

Aufklärung der Regulation und Funktion des Toll-like Rezeptor 9 Signalweges in Adipozyten und seine Bedeutung im Kontext von Adipositas

**Investigation of the Regulation and Functional Role of Toll-like Receptor 9
Signaling in Adipocytes and its Impact in the Context of Obesity**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

Vorgelegt am Fachbereich 08 Biologie und Chemie der
Justus-Liebig-Universität Gießen

von

Miriam Johanna Thomalla

Gießen, den 16.01.2020

Erstgutachter: Prof. Dr. Adriaan Dorresteyn

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Andreas Schäffler

Diese Arbeit wurde in der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III und deren Labors im ForMed-Gebäude (Abteilung: molekulare Endokrinologie) der Justus-Liebig-Universität Gießen erstellt.

„Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.“

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	vii
Abbildungsverzeichnis.....	xii
Tabellenverzeichnis.....	xiv
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Bedeutung von Adipositas im globalen Kontext	1
1.2 Fettgewebe	2
1.2.1 Vorkommen und Funktion des Fettgewebes	2
1.2.2 Zelluläre Entwicklung von Fettzellen während der Adipogenese	3
1.2.3 Signalmoleküle der Fettzellen	4
1.2.3.1 Adiponektin	6
1.2.3.2 Resistin	6
1.2.4 Energie-Aufnahme und -Speicherung bei Adipozyten	7
1.2.5 Immunmodulatorische Eigenschaften von Adipozyten	10
1.3 Aufbau und Funktion von Toll-like Rezeptoren.....	10
1.3.1 TLR9 und seine Bedeutung bei Adipositas.....	14
1.3.2 Synthetische und physiologische TLR9 Liganden	15
1.4 Zielsetzung der Arbeit	20
2 Material und Methoden.....	21
2.1 Materialien	21
2.1.1 Antikörper (AK)	21
2.1.2 Chemikalien	21
2.1.3 Geräte.....	24
2.1.4 Kit-Systeme	26
2.1.5 Verbrauchsmaterialien	26
2.1.6 Medien, Puffer und Lösungen	29
2.1.6.1 Medien für humane Zellen.....	29
2.1.6.2 Medien für murine Zellen.....	29
2.1.6.3 Puffer und Lösungen.....	29
2.1.7 Oligonukleotidsequenzen	31
2.1.7.1 Humane Primer.....	31
2.1.7.2 Murine Primer	31
2.1.7.3 siRNA-Sequenzen.....	32
2.1.8 Software und Programme	32

2.1.9 Zelllinien	32
2.2 Methoden	33
2.2.1 <i>In vitro</i> Zellkulturarbeiten	33
2.2.1.1 Kultivierung und Differenzierung von murinen 3T3-L1 Zellen	33
2.2.1.2 Isolation von primären murinen Zellen	34
2.2.1.2.1 Isolation von primären murinen Prä-Adipozyten	34
2.2.1.2.2 Isolation von primären Adipozyten und von Zellen der stromavaskulären Fraktion aus Mäusen	34
2.2.1.2.3 Kultivierung und Differenzierung primärer muriner Prä-Adipozyten	35
2.2.1.3 Kultivierung und Differenzierung humaner Prä-Adipozyten	35
2.2.1.4 Stimulation der Adipozyten mit TLR-Liganden	36
2.2.2 Arbeiten mit RNA/DNA	36
2.2.2.1 Transfektion mit <i>small interfering</i> RNA (siRNA)	36
2.2.2.2.1 Isolation von RNA aus Gesamtzelllysaten	37
2.2.2.2.2 Isolation von RNA aus Geweben	37
2.2.2.2.3 Isolation von RNA aus isolierten Adipozyten/ Zellen der stromavaskulären Fraktion (SVF)	38
2.2.2.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren	38
2.2.2.4 Reverse Transkription	39
2.2.2.5 Quantitative <i>real time</i> PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	40
2.2.3 Arbeiten mit Proteinen	41
2.2.3.1 Bestimmung der Zellvitalität	41
2.2.3.2 Präparation von Proteinextrakten aus Gesamtzelllysaten	42
2.2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen aus Gesamtzelllysaten	42
2.2.3.4 Serumpräparation von murinen Blutproben	43
2.2.3.5 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	43
2.2.4 Färbemethoden	44
2.2.4.1 Färbung muriner 3T3-L1 Zellen	44
2.2.4.1.1 Oil Red O' Lipidfärbung	44
2.2.4.1.2 Fixierung muriner 3T3-L1 Zellen	44
2.2.4.1.3 Immunzytochemie	44
2.2.4.2 Färbung humaner und muriner Gewebeproben	45
2.2.4.2.1 Fixierung und Konservierung der Gewebe	45
2.2.4.2.2 Schnittpräparation mit dem Mikrotom	45
2.2.4.2.3 Hämatoxylin- und Eosin-Übersichtsfärbung	45
2.2.4.2.4 Immunhistochemische Färbung von TLR9 Protein	46

2.2.5 Tiere	46
2.2.5.1 C57Bl/6	46
2.2.5.2 Balb/c.....	47
2.2.6 Patienten und Studien-Kohorte	47
2.2.7 Statistische Analyse	48
3 Ergebnisse	49
3.1. TLR9-Expression in Adipozyten	49
3.1.1. TLR9-Expression während der Differenzierung muriner 3T3-L1-Adipozyten	49
3.1.2. TLR9-Expression in murinem Fettgewebe	51
3.1.3 TLR9-Expression in humanem Fettgewebe	54
3.1.4 Bivariate Korrelation der Fettgewebs-spezifischen TLR9-Expression mit physiologischen und anthropometrischen Parametern bei Adipositas	55
3.2. Die funktionale Rolle von TLR9 während der adipozytären Differenzierung	57
3.3 Der Einfluss von TLR9-Agonisten (CpG-ODNs) auf das Sekretionsprofil von Adipozyten.....	60
3.3.1 Stimulation von murinen 3T3-L1 Adipozyten mit TLR9-Agonisten	60
3.3.2 Stimulation von primären Adipozyten aus TLR9 ^{wt/wt} und TLR9 ^{-/-} Mäusen mit TLR9- Agonisten.....	68
3.3.3 Stimulation von humanen Adipozyten mit TLR9-Agonisten	73
4 Diskussion	77
4.1. TLR9-Expression in Adipozyten	77
4.2. Die Bedeutung der TLR9-Expression während der adipozytären Differenzierung ..	80
4.3 Der Einfluss von TLR9-Agonisten (CpG-ODNs) auf das Sekretionsprofil von Adipozyten.....	82
5.1 Zusammenfassung	89
5.2 Summary	91
6 Publikationen und Kongressbeiträge	93
6.1 Publikationen	93
6.1.1 Erstautorenschaften	93
6.1.2 Koautorenschaften	93
6.2 Kongressbeiträge	93
7 Literaturverzeichnis	95

Abkürzungsverzeichnis

$\alpha_2\text{Col6}$	α_2 chain of collagen 6
ϵ_{RNA}	RNA-Absorptionskoeffizient
μ	mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
-/-	homozygoter Genknockout
A	Absorption
Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym
Acrp30	Adiponektin (<i>adipocyte complement-related protein of 30 kDa</i>)
ADD1	<i>adipocyte determination- and differentiation-dependent factor-1</i>
AdipoR	Adiponektin Rezeptor
ADSF	<i>Adipose Tissue-Specific Secretory Factor</i>
AEC	3-amino-9-ethylcarbazole
AK	Antikörper
AP1	Aktivator Protein 1
AT	Fettgewebe (<i>adipose tissue</i>)
ATGL	adipose triglyceride lipase (ATGL)
BMI	Körpermassenindex [kg/m^2] (<i>Body-Mass-Index</i>)
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
C/EBP	<i>CCAAT-enhancer binding protein</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA
cfDNA	zellfreier DNA
cm	Zentimeter
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CpG	Cytidin-Phosphat-Guanosin
CREB	<i>cyclic AMP-responsive element-binding protein</i>
C_{RNA}	RNA-Konzentration
Ct	<i>Cycle threshold</i>

Abkürzungsverzeichnis

DAMP	Gefahren-assoziierte molekulare Muster (<i>danger associated molecular pattern</i>)
DC	Dendritische Zelle
dH ₂ O	destilliertes Wasser
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherchia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
e. g.	<i>example given</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ET	<i>extracellular traps</i>
<i>et al.</i>	<i>Et alii</i> (lat.: und andere)
FABP3	<i>fatty acid binding protein 3</i>
FIZZ	<i>found in inflammatory zone</i>
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLUT	Glukosetransporter
gon	gonadal
GpC	Guanosin-Phosphat-Cytidin
G _{xr}	relative Genexpression des Zielgens
h	Stunde (<i>hour</i>)
H ₂ O	Wasser
HEK-Zellen	<i>Human Embryonic Kidney Cells</i>
HFD	Hoch-Fett-Diät
HPAd	humane Prä-Adipozyten
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IGF	<i>Insulin-like growth-factor</i>
IgG	ImmunglobulinG
IL	Interleukin
IR	Insulinresistenz
IRF	Interferon-regulatorischen Faktoren
IRAK	IL-1 Rezeptor-assoziierte Kinasen
IT	Isotyp
JNK	JUN N-terminalen Kinasen

Abkürzungsverzeichnis

kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
K_m	Michaeliskonstante
Ktrl.	Kontrolle
l	Liter
lcSFA	langkettige gesättigte Fettsäuren (<i>long chain saturated fatty acids</i>)
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LPL	Lipoprotein Lipase
LPS	Lipopolysaccharid
mM	Millimolar
M	molar [mol/l]
MAL	<i>MYD88-adaptor-like protein</i>
MALP	Makrophagen-aktivierendes Lipopeptid
MAPK	Mitogen-aktivierten Protein Kinasen
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MGL	Monoglycerol-Lipase
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
Min	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mu	murin
MYD88	<i>myeloid differentiation primary-response protein 88</i>
N	Normalität [N]
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Hydrid
NAFLD	nichtalkoholischen Fettlebererkrankung (<i>nonalcoholic fatty liver disease</i>)
NCS	Neugenorenes Kälberserum (<i>Newborn Calf Serum</i>)
NF-κB	Nuklear Factor-κB
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
ntsiRNA	<i>non template small interfering RNA</i>
ODN	Oligodesoxynukleotide
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (<i>pathogen associated molecular pattern</i>)

Abkürzungsverzeichnis

PBS	Phosphat-gepufferter Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pDC	plasmazytoide Dendritische Zelle
PLIN1	Perilipin-1
poly(I:C)	<i>polyinosinic-polycytidylic acid</i>
PO ₄	Phosphodiester
PO ₃ S	Phosphorothioat
PPAR	<i>peroxisome proliferator activated receptor</i>
PRR	Mustererkennungsrezeptor (<i>Pattern Recognition Receptor</i>)
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RLT-Puffer	RNeasy Lyse Puffer
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
ROBS	<i>Research and Registry in Obesity and Bariatric Surgery</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>real time polymerase chain reaction</i>
s.	siehe
sc	subkutan
sek	Sekunden
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SLE	systemischer Lupus erythematodes
SVF	stroma-vaskuläre Fraktion
Tab.	Tabelle
TIR	Toll-Interleukin-1 Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
T _m	Annealing-Temperatur
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TRAF	TNF Rezeptor-assoziierten Faktoren
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adaptor protein inducing IFNβ</i>
UV	Ultra-Violett
V	Verdünnungsfaktor

Abkürzungsverzeichnis

v. Chr.	vor Christus
vis	viszeral
WHO	Weltgesundheitsorganisation
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entwicklungs- und Genexpressionsprofil während der adipozytären Differenzierung.	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Glukoseaufnahme in Adipozyten.	9
Abbildung 3: Signalkaskade der Toll-like Rezeptoren (TLR) in Mammalia.	12
Abbildung 4: Schemadarstellung einer Phosphodiester- und einer Phosphorothioat-Bindung zwischen zwei Nukleotiden.	16
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Zusammensetzung des Klasse A ODNs 1585, des Klasse B ODNs 1826, des Klasse C ODNs 2395 und den entsprechenden Kontroll ODNs.	18
Abbildung 6: Schematische Darstellung intrinsischer Quellen für physiologische TLR9-Liganden.	19
Abbildung 7: Die TLR9 Genexpression in murinen 3T3-L1 Zellen ist in der adiopozytären Differenzierung induziert.	49
Abbildung 8: Lichtmikroskopie von murinen 3T3-L1 Zellen nach immunzytochemischer Färbung von zytoplasmatisch lokalisiertem TLR9-Protein (rot).	51
Abbildung 9: TLR9 mRNA Expressionsniveau in subkutanen und gonadalen Fettgewebe (AT) aus normalgewichtigen BALB/c Mäusen.	52
Abbildung 10: Lichtmikroskopie von gonadalem (gon) Fettgewebe (AT) nach immunhistochemischer TLR9 Proteinfärbung.	52
Abbildung 11: Relative TLR9 mRNA Expression in Adipozyten und stroma-vaskulärer Fraktion (SVF), isoliert aus gonadalem (gon) und subkutanem (sc) Fettgewebe (AT) von C57BL/6 Mäusen.	53
Abbildung 12: TLR9 mRNA Expressionsniveau in subkutanen und viszeralen Fettgewebe (AT) aus Adipositaspatientinnen.	54
Abbildung 13: Lichtmikroskopie von humanem (hu) subkutanem (sc) und viszeralem (vis) Fettgewebe (AT) nach immunhistochemischer Färbung von TLR9-Protein.	55
Abbildung 14: Systemische Resistinkonzentration in Korrelation mit der TLR9 mRNA Expression in subkutanem (sc) (A) und viszeralem (vis) Fettgewebe (B).	56
Abbildung 15: Bivariate Korrelation nach Spearman der TLR9 mRNA Expression in viszeralem Fettgewebe und des Hüftumfangs bei Adipositas.	57
Abbildung 16: Lichtmikroskopie von 3T3-L1 Adipozyten nach wiederholtem TLR9 siRNA Knockdown.	58
Abbildung 17: Adiponektin-, Leptin- und Resistin- Genexpressionsanalysen in Gesamtzelllysaten von murinen 3T3-L1 Adipozyten.	59
Abbildung 18: Adiponektin- und Resistinkonzentration im Serum von BALB/c TLR9 ^{wt/wt} und TLR9 ^{-/-} Mäusen.	60
Abbildung 19: Resistin- (A-C) und Adiponektin-Proteinkonzentration (D-F) im Zellkulturüberstand von 3T3-L1 Adipozyten nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen des Oligodesoxynukleotids (ODN) 1585 (A, D), dem entsprechenden Kontroll-ODN A (Ktrl. ODN A) (B, E) und in Ko-Stimulation mit dem ODN A und Lipopolysaccharide (LPS) (C, F).	62
Abbildung 20: Resistin- (A-C) und Adiponektin-Proteinkonzentration (D-F) im Zellkulturüberstand von 3T3-L1 Adipozyten nach 18 h Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen des ODN 1826 (Klasse B) (A, D), nach Stimulation mit dem entsprechenden Kontroll-ODN (Ktrl. ODN B; 20µg/ml) (B, E), oder in Ko-Stimulation mit dem ODN B und LPS (10 ng/ml) (C, F).	63
Abbildung 21: Resistin- (A-C) und Adiponektin-Proteinkonzentration (D-F) im Zellkulturüberstand von 3T3-L1 Adipozyten nach 18 h Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen des ODN 2395 (Klasse C) (A, D), nach Stimulation mit dem	

entsprechenden Kontroll-ODN (Ktrl. ODN C; 20µg/ml) (B, E) und in Ko-Stimulation mit ODN C und LPS (10 ng/ml).	65
Abbildung 22: Die Genexpression von MCP-1, GLUT1 und GLUT4 in murinen 3T3-L1 Adipozyten nach Stimulation mit 20 µg/ml Klasse A, B und C ODN (1585, 1826, 2395) verglichen mit den entsprechenden ODN Kontrollen (Ktrl. ODN; 20 µg/ml) und der Lösungsmittelkontrolle (Ktrl.).	68
Abbildung 23: Basale Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand von <i>ex vivo</i> differenzierten primären murinen Adipozyten aus TLR9 ^{wt/wt} und TLR9 ^{-/-} Mäusen. Adipozyten aus Knockout-Tieren produzieren signifikant weniger Adiponektin (A), während die MCP-1- (B) sowie Resistin- (C) Produktion gegenüber den TLR9 ^{wt/wt} Tieren induziert ist.	69
Abbildung 24: Adiponektin- (A), MCP-1 (B)- und Resistin (C)-Sekretion in den Zellkulturüberstand von primären murinen Adipozyten (pmAd) nach Stimulation mit 20 µg/ml CpG ODN 1585 (Klasse A) versus dem entsprechenden Kontroll-ODN (Ktrl. ODN) versus der Lösungsmittelkontrolle (Ktrl.).	70
Abbildung 25: Adiponektin- (A), MCP-1 (B)- und Resistin (C)-Sekretion in den Zellkulturüberstand von primären murinen Adipozyten (pmAd) nach Stimulation mit 20µg/ml CpG ODN 1826 (Klasse B) versus dem entsprechenden Kontroll-ODN (Ktrl. ODN) versus der Lösungsmittelkontrolle (Ktrl.).	71
Abbildung 26: Adiponektin- (A), MCP-1 (B)- und Resistin (C)-Sekretion in den Zellkulturüberstand von primären murinen Adipozyten (pmAd) nach Stimulation mit 20 µg/ml CpG ODN 2395 (Klasse C) versus dem entsprechenden Kontroll-ODN (Ktrl. ODN) versus der Lösungsmittelkontrolle (Ktrl.).	72
Abbildung 27: Relative Adiponektinkonzentration im Zellkulturüberstand von primären humanen Adipozyten (phAd) nach Stimulation mit Klasse A ODN 2216, Klasse B ODN 2006 und Klasse C ODN 2395 und den entsprechenden Kontroll ODN (Ktrl. ODN).	74
Abbildung 28: Relative mRNA Expression von MCP-1 in primären humanen Adipozyten (phAd) nach Stimulation mit Klasse A ODN 2216, Klasse B ODN 2006 und Klasse C ODN 2395 und den entsprechenden Kontroll-ODNs (Ktrl. ODN).	75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der adipozytär exprimierten TLR-Proteine, sowie deren beschriebene Funktion nach Ligandenbindung.....	13
Tabelle 2: Übersicht der Charakteristika der verschiedenen CpG-ODN Klassen.....	16
Tabelle 3: Innerhalb dieser Arbeit verwendete humane Primer mit Sequenzangabe, sowie die bei der PCR eingesetzte Annealing-Temperatur (T_m).....	31
Tabelle 4: Innerhalb dieser Arbeit verwendete murine Primer mit Sequenzangabe, sowie die bei der PCR eingesetzte Annealing-Temperatur (T_m).....	31
Tabelle 5: Bivariate Korrelation nach Spearman Rho der TLR9-Genexpression in subkutanen (sc) und viszeralen (vis) Fettgewebe mit physiologischen Parametern. ..	56
Tabelle 6: Zusammenfassung der Auswirkungen von Klasse A, B und C ODNs auf die Resistin- und Adiponektin- Proteinsekretion in den Zellkulturüberstand von murinen 3T3-L1 Adiozyten gegenüber der Lösungsmittelkontrolle in An- und Abwesenheit von LPS (10 ng/μl).....	66
Tabelle 7: Zusammenfassung der Auswirkungen von Klasse A ODN 1585, Klasse B ODN 1826 und Klasse C ODN 2395, sowie den entsprechenden GpC-haltigen ODN Kontrollen (ODN Ktrl.) auf die Adipokinsekretion von primären murinen Adipozyten (pmAd) aus TLR9^{wt/wt} und TLR9^{-/-} Tieren.	73

1 Einleitung

1.1 Die Bedeutung von Adipositas im globalen Kontext

Nach Angaben der WHO sterben weltweit mindestens 2,8 Millionen Menschen pro Jahr an den Folgen von Fettsucht und Übergewicht. Schätzungsweise sind 23 % aller Frauen und 20 % aller Männer innerhalb Europas adipös, Tendenz steigend. Übergewicht und Adipositas sind mit zahlreichen lebensbedrohlichen Erkrankungen wie Diabetes, Krebs und kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert. Schon Hippocrates (456-375 v. Chr.) erkannte, dass ein unerwarteter Tod bei übergewichtigen Personen häufiger als bei schlanken Personen vorkommt. Adipositas ist außerdem ein wichtiger Risikofaktor für die Entstehung zahlreicher weiterer Erkrankungen wie z. B. des metabolischen Syndroms (Hyperlipidämie, Typ 2 Diabetes, Insulinresistenz (IR)), der nichtalkoholischen Fettleber, Autoimmunerkrankungen, Osteoarthritis, Gicht, Atemproblemen, Erkrankung der Gallenblase, Infertilität und Schlafapnoe^{1,2}. Sie impliziert damit eine massive Einschränkung für die Betroffenen durch den Verlust von Lebensqualität, die sich auch durch soziale Ausgrenzung, Bewegungseinschränkung, krankheitsbedingte Arbeitsunfähigkeit und damit einhergehende vorzeitige Verrentung bemerkbar macht. Jährlich entstehen alleine in Deutschland durch Adipositas direkte Kosten in Höhe von 29,39 Milliarden Euro und zusätzliche indirekte Kosten in Höhe von 33,65 Milliarden Euro³.

Die Ursachen für die Entstehung von Adipositas sind sehr vielfältig. Meist beruht sie auf der Interaktion mehrerer Faktoren. Dazu gehören Umwelteinflüsse, genetische Veranlagungen, spezielle Vorerkrankungen (z. B. Morbus Cushing), bestimmte Medikationen, psychische Erkrankungen, physische Inaktivität, energiereiche Ernährung oder einer Störung der circadianen Rhythmik⁴.

Adipositas ist eine chronische Erkrankung und gehört zu den hormonell beeinflussten Ernährungs- und Stoffwechselkrankheiten. Übersteigt die Kalorienaufnahme den Verbrauch deutlich, werden dadurch erhebliche Veränderungen des Fettgewebes induziert. Die hohe Verfügbarkeit von Energie führt zu einer vermehrten intrazellulären Einlagerung von Triglyzeriden, die sich letztendlich in Form von Hypertrophie (Vergrößerung) und Hyperplasie (Vermehrung) der Adipozyten im Fettgewebe manifestiert. Infolgedessen kommt es insgesamt zu einer deutlichen Volumenzunahme des Fettgewebes, die in eine krankhafte Fettleibigkeit übergehen kann. Der Body-Maß-Index (BMI) gilt als Richtlinie zur Einschätzung der Fettansammlung im Körper. Er berechnet sich aus der Division des Körpergewichts in Kilogramm [kg] und

der Körpergröße zum Quadrat [m²]. Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) gilt ein Mensch ab einem BMI von 25 als übergewichtig und ab einem BMI von 30 als adipös. Neben den morphologischen Veränderungen des Fettgewebes, wird bei einer Adipositas außerdem ein komplexes immunologisches Netzwerk aktiviert, welches die Entstehung der damit assoziierten Komplikationen begünstigt ^{5,6}.

1.2 Fettgewebe

1.2.1 Vorkommen und Funktion des Fettgewebes

Hoch entwickelte Organismen haben sich in der Evolution vor allem deswegen so erfolgreich durchgesetzt, weil sie in der Lage sind, Pathogeninfektionen zu bekämpfen und Energie für Phasen der Nahrungsknappeit zu speichern. Das System der Pathogenbekämpfung und der Energiespeicherung sind hochkonservierte Mechanismen und reichen von evolutionär älteren Tierarten wie dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* und der Fruchtfliege *Drosophila* bis hin zu Säugetieren (Mammalia). Evolutionsbiologisch betrachtet haben das Fettgewebe und das Immunsystem eine gemeinsame Ahnenstruktur. Der Fettkörper von *Drosophila* beispielsweise vereint die Funktionen des Fettgewebes, der Leber und des hämatopoetischen Systems der Mammalia ^{7,8}.

In Mammalia unterscheidet man grundsätzlich zwei Formen des Fettgewebes. Das weiße und das braune Fettgewebe. Letzteres ist dabei die weniger verbreitete Form innerhalb eines Organismus und reguliert besonders bei Neugeborenen die Körpertemperatur durch aktive Thermogenese. Das weiße Fettgewebe bildet sich im Gegensatz dazu an zahlreichen Stellen des Körpers und dient vor allem als Energiespeicher, indem es Triglyzeride in die Lipidvakuolen der Adipozyten einlagert. Die Triglyzeride werden bei Bedarf durch Lipasen gespalten. Die dabei freigesetzten Fettsäuren werden über den Blutkreislauf zu den Hepatozyten transportiert, um daraus im Verlauf der β -Oxidation das Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) zu gewinnen, das wiederum über den Citrat-Zyklus und die Atmungskette unter Energiegewinnung zu Kohlenstoffdioxid (CO₂) oxidiert wird.

Weißes Fett wird an zahlreichen Stellen des Organismus gebildet und anhand seiner Lokalisation definiert. So unterscheidet man beispielsweise zwischen dem epikardialen und dem perirenal Fett. Die zwei größten zusammenhängenden Fettgewebe bilden jedoch das subkutane (sc) und das viszerale (vis) Fett. Sie unterscheiden sich jedoch nicht nur anhand ihrer Lokalisation, sondern auch in ihren physiologischen Eigenschaften. Das sc Fettgewebe (auch: Unterhautfettgewebe) macht bis zu 80 % des Körperfetts aus, während das vis Fettgewebe (auch Bauchfett) im schlanken Zustand bei

Männern nur 10-20 % und bei Frauen 5-8 % ausmacht^{9,10}. Das humane vis Fett ist äquivalent zu dem murinen gonadalen (gon) Fett. Die Masse des vis Fetts korreliert mit der Entstehung von IR¹¹. Außerdem ist eine höhere lipolytische Aktivität in Adipozyten des vis Fettgewebes nachgewiesen, wodurch dieses die Plasmakonzentration von freien Fettsäuren stark beeinflusst.

Das sc Fettgewebe kann zusätzlich in zwei weitere Kompartimente unterteilt werden, die durch die *Scarpia fascia* voneinander isoliert werden und die sich auch in ihrer Funktion unterscheiden. So wurde z. B. in sc Fettgewebe, das oberhalb dieser Membranschicht lokalisiert ist, eine höhere Konzentration an infiltrierenden Makrophagen nachgewiesen als im Fettgewebe unterhalb der *Scarpia fascia*¹². Zudem wurde eine starke Homologie des tieferen sc Fettgewebes mit dem vis Fettgewebe nachgewiesen.

Das Fettgewebe besteht zum größten Teil aus Adipozyten. Neben diesen findet man aber auch noch eine Vielzahl diverser anderer Zelltypen wie z. B. Makrophagen, adipozytäre Vorläuferzellen, Fibroblasten, Granulozyten und viele mehr, die in ihrer Gesamtheit die zweite Komponente des Fettgewebes, die sogenannte stroma-vaskuläre Fraktion (SVF) bilden¹⁰.

1.2.2 Zelluläre Entwicklung von Fettzellen während der Adipogenese

Das Fettgewebe besteht zum größten Teil aus Adipozyten. Sie differenzieren sich aus adipozytären Vorläuferzellen, den sogenannten Prä-Adipozyten, deren Ursprung pluripotente mesenchymale Stammzellen sind¹³. Die Adipogenese ist ein komplexer Mechanismus, bei dem die Zelle zahlreiche Differenzierungsstadien durchläuft¹⁴ (Abbildung 1). Dabei kommt es nicht nur zu enormen phänotypischen Veränderungen. Auch die physiologischen Eigenschaften der Zellen verändern sich maßgebend (hinsichtlich Genexpressionsprofil, Teilungsaktivität etc.). Prä-Adipozyten haben eine fibroblastenartige Struktur mit langen zellulären Ausläufern und sind sehr teilungsaktiv. Durch Zell-Zellkontakte exprimieren diese Zellen im frühen Stadium Gene wie α_2 chain of collagen 6 (α_2 Col6), *Insulin-like growth-factor 1* (IGF-1) und *Lipoprotein Lipase* (LPL). Nach der klonalen Expansion der Zellen kommt es zu einem Wachstumsstopp, der notwendig für die Differenzierung zu reifen Adipozyten ist. Voraussetzung für die weitere Adipogenese ist außerdem die Expression bestimmter Wachstumsfaktoren wie *CCAAT-enhancer binding protein* (C/EBP) β , C/EB δ , *peroxisome proliferator activated receptor* (PPAR) γ , und *adipocyte determination- and differentiation-dependent factor-1* (ADD1)¹⁴. In Folge dieser bedeutenden Veränderungen auf der Transkriptionsebene beginnen die Zellen Lipidvakuolen auszubilden, formen einen sphärischen Zellkörper

1 Einleitung

und exprimieren späte Differenzierungsmarker wie C/EBP α , Glukose Transporter-4, Perilipin sowie lipogene und lipolytische Enzyme.

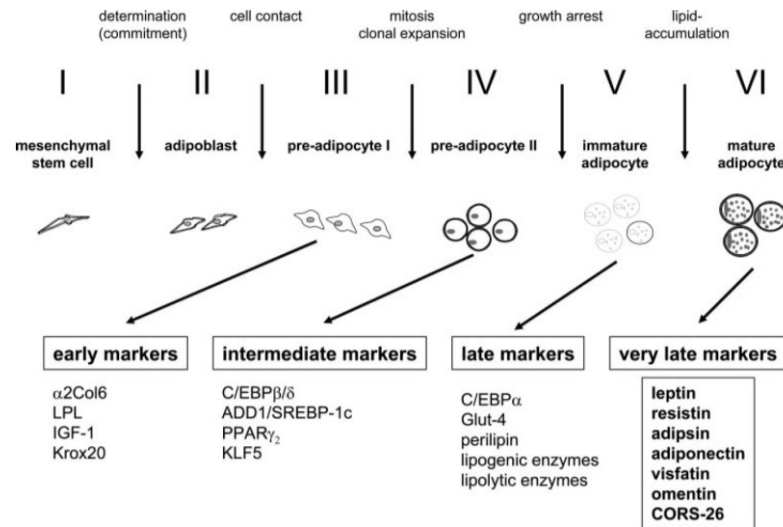


Abbildung 1: Entwicklungs- und Genexpressionsprofil während der adipozytären Differenzierung ¹⁴.

Im Verlauf der adipozytären Differenzierung nehmen die Lipidvakuolen immer mehr Platz in Anspruch und drängen dabei die anderen Zellorganellen und den Zellkern in die Peripherie. Molekularbiologisch zeichnen sich reife Adipozyten durch die Expression diverser später Differenzierungsmarker aus, über die Energie-, Glukose und Fettstoffwechsel reguliert werden ¹⁵. Dazu gehören unter anderem Leptin ¹⁶, Adiponektin ¹⁷, Resistin ¹⁸, Visfatin ^{19,20}, Omentin ²¹, Adipsin ²² und *collagenous repeat containing sequence of 26 kDa protein* (CORS-26) ²³. Diese vom Fettgewebe sezernierten Proteine werden auch als Adipokine bezeichnet. Über die Expression dieser Signalmoleküle können Adipozyten autokrin, parakrin und endokrin wirken. Zahlreiche Studien implizieren eine bedeutende Funktion der Adipokinregulation bei Adipositas, IR und Typ 2 Diabetes innerhalb des metabolischen Syndroms. In diesem Kontext scheinen vor allem die Adipokine Leptin, Adiponektin und Resistin eine bedeutende Funktion zu haben ^{24,25}.

1.2.3 Signalmoleküle der Fettzellen

Lange Zeit ist man davon ausgegangen, dass es sich bei dem Fettgewebe vorrangig um einen simplen Energiespeicher handelt. In den letzten Jahrzehnten erkannte man aber mehr und mehr die endokrine Funktion des Fettgewebes, da es in der Lage ist eine Vielzahl an bioaktiven Peptiden zu sezernieren. Durch die Sekretion verschiedener Chemokine, Hormone, freien Fettsäuren, Komplementfaktoren, Zytokinen und

1 Einleitung

Wachstumsfaktoren ist das Fettgewebe in der Lage, den Metabolismus, aber auch den Appetit, die Fruchtbarkeit, die Inflammation, das Tumorwachstum und viele weitere physiologische Prozesse zu beeinflussen^{14,26}. Dabei können Adipokine sowohl pro- als auch antiinflammatorisch wirken.

Charakteristisch für ein bestehendes metabolisches Syndrom und Adipositas ist eine Fehlregulation der Adipokinsekretion. Die Verschiebung des Adipokinprofils hat Auswirkungen auf die Insulinsensitivität und induziert weitere biochemische Veränderungen von Stoffwechselprodukten, wodurch letztendlich metabolische Fehlfunktionen gefördert werden. Damit ist das Adipokinsekretionsprofil von großer Bedeutung für die Pathogenese von Adipositas-assoziierten Krankheiten, die häufig mit einer Fehlregulation der Adipokinsekretion einhergehen. Adipokine stellen somit eine Verbindung zwischen Adipositas und den damit assoziierten Komorbiditäten her.

Eines der ersten beschriebenen Adipokine ist das Peptidhormon Leptin. Es stellt ein eindrucksvolles Exempel für die Bedeutung der regulatorischen Funktion von Adipokinen dar. Das 1994 entdeckte Serumprotein ist ein entscheidender Faktor im Energiemetabolismus²⁷. Die Leptinsekretion von Adipozyten ist nahezu proportional zu deren Triglyzeridspeicherung, wodurch es ein Signalmolekül für die Quantität der Energiespeicherung darstellt²⁸. Es beeinflusst die Nahrungsaufnahme und den Energieverbrauch und ist zudem auch an Prozessen wie Hämatopoese, Angiogenese, Wundheilung und Inflammation beteiligt²⁹. Mäuse, die aufgrund eines Genknockouts nicht mehr in der Lage sind, Leptin zu synthetisieren, sind adipös und entwickeln einen Diabetes mellitus Typ 2³⁰. Schon eine reduzierte Leptinkonzentration im Serum ist mit Adipositas assoziiert^{31,32}. Neben Leptin beeinflussen auch die beiden weiteren Adipokine Adiponektin und Resistin das metabolische Profil von Adipositaspatienten maßgebend. Sie gelten als antagonistische Proteine. Während Adiponektin eher als antiinflammatorisch verstanden wird, ist Resistin ein Peptid, das eher mit einer proinflammatorischen Wirkung assoziiert ist. Auch hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Insulinsensitivität ist der Einfluss der beiden Proteine recht gegensätzlich. Während Adiponektin sich eher positiv auf die Insulinsensitivität auswirkt, korreliert Resistin mit der Entstehung einer IR. Zahlreiche Studien implizieren eine wichtige Rolle der beiden Adipokine und ihrer Interaktion innerhalb der Entstehung von Adipositas und des metabolischen Syndroms^{33–39}. Deswegen wird im Folgenden insbesondere auf diese beiden Adipokine eingegangen.

1.2.3.1 Adiponektin

Als eines der bekanntesten Adipokine wurde Adiponektin erstmals 1995 als *adipocyte complement-related protein of 30 kDa* (Acrp30) beschrieben. Die Expression dieses Polypeptids ist spezifisch für humane sowie murine Adipozyten und wird während der adipozytären Differenzierung induziert^{40,41}. Über die Adiponektinsekretion kommuniziert das Fettgewebe mit zahlreichen Organen, die dessen Rezeptoren *Adiponectin receptor 1* (AdipoR1) und 2 (AdipoR2) exprimieren. So wirkt Adiponektin beispielsweise regulatorisch auf den Hypothalamus und kann so die Nahrungsaufnahme beeinflussen⁴². In diversen Krankheitsbildern hat die Adiponektinexpression im Wesentlichen eine antiinflammatorische Funktion. Es inhibiert beispielsweise die Apoptose von Podozyten und schützt damit die Nierenfunktion bei Diabetes⁴³. In chronischen Entzündungskrankheiten wie Multipler Sklerose und Psoriasis ist die Serumkonzentration von Adiponektin erniedrigt, was ebenfalls eine basal entzündungshemmende Funktion von Adiponektin impliziert^{44,45}.

Zahlreiche Gewebe exprimieren Adiponektinrezeptoren und können deshalb durch das Adipokin stimuliert werden. Dazu gehören unter anderem das Leber-, Herz- und Muskelgewebe. Adiponektin ist damit ein wichtiges Element im *Crosstalk* zwischen Fettgewebe und anderen Organen. Auch über diverse andere Mechanismen beeinflusst das Peptidhormon die Energie-Homöostase im Organismus und reguliert dafür den Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel. Adiponektin wird Insulin-abhängig sezerniert und erhöht die Insulinsensitivität von Adipozyten^{40,46,47}. *In vivo* inhibiert es die Glukoneogenese in Hepatozyten und steigert den Energieverbrauch in Muskelzellen⁴⁶. In Leber- und Muskelzellen stimuliert es die Oxidation von Fettsäuren^{41,48}. Eine Dysregulation von Adiponektin hat großen Einfluss auf die Entstehung des metabolischen Syndroms³⁶. Die Konzentration von zirkulierendem Adiponektin korreliert sowohl bei Mäusen als auch bei Menschen negativ mit Adipositas und Typ II Diabetes^{37,41,48,49}. In dem Kontext von Diabetes und IR hat Adiponektin eine bedeutende regulatorische Funktion. So konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass das Polypeptid die Glukoseaufnahme von Skelettmuskelzellen induzieren kann, indem es die Translokation des Glukosetransporters 4 (GLUT4) reguliert⁵⁰.

1.2.3.2 Resistin

In den Jahren 2000-2001 wurde Resistin nahezu gleichzeitig von drei verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben, weshalb das Protein heute unter drei verschiedenen

Namen bekannt ist, von denen sich allerdings die Bezeichnung als „Resistin“ (für: resistent gegen Insulin) weitgehend durchgesetzt hat.

Resistin wurde von Holcomb *et al.*⁵¹ als Mitglied der Proteinfamilie *found in inflammatory zone* (FIZZ) beschrieben. Sie benannten das spezifisch vom weißen Fettgewebe exprimierte Protein FIZZ3, da es hohe Sequenzhomologien zu FIZZ1 aufweist. Das die Proteinfamilie begründende FIZZ1 wurde erstmals im Rahmen einer allergischen Lungenentzündung beschrieben, wo es von bronchialen und alveolaren Epithelzellen vermehrt exprimiert wird⁵¹.

Kim *et al.*⁵² definierten Resistin 2001 als *Adipose Tissue-Specific Secretory Factor* (ADSF). Sie beschrieben, dass das Protein ausschließlich vom Fettgewebe exprimiert wird und während der adipozytären Differenzierung von 3T3-L1 Adipozyten induziert wird, gleichzeitig aber auch diese inhibiert. Diese negative Rückkopplung deutet damit auf eine regulatorische Funktion von Resistin innerhalb der Homöostase des Fettgewebes hin. Die Insulin-abhängige Induktion von Resistin impliziert außerdem einen Zusammenhang dieser beiden Proteine^{24,25}. Stepan *et al.*⁵³ charakterisierten Resistin zum ersten Mal als verknüpfendes Element zwischen Adipositas und Diabetes. Murines Resistin ist sowohl bei einer genetisch- als auch bei einer Diät-induzierten Adipositas im Serum erhöht^{53,54}. Die intraperitoneale (i.p.) Injektion von Resistin beeinträchtigte zudem die Glukosetoleranz in C57Bl/6J Mäusen und bei 3T3-L1 Adipozyten induzierte die Inhibition von Resistin die Insulin-abhängige Glukoseaufnahme. Auch im humanen System wurde eine positive Korrelation zwischen der Resistin-Expression und dem Körpergewicht beschrieben^{38,39}.

Neben den IR-fördernden Eigenschaften von Resistin induziert es NF- κ B-vermittelt die Expression proinflammatorischer Zytokine, wie *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), Tumornekrosefaktor α (TNF α) und Interleukin 6 (IL-6)^{55–57} und wird deshalb überwiegend als entzündungsförderndes Zytokin verstanden.

1.2.4 Energie-Aufnahme und -Speicherung bei Adipozyten

Eine wesentliche Aufgabe von Adipozyten ist die Speicherung von Energie. Dafür synthetisieren sie aus Glukose Fettsäuren. Glukose enthält zahlreiche Hydroxygruppen, wodurch es hydrophil ist und die Lipiddoppelschicht einer Zellmembran im Allgemeinen nur sehr schwer passieren kann. Aus diesem Grund besitzen Zellen transmembrane Glukosetransporter (GLUT), die zirkulierende Glukose in die Zellen transportieren. Bislang wurden 14 verschiedene humane Glukosetransporter beschrieben^{58,59}. Sie unterscheiden sich vor allem in ihren biochemischen Eigenschaften und in ihrer

1 Einleitung

Lokalisation im Organismus. So wird z. B. GLUT2 in der Leber, dem Pankreas und dem Dünndarm exprimiert, während der GLUT3 überwiegend im Gehirn und in Neuronen exprimiert wird. GLUT1 hat gegenüber GLUT2 eine deutlich niedrigere Michaeliskonstante (K_m) ($K_m \sim 1 \text{ mM}$ vs. $K_m \sim 17 \text{ mM}$)⁵⁸. Dadurch ist schon eine vergleichsweise geringe Konzentration ausreichend um Glukose *via* GLUT1 in die Neuronen einzuschleusen. Adipozyten katalysieren den Glukosetransport in die Zellen über die Expression von GLUT1 und GLUT4⁶⁰.

GLUT1 ist ein Insulin-unabhängiger Glukosetransporter, der ubiquitär exprimiert wird und eine hohe Glukoseaffinität besitzt. Bereits niedrige Glukosekonzentrationen sind ausreichend, damit Glukose effizient an den Transporter bindet ($K_m \sim 1 \text{ mM}$) und über eine Konformationsänderung des Transporters in die Zelle geschleust wird, wo es innerhalb der *de novo* Lipogense für die Biosynthese von Triacylglycerolen verwendet und letztendlich in den Lipidvakuolen der Adipozyten gespeichert wird (Abbildung 2).

Anders als GLUT1 wird GLUT4 ausschließlich auf der Oberfläche von Muskel- und Fettzellen exprimiert, wenn diese vorher durch Insulin aktiviert wurden. Hohe Glukosekonzentrationen im Blut induzieren die Ausschüttung von Insulin, das an die α -Untereinheit des Insulinrezeptors der Adipozyten bindet und eine Autophosphorylierung der β -Untereinheit induziert. Die dadurch aktivierte Signalkaskade resultiert in der Translokation der intrazellulären GLUT4 Vesikel an die Zellmembran. Durch die Fusion der Vesikel mit der Zellmembran gelangt GLUT4 an die Zelloberfläche, wo es, gemäß einem analogen Mechanismus wie für GLUT1 beschrieben, den Glukosetransport katalysiert (Abbildung 2).

1 Einleitung

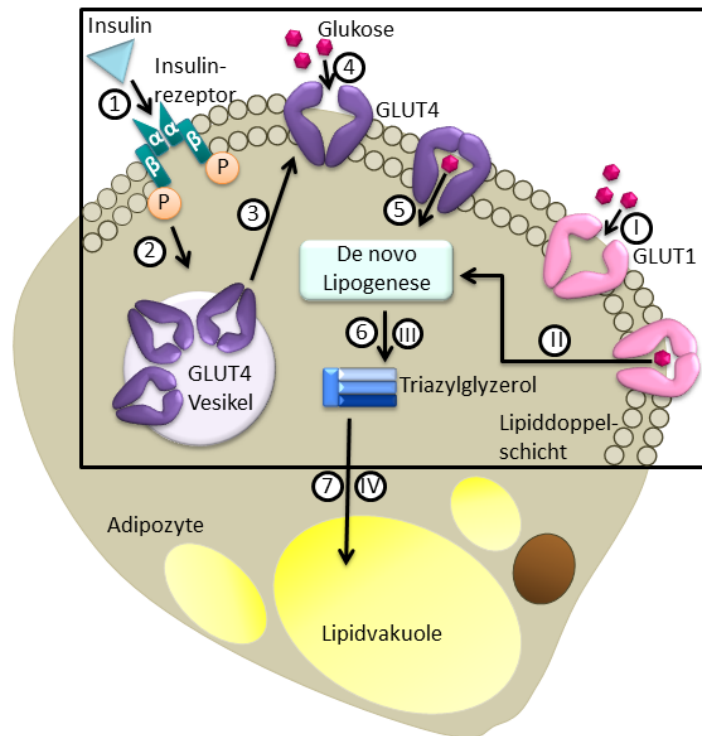


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Glukoseaufnahme in Adipozyten. Die Aufnahme von Glukose in Adipozyten wird durch den Insulin-unabhängigen Glukosetransporter (GLUT)1 (I-IV) und den Insulin-abhängigen GLUT4 (1-7) katalysiert. Die Bindung von Insulin an seinen membranständigen Rezeptor (1) induziert die Autophosphorylierung der β-Untereinheit des Insulinrezeptors, wodurch eine Signalkaskade aktiviert wird (2), die letztendlich in der Translokation von intrazellulären GLUT4 Vesikeln an die Zellmembran resultiert (3). Durch die Bindung zirkulierender Glukose an die membranständigen Glukosetransporter wird eine Konformationsänderung des Proteins induziert (I und 4). Glukose wird in die Zelle transportiert (II und 5), wo es durch die *de novo* Lipogenese in Triacylglycerole umgewandelt wird (III und 6), die in den Lipidvakuolen der Adipozyte gespeichert werden. P= Phosphat.

