

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
Abteilung Innere Medizin IV
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.-U. Häring

**Fettsäure-induzierte Apoptose:
Die Bedeutung der Toll-like Rezeptoren 2 und 4
in insulinsezernierenden Zellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Dennis Miklas Döcker
aus
Tübingen

2010

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Frau Professor Dr. S. Ullrich

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. T. Wieder

Meinen Eltern, die mich immer rückhaltlos unterstützt haben:

Andreas und Marie Rose Döcker

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
1. Einleitung.....	1
1.1. Diabetes mellitus.....	1
1.1.1. Definition, Diagnose und Formen des Diabetes mellitus	1
1.2. Langerhans-Inseln	2
1.3. Insulin	4
1.3.1. Geschichte des Insulins	4
1.3.2. Metabolische Wirkungen von Insulin	6
1.4. β -Zellplastizität.....	6
1.5. Toll-like Rezeptoren	7
1.6. Apoptose.....	12
1.7. NF κ B.....	13
1.8. Freie Fettsäuren, Toll-like Rezeptoren und Diabetes.....	16
1.9. Fragestellung	19
2. Material und Methoden.....	20
2.1. INS-1 Zellkultur	20
2.2. MIN6 Zellkultur.....	21
2.3. Isolierung von Mausinseln	21
2.3.1. Vorbereitung.....	21
2.3.2. Präparation.....	23
2.3.3. Maus-Inselkultur.....	24
2.3.4. β -Zellpräparation und -kultur	25
2.4. Real Time RT-PCR	26
2.5. RT-PCR	26
2.5.1. Sequenzierung der Produkte TLR2 und TLR4	28
2.6. Rezeptoraktivierung.....	28
2.7. Apoptosemessungen	30
2.7.1. TUNEL (Terminal dUTP Nick End-Labeling) Assay	30
2.7.2. DAPI Färbung.....	31

2.7.3. Einbettung in Polyvinylalkohol/Glycerin-Lösung.....	32
2.7.4. Fluoreszenzmikroskopie und Auswertung.....	32
2.8. NFκB-Messung in Mausinseln	33
2.9. Verwendete Materialien und Statistik.....	34
3. Ergebnisse	35
3.1. Expression von NFκB-assoziierten Genen in Mausinseln, Veränderung der Expression durch Palmitinsäure.....	35
3.2. Expression der Toll-like Rezeptoren 1, 2, 4 und 6 in insulin- sezernierenden Zellen	37
3.3. Palmitinsäure steigert konzentrations- und zeitabhängig die Apoptoserate in insulinsezernierenden INS-1 Zellen	38
3.4. TLR Aktivierung in INS-1 Zellen.....	43
3.5. Effekte von Palmitinsäure und TLR Agonisten auf die Apoptoserate in C57BL/6 Mausinselnzellen.....	44
3.6. Steigert TLR Aktivierung die NFκB-Aktivität in Mausinseln?.....	48
3.7. Wirkung von TLR2 und TLR4 Agonisten in TLR2/4 ^{-/-} Mausinselnzellen..	50
3.8. Zusammenfassung der Ergebnisse	51
4. Diskussion	53
4.1. Expression von Genen des TLR Signalweges in insulinsezernierenden Zellen	53
4.2. Toll-like Rezeptoren 2 und 4 sowie Palmitinsäure: Was löst in insulinsezernierenden Zellen Apoptose aus?	56
4.3. Wirkt Palmitinsäure spezifisch über TLR2 und/oder TLR4?.....	61
4.4. Schlussfolgerungen	62
5. Zusammenfassung	64
6. Referenzen.....	66
7. Anhang	77
7.1: Zusammenschau der verwendeten Materialien, Geräte, Mäuse und Zelllinien.....	77
7.2. Übersicht über die in Kapitel 3.1. beschriebenen Gene	81
Danksagung	86

Abkürzungsverzeichnis

Abe	Abequose
AP-1	Aktivator Protein-1
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C57BL/6	Mausstamm
cDNA	<i>copy</i> DNA
C3H	Mausstamm
CD	<i>cluster of differentiation</i>
D-	<i>dexter</i> (Raumstrukturbeschreibung einer chiralen chemischen Verbindung in der Fischer-Projektion)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid (organisches Lösungsmittel)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPP-4	Dipeptidyl-Peptidase 4
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Erk	extrazelluläre Signal-regulierte Kinase
F	<i>forward</i> (im Zusammenhang mit Primern)
FA/FFA	Fettsäure/freie Fettsäure
Gal	Galaktose
Glc	Glukose
Gln	Glukosamin
GLP-1	<i>glucagon-like peptide 1</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (Puffer)
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
HSP	Hitzeschockprotein
IDE	Insulin-degradierendes Enzym
IFN- β	Interferon- β
IKK	I κ B Kinase
INS-1	β -Zelllinie aus einem Ratteninsulinom
IRAK	Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase
IRF	Interferon-regulierender Faktor
IU	internationale Einheiten
JNK	Jun N-terminale Kinase
K.O.	<i>knockout</i> (Ausschaltung bestimmter Gene)
L-	<i>laevus</i> (Raumstrukturbeschreibung einer chiralen chemischen Verbindung in der Fischer-Projektion)
LPS	Lipopolysaccharid (Endotoxin, Bestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien)
Lys	Lysin
MAL/TIRAP	<i>MyD88-adaptor-like/TIR(Toll-interleukin 1 receptor domain)-associated protein</i>
Man	Mannose

MD-2	extrazelluläres Adaptermolekül zur Signaltransduktion von LPS
MIN6	Zelllinie aus einem Mausinsulinom
MODY	<i>Maturity Onset Diabetes of the Young</i>
MPI	Max-Planck-Institut
MyD88	<i>myeloid differentiation factor 88</i>
NEMO	<i>NFκB essential modulator</i>
NFκB	nukleärer Faktor kappa B (Transkriptionsfaktor)
OGTT	oraler Glukose-Toleranztest
p50	Untereinheit von NFκB
Pam3CSK4	synthetische Substanz zur Stimulation von TLR2/TLR1
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (Puffer)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKC	Proteinkinase C
Pos	Positiv-Kontrolle
PRR	<i>pattern recognition receptor</i> (Mustererkennungsrezeptor)
R	<i>reverse</i> (im Zusammenhang mit Primern)
RelA	Untereinheit von NFκB (Synonym: p65)
Rha	Rhamnose
RHD	<i>Rel Homology Domain</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (Namensgeber des RPMI 1640 Zellkulturmediums)
RT	Reverse Transkriptase
SEM	<i>standard error of the mean</i>
Ser	Serin
Stat1	<i>signal transducer and activator of transcription 1</i>
SV40	Simianes Virus 40
Tak	<i>transforming growth factor-β activated kinase</i>
Tbk	<i>TANK (TRAF family member-associated NF-κB activator)-binding kinase 1</i>
TIR	<i>toll-interleukin 1 homologous region</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TLR	Toll-like Rezeptor
TRAF	Toll-Rezeptor-assoziiertes Faktor
TRIF	Toll-Rezeptor-assoziiertes Aktivator von Interferon
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Trometamol, Puffer)
TUNEL Assay	<i>Terminal dUTP Nick End-Labeling Assay</i> (detektiert apoptotische Zellkerne)
UTP	Uridintriphosphat
VECs	vaskuläre Endothelzellen
ZMBP	Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen, Universität Tübingen

Weitere in Kapitel 3.1. verwendete Abkürzungen finden sich im Anhang 2.

1. Einleitung

1.1. Diabetes mellitus

Der Typ 2 Diabetes mellitus zählt zu den häufigsten, schwersten und aufgrund der Folgeschäden auch zu den kostenträchtigsten Krankheitsbildern. In Deutschland liegt die Prävalenz bei ungefähr 7%, das heißt, es leiden etwa 6 Millionen Deutsche an Diabetes mellitus (1, 2). Weltweit wird von 171 Millionen Diabetikern im Jahre 2000 zu 366 Millionen Diabetikern im Jahre 2030 mehr als eine Verdopplung der Prävalenz vorausgesagt, wobei die größte Zunahme in der Inzidenz sich in den Entwicklungsländern abzuspielen scheint: Der Diabetes mellitus korreliert mit sesshaftem Lebensstil, westlicher Lebensweise, überreicher Ernährung und Fettleibigkeit (3, 4). Dafür sind auch eigens andere, verwandte Krankheitsbilder beschrieben worden, so zum Beispiel das metabolische Syndrom oder der englische Begriff *diabesity*, der vor allem den Zusammenhang mit der Fettleibigkeit hervorheben will (5, 6). Trotzdem gibt es Menschen, die fettleibig sind und/oder unter anderen Symptomen des metabolischen Syndroms leiden, aber keine Anzeichen eines Diabetes mellitus aufweisen (4). Was Ätiologie und Pathogenese des Diabetes mellitus angeht, ist und bleibt also ein weites Feld, das noch längst nicht abgesteckt ist.

1.1.1. Definition, Diagnose und Formen des Diabetes mellitus

In den Evidenzbasierten Leitlinien der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) ist der Diabetes mellitus definiert als eine durch den Leitbefund chronische Hyperglykämie charakterisierte Regulationsstörung des Stoffwechsels (7, 8). Ursache ist entweder eine gestörte Insulinsekretion oder eine verminderte Insulinwirkung (Insulinresistenz) an den Zielorganen oder, wie im fortgeschrittenen Stadium des Typ 2 Diabetes mellitus, beides zusammen.

Folgen der chronischen Hyperglykämie sind mikro- und makroangiopathische Veränderungen, wobei die Mikroangiopathie vor allem zu Folgeerkrankungen an Augen, Nieren und Nervensystem führt (z.B. Erblindung, Niereninsuffizienz, Polyneuropathie), während die Makroangiopathie sich vor allem an Herz,

Gehirn und peripheren Arterien manifestiert (z.B. Herzinfarkt, Schlaganfall, periphere arterielle Verschlusskrankheit) (7).

Die Diagnose des Diabetes mellitus erfolgt über die Bestimmung des Glukosespiegels im Blut. Dabei gilt der orale Glukosetoleranztest (OGTT) mit 75 g Glukose als Goldstandard. Bei einer Nüchtern-Plasmaglukose (venös) von ≥ 126 mg/dl (≥ 7 mmol/l) bzw. einem 2 h OGTT – Wert von ≥ 200 mg/dl ($\geq 11,1$ mmol/l) diagnostiziert man einen Diabetes mellitus (7). Dabei gibt es verschiedene Vor-Formen der Diagnose, was im amerikanischen Sprachraum zum Begriff „Prä-Diabetes“ geführt hat: abnorme Nüchtern-Glukose (IFT, *impaired fasting glucose*) und gestörte Glukosetoleranz (IGT, *impaired glucose tolerance*). Vor allem die Diagnose der IGT hat sich als ein guter Prädiktor des weiteren Verlaufs herausgestellt (4).

Nach dem Expertenkomitee der *American Diabetes Association* (ADA) wird der Diabetes mellitus nach der Ätiologie in vier große Gruppen eingeteilt (9):

- Typ 1 Diabetes mellitus (1A: immunvermittelt, 1B: idiopathisch)
- Typ 2 Diabetes mellitus
- andere spezifische Typen (z.B. MODY)
- Gestationsdiabetes

Gesellschaftlich und gesundheitspolitisch gesehen spielt der Typ 2 Diabetes mellitus die größte Rolle, auch wenn zum Beispiel der Typ 1 Diabetes für den Patienten ein härteres Schicksal bedeutet, denn hier ist ein Überleben ohne Insulin nicht möglich. Wichtig ist noch anzumerken, dass eine Unterscheidung zwischen Typ 1 und Typ 2 Diabetes mellitus nicht immer eindeutig möglich ist, da sich die Charakteristika der beiden Typen überschneiden (10).

1.2. Langerhans-Inseln

Insulin wird nach heutigem Stand der Wissenschaft ausschließlich in den endokrinen pankreatischen β -Zellen produziert. Diese β -Zellen sind in vielen kleinen Ansammlungen organisiert, die in großer Zahl im Pankreas zu finden sind. Die Ansammlungen sind nach ihrem Entdecker Paul Langerhans (deutscher Pathologe, 1847-1888) benannt, der sie ihm Rahmen seiner Dis-

sertation „Beitrag zur mikroskopischen Anatomie der Bauchspeicheldrüse“ im Jahre 1869 beschrieb (11). Das menschliche Pankreas enthält beim Erwachsenen zirka 1 Million Langerhans-Inseln, die nur ungefähr 1 bis 2 % des Gesamtvolumens des Pankreas ausmachen und von exokrinem Gewebe umgeben sind. Die Inseln sind rundlich, haben einen Durchmesser von meist 100-200 μm (beim „Prädiabetes“ auch größer (12)) und enthalten bis zu 5000 hormonproduzierende Zellen, von denen die β -Zellen mit bis zu 80% den größten Anteil ausmachen. Diese liegen hauptsächlich zentral und werden ringartig von α -Zellen, δ -Zellen und PP-Zellen umgeben.

α -Zellen (ca. 10-20% der endokrinen Zellen) produzieren Glukagon, ein 29 Aminosäuren großes Peptid, das hauptsächlich in der Leber wirkt, wo es Glukoneogenese und Glykolyse bewirkt. Es ist ein Antagonist von Insulin und hebt den Blutzuckerspiegel.

Die β -Zellen (ca. 70-80% der endokrinen Zellen) produzieren Insulin und Amylin. Amylin ist ein 37 Aminosäuren großes Peptid, das zusammen mit Insulin in den β -Granula (in einem Verhältnis von Amylin: Insulin von 1:100) gespeichert wird. Amylin inhibiert die Glukagonsekretion und verlangsamt die Magen-Darm-Passage.

Die δ -Zellen (ca. 5-10% der endokrinen Zellen) produzieren Somatostatin. Somatostatin ist ein universeller Hemmer der gastrointestinalen Funktion und der Freisetzung von Hormonen wie z.B. Glukagon, Insulin oder pankreatischem Polypeptid.

Die PP-Zellen (weniger als 2% der endokrinen Zellen) produzieren das pankreatische Polypeptid (PP), das die exokrine Pankreassekretion und den Gallefluss hemmt.

In sehr geringer Anzahl sind auch weitere Zelltypen in den Langerhans-Inseln beschrieben worden, z.B. die Ghrelin-Zellen (ϵ -Zellen) (13). Nicht außer Acht gelassen werden darf - speziell in der Aufklärung von Ätiologie und Pathogenese des β -Zellverlustes - die Tatsache, dass die Inseln dicht vaskularisiert (*vascular endothelial cells, VECs*) (14) und innerviert (15) sind, sowie dass sie Fibroblasten und Makrophagen (16) enthalten. Speziell die

Funktion der Gefäßendothelzellen scheint in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle zu spielen.

Der Aufbau der Langerhansschen Inseln ist bei Säugetieren, also zum Beispiel bei Maus und Mensch, ähnlich. Es gibt jedoch auch wichtige Unterschiede, auf die in der Diskussion eingegangen wird.

1.3. Insulin

1.3.1. Geschichte des Insulins

Die Isolation von Insulin aus Pankreasgewebe ist nach wie vor einer der Meilensteine in der Geschichte der Medizin. Dies gelang 1916 zum ersten Mal dem rumänischen Physiologen Nicolae Paulescu, der sein isoliertes Extrakt als *pancreine* bezeichnete (17-19). 1921 gelang auch zwei Wissenschaftlern an der University of Toronto die Isolation von Insulin aus Pankreasgewebe, dies waren Frederic Banting und Charles Best. Sie nannten ihr Extrakt *isletin*, und es war in der Lage, in hyperglykämischen pankreatektomierten Hunden den Blutzucker zu senken (20, 21).

Für diese Arbeit bekam Banting, zusammen mit John J. R. Macleod, dem damaligen Chef der Physiologie an der University of Toronto (nicht aber Paulescu oder Best) im Jahre 1923 den Nobelpreis für Medizin oder Physiologie.

1922 wurde die erste Insulininjektion mit einer unreinen Insulinpräparation einem Patienten mit Typ 1 Diabetes mellitus verabreicht. Ein relativ reines Insulinextrakt wurde zuerst ebenfalls im Jahre 1922 von Eli Lilly and Company produziert (20).

1928 gelang Oskar Wintersteiner et al. der Nachweis, dass Insulin ein Protein ist (22, 23). 1934 beschrieb David A. Scott, dass Insulinkristalle Zink enthalten. Er bemerkte, dass das Insulin durch Zink in seiner Wirkung gebremst wird und entwickelte das erste Zinkinsulin (24). Zwei Jahre später wurde neben dem Zink auch das Protein Protamin verwendet um ein langwirkendes Insulin herzustellen: das Protamin-Zink-Insulin (PZI). Ein weiterer Ansatz eines

langwirkenden Verzögerungsinsulins war das neutrale Protamin Hagedorn (NPH-Insulin).

1958 bekam der Brite Frederick Sanger den zweiten Nobelpreis in der Geschichte des Insulins. Er war alleiniger Träger des Nobelpreises für Chemie, nachdem er 1955 nach zwölfjähriger Arbeit die komplette Aminosäuresequenz des Insulins veröffentlicht hatte (25). 1960 beschrieben D.S. Nicol und L.F. Smith die Struktur von Humaninsulin (26). 1963 gelang Helmut Zahn et al. die weltweit erste chemische Synthese des Insulins (27). Aufgrund der über 200 Synthesestufen konnte diese Insulinsynthese jedoch noch nicht industriell genutzt werden.

1976 gelang Rainer Obermaier und Rolf Geiger die enzymatische Synthese von Humaninsulin aus Schweineinsulin (28). 1982 war es erstmals möglich, Insulin mithilfe gentechnisch veränderter Bakterien in großer Menge herzustellen (29). 1996 kam mit Lispro von Lilly das erste schnellwirkende Insulinanalogon auf den Markt. Es stellte sich als gut wirksam heraus (30). Die Zulassung weiterer, auch langwirkender Insulinanaloga folgte (z.B. Glargine von Aventis, Aspart und Detemir von Novo).

Neben dem Insulin wurden seit 1956 aber auch andere Medikamente zur Behandlung des Typ 2 Diabetes mellitus eingesetzt, die sogenannten oralen Antidiabetika. Die ersten waren Sulfonylharnstoffe (Tolbutamid, Carbutamid) und Biguanide (Metformin, Phenformin). Davor war auch für die Behandlung des Typ 2 Diabetes mellitus der Einsatz von Insulin die einzige Möglichkeit einer medikamentösen Therapie.

Eine der neuesten Entwicklungen der oralen Antidiabetika sind die Inkretinmimetika und die Dipeptidyl-Peptidase 4 (DPP4)-Inhibitoren. Inkretinmimetika imitieren die Wirkungen des körpereigenen Hormons *Glucagon-like peptide 1* (GLP-1). DPP4-Inhibitoren verhindern den Abbau von GLP-1. Offenbar können diese Stoffe den Blutzucker ohne die Gefahr einer Hypoglykämie effektiv senken. Außerdem wirken sie anders als viele andere orale Antidiabetika nicht gewichtsfördernd, sondern scheinen eher noch zu einer für Typ 2 Diabetiker so wichtigen Gewichtsabnahme zu führen (31-34).

Exenatide (Handelsname Byetta von Lilly) ist das erste zugelassene Inkretinmimetikum (April 2005).

1.3.2. Metabolische Wirkungen von Insulin

Insulin ist das einzige (bekannte) Hormon des Menschen, das in der Lage ist, den Blutzucker zu senken. Es ist ein anaboles Hormon, das die Aufnahme von Glukose, Aminosäuren und Fettsäuren in periphere Gewebe, die an der Energiespeicherung beteiligt sind, stimuliert (Fettgewebe und Muskeln). Insulin inhibiert Lipolyse, Glykogenolyse, Glukoneogenese und Proteinabbau, während es Lipogenese, sowie Glykogen- und Proteinsynthese stimuliert. Insulin stimuliert auch Zellwachstum und –differenzierung (35).

In gesunden Individuen wird der Plasmaglukosespiegel unabhängig von Mahlzeiten oder Nüchternheit ziemlich konstant in einem Bereich um 5 mmol/l (90 mg/dl) gehalten. Dies ist möglich dank der engen Regulation der Glukoseaufnahme in periphere Gewebe und der Glukoseproduktion der Leber. Die Halbwertszeit von Insulin im Plasma ist kurz (4-6 min), was an der Aktivität des *insulin-degrading enzyme (IDE)* liegt. Die Clearance von Insulin findet vor allem in der Leber und den Nieren statt, aber prinzipiell sind hierzu alle Zellen, die Insulinrezeptoren und Internalisierungsmechanismen besitzen, in der Lage (36).

1.4. β -Zellplastizität

Anders als lange angenommen, stellen die pankreatischen β -Zellen ein äußerst plastisches Gewebe dar. Im Laufe eines Lebens gibt es viele physiologische wie pathologische Veränderungen. Dabei haben vier Faktoren einen Einfluss auf die β -Zellmasse (37, 38):

- β -Zellreplikation
- β -Zellneogenese
- β -Zellgröße
- β -Zellapoptose

Typisch für die Pathogenese des Typ 2 Diabetes mellitus ist beispielsweise in frühen Stadien (z.B. verminderte Glukosetoleranz, nichtdiabetische Fettleibigkeit) eine Zunahme von β -Zellmasse und -größe, die die oft schon vorhandene periphere Insulinresistenz zunächst überspielen kann. Bei weiterer Progredienz kommt es hingegen zu β -Zellverlust, Desorganisation und Amyloidablagerungen. Es kommt zur β -Zelldysfunktion und zur Manifestation eines Typ 2 Diabetes mit dem Leitsymptom Hyperglykämie. Eine besondere Rolle spielt bei diesem Vorgang vermutlich die β -Zellapoptose (37, 39, 40).

Als mögliche Ursachen von β -Zelldysfunktion und β -Zellapoptose gelten genetische wie erworbene Faktoren, wie zum Beispiel Glukolipotoxizität, Lipotoxizität, gestörte Insulinsynthese, oxidativer Stress, ER Stress oder mitochondriale Dysfunktion (40).

1.5. Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren sind Rezeptoren des angeborenen (nicht-adaptiven) Immunsystems. Sie gehören zur Gruppe der Mustererkennungsrezeptoren (PRRs, *pattern recognition receptors*) (41-46). Benannt sind sie nach ihrer Ähnlichkeit zu einem Protein in der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*), das die Tübinger Nobelpreisträgerin Christiane Nüsslein-Volhard als „Toll“ bezeichnet hat (47). Es spielt in der Embryogenese der Fruchtfliege eine entscheidende Rolle (48). Später fanden Bruno Lemaitre und Jules Hoffmann heraus, dass es auch an der angeborenen Immunität der Fruchtfliege beteiligt ist (49). Kurz danach entdeckten Ruslan Medzhitov und Charles A. Janeway ähnliche Proteine (Toll-artige oder Toll-like Rezeptoren) auch im Menschen (50). Erst 2006 wurde publiziert, dass diese Rezeptoren nicht nur an der Abwehr, sondern auch an der Signaltransduktion endogener Stoffwechselprodukte, zum Beispiel Fettsäuren, beteiligt sind und so auch in der Pathogenese des Typ 2 Diabetes mellitus eine Rolle spielen könnten (51-53). Tabelle 1 zeigt einen Überblick über die geschichtliche Entwicklung der wissenschaftlichen Beschreibung von Toll-like Rezeptoren, speziell die der Toll-like Rezeptoren 2 und 4.

Tabelle 1: Geschichtliche Entwicklung der wissenschaftlichen Beschreibung der Toll-like Rezeptoren (TLRs) mit Angabe von Jahr der Publikation, Hauptautoren (Erst- und Letztautor) und zitiertem Paper. Es wird besonders auf TLR2 und TLR4 eingegangen.

Jahr	Beschreiber	Entdeckung	Referenz
1985	Nüsslein-Volhard, Anderson	Entdeckung des Toll-Proteins in <i>Drosophila melanogaster</i> , das eine wichtige Rolle in der Embryogenese spielt (dorso-ventrale Differenzierung)	(47, 48)
1988	Hashimoto, Anderson	Klonierung und Sequenzierung des Toll-Proteins	(54)
1996	Lemaitre, Hoffmann	Das Toll-Protein ist auch an der angeborenen Immunität beteiligt (schützt Fliegen vor Pilzinfektionen)	(49)
1997	Medzhitov, Janeway	Ein humanes Homolog – ein Toll-artiger (engl. <i>Toll-like</i>) Rezeptor – wird beschrieben, der Funktion in der angeborenen Immunität hat	(50)
1998	Poltorak, Beutler	Eine TLR4 Mutation schützt vor Sepsis mit gramnegativen Bakterien, TLR4 wird als Rezeptor für LPS identifiziert	(55)
2003	Vives-Pi, Pujol-Borrell	Detektion von TLR2 und TLR4 in humanen β -Zellen	(56)
2006	Senn Shi, Flier	TLR2 und TLR4 scheinen in der Entwicklung Fettsäure-induzierter peripherer Insulinresistenz beteiligt zu sein	(51, 52)

Inzwischen sind in Säugetieren 13 verschiedene TLR Homologe identifiziert worden (10 in Menschen und 12 in Mäusen) (46). Toll-like Rezeptoren sind Typ I Transmembran-Rezeptoren (zu dieser Gruppe gehört auch der Insulinrezeptor). Ihre extrazelluläre Domäne ist durch Leucin-reiche Wiederholungen (LRRs, *leucin rich repeats*) gekennzeichnet. Ihre zytoplasmatische Domäne

gleich der des Interleukin-1 Rezeptors und wird deshalb als TIR-Domäne (*Toll/interleukin-1 receptor homologous region domain*) genannt. Man geht davon aus, dass die Toll-like Rezeptoren nur durch Dimerisierung zu einer Signaltransduktion führen. Dabei kann es sich um Homodimere handeln; TLR2 zum Beispiel kann aber auch mit TLR1 oder TLR6 Heterodimere formen (45).

