

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN I  
PROF. DR. MED. MARTINA MÜLLER-SCHILLING  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

VERGLEICH DER TLR9-ABHÄNGIGEN AKTIVIERUNG VON  
TRANSKRIPTIONSFAKTOREN IN INTESTINALEN IMMUNZELLEN UNTER  
GESUNDEN UND CHRONISCH ENTZÜNDLICHEN BEDINGUNGEN

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Sebastian Siller

2014



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN I  
PROF. DR. MED. MARTINA MÜLLER-SCHILLING  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

VERGLEICH DER TLR9-ABHÄNGIGEN AKTIVIERUNG VON  
TRANSKRIPTIONSFAKTOREN IN INTESTINALEN IMMUNZELLEN UNTER  
GESUNDEN UND CHRONISCH ENTZÜNDLICHEN BEDINGUNGEN

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Sebastian Siller

2014

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert  
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Florian Obermeier  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Fichtner-Feigl  
Tag der mündlichen Prüfung: 17.04.2015



Die Wahrheit ist ein Verdacht,  
der andauert.

*Ramón de Campoamor*

Für meine Familie





## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACS	American Chemical Society
Ak	Antikörper
Akt	thymoma viral proto-oncogene 1 (Mus musculus) (Syn.: Akt1, PKB)
AP	Activator protein
APC	antigen-presenting cells
BALB/c	“Bagg Albino” / c
Bis-Tris	2-[Bis(2-hydroxyethyl)amino]-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol
bit	Bit (binary digit)
BP	British Pharmacopoeia
BSA	Bovine serum albumin
C	Cytosin
C57BL/6	“C57 Black” / 6
Ca <sup>2+</sup>	Calciumkation
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cAMP	3'-5'-cyclic adenosine monophosphate
CARD	Caspase recruitment domain
CBB	Complete binding buffer
CBBG	Coomassie brilliant blue G-250
CBP	CREB-binding protein
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA (Syn.: copy DNA)
cDSS-Colitis	chronische DSS-induzierte Colitis
CED	Chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (engl.: Inflammatory bowel disease, IBD)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
Cl <sup>-</sup>	Chloridanion
CLB	Complete lysis buffer

CLR	C-type lectin receptor
Cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Cos-7	Cercopithecus aethiops, origin-defective SV-40 (Zelllinie)
Cot	Cancer Osaka thyroid
CpG	Cytosine-guanosine-dinucleotide
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element-binding protein
CRP	C-reactive protein
CT	Cycle threshold
CU	Colitis ulcerosa
Poly-[d(I-C)]	Poly-(deoxyinosinic-deoxycytidylic) acid
Da	Dalton
DC	Dendritic cells
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNase	Deoxyribonuclease
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
dsRNA	Double-stranded ribonucleic acid
DSS	Dextrane sulfate sodium salt
dT	2'-Desoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
ECL	Electrochemiluminescence (Syn.: Electrogenenerated chemi-luminescence)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EMPROVE exp	firmeninterner Qualitätsstandard der Firma Merck, Darmstadt
EMSURE	firmeninterner Qualitätsstandard der Firma Merck, Darmstadt
ER	Endoplasmic reticulum
ERK	Extracellular signal regulated kinase

F <sup>-</sup>	Fluoridanion
FAM	6-Carboxyfluorescein (Syn.: 6-FAM)
FBS	Fetale bovine serum
FDC	Follicular dendritic cell
G	Guanin
g	Gramm
GALT	Gut-associated lymphoid tissue
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GC	Gas chromatography
Gll.	Glandulae
GOLD	Golgi dynamics
GpG	Guanosine-guanosine-dinucleotide
GSK3-β	Glycogen synthase kinase 3 beta
H <sup>+</sup>	Wasserstoffkation, Proton
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Dihydrogenphosphatanion
HCl	Hydrogenchlorid, Salzsäure
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Hydrogencarbonatanion
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid
HNF4A	Hepatocyte nuclear factor 4 alpha
Hrp	Horseradish peroxidase
Hsp	Heat shock proteins
HPLC	High-performance liquid chromatography
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Hydrogenphosphatanion
IDC	Interdigitating dendritic cell
IEL	Intraepithelial lymphocyte
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IκB	Inhibitor of NF-Kb
IKK	IκB kinase
IL	Interleukin

ILR	Interleukin receptor
IRAK	IL-1 receptor-associated kinase
IRF	Interferon regulatory factor
ISO	International Organization for Standardization
ISRE	IFN-stimulated response element
IVC	Individually ventilated cage
JAK	Janus kinase
JNK	Jun N-terminal kinase
K <sup>+</sup>	Kaliumkation
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LPL	Lamina propria lymphocytes
LPMZ	Lamina propria mononukleäre Zellen
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Leucine rich repeats
LTA	Lipoteichoic acid
M	Molar
m	Meter
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
mA	Milliamper
MC	Morbus Crohn
mDC	Myeloid dendritic cell
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MLN	Mesenteric lymph nodes
mM	Millimolar
mm	Millimeter

