen die Kultivierung unter gleichbleibenden Bedingungen. Es wurden je 2 ml Zellsuspension mit ca. $1,0 \cdot 10^6$ Zellen/ml in 48-Lochplatten kultiviert. Als Zellmedium diente standardisiertes T-Zell-Medium basierend auf RPMI 1640. Je nach Versuchsansatz erfolgte eine Lymphozytenstimulation sowie die Inkubation mit Leptin in unterschiedlichen Konzentrationen. Die für die Polarisation benötigten Zytokine und Antikörper wurden dem Zellmedium separat beigegeben.

Nach je 72 Stunden Kultivierung erfolgte eine Passagierung der Zellen. Hierzu wurden die proliferierenden Zellen mit der Pipette resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugationsröhrchen verbracht und anschließend das alte Zellmedium abzentrifugiert. Danach erfolgte die Rekultivierung der Zellen mit einer Zelldichte von $1,0 \cdot 10^6$ Zellen/ml mit frischem Zellmedium. Sämtliche Zellkulturen wurden bei 37°C , 5% CO_2 und in mit Wasserdampf gesättigter Atmosphäre im Brutschrank kultiviert.

3.3.4 Zellseparation

Die Magnet-assisted Cell Separation (MACS, Miltenyi Biotech) beruht auf der Grundlage, markierte Zellen in einem Magnetfeld festzuhalten, während unmarkierte Zellen dieses Magnetfeld passieren können. Dieses Verfahren ergibt eine sog. Positivselektion, d. h. nur die gewünschten Zellen verbleiben im Magnetfeld. Die magnetische Markierung erfolgt über MicroBeads (Miltenyi Biotech) gekoppelte hochspezifische monoklonale Antikörper gegen Epitope auf den Zelloberflächen der gesuchten Zellpopulation. MicroBeads sind nach Herstellerangaben superparamagnetische Partikel mit einer durchschnittlichen Größe von 50 µm. Diese dienen in MACS-Säulen (Miltenyi Biotech) im Hochgradientenmagnetfeld der Zellseparierung.

Die gesuchte Zellpopulation wird mit MicroBead-gekoppelten Antikörpern markiert. Wenn eine Mischpopulation von Zellen eine mit Stahlwolle gefüllte Säule durchläuft, die in ein Magnetfeld eingebettet ist, verfangen sich die markierten Zellen in der Säule, die unmarkierten durchlaufen die Säule unbeeinträchtigt. Nach Entfernen des Magnetfeldes verlassen auch die markierten Zellen die Säule und befinden sich nun in einem hochangereichertem Zustand.

3.3.5 Zellseparation naiver T-Lymphozyten

Die Separierung von naiven T-Zellen per MACS nutzt die Koexpression der zwei Oberflächenmoleküle CD4 und CD62L auf naiven T-Zellen. CD4 dient als Korezeptor für MHC-Klasse-II Moleküle auf T-Helferzellen, Monozyten und Makrophagen. CD62L ist das Leukozyten-Adhäsionsmolekül Selectin. Es bindet an CD34, welches vor allem auf Kapillarendothel vorhanden ist. Naiven T-Lymphozyten dient CD62L zur Migration in Lymphknoten oder in entzündetes Gewebe.

Im ersten Schritt der Separation wurden per Positivselektion CD4⁺ Zellen aus der Zellsuspension selektiert. Hierzu wurde die Zellsuspension für 10 min bei 4 °C im Verhältnis 1:2000 unter Lichtausschluss mit einem FITC (Fluoreszinoisothiocyanat)-gekoppelten anti-Maus-CD4-Antikörper (DRFZ, Berlin) inkubiert.

Material und Methoden

Nach Verdünnen in MACS-Pufferlösung mit folgender Zentrifugation für 7 min bei 400 g und 4 °C wurde das Zellpellet in 2 ml MACS-Puffer resuspendiert. Dieser Vorgang wird im Folgenden als „Waschen“ bezeichnet.

Die Kopplung der MicroBeads erfolgte durch Inkubation für 15 min bei 4-8 °C mit Anti-FITC-MicroBeads gekoppelten Antikörpern (Miltenyi Biotech) im Verhältnis 1:10. Anschließend erfolgte wieder ein Waschvorgang mit erneutem Resuspendieren der Zellen allerdings in 4 ml MACS-Pufferlösung. Die Zellsuspension wurde durch eine MACS-Zellauftrennungssäule (Typ LD, Fassungsvermögen $5,0 \cdot 10^8$ Zellen, Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach) im Magnetfeld gegeben. Nur die CD4⁺ Zellen blieben daraufhin in der Säule hängen. Nach Trennen vom Magnetfeld konnten nun die separierten Zellen gelöst werden.

Um nach dem selben Prinzip im Anschluss die CD62L⁺ Zellen unter den CD4⁺ Zellen zu isolieren, mussten die MicroBeads vorerst gelöst werden, da sonst die zweite Selektion nicht suffizient sein würde. Dies geschah durch 25 min Inkubation von 100 µl MACS-Release Reagenz (Miltenyi Biotech) auf 5 ml Zellsuspension. Nach einem folgenden Waschgang konnte die Zellsuspension nun mit MicroBeads konjugierten Anti-Maus-CD62L-Antikörpern (Miltenyi Biotech) im Verhältnis 1:50 für 15 min bei 6-12 °C inkubiert werden. Anschließend wurde die Zellsuspension wie im ersten Separationsschritt durch die MACS-Säule befördert.

Die Reinheit der Zielpopulation wurde anschließend per Durchflusszytometrie kontrolliert. Hierzu erfolgte eine weitere Inkubation der Zellsuspension mit α-CD62L-PE markierten Antikörpern (BD Pharmingen, Heidelberg) im Verhältnis 1:200 bei 10 min auf Eis. Anschließend wurde erneut gewaschen und in 300 µl MACS-Pufferlösung resuspendiert. Die CD4-Färbung vom ersten Aufreinigungsschritt noch gewährleistet. Die Reinheit der Zellisolation wurde durchflusszytometrisch durch die Anzahl der CD4-FITC⁺ und CD62-PE⁺ doppelt positiven Zellen bestimmt.

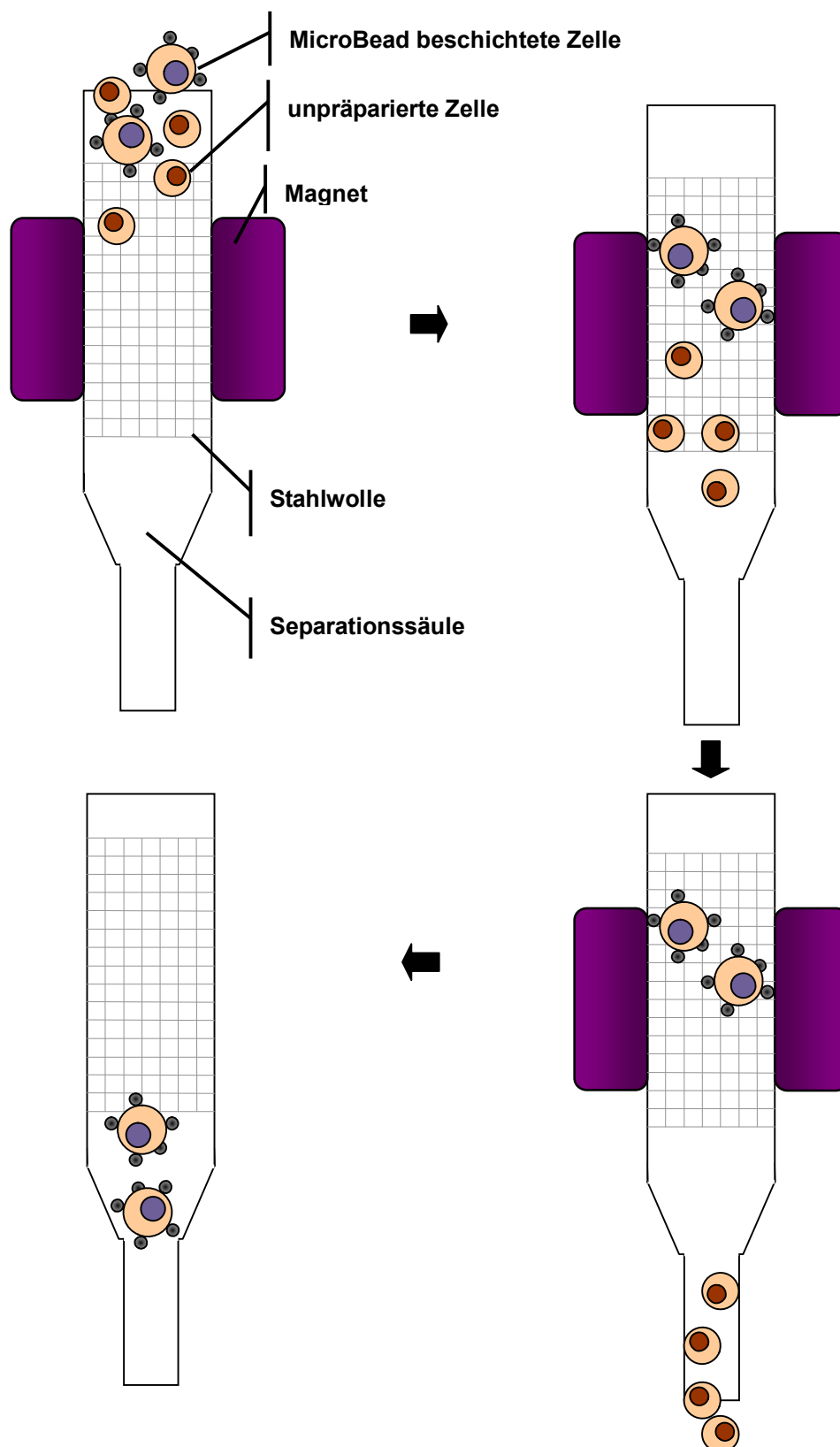


Abbildung 4 Schematische Darstellung einer Positivselektion durch MACS
Eine gemischte Zellpopulation wird in eine Zellaufreinigungssäule gegeben. Die MicroBeads beschichteten Zellen bleiben im Magnetfeld haften, während die unpräparierten Zellen durch die Säule gespült werden. Nach Trennung vom Magnetfeld können die gewünschten Zellen isoliert werden.

3.3.6 Isolierung von antigenpräsentierenden Zellen

Die vorliegende Arbeit sah vor, naive T-Lymphozyten unter Polarisierungsbedingungen Leptin auszusetzen und anschließend die Proliferationsrate zu untersuchen. Wie bereits beschrieben, benötigen T-Zellen eine initiale Stimulation. Ein Versuchsansatz sah vor die Stimulation durch professionelle antigenpräsentierende Zellen (APZ) vorzunehmen. Hierzu gehören beispielsweise B-Lymphozyten, Makrophagen sowie dendritische Zellen. Die Isolierung der APZ erfolgte durch einen einzigen Arbeitsschritt der Negativselektion von CD90.2⁻ Zellen. CD90.2 ist ein Pan-T-Zellmarker, der auf peripheren T-Lymphozyten, hämatopoietischen Stammzellen sowie Thymozyten gefunden wird. In der Theorie bleiben nach Negativselektion von CD90.2⁺ T-Zellen aus lymphatischem Gewebe nur APZ zurück.

Die benötigten Zellen wurden aus C57BL/6^{ob/ob} sowie C57BL/6 Mausstämmen rekrutiert. Die vorangehenden Schritte bis zur Gewinnung einer erythrozytenfreien Zellsuspension wurden wie oben beschrieben unternommen. Anschließend wurde die Suspension für 15 min bei 2-8 °C im Verhältnis 1:10 bei einem Gesamtvolumen von 100 µl unter Lichtausschluss mit einem MicroBeads gekoppelten Anti-Maus-CD90.2-Antikörper (Miltenyi Biotech) inkubiert. Nach Verdünnen in MACS-Pufferlösung mit folgender Zentrifugation für 7 min bei 400 g und 4 °C wurde das Zellpellet in 2 ml MACS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend zügig durch eine MACS-Säule (Typ LD, Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach) im Magnetfeld befördert. Nur die CD90.2⁺ Zellen blieben daraufhin in der Säule hängen. Die CD90.2⁻ APZ wurden aufgefangen und nach einer Zentrifugation in MACS-Pufferlösung resuspendiert und bei 4 °C unter Lichtausschluss gelagert, bis die folgenden Stimulationsansätze durchgeführt werden konnten. Die in der Säule befindlichen CD90.2⁺ Zellen wurden anschließend verworfen.

3.3.7 Antigenunspezifische Stimulation

Die antigenunspezifische Helferzellstimulation basiert auf dem Gedanken, durch gezielte Stimulation eines Teils des T-Zellrezeptorkomplexes (CD3) sowie gleichzeitiger Kostimulation von CD28 durch entsprechende Antikörper eine intrazelluläre Reaktionskaskade auszulösen. Das Ziel dabei ist, polyklonale T-Helferzellen zur Polarisierung anzuregen.

48-Loch-Mikrotiterplatten wurden hierfür zunächst für 24 h bei 4-8 °C mit je 10 µg/ml α-CD3-Antikörpern (DRFZ, Berlin) und α-CD28- Antikörpern (MPI f. Infektionsbiologie, Berlin) bestückt. Anschließend wurde der Überstand zweimal mit PBS ausgewaschen. Für die antigenunspezifische Stimulation der T-Zellen wurden nun je $1,0\text{-}2,0 \cdot 10^6$ aufgereinigte $\text{CD4}^+\text{CD62L}^+$ Zellen pro Vertiefung in 1000 µl Kulturmedium für 72 h kultiviert. In Abhängigkeit vom Polarisierungsziel wurde ein entsprechendes Zytokinmilieu geschaffen und jeweils mit oder ohne Leptinpräinkubation kultiviert.

3.3.8 Antigenspezifische Stimulation

Ziel der antigenspezifischen Stimulation war, naive T-Helferzellen zur Polarisierung zu stimulieren. Hierfür wurden $\text{CD4}^+\text{CD62L}^+$ Zellen auf DO11.10 Hintergrund isoliert, die eine Transgenität für den α/β-T-Zellrezeptor aufweisen, der spezifisch $\text{OVA}_{(323-329)}$ -Peptid bindet.⁴⁸ Die Helferzellen sollten von APZ stimuliert werden, die jeweils Leptin-kompetent bzw. -defizient sind.

In unbehandelten 48-Loch-Mikrotiterplatten wurden $2,0 \cdot 10^6$ $\text{CD4}^+\text{CD62L}^+$ Helferzellen mit DO11.10 Hintergrund mit der gleichen Anzahl von entweder $\text{C57BL/6}^{ob/ob}$ Leptin-defizienten CD90.2^+ APZ oder C57BL/6 Wildtypzellen inkubiert. Als Antigen diente entweder 5 µg/ml $\text{OVA}_{(323-329)}$ -Peptid (Institut für Biochemie, HU-Berlin) oder Ovalbumin (Sigma-Aldrich, München). Die Kultivierung lief jeweils über 5 Tage. Ovalbumin muss im Gegensatz zum OVA-Peptid vor der Antigenpräsentation durch die APZ internalisiert und prozessiert werden. Je nach gewünschter Polarisierung und Fragestellung wurde ein entsprechendes Zytokinmilieu geschaffen, sowie in Anwesenheit von Leptin kultiviert.

3.3.9 Polarisierung

Th1-Zellen wurden generiert, indem im Zellkulturmedium ein Milieu mit 5 µg/ml α-IL-4-Antikörpern (DRFZ, Berlin) und 20 ng/ml IL-12 (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt) geschaffen wurde. Th2-Zellen wurden mit Hilfe von je 10 µg/ml α-IFNγ- (DRFZ, Berlin) sowie 10 µg/ml α-IL-12-Antikörpern (DRFZ, Berlin) und 30 ng/ml IL-4 (R&D Systems) polarisiert.