Heute ist bekannt, dass Toll-like Rezeptoren durch eine ganze Reihe von Liganden aktiviert werden können. Eine Auswahl dieser Liganden ist in den Tabellen 2 und 3 gezeigt. Wie aus den beiden Tabellen hervorgeht, werden die Rezeptoren teilweise durch denselben Liganden aktiviert. Die Aufreinigung natürlicher Liganden ist schwierig und unvollkommen. So ist zum Beispiel Peptidoglykan zur Stimulation von TLR2 präparationsbedingt verunreinigt, sodass auch andere Rezeptoren (z.B. TLR4) aktiviert werden (45). Eine Möglichkeit, die Einflussnahme von Verunreinigungen auf ein Minimum zu reduzieren ist die Verwendung von synthetischen Liganden, wie zum Beispiel von synthetisch hergestelltem Pam3CSK4 zur Stimulation von TLR2.

Tabelle 2: Auswahl von Liganden des Toll-like Rezeptors 2 (TLR2) mit Angabe des Liganden, seines Ursprungs und der Referenzen (adaptiert nach Gay und Gangloff (45)).

TLR2 Liganden	Ursprung der Liganden	Referenzen
Lipoprotein/Lipopeptide	verschiedene Pathogene	(57, 58)
Peptidoglykan	Gram-positive Bakterien	(59)
Lipoteichonsäure	Gram-positive Bakterien	(59)
Porine	<i>Neisseria meningitidis</i>	(60)
Atypisches LPS	<i>Leptospira interrogans</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i>	(61, 62)
HSP70	endogen	(63)
Triacylierte Lipoproteine (Pam3CSK4)	Bakterien, Mykobakterien; synthetisch (aktiviert TLR1/ TLR2 Heterodimere)	(64)

Diacylierte Lipoproteine	Mycoplasma (aktiviert TLR2/ TLR6 Heterodimere)	(65)
Freie Fettsäuren/ Palmitin- säure	endogen	(51)

Tabelle 3: Auswahl von Liganden des Toll-like Rezeptors 4 (TLR4) mit Angabe des Liganden, seines Ursprungs und der Referenzen (adaptiert nach Gay und Gangloff (45)).

TLR4 Liganden	Ursprung der Liganden	Referenzen
Lipopolysaccharid (LPS)	Gram-negative Bakterien	(55)
Fusionsproteine	Respiratorisches Synzytial- Virus (RSV)	(66)
Hüllproteine	Maus-Mammatumovirus (MMTV)	(67)
HSP 60	endogen	(68, 69)
HSP 70	endogen	(63)
Fibrinogen	endogen	(70)
Freie Fettsäuren	endogen	(52)

Die Signaltransduktion der Toll-like Rezeptoren ist komplex und nach wie vor Gegenstand aktueller Forschung. Es sind heute mehrere Adapterproteine bekannt sowie viele Proteinkinasen, die zu *downstream signalling* Effekten und so letzten Endes zu zellulären Effekten wie zum Beispiel Apoptose führen können (45). Abbildung 1 gibt eine Übersicht über die wichtigsten Adapterproteine, die mit ihnen verbundenen Proteinkinasen und weitere *downstream signalling* Effekte.

Eine der neuesten Erkenntnisse über das Toll-like Rezeptor Signalling ist, dass die Proteinkinase C δ an die Adapterproteine MAL/TIRAP bindet und so auch an der TLR Signaltransduktion beteiligt zu sein scheint (71). In insulinsezernierenden Zellen ist auch bekannt, dass PKC δ -Aktivierung für die über freie Fettsäuren induzierte Apoptose notwendig ist (72).

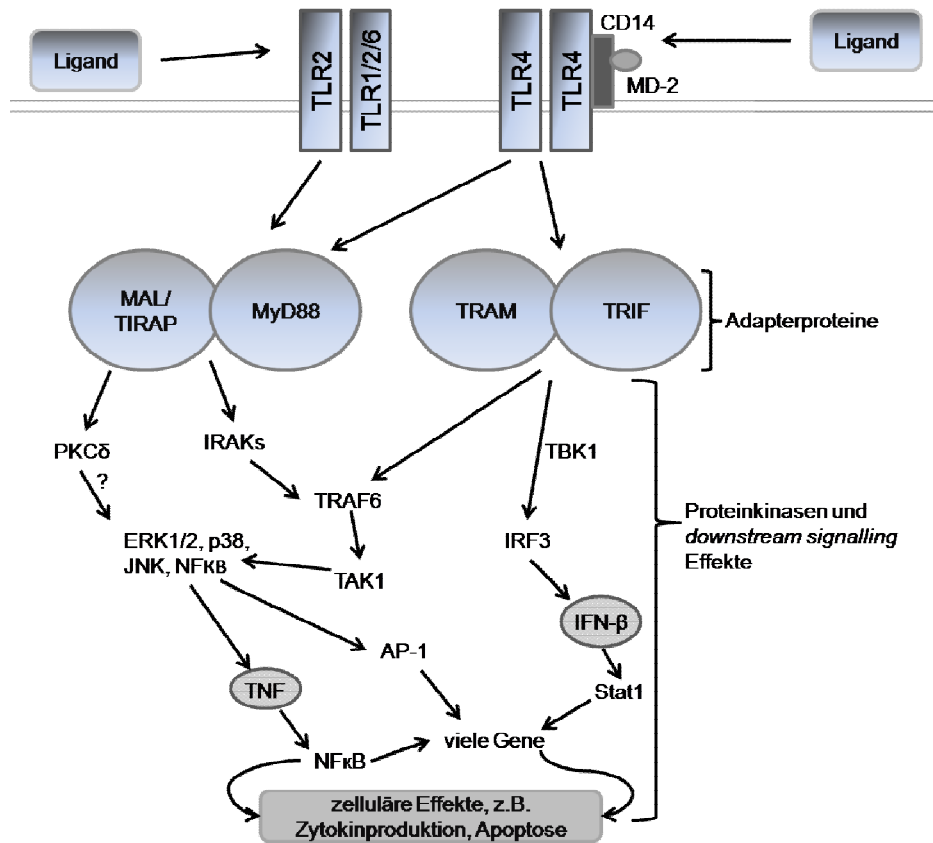


Abbildung 1: Übersicht über die grundlegende Beziehung zwischen den Toll-like Rezeptoren 2 und 4, ihren Adapterproteinen, den daran gekoppelten Proteinkinasen und den *downstream signalling* Effekten.

Toll-like Rezeptoren wirken als Homodimere (zum Beispiel TLR2, TLR4) oder Heterodimere (TLR2 mit TLR1 oder TLR6). Zur Aktivierung von TLR4 durch den Hauptliganden LPS sind außerdem das extrazelluläre Adapterprotein MD-2 sowie das Oberflächenmolekül CD14 notwendig. Stimulation der TLRs führt zur Aktivierung von intrazellulären Adapterproteinen, die über Proteinkinasen zu *downstream signalling* Effekten und so letztlich - unter anderem auch über die sezernierten extrazellulären Zytokine TNF und IFN- β - zu zellulären Effekten führen. Das Schaubild ist erstellt mit Daten aus (45, 46, 71, 73). Eine genauere Darstellung des NF κ B Signallings wird in Kapitel 1.7. gezeigt.

Abkürzungen: CD14 = *cluster of differentiation 14*; MD-2 = Ly96 = Lymphozyten-Antigen 96; TLR = Toll-like Rezeptor; MyD88 = *myeloid differentiation factor 88*; MAL/TIRAP = *MyD88-adaptor-like/TIR(Toll-interleukin 1 receptor domain)-associated protein*; TRAM = *Toll-receptor-associated*

molecule; TRIF = Toll-receptor-associated activator of interferon; PKCδ = Proteinkinase C δ; IRAKs = interleukin-1 receptor associated kinases; TRAF6 = TNF receptor associated factor 6; TNF = Tumor-Nekrose-Faktor; ERK1/2 = extracellular signal-regulated kinase 1/2; p38 = p38 mitogen-activated protein kinase; JNK = Jun N-terminal kinase; NFκB = nukleärer Faktor κB; TAK1 = transforming growth factor-β activated kinase 1; AP-1 = activator protein-1; TBK1 = TANK (TRAF family member-associated NF-κB activator)-binding kinase 1; IRF3 = interferon regulatory factor 3; IFN-β = Interferon-β; Stat1 = signal transducer and activator of transcription 1

1.6. Apoptose

Unter Apoptose versteht man den Prozess des programmierten Zelltodes, der durch verschiedene morphologische Charakteristika sowie energieabhängige, geordnete biochemische Mechanismen gekennzeichnet ist. Funktionierende Apoptose ist ein lebenswichtiger Bestandteil verschiedener Prozesse, wie zum Beispiel von normalem Zellumsatz, richtiger Entwicklung oder korrektem Funktionieren des Immunsystems. Zu viel oder zu wenig Apoptose ist allerdings verantwortlich für eine ganze Reihe von Pathologien, unter anderem neurodegenerative Erkrankungen, ischämischen Schaden, Autoimmunkrankheiten oder auch viele Arten von Krebs (74).

Der Begriff „Apoptose“ wurde zum ersten Mal in einem Paper von John F. Kerr, Andrew H. Wyllie und Alastair R. Currie im Jahre 1972 verwendet, um eine morphologisch andersartige Form des Zelltodes zu beschreiben (75). Hierbei ist vor allem die Abgrenzung gegen den sogenannten nekrotischen Zelltod gemeint, welcher ein energieunabhängiger, ungeordneter Weg des Zelltods ist. Dieser tritt auf, wenn die Zelle nicht mehr genug Energie besitzt, um den für den Gesamtorganismus weit schonenderen Weg der Apoptose einzuschlagen. Die Apoptose ist im Gegensatz zur Nekrose ein aktiver Vorgang einer Zelle.

Nekrose ist gekennzeichnet durch Karyolyse, Zellschwellung, Zerstörung der Zellmembran, Zytoplasmafreisetzung und konsekutiv entzündliche Begleitveränderungen. Oft sind größere, zusammenhängende Zellverbände betroffen.

Beim apoptotischen Zelltod hingegen sind meist nur einzelne Zellen involviert. Es findet eine Kernschrumpfung statt, und die Organellen sowie das Zytoplasma der Zelle werden in sogenannten apoptotischen Körperchen zurückgehalten, damit sie im umgebenden Gewebe keinen weiteren Schaden anrichten können. Die Zellmembran bleibt intakt und es kommt nicht oder nur kaum zu Entzündung.

Allerdings ist nicht immer klar zwischen den beiden Zelltodformen zu unterscheiden, sodass Caroline J. Zeiss im Jahr 2003 den Begriff des „Apoptose-Nekrose-Kontinuums“ beschrieben hat, was auf geteilte biochemische Netzwerke beim Ablauf des jeweiligen Zelltodes abzielt (76).

Es sind auch noch weitere Formen des Zelltods beschrieben, zum Beispiel die Autophagie (77, 78), auf die an dieser Stelle allerdings nicht näher eingegangen werden soll.

Heute sind drei Hauptwege der Apoptose bekannt, die nach unterschiedlicher Aktivierung alle in einer gemeinsamen Endstrecke, nämlich dem Exekutionsweg mit Caspase-3 Aktivierung, enden:

- Extrinsischer oder Todesrezeptor-Weg
- Intrinsischer oder mitochondrialer Weg
- Perforin/Granzym-Weg (T-Zell-vermittelt)

Die Caspase-3 Aktivierung bewirkt schließlich die Aktivierung von Endonukleasen, die die zelluläre DNA abbauen, sowie die Aktivierung von Proteasen. Es folgen zytomorphologische Veränderungen wie Kondensation von Chromatin und Zytoplasma, Kernfragmentation und letztendlich die Formierung apoptotischer Körperchen, die ohne Entzündungsreaktion abgeräumt werden können (74).

1.7. NFκB

Der nukleäre Faktor kappa B (NFκB) ist ein wichtiger, ubiquitär vorkommender Transkriptionsfaktor. Dabei ist die Bezeichnung nukleärer Faktor κB eigentlich eine grobe Vereinfachung der Tatsache, dass NFκB eine ganze Proteinfamilie darstellt, die sich wieder in zwei große Subfamilien untergliedern lässt: die NFκB Proteine und die Rel Proteine. Alle diese Proteine teilen eine hoch

konservierte DNA-Bindungs/Dimerisierungs-Domäne, die *Rel Homology Domain* (RHD) genannt wird.

Bei Säugetieren besteht die Rel Subfamilie aus c-Rel, RelB und RelA (=p65), während die NFκB Subfamilie aus p105 und p100 besteht, aus denen entweder durch limitierte Proteolyse oder durch arretrierte Translation p50 (aus p105) bzw. p52 (aus p100) entstehen können. p50 wird auch als NFκB1, und p52 als NFκB2 bezeichnet.

Der aktive nukleäre Faktor kappa B entsteht durch Dimerisierung zweier verschiedener Proteine aus der NFκB Familie, wobei oft je ein Protein aus der NFκB Subfamilie mit einem Protein der Rel Subfamilie kombiniert zu finden sind. Klassisches Beispiel ist das p50/RelA(=p65)-Heterodimer (79-81).

Aus dem eben gesagten lässt sich schlussfolgern, dass es sehr schwierig ist, die Funktionsweise von „NFκB“ zu erkennen und zu verstehen. Auch ist leicht einsichtig, dass „NFκB“ an multiplen zellulären Vorgängen beteiligt ist (z.B. Immunantwort, Entzündung, Zellproliferation, Zelltod). Dabei kann „NFκB“ oft auch entgegengesetzte Wirkungen haben, zum Beispiel kann es sowohl pro- als auch antiapoptotisch wirken (82).

Das NFκB Signalling wird vor allem durch IκB Proteine (*inhibitor of kappa B*) und den IκB Kinase Komplex reguliert. Dabei unterscheidet man einen kanonischen (klassischen) von einem nicht-kanonischen (nicht-klassischen) Weg, sowie einen „dritten Weg“ (79). Auf den nicht-kanonischen Weg sowie den dritten Weg soll hier nicht eingegangen werden. Abbildung 2 zeigt schematisch den kanonischen Weg, über den auch die oben erwähnten Toll-like Rezeptoren oder der Tumor-Nekrose-Faktor ihre Wirkung entfalten.

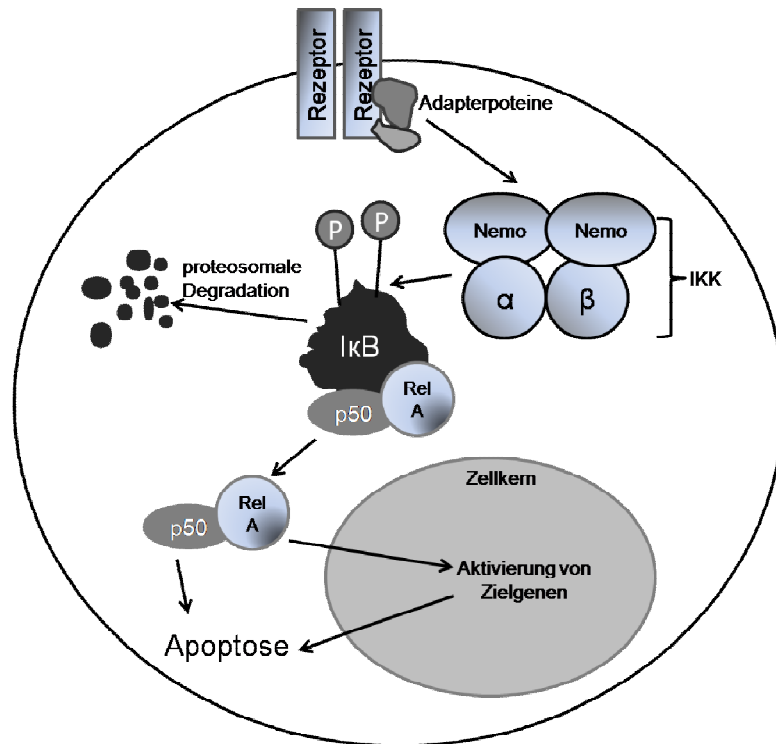


Abbildung 2: Der kanonische Weg der NFκB Signaltransduktion.

NFκB-Dimere wie zum Beispiel p50/RelA(=p65) befinden sich im Zytoplasma gebunden an ein unabhängiges IκB Molekül. Die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor an der Zelloberfläche (Typ I Transmembranrezeptoren, z.B. TNF-R oder Toll-like Rezeptoren) rekrutiert Adapterproteine zur zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors. Diese Adapterproteine aktivieren einen IKK Komplex (bestehend aus vier Untereinheiten). IKK phosphoryliert IκB an zwei Serin-Resten, die zu dessen Ubiquitinierung und Degradation durch Proteasomen führt. Nun kann NFκB in den Kern eintreten und Zielgene aktivieren, die dann zu weiteren zellulären Effekten wie zum Beispiel Apoptose führen können. NFκB kann unter Umständen auch direkt zu Apoptose führen.

Das Schaubild ist mit Daten aus (79, 81, 82) erstellt worden.

Abkürzungen: NFκB = nukleärer Faktor κB; NEMO = *NFκB essential modulator*, IKK = IκB Kinase, TNF-R = Rezeptor für den Tumor-Nekrose-Faktor, TRAF = *TNF-receptor associated factor*, P = Phosphatrest. p50 und Rel1 (=p65) sind Untereinheiten von NFκB.

1.8. Freie Fettsäuren, Toll-like Rezeptoren und Diabetes

Es ist bekannt, dass sowohl Fettleibigkeit, die üblicherweise mit erhöhten freien Fettsäuren einhergeht (83-86), als auch eine alleinige Erhöhung der freien Fettsäuren im Blut ohne Fettleibigkeit an der Pathogenese des Typ 2 Diabetes beteiligt sind (86, 87). Dabei scheinen in der Pathogenese vor allem die gesättigten Fettsäuren eine Rolle zu spielen, während die ungesättigten Fettsäuren im Allgemeinen eher als unschädlich oder gar protektiv beschrieben werden (72). Diese Annahmen sind jedoch selbst in Fachkreisen sehr umstritten. Unstrittig ist hingegen eine Assoziation von freien Fettsäuren und Entstehen eines Typ 2 Diabetes.

Nach einer Arbeit von Katrin Eitel et al. (72) findet sich physiologischerweise im menschlichen Blut eine Vielzahl an freien Fettsäuren, von denen zirka 44 % zu den gesättigten und zirka 56 % zu den ungesättigten Fettsäuren gehören. Die Palmitinsäure ist mit zirka 28% (Gesamtanteil aller Fettsäuren im Blut) die mit Abstand häufigste freie gesättigte Fettsäure im Blut. Die häufigste ungesättigte freie Fettsäure im Blut ist die Oleinsäure (zirka 32% Gesamtanteil aller Fettsäuren im Blut).

Freie Fettsäuren sind wichtig für viele zelluläre Funktionen. Für viele Zelltypen, insbesondere für Leber-, Herzmuskel- und Skelettmuskelzellen, aber unter anderem auch für β -Zellen, stellen freie Fettsäuren eine wichtige Quelle für die Energiegewinnung dar. Im Zentrum des Lipidstoffwechsels steht dabei das Acetyl-CoA, welches einerseits als Produkt der β -Oxidation in den Citratzyklus einfließen kann und so zu Energie in Form von ATP verarbeitet werden kann, welches aber andererseits auch Ausgangspunkt für eine ganze Reihe von Lipiden ist, die ihrerseits wichtige Bedeutung für Energiespeicherung haben (zum Beispiel Triacylglycerine = TAGs, die mengenmäßig vor allem im Fettgewebe gespeichert werden). Lipide sind aber auch Bestandteile von Membranen und/oder weisen weitere Funktionen auf. In Hungerzuständen synthetisiert die Leber aus Acetyl-CoA Ketonkörper, die dann physiologischerweise Substrate für Herz und Gehirn darstellen. In pathologisch

hohen Konzentrationen, wie sie sowohl beim Typ 1 als auch Typ 2 Diabetes mellitus als Komplikation auftreten, sind sie allerdings die Ursache für die gefürchtete Ketoazidose, die lebensgefährlich sein kann (88).

Fettsäuren, aber auch aus ihnen aufgebaute Phospho- und Glykolipide, sind elementare Bestandteile von Zellmembranen. Aus manchen Phospholipiden können intrazelluläre Botenstoffe (*second messenger*) freigesetzt werden, die dann an der Signaltransduktion von den verschiedensten Stoffen beteiligt sind. Wichtige Beispiele sind hier das Diacylglycerol (DAG) und das Inositoltrisphosphat (IP₃), die aus dem membranständigen Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) durch eine Phospholipase C freigesetzt werden (89).

Aus dem durch die β -Oxidation entstehenden Acetyl-CoA wird aber auch das Cholesterin aufgebaut, welches einerseits ebenfalls elementarer Bestandteil von Zellmembranen und Grundbaustein der Steroidhormone ist, andererseits aber auch bei der Pathogenese von Krankheiten wie zum Beispiel der Arteriosklerose mit all ihren Folgeerscheinungen eine wichtige Rolle spielt (90).

Fettsäuren sind auch für die Synthese von Ceramid notwendig, das in Form von Sphingomyelin oder Glykolipiden in die Zellmembran eingebaut wird. Ceramid und andere Sphingolipide sind an einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung oder Zellmigration beteiligt (91).

Auch für die Exozytose von Vesikeln sind freie Fettsäuren notwendig. In der β -Zelle ist die Glukose-stimulierte Insulinsekretion auf die Präsenz einiger freier Fettsäuren angewiesen.

Außerdem haben freie Fettsäuren die Fähigkeit, die Glukose-stimulierte Insulinsekretion um ein Vielfaches zu amplifizieren, was vor allem in Situationen von β -Zell-kompensierter peripherer Insulinresistenz (verminderte Glukosetoleranz, nichtdiabetische Fettleibigkeit, „Prä-Diabetes“) von außerordentlicher Bedeutung ist (92).

Ein wichtiger bekannter Fettsäurerezeptor, der bei der durch freie Fettsäuren induzierten beziehungsweise durch freie Fettsäuren potenzierten Insulinsekretion eine entscheidende Rolle spielt, ist der G-Protein gekoppelte Rezeptor 40 (GPR40), der auch unter dem Namen FFAR1 (*free fatty acid receptor 1*) bekannt ist (93).

Als weitere Rezeptoren, die an der Fettsäure-Signaltransduktion beteiligt zu sein scheinen, sind in den letzten Jahren die Toll-like Rezeptoren 2 und 4 beschrieben worden, und zwar unter anderem in Zusammenhang mit der Fettsäure-induzierten Insulinresistenz (51-53, 56, 94-97).

Dabei scheint der Toll-like Rezeptor 2 essenziell für die Entstehung einer Insulinresistenz in Myotuben durch die gesättigte Fettsäure Palmitinsäure zu sein. Weiterhin wurden eine Aktivierung der Stress-gekoppelten Kinasen p38, JNK und der Proteinkinase C beobachtet, ebenso wie eine Degradation von I κ B α und erhöhte Bindung von NF κ B an DNA (51).

Dass auch der Toll-like Rezeptor 4 am Entstehen einer peripheren Insulinresistenz beteiligt ist, zeigten Hang Shi et al. Die Untersuchungen ergaben, dass TLR4^{-/-} Mäuse im Wesentlichen vor den Folgen einer systemischen Lipidinfusion geschützt sind, also keine periphere Insulinresistenz ausbilden, die für den Beginn eines Typ 2 Diabetes mellitus charakteristisch ist (52).

Die Existenz der Toll-like Rezeptoren in insulinsensitivem Gewebe scheint also eine große Rolle bei der Entstehung von Insulinresistenz und damit Typ 2 Diabetes mellitus zu spielen. Neuerdings ist auch eine Expression von TLR2 und TLR4 in humanen β -Zellen bekannt (56).

Weitgehend unbekannt ist aber nach wie vor die Bedeutung dieser Rezeptoren in den β -Zellen.

1.9. Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob eine Aktivierung von Toll-like Rezeptoren bei der durch freie Fettsäuren induzierten Apoptose in insulinsezernierenden Zellen eine Rolle spielt.

Für die Beantwortung dieser Frage standen die β -Zelllinien INS-1 und MIN6, die Wildtyp-Mausstämme C57BL/6 und C3H sowie ein Doppel-*knock out* Mausstamm für TLR2 und TLR4 (TLR2/4^{-/-}) zur Verfügung.

Zunächst wurde die Expression von Toll-like Rezeptoren und deren Komponenten in der Signaltransduktion auf mRNA-Ebene in insulinsezernierenden Zellen untersucht.

Anschließend wurden die Effekte spezifischer Agonisten für TLR2 und TLR4 mit den Effekten von Palmitinsäure auf die Aktivierung von NF κ B sowie auf die Apoptoserate verglichen. Mittels der Doppel-*knock out* Mäuse für TLR2 und TLR4 sollte untersucht werden, ob Effekte von Palmitinsäure spezifisch über TLR2 und TLR4 hervorgerufen werden.