Wenn im Rahmen einer Autoimmunreaktion die Insulinproduktion inhibiert wird (Typ-1 Diabetes) oder die Zellen eine IR ausbilden (Typ-2 Diabetes), kann zirkulierende Glukose nur noch über den GLUT1 in die Zellen transportiert werden. Da GLUT1 verglichen mit GLUT4 aber in einem deutlich geringeren Ausmaß exprimiert wird⁶¹⁻⁶³, ist der Transport *via* GLUT1 nicht ausreichend, um die zirkulierende Glukose aus dem Blut in die Zellen zu befördern. So kann vor allem postprandial ein langanhaltend hoher Blutzuckerspiegel entstehen, wodurch wiederum Glukosetransporter mit einer niedrigen Michaeliskonstante, wie z. B. der überwiegend von Hepatozyten exprimierte GLUT2, aktiviert werden. Dies begünstigt letztendlich die Entstehung von Adipositas- und Diabetes-assoziierten Komorbiditäten, wie in diesem Beispiel der nichtalkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD).

Aktuelle Studien weisen darauf hin, dass die Aktivierung von Toll-like Rezeptoren (TLR) maßgeblich zur proinflammatorischen Transformation bei Adipositas beitragen und somit letztendlich die Insulin-Signalkaskade und den Glukosetransport inhibieren könnte^{1,64}.

1.2.5 Immunmodulatorische Eigenschaften von Adipozyten

Aktuelle Studien konnten nachweisen, dass das Fettgewebe nicht nur endokrinologisch, sondern auch immunmodulatorisch wirksam ist⁴. Dabei rückt die Funktion der Adipozyten immer mehr in den Fokus. So konnte z. B. nachgewiesen werden, dass Adipozyten selbst in der Lage sind, immunmodulatorische Proteine zu exprimieren. 2013 wurde von Deng *et al.* die Expression des MHC Klasse II Moleküls auf Adipozyten nachgewiesen. Es handelt sich dabei um ein Oberflächenprotein, das von Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert wird, um *Cluster of Differentiation* (CD) 4⁺ T-Zellen zu stimulieren⁶⁵. Interessanterweise ist die Expression von Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) Klasse II auf primären humanen sowie murinen Adipozyten bei Adipositas induziert. Schon nach einer zweiwöchigen Hoch-Fett-Diät kann ein Anstieg der MHC Klasse II Expression in den murinen Adipozyten detektiert werden⁶⁵. Adipozyten scheinen jedoch nicht nur andere Immunzellen beeinflussen zu können. Über die Expression von TLRs sind sie sogar in der Lage, aktiv gegen eine Pathogeninfektion vorzugehen.

Eine der ersten Arbeiten über die Funktion von TLRs in Adipozyten wurde 2010 veröffentlicht. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass eine Stimulation mit diversen TLR-Liganden das Sekretionsprofil von primären humanen Adipozyten verändert⁶⁶. Auch die Expression einiger TLRs auf Adipozyten sowie deren Funktionalität wurde in den letzten Jahren beschrieben. So gelang es beispielsweise Yu *et al.*, die Expression von adipozytärem TLR3 nachzuweisen, der außerdem durch seinen Liganden *polyinosinic-polycytidylic acid* (poly(I:C)) stimuliert werden konnte⁶⁷. Einer anderen Arbeitsgruppe gelang es nachzuweisen, dass dermale Adipozyten bei einer bakteriellen Infektion mit *Staphylococcus aureus* eine TLR-vermittelte Immunantwort gegen die Pathogene einleiten, indem sie die Zellproliferation induzieren und das antimikrobielle Peptid Cathelicidin sezernieren⁶⁸. Aktuelle Studien implizieren, dass die Aktivierung von TLRs in einigen Geweben zur Entstehung der Adipositas-assoziierten Insulin-Resistenz beitragen¹.

1.3 Aufbau und Funktion von Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren gehören zu den *Pattern Recognition Receptors* (PRR) der Mammalia, die Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) aus Mikroorganismen oder Gefahren-assoziierte molekulare Muster (DAMPs) aus beschädigtem Gewebe erkennen. Im Falle einer Pathogeninfektion reagiert das angeborene Immunsystem mit

1 Einleitung

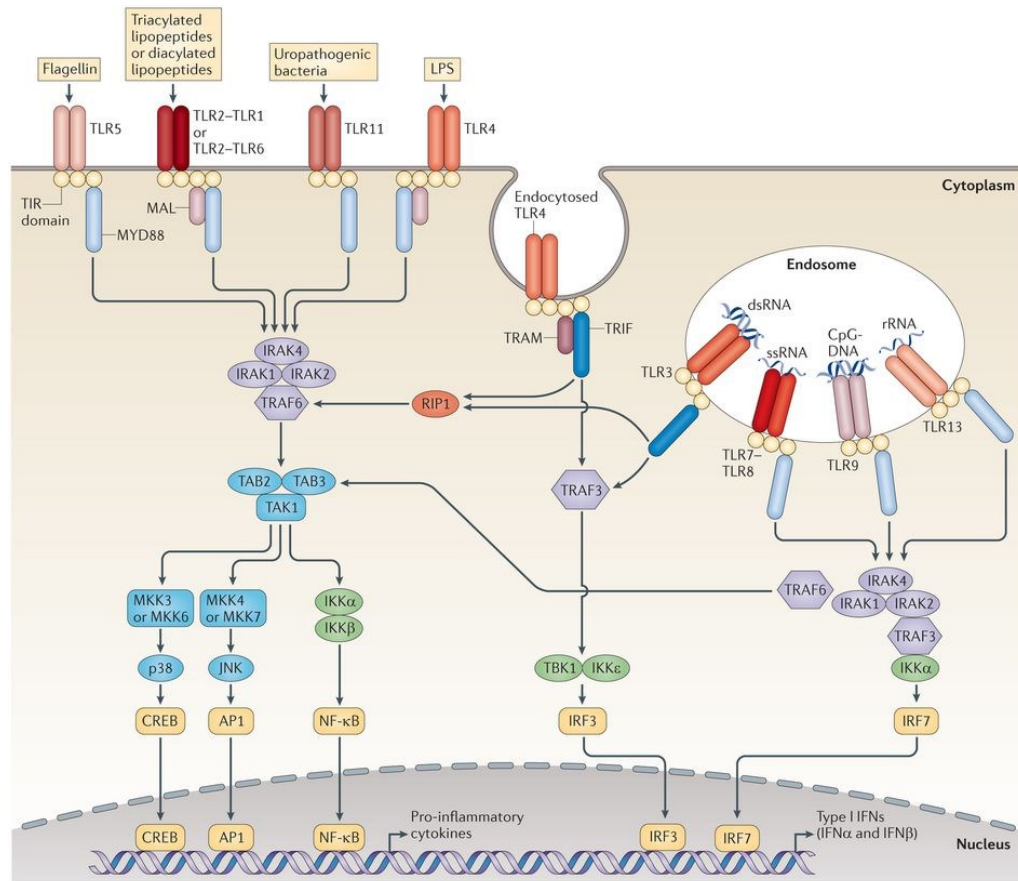
einer rapiden inflammatorischen Immunantwort, um das Wachstum und die Verbreitung des Pathogens zu inhibieren. In Vertebraten folgt auf diesen Mechanismus eine adaptive Immunantwort durch die Bildung hoch spezifischer B- und T-Zellen. Die Bindungsstelle dieser Zellen wird dabei durch somatische Rekombination und Mutation an die individuellen Strukturen des jeweiligen Pathogens angepasst und induziert nach der Ligandenbindung eine spezifische Immunantwort zur Pathogenbekämpfung⁶⁹. Im Gegensatz dazu sind die Immunrezeptoren des angeborenen Immunsystems schon in der Keimbahn festgelegt und erkennen determinierte molekulare Strukturen von Pathogenen⁷⁰⁻⁷².

Toll-like Rezeptoren sind aufgrund ihrer starken Sequenzhomologie zur intrazellulären Domäne des Toll Rezeptors in *Drosophila* nach diesem benannt. Das Toll Protein wurde ursprünglich durch seine Funktion in der Entwicklung der dorsoventralen Polarität in *Drosophila*-Embryonen entdeckt⁷³. Wenig später wurde auch seine immunregulatorische Funktion bei der Abwehr von Pilzbefall bei adulten Fruchtfliegen nachgewiesen⁷⁴. Die Strukturen von TLRs sind hoch konserviert und finden sich sogar in Pflanzen wieder⁷⁵. Bisher wurden insgesamt 10 humane und 12 murine TLRs beschrieben^{76,77}. Die Toll-like Rezeptoren 1, 2, 4, 5 und 6 werden auf der Zelloberfläche exprimiert, während TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 im Endosomen der Zelle lokalisiert sind. Sie bestehen aus einer N-terminalen Ektodomäne zur Ligandenbindung, die über eine Transmembrandomäne mit der zytoplasmatischen C-terminalen Signaltransduktionsdomäne Toll-Interleukin (IL)-1 Rezeptor (TIR) Domäne verbunden ist⁷⁸⁻⁸⁰. Bindet ein Pathogen an die Ektodomäne des TLR, kommt es zu Dimerisierung der Rezeptoren. So bilden z. B. die membranständigen TLR1 und TLR2 ein Heterodimer, ausgelöst durch die Bindung triacylierter Lipopeptide wie Pam3CSK, die an der Aminogruppe des Cysteins eine weitere Palmitinsäure tragen. TLR2 und TLR6 bilden ein Heterodimer durch die Bindung von diacylierten Lipopeptiden, wie dem Makrophagen-aktivierenden Lipopeptid-2 (MALP-2)⁸¹⁻⁸⁵. TLR5 erkennt eine Komponente von bakteriellen Flagellen, das Flagellin, woraufhin es homodimerisiert. TLR10 ist ein Rezeptor, der bislang nur auf humanen Zellen nachgewiesen werden konnte. In der Natur wird er nicht von murinen Zellen exprimiert. Von TLR10 sind derzeit weder der Ligand noch die genaue Funktion bekannt⁸⁶. Seine Expression scheint jedoch das Sekretionsprofil nach Stimulation und Aktivierung anderer TLR zu beeinflussen⁸⁷⁻⁸⁹. TLR11 erkennt eine Komponente aus uropathogenen Bakterien⁹⁰ und in Kombination mit TLR12 bindet es das Protein Profilin aus *Toxoplasma Gondii*. Murines TLR13 bindet bakterielle ribosomale RNA⁹¹⁻⁹³.

TLR4 gehört zu den TLRs, die am besten charakterisiert sind. Er ist sowohl auf der Plasmamembran als auch in Endosomen lokalisiert und bindet bakterielles Lipopolysaccharid (LPS)⁹⁴. Virale und bakterielle DNA-Moleküle gelangen über die

1 Einleitung

Endozytose in die Wirtszellen, wo sie von den endosomal lokalisierten Rezeptoren erkannt werden. Dabei wird TLR3 durch doppelsträngige RNA^{95,96}, TLR7/8 durch einzelsträngige RNA^{97–100} und TLR9 durch DNA-Fragmente mit integrierten unmethylierten Cytidin-Phosphat-Guanosin (CpG) Sequenzen aktiviert^{101–104}.



Nature Reviews | Immunology

Abbildung 3: Signalkaskade der Toll-like Rezeptoren (TLR) in Mammalia¹⁰⁵.

Die Aktivierung von PRRs durch eine Ligandenbindung initiiert die Dimerisierung der entsprechenden TLRs, wodurch die beiden zytoplasmatischen TIR-Domänen miteinander in Kontakt kommen und die TLR-spezifischen Adapterproteine (*myeloid differentiation primary-response protein 88* (MYD88) und *MYD88-adaptor-like protein* (MAL) bzw. *TIR domain-containing adaptor protein inducing IFNβ* (TRIF) und *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM)) rekrutiert werden. Dadurch wird eine zytoplasmatische Signalkaskade ausgelöst, bei der IL-1 Rezeptor-assoziierte Kinasen (IRAKs) und deren Adaptermolekülen (TNF Rezeptor-assoziierten Faktoren (TRAFs)) phosphoryliert werden, was wiederum die Aktivierung von Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK), JUN N-terminalen Kinasen (JNK) und p38 induziert. Auf diesem Weg werden letztendlich die Transkriptionsfaktoren Nuklear Factor-κB (NF-κB), die

Interferon-regulatorischen Faktoren (IRF), *cyclic AMP-responsive element-binding protein* (CREB) sowie das Aktivator Protein 1 (AP1) aktiviert, die wiederum die Expression von Zytokinen und Chemokinen regulieren ¹⁰⁵.

Bei Adipositas und Übergewicht ist die Expression der TLRs im Fettgewebe induziert ²⁶. So kann z. B. in sc Fettgewebe von Adipositaspatienten signifikant mehr TLR2 und TLR4 nachgewiesen werden als im Gewebe von gesunden normalgewichtigen Personen ¹⁰⁶. Das Fettgewebe ist ein endokrines Organ, das innerhalb eines Organismus großflächig und vielschichtig verteilt ist. Aus diesem Grund haben diverse Studien dessen immunmodulatorische Eigenschaften analysiert und sich mit der Expression von TLRs auf Adipozyten befasst. In Tabelle 1 sind die TLRs zusammengefasst, deren Proteinexpression bereits auf Adipozyten nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 1: Übersicht der adipozytär exprimierten TLR-Proteine, sowie deren beschriebene Funktion nach Ligandenbindung ^{86,107,116,108–115}.

Auf Adipozyten beschriebene TLR-Proteinexpression	Funktion
TLR1/2	Aktiviert NF-κB Signalweg und induziert die TNFα -, MCP-1 sowie IL-6 Sekretion
TLR2 bzw. TLR2/6	Induziert die IL-6 und die TNFα –Sekretion und reduziert die Lipin-1 Genexpression
TLR3	Induziert die IL-6, die IL-8 und die MCP-1 Genexpression
TLR4	Induziert die IL-8 Genexpression, sowie die Sekretion von IL-6, MCP-1, TNFα und Glycerol
TLR5	Induziert die Glycerol Sekretion, sowie die Genexpression von <i>adipose triglyceride lipase</i> (ATGL), <i>fatty acid binding protein 3</i> (FABP3), Monoglycerol-Lipase (MGL), während die Perilipin-1 (PLIN1) Genexpression reduziert wird
TLR8	Erkennt üblicherweise Einzelsträngige und kurze doppelsträngige RNA. Funktionalität in Adipozyten nicht nachgewiesen
TLR10	Ligand und Funktion weder in Adipozyten noch in anderen Zellen bekannt

Hinsichtlich der inflammatorischen Transformation des Fettgewebes und der Adipositas-assoziierten metabolischen Dysfunktionen rückt besonders TLR9 immer mehr in den Fokus der Wissenschaft, weshalb im Folgenden dessen metabolische Bedeutung genauer beschrieben wird ^{117–119}.

1.3.1 TLR9 und seine Bedeutung bei Adipositas

Die Funktion des Immunrezeptors TLR9 wurde ursprünglich auf klassischen Immunzellen wie den B-Lymphozyten, Makrophagen und plasmazytoiden Dendritischen Zellen (pDC) charakterisiert ^{120,121}. Aber auch auf Neutrophilen und Monozyten konnte die Expression des Rezeptors nachgewiesen werden ^{122,123}. Aktuelle Studien beschreiben außerdem die Expression von TLR9 auf nicht primär immunologisch aktiven Zellen, wie den intestinalen Epithelzellen ^{124,125}. Im Jahr 2000 wurde das Protein TLR9 zum ersten Mal als Rezeptor beschrieben, der CpG-Einheiten in DNA-Sequenzen erkennt ¹⁰¹. Typischerweise findet man vor allem in bakterieller DNA CpG-haltige Sequenzen. In Vertebraten ist diese Sequenzabfolge eher selten und liegt wenn dann häufig in methyliertem Zustand vor, wodurch sie für den Rezeptor nicht zugänglich ist ¹⁰⁵. Schon 1998 konnte in der Arbeit von Häcker *et al.* bewiesen werden, dass TLR9 in murinen Makrophagen endosomal lokalisiert ist ¹²¹. TLR9-Liganden werden *via* Endozytose von der Zelle aufgenommen, woraufhin TLR9 vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) zu Endosomen/Lysosomen transloziert, wo es schließlich seinen Liganden binden kann ¹²⁶. In den letzten Jahren haben zahlreiche Studien TLR9 in Verbindung mit diversen Krankheitsbildern gebracht, die häufig mit einer Adipositas assoziiert sind, darunter chronische Colitis, systemischer Lupus erythematosus (SLE), Arteriosklerose und vor allem Insulin-Resistenz und damit auch Diabetes ^{118,127–129}. Interessanterweise ist die Expression von TLR9 und TLR8 in Mäusen, bei denen durch eine Hochfettdiät die Ausbildung von Adipositas induziert wurde, stark erhöht. Vor allem im gon Fettgewebe ist die Expression dieser beiden Rezeptoren verglichen mit anderen TLRs deutlich induziert ²⁶. Das murine Adipositasmodell gilt als etabliertes Modell der humanen Adipositas und impliziert damit eine bedeutende Funktion von TLR9, während der Adipositas-assoziierten proinflammatorischen Transformation des vis Fettgewebes. Außerdem ist TLR9 möglicherweise ein wichtiger regulatorischer Faktor für die Interaktion von Metabolismus und dem innaten Immunsystem. Bemerkenswerterweise konnte außerdem nachgewiesen werden, dass TLR9-defiziente Mäuse bei einer Hochfettdiät signifikant stärker an Gewicht zunehmen als Wildtyp- (wt) Mäuse. Gleichzeitig infiltrieren bei Letzteren deutlich mehr (proinflammatorische) M1 Makrophagen in das gon Fettgewebe, während in den TLR9-defizienten Mäusen deutlich höhere Spiegel proinflammatorischer Zytokine im Serum nachgewiesen werden können ¹¹⁷. Interessanterweise induziert Adipositas bei Mensch und Maus das Absterben von Adipozyten, wobei u. a. DNA in den extrazellulären Raum freigesetzt wird. Eine fettreiche Ernährung induziert schon innerhalb kürzester Zeit erhöhte Konzentrationen von zellfreier DNA (cfDNA) im Plasma ¹¹⁸. Diese cfDNA ist in der Lage,

proinflammatorische Makrophagen in Wildtyp-Mäusen, nicht aber in TLR9-defizienten Mäusen zu aktivieren. Die signifikante Zunahme des gon Fettgewebes in TLR9-defizienten Tieren gegenüber den Kontrollmäusen unter einer Hochfettdiät konnten von Nishimoto *et al.* allerdings nicht bestätigt werden. Außerdem wurden deutlich geringere Mengen proinflammatorischer Makrophagen und entzündlicher Infiltrate im gon Fettgewebe und eine bessere Insulinsensitivität in TLR9-defizienten Mäusen gegenüber den Wildtyp-Mäusen detektiert ¹¹⁸.

1.3.2 Synthetische und physiologische TLR9 Liganden

Hypomethylierte CpG-haltige DNA Sequenzen gelten als klassische TLR9-Liganden ¹⁰¹. Sie liegen vor allem in bakterieller DNA und vielen viralen Nukleinsäuren vor, während sie in Vertebraten eher selten und wenn dann methyliert sind ¹³⁰. So induziert beispielsweise DNA aus *Escherchia coli* (*E. coli*) die Proliferation von humanen B-Zellen und DC, wohingegen zuvor mit DNase degradierte DNA keinen vergleichbaren Effekt auslöst ¹³¹. Kommerziell erhältlich sind entsprechende synthetische DNA-Moleküle, sogenannte CpG- Oligodesoxynukleotide (ODN), bei deren Synthese eine definierte Sequenzabfolge beachtet wird. Sie haben damit eine determinierte Struktur sowie Basenfolge. Die Behandlung von humanen B-Zellen und DC mit synthetischen CpG-ODNs, induziert wie auch die Behandlung mit bakterieller DNA, eine Proliferation der beiden Zelltypen. Ausschlaggebend ist dafür, dass die DNA nicht-methylierte CpG-Einheiten enthält. Bei Stimulation mit Kontroll- (Ktrl.) ODNs, bei denen anstelle der CpG- eine Guanosin-Phosphat-Cytidin (GpC) -Sequenz eingebaut ist, sowie DNA Sequenzen, bei denen die CpG-Einheiten methyliert vorliegen, ist der stimulatorische Effekt auf die B-Zellen und DC deutlich abgeschwächt ¹³¹. Gleiches gilt auch für die IL-8 Produktion. Sie ist ausschließlich bei Stimulation mit *E. coli* DNA und CpG-DNA induziert ¹³¹. In *Human Embryonic Kidney* (HEK) Zellen wird ebenfalls eine CpG-abhängige Aktivierung von NFκB durch die Stimulation mit einem CpG-ODNs induziert. Methylierte CpG-ODNs sowie GpC-ODNs lösen keinen vergleichbaren Effekt aus ¹³¹.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen bakterieller DNA und den synthetischen CpG-ODNs ist das DNA-Rückgrat. Während bakterielle DNA, so wie auch eukaryotische DNA, ein natürlich vorkommendes Phosphodiester (PO₄)-Rückgrat hat, besteht das Rückgrat von CpG-ODNs teilweise oder komplett aus Phosphorothioat (PO₃S)-Verbindungen. Letztere findet man in der Natur nur bei ausgewählten Bakterien und Archaea ^{132–134}. Phosphorothioat Verbindungen sind auch bekannt als S-Oligos, da

1 Einleitung

im Phosphat, über das die Nukleotide miteinander verbunden sind, ein Sauerstoffatom durch Schwefel substituiert ist (Abbildung 4). Diese schwefelhaltigen Verbindungen sind dabei weniger anfällig für extra- und intrazelluläre Nukleasen^{135,136}.

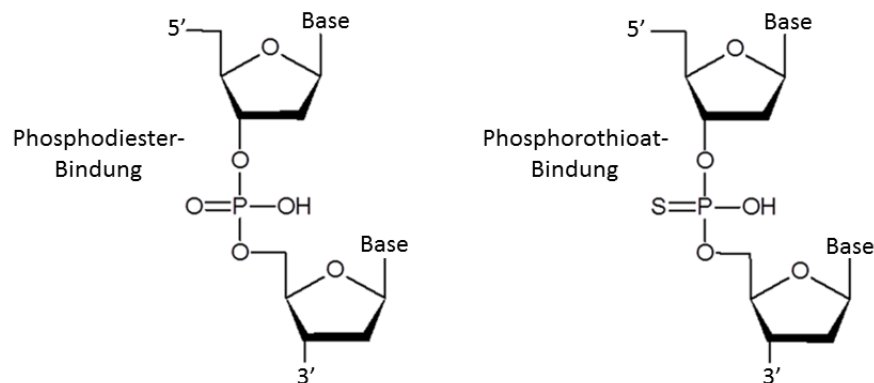


Abbildung 4: Schemadarstellung einer Phosphodiester- und einer Phosphorothioat-Bindung zwischen zwei Nukleotiden¹³⁵. Die Zuckerreste in natürlich vorkommenden DNA-Oligonukleotiden sind über eine gewöhnliche Phosphat-Gruppe (PO_4) miteinander verbunden. Bei einer Phosphorothioat-Bindung ist im Phosphat ein Sauerstoffatom durch Schwefel ersetzt (PO_3S).

Durch die individuelle DNA-Rückgrat- und Sequenzzusammensetzung haben jeweilige CpG-ODNs unterschiedliche immunstimulatorische Eigenschaften^{130,137–140}. Anhand ihrer Struktur unterscheidet man CpG-ODNs der drei Klassen A, B und C.

ODNs mit einem PO_4 -Rückgrat sind in der Lage, insbesondere natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und pDC zu aktivieren. Sie induzieren eine starke IFN- α Expression^{130,140,141}. Ihre stimulatorischen Fähigkeiten auf B-Zellen sind hingegen eingeschränkt¹³⁰. Sie werden als Klasse A CpG-ODNs bezeichnet und tragen eine zentrale Palindromsequenz, in dem eine CpG-Einheit integriert ist. Durch das Sequenzpalindrom wird das ODN an diesem kurzen Sequenzabschnitt doppelsträngig. Klasse A CpG-ODNs beinhalten außerdem am 3' Ende ein PS-modifizierte poly-Guanosin Sequenz.

Tabelle 2: Übersicht der Charakteristika der verschiedenen CpG-ODN Klassen. Interleukin 6 (IL-6); Interferon α (IFN- α); plasmazytoide Dendritische Zellen (pDc); Phosphodiesterbindung (PO_4); Phosphorothioatebindung (PO_3S).

Klasse	DNA-Rückgrat	B-Zellen	pDC	IFN- α	IL-6
A	$\text{PO}_3\text{S}-\text{PO}_4$	+	++++	++++	+
B	PO_3S	++++	++++	+	+++
C	PO_3S	+++	+++	+++	++

Quelle: invivogen.com; Stand August 2019

1 Einleitung

Durch ein vollständiges PO_3S -Rückgrat sind die linearen Klasse B CpG-ODNs wesentlich stabiler als Klasse A CpG-ODNs. Sie aktivieren B-Zellen besonders stark und induzieren deren Zellproliferation sowie IL-6 Sekretion, während die IFN- α Sekretion durch sie nicht reguliert wird. In pDCs induzieren sie die Expression von TNF α und IL-6^{138,142–145}. Klasse B CpG-ODNs enthalten eine oder mehrere CpG-Einheiten, aber keine poly-Guanosin Sequenz und auch kein Palindrom¹⁴⁶.

Die jüngste Klasse bilden die Klasse C CpG-ODNs. Sie sind eine Kombination der ersten beiden Klassen. Sie haben sowohl ein vollständiges PS-Rückgrat als auch ein integriertes Sequenzpalindrom. Charakteristisch für Klasse C CpG-ODNs sind mindestens eine TCG Sequenz nahe dem 5' Ende sowie ein Sequenzpalindrom, das optimalerweise aus mindestens 12 Basen besteht, die zwei oder mehr CpG-Einheiten beinhalten. Klasse C CpG-ODNs aktivieren sehr effizient B-Zellen und pDCs. Bei letzteren induzieren sie besonders die IFN- α Expression¹⁴⁷.

Die Bindung des TLR9-Liganden an seinen Rezeptor kann inhibiert werden, indem die endosomale Reifung der Zellen durch z. B. Bafilomycin A und Chloroquin inhibiert wird^{121,148}. Diese Daten implizierten schon vor dem Immunfluoreszenznachweis von Latz *et al.*¹²⁶, dass die TLR9-Liganden *via* Endozytose in das Endosom der Zellen gelangen, wo sie letztendlich an ihren Rezeptor binden.

Es gibt Hinweise darauf, dass pathogene Substanzen aus unterschiedlichen Quellen TLR9 aktivieren können¹⁴⁹. DNA kann durch Apoptose, Nekrose, Phagozytose, Onkose und aktive Sekretion freigesetzt werden¹⁵⁰. Es wurde nachgewiesen, dass freie DNA vermehrt im Serum von Patienten, die unter *SLE oder Krebs* leiden, detektiert werden kann^{151,152}. Auch bei Patienten, die einen Herzinfarkt erlitten, ist die Konzentration freier DNA im Plasma erhöht¹⁵³. Bakterielle DNA kann außerdem aus dem gastrointestinalen Trakt das umliegende Gewebe infiltrieren¹²⁷ (Abbildung 6). Im Rahmen einer Inflammation des vis Fettgewebes unter Hochfettdiät ist außerdem die intestinale Permeabilität erhöht¹⁵⁴. Über die intestinale Schleimhaut (Mukosa) können Bakterien in das Blut und in das umliegende Fettgewebe gelangen¹⁵⁵. Bei Übergewicht und Adipositas kommt es zudem vermehrt zur Degeneration von Adipozyten. In humanen und murinen Fettgeweben kann bei einer vorliegenden Adipositas vermehrt die Bildung sogenannter *Crown-like structures* beobachtet werden (Abbildung 6).

1 Einleitung

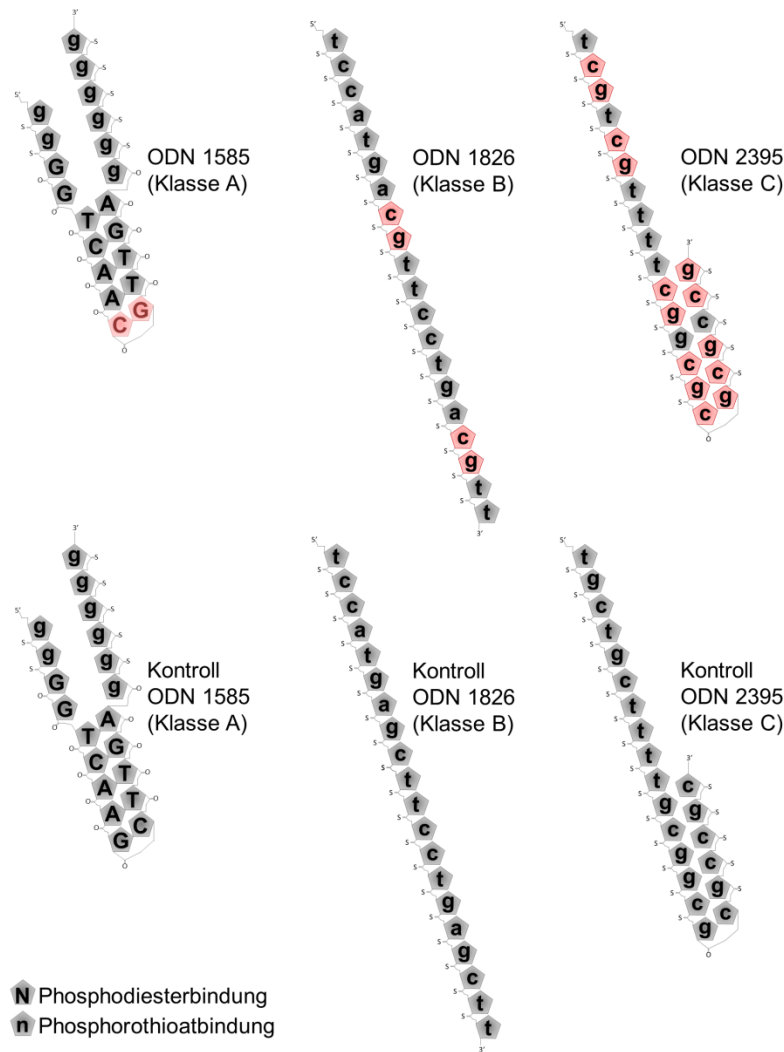


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Zusammensetzung des Klasse A ODNs 1585, des Klasse B ODNs 1826, des Klasse C ODNs 2395 und den entsprechenden Kontroll ODNs. Entwurf nach strukturellen Angaben von InvivoGen.com; Stand August 2019.

Dabei handelt es sich um Makrophagen, die sich um absterbende Adipozyten aggregieren^{156,157}. Durch die untergehenden Adipozyten wird cfDNA frei. Dabei handelt es sich sowohl um einzelsträngige als auch doppelsträngige DNA. Gerade bei Adipositas sind die Level der cfDNA im Plasma und im vis Fettgewebe besonders hoch¹¹⁸. Nishimoto *et al.* haben einen Zusammenhang der Inflammation des Gewebes und der erhöhten cfDNA bei Adipositas in Abhängigkeit von TLR9 beschrieben, was impliziert, dass cfDNA ein physiologischer Ligand von TLR9 ist¹¹⁸ (Abbildung 6). Diese Studien fokussierten sich dabei aber auf die TLR9-Expression in fettgewebsinfiltrierenden Makrophagen. Zur Funktion von adipozytärem TLR9 ist bislang kaum etwas bekannt. In diesem Zusammenhang haben Revelo *et al.* außerdem nachgewiesen, dass Immunzellen im Rahmen einer Hoch-Fett-Diät *extracellular traps* (ETs) ausbilden, die

aus Nukleinsäuren bestehen und pDCs via TLR7/9 aktivieren können ¹¹⁹. Damit scheint TLR9 besonders im Rahmen der Adipoinflammation eine wichtige Funktion zuzukommen, die bislang allerdings nur auf Immunzellen wie Makrophagen, Neutrophilen und DCs untersucht wurden und nicht auf den Adipozyten selbst. Auch die TLR9-abhängige Kommunikation von Adipozyten und Immunzellen innerhalb dieser Entzündungsreaktion ist kaum erforscht.

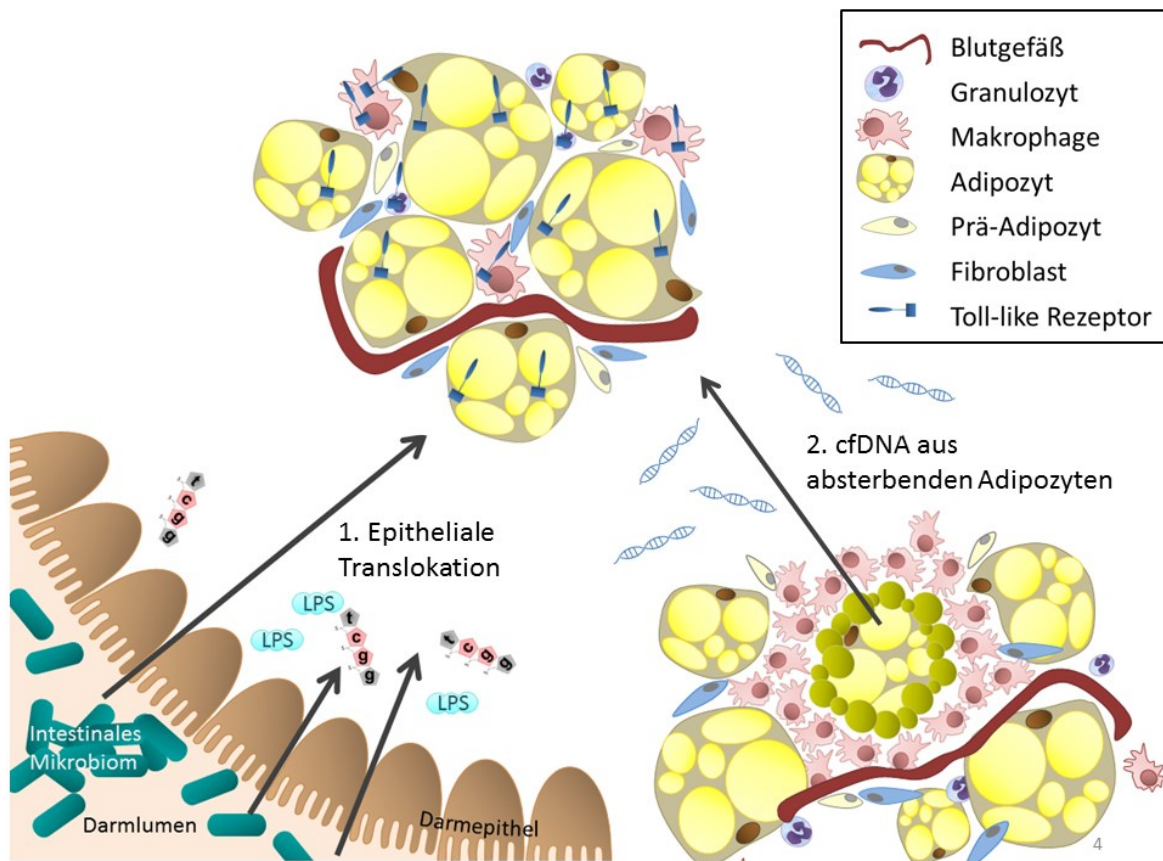


Abbildung 6: Schematische Darstellung intrinsischer Quellen für physiologische TLR9-Liganden.

1. Externe mikrobielle Substanzen aus dem intestinalen Trakt können über das Darmepithel das umliegende Gewebe infiltrieren und die TLR9-Signalkaskade im viszeralem Fettgewebe aktivieren. 2. Im Rahmen der Metaflammation bei Adipositas kommt es vermehrt zur Ausbildung von *crown-like structures*, bei der Makrophagen sich um absterbende Adipozyten akkumulieren und eigene zellfreie DNA (cfDNA) in das umliegende Gewebe entlassen wird.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Expression und Funktion von TLR9 in Adipozyten nachzuweisen. Um herauszufinden, ob TLR9 von Adipozyten und ihren Vorläuferzellen exprimiert wird, sollten via *real time* PCR und Immunzytochemie TLR9-Gen- und Proteinexpressionsanalysen zu verschiedenen Zeitpunkten der adipozytären Differenzierung von murinen 3T3-L1 Adipozyten durchgeführt werden. Außerdem sollte die Gen- und Proteinexpression von TLR9 in murinem sowie humanem Fettgewebe untersucht werden. Der hypothetische Einfluss der TLR9-Expression auf die adipozytäre Differenzierung sollte durch einen TLR9-spezifischen Knockdown über die gesamte Dauer der Adipogenese von murinen 3T3-L1 Adipozyten durch einen *small interfering* RNA- (siRNA) vermittelten Knockdown inhibiert werden. Hierbei sollten Auswirkungen des Knockdown auf die adipozytäre Zellmorphologie sowie auf die Expression von späten Differenzierungsmarkern untersucht werden.