$\mu\text{m}$	Mikrometer (engl.: micron)
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MBL	Mannan-binding lectin
$\text{Mg}^{2+}$	Magnesiumkation
$\text{MgCl}_2$	Magnesiumchlorid
MHC	Major histocompatibility complex (Syn.: Human leukocyte antigen, HLA)
MOPS	3-Morpholinopropane-1-sulfonic acid
MW	Molecular weight
MyD	Myeloid differentiation primary-response protein
N	Normalität (Syn.: Äquivalentkonzentration $c_{\text{eq}}$ )
n.s.	nicht signifikant ( $p > 0,05$ )
$\text{Na}^+$	Natriumkation
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat
$\text{Na}_3\text{VO}_4$	Natriumorthovanadat
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (kurz: Nuclear factor kappa B)
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLR	NOD-like receptors
NOD	Nucleotid-binding oligomerization domain
ODN	Oligodeoxynucleotides
P	Prolin
p	Phospho-
p.a.	pro analysi
p-p38	Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)
p300	E1A binding protein p300 (Syn.: EP300)
p38	p38 MAPK
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
pAkt	Phospho-Akt (Ser473)
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern

PBL	Peripheral blood lymphocytes
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
pCREB	Phospho-CREB (Ser133)
pDC	Plasmacytoid dendritic cell
pErk	Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2)
pGSK3- $\beta$	Phospho-GSK3- $\beta$ (Ser9)
pH	Pondus Hydrogenii (Syn.: potentia Hydrogenii)
Ph Eur	Europäisches Arzneibuch
PI3K	Phosphatidylinositide 3-kinase
PKB	Protein kinase B (Syn.: Akt, Akt1)
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
pNF- $\kappa$ B (p65)	Phospho-NF- $\kappa$ B p65 (Ser536)
polykl.	polyklonal
PRR	Pattern recognition receptor
PUFFERAN	„für Puffer geeignet“ (firmeninterner Qualitätsstandard der Firma Roth, Karlsruhe)
QPCR	Quantitative real time polymerase chain reaction (Syn.: qRT-PCR)
qRT-PCR	Quantitative real time polymerase chain reaction (Syn.: QPCR)
Rel	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog (avian)
RIG	Retinoic acid inducible gene
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RLR	RIG-I-like receptor
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuclease
ROX	5- and 6-Carboxy-X-Rhodamine
rpm	Revolutions per minute
RPMI 1640	am <u>Roswell Park Memorial Institute</u> (RPMI) entwickeltes Zellkulturmedium
SAP	Serum amyloid P component
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SD System	Sequence Detection System

Ser	Serin
SP140	Nuclear body protein SP140
SR	Scavenger receptor
ssRNA	Single-stranded ribonucleic acid
STAT	Signal transducer and activator of transcription
T	Thymin
TAK	Transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase
TAMRA	6-Carboxy-tetramethyl-rhodamine
Taq	Thermus aquaticus polymerase
TBP	TATA binding protein
TGF	Transforming growth factor
T <sub>H</sub> -Zelle	T-Helfer-Zelle
Thr	Threonin
TIR	Toll/IL-1 receptor
TLC	Thin layer chromatography
TLR	Toll-like receptor
TLR9 <sup>-/-</sup>	TLR9-deficient
Tm	Schmelztemperatur (engl.: melting temperature)
TM	Unregistered trademark
TNF	Tumour necrosis factor
TNFSF	Tumour necrosis factor superfamily
TpC	Thymine-cytosine-dinucleotide
TpT	Thymine-thymin-dinucleotide
TRIS	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
TRIS/Base	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRIS/HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid
Trp	Tryptophan
TWEEN	Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate
Tyr	Tyrosin
U	Units
UNC93B1	Unc-93 homolog B1 (C. elegans)

---

USP	United States Pharmacopoeia
V	Volt
var.	variabel
VIC	Fluoreszenzfarbstoff der Firma Life Technologies Applied Biosystems, Foster City, USA
VLE	Very low endotoxin
w/v	Weight/volume
WI-38 (Forskolin)	Human embryonic fibroblast cell line, lung-derived (Zelllinie, Forskolin stimuliert)
wt	Wild type
3'-	3'-Ende einer Nukleinsäure
5'-	5'-Ende einer Nukleinsäure
Δ	Delta, Differenz