2. Material und Methoden

2.1. INS-1 Zellkultur

Die INS-1 Zellen wurden von Prof. Dr. Claes B. Wollheim vom Universitätsklinikum Genf/Schweiz zur Verfügung gestellt. Die INS-1 Zelllinie ist eine pankreatische β -Zelllinie, die aus einem Ratteninsulinom gewonnen wurde. Das Insulinom wurde durch Röntgenstrahlung induziert (98).

Die Zellen wurden in 75 cm² Flaschen (Techno Plastic Products AG, Trasadingen/Schweiz, Katalognummer 90076) in RPMI 1640 Medium (mit 11 mmol/l Glukose, Invitrogen Corporation, Carlsbad/USA, Katalognummer 31870-074) unter Zusatz von 10% (Volumen/Volumen) fötalem Rinderserum (Biochrom AG, Berlin, Katalognummer S0615), 1 mmol/l HEPES (Invitrogen Corporation, Carlsbad/USA, Katalognummer 15630-049), 50 μ mol/l β -Mercaptoethanol (Sigma, St. Louis/USA, Katalognummer M7522), 1 mmol/l Natrium-Pyruvat (Invitrogen Corporation, Carlsbad/USA, Katalognummer 11360-039), 2 mmol/l L-Glutamin (Invitrogen Corporation, Carlsbad/USA, Katalognummer 25030-024), 100 000 IU/l Penicillin und 100 mg/l Streptomycin (Fertiglösung, Invitrogen Corporation, Carlsbad/USA, Katalognummer 15140-122) kultiviert. Die Zellen wurden in einer Dichte von 5×10^6 Zellen pro 20 ml ausgesät und in 5%iger CO₂ Atmosphäre bei 37°C für eine Woche kultiviert (Mediumwechsel alle zwei Tage), bevor sie wieder neu fraktioniert wurden.

Für die Trypsinierung wurde das Medium entfernt und die Zellen einmal mit 15 ml 37°C warmem PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung, Ca²⁺/Mg²⁺- frei; pH 7,2; Invitrogen Corporation, Carlsbad/USA, Katalognummer 20012-068) gewaschen. PBS wurde vollständig entfernt und es wurden 10 ml 37°C warme Trypsin-PBS-Lösung (1:4 in PBS) auf die Zellen pipettiert. Daraufhin wurden die Zellen für 3 bis 5 min in den Zellinkubator gestellt, um sie von der Kulturflasche zu lösen.

Trypsin (10-fach Vorratslösung, Invitrogen Corporation, Carlsbad/USA, Katalognummer 15400-054) wurde mit PBS zu einer 1-fach Vorratslösung verdünnt und bei -20°C gelagert. Die weitere Verdünnung zu 1:4 (Trypsin zu PBS) wurde erst direkt vor der Trypsinierung der Zellen vorgenommen.

Die abgelösten Zellen wurden vorsichtig einige Male auf- und abpipettiert, um noch vorhandene Zellagglomerate in eine Einzelzelllösung zu überführen. Durch Zugabe von 25 ml eiskaltem Kulturmedium (siehe oben) wurde die Trypsinierung gestoppt. Die Zellen wurden bei 300 g für 4 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Nach dem Zählen in einer Neubauer-Kammer wurden 5×10^6 Zellen in einer 75 cm² Kulturflasche ausgesät, oder entsprechend geringere Mengen für die durchgeführten Versuche (siehe unten).

2.2. MIN6 Zellkultur

Die MIN6 Zellkultur erfolgte analog zu der oben beschriebenen INS-1 Zellkultur. Allerdings wurde hier ein anderes Kulturmedium verwendet, das DMEM-Medium (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Lonza, Basel/Schweiz, Katalognummer BE12-707F), unter Zugabe von Glukose auf eine Gesamtkonzentration von 23,6 mmol/l, sowie 15% (Volumen/Volumen) fötalem Rinderserum, 71 µmol/l β-Mercaptoethanol und 4 mmol/l L-Glutamin.

MIN6 Zellen sind eine β-Zellkultur aus einem Mausinsulinom. Das Insulinom wurde hier nicht wie bei den INS-1 Zellen durch Röntgenstrahlung, sondern durch das Polyomavirus SV40 (Simianes Virus 40) induziert (99, 100). Die MIN6 Zellen wurden von Prof. Dr. Philippe A. Halban vom Universitätsklinikum Genf/Schweiz zur Verfügung gestellt.

2.3. Isolierung von Mausinseln

2.3.1. Vorbereitung

Für die Insel-Isolierung wurden 2-4 Monate alte Mäuse verwendet: C57BL/6 Mäuse (Charles River Laboratories, Wilmington/USA), sowie TLR2/4^{-/-} Mäuse

und ihre entsprechenden Kontrollen C3H. Die TLR2/4^{-/-} Mäuse wurden von Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee von der Abteilung für Immunologie (Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt. Die C3H Mäuse wurden wie die C57BL/6 Mäuse von Charles River Laboratories gekauft.

Die für die Isolation verwendete Hanks-Lösung (4-fach) beinhaltete:

- 137 mmol/l Natriumchlorid (NaCl, Merck KGaA, Darmstadt, Katalognummer 1.06404.1000)
- 5,4 mmol/l Kaliumchlorid (KCl, Merck KGaA, Darmstadt, Katalognummer 1.04936.0250)
- 1,26 mmol/l Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, Carl Roth, Karlsruhe, Katalognummer 5239.1)
- 0,8 mmol/l Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, Fluka, St. Louis/USA, Katalognummer 63140)
- 0,4 mmol/l Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, Merck KGaA, Darmstadt, Katalognummer 1.06580.1000)
- 0,44 mmol/l Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4 , Merck KGaA, Darmstadt, Katalognummer 1.04873.0250)
- 4,2 mmol/l Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3 , Carl Roth, Karlsruhe, Katalognummer 85631)
- 10 mmol/l HEPES

Die Reagenzien wurden bis auf das $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ zusammen eingewogen. Dieses wurde getrennt in 10 ml Aqua dest. gelöst und dann zugegeben. Aus dieser 4-fach Hanks-Lösung wurden am Tag des Experiments die Präparierlösungen hergestellt.

Präparierlösung A (ohne BSA)

Durch die Zugabe von 300 ml Aqua dest. zu 100 ml der 4-fach konzentrierten Hanks-Lösung und Addition von 0,22 g D-(+)-Glukose (Sigma, St. Louis/USA, Katalognummer G-8270) erreichte man die gewünschte einfache Hanks-Lösung mit einer Glukosekonzentration von 2,8 mmol/l. Diese Lösung wurde durch Zugabe von 1 mol/l beziehungsweise 5 mol/l Natriumhydroxid (NaOH, Merck

KGaA, Darmstadt, Katalognummer 1.06498.1000) auf einen pH-Wert von 7,25 eingestellt.

Präparierlösung B (mit BSA)

Es wurden 1,22 g BSA (Bovines Serum Albumin, Fraktion V, 96%, Sigma, St. Louis/USA, Katalognummer A4503) zu 350 ml Präparierlösung A hinzugegeben.

Kollagenase-Lösung zum Verdau des exokrinen Pankreas

Für die Präparation eines Mauspankreas wurden 23,4 µl von 1 mmol/l CaCl₂-Lösung zu 4 ml Präparierlösung A mit 1 mg/ml Kollagenase (aus *Clostridium histolyticum*, SERVA, Heidelberg, Katalognummer 17456-02) hinzugegeben. Diese Lösung wurde dann während der Präparation transduktal durch die Vatersche Papille in das Pankreas injiziert (siehe unten).

Alle verwendeten Lösungen wurden während der Präparation auf Eis gestellt und eiskalt verwendet.

2.3.2. Präparation

Das Prinzip der Langerhans-Insel-Isolation wurde bereits 1967 von Lacy und Kostianovsky publiziert, dort aus Rattenpankreas (101). Die in dieser Arbeit verwendete Isolationsmethode für Mäuse war ähnlich.

Hierzu wurde die Maus mit CO₂ getötet. Dann wurde das Fell über dem Abdomen mit Alkohol desinfiziert, eingeschnitten und weiträumig entfernt, bevor das Peritoneum eröffnet wurde. Nun wurde das Duodenum aufgesucht. Mit Klammern wurde oral und aboral der Vaterschen Papille (Papilla duodeni major, gemeinsame Mündungsstelle von Ductus choledochus und Ductus pancreaticus) ligiert. Das Ligamentum hepatoduodenale, das den Ductus choledochus enthält, wurde mit einem dünnen Faden ligiert. Es erfolgte eine Inzision an der Vaterschen Papille, und es wurden transduktal mit einer dünnen, stumpfen Nadel 3 ml der Kollagenase-Lösung injiziert. Das aufgeblähte Pankreas wurde mit einer Schere herausgetrennt und in einem 50 ml Röhrchen (Greiner Bio-

One International AG, Kremsmünster/Österreich, Katalognummer 210 261) für 10 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe von 30 ml von Präparierlösung B und vorsichtigem Schütteln der Verdau des Pankreas durch die Kollagenase gestoppt. Nach einminütiger Zentrifugation bei 300 g wurde der Überstand bis auf zirka 5 ml verworfen. Durch sechsmaliges langsames Auf- und Abziehen in einer 20 ml-Spritze mit Metallkanülenaufsatz (0,2 mm Durchmesser) wurde das Isolat mechanisch homogenisiert, wobei die verbliebenen exokrinen Anteile des Pankreas von den Inseln abgelöst werden sollten. Daraufhin wurde das 50 ml Röhrchen mit dem sich darin befindenden Isolat wieder bis auf 30 ml mit Präparierlösung A aufgefüllt und erneut bei 300 g für 1 min zentrifugiert. Es wurde wieder der Überstand bis auf 5 ml verworfen und der Rest schließlich nach erneutem Auf- und Abpipettieren durch ein Teesieb in eine Petri-Schale mit schwarzem Untergrund filtriert.

Unter dem Binokular erschienen die Inseln nun als kleine, rundliche weiße Punkte inmitten von exokrinem Gewebe. Die Inseln wurden manuell mit einer Pipette verlesen und in eine weitere Petrischale, die mit frischer Präparierlösung B gefüllt war, pipettiert. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis die Inseln in reiner Form vorlagen, in der Regel drei bis fünf Mal. Währenddessen wurden die Inseln die ganze Zeit auf Eis gekühlt. Am Ende einer solchen Präparation standen zirka 100 bis 350 aufgereinigte isolierte Inseln für Versuche zur Verfügung.

2.3.3. Maus-Inselkultur

Es wurde dasselbe Medium wie bei der INS-1 Zellkultur verwendet, jedoch ohne Zugabe von β -Mercaptoethanol. Nach der oben beschriebenen Trennung von dem exokrinen Gewebe wurden die Inseln in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß in 0,5 - 1 ml Hanks-Lösung gesammelt. Anschließend wurden die Inseln unter der Sterilbank in ein steriles 15 ml Röhrchen, das mit 10 ml Kulturmedium gefüllt war, transferiert. Nun wurde für 1 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Inseln wurden erneut in ein steriles, 10 ml Kulturmedium enthaltendes 15 ml Röhrchen transferiert. Nach Zentrifugation wurde der

Überstand wieder entfernt und die Inseln in sterile, nichtanhaftende Petrischalen pipettiert (mit 2 ml Kulturmedium). Es erfolgte eine Inkubation in 5%iger CO₂ Atmosphäre bei 37 °C über Nacht. Am folgenden Morgen standen die Inseln für Versuche zur Verfügung.

2.3.4. β -Zellpräparation und -kultur

Für die β -Zellkultur wurde das gleiche Medium wie für die Inselkultur verwendet. Nach der Aufreinigung wurden die Zellen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß in 0,5 - 1 ml Hanks-Lösung gesammelt und dann unter der Sterilbank in ein 15 ml Röhrchen, das mit 10 ml sterilem eiskaltem PBS gefüllt war, transferiert und zentrifugiert (1 min bei 300 g bei Raumtemperatur). PBS wurde entfernt und 200 μ l Trypsin-Lösung (1:4 in PBS) pro 100 Inseln wurden hinzugefügt und vorsichtig auf- und abpipettiert. Die Inseln wurden bei 37°C für 4 min inkubiert und mechanisch durch Auf- und Abpipettieren zerkleinert. Der Verdau wurde durch Zugabe von 10 ml Kulturmedium gestoppt. Nach Zentrifugation (4 min bei 1200 g bei Raumtemperatur) wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden in 1 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf ein mit 10 ml frischem Kulturmedium gefüllten 15 ml Röhrchen aufgetropft und erneut zentrifugiert (4 min bei 1200 g bei Raumtemperatur). Es wurde der Überstand entfernt und das Pellet in einem kleinen Volumen Kulturmedium (200 μ l pro 100 Inseln) resuspendiert. Dann wurden Tropfen von 20 - 25 μ l von der Zellsuspension in die Mitte von Poly-L-Ornithin-beschichteten Glasdeckplättchen pipettiert (Poly-L-Ornithin-Lösung: Sigma, St. Louis/USA, Katalognummer P4957). Die Deckplättchen lagen dabei in Zellkulturschalen und waren am Rand mit zwei Tropfen Kulturmedium versehen (zum Verhindern der Austrocknung). Die Zellkulturschalen wurden nun für 60 bis 120 min in den Zellinkubator gestellt (5% CO₂, 37°C), damit die Zellen auf den Deckgläschen anhaften konnten. Dann wurden die Zellkulturschalen mit 2 ml Kulturmedium aufgefüllt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel und die Zellen konnten für die entsprechenden Versuche behandelt werden.

2.4. Real Time RT-PCR

Das Mouse NF κ B Signaling Pathway RT² Profiler PCR Array (SuperArray Bioscience Corporation, Frederick/USA, Katalognummer PAMM-025F) erlaubt das gleichzeitige Screenen von 84 Genen, die mit NF κ B-vermittelter Signaltransduktion in Verbindung stehen. Die Analyse wurde mit cDNA aus 1 μ g RNA aus isolierten Mausinseln, die kultiviert und 2 h mit Palmitinsäure (600 μ mol/l) stimuliert wurden, durchgeführt. Es wurde streng nach dem Protokoll des Herstellers gearbeitet.

2.5. RT-PCR

Mithilfe von RT (Reverse Transkription)-PCR wurde speziell die Expression der Toll-like Rezeptoren 1, 2, 4 und 6 in Mausinselzellen, sowie in MIN6 Zellen und INS-1 Zellen untersucht. Als Positivkontrolle für die TLR-Primer dienten Maus-Mastzellen (die cDNA wurde freundlicherweise von Frau Dr. Ekaterina Shumilina vom Physiologischen Institut, Universität Tübingen, zur Verfügung gestellt). Als Positivkontrolle für insulinsezernierende Zellen diente der Nachweis von Insulin-mRNA.

Die RNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo/Niederlande, Katalognummer 74104) isoliert. Die spezifischen Primer wurden mit dem Programm Primer3 (102) designed.

Tabelle 4 zeigt die Sequenzen und Produktgrößen der verwendeten TLR-Primer sowie des Insulin-Primers. Die Primer wurden bei der Invitrogen Corporation (Carlsbad/USA) bestellt.

Die PCR wurde gemäß des in Tabelle 5 gezeigten Protokolls durchgeführt.

Tabelle 4: Verwendete TLR-Primer und Insulin-Primer mit Angabe von Spezies, Name, Sequenz und Produktgröße. Abkürzungen: TLR = Toll-like Rezeptor; bp = Basenpaare; A = Adenin; G = Guanin; C = Cytosin; T = Thymin. In den Namen steht F für *forward* und R für *reverse*.

TLR	Spezies	Name	Sequenz (von 5' nach 3')	Produktgröße
TLR1	Maus	TLR1F1	AAGAACTCAGGCGAGCAGAG	226 bp
		TLR1R1	GTTTGCGTTTGGCCTCTTTA	
TLR2	Ratte	INS-1	GGAGACTCTGGAAGCAGGTG	245 bp
		TLR2F1		
		INS-1	CGCCTAAGAGCAGGATCAAC	
	Maus	TLR2R1		219 bp
		TLR2F1	CTCCCACTTCAGGCTCTTTG	
		TLR2R1	TCAGGAACTGGGTGGAGAAC	
		TLR2F2	CGGACTGTTTCCTTCTGACC	165 bp
		TLR2R2	CCAAAGAGCTCGTAGCATCC	
TLR4	Ratte	INS-1	TGCTCAGACATGGCAGTTTC	206 bp
		TLR4F1		
		INS-1	TCAAGGCTTTTCCATCCAAC	
	Maus	TLR4R1		373 bp
		TLR4F1	TGTTCTTCTCCTGCCTGACA	
		TLR4R1	GAGGCCAATTTTGTCTCCAC	
		TLR4F2	GTAAAGAATTTAGAAGAAG	188 bp
		TLR4R2	TGAGCAATCTCATATTCAAAG	
TLR6	Maus	TLR6F1	CGTCAGTGCTGGAAATAGAGC	171 bp
		TLR6R1	TTAGAGAACGGGGTCATGCT	
Insulin	Maus	Insu2F1	CAGCACCTTTGTGGTTCTCA	162 bp
		Insu2R1	CAGTGCCAAGGTCTGAAGGT	

Tabelle 5: PCR-Protokoll

Phase	Temperatur	Zeitdauer
Start	94°C	60 s
Denaturierung	94°C	30 s
Annealing	64°C	30 s
Synthese	72°C	30 s
Ende	72°C	180 s
Kühlen	4°C	bis zur Entnahme der Proben

} 35 Zyklen

2.5.1. Sequenzierung der Produkte TLR2 und TLR4

Die RT-PCR-Produkte von TLR2 und TLR4 wurden zur Bestätigung sequenziert. Dies wurde durch die Firma 4base lab GmbH (Reutlingen) vorgenommen.

2.6. Rezeptoraktivierung

INS-1 Zellen, sowie kultivierte isolierte Mausinselzellen (C57BL/6, C3H, TLR2/4^{-/-}) wurden mit spezifischen Agonisten für TLR2 und TLR4 stimuliert.

Pam3CSK4 (InvivoGen, San Diego/USA, Katalognummer tlr-pms) ist ein synthetisches Lipoprotein zur Aktivierung von TLR2/TLR1. Es wurde ein synthetischer Aktivator verwendet, da natürliche Substanzen oft mit anderen Stimulanzien kontaminiert sind und somit unter Umständen die beobachteten Effekte nicht spezifisch einer TLR2 Aktivierung zugeordnet werden können (45). Es wurde mit einer maximalen Konzentration von 1 mg/l stimuliert.

Lipopolysaccharid (LPS, Endotoxin, Sigma, St. Louis/USA, Katalognummer L6529) aktiviert TLR4. Es wurde ebenfalls in einer Konzentration von 1 mg/l verwendet (103).

Die Substanzen wurden sowohl einzeln, als auch zusammen appliziert. Außerdem wurde mit der Fettsäure Palmitinsäure (Sigma, St. Louis/USA, Katalognummer P0500) stimuliert. Es wurden Konzentrationen zwischen 100 µmol/l und 600 µmol/l angewandt. Die Palmitinsäure wurde in DMSO gelöst und in FBS als Stammlösungen mit 1, 3 und 6 mmol/l Palmitinsäure gelagert. Vor den

Versuchen wurden dann die Stammlösungen entsprechend 10-fach mit Kulturmedium ohne FBS verdünnt. Die Applikationsdauer betrug für Apoptosemessungen ein bis vier Tage. Für mRNA Quantifizierung sowie die Messungen der NFκB-Aktivität wurden die Substanzen 30 min bis 2 h gegeben.

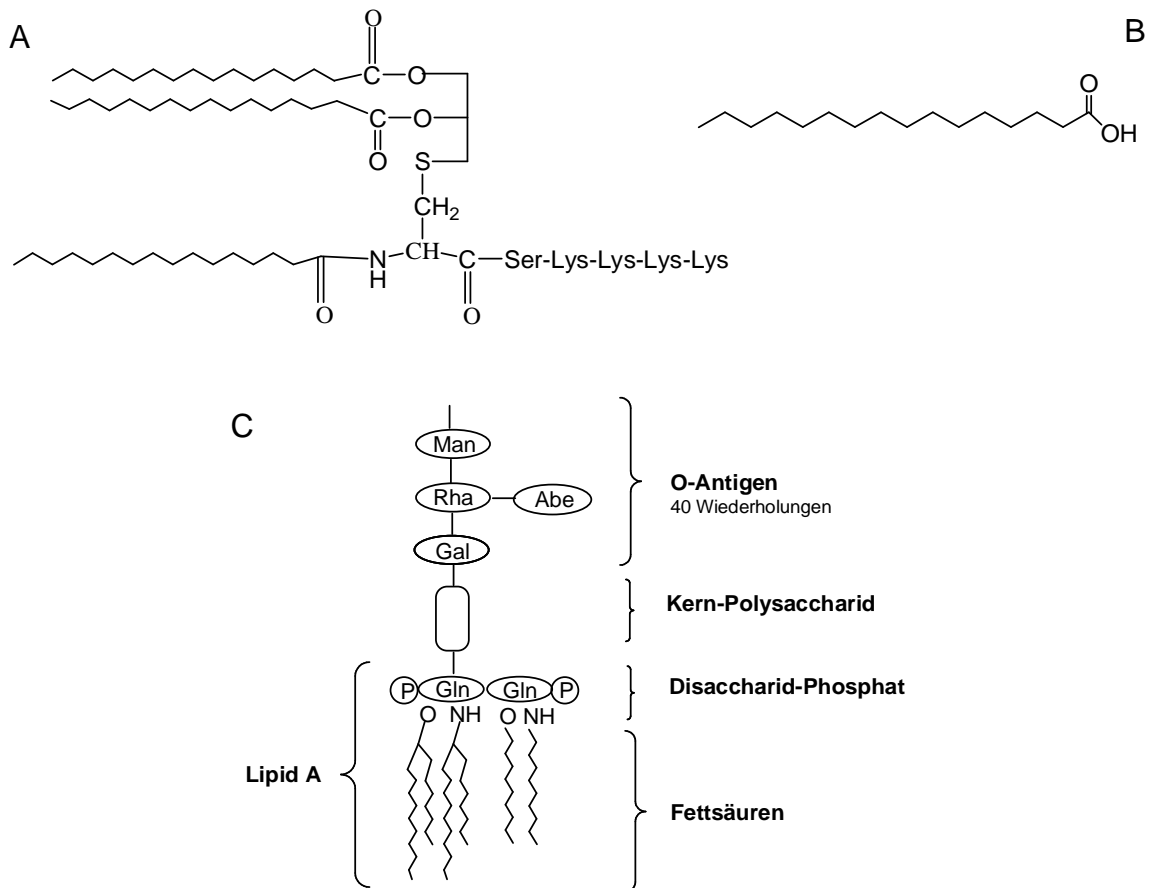


Abbildung 3: Strukturformeln von Pam3CSK4, Palmitinsäure und schematische Darstellung von Lipopolysaccharid

- A Pam3CSK4 (Summenformel $C_{81}H_{156}N_{10}O_{13}S, 3HCl$)
- B Palmitinsäure (= Hexadecansäure, Summenformel $C_{15}H_{31}COOH$)
- C Schematische Darstellung von Lipopolysaccharid (LPS, Endotoxin). Der als Lipid A zusammengefasste Bereich des Moleküls wirkt als Endotoxin.

Abkürzungen: Man = Mannose; Rha = Rhamnose; Abe = Abequose; Gal = Galaktose; Gln = Glukosamin; Ser = Serin; Lys = Lysin; P = Phosphatrest; O = Sauerstoff; C = Kohlenstoff; S = Schwefel; N = Stickstoff; H = Wasserstoff.

2.7. Apoptosemessungen

2.7.1. TUNEL (Terminal dUTP Nick End-Labeling) Assay

Das Terminal dUTP Nick End-Labeling Assay detektiert DNA-Strangbrüche, die charakteristisch für apoptotische Zellen sind.

Um eine Nekrose sicher auszuschließen und den apoptotischen Zelltod zu bestätigen, muss jedoch ein weiterer spezifischer Apoptosenachweis durchgeführt werden, zum Beispiel Transmissionselektronenmikroskopie (zytomorphologische Veränderungen), DNA Fragmentierung („DNA laddering“), Aktivierung von Caspasen, und andere (74). Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche genügte es zunächst, tote Zellen zu detektieren. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um einen apoptotischen Zelltod. Deshalb wird auch im Weiteren von Apoptose gesprochen.

Eines der Kennzeichen des späten Stadiums der Apoptose ist die Fragmentierung von nukleärem Chromatin durch Endonukleasen, was eine Vielzahl von 3'-Hydroxyl-Gruppen an den Enden der DNA-Bruchstücke zur Folge hat. Diese Enden werden mit Desoxyuridintriphosphat-Trinukleotiden, an die ein Fluoreszenzfarbstoff (Fluorescein) gekoppelt ist, markiert. Dabei katalysiert das Enzym terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) die Addition an die freie 3'-Hydroxyl-Gruppe. Nicht-apoptotische Zellen werden aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxyl-DNA Enden nicht markiert.