Um die regulatorische Funktion von TLR9 in Adipozyten zu analysieren, sollten Stimulationsexperimente mit synthetischen CpG-ODNs durchgeführt werden. Die Auswirkungen auf das adipozytäre Sekretionsprofil nach Stimulation von murinen 3T3-L1 Adipozyten und primären humanen Adipozyten mit TLR9-Liganden sollte Aufschluss über die inflammatorische Wirkung von TLR9 in Adipozyten geben. Der Einfluss der TLR9-Aktivierung auf den Metabolismus der Adipozyten sollte anhand der Genexpression der adipozytären Glukosetransporter analysiert werden. Um das proinflammatorische Milieu im Fettgewebe bei Adipositas zu imitieren, sollten außerdem Ko-Stimulationsexperimente von CpG-ODNs und dem TLR4-Liganden LPS in 3T3-L1 Adipozyten durchgeführt werden. Zur Verifizierung der TLR9-Abhängigkeit auftretender Effekte sollten Stimulationsexperimente mit TLR9-Liganden analog in primären murinen Adipozyten aus Wildtyp und TLR9-defizienten (TLR9^{-/-}) Mäusen *ex vivo* durchgeführt werden. Der Einfluss der CpG-ODNs auf das Sekretionsprofil der Adipozyten sollte mit Hilfe des *Enzyme-Linked Immunosorbent Assays* (ELISA) analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Antikörper (AK)

AK-Bezeichnung	Hersteller
Isotypkontrolle Kaninchen, polyklonaler rabbit IgG (ab27478)	Abcam
Primärer anti-TLR9 Antikörper, polyklonal (ab37154)	Abcam
Sekundärer Peroxidase-konjugierter AK, goat anti-rabbit IgG (P0448)	DAKO

2.1.2 Chemikalien

Name	Hersteller
7-aminoactinomycin D (7-AAD)	eBioscience
Aceton	Carl Roth
Aluminum potassium sulfate dodecahydrate/ Kalilaun	Sigma-Aldrich
Ampicillin	Serva
Apo-Transferrin	Sigma-Aldrich
Ascorbat	Sigma-Aldrich
Bad Stabil®	Neolab
β-Mercaptoethanol (2-ME)	Sigma-Aldrich
Biotin	Sigma-Aldrich
Bovine Pituitary Extract (bPE)	Sigma-Aldrich
Citric Acid Monohydrate	Sigma-Aldrich
Chloralhydrat	Sigma-Aldrich
Complete tablets	Roche
Corticosteron	Sigma-Aldrich
Desoxycholate	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO), Hybri-Max™	Serva
DNaseI aus Rinderpankreas	Roche
Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 4,5 g/l Glucose (DMEM)	Merck (Biochrom)
DMEM F-12	Lonza
Entellan	Merck
Eosin	Carl Roth
Ethanol 70 %, vergällt	SAV-Liquid Production GmbH
Ethanol absolut 99,99%	Chemsolute

2 Material und Methoden

Ethanol 99,8%, vergällt	Carl Roth
Ethansäure/ Essigsäure	Merck
Ethidium Bromid (EthBr)	Carl Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich
Fetuin	MP-Biomedicals
Fixierlösung ROTI®Histofix 4%	Carl Roth
Freka-Nol AF, alkoholisches Schnelldesinfektionsmittel	Dr. Schumacher GmbH
Formaldehydlösung 37%	Carl Roth
Gelatine, porcine	Sigma-Aldrich
Glycerin 99,5%	Carl Roth
Glyceringelatine phenolfrei	Carl Roth
Hämatoxylin	Carl Roth
Heparin	Sigma-Aldrich
HEPES	PAA
Hühnerserum	Sigma-Aldrich
Hygromycin	Sigma-Aldrich
IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin)	Serva
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich
Inzidin plus	Ecolab
Insulin	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Carl Roth
iTaq universal SYBR Green Supermix für RT-PCR	BioRad
Kaliumacetat	Carl Roth
Kaliumchlorid	Carl Roth
Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth
Kollagenase NB6	Serva
LAL-Wasser	Invitrogen
Lipopolysaccharide (LPS), E.coli-Stamm 055:B5	Sigma-Aldrich
Leukemia inhibitory factor (LIF) (ESGRO®)	Millipore
Medium Biowhithaker F-12	Lonza
Methanol	Carl Roth
Merrettichperoxidase (HRP) Avidin	Bio Legend
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Carl Roth

2 Material und Methoden

Natriumhydroxid	Carl Roth
Natriumjodat	Sigma-Aldrich
n-Butanol	Roth
Newborn Calf Serum (NCS)	Sigma-Aldrich
Nuclease-freies Wasser	Qiagen
ODN 2216, human	InvivoGen
ODN 2243 (2216 Ktrl.), human	InvivoGen
ODN 2006, human	InvivoGen
ODN 2137 (2006 Ktrl.), human	InvivoGen
ODN 2395, human/murin	InvivoGen
ODN 2395 Ktrl., human/murin	InvivoGen
ODN 1585, murin	InvivoGen
ODN 1585 Ktrl., murin	InvivoGen
ODN 1826, murin	InvivoGen
ODN 1826 Ktrl., murin	InvivoGen
Panthothensäure	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth
Paraffin-Pastillen Roti®-Plast	Carl Roth
Phosphat-Buffered Saline (PBS) Dulbecco	Biochrom
PBS Endotoxin-frei, Dulbecco's PBS Ca ²⁺ & Mg ²⁺ frei	Sigma Aldrich
Penicillin/Streptomycin (Pen/Str)	PAN Biotech
Pfu Polymerase	Fermentas
Phosphatase Inhibitor Cocktail phosSTOP	Roche
Poly (2-hydroxyethyl methacrylate) (polyHEMA)	Sigma-Aldrich
Polybrene (Hexadimethrin Bromid) [10mg/ml]	Millipore
Protease Inhibitor Cocktail Complete Mini	Roche
Rinderserumalbumin (BSA) Pulver	Roth
RNeasy Lyse (RLT) Puffer	Qiagen
Rnase-freies Wasser	Qiagen
Schwefelsäure 95-97%	Merck
siRNA Transfektions Reagenz, X-tremeGENE	Roche
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Merck
Sodium Iodate ≥ 99 %	Sigma Aldrich
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Fermentas
Sodium Pyruvate (Pyruvat)	PAA
Stickstoff, flüssig	Linde

SYBR Green, iTaq Univer, Supermix	Bio-Rad
Taq Polymerase	Bioline
TNFalpha	Biomol
Trichlormethan/Chloroform	Carl Roth
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth
Tri-Sodium Citrat Dihydrate	Fluka
Triton X-100	Sigma Aldrich
TRIzol	Ambion Life Technologies
Trypan Blau	Sigma Aldrich
Trypsin-EDTA	PAN-Biotech
Tween-20	Carl Roth
Tween-20	Sigma Aldrich
Wasserstoffperoxid 30% (H ₂ O ₂)	Carl Roth
Xylol	Carl Roth

2.1.3 Geräte

Gerät	Hersteller
Alu-Rack 1,5 und 2	Carl Roth
Analysewaage ACJ 220-4M (0,01 g - 220 g)	Kern
Brutschrank Heracell 150i, CO ₂ -Inkubator	Thermo Scientific
Durchlichtmikroskop DMIL LED	Leica
Eiswanne	VWR
Etikettiergerät P-touch 3600	Brother
Feinwaage ACJ 220-4M	Kern
Gefrierschrank -20 °C, Comfort NoFrost	Liebherr
Gefrierschrank -20 °C	Bosch
Gefrierschrank -20 °C, Arctis	AEG
Gefrierschrank -80 °C, HERAFreeze™ HFU T Serie	Thermo Scientific
Gewebshomogenisator, gentleMACS™ Dissociator	Miltenyi Biotec
Kühlschrank comfort	Liebherr
Kühlschrank cooler	Bosch
Magnetisches Feld für Affinitätsseparation, MACS® MultiStand	Miltenyi Biotec
Magnetrührer MR Hei-Standard	Heidolph
Magnetrührer RH Basic 2	IKA
Mikroskop-Kamera MC120 HD	Leica

2 Material und Methoden

Mikrotom, Rotary Microtome HM340E mit Section Transfer System	Thermo Scientific
STS und Cool-Cut	Biotek
Nanoquantplatte Take 3, Epoch	Fine Science
Pinzette Dumont Medical 5	Tools
Pinzette Dumont Medical 7, curved	Fine Science
Pinzette mit feiner Spitze, gerade	Tools
Pipettensatz (Spannweite 0,1 µl - 5000 µl)	Carl Roth
Pipettierhelfer, accu-jet® pro	Eppendorf
Real-Time PCR Detection System, CFX Connect	Omnilab
Schere, fein, gerade	BioRad
Schüttelinkubator S1500	Fine Science
Schüttler MKR 13	Tools
Sonifikator Sonoplus HD 3100	Stuart Orbital
Sonotrode	Ditabis
Spektrophotometer für Mikroplatten, Epoch, ELISA Reader	Bandelin
Sterilwerkbank, Flow MSC Advantage	Bandelin
Stickstofftank für Cryokonservierung, 21HCL	BioTek
Stickstofftank, TP60	Thermo Scientific
T100 Thermal Cycler	Taylor-Wharton
Thermomixer F1,5	Cryo-Tech
Vakuumpumpe	BioRad
Vakuumpumpe Laboport	Eppendorf
Vortex 1	Biometra
Vortexer VTX-3000L, UZUSIO	KNF Lab
Waage EMB 500-1 (0,1 g - 500 g)	IKA
Wasserbad	LMS
Zellseparator, magnetisch MiniMACS™ Separator für MS-column	Kern
Zellseparator, magnetisch QuadroMACS™ Separator für LS-column	Memmert
Zentrifuge, Mikro 120	Miltenyi Biotec
Zentrifuge, Mikro 200 R	Miltenyi Biotec
Zentrifuge, Minifuge	Hettich
Zentrifuge, Minifuge	Hettich
Zentrifuge, Rotina 380R	LLG Labware
	Sprout
	Hettich

2.1.4 Kit-Systeme

Kit-Systeme

Adipose Tissue Progenitor Isolation Kit mouse, MACS	Miltenyi Biotec
AEC Peroxidase (HRP) Substrate Kit, 3-amino-9-ethylcarbazole	Vector Laboratories
BCA Protein Assay Kit	Pierce/Thermo Scientific
ELISA MCP-1 murin	BioLegend
ELISA, DuoSet® Adiponektin human	R&D Systems
ELISA, DuoSet® Adiponektin murin	R&D Systems
ELISA, DuoSet® Leptin murin	R&D Systems
ELISA, DuoSet® MCP-1 human	R&D Systems
ELISA, DuoSet® Resistin murin	R&D Systems
QIAmp DNA Mikro	Qiagen
Reverse Transcription Kit, Quantitect®	Qiagen
RNase-Free DNase Set	Qiagen
Rneasy Mini Kit	Qiagen
RT-Kit	Qiagen
Substrate Reagent Pack (Hydrogenperoxid, TMB-Substrat)	R&D Systems
Zytotoxizitäts-Test, Laktat-Dehydrogenase (LDH)	Roche

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial

Abdeckfolie Easy-Seal	Greiner bio-one
Abdeckfolie MicroSeal	BioRad
Aspirationspipette 2 ml	Sarstedt
Aufbewahrungsbox, Karton	Ratio-Lab
Aufbewahrungsbox, PCR, 0,2 ml	Biozym
Combitips 0,5 ml, 1ml, 2,5 ml, 5 ml, 10 ml	Eppendorf
Deckgläser, 24 x 24 mm und 24 x 60 mm	Omnilab
Einbettkassette	Carl Roth
Eiswanne	Magic Touch Icewares
Entsorgungbeutel 200 x 300 mm	Carl Roth
Färbegestell aus Glas mit Drahtbügel	Carl Roth
Färbekasten	Carl Roth
Färbekasten nach Coplin, Glas	Carl Roth
Farbetiketten, rund	Herma

2 Material und Methoden

Färbetrog	Carl Roth
Fettstift	Merck
Filterspitzen 200µl, 100µl, 20µl, 10µl super slim	Nerbe plus
Filterspitzen Extra-long 1250µl	Sarstedt
Filtersystem steril, 150 ml, 250 ml	Corning
Handschuhe Latex, puderfrei	Nobaglove
Handschuhe Micro-Touch	Nitra-tex
Kammerobjektträger 8 well	Thermo Fisher Scientific
Kanüle, steril, 24G	BD Microlance™ 3
Kryoboxen	Ratio-Lab
Kryoröhrchen, Cryo-Pure Gefäß 1,6 ml	Sarstedt
Membranfilter für Pipettierhilfe	Brand
Messzylinder	Brand
Mikroplatte 96 well, half area	Greiner bio-one
Minifilter Mini Sart	Sartorius
Monovette, Citrat oder Serum	Sarstedt
M-Tube, gentleMACS	Miltenyi Biotec
Multipette E3	Eppendorf
Multipette M4	Eppendorf
Multiply Pro 0,2ml Reaktionsgefäß	Sarstedt
Objektträger, Superfrost plus	Thermo Fisher Scientific
Objektträger-Kasten	Carl Roth
Objektträger-Küvette	Carl Roth
Parafilm	Parafilm
Pasteurpipetten, Glas	Brand
PCR Platte, 96 well, Hard Shell	BioRad
Pipetten, Einwegpipette, serologisch, cell star 2ml, 5ml, 10ml, 25 ml, 50ml	Greiner bio-one
Pipettenspitzen	Eppendorf
Pipettenspitzen	Sarstedt
Pipettierhilfe Accu-Jet Pro	Brand
Pipettierhilfe Research	Eppendorf
Pipettierhilfe Research plus	Eppendorf
Qiashredder	Qiagen

2 Material und Methoden

Rastereinsatz aus Karton für Aufbewahrungsbox	Ratio-Lab
Reagiergefäße 5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäße RNase-frei 0,2 ml	Nerbe plus
Reaktionsgefäße RNase-frei, 1,5 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäßständer	Brand
Röhrchen für magnetische Affinitätsseparation, LS column	Miltenyi Biotec
Röhrchen für magnetische Affinitätsseparation, MS column	Miltenyi Biotec
Safe-Seal Reagiergefäße, Biosphere® 0,5 ml, 1,5 ml	Sarstedt
Schraubverschluss Mikroröhre 1,5 ml	Sarstedt
Schriftbandkassette, 12 mm	Brother
Skalpell, Einweg, Nr. 15, Nr.21	Feather
Spritze Injekt®, 10 ml	Braun
Spritze Injekt®-F, 1 ml	Braun
Spritzenfilter, Minisart, 0,2 µm	Sartorius Stedim Biotech
Tücher Brozell	Brod
Tücher Kimtech Science	Kimberly Clark
Wägeschale, Einweg	NeoLab
Zell- und Gewebshomogenisator QIAshredder	Qiagen
Zellkulturflasche T75	Sarstedt
Zellkulturplatte Tissue-culture plate 12- well	Falcon
Zellschaber 16cm	Sarstedt
Zellsieb, Nylonmesh 100 µm	Sarstedt
Zellsiebadapter für 15 ml Röhrchen	Sarstedt
Zell-Zählkammer	Neubauer
Zentrifugenröhrchen konisch, Cellstar, Falcon 15 ml und 50 ml	Greiner bio-one

2.1.6 Medien, Puffer und Lösungen

2.1.6.1 Medien für humane Zellen

Human Adipocyte Differentiation Medium	Cell Application Inc.
Human Adipocyte Starvation Medium	Cell Application Inc.
Human Preadipocyte Growth Medium	Cell Application Inc.
Hanks' Balanced Salt solution (HBSS)	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA Solution	Sigma-Aldrich
Trypsin Inhibitor Solution	Sigma-Aldrich

2.1.6.2 Medien für murine Zellen

Medium	Supplementation
<u>Anzuchtsmedium</u>	
DMEM	10 % NCS + ggf. 1 % Pen/Str
<u>Differenzierungsmedium</u>	
DMEM F-12	5%NCS 17 nM Panthothensäure 10 nM Biotin 2 ng/ml apo-Transferrin 30 ng/ml Fetuin 1µM Corticosteron (unmittelbar vor Verwendung hinzugeben) 200 µM Ascorbat (unmittelbar vor Verwendung hinzugeben) 2,5 µM IBMX (unmittelbar vor Verwendung hinzugeben) 100 nM Insulin (unmittelbar vor Verwendung hinzugeben)
<u>DMEM/I⁺</u>	
DMEM F-12	1 µM Insulin (unmittelbar vor Verwendung hinzugeben)

2.1.6.3 Puffer und Lösungen

Eosinlösung

Eosin (10 g) in 1 l H₂O lösen, filtrieren und dunkel lagern.

Vor Gebrauch einige Tropfen 96%ige Essigsäure in die Küvette geben.

2 Material und Methoden

Hämalaun

Hämatoxylin	1 g
Sodium Iodate	0,2 g
Kalilaun	50 g
Chloralhydrat	50 g
Citric Acid Monohydrate	1 g
	ad 1 l dH ₂ O (filtrieren und dunkel lagern)

RIPA-Zellysepuffer

Natriumchlorid 3 M Stammlösung	2,5 ml
IGEPAL	500 µl
Desoxycholate	0,025 g
SDS, 20% ige Stammlösung	250 µl
TRIS 1 M Stammlösung, pH 7,5	2,5 ml
	ad 50 ml ddH ₂ O

Sodium Zitrat

Sodium Citrate Dehydrate	7,35 g
	ad 250 ml dH ₂ O

Zitratpuffer

Zitronensäure 0,1 M	9 ml
Sodium Zitrat 0,1M	41 ml
	ad 450 ml dH ₂ O

Zitronensäure

Citric Acid Monohydrate	10,5 g
	ad 50 ml dH ₂ O

2.1.7 Oligonukleotidsequenzen

2.1.7.1 Humane Primer

Tabelle 3: Innerhalb dieser Arbeit verwendete humane Primer mit Sequenzangabe, sowie die bei der PCR eingesetzte Annealing-Temperatur (T_m).

Oligonukleotid		T_m	Sequenz 5'→3'
Adiponektin	forward	60 °C	5'-GAC CAG GAA ACC ACG ACT CA-3'
	reverse		5'-CCT TAG GAC CAA TAA GAC CTG GA-3'
GAPDH	forward	62,5 °C	5'-GAG TCC ACT GGC GTC TTC AC-3'
	reverse		5'-CCA GGG GTG CTA AGC AGT T-3'
MCP-1	forward	60 °C	5'-CTC TCG CCT CCA GCA TGA AA-3'
	reverse		5'- GTC TTG AAG ATC ACA GCT TCT TTG G-3'
TLR9	forward	63 °C	5'-CCC CCA GCA TGG GTT TCT-3'
	reverse		5'-TGG AGC TCA CAG GGT AGG AA-3'

2.1.7.2 Murine Primer

Tabelle 4: Innerhalb dieser Arbeit verwendete murine Primer mit Sequenzangabe, sowie die bei der PCR eingesetzte Annealing-Temperatur (T_m).

Oligonukleotid		T_m	Sequenz 5'→3'
Adiponektin	forward	62 °C	5'-AGG GAG AGA AAG GAG ATG CAG-3'
	reverse		5'-CAG ACT TGG GCT CCC ACC TC-3'
GAPDH	forward	58,9 °C	5'-TGT CCG TCG TGG ATC TGA C-3'
	reverse		5'-AGG GAG ATG CTC AGT GTT GG-3'
GLUT1	forward	62 °C	5'-AGC AGA GGC TTG CTT GTA GA-3'
	reverse		5'-AAC TCC TCA ATA ACC TTC TGG GGG-3'
GLUT4	forward	60 °C	5'-TGG TTC ARR GTG GCA GAG C-3'
	reverse		5'-CGT AAG GAC CCA TAG CAT CC-3'
IL-6	forward	60 °C	5'-AGT TGC CTT CTT GGG ACT GA-3'
	reverse		5'-TCC ACG ATT TCC CAG AGA AC-3'
Leptin	forward	60 °C	5'-AGG ATC TGA GGG GTG ATG TG-3'
	reverse		5'-AGG TGA CCA AGG TGG CAT AG-3'
MCP-1	forward	61 °C	5'-AGG TCC CTG TCA TGC TTC TG-3'
	reverse		5'-TCT GGA CCC ATT CCT TCT TG-3'
Resistin	forward	62 °C	5'-TGC TAA GTC CTC TGC CAC GTA-3'
	reverse		5'-TCA ACT GAC CGA CAT CAG GA-3'
TLR9	forward	60 °C	5'-CAT CTC CCA ACA TGG TTC TCC-3'
	reverse		5'-GCA GAG AAA CGG GGT ACA GA-3'
TNF α	forward	60 °C	5'-CCA GAC CCT CAC ACT CAG ATC AT-3'
	reverse		5'-CCA GAC CCT CAC ACT CAG ATC AT-3'

2.1.7.3 siRNA-Sequenzen

Name siRNA	Sequenz	Identifikationsnr.	Hersteller
TLR9 sense (murin)	5'-GCU AUA AUG GUA UCA CCA ACTt-3'	# 175054	Ambion Life Technologies
TLR9 sense (murin)	5'-GCU CUC UCC AUA CAC UGA Att-3'	# 175055	Ambion Life Technologies
TLR9 sense (murin)	5'-GCG AGA ACU UUC UCU AUG Att-3'	# 175056	Ambion Life Technologies

Als Negativkontrolle zur Transfektion mit der genspezifischen siRNA wurde die *non template* siRNA (ntsiRNA) Silencer Select Negative Control siRNA #1 von Ambion Life Technologies eingesetzt, die keine bekannte mRNA-Sequenz des murinen Transkriptoms spezifisch bindet.

2.1.8 Software und Programme

Bio-Rad CFX Manager 3.1
 Gen5 2.05
 Leica Application Suite V4.3
 Leica Application Suite V4.9.0
 Microsoft Office 2007
 SPSS (IBM Statistics, Versionen 22.0 und 26.0)

2.1.9 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
Murine 3T3-L1Prä-Adipozyten (ATCC ® CL-173™)	American Type Culture Collection
Humane Prä-Adipozyten (HPAd)	Sigma-Aldrich

2.2 Methoden

2.2.1 *In vitro* Zellkulturarbeiten

Die Kultivierung aller Zellen erfolgte unter konstanten Bedingungen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ bei wassergesättigter Atmosphäre.

2.2.1.1 Kultivierung und Differenzierung von murinen 3T3-L1 Zellen

Fibroblasten der murinen Zelllinie 3T3-L1 können unter Behandlung mit adipogenen Substanzen zur Akkumulation von Lipidvakuolen angeregt werden. Sie differenzieren dabei innerhalb von 8 Tagen zu einem Zelltyp, der primären Adipozyten morphologisch sowie funktionell sehr ähnlich ist. Sie werden deswegen auch als Prä-Adipozyten beschrieben und gelten seit 1974 als etabliertes, gut charakterisiertes *in vitro* Model für klassische, „weiße“ Adipozyten¹⁵⁸.

Kultiviert werden die 3T3-L1 Zellen in 10 ml DMEM (s. 2.1.3) mit 10 % *Newborn Calf Serum* (NCS) und 1 % Penizillin/Streptomycin. Initial wurden 3x10³ Zellen/cm² in Zellkulturflaschen für adhärente Zellen mit 10 ml Anzuchtsmedium (s. 2.1.4) ausgesät. Nach einer Woche erreichten die Fibroblasten eine Konfluenz von 80-90 %, woraufhin sie im Verhältnis 1:15 passagiert wurden. Dafür erfolgte eine 10-minütige Trypsin-Behandlung bei 37 °C. Durch das Trypsin werden die adhärenenten Zellen vom Flaschenboden gelöst und interzelluläre Kontakte unterbrochen. Zum Beenden der Reaktion wurde die Einzelzellsuspension in frischem NCS-haltigem Medium aufgenommen. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 1200 rpm wurden die Zellen in frischem Trypsin-freiem Medium resuspendiert und auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Die Fibroblasten wurden maximal über 8 Passagen kultiviert.

Für die adipogene Differenzierung wurden 3T3-L1 Fibroblasten mit 3x10³ Zellen/cm² in 12-*well*-Zellkulturplatten mit 1 ml Anzuchtsmedium ausgesät. Innerhalb von 24 Stunden (h) sedimentieren die Zellen der Suspension und heften sich an den Plattenboden, woraufhin das Anzuchtsmedium entfernt werden kann. Durch die Zugabe von 500 µl Differenzierungsmedium (s. 2.1.4) pro *well* wurde die Adipogenese initiiert. Dieser Tag wird als Tag 0 der Differenzierung definiert. Ein Mediumwechsel erfolgte an Tag 3 und 6 der Differenzierung. Am siebten Tag wurde das Differenzierungsmedium durch DMEM/I⁺ (s. 2.1.4) ersetzt. Während der adipogenen Zelldifferenzierung wurden lichtmikroskopisch die Rückbildung der langen Ausläufer der flachen Fibroblasten und die Ausbildung des adipozytenspezifischen kugelförmigen Phänotyps mit ausgeprägten Lipidvakuolen kontrolliert. Nach Beginn der Differenzierung sind die Zellen an Tag 8 voll

differenziert und können für Stimulationsexperimente oder Zellfärbungen verwendet werden.

2.2.1.2 Isolation von primären murinen Zellen

Adipozytäre Vorläuferzellen wurden aus C57BL/6J-Wildtyp und TLR9-defizienten C57BL/6J-TLR9M7Btlr/Mmjax Mäusen gewonnen. Nach Präparation des sc sowie des gon Fettgewebes wurden diese manuell zerkleinert und in 1 ml/(Gramm Fettgewebe) eiskaltem sterilen Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) eingelegt. Der anschließende Gewebsverdau mit 0,225 U/ml Collagenase erfolgte bei 37 °C und 150 rpm für 30-60 min. Der Fortschritt des Gewebsverdaus wurde dabei makroskopisch kontrolliert. Aus diesen Proben konnten anschließend die murinen Adipozyten und die SVF für Genexpressionsanalysen oder die primären murinen Prä-Adipozyten für die *ex vivo* Differenzierung isoliert werden.

2.2.1.2.1 Isolation von primären murinen Prä-Adipozyten

Der Collagenaseverdau wurde für die Isolation von adipozytären Vorläuferzellen mit dem doppelten Volumen an Rinderserumalbumin- (BSA) und EDTA-haltigem MACS Puffer (Adipose Tissue Progenitor Isolation Kit mouse, MACS Miltenyi Biotec) abgestoppt. Anschließend wurde das Fettgewebslysate filtriert (Porengröße 100 µm) und für 10 min bei 300 rcf 4 °C zentrifugiert. Die Separation der adipozytären Vorläuferzellen aus dem Zellpellet wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden die Prä-Adipozyten an Magnetpartikel gebunden und in einer Negativ-Selektion sowie einer anschließenden Positiv-Selektion von den restlichen Zellen im Gewebslysate getrennt. Mit einer 1:1 Verdünnung in Trypanblau wurde die Zahl der vitalen Zellen mit Hilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt.

2.2.1.2.2 Isolation von primären Adipozyten und von Zellen der stromavaskulären Fraktion aus Mäusen

Der Collagenaseverdau wurde für die Isolation von murinen Adipozyten und der SVF mit dem doppelten Volumen an DMEM (s. 2.1.3) abgestoppt. Anschließend wurde das Fettgewebslysate filtriert (Porengröße 100 µm). Durch eine Zentrifugation für 10 min bei 300 rcf 4 °C wurden die beiden Zellfraktionen voneinander getrennt. Die lipidhaltigen Adipozyten befanden sich anschließend in der oberen Phase und waren über eine intermediäre Phase von dem Pellet der SVF getrennt. Das Zellpellet wurde vorsichtig mit einer Pipette aufgesogen und in ein separates Gefäß überführt. Die bei den Adipozyten verbliebene intermediäre Phase wurde vorsichtig abgenommen. Beide Zellfraktionen

wurden daraufhin insgesamt dreimal mit 2 ml PBS gewaschen und jeweils wieder für 10 min bei 300 rcf und 4 °C zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde das PBS verworfen und durch 2 ml TRIzol® Reagenz ersetzt. In einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur (RT) denaturieren dabei die Proteine in der Probe, wodurch die Integrität der RNA geschützt wird. Anschließend konnte die RNA aus den jeweiligen Proben, wie in Kapitel 2.2.2.2.3 beschrieben, isoliert werden.

2.2.1.2.3 Kultivierung und Differenzierung primärer muriner Prä-Adipozyten

Für die adipogene Differenzierung wurden primäre murine Prä-Adipozyten, wie in Kapitel 2.2.1.2.1 beschrieben, isoliert. Es wurden $2,03 \times 10^4$ sc Zellen und $1,68 \times 10^4$ gon Zellen pro well in 1 ml Anzuchtsmedium in 12 well Platten ausgesät. Nach 2 Tagen wurde das Anzuchtsmedium erneuert, um nicht angeheftete Zellen aus dem Zellkulturüberstand zu entfernen. Vor dem Mediumwechsel wurden die Zellen außerdem mit 500 µl von 37 °C warmem PBS gewaschen. Nachdem die Zellen eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht hatten, wurde die Differenzierung mit Differenzierungsmedium (Tag 0 der Differenzierung) gestartet. Zuvor wurden die Zellen wiederum mit 500 µl des 37 °C warmen PBS gewaschen. An Tag 4 und 8 der Differenzierung wurden die Zellen mit frischem Differenzierungsmedium versorgt. Das Medium der gon Adipozyten wurde an Tag 9 und das Medium der sc Adipozyten an Tag 10 durch DMEM/I⁺ ersetzt. Mindestens 4 h vor der Stimulation an Tag 10 bzw. Tag 11 wurden die Zellen in Medium ohne Zusätze (reines DMEM) akklimatisiert. Während der adipogenen Zelldifferenzierung wurden die Rückbildung des Fibroblasten-ähnlichen Zelltyps und die Ausbildung des Adipozyten-spezifischen Phänotyps lichtmikroskopisch kontrolliert. An Tag 11 der Differenzierung waren die Zellen voll differenziert.

2.2.1.3 Kultivierung und Differenzierung humaner Prä-Adipozyten

Die Kultivierung und Differenzierung der humanen Prä-Adipozyten erfolgte exakt nach dem Protokoll des Herstellers (*Sigma-Aldrich Human Preadipocytes (HPAd) Culture Protocol*). Die Zellen wurden bis zum Erreichen einer Konfluenz von 85-95 % in T-75 Zellkulturflaschen kultiviert. Zum Start der Adipogenese wurden die Prä-Adipozyten mit $4,4 \times 10^4$ Zellen/cm² in 12-well-Zellkulturplatten ausgesät. Erst bei einer Konfluenz von 100 % wurde die adipozytäre Differenzierung durch das Hinzufügen von *Human Adipocyte Differentiation Medium* initiiert. Am achten Tage der Differenzierung hatten die Zellen einen vollständig ausgeprägten adipozytären Phänotyp ausgebildet. Daraufhin wurde das humane Differenzierungsmedium 24 h vor der Stimulation an Tag 9 durch *Starvation Medium* ersetzt.

2.2.1.4 Stimulation der Adipozyten mit TLR-Liganden

Die reifen murinen Adipozyten wurden nach Abschluss der Adipogenese mindestens 4 h zur Akklimatisation in frischem DMEM ohne Zusätze inkubiert. Reife humane Adipozyten wurde an Tag 8 der Differenzierung für 24 h in *Starvation Medium* inkubiert.

Die TLR9 Agonisten wurden nach Herstellerangaben in LAL-H₂O gelöst und in DMEM verdünnt. Die Adipozyten wurden jeweils mit 500 µl der Stimulationslösung (37 °C) pro *well* für 18 h stimuliert. Bei einer Ko-Stimulation mit LPS wurde 1 h nach Stimulation mit den TLR9-Agonisten das LPS tropfenweise in jedes *well* hinzugefügt und durch Schwenken der Platte mit dem Medium vermischt. Auch hier wurden nach 18 h Stimulation die Zellkulturüberstände abgenommen sowie Gesamtprotein oder Gesamt-RNA aus den Zelllysaten isoliert.

2.2.2 Arbeiten mit RNA/DNA

2.2.2.1 Transfektion mit *small interfering RNA* (siRNA)

Der TLR9-spezifische *knockdown* wurde mittels RNA-Interferenz (RNAi) durchgeführt. Bei dem Prozess erfolgt ein posttranskriptionelles Gen-silencing, indem doppelsträngige siRNA über eine Transfektion in die eukaryotischen Zellen eingebracht wird. Die Sequenz der ausgewählten siRNA muss zu einem Abschnitt der *messenger RNA* (mRNA) des Zielgens komplementär sein, um spezifisch an diese zu binden und den *knockdown* des Zielgens zu initiieren. Für die Transfektion wurde hier das Roche X-tremeGENE siRNA Transfektionsreagenz verwendet. Es basiert auf dem Prinzip der Lipofektion und hat eine geringe Zytotoxizität. Das lipidhaltige Multikomponenten-Reagenz bildet einen Komplex mit der siRNA und schleust diese über Endozytose in die Zielzellen. Im Zytosol bindet die doppelsträngige siRNA an die Ribonuklease (RNase) *Dicer*, wodurch sie in kleinere 19-22 bp lange Oligonukleotide gespalten wird^{159,160}. Die siRNA wird daraufhin vom Argonautenprotein des RNA-induzierten Stummschaltungs-Komplex, dem *RNA-induced silencing complex* (RISC), gebunden. Dort wird die doppelsträngige RNA in ihre Einzelstränge gespalten. Während ein Strang abgebaut wird, wird der zur TLR9-Sequenz komplementäre Leitstrang in den aktiven Stummschaltungs-Komplex integriert. Dieser bindet nun sehr spezifisch an die komplementäre Sequenz der mRNA und spaltet sie an der Bindungsstelle. Die mRNA wird daraufhin abgebaut und steht nicht mehr für die Proteinbiosynthese durch Translation zur Verfügung. Der RISC mit dem integrierten Leitstrang kann nach diesem Vorgang erneut mRNA binden und diese spalten^{161–163}. Für

eine höhere Effektivität der RNA-Interferenz (RNAi) wurde hier ein Gemisch aus drei TLR9 siRNA-Sequenzen (#175054, #175055, #175056, Ambion Life Technologies) in einer finalen Konzentration von 100 nM eingesetzt. Als Kontrolle des siRNA-vermittelten Knockdowns wurden Zellen mit einer *non template* siRNA (ntsiRNA), die keine bekannte mRNA-Sequenz des murinen Transkriptoms spezifisch bindet, transfiziert (Silencer Select Negative Control siRNA #1, Ambion Life Technologies). Der Transfektionsansatz wurde wie folgt zusammengesetzt:

Komponente	Volumen/well
DMEM	42,5 µl
siRNA (100 nM)	5 µl
X-treme Transfektionsreagenz	2,5 µl

Die Transfektion der 3T3-L1 Zellen erfolgte jeweils für 3 h an Tag 0, 3, 6 und 8 der adipozytären Differenzierung in 12-well-Platten. Dabei wurde jeweils ein Mastermix für alle Reaktionen angesetzt, von dem jeweils 50 µl tropfenweise in jedes well hinzugegeben wurde. Nach der dreistündigen Inkubation wurde das Medium der Zellen wieder durch Differenzierungsmedium ersetzt.

2.2.2.2.1 Isolation von RNA aus Gesamtzelllysaten

Für die Isolation von RNA aus Gesamtzelllysaten wurde der Zellkulturüberstand aus den wells abgenommen und durch 350 µl RLT Puffer mit β -Mercaptoethanol ersetzt. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen zusätzlich vom well-Boden abgelöst. Die RNA-Aufreinigung erfolgte anschließend nach Herstellerangaben des Qiagen RNeasy Mini Kits. Dabei wurde das Lysat auf die Polymersäule eines Qiashreder-Gefäßes überführt und durch eine 2-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C homogenisiert. Die RNA im Durchfluss wurde anschließend mit 350 µl 70 % EtOH präzipitiert und auf die Silica Membran des RNeasy Spin Columns überführt. Alle Wasch- und Trockeneinheiten wurden exakt nach Herstellerangaben durchgeführt bevor die RNA in 30-40 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bei -80 °C gelagert wurde.

2.2.2.2.2 Isolation von RNA aus Geweben

Murine sowie humane Fettgewebeproben wurden bis zur Isolation der RNA bei -80 °C gelagert. Auf einer Feinwaage wurden 50-90 mg der Gewebe abgewogen und in ein Miltenyi Gentle MACS M-Tube, gefüllt mit 1 ml TRIzol® Reagenz, überführt. Das im TRIzol® Reagenz enthaltene Guanidiniumthiocyanat lysiert die Zellen und inaktiviert gleichzeitig RNasen sowie andere Enzyme, während die RNA in dem ebenfalls

enthaltenen Phenol gelöst wird. Mit dem Protokoll des Gentle MACS-Dissociators für RNA wurde das Gewebe aufgeschlossen. Nach einer Zentrifugation der Suspension bei 2000 rpm für 10 min und 4 °C wurde die Flüssigkeit, nach Möglichkeit ohne die Lipide, auf die Polymersäule des Qias shredders überführt und durch eine 2-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C homogenisiert. Für eine bessere Phasentrennung wurden 200 µl/ml Chloroform hinzugegeben. Die Lösung wurde 15 Mal invertiert und für 3 min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 15 min bei 11.200 rpm und 4 °C lag die RNA in der oberen wässrigen Phase gelöst vor, während die DNA in der dünnen Interphase und Proteine in der unteren Phenol-Chloroformphase vorlagen. Die RNA-haltige klare Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und im Verhältnis 1:1 mit 70 % Ethanol vermischt, um die RNA zu präzipitieren. Das Gemisch wurde in die Qiagen RNeasy Spin Columns überführt, wo die negativ geladene RNA an die Salze der positiv geladenen Silica Membran bindet. Die RNA wurde anschließend nach Herstellerangaben (Qiagen RNeasy Mini Kit protocol) aufgereinigt und, je nach erwarteter Ausbeute, in 30-40 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Für weitere Experimente wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

2.2.2.2.3 Isolation von RNA aus isolierten Adipozyten/ Zellen der stromavaskulären Fraktion (SVF)

Die jeweilige Zellfraktion wurde nach der Isolation mit 2 ml TRIzol® Reagenz versetzt. Die anschließende Phenol-Chloroform-Extraktion wurde, wie in Kapitel 2.2.2.2.2 beschrieben, durchgeführt. Nach der Zentrifugation wurde auch hier die RNA in der oberen wässrigen Phase von der DNA in der Interphase und den Proteinen in der unteren Phenol-Chloroformphase getrennt und in ein neues Gefäß überführt. Die RNA wurde mit 200 µl 99,99 % Ethanol präzipitiert und auf die Silica Membran des Qiagen RNeasy Spin Columns überführt. Anschließend wurde nach Herstellerangaben (Qiagen RNeasy Mini Kit protocol) die RNA gewaschen und eluiert. Es wurde ein zusätzlicher fünfzehnminütiger DNase-Verdau mit dem RNase-Free DNase Set (Qiagen) nach Herstellerangaben für jeden Ansatz nach dem ersten Waschschrift innerhalb dieses Protokolls durchgeführt. Die RNA wurde je nach erwarteter Ausbeute in 30-40 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

2.2.2.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde eine Ultra-Violett (UV) spektrophotometrische Analyse durchgeführt. Dafür wurde die Biotek Take 3 Platte mit 2 µl der extrahierten RNA beladen und mit Hilfe des BioTek Epoch-Readers die

2 Material und Methoden

Absorption (angegeben in Absorptionseinheiten A) bei 260 nm, 280 nm und 320 nm gemessen. Purine und Pyrimidine absorbieren Licht bei 260 nm. Die Absorption von reinen RNA-Proben mit einer Konzentration von 40 µg/ml beträgt bei einer Weglänge von 1 cm exakt 1 A und ergibt einen Absorptionskoeffizienten für RNA von 40 µg/ml. Auf Basis des Lambert-Beerschen Gesetzes wurde mit Hilfe der ermittelten Werte die RNA-Konzentration wie folgt berechnet:

$$C_{\text{RNA}} = A_{260} \times \epsilon_{\text{RNA}} \times V$$

C_{RNA} : RNA-Konzentration (µg/ml)

A_{260} : Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm

ϵ_{RNA} : RNA-Absorptionskoeffizient (40 µg/ml)

V: Verdünnungsfaktor, hier 1

Für eine Referenzwellenkorrektur in der Auswertungs-Software Gen 5 wurde außerdem die Absorption (A) bei 320 nm gemessen und von der A_{260} subtrahiert. So wird eine Beeinträchtigung der Messung durch mögliche Lichtstreuung der Take 3 Platte behoben. Diese Korrektur wird sowohl für den Blank (H₂O-Kontrolle) als auch für die RNA-Probe durchgeführt, bevor die A_{260} der Probe durch Subtraktion des Blank-Wertes korrigiert wurde:

$$A_{260 \text{ Probe}} = (A_{260 \text{ RNA}} - A_{320 \text{ RNA}}) - (A_{260 \text{ Blank}} - A_{320 \text{ Blank}})$$

Es wurde jeweils auf den Mittelwert von mindestens zwei Blanks korrigiert, deren Variationskoeffizient < 10 % ist, um eine Beeinflussung des Messwertes durch eine mögliche Lichtstreuung des Lösemittels auszuschließen.

Außerdem wurde die Absorption bei 280 nm gemessen, um über den Quotient A_{260}/A_{280} die Reinheit der RNA bestimmen zu können. RNA mit einem Quotient von 1,8-2,0 wurde dabei als rein angenommen und konnte für weiterführende Analysen verwendet werden. Ein Quotient <1,8 weist auf Verunreinigungen durch z. B. Proteine oder Phenolreste hin, weshalb die Qualität dieser RNA als unzureichend eingeschätzt wurde und sie nicht für weitere Analysen verwendete.

2.2.2.4 Reverse Transkription

Isolierte RNA wurde mit Hilfe des *Qiagen Reverse Transcription Kits* anhand des Herstellerprotokolls in komplementäre DNA (cDNA) übersetzt. Dabei wurde innerhalb einer Versuchsreihe für alle Proben die gleiche Konzentration an RNA eingesetzt und auf ein Gesamtvolumen von 12 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Durch eine 5-minütige Inkubation bei 42 °C mit 2 µl des gDNA *wipeout buffers* wurde ggf. in der

RNA-Probe vorhandene genomische DNA entfernt. Nach diesem DNase-Verdau wurden die einzelnen Proben mit dem folgenden Mastermix versetzt:

Komponente	Volumen/Reaktion
RT Puffer	4 µl
Primer Mix	1 µl
Reverse Transkriptase	1 µl

Als Negativ-Kontrolle der reversen Transkription wurde eine Probe mitgeführt, die anstelle der DNA-Polymerase mit Wasser versetzt wurde und bei der damit keine einzelsträngige cDNA synthetisiert wurde. Die enzymatische Reaktion fand bei 42 °C für 30 min statt. Die Reverse Transkriptase wurde anschließend durch 3 min bei 95 °C inaktiviert und die synthetisierte cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.2.5 Quantitative *real time* PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Unter Anwendung der quantitativen *real time polymerase chain reaction* (RT-PCR) wurde die synthetisierte cDNA analysiert. Ein PCR-Zyklus beginnt mit der Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 95 °C für 10 sek. In der anschließenden Annealingphase werden die Primersequenzen innerhalb von 30 sek an den Einzelstrang angelagert. Die Annealing-Temperatur ist dabei primerspezifisch und hängt von der Länge sowie dem GC-Gehalt des Primers ab (Tabelle 2 und 3) In der Elongationsphase bei 72 °C (20 sek) werden die komplementären Basen von der DNA-Polymerase an die Primer angefügt und es entsteht wieder eine doppelsträngige DNA. Dabei ist die Dauer der Elongationsphase abhängig von der verwendeten Polymerase (*hier: iTaqTM Universal SYBR Green[®] Supermix*; Bio Rad). Der Hersteller empfiehlt für die iTaqTM Polymerase in Abhängigkeit von der Größe des erwarteten PCR Produktes eine Elongation über 15-30 sek. Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR[®] Green, der in doppelsträngige DNA interkaliert, wurde nach jedem PCR-Zyklus die Menge der amplifizierten DNA bestimmt. Durch die exponentielle Vervielfältigung wurde die Menge der amplifizierten DNA abhängig von der Zunahme der Fluoreszenzintensität analysiert. Für jede Probe wurde jeweils der PCR-Zyklus bestimmt, bei dem sich das Fluoreszenzsignal erstmals deutlich vom Hintergrundrauschen abhebt und von dem an die cDNA exponentiell amplifiziert wird. Dieser Wert wird als *Cycle threshold* (Ct-Wert) definiert.

Jede *real time* PCR wurde mit der Erstellung einer Schmelzkurve beendet, um die Integrität des PCR-Produktes zu überprüfen. Dafür wird die Temperatur stufenweise um 0,5 °C von 65 °C auf 95 °C erhöht. Die Temperatur, bei der sich die doppelsträngige

DNA in ihre Einzelstränge trennt und damit das Fluoreszenzsignal des SYBR® Green stark an Intensität verliert, ist spezifisch für das jeweilige DNA-Molekül, da sie abhängig von der Länge des Produktes sowie vom CG-Gehalt ist.

Der verwendete Bio-Rad SYBR® Green Master Mix enthält neben dem Fluoreszenzfarbstoff zusätzlich Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), Magnesiumchlorid (MgCl_2) sowie die DNA-Polymerase. Die Reaktion erfolgte jeweils in 96-*well*-Platten im Bio-Rad CFX Cycler. Die cDNA wurde in einer, an das genspezifische Expressionsniveau angepassten, Verdünnung eingesetzt. Der Reaktionsmix setzte sich wie folgt zusammen:

Komponente	Volumen/Reaktion
SYBR® Green Mastermix	5 µl
Primer Mix (forward & reverse)	1 µl
cDNA	4 µl

Die Ct-Werte des amplifizierten Zielgens wurden schließlich auf das konstitutiv exprimierte Referenzgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) normalisiert. Die relative Genexpression des Zielgens wurde wie folgt berechnet:

$$G_{xr} = 2^{-\Delta Ct}$$

G_{xr} = relative Genexpression des Zielgens

ΔCt = Ct-Wert des Zielgens – Ct-Wert des Referenzgens

Für eine leichtere Handhabung wurde die relative Genexpression des Zielgens mit 1×10^6 multipliziert.

2.2.3 Arbeiten mit Proteinen

2.2.3.1 Bestimmung der Zellvitalität

Nach der Inkubation der Zellen über 18 h mit den entsprechenden Stimulanzien wurde der Zellkulturüberstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Zelltrümmer wurden durch eine Zentrifugation bei 4000 rpm und 4 °C für 5 min pelletiert und der Überstand wurde in ein frisches Gefäß überführt. Um eine zytotoxische Wirkung der Stimulanzien auszuschließen, wurde die Zellvitalität mit dem Sigma-Aldrich *Cytotoxicity Detection Kit* analysiert. Dabei wird die Konzentration der Laktat-Dehydrogenase (LDH) im Zellkulturüberstand kolorimetrisch bestimmt. Die LDH ist ein intrazelluläres

Stoffwechselenzym, das nur von apoptotischen und nekrotischen Zellen freigesetzt wird. Für die Analyse wurde der Zellkulturüberstand im Verhältnis 1:1 mit dem DMEM in einer 96 *half area plate* verdünnt und nach Herstellerangaben mit dem Reaktionsgemisch, bestehend aus NAD^+ , Katalyst (Diaphorase) und farbgebenden Tetrazolium-Salz, für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Freies LDH katalysiert dabei die Umsetzung von Laktat zu Pyruvat unter der Reduktion von NAD^+ zu NADH/H^+ . Daraufhin werden zwei Wasserstoffatome von NADH/H^+ durch den Katalyst auf das schwach gelblich gefärbte Tetrazolium übertragen, wodurch dieses zu dem roten Farbstoff Formazan reduziert wird. Die Lichtabsorption durch den roten Farbstoff korreliert dabei mit der Konzentration an aktiver LDH, die von absterbenden Zellen freigesetzt wird und ist damit ein Indikator für die Zellvitalität. Für die Blank-Kontrolle wurde reines DMEM mit dem Reaktionsgemisch versetzt. Die Absorption von Formazan wurde photometrisch mit dem Biotek *Epoch Plate Reader* bei 490 nm bestimmt. Die Zytotoxizität der im Versuch verwendeten Stimulanzien wurde als unbedenklich eingeschätzt, wenn sich die relativen (auf das Gesamtprotein in den Zelllysaten normierte) LDH-Konzentrationen in den Zellüberständen von Kontrollansätzen und stimulierten Zellen nicht statistisch signifikant unterschieden.

2.2.3.2 Präparation von Proteinextrakten aus Gesamtzelllysaten

Um das Gesamtzellprotein zu isolieren, wurde der Zellkulturüberstand abgenommen. Pro *well* wurden 350 μl PBS (mit Proteaseinhibitor) auf die Zellen pipettiert. Mit einem Zellschaber wurden die Adipozyten auf Eis vom *well*-Boden abgelöst. Die Suspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 4.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, um das Zellpellet in eiskaltem 50 μl RIPA-Zelllysepuffer (s. 2.1.6.3) mit Protease und Phosphataseinhibitor zu resuspendieren. Mit Hilfe eines Sonifikators wurden in den eisgekühlten Proben die Zellmembranen durch Ultraschall geschert (10 sek; Intensität 30 %). Die Lysate wurden anschließend bei -20 °C gelagert.

2.2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen aus Gesamtzelllysaten

Unter Verwendung des Thermo Fisher *BCA Protein Assay Kit* wurde die Konzentration der Gesamtzelllysate ermittelt. Dafür wurden die Proteinextrakte im Verhältnis 1:5 mit PBS verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 10 μl in einer 96 *half area plate* mit 100 μl eines Gemischs aus 4%iger Kupfer(II)sulfatlösung und Bicinchoninsäure (BCA) (Mischverhältnis 1:50) versetzt. Während einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C katalysieren die Proteine eine Reduktion von Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen, die wiederum mit

dem BCA einen violetten Farbstoffkomplex bilden. Dessen kolorimetrisch bestimmbare Konzentration ist proportional zur Proteinkonzentration. Mit dem Biotek Epoch Plate Reader wurde die Licht-Extinktion bei 562 nm bestimmt. Über die Extinktionswerte der BCA-Reaktion einer definierten BSA-Standardreihe konnte damit die Proteinkonzentration der Proben berechnet werden.