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>21</b>
1.1.	Aufbau und Funktion des menschlichen Magen-Darm-Trakts .....	21
1.2.	Das Immunsystem des menschlichen Darms .....	23
1.2.1.	Das angeborene und erworbene Immunsystem .....	23
1.2.2.	Die Erkennung mikrobieller Motive durch das angeborene Immunsystem .....	28
1.2.3.	Ein Überblick über die Gruppe der Toll-like Rezeptoren .....	29
1.2.4.	TLR9 und CpG-Motive bakterieller DNA .....	30
1.2.5.	Die Signaltransduktion des TLR9 .....	31
1.3.	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) .....	34
1.3.1.	Morbus Crohn und Colitis ulcerosa .....	35
1.3.2.	Die Ätiologie und Pathogenese der CED .....	37
1.3.3.	CpG-Motive und CED .....	39
<b>2</b>	<b>Arbeitsziele .....</b>	<b>41</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>42</b>
3.1.	Material .....	42
3.1.1.	Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	42
3.1.1.1.	Allgemeine Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien .....	42
3.1.1.2.	Spezielle Geräte, Materialien und Chemikalien für die Versuchstierbehandlung .....	43
3.1.1.3.	Spezielle Geräte und Chemikalien für die Zellisolation sowie für die Herstellung und Quantifizierung von Protein- und RNA-Lysaten .....	43
3.1.1.4.	Spezielle Geräte, Materialien und Chemikalien für die Untersuchungen mittels quantitativer TaqMan <sup>®</sup> Echtzeit-Polymerasekettenreaktion .....	44
3.1.1.5.	Spezielle Geräte, Materialien und Chemikalien für die Untersuchungen mittels DNA-Bindungsaktivitäts-Assays .....	46
3.1.1.6.	Spezielle Geräte, Materialien und Chemikalien für die Untersuchungen mittels Gelelektrophorese, Western Blot und Immundetektion der Proteine .....	46
3.1.2.	Puffer und Lösungen .....	49
3.1.2.1.	Puffer und Lösungen für die Zellisolation, Herstellung von Protein- und RNA-Lysaten sowie Proteinkonzentrationsbestimmung .....	49
3.1.2.2.	Puffer und Lösungen für die Untersuchung mittels quantitativer TaqMan <sup>®</sup> Echtzeit- Polymerasekettenreaktion .....	50
3.1.2.3.	Puffer und Lösungen für die Untersuchung mittels Gelelektrophorese, Western Blot und Immundetektion	

	der Proteine .....	50
3.2.	Methoden .....	52
3.2.1.	Die Behandlung von Versuchstieren .....	52
3.2.1.1.	Die Untersuchungen an TLR9 <sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäusen .....	53
3.2.1.2.	Die Untersuchungen an wt C57BL/6 Mäusen .....	53
3.2.2.	Die Zellisolation und die Herstellung von Protein- und RNA-Lysaten .....	54
3.2.2.1.	Die Aufarbeitung muriner Gewebeproben .....	54
3.2.2.2.	Die Herstellung von Protein- und RNA-Lysaten .....	55
3.2.3.	Die Konzentrationsbestimmung in Proteinlysaten .....	55
3.2.3.1.	Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Gesamtzelllysaten .....	55
3.2.3.2.	Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Zellkernextrakten .....	56
3.2.4.	Die Untersuchungen mittels quantitativer TaqMan <sup>®</sup> Echtzeit- Polymerasekettenreaktion .....	57
3.2.4.1.	Die Isolation der RNA aus RNA-Lysaten .....	57
3.2.4.2.	Die Bestimmung der RNA-Konzentration in den RNA-Isolate .....	57
3.2.4.3.	Das Umschreiben der RNA-Isolate in cDNA .....	57
3.2.4.4.	Die Durchführung der TaqMan <sup>®</sup> Real-Time-PCR .....	57
3.2.5.	Die Ermittlung der DNA-Bindungsaktivität mittels TransAM <sup>®</sup> -Assays ....	60
3.2.6.	Die Untersuchungen mittels Gelelektrophorese, Western Blot und Immundetektion der Proteine .....	61
3.2.6.1.	Die Durchführung der Gelelektrophorese .....	61
3.2.6.2.	Die Durchführung des Western Blots .....	62
3.2.6.3.	Die Durchführung der Immundetektion von Proteinen ..	63
3.2.6.4.	Die densitometrische Quantifizierung der Immundetektion .....	64
3.2.7.	Statistische Analyse .....	65
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>66</b>
4.1.	Vergleich von gesunden wt und TLR9 <sup>-/-</sup> Versuchstieren .....	66
4.1.1.	Untersuchung mittels TaqMan <sup>®</sup> Real-Time-PCR .....	66
4.1.1.1.	TLR9-Defizienz und Expression von IRF-Genen im gesunden Milieu .....	66
4.1.1.2.	TLR9-Defizienz und Expression von Genen pro- und antiinflammatorischer Zytokine im gesunden Milieu .....	67
4.1.2.	Untersuchung mittels Transkriptionsfaktor-Aktivierungsassays - CREB- und NF-κB-Aktivität in wt und TLR9 <sup>-/-</sup> Versuchstieren im gesunden Milieu .....	68
4.1.3.	Untersuchung mittels Western Blot .....	69
4.1.3.1.	Aktivierung von CREB und NF-κB in Milz- und MLN- Zellen von wt und TLR9 <sup>-/-</sup> Versuchstieren im gesunden Milieu .....	70