Absichtlich unpolarisiert belassene Helferzellen wurden in Abwesenheit von zusätzlichen Zytokinen und Antikörpern stimuliert. Sämtliche Polarisierungsexperimente wurden mit und ohne einstündige Präinkubation von 10 ng/ml, 100 ng/ml oder 1000 ng/ml Leptin durchgeführt.

3.3.10 Bestimmung der Zellproliferation mittels CFSE

Der membrangängige Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidylester (CFDA-SE) bindet an freie Amine zytoplasmatischer Proteine. Nach der Bindung erfährt es durch Abspaltung von Acetatgruppen durch intrazelluläre Esterasen eine Umwandlung in den fluoreszierenden Carboxyfluorescein Succinimidylester (CFSE), dessen Membrangängigkeit herabgesetzt ist. Wird eine initiale Zellpopulation mit CFSE angefärbt hat sie eine gewisse Fluoreszenzintensität. Da CFSE nach Veresterung nur schlecht aus den Zellen diffundiert, bleibt dessen Fluoreszenzintensität über die Zeit kaum verändert. Wenn sich die Zellen allerdings teilen, vermindert sich diese Intensität pro Zelle jeweils um die Hälfte pro Teilungsvorgang. Die Abnahme lässt sich in der Durchflusszytometrie darstellen und anhand der Intensitätsverteilung die Anzahl der proliferierenden Zellen berechnen. Zur Markierung mit CFDA-SE wurden die Zellen bei einer Konzentration von $1,0 \cdot 10^7$ Zellen/ml in PBS mit 0,1 % BSA gelöst. 5 µl der vorgegebenen CFDA-SE-Stocklösung (Invitrogen, Karlsruhe) wurde in 495 µl 0,1 % PBS / BSA verdünnt. Von der so hergestellten Verdünnung wurden anschließend 100 µl auf 1 ml Zellsuspension in einem 50 ml Verschlussröhrchen bei 37 °C für 10 min inkubiert. Anschließend wurde das Verschlussröhrchen zweimal nacheinander mit 0,1 % PBS / BSA gefüllt, bei 400 g für 7 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde zu-

Material und Methoden

letzt in 0,5 % PBS / BSA bei einer Zellkonzentration von $1,0 \cdot 10^7$ Zellen/ml gelöst. Dieser Vorgang musste direkt vor der Stimulation erfolgen. Die Auswertung wurde anschließend durchflusszytometrisch vorgenommen. Der Anteil an Zellen, die sich in Teilung befanden, wurde softwaregestützt ermittelt (FlowJo, Tree Star; Ashland, USA)

3.3.11 Bestimmung der Apoptoserate anhand von Annexin V

Annexin V ist ein Phospholipid-bindendes Protein. Während der Apoptose wird Phosphatidylserin von der Zellinnenseite nach außen gekehrt, sodass Annexin V daran binden und somit sicher eine Apoptose nachweisen kann. Das verwendete Annexin V ist in den vorliegenden Versuchen an FITC gekoppelt und kann im Durchflusszytometer detektiert werden.

Zur Markierung mit Annexin V wurden ca. $1,0-2,0 \cdot 10^7$ Zellen in 50 μ l Annexin V Binding-Buffer (BD Pharmingen) gelöst und für 15 min bei Raumtemperatur mit einer Verdünnung von 1:200 mit Annexin V FITC Stocklösung (BD Pharmingen) inkubiert. Die Lösung wurde anschließend mit Annexin V Binding-Buffer auf 200 μ l aufgefüllt und mit 1 μ l 20 % Propidiumjodid (PI)-Lösung (AppliChem) versetzt. Die Anzahl Annexin V und PI doppelt positiver Zellen wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Propidiumjodid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in permeabilisierten Zellen im Zellkern mit der DNA interagiert. Während der Apoptose kommt es zur DNA-Fragmentierung, diese Fragmente können somit sichtbar gemacht werden.

3.3.12 Intrazelluläre Zytokinmarkierung

Vor der Färbung wurden die Zellen initial mit 1 μ g/ml Ionomycin (Sigma-Aldrich) sowie 100 ng/ml Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA, Sigma-Aldrich) für 2 h im Brutschrank zur Produktion von Zytokinen angeregt. Anschließend wurde die Inkubation für weitere 2 h nach Applikation von 3 μ M Monensin (Sigma-Aldrich) fortgeführt. Monensin hemmt den intrazellulären Proteintransport, sodass nach der beschriebenen Prozedur eine erhöhte intrazelluläre Zytokinkonzentration zu erwarten war. Um die Zellen anschließend für die intrazelluläre Färbung zugänglich zu machen, wurden je $1,0-2,0 \cdot 10^7$ Zellen

Material und Methoden

mehrmals in PBS / BSA gewaschen. Die Zellen wurden danach für 5 min bei 37 °C in 50 µl 4 % Formalin-Lösung (AppliChem) inkubiert. Dadurch wurden die Zellproteine vernetzt und lösliche Antigene in ihrer Mobilität eingeschränkt. Die Zellsuspension wurde mit 200 µl Formalin aufgefüllt und gewaschen. Es folgten mehrmaliges Waschen mit reinem PBS / BSA um restliche Proteine aus der Suspension zu entfernen. Dieser Vorgang wird als Zellfixation bezeichnet. Zur intrazellulären Markierung wurden die Zellen in 50 µl Saponinlösung (Sigma-Aldrich, München) mit 1:50 α-IL-4-PE (BD Pharmingen) und 1:200 α-IFN-γ-APC (BD Pharmingen) Antikörperstock für 25 min bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss gelöst. Saponin bildet Octamere in der Zellmembran und macht sie so durchlässig für die Antikörper. Um die Membran wieder zu verschließen sowie nicht gebundene Antikörper zu lösen, wurden die Zellen mehrmals in PBS / BSA-Puffer gewaschen.

3.3.13 Durchflusszytometrische Auswertung

Zellen, die sich in Suspension befinden, werden in der durchflusszytometrischen Analyse an einem Laser vorbeigeführt. In Abhängigkeit vom Zelltyp sowie der Präparation dieser Zellen werden charakteristische Sekundärsignale emittiert und durch Detektoren nachgewiesen. Im ersten Schritt werden die Zellen aus dem Probenbehältnis in das System eingesogen. Anschließend erfolgt eine sog. hydrodynamische Fokussierung: Durch eine laminare Strömung wird der Abstand jeder Zelle im System derart vergrößert, dass nur eine Zelle pro Zeiteinheit den Lichtfokus des Lasers passiert. Für die durchflusszytometrische Analyse wurde ein FACS Calibur (Beckton-Dickinson, San Jose, USA) mit einem Argonlaser (Wellenlänge 488 nm) sowie einem zweitem Diodenlaser (Wellenlänge 635 nm) verwendet. Durch die Detektionsoptik können in dem vorliegenden Gerät verschiedene Parameter simultan gemessen werden. Die Lichtbeugung (Forward scatter, FSC) wird entlang der Achse des einfallenden Lasers gemessen und ist proportional zur Zellgröße. Die Lichtbrechung und Reflexion (Sideward scatter, SSC) wird im rechten Winkel zum einfallenden Licht detektiert und ist proportional zur Zellgranularität. Die Fluoreszenzen (FL1, FL2, FL3) sind von der Probenvorbereitung abhängig, z. B. von der Markierung mit Fluorochromen. Hierbei unterscheiden sich die verschiedenen Emissionsmaxima in Abhängigkeit vom Fluorochrom.

Material und Methoden

Die Stärke und Dichte der über Detektoren empfangenen Signalimpulse werden per Software verarbeitet und in der Regel grafisch dargestellt. Hier können durch Wahl der Detektoren und Einstellung von sog. "Gates" Subpopulationen für analytische Zwecke dargestellt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich zweidimensionale Punktdiagramme dargestellt, in denen je eine Zelle einen Punkt darstellt.

Fluoreszenzkanal	Farbstoff	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
FL1	Fluoreszini- sothiocyanat (FITC)	495 nm	519 nm
FL2	Phycoerythrin (PE)	480 nm/565 nm	578 nm
FL3	Propidiumjodid (PI)	536 nm	617nm
FL4	Allophycocyanin (APC)	650 nm	660 nm

Tabelle 7 Darstellung der Emissionsmaxima einzelner Fluoreszenzfarbstoffe der Durchflusszytometrie

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation wurde mit Hilfe von TriFast (Peqlab, Erlangen) vorgenommen. Dies ist eine kommerzielle Methode, die auf der Einschnitt-Flüssigphasen-Separation beruht. Zur Isolation der RNA wurden ca. $2,0 \cdot 10^6$ naive T-Zellen in jeweils 500 μ l peqGold TriFast (Peqlab, Erlangen) lysiert, indem die Suspension mehrmals mit einer Pipette aufgesogen und anschließend für 24 h bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren wurde. Nach dem Auftauen wurden den Proben je 100 μ l Chloroform (Sigma-Aldrich, München) zugefügt. Die Proben mussten anschließend für ca. 15 Sekunden geschüttelt werden und danach für 3 min ruhen. Darauf folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 12000 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Das ursprüngliche Homogenat wurde dabei in drei Phasen aufgetrennt: eine obere wässrige Phase, die RNA enthielt, eine Interphase mit überwiegend DNA und eine untere organische Phase, die außer DNA auch noch Proteine enthielt. Zur Weiterbearbeitung wurde einzig der wässrige Überstand vorsichtig entnommen und in 250 μ l Isopropanol (Carl Roth, Karlsruhe) und 0,8 μ l Glykogen (Sigma-Aldrich) gelöst. Um die RNA ausfällen zu lassen, wurde die Lösung daraufhin für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 15 min bei 12000 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml 70 % Ethanol (Carl Roth) überführt und für 5 min bei 12000 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Diese Prozedur wurde einmal wiederholt. Das Pellet wurde luftgetrocknet und zuletzt in 20 μ l Wasser gelöst und für 10 min bei $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

3.4.2 Reverse Transkription

RNA kann nicht direkt durch die PCR amplifiziert werden. Deshalb muss sie initial in DNA umgeschrieben werden. Dieser Schritt wird durch die Reverse Transkriptase (RT) des Moloney-Murine-Leukemia-Virus (M-MLV) ermöglicht. Zur RNA wird in Anwesenheit eines Primers ein komplementärer DNA-Strang synthetisiert, die sogenannte cDNA. Dazu wurde zunächst die eventuell noch vorhandene DNA durch DNase I (Invitrogen,

Material und Methoden

Karlsruhe) für 20 min bei Raumtemperatur gespalten. Hierzu wurden für je 20 µl RNA ein Ansatz aus 2,5 µl DNase Puffer (Invitrogen, Karlsruhe), 1,5 µl Aqua dest. sowie 1 µl DNase I inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden 2,5 µl Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Sigma-Aldrich) zugegeben und die Proben für 10 min bei 65°C inkubiert. In ein nukleasefreies Mikrozentrifugen-Röhrchen wurden im Folgenden hinzugefügt:

Substanz	Volumen	Hersteller
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈	2 µl	Invitrogen
Proben-RNA	5 µg	
Desoxynukleosidtriphosphat-Mischung (10 nM dNTP-Mix)	4 µl	Invitrogen
Aqua dest	20,5 µl	Fresenius Kabi, Bad Homburg

Tabelle 8 Reverse Transkription 1

Oligo(dT)-Primer sind für die cDNA Synthese anhand der RT essenziell, sie hybridisieren mit der vorliegenden mRNA. Der dNTP-Mix stellt alle vier Nukleotidbausteine in 2'-Desoxynukleosid 5'-Triphosphat-Form bereit: Desoxyadenosintriphosphat (dATP), Desoxycytidintriphosphat (dCTP), Desoxyguanosintriphosphat (dGTP), Desoxythymidintriphosphat (dTTP). Die Mischung wurde in 65 °C für 5 min inkubiert und anschließend zügig auf Eis gekühlt. Anschließend wurde folgendes hinzugegeben:

Substanz	Volumen	Hersteller
5x First-strand-Buffer	16 µl	Invitrogen
Dithiothreitol (DTT; 0,1 M)	8 µl	Invitrogen
RNAseOUT	1 µl	Invitrogen

Tabelle 9 Reverse Transkription 2

Material und Methoden

Der Inhalt der Zentrifugenröhrchen wurde vorsichtig mit dem Vortex-Mischer vermischt und für 2 min bei 37°C inkubiert.

Zuletzt wurde 1 µl M-MLV RT (Invitrogen, Karlsruhe) appliziert. Optimale Reaktionsbedingungen wurden für 50 min bei 37°C und danach für 15 min bei 70°C geschaffen. Die hergestellte cDNA konnte im nächsten Schritt für die Polymerase-Kettenreaktion verwendet werden.

3.4.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase-Chainreaction, PCR) wird verwendet um kurze, definierte Abschnitte einer DNA zu amplifizieren. Die Reaktion verläuft in drei Schritten. Komplementäre DNA-Stränge werden im ersten Schritt für ca. 3 min auf 95°C erhitzt. Dadurch werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Strängen reversibel gelöst. Diesen Vorgang bezeichnet man als Denaturierung. Annealing bezeichnet man die zweite Phase, in der sich die gewählten vorwärts (forward) und rückwärts (reverse) Primer bei einer niedrigeren Temperatur anlagern. Die Synthese zweier neuer Doppelstränge erfolgt mit Hilfe der thermostabilen DNA-Polymerase, Taq-DNA-Polymerase, des Bakteriums *Thermophilus aquaticus*. Werden die drei beschriebenen Schritte wiederholt, erhält man eine selektive Amplifikation gewünschter DNA-Sequenzen. Um einen Vergleich zur synthetisierten Gesamtmenge zu gewinnen, wurde die PCR des OB-R_b parallel zur PCR von konstitutionell exprimierter Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) durchgeführt.

Im einfachen 50 µl PCR - Ansatz wurden die nötigen Substanzen nach der unten abgebildeten *Tabelle 10* zusammengestellt. Die Proben durchliefen 40 PCR-Zyklen des automatisierten Programmes des T3000 Thermocyclers (Biometra, Göttingen). Hierzu durchliefen die Proben jeweils einminütige Phasen eines Denaturierungszyklus von 94°C, eines Hybridisierungszyklus bei 60 °C gefolgt von 72 °C der Amplifikation. Für jede PCR wurde je eine Negativkontrolle (Aqua dest.) und eine DNA-Positivkontrolle (Leberparenchym von C57BL/6) durchgeführt.

Substanz	Volumen	Hersteller
Aqua dest.	26,8 µl	Fresenius Kabi
cDNA	5 µl	
Green GoTaq Flexi Puffer	10 µl	Promega (Mannheim)
Magnesiumchlorid (25nM)	5 µl	Promega (Mannheim)
dNTP (10nM)	1,0 µl	Carl Roth (Karlsruhe)
Taq-DNA-Polymerase	0,2 µl	Promega (Mannheim)
Forward Primer (50 µM)	1,0 µl	TIP MOLBIOL (Berlin)
Reverse Primer (50 µM)	1,0 µl	TIP MOLBIOL

Tabelle 10 Ansatz für die PCR

3.4.4 Gelelektrophorese

Die qualitative Überprüfung der amplifizierten DNA wurde durch eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. 2 g Agarose (Carl Roth) wurden in 100 ml Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE, Genaxxon, Ulm) durch Erhitzen auf 100 °C gelöst und mit 10 µl Ethidiumbromid (Carl Roth) versetzt. Es folgte die Auspolymerisierung in der Gelkammer. Die Taschen wurden mit je 15 µl Probe beladen. Als Vergleich wurde eine weitere Tasche mit einer Negativkontrolle beladen. Die Elektrophorese erfolgte für 45 min bei 80 V in TAE-Pufferlösung. Nach der Auftrennung konnten die DNA-Fragmente anhand des fluoreszierenden Ethidiumbromids im UV-Licht sichtbar gemacht werden.