2.2.3.4 Serumpräparation von murinen Blutproben

Das Blut gesunder weiblicher Balb/c TLR9^{wt/wt} und TLR9^{-/-} Mäuse wurde nach der Herzpunktion auf Eis gelagert und anschließend für 30 min bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert. Das gelbliche Serum wurde vorsichtig abgenommen, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

2.2.3.5 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Konzentration spezifischer Proteine im Zellkulturüberstand oder in Serumproben wurde mit Hilfe des ELISA ermittelt. Die eingesetzten humanen und murinen ELISA Kits wurden nach Herstellerangaben verwendet. Dabei wurde ein spezifischer primärer Antikörper (*capture antibody*) über Nacht auf dem Boden einer 96 *half area* Platte angeheftet, über den das Zielprotein in den untersuchten Proben spezifisch gebunden wurde. Das dadurch auf der Platte immobilisierte Zielprotein wurde daraufhin von einem sekundären, biotinylierten Detektionsantikörper gebunden. Nachdem die Mikrotiterplatte gewaschen wurde, folgte eine Behandlung der Proben mit der Streptavidin-konjugierten Meerrettichperoxidase (HRP). Dieses Enzym bindet an das Biotin des Detektionsantikörpers und wird dadurch an das immobilisierte Zielprotein gekoppelt. Die beiden Komponenten des *Substrate Reagent Pack* (R&D Systems) Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin (TMB) wurden vor dem Gebrauch im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die *wells* der ELISA-Platte pipettiert. In Abhängigkeit der an das Zielprotein gebundenen Meerrettichperoxidase, wird die Reduktion von Wasserstoffperoxid und die Oxidation von TMB katalysiert. Das TMB entwickelt dabei proportional zum gebundenen Protein eine tiefblaue Farbe und wird nach Abstoppen der Reaktion mit Schwefelsäure leuchtend gelb. Anschließend kann über die Extinktion bei 450 nm die Proteinkonzentration der Probe anhand der Standardkurve berechnet werden.

2.2.4 Färbemethoden

2.2.4.1 Färbung muriner 3T3-L1 Zellen

2.2.4.1.1 Oil Red O¹ Lipidfärbung

Um nachzuweisen, dass die differenzierenden Adipozyten lipidhaltige Vakuolen ausgebildet hatten, wurden die Triglyzeride mit Oil Red O rot gefärbt. Dafür wurden die Zellen vor der Färbung in der 12-*well*-Platte zweimal mit je 1 ml 37 °C warmem PBS gewaschen und anschließend für 10 min mit 1 ml 10 % Formaldehyd in PBS fixiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 1 ml 60 % Isopropanol gewaschen und bei RT luftgetrocknet. Die Adipozyten wurden mit der Oil Red O Färbelösung bedeckt und für 20 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit je 1 ml Wasser gewaschen. Um eine Dehydrierung der Adipozyten zu verhindern, wurden die Zellen während der lichtmikroskopischen Analysen mit Wasser bedeckt.

2.2.4.1.2 Fixierung muriner 3T3-L1 Zellen

Für die immunzytochemische Färbung wurde die 3T3-L1 Fibroblasten auf *Chamber Slides* wie zuvor beschrieben acht Tage lang zu reifen Adipozyten differenziert. Nach Abschluss der Differenzierung wurden die reifen Adipozyten mit 500 µl PBS pro *well* gewaschen und 10 min in -20 °C kaltem Aceton fixiert und luftgetrocknet. Anschließend wurden sie bis zur Färbung bei -20 °C gelagert.

2.2.4.1.3 Immunzytochemie

Für die immunzytochemische Färbung wurden die auf Chamber Slides gewachsenen Adipozyten für 10 min in PBS rehydriert. Peroxidasen wurden durch 10 min in 3 % H₂O₂ blockiert. Danach wurden die Zellen mit Wasser gespült und weitere 10 min in PBS gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch eine Inkubation über 45 min in 10 % BSA, 10 % FCS und 10 % Hühnerserum gesättigt. Zum Entfernen der Blockierlösung wurden die Zellen mit PBS gespült.

Der primäre TLR9 Antikörper (ab37154) wurde in einer Konzentration von 5 µg/ml in 1 % BSA auf die Zellen gegeben und für 3 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Für die Isotypkontrolle wurden 5 µg/ml eines polyklonalen rabbit IgGs (ab27478) verwendet. Der primäre Antikörper wurde durch zweimal 5 min in PBS + 0,3 % Triton X-100 und einmal 5 min in PBS abgewaschen.

In einer 90-minütigen Inkubation wurde das Peroxidase-konjugierte goat anti-rabbit IgG (2,5 µg/ml in 1 % BSA; DAKO P0448) an den TLR9-spezifischen Antikörper gekoppelt. Nicht gebundener Antikörper wurde durch zweimal 5 min in PBS mit 0,3 % Triton X-100 abgewaschen. Nach einem 5-minütigen Waschschrift mit PBS wurde die farbgebende Reaktion mit dem 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) Substrat (Vector Laboratories) nach Herstellerangaben induziert. Es wurde während des gesamten Vorgangs streng darauf geachtet, dass die Zellen nicht antrockneten. Das AEC-Substrat wurde nach genau 30 min entfernt und die Zellen wurden in Glyzeringelatine eingebettet.

2.2.4.2 Färbung humaner und muriner Gewebeproben

2.2.4.2.1 Fixierung und Konservierung der Gewebe

Humanes und murines Gewebe wurden unmittelbar nach der Präparation in 4 % Formalin/PBS fixiert. Durch die Behandlung mit Formalin werden Gewebeproteine vernetzt und denaturiert. Lipide sowie Kohlenhydrate, die nicht mit Proteinen assoziiert sind, können dabei nicht vernetzt werden. Das Gewebe wird anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (30 min 50 % EtOH/PBS; 60 min 75 % EtOH/PBS; 2 x 90 min 96 % EtOH/PBS). Danach wurde das Gewebe 2 x 45 min in 100 % Xylol inkubiert. Xylol ist ein Intermedium, das sich sowohl mit Alkohol als auch mit Paraffin mischt. Es folgten eine 60-minütige Inkubation mit 50 % Xylol/Paraffin bei 60 °C und weitere dreimal 60 min in reinem flüssigem Paraffin bei 60 °C. Durch eine Inkubation ü. N. bei 60 °C wurde sichergestellt, dass das Paraffin die Gewebe komplett durchdringt. Schließlich konnten sie in Einbettförmchen eingelegt werden. In den Paraffinblöcken kann das Gewebe anschließend mindestens 10 Jahre lang bei RT gelagert werden.

2.2.4.2.2 Schnittpräparation mit dem Mikrotom

Vor der Schnittpräparation wurden die Paraffinblöcke mindestens 24 h bei 4 °C gelagert. Anschließend wurde der Block mit dem eingebetteten Gewebe an die Kühlapparatur des Mikrotoms gespannt. Die Kryoschnitte wurden mit einer Schnittdicke von 5 µm angefertigt und unmittelbar über eine Rampe in ein warmes Wasserbecken geleitet. Von dort aus wurden sie auf einen Objektträger gebracht und ü. N. bei 37 °C getrocknet.

2.2.4.2.3 Hämatoxylin- und Eosin-Übersichtsfärbung

Zum Entparaffinieren wurden die Kryoschnitte 2 x 10 min in 100 % Xylol, 10 min in 100 % EtOH, 10 min in 96 % EtOH und je 5 min in 80 %, 70 % und 50 % EtOH inkubiert. Anschließend wurde der Objektträger 5 min mit PBS gewaschen. Danach wurden in

einer 7-minütigen Inkubation in Hämalaun die sauren bzw. basophilen Gewebekomponenten (z. B. Zellkerne) blau gefärbt. Nach einem Spülvorgang mit Wasser erfolgte direkt die Eosinfärbung, bei der basische und acidophilen Gewebsstrukturen (Proteine, Zytoplasma, Mitochondrien, Kollagen etc.) rot gefärbt werden. Vor dem Eindeckeln der Präparate wurde erneut eine aufsteigende Alkoholreihe (je 5 min 50 %, 70 %, 96 %, 100 % EtOH) zum Entwässern der Präparate durchgeführt. Nach dreimal 5 min in Xylol konnten die Proben mit Entellan eingedeckelt werden. Die Objektträger wurden mindestens 48 h unter dem Abzug ausgedampft und im Dunkeln bei RT gelagert.

2.2.4.2.4 Immunhistochemische Färbung von TLR9 Protein

Für die immunhistochemische Färbung von TLR9 wurden die Kryoschnitte zunächst entparaffiniert und rehydriert. Dafür wurden sie 2 x 5 min in 100 % Xylol und anschließend je 5 min in 100 %, 96 % und 70 % Ethanol inkubiert. Die Objektträger wurden 2 x 5 min in Wasser gewaschen. Endogene Peroxidasen wurden mit 3 % H₂O₂ in Wasser (5 min) blockiert. Um die Immunreaktivität nach der Formalinfixierung und Paraffineinbettung wieder herzustellen, wurden die Antigen-Epitope mit Citratpuffer (1 h, 60 °C) demaskiert. Nach dem Auskühlen der Proben (30 min) wurden sie 3 x 5 min in Wasser gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einer 5 % BSA-Lösung (1 h; RT; in einer Feuchtekammer) gesättigt. Danach wurden die Gewebe ü. N. mit dem *rabbit anti-mouse/human* TLR9 Antikörper (10 µg/ mL in 1 % BSA; ab37154; Abcam) inkubiert. In einer 90-minütigen Inkubation wurde das Peroxidase-konjugierte *goat anti-rabbit* IgG (2.5 µg/ml in 1 % BSA; DAKO P0448) an den TLR9-spezifischen Antikörper gekoppelt. Nicht gebundener Antikörper wurde durch zweimal 5 min in PBS abgewaschen. Die farbgebende Reaktion mit dem 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) Substrat (Vector Laboratories) wurde daraufhin nach Herstellerangaben induziert. Es wurde während des gesamten Vorgangs streng darauf geachtet, dass die Zellen nicht austrockneten. Das AEC-Substrat wurde nach genau 30 min entfernt und die Zellen wurden in Glyzeringelatine eingebettet. Die Gewebe mussten anschließend mindestens 48 h ausdampfen und konnte anschließend lichtmikroskopisch analysiert werden.

2.2.5 Tiere

2.2.5.1 C57BL/6

C57BL/6 Wildtyp (wt) Mäuse (n = 16; 24–28 g, TaconicArtemis) wurden unter Standardbedingungen gehalten und mit einer Standard-Diät *ad libitum* gefüttert. Für die

Organ- und Gewebsentnahme wurden die Tiere durch Kohlendioxid und anschließendem Genickbruch getötet (gemäß den Bestimmungen in § 4 Abs. 3 Tierschutzgesetz). Das gon und sc Fettgewebe wurden auf Eis gelagert. Unmittelbar nach der Präparation wurden die Adipozyten und die SVF aus den beiden Fettdepots, wie in Kapitel 2.2.1.2.2 beschrieben, isoliert. Separat wurden für Genexpressionsanalysen aus Gesamtfettgewebe gon und sc Gewebeproben unmittelbar in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

C57BL/6 wt Mäuse (n = 3), deren gon Gewebe für die immunhistochemische Färbung verwendet wurde, hatten ein Gewicht von 27-28 g. Die Tiere wurden ebenfalls unter Standardbedingungen gehalten und mit einer Standard-Diät *ad libitum* gefüttert.

Für die Isolation primärer muriner Prä-Adipozyten wurde zusätzlich gon und sc Fettgewebe aus C57BL/6 wt (n = 6, weiblich) und TLR9-defizienten Tieren (jeweils n = 6, weiblich, TLR9^{tm1Aki} (Hemmi *et al.* 2000), mit C57BL/6 genetischem Hintergrund) isoliert. Die Tiere wurden unter Standardbedingungen gehalten und mit einer Standard-Diät *ad libitum* gefüttert. Die Gewebe wurden manuell zerkleinert und bis zum Kollagenaseverdau auf Eis gelagert.

Die Tierzucht/-haltung und die Gewebsentnahmen wurden an der Universität Gießen und der Universität Regensburg durchgeführt.

2.2.5.2 Balb/c

Serum und Fettgewebeproben für ELISA-Analysen und TLR9-mRNA Expressionsanalysen wurden außerdem aus Balb/c TLR9^{wt/wt} (Charles River) und TLR9-defizienten (TLR9^{tm1Aki}) Mäusen (n = 11 pro Genotyp; weiblich, 20-22 g schwer) postmortal entnommen. Die Tiere wurden freundlicherweise von Dr. F. Obermeier (Regensburg, Germany) und Dr. Shizuo Akira (Osaka, Japan) für die Analysen zur Verfügung gestellt. Vor der Verwendung für diese Analysen erfolgte eine Rückkreuzung der Mäuse über mindestens 7 Generationen auf den genetischen Hintergrund des BALB/c Stammes (Hofmann *et al.* 2014, Karrasch *et al.* 2015).

2.2.6 Patienten und Studien-Kohorte

Humane sc und vis Fettgewebeproben wurden während einer bariatrischen Operation innerhalb der *Research and Registry in Obesity and Bariatric Surgery* (ROBS) Studien-Kohorte der Uniklinik Gießen gewonnen. Die 21 Patientinnen waren zwischen 20-57 Jahre alt. Das durchschnittliche Alter lag bei 38.2 ± 2.5 Jahren. Die Patientinnen sind bei BMI-Werten von 44.8-63.6 kg/m² durchgängig adipös (mittlerer BMI: 52.0 ± 1.1 kg/m²). Alle klinischen und experimentellen Arbeiten wurden an dem

Universitätsklinikum Gießen durchgeführt und wurden von der lokalen Ethikkommission genehmigt.

2.2.7 Statistische Analyse

Für die statistische Auswertung wurden die in den Überständen der Zellkulturproben gemessenen Proteinkonzentrationen stets auf den jeweiligen Gesamtproteingehalt der Zellysate normalisiert. Genexpressionsdaten von Zielgenen wurden, wie in Kapitel 2.2.2.5 beschrieben, jeweils auf ein Referenzgen normalisiert.

Das Softwareprogramm SPSS (IBM, Version 22.0) wurde für die statistische Auswertung und Diagrammerstellung verwendet. Ausreißer, die größer/kleiner als der doppelte Betrag der Standardabweichung vom jeweiligen Mittelwert waren, wurden von der Analyse ausgeschlossen. Die Mittelwerte wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U-Test für zwei unabhängige Variablen verglichen. Korrelationen wurden mit dem Spearman-Rho Test für lineare Variablen berechnet. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen. In den Balkendiagrammen sind die Mittelwerte durch die Größe der Balken und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) durch die Whisker gekennzeichnet. In dem Boxplot-Diagramm ist der Median innerhalb der Box dargestellt, welche die beiden mittleren Quartile gekennzeichnet. Die Whisker bezeichnen die Werte innerhalb des 1. und des 4. Quartils, deren Abweichung das 1,5-fache der Streubreite der beiden mittleren Quartile nicht übersteigen. Ausreißer außerhalb dieser Intervalle sind als kleine Kreise bzw. in Sternform dargestellt.

3 Ergebnisse

Ein Großteil der hier aufgeführten Ergebnisse wurden im Februar 2019 im *Journal of Endocrinology* von Thomalla *et al.* veröffentlicht ¹⁶⁴.

3.1. TLR9-Expression in Adipozyten

3.1.1. TLR9-Expression während der Differenzierung muriner 3T3-L1-Adipozyten

Um die Hypothese, dass Adipozyten den Toll-like Rezeptor 9 exprimieren, zu belegen, wurden Genexpressionsanalysen von murinen 3T3-L1 Zellen während ihrer adipozytären Differenzierung durchgeführt. In drei unabhängigen Ansätzen wurde *in vitro* die Adipogenese von 3T3-L1 Zellen eingeleitet. Am Tag des Differenzierungsstarts sowie drei, fünf, sieben und neun Tage nach Beginn der Differenzierung wurde mRNA aus Gesamtzelllysaten (je $n = 6$) für *real time* PCR-basierte Genexpressionsanalysen isoliert. Die TLR9-Expression wurde dabei auf das während der adipozytären Differenzierung konstitutiv exprimierte Gen GAPDH normalisiert. Für eine erleichterte Handhabung wurden die daraus resultierenden kleinen Dezimalzahlen mit dem Faktor von 1 Mio. (1×10^6) multipliziert. Die Ausbildung des adipozytären Phänotyps wurde lichtmikroskopisch überwacht. Die TLR9 Transkriptionslevel korrelieren positiv mit dem Fortschritt der adipozytären Differenzierung (Abbildung 7).

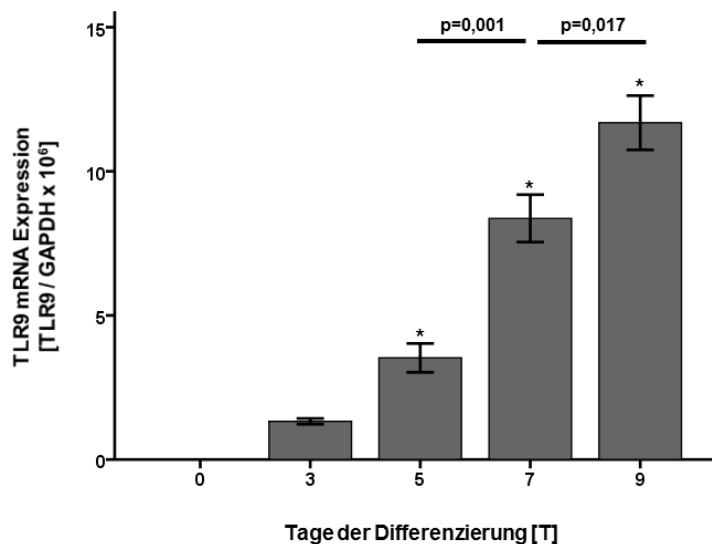


Abbildung 7: Die TLR9 Genexpression in murinen 3T3-L1 Zellen ist in der adipozytären Differenzierung induziert ¹⁶⁴. Die mRNA der Prä-Adipozyten wurde während der hormonellen Differenzierung, zu den angegebenen Zeitpunkten aus Gesamtzelllysaten isoliert und revers transkribiert ($n = 7-17$ pro Ansatz). Mittels *real time* PCR wurde die TLR9 mRNA in Relation zur GAPDH mRNA $\times 10^6$ analysiert. Zu Beginn der Differenzierung konnte keine TLR9-Expression in den Prä-Adipozyten (Tag 0) detektiert werden. Im Verlauf der Adipogenese (Tag 3 bis Tag 9) ist die Expression signifikant induziert und

3 Ergebnisse

erreicht ihr Maximum an Tag 9 mit Vollendung der Adipogenese. Die Fehlerbalken kennzeichnen $\pm 1 \times$ Standardfehler des Mittelwertes (SEM); * $p < 0,002$ versus Tag 3.

3T3-L1-Zellen, die nicht hormonell behandelt wurden (Tag 0), exprimieren keine TLR9-mRNA. Während der Adipogenese ist die Expression stufenweise induziert (Tag 3 bis Tag 9). Das Expressionsniveau ist *versus* Tag 3 zu jedem folgenden Zeitpunkt signifikant induziert. Zudem ist jeder Messpunkt gegenüber dem jeweils vorhergehenden Zeitpunkt signifikant erhöht. Reife Adipozyten (neun Tage nach Beginn der Differenzierung) erreichen innerhalb dieser Versuchsreihe das maximale TLR9 mRNA-Transkriptionslevel (Abbildung 7). Sie exprimieren nahezu neun Mal mehr TLR9 mRNA als an Tag 3.

Den Genexpressionsanalysen zufolge kann TLR9 mRNA bei Prä-Adipozyten drei Tage nach Differenzierungsstart detektiert werden und wird von reifen Adipozyten am stärksten exprimiert. Immunzytochemische Analysen von TLR9 Protein in den murinen 3T3-L1 Adipozyten sollten diese Beobachtung auf Proteinebene verifizieren. Die Prä-Adipozyten wurden jeweils drei und neun Tage lang auf Kammerobjektträgern kultiviert, anschließend fixiert und gefärbt. Für die ICC wurde ein polyklonaler anti-TLR9 AK (aus Kaninchen) und ein sekundärer HRP-konjugierte AK verwendet. Zur Visualisierung der Zellkerne erfolgte zusätzlich eine Hämatoxylin-Färbung (lila). Spezifisch gebundenes TLR9 Protein (rot) konnte im Zytoplasma beider Differenzierungsstadien nachgewiesen werden (Abbildung 8 A, D). Alles in allem ist die Farbintensität der ICC bei den Adipozyten ausgeprägter als bei den Prä-Adipozyten. Die Färbung ist bei beiden Differenzierungsstadien um den Zellkern herum deutlich intensiver. Anders als bei den Prä-Adipozyten, ist die Immunfärbung im Zytoplasma der reifen Adipozyten granulär. Innerhalb des Zellkerns und der Lipidvakuolen wurde kein Protein von dem AK gebunden. Am unmittelbaren Grenzbereich der Fetttröpfchen ist die Färbung teilweise besonders intensiv (Abbildung 8 A, D). Mit der Isotyp-Kontrolle (IT-Kontrolle) sollte ausgeschlossen werden, dass der sekundäre AK unspezifisch an Epitope aus dem Wirtsorganismus des primären Antikörpers bindet. Dafür wurde anstelle des TLR9 Antikörpers eine unspezifische IgG-Lösung (Isotyp-Kontrolle) eingesetzt. Es kam zu keiner unspezifischen AK-Färbung (Abbildung 8 B, E). Kreuzreaktionen des sekundären Antikörpers mit murinen Epitopen wurden ausgeschlossen, indem man auf die Vorbehandlung mit Kaninchen-IgGs verzichtete und nur den sekundären AK einsetzte (AK II-Kontrolle). Bei dieser Behandlung wurden keine zellulären Strukturen gefärbt (Abbildung 8 C, F).

3 Ergebnisse

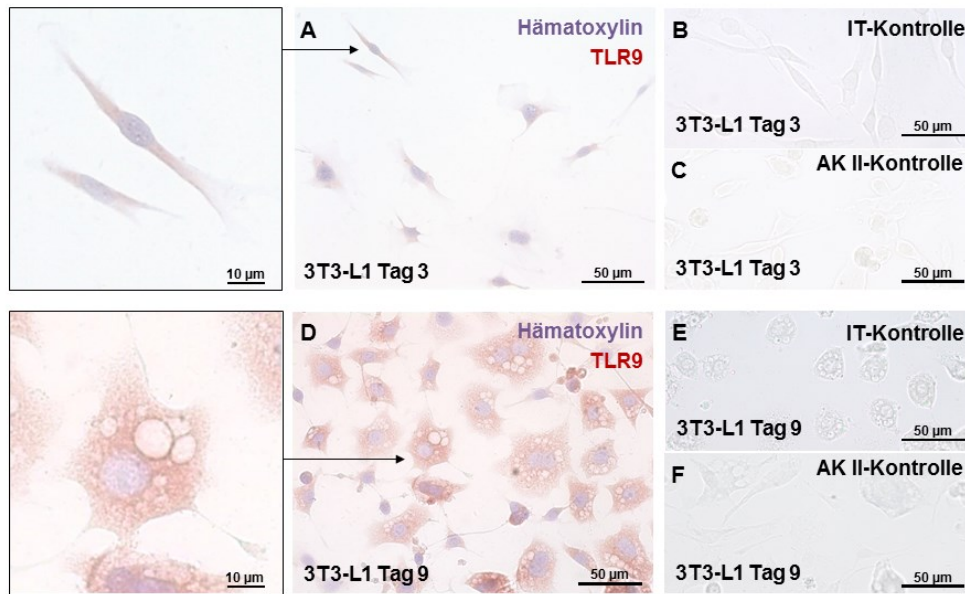


Abbildung 8: Lichtmikroskopie von murinen 3T3-L1 Zellen nach immunzytochemischer Färbung von zytoplasmatisch lokalisiertem TLR9-Protein (rot). Abgebildet ist jeweils eine repräsentative Aufnahme der murinen Prä-Adipozyten, die drei (A) / neun Tage (D) auf Kammerobjektträgern zu Adipozyten differenziert wurden. Für die Immunzytochemie (ICC) wurden ein polyklonaler TLR9-Antikörper (AK) (Abcam) und ein sekundärer Peroxidase-konjugierter AK (DAKO) verwendet. Zellkerne wurden mit Hämatoxylin (lila) gefärbt. Es ist keine unspezifische Färbung detektierbar, wenn der primäre AK durch einen Isotyp (IT) –AK ausgetauscht wird (IT-Kontrolle: B, E). Ohne Behandlung mit dem primären AK ist keine unspezifische Färbung detektierbar (AK II-Kontrolle: C, F). Modifiziert nach Thomalla *et al.* ¹⁶⁴.

3.1.2. TLR9-Expression in murinem Fettgewebe

Nach dem erfolgreichen *in vitro* Nachweis von TLR9, sollte die Expression des Rezeptors auch *in vivo* verifiziert werden. Dafür wurden sc und gon Fettgewebeproben aus gesunden, unbehandelten BALB/c Mäusen entnommen. Die mRNA wurde aus Gesamtzelllysaten des jeweiligen Fettdepots isoliert und *via real time* PCR analysiert. Das TLR9 mRNA Expressionsniveau wurde auf das konstitutiv exprimierte Gen GAPDH normiert. Für eine erleichterte Handhabung wurden die daraus resultierenden kleinen Dezimalzahlen mit dem Faktor von 1 Mio. (1×10^6) multipliziert. Sowohl sc als auch viszeral wurde eine signifikante TLR9 mRNA Expression detektiert (Abbildung 9). Dabei konnte kein spezifischer Unterschied des Expressionsniveaus zwischen den beiden Fettdepots detektiert werden.

3 Ergebnisse

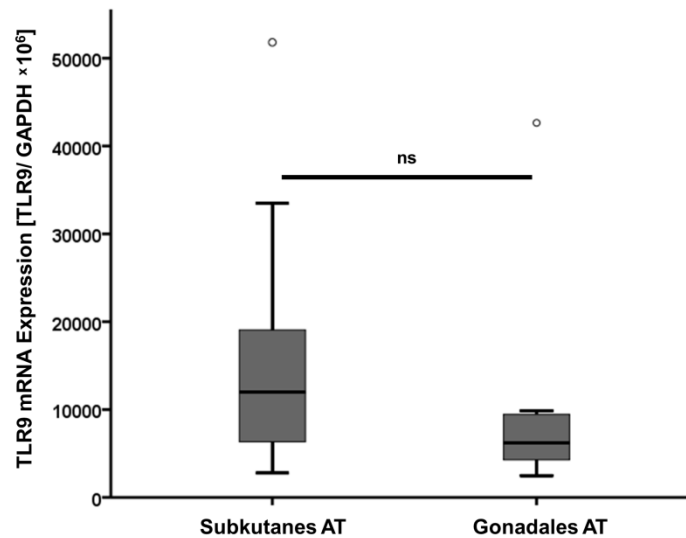


Abbildung 9: TLR9 mRNA Expressionsniveau in subkutanen und gonadalen Fettgewebe (AT) aus normalgewichtigen BALB/c Mäusen ¹⁶⁴. Die mRNA wurde aus Gesamtzelllysaten des jeweiligen Fettdepots isoliert (jeweils n=10). Nach der reversen Transkription wurden TLR9-Genexpressionsanalysen mittels *real time* PCR durchgeführt und in Relation zur GAPDH mRNA Expression $\times 10^6$ gesetzt. Nicht signifikant (n. s.).

Immunhistochemische Analysen sollten die TLR9-Proteinexpression in den Adipozyten *in vivo* verifizieren. Gonadale Gewebeproben aus C57BL/6 Mäusen wurden unmittelbar nach Entnahme fixiert und für die IHC in Paraffin-eingebettet. Unter Verwendung des polyklonalen anti-TLR9 AK und des sekundären HRP-konjugierten AK, konnte spezifisch gebundenes TLR9 Protein (rot) im Zytoplasma des murinen gon Fettgewebes nachgewiesen werden (Abbildung 10 A). Die Zellkerne der univakuolären Adipozyten wurden durch eine Hämatoxylin-Färbung visualisiert (lila).

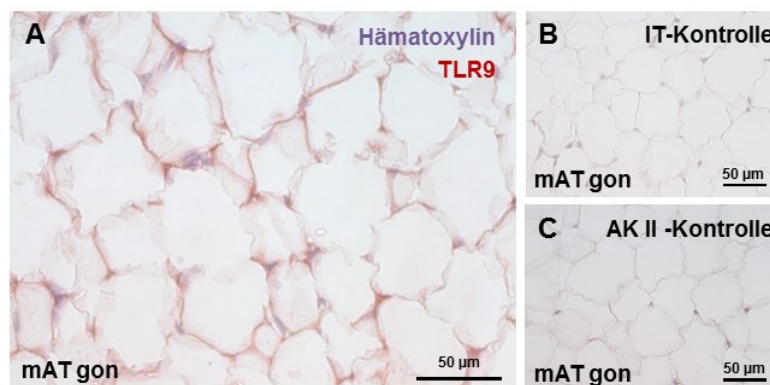


Abbildung 10: Lichtmikroskopie von gonadalem (gon) Fettgewebe (AT) nach immunhistochemischer TLR9 Proteinfärbung. Das murine (m) Gewebe wurden unverzüglich nach Entnahme aus C57BL/6 Tieren fixiert und in Paraffin eingebettet. Unter Verwendung des polyklonalen TLR9-Antikörpers (AK) und des sekundären Peroxidase-konjugierten AK wurde das TLR9-Protein rot gefärbt (A). Zellkernfärbung mit Hämatoxylin (lila). Behandlung mit speziesspezifischem Isotyp-AK (IT-Kontrolle) induzierte keine chromogene Reaktion (B). Kreuzreaktionen des sekundären AK mit murinen Epitopen wurden durch Behandlung mit ausschließlich sekundärem AK ausgeschlossen (AK II -Kontrolle) (C). Modifiziert nach Thomalla *et al.* ¹⁶⁴.

3 Ergebnisse

Bei der Behandlung mit Isotyp-Kontrollantikörpern (IT-Kontrollen), kam es zu keiner unspezifischen Färbung (Abbildung 10 B). Kreuzreaktionen des sekundären Antikörpers mit murinen Epitopen wurden durch eine Behandlung mit ausschließlich sekundärem Antikörper (AK II-Kontrolle) ausgeschlossen. Hier wurde keine chromogene Reaktion ausgelöst (Abbildung 10 C).

TLR9 wird bekanntermaßen von Immunzellen exprimiert. Diese sind neben diversen anderen Zelltypen ein wesentlicher Bestandteil der SVF des Fettgewebes. Für eine Gegenüberstellung wurden aus gon und sc Fettgewebe unbehandelter C57BL/6 Mäuse die Adipozyten und die SVF getrennt isoliert und jeweils für *real time* PCR-basierte TLR9-Genexpressionsanalysen verwendet. Dabei wurde die TLR9-mRNA Expression auf das konstitutiv exprimierte Gen GAPDH normiert. Für eine erleichterte Handhabung wurden die daraus resultierenden kleinen Dezimalzahlen mit dem Faktor von 1 Mio. (1×10^6) multipliziert. Die SVF exprimiert TLR9 mRNA in hohen Konzentrationen. Zugleich wurde auch in den Adipozyten eine signifikante TLR9 mRNA Expression detektiert (Abbildung 11). Während gon und sc Adipozyten etwa gleich stark TLR9 mRNA exprimieren, ist das Transkriptionslevel der SVF des sc Gewebes gegenüber der SVF des gon Gewebes signifikant erhöht.

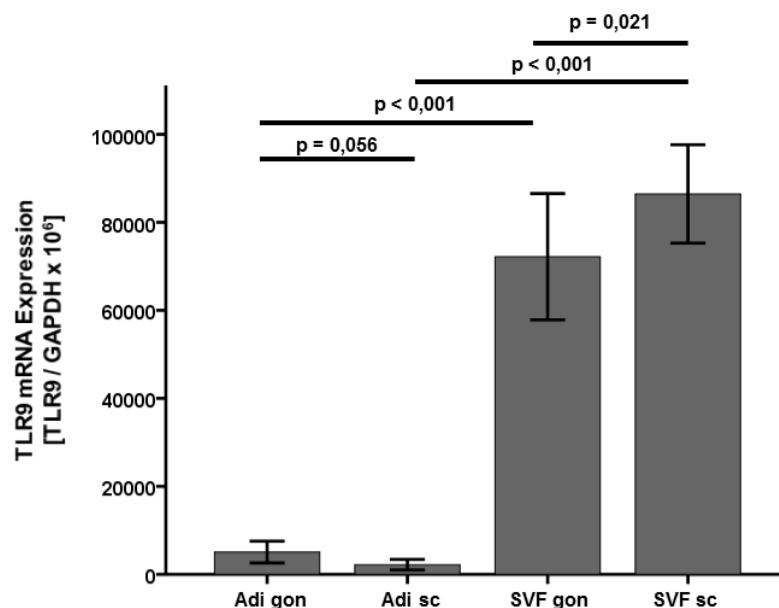


Abbildung 11: Relative TLR9 mRNA Expression in Adipozyten und stroma-vasculärer Fraktion (SVF), isoliert aus gonadalem (gon) und subkutanem (sc) Fettgewebe (AT) von C57BL/6 Mäusen¹⁶⁴. Reverse transkribierte mRNA aus Gesamtzelllysaten wurde für die Analyse von TLR9 mRNA, in Relation zu GAPDH mRNA $\times 10^6$, verwendet. Die Fehlerbalken kennzeichnen $\pm 1 \times$ Standardfehler des Mittelwertes (SEM); n = 16 in allen Ansätzen.

3.1.3 TLR9-Expression in humanem Fettgewebe

Humane Gewebeproben wurden im Rahmen der ROBS (Research and Registry in Obesity and Bariatric Surgery) Studie unter Einverständnis der Patienten gewonnen. Resektate aus sc und vis Fettgewebe wurden während einer bariatrischen Operation entnommen (n=21; durchschnittlicher BMI: $52,0 \pm 1,1 \text{ kg/m}^2$ (zwischen 44,8 und $63,6 \text{ kg/m}^2$); Durchschnittsalter: $38,2 \pm 2,5$ Jahre (zwischen 20 und 57 Jahren)). Diabetiker und Patienten unter diabetischer Medikation (z. B. Metformin, DPP4 Inhibitoren) wurden nicht in die Analysen eingeschlossen. Die mRNA wurde aus Gesamtzelllysaten des jeweiligen Fettdepots isoliert und *via real time* PCR analysiert. Die TLR9 mRNA Expression wurde auf das konstitutiv exprimierte Gen GAPDH normiert. Für eine erleichterte Handhabung wurden die daraus resultierenden kleinen Dezimalzahlen mit dem Faktor von 1 Mio. (1×10^6) multipliziert. In beiden Fettdepots wurde eine signifikante TLR9 mRNA Expression detektiert, wobei das Expressionsniveau in vis Fettgewebe gegenüber dem sc Fettgewebe signifikant erhöht war ($p < 0,001$; Abbildung 12).

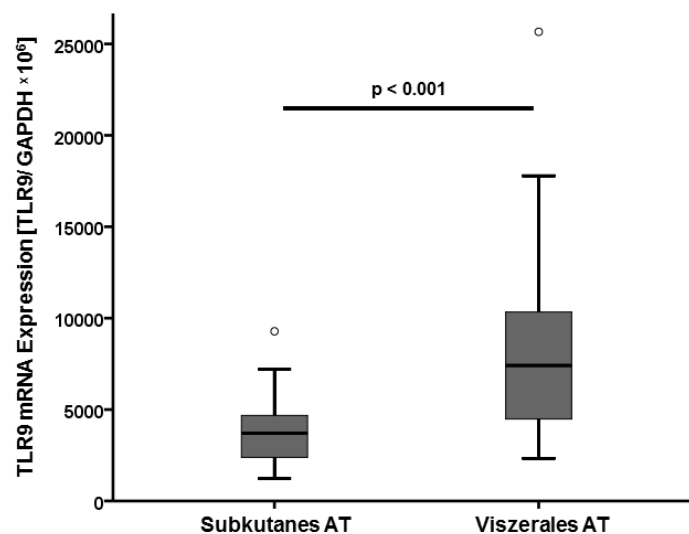


Abbildung 12: TLR9 mRNA Expressionsniveau in subkutanen und viszeralen Fettgewebe (AT) aus Adipositaspatientinnen¹⁶⁴. Fettgewebeproben wurden von 21 Patientinnen im Verlauf einer bariatrischen Operation gewonnen (Nichtdiabetiker; durchschnittlicher BMI: $52,0 \pm 1,1 \text{ kg/m}^2$ (zwischen 44,8 und $63,6 \text{ kg/m}^2$); Durchschnittsalter: $38,2 \pm 2,5$ Jahre (zwischen 20 und 57 Jahren)). Die mRNA wurde aus Gesamtzelllysaten des jeweiligen Fettdepots isoliert. Nach der reversen Transkription wurden TLR9-Genexpressionsanalysen mittels *real time* PCR durchgeführt und in Relation zur GAPDH mRNA Expression $\times 10^6$ gesetzt.

Humanes Gewebe wurde für die IHC analog zu den murinen Proben behandelt (siehe Abschnitt 3.1.2). Mit dem polyklonalen anti-TLR9 AK wurde TLR9 Protein spezifisch gebunden (rot). Es konnte im Zytoplasma der sc und der vis Adipozyten nachgewiesen werden (Abbildung 13 A, B). Die Zellkerne der univakuolären Adipozyten wurden durch

3 Ergebnisse

eine Hämatoxylin-Färbung visualisiert (lila). Bei der Behandlung mit Isotyp-Kontrollantikörpern (IT-Kontrollen) kam es zu keiner unspezifischen Färbung (Abbildung 13 C, E). Kreuzreaktionen des sekundären Antikörpers mit humanen Epitopen wurden ausgeschlossen, indem man auf die Vorbehandlung mit Kaninchen-IgGs verzichtete und nur den sekundären AK einsetzte (AK II-Kontrolle). Bei diesen Kontrollansätzen wurden keine chromogenen Reaktionen ausgelöst (Abbildung 13 D, F).

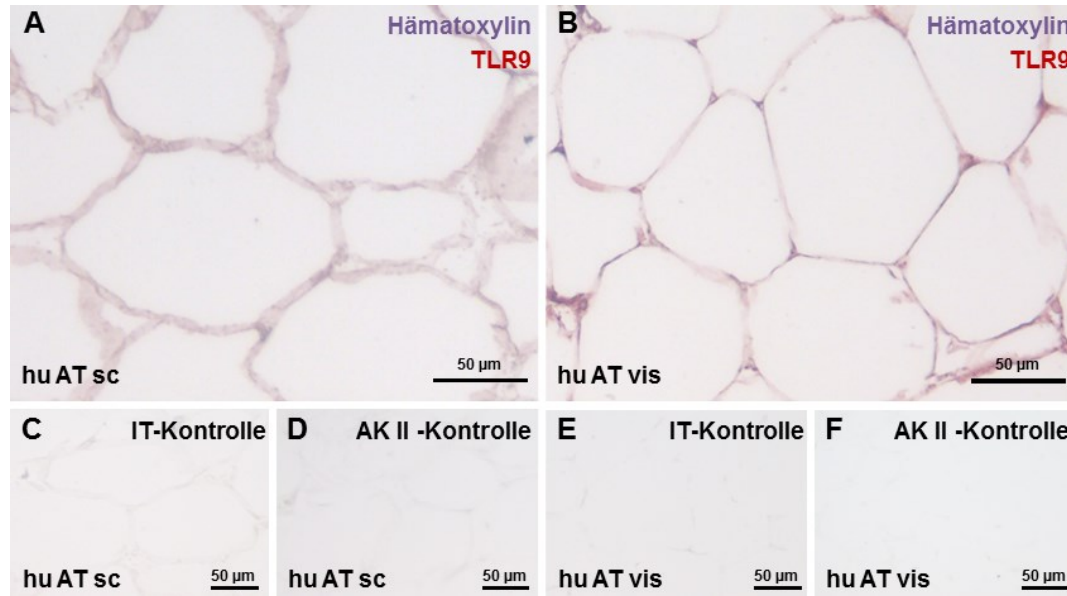


Abbildung 13: Lichtmikroskopie von humanem (hu) subkutanem (sc) und viszeralem (vis) Fettgewebe (AT) nach immunhistochemischer Färbung von TLR9-Protein. Gewebe wurden im Rahmen einer bariatrischen Operation entnommen, fixiert und für die Immunhistochemie in Paraffin eingebettet. Unter Verwendung des polyklonalen TLR9-Antikörpers (AK; Abcam) und des sekundären Peroxidase-konjugierten Antikörpers (DAKO) wurde TLR9-Protein rot gefärbt (A, B). Zellkernfärbung mit Hämatoxylin (lila). Behandlung mit speziesspezifischem Isotyp-AK (IT-Kontrolle) löste keine chromogene Reaktion aus (C, E). Kreuzreaktionen des sekundären AKs mit murinen Epitopen wurden durch Behandlung mit ausschließlich sekundärem AK ausgeschlossen (AK II-Kontrolle) (D, F). Modifiziert nach Thomalla *et al.* ¹⁶⁴.

3.1.4 Bivariate Korrelation der Fettgewebs-spezifischen TLR9-Expression mit physiologischen und anthropometrischen Parametern bei Adipositas

Im Anschluss an den erfolgreichen Nachweis der TLR9-Expression in humanen Fettgewebe sollte der Zusammenhang des TLR9-Expressionsniveaus und der Konzentration von Adiponektin, MCP-1 und Resistin im Serum untersucht werden. Von $n = 21$ Patientinnen wurden vor bzw. im Verlauf einer bariatrischen Operation Serum- und Fettgewebsproben gewonnen (siehe Kapitel 2.2.6). Die bivariaten Korrelationsanalyse nach Spearman (Tabelle 54) ergab eine signifikante negative Korrelation des Resistinspiegels im Serum und der TLR9 Genexpression in sc Fettgewebe ($r = 0,512$; $p = 0,018$). Im Gegensatz dazu korreliert das Serumresistin

3 Ergebnisse

signifikant positiv mit der TLR9 Genexpression in vis Fettgewebe ($r = 0,539$; $p = 0,012$) (Abbildung 14).

Tabelle 5: Bivariate Korrelation nach Spearman Rho der TLR9-Genexpression in subkutanen (sc) und viszeralen (vis) Fettgewebe mit physiologischen Parametern. Im Verlauf einer bariatrischen Operation wurden die Serum- und Fettgewebeproben von 21 Patientinnen gewonnen (Nichtdiabetiker; durchschnittlicher BMI: $52,0 \pm 1,1 \text{ kg/m}^2$ (zwischen 44,8 und $63,6 \text{ kg/m}^2$); Durchschnittsalter: $38,2 \pm 2,5$ Jahre (zwischen 20 und 57 Jahren)). Ermittlung der Proteinkonzentration im Serum via ELISA. Genexpressionsanalysen waren *real time* PCR-basiert. r = Korrelationskoeffizient

Serumprotein	sc TLR9 mRNA Expression	vis TLR9 mRNA Expression
Adiponektin	$r = 0,026$ $p = 0,915$	$r = 0,329$ $p = 0,156$
MCP-1	$r = 0,281$ $p = 0,244$	$r = 0,379$ $p = 0,11$
Resistin	$r = -0,512^*$ $p = 0,018$	$r = 0,539^*$ $p = 0,012$

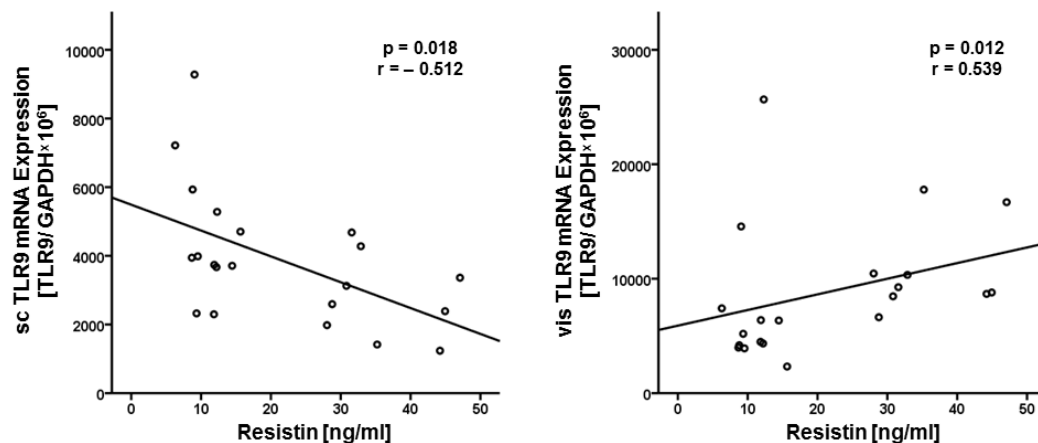


Abbildung 14: Systemische Resistinkonzentration in Korrelation mit der TLR9 mRNA Expression in subkutanem (sc) (A) und viszeralem (vis) Fettgewebe (B) ¹⁶⁴. Serum- und Fettgewebeproben wurden von 21 Patientinnen im Verlauf einer bariatrischen Operation gewonnen (Nichtdiabetiker; durchschnittlicher BMI: $52,0 \pm 1,1 \text{ kg/m}^2$ (zwischen 44,8 und $63,6 \text{ kg/m}^2$); Durchschnittsalter: $38,2 \pm 2,5$ Jahre (zwischen 20 und 57 Jahren)). Die Konzentration von Resistin im Blutserum wurde via ELISA detektiert. Für TLR9-Genexpressionsanalysen wurde mRNA aus beiden Fettdepots reverse transkribiert und in Relation zu GAPDH $\times 10^6$ analysiert. r = Korrelationskoeffizient.