4.1.3.2.	Aktivierung von Proteinkinasen in Milz- und MLN-Zellen von wt und TLR9 <sup>-/-</sup> Versuchstieren im gesunden Milieu .....	71
4.1.3.3.	Aktivierung von CREB und NF-κB in Milz- und MLN-Zellkernen von wt und TLR9 <sup>-/-</sup> Versuchstieren im gesunden Milieu .....	72
4.1.3.4.	IRFs in Milz- und MLN-Zellkernen von wt und TLR9 <sup>-/-</sup> Versuchstieren im gesunden Milieu .....	74
4.2.	Stimulation des TLR9 in gesunden wt Versuchstieren .....	76
4.2.1.	Untersuchung mittels TaqMan <sup>®</sup> Real-Time-PCR .....	76
4.2.1.1.	CpG-vermittelte TLR9-Stimulation und Expression von IRF-Genen im gesunden Milieu .....	76
4.2.1.2.	CpG-vermittelte TLR9-Stimulation und Expression von Genen pro- und antiinflammatorischer Zytokine im gesunden Milieu .....	77
4.2.2.	Untersuchung mittels Transkriptionsfaktor-Aktivierungsassays - CREB-, NF-κB- und IRF7-Aktivität bei CpG-vermittelter TLR9-Stimulation im gesunden Milieu .....	78
4.2.3.	Untersuchung mittels Western Blot .....	80
4.2.3.1.	Aktivierung von Transkriptionsfaktoren in MLN-Zellen bei CpG-vermittelter TLR9-Stimulation im gesunden Milieu .....	81
4.2.3.2.	Aktivierung von Proteinkinasen in MLN-Zellen bei CpG-vermittelter TLR9-Stimulation im gesunden Milieu .....	82
4.3.	Auswirkungen einer DSS-induzierten chronischen Colitis in wt Versuchstieren ...	85
4.3.1.	Untersuchung mittels TaqMan <sup>®</sup> Real-Time-PCR .....	85
4.3.1.1.	Expression von IRF-Genen im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu .....	85
4.3.1.2.	Expression von Genen pro- und antiinflammatorischer Zytokine im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu .....	86
4.3.2.	Untersuchung mittels Transkriptionsfaktor-Aktivierungsassays - CREB-, NF-κB- und IRF7-Aktivität im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu .....	87
4.3.3.	Untersuchung mittels Western Blot .....	89
4.3.3.1.	Aktivierung von Transkriptionsfaktoren in MLN-Zellen im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu .....	89
4.3.3.2.	Aktivierung von Proteinkinasen in MLN-Zellen im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu .....	91
4.4.	Stimulation des TLR9 in chronisch entzündeten wt Versuchstieren .....	93
4.4.1.	Untersuchung mittels TaqMan <sup>®</sup> Real-Time-PCR .....	93
4.4.1.1.	CpG-vermittelte TLR9-Stimulation und Expression von IRF-Genen im chronisch entzündlichen Milieu .....	93
4.4.1.2.	CpG-vermittelte TLR9-Stimulation und Expression von Genen pro- und antiinflammatorischer Zytokine im chronisch entzündlichen Milieu .....	94
4.4.2.	Untersuchung mittels Transkriptionsfaktor-Aktivierungsassays - CREB-, NF-κB- und IRF7-Aktivität bei CpG-vermittelter TLR9-	

Stimulation im chronisch entzündlichen Milieu .....	95
4.4.3. Untersuchung mittels Western Blot .....	97
4.4.3.1. Aktivierung von Transkriptionsfaktoren in MLN-Zellen bei CpG-vermittelter TLR9-Stimulation im chronisch entzündlichen Milieu .....	97
4.4.3.2. Aktivierung von Proteinkinasen in MLN-Zellen bei CpG-vermittelter TLR9-Stimulation im chronisch entzündlichen Milieu .....	99
4.5. Vergleich der Effekte der CpG-vermittelten TLR9-Stimulation im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu .....	101
4.5.1. Vergleich mittels TaqMan <sup>®</sup> Real-Time-PCR .....	101
4.5.1.1. Effekt der CpG-vermittelte TLR9-Stimulation auf die Expression von IRF-Genen im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu .....	101
4.5.1.2. Effekt der CpG-vermittelte TLR9-Stimulation auf die Expression von Genen pro- und antiinflammatorischer Zytokine im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu .....	102
4.5.2. Vergleich mittels Transkriptionsfaktor-Aktivierungsassays - CREB-, NF- $\kappa$ B- und IRF7-Aktivität bei CpG-vermittelter TLR9-Stimulation im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu .....	104
4.5.3. Vergleich mittels Western Blot .....	106
4.5.3.1. Effekt der CpG-vermittelten TLR9-Stimulation auf die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu .....	106
4.5.3.2. Effekt der CpG-vermittelten TLR9-Stimulation auf die Aktivierung von Proteinkinasen im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu .....	107
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>109</b>
5.1. Vergleich von gesunden wt und TLR9 <sup>-/-</sup> Versuchstieren .....	110
5.2. Stimulation des TLR9 in gesunden wt Versuchstieren .....	112
5.3. Auswirkungen einer DSS-induzierten chronischen Colitis in wt Versuchstieren ...	115
5.4. Stimulation des TLR9 in chronisch entzündeten wt Versuchstieren .....	118
5.5. Vergleich der Effekte der CpG-vermittelten TLR9-Stimulation im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu .....	120
<b>6 Zusammenfassung .....</b>	<b>123</b>
<b>7 Ausblick .....</b>	<b>126</b>
<b>8 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>128</b>
<b>9 Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>141</b>
<b>10 Anhang .....</b>	<b>143</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau und Funktion des menschlichen Magen-Darm-Trakts