Für das TUNEL Assay wurde das In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche Diagnostics GmbH, Basel/Schweiz, Katalognummer 11 684 795 910) verwendet. Das Protokoll war eine leichte Modifizierung des Protokolls nach Angabe des Herstellers (zusätzliche Waschschriffe, anschließende DAPI-Färbung, siehe unten):

Zunächst wurden die Zellen für 60 min mit Paraformaldehyd (Sigma, St. Louis/USA, Katalognummer 158127, 4% in PBS) fixiert. Dann wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 2 min auf Eis mit 0,1% Triton-X-100 (Carl Roth, Karlsruhe, Katalognummer 6683.1) und 0,1% Natriumcitrat (Sigma, St. Louis/USA, Katalognummer S-4641) enthaltendem PBS permeabilisiert. Es folgte zweimaliges Waschen mit PBS und Absaugen jeglicher Flüssigkeit um die

Zellen herum sowie kurzes Lufttrocknen. Die TUNEL Reaktions-Mixtur wurde vorsichtig auf die Zellen pipettiert (50 µl/Zellkulturschale, unter Sichtkontrolle). Die Kuturschalen wurden geschlossen und für 60 min in einem geschlossenen Wasserbad inkubiert. Vor der sich anschließenden DAPI-Färbung wurden die Zellen noch zwei Mal mit PBS gewaschen.

2.7.2. DAPI Färbung

4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, C₁₆H₁₅N₅; Sigma, St. Louis/USA, Katalognummer D9542) bildet fluoreszierende Komplexe mit doppelsträngiger DNA. Die Verbindung lagert sich bevorzugt in AT-reichen Regionen in der kleinen Furche der DNA an (104). Die Färbung mit DAPI dient der Darstellung aller DNA in einer Probe. Bereits mit dieser Methode kann man die toten Zellen detektieren. Man erkennt sie an einem kleineren, kondensierten Kern. Die oben beschriebene TUNEL Methode diente der Bestätigung des apoptotischen Zelltodes.

Die DAPI Färbung wurde direkt in Anschluss an die TUNEL Färbung durchgeführt. Dafür wurden 0,1 mg/l DAPI in PBS aufgelöst und pro Zellkulturschale 2 ml dieser Lösung hinzupipettiert. Es folgte eine Inkubation im geschlossenen Wasserbad bei 37 °C für 10 min. Es wurde schließlich noch zwei Mal mit PBS und ein weiteres Mal mit Aqua dest. (zur Vermeidung von Kristallbildungen, die das Bild im Fluoreszenzmikroskop stören) gewaschen.

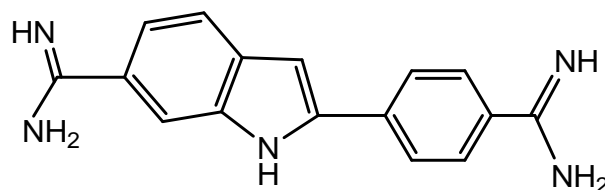


Abbildung 4: Strukturformel von 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, C₁₆H₁₅N₅).

2.7.3. Einbettung in Polyvinylalkohol/Glycerin-Lösung

Nach den Färbungen wurden die Proben in eine Polyvinylalkohol/Glycerin-Lösung eingebettet, deren Verwendung erstmals 1960 von J. Rodriguez und Friedrich Deinhardt beschrieben wurde (105). Die erste Probe der Fixierlösung stammte von Dr. York-Dieter Stierhof vom Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen (ZMBP), Universität Tübingen. Das Protokoll „Semipermanente Einbettung von Immunfluoreszenzpräparaten in Polyvinylalkohol“ wurde freundlicherweise von Dr. Heinz Schwarz vom Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen, zur Verfügung gestellt:

- 5 g Polyvinylalkohol in 20 ml 100 mmol/l Tris pH 8,0 lösen
- 16 h rühren
- 10 ml Glycerin zugeben
- 16 h rühren
- nichtgelösten Polyvinylalkohol abzentrifugieren, Proben aliquotieren und zur Aufbewahrung einfrieren

2.7.4. Fluoreszenzmikroskopie und Auswertung

Die fertigen Präparate wurden an einem Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Modell Axiophot) mikroskopiert, welches freundlicherweise von Dr. York-Dieter Stierhof vom Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen (ZMBP), Universität Tübingen, zur Verfügung gestellt wurde. Es wurden je Präparat fünf Aufnahmen unterschiedlicher Regionen gemacht. Dabei wurde zunächst für die DAPI Färbung zur Darstellung aller Zellkerne mit einem Blaufilter mikroskopiert (Anregung: 365 nm, Strahlteiler: 395 nm, Emission: 420 nm). Anschließend wurde derselbe Bildausschnitt für die TUNEL Färbung zur Darstellung der apoptotischen Zellkerne mit einem Grünfilter mikroskopiert (Anregung: 450-490 nm, Strahlteiler: 510 nm, Emission: 520 nm). Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte später am Bildschirm eines Computers. Es wurden stets alle fünf Bilder ausgewertet, sodass für ein Experiment zwischen 200 und 1000 Zellkerne in die Auswertung eingegangen sind. Es wurde der Anteil der TUNEL-positiven Zellkerne an allen, mit DAPI markierten, Zellkernen bestimmt (in Prozent).

2.8. NFκB-Messung in Mausinseln

Mit dem TransAM™ NFκB p65 Transcription Factor Assay Kit (Active Motif, Carlsbad/USA, Katalognummer 40096) wird die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB durch die Bindung seiner Untereinheit p65 (=RelA) an DNA im ELISA Kit nachgewiesen.

Isolierte Inseln wurden unter Kontrollbedingungen oder nach Zugabe von Palmitinsäure (600 μmol/l) bzw. LPS/Pam3CSK4 (je 1 mg/l) für 30 min - 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Inseln mit dem im Kit enthaltenen *Complete Lysis Buffer* lysiert und unverdünnt sowie in 1:2 und 1:4 Verdünnungen (in *Complete Lysis Buffer*) bis zum Versuch auf Eis gestellt. Das nachfolgende Assay bestand aus vier Schritten:

Schritt 1: Bindung von NFκB an seine Konsensussequenz

Es wurden 30 μl *Complete Binding Buffer* in jedes zu verwendende Well hinein-pipettiert. Dann wurden 20 μl der in dem *Complete Lysis Buffer* gelösten entsprechenden Probe hinzupipettiert. Als Negativkontrolle wurden nur 20 μl von *Complete Binding Buffer* ohne Zugabe von Probe in ein Well pipettiert. Als Positivkontrolle wurde 1 μl (= 2,5 μg) des im Kit enthaltenen *Jurkat nuclear* Extraktes zu 19 μl *Complete Lysis Buffer* in ein Well pipettiert (ohne Verdünnungsstufen). Anschließend wurden die Proben unter leichtem Schütteln abgedeckt für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde drei Mal mit jeweils 200 μl *Washing Buffer* gewaschen.

Schritt 2: Bindung des primären Antikörpers

Es wurden 100 μl einer NFκB Antikörper-Lösung (1:1000 Verdünnung des NFκB Antikörpers in *Antibody Binding Buffer*) in das jeweilige Well hinzugegeben und für 1 h ohne Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde wieder drei Mal mit jeweils 200 μl *Washing Buffer* gewaschen.

Schritt 3: Bindung des sekundären Antikörpers

Es wurden 100 μl einer *HRP Antibody*-Lösung (1:1000 Verdünnung des sekun-

dären, an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörpers in *Antibody Binding Buffer*) in jedes Well hinzupipettiert. Anschließend wurde wieder für 1 h ohne Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert und vier Mal mit jeweils 200 µl *Washing Buffer* gewaschen.

Schritt 4: Kolorimetrische Reaktion

Es wurden je 100 µl der *Developing Solution* in jedes Well hinzupipettiert. Anschließend wurde für 30 s bis 5 min (unter visueller Kontrolle bis zur Entwicklung einer bläulichen Farbe der Lösungen) bei Raumtemperatur geschützt vor direkter Lichteinstrahlung inkubiert. Dann wurden 100 µl der *Stop solution* hinzugegeben. Es wurde sogleich bei 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 655 nm ausgelesen (ELISA-Reader: Bio-Rad, Hercules/USA, Model 680 Microplate Reader).

2.9. Verwendete Materialien und Statistik

Die Tabellen im Anhang auf den Seiten 77ff zeigen eine Zusammenschau der Materialien, Geräte, Mäuse und Zelllinien, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Als statistischer Test wurde je nach Fragestellung ein ANOVA/Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test, ein Dunnett Multiple Comparisons Test oder ein t-Test durchgeführt. Dabei wurde $p < 0,05$ als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. Expression von NFkB-assozierten Genen in Mausinseln, Veränderung der Expression durch Palmitinsäure

Um zu untersuchen, ob Proteine der TLR Signalwege in Mausinseln exprimiert werden und ob diese Expression durch Palmitinsäure verändert wird, wurden zunächst isolierte Mausinseln aus C57BL/6 Mäusen für 2 h unter Standardbedingungen beziehungsweise unter Kulturmedium mit Zugabe von 600 µmol/l Palmitinsäure gehalten.

Dann wurde ein Screening Assay über die Expression von 84 NFkB-assozierten Genen in Mausinseln (TransAM™ NFkB p65 Transcription Factor Assay Kit, Active Motif, Carlsbad/USA) durchgeführt. Mit dem Assay wurde die Expression der mRNA von 69 Genen gezeigt, wobei hier als Nachweis galt, wenn das PCR-Produkt eines Gens in dieser Screening Real Time RT-PCR entweder in der Kontrollgruppe und/oder in der behandelten Gruppe nach weniger als 35 Zyklen nachweisbar war. Die Expression folgender Gene wurde nachgewiesen:

Akt1, Alt1, Alt2, Bcl10, Bcl3, C3, Nod1, Casp1, Casp8, Ccl2, Cflar, Chuk, Crebbp, Csf3, Edg2, Egr1, F2r, Fadd, Fos, Gja1, Htr2b, Icam1, Ikbkb, Ikbkg, IL10, IL1a, IL1b, IL1r1, IL6, Irak1, Irak2, Irf1, Jun, Lta, Ltbr, Map3k1, Mapk3, Nfkb1, Nfkb2, Nfkbia, Pcaf, Ei2ak2, Raf1, Rel, Rela, Relb, Ripk1, Ripk2, Slc20a1, Smad3, Stat1, Tbk1, Tgfbr1, TLR1, TLR2, TLR3, Tnfrsf10b, Tnfrsf1a, CD40, Tnfsf10, Tollip, Tradd, Traf2, Traf3, Gusb, Hpvt1, Hsp90ab1, Gapdh, Actb.

Eine Liste mit Bezeichnungen in UniGene und GenBank sowie den Bedeutungen der Abkürzungen befindet sich im Anhang 2.

Die Expression in Inseln in Kontrollkultur wurde mit der Geninduktion oder -repression durch Stimulation mit der Fettsäure Palmitinsäure verglichen. Die Ergebnisse hierzu sind in Abbildung 5 zusammengestellt. Als induziert bzw. reprimiert

miert galt eine mindestens 4-fache Veränderung des entsprechenden mRNA-Levels nach oben bzw. unten nach Behandlung mit Palmitinsäure.

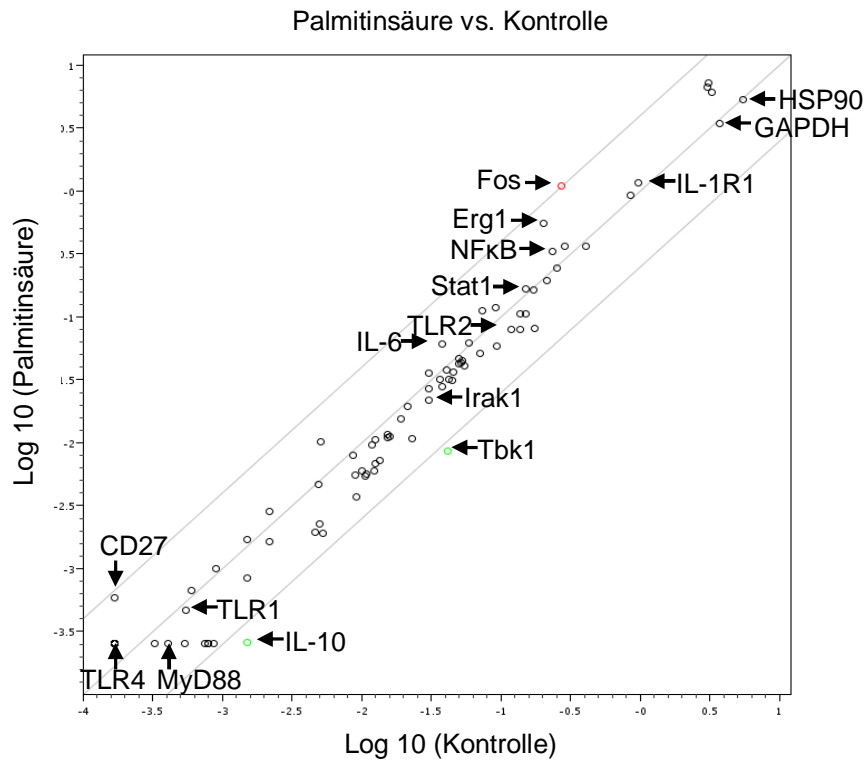


Abbildung 5: Expression von NFκB-assoziierten Genen in C57BL/6 Mausinseln und Veränderung der Expression durch Stimulation mit der gesättigten Fettsäure Palmitinsäure.

Aufgetragen ist in logarithmischer Skala (\log_{10}) die Menge des PCR-Produkts der Inseln unter Kontrollkultur (x-Achse) gegen das PCR-Produkt von über 2 h mit 600 $\mu\text{mol/l}$ Palmitinsäure behandelten Inseln (y-Achse). Das Diagramm wurde mit der von Active Motif zur Verfügung gestellten Software erstellt. Mit Pfeilen markiert ist eine Auswahl der untersuchten Gene. Starke Expression zeigten z.B. die beiden *housekeeping genes* HSP90 und GAPDH. Gabe von Palmitinsäure hatte keinen Einfluss auf die Expression dieser beiden Gene. Auch einige Gene der Toll-like Rezeptor Signaltransduktion wurden nachgewiesen, z.B. NFκB, Stat1, TLR2, Irak1, TLR1. Auch ihre Expression veränderte sich nicht nach Behandlung mit Palmitinsäure. Sehr wenig oder gar nicht nachweisbar waren TLR4, TLR6 und MyD88.

Eine erhöhte Expression nach Palmitinsäurebehandlung zeigten die Transkriptionsfaktoren Erg1 und Fos. Auch die Expression von CD27 (TNF Rezeptor) war erhöht. Vermindert exprimiert durch Palmitinsäurebehandlung wurden Tbk1 sowie das anti-inflammatorische Zytokin IL-10.

Eine Liste der im Diagramm verwendeten Abkürzungen befindet sich im Anhang 2.

3.2. Expression der Toll-like Rezeptoren 1, 2, 4 und 6 in insulin-sezernierenden Zellen

Mittels RT-PCR wurde in weiteren Experimenten die mRNA von Toll-like Rezeptoren in C57BL/6 Mausinseln, in MIN6 Zellen und in INS-1 Zellen nachgewiesen.

Dabei interessierte speziell die Expression der Toll-like Rezeptoren 2 und 4 (sowie 1 und 6, da diese mit TLR2 dimerisieren können). Die Ergebnisse wurden jeweils mindestens drei Mal reproduziert. Als Positivkontrolle (Pos, Abb. 6) für insulinsezernierende Zellen diente der Nachweis der mRNA für Insulin. Abbildung 6 zeigt eine Übersichtsaufnahme der Ergebnisse.

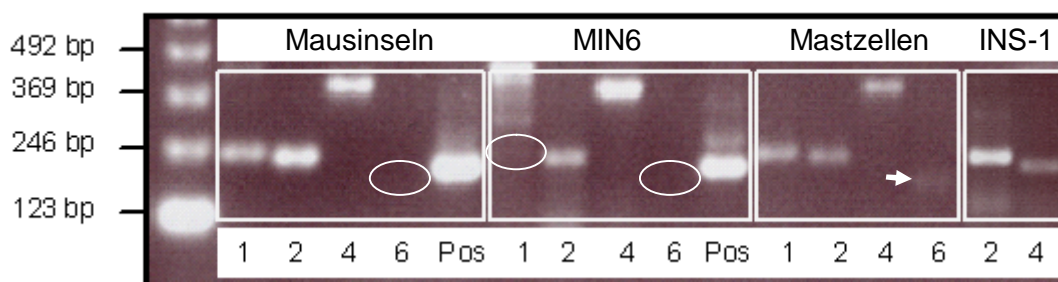


Abbildung 6: Nachweis von TLR1, 2 und 4 in insulinsezernierenden Zellen anhand von RT-PCR. Der Nachweis von Insulin-mRNA diente als Positivkontrolle (Pos, 162 bp). Die Inseln, die MIN6 Zellen sowie die Mastzellen stammen von der Maus; die INS-1 Zelllinie entstammt der Ratte.

Detektiert wurden TLR1 (226 bp, nicht in MIN6), TLR2 (219 bp für Maus, 245 bp für Ratte) und TLR4 (373 bp für Maus, 216 bp für Ratte). Über TLR6 (171 bp) können keine Angaben gemacht werden, da auch die Positivkontrolle in den

Mastzellen nur schwach positiv oder sogar negativ ist (Pfeil). Die Ellipsen zeigen die Position, an der man die jeweilige Bande bei Vorhandensein erwartet hätte. Nicht gezeigt auf diesem Gel ist die Positivkontrolle (Insulin) für die INS-1 Zellen. Die PCR-Produkte TLR2 und TLR4 aus Mausinseln wurden durch Sequenzierung verifiziert (4baseLab, Reutlingen). Man beachte, dass für die PCR unterschiedliche cDNA-Mengen eingesetzt wurden: Für die TLRs in Mausinseln je 9 µg; in MIN6 Zellen je 4 µg; in INS-1 Zellen je 5 µg. Für die Positivkontrolle (Insulin) wurden immer 2 µg cDNA eingesetzt.

Die Tatsache, dass TLR2 und TLR4 auch in reinen Zelllinien wie der Maus-β-Zelllinie MIN6 und der Ratten-β-Zelllinie INS-1 exprimiert werden, untermauert die Vermutung, dass sich diese beiden Rezeptoren tatsächlich in den β-Zellen, und nicht etwa nur in den anderen endokrinen Inselzellen oder den Endothelzellen befinden.

3.3. Palmitinsäure steigert konzentrations- und zeitabhängig die Apoptoserate in insulinsezernierenden INS-1 Zellen

Dieser Versuch diente dazu, die schädigende Wirkung von gesättigten Fettsäuren auf insulinsezernierende Zellen abschätzen zu können. Da bei Inselzellpräparationen nicht auszuschließen ist, dass „nicht-β-Zellen“, also andere in einer Langerhans-Insel enthaltene endokrine Zellen, einen wichtigen Anteil am Effekt ausmachen, wurde zunächst mit der klonalen β-Zelllinie INS-1 gearbeitet. Es wurden INS-1 Zellen über 1 Tag unterschiedlichen Palmitinsäurekonzentrationen ausgesetzt: Eine Gruppe wurde mit Palmitinsäure 100 µmol/l, eine weitere Gruppe mit Palmitinsäure 300 µmol/l und die letzte Gruppe schließlich mit Palmitinsäure 600 µmol/l behandelt. Dabei wurde ein konzentrationsabhängiger Unterschied in der Palmitinsäure-induzierten Apoptoserate beobachtet, wobei erst eine hohe Konzentration von Palmitinsäure 600 µmol/l eine signifikant höhere Apoptoserate im Vergleich zur Kultur unter Standardbedingungen auslöste. Die Unterschiede der Apoptoserate beim Vergleich der Behandlung mit den unterschiedlichen Palmitinsäurekonzentrationen unter-

einander sind nicht signifikant. Es ist aber eine klare Tendenz zu erkennen. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 7 dargestellt.

Auch in anderen Zellsystemen (zum Beispiel bei der in dieser Arbeit nicht näher beschriebenen Behandlung von humanen Inselzellen mit Palmitinsäure in unterschiedlichen Konzentrationen) sowie bei konzentrationsabhängiger längerer Behandlung von INS-1 Zellen wurde dieser Effekt beobachtet (Daten nicht gezeigt).

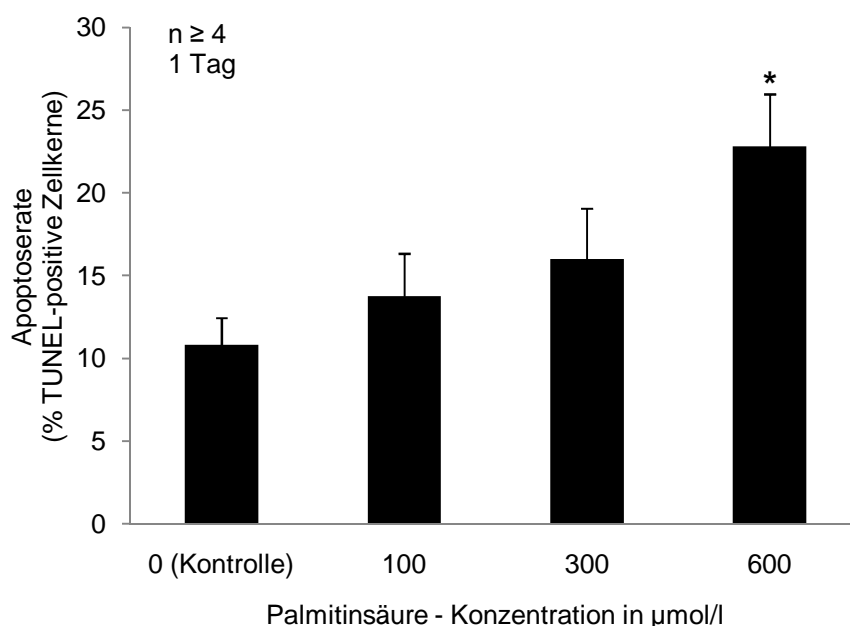


Abbildung 7: Konzentrationsabhängig gesteigerte Apoptoserate in INS-1 Zellen nach Behandlung mit 0, 100, 300 bzw. 600 µmol/l Palmitinsäure über 1 Tag. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM von n = 6 (Kontrolle, Palmitinsäure 600 µmol/l) bzw. 4 (Palmitinsäure 100 µmol/l, Palmitinsäure 300 µmol/l) unabhängigen Versuchen. * zeigt Signifikanz gegenüber der Kontrolle an (p<0,05; ANOVA/Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test).

Nachdem gezeigt wurde, dass Palmitinsäure konzentrationsabhängig zu einer gesteigerten Apoptoserate führt, war auch interessant, ob Palmitinsäure zeitabhängig zu einer gesteigerten Apoptoserate in insulinsezernierenden Zellen führt. Hierfür wurden INS-1 Zellen 1, 2, 3 und 4 Tage lang mit einer hohen Palmitinsäurekonzentration von 600 µmol/l beziehungsweise unter

Standardbedingungen kultiviert. Dabei zeigte sich bei $n = 6$ (1 Tag) beziehungsweise $n = 3$ (2, 3, 4 Tage) unabhängigen Versuchen eine zeitabhängig erhöhte Apoptoserate unter Kultur mit Palmitinsäure $600 \mu\text{mol/l}$, die am ersten Tag sowie nach 3 und 4 Tagen signifikant war. Nach 3 Tagen Behandlung zeigte sich der maximale Effekt mit einer Apoptoserate von $60,8 \%$ unter Behandlung mit Palmitinsäure $600 \mu\text{mol/l}$ im Vergleich zu $10,8\%$ bei Kultur unter Standardbedingungen.

Die Abbildungen 8 und 9 zeigen mikroskopische Aufnahmen nach 3 Tagen unter Kontrollbedingungen bzw. nach Behandlung mit Palmitinsäure $600 \mu\text{mol/l}$. Abbildung 10 zeigt in der Übersicht die zeitabhängig gesteigerte Apoptoserate bei Behandlung mit Palmitinsäure. Wie aus den mikroskopischen Bildern hervorgeht, wurden die Zellen subkonfluent untersucht, in einer Wachstumsphase, in der wenige Zell-Zell-Kontakte ausgebildet sind.

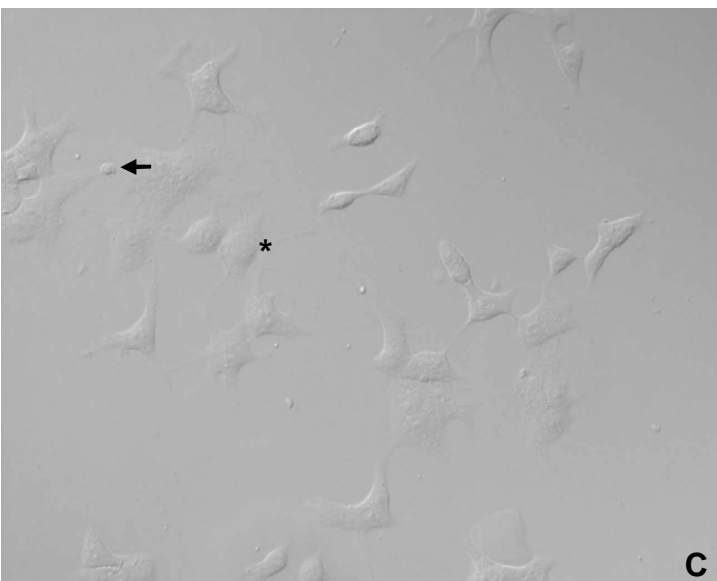
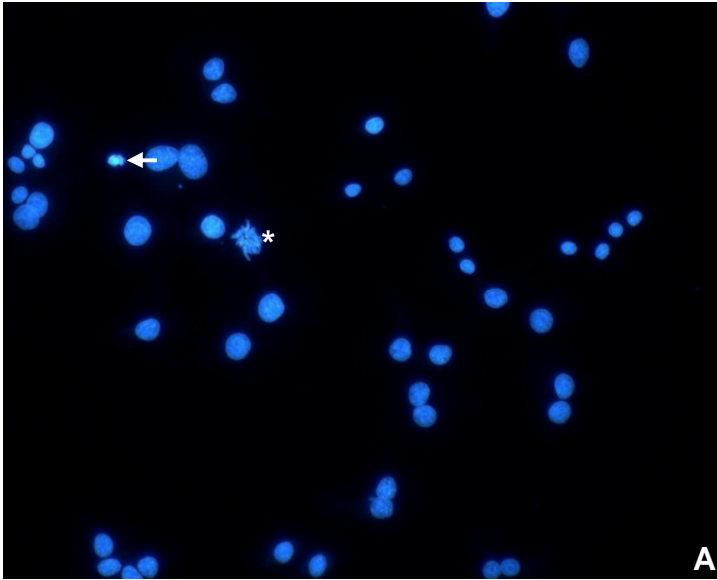


Abbildung 8:

Bildbeispiele zu den Versuchen mit kultivierten INS-1 Zellen. Die Bilder zeigen INS-1 Zellen nach 3 Tagen Kultur unter Standardbedingungen.