Die bivariate Korrelation der TLR9-Genexpression in den beiden Fettdepots mit anthropometrischen Parametern (BMI, Gewicht, Hüftumfang, Körperfett) ergab eine statistisch signifikante Korrelation der viszeralen TLR9 mRNA Expression mit dem Hüftumfang ($r = 0,441$; $p = 0,045$; Abbildung 15).

3 Ergebnisse

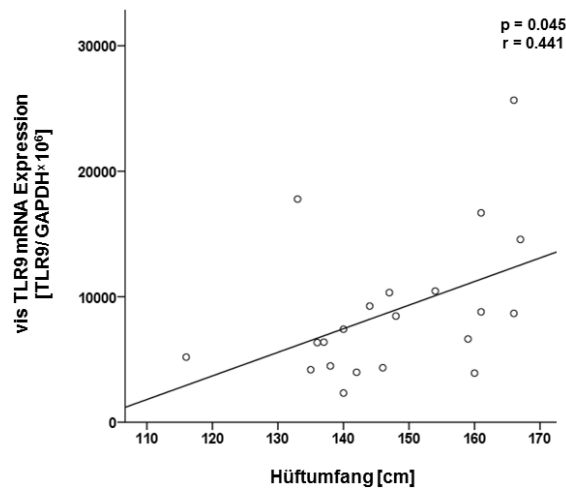


Abbildung 15: Bivariate Korrelation nach Spearman der TLR9 mRNA Expression in viszeralem Fettgewebe und des Hüftumfangs bei Adipositas. Viszerale Fettgewebe wurden von 21 Patientinnen im Verlauf einer bariatrischen Operation gewonnen (Nichtdiabetiker; durchschnittlicher BMI: $52,0 \pm 1,1 \text{ kg/m}^2$ (zwischen $44,8$ und $63,6 \text{ kg/m}^2$); Durchschnittsalter: $38,2 \pm 2,5$ Jahre (zwischen 20 und 57 Jahren)). Für TLR9-Genexpressionsanalysen wurde mRNA aus dem viszeralen Gewebe reverse transkribiert und in Relation zu GAPDH $\times 10^6$ analysiert. r = Korrelationskoeffizient.

3.2. Die funktionale Rolle von TLR9 während der adipozytären Differenzierung

In Abschnitt 3.1.1 ist ein Zusammenhang zwischen der TLR9 mRNA Expression und der Adipogenese beschrieben. TLR9-Transkriptionslevel steigen dabei mit fortschreitender Ausbildung des adipozytären Phänotyps. Im Folgenden sollte deshalb *vice versa* der Einfluss von TLR9 auf die adipozytäre Differenzierung untersucht werden. Dafür wurde in Prä-Adipozyten während der hormonell induzierten Adipogenese zusätzlich ein siRNA-vermittelter Knockdown von TLR9 ausgelöst. Um den Knockdown über den gesamten Zeitraum der Adipogenese zu gewährleisten, wurde wiederholt mit TLR9 siRNA transfiziert (Tag 0, 3, 6, 8). Als Kontrolle wurden Prä-Adipozyten mit siRNA behandelt, die nicht spezifisch an TLR9-mRNA bindet. Das Monitoring der Ausbildung eines adipozytären Phänotyps erfolgte lichtmikroskopisch. Durch den TLR9-Knockdown wurde die Lipidakkumulation in den Adipozyten gehemmt. Mit TLR9-spezifischer siRNA behandelte Zellen haben deutlich weniger Lipidvakuolen ausgebildet (Abbildung 16).

Zur Verifizierung dieses Effektes wurden mit Hilfe des fettlöslichen Oil Red O'-Farbstoffes intrazelluläre Lipide und Triglyceride in den 3T3-L1 Adipozyten rot gefärbt (Abbildung 16 C, F). Verglichen mit den Kontroll-Zellen haben TLR9 siRNA behandelte Zellen weniger Lipide eingelagert, wobei insgesamt auch weniger Zellen in der Lage waren, die für Adipozyten charakteristischen Lipidvakuolen auszubilden.

3 Ergebnisse

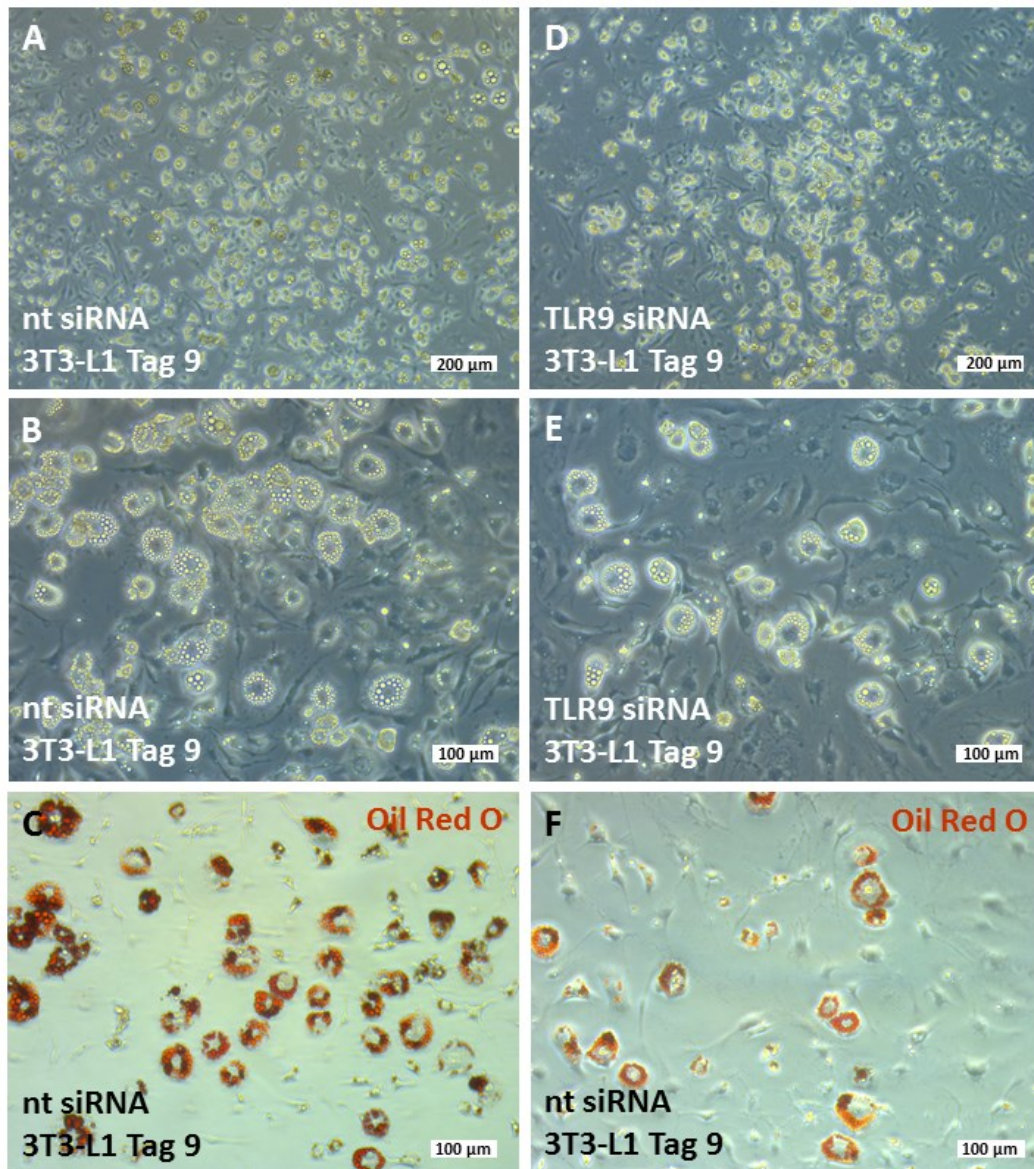


Abbildung 16: Lichtmikroskopie von 3T3-L1 Adipozyten nach wiederholtem TLR9 siRNA Knockdown (D-F). Als Kontrolle wurden Zellen mit *non-targeting* (nt) siRNA behandelt (A-C). Adipozytäre Lipidvakuolen wurden mit Oil Red O gefärbt (rot) (C, F)¹⁶⁴. Der TLR9-Knockdown (an Tag 0, 3, 6, 8) inhibiert die Lipidakkumulation in murinen 3T3-L1 Adipozyten. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen von jeweils n = 6 unabhängigen Experimenten.

Dieser durch den TLR9-Knockdown verursachte inhibierende Effekt auf die Ausbildung des adipozytären Phänotyps sollte zusätzlich auf Genexpressionsebene verifiziert werden. Nach der siRNA Transfektion wurde deshalb mRNA aus Gesamtzelllysaten isoliert und revers transkribiert. Das Expressionsniveau von Adiponektin, Resistin und Leptin, als Marker der fortgeschrittenen adipozytären Differenzierung, wurde in Relation zum konstitutiv exprimierten Gen GAPDH mittels *real-time* PCR analysiert. Durch den TLR9-Knockdown wurde die Expression von Adiponektin verglichen mit dem Kontroll-Ansatz (nt siRNA) signifikant reduziert (Abbildung 17 A). Der Knockdown hatte

3 Ergebnisse

keine signifikanten Effekte auf die Leptin und Resistin Expressionslevel (Abbildung 17 B, C).

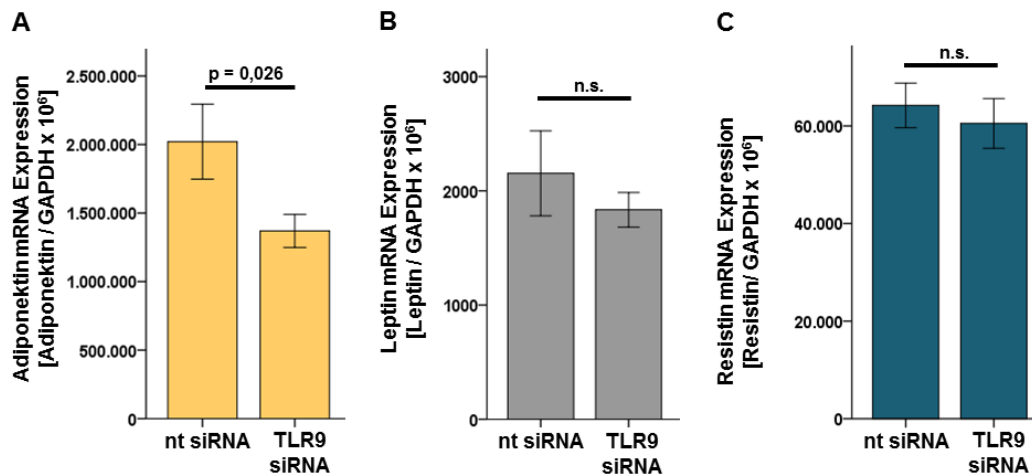


Abbildung 17: Adiponektin-, Leptin- und Resistin- Genexpressionsanalysen in Gesamzelllysaten von murinen 3T3-L1 Adipozyten. siRNA-vermittelter TLR9-Knockdown inhibiert die Adiponektinexpression signifikant (A), hat aber keinen Effekt auf die Leptin- (B) und Resistin-Expression (C). Die murinen 3T3-L1 Prä-Adipozyten wurden neun Tage hormonell differenziert und wiederholt (an Tag 0, 3, 6, 8) mit 100 nM non-target siRNA (nt siRNA) oder mit 100 nM TLR9 siRNA Cocktail (Ambion Life Technologies, #175054, #175055, #175056) Lipofectamin-basiert transfiziert. Nach der reversen Transkription wurde mittels *real-time* PCR die TLR9 mRNA in Relation zur GAPDH mRNA x 10⁶ analysiert. Die Fehlerbalken kennzeichnen $\pm 1 \times$ Standardfehler des Mittelwertes (SEM); n = 5-6 pro Ansatz. n. s. = nicht signifikant. Modifiziert nach Thomalla *et al.* ¹⁶⁴.

Entsprechende Untersuchungen in TLR9^{wt/wt} und TLR9^{-/-} Mäusen sollten die Ergebnisse der Zellkultur verifizieren. Aus diesem Grund wurden ELISA-basierte Analysen von Adipokinen im Serum von BALB/c Mäusen durchgeführt. Wie schon bei dem siRNA Knockdown war die Konzentration des Serum-Adiponektins in den TLR9^{-/-} Mäusen gegenüber den TLR9^{wt/wt} signifikant erniedrigt, während die Resistinlevel in den Wildtyp- und Knockout-Tieren in etwa gleich hoch waren (Abbildung 18).

3 Ergebnisse

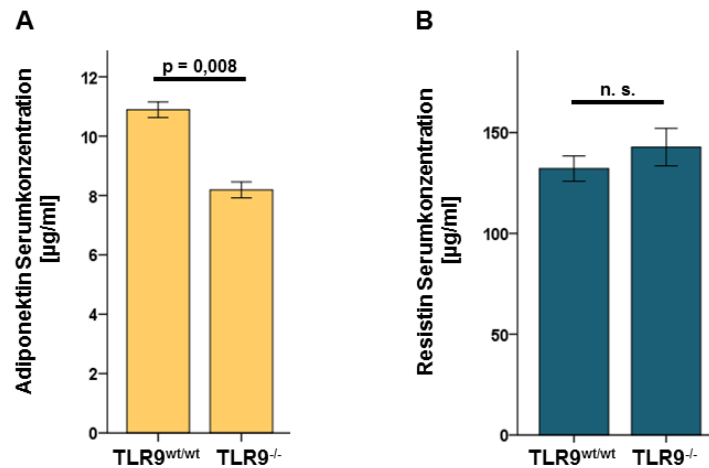


Abbildung 18: Adiponektin- und Resistinkonzentration im Serum von BALB/c TLR9^{wt/wt} und TLR9^{-/-} Mäusen. Die Konzentration von Adiponektin im Serum von TLR9^{-/-} Mäusen ist gegenüber TLR9^{wt/wt} signifikant reduziert (A). Die Konzentration von Resistin im Serum von TLR9^{-/-} Mäusen ist gegenüber TLR9^{wt/wt} unverändert (B). Serumlevel der Adipokine wurden in den Wurfgeschwistern mittels ELISA bestimmt. Die Fehlerbalken kennzeichnen $\pm 1 \times$ Standardfehler des Mittelwertes (SEM); n = 5 pro Kategorie. Nicht signifikant (n. s.). Modifiziert nach Thomalla *et al.* ¹⁶⁴.

3.3 Der Einfluss von TLR9-Agonisten (CpG-ODNs) auf das Sekretionsprofil von Adipozyten

3.3.1 Stimulation von murinen 3T3-L1 Adipozyten mit TLR9-Agonisten

Nach dem Nachweis von TLR9 mRNA sowie Protein sollte seine Funktionalität in Adipozyten analysiert werden. Dafür wurden murine 3T3-L1 Fibroblasten, wie zuvor beschrieben, acht Tage hormonell differenziert und anschließend über 18 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von TLR9 Agonisten behandelt. Eine Kontrolle der Zellvitalität erfolgte über lichtmikroskopische Bildgebung und über die Analyse freigesetzter Laktat-Dehydrogenase (LDH) in den Zellkulturüberstand. Alle hier gezeigten Behandlungen waren in diesem Zytotoxizitätsscreening unauffällig.

Synthetische TLR9-Liganden, die sogenannten CpG ODNs, werden je nach Struktur und Anordnung der Nukleinsäuren, in verschiedene Klassen unterteilt. Folgend wurde die Wirkung der Klasse A (ODN 1585), Klasse B (ODN 1826) und Klasse C (ODN 2395) Agonisten auf Adipozyten untersucht. Die jeweiligen Kontroll-ODNs haben dabei dieselbe Struktur, enthalten jedoch anstelle des CpG Motivs eine GpC-Sequenz.

Die achtzehnstündige Behandlung der reifen Adipozyten mit 1 µg/ml, 5 µg/ml und 20 µg/ml ODN 1585 verursachte eine signifikante und dosisabhängige Reduktion der Resistinkonzentration im Zellkulturüberstand um 5,8 %, 27,3 % und 74,1 % (p = 0,002 versus Kontrolle bei 5 µg/ml und 20 µg/ml ODN 1585), verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle (Abbildung 19 A). Die Stimulation mit Ktrl. ODN A hatte keinen

3 Ergebnisse

signifikanten Einfluss auf die Resistinsekretion (Abbildung 19, B). Um das bei Adipositas vorherrschende inflammatorische Milieu im Fettgewebe zu simulieren, wurden zusätzlich Ko-Stimulationsversuche mit TLR9-Liganden und LPS durchgeführt. Vor der Zugabe von LPS wurden die reifen Adipozyten eine Stunde mit dem jeweiligen ODN vorbehandelt. Auch in Anwesenheit von LPS (10 ng/ml) reduzierte das Klasse A ODN die Resistinkonzentration im Zellkulturüberstand dosisabhängig (Abbildung 19 C). Verglichen mit der Behandlung mit ausschließlich LPS verursachten 5 µg/ml ODN 1585 eine Reduktion um 38,8 % und 20 µg/ml ODN 1585 eine Reduktion um 80,5 %. Die Stimulation mit der ODN 1585 Dosiskurve, sowie die Behandlung mit dem Ktrl. ODN A hatten keinen Einfluss auf die Adiponektinsekretion (Abbildung 19 D, E). Bei der Ko-Stimulation mit 20 µg/ml ODN A und 10 ng/ml LPS wurde die Adiponektinkonzentration im Zellkulturüberstand signifikant reduziert (Reduktion um 23,1 %) (Abbildung 19 F).

3 Ergebnisse

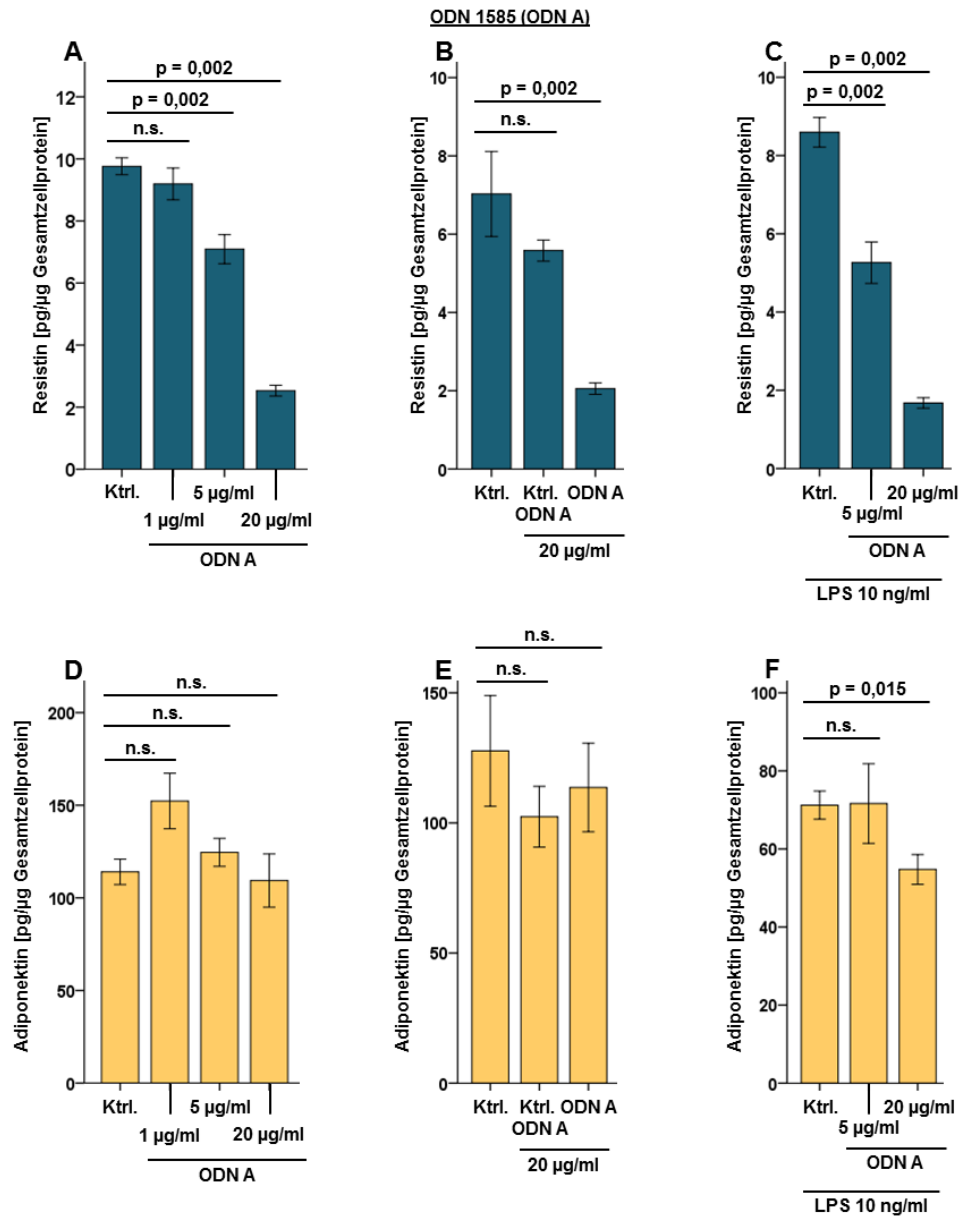


Abbildung 19: Resistin- (A-C) und Adiponektin-Proteinkonzentration (D-F) im Zellkulturüberstand von 3T3-L1 Adipozyten nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen des Oligodesoxynukleotids (ODN) 1585 (A, D), dem entsprechenden Kontroll-ODN A (Ktrl. ODN A) (B, E) und in Ko-Stimulation mit dem ODN A und Lipopolysaccharide (LPS) (C, F) (Thomalla et al. 2019) (164) (164). Reife Adipozyten wurden mit 1 μg/ml, 5 μg/ml und 20 μg/ml ODN 1585 (Klasse A) behandelt. Für Ko-Stimulationsexperimente mit LPS (10 ng/ml) wurden die Adipozyten 1 h mit 5 μg/ml oder 20 μg/ml vorbehandelt. Proteinkonzentrationen wurden *via* ELISA aus *n* = 6 *wells* pro Ansatz ermittelt und auf das Gesamtzellprotein normiert. Die Fehlerbalken kennzeichnen $\pm 1 \times$ Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Nicht signifikant (n. s.). Modifiziert nach Thomalla *et al.* ¹⁶⁴.

Das Klasse B ODN löst bei murinen 3T3-L1 Adipozyten ähnliche Effekte aus wie das Klasse A ODN, insgesamt aber in einem etwas geringeren Ausmaß. 5 μg/ml und 20 μg/ml induzierten eine signifikante und dosisabhängige Reduktion des Resistinlevels im Zellkulturüberstand um 18,0 % und 30,2 % (Abbildung 20 A). Die Stimulation mit Ktrl.

3 Ergebnisse

ODN B hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Resistinsekretion (Abbildung 20 B). Auch in Anwesenheit von LPS (10 ng/ml) reduzierte das Klasse B ODN die Resistinkonzentration im Zellkulturüberstand dosisabhängig (Abbildung 20). 5 µg/ml ODN 1826 verursachten eine Reduktion um 23,2 % und 20 µg/ml ODN 1826 um 43,3 % verglichen mit der Behandlung mit ausschließlich LPS.

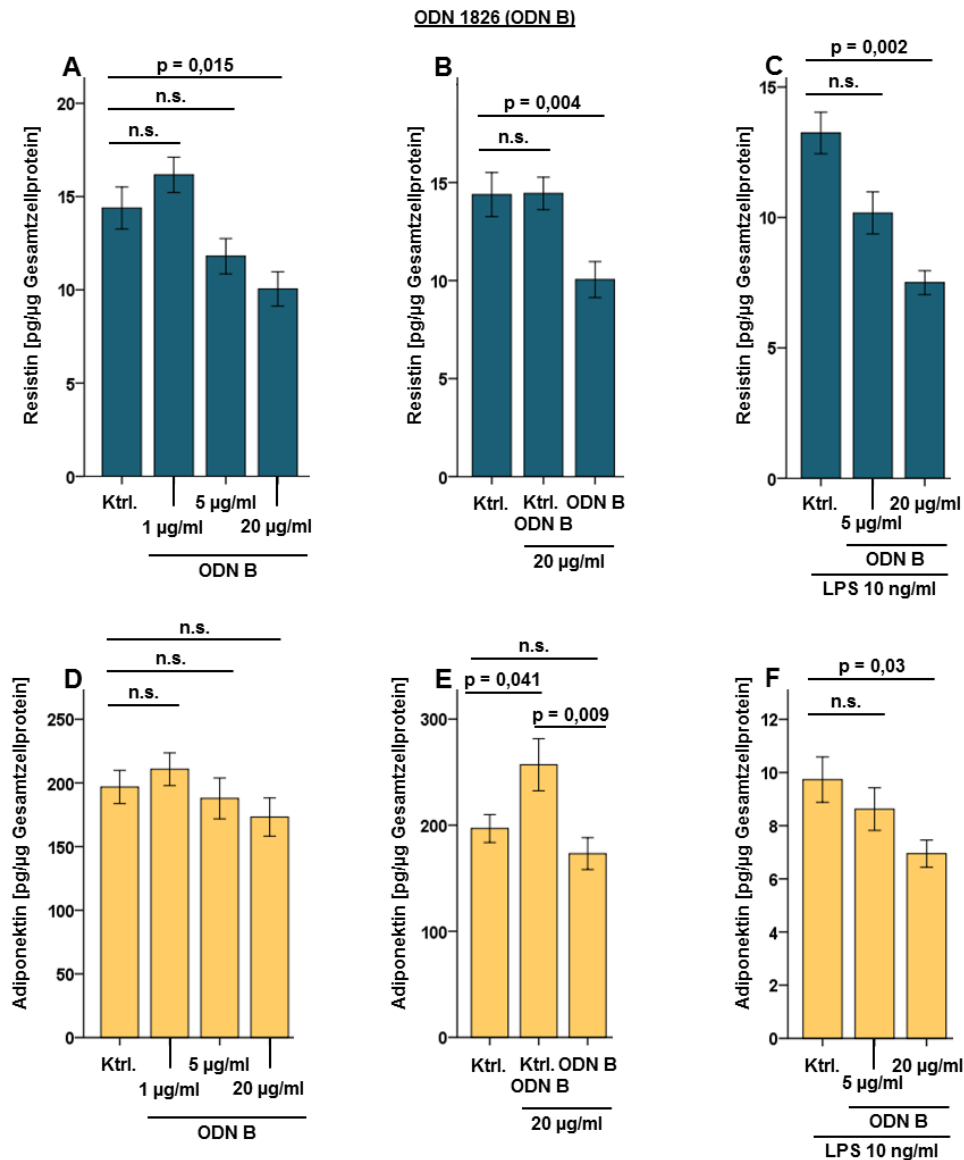


Abbildung 20: Resistin- (A-C) und Adiponektin-Proteinkonzentration (D-F) im Zellkulturüberstand von 3T3-L1 Adipozyten nach 18 h Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen des ODN 1826 (Klasse B) (A, D), nach Stimulation mit dem entsprechenden Kontroll-ODN (Ktrl. ODN B; 20µg/ml) (B, E), oder in Ko-Stimulation mit dem ODN B und LPS (10 ng/ml) (C, F). Als Kontrolle (Ktrl.) dienten Zellen die mit der entsprechenden Menge an Lösungsmittel behandelt wurden. Für die Dosiskurve wurden reife Adipozyten mit 1 µg/ml, 5 µg/ml und 20 µg/ml ODN 1826 (Klasse B) behandelt. Für Ko-Stimulationsexperimente mit LPS (10 ng/ml) wurden die Adipozyten vor der Zugabe von LPS 1 h mit 5 µg/ml oder 20 µg/ml vorbehandelt. Proteinkonzentrationen wurden *via* ELISA aus n = 6 *wells* pro Ansatz ermittelt und auf das Gesamtzellprotein normiert. Die Fehlerbalken kennzeichnen $\pm 1 \times$ Standardfehler des Mittelwertes (SEM); n = 5-6 pro Ansatz. Nicht signifikant (n. s). Modifiziert nach Thomalla *et al.* ¹⁶⁴.

3 Ergebnisse

Die Adiponektinsekretion blieb durch die Behandlung mit verschiedenen Dosen des ODN 1826 unbeeinflusst (Abbildung 20 D). Während das ODN selbst die Adiponektinkonzentration im Überstand nicht signifikant veränderte, kam es bei dem Ktrl. ODN 1826 zu einer leichten Induktion ($p = 0,041$ *versus* Ktrl. und $p = 0,009$ *versus* ODN 1826; Abbildung 20 E). Analysen der Ko-Stimulationsexperimente mit dem Klasse B ODN und anschließender Zugabe von LPS ergaben eine Verminderung des Adiponektinlevels um 29 % gegenüber der Behandlung mit ausschließlich LPS (Abbildung 20 F).

Die Behandlung mit 5 µg/ml und 20 µg/ml des Klasse C ODNs 2395 induzierten eine signifikante und dosisabhängige Reduktion des Resistinlevels im Zellkulturüberstand um 43 % und 61 % (Abbildung 21 A). Die Stimulation mit dem Ktrl. ODN C hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Resistinsekretion (Abbildung 21 B).

Die Ko-Stimulation mit ODN 2395 (5 µg/ml, 20 µg/ml) und LPS (10 ng/ml) reduzierte die Resistinkonzentration im Zellkulturüberstand dosisabhängig um 44 % bei 5 µg/ml ODN C und 61 % bei 20 µg/ml ODN C, verglichen mit der LPS-Kontrolle (Abbildung 21 C). Die Adiponektinkonzentration wurde weder durch die Stimulation mit ODN 2395 noch durch Stimulation mit der ODN 2395 Kontrolle beeinflusst. Auch die Ko-Stimulation mit ODN C und LPS hatten keine Auswirkungen auf die Proteinkonzentration von Adiponektin im Zellkulturüberstand der 3T3-L1 Adipozyten (Abbildung 21 D, E, F).

3 Ergebnisse

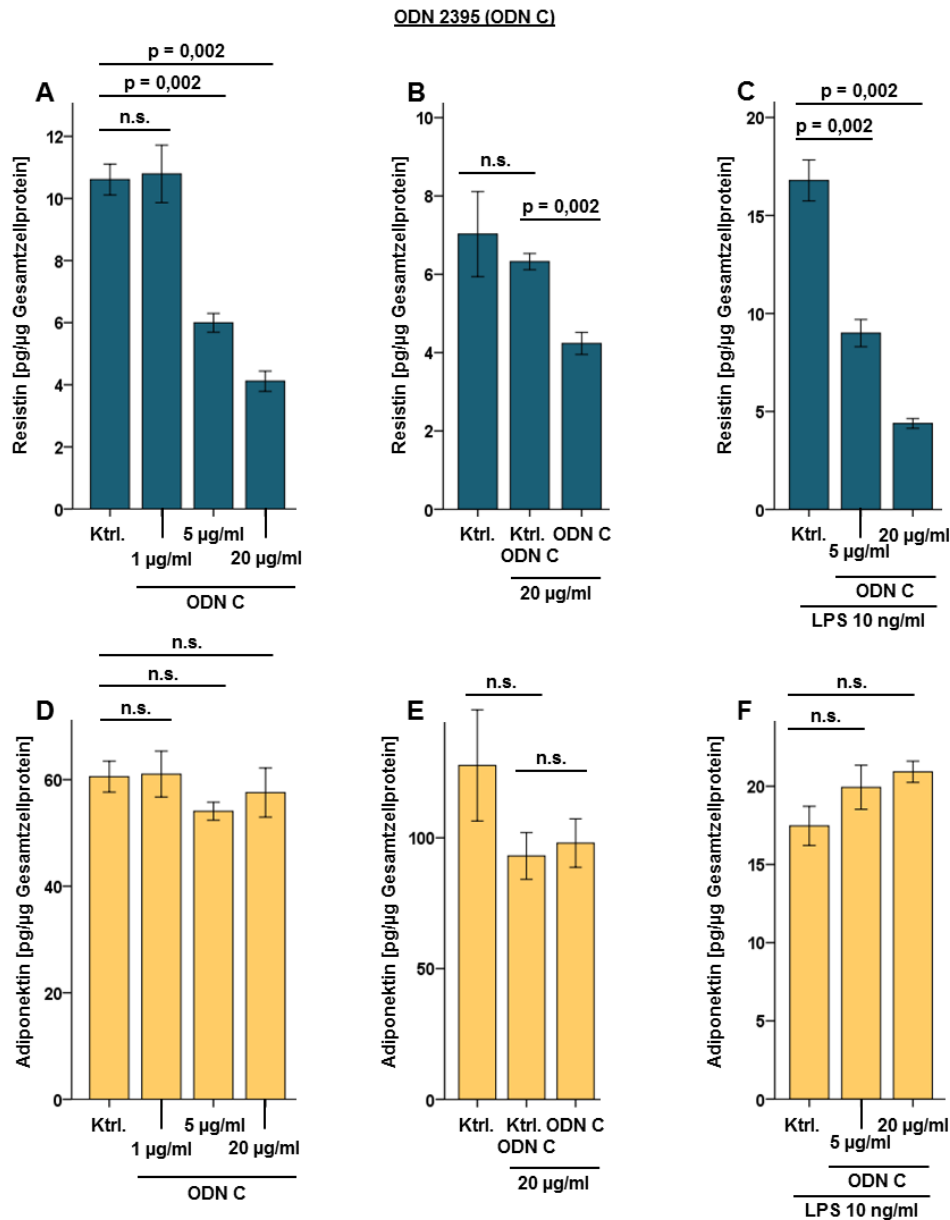


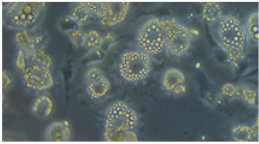
Abbildung 21: Resistin- (A-C) und Adiponektin-Proteinkonzentration (D-F) im Zellkulturüberstand von 3T3-L1 Adipozyten nach 18 h Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen des ODN 2395 (Klasse C) (A, D), nach Stimulation mit dem entsprechenden Kontroll-ODN (Ktrl. ODN C; 20 µg/ml) (B, E) und in Ko-Stimulation mit ODN C und LPS (10 ng/ml). Als Kontrolle (Ktrl.) dienen Zellen die mit der entsprechenden Menge des Lösungsmittels behandelt wurden. Für die Dosiskurve wurden reife Adipozyten mit 1 µg/ml, 5 µg/ml und 20 µg/ml ODN 2395 (Klasse C) behandelt. Für Ko-Stimulationsexperimente mit LPS (10 ng/ml) wurden die Adipozyten vor der Zugabe von LPS 1 h mit 5 µg/ml oder 20 µg/ml vorbehandelt. Proteinkonzentrationen wurden via ELISA aus $n = 6$ wells pro Ansatz ermittelt und auf das Gesamtzellprotein normiert. Die Fehlerbalken kennzeichnen $\pm 1 \times$ Standardfehler des Mittelwertes (SEM); $n = 6$ pro Ansatz. Nicht signifikant (n. s.). Modifiziert nach Thomalla *et al.* ¹⁶⁴.

In Tabelle 6 sind die Effekte der Stimulation durch die drei verschiedenen TLR9-Liganden und deren Kontrollen zusammengefasst. Auch die Effekte der ODNs unter proinflammatorischen Bedingungen (Ko-Stimulation mit LPS) sind in dieser Tabelle aufgeführt. Alles in allem verursachte die Stimulation mit den ODNs eine Reduktion von Resistin, wobei diese bei dem Klasse A ODN am stärksten und bei dem Klasse B ODN

3 Ergebnisse

am schwächsten ausgeprägt war. Auch unter Zugabe von LPS blieben die Effekte auf Resistin erhalten. Im Gegensatz dazu wurde die Adiponektinsekretion ausschließlich unter proinflammatorischen Bedingungen und auch nur durch das ODN A und das ODN B leicht inhibiert. Ansonsten blieben dessen Konzentrationen im Zellkulturüberstand unbeeinflusst.

Tabelle 6: Zusammenfassung der Auswirkungen von Klasse A, B und C ODNs auf die Resistin- und Adiponektin- Proteinsekretion in den Zellkulturüberstand von murinen 3T3-L1 Adipozyten gegenüber der Lösungsmittelkontrolle in An- und Abwesenheit von LPS (10 ng/μl) ¹⁶⁴. ↓↓↓ Sehr starke Supression, ↓↓ starke Supression, ↓ mäßige Supression, ↔ kein signifikanter Effekt; ODN = CpG Oligodesoxynucleotide; LPS = Lipopolysaccharide.

		basal		inflammatorische Bedingungen (LPS 10 ng/ml)	
		ODN Konzentration		ODN Konzentration	
		1 μg/ml 5 μg/ml 20 μg/ml		5 μg/ml 20 μg/ml	
Resistin	Klasse A ODN (ODN 1585)	↓↓↓	-6% -27% -74%	↓↓↓	-39% -80%
	Klasse B ODN (ODN1826)	↓	- -18% -30%	↓	-23% -43%
	Klasse C ODN (ODN2395)	↓↓	- -43% -61%	↓↓	-44% -61%
Adiponektin	Klasse A ODN (ODN 1585)	↔	- - -	↓	- -23%
	Klasse B ODN (ODN1826)	↔	- - -	↓	- -29%
	Klasse C ODN (ODN2395)	↔	- - -	↔	- -

Da Resistin grundsätzlich als proinflammatorisches Zytokin bei Diabetes und dem metabolischen Syndrom verstanden wird ¹⁶⁵, ist die Wirkung der TLR9-Agonisten auf 3T3-L1 Adipozyten eher als antiinflammatorisch einzuordnen. Außerdem ist bekannt, dass es im Rahmen von Adipositas und IR zu einer proinflammatorischen Transformation des viszeralen Fettgewebes kommt ¹⁶⁶. Damit könnte dieser Prozess direkt in Verbindung mit dem TLR9-Signalweg stehen. Aus diesem Grund wurde im Folgenden der Einfluss der TLR9-Agonisten auf andere inflammatorische Marker (MCP-1, IL-6, TNFα) sowie auf die Proteine des Glukosestoffwechsels (GLUT1 und GLUT4) analysiert.

Für die Genexpressionsanalysen wurden murine 3T3-L1 Adipozyten 18 h mit den drei ODN Klassen A, B und C stimuliert und die mRNA aus den Gesamtzelllysaten isoliert. Neben der Lösungsmittelkontrolle (Ktrl.) wurde außerdem mit den entsprechenden

3 Ergebnisse

Kontroll-ODNs (Ktrl. ODN) stimuliert. Nach der reversen Transkription wurde die cDNA mit den spezifischen Primern *via real time* PCR quantifiziert.

Die Genexpression des proinflammatorischen Proteins MCP-1 wird durch die Stimulation mit allen drei ODN-Klassen *versus* der Lösungsmittelkontrolle signifikant reduziert (Abbildung 22 A). Die Ktrl. ODNs B und C haben dabei verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle einen ähnlichen Effekt auf die Expression von MCP-1, der sich nicht signifikant von dem der entsprechenden ODNs unterscheidet. Auch das Ktrl. ODN A verursacht eine signifikante Reduktion der MCP-1 mRNA Expression ($p = 0,041$ versus Ktrl.). Diese ist jedoch nicht so stark ausgeprägt wie bei dem ODN A selbst ($p = 0,026$ versus ODN A). Auf die Expression der IL-6 mRNA hatte die Behandlung mit den ODNs keinen Einfluss (Daten nicht gezeigt). TNF α wird von 3T3-L1 Adipozyten basal kaum exprimiert und ist auch auf mRNA Ebene nach ODN-Stimulation nicht detektierbar (Daten nicht gezeigt).

Die Stimulation mit ODN A löst eine starke Reduktion des GLUT1 aus. Diese ist sowohl gegenüber der Lösungsmittelkontrolle ($p = 0,009$) als auch gegenüber der Ktrl. ODN A Stimulation ($p = 0,026$) signifikant. Dabei gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Behandlung mit dem Lösungsmittel und dem Ktrl. ODN A. Im Gegensatz dazu führt die Behandlung mit Ktrl. ODN B und C Sequenzen zu einer signifikanten Reduktion der GLUT1 mRNA Expression ($p = 0,002$ und $p = 0,041$), die jedoch gegenüber dem ODN B und C nicht signifikant verändert ist. Während das ODN B gegenüber der Lösungsmittelkontrolle keine signifikanten Effekte auslöst, wird durch die Behandlung mit dem ODN C wiederum die GLUT1 mRNA Expression reduziert ($p = 0,002$).

Eine spezifische und signifikante Reduktion der GLUT4 mRNA Expression wurde ausschließlich durch die Stimulation mit dem Klasse A ODN bewirkt ($p = 0,026$ *versus* Lösungsmittelkontrolle). Diese Reduktion ist auch gegenüber der Behandlung mit dem Ktrl. ODN A signifikant ($p = 0,009$). Die Stimulation mit Klasse B und Klasse C DNA-Sequenzen beeinflusst die GLUT4 Genexpression nicht (n. s.).