3.5 Statistik

Zur Vorbereitung der Auswertung wurden jeweils die arithmetischen Mittelwerte der ermittelten Daten gebildet. Es folgte ferner die Berechnung der Standardabweichungen und der Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of mean*, SEM).

Die Signifikanzen der unterschiedlich behandelten Zellpopulationen wurden anhand von gepaarten zweiseitigen t-Tests mit Hilfe von PRISM (Version 4.00 for Windows; Graph-Pad Software, San Diego, USA) errechnet. Ein p-Wert größer 0,05 wurde als nicht-signifikanter Unterschied zwischen den zu vergleichenden Stichproben gewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Nachweis des OB-R_b mittels PCR

Die Wirkung des Proteohormons Leptin auf Zellen erfolgt über eine klassische Rezeptor-Liganden-Bindung. Als bisher einzig bekannte funktionelle Isoform des Rezeptors wird der OB-R_b auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert. Mittels PCR erfolgte in dieser Arbeit der Nachweis von OB-R_b-mRNA in T-Lymphozyten. Als Positivkontrolle wurden von C57BL6 Mäusen stammende Leberparenchymzellen eingesetzt.

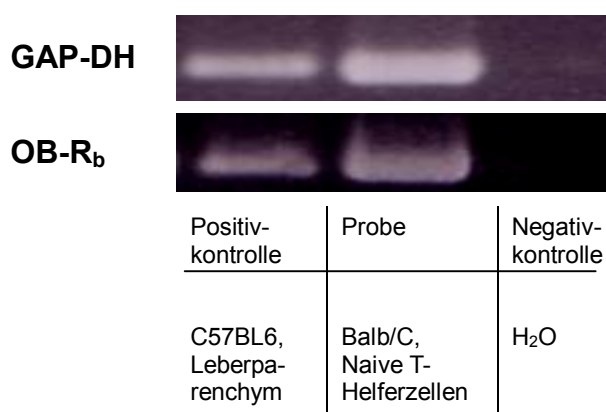


Abbildung 5 Gelelektrophorese

Dargestellt ist die Expression von mRNA der langen Isoform OB-R_b in Bezug auf die Expression von GAP-DH.

4.2 Zellseparation mittels MACS

Ein hoher Grad an Aufreinigung von naiven T-Lymphozyten war eine notwendige Voraussetzung, um die Versuche unter den gewünschten Polarisierungsbedingungen durchführen zu können. Diese wurde mit Hilfe der MACS-Zellseparation nach den Zielantigenen CD4 und CD62L erreicht.

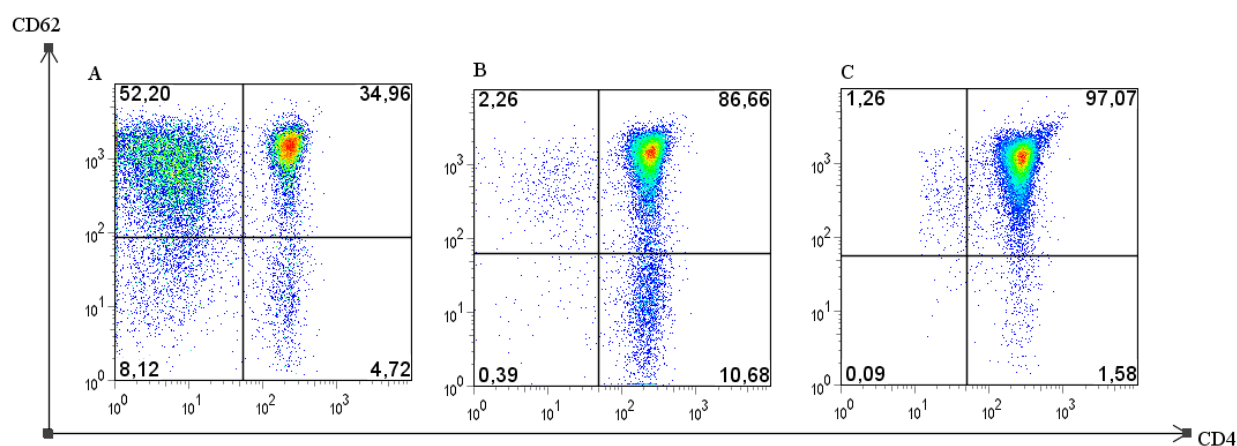


Abbildung 6 Exemplarische Darstellung einer Zellseparation von CD4⁺CD62L⁺ naiven T-Helfer-Zellen
Durchflusszytometrische Bestimmung der Reinheit der naiven T-Zellen nach CD4-FITC und CD62L-PE Doppel-färbung: Von (A) zu (B) erfolgte die CD4⁺ Positivselektion; die Reinheit CD4⁺CD62L⁺ Zellen stieg von 34,96% auf 86,66% gemessen an der Gesamtpopulation. Die CD62L⁺ Positivselektion erfolgte von (B) zu (C) mit einer endgültigen Reinheit an naiven T-Helfer-Zellen von 97,07%.

Das hohe Niveau der Zellseparation konnte für alle Stimulationsversuche hinweg sicher aufrechterhalten werden. Im Median lagen die Zellseparationen bei einem Wert von 97,3 % CD4⁺CD62L⁺ doppelt positiven Zellen. 25 % der Stimulationen sind mit einer Reinheit an naiven T-Lymphozyten bis zu einem Wert von 96,5 % und 75 % mit einer Reinheit von bis zu 97,4 % durchgeführt worden.

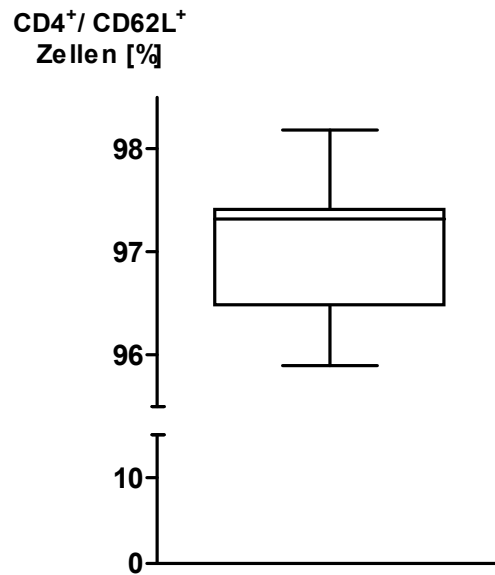


Abbildung 7 Darstellung der Reinheit naiver T-Helferzellen nach MACS im Boxplot

Der Median liegt bei einem Wert von 97,3 %. Die 75. Perzentile ist bei 96,5 % und die 25. Perzentile bei 97,4 %. Das Maximum betrug 98,2 %. Die minimale Zellreinheit betrug 95,9 %. Es handelt sich um eine Darstellung von zehn Versuchsansätzen.

4.3 Antigenunspezifische Stimulation

4.3.1 Einfluss von Leptin auf unpolarisierte T-Lymphozyten

Naive T-Helferzellen zeigen bereits nach alleiniger Antigenstimulation eine Tendenz zur Th1-Polarisierung. Die Wirkung von Leptin auf diesen Prozess wurde in folgendem Versuch untersucht. Hierzu wurden aufgereinigte naive T-Helferzellen für 1 h in An- und Abwesenheit von Leptin präinkubiert und anschließend antigenunspezifisch stimuliert, ohne experimentell ein bestimmtes Zytokinmilieu zu erzeugen.

Nach 72 h zeigten die naiven Zellen eine Tendenz zu $4,83 \pm 0,64$ % IFN- γ zu produzieren. Die Zugabe von 1 $\mu\text{g/ml}$ Leptin erhöhte die Anzahl IFN- γ produzierender Zellen signifikant auf $5,62 \pm 0,51$ % ($p < 0,05$; $n = 10$ Versuchsansätze).

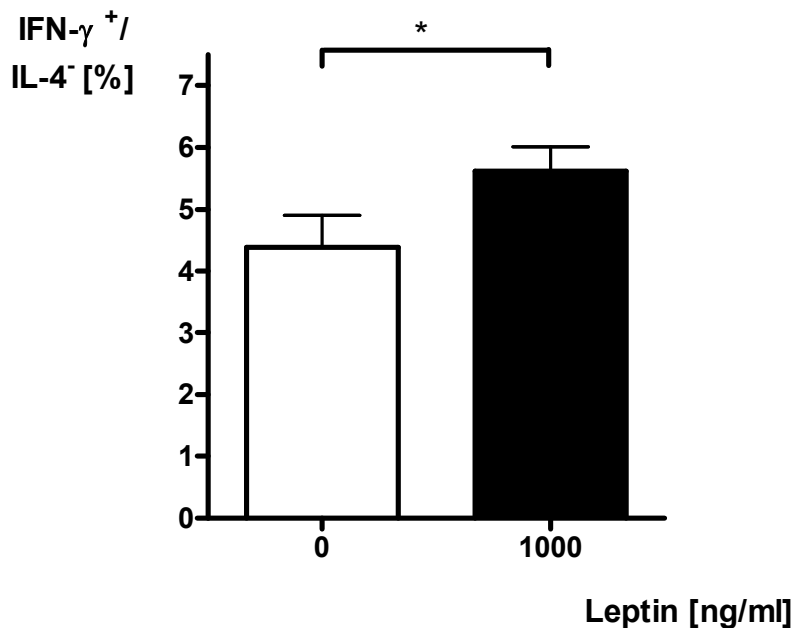


Abbildung 8 Tendenz zur Th1-Polarisierung naiver T-Zellen unter antigenunspezifischen Bedingungen

Durch Anwesenheit von Leptin im polarisationsneutralem Milieu zeigt sich eine vermehrte IFN- γ Sekretion. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM von zehn Versuchsansätzen dargestellt.

Ergebnisse

4.3.2 Einfluss von Leptin auf die Th1-Polarisierung

Naive T-Helferzellen wurden unter Th1-polarisierenden Bedingungen für 72 h unter antigenunspezifischer Stimulation polarisiert, nachdem sie für 1 h in An- oder Abwesenheit von Leptin präinkubiert wurden. Die basale Polarisierungsrate ohne den Einfluss von Leptin betrug $9,78 \pm 1,62$ %. Die Präinkubation mit Leptin führte zu einem signifikanten Anstieg der IFN- γ Produzenten auf $11,8 \pm 1,99$ % ($n=10$ Versuchsansätze, $p<0,005$).

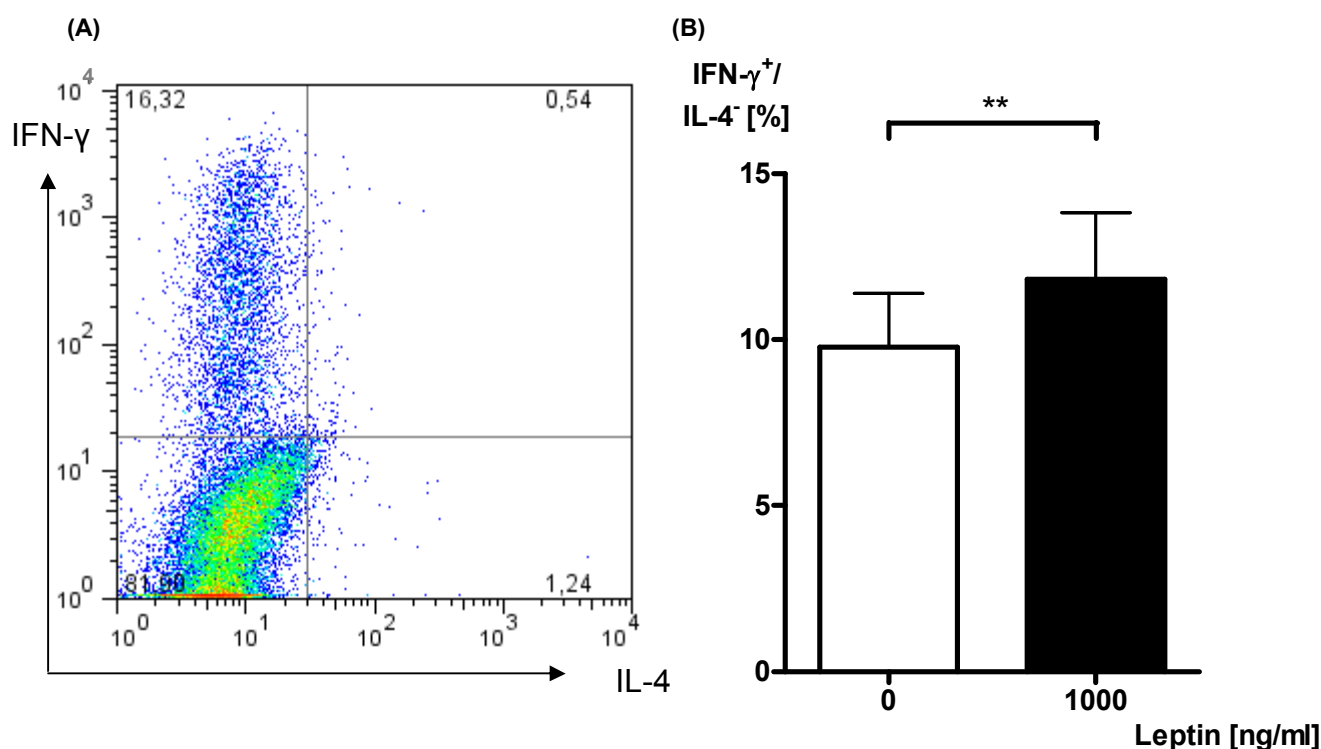


Abbildung 9 Vermehrte IFN- γ Produktion unter Einfluss von Leptin

(A) Exemplarische Darstellung einer durchflusszytometrischen Bestimmung des Anteils Th1 polarisierter T-Helferzellen (hier: 16,3 %) durch intrazelluläre Anfärbung IFN- γ^+ /IL-4 $^-$ Zellen. (B) Anstieg Th1-polarisierender Zellen durch Anwesenheit von 1 $\mu\text{g/ml}$ Leptin unter Th1-polarisierenden antigenunspezifischen Bedingungen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM von zehn Versuchsansätzen dargestellt.

4.3.3 Einfluss von Leptin auf die Th2-Polarisierung

Nach einstündiger Präinkubation mit Leptin wurden naive T-Helferzellen im Th2-polarisierenden Milieu für 72 h antigenunspezifisch stimuliert. Die Inkubation mit Leptin bewirkte eine Verringerung der IL-4 produzierenden Zellen von $3,81 \pm 0,56$ % auf $2,97 \pm 0,49$ %. Die durch Leptin induzierte Suppression von Th2-Zellen konnte unter polarisierenden Bedingungen gezeigt werden ($n=23$ Versuchsansätze, $p<0,005$).