(A) Fluoreszenzbild der DAPI-markierten Zellkerne

(B) TUNEL-markierte Zellkerne

(C) Darstellung mit Nomarski-Prisma

Anmerkung: In diesem Bildausschnitt stellen sich wenig apoptotische Kerne dar. Im Durchschnitt liegt die Apoptoserate hier bei ca. 10% im Vergleich zu ca. 60% bei Behandlung mit Palmitinsäure. Mit einem Stern markiert ist ein mitotischer Zellkern. Dies ist bei INS-1 Zellkulturen kein ungewöhnlicher Befund.

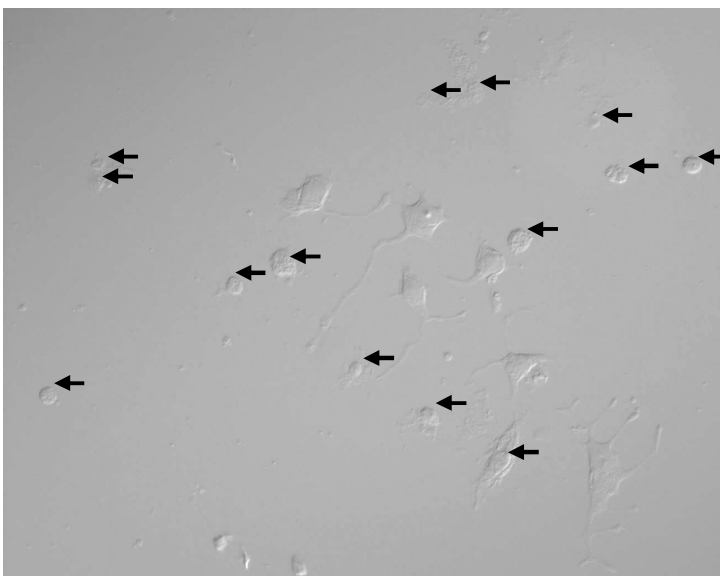
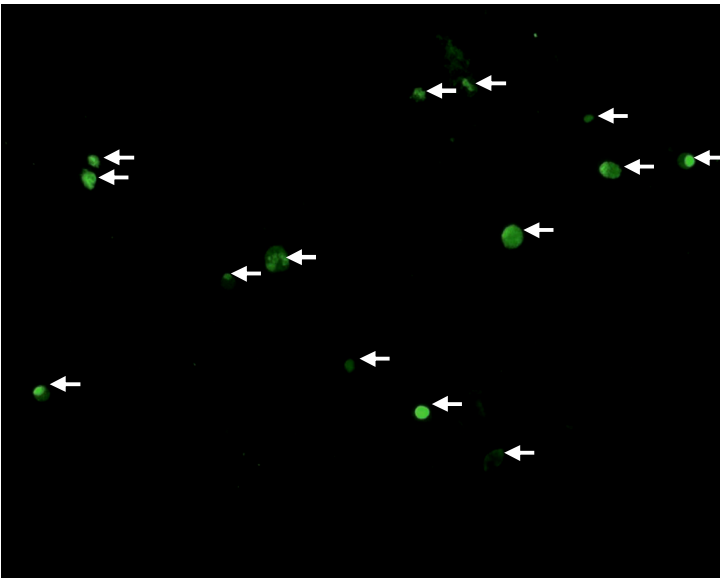
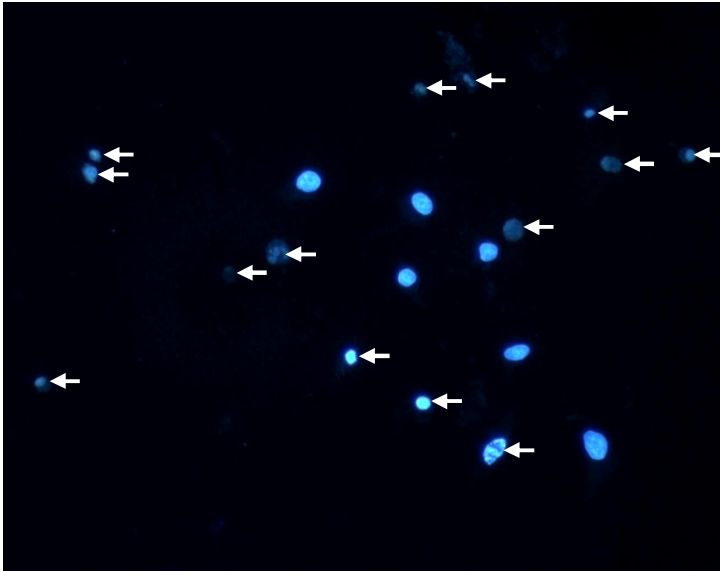


Abbildung 9:

Bildbeispiele zu den Versuchen mit kultivierten INS-1 Zellen. Die Bilder zeigen INS-1 Zellen nach 3 Tagen Behandlung mit Palmitinsäure (600 $\mu\text{mol/l}$).

(A) Fluoreszenzbild der DAPI-markierten Zellkerne
(B) TUNEL-markierte Zellkerne

(C) Darstellung mit Nomarski-Prisma. Im Vergleich zu den oben gezeigten Zellen unter Kontrollbedingungen stellen sich in einem Sichtfeld deutlich weniger Zellkerne dar. In der Nomarski-Darstellung kann man gut erkennen, dass der Zellverband völlig zerstört ist.

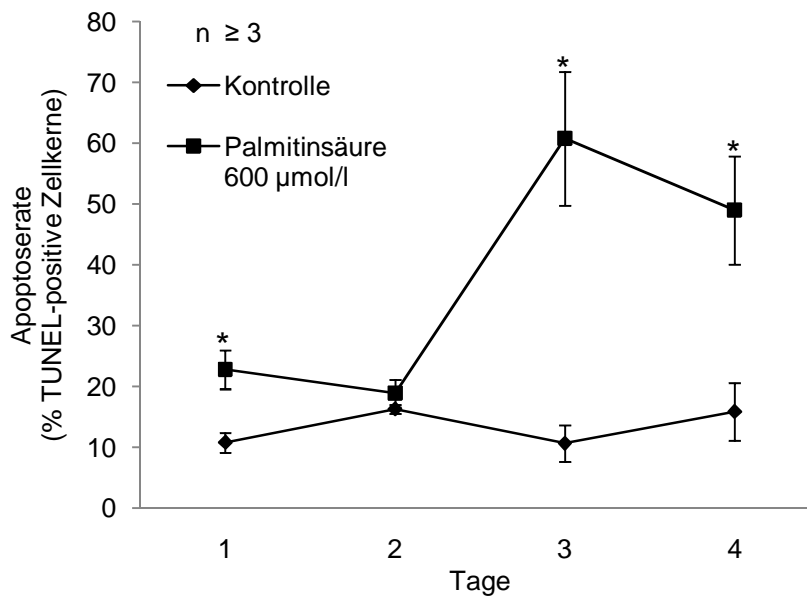
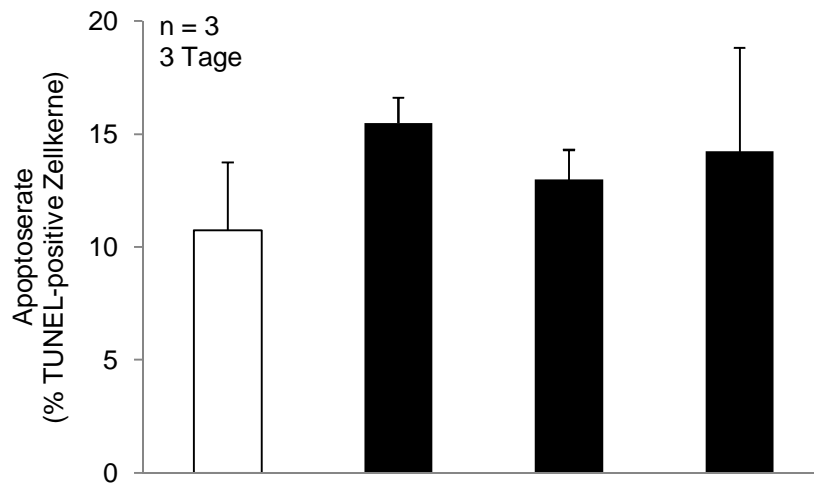


Abbildung 10: Zeitabhängige Apoptose nach Behandlung von INS-1 Zellen mit Palmitinsäure 600 µmol/l über 1, 2, 3 und 4 Tage. Dargestellt ist der Anteil TUNEL-positiver Zellkerne als Mittelwerte \pm SEM von $n = 6$ (1 Tag) beziehungsweise $n = 3$ (2, 3 und 4 Tage) unabhängigen Experimenten.

* zeigt Signifikanz gegenüber der Kontrolle (Kultur unter Standardbedingungen) an ($p < 0,05$; t-Test).

3.4. TLR Aktivierung in INS-1 Zellen

Nun sollte herausgefunden werden, ob eine Aktivierung von Toll-like Rezeptoren den beobachteten Effekt von Palmitinsäure auf die Apoptose von INS-1 Zellen nachahmen kann. Hierzu wurden INS-1 Zellen über 1, 2, 3, und 4 Tage unter Standardbedingungen (Kontrolle) sowie in Anwesenheit von 1 mg/l Pam3CSK4 (synthetischer TLR1/2 Agonist), 1 mg/l Lipopolysaccharid (TLR4 Agonist) sowie von beiden Substanzen zusammen (je 1 mg/l) gehalten. Dabei zeigte sich bei $n = 6$ unabhängigen Versuchen, dass Agonisten von TLR2 und TLR4 in INS-1 Zellen keine signifikant erhöhte Apoptoserate auslösen und somit den unter Gabe von Palmitinsäure beobachteten Effekt nicht nachahmen konnten. Abbildung 11 zeigt beispielhaft für Tag 3, an dem unter Palmitinsäurebehandlung der maximale Effekt auf die Apoptoserate beobachtet wurde, die unveränderte Apoptoserate bei Stimulation von TLR2 und/oder TLR4.



LPS (mg/l)

-

-

1

1

Pam3CSK4 (mg/l)

-

1

-

1

Abbildung 11: Apoptoserate in INS-1 Zellen nach 3 Tagen Stimulation von TLR2 und TLR4 einzeln oder gemeinsam. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede nach Stimulation im Vergleich zu Kultur unter Kontrollbedingungen. Dargestellt ist der Anteil TUNEL-positiver Zellkerne als Mittelwerte + SEM von n = 3 unabhängigen Experimenten.

3.5. Effekte von Palmitinsäure und TLR Agonisten auf die Apoptoserate in C57BL/6 Mausinselzellen

Das Ziel der hier vorgestellten Experimente war zu sehen, ob eine Applikation von Palmitinsäure oder eine Stimulation von Toll-like Rezeptoren eine Auswirkung auf die Apoptoserate in kultivierten C57BL/6 Mausinselzellen hat. Dazu wurden die Zellen für 2 Tage unter Standardkulturbedingungen (Kontrolle) sowie in Anwesenheit von 1 mg/l Pam3CSK4 zur Stimulation von TLR2, 1 mg/l Lipopolysaccharid zur Stimulation von TLR4 sowie den beiden Substanzen zusammen (je 1 mg/l) gehalten. Außerdem wurde eine weitere Gruppe mit der gesättigten Fettsäure Palmitinsäure (600 µmol/l) behandelt. Die Apoptoserate wurde wie in den vorherigen Versuchen mittels DAPI Färbung und TUNEL Assay bestimmt.

Die Ergebnisse aus $n = 5$ unabhängig durchgeführten Experimenten zeigen geringe, aber nicht signifikante Effekte bei der Stimulation von TLR2 bzw. TLR4 alleine sowie bei der Behandlung mit Palmitinsäure. Bei der Stimulation von TLR2 und TLR4 gemeinsam konnte hingegen eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden ($p < 0,05$).

Die Abbildungen 12 und 13 zeigen im mikroskopischen Bild die unterschiedliche Apoptoserate unter Kontrollbedingungen bzw. unter gleichzeitiger Stimulation von TLR2 und TLR4. Abbildung 14 zeigt die beobachteten Ergebnisse in der Übersicht.

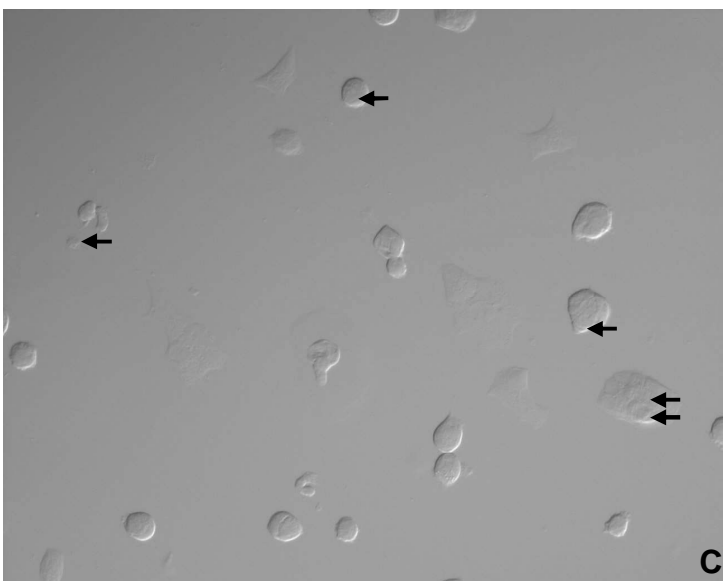
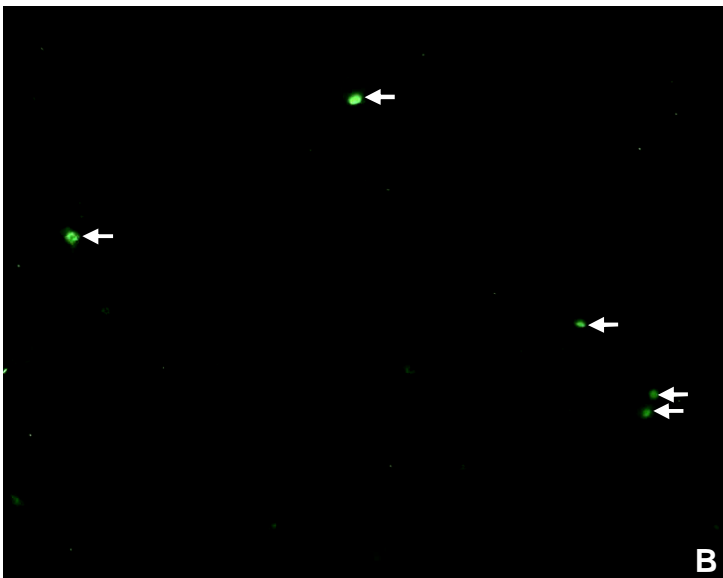
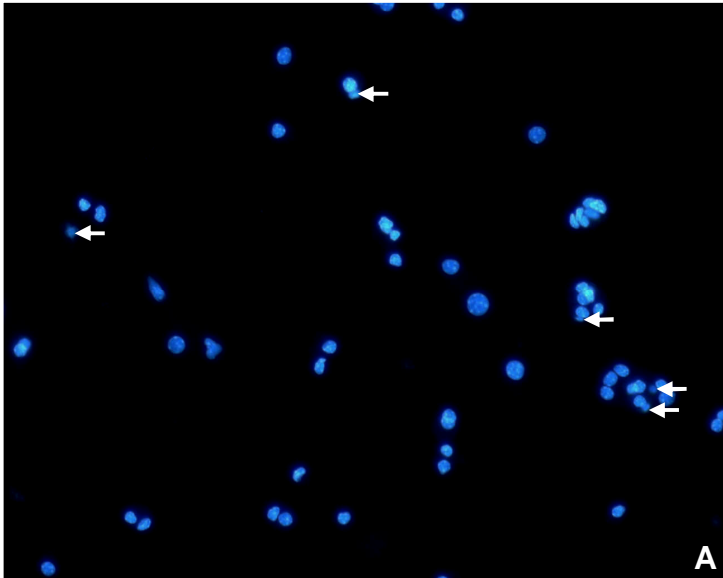


Abbildung 12:
Bildbeispiele zu den
Versuchen mit kultivierten C57BL/6 Maus-
inselzellen.

Die Bilder zeigen Insel-
zellen nach 2 Tagen
Kultur unter Standard-
bedingungen.

- (A)** Fluoreszenzbild der DAPI-markierten Zellkerne
- (B)** TUNEL-markierte Zellkerne
- (C)** Darstellung mit Nomarski-Prisma

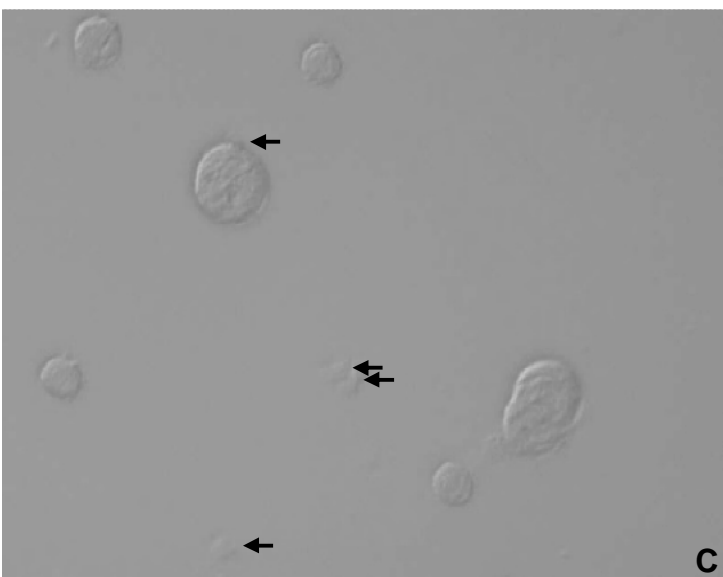
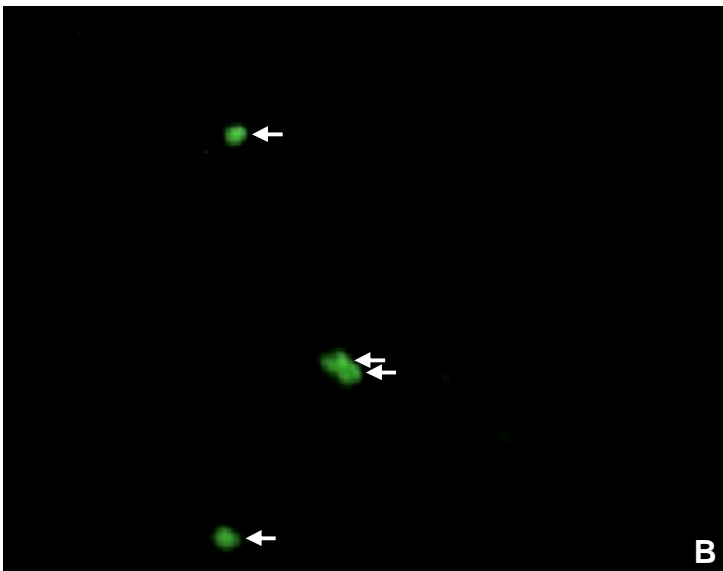
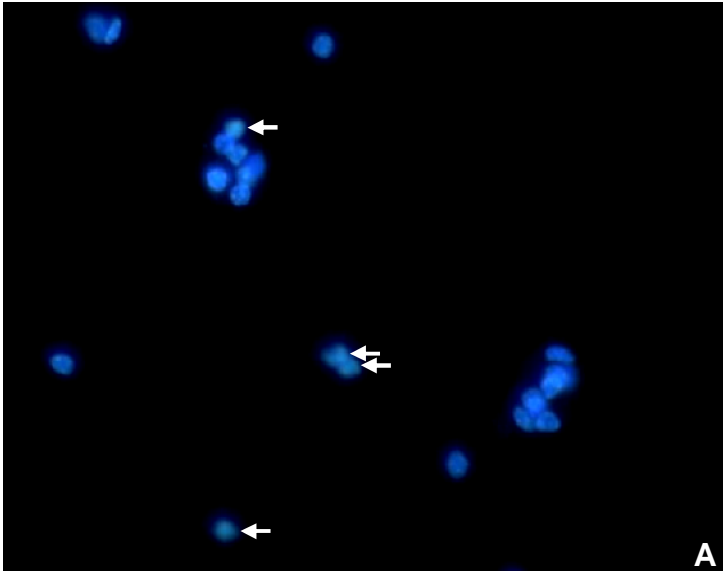


Abbildung 13:
Bildbeispiele zu den
Versuchen mit kultivierten
C57BL/6 Maus-
inselzellen. Die Bilder
zeigen Inselzellen nach 2
Tagen Stimulation von
TLR2 und TLR4.

(A) Fluoreszenzbild der
 DAPI-markierten Zellkerne

(B) TUNEL-markierte Zellkerne

(C) Darstellung mit Normarski-Prisma

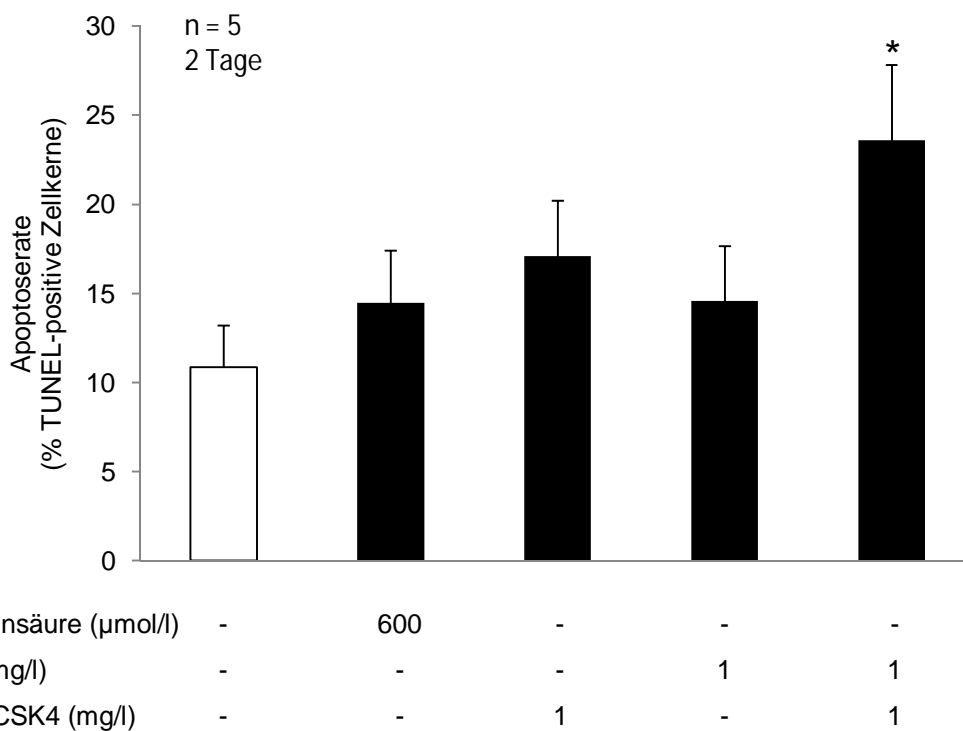


Abbildung 14: Apoptoserate (% der TUNEL-positiven Zellkerne) unter Kontrollbedingungen sowie nach Stimulation von TLR2 und TLR4 allein oder zusammen sowie nach Behandlung mit Palmitinsäure von n = 5 unabhängigen Versuchen.

Die basale Apoptoserate lag bei 10,9 %. Dargestellt sind die Durchschnittswerte + SEM. * zeigt Signifikanz gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen (p<0,05; Dunnett Multiple Comparisons Test) an.

3.6. Steigert TLR Aktivierung die NFκB-Aktivität in Mausinseln?

Um weitere Hinweise darauf zu bekommen, ob Toll-like Rezeptoren in insulinsezernierenden Zellen durch Palmitinsäure aktiviert werden, wurde die NFκB-Aktivität in C57BL/6 Mausinseln untersucht. Es wurde mit dem TransAM™ NFκB p65 Transcription Factor Assay Kit (Active Motif, Carlsbad/USA) gearbeitet. In diesem Assay kann NFκB-Aktivität zwischen Nullwert und Standard als Maximalwert nachgewiesen werden.