Das Verdauungssystem des Menschen setzt sich aus dem Verdauungskanal und den darin einmündenden extramuralen Drüsen (Mundspeicheldrüsen, Pankreas und Leber) zusammen. Der menschliche Magen-Darm-Kanal lässt sich weiterhin in einen Kopfdarm und einen Rumpfdarm gliedern. Der Kopfdarm umfasst die Mundhöhle (Cavitas oris) und den Rachen (Pharynx) und dient vorwiegend der Nahrungsaufnahme und -zerkleinerung sowie dem Transport in die Speiseröhre (Ösophagus) als ersten Abschnitt des Rumpfdarms. Der Rumpfdarm setzt sich dann über den Magen (Gaster), den Dünndarm (Intestinum tenue) und den Dickdarm (Intestinum crassum) bis zum After (Anus) fort. Die Aufgabe des Rumpfdarmes besteht in der enzymatischen Aufspaltung der Nahrung in resorbierbare Nährstoffe (vor allem Fette, Aminosäuren und Zucker), welche samt Flüssigkeit und Ionen im Darm resorbiert werden. Außerdem gewährleistet er die Sekretion verschiedener ausscheidungspflichtiger Substanzen in das Darmlumen. Nicht verdaute oder resorbierte Bestandteile werden am Ende des Darms ausgeschieden.

Mit kleineren Ausnahmen im Kopfdarm- und Enddarmbereich, zeigt der menschliche Darm einen relativ einheitlichen Wandbau. Von innen nach außen lassen sich vier verschiedene Schichten unterscheiden:

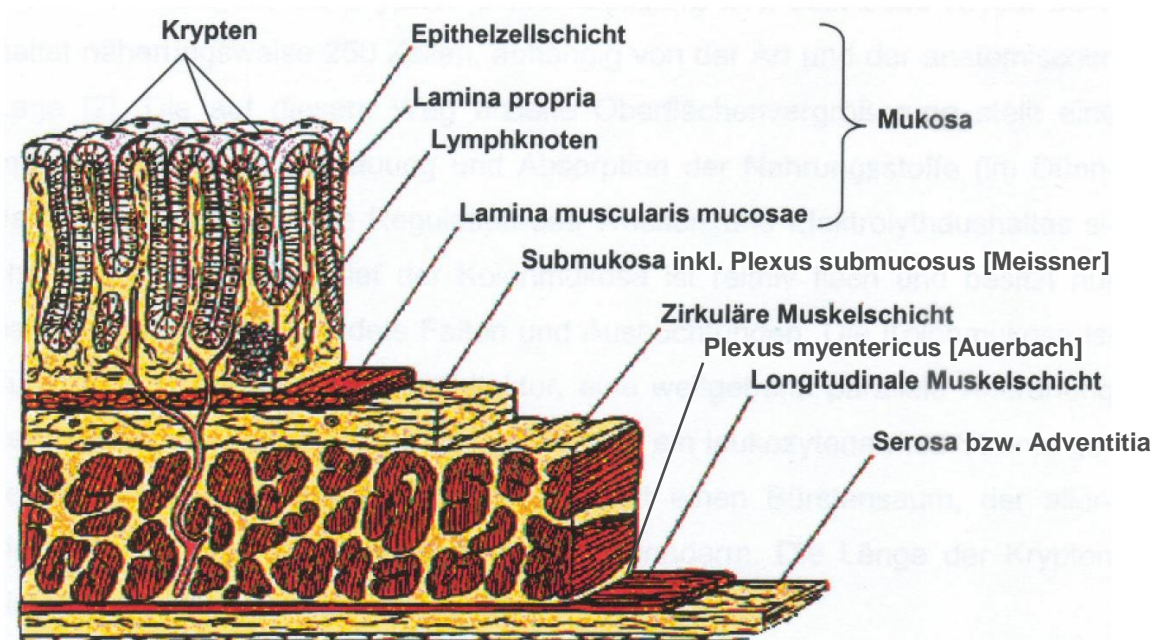
Die innerste und somit an das Darmlumen grenzende Schicht ist die Tunica mucosa. Deren Epithelschicht (Epithelium mucosae) ist je nach Darmabschnitt entsprechend der Funktion (Transport, Sekretion, Resorption) unterschiedlich gebaut und besteht im Bereich des Rumpfdarms vorwiegend aus einfachem, Bürstensaum-tragendem Säulenepithel zusammen mit Panethzellen, Becherzellen und disseminierte neuroendokrinen Zellen in je nach Lokalisation unterschiedlicher Häufigkeit. In allen Darmabschnitten finden sich neben diesem Oberflächenepithel auch tubuläre Drüsenepithelien, die im Dün- und Dickdarm als Krypten (Gll. mucosae intestinales) bezeichnet werden. Im Dünndarm ist die luminale Oberfläche außerdem durch makroskopisch sichtbare, permanente Falten (Plicae circulares) und bei Lupenvergrößerung durch Zotten (Villi intestinales) stark vergrößert. Es folgt eine lockere Bindegewebsschicht (Lamina propria mucosae) mit vielen freien Zellen: Lymphozyten, Granulozyten, Plasmazellen, Mastzellen und Makrophagen

(Monozyten). Auch Lymphfollikel werden hier angetroffen. Hier findet auch die Endaufzweigung der Blutgefäße und Nerven statt und die feinen Lymphkapillaren haben hier ihren Beginn. Eine dünne Schicht glatter Muskelzellen (Lamina muscularis mucosae) liegt der Lamina propria im gesamten Rumpfdarmbereich auf.