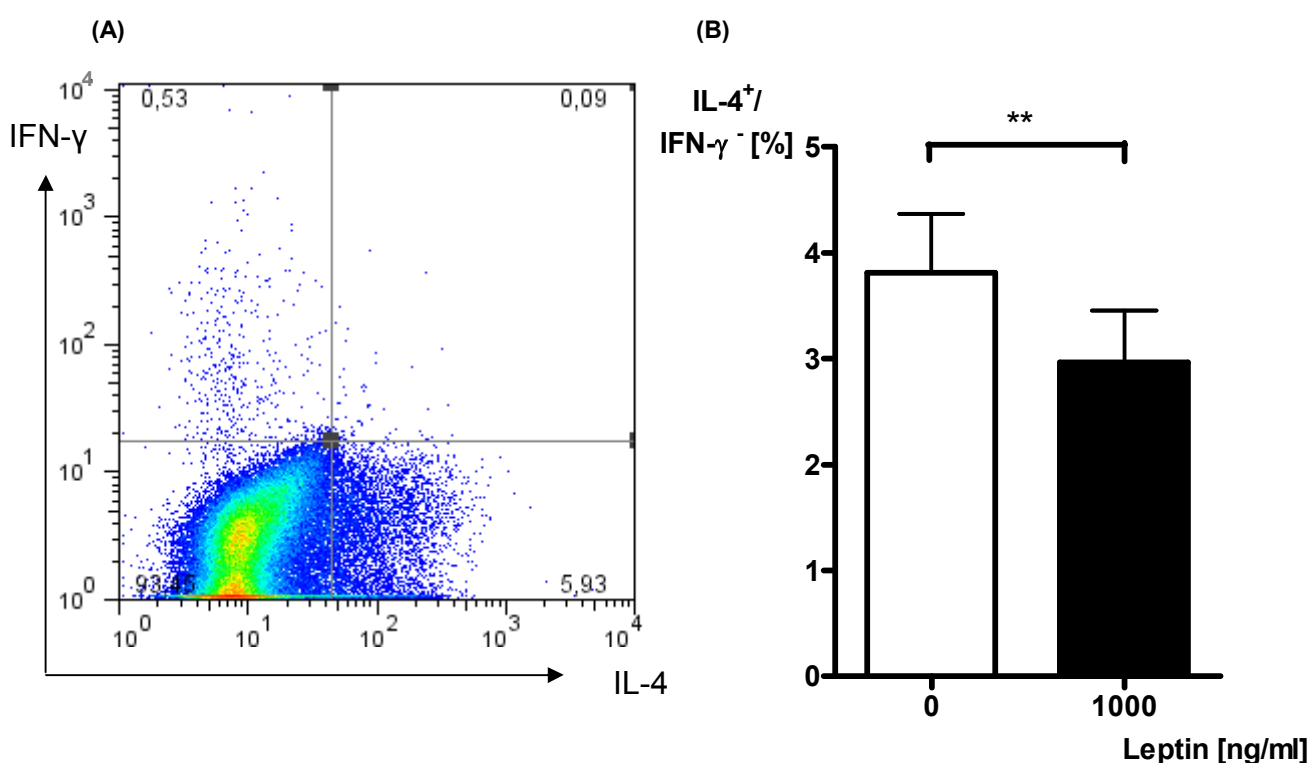


Abbildung 10 Inhibition der IL-4 Produktion durch Wirkung von Leptin

(A) Exemplarische Darstellung einer durchflusszytometrischen Bestimmung des Anteils Th2-polarisierter T-Helferzellen durch intrazelluläre Anfärbung IL-4⁺ / IFN- γ ⁻ Zellen (hier: 5,93 %). **(B)** Verringerung der Th2-Zellen durch Inkubation mit Leptin unter Th2-polarisierenden Bedingungen. Die Prozentzahl IL-4 produzierender Zellen wurde mittels intrazellulärer IL-4 Färbung bestimmt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM von 23 Versuchsansätzen dargestellt.

4.3.4 Einfluss von Leptin auf die Th2-Polarisierung nach Restimulation

Der inhibierende Effekt auf die Th2-Polarisierung ließ sich durch wiederholte antigenunspezifische Stimulationen verstärken. Hierzu wurden polarisierte Th2-Zellen nach 72-stündiger Inkubation erneut in An- oder Abwesenheit von Leptin stimuliert. Der Anteil IL-4 produzierender Zellen nahm mit jeder Restimulation zu. Im gleichen Maße wurde der Effekt der Th2-Hemmung mit jeder Stimulation deutlicher.

So hemmte die Anwesenheit von Leptin die IL-4 produzierenden Zellen in der ersten Restimulation von $4,44 \pm 0,7$ % auf $2,29 \pm 0,43$ % und nach der zweiten Restimulation von $14,5 \pm 3,81$ % auf $8,81 \pm 1,6$ %. Nach dreimaliger Restimulation schließlich wurde der Anteil an IL-4 Produzenten von $17,5 \pm 2,54$ % auf $9,49 \pm 2,20$ % supprimiert. Dieser hemmende Effekt war in jeder Restimulation signifikant ($n=3$ Versuchsansätze, $p<0,05$).

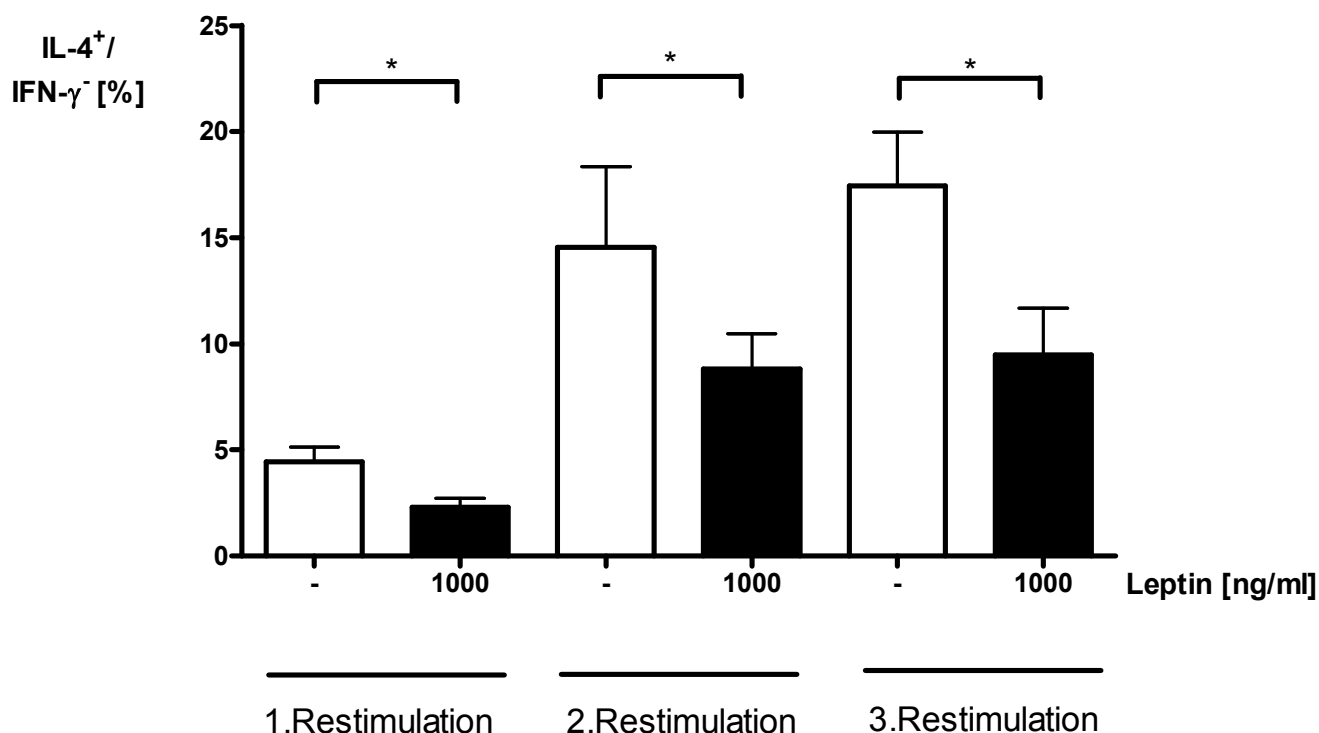


Abbildung 11 Einfluss von Leptin auf die IL-4 Produktion nach mehrmaliger antigenunspezifischer Stimulation

Die Prozentzahl IL-4 produzierender Zellen wurde mittels intrazellulärer IL-4 Färbung bestimmt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM von je drei Versuchsansätzen dargestellt.

4.4 Stimulation von *ob/ob* Lymphozyten

4.4.1 Einfluss von Leptin auf die Th1-Polarisierung von *ob/ob* Zellen

Naive C57BL/6^{*ob/ob*} T-Helferzellen wurden wie auch deren C57BL/6-Wildtyp (WT) unter Th1-polarisierenden Bedingungen für 72 h unter antigenunspezifischer Stimulation polarisiert, nachdem sie vorher für 1 h in An- und Abwesenheit von Leptin präinkubiert wurden. Die intrazelluläre Zytokinexpression wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Sowohl die WT-Zellen ($8,49 \pm 0,49$ % Kontrolle; $12,62 \pm 0,33$ % unter $1 \mu\text{g/ml}$ Leptin) als auch die *ob/ob* Zellen ($5,92 \pm 0,56$ % Leerkontrolle; $8,41 \pm 0,29$ % unter $1 \mu\text{g/ml}$ Leptin) polarisierten vermehrt zugunsten von Th1 unter Anwesenheit von Leptin ($n=3$, $p<0,05$). Gleichzeitig war zu beobachten, dass die *ob/ob* Zellreihe eine signifikant geringere Polarisierungsrate im Vergleich zum WT sowohl in Anwesenheit (WT: $12,62 \pm 0,33$ %; *ob/ob*: $8,41 \pm 0,29$ %; $p<0,05$) als auch in Abwesenheit von Leptin (WT: $8,49 \pm 0,49$ %; *ob/ob*: $5,92 \pm 0,56$ % ; $p<0,05$) aufwies.

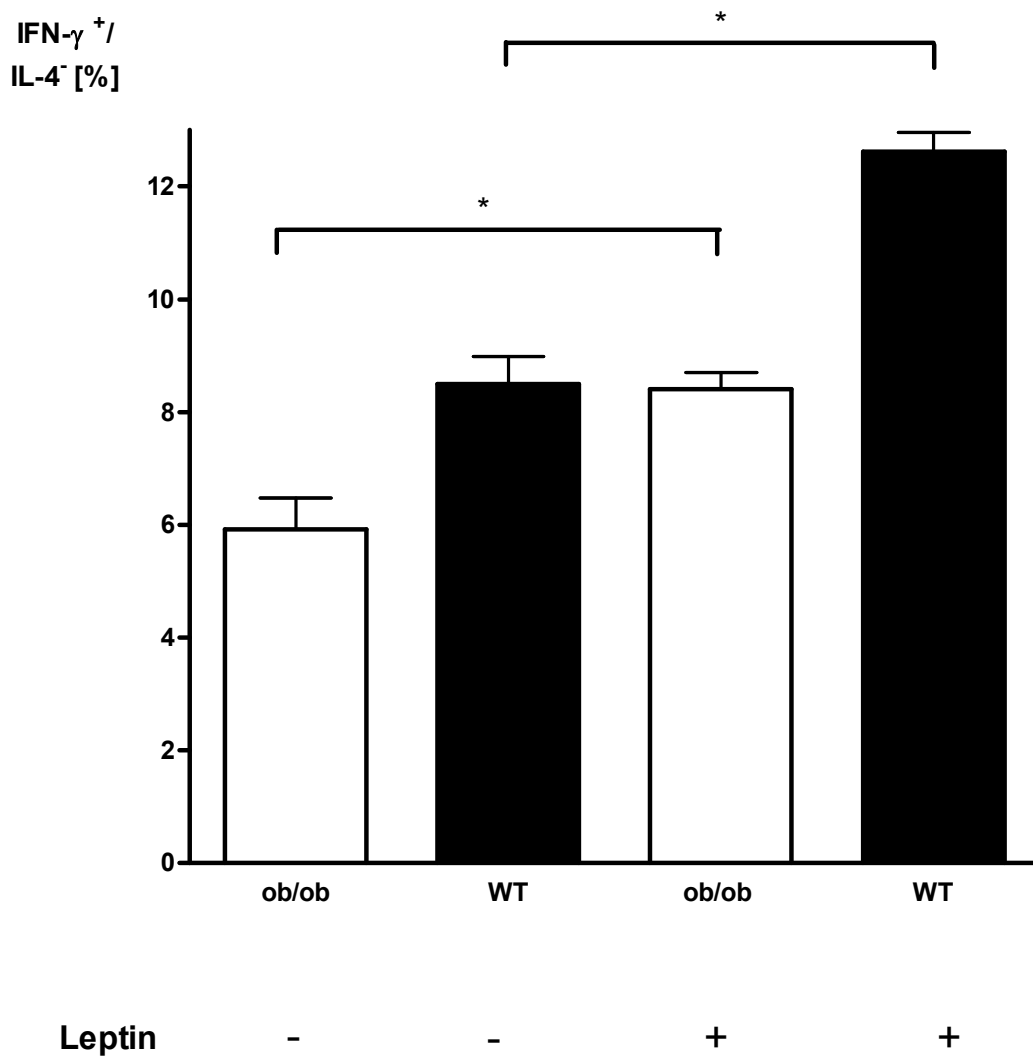


Abbildung 12 Einfluss von Leptin auf *ob/ob* Th1-Lymphozyten

Die Polarisierung verläuft zugunsten von Th1 bei *ob/ob* als auch WT-Zellen durch Inkubation mit 1 μ g/ml Leptin unter Th1-polarisierenden Bedingungen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM von drei Versuchsansätzen dargestellt.

4.4.2 Einfluss von Leptin auf die Th2-Polarisierung von *ob/ob* Zellen

Nach einstündiger Präinkubation mit Leptin wurden naive *ob/ob* sowie deren WT im Th2-polarisierenden Milieu für 72 h antigenunspezifisch stimuliert. Die Inkubation mit Leptin bewirkte eine signifikante Supprimierung der Th2 *ob/ob* Zellen ($16,4 \pm 0,37$ % Kontrolle; $14,61 \pm 0,29$ % bei $1 \mu\text{g/ml}$ Leptin, $n=3$, $p<0,05$). Die leptinabhängige Reduktion von Th2-Zellen war bei WT in diesem Versuchsansatz nicht im signifikanten Bereich.

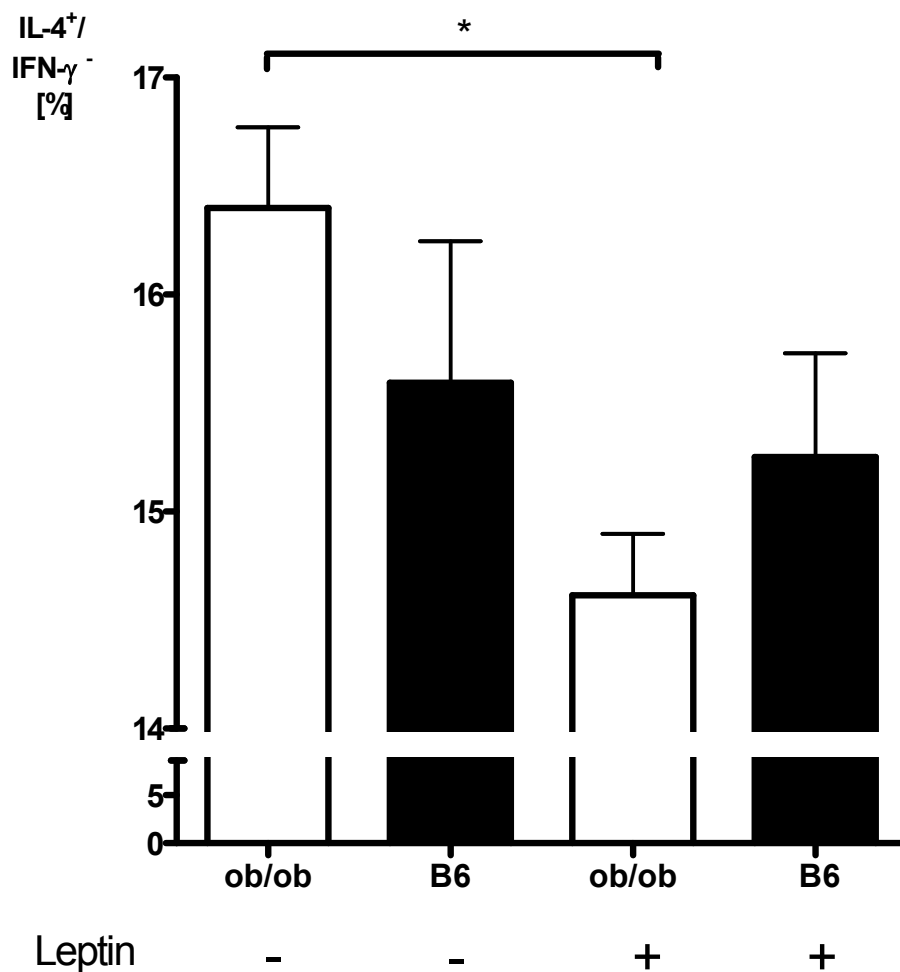


Abbildung 13 Einfluss von Leptin auf die Th2 Polarisierung von *ob/ob*- Zellen
 Unter Einwirkung von $1 \mu\text{g/ml}$ Leptin zeigte sich eine verminderte Tendenz zur IL-4 Produktion unter den *ob/ob* Helferzellen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM von drei Versuchsansätzen dargestellt.