3 Ergebnisse

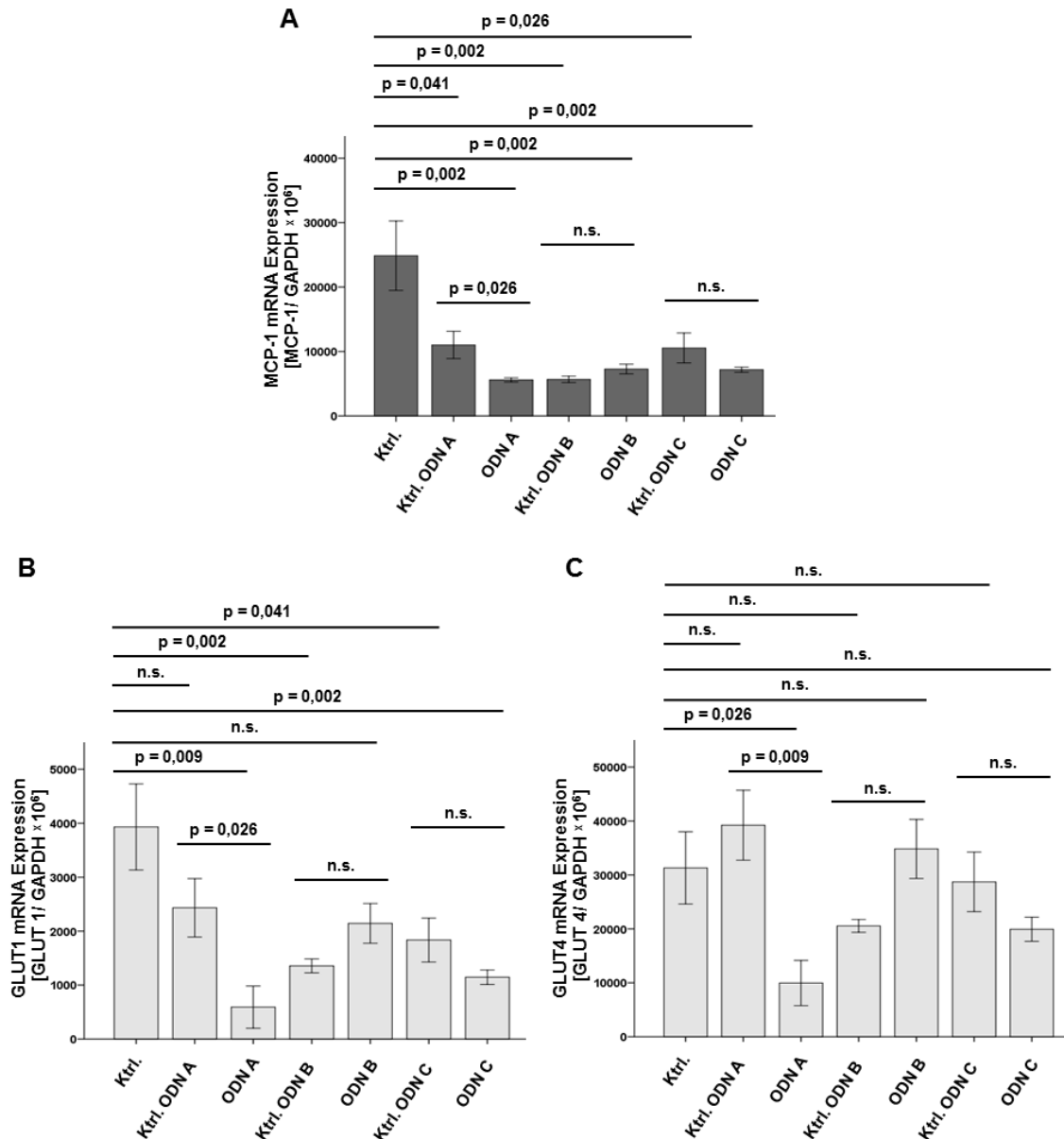


Abbildung 22: Die Genexpression von MCP-1, GLUT1 und GLUT4 in murinen 3T3-L1 Adipozyten nach Stimulation mit 20 µg/ml Klasse A, B und C ODN (1585, 1826, 2395) verglichen mit den entsprechenden ODN Kontrollen (Ktrl. ODN; 20 µg/ml) und der Lösungsmittelkontrolle (Ktrl.)¹⁶⁴. Die mRNA wurde aus Gesamtzelllysaten der reifen Adipozyten gewonnen. Nach der reversen Transkription wurde die cDNA von MCP-1, GLUT1 und 4 *via real time* PCR quantifiziert. Die Fehlerbalken kennzeichnen $\pm 1 \times$ Standardfehler des Mittelwertes (SEM); n = jeweils 6 pro Ansatz. n.s. = nicht signifikant.

3.3.2 Stimulation von primären Adipozyten aus TLR9^{wt/wt} und TLR9^{-/-} Mäusen mit TLR9-Agonisten

Um die Ergebnisse der *in vitro* Analysen zu verifizieren, wurden adipozytäre Vorläuferzellen aus dem Fettgewebe von TLR9^{wt/wt} und TLR9^{-/-} Mäusen isoliert und *ex vivo* zu reifen Adipozyten differenziert. ELISA basierte Proteinexpressionsanalysen ergaben, dass Adipozyten aus TLR9^{-/-} Tieren gegenüber den TLR9^{wt/wt} Tieren signifikant

3 Ergebnisse

weniger Adiponektin in den Zellkulturüberstand sezernieren (Abbildung 23 A). Das MCP-1 und Resistin mRNA Expressionsniveau hingegen war basal in den TLR9^{-/-} Adipozyten deutlich höher als in den TLR9^{wt/wt} Adipozyten (Abbildung 23 B, C).

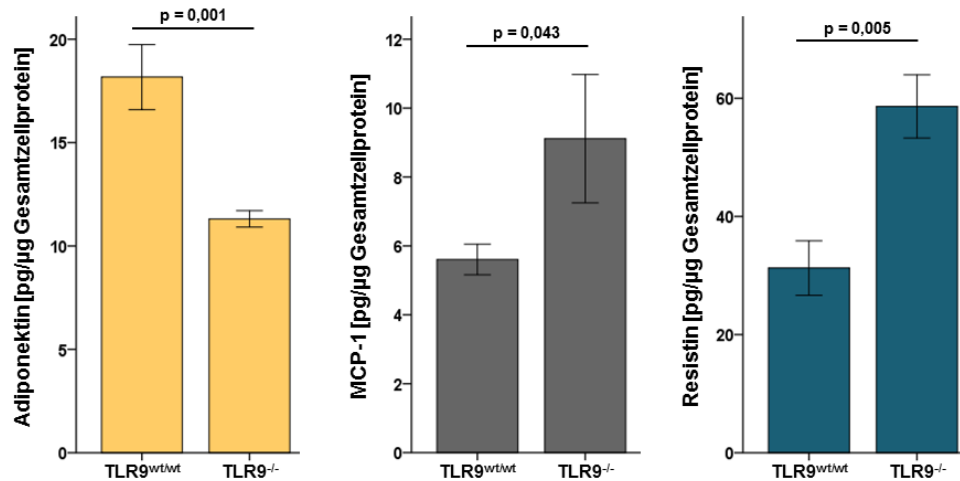


Abbildung 23: Basale Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand von ex vivo differenzierten primären murinen Adipozyten aus TLR9^{wt/wt} und TLR9^{-/-} Mäusen. Adipozyten aus Knockout-Tieren produzieren signifikant weniger Adiponektin (A), während die MCP-1- (B) sowie Resistin- (C) Produktion gegenüber den TLR9^{wt/wt} Tieren induziert ist. Die Prä-Adipozyten wurden aus subkutanem Fettgewebe isoliert und hormonell innerhalb von 11 Tagen zu reifen Adipozyten differenziert. Die Fehlerbalken kennzeichnen $\pm 1 \times$ Standardfehler des Mittelwertes (SEM); n = 6-8 pro Ansatz. Modifiziert nach Thomalla *et al.* ¹⁶⁴.

Um zu überprüfen, ob im murinen System TLR9 der einzige Rezeptor ist, der durch DNA-Sequenzen aktiviert wird, sollten TLR9^{-/-} Adipozyten mit ODNs stimuliert werden. Dafür wurden adipozytäre Vorläuferzellen aus dem Fettgewebe von TLR9^{wt/wt} und TLR9^{-/-} Mäusen isoliert, ex vivo zu reifen Adipozyten differenziert und 18 h mit den jeweiligen ODNs und Ktrl. ODNs stimuliert. Als Kontrolle fungierte wiederum eine Behandlung mit der entsprechenden Menge des Lösungsmittels der ODNs. Mittels ELISA wurden die Proteinkonzentrationen von Adiponektin, MCP-1 und Resistin im Zellkulturüberstand der primären Adipozyten detektiert.

Die Stimulation mit dem ODN A induziert in den TLR9^{wt/wt} Adipozyten, nicht aber in den TLR9^{-/-} Adipozyten die Adiponektinkonzentration signifikant (Abbildung 24 A). Eine Behandlung mit dem Ktrl. ODN A hatte dabei in den Zellen beider Genotypen vergleichbare Auswirkungen auf das Adiponektinniveau.

Auch die Proteinkonzentration von MCP-1 im Zellkulturüberstand der TLR9^{-/-} Adipozyten wurde durch die Stimulation mit den ODN A DNA-Sequenzen nicht signifikant beeinflusst. Interessanterweise kam es aber bei den TLR9^{wt/wt} Adipozyten zu einer Inhibition der MCP-1 Sekretion verglichen mit der Ktrl. ODN A Behandlung (p = 0,004)

3 Ergebnisse

(Abbildung 24 B). Gegenüber der Lösungsmittelkontrolle war hier die MCP-1 Konzentration weder nach Ktrl. ODN A Stimulation noch nach Stimulation mit dem ODN A signifikant beeinflusst.

Resistin wurde durch die CpG-Stimulation sowohl in den Wildtyp- als auch in den TLR9^{-/-} Adipozyten in signifikant geringerem Maße in den Zellkulturüberstand sezerniert ($p = 0,002$ versus Ktrl. ODN A; Abbildung 24 C). Dabei ist jedoch zu beachten, dass trotz der höheren basalen Expression bei TLR9^{-/-} Adipozyten als bei den Zellen aus Wildtyp-Tieren Resistin bei Zellen beider Genotypen durch die CpG- und die GpC Stimulation auf ein etwa gleiches Niveau reduziert wird ($p \leq 0,002$ versus Kontrolle; Abbildung 24).

Klasse A: ODN 1585

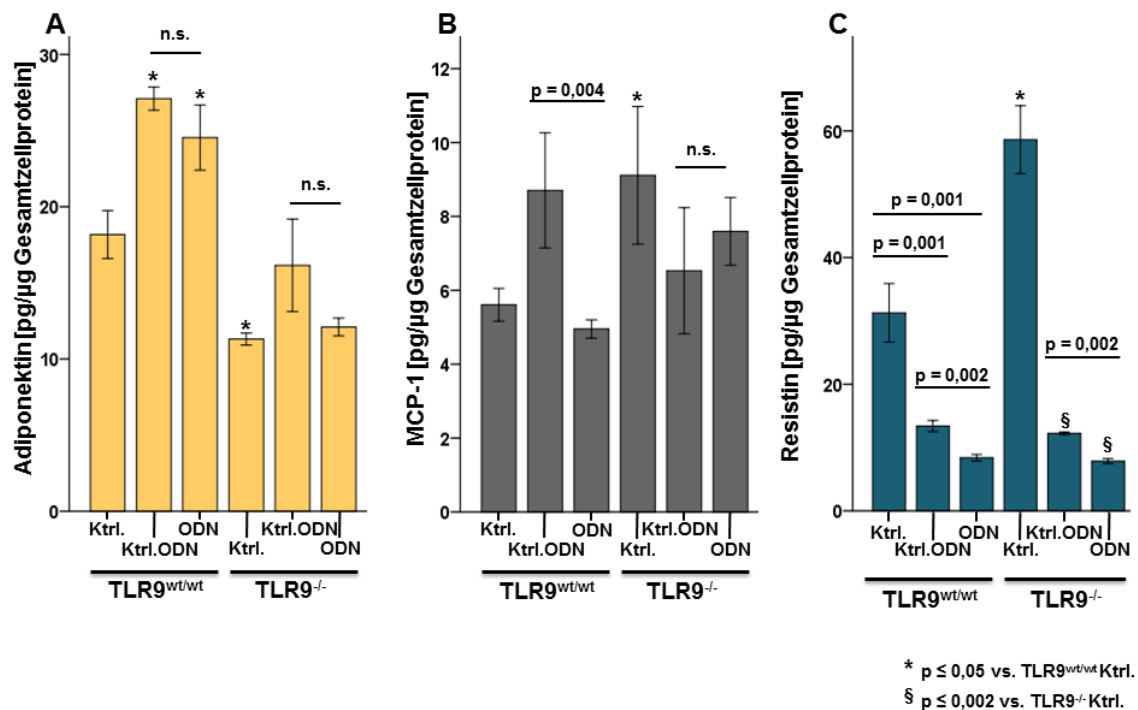


Abbildung 24: Adiponektin- (A), MCP-1 (B)- und Resistin (C)-Sekretion in den Zellkulturüberstand von primären murinen Adipozyten (pmAd) nach Stimulation mit 20 µg/ml CpG ODN 1585 (Klasse A) versus dem entsprechenden Kontroll-ODN (Ktrl. ODN) versus der Lösungsmittelkontrolle (Ktrl.). Die Zellen wurden aus subkutanem Fettgewebe von TLR9^{wt/wt} und TLR9^{-/-} Mäusen isoliert. Nach Abschluss der adipozytären Differenzierung wurden die Zellen über 18 h stimuliert. Proteinlevel in den Zellkulturüberständen wurden mittels ELISA bestimmt und auf das Gesamtzellprotein normiert. Die Fehlerbalken kennzeichnen $\pm 1 \times$ Standardfehler des Mittelwertes (SEM); $n = 6-8$ pro Ansatz. Modifiziert nach Thomalla *et al.* ¹⁶⁴.

Eine Behandlung der primären murinen Adipozyten mit dem Klasse B ODN beeinflusst die Adiponektinsekretion gegenüber der Ktrl. ODN B Stimulation nicht signifikant (Abbildung 25 A). Gegenüber der Lösungsmittelkontrolle wird Adiponektin durch das ODN B von den Adipozyten der TLR9^{wt/wt} Tiere jedoch signifikant weniger in den

3 Ergebnisse

Zellkulturüberstand sezerniert ($p = 0,02$). Dieser Effekt ist weder bei dem Ktrl. ODN B noch in den TLR9^{-/-} Adipozyten erhalten. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Grundexpression von Adiponektin in den TLR9-defizienten Tieren gegenüber den Wildtypen *a priori* reduziert ist. Ein besonders starker und CpG-spezifischer Effekt bildet sich in Bezug auf MCP-1 aus. Das Protein wurde in TLR9^{wt/wt} Tieren durch das ODN B stark induziert ($p = 0,002$ versus Ktrl. ODN und $p = 0,001$ versus Ktrl.), nicht aber in den TLR9^{-/-} Tieren (Abbildung 25 B). Das Ktrl. ODN B verursacht eine leichte Induktion von MCP-1 versus der Kontrolle bei dem wt-Genotyp ($p = 0,013$), nicht aber bei den TLR9-Knockout Tieren. Es wurden keine CpG-spezifischen Effekte auf die Resistinsekretion detektiert. Das Protein wurde aber bei TLR9^{-/-} Adipozyten durch die Stimulation mit dem CpG sowie dem GpC ($p \leq 0,004$ versus Kontrolle) signifikant reduziert. Dabei ist jedoch zu beachten, dass Resistin in TLR9-defizienten Tieren basal erhöht ist.

Klasse B: ODN 1826

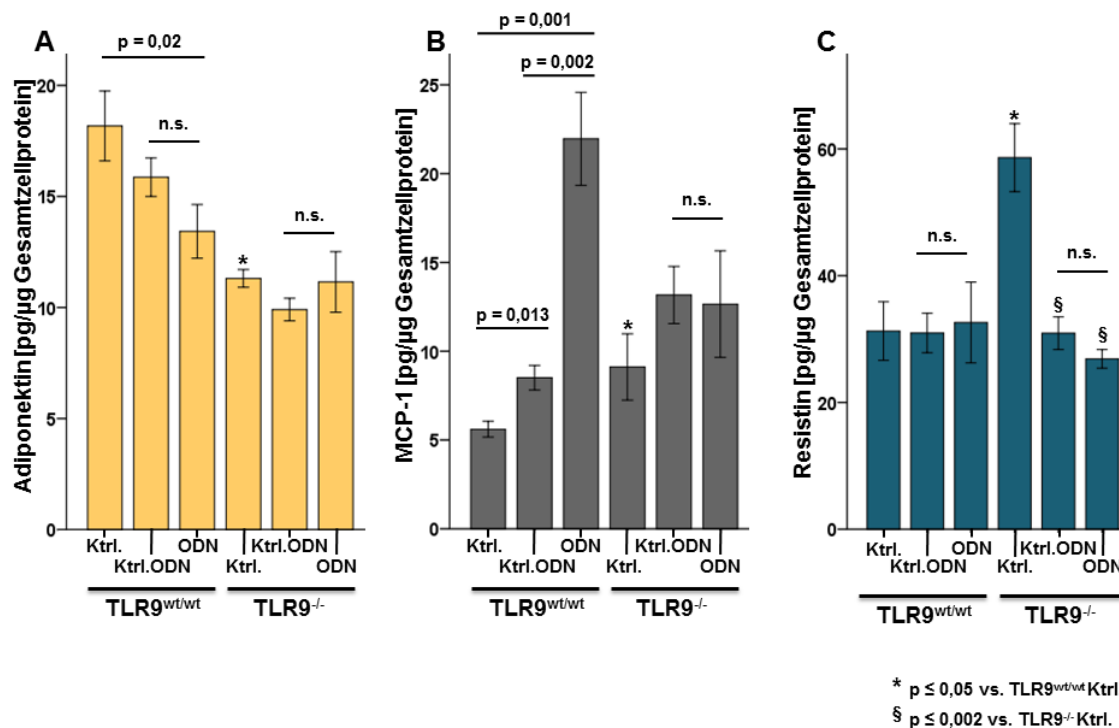


Abbildung 25: Adiponektin- (A), MCP-1 (B)- und Resistin (C)-Sekretion in den Zellkulturüberstand von primären murinen Adipozyten (pmAd) nach Stimulation mit 20 µg/ml CpG ODN 1826 (Klasse B) versus dem entsprechenden Kontroll-ODN (Ktrl. ODN) versus der Lösungsmittelkontrolle (Ktrl.). Die Zellen wurden aus subkutanem Fettgewebe von TLR9^{wt/wt} und TLR9^{-/-} Mäusen isoliert. Nach Abschluss der adipozytären Differenzierung wurden die Zellen über 18 h stimuliert. Proteinlevel in den Zellkulturüberständen wurden mittels ELISA bestimmt und auf das Gesamtzellprotein normiert. Die Fehlerbalken kennzeichnen $\pm 1 \times$ Standardfehler des Mittelwertes (SEM); $n = 6-8$ pro Ansatz. Modifiziert nach Thomalla *et al.* ¹⁶⁴.

Die Adiponektinkonzentration im Zellkulturüberstand der Adipozyten aus TLR9^{wt/wt} Mäusen blieb nach Stimulation mit dem Klasse C ODN sowie dem entsprechenden Ktrl.

3 Ergebnisse

ODN C unbeeinflusst. In den TLR9--defizienten Mäusen hingegen verursachen beide Nukleinsäuresequenzen eine starke und signifikante Induktion.

Die MCP-1 Proteinexpression wurde durch die Behandlung mit ODN C in den Adipozyten beider Genotypen signifikant induziert (TLR9^{wt/wt}: $p = 0,001$ versus Lösungsmittelkontrolle und $p = 0,002$ versus Ktrl. ODN C; TLR9^{-/-}: $p = 0,026$ versus Lösungsmittelkontrolle und $p = 0,015$ versus Ktrl. ODN C; Abbildung 26 B). Das Ktrl. ODN C hat auf die Adipozyten beider Genotypen gegenüber der Kontrolle keinen signifikanten Einfluss auf die MCP-1 Sekretion.

Klasse C: ODN 2395

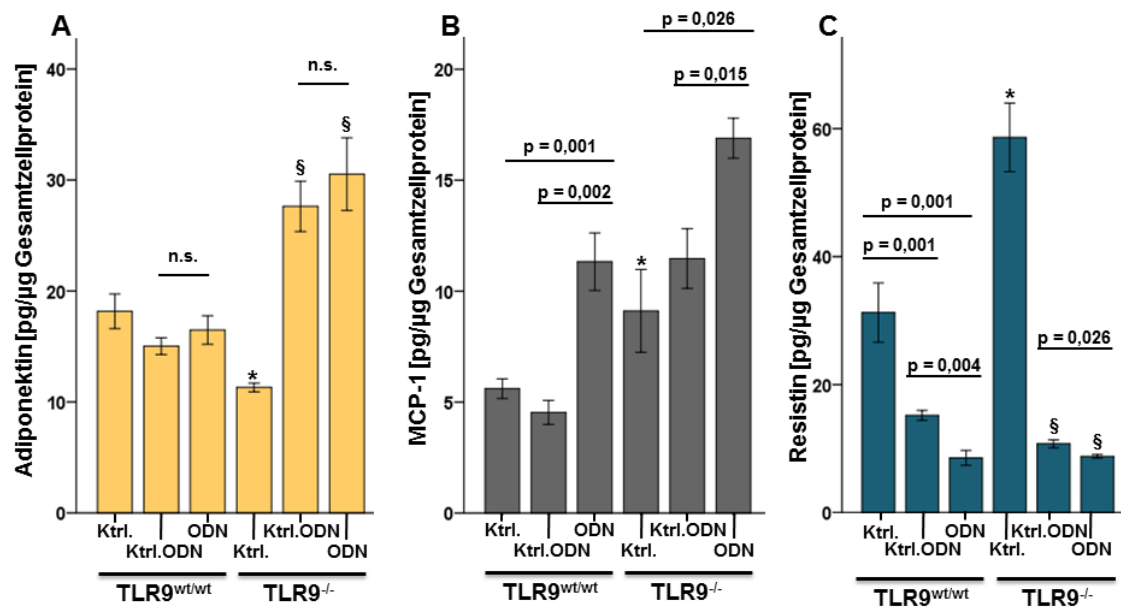


Abbildung 26: Adiponektin- (A), MCP-1 (B)- und Resistin (C)-Sekretion in den Zellkulturüberstand von primären murinen Adipozyten (pmAd) nach Stimulation mit 20 µg/ml CpG ODN 2395 (Klasse C) versus dem entsprechenden Kontroll-ODN (Ktrl. ODN) versus der Lösungsmittelkontrolle (Ktrl.). Die Zellen wurden aus subkutanem Fettgewebe von TLR9^{wt/wt} und TLR9^{-/-} Mäusen isoliert. Nach Abschluss der adipozytären Differenzierung wurden die Zellen über 18 h stimuliert. Proteinlevel in den Zellkulturüberständen wurden mittels ELISA bestimmt und auf das Gesamtzellprotein normiert. Die Fehlerbalken kennzeichnen $\pm 1 \times$ Standardfehler des Mittelwertes (SEM); $n = 6-8$ pro Ansatz. Modifiziert nach Thomalla *et al.* ¹⁶⁴.

Die Resistinsekretion in den Zellkulturüberstand wurde sowohl in den TLR9^{wt/wt} Adipozyten als auch in den TLR9^{-/-} Adipozyten durch die Stimulation mit dem ODN C signifikant inhibiert (TLR9^{wt/wt}: $p = 0,001$ versus Lösungsmittelkontrolle und $p = 0,004$ versus Ktrl. ODN C, TLR9^{-/-}: $p \leq 0,002$ versus Lösungsmittelkontrolle und $p = 0,026$ versus Ktrl. ODN C; Abbildung 26 C). Dabei ist wiederum zu beachten, dass die Klasse C ODNs in beiden Genotypen eine ähnlich starke Inhibition ausgelöst haben, obwohl

3 Ergebnisse

Resistin basal deutlich stärker von den TLR9^{-/-} Adipozyten sezerniert wird. Wenn auch nicht ganz so stark wie durch das ODN C selbst, wurde durch die Ktrl. ODN C Sequenz die Resistinkonzentration gegenüber der Lösungsmittelkontrolle in Adipozyten beider Genotypen ebenfalls inhibiert ($p \leq 0,002$).

Tabelle 6 fasst die Auswirkungen der ODN-Stimulationen auf die Adipokinsekretion der pmAd aus TLR9^{wt/wt} und TLR9^{-/-} Adipozyten zusammen und hebt CpG-spezifische sowie Genotyp-abhängige Effekte hervor. Das ODN A induziert grundsätzlich antiinflammatorische Effekte in den TLR9^{wt/wt} Adipozyten, die unter gleichen Bedingungen bei TLR9^{-/-} Adipozyten nicht ausgelöst werden. Das ODN B hingegen induziert bei den TLR9^{wt/wt} Adipozyten, nicht aber bei den TLR9^{-/-} Adipozyten, eine CpG-spezifische proinflammatorische Signalkaskade. Die Effekte der ODN C-Stimulation waren auf beide Genotypen überwiegend gleich, mit der Ausnahme, dass Adiponektin in den TLR9^{-/-} Adipozyten CpG-unabhängig induziert wurde. Auffällig ist, dass die Effekte der CpG-ODNs zum Teil im selben Ausmaß und teilweise in etwas abgeschwächter Form auch durch die Ktrl. ODNs ausgelöst wurden.

Tabelle 7: Zusammenfassung der Auswirkungen von Klasse A ODN 1585, Klasse B ODN 1826 und Klasse C ODN 2395, sowie den entsprechenden GpC-haltigen ODN Kontrollen (ODN Ktrl.) auf die Adipokinsekretion von primären murinen Adipozyten (pmAd) aus TLR9^{wt/wt} und TLR9^{-/-} Tieren. Adipozytäre Vorläuferzellen wurden aus dem subkutanen Gewebe der Tiere isoliert und unter hormoneller Behandlung *ex vivo* zu reifen Adipozyten differenziert. Nach 18 h Stimulation mit den Nukleinsäuren (20 µg/ml) wurde die Proteinkonzentration von Adiponektin, MCP-1 und Resistin im Zellkulturüberstand *via* ELISA bestimmt und auf das Gesamtzellprotein normiert; n = 6-8 pro Ansatz. ↑ = Induktion *versus* Lösungsmittelkontrolle; ↑↑ = Induktion *versus* Lösungsmittelkontrolle und ODN Ktrl.; ↔ = keine Veränderung; ↓ = Suppression *versus* Lösungsmittelkontrolle; ↓↓ = Suppression *versus* Lösungsmittelkontrolle und ODN Ktrl.; ↓* = Suppression ausschließlich *versus* ODN Ktrl.; Genotyp- spezifische Effekte sind gelb unterlegt; Genotyp- und CpG-spezifische Effekte sind rot markiert.

	TLR9 ^{wt/wt}						TLR9 ^{-/-}					
	ODN A Ktrl.	ODN A	ODN B Ktrl.	ODN B	ODN C Ktrl.	ODN C	ODN A Ktrl.	ODN A	ODN B Ktrl.	ODN B	ODN C Ktrl.	ODN C
Adiponektin	↑	↑	↔	↓	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↑	↑
MCP-1	↔	↓*	↑	↑↑	↔	↑↑	↔	↔	↔	↔	↔	↑↑
Resistin	↓	↓↓	↔	↔	↓	↓↓	↓	↓↓	↓	↓	↓	↓↓

3.3.3 Stimulation von humanen Adipozyten mit TLR9-Agonisten

Nicht zuletzt sollte der TLR9-Signalweg auch in primären humanen Adipozyten (phAd) analysiert werden. Dafür wurden die primären humanen Prä-Adipozyten nach einem

3 Ergebnisse

etablierten Protokoll zu reifen Adipozyten differenziert und über 18 h mit den human-spezifischen CpG-ODNs der drei Klassen A (2216), B (2006) und C (2395) sowie den entsprechenden GpC ODN Kontrollen stimuliert. Anschließend wurden die Adiponektin- und die MCP-1 Konzentration in den Zellkulturüberständen mittels ELISA bestimmt. Verglichen mit der jeweiligen ODN-Kontrolle blieb die Adiponektinsekretion durch die CpG-ODN-Stimulation unverändert (Abbildung 27). Das Klasse A und Klasse B ODN haben die Adiponektinsekretion auch in Bezug zur Vektorkontrolle nicht beeinflusst. Das Klasse C ODN hingegen bewirkte eine signifikante Induktion des Adiponektinniveaus im Überstand ($p < 0,001$). Dabei ist jedoch zu beachten, dass auch das Klasse C Kontroll-ODN eine ähnlich stark ausgeprägte Induktion verursachte ($p = 0,007$).

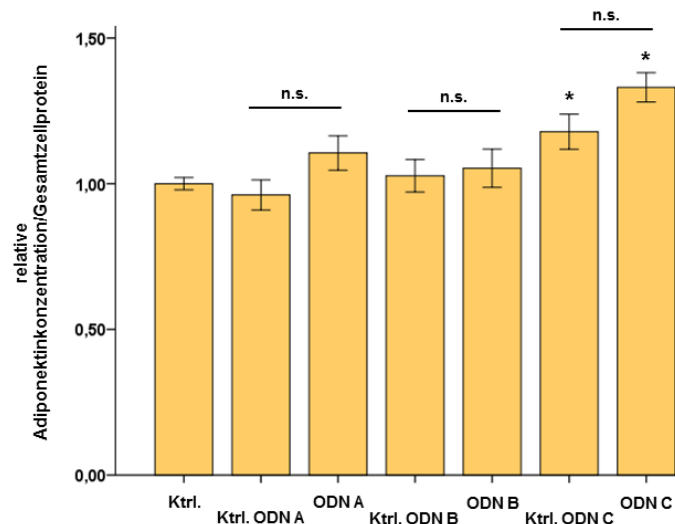


Abbildung 27: Relative Adiponektinkonzentration im Zellkulturüberstand von primären humanen Adipozyten (phAd) nach Stimulation mit Klasse A ODN 2216, Klasse B ODN 2006 und Klasse C ODN 2395 und den entsprechenden Kontroll ODN (Ktrl. ODN). Adipozytäre Vorläuferzellen wurden hormonell zu reifen Adipozyten differenziert und mit jeweils 20 µg/ml für 18 h stimuliert. Die Adiponektinkonzentration wurde mittels ELISA detektiert und auf das Gesamtzellprotein normiert. Es folgte eine zusätzliche Normierung auf die entsprechende Lösungsmittelkontrolle (Ktrl.). Die Fehlerbalken kennzeichnen $\pm 1 \times$ Standardfehler des Mittelwertes (SEM); * $p \leq 0,007$ versus Ktrl.; $n = 5-6$.

Nur im Falle des Klasse A CpG ODNs kam es zu einer signifikanten Reduktion des MCP-1-Niveaus im Zellkulturüberstand, verglichen mit dem Kontroll-ODN (Abbildung 28). Dieser Effekt war bei dem Klasse B und C ODN nicht vorhanden. Interessanterweise verursachten aber alle CpG sowie GpC ODNs eine signifikante Reduktion von MCP-1 gegenüber der Vektorkontrolle ($p \leq 0,003$).

3 Ergebnisse

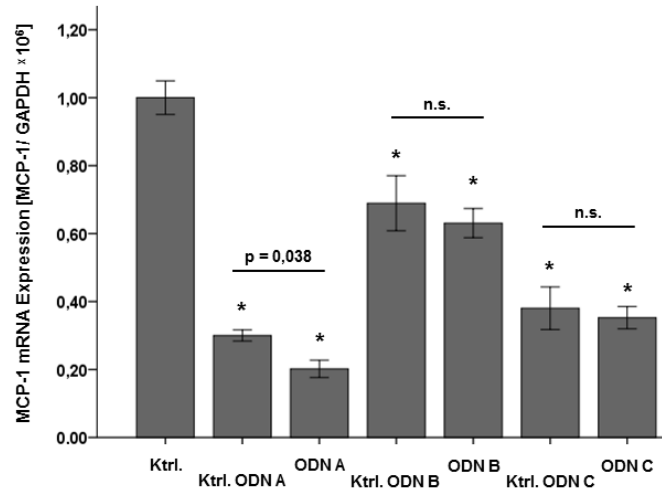


Abbildung 28: Relative mRNA Expression von MCP-1 in primären humanen Adipozyten (phAd) nach Stimulation mit Klasse A ODN 2216, Klasse B ODN 2006 und Klasse C ODN 2395 und den entsprechenden Kontroll-ODNs (Ktrl. ODN). Adipozytäre Vorläuferzellen wurden hormonell zu reifen Adipozyten differenziert und mit jeweils 20 µg/ml für 18 h stimuliert. Mittels *real-time* PCR wurde die mRNA in Relation zur GAPDH mRNA $\times 10^6$ analysiert und anschließend auf die Vektorkontrolle (Ktrl.) normiert. Die Fehlerbalken kennzeichnen $\pm 1 \times$ Standardfehler des Mittelwertes (SEM); * $p \leq 0,003$ versus Ktrl.; n = jeweils 4-6 pro Ansatz.

Resistin wurde von den humanen Adipozyten kaum exprimiert. Das Protein war weder basal noch nach Stimulation mit ODNs detektierbar.

4 Diskussion

Toll-like Rezeptoren gehören zur Familie der Mustererkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems. Aus diesem Grund konzentrieren sich die meisten Studien zu TLR9 überwiegend auf die klassischen Zellen des Immunsystems. TLR9 wurde ursprünglich auf B-Zellen charakterisiert, wo seine Aktivierung eine proinflammatorische Signalkaskade induziert. In aktuellen Studien konnte nachgewiesen werden, dass auch andere Zellen wie z. B. intestinale Epithelzellen in der Lage sind TLR9 zu exprimieren. Zahlreiche Studien haben die pro- bzw. antiinflammatorische Wirkung von TLR9 bei Adipositas, Glukosetoleranz und IR diskutiert. So ist z. B. eine bessere Glukosetoleranz bei TLR9^{wt/wt} gegenüber TLR9^{-/-} Mäusen beschrieben ¹¹⁹. Auf der anderen Seite konnten Studien nachweisen, dass unter einer Hoch-Fett-Diät (HFD) die Serumkonzentration von Insulin bei TLR9^{-/-} Mäusen *versus* TLR9^{wt/wt} Mäusen deutlich erhöht ist, was auf eine ausgeprägtere IR in TLR9-defizienten Tieren deutet. Zugleich war in diesen Tieren die Genexpression von proinflammatorischen Zytokinen (TNFa, IL-6, IFN γ , MCP-1, Rantes) im gon Fettgewebe signifikant induziert, was eine antiinflammatorische Funktion von TLR9 impliziert ¹¹⁷. Dabei scheint der TLR9 Signalkaskade vor allem im viszeralen Fettgewebe eine Schlüsselfunktion zuzukommen ^{117–119,167}. Inwiefern die verschiedenen Zelltypen des Fettgewebes zu der damit assoziierten Pathophysiologie beitragen, ist bislang nicht geklärt ⁴. Aktuelle Studien konnten zwar nachweisen, dass Adipozyten selbst aktiv an antiviralen und antibakteriellen Immunantworten mitwirken können, die Charakterisierung der TLR9 Signaltransduktion bezieht sich jedoch überwiegend auf die klassischen Immunzellen, wie Makrophagen, Neutrophile und B-Zellen. Vor diesem Hintergrund besteht die Frage, ob Adipozyten gleichfalls in der Lage sind, TLR9 zu exprimieren und über dessen Signaltransduktion regulatorischen Einfluss auf Adipositas, Glukoseintoleranz und IR auszuüben.

4.1. TLR9-Expression in Adipozyten

Das Interesse an der Expression von Immunrezeptoren in Adipozyten ist in den letzten Jahren stetig gestiegen. 2007 wurde die Induktion der TLR4 mRNA Expression während der adipozytären Differenzierung von 3T3-L1 Zellen beschrieben ¹⁶⁸. Analog zu den Daten von Poulain-Godefroy und Froguel konnte im Rahmen dieser Arbeit die stufenweise Induktion der Genexpression sowie eine deutliche Induktion der

Proteinexpression des TLR9 während der adipozytären Differenzierung in murinen 3T3-L1 Zellen nachgewiesen werden (Abschnitt 3.1.1). Damit wurde der Immunrezeptor TLR9 als ein später Marker der adipozytären Differenzierung etabliert. Auch die Expression anderer TLRs wird erst durch Ausbildung des adipozytären Phänotyps induziert. So konnten unter anderem Ballak *et al.* zeigen, dass die TLR3-Expression ebenfalls während der Differenzierung humaner SGBS-Adipozyten induziert wird ¹¹².

Die spezifische Expression von PRRs und vor allem von TLRs ist damit ein essentielles Element innerhalb der Adipogenese. Die starke Induktion der Expression der Immunrezeptoren legt nahe, dass sie entscheidend für die regulatorische Funktion von Adipozyten im Organismus sind.

Latz *et al.* konnten mittels Fluoreszenzmarkierungen die Ko-Lokalisation von TLR9 mit membranständigen Proteinen des Endoplasmatischen Reticulums (ER) in murinen plasmazytoiden Dendritischen Zellen sowie in human embryonic kidney (HEK) Zellen nachweisen. Analysen von Stimulationsexperimenten mit fluoreszierenden ODNs ergaben außerdem, dass TLR9 ausgelöst durch den Stimulus vom ER zu Endosomen transloziert ¹²⁶. Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte mit einer immunzytochemischen Proteinfärbung die zytoplasmatische Lokalisation von TLR9 in murinen 3T3-L1 Adipozyten nachgewiesen werden, was impliziert, dass der Immunrezeptor auch in Adipozyten im ER und in Lysosomen lokalisiert ist. Weiterführende konfokalmikroskopische Analysen müssen künftig Aufschluss über die exakte Lokalisation von TLR9 in Adipozyten geben.

Interessanterweise ist sowohl die Expression von TLR9 als auch die von PPAR γ abhängig von der Aktivierung des adipozytären Transkriptionsfaktors C/EBP α ^{169–171}. Dieser Zusammenhang auf Transkriptionsebene könnte eine mögliche Erklärung für die induzierte TLR9-Expression vor allem in der späten adipozytären Differenzierung sein.

Neben den *in vitro* Untersuchungen wurden zusätzlich *in vivo* Expressionsanalysen durchgeführt. PCR-basierte Untersuchungen aus Gesamtzelllysaten von gon und sc Fettgewebe aus Balb/C Mäusen ergaben, dass sich die TLR9 Genexpression zwischen den beiden Depots nicht signifikant unterscheidet. Bei demselben Mausstamm haben Khazen *et al.* eine signifikant höhere Expression im sc gegenüber dem gon Fettgewebe detektiert ¹⁷². Es ist hierbei nicht auszuschließen, dass die von Khazen *et al.* gegenüber den hier vorgestellten Arbeiten deutlich geringere verwendete Probenzahl ($n = 3$ versus $n = 11$) für die abweichenden Ergebnisse verantwortlich ist.

Das Fettgewebe ist ein auf zellulärer Ebene sehr heterogenes Organ. Neben Adipozyten findet man bekanntermaßen in der SVF auch zahlreiche andere Zelltypen, wie z. B. Makrophagen, Granulozyten, Dendritische Zellen oder Prä-Adipozyten. Bei Genexpressionsanalysen aus Gesamtzelllysaten können diese Zellen das

Expressionsniveau bei den Untersuchungen maßgebend beeinflussen. Aus diesem Grund wurden im nächsten Schritt die Adipozyten und die SVF aus gon und sc Fettgewebe von C57BL/6 Mäusen isoliert. TLR9-Genexpressionsanalysen verdeutlichten die starke Expression des Immunrezeptors in der SVF beider Kompartimente. Zugleich konnte aber auch in den Adipozyten eine signifikante TLR9-Expression detektiert werden. Wie schon bei den Balb/C Mäusen war auch bei den Adipozyten der C57BL/6 Tiere kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der gon und der sc TLR9 mRNA Expression detektierbar.

TLR9-Genexpressionsanalysen humaner Fettgewebeproben offenbarten, anders als in den murinen Proben, eine deutlich höhere Expression im viszeralen gegenüber dem sc Fettgewebe. Das sc Fettgewebe kann zusätzlich in zwei weitere Kompartimente unterteilt werden, die durch die *Scarpia fascia* voneinander getrennt werden und die sich auch in ihrer Funktion unterscheiden. So wurde z. B. in sc Fettgewebe, dass oberhalb dieser Membranschicht lokalisiert ist, eine höhere Konzentration an infiltrierenden Makrophagen nachgewiesen werden als im Fettgewebe unterhalb der *Scarpia fascia* ¹². Aufgrund der starken Homologie des tieferen sc Fettgewebes mit dem viszeralen Fettgewebe wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit ausschließlich das oberflächliche sc Gewebe untersucht.

Die unterschiedliche Ausprägung der TLR9-Expression im humanen Fettgewebe könnte auf der Tatsache begründet sein, dass das omentale Fettgewebe beim Menschen in unmittelbarer Nähe zum intestinalen Trakt lokalisiert ist, während das gon Fettgewebe bei Mäusen keinen direkten Kontakt zum intestinalen Trakt hat. Zahlreiche Studien konnten eine hohe Konzentration von mikrobiellen Substanzen in humanem Fettgewebe nachweisen, die aus dem Intestinum in das umliegende Gewebe einwandern ^{127,149,154,155}. Dadurch kommt humanes viszerales Fettgewebe vermehrt in Kontakt mit PAMPs, die wiederum von den PRRs der Adipozyten erkannt werden können. Auf diese Tatsache ist wahrscheinlich auch die positive Korrelation von hTLR9 und dem Hüftumfang der Adipositaspatientinnen (Abbildung 15) zurückzuführen. Ein zunehmender Hüftumfang ist ein Indiz für das Ausmaß von Adipositas. Aus diesem Grund impliziert ein großer Hüftumfang im Rahmen der Adipoinflammation möglicherweise eine stärkere Infiltration des Fettgewebes mit TLR9 exprimierenden Makrophagen und anderen Immunzellen. Aktuelle Studien haben nachgewiesen, dass die TLR9-Expression und Aktivierung besonders im viszeralen Fettgewebe proinflammatorische Veränderungen während einer Adipositas verursachen und mit IR assoziiert sind. Auch wenn sich bei den hier ausgewählten Adipositas-Patientinnen der ROBS Studienkohorte noch kein Diabetes mellitus ausgebildet hatte, kann das hohe Expressionsniveau von TLR9 im viszeralen Fettgewebe ein Hinweis für die Entstehung von IR und Diabetes mellitus sein. Auf der

anderen Seite haben Miura *et al.* beschrieben, dass eine Diät-induzierte Steatohepatitis und IR in TLR9^{-/-} Mäusen weniger ausgeprägt war als bei TLR9^{wt/wt} Mäusen, aufgrund einer reduzierten IL-1 β -Produktion der hepatischen Sternzellen (HSC) ¹⁷³. Die physiologische Funktion von TLR9 ist damit abhängig vom jeweiligen Zelltyp, der den Rezeptor exprimiert. Zukünftige Analysen müssen deshalb die Bedeutung der TLR9-Signaltransduktion im Kontext von Adipositas, Insulin Resistenz und Diabetes mellitus aufklären, indem die Auswirkungen der TLR9-Signaltransduktion in Abhängigkeit vom individuellen Zelltyp und dem Zustand der metabolischen Inflammation untersucht und mit normalgewichtigen Organismen verglichen wird.

Interessanterweise korreliert die TLR9 mRNA Expression im viszeralen Fettgewebe positiv mit dem Serumresistin, während letzteres negativ mit TLR9 mRNA im sc Fettgewebe korreliert ist (Abbildung 14). Diese Inkongruenz könnte durch die bereits erwähnte Zelldiversität im Fettgewebe bedingt sein. Da die Genexpressionsdaten von humanem TLR9 im Fettgewebe aus Gesamtzelllysaten gewonnen wurden, kann man davon ausgehen, dass ein Großteil der TLR9 mRNA durch die Zellen der SVF sezerniert wurde (siehe Abbildung 11). Resistin wird beim Menschen, anders als bei der Maus, nicht von Adipozyten sezerniert und ist damit auf die Zellen der SVF zurückzuführen. Außerdem fällt auf, dass bei den Genexpressionsanalysen im viszeralen Fettgewebe die Akkumulation des TLR9-Proteins vergleichsweise stark zwischen den individuellen Patientinnen variiert. Um Adipozyten-spezifische Effekte zu analysieren, müssen deshalb Genexpressionsanalysen in isolierten Adipozyten aus den humanen Fettgewebeproben unter Berücksichtigung der einzelnen Kompartimente vor und nach der bariatrischen Operation durchgeführt werden.

4.2. Die Bedeutung der TLR9-Expression während der adipozytären Differenzierung

Zuvor wurde eine Abhängigkeit der TLR9-Expression von dem Differenzierungsgrad der Adipozyten beschrieben (Abschnitt 3.1.1.). Deswegen sollte überprüft werden, ob im Umkehrschluss die adipozytäre Differenzierung auch abhängig von der TLR9-Expression ist. Dafür wurde ein siRNA-vermittelter Knockdown von TLR9 in 3T3-L1 Adipozyten durchgeführt. Lichtmikroskopisches Monitoring konnte eine deutlich verminderte Anzahl an differenzierten Adipozyten nach dem TLR9-Knockdown gegenüber den Kontrollansätzen nachweisen. Eine *Oil Red O* -Färbung der Zellen verdeutlichte, dass die einzelnen Lipidvakuolen der TLR9-Knockdown Adipozyten ein deutlich reduziertes Volumen gegenüber den Kontroll-Adipozyten hatten (Abbildung 16). Damit scheint die Expression von TLR9 auf Adipozyten wichtig für die Einlagerung von

Triglyzeriden in den Zellen zu sein. In Übereinstimmung mit diesen Daten demonstrierten Revelo *et al.* in einer aktuellen Studie, dass TLR9^{-/-} Mäusen unter Hochfettdiät deutlich weniger viszerales Fett aufbauen als TLR9^{wt/wt} Mäuse¹¹⁹.