Zwischen Lamina muscularis mucosae und Tunica muscularis liegt eine weitere Verschiebeschicht aus lockerem Bindegewebe (Tela submucosa). Dort findet sich ein Netzwerk feinsten Nervenfasern und Neuronen (Plexus submucosus [Meissner]) zur Steuerung der Drüsensekretion in Magen und Darm.

Die sich anschließende dicke Muskelschicht (Tunica muscularis) enthält vom unteren Drittel des Ösophagus an ausschließlich glatte Muskulatur und gliedert sich in eine innere Ringmuskelschicht (Stratum circulare) und eine äußere Längsmuskelschicht (Stratum longitudinale). Zwischen Stratum circulare und Stratum longitudinale liegt lockeres Bindegewebe samt einem Nervengeflecht (Plexus myentericus [Auerbach]), das die nervöse Versorgung der beiden Muskellagen vermittelt.

Die Muskelschicht wird außen von einer Schicht lockeren Bindegewebes umgeben. Dort, wo der Darm nicht vom Peritoneum überzogen ist, spricht man von einer Tunica adventitia, dort, wo ein Peritonealüberzug vorhanden ist, von einer Tunica serosa, die dem parietalen Blatt des Peritoneums (Mesothel) entspricht und von einer bindegewebigen Tela subserosa unterlagert ist (1) (siehe Abb. 1.1).



**Abbildung 1.1:** Schematischer Aufbau der Darmwand [adaptiert nach (2)].

## 1.2 Das Immunsystem des menschlichen Darms

Durch die Oberflächenvergrößerung der Darmschleimhaut ergibt sich eine Gesamtoberfläche von über 200 m<sup>2</sup> (3) und somit die größte Grenzfläche zwischen Mensch und Umgebung. Neben seiner Verdauungsfunktion muss der Magen-Darm-Trakt dementsprechend auch eine entscheidende Funktion in der immunologischen Auseinandersetzung sowohl mit der endogenen Darmflora als auch mit der Umwelt besitzen - und zwar ohne dabei das gesunde Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Prozessen im Darm zu verlieren.

### 1.2.1 Das angeborene und erworbene Immunsystem

Das Immunsystem stellt ein komplexes System von Zellen und Faktoren dar, welches den Organismus in die Lage versetzt, mit Pathogenen und anderen Fremdstrukturen umzugehen. Die entsprechenden Instrumente dieses Systems verteilen sich über den gesamten Organismus mit Schwerpunkt in den primären und sekundären lymphatischen Organen inklusive den geschätzten 10<sup>12</sup> immunologisch bedeutsamen Zellen (4). Die Immunabwehr bedient sich dabei zweier unterschiedlicher Abwehrebene, die miteinander vernetzt sind:

Das angeborene, unspezifische („natürliche“) Immunsystem ist als phylogenetisch älterer Bestandteil im Vergleich zur erworbenen Immunantwort wesentlich weniger spezifisch, jedoch gegen Mikroorganismen aller Art gerichtet und innerhalb kürzester Zeit mit seinen mechanischen, humoralen und zellulären Komponenten verfügbar (5, 6, 7). Bevor ein Pathogen über den Darm in den menschlichen Organismus eindringen kann, muss es zunächst einmal verschiedene physikalische Barrieren (wie die intestinale Mukusschicht) und chemische Barrieren (wie das saure Magensekret) überwinden (6, 8). Pathogene, denen eine Überwindung dieser natürlichen Hindernisse gelingt, werden in der Regel durch das Komplementsystem oder von den Zellen des angeborenen Immunsystems neutralisiert. Neben neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten spielen Monozyten und Makrophagen sowie natürliche Killerzellen (NK-Zellen) eine wichtige Rolle in der ersten Phase der Immunantwort (6, 7, 9). Granulozyten sind zur Phagozytose befähigt und zerstören Mikroorganismen mittels Komponenten ihrer Granula (wie Superoxidanionen) (4, 7). Auch Monozyten/Makrophagen sind zur Phagozytose fähig und bilden dabei

proinflammatorische Zytokine wie Interleukin (IL) -1, -6, -8, -12, -18 sowie Tumornekrosefaktor (TNF), die als Chemokine und Pyrogene fungieren und die Bildung von Akute-Phase-Proteinen in der Leber induzieren (4, 7). Die Identifizierung von Mikroorganismen erfolgt dabei über hochkonservierte Strukturelemente der Pathogene - den Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Mittels Pattern-Recognition Receptors (PRRs) können diese PAMPs erkannt werden, sodass es zur Mediatorausschüttung und Effektorzellaktivierung kommt (4, 10). NK-Zellen werden unter anderem von IL-1 aktiviert und helfen bei der Beseitigung virusinfizierter Zellen (7). Auch dendritische Zellen (dendritic cells, DCs) sind zur Phagozytose befähigt und bilden zusammen mit den Makrophagen und B-Lymphozyten als Gruppe der Antigen-präsentierenden Zellen (antigen-presenting cells, APCs) die Verbindung zur Aktivierung des spezifischen Immunsystems (6).