4.5 Zellproliferation

Der Einfluss von Leptin auf die Proliferation sollte anhand der Zellteilungsrate untersucht werden. Hierzu wurde die intrazelluläre Anfärbung der Zellmembranen mit CFSE gewählt. Vor der einstündigen Präinkubation mit Leptin wurden naive T-Helferzellen mit CFSE markiert. Es folgte eine 72-stündige antigenunspezifische Stimulation unter nicht-polarisierenden Bedingungen. Die Inkubation mit Leptin bewirkte einen signifikanten Anstieg des Anteils proliferierender Zellen von $72,75 \pm 0,69 \%$ ohne Leptin auf $80,64 \pm 2,72 \%$ ($n=5$ Versuchsansätze, $p<0,05$).

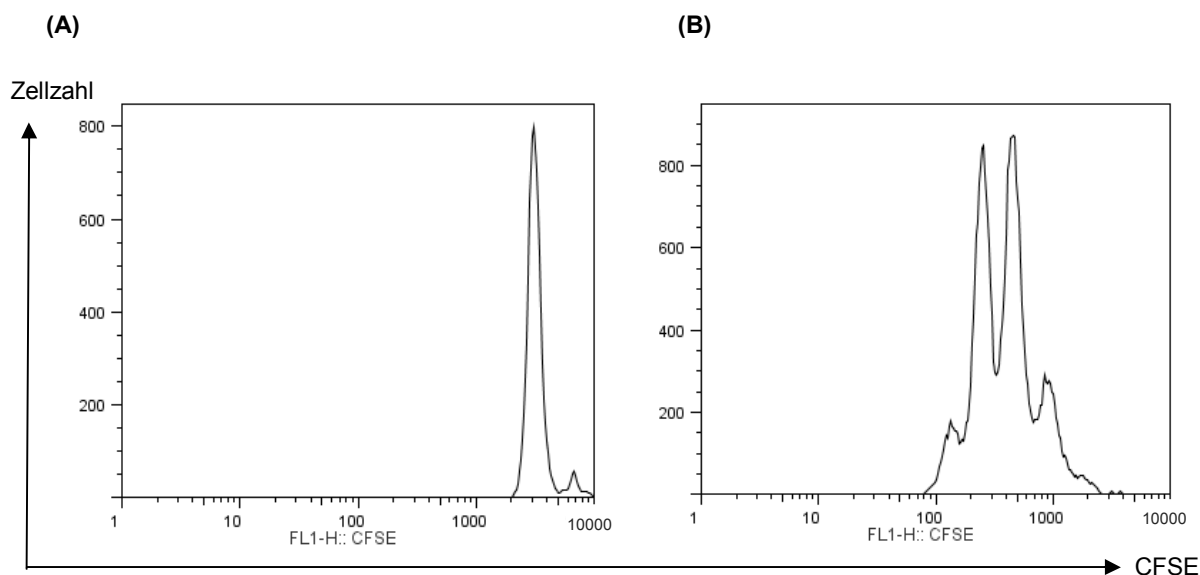


Abbildung 14 Histogrammische Darstellung der Zellproliferation anhand von intrazellulärer CFSE-Färbung

(A) Zum Zeitpunkt Null nach Färbung besitzen alle Zellen dieselbe Intensität. **(B)** Nach dreitägiger Inkubation unter den beschriebenen Stimulationsbedingungen waren durchflusszytometrisch mehrere Maxima im Histogramm darstellbar. Jedes Maximum entspricht einer Teilungsgeneration. Das Histogramm war insgesamt nach links verschoben, die Intensität der Maxima ist jeweils geringer als zu Beginn. Dies ist durch die Abnahme der Fluoreszenz pro Einzelzelle und Zellteilung begründet.

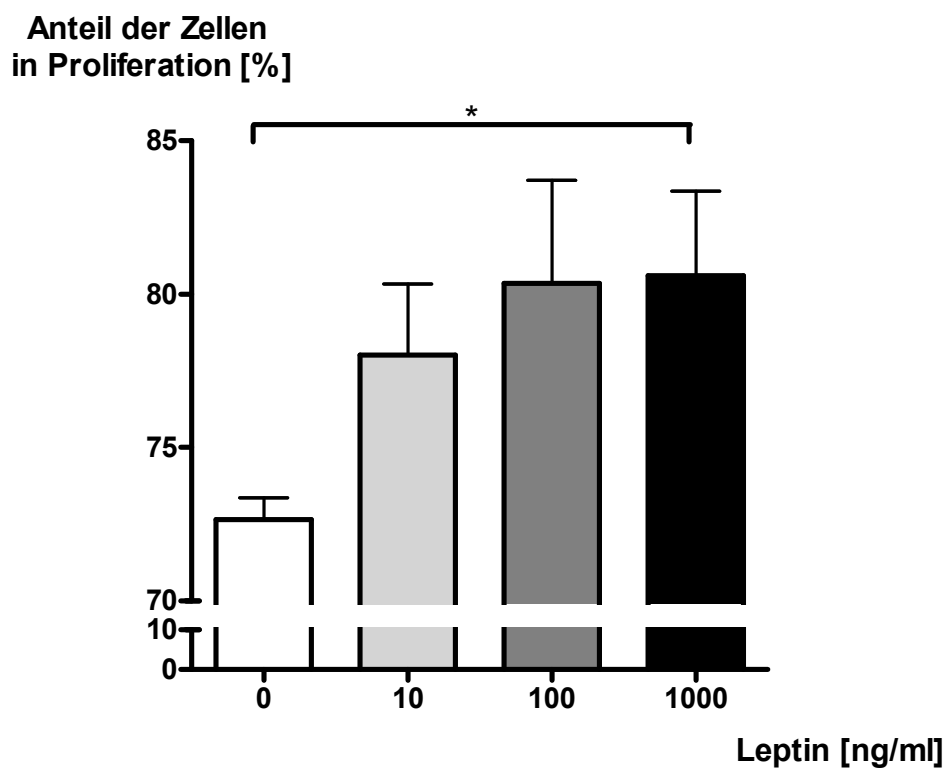


Abbildung 15 Konzentrationsabhängiger Anstieg der Proliferation von naiven T-Lymphozyten durch Leptin
Die Anzahl der proliferierten Zellen wurden anhand CFSE-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM von fünf Versuchsansätzen dargestellt.

4.6 Apoptose

4.6.1 Einfluss von Leptin unter antigenunspezifischer Stimulation

Die Apoptoserate in Abhängigkeit von Leptin wurde unter nicht-polarisierenden Bedingungen untersucht. Hierzu wurden naive T-Lymphozyten unter aufsteigenden Konzentrationen von Leptin (ohne Leptin, 10 und 1000 ng/ml) präinkubiert und anschließend 72 h antigenunspezifisch stimuliert. Es erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung des Prozentsatzes an Annexin V⁺/PI⁺ Zellen. Dieser Anteil wurde als apoptotisch untergegangener Zellverbund definiert. Unter nicht-polarisierenden Bedingungen zeigte sich kein Effekt von Leptin auf die Apoptose bei der Stimulation naiver T-Helferzellen. Die Apoptoserate blieb konstant bei $13,25 \pm 1,19$ % in Abwesenheit von Leptin und $13,82 \pm 0,74$ % unter Präinkubation mit 10 ng/ml Leptin sowie $13,33 \pm 0,88$ % mit 1 µg/ml Leptin (n=9 Versuchsansätze). Der Anteil an Annexin V⁻/PI⁺ Zellen blieb in allen Versuchen unverändert.

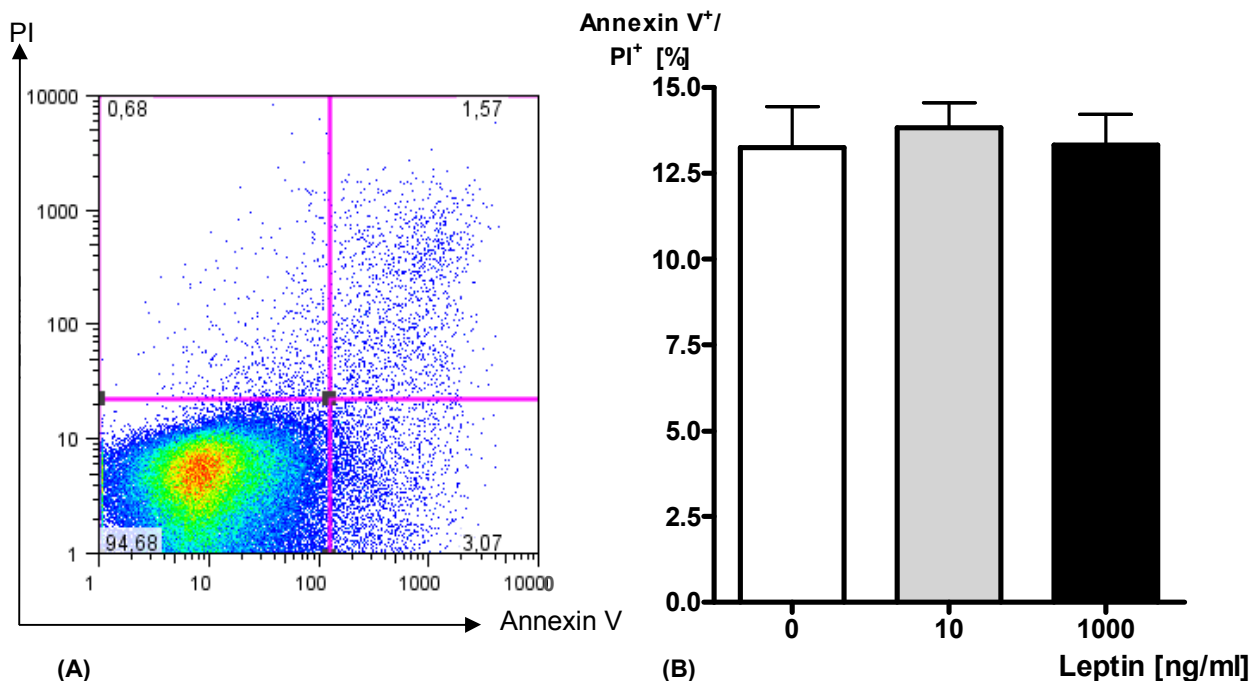


Abbildung 16 Apoptoserate unter antigenunspezifischer Stimulation

(A) Beispielhafte Darstellung von Annexin V⁺/PI⁺ Zellen in der Durchflusszytometrie (hier: 1,57 %). (B) Unveränderte Apoptoserate unter Leptineinfluss und nicht-polarisierenden Bedingungen. Nach Präinkubation und Stimulation wurden die Apoptoserate durchflusszytometrisch mittels Annexin V- und PI-Doppelfärbung bestimmt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM von neun Versuchsansätzen dargestellt.

4.6.2 Einfluss von Leptin bei Th1-Polarisierung

Naive T-Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen von Leptin (ohne Leptin, 10 und 1000 ng/ml) für 1 h präinkubiert und für 72 h antigenunspezifisch stimuliert und anschließend die Apoptoserate durchflusszytometrisch durch Annexin V/PI-Doppelfärbung bestimmt. Die Präinkubation der Zellen mit 10 ng/ml führte zur Vergleichsgruppe ohne Leptin zu keiner Veränderung der Apoptoserate. Allerdings zeigte sich eine signifikante Verminderung der Apoptoserate von basal $17,46 \pm 0,97$ % auf $12,34 \pm 0,81$ % nach Präinkubation mit $1 \mu\text{g/ml}$ Leptin ($p < 0,001$, $n=7$). Die Inkubation mit $1 \mu\text{g/ml}$ Leptin resultierte ferner in einer signifikant inhibierten Apoptose verglichen zur Inkubation mit geringerer Leptinkonzentration von 10 ng/ml, welche eine Apoptoserate von $18,20 \pm 1,80$ % aufwies ($n=7$ Versuchsansätze, $p < 0,05$). Der Anteil an Annexin V⁻/PI⁺ Zellen blieb in allen Versuchen unverändert.

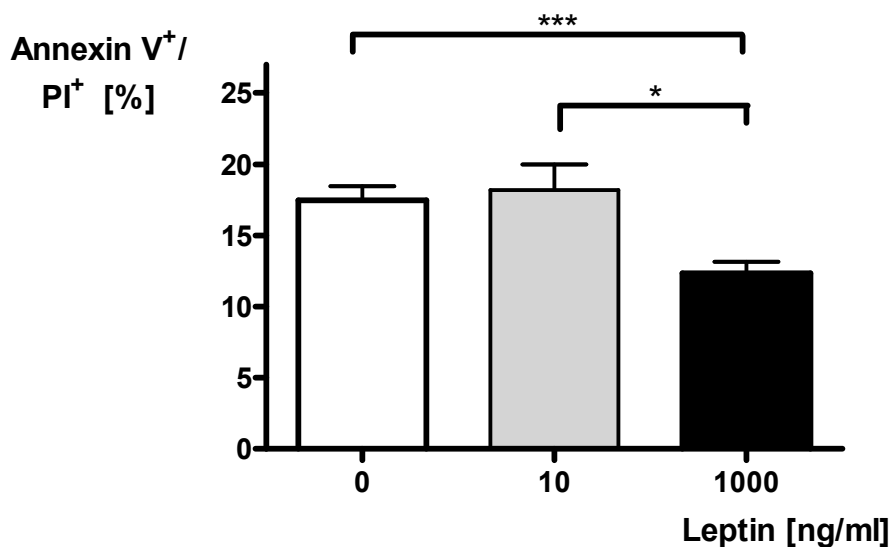


Abbildung 17 Konzentrationsabhängige Verringerung der Apoptoserate unter Th1-polarisierenden Bedingungen
Die Apoptoserate wurde durchflusszytometrisch durch Annexin V/ PI-Doppelfärbung bestimmt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM von sieben Versuchsansätzen dargestellt.

4.6.3 Einfluss von Leptin bei Th2-Polarisierung

Zur Untersuchung der Apoptosemodulation durch Leptin unter Th2-polarisierenden Bedingungen wurden naive T –Zellen mit unterschiedlichen Leptinkonzentrationen für 1 h inkubiert und anschließend im antigenunspezifischen System unter Th2-polarisierenden Bedingungen stimuliert. Die Apoptoserate wurde analog zur den Vorversuchen durchflusszytometrisch bestimmt. Der Anteil der apoptotischen Zellen blieb auch unter den verschiedenen Präinkubationskonditionen von 10 ng/ml Leptin bei $5,90 \pm 0,21$ % und $8,04 \pm 1,66$ % bei 1 μ g/ml im insignifikanten Niveau. Die basale Apoptoserate unter Th2-Polarisierung betrug $6,47 \pm 0,47$ %. Ein Effekt von Leptin auf die Apoptose konnte unter Th2-Polarisierung nicht nachgewiesen werden (n=7 Versuchsansätze).