Es gibt außerdem einen molekularbiologischen Zusammenhang zwischen der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren während der Adipogenese und dem TLR9-Signalweg. Im frühen Stadium der adipozytären Differenzierung wird die Adipogenese durch die Aktivierung von C/EBP δ über MAPKp38 vermittelt¹⁷⁴. Auch die TLR9-Signalkaskade ist abhängig von MAPKp38¹⁰⁵. Neben C/EBP δ sind auch weitere Transkriptionsfaktoren der C/EBP-Proteinfamilie in die Differenzierung von Adipozyten involviert¹⁷⁵. So ist unter anderem in C/EBP α ^{-/-} Mäusen die dermale Lipidakkumulation inhibiert¹⁷⁶. Daneben gibt es Hinweise dafür, dass die C/EBP α Bindungsstelle innerhalb des TLR9 Genpromotors lokalisiert ist¹⁶⁹, wodurch die Möglichkeit besteht, dass der siRNA-vermittelte TLR9-Knockdown Einfluss auf die Expression von C/EBP α hatte, was letztendlich die Lipidakkumulation sowohl in den dermalen Adipozyten der C/EBP α ^{-/-} Mäuse¹⁷⁶ als auch bei dem siRNA-vermittelten TLR9-Knockdown (Abbildung 16) hemmt.

Interessanterweise wurde 2012 von Schmid *et al.* beschrieben, dass bei einem siRNA-vermittelten Knockdown von C1q/TNF-related Protein-3 (CTRP-3) ebenfalls die Bildung intrazellulärer Lipidvakuolen in murinen 3T3-L1 Adipozyten inhibiert wird¹⁷⁷. CTRP-3 gilt als entzündungshemmendes Adipokin, das LPS- und TLR-vermittelte proinflammatorische Signalwege inhibiert^{178,179}. In einer aktuellen Studie wurde ein Einfluss von CTRP-3 auf die NF- κ B p65 Phosphorylierung, die MyD88- und die PPAR γ -Proteinexpression detektiert¹⁸⁰. Damit gibt es auch ein Zusammenhang zwischen den Schlüsselproteinen des TLR9- und des CTRP-3 Signalweges, der möglicherweise die Ursache für die Inhibition der Lipidakkumulation in Adipozyten ist, sobald eines der beiden Proteine ausgeschaltet wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde außerdem ein signifikanter Einfluss der TLR9-Expression auf die Adiponektinsekretion detektiert. Die Adiponektin-Proteinlevel wurden durch den TLR9-Knockdown in den 3T3-L1-Adipozyten signifikant verringert (Abbildung 17). Interessanterweise war auch im Serum der TLR9^{-/-} Mäuse die Konzentration von zirkulierendem Adiponektin gegenüber den Kontrolltieren deutlich reduziert (Abbildung 18). Nach Lakota *et al.* können reduzierte Adiponektin-Level auf eine verringerte PPAR γ -Aktivität hinweisen¹⁸¹. Der Rezeptor PPAR γ gilt als antiinflammatorisch, da er unter anderem die Insulinsensibilität von Zellen verbessert¹⁸². Die beiden Differenzierungsmarker PPAR γ und C/EBP α beeinflussen sich synergetisch und sind wichtige Elemente innerhalb der Adipogenese^{14,183}. Eine Beeinflussung dieser

beiden Proteine durch den TLR9-Knockdown könnte somit die Verbindung zwischen der inhibierten Lipidakkumulation und der reduzierten Adiponektinsekretion darstellen. Zukünftige regulatorische Analysen müssen deshalb Aufschluss über den Zusammenhang zwischen der Expression und Aktivierung von TLR9, C/EBP α , C/EBP δ , PPAR γ sowie CTRP-3 geben.

Diese sowohl *in vitro* als auch *in vivo* detektierte Hemmung des Differenzierungsmarkers Adiponektin in Kombination mit der inhibierten intrazellulären Lipidakkumulation beim gezielten Knockdown bzw. Knockout von TLR9 implizieren, dass die intakte TLR9-Expression ein wichtiges Element innerhalb der adipozytären Differenzierung darstellt. Vergleichbare Auswirkungen auf die Leptin- und Resistinexpression konnten weder in der 3T3-L1 Zellkultur noch im Serum der Mäuse detektiert werden. Die Ursache dafür ist möglicherweise die Tatsache, dass in Abwesenheit von TLR9 die Adipogenese zwar inhibiert aber nicht vollständig unterdrückt wird. Die wenn auch schlecht differenzierten Adipozyten scheinen dabei immer noch in der Lage zu sein, ausgewählte Adipokine in einer nahezu unveränderten Konzentration zu sezernieren.

Adiponektin ist ein Adipokin, dass grundsätzlich als antiinflammatorisch verstanden wird, da seine Serumkonzentration unter anderem negativ mit dem BMI sowie der Inzidenz von IR und Diabetes korreliert ist ^{49,184,185}. Aktuelle Studien postulieren außerdem einen Zusammenhang von TLR9 mit Adipositas und IR ^{117,118,167,186}. Damit könnte die Interaktion zwischen den genannten Parametern eine signifikante Funktion im Rahmen des metabolischen Syndroms haben. Für ein besseres Verständnis des TLR9-Signalweges und seiner endokrinologischen Bedeutung müssen weitere molekularbiologische Analysen Aufschluss über den Ablauf der TLR9-Signaltransduktion geben und den Zusammenhang mit anderen, während der Adipogenese aktivierten Signalkaskaden, aufklären.

4.3 Der Einfluss von TLR9-Agonisten (CpG-ODNs) auf das Sekretionsprofil von Adipozyten

Um die Funktionalität von adipozytärem TLR9 nachzuweisen, wurden anschließend Stimulationsexperimente mit TLR9-Liganden durchgeführt. Insgesamt hatte die Behandlung der murinen 3T3-L1 Adipozyten mit den synthetischen DNA-Sequenzen eine dosisabhängige und signifikante Reduktion der Resistinsekretion in die Zellkulturüberstände zur Folge. Dieser Effekt wurde, wenn auch mit unterschiedlicher Intensität, klassenübergreifend durch alle drei verwendeten CpG-haltigen ODNs (ODN 1585, ODN 1826, ODN 2395) ausgelöst. Auffällig war dabei, dass die Reduktion bei ODNs, die eine palindromische Sequenz enthalten (ODN 1585 und ODN 2395)

stärker ausgeprägt war. Am effektivsten wurde Resistin durch das Klasse A ODN 1585 inhibiert. Neben der zentralen palindromischen Sequenz unterscheidet sich dieses ODN durch die Zusammensetzung seines DNA-Rückgrats von den anderen beiden ODN-Klassen. So besteht das Rückgrat des Klasse A ODNs nicht komplett aus Thiophosphat (*Phosphorothioate*, PO_3S)-Bindungen, sondern enthält auch Phosphodiester (PO_4)-Bindungen. In einer Arbeit von Pohar *et al.* konnte eine deutlich stärkere Aktivierung von TLR9 in humanen B-Zellen und pDCs bei Stimulation mit PD-haltigen ODNs nachgewiesen werden als bei Stimulation mit ODNs, die ausschließlich PTO-Bindungen enthielten¹⁸⁷. Die ausgeprägte Inhibition der Resistinkonzentration durch das ODN 1585 basiert deshalb wahrscheinlich auf seinen besonderen strukturellen Eigenschaften (der kompakten Form durch das zentrale Palindrom und dem PD-haltigen DNA-Gerüst). Entsprechende Ktrl. ODNs, die keine TLR9-aktivierende CpG-Sequenz enthalten, hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Resistinlevel.

Um den proinflammatorischen Zustand im viszeralen Fettgewebe zu modellieren^{4,166,188}, wurden zusätzlich ODN-Stimulationsexperimente mit Adipozyten durchgeführt, die vorher inflammatorisch mit LPS stimuliert wurden. Bemerkenswerterweise wurde auch in diesen Zellen die Resistinsekretion signifikant inhibiert. Die Adiponektinkonzentration im Zellkulturüberstand der 3T3-L1 Adipozyten wurde durch die Stimulation mit den TLR9-Liganden basal nicht beeinflusst, während in Anwesenheit von LPS (10 ng/ml) das Klasse A ODN 1585 und das Klasse B ODN 1826 das Adiponektinniveau leicht reduziert wurde (Abbildung 19-21). In HEK293 Zellen wurde nach Stimulation mit CpG-Sequenzen eine starke TLR9-abhängige NF- κ B Aktivierung nachgewiesen, die in diesem Ausmaß von GpC-Sequenzen nicht induziert wurde¹⁸⁹. Diese CpG-spezifische Aktivierung von TLR9 konnte hier auch in den 3T3-L1 Adipozyten detektiert werden.

Resistin ist ein Adipokin, das hauptsächlich in Verbindung mit proinflammatorischen Prozessen wie dem metabolischen Syndrom, Diabetes mellitus und kardiovaskulären Erkrankungen gebracht wird^{55,190–192}. Im Gegensatz dazu ist Adiponektin grundsätzlich mit antiinflammatorischen Prozessen assoziiert^{49,184,193–195}. Interessanterweise wurde die Adiponektinkonzentration im Zellkulturüberstand durch die ODN-Behandlung alleine nicht beeinflusst, während eine Ko-Stimulation mit LPS (10 ng/ml) und ODN A oder ODN B (20 $\mu\text{g/ml}$) eine moderate Inhibition auslöste. In einer Arbeit von De Nardo *et al.* wurde beschrieben, dass murine Makrophagen nach Stimulation mit CpG-DNA signifikant mehr TNF α und IL-6 exprimierten, wenn die Zellen vorher mit LPS behandelt wurden¹⁹⁶. Der Crosstalk zwischen dem TLR9- und TLR4-Signalweg konnte im Rahmen dieser Arbeit auch für Adipozyten nachgewiesen werden und hatte Auswirkungen auf die Resistin- sowie Adiponektinsekretion in 3T3-L1 Adipozyten.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Aktivierung von TLR9 in 3T3-L1 Adipozyten das Profil der Proteinsekretion insgesamt eher antiinflammatorisch beeinflusst und dass diese Effekte auch in Anwesenheit von LPS überwiegend bestehen bleiben. Diese Beobachtungen stützen wiederum die Hypothese eines möglichen Zusammenhangs mit dem entzündungshemmenden CTRP-3. Weiterführende Stimulationsexperimente mit TLR9-Liganden in Kombination mit CTRP-3 müssen deshalb in Zukunft durchgeführt werden, um den Zusammenhang der beiden Signalkaskaden über die Proteinexpression zu analysieren.

Nachfolgend sollte zusätzlich die Genexpression weiterer Entzündungsmarker (IL-6, MCP-1 und TNF α) nach Stimulation mit TLR9 Agonisten analysiert werden. Die mRNA-Expression von IL-6 wurde durch die ODN-Behandlung nicht beeinflusst, während die MCP-1 Genexpression sowohl durch CpG-haltige DNA-Sequenzen als auch durch die nicht CpG-haltigen Ktrl. ODNs signifikant reduziert wurde. Die TNF α -Genexpression war in den 3T3-L1 Adipozyten basal und nach Stimulation mit den ODNs nicht detektierbar. IL-6 wird klassischerweise als ein proinflammatorisches Zytokin verstanden, da es z. B. Makrophagen und Monozyten rekrutiert, die Differenzierung von B-Zellen induziert und die Apoptose bei T-Zellen inhibiert¹⁹⁷. Es ist außerdem mit akuten sowie chronischen Entzündungsprozessen und Autoimmunerkrankungen assoziiert. In 3T3-L1 Adipozyten induziert es eine IR und inhibiert die Adiponektinsekretion^{198,199}^{198–200}. Durch diesen Zusammenhang mit Adiponektin und aufgrund der Tatsache, dass durch die ODN-Stimulation die Adiponektinsekretion in den Adipozyten nicht beeinflusst wurde, scheint es demnach sinnig, dass auch die IL-6 Genexpression nicht reguliert wurde.

Ein entscheidendes Element innerhalb der proinflammatorischen Transformation des viszeralen Fettgewebes im Rahmen von Adipositas und IR ist das IR-fördernde proinflammatorische Protein Resistin. Vor dem Hintergrund der signifikanten Inhibition der Resistinexpression durch die TLR9-Aktivierung wurden außerdem Genexpressionsanalysen der adipozytären Glukosetransporter durchgeführt. Interessanterweise wurde vor allem durch das ODN A eine Reduktion der GLUT1 und GLUT4 Genexpression induziert. Damit scheint die Glukoseaufnahme in Adipozyten ODN-abhängig von TLR9 beeinflusst zu werden und zur Ausbildung einer IR in Adipozyten beizutragen. Die Umprogrammierung des zellulären Stoffwechsels in Adipozyten, die möglicherweise über die Aktivierung von TLR9 vermittelt wird, stellt einen direkten Bezug des adipozytären TLR9-Signalweges zur Pathophysiologie von Adipositas und der damit einhergehenden Metaflammation her.

Weitere Analysen zu dem Einfluss von ODN A auf die GLUT1 und GLUT4 Genexpression sowie die Lipolyserate der Adipozyten unter hoch *versus*

niedrig-Glukose-/Insulin-Bedingungen müssen zukünftig die funktionale Rolle von TLR9 im Adipozytenmetabolismus genauer aufklären.

Untersuchungen des TLR9 Signalweges in primären Adipozyten aus TLR9^{wt/wt} und TLR9^{-/-} Mäusen sollten die Funktion des Immunrezeptors in Adipozyten im weiteren Vorgehen genauer analysieren. Bemerkenswerterweise waren die Adiponektinsekretionslevel in den TLR9^{-/-} Adipozyten gegenüber den TLR9^{wt/wt} schon basal signifikant inhibiert, während die MCP-1 und Resistin-Proteinexpression gegenüber den TLR9^{wt/wt} Adipozyten signifikant induziert war. Damit beeinflusst eine intakte TLR9-Expression scheinbar schon basal die adipozytäre Proteinexpression antiinflammatorisch. Die Ergebnisse der Adiponektin-Expressionsanalysen korrelieren dabei mit dem reduzierten Adiponektin-Level im Serum der TLR9-Knockout Mäuse sowie mit der inhibierten Adiponektinexpression nach TLR9-Knockdown in 3T3-L1 Adipozyten (Kapitel 3.2).

Die Stimulation mit dem Klasse A ODN 1585 induzierte in den primären TLR9^{wt/wt} Adipozyten die Adiponektinexpression signifikant, während MCP-1 und Resistin CpG-abhängig inhibiert wurden. Mit Ausnahme der Resistinexpression waren diese Effekte Genotyp-spezifisch und konnten in den TLR9^{-/-} Adipozyten nicht ausgelöst werden. Damit induziert das ODN A eine insgesamt antiinflammatorische Proteinsekretion in Adipozyten. Eine Behandlung mit dem Klasse B ODN beeinflusste die Proteinexpression überwiegend proinflammatorisch. Die Adiponektinsekretion der TLR9^{wt/wt} Adipozyten wurde signifikant und CpG-spezifisch inhibiert, während die MCP-1-Sekretion induziert wurde. Die Konzentrationen beider Adipokine blieben dabei in TLR9^{-/-} Adipozyten unverändert.

Korrelierend mit den Daten der Resistinexpressionsanalysen nach ODN Stimulation in 3T3-L1 Adipozyten wurde die Resistinkonzentration im Zellkulturüberstand der primären Adipozyten durch die Behandlung mit den verschiedenen Klassen der TLR9-Liganden grundsätzlich inhibiert. Interessanterweise war diese Inhibition in den TLR9^{wt/wt} Adipozyten und den TLR9^{-/-} Adipozyten ähnlich stark ausgeprägt, was impliziert, dass die Reduktion durch die DNA-Sequenzen unabhängig von TLR9 über einen anderen Rezeptor vermittelt werden muss. Die Stimulation mit dem Klasse C ODN 2395 induzierte die Adiponektinsekretion in TLR9-defizienten Adipozyten. Die CpG-spezifische Induktion der MCP-1-Sekretion wurde, wie auch die Inhibition der Resistin-Sekretion, nicht durch die Aktivierung von TLR9 ausgelöst. Damit werden die stimulierenden Effekte des Klasse C ODNs in primären murinen Adipozyten überwiegend TLR9-unabhängig vermittelt. Diese Effekte könnten durch andere endosomal lokalisierte Immunrezeptoren wie TLR3, TLR7 oder TLR8 vermittelt werden, worüber weiterführende

Stimulationsexperimente mit Adipozyten aus entsprechenden Knockout-Mäusen künftig Aufschluss werden verschaffen können.

In 50 % der Fälle haben Ktrl. ODNs, die keine CpG-Sequenz beinhalten, ähnliche Effekte wie die ODNs selbst verursacht. Damit kann die TLR9-Aktivierung in Adipozyten, anders als in Monozyten, offenbar CpG-unabhängig erfolgen.

Alles in Allem zeigten die verschiedenen ODN-Klassen im Rahmen dieser Arbeit sehr unterschiedliche Auswirkungen auf die inflammatorische Adipokinsekretion der primären Adipozyten aus TLR9^{wt/wt} und TLR9^{-/-} Mäusen und müssen auf die individuellen Eigenschaften der jeweiligen ODNs zurückzuführen sein. Wie auch von zahlreichen anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurde, unterscheiden sich verschiedene ODN-Klassen immens in ihren immun-stimulierenden Eigenschaften. Während Klasse A CpG-Sequenzen bekanntermaßen eine starke IFN α Produktion in plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) induzieren, aktivieren sie den NF- κ B-Signalweg nur sehr moderat. Klasse B ODNs sind weniger für die Induktion der IFN α Produktion verantwortlich, gelten aber als starke Aktivator von B-Zellen. Klasse C ODNs hingegen sind in der Lage, sowohl B-Zellen als auch pDCs zu aktivieren und können eine starke IFN α Sekretion induzieren. Ein wesentlicher struktureller Unterschied zwischen den drei verschiedenen ODN-Klassen ist der Besitz und die Lokalisation einer palindromischen Sequenz. Klasse A ODNs tragen ein zentrales Palindrom innerhalb ihrer Sequenz, wodurch sie eine relativ kompakte Form haben. Im Gegensatz dazu ist in den linearen Klasse B ODNs keine palindromische Sequenz verankert. Klasse C ODNs bilden die Mischform aus Klasse A und B ODNs. Bei ihnen ist die palindromische Sequenz dezentral lokalisiert. Des Weiteren unterscheidet sich das Klasse A ODN 1585 von den anderen beiden ODN Klassen, wie zuvor erwähnt, durch sein PD-haltiges DNA-Rückgrat, was seine immun-stimulierenden Eigenschaften ebenfalls beeinflussen kann¹⁸⁷. Bei der Planung von Stimulationsexperimenten ist es deshalb unabdinglich, anhand dieser Adipozyten-spezifischen Daten einen TLR9-Liganden auszuwählen, der sich für die Beantwortung der jeweiligen Fragestellung eignet.

Um die funktionale Rolle von TLR9 im Menschen zu analysieren, wurden außerdem primäre humane Prä-Adipozyten *in vitro* unter hormoneller Supplementierung zu reifen Adipozyten differenziert. Entsprechend den Stimulationsexperimenten in den murinen Zellen wurden die humanen Adipozyten mit human-spezifischen ODNs der Klasse A, B und C für Proteinexpressionsanalysen via ELISA stimuliert. Wie schon bei den murinen 3T3-L1 Adipozyten, blieb das Adiponektin-Sekretionsniveau der humanen Adipozyten durch die Behandlung mit den ODNs weitestgehend unbeeinflusst. Lediglich das ODN C hatte eine moderate Induktion *versus* der Ktrl. Behandlung, aber nicht *versus* der Behandlung mit dem Ktrl. ODN C zur Folge. Korrelierend mit MCP-1

Genexpressionsanalysen der 3T3-L1 Zellen, wurde die MCP-1 Proteinexpression durch die Stimulation mit allen drei ODN-Klassen gegenüber der Lösemittelkontrolle signifikant reduziert. Dabei hatten die jeweiligen Ktrl. ODNs vergleichbare Effekte. Nur das ODN A inhibierte die MCP-1 Sekretion auch gegenüber dem Ktrl. ODN A signifikant. Resistin konnte als Protein im Überstand der humanen Zellen basal wie auch nach Stimulation mit den TLR9-Liganden nicht nachgewiesen werden. Anders als murine Adipozyten produzieren humane Adipozyten kaum Resistin. Eine Induktion dieses proinflammatorischen Proteins durch TLR9 Liganden konnte somit ausgeschlossen werden. Insgesamt induziert die Aktivierung von TLR9 damit auch in humanen Zellen eine eher antiinflammatorisch geprägte Signaltransduktion. Angesichts dieser grundsätzlichen Kongruenz der Ergebnisse scheint das Maus-Modell ein geeignetes Tiermodell für die Erforschung der funktionalen Rolle von TLR9 im Fettgewebe im Kontext von Adipositas und des metabolischen Syndroms zu sein.

Der klassische TLR9-Ligand ist bakterielle hypomethylierte DNA, die sich durch ihre charakteristischen CpG-Basensequenzen auszeichnet^{101,131,194,201,202}. Spätere Studien konnten nachweisen, dass nicht-CpG-haltige sowie methylierte DNA Sequenzen ebenfalls spezifisch TLR9 aktivieren können, wenn auch in geringerem Ausmaß als CpG ODNs^{203–205}. Korrelierend mit diesen Beobachtungen ging auch aus unseren Daten hervor, dass TLR9 in Adipozyten von den murinen ODNs 1585, 1826, 2395 sowie den humanen ODNs 2216, 2006, 2395 auch CpG-unabhängig aktiviert werden kann. Die verschiedenen ODNs hatten dabei unterschiedliche Auswirkungen auf Adipozyten, die nur teilweise TLR9-spezifisch waren. Aktuelle Studien konnten außerdem nachweisen, dass Zell-freie (cf)DNA aus apoptotischen Adipozyten ein physiologischer Ligand von TLR9 ist^{118,119}. Interessanterweise wurde auch für TLR4 ein alternativer Ligand beschrieben (Neoseptin-3), der den Immunrezeptor genauso effizient aktiviert wie sein klassischer Ligand LPS, obwohl es strukturell keinerlei Ähnlichkeit zwischen diesen beiden Molekülen gibt (Wang 2016). Eine sehr aktuelle Studie konnte außerdem belegen, dass langkettige gesättigte Fettsäuren (lcSFA), anders als bislang vermutet, nicht in der Lage sind, TLR4 zu binden, ihre proinflammatorische Wirkung aber trotzdem TLR-vermittelt ist. Während die Wirkung von lcSFA in TLR4^{-/-} Makrophagen inhibiert war, konnte sie durch die Vorbehandlung mit anderen TLR-Liganden (TLR2- und TLR3-Agonisten) wiederhergestellt werden. Damit konnte die Arbeitsgruppe nachweisen, dass TLR-vermittelt eine Umprogrammierung des zellulären Metabolismus sowie Veränderungen der Genexpression, des Lipidstoffwechsels und der Membranzusammensetzung induziert werden, die essentiell das inflammatorische Potential von lcSFAs beeinflussen²⁰⁶. Analog ist auch eine TLR9-vermittelte

4 Diskussion

Umprogrammierung des zellulären Metabolismus von Adipozyten durch ODNs oder andere Liganden (wie z. B. der cfDNA) denkbar, und die TLR9-unabhängige Inhibition von Resistin könnte ein Indikator für eine veränderte Genexpression durch z. B. TLR7- oder TLR9-induziertes Priming in Adipozyten sein. Zukünftige Studien müssen deshalb Aufschluss über die Interaktion von TLR9 mit anderen endosomal lokalisierten Rezeptoren (TLR3, TLR7, TLR8) in diesem Zusammenhang geben müssen.

5.1 Zusammenfassung

Weltweit sterben jährlich mindestens 2,8 Millionen Menschen pro Jahr an den Folgen von Adipositas, die Tendenz ist steigend. Übergewicht und Adipositas sind mit zahlreichen Komorbiditäten wie Diabetes mellitus Typ 2, Krebs und kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert und bedeuten massive Einschränkungen der Lebensqualität der Betroffenen. Durch den Einfluss zahlreicher Faktoren übersteigt bei Adipositas die Kalorienaufnahme den Verbrauch deutlich, wodurch generell eine Volumenzunahme des Fettgewebes und dessen proinflammatorische Transformation (*adipose inflammation*) induziert werden. Diese Adipositas-assoziierte metabolische Entzündung wird auch als Metaflammation bezeichnet.

Lange Zeit wurde das Fettgewebe als simpler Energiespeicher verstanden, da die primäre Funktion von Fettzellen die Umwandlung von Glukose zu Fettsäuren ist, die sie in Form von Triglyzeriden in ihren Lipidvakuolen für einen späteren Bedarf speichern. In den letzten Jahrzehnten hat sich das Fettgewebe, vor allem durch seine Fähigkeit zur Sekretion von Adipokinen, als endokrines Organ etabliert. Durch die aktive Expression diverser bioaktiver Peptide ist es in der Lage, zahlreiche physiologische Prozesse zu beeinflussen. Aktuelle Studien konnten außerdem nachweisen, dass Adipozyten selbst in der Lage sind immunmodulatorisch zu wirken, indem sie über die Expression und Aktivierung von TLRs aktiv die Sekretion antipathogener Moleküle induzieren. Neueste Erkenntnisse implizieren, dass die Aktivierung von TLRs in diversen Geweben zur Entstehung der Adipositas-assoziierten Insulin-Resistenz beitragen könnten. Dabei scheint vor allem die Expression von TLR9 bei Adipositas von großer Bedeutung zu sein. Sämtliche Studien zu TLR9 fokussieren sich allerdings auf dessen Expression und Funktion in Immunzellen wie Makrophagen oder dendritische Zellen. Zu TLR9 in Adipozyten ist bislang wenig bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals die Gen- sowie Proteinexpression von TLR9 in murinen 3T3-L1 Adipozyten, sowie in humanen und murinen Fettgeweben nachgewiesen werden. Analysen von 3T3-L1 Adipozyten zu verschiedenen Zeitpunkten der adipozytären Differenzierung ergaben dabei, dass TLR9 im Verlauf der Adipogenese induziert wird. Immunzytochemische Analysen wiesen außerdem auf eine zytoplasmatische Lokalisation von TLR9 in Adipozyten hin. Die TLR9-Expression ist im viszeralen gegenüber dem sc Fettgewebe von nicht-diabetischen Adipositaspatientinnen signifikant erhöht und korreliert Fettdepot-abhängig mit systemischen Resistinkonzentrationen.

5.1 Zusammenfassung

Durch einen siRNA-vermittelten Knockdown von TLR9 in 3T3-L1 Adipozyten konnte außerdem nachgewiesen werden, dass eine intakte TLR9-Expression notwendig für eine adäquate adipozytäre Differenzierung ist. Der TLR9-Knockdown verursachte eine Inhibition der intrazellulären Lipidakkumulation, sowie der Expression des Adipozyten-spezifischen Adipokins Adiponektin. Korrelierend mit diesen Beobachtungen wurde auch im Serum von TLR9-defizienten BALB/c Mäusen verglichen mit Wildtyp-Mäusen eine signifikant reduzierte Adiponektinkonzentration detektiert.

Um außerdem die regulatorische Funktion von TLR9 in Adipozyten zu analysieren, wurden zusätzlich Stimulationsexperimente mit synthetischen CpG-ODNs durchgeführt. Während eine Stimulation von murinen 3T3-L1 Adipozyten mit diesen TLR9-Liganden die Expression und Sekretion des proinflammatorischen Proteins Resistin reduziert, blieb die Sekretion des eher antiinflammatorischen Adiponektins unverändert. Diese Effekte blieben größtenteils auch bei einer Kostimulation mit dem proinflammatorischen Molekül LPS bestehen. Genexpressionsanalysen nach Stimulation mit CpG-ODNs ergaben außerdem, dass auch die Expression von proinflammatorischen MCP-1 durch die Aktivierung der TLR9-Signalkaskade inhibiert wird. Zusätzlich wurde ein Einfluss der TLR9-spezifischen Ligandenbindung auf die Expression der Glukosetransporter detektiert. Um zu verifizieren, dass diese Effekte in Abhängigkeit von TLR9 induziert werden, wurden außerdem analoge Stimulationsexperimente mit TLR9-Liganden in primären Adipozyten aus Wildtyp- und TLR9-defizienten Mäusen *ex vivo* durchgeführt. Dabei haben die verschiedenen CpG-ODNs unterschiedliche Effekte in den primären Adipozyten aus TLR9^{-/-} und TLR9^{wt/wt} Mäusen ausgelöst. In primären humanen Adipozyten hat die Stimulation mit den verschiedenen TLR9 Liganden eine starke Inhibition der MCP-1 Expression ausgelöst, während die Adiponektinexpression überwiegend unbeeinflusst blieb.

Zusammenfassend scheint TLR9 in Adipozyten damit, anders als in Immunzellen, eine eher antiinflammatorische Funktion zu haben. Möglicherweise erkennen Adipozyten die Nukleotide, welche von nekrotischen Adipozyten (*crown-like structures*) bei viszeraler Adipositas lokal freigesetzt werden. Eine gezielte Beeinflussung der adipozytären TLR9-Signaltransduktion bietet damit einen potentiellen neuen, protektiven Therapieansatz für die proinflammatorische Transformation des Fettgewebes, vor allem bei Adipositas.

5.2 Summary

Worldwide approximately 2.8 million deaths per year are related to obesity and its numerous comorbidities, e. g. diabetes mellitus type 2, cancer and cardio-vascular disease. Furthermore obesity not only portrays a severe burden for public health systems, but it also implies a substantial restriction in the quality of life for obese patients. There are numerous key elements causing an excess of nutrients and energy, inducing a general increase of total adipose tissue mass. In response multiple cell types including immune cells generate a systemic low-grade inflammatory state of the adipose tissue (adipose inflammation). This metabolic inflammatory state is also known as metaflammation.

Traditionally, adipose tissue was seen as a simple reservoir for energy storage, due to its primary function of metabolizing glucose into fatty acids and to store them in form of triglycerides within the lipid droplets of adipocytes. Within the last decades this understanding has changed. Today adipose tissue is known to be an endocrine organ, which directly influences numerous physiological processes through the active secretion of cytokines and chemokines. Furthermore recent studies demonstrated that adipocytes themselves are able to actively participate in anti-microbial responses by the activation and expression of different pattern recognition receptor (PRR) subtypes, such as Toll-like receptors (TLRs). Recent data imply an association between the activation of TLRs and insulin resistance within obesity, particularly the expression of TLR9. Currently, available studies on the role of TLR9 during obesity exclusively focused on its expression and function in immune cells, like macrophages and dendritic cells. To date little is known about TLR9 in adipocytes.

Within this work the TLR9 gene and protein expression were described for the first time in murine 3T3-L1 adipocytes, as well as in human and murine adipose tissue. Analysis of 3T3-L1 adipocytes on different states of adipose differentiation revealed, that TLR9-expression is induced during adipogenesis. Immunocytochemical analysis implied a cytoplasmatic localization of TLR9. Total TLR9 gene expression in visceral adipose tissue was significantly induced compared to subcutaneous adipose tissue in female non-diabetic patients suffering from obesity. Depending on different fat depots there was a significant correlation of the TLR9 gene expression and systemic resistin concentrations.

In 3T3-L1 adipocytes a siRNA-mediated knockdown of TLR9 revealed that TLR9-expression is inevitable for functional adipogenesis. TLR9 knockdown caused a severe inhibition of intracellular lipid accumulation and significantly reduced adiponectin

5.2 Summary

expression. In correlation to these findings systemic adiponectin levels are significantly reduced in TLR9-deficient BALB/c mice compared to wildtype littermates.

The physiological function of TLR9 in adipocytes was analyzed by stimulation experiments using synthetic TLR9-agonists, so called CpG-oligonucleotides (ODNs), containing a cytosine–phosphate–guanine (CpG) dideoxynucleotide motif. Agonist-activation of TLR9 in murine 3T3-L1 adipocytes significantly reduced the secretion of proinflammatory resistin, while concentrations of antiinflammatory adiponectin remained unaffected. In general co-stimulation with proinflammatory lipopolysaccharide (LPS) did not alter the stimulatory characteristics of CpG-ODNs on the adipokine secretion profile. Gene-expression analysis following stimulation with CpG-ODNs revealed a significant reduction of proinflammatory monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1). Interestingly activation of TLR9-signalling also had an impact on gene-expression of glucose transporters. To verify that these stimulatory effects were TLR9-dependent, analogous experiments were performed using *ex vivo* differentiated primary adipocytes from TLR9^{wt/wt} and TLR9^{-/-} mice. Stimulation with TLR9-agonists had differential effects on gene-and protein-expression. In primary human adipocytes MCP-1 expression was significantly reduced upon CpG-ODN stimulation, while adiponectin expression remained unaffected.

Thus, opposed to its well described function in immune cells, adipocytic TLR9 seems to have a rather antiinflammatory effect. Thus, adipocytes are potential physiological sensors of nucleotides, released by necrotic adipocytes (*crown-like structures*) within visceral obesity. Therefore the specific manipulation of adipocytic TLR9-signalling could be a potential target for a new protective therapy against adipose tissue inflammation, especially within obesity.

6 Publikationen und Kongressbeiträge

6.1 Publikationen

6.1.1 Erstautorenschaften

Thomalla M, Schmid A, Neumann E, Pfefferle PI, Müller-Ladner U, Schäffler A, Karrasch T. Evidence of an anti-inflammatory toll-like receptor 9 (TLR 9) pathway in adipocytes. *The Journal of Endocrinology* 2019; 240(2):325-343.

6.1.2 Koautorenschaften

Schmid A, Karrasch T, Thomalla M, Schlegel J, Salzberger B, Schäffler A, Hanses F. Innate Immunity of Adipose Tissue in Rodent Models of Local and Systemic *Staphylococcus aureus* Infection. *Mediators of Inflammation* 2017; 2017: 1-13.

Schmid A, Schlegel J, Thomalla M, Karrasch T, Schäffler A. Evidence of functional bile acid signaling pathways in adipocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2019; 483:1-10.

Brock J, Schmid A, Karrasch T, Pfefferle P, Schlegel J, Busse I, Hauenschild A, Schmidt B, Koukou M, Arapogianni E, Schultz A, Thomalla M, Akinci S, Kruse J, Padberg W, Schäffler A, Albrecht J. Progranulin serum levels and gene expression in subcutaneous vs visceral adipose tissue of severely obese patients undergoing bariatric surgery. *Clinical Endocrinology* 2019; 91(3):400-410.

Schmid A, Hochberg A, Kreiß AF, Gehl J, Patz M, Thomalla M, Hanses F, Karrasch T, Schäffler A. Role of progranulin in adipose tissue innate immunity. *Cytokine*. 2020; 125:154796.

6.2 Kongressbeiträge

Miriam Thomalla, Andreas Schmid, Jutta Schlegel, Elena Neumann, Andreas Schäffler, Thomas Karrasch: Toll-Like Receptor 9 in Adipocytes. Posterbeitrag P32, 8th GGL Conference on Life Sciences, Gießen, 30.09.-01.10.2015.

Miriam Thomalla, Andreas Schmid, Jutta Schlegel, Elena Neumann, Andreas Schäffler, Thomas Karrasch: Anti-Inflammatory Role of Toll-Like Receptor 9 in Adipocytes. Posterbeitrag P07-01, D·A·CH-Tagung der DGE, ÖGES und SGED: 59. Symposium der

6 Publikationen und Kongressbeiträge

Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, 21. Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Endokrinologie und Stoffwechsel und Frühjahrstagung 2016 der Schweizerischen Gesellschaft für Endokrinologie und Diabetologie, München, 26.-28.05.2016.

Miriam Thomalla, Andreas Schmid, Jutta Schlegel, Elena Neumann, Andreas Schäffler, Thomas Karrasch: Anti-Inflammatory Role of Toll-Like Receptor 9 in Adipocytes. Posterbeitrag P23, 9th GGL Conference on Life Sciences, Gießen, 20.-21.09.2016

Miriam Thomalla, Andreas Schmid, Jutta Schlegel, Elena Neumann, Andreas Schäffler, Thomas Karrasch: Toll-Like Receptor 9 Induces Anti-Inflammatory Signaling in Adipocytes. Posterbeitrag P22, 10th GGL Conference on Life Sciences, Gießen, 27.-28.09.2017

Miriam Thomalla, Andreas Schmid, Elena Neumann, Ulf Müller-Ladner, Andreas Schäffler, Thomas Karrasch: Adipocytic Toll-Like Receptor 9 (TLR9) Supports Differentiation and Acts Anti-Inflammatorily in Adult Adipocytes. Symposiumsvortrag OS03-01, 61. Deutscher Kongress für Endokrinologie, Bonn, 14.- 16. März 2018.

Miriam Thomalla, Andreas Schmid, Elena Neumann, Petra Ina Pfefferle, Ulf Müller-Ladner, Andreas Schäffler, Thomas Karrasch: Evidence of an Anti-Inflammatory Toll-Like Receptor 9 (TLR9) pathway in adipocytes. Symposiumsvortrag ST10-02, 62. Deutscher Kongress für Endokrinologie, Göttingen, 20.-22.03.2019.

7 Literaturverzeichnis

1. Könnert, A. C. & Brüning, J. C. Toll-like receptors: Linking inflammation to metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism* vol. 22 16–23 (2011).
2. Haslam, D. W. & James, W. P. T. Lecture 4 Obesity. *Lancet* **366**, 1197–209 (2005).
3. Effertz, T., Engel, S., Verheyen, F. & Linder, R. The costs and consequences of obesity in Germany: a new approach from a prevalence and life-cycle perspective. *Eur. J. Heal. Econ.* **17**, 1141–1158 (2016).
4. Apostolopoulos, V., de Courten, M. P. J., Stojanovska, L., Blatch, G. L., Tangalakakis, K. & de Courten, B. The complex immunological and inflammatory network of adipose tissue in obesity. *Mol. Nutr. Food Res.* **60**, 43–57 (2016).
5. Plum, L., Belgardt, B. F. & C., B. Central insulin action in energy and glucose homeostasis. *Insulin* **116**, 1761–1766 (2006).
6. Galic, S., Oakhill, J. S. & Steinberg, G. R. Molecular and Cellular Endocrinology Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol. Cell. Endocrinol.* **316**, 129–139 (2010).
7. Hotamisligil, G. S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **444**, 860–867 (2006).
8. Hotamisligil, G. S. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nat. Publ. Gr.* **542**, 177–185 (2017).
9. Wajchenberg, B. L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: Their relation to the metabolic syndrome. *Endocr. Rev.* **21**, 697–738 (2000).
10. Ibrahim, M. M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: Structural and functional differences. *Obes. Rev.* **11**, 11–18 (2010).
11. Preis, S. R., Massaro, J. M., Robins, S. J., Hoffmann, U., Vasan, R. S., Irlbeck, T., Meigs, J. B., Sutherland, P., D'Agostino, R. B., O'Donnell, C. J. & Fox, C. S. Abdominal subcutaneous and visceral adipose tissue and insulin resistance in the framingham heart study. *Obesity* **18**, 2191–2198 (2010).
12. Cappellano, G., Morandi, E. M., Rainer, J., Grubwieser, P., Heinz, K., Wolfram, D., Bernhard, D., Lobenwein, S., Pierer, G. & Ploner, C. Human macrophages preferentially infiltrate the superficial adipose tissue. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1–14 (2018).
13. Lane, M. D. & Tang, Q. Q. From multipotent stem cell to adipocyte. *Birth Defects Res. Part A - Clin. Mol. Teratol.* **73**, 476–477 (2005).
14. Schäffler, A., Müller-Ladner, U., Schölmerich, J. & Büchler, C. Role of Adipose Tissue as an Inflammatory Organ in Human Diseases. *Endocr. Rev.* **27**, 449–467 (2006).
15. Frühbeck, G., , Gómez-Ambrosi, J., Muruzábal, F. & Burrell, M. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Org. Process Res. Dev.* **280**, 827–47 (2001).
16. Margetic, S., Gazzola, C., Pegg, G. G. & Hill, R. A. Leptin: A review of its peripheral actions and interactions. *Int. J. Obes.* **26**, 1407–1433 (2002).
17. Kadowaki, T. & Yamauchi, T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr. Rev.* **26**, 439–451 (2005).
18. Rea, R. & Donnelly, R. Resistin: An adipocyte-derived hormone. Has it a role in diabetes and obesity. *Diabetes, Obes. Metab.* **6**, 163–170 (2004).
19. Fukuhara, A., Matsuda, M., Nishizawa, M., Segawa, K., Tanaka, M., Kishimoto, K., Matsuk, i Y., Murakami, i M., Ichisaka, T., Murakami, H., Watanabe, E., Takagi, T., Akiyoshi, M., Ohtsubo, T., Kihara, S., Ya- mashita, S., Makishima, M., Funahashi, T., Yamanaka, S., Hiramatsu, R., Matsuzawa, Y.,

- Shimomura, I. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimetics the effects of insulin. *Science* (80-.). **307**, 426–30 (2005).
20. Hug, C. & Lodish, H. F. Visfatin: A new adipokine. *Science* (80-.). **307**, 366–367 (2005).
 21. Kralisch, S., Klein, J., Bluher, M., Paschke, R., Stumvoll, M. & Fasshauer, M. Therapeutic perspectives of adipocytokines. *Expert Opin. Pharmacother.* **6**, 863–872 (2005).
 22. Rentsch, J. & Chiesi, M. Regulation of ob gene mRNA levels in cultured adipocytes. *FEBS Lett.* **379**, 55–59 (1996).
 23. Schäffler, A., Ehling, A., Neumann, E., Herfarth, H., Paul, G., Tarner, I., Gay, S., Schölmerich, J. & Müller-Ladner, U. Genomic organization, promoter, amino acid sequence, chromosomal localization, and expression of the human gene for CORS-26 (collagenous repeat-containing sequence of 26-kDa protein). *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* **1630**, 123–129 (2003).
 24. Halberg, N., Wernstedt-Asterholm, I. & Scherer, P. E. The Adipocyte as an Endocrine Cell. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **37**, 753–768 (2008).
 25. Kershaw, E. E. & Flier, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 2548–2556 (2004).
 26. Kim, S. J., Choi, Y., Choi, Y. H. & Park, T. Obesity activates toll-like receptor-mediated proinflammatory signaling cascades in the adipose tissue of mice. *J. Nutr. Biochem.* **23**, 113–122 (2012).
 27. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L & Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425–432 (1994).
 28. Frederich, R., Hamann, A., Anderson, S., Lollmann, B., Lowell, B. B. & Flier, S. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat. Med.* **12**, 1311–1314 (1995).
 29. Fantuzzi, G. & Faggioni, R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J. Leukoc. Biol.* **68**, 437–46 (2000).
 30. Ingalls, A. M., Dickie, M. M. & Snell, G. D. Obese, a new mutation in the house mouse. *J. Hered.* **41**, 315–317 (1950).
 31. Maffei, M., Halaas, J., , Ravussin, E., Pratley, R., Lee, G., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R. & Ranganathan, S. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat. Med.* **11**, 1155–61 (1995).
 32. Considine, R. V., Sinha, M. K., Heiman, M. L., Kriauciunas, A., Stephens, T. W., Nyce, M. R., Ohannesian, J. P., Marco, C. C., Mckee, L. J., Bauer, T. L. & Caro, J. F. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.* **334**, 292–295 (1996).
 33. Choi, H. Y., Kim, S., Yang, S. J., Yoo, H. J., Seo, J. A., Kim, S. G., Kim, N. H., Baik, S. H., Choi, D. S. & Choi, K. M. Association of adiponectin, resistin, and vascular inflammation: Analysis with 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 944–949 (2011).
 34. Ortega Moreno, L., Lamacchia, O., Fontana, A., Copetti, M., Salvemini, L., De Bonis, C., Cignarelli, M., Trischitta, V. & Menzaghi, C. The combined effect of adiponectin and resistin on all-cause mortality in patients with type 2 diabetes: Evidence of synergism with abdominal adiposity. *Atherosclerosis* **250**, 23–29 (2016).
 35. Smekal, A. & Vaclavik, J. Adipokines and cardiovascular disease: A comprehensive review. *Biomed. Pap.* **161**, 31–40 (2017).
 36. Ryo, M., Nakamura, T., Kihara, S. & Kumada, M. Adiponectin as a Biomarker of the Metabolic Syndrome. *Circ. J. Off. J. Japanese Circ. Soc.* **68**, 975–981 (2004).
 37. Weyer, C., Funahashi, T., Tanaka, S., Hotta, K., Matsuzawa, Y., Pratley, R. E. & Tataranni, P. A. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: Close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J. Clin. Endocrinol.*