Es ist bekannt, dass NFκB zyklisch aktiviert wird, daher wurden als Inkubationsdauer zwei verschiedene Zeitpunkte gewählt, 30 min und 2 h.

Es wurden pro Versuch 200 bis 360 Mausinseln eingesetzt. Es wurden insgesamt 3 Versuche durchgeführt. Abbildung 15 zeigt eines der Ergebnisse. Hier wurden insgesamt 300 Inseln verwendet und auf die verschiedenen Behandlungsgruppen (Kontrolle, Palmitinsäure, LPS + Pam3CSK4) verteilt. Die Inkubationsdauer betrug in diesem Versuch 2 h.

In den Kontrollinseln stieg die nachweisbare NFκB-Aktivität proportional zur Menge der eingesetzten Inseln an. Die Aktivität, die in 100 Inseln gemessen wurde, blieb aber unter 20 % der maximal messbaren Aktivität. Nach Inkubation mit Palmitinsäure 600 μmol/l oder LPS + Pam3CSK4 (je 1 mg/l) konnte keine erhöhte NFκB-Aktivität gemessen werden. Auch bei einer Inkubationsdauer von 30 min konnte keine im Vergleich zur basalen NFκB-Aktivität erhöhte Aktivität gezeigt werden.

Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass die NFκB-Aktivität nach 30 min bzw. 2 h Palmitinsäurestimulation oder Inkubation mit LPS + Pam3CSK4 nicht stimuliert war.

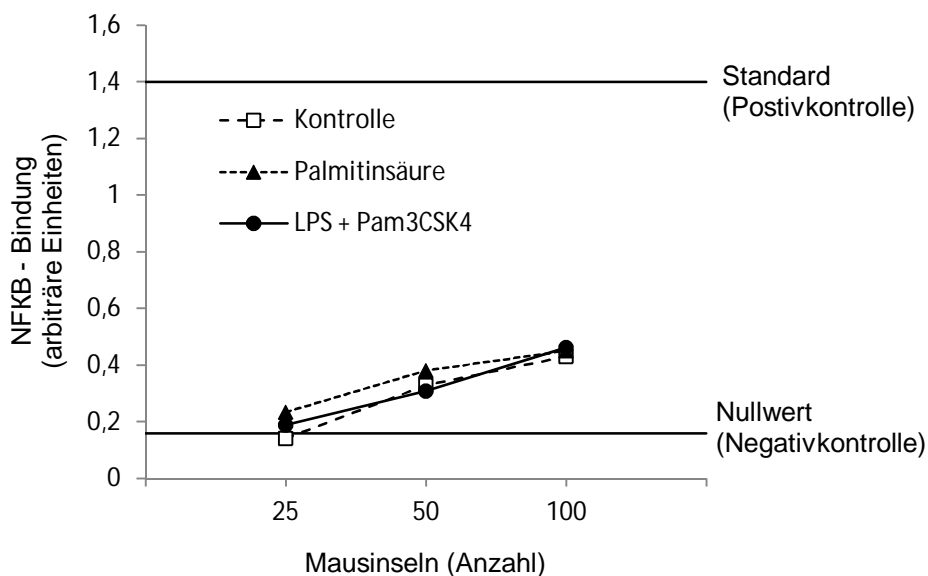


Abbildung 15: NFκB-Aktivität in isolierten C57BL/6 Mausinseln.

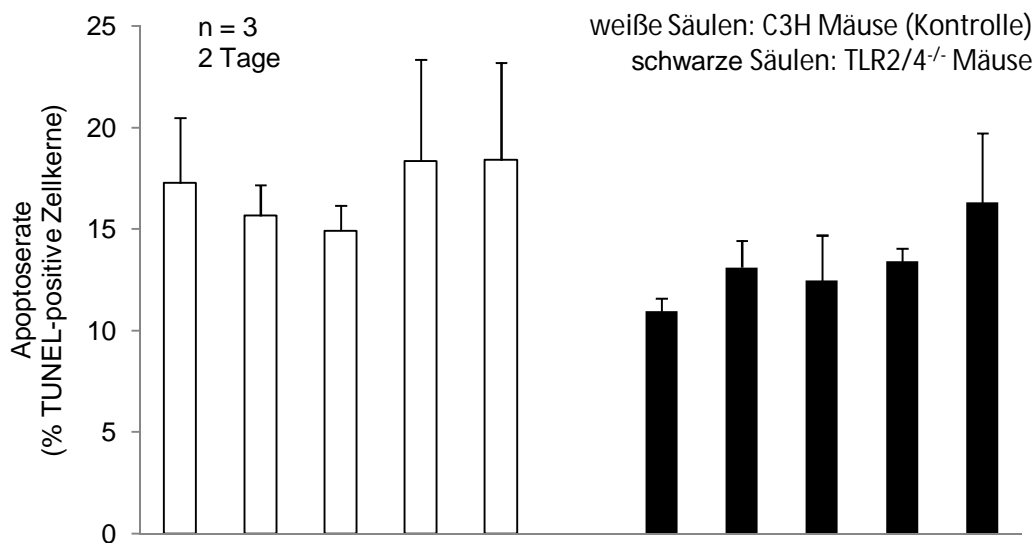
Isolierte Mausinseln (200/Ansatz) wurden 2 h unter Kontrollbedingungen (Kontrolle) oder mit 600 μmol/l Palmitinsäure bzw. mit 1 mg/l Lipopolysaccharid

und 1 mg/l Pam3CSK4 inkubiert. Danach wurden die Inseln lysiert und die NFκB-Aktivität in Zelllysaten aus 100, 50 und 25 Inseln gemessen. Der Nullwert (Negativkontrolle) und der Standard des Assays (Positivkontrolle) werden ohne Verdünnungen bestimmt und sind daher als waagerechte Linien eingezeichnet.

3.7. Wirkung von TLR2 und TLR4 Agonisten in TLR2/4^{-/-} Mausinselzellen

Um herauszufinden, ob die gesättigte Fettsäure Palmitinsäure über die Toll-like Rezeptoren 2 und 4 zu Apoptose führen kann, wurden TLR2/4^{-/-} Mäuse mit Palmitinsäure (600 μmol/l), sowie mit Agonisten für TLR2 (Pam3CSK4 1 mg/l) und TLR4 (LPS 1 mg/l) behandelt. Pam3CSK4 und LPS wurden sowohl einzeln als auch gemeinsam appliziert. Als Kontrolle dienten C3H Mausinselzellen. Nach 2 Tagen Behandlungsdauer konnte kein signifikanter Unterschied in der Apoptoserate nach Behandlung im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Jedoch konnte in den C3H Kontrollmäusen nicht der Effekt einer erhöhten Apoptoserate nach gleichzeitiger Stimulation von TLR2 und TLR4, wie es in C57BL/6 Mäusen zu beobachten war, gezeigt werden.

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 16 dargestellt. Versuche mit 4 Tagen Behandlungsdauer zeigten sehr ähnliche Ergebnisse und werden deshalb nicht gezeigt.



Palmitinsäure (µg/ml)	-	600	-	-	-	-	600	-	-	-
LPS (mg/l)	-	-	1	-	1	-	-	1	-	1
Pam3CSK4 (mg/l)	-	-	-	1	1	-	-	-	1	1

Abbildung 16: Apoptoserate von isolierten kultivierten Inselzellen aus TLR2/4^{-/-} Mäusen und ihrer Kontrolle, isolierten kultivierten Inselzellen aus C3H Mäusen von n = 3 unabhängigen Experimenten. Gezeigt ist der Anteil TUNEL-positiver Zellkerne + SEM.

In diesem Modell konnten weder ein Unterschied nach Stimulation mit Agonisten von TLR2 und TLR4 (weder einzeln noch gemeinsam gegeben), noch nach Behandlung mit Palmitinsäure 600 µmol/l beobachtet werden. Es zeigte sich auch kein signifikanter Unterschied zwischen der Apoptoserate in den K.O. Mäusen im Vergleich zu ihren Kontrollen.

3.8. Zusammenfassung der Ergebnisse

Beim Screening auf 84 NFκB assoziierte Gene zeigte sich, dass 69 dieser Gene in C57BL/6 Mausinseln exprimiert werden. Darunter befinden sich auch einige Gene der Signaltransduktion von Toll-like Rezeptoren, wie zum Beispiel TLR1, TLR2, Irak1, NFκB oder Stat1.

Über RT-PCR der Toll-like Rezeptoren 1, 2, 4, und 6 konnten die Ergebnisse des Screening Assays bestätigt und ergänzt werden. Die Toll-like Rezeptoren 1,

2 und 4 werden in C57BL/6 Mausinselzellen exprimiert. Nicht nachgewiesen werden konnte hingegen TLR6. TLR2 und TLR4 werden außerdem auch in den β -Zelllinien MIN6 und INS-1 exprimiert, was die Vermutung unterstützt, dass TLR2 und TLR4 tatsächlich in den β -Zellen selbst und nicht bzw. nicht ausschließlich in anderen endokrinen Zellen oder Endothelzellen der Langerhans-Inseln vorkommen.

In INS-1 Zellen konnte eine zeitabhängige signifikant erhöhte Apoptoserate nach Behandlung mit Palmitinsäure gezeigt werden, die nach 3 und 4 Tagen durchschnittlich bei über 50% lag.

Des Weiteren war in INS-1 Zellen eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Apoptoserate nach Exposition zu Palmitinsäure in unterschiedlichen Konzentrationen zu beobachten. Dieser Effekt wurde auch in anderen Zellmodellen, wie zum Beispiel humanen Inselzellen, beobachtet.

In C57BL/6 Mausinselzellen zeigte sich eine erhöhte Apoptoserate nach gleichzeitiger Stimulation von TLR2 und TLR4. Eine Erhöhung der Apoptoserate durch Behandlung mit Palmitinsäure war als Tendenz zu erkennen, jedoch nicht signifikant. Eine Erhöhung der NF κ B-Aktivität in kultivierten Mausinseln durch Behandlung mit Palmitinsäure oder Stimulation von TLR2 und TLR4 konnte nicht nachgewiesen werden.

Versuche mit kultivierten Inselzellen aus TLR2/4^{-/-} Mäusen sollten zeigen, dass die Agonisten von TLR2 und TLR4 tatsächlich spezifisch sind. Außerdem interessierte, ob die gesättigte Fettsäure Palmitinsäure über TLR2 und/oder TLR4 zelluläre Wirkungen hervorruft. Da in den dazugehörigen Kontrollmäusen des Stamms C3H jedoch auch keine Effekte (weder von TLR2 und/oder TLR4 Agonisten, noch von Palmitinsäure) beobachten werden konnten, können keine Angaben zu diesen beiden Fragestellungen gemacht werden.

4. Diskussion

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Bedeutung der Toll-like Rezeptoren 2 und 4 in insulinsezernierenden Zellen.

4.1. Expression von Genen des TLR Signalweges in insulinsezernierenden Zellen

Zunächst wurde ein Screeningtest auf NF κ B-assoziierte Gene durchgeführt, der auch die Expression einiger Gene der Toll-like Rezeptor Kaskade beinhaltet. Dabei zeigte sich in C57BL/6 Mäusen die Expression der Gene TLR1, TLR2, Stat1, IRAK1 und NF κ B. Stat1 und IRAK1 sind unter anderem über TLRs aktivierte Proteinkinasen, die ebenso wie NF κ B an der Signaltransduktion der TLRs beteiligt sind (siehe Einleitung).

Nicht nachgewiesen werden konnte die Expression der Gene TLR4, TLR6 sowie MyD88. MyD88 ist ein bekanntes Adapterprotein von TLR2 und TLR4 (siehe Einleitung). Ob diese Rezeptoren in insulinsezernierenden Zellen über MyD88 wirken, müsste durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Eine Änderung der Expression der untersuchten Gene durch Behandlung mit der Fettsäure Palmitinsäure konnte nicht festgestellt werden.

Da für diese Arbeit speziell die Expression von TLR1, TLR2, TLR4 und TLR6 interessant war, wurden RT-PCRs durchgeführt. Die Expression von TLR1 und TLR6 interessierte dabei, weil diese mit TLR2 Heterodimere bilden können (106). Dabei konnte eine Expression von TLR1, TLR2 und TLR4 in Inselzellen von C57BL/6 Mäusen nachgewiesen werden. Die Expression von TLR2 und TLR4 konnte auch in den β -Zellkulturlinien MIN6 (Maus) und INS-1 (Ratte) beobachtet werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass TLR2 und TLR4 tatsächlich in den β -Zellen selbst und nicht etwa nur teilweise oder gar ausschließlich in anderen Zellen des endokrinen Pankreas exprimiert werden. Nicht nachgewiesen werden konnte in MIN6 Zellen TLR1. Über die Expression von TLR6 in insulinsezernierenden Zellen kann keine Aussage

gemacht werden, da auch in der Positivkontrolle Mastzellen (Maus) nur eine schwache Bande zu erkennen war.

TLR Aktivierung führt in vielen verschiedenen Zellen zu NFκB-Aktivierung und Zytokinproduktion. Nach dem „Insulinitis bei Typ 2 Diabetes“ - Modell von Marc Donath und seiner Züricher Arbeitsgruppe spielt bei der Pathogenese des Typ 2 Diabetes das IL-1β, dessen Expression in einem in dieser Arbeit vorgestellten Assay auch gezeigt wurde, eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung von Sekretionsversagen und Apoptose der β-Zellen. Die IL-1β Produktion ist dabei NFκB-abhängig (107-109). Die Zytokine wirken nach diesem Modell als Chemokine und locken Immunzellen wie zum Beispiel Makrophagen an, die dann ihrerseits Zytokine ausschütten. Wichtiger Bestandteil dieser Pathogenese ist der IL-1β Rezeptor, der in dem in dieser Arbeit vorgestellten Assay eine relativ hohe Expression zeigte, fast so hoch wie die der *housekeeping* Gene HSP90 und GAPDH. Dieser Rezeptor ist auch klinisch interessant. Eine Blockade des Rezeptors mit dem rekombinanten humanen Antagonisten Anakinra führte in einer klinischen Studie zu besserer β-Zellsekretion und reduzierten systemischen Entzündungsmarkern (110). Über die β-Zellapoptose können im Rahmen einer klinischen Studie keine Aussagen gemacht werden, es ist aber durchaus denkbar, dass sich auch *in vivo* eine verminderte Apoptose zeigt.

Im Folgenden werden einige Arbeiten zur Expression von Toll-like Rezeptoren oder von Genen der TLR Kaskade im Zusammenhang mit Diabetes vorgestellt.

Oren Froy et al. untersuchten in Ratten (männlichen Sprague-Dawley Ratten) die Expression von TLR2 und TLR4 in den Organen Niere, Lunge, Leber und Gehirn. Im Modell des Streptozotocin-induzierten Diabetes, in dem bei den Tieren spezifisch die β-Zellen der Langerhans-Inseln zerstört werden, fanden sie dabei eine veränderte Genexpression der Toll-like Rezeptoren in den verschiedenen Organen. So waren die Expressionsniveaus von TLR2 und TLR4 in den Nieren der diabetisch gemachten Tiere niedriger als in den

gesunden Kontrolltieren. Durch Insulinbehandlung konnte dabei die Expression wieder auf normale Niveaus angehoben werden.

In den Lungen, den Lebern und den Gehirnen der diabetischen Tiere zeigte sich teils eine erhöhte, teils eine erniedrigte Expression von TLR2 und TLR4. In diesen Organen konnte eine Behandlung mit Insulin keine Wiederherstellung von normalen Expressionsniveaus wie in den Kontrolltieren bewirken (111).

Ebenfalls untersucht ist die Expression und Bedeutung von Toll-like Rezeptoren in Verbindung mit peripherer Insulinresistenz, also in Muskel- und Fettgewebe. Joseph Senn zeigte, dass TLR2 essenziell für das Entstehen von Insulinresistenz in C2C12 Myotuben ist (51). Marjorie Poggi et al. zeigten, dass C3H/HeJ Mäuse, die eine TLR4 Mutation tragen, vor der Entwicklung einer Insulinresistenz in weißem Fettgewebe geschützt sind (94).

Die bisher genannten Arbeiten beschäftigten sich alle mit der Expression und/oder Bedeutung von Toll-like Rezeptoren in verschiedenen Organen - nicht jedoch mit Expression oder Bedeutung dieser Rezeptoren in den β -Zellen der Langerhans-Inseln.

Die erste Arbeit zur Expression von TLRs in insulinsezernierenden Zellen ist eine Arbeit von Marta Vives-Pi et al. Sie fanden eine Expression von TLR2 und TLR4 sowie den assoziierten Genen CD14 und MD-2 in humanen Inselzellen sowie Ratteninzelzellen. Sie konnten außerdem eine Sensitivität der insulinsezernierenden HP62 Zellen auf LPS nachweisen: Einerseits produzierten die Zellen nach LPS-Gabe Zytokine wie IL-1 β , IL-6 oder TNF- α ; andererseits inhibierte eine LPS-Gabe die Glukose-induzierte Insulinfreisetzung. Diese Ergebnisse zeigen, dass insulinsezernierende Zellen einen funktionalen TLR4 Rezeptor exprimieren (56).

Alyssa Goldberg et al. zeigten in Mausinseln, dass die Unterdrückung einer Hochregulation von TLR4 durch Kohlenstoffmonoxid in β -Zellen bei Inseltransplantation zu einem verbessertem Überleben führt. Inselzell-

transplantate von TLR4^{-/-} Mäusen überlebten länger und zeigten weniger Entzündung als Inselzelltransplantate von Kontrollmäusen. Außerdem schützte in dieser Studie ein TLR4 Antikörper in der β -Zelllinie β -TC3 vor Zytokin-induzierter Apoptose (96).

Man kann also sagen, dass die Expression von Rezeptoren des unspezifischen Immunsystems, speziell TLR2 und TLR4 und anderer an ihrer Signaltransduktion beteiligter Moleküle, eine Rolle bei der Entstehung des Diabetes mellitus zu spielen scheint. Gut untersucht ist ihre Bedeutung bei der Entstehung der peripheren Insulinresistenz, die an der Pathogenese des Typ 2 Diabetes mellitus beteiligt ist. TLR2 und TLR4 werden auch in insulinsezernierenden Zellen exprimiert. Ihre Bedeutung in β -Zellen ist bislang nicht ausreichend erforscht.

4.2. Toll-like Rezeptoren 2 und 4 sowie Palmitinsäure: Was löst in insulinsezernierenden Zellen Apoptose aus?

Das Vorhandensein freier Fettsäuren ist physiologisch notwendig zur Insulinsekretion. Dies gilt für akute Exposition; chronische Exposition führt hingegen zu Desensibilisierung und Unterdrückung der Insulinsekretion, gefolgt von der Einleitung von Apoptose (112). Für die Signaltransduktion der freien Fettsäuren in β -Zellen zur Regulation der Insulinsekretion ist der Fettsäurerezeptor GPR40 (*G-protein coupled receptor 40*, auch bekannt als FFAR1= *free fatty acid receptor 1*) verantwortlich (93). Seine Rolle ist auch in Verbindung mit der über Fettsäuren induzierten Apoptose beschrieben: Ying Zhang et al. fanden in der Maus- β -Zelllinie NIT-1, dass Palmitinsäure in dieser Zelllinie Apoptose auslöste, allerdings unabhängig von GPR40. Oleinsäure hingegen schützte die Zellen vor der Palmitinsäure-induzierten Apoptose. Dieser Effekt wurde zumindest teilweise über den GPR40 vermittelt (113).

Da TLR2 und TLR4 in anderen Zellen für die Signaltransduktion von freien Fettsäuren verantwortlich sind (51, 94) und GPR40 in insulinsezernierenden

Zellen nicht an der Palmitinsäure-induzierten Apoptose beteiligt zu sein scheint, schien es also lohnend, die Bedeutung von TLR2 und TLR4 auch in insulinsezierenden Zellen zu untersuchen.

In den in dieser Arbeit vorgestellten Versuchen führte in kultivierten C57BL/6 Mausinselnzellen die gleichzeitige Stimulation von TLR2 und TLR4 durch Pam3CSK4 und LPS nach einem Tag zu einer signifikant erhöhten Apoptoserate. Der statistische Test wurde hier mit dem Dunnett Multiple Comparison Test durchgeführt, mit ANOVA war der Unterschied nicht signifikant. In INS-1 Zellen führte bei 1 bis 4 Tagen Behandlungsdauer die Stimulation von TLR2 und TLR4 einzeln oder gemeinsam nicht zu einer signifikant erhöhten Apoptoserate. Die Fettsäure Palmitinsäure zeigte jedoch große Effekte. Nach 3 und 4 Tagen Behandlungsdauer war die Apoptoserate maximal erhöht, und zwar ungefähr um den Faktor 5. In INS-1 Zellen konnte auch eine konzentrationsabhängige gesteigerte Apoptoserate nach Exposition über 1 Tag zu unterschiedlichen Konzentrationen an Palmitinsäure gezeigt werden.

Bei allen Versuchen war ein Problem, dass die basale Apoptoserate in den Kontrollzellen bei meist etwas über 10 Prozent lag, was im Vergleich zu veröffentlichten Daten relativ hoch ist.

Katrin Eitel et al. hatten bei der Untersuchung der Ratteninsulinom-Zelllinie RIN 1046-38 eine basale Apoptoserate in der Kontrollkultur von 0,5 % (72). Felicia Ranta et al. veröffentlichten eine Arbeit, bei der die basale Apoptoserate in Kontrollkultur in INS-1 Zellen bei unter 1 % lag, in kultivierten Mausinselnzellen bei ca. 2 % (114). Warum die basale Apoptoserate in der Kontrollkultur bei dieser Arbeit in verschiedenen Zellmodellen relativ konstant deutlich höher bei ca. 10 % lag, ist nicht ganz klar. Teilweise ist dies vermutlich auf die hohe Sensitivität der verwendeten Methode des TUNEL Assays zurückzuführen. Auf jeden Fall könnte die relativ hohe basale Apoptoserate Effekte kaschieren, da geringe Unterschiede in der Apoptoserate so statistisch nicht signifikant werden könnten, obwohl sie vielleicht existieren. Ein wichtiger Einflussfaktor auf die

Varianz der Ergebnisse könnte unter anderem auch die relativ hohe Konzentration an eingesetztem Serum/FBS sein, da Serum kein einheitliches Agens ist und darin unterschiedlich viel Albumin enthalten sein kann, das freie Fettsäuren zu binden vermag und somit direkten Einfluss auf die Effektstärke der Fettsäuren hat.

Ein generelles Problem bei der Arbeit mit isolierten Inselzellen ist auch, dass die Zellen durch den Isolationsvorgang unspezifisch aktiviert werden. Solche Probleme sind auch aus der angewandten Medizin bekannt: So fanden zum Beispiel Hirofumi Noguchi et al. heraus, dass bei isolierten Inselzellen die Stress-assoziierte Kinase *c-Jun NH₂-terminal kinase* (JNK) vermehrt exprimiert wird und die Zellen eine erhöhte Apoptoserate aufweisen. Dieser Effekt ließ sich durch Inhibition der Kinase vermindern (115-117). Auch Steven Paraskevas et al. konnten zeigen, dass die Isolation von humanen Inselzellen zu einer erhöhten Apoptoserate führt (118).

Dazu passen auch die hier vorgestellten Ergebnisse. Es wurde in isolierten C57BL/6 Mausinseln die Aktivität von NFκB untersucht. NFκB ist in der Signalkaskade von TLR2 und TLR4 involviert (81, 119). Es konnte allerdings kein Unterschied der NFκB Aktivität durch Stimulation von TLR2 und TLR4 oder durch Palmitinsäure gezeigt werden. Möglicherweise könnten auch diese Effekte durch die basale Aktivierung durch Isolation, wie sie bereits weiter oben diskutiert wurde, kaschiert worden sein. Auch möglich wäre, dass bei den in dieser Arbeit durchgeführten Assays (30 min oder 2 h Behandlungsdauer) der Zeitpunkt der NFκB Aktivierung nicht getroffen wurde. NFκB wird auf einen kontinuierlichen Stimulus in der Regel vorübergehend und zyklisch aktiviert, wobei sich die genauen Angaben in der Literatur unterscheiden. Thomas D. Gilmore, der die größte Website im Internet über NFκB betreibt, schrieb 2006 in *Oncogene*, dass man - trotz über 25 000 Veröffentlichungen über NFκB - immer noch sehr rudimentäres Wissen über die Dynamik des NFκB-Weges in kultivierten Zellen, geschweige denn in ganzen Organismen habe (79). In Mausfibroblasten zum Beispiel wird NFκB auf TNF-α als Stimulus in Zyklen von

30 bis 60 min aktiv. Diese Zyklen sind auf die Degradierung und Resynthese von I κ B und die konsekutive Aktivierung und Deaktivierung von NF κ B zurückzuführen (79, 120). In der Insulinomzelllinie MIN6 stimulierten Stefan Norlin et al. die Zellen für 2 h, ehe sie mit einem Luciferase NF κ B Reporter Assay die NF κ B Aktivität bestimmten (121). 30 min sowie 2 h schienen daher geeignete Zeitpunkte, um eine mögliche NF κ B Aktivierung zu untersuchen.

Auch die genaue Bedeutung der Aktivierung von NF κ B ist bisher nicht ganz klar, so kann NF κ B zum Beispiel sowohl pro- als auch antiapoptotisch wirken (79, 80).