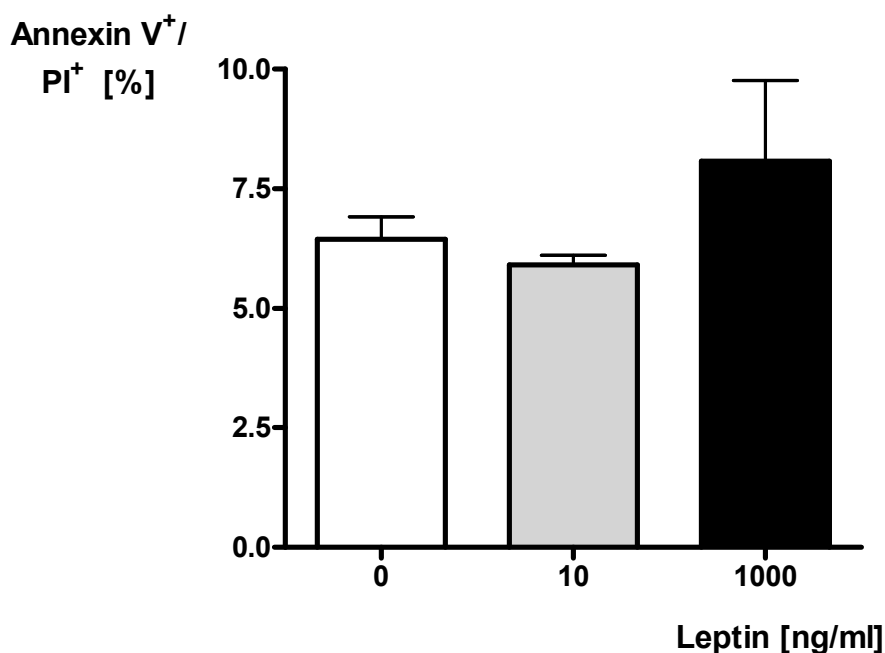


Abbildung 18 Apoptoserate unter Th2 Polarisierung

Dargestellt ist die unveränderte Apoptoserate unter verschiedenen Leptinkonzentrationen im Th2-polarisierenden und antigenunspezifischem System. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM von sieben Versuchsansätzen dargestellt.

4.7 Antigen-spezifische Stimulation

4.7.1 Einfluss von Leptin auf die Th1-Polarisierung

Die *in vitro* Stimulation von naiven DO11.10 T-Lymphozyten entweder mit C57BL/6^{ob/ob} oder mit C57BL/6 WT-APZ wurde unter den beschriebenen Th1-polarisierenden Bedingungen vorgenommen. Naive T-Zellen wurden für 1 h in An- oder Abwesenheit von Leptin präinkubiert und für 5 Tage zusammen mit APZ entweder mit Ovalbumin oder mit Ova-Peptid als Antigen stimuliert. Unter diesen Bedingungen war bei erstmaliger Stimulation kein signifikanter Unterschied in der Polarisierung der T-Lymphozyten unter Einfluss von Leptin zu verzeichnen. Die Polarisierungsraten unter Ova-Peptid waren insgesamt deutlich schlechter als unter Ovalbumin.

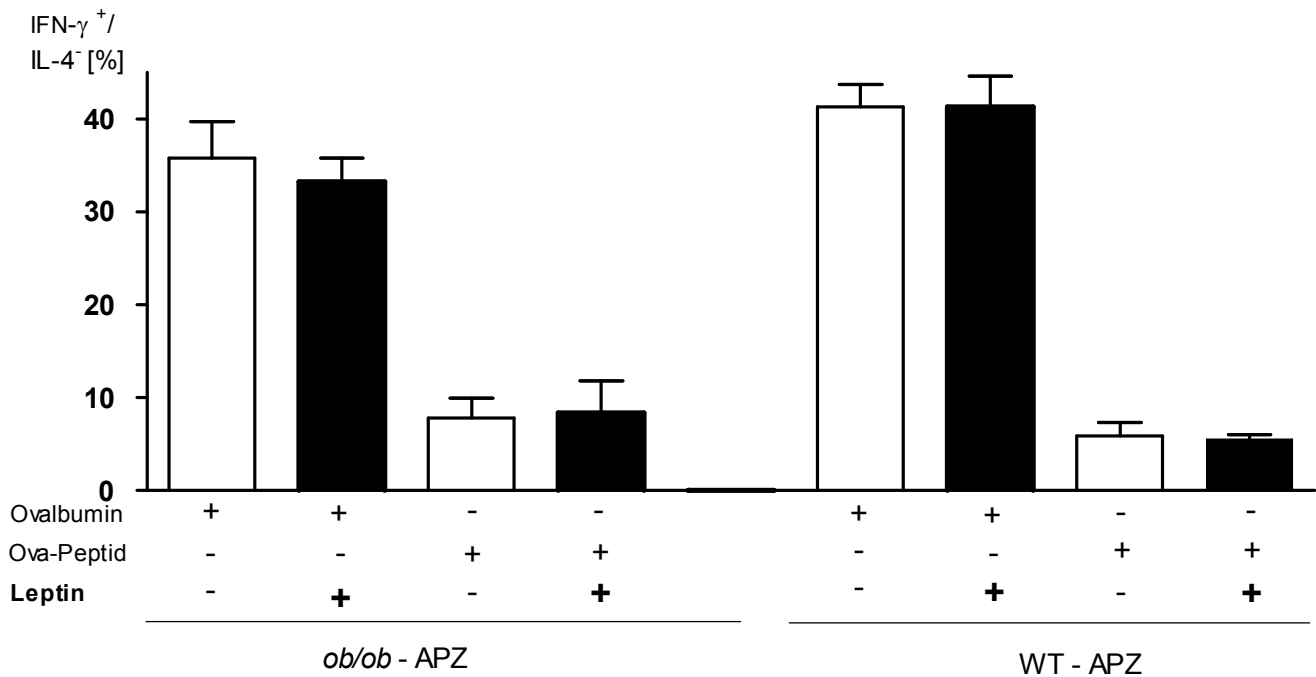


Abbildung 19 Einfluss von Leptin auf die antigen-spezifische Stimulation unter Th1 Polarisierung
 Ein Effekt auf die Polarisierung unter diesen Bedingungen ist nicht zu beobachten. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei Versuchsansätzen.

Ergebnisse

4.7.2 Einfluss von Leptin auf die Th1-Polarisierung nach Restimulation

Die Zellen wurden im nächsten Ansatz für 5 weitere Tage restimuliert. Es konnte ein deutlicher Unterschied in der Polarisierung bei Stimulation durch Ovalbumin beobachtet werden. Nach Gabe von Leptin polarisierten die T-Helferzellen unter *ob/ob*- als auch unter WT -APZ schlechter zu Th1-Zellen (*ob/ob* -APZ: $18,57 \pm 0,86\%$ zu $7,92 \pm 1,35\%$; WT-APZ: $8,44 \pm 0,92\%$ zu $6,51 \pm 0,47\%$; $n=3$, $p<0,05$). Auch hier war die Stimulation mit Ova-Peptid als Antigen mit einer deutlich geringeren Polarisierungsrate verbunden.

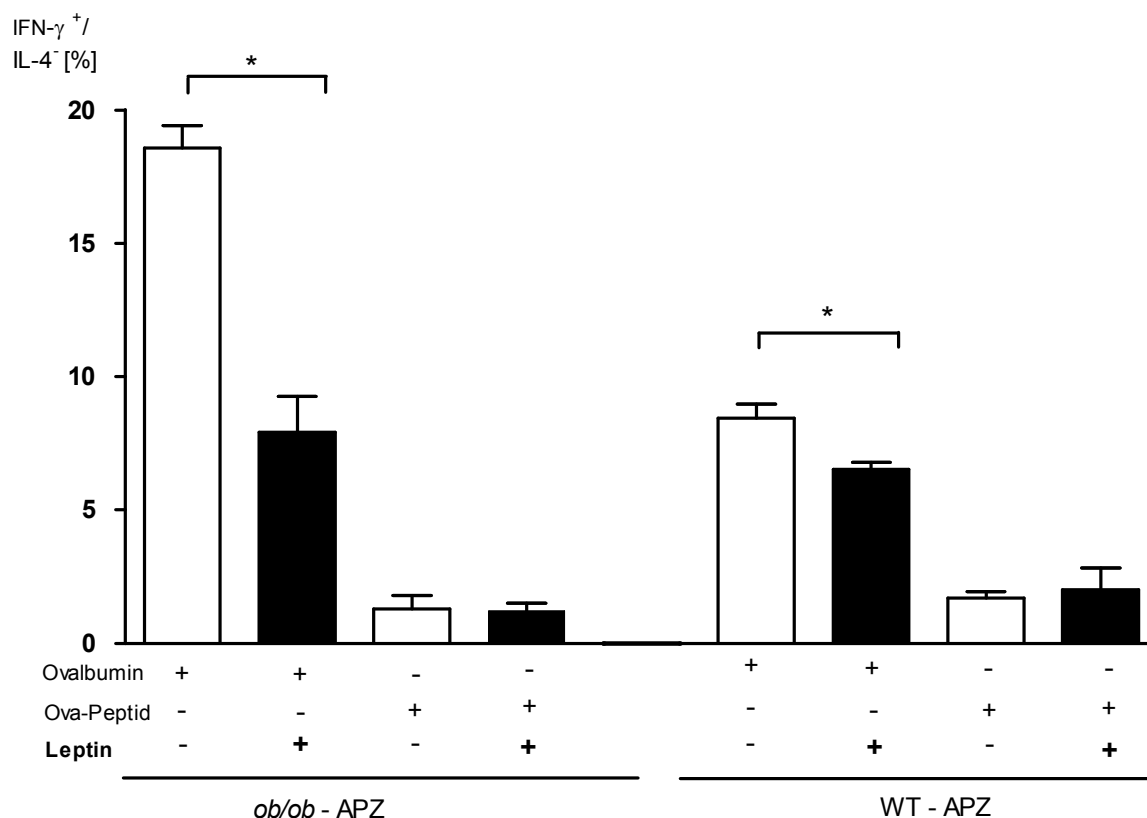


Abbildung 20 Restimulation von APZ und T-Helferzellen

Die reduzierte Produktion von IFN- γ unter antigenspezifischer Stimulation von DO11.10 T-Lymphozyten durch Wildtyp-APZ und *ob/ob* APZ ist im Zusammenhang mit der Leptingabe zu beobachten. Das Antigen ist in diesen Fällen Ovalbumin. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei Versuchsansätzen.

4.7.3 Einfluss von Leptin auf die Th2-Polarisierung

Unter antigenspezifischen Bedingungen sind naive T-Helferzellen erneut in Abhängigkeit von Leptin zugunsten von Th2 polarisiert worden. Im ersten Polarisierungsschritt war keine signifikanten Veränderungen nachweisbar gewesen (Daten nicht dargestellt). Um die Effizienz der Polarisierung zu erhöhen, wurden die Zellen auch hier wieder analog zu den vorausgegangenen Versuchen restimuliert. Die Anwesenheit von Leptin beeinflusste nicht die Polarisierung in Richtung des Th2-Subtyps wenn die Zellen in Anwesenheit von *ob/ob* APZ stimuliert wurden.

Die Anwesenheit von Wildtyp -APZ hatte jedoch weitaus differenziertere Effekte als bisher beobachtet: Leptin vermehrte die intrazelluläre IL-4 Produktion, wenn Ovalbumin das zu präsentierende Antigen darstellte (Anstieg von $11,72 \pm 1,38$ % in der Kontrollgruppe zu $18,12 \pm 0,88$ % unter $1 \mu\text{g/ml}$ Leptin, $n=3$, $p<0,05$), verminderte jedoch signifikant den Anteil Th2-polarisierter T-Lymphozyten, wenn Ova-Peptid als Antigen eingesetzt wurde (Abfall von $31,34 \pm 1,35$ % in der Kontrollgruppe zu $17,87 \pm 2,21$ % unter $1 \mu\text{g/ml}$ Leptin, $n=3$, $p<0,05$).

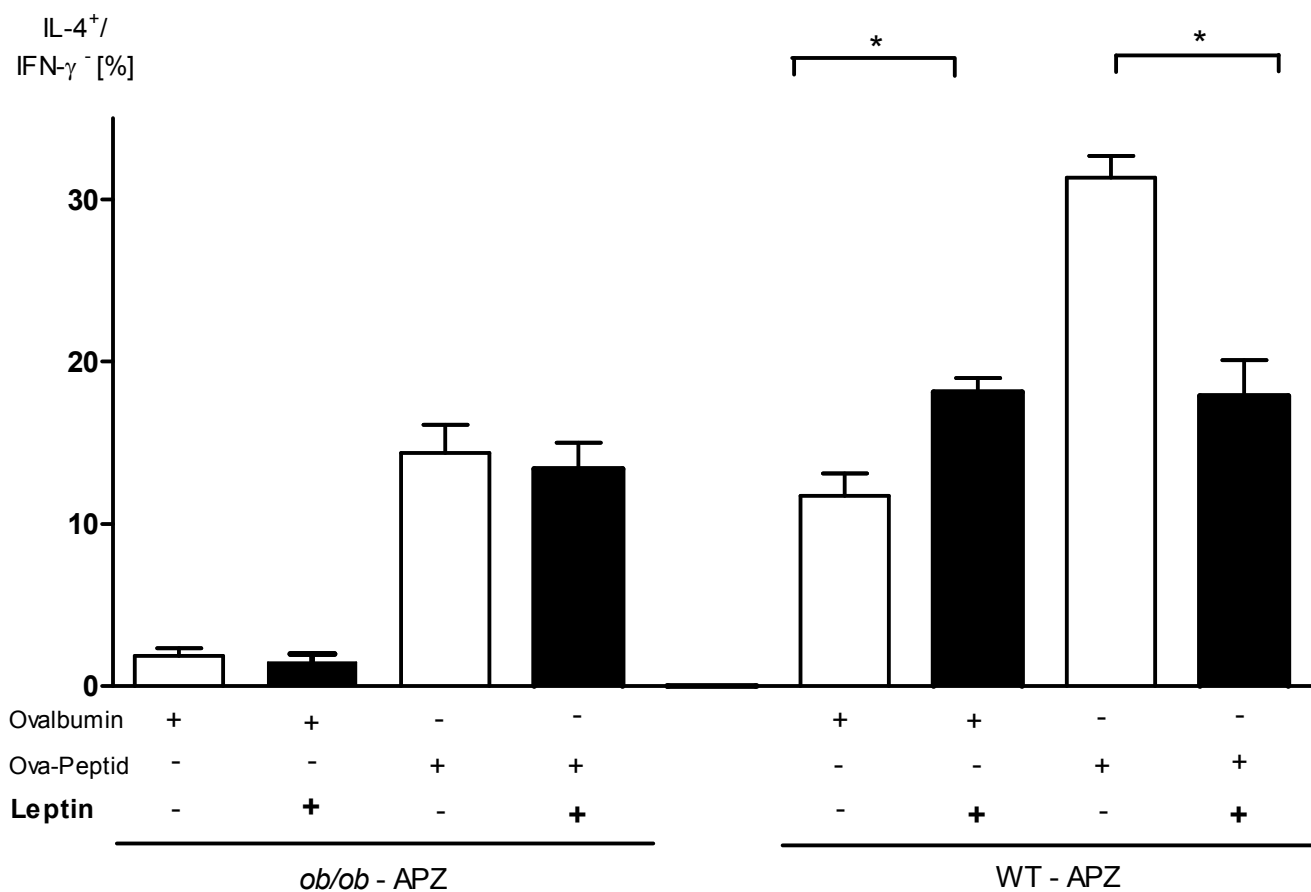


Abbildung 21 Effekt von Leptin auf die Polarisierung von DO11.10 T-Helferzellen bei Restimulation
 Leptin hat in Kombination mit Ovalbumin als Antigen einen fördernden Effekt auf die IL-4 Synthese wenn WT-APZ eingesetzt wurden. Die Wirkung von Leptin auf die Antigenpräsentation mit Ova-Peptid hatte einen hemmenden Effekt auf die Th2-Polarisierung. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von drei Versuchsansätzen.