Das spezifische, erworbene („adaptive“) Immunsystem als phylogenetisch jüngerer Teil ist mit seinen humoralen und zellulären Bestandteilen durch Antigenpezifität, Fremd-/Selbstdiskriminierung und ein immunologisches Gedächtnis charakterisiert, wobei es jedoch erst innerhalb von Tagen zur Wirkung gelangen kann (4, 7). Adaptive Immunantworten werden im Wesentlichen von T- und B-Lymphozyten getragen (6), deren Rezeptorvielfalt anders als bei den PRRs nicht Keimbahnkodiert, sondern durch Genumlagerung (rearrangement) und somatische Rekombination während der Entwicklung dieser Zellen festgelegt ist (4, 5). Dies führt dazu, dass im T-Zellbereich etwa  $10^{15}$  und im B-Zellbereich etwa  $10^{11}$  verschiedene Antigene diskriminiert werden können und das Immunsystem praktisch auf jedes denkbare Antigen reagieren kann (4). Während die im Thymus positiv- und negativ-selektionierten T-Lymphozyten etwa 70% des zirkulierenden Lymphozytenpools ausmachen, stellen die sich im Knochenmark entwickelnden B-Lymphozyten nur etwa 10% dar. T-Lymphozyten tragen neben ihrem spezifischen T-Zellrezeptor auch einen Corezeptor, anhand dessen sie in CD8- und CD4-positiven T-Zellen eingeteilt werden können. CD8-positive T-Zellen werden als zytotoxische T-Lymphozyten bezeichnet und von intrazellulären Antigenen aktiviert, welche durch den ubiquitär auf kernhaltigen Zellen vorkommenden MHC-I-Rezeptoren präsentiert werden. Diese Zellen dienen also hauptsächlich der Lyse von virusinfizierten oder transformierten Zellen (7). CD4-positive T-Helfer-Zellen ( $T_H$ -Zellen) werden von Antigenen, welche durch den MHC-II-Rezeptoren der APCs präsentiert werden, zur Sekretion von IL-2 und Proliferation angeregt und differenzieren dabei zu  $T_H0$ -Zellen. In Gegenwart von



IL-12 und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) findet die endgültige Differenzierung in T<sub>H</sub>1-Zellen statt, welche über die Produktion von IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF Makrophagen aktivieren oder infizierte Zellen abtöten. Unter dem Einfluss von IL-4 hingegen differenzieren T<sub>H</sub>0-Zellen zu T<sub>H</sub>2-Zellen, welche über IL-4, -5, -9, -10 und -13 die Differenzierung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen propagieren (6, 7). Neben T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen sind weitere, sogenannte regulatorische T-Zellen beschrieben, deren bekannteste Form CD4 und CD25 sowie den Transkriptionsfaktor Foxp3 exprimiert und über direkten Zellkontakt und Produktion der immunsuppressiven Zytokine TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor- $\beta$ 1) und IL-10 wirkt (4). Etwa 60% aller T-Zellen befinden sich als intraepitheliale Lymphozyten (IEL) in der Epithelschicht des Dünndarms (11). Damit sich ein reifer B-Lymphozyt in eine Antikörper-produzierende Plasmazelle umwandeln kann, ist es notwendig, dass ein passendes Antigen an den B-Zellrezeptor bindet und dieses dann nach Internalisierung und Fragmentierung auf dem MHC-II-Rezeptor der B-Zelloberfläche einer passenden T<sub>H</sub>2-Zelle präsentiert wird. Vor allem durch IL-4 und der Interaktion von CD40-Ligand mit dem B-Zellständigen CD40 kommt es zur klonalen Expansion und schließlich zur Umwandlung in Plasmazellen oder alternativ in Gedächtniszellen (4, 7). Während von Plasmazellen anfangs nur IgM-Antikörper gebildet werden, kommt es unter dem Einfluss von Zytokinen zum Immunglobulin-Klassenwechsel (isotype switch), sodass auch IgG-, IgA- und IgE-Antikörper gebildet werden (6, 7). IgA-Antikörper stellen die meistproduzierten Immunglobuline dar und entfalten in ihrer dimeren Form unter anderem im Mukus der Darmschleimhaut ihre schützende Wirkung (4).

Die Gesamtheit der in der Schleimhaut des Magen-Darm-Kanals diffus verteilten lymphatische Zellen, lymphozytenreichen Zotten (lymphocyte-filled villi), Solitärfollikel (Noduli lymphoidei solitarii) und Peyer-Plaques (Nodi lymphoidei aggregati) wird zum sogenannten gut-associated lymphoid tissue (GALT) zusammengefasst und trägt hauptsächlich zu immunologischen Vorgängen im menschlichen Darm bei (1, 12).