Allerdings kann man nicht von einer NF κ B Aktivierung direkt auf eine Aktivierung des Toll-like Rezeptor Signalweges schließen. NF κ B wird durch eine ganze Reihe an Molekülen aktiviert. So ist zum Beispiel bekannt, dass die NF κ B Aktivität in β -Zellen für die Glukose-stimulierte Insulinsekretion erforderlich ist. Da β -Zellen permanent eine gewisse basale Rate an Insulin produzieren, ist auch generell von einer gewissen NF κ B Aktivierung auszugehen (121). Die Ergebnisse aus dem in dieser Arbeit vorgestellten NF κ B Assay lassen also keine endgültigen Aussagen zu, ob NF κ B wirklich nicht durch Stimulation von TLR2 und TLR4 oder Palmitinsäure aktiviert wird.

Die unterschiedlichen Effekte durch Stimulation von TLR2 und TLR4 oder Palmitinsäure auf Mausinselzellen beziehungsweise die Zelllinie INS-1 lassen sich auch dadurch erklären, dass die Zelllinie eine reine β -Zelllinie ist (beziehungsweise eine reine β -Zell-ähnliche Zelllinie (98)), die nicht einen gewissen Anteil anderer endokriner Zellen wie zum Beispiel α -Zellen, δ -Zellen oder PP-Zellen, oder auch nicht-endokriner Zellen wie zum Beispiel vaskulärer Endothelzellen oder auch Makrophagen enthält. Jede dieser Zellen kann bei der Kultivierung von Mausinselzellen die Ergebnisse beeinflussen. Das heißt, der Effekt, der bei der Kultur isolierter Mausinselzellen zu sehen war, muss nicht unbedingt nur durch die β -Zellen bedingt sein.

Diese Tatsache muss allerdings kein Nachteil sein, denn letzten Endes interessiert, wie es sich unter *in vivo* Bedingungen verhält. In dieser Hinsicht ist die Mausinselzellkultur der reinen Zelllinienkultur überlegen. Leider verliert man

dadurch aber auch an Genauigkeit bezüglich der Apoptoserate der β -Zellen, denn β -Zellen machen nur zirka 80% des endokrinen Pankreas aus.

Man darf auch nicht vergessen, dass die INS-1 Zellen eine Tumorzelllinie darstellt, die zwar β -Zellen entstammt, aber durch ihre Entartung durch Bestrahlung auch sicherlich einige Charakteristika der β -Zelle verloren hat (98). Die INS-1 Zelllinie bietet dafür einige Vorteile gegenüber der Kultur isolierter Mausinselzellen: Es handelt sich um eine reine β -Zelllinie. Außerdem weisen die INS-1 Zellen eine relativ hohe Mitoserate auf, wodurch sie einfach zu kultivieren sind und andererseits aber auch bei Versuchen besonders sensibel gegenüber bestimmten Agenzien wie zum Beispiel Palmitinsäure sind.

Es ist daher zum Verständnis der *in vivo* Bedingungen essenziell, sowohl mit Zelllinien als auch mit primären Zellen zu arbeiten, da beide Kulturen ihre Vor- und Nachteile aufweisen.

Es finden sich in der Literatur keine eindeutigen Angaben über die Bedeutung von Toll-like Rezeptoren in insulinsezernierenden Zellen. So zeigten zum Beispiel Alyssa Goldberg et al., dass TLR4-Induktion in Maus- β -Zellen am β -Zelltod nach Inseltransplantation beteiligt sind (96). Thomas Illig et al. fanden hingegen heraus, dass TLR4 Polymorphismen in Menschen nicht an der Entstehung von Diabetes oder Komponenten des metabolischen Syndroms beteiligt sind (122).

Bei der Forschung über β -Zellen muss man, außer auf die Art der verwendeten Zellen wie verschiedenen Zelllinien und primären Zellen (siehe oben), auch darauf achten, dass man Zellen verschiedener Spezies verwendet. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Zellen aus Maus und Ratte gearbeitet.

Langerhans-Inseln und ihre Organisation sind sehr speziesspezifisch. Sie sind in ein Netzwerk spezialisierter Kapillaren eingebettet, die den Blutfluss durch die Inseln regulieren. Der endokrine Anteil des Pankreas ist sehr gut durchblutet; obwohl er nur etwa 1% der Pankreasmasse ausmacht, erhält er 5 - 15% der Organdurchblutung (123, 124). Über den Blutfluss werden Stoffwechselprodukte und Signalstoffe an- und abtransportiert, sodass dieser durchaus eine

Bedeutung bei Vorgängen *in vivo* aufweisen könnte. Dabei weisen sowohl Anatomie als auch Physiologie der Inselmikrozirkulation große Unterschiede zwischen den Spezies auf. Die Implikationen für das humane Pankreas und noch genereller die allgemeine Bedeutung einer Entdeckung bei einer Spezies sind also nach wie vor ungewiss (14). Es müssen Ergebnisse aus unterschiedlichen Spezies miteinander verglichen werden, um Aussagen machen zu können.

Wenn man alle Ergebnisse sowie alle Diskussionspunkte berücksichtigt, kann man also sagen, dass die hier vorgestellten Ergebnisse darauf hinweisen, dass die Toll-like Rezeptoren TLR2 und TLR4 in insulinsezernierenden Zellen eine Rolle spielen, genauso wie die Exposition zu Palmitinsäure. Die genaue Stellung und Bedeutung von TLR2 und TLR4 im Zusammenhang mit dem β -Zelltod ist nach wie vor noch nicht gut verstanden.

4.3. Wirkt Palmitinsäure spezifisch über TLR2 und/oder TLR4?

Um Erkenntnisse zur Frage zu gewinnen, ob Palmitinsäure spezifisch über TLR2 und/oder TLR4 Apoptose auslösen kann, wurden in kultivierten Mausinselzellen aus TLR2/4^{-/-} Mäusen TLR2 und TLR4 stimuliert und die Apoptoserate bestimmt. Es konnten nach zwei Tagen Stimulation keine signifikanten Unterschiede in der Apoptoserate festgestellt werden. Der Hintergrund der TLR2/4^{-/-} Mäuse ist eine C3H Mauslinie. Es konnten als Kontrollen daher nicht wie bisher C57BL/6 Mäusen verwendet werden, sondern C3H Mäuse. Bei den C3H Mäusen konnte nicht derselbe Effekt von Stimulation von TLR2 und TLR4, wie er bei C57BL/6 Mäusen zu beobachten war, gefunden werden. Das heißt, dass in diesem Modell generell keine Effekte von TLR2 und/oder TLR4 gefunden werden konnten, und somit die Frage nicht beantwortet werden kann. Außerdem zeigte sich eine signifikant erhöhte Apoptoserate durch Palmitinsäure bei den Versuchen nur in der INS-1 Zelllinie. Bei den C57BL/6 Mäusen war der Unterschied nicht signifikant.

Auffällig bei den Versuchen mit K.O. Mäusen und ihren Kontrollen C3H war eine extrem hohe basale Apoptoserate bei den kultivierten C3H Mausinselnzellen, die bei zirka 17% lag. Bei den TLR2/4^{-/-} Mäusen lag die basale Apoptoserate niedriger bei zirka 11%. Das entspricht ungefähr der basalen Apoptoserate bei allen anderen Versuchen. Warum die basale Apoptoserate bei den kultivierten C3H Mausinselnzellen so hoch ist, ist unklar.

Es können also aufgrund der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse keine Angaben dazu gemacht werden, ob Palmitinsäure spezifisch über TLR2 und/oder TLR4 zu Apoptose führt. Es ist jedoch nach wie vor zu vermuten, dass TLR2 und TLR4 eine Bedeutung in der β -Zelle haben, denn TLR2 und TLR4 werden in Inselzellen exprimiert und ihre Bedeutung bei der peripheren Insulinresistenz wurde auch bereits gezeigt: So zeigte Joseph Senn, dass TLR2 essenziell für die Entstehung einer Palmitinsäure-induzierten Insulinresistenz in Myotuben ist (51). Hang Shi et al. zeigten die Bedeutung von TLR4 in Zusammenhang mit Fettsäure-induzierter Insulinresistenz in Fettgewebe (52, 53, 97).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse in kultivierten C57BL/6 Inselzellen zeigen eine gesteigerte Apoptoserate nach gemeinsamer Stimulation von TLR2 und TLR4. TLR2 und TLR4 scheinen also auch in β -Zellen eine Rolle zu spielen. Die proapoptotische Wirkung der Palmitinsäure wird dabei unter Umständen teilweise, sicher aber nicht ausschließlich, über die Toll-like Rezeptoren 2 und 4 vermittelt.

Es bedarf weiterer Untersuchungen, um die Bedeutung dieser Rezeptoren in insulinsezernierenden Zellen besser zu verstehen.

4.4. Schlussfolgerungen

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Bedeutung der Toll-like Rezeptoren 2 und 4 in insulinsezernierenden Zellen. Es konnte die Expression von TLR2 und TLR4 in insulinsezernierenden Zellen gezeigt werden, ebenso eine signifikant erhöhte Apoptoserate in kultivierten C57BL/6 Mausinselnzellen bei gleichzeitiger

Stimulation dieser beiden Rezeptoren über einen Tag. Die Rezeptoren scheinen also eine Bedeutung in Inselzellen zu haben.

Für die weitere Untersuchung dieser Rezeptoren in β -Zellen ist es wichtig, die basale Apoptoserate zu senken, um auch eventuell vorhandene kleine Effekte aufdecken zu können. Wichtig ist auch, immer mit mehreren verschiedenen Spezies zu arbeiten, da die Anatomie und Physiologie der Langerhans-Insel und der darin enthaltenen Zellen sich zwischen den Spezies deutlich unterscheiden. Man könnte die Ratte, die deutlich mehr Material bietet als die Maus, als weitere Spezies für die Inselisolierung verwenden. Die aus diesen Inseln isolierten Zellen könnte man mit einem FACS Gerät in Subtypen aufteilen und jede Zellart zunächst einzeln untersuchen, um später das Zusammenspiel dieser *in vivo* verbundenen Zellen verstehen zu können.

5. Zusammenfassung

Toll-like Rezeptoren sind als Rezeptoren des angeborenen Immunsystems bekannt. Sie gehören zur Gruppe der Mustererkennungsrezeptoren. Neben der Erkennung von körperfremden Pathogenen scheinen diese Rezeptoren auch durch andere molekulare Muster - wie zum Beispiel freie Fettsäuren - aktiviert zu werden. Dass sie an der Pathogenese des Typ 2 Diabetes in Zusammenhang mit Fettsäure-induzierter peripherer Insulinresistenz beteiligt sind, legen Ergebnisse mehrerer Gruppen nahe. Der Typ 2 Diabetes mellitus führt aber nicht nur durch die Entwicklung einer peripheren Insulinresistenz zum Auftreten klinischer Erscheinungen. Auch der Untergang von β -Zellmasse, also eine gesteigerte Apoptoserate dieser Zellen, ist Teil der Pathogenese.

Mit dieser Studie wurde untersucht, ob die Stimulation von Toll-like Rezeptor 2 und Toll-like Rezeptor 4 Apoptose in insulinsezernierenden Zellen auslösen kann und ob die Fettsäure Palmitinsäure spezifisch über diese Rezeptoren wirkt.

Zunächst wurde mithilfe eines Screeningtests sowie RT-PCR die Expression von Toll-like Rezeptor 2 und Toll-like Rezeptor 4 in Mausinselzellen sowie in den β -Zelllinien INS-1 (Ratte) und MIN6 (Maus) nachgewiesen. Mausinselzellen exprimieren auch den Toll-like Rezeptor 1. Es werden auch weitere Gene des Toll-like Rezeptor Signalweges exprimiert, zum Beispiel IRAK1, NF κ B und Stat1.

In den aus C57BL/6 Mäusen durchgeführten Apoptosemessungen bei kultivierten isolierten Mausinselzellen führte die gleichzeitige Stimulation der Toll-like Rezeptoren 2 und 4 über einen Tag zu einer signifikant erhöhten Apoptoserate. Zur Stimulation wurden jeweils 1 μ g/ml Pam3CSK4 (synthetisch, aktiviert den Toll-like Rezeptor 2) beziehungsweise Lipopolysaccharid (aktiviert den Toll-like Rezeptor 4) verwendet. Stimulation mit der Fettsäure Palmitinsäure zeigte in diesem Modell keinen signifikanten Effekt.

Applikation von 600 μ mol/l Palmitinsäure auf INS-1 Zellen führte zu einer signifikant gesteigerten Apoptoserate, nach drei und vier Tagen um ungefähr

den Faktor fünf. Es konnten aber bei Stimulation des Toll-like Rezeptors 2 und/oder Toll-like Rezeptors 4 keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden.

In Untersuchungen der Aktivität des nukleären Faktors κB in isolierten kultivierten Mausinseln nach Stimulation von Toll-like Rezeptor 2 und Toll-like Rezeptor 4 beziehungsweise mit Palmitinsäure konnte nach einer halben beziehungsweise 2 h keine gesteigerte Aktivität im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden. Dies schließt aber nicht aus, dass es zu einer gesteigerten Aktivität durch Stimulation gekommen ist, denn der nukleäre Faktor κB wird zyklisch aktiviert. Hierbei unterscheiden sich die Angaben in der Literatur und somit ist nicht sicher, ob der richtige Zeitpunkt getroffen wurde.

Zu der letzten Frage, ob Palmitinsäure spezifisch über die Toll-like Rezeptoren 2 und 4 wirkt, können keine Angaben gemacht werden, da als Kontrolllinie zu den TLR2/4^{-/-} Mäusen ein anderer Stamm (C3H) verwendet werden musste. In C3H Mäusen hatte die Stimulation der Toll-like Rezeptoren 2 und 4 keinen Effekt auf die Apoptoserate.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Toll-like Rezeptoren 2 und 4 in insulinsezernierenden Zellen exprimiert werden und dass sie dort eine Bedeutung haben. Ihre Stimulation kann unter bestimmten Bedingungen zu einer gesteigerten Apoptoserate führen. In der Arbeit wird auch ausführlich über die Probleme der Forschung an diesen Rezeptoren in insulinsezernierenden Zellen, im speziellen in Mausinselnzellen, eingegangen.

6. Referenzen

1. Hauner, H., I. Koster, and L. von Ferber. 2003. [Prevalence of diabetes mellitus in Germany 1998-2001. Secondary data analysis of a health insurance sample of the AOK in Hesse/KV in Hesse]. *Dtsch Med Wochenschr* 128:2632-2637.
2. Giani, G., H. U. Janka, H. Hauner, E. Standl, R. Schiel, A. Neu, W. Rathmann, and J. Rosenbauer. 2004. Epidemiologie und Verlauf des Diabetes mellitus in Deutschland. *Evidenzbasierte Diabetes-Leitlinien DDG* 2004:1-12.
3. Wild, S., G. Roglic, A. Green, R. Sicree, and H. King. 2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27:1047-1053.
4. Zimmet, P., K. G. Alberti, and J. Shaw. 2001. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414:782-787.
5. Shafrir, E. 1996. Development and consequences of insulin resistance: lessons from animals with hyperinsulinaemia. *Diabetes Metab* 22:122-131.
6. Astrup, A., and N. Finer. 2000. Redefining type 2 diabetes: 'diabesity' or 'obesity dependent diabetes mellitus'? *Obes Rev* 1:57-59.
7. Kerner, W., J. Brückel, and B. O. Böhm. 2004. Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. *Evidenzbasierte Diabetes-Leitlinien DDG*:1-11.
8. Kerner, W., and J. Brückel. 2008. Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. *Diabetologie* 2008 2008:131-133.
9. 2003. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 26:S5-20.
10. Donath, M. Y., and J. A. Ehses. 2006. Type 1, type 1.5, and type 2 diabetes: NOD the diabetes we thought it was. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12217-12218.
11. Busnardo, A. C., L. J. DiDio, R. T. Tidrick, and N. R. Thomford. 1983. History of the pancreas. *Am J Surg* 146:539-550.
12. Flier, S. N., R. N. Kulkarni, and C. R. Kahn. 2001. Evidence for a circulating islet cell growth factor in insulin-resistant states. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7475-7480.

13. Wierup, N., H. Svensson, H. Mulder, and F. Sundler. 2002. The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Pept* 107:63-69.
14. Ballian, N., and F. C. Brunnicardi. 2007. Islet vasculature as a regulator of endocrine pancreas function. *World J Surg* 31:705-714.
15. Ahren, B. 2000. Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia* 43:393-410.
16. Ehses, J. A., A. Perren, E. Eppler, P. Ribaux, J. A. Pospisilik, R. Maor-Cahn, X. Gueripel, H. Ellingsgaard, M. K. Schneider, G. Biollaz, A. Fontana, M. Reinecke, F. Homo-Delarche, and M. Y. Donath. 2007. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes* 56:2356-2370.
17. Alberti, G. 2001. Lessons from the History of Insulin. *Diabetes Voice* Volume 46:33-34.
18. Haulica, I. 2001. [Professor Nicolae C. Paulescu- the true discoverer of insulin]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 105:602-605.
19. Murray, I. 1971. Paulesco and the Isolation of Insulin. *J Hist Med Allied Sci* XXVI:150-157.
20. Rosenfeld, L. 2002. Insulin: discovery and controversy. *Clin Chem* 48:2270-2288.
21. Simoni, R. D., R. L. Hill, and M. Vaughan. 2002. The Discovery of Insulin: the Work of Frederick Banting and Charles Best. *J. Biol. Chem.* 277:e15.
22. Wintersteiner, O., V. du Vigneaud, and H. Jensen. 1928. Studies on crystalline insulin v. the distribution of nitrogen in crystalline insulin. *J Pharmacol Exp Ther* 32:397-411.
23. Jensen, H., and O. Wintersteiner. 1932. Studies on crystalline insulin . XIV. The isolation of glutamic acid. *J. Biol. Chem.* 97:93-98.
24. Scott, D. A. 1934. Crystalline insulin. *Biochem. J.* 28:1592-1590.
25. Brown, H., F. Sanger, and R. Kitai. 1955. The structure of pig and sheep insulins. *Biochem J* 60:556-565.
26. Nicol, D. S., and L. F. Smith. 1960. Amino-acid sequence of human insulin. *Nature* 187:483-485.
27. Meienhofer, J., E. Schnabel, H. Bremer, O. Brinkhoff, R. Zabel, W. Sroka, H. Klostermayer, D. Brandenburg, T. Okuda, and H. Zahn. 1963.

- [Synthesis of Insulin Chains and Their Combination to Insulin-Active Preparations.]. *Z Naturforsch B* 18:1120-1121.
28. Obermeier, R., and R. Geiger. 1976. A new semisynthesis of human insulin. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 357:759-767.
 29. Williams, D., R. Van Frank, W. Muth, and J. Burnett. 1982. Cytoplasmic inclusion bodies in *Escherichia coli* producing biosynthetic human insulin proteins. *Science* 215:687-689.
 30. Henrichs, H. R., H. Unger, M. E. Trautmann, and A. Pfützner. 1996. Severe insulin resistance treated with insulin lispro. *The Lancet* 348:1248-1248.
 31. Gallwitz, B. 2005. New therapeutic strategies for the treatment of type 2 diabetes mellitus based on incretins. *Rev Diabet Stud* 2:61-69.
 32. Gallwitz, B. 2005. Glucagon-like peptide-1-based therapies for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Treat Endocrinol* 4:361-370.
 33. Gallwitz, B. 2005. Glucagon-like peptide-1 as a treatment option for type 2 diabetes and its role in restoring beta-cell mass. *Diabetes Technol Ther* 7:651-657.
 34. Gallwitz, B. 2006. Exenatide in type 2 diabetes: treatment effects in clinical studies and animal study data. *Int J Clin Pract* 60:1654-1661.
 35. Saltiel, A. R., and C. R. Kahn. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806.
 36. Duckworth, W. C., R. G. Bennett, and F. G. Hamel. 1998. Insulin degradation: progress and potential. *Endocr Rev* 19:608-624.
 37. Rhodes, C. J. 2005. Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science* 307:380-384.
 38. Bonner-Weir, S. 2001. beta-cell turnover: its assessment and implications. *Diabetes* 50 Suppl 1:S20-24.
 39. Jaikaran, E. T., and A. Clark. 2001. Islet amyloid and type 2 diabetes: from molecular misfolding to islet pathophysiology. *Biochim Biophys Acta* 1537:179-203.
 40. Prentki, M., and C. J. Nolan. 2006. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 116:1802-1812.
 41. Janeway, C. A., Jr., and R. Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216.

42. Aderem, A., and R. J. Ulevitch. 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406:782-787.
43. Kaisho, T., and S. Akira. 2006. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* 117:979-987; quiz 988.
44. Hoffmann, J. A., F. C. Kafatos, C. A. Janeway, and R. A. Ezekowitz. 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284:1313-1318.
45. Gay, N. J., and M. Gangloff. 2007. Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu Rev Biochem* 76:141-165.
46. Beutler, B. 2004. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430:257-263.
47. Hansson, G. K., and K. Edfeldt. 2005. Toll To Be Paid at the Gateway to the Vessel Wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:1085-1087.
48. Anderson, K. V., L. Bokla, and C. Nusslein-Volhard. 1985. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 42:791-798.
49. Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart, and J. A. Hoffmann. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-983.
50. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway, Jr. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397.
51. Senn, J. J. 2006. Toll-like receptor-2 is essential for the development of palmitate-induced insulin resistance in myotubes. *J Biol Chem* 281:26865-26875.
52. Shi, H., M. V. Kokoeva, K. Inouye, I. Tzameli, H. Yin, and J. S. Flier. 2006. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 116:3015-3025.
53. Kim, J. K. 2006. Fat uses a TOLL-road to connect inflammation and diabetes. *Cell Metab* 4:417-419.
54. Hashimoto, C., K. L. Hudson, and K. V. Anderson. 1988. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52:269-279.

55. Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, and B. Beutler. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282:2085-2088.
56. Vives-Pi, M., N. Somoza, J. Fernandez-Alvarez, F. Vargas, P. Caro, A. Alba, R. Gomis, M. O. Labeta, and R. Pujol-Borrell. 2003. Evidence of expression of endotoxin receptors CD14, toll-like receptors TLR4 and TLR2 and associated molecule MD-2 and of sensitivity to endotoxin (LPS) in islet beta cells. *Clin Exp Immunol* 133:208-218.
57. Aliprantis, A. O., R. B. Yang, M. R. Mark, S. Suggett, B. Devaux, J. D. Radolf, G. R. Klimpel, P. Godowski, and A. Zychlinsky. 1999. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 285:736-739.
58. Brightbill, H. D., D. H. Libraty, S. R. Krutzik, R. B. Yang, J. T. Belisle, J. R. Bleharski, M. Maitland, M. V. Norgard, S. E. Plevy, S. T. Smale, P. J. Brennan, B. R. Bloom, P. J. Godowski, and R. L. Modlin. 1999. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 285:732-736.
59. Schwandner, R., R. Dziarski, H. Wesche, M. Rothe, and C. J. Kirschning. 1999. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 274:17406-17409.
60. Massari, P., P. Henneke, Y. Ho, E. Latz, D. T. Golenbock, and L. M. Wetzler. 2002. Cutting edge: Immune stimulation by neisserial porins is toll-like receptor 2 and MyD88 dependent. *J Immunol* 168:1533-1537.
61. Werts, C., R. I. Tapping, J. C. Mathison, T. H. Chuang, V. Kravchenko, I. Saint Girons, D. A. Haake, P. J. Godowski, F. Hayashi, A. Ozinsky, D. M. Underhill, C. J. Kirschning, H. Wagner, A. Aderem, P. S. Tobias, and R. J. Ulevitch. 2001. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol* 2:346-352.
62. Hirschfeld, M., J. J. Weis, V. Toshchakov, C. A. Salkowski, M. J. Cody, D. C. Ward, N. Qureshi, S. M. Michalek, and S. N. Vogel. 2001. Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun* 69:1477-1482.
63. Asea, A., M. Rehli, E. Kabingu, J. A. Boch, O. Bare, P. E. Auron, M. A. Stevenson, and S. K. Calderwood. 2002. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* 277:15028-15034.

64. Takeuchi, O., S. Sato, T. Horiuchi, K. Hoshino, K. Takeda, Z. Dong, R. L. Modlin, and S. Akira. 2002. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 169:10-14.
65. Takeuchi, O., T. Kawai, P. F. Muhlradt, M. Morr, J. D. Radolf, A. Zychlinsky, K. Takeda, and S. Akira. 2001. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 13:933-940.
66. Kurt-Jones, E. A., L. Popova, L. Kwinn, L. M. Haynes, L. P. Jones, R. A. Tripp, E. E. Walsh, M. W. Freeman, D. T. Golenbock, L. J. Anderson, and R. W. Finberg. 2000. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 1:398-401.
67. Rassa, J. C., J. L. Meyers, Y. Zhang, R. Kudaravalli, and S. R. Ross. 2002. Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2281-2286.
68. Bulut, Y., E. Faure, L. Thomas, H. Karahashi, K. S. Michelsen, O. Equils, S. G. Morrison, R. P. Morrison, and M. Arditi. 2002. Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway. *J Immunol* 168:1435-1440.
69. Ohashi, K., V. Burkart, S. Flohe, and H. Kolb. 2000. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 164:558-561.
70. Smiley, S. T., J. A. King, and W. W. Hancock. 2001. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol* 167:2887-2894.
71. Kubo-Murai, M., K. Hazeki, N. Sukenobu, K. Yoshikawa, K. Nigorikawa, K. Inoue, T. Yamamoto, M. Matsumoto, T. Seya, N. Inoue, and O. Hazeki. 2007. Protein kinase Cdelta binds TIRAP/Mal to participate in TLR signaling. *Mol Immunol* 44:2257-2264.
72. Eitel, K., H. Staiger, J. Rieger, H. Mischak, H. Brandhorst, M. D. Brendel, R. G. Bretzel, H. U. Haring, and M. Kellerer. 2003. Protein kinase C delta activation and translocation to the nucleus are required for fatty acid-induced apoptosis of insulin-secreting cells. *Diabetes* 52:991-997.
73. Turvey, S. E., and T. R. Hawn. 2006. Towards subtlety: understanding the role of Toll-like receptor signaling in susceptibility to human infections. *Clin Immunol* 120:1-9.
74. Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35:495-516.