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Leptin auf die *in vitro* Polarisierung von naiven T-Helferzellen unter antigenspezifischer sowie antigenunspezifischer Stimulation untersucht.

Es erfolgte initial die hochgradige Aufreinigung von CD4⁺CD62L⁺ naiven T-Helferzellen mittels MACS. Anschließend erfolgte eine PCR zum Nachweis der funktionellen Rezeptors OB-R_b auf den Lymphozyten.

Es zeigte sich nach antigenunspezifischer Stimulation, dass Leptin die Polarisierung von Th1-Lymphozyten fördert. Th2-Lymphozyten werden bei Anwesenheit von Leptin in ihrer Polarisierung supprimiert, dieser Effekt lässt sich unter wiederholter Restimulation verstärken. Die Effekte auf die Polarisierung von T-Helferzellen lassen sich unabhängig von der Leptinkompetenz der Zellen reproduzieren.

Die Apoptoserate ist unter antigenunspezifischer Stimulation und Polarisierung zu Th1 in Anwesenheit von Leptin signifikant vermindert. Unter anderen Polarisierungsbedingungen ist dieser Effekt nicht relevant. Nach antigenunspezifischer Stimulation konnte eine signifikante Steigerung der Proliferationsrate in Anwesenheit von Leptin beobachtet werden. Dieser Effekt ist konzentrationsabhängig.

Antigenspezifisch stimulierte, naive T-Helferzellen zeigen erst nach einmaliger Restimulation signifikante Effekte. Hier zeigt sich, dass Helferzellen unter *ob/ob* als auch unter WT-APZ in Anwesenheit von Leptin in der Th1-Polarisierung inhibiert werden. Dieser Effekt tritt nur in Erscheinung, wenn Ovalbumin als Antigen dient, sonst ist der Effekt nicht signifikant.

Die Th2-Polarisierung zeigt ein bunteres Bild auf: In Anwesenheit von Wildtyp-APZ vermehrt Leptin die Th2-Polarisierungsrate, wenn Ovalbumin das zu präsentierende Antigen darstellt. Der Anteil an Th2-polarisierter T-Lymphozyten bei WT-APZ ist jedoch vermindert, wenn Ova-Peptid als Antigen eingesetzt wird.

5.2 Bewertung der Ergebnisse im Vergleich zur Literatur

5.2.1 Nachweis des Leptinrezeptors

Die lange Form des Leptinrezeptors, die dem heutigen OB-R_b identisch ist, konnte erstmals 1995 identifiziert werden.^{13,15}

Er konnte bereits auf verschiedenen Gewebetypen wie dem Plexus choroideus, dem Dottersack, dem Knochenmark, der Lunge und auch auf CD4⁺-T-Lymphozyten nachgewiesen werden.⁹

OB-R_b wird als einzige für die Signaltransduktion funktionelle Isoform anerkannt.¹⁴ Da bisherige Nachweise des Rezeptors auf CD4⁺-T-Zellen nicht differenzieren, ob diese schon Effektorfunktion haben oder noch naiv sind, war für die vorliegende Arbeit der Nachweis der Rezeptors auf CD4⁺CD62L⁺ naiven T-Helferzellen essenziell.^{39 47} Es erfolgte der Nachweis durch PCR im Vergleich zu Gewebe auf dem dieser Rezeptor bereits zuvor nachgewiesen wurde.⁹ Die Beobachtungen aus den folgenden Versuchsansätzen erlauben anschließend Rückschlüsse auf die direkte rezeptorvermittelte Wirkung von Leptin auf die Polarisierung naiver T-Lymphozyten und damit auf die Funktionalität des Rezeptors auf dieser Zellpopulation.

5.2.2 Polarisierung naiver T-Helferzellen unter Einfluss von Leptin unter antigenunspezifischer Stimulation

Frühere Untersuchungen zeigten, dass Leptin die Proliferation von T-Helferzellen entscheidend beeinflusst. Dies gilt nur für naive T-Zellen. Memory-Zellen scheinen von diesem Effekt ausgenommen zu sein.³⁹ T-Helferzellen sind durch ihr sezerniertes Zytokinprofil eindeutig definiert.²⁹ Folglich kann durch Bestimmung des intrazellulären Zytokinprofils die Zuordnung der T-Helferzell-Subpopulation eindeutig erfolgen. Zusammenfassend zeigen die bisherigen Ergebnisse in der Literatur, dass Leptin bevorzugt Th1-Immunantworten fördert. Im Umkehrschluss zeigt sich ebenfalls bei Abwesenheit von Leptin, z. B. durch angeborene Defizienz, dass Th2-Zytokine überwiegen.

Martin-Romero et al. zeigten anhand durchflusszytometrischer Bestimmung von CD4⁺ Lymphozyten unter Stimulation mit Phytohämagglutinin (PHA) sowie Kostimulation mit Leptin, einen Anstieg von IFN- γ und IL-2 produzierenden CD3⁺CD4⁺ Zellen, während eine IL-4 Produktion nicht mehr nachzuweisen war.⁴⁷ Frühere Arbeiten aus der Arbeitsgruppe um *Siegmund et al.* verdeutlichen, dass *db/db* CD4⁺ T-Lymphozyten bei α -CD3 Stimulation im Vergleich zum Wildtyp kaum IFN- γ sezernieren. Erst unter Kostimulation mit α -CD28 normalisiert sich die IFN- γ Produktion.⁴⁵

Busso et al. zeigten in einem Modell für die experimentelle rheumatoide Arthritis eine geringere Sekretion von IFN- γ durch *ob/ob* Lymphozyten.⁴⁰ Bei der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis spielt das Verhältnis von Th1 zu Th2 eine wichtige Rolle. Bei fastenden Patienten mit rheumatoider Arthritis ist neben einer verminderten Krankheitsaktivität *in vitro* eine geringere Aktivierung von CD4⁺ Lymphozyten durch α -CD3-Antikörper zu beobachten. Die Produktion von IL-4 ist erhöht, während IFN- γ inhibiert zu sein scheint.⁴⁹

Lord et al. zeigten in analoger Weise, dass unter gemischten alloproliferativen Lymphozytenreaktionen CD4⁺ Lymphozyten mit steigender Leptinkonzentration die IL-4 Produktion einstellen und zunehmend IFN- γ sezernieren.³⁹

Die vorliegenden Ergebnisse der antigenunspezifischen Stimulation naiver T-Lymphozyten stellen einen neuen Versuchsansatz dar. Bisherige Untersuchungen berücksichtigten nicht explizit CD4⁺CD62L⁺ naive T-Zellen während der Polarisierung, ebenso wenig das intrazelluläre Zytokinprofil, das exakte Aussagen über die Polarisierung erlaubt. Es wurden in dieser Arbeit erstmals die Effekte unter Polarisationsbedingungen untersucht.

Die vorliegenden Daten bestätigen den fördernden Effekt Leptins für die Th1-Polarisierung unter antigenunspezifischen Bedingungen. Weiterhin konnte die isolierte Inhibition der Th2-Polarisierung unter Einwirkung von Leptin beobachtet werden. Die vorliegende Arbeit differenziert die Polarisierung von Leptin-kompetenten sowie *ob/ob*-Lymphozyten. In beiden Zellreihen sind die Effekte von Leptin auf die Polarisierung gleich. Es zeigt sich auch hier, dass *ob/ob* T-Lymphozyten insgesamt wesentlich schlechter differenzieren als deren WT. Nach Substitution von Leptin ist der Effekt auch in der vorliegenden Arbeit reversibel.

5.2.3 Proliferation

Leptin hat fördernde Eigenschaften auf die *in vitro* Proliferation von humanen T-Lymphozyten. Dies ließ sich bereits anhand von vermehrtem radioaktiven [³H]-Thymidineinbau bei unspezifisch stimulierten T-Zellen nachweisen.⁴⁷

Lord et al. beschrieben eine dosisabhängige Steigerung der Proliferationsrate von peripheren Blutlymphozyten in der gemischten alloproliferativen Lymphozytenreaktion durch Leptin. Es zeigte sich auch, dass die vermehrte Proliferation auf den Effekt von Leptin auf die CD4⁺ Population zurückzuführen ist. Dieser Effekt lässt sich auch bei isolierten CD4⁺ Lymphozyten nachweisen. Dies basiert nachweislich auf der Expansion von naiven T-Lymphozyten aber nicht von Memoryzellen.³⁹

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter antigenunspezifischer Stimulation von naiven CD4⁺CD62L⁺ T-Helferzellen *in vitro* ebenfalls ein dosisabhängiger Anstieg der Proliferationsrate zu erkennen ist. Als Methode zur Detektion wurde die intrazelluläre CFSE Anfärbung naiver T-Zellen gewählt. Dies hat den Vorteil die zellulären Reaktionen, im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Versuchen, isoliert und unabhängig von der Proliferation anderer Zellpopulationen zu untersuchen.

Die Beobachtungen dieser Arbeit stehen im Einklang mit früheren Untersuchungen aus der Literatur. Die Ergebnisse unterstützen die Rolle von Leptin als potenter Stimulator der T-Zellproliferation.

5.2.4 Apoptoserate

Die Veränderung der Apoptoserate von T-Lymphozyten durch den Einfluss von Leptin wurde in der Literatur mehrfach untersucht. *Fujita et al.* zeigten, dass wiederholte intraperitoneale Injektionen von Leptin *in vivo* einerseits die Fasten-induzierte Abnahme der Zellzahl, sowie die Cortison- und Ceramid-induzierte Apoptoserate von CD4⁺CD8⁺-Thymozyten deutlich zurückgehen lässt.⁵⁰ Ein Effekt auf die α-CD3-Antikörper induzierte Apoptose konnte nicht nachgewiesen werden. Als ein beitragender Mechanismus wird der STAT3 aktivierte Anstieg von antiapoptotischem Bcl-xL verantwortlich gemacht.

Diskussion

Bekannt ist auch, dass 48-stündiges Fasten eine Abnahme der Thymozytenzellzahl um ca. 13% verursacht. CD4⁺CD8⁺ Thymozyten, die vor allem im Cortex aufzufinden sind, werden durch Leptin vor dem Zelluntergang geschützt und die Zellzahl konstant gehalten. Leptin schützt folglich vor einer Fasten-assoziierten Thymusatrophie.³⁷

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen einen antiapoptotischen *in vitro* Effekt von Leptin. Dieser Effekt wirkte sich allerdings nur bei der Polarisierung zu Th1-Lymphozyten im signifikanten Maße aus. Die Apoptoserate unter Th2-Polarisierung von unpolarisierten stimulierten Zellen blieb unbeeinflusst. Der antiapoptotische Effekt von Leptin steht im Einklang mit der erhöhten Proliferationsrate unter Leptineinfluss.

Die vorliegenden Ergebnisse bestärken, dass die vermehrte Polarisierung von naiven T-Lymphozyten nicht auf relative Effekte basieren kann, beispielsweise durch erhöhten Zelluntergang nicht polarisierter Zellen, da sich unter keinen Bedingungen eine erhöhte Apoptoserate unter Leptineinfluss nachweisen lässt.

Ebenso bestätigt sich, dass die beobachtete Th2-Suppression tatsächlich auch auf eine verminderte Polarisierung und nicht auf eine vermehrte Apoptoserate zurückführbar ist.

5.2.5 Polarisierung naiver T-Helferzellen unter Einfluss von Leptin unter antigenspezifischer Stimulation

Die Datenlage der vorliegenden Arbeit zur Polarisierung unter antigenspezifischer Stimulation stellt neue Aspekte im Vergleich zur Literatur dar. In allen vorliegenden Versuchsansätzen war durchweg erst eine signifikante Wirkung von Leptin zu beobachten, wenn eine Restimulation der Zellen mit APZ und entsprechenden Antigenen stattgefunden hatte.

Diese Restimulation ist allerdings durchaus gerechtfertigt, da gerade zu Beginn der Lymphozytenaktivierung das sezernierte Zytokinprofil noch bunt sein kann. *In vitro* konnte in anderen Arbeiten gezeigt werden, dass wiederholte Stimulation von T-Zellen zu diskreteren und höheren Polarisationsraten führt.^{29,51} So konnten *Murphy et al.* zeigen, dass antigenspezifisch stimulierte DO11.10 T-Zellen nach einwöchiger Polarisierung in Richtung Th1 durch Gabe von IL-4 und anti-IL-12 Antikörpern zu IL-4 sezernierenden Th2-Zellen konvertierbar waren. Der umgekehrte Effekt ließ sich auch für Th2

Diskussion

zeigen. Dieser Effekt ist allerdings nach dreiwöchiger Stimulation nicht mehr reproduzierbar.³⁴

Die vorliegenden Daten zeigen, dass die Wirkung von Leptin auf die Polarisierung unter antigenspezifischer Stimulation deutlich vom gewählten Antigen und der gewählten APZ abhängt.

Der bisher typische Th1-favorisierende Effekt ist unter *ob/ob* als auch unter WT-APZ nicht zu beobachten. Es zeigt sich im allgemeinen, dass die Helferzellen unter spezifischer Stimulation mit Leptin schlechter zu Th1 polarisieren. Dieser Effekt ist erst signifikant, wenn Ovalbumin als Antigen dient. Unter Ova-Peptid ist kein Einfluss von Leptin zu erkennen.

Die Th2-Polarisierung verläuft ebenfalls anders als bisher beschrieben. In Anwesenheit von WT-APZ vermehrt Leptin die intrazelluläre IL-4 Produktion wenn Ovalbumin das zu präsentierende Antigen darstellt. Der Anteil an Th2 polarisierten T-Lymphozyten ist jedoch vermindert, wenn Ova-Peptid als Antigen eingesetzt wird. Durch leptindefiziente APZ stimulierte Lymphozyten polarisieren insgesamt deutlich geringer als die WT-Gruppe. Eine Leptinapplikation beeinflusst die Polarisierung in diesem Falle nicht.

Es zeigt sich also auch unter antigenspezifischer Stimulation ein eindeutiger Effekt von Leptin auf die Polarisierung, jedoch geht dieser nicht konform mit den bisher beschriebenen Befunden der Literatur. Diese neuen Erkenntnisse können mit der Regulation der T-Zellstimulation durch kostimulatorische Modelle erklärt werden:

Wie bereits beschrieben ist nach Aktivierung eines T-Lymphozyten ein zweites Signal, die so genannte Kostimulation, erforderlich.^{29,28} In dieser Arbeit wurden zwei Modelle der Lymphozytenaktivierung angewendet.

Einerseits die beschriebene antigenunspezifische Stimulation, bei der monoklonale Antikörper Anwendung fanden, die in der Gesamtheit an die gleichen Epitope binden (CD3 und CD28). Die Stimulation findet in diesem Falle gleichartig auf alle erfassten Zellen statt.