- Metab.* **86**, 1930–1935 (2001).
38. Degawa-Yamauchi, M., Bovenkerk, J. E., Juliar, B. E., Watson, W., Kerr, K., Jones, R., Zhu, Q. & Considine, R. V. Serum Resistin (FIZZ3) Protein Is Increased in Obese Humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 5452–5455 (2003).
 39. Schäffler, A., Büchler, C., Müller-Ladner, U., Herfarth, H., Ehling, A., Paul, C., Schölmerich, J. & Zietz, B. Identification of variables influencing resistin serum levels in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Horm. Metab. Res.* **36**, 702–707 (2004).
 40. Scherer, P. E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G. & Lodish, H. F. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J. Biol. Chem.* **270**, 26746–26749 (1995).
 41. Hu, E., Liang, P. & Spiegelman, B. M. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J. Biol. Chem.* **271**, 10697–10703 (1996).
 42. Qi, Y., Takahashi, N., Hileman, S. M., Patel, H. R., Berg, A. H., Pajvani, U. B., Scherer, P. E. & Ahima, R. S. Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat. Med.* **10**, 524–529 (2004).
 43. Rutkowski, J. M., Wang, Z. V., Park, A. S. D., Zhang, J., Zhang, D., Hu, M. C., Moe, O. W., Susztak, K. & Scherer, P. E. Adiponectin promotes functional recovery After podocyte ablation. *J. Am. Soc. Nephrol.* **24**, 268–282 (2013).
 44. Musabak, U., Demirkaya, S., Genç, G., Ilikci, R. S. & Odabasi, Z. Serum Adiponectin, TNF- α , IL-12p70, and IL-13 Levels in Multiple Sclerosis and the Effects of Different Therapy Regimens. **18**, 57–66 (2011).
 45. Li, R. C., Krishnamoorthy, P., Derohannessian, S., Doveikis, J., Wilcox, M., Thomas, P., Rader, D. J., Reilly, M. P., Voorhees, A. Van, Gelfand, J. M. & Mehta, N. N. Psoriasis is associated with decreased plasma adiponectin levels independently of cardiometabolic risk factors. *Clin. Exp. Dermatol.* **39**, 19–24 (2014).
 46. Combs, T. P., Berg, A. H., Obici, S., Scherer, P. E. & Rossetti, L. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J. Clin. Invest.* **108**, 1875–1881 (2001).
 47. Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Hara, K., Ueki, K. & Tobe, K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation. J. Clin. Invest.* **116**, 1784–1792 (2006).
 48. Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., Mori, Y., Ide, T., Murakami, K., Tsuboyama-Kasaoka, N., Ezaki, O., Akanuma, Y., Gavrilova, O., Vinson, C., Reitman, M. L., Kagechika, H., Shudo, K., Yoda, M., Nakano, Y., Tobe, K., Nagai, R., Kimura, S., Tomita, M., Froguel, P., Kadowaki, T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat. Med.* **7**, 941–946 (2001).
 49. Hotta, K., Funahashi, T., Bodkin, N. L., Ortmeier, H. K., Arita, Y., Hansen, B. C. & Matsuzawa, Y. Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes* **50**, 1126–1133 (2001).
 50. Ceddia, R. B., Somwar, R., Maida, A., Fang, X., Bikopoulos, G. & Sweeney, G. Globular adiponectin increases GLUT4 translocation and glucose uptake but reduces glycogen synthesis in rat skeletal muscle cells. *Diabetologia* **48**, 132–139 (2005).
 51. Holcomb, I. N., Kabakoff, R. C., Chan, B., Baker, T. W., Gurney, A., Henzel, W., Nelson, C., Lowman, H. B., Wright, B. D., Skelton, N. J., Frantz, G. D., Tumas, D. B., Peale, F. V., Shelton, D. L. & He, C. C. FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *EMBO J.* **19**, 4046–4055 (2000).
 52. Kim, K., Lee, K., Moon, Y. S. & Sul, H. S. A Cysteine-rich Adipose Tissue-specific Secretory Factor Inhibits Adipocyte Differentiation *. *J. ob Biol. Chem.* **276**,

- 11252–11256 (2001).
53. Steppan, C. M., Bailey, Shannon T., Bhat, S., Brown, E. J., Banerjee, Ronadip R. , Wright, C. M., Patel, H. R. & Ahima, Rexford S. & Lazar, M. A. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* **409**, 307–312 (2001).
 54. Rajala, M. W., Qi, Y., Patel, H. R., Takahashi, N., Banerjee, R., Pajvani, U. B., Sinha, M. K., Gingerich, R. L., Scherer, P. E. & Ahima, R. S. Regulation of Resistin Expression and Circulating Levels in Obesity , Diabetes , and Fasting. *Diabetes* **53**, 1671–1679 (2004).
 55. Bokarewa, M., Nagaev, I., Dahlberg, L., Smith, U. & Tarkowski, A. Resistin, an Adipokine with Potent Proinflammatory Properties. *J. Immunol.* **174**, 5789–5795 (2005).
 56. Fu, Y., Luo, L., Luo, N. & Garvey, W. T. Proinflammatory cytokine production and insulin sensitivity regulated by overexpression of resistin in 3T3-L1 adipocytes. *Nutr. Metab.* **3**, 1–10 (2006).
 57. Bertolani, C., Sancho-Bru, P., Failli, P., Bataller, R., Aleffi, S., DeFranco, R., Mazzeinghi, B., Romagnani, P., Milani, S., Ginés, P., Colmenero, J., Parola, M., Gelmini, S., Tarquini, R., Laffi, G., Pinzani, M. & Marra, F. Resistin as an intrahepatic cytokine: Overexpression during chronic injury and induction of proinflammatory actions in hepatic stellate cells. *Am. J. Pathol.* **169**, 2042–2053 (2006).
 58. Thorens, B. & Mueckler, M. Glucose transporters in the 21st Century. *Am. J. Physiol. Metab.* **298**, E141–E145 (2010).
 59. Uldry, M. & Thorens, B. The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **447**, 480–489 (2004).
 60. Hauner, H., Roëhrig, K., Spelleken, M., Liu, L. & Eckel, J. Development of insulin-responsive glucose uptake and GLUT4 expression in differentiating human adipocyte precursor cells. *Int. J. Obes.* **22**, 448–453 (1998).
 61. Marette, A., Atgie, C., Lui, Z., Bukowiecki, L. J. & Klip, A. Differential regulation of GLUT1 and GLUT4 glucose transporters in skeletal muscle of a new model of type II diabetes: The obese SHR/N-cp rat. *Diabetes* **42**, 1195–1201 (1993).
 62. Marette, A., Richardson, J. M., Ramlal, T., Balon, T. W., Vranic, M., Pessin, J. E. & Klip, A. and insulin-induced translocation of glucose transporters in red and white muscle. *Am. J. Physiol.* 443–52 (1992).
 63. Dallner, O. S., Chernogubova, E., Brolinson, K. A. & Bengtsson, T. B3-Adrenergic Receptors Stimulate Glucose Uptake in Brown Adipocytes By Two Mechanisms Independently of Glucose Transporter 4 Translocation. *Endocrinology* **147**, 5730–5739 (2006).
 64. Lacombe, V. A. Expression and Regulation of Facilitative Glucose Transporters in Equine Insulin-Sensitive Tissue: From Physiology to Pathology. *ISRN Vet. Sci.* **2014**, 1–15 (2014).
 65. Deng, T., Lyon, C., LJ, M., J, L., J, Z., JZ, L., Y, R., Z, Y., DJ, H., PR, R., V, S., HY, W., KJ, P., P, W., ST, W., RF, W. & WA., H. Class II major histocompatibility complex plays an essential role in obesity-induced adipose inflammation. *Cell Metab.* **17**, 411–422 (2013).
 66. Kopp, A., Buechler, C., Bala, M., Neumeier, M., Schölmerich, J. & Schäffler, A. Toll-like receptor ligands cause proinflammatory and prediabetic activation of adipocytes via phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase but not interferon regulatory factor-3. *Endocrinology* **151**, 1097–1108 (2010).
 67. Yu, L., Yan, K., Liu, P., Li, N., Liu, Z., Zhu, W., Chen, Y. & Han, D. Pattern recognition receptor-initiated innate antiviral response in mouse adipose cells. *Immunol. Cell Biol.* **92**, 105–115 (2014).
 68. Zhang, L., Guerrero-Juarez, C. F., Hata, T., Bapat, S. P., Ramos, R., Plikus, M. V & Gallo, R. L. Dermal adipocytes protect against invasive *Staphylococcus aureus* skin infection. *Science* (80-.). **347**, 67–72 (2015).

69. Janeway, C. A. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197–216 (2002).
70. Matzinger, P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 991–1045 (1994).
71. Yang, D., Tewary, P., de la Rosa, G., Wei, F. & Oppenheim, J. The alarmin functions of high-mobility group proteins. *Physiol. Behav.* **1–2**, 157–63 (2010).
72. Erridge, C. Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? *J. Leukoc. Biol.* **87**, 989–999 (2010).
73. Anderson, K. V., Bokla, L. & Nüsslein-Volhard, C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the drosophila embryo: The induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* **42**, 791–798 (1985).
74. Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. & Hoffmann, J. A. The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette. *Cell* **86**, 973–983 (1996).
75. Whitham, S., Dinesh-Kumar, S. P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C. & Baker, B. The Product of the Tobacco Mosaic Virus Resistance Gene *Al*: Similarity to Toll and the Interleukin-1 Receptor. *Cell Press* **79**, 1101–1115 (1994).
76. Kawai, T. & Akira, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int. Immunol.* **21**, 317–337 (2009).
77. Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783–801 (2006).
78. Bell, J. K., Mullen, G. E. D., Leifer, C. A., Mazzoni, A., Davies, D. R. & Segal, D. M. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol.* **24**, 528–533 (2003).
79. Yamamoto, M., Takeda, K. & Akira, S. TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol. Immunol.* **40**, 861–868 (2004).
80. O'Neill, L. A. J. & Bowie, A. G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 353–364 (2007).
81. Takeuchi, O., Kawai, T., Mühlrad, P. F., Morr, M., Radolf, J. D., Zychlinsky, A., Takeda, K. & Akira, S. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int. Immunol.* **13**, 933–940 (2001).
82. Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R. L. & Akira, S. Cutting Edge: Role of Toll-Like Receptor 1 in Mediating Immune Response to Microbial Lipoproteins. *J. Immunol.* **169**, 10–14 (2002).
83. Jin, M. S., Kim, S. E., Heo, J. Y., Lee, M. E., Kim, H. M., Paik, S. G., Lee, H. & Lee, J. O. Crystal Structure of the TLR1-TLR2 Heterodimer Induced by Binding of a Tri-Acylated Lipopeptide. *Cell* **130**, 1071–1082 (2007).
84. Kang, J. Y., Nan, X., Jin, M. S., Youn, S. J., Ryu, Y. H., Mah, S., Han, S. H., Lee, H., Paik, S. G. & Lee, J. O. Recognition of Lipopeptide Patterns by Toll-like Receptor 2-Toll-like Receptor 6 Heterodimer. *Immunity* **31**, 873–884 (2009).
85. Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L. & Aderem, A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 13766–13771 (2000).
86. Guan, Y., Ranoa, D. R. E., Jiang, S., Mutha, S. K., Li, X., Baudry, J. & Tapping, R. I. Human TLRs 10 and 1 Share Common Mechanisms of Innate Immune Sensing but Not Signaling. *J. Immunol.* **184**, 5094–5103 (2010).
87. Jiang, S., Li, X., Hess, N. J., Guan, Y. & Tapping, R. I. TLR10 Is a Negative Regulator of Both MyD88-Dependent and -Independent TLR Signaling. *J. Immunol.* **196**, 3834–3841 (2016).
88. Oosting, M., Cheng, S. C., Bolscher, J. M., Vestering-Stenger, R., Plantinga, T. S., Verschueren, I. C., Arts, P., Garritsen, A., Van Eenennaam, H., Sturm, P., Kullberg, B. J., Hoischen, A., Adema, G. J., Van Der Meer, J. W. M., Netea, M. G. & Joosten, L. A. B. Human TLR10 is an anti-inflammatory pattern-recognition receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, E4478–E4484 (2014).
89. Hess, N. J., Felicelli, C., Grage, J. & Tapping, R. I. TLR10 suppresses the

- activation and differentiation of monocytes with effects on DC-mediated adaptive immune responses. *J. Leukoc. Biol.* **101**, 1245–1252 (2017).
90. Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M. S., Greenblatt, M. B., Bussey, C., Flavell, R. A. & Ghosh, S. A Toll-like Receptor That Prevent Infection by Uropathogenic Bacteria. *Science* (80-.). **303**, 1522–1526 (2004).
 91. Oldenburg, M., Krüger, A., Ferstl, R., Kaufmann, A., Nees, G., Sigmund, A., Bathke, B., Lauterbach, H., Suter, M., Dreher, S., Koedel, U., Akira, S., Kawai, T., Buer, J., Wagner, H., Bauer, S., Hochrein, H. & Kirschning, C. TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification. *Science* (80-.). **1111**, 1111–1115 (2012).
 92. Li, X. D. & Chen, Z. J. Sequence specific detection of bacterial 23S ribosomal RNA by TLR13. *Elife* **2012**, 1–14 (2012).
 93. Hidmark, A., von Saint Paul, A. & Dalpke, A. H. Cutting Edge: TLR13 Is a Receptor for Bacterial RNA. *J. Immunol.* **189**, 2717–2721 (2012).
 94. Jin, M. S. & Lee, J. O. Structures of the Toll-like Receptor Family and Its Ligand Complexes. *Immunity* 182–91 (2008) doi:10.1016/j.immuni.2008.07.007.
 95. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, F. R. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like Receptor 3. *Nature* **413**, 732–8 (2001).
 96. Liu, L., Botos, I., Wang, Y., Leonard, J., , Shiloach, J., Segal, D. & Davies, D. Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science* (80-.). **320**, 379–381 (2008).
 97. Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K. & Akira, S. Small-antiviral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.* **3**, 196–200 (2002).
 98. Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H. & Bauer, S. Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8. *Science* (80-.). **303**, 1526–1529 (2004).
 99. Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. & Reis E Sousa, C. Innate Antiviral Responses by Means of TLR7-Mediated Recognition of Single-Stranded RNA. *Science* (80-.). **303**, 1529–1531 (2004).
 100. Lund, J. M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N. C., Gale, N. W., Iwasaki, A. & Flavell, R. A. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 5598–5603 (2004).
 101. Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. & Akira, S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740–745 (2000).
 102. Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R. & Iwasaki, A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* **198**, 513–520 (2003).
 103. Krug, A., French, A. R., Barchet, W., Fischer, J. A. A., Dzionek, A., Pingel, J. T., Orihuela, M. M., Akira, S., Yokoyama, W. M. & Colonna, M. TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* **21**, 107–119 (2004).
 104. Krug, A., Luker, G. D., Barchet, W., Leib, D. A., Akira, S. & Colonna, M. Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* **103**, 1433–1437 (2004).
 105. O'Neill, L. A. J., Golenbock, D. & Bowie, A. G. The history of Toll-like receptors — redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 453–460 (2013).
 106. Ahmad, R., Al-Mass, A., Atizado, V., Al-Hubail, A., Al-Ghimlas, F., Al-Arouj, M., Bennakhi, A., Dermime, S. & Behbehani, K. Elevated expression of the toll like receptors 2 and 4 in obese individuals: Its significance for obesity-induced inflammation. *J. Inflamm. (United Kingdom)* **9**, 1 (2012).
 107. Vitseva, O. I., Tanriverdi, K., Tchkonja, T. T., Kirkland, J. L., McDonnell, M. E.,

- Apovian, C. M., Freedman, J. & Gokce, N. Inducible Toll-like Receptor and NF- κ B Regulatory Pathway Expression in Human Adipose Tissue. *Obes. (Silver Spring)* **16**, 932–937 (2008).
108. Kopp, A., Buechler, C., Neumeier, M., Weigert, J., Aslanidis, C., Schölmerich, J. & Schäffler, A. Innate immunity and adipocyte function: Ligand-specific activation of multiple toll-like receptors modulates cytokine, adipokine, and chemokine secretion in adipocytes. *Obesity* **17**, 648–656 (2009).
 109. Bès-Houtmann, S., Roche, R., Hoareau, L., Gonthier, M. P., Festy, F., Caillens, H., Gasque, P., Lefebvre D'Hellencourt, C. & Cesari, M. Presence of functional TLR2 and TLR4 on human adipocytes. *Histochem. Cell Biol.* **127**, 131–137 (2007).
 110. Lin, Y., Lee, H., Berg, A. H., Lisanti, M. P., Shapiro, L. & Scherer, P. E. The lipopolysaccharide-activated Toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes. *J. Biol. Chem.* **275**, 24255–24263 (2000).
 111. Lu, B., Lu, Y., Moser, A. H., Shigenaga, J. K., Grunfeld, C. & Feingold, K. R. LPS and proinflammatory cytokines decrease lipin-1 in mouse adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **295**, 18940942 (2008).
 112. Ballak, D. B., Asseldonk, E. J. P. Van, Diepen, J. A. Van, Jansen, H., Hijmans, A., Joosten, L. A. B., Tack, C. J., Netea, M. G. & Stienstra, R. TLR-3 is Present in Human Adipocytes , but Its Signalling is Not Required for Obesity- Induced Inflammation in Adipose Tissue In Vivo. *PLoS One* 1–14 (2015)
doi:10.1371/journal.pone.0123152.
 113. Pekkala, S., Munukka, E., Kong, L., Pöllänen, E., Autio, R., Roos, C., Wiklund, P., Fischer-Posovszky, P., Wabitsch, M., Alen, M., Huovinen, P. & Cheng, S. Toll-like receptor 5 in obesity: The role of gut microbiota and adipose tissue inflammation. *Obesity* **23**, 581–590 (2015).
 114. Munukka, E., Wiklund, P., Partanen, T., Välimäki, S., Laakkonen, E. K., Lehti, M., Fischer-Posovszky, P., Wabitsch, M., Cheng, S., Huovinen, P. & Pekkala, S. Adipocytes as a Link Between Gut Microbiota-Derived Flagellin and Hepatocyte Fat Accumulation. *PLoS One* **11**, 1–16 (2016).
 115. Ahmad, R., Kochumon, S., Thomas, R., Atizado, V. & Sindhu, S. Increased adipose tissue expression of TLR8 in obese individuals with or without type-2 diabetes: significance in metabolic inflammation. *J. Inflamm.* **13**, (2016).
 116. Sindhu, S., Akhter, N., Kochumon, S., Thomas, R., Wilson, A., Shenouda, S., Tuomilehto, J. & Ahmad, R. Increased expression of the innate immune receptor TLR10 in obesity and type-2 Diabetes: Association with ROS-mediated oxidative stress. *Cell. Physiol. Biochem.* **45**, 572–590 (2018).
 117. Hong, C. P., Yun, C. H., Lee, G. W., Park, A., Kim, Y. M. & Jang, M. H. TLR9 regulates adipose tissue inflammation and obesity-related metabolic disorders. *Obesity* **23**, 2199–2206 (2015).
 118. Nishimoto, S., Fukuda, D., Higashikuni, Y., Tanaka, K., Hirata, Y., Murata, C., Kim-Kaneyama, J. R., Sato, F., Bando, M., Yagi, S., Soeki, T., Hayashi, T., Imoto, I., Sakaue, H., Shimabukuro, M. & Sata, M. Obesity-induced DNA released from adipocytes stimulates chronic adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Sci. Adv.* **2**, e1501332 (2016).
 119. Revelo, X. S., Ghazarian, M., Chng, M. H. Y., Luck, H., Kim, J. H., Zeng, K., Shi, S. Y., Tsai, S., Lei, H., Kenkel, J., Liu, C. L., Tangsombatvisit, S., Tsui, H., Sima, C., Xiao, C., Shen, L., Li, X., Jin, T., Lewis, G. F., Woo, M., Utz, P. J., Glogauer, M., Engleman, E., Winer, S., Winer, D. A. Nucleic Acid-Targeting Pathways Promote Inflammation in Obesity-Related Insulin Resistance. *Cell Rep.* **16**, 717–730 (2016).
 120. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* **5**, 987–995 (2004).
 121. Haecker, H., Mischak, H., Miethke, T., Liptay, S., Schmid, R., Sparwasser, T.,

- Heeg, K., Lipford, G. B. & Wagner, H. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J.* **17**, 6230–6240 (1998).
122. Hayashi, F., Means, T. K. & Luster, A. D. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* **102**, 2660–2669 (2003).
 123. Saikh, K. U., Kissner, T. L., Sultana, A., Ruthel, G. & Ulrich, R. G. Human Monocytes Infected with *Yersinia pestis* Express Cell Surface TLR9 and Differentiate into Dendritic Cells. *J. Immunol.* **173**, 7426–7434 (2004).
 124. Pedersen, G., Andresen, L. & Brynskov, J. Expression of Toll-like receptor 9 and response to bacterial CpG oligodeoxynucleotides in human intestinal epithelium *. *Clin. Exp. Immunol.* **141**, 298–306 (2005).
 125. Lee, J., Mo, J. H., Katakura, K., Alkalay, I., Rucker, A. N., Liu, Y. T., Lee, H. K., Shen, C., Cojocaru, G., Shenouda, S., Kagnoff, M., Eckmann, L., Ben-Neriah, Y. & Raz, E. Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat. Cell Biol.* **8**, 1327–1336 (2006).
 126. Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K. A., Monks, B. G., Knetter, C. F., Lien, E., Nilsen, N. J., Espevik, T. & Golenbock, D. T. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat. Immunol.* **5**, 190–198 (2004).
 127. Rachmilewitz, D., Katakura, K., Karmeli, F., Hayashi, T., Reinus, C., Rudensky, B., Akira, S., Takeda, K., Lee, J., Takabayashi, K. & Raz, E. Toll-Like Receptor 9 Signaling Mediates the Anti-inflammatory Effects of Probiotics in Murine Experimental Colitis. *Gastroenterology* **126**, 520–528 (2004).
 128. Guiducci, C., Gong, M., Xu, Z., Gill, M., Chaussabel, D., Meeker, T., Chan, J. H., Wright, T., Punaro, M., Bolland, S., Soumelis, V., Banchereau, J., Coffman, R. L., Pascual, V. & Barrat, F. J. TLR recognition of self nucleic acids hampers glucocorticoid activity in lupus. *Nature* **465**, 937–941 (2010).
 129. Koulis, C., Chen, Y.-C., Hausding, C., Ahrens, I., Kyaw, T. S., Tay, C., Allen, T., Jandeleit-Dahm, K., Sweet, M. J., Akira, S., Bobik, A., Peter, K. & Agrotis, A. Protective role for Toll-like receptor-9 in the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**, 516–25 (2014).
 130. Krieg, A. M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 709–760 (2002).
 131. Bauer, S., Kirschning, C. J., Häcker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H. & Lipford, G. B. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 9237–9242 (2001).
 132. Wang, L., Chen, S., Xu, T., Taghizadeh, K., Wishnok, J. S., Zhou, X., You, D., Deng, Z. & Dedon, P. C. Phosphorothioation of DNA in bacteria by *dnd* genes. **3**, 709–710 (2007).
 133. Xiong, L., Liu, S., Chen, S., Xiao, Y., Zhu, B., Gao, Y., Zhang, Y., Chen, B., Luo, J., Deng, Z., Chen, X., Wang, L. & Chen, S. antiviral system in archaea. *Nat. Commun.* **10**, 1–11 (2019).
 134. Gan, R., Wu, X., He, W., Zhenhua, L., Wu, S., Chen, C., Chen, S., Xiang, Q., Deng, Z., Liang, D., Chen, S. & Wang, L. influence the global transcriptional double-stranded breaks. *Sci. Rep.* **4**, 1–8 (2014).
 135. Eckstein, F. What Is Their Origin and What Is Unique About Them ? Phosphorothioate. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **10**, 117–121 (2000).
 136. Putney, S. D., Benkovict, S. J. & Schimmel, P. R. A DNA fragment with an a-phosphorothioate nucleotide at one end is asymmetrically blocked from digestion by exonuclease III and can be replicated in vivo (subcloning/DNA endwise digestion/nuclease inhibition/plasmid reconstruction). *Proc. Natl Acad Sci. USA Biochem.* **78**, 7350–7354 (1981).
 137. Kuramoto, E., O, Y., Y, K., M, B., T, M., S, Y., T, Y., Kataoka T, T. & T., O.

- Oligonucleotide sequences required for natural killer cell activation. 1128–31 (1992).
138. Verthelyi, D., Ishii, K. J., Gursel, M., Takeshita, F. & Klinman, D. M. Human Peripheral Blood Cells Differentially Recognize and Respond to Two Distinct CpG Motifs. *J. Immunol.* **166**, 2372–2377 (2001).
 139. Sester, D. P., Naik, S., Beasley, S. J., Hume, D. A. & Stacey, K. J. Phosphorothioate Backbone Modification Modulates Macrophage Activation by CpG DNA. *J. Immunol.* **165**, 4165–4173 (2000).
 140. Kadowaki, N., Antonenko, S. & Liu, Y.-J. Distinct CpG DNA and Polyinosinic-Polycytidylic Acid Double-Stranded RNA, Respectively, Stimulate CD11c – Type 2 Dendritic Cell Precursors and CD11c + Dendritic Cells to Produce Type I IFN . *J. Immunol.* **166**, 2291–2295 (2001).
 141. Vallin, H., Perers, A., Alm, G. V & Rönnblom, L. Anti-double-stranded DNA antibodies and immunostimulatory plasmid DNA in combination mimic the endogenous IFN-alpha inducer in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* **163**, 6306–13 (1999).
 142. Ballas, Z. K., Rasmussen, W. L. & Krieg, A. M. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J. Immunol.* **157**, 1840–5 (1996).
 143. Tang, J., Roskey, A., Li, Y. & Agrawal, S. Enzymatic synthesis of stereoregular (all Rp) oligonucleotide phosphorothioate and its properties. *Nucleosides and Nucleotides* **14**, 985–990 (1995).
 144. Yamamoto, S., Yamamoto, T., Kataoka, T., Kuramoto, E., Yano, O. & Tokunaga, T. Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN [correction of INF] and augment IFN-mediated [correction of INF] natural killer activity. *J. Immunol.* **148**, 4072–6 (1992).
 145. Stacey, K. J., Sweet, M. J. & Hume, D. A. Macrophages Ingest and Are Activated by Bacterial DNA. *J. Immunol.* **157**, 2116–2122 (1996).
 146. Krieg, A. M. Now I know my CpGs. *Trends Microbiol.* **9**, 249–252 (2001).
 147. Marshall, J. D., Fearon, K. L., Higgins, D., Hessel, E. M., Kanzler, H., Abbate, C., Yee, P., Gregorio, J., Dela Cruz, T., Lizcano, J. O., Zolotarev, A., McClure, H. M., Brasky, K. M., Murthy, K. K., Coffman, R. L. & Van Nest, G. Superior activity of the type C class of ISS in vitro and in vivo across multiple species. *DNA Cell Biol.* **24**, 63–72 (2005).
 148. Macfarlane, D. E. & Manzel, L. Antagonism of Immunostimulatory CpG-Oligodeoxynucleotides by Quinacrine, Chloroquine, and Structurally Related Compounds. *J. Immunol.* **160**, 1122–1131 (1998).
 149. Henao-Mejia, J., Elinav, E., Jin, C.-C., Hao, L., Mehal, W. Z., Strowig, T., Thaïss, C. A., Kau, A. L., Eisenbarth, S. C., Jurczak, M. J., Camporez, J.-P., Shulman, G. I., Gordon, J. I., Hoffman, H. M. & Flavell, R. A. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity HHS Public Access. *Nature* **482**, 179–185 (2012).
 150. Thierry, A. R., El Messaoudi, S., Gahan, P. B., Anker, P. & Stroun, M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev.* **35**, 347–376 (2016).
 151. Tan, E. M., Carr, R. I., Kunkel, H. G., Tan, E. M., Schur, P. H., Carr, R. I. & Kunkel, H. G. Deoxyribonucleic Acid (DNA) and Antibodies to DNA in the Serum of Patients with Systemic Lupus. *J. Clin. Invest.* **45**, 1732–1740 (1966).
 152. Leon, S. A., Shapiro, B., Sklaroff, D. M. & Yaros, M. J. Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy. *Am. Assoc. Cancer Res.* **37**, 646–650 (1977).
 153. Chang, C. P., Chia, R., Wu, T., Tsao, K., Sun, C. & Wu, J. T. Elevated cell-free serum DNA detected in patients with myocardial infarction. *Clin. Chim. Acta* **327**, 95–101 (2003).
 154. Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Lie Waget, A., Neyrinck, A. M. & Delzenne, N.

- M. Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes* **57**, 1470–1481 (2008).
155. Amar, J., Chabo, C., Waget, A., Klopp, P., Vachoux, C., Bermúdez-Humarán, L. G., Smirnova, N., Bergé, M., Sulpice, T., Lahtinen, S., Ouwehand, A., Langella, P., Rautonen, N., Sansonetti, P. J. & Burcelin, R. Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. *Danisco Heal. Nutr. EMBO Mol Med EMBO Mol. Med.* **3**, 559–572 (2011).
 156. Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., Wang, S., Fortier, M., Greenberg, A. S. & Obin, M. S. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J. Lipid Res.* **46**, 2347–2355 (2005).
 157. Murano, I., Barbatelli, G., Parisani, V., Latini, C., Muzzonigro, G. & Castellucci, M. Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *J. Lipid Res.* **49**, 1562–1568 (2008).
 158. Green, H. & Meuth, M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* **3**, 127–133 (1974).
 159. Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. & Hannon, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363–366 (2001).
 160. Dana, H., Chalbatani, G. M., Mahmoodzadeh, H., Karimloo, R., Rezaiean, O., Moradzadeh, A., Mehmandoost, N., Moazzen, F., Mazraeh, A., Marmari, V., Ebrahimi, M., Rashno, M. M., Abadi, S. J. & Gharagouzlo, E. Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. *Int. J. Biomed. Sci.* **13**, 48–57 (2017).
 161. Jinek, M. & Doudna, J. A. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* **457**, 405–412 (2009).
 162. Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G. & Tuschl, T. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell* **15**, 185–197 (2004).
 163. Dana, H., Chalbatani, G. M., Mahmoodzadeh, H., Karimloo, R., Rezaiean, O., Moradzadeh, A., Mehmandoost, N., Moazzen, F., Mazraeh, A., Marmari, V., Ebrahimi, M., Rashno, M. M., Abadi, S. J. & Gharagouzlo, E. Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. *Int. J. Biomed. Sci.* **13**, 48–57 (2017).
 164. Thomalla, M., Schmid, A., Neumann, E., Pfefferle, P. I., Müller-Ladner, U., Schäffler, A. & Karrasch, T. Evidence of an anti-inflammatory toll-like receptor 9 (TLR9) pathway in adipocytes. *J. Endocrinol.* **240**, 325–343 (2019).
 165. Abate, N., Hanaa, S. S., Rizzo, M., Nikolic, D., Obradovic, M., Bjelogrljic, P. & Isenovic, E. R. Resistin: an inflammatory cytokine. Role in cardiovascular diseases, diabetes and the metabolic syndrome. *Curr. Pharm. Des.* **20**, 4961–4969 (2014).
 166. Gregor, M. F. & Hotamisligil, S. Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 415–45 (2011).
 167. Ghosh, A. R., Bhattacharya, R., Bhattacharya, S., Nargis, T., Rahaman, O., Duttagupta, P., Raychaudhuri, D., Liu, C. S. C., Roy, S., Ghosh, P., Khanna, S., Chaudhuri, T., Tantia, O., Haak, S., Bandyopadhyay, S., Mukhopadhyay, S., Chakrabarti, P. & Ganguly, D. Adipose recruitment and activation of plasmacytoid dendritic cells fuel metaflammation. *Diabetes* **65**, 3440–3452 (2016).
 168. Poulain-Godefroy, O. & Froguel, P. Preadipocyte response and impairment of differentiation in an inflammatory environment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **356**, 662–667 (2007).
 169. Takeshita, F., Koichi, S., Shin, S., Norihisa, I., Dennis M., K. & Ken J., I. Transcriptional Regulation of the Human TLR9 Gene. *J. Immunol.* **173**, 2552–

- 2561 (2004).
170. Cristancho, A. G. & Lazar, M. A. Forming functional fat: A growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 722–734 (2011).
 171. García-Alonso, V. & Clària, J. Prostaglandin E 2 signals white-to-brown adipogenic differentiation. *Adipocyte* **3**, 290–296 (2014).
 172. Khazen, W., Bika, J. M., Collinet, M. & Tramonì, M. Differentiation-dependent expression of interferon gamma and toll-like receptor 9 in 3T3-F442A adipocytes. (2007) doi:10.1016/j.biochi.2007.01.003.
 173. Miura, K., Kodama, Y., Inokuchi, S., Schnabl, B., Aoyama, T., Ohnishi, H., Olefsky, J. M., Brenner, D. A. & Seki, E. Toll-Like Receptor 9 Promotes Steatohepatitis by Induction of Interleukin-1 β in Mice. *Gastroenterology* **139**, 323–334.e7 (2010).
 174. Cho, Y. L., Min, J. K., Roh, K. M., Kim, W. K., Han, B. S., Bae, K. H., Lee, S. C., Chung, S. J. & Kang, H. J. Phosphoprotein phosphatase 1CB (PPP1CB), a novel adipogenic activator, promotes 3T3-L1 adipogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **467**, 211–217 (2015).
 175. Mandrup, S. & Lane, M. D. Regulating Adipogenesis *. *J. ob Biol. Chem.* **272**, 5367–5370 (1997).
 176. Darlington, G. J., Ross, S. E. & Macdougald, O. A. The Role of C / EBP Genes in Adipocyte Differentiation *. *J. ob Biol. Chem.* **273**, 30057–30060 (1998).
 177. Schmid, A., Kopp, A., Hanses, F., Bala, M., Müller, M. & Schäffler, A. The novel adipokine C1q/TNF-related protein-3 is expressed in human adipocytes and regulated by metabolic and infection-related parameters. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* (2012) doi:10.1055/s-0032-1323803.
 178. Compton, S. A. & Cheatham, B. CTRP-3: Blocking a toll booth to obesity-related inflammation. *Endocrinology* **151**, 5095–5097 (2010).
 179. Kopp, A., Bala, M., Buechler, C., Falk, W., Gross, P., Neumeier, M., Schölmerich, J. & Schäffler, A. C1q/TNF-related protein-3 represents a novel and endogenous lipopolysaccharide antagonist of the adipose tissue. *Endocrinology* **151**, 5267–5278 (2010).
 180. Lin, J., Liu, Q., Zhang, H., Huang, X., Zhang, R., Chen, S., Wang, X., Yu, B. & Hou, J. C1q/Tumor necrosis factor-related protein-3 protects macrophages against LPS-induced lipid accumulation, inflammation and phenotype transition via PPAR γ and TLR4-mediated pathways. *Oncotarget* **8**, 82541–82557 (2017).
 181. Lakota, K., Wei, J., Carns, M., Hinchcliff, M., Lee, J., Whitfield, M. L., Sodin-semrl, S. & Varga, J. Levels of adiponectin , a marker for PPAR-gamma activity , correlate with skin fibrosis in systemic sclerosis : potential utility as biomarker ? *Arthritis Res. Ther.* **14**, R102 (2012).
 182. Spiegelman, B. M. PPAR γ : Adipogenic Regulator and Thiazolidinedione Receptor. *Perspect. Diabetes* **47**, 507–514 (1998).
 183. Madsen, M. S., Siersbaek, R., Boergesen, M., Nielsen, R. & Mandrup, S. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor and C/EBP Synergistically Activate Key Metabolic Adipocyte Genes by Assisted Loading. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 939–954 (2014).
 184. Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., Miyagawa, J. I., Hotta, K., Shimomura, I., Nakamura, T., Miyaoka, K., Kuriyama, H., Nishida, M., Yamashita, S., Okubo, K., Matsubara, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Funahashi, T. & Matsuzawa, Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**, 79–83 (1999).
 185. Yatagai, T., Nagasaka, S., Taniguchi, A., Fukushima, M., Nakamura, T., Kuroe, A., Nakai, Y. & Ishibashi, S. Hypoadiponectinemia is associated with visceral fat accumulation and insulin resistance in Japanese men with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* **52**, 1274–1278 (2003).
 186. Liu, M., Peng, J., Tai, N., Pearson, J. A., Hu, C., Guo, J., Hou, L., Zhao, H., Wong, F. S. & Wen, L. Toll-like receptor 9 negatively regulates pancreatic islet beta cell

- growth and function in a mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia* **61**, 2333–2343 (2018).
187. Pohar, J., Lainšček, D., Kunšek, A., Cajnko, M. M., Jerala, R. & Benčina, M. Phosphodiester backbone of the CpG motif within immunostimulatory oligodeoxynucleotides augments activation of Toll-like receptor. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).
 188. Weisberg, S. P., Leibel, R. L., Anthony, W., Jr, F., Weisberg, S. P., Mccann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L. & Ferrante, A. W. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue Find the latest version : Obesity is associated with. *J Clin Invest.* **112**, 1796–1808 (2003).
 189. Cornelie, S., Hoebeke, J., Schacht, A., Bertin, B., Capron, M. & Riveau, G. Direct Evidence that Toll-like Receptor 9 (TLR9) Functionally Binds Plasmid DNA by Specific Cytosine-phosphate-guanine Motif Recognition *. **279**, 15124–15129 (2004).
 190. Abate, N., Sallam, H., Rizzo, M., Nikolic, D., Obradovic, M., Bjelogrić, P. & Isenovic, E. Resistin: An Inflammatory Cytokine. Role in Cardiovascular Diseases, Diabetes and the Metabolic Syndrome. *Curr. Pharm. Des.* **20**, 4961–4969 (2014).
 191. Hutcheson, J. Adipokines influence the inflammatory balance in autoimmunity. *Cytokine* **75**, 272–279 (2015).
 192. Kusminski, C. M., McTernan, P. G. & Kumar, S. Role of resistin in obesity, insulin resistance and Type II diabetes. *Clin. Sci.* **109**, 243–256 (2005).
 193. Ohashi, K., Parker, J. L., Ouchi, N., Higuchi, A., Vita, J. A., Gokce, N., Pedersen, A. A., Kalthoff, C., Tullin, S., Sams, A., Summer, R. & Walsh, K. Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. *J. Biol. Chem.* **285**, 6153–6160 (2010).
 194. Takeshita, F., Leifer, C. A., Gursel, I., Ishii, K. J., Takeshita, S., Gursel, M. & Klinman, D. M. Cutting Edge: Role of Toll-Like Receptor 9 in CpG DNA-Induced Activation of Human Cells. *J. Immunol.* **167**, 3555–3558 (2001).
 195. Tilg, H. & Moschen, A. R. Adipocytokines: Mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 772–783 (2006).
 196. De Nardo, D., De Nardo, C. M., Nguyen, T., Hamilton, J. A. & Scholz, G. M. Signaling Crosstalk during Sequential TLR4 and TLR9 Activation Amplifies the Inflammatory Response of Mouse Macrophages. *J. Immunol.* **183**, 8110–8118 (2009).
 197. Romano, M., Sironi, M., Toniatti, C., Polentarutti, N., Fruscella, P., Ghezzi, P., Faggioni, R., Luini, W., Van Hinsbergh, V., Sozzani, S., Bussolino, F., Poli, V., Ciliberto, G. & Mantovani, A. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* **6**, 315–325 (1997).
 198. Fasshauer, M., Kralisch, S., Klier, M., Lossner, U., Bluher, M., Klein, J. & Paschke, R. Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301**, 1045–1050 (2003).
 199. Rotter, V., Nagaev, I. & Smith, U. Interleukin-6 (IL-6) Induces Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes and Is, Like IL-8 and Tumor Necrosis Factor- α , Overexpressed in Human Fat Cells from Insulin-resistant Subjects. *J. Biol. Chem.* **278**, 45777–45784 (2003).
 200. Stouthard, J. M. L., Oude Elferink, R. P. J. & Sauerwein, H. P. Interleukin-6 enhances glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**, 241–245 (1996).
 201. Chuang, T.-H., Lee, J., Kline, L., Mathison, J. C. & Ulevitch, R. J. Toll-like receptor 9 mediates CpG-DNA signaling. *J. Leukoc. Biol.* **71**, 538–544 (2002).
 202. Krieg, A. M., Ae-Kyung, Y., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky, G. A. & Klinman, D. M. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* **374**, 546–549 (1995).
 203. Vollmer, J., Weeratna, R. D., Jurk, M., Samulowicz, U., McCluskie, M. J., Payette, P., Davis, H. L., Schetter, C. & Krieg, A. M. Oligodeoxynucleotides lacking CpG

- dinucleotides mediate Toll-like receptor 9 dependent T helper type 2 biased immune stimulation. *Immunology* **113**, 212–223 (2004).
204. Ishii, K. J., Coban, C., Kato, H., Takahashi, K., Torii, Y., Takeshita, F., Ludwig, H., Sutter, G., Suzuki, K., Hemmi, H., Sato, S., Yamamoto, M., Uematsu, S., Kawai, T., Takeuchi, O. & Akira, S. A Toll-like receptor – independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat. Immunol.* **7**, 40–49 (2006).
 205. Brencicova, E. & Diebold, S. S. Nucleic acids and endosomal pattern recognition : how to tell friend from foe ? *Cell. Infect. Microbiol.* **3**, 1–14 (2013).
 206. Lancaster, G. I., Langley, K. G., Berglund, N. A., Meikle, P. J., Bond, P. J., Febbraio, M. A., Lancaster, G. I., Langley, K. G., Berglund, N. A., Kammoun, H. L., Reibe, S., Timpson, P., Murphy, A. J., Masters, S. L., Gerondakis, S. & Bartonicek, N. Evidence that TLR4 Is Not a Receptor for Saturated Fatty Acids but Mediates Lipid-Induced Inflammation by Reprogramming Macrophage Metabolism Article Evidence that TLR4 Is Not a Receptor for Saturated Fatty Acids but Mediates Lipid-Induced Inflammation by. *Cell Metab.* **27**, 1096-1110.e5 (2018).

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Adriaan Dorresteyn danke ich für die Übernahme meiner Betreuung als mein Doktorvater und für die wertvollen Denkanstöße zur Erstellung meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Herr Prof. Dr. med. Andreas Schäffler danke ich herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die Vergabe des Themas, die langjährige Betreuung und die Erstellung des Zweitgutachtens. Außerdem bin ich dankbar dafür, dass ich die Möglichkeit bekommen habe an zahlreichen Kongressen und Weiterbildungen teilzunehmen, die mich in meiner persönlichen Entwicklung sehr gefördert haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Thomas Karrasch, der mir als sehr engagierter begleitender Betreuer immer mit einem guten Rat zur Seite stand und mit seinen kreativen Ideen einen unentbehrlichen Beitrag zu diesem Projekt hinzugefügt hat. Mit seiner wissenschaftlichen aber auch menschlichen Kompetenz wird er mir stets ein Vorbild sein. Danke für das unerschütterliche Vertrauen in mich und meine Arbeit!

Ein großer Dank gilt auch allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Labors für molekulare Endokrinologie, insbesondere Herr Dr. rer. nat. Andreas Schmid und Frau Dr. rer. nat. Jutta Schlegel, die mir als direkte Ansprechpartner mit ihrer Erfahrung oft eine große Hilfe waren. Aber auch Frau Kathrin Ebeling und Frau Lisa Phillippus, die stets mit ihrer Kompetenz und ihrem Fleiß einen reibungslosen Ablauf im Labor organisieren. Danke für die schöne Zusammenarbeit und die gute Freundschaft!

Ich bedanke mich außerdem von Herzen bei meiner ganzen Familie, insbesondere bei meinen Eltern Josef und Edith Thomalla und meiner Schwester Colleen Thomalla, sowie bei all meinen guten Freunden für den Zuspruch und jedes motivierende Wort, ebenso wie für das eiserne Vertrauen in mich und meine Fähigkeiten. Danke für die bedingungslose Unterstützung und das Verständnis während meiner gesamten Promotionszeit!

Zum Schluss aber dennoch an erster Stelle bedanke ich mich bei meinem wunderbaren Ehemann Thorben, der während der gesamten Zeit mein geduldiger Ruhepol war, mich sowohl seelisch als auch moralisch immer liebevoll unterstützt hat und auf dessen einfühlsames Verständnis ich immer vertrauen konnte.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt zu haben, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Datum

Unterschrift