75. Kerr, J. F., A. H. Wyllie, and A. R. Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257.
76. Zeiss, C. J. 2003. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol* 40:481-495.
77. Schwartz, L. M., S. W. Smith, M. E. Jones, and B. A. Osborne. 1993. Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:980-984.
78. Debnath, J., E. H. Baehrecke, and G. Kroemer. 2005. Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy* 1:66-74.
79. Gilmore, T. D. 2006. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25:6680-6684.
80. Thanos, D., and T. Maniatis. 1995. NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell* 80:529-532.
81. Li, X., and G. R. Stark. 2002. NFkappaB-dependent signaling pathways. *Exp Hematol* 30:285-296.
82. Dutta, J., Y. Fan, N. Gupta, G. Fan, and C. Gelinas. 2006. Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB. *Oncogene* 25:6800-6816.
83. Gordon, E. S. 1960. Non-Esterified Fatty Acids in the Blood of Obese and Lean Subjects. *Am J Clin Nutr* 8:740-747.
84. Jensen, M. D., M. W. Haymond, R. A. Rizza, P. E. Cryer, and J. M. Miles. 1989. Influence of body fat distribution on free fatty acid metabolism in obesity. *J Clin Invest* 83:1168-1173.
85. Bjorntorp, P., H. Bergman, and E. Varnauskas. 1969. Plasma free fatty acid turnover rate in obesity. *Acta Med Scand* 185:351-356.
86. Boden, G. 2008. Obesity and free fatty acids. *Endocrinol Metab Clin North Am* 37:635-646, viii-ix.
87. Boden, G., and G. I. Shulman. 2002. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest* 32 Suppl 3:14-23.
88. Eledrisi, M. S., M. S. Alshanti, M. F. Shah, B. Brolosy, and N. Jaha. 2006. Overview of the diagnosis and management of diabetic ketoacidosis. *Am J Med Sci* 331:243-251.

89. Suh, P. G., J. I. Park, L. Manzoli, L. Cocco, J. C. Peak, M. Katan, K. Fukami, T. Kataoka, S. Yun, and S. H. Ryu. 2008. Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *BMB Rep* 41:415-434.
90. Jenssen, B. P., and M. S. Jacobson. 2008. Screening adolescents for lipid disorders: what is the best approach? *Adolesc Med State Art Rev* 19:507-520, x.
91. Hannun, Y. A., and L. M. Obeid. 2008. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:139-150.
92. Nolan, C. J., M. S. Madiraju, V. Delghingaro-Augusto, M. L. Peyot, and M. Prentki. 2006. Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion. *Diabetes* 55 Suppl 2:S16-23.
93. Itoh, Y., Y. Kawamata, M. Harada, M. Kobayashi, R. Fujii, S. Fukusumi, K. Ogi, M. Hosoya, Y. Tanaka, H. Uejima, H. Tanaka, M. Maruyama, R. Satoh, S. Okubo, H. Kizawa, H. Komatsu, F. Matsumura, Y. Noguchi, T. Shinohara, S. Hinuma, Y. Fujisawa, and M. Fujino. 2003. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature* 422:173-176.
94. Poggi, M., D. Bastelica, P. Gual, M. A. Iglesias, T. Gremeaux, C. Knauf, F. Peiretti, M. Verdier, I. Juhan-Vague, J. F. Tanti, R. Burcelin, and M. C. Alessi. 2007. C3H/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet. *Diabetologia* 50:1267-1276.
95. Kim, H. S., M. S. Han, K. W. Chung, S. Kim, E. Kim, M. J. Kim, E. Jang, H. A. Lee, J. Youn, S. Akira, and M. S. Lee. 2007. Toll-like receptor 2 senses beta-cell death and contributes to the initiation of autoimmune diabetes. *Immunity* 27:321-333.
96. Goldberg, A., M. Parolini, B. Y. Chin, E. Czismadia, L. E. Otterbein, F. H. Bach, and H. Wang. 2007. Toll-like receptor 4 suppression leads to islet allograft survival. *FASEB J* 21:2840-2848.
97. Kim, F., M. Pham, I. Luttrell, D. D. Bannerman, J. Tupper, J. Thaler, T. R. Hawn, E. W. Raines, and M. W. Schwartz. 2007. Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. *Circ Res* 100:1589-1596.
98. Asfari, M., D. Janjic, P. Meda, G. Li, P. A. Halban, and C. B. Wollheim. 1992. Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 130:167-178.

99. Miyazaki, J., K. Araki, E. Yamato, H. Ikegami, T. Asano, Y. Shibasaki, Y. Oka, and K. Yamamura. 1990. Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology* 127:126-132.
100. Ishihara, H., T. Asano, K. Tsukuda, H. Katagiri, K. Inukai, M. Anai, M. Kikuchi, Y. Yazaki, J. I. Miyazaki, and Y. Oka. 1993. Pancreatic beta cell line MIN6 exhibits characteristics of glucose metabolism and glucose-stimulated insulin secretion similar to those of normal islets. *Diabetologia* 36:1139-1145.
101. Lacy, P. E., and M. Kostianovsky. 1967. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 16:35-39.
102. Rozen, S., and H. J. Skaletsky. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S., Misener, S. (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.
103. Theiner, G. B. 2005. Modulation der T-Helferzell Immunantwort durch Signale von Toll-like Rezeptoren und Mastzellmediatoren auf Dendritische Zellen. *Med. Dissertation, Universität Erlangen-Nürnberg*.
104. Tanious, F. A., J. M. Veal, H. Buczak, L. S. Ratmeyer, and W. D. Wilson. 1992. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry* 31:3103-3112.
105. Rodriguez, J., and F. Deinhardt. 1960. Preparation of a semipermanent mounting medium for fluorescent antibody studies. *Virology* 12:316-317.
106. Takeda, K., and S. Akira. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17:1-14.
107. Boni-Schnetzler, M., J. A. Ehses, M. Faulenbach, and M. Y. Donath. 2008. Insulinitis in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 10 Suppl 4:201-204.
108. Boni-Schnetzler, M., J. Thorne, G. Parnaud, L. Marselli, J. A. Ehses, J. Kerr-Conte, F. Pattou, P. A. Halban, G. C. Weir, and M. Y. Donath. 2008. Increased interleukin (IL)-1beta messenger ribonucleic acid expression in beta -cells of individuals with type 2 diabetes and regulation of IL-1beta in human islets by glucose and autostimulation. *J Clin Endocrinol Metab* 93:4065-4074.
109. Ehses, J. A., M. Boni-Schnetzler, M. Faulenbach, and M. Y. Donath. 2008. Macrophages, cytokines and beta-cell death in Type 2 diabetes. *Biochem Soc Trans* 36:340-342.

110. Larsen, C. M., M. Faulenbach, A. Vaag, A. Volund, J. A. Ehlers, B. Seifert, T. Mandrup-Poulsen, and M. Y. Donath. 2007. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 356:1517-1526.
111. Froy, O., A. Hananel, N. Chapnik, and Z. Madar. 2007. Differential effect of insulin treatment on decreased levels of beta-defensins and Toll-like receptors in diabetic rats. *Mol Immunol* 44:796-802.
112. Newsholme, P., D. Keane, H. J. Welters, and N. G. Morgan. 2007. Life and death decisions of the pancreatic beta-cell: the role of fatty acids. *Clin Sci (Lond)* 112:27-42.
113. Zhang, Y., M. Xu, S. Zhang, L. Yan, C. Yang, W. Lu, Y. Li, and H. Cheng. 2007. The role of G protein-coupled receptor 40 in lipoapoptosis in mouse beta-cell line NIT-1. *J Mol Endocrinol* 38:651-661.
114. Ranta, F., D. Avram, S. Berchtold, M. Dufer, G. Drews, F. Lang, and S. Ullrich. 2006. Dexamethasone induces cell death in insulin-secreting cells, an effect reversed by exendin-4. *Diabetes* 55:1380-1390.
115. Noguchi, H., S. Matsumoto, N. Kobayashi, S. Hayashi, Y. Iwanaga, H. Nagata, A. Jackson, B. Naziruddin, T. Okitsu, and M. F. Levy. 2008. Effect of JNK inhibitor during islet isolation and transplantation. *Transplant Proc* 40:379-381.
116. Noguchi, H., S. Matsumoto, N. Onaca, B. Naziruddin, A. Jackson, T. Ikemoto, M. Shimoda, Y. Fujita, D. Chujo, Y. Iwanaga, H. Nagata, T. Okitsu, N. Kobayashi, H. Ueno, D. Chaussabel, P. Grayburn, J. Banchereau, and M. F. Levy. 2008. Ductal injection of JNK inhibitors before pancreas preservation prevents islet apoptosis and improves islet graft function. *Hum Gene Ther*.
117. Noguchi, H., Y. Nakai, M. Ueda, Y. Masui, S. Futaki, N. Kobayashi, S. Hayashi, and S. Matsumoto. 2007. Activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) pathway during islet transplantation and prevention of islet graft loss by intraportal injection of JNK inhibitor. *Diabetologia* 50:612-619.
118. Paraskevas, S., D. Maysinger, R. Wang, T. P. Duguid, and L. Rosenberg. 2000. Cell loss in isolated human islets occurs by apoptosis. *Pancreas* 20:270-276.
119. Kawai, T., and S. Akira. 2007. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 13:460-469.
120. Hoffmann, A., G. Natoli, and G. Ghosh. 2006. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene* 25:6706-6716.

121. Norlin, S., U. Ahlgren, and H. Edlund. 2005. Nuclear factor- κ B activity in β -cells is required for glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 54:125-132.
122. Illig, T., F. Bongardt, A. Schopfer, R. Holle, S. Muller, W. Rathmann, W. Koenig, C. Meisinger, H. E. Wichmann, and H. Kolb. 2003. The endotoxin receptor TLR4 polymorphism is not associated with diabetes or components of the metabolic syndrome. *Diabetes* 52:2861-2864.
123. Jansson, L., and P. O. Carlsson. 2002. Graft vascular function after transplantation of pancreatic islets. *Diabetologia* 45:749-763.
124. Menger, M. D., J. Yamauchi, and B. Vollmar. 2001. Revascularization and microcirculation of freely grafted islets of Langerhans. *World J Surg* 25:509-515.

7. Anhang

7.1: Zusammenschau der verwendeten Materialien, Geräte, Mäuse und Zelllinien

Tabelle 6: Zusammenschau über die in der Arbeit verwendeten Materialien mit alphabetisch geordneter Auflistung des Produktes und Angabe von Hersteller, Katalognummer und ggf. Anmerkung.

Hersteller (in Klammern der Firmensitz): 1 = Active Motif (Carlsbad/USA); 2 = Biochrom AG (Berlin); 3 = Carl Roth (Karlsruhe); 4 = Fluka (gehört zur Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis/USA); 5 = Invitrogen Corporation (gehört zu der Life Technologies Corporation, Carlsbad/USA. Die für diese Arbeit verwendete Marke war GIBCO®); 6 = InvivoGen (San Diego/USA); 7 = Lonza Group AG (Basel/ Schweiz); 8 = Merck KGaA (Darmstadt); 9 = Qiagen (Venlo/ Niederlande); 10 = Roche Diagnostics GmbH (Basel/Schweiz); 11 = Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg/Deutschland); 12 = Sigma (gehört zur Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis/USA); 13 = SuperArray Bioscience Corporation (neuer Name SABiosciences Corporation, Frederick/USA); 14 = TPP Techno Plastic Products AG (Trasadingen/Schweiz)

Produkt	Hersteller	Katalognummer	Anmerkung
Bovines Serumalbumin (BSA)	12	A4503	Cohn Fraktion 5, ≥95%
Calciumchlorid (CaCl ₂)	12	C4901	H ₂ O-frei
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl ₂ x 2 H ₂ O)	3	5239.1	-
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	12	D9542	-
Dimethylsulfoxid (DMSO)	12	D4540	-
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O)	8	1.06580.1000	-

DMEM Medium	7	BE12-707F	mit 1 g/l Glukose
FBS Superior (10% fötales Rinderserum)	2	S0615	-
75 cm ² Flaschen	14	90076	-
D-(+)-Glukose	12	G-8270	-
L-Glutamin	5	25030-024	-
Glycerin	11		-
HEPES	5	15630-049	-
In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein	10	11 684 795 910	-
Kaliumchlorid (KCl)	8	1.04936.0250	-
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	8	1.04873.0250	-
Kollagenase	11	17456.02	aus Cl. histolyticum
Lipopolysaccharid (LPS)	12	L6529	aus E. coli 055:B5
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄ x 7 H ₂ O)	4	63140	-
β-Mercaptoethanol	12	M7522	-
Mouse NFκB Signaling Pathway RT ² Profiler PCR Array	13	PAMM-025F	-
Natriumchlorid (NaCl)	8	1.06404.1000	-
Natriumcitrat	12	S-4641	-
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	3	85631	-
Natriumhydroxid (NaOH)	8	1.06498.1000	Verwendung 1 bzw. 5 mmol/l
Natrium-Pyruvat	5	11360-039	-
Palmitinsäure	12	P0500	-

Pam3CSK4	6	tlr-pms	-
Paraformaldehyd (PFA)	12	158127	95%
PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)	5	20012-068	Ca ²⁺ /Mg ²⁺ frei; pH 7,2
Penicillin/Streptomycin Fertiglösung	5	15140-122	100 000 IU/l bzw. 100 mg/l
Poly-L-Ornithin-Lösung	12	P4957	-
Polyvinylalkohol	12	P8136-250G	-
RNeasy Mini Kit	9	74104	-
RPMI 1640 Medium	5	31870-074	mit 11 mmol/l Glukose
TransAM™ NFκB p65 Transcription Factor Assay Kit	1	40096	-
Trizma® base	12	T-1503	= Tris(hydroxymethyl)-amino-methan (Tris)
Triton-X-100	3	6683.1	-
Trypsin	5	15400-054	10 x Vorratslösung

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Geräte in alphabetischer Reihenfolge mit Angabe von Gerät, Hersteller (in Klammern der Firmensitz) sowie Modell.

Gerät	Hersteller	Modell
Binokular	Hemytech Germany	Binokular
Binokular (Beleuchtung)	Hemytech Germany	Cold Light L-150A
Elektrophoresekammern/ Power Supply	1) Bio-Rad (Hercules/USA) 2) Consort (Turnhout/Belgien)	PowerPac Basic EV231
ELISA Reader	Bio-Rad (Hercules/USA)	Model 680 Microplate Reader

Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss AG (Oberkochen)	Axiophot
Inkubationsbad	GFL (Burgwedel)	Inkubationsbad 1003
Mikrowaage	Mettler Toledo (Greifensee/ Schweiz)	AB 104
pH-Meter	WTW GmbH (Weilheim)	pH526
Sterilbank	Heraeus (Frankfurt)	Herasafe HS 12
Thermocycler	Techne	Progene
Vortex	1) VWR (West Chester/ USA) 2) Scientific Industries (Bohemia/USA)	Analog Vortex Mixer Vortex-Genie 2
Waage	Mettler Toledo (Greifensee/ Schweiz)	PG2002
Wasseraufbereitungs- system	Millipore (Billerica/USA)	Milli-Q PF Plus
Wasserbad	Julabo (Seelbach)	Julabo 7A
Einhängethermostat	Julabo (Seelbach)	Julabo MP
Zellinkubator	Heraeus (Frankfurt)	HERAcell CO ₂ Inkubator
Zentrifugen	Heraeus (Frankfurt)	1) Biofuge fresco, 2) Megafuge 2.OR

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Mäuse und Zelllinien mit Angabe der Bezugsquelle und des Sitzes der Bezugsquelle.

Zelllinien/Mäuse	Bezugsquelle	Sitz der Bezugsquelle
INS-1 Zellen	Prof. Dr. Claes B. Wollheim	Universitätsklinikum Genf/ Schweiz
MIN6 Zellen	Prof. Dr. Philippe A. Halban	Universitätsklinikum Genf/ Schweiz
C57BL/6 Mäuse	Charles River Laboratories	Wilmington/USA

TLR2/4 ^{-/-} Mäuse	Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee	Abteilung für Immunologie, Universität Tübingen
C3H Mäuse	Charles River Laboratories	Wilmington/USA
Maus-Mastzellen	Frau Dr. Ekaterina Shumilina	Physiologisches Institut, Universität Tübingen

7.2. Übersicht über die in Kapitel 3.1. beschriebenen Gene

Tabelle 9: Übersicht über die mit dem TransAM™ NFκB p65 Transcription Factor Assay Kit untersuchten Gene mit Angabe des Codes bei Unigene und GeneBank sowie Symbol und Beschreibung. Die Angaben wurden aus dem *Product Specification Sheet* des Assays übernommen.

Unigene	GeneBank	Symbol	Beschreibung
Mm.6645	NM_009652	Akt1	Thymoma viral proto-oncogene 1
Mm.471328	NM_007497	Atf1	Activating transcription factor 1
Mm.209903	NM_009715	Atf2	Activating transcription factor 2
Mm.239141	NM_009740	Bcl10	B-cell leukemia/lymphoma 10
Mm.1068	NM_033601	Bcl3	B-cell leukemia/lymphoma 3
Mm.19131	NM_009778	C3	Complement component 3
Mm.17629	NM_130859	Card10	Caspase recruitment domain family, member 10
Mm.28498	NM_172729	Nod1	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1
Mm.1051	NM_009807	Casp1	Caspase 1
Mm.336851	NM_009812	Casp8	Caspase 8
Mm.290320	NM_011333	Ccl2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
Mm.336848	NM_009805	Cflar	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
Mm.3996	NM_007700	Chuk	Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase

Mm.132238	NM_001025432	Crebbp	CREB binding protein
Mm.4922	NM_009969	Csf2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
Mm.1238	NM_009971	Csf3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)
Mm.4772	NM_010336	Edg2	Endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein- coupled receptor, 2
Mm.181959	NM_007913	Egr1	Early growth response 1
Mm.458259	NM_007922	Elk1	ELK1, member of ETS oncogene family
Mm.24816	NM_010169	F2r	Coagulation factor II (thrombin) receptor
Mm.5126	NM_010175	Fadd	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain
Mm.3355	NM_010177	Fasl	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
Mm.246513	NM_010234	Fos	FBJ osteosarcoma oncogene
Mm.378921	NM_010288	Gja1	Gap junction protein, alpha 1
Mm.439747	NM_008311	Htr2b	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B
Mm.435508	NM_010493	Icam1	Intercellular adhesion molecule 1
Mm.240327	NM_008337	Ifnγ	Interferon gamma
Mm.277886	NM_010546	Ikbkb	Inhibitor of kappaB kinase beta
Mm.386783	NM_019777	Ikbke	Inhibitor of kappaB kinase epsilon
Mm.12967	NM_010547	Ikbkg	Inhibitor of kappaB kinase gamma
Mm.874	NM_010548	Il10	Interleukin 10
Mm.15534	NM_010554	Il1a	Interleukin 1 alpha
Mm.222830	NM_008361	Il1b	Interleukin 1 beta
Mm.896	NM_008362	Il1r1	Interleukin 1 receptor, type I
Mm.1019	NM_031168	Il6	Interleukin 6

Mm.38241	NM_008363	Irak1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1
Mm.152142	NM_172161	Irak2	Interleukin-1 receptor-associated kinase 2
Mm.105218	NM_008390	Irf1	Interferon regulatory factor 1
Mm.275071	NM_010591	Jun	Jun oncogene
Mm.87787	NM_010735	Lta	Lymphotoxin A
Mm.3122	NM_010736	Ltbr	Lymphotoxin B receptor
Mm.15918	NM_011945	Map3k1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1
Mm.8385	NM_011952	Mapk3	Mitogen-activated protein kinase 3
Mm.213003	NM_010851	Myd88	Myeloid differentiation primary response gene 88
Mm.277152	XM_904112	Nlrp12	NLR family, pyrin domain containing 12
Mm.256765	NM_008689	Nfkb1	Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells 1, p105
Mm.102365	NM_019408	Nfkb2	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2, p49/p100
Mm.170515	NM_010907	Nfkbia	Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
Mm.255025	NM_020005	Pcaf	P300/CBP-associated factor
Mm.378990	NM_011163	Eif2ak2	Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2
Mm.184163	NM_029780	Raf1	V-raf-leukemia viral oncogene 1
Mm.4869	NM_009044	Rel	Reticuloendotheliosis oncogene
Mm.249966	NM_009045	Rela	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)

Mm.1741	NM_009046	Relb	Avian reticuloendotheliosis viral (v-rel) oncogene related B
Mm.374799	NM_009068	Ripk1	Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1
Mm.112765	NM_138952	Ripk2	Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 2
Mm.272675	NM_015747	Slc20a1	Solute carrier family 20, member 1
Mm.7320	NM_016769	Smad3	MAD homolog 3 (Drosophila)
Mm.277406	NM_009283	Stat1	Signal transducer and activator of transcription 1
Mm.34580	NM_019786	Tbk1	TANK-binding kinase 1
Mm.197552	NM_009370	Tgfbr1	Transforming growth factor, beta receptor I
Mm.172346	NM_009371	Tgfbr2	Transforming growth factor, beta receptor II
Mm.273024	NM_030682	Tlr1	Toll-like receptor 1
Mm.87596	NM_011905	Tlr2	Toll-like receptor 2
Mm.33874	NM_126166	Tlr3	Toll-like receptor 3
Mm.38049	NM_021297	Tlr4	Toll-like receptor 4
Mm.42146	NM_011604	Tlr6	Toll-like receptor 6
Mm.23979	NM_133211	Tlr7	Toll-like receptor 7
Mm.196676	NM_133212	Tlr8	Toll-like receptor 8
Mm.44889	NM_031178	Tlr9	Toll-like receptor 9
Mm.1293	NM_013693	Tnf	Tumor necrosis factor
Mm.116683	NM_009397	Tnfaip3	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3
Mm.193430	NM_020275	Tnfrsf10b	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b
Mm.1258	NM_011609	Tnfrsf1a	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a

Mm.235328	NM_011610	Tnfrsf1b	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b
Mm.271833	NM_011611	Cd40	CD40 antigen
Mm.367714	NM_001033126	Cd27	CD antigen 27
Mm.1062	NM_009425	Tnfsf10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
Mm.307668	NM_019418	Tnfsf14	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14
Mm.103551	NM_023764	Tollip	Toll interacting protein
Mm.264255	NM_001033161	Tradd	TNFRSF1A-associated via death domain
Mm.3399	NM_00942	Traf2	Tnf receptor-associated factor 2

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meiner Betreuerin und Doktormutter, Frau Prof. Dr. Susanne Ullrich, herzlich bedanken. Wichtig war für mich vor allem die hilfreiche und kompetente Unterstützung, die ich während meiner Arbeit genießen durfte, sei es inhaltlich oder auf zwischenmenschlicher Ebene. Vielen Dank!

Ich möchte mich auch bei meinen Laborkollegen bedanken, die immer ein kompetenter Ansprechpartner für mich waren und meine endlosen Fragen stets gerne beantworteten. Dies sind Frau Dr. Felicia Ranta (geb. Suarasan), Frau Dipl.-Biol. Diana Michael (geb. Avram), Frau Ying Zhang und Frau Sieglinde Haug. Ich möchte mich auch bei folgenden anderen Mitarbeitern der Abteilung Innere Medizin IV der Universität Tübingen bedanken, die alle ihren Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben: Frau Dr. Anita M. Hennige, Herrn PD Dr. Harald Staiger, Frau Dipl.-Biol. Anna-Maria Kovacs, Frau Martina Melzer, sowie dem Ärztlichen Direktor der Inneren Medizin IV, Herrn Prof. Dr. Hans-Ulrich Häring.

Unverzichtbar für das Gelingen meiner Arbeit waren auch Herr Dr. York-Dieter Stierhof und Frau Dagmar Ripper vom Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen (ZMBP) der Universität Tübingen, die mir bei allen Fragen bezüglich der Mikroskopie fachmännisch zur Seite standen und deren Fluoreszenzmikroskop ich benutzen durfte. Herzlichen Dank!

An diese Stelle gehört auch ein großer Dank an Herrn Dr. Heinz Schwarz vom Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen, der meine Arbeit ebenfalls als ausgewiesener Mikroskopie-Experte sehr unterstützt hat.

Ich möchte auch der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) danken, die mir für die Vorstellung meines Posters auf der DDG Jahrestagung 2008 in München ein Reisestipendium zukommen ließ.

Ein unglaublich großer Dank gilt auch meiner ganzen Familie, meinen Freunden und meiner Freundin Miriam Opitz. Danke, dass Ihr mich während dieser Zeit ertragen und mich immer wieder zum Arbeiten motiviert habt! Danke auch an Florian Weissmann für kompetente Antworten auf meine biochemischen Fragen. Miriam und mein Bruder Janosch halfen mir außerdem bei Layout und Korrekturlesen. Herzlichen Dank!

Und Miriam - danke, dass es Dich gibt!