Andererseits wurden zur antigenspezifischen Stimulation APZ angewandt, die eine Vielzahl kostimulatorischer Proteine exprimieren. So stellen zum Beispiel B7.1 und B7.2 die am besten analysierten kostimulatorischen Moleküle der APZ-Oberfläche dar. Es ist

allerdings auch bekannt, dass eine Vielzahl weiterer Kofaktoren auf T-Lymphozyten existieren; als Beispiele seien 4-1BB (CD137) und sein Ligand 4-1BBL genannt.²⁸

Es wurde beschrieben, dass B7-1 und B7-2 in der Lage sind, die Entwicklung von T-Helferzellen je nach Bindung unterschiedlich zu moderieren: In einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Polarisierung in Th1 und Th2 durch kostimulatorische Membranproteine beeinflusst werden kann. Untersuchungen zur Induktion der experimentellen Autoimmunenzephalitis konnten *in vivo* wie *in vitro* zeigen, dass die Gabe von interagierenden α -B7-1-Antikörpern bei der Polarisierung eine Th2-Favorisierung zur Folge hat.⁵² Das heißt, alleine die Aktivierung verschiedener Kostimulatoren kann ausschlaggebend für die Th1/Th2 Polarisierung sein. Im Vergleich zur antigenunspezifischen Stimulation ist die Interaktion zwischen Antigen, Antigen-präsentierender Zelle und naivem T-Lymphozyt komplexer und von weitaus mehr Faktoren abhängig. So ist also nicht steuerbar welche Kofaktoren in der direkten Antigenpräsentation miteinander interagieren, während bei der antigenunspezifischen Stimulation nur zwei Epitope des Lymphozyten aktiviert werden, CD3 und CD28. Dies scheint nach vorliegenden Daten einen wichtigen Einfluss auf den Effekt von Leptin auf die Polarisierung zu nehmen.

5.3 Klinische Relevanz

Der Einsatz von rekombinanten Leptin als Pharmakon zur Therapie spontaner und extrem rarer Mutationen im Leptin-Gen beim Menschen ist bereits etabliert.²⁷ Täglich subkutan appliziert, zeigt Leptin einen eindeutigen Vorteil in Bezug auf die reduzierte Gesamtfettmasse und den reduzierten Appetit. Die Hyperinsulinämie und korrelierende Hyperlipidiämie normalisieren sich und die Schilddrüsen- und Wachstumshormone steigen auf normale Werte an. Auch das Immunsystem wird dadurch beeinflusst. Die verminderte Anzahl der naiven anergen T-Helferzellen unter Leptindefizienz steigt durch Leptinstimulation *in vivo* in Bezug auf die Anzahl und Reaktionsvermögen an. Eine verminderte Sekretion von IFN- γ bei gleichzeitig verstärkter IL-4 und IL-10 Produktion, stellt eine Verschiebung der typischen Zytokine in Richtung von Th2 dar. Dies ist rückläufig, sobald Leptin appliziert wird.^{26,47} Diese immunstimulatorische Wirkung von Leptin wird auch durch seine eigene Aktion vermindert. Eine Steigerung der zuvor supprimierten T-Zellaktivität kann auch eine Antikörperinduktion gegen rekombinantes Leptin

Diskussion

als „Fremdprotein“ bei Leptindefizienz bewirken und verstärken, und dadurch seine eigene Wirkung abschwächen.²⁶

Viele Hoffnungen wurden in das Potenzial der Gewichtsregulation von Leptin gelegt. Adipositas und ihre Folgen (Metabolisches Syndrom, Insulinresistenz, Arteriosklerose, koronare Herzkrankheit), die in den Industriestaaten zunehmend als Krankheitsbild an Bedeutung gewinnen, sollten durch die Anwendung von rekombinanten Leptin neue Therapieansätze bekommen. Die Mehrheit der adipösen Menschen haben allerdings erhöhte Leptinserumspiegel und eine Leptinresistenz entwickelt.²⁷ Kontrollierte Studien über die Therapie von Adipositas beim Menschen mit rekombinantem humanen Leptin zeigten bisher keinen Erfolg bei einer hohen Variationsbreite der Gewichtsbeeinflussung. Deshalb erscheint ein pharmakologischer Einsatz von Leptin, bis auf den Ausnahmefall bei humaner *ob/ob*-Mutation, in der Zukunft sehr unwahrscheinlich.

6 Zusammenfassung

Frühere Arbeiten zeigten eine vielfältige Interaktion von Leptin und dem Immunsystem. In Bezug auf T-Lymphozyten zeigten vor allem *Lord et. al*³⁹ *in vitro* sowie *in vivo* unter Leptineinfluss eine Präferenz zugunsten der IFN- γ dominierten Th1-Antwort. Weitere Untersuchungen zeigten daraufhin, dass die Modulation nicht nur auf die Th1- Polarisierung beschränkt zu sein schien, denn auch die Th2-Antwort wurde beeinflusst.⁵³

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Einfluss von Leptin auf die *in vitro* Polarisierung naiver T-Helferzellen unter antigenspezifischer sowie -unspezifischer Stimulation zu charakterisieren. Ferner sollten die Effekte von Leptin auf die Apoptose und Proliferation unter Polarisierungsbedingungen untersucht werden.

Nach Aufreinigung von CD4⁺CD62L⁺ T-Helferzellen mittels MACS erfolgte der Nachweis des OB-R_b mittels PCR. Nach Präinkubation der Zellen in An- oder Abwesenheit von Leptin erfolgte anschließend die Polarisierung unter antigenspezifischen sowie -unspezifischen Bedingungen. Die quantitative Auswertung des intrazellulären Zytokinprofils sowie die Apoptose- und Proliferationsrate wurden anhand durchflusszytometrischer Analysen ermittelt.

Unter antigenunspezifischer Stimulation fördert Leptin die Polarisierung von Th1-Lymphozyten. Th2-Lymphozyten werden in Anwesenheit von Leptin in Ihrer Polarisierung supprimiert. Diese Effekte auf die Polarisierung sind unabhängig von der Leptinkompetenz der T-Lymphozyten zu beobachten. Die Apoptoserate ist unter antigenunspezifischer Stimulation und Polarisierung zu Th1 in Anwesenheit von Leptin signifikant vermindert. Unter anderen Konditionen bleibt die Apoptose durch Leptin jedoch unbeeinflusst. Es konnte ferner eine signifikante Steigerung der Proliferationsrate in Anwesenheit von Leptin nachgewiesen werden.

Antigenspezifisch stimulierte, naive T-Helferzellen zeigen in Anwesenheit von Leptin unter *ob/ob* als auch unter WT-APZ eine deutlich geringere Tendenz zur Th1-Polarisierung, wenn Ovalbumin als Antigen präsentiert wird. Der Einfluss auf die Th2-Polarisierung zeigte sich ebenfalls stark abhängig von den Rahmenbedingungen. Nur in Anwesenheit von Wildtyp-APZ steigerte Leptin die Th2-Proliferation, wenn Ovalbumin das zu präsentierende Antigen darstellte. Der Anteil Th2-polarisierter T-Lymphozyten war allerdings vermindert, wenn Ova-Peptid als Antigen der WT-APZ eingesetzt wurde.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte der Einfluss von Leptin auf die *in vitro* Polarisierung von naiven T-Helferzellen eindeutig gezeigt werden. Während im antigenunspezifischen System, wie bereits postuliert, die Th1-Polarisierung gefördert und die Th2-Polarisierung gehemmt wird, ist der Einfluss auf das antigenspezifische System vielfältiger und stärker abhängig von den Kofaktoren der Antigenpräsentation sowie der Lymphozytenstimulation.

Die antigenspezifische Stimulation kommt jedoch im Vergleich zur unspezifischen Stimulation *in vivo* Vorgängen näher. Die Ergebnisse geben daher einen Einblick darauf, dass die systemischen Einflüsse von Leptin auf immunologische Prozesse weitaus komplexer und facettenreicher sind, als bisher bereits in der Literatur postuliert wurde.

7 Literatur

1. Batra A, Zeitz M, Siegmund B. [The role of leptin in the immune system--a linking of endocrinology and immunology]. *Dtsch Med Wochenschr* 2005;130:226-9.
2. Löffler G, Petrides P. *Biochemie und Pathobiochemie*. 7. Auflage ed. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag; 2003.
3. Ingalls AM, Dickie MM, Snell GD. Obese, a new mutation in the house mouse. *J Hered* 1950;41:317-8.
4. Hausberger FX. Behavior of transplanted adipose tissue of hereditarily obese mice. *Anat Rec* 1959;135:109-13.
5. Coleman DL. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia* 1978;14:141-8.
6. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, et al. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 1996;382:250-2.
7. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;372:425-32.
8. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 1995;269:543-6.
9. Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol* 2000;68:437-46.
10. Zhang F, Basinski MB, Beals JM, et al. Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature* 1997;387:206-9.

Literatur

11. DeGroot LJ, Jameson JL. *Endocrinology*. 4th ed. ed: W.B. Saunders Company; 2001.
12. La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol* 2004;4:371-9.
13. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 1995;83:1263-71.
14. Hegyi K, Fulop K, Kovacs K, Toth S, Falus A. Leptin-induced signal transduction pathways. *Cell Biol Int* 2004;28:159-69.
15. Tartaglia LA. The leptin receptor. *J Biol Chem* 1997;272:6093-6.
16. Fei H, Okano HJ, Li C, et al. Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:7001-5.
17. Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim MH, Skoda RC. Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:6231-5.
18. Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, et al. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 1998;281:1683-6.
19. Bennett BD, Solar GP, Yuan JQ, Mathias J, Thomas GR, Matthews W. A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis. *Curr Biol* 1996;6:1170-80.
20. Chehab FF, Lim ME, Lu R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet* 1996;12:318-20.

Literatur

21. Fantuzzi G, Sennello JA, Batra A, et al. Defining the role of T cell-derived leptin in the modulation of hepatic or intestinal inflammation in mice. *Clin Exp Immunol* 2005;142:31-8.
22. Devos R, Guisez Y, Van der Heyden J, et al. Ligand-independent dimerization of the extracellular domain of the leptin receptor and determination of the stoichiometry of leptin binding. *J Biol Chem* 1997;272:18304-10.
23. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998;395:763-70.
24. Silbernagl S, Despopoulos A. Taschenatlas der Physiologie. 6., korr. Aufl. ed. Stuttgart: Thieme; 2003.
25. G. L, P. P. Biochemie und Pathobiochemie. 7. Auflage ed. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag; 2003.
26. Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, et al. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest* 2002;110:1093-103.
27. Kasper DLea. Harrison's principles of internal medicine. 16th edition ed. New York, Chicago, San Francisco: McGraw-Hill; 2005.
28. Janeway CA. Immunobiology: the immune system in health and disease. 6th ed. ed: Churchill Livingstone; 2005.
29. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383:787-93.

Literatur

30. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348-57.
31. Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 2007;148:32-46.
32. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000;100:655-69.
33. Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997;89:587-96.
34. Murphy E, Shibuya K, Hosken N, et al. Reversibility of T helper 1 and 2 populations is lost after long-term stimulation. *J Exp Med* 1996;183:901-13.
35. Polack E, Nahmod VE, Emeric-Sauval E, et al. Low lymphocyte interferon-gamma production and variable proliferative response in anorexia nervosa patients. *J Clin Immunol* 1993;13:445-51.
36. Mandel MA, Mahmoud AA. Impairment of cell-mediated immunity in mutation diabetic mice (db/db). *J Immunol* 1978;120:1375-7.
37. Howard JK, Lord GM, Matarese G, et al. Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice. *J Clin Invest* 1999;104:1051-9.
38. Matarese G, Di Giacomo A, Sanna V, et al. Requirement for leptin in the induction and progression of autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2001;166:5909-16.

Literatur

39. Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 1998;394:897-901.
40. Busso N, So A, Chobaz-Peclat V, et al. Leptin signaling deficiency impairs humoral and cellular immune responses and attenuates experimental arthritis. *J Immunol* 2002;168:875-82.
41. Matarese G, Sanna V, Di Giacomo A, et al. Leptin potentiates experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL female mice and confers susceptibility to males. *Eur J Immunol* 2001;31:1324-32.
42. Faggioni R, Jones-Carson J, Reed DA, et al. Leptin-deficient (ob/ob) mice are protected from T cell-mediated hepatotoxicity: role of tumor necrosis factor alpha and IL-18. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:2367-72.
43. Siegmund B, Lear-Kaul KC, Faggioni R, Fantuzzi G. Leptin deficiency, not obesity, protects mice from Con A-induced hepatitis. *Eur J Immunol* 2002;32:552-60.
44. Siegmund B, Lehr HA, Fantuzzi G. Leptin: a pivotal mediator of intestinal inflammation in mice. *Gastroenterology* 2002;122:2011-25.
45. Siegmund B, Sennello JA, Jones-Carson J, et al. Leptin receptor expression on T lymphocytes modulates chronic intestinal inflammation in mice. *Gut* 2004;53:965-72.
46. Sarraf P, Frederich RC, Turner EM, et al. Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia. *J Exp Med* 1997;185:171-5.
47. Martin-Romero C, Santos-Alvarez J, Goberna R, Sanchez-Margalet V. Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes. *Cell Immunol* 2000;199:15-24.

Literatur

48. Murphy KM, Heimberger AB, Loh DY. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCR α 0 thymocytes in vivo. *Science* 1990;250:1720-3.
49. Fraser DA, Thoen J, Reseland JE, Forre O, Kjeldsen-Kragh J. Decreased CD4+ lymphocyte activation and increased interleukin-4 production in peripheral blood of rheumatoid arthritis patients after acute starvation. *Clin Rheumatol* 1999;18:394-401.
50. Fujita Y, Murakami M, Ogawa Y, et al. Leptin inhibits stress-induced apoptosis of T lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 2002;128:21-6.
51. Croft M, Swain SL. Recently activated naive CD4 T cells can help resting B cells, and can produce sufficient autocrine IL-4 to drive differentiation to secretion of T helper 2-type cytokines. *J Immunol* 1995;154:4269-82.
52. Kuchroo VK, Das MP, Brown JA, et al. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 1995;80:707-18.
53. Shore SA, Schwartzman IN, Mellema MS, Flynt L, Imrich A, Johnston RA. Effect of leptin on allergic airway responses in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:103-9.

8 Danksagung

Ich bedanke mich bei Frau PD Dr. Britta Siegmund für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas. Das beharrliche Interesse am Fortschritt meiner Arbeit und die stetige Unterstützung beeindruckten mich sehr.

Bei Dr. Rainer Glauben möchte ich mich für die Betreuung in einem äußerst angenehmen Arbeitsklima und für die Einarbeitung in die wissenschaftliche Methoden bedanken. Herrn Dr. Arvind Batra danke ich für die produktiven Diskussionen und Korrekturen der vorliegenden Arbeit.

Frau Inka Fedke und Herrn Dr. Thorsten Stroh möchte ich für die technische Hilfe und die Unterstützung bei Laborexperimenten meinen Dank aussprechen.

Nicht zuletzt geht der Dank an meine Familie und Freunde für ihre fortwährende Unterstützung.

9 Lebenslauf

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

10 Veröffentlichungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in Teilen in internationalen Fachzeitschriften veröffentlicht worden:

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 Jan;151(1):56-62. Epub 2009 Dec 4.

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

Pietsch J, Batra A, Stroh T, Fedke I, Glauben R, Okur B, Zeitz M, Siegmund B, Toll-like receptor expression and response to specific stimulation in adipocytes and preadipocytes: on the role of fat in inflammation, Ann N Y Acad Sci, 2006, 1072: 407-409.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind auf folgenden Kongressen vorgestellt und als Abstract veröffentlicht worden:

Besir Okur, Rainer Glauben, Arvind Batra, Thorsten Stroh, Inka Fedke, Jeannette Pietsch, Martin Zeitz, Britta Siegmund, Effects of Leptin on T helper cell polarization. 37th Annual Meeting of the German Society of Immunology, 09/2007, Heidelberg

Besir Okur, Arvind Batra, Rainer Glauben, Thorsten Stroh, Inka Fedke, Martin Zeitz, Britta Siegmund, Adipokine-dependent T cell polarization-Modulating intestinal inflammation. Falk Workshop – Mechanisms of Intestinal Inflammation, 10/2007 Dresden

A. Batra, B. Okur, J. Ihbe, T. Stroh, R. Glauben, I. Fedke, M. Zeitz, B. Siegmund, On the role of adipokines in Th2 lymphocyte polarization. Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies, Wien 2008

11 Selbstständigkeitserklärung

Ich, Besir Okur, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Die Polarisierung von naiven T-Helferzellen unter Einfluss von Leptin" 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