Die Induktion einer Immunantwort im menschlichen Darm hat vorzugsweise in den Lymphfollikeln und Peyer-Plaques ihren Ausgang. Dort aktivierte T- und B-Zellen wandern dann in die Lamina propria und das Darmepithel als den eigentlichen Effektorort der Immunantwort. In der Lamina propria findet sich deshalb eine große und heterogene Gruppe von lymphoiden und myeloiden Zellpopulationen mit Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen, DCs, Mastzellen sowie neutrophilen,

eosinophilen und basophilen Granulozyten (12). Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen der Lamina propria werden aufgrund ihres nicht-segmentierten Zellkerns als „Lamina Propria Mononukleäre Zellen“ (LPMZ) zusammengefasst und machen dort etwa 97% aller Immunzellen aus. 6-14% aller mononukleären Zellen in der Lamina propria sind Monozyten/Makrophagen und 86-94% aller LPMZ sind Lymphozyten (Lamina Propria Lymphozyte, LPL) - vornehmlich CD4-positiv T-Zellen (12 - 14). Im Unterschied zu peripheren Blutlymphozyten (PBL), sind die T-Lymphozyten der Lamina propria jedoch in einem Zustand erhöhter Aktivierung bezüglich ihrer Oberflächenmarker und produzieren nach CD2-Stimulation vermehrt Zytokine - vermutlich als Ausdruck der ständigen Konfrontation mit Antigenen aus dem Darmlumen (12, 15). T-Lymphozyten der Lamina propria zeigen dabei vermehrt den Phänotyp von reifen T-Zellen oder Gedächtnis-T-Zellen (12, 14) und besitzen eine geringere Proliferationsrate bei Mitogen-Stimulation als periphere Blutlymphozyten, sodass man davon ausgehen muss, dass CD4-positiv T-Zellen der Lamina propria hochdifferenzierte Effektorzellen mit einer erhöhten Aktivierungsschwelle darstellen, um eine überschießende Immunantwort gegen harmlose intraluminale Antigene zu verhindern (12). Im Vergleich zu gesunden Kontrollen zeigen intestinale B-Zellen sowie CD4- und CD8-positiv T-Zellen von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa (siehe Kapitel 1.3) eine nochmals erhöhte Expression von Oberflächenmarkern, sodass von einem zusätzlich erhöhten Aktivierungszustand bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) ausgegangen werden muss (15). Des Weiteren sezernieren LPL von Crohn-Patienten spontan IFN- $\gamma$  und zeigen im Vergleich zu LPL von gesunden Probanden eine erhöhte IFN- $\gamma$ -Produktion nach Stimulation (16). LPL sind somit sowohl an der Aufrechterhaltung der Homöostase als auch an Entzündungsprozessen beteiligt.

Mesenteriale Lymphknoten (mesenteric lymph nodes, MLN) gehören - zusammen mit den Lymphfollikeln und Peyer-Plaques der Darmschleimhaut - zu den Strukturen des GALT, die an der Induktion der intestinalen Immunantwort beteiligt sind (11). Unter den MLN versteht man diejenigen Lymphknoten, die sich innerhalb des Mesenteriums (Peritonealduplikatur des Jejunums und Ileums) befinden (17). Als sekundäre lymphatische Organe zeigen sie den gleichen Aufbau wie andere periphere Lymphknoten (11) mit afferenten und efferenten Lymphgefäßen in das lymphatische Parenchym, das sich in Kortex (Rinde), Parakortex und Medulla (Mark) gliedern lässt. Im Kortex (B-Zone) finden sich Primärfollikel (ruhende B-Zellformationen) und

Sekundärfollikel, welche sich nach Antigenkontakt aus den Primärfollikeln bilden und proliferierenden B-Zellen sowie Plasmazellen enthalten. Zur Ausbildung sekundärer Lymphfollikel ist die Mitwirkung von T-Lymphozyten erforderlich, welche sich bevorzugt im Randgebiet der Sekundärfollikel sowie im Parakortex (T-Zone) aufhalten. Als APCs finden sich Makrophagen, interdigitierende DCs (IDCs) und follikuläre DCs (FDCs) (18). Sinusendothelzellen, fibroblastische Retikulumzellen und Gefäßendothelzellen sind als weitere Zelltypen am Aufbau des Lymphknotens beteiligt (19). Von den übrigen peripheren Lymphknoten unterscheiden sich MLN darin, dass bei der Embryogenese vermutlich andere Mitglieder der TNF-Familie beteiligt sind (11). MLN scheinen eine wichtige Rolle im intestinalen Immunsystem und bei CED zu spielen: Antigen-beladene DCs der Lamina propria oder den Peyer-Plaques gelangen zunächst über die afferenten Lymphgefäße zu den MLN. Dies ist dann der Ort, an dem die naiven T-Zellen ihren ersten Kontakt mit intestinalen Antigenen haben und nach Polarisierung und Proliferation zu kolitogenen T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>17-Effektorzellen differenzieren (20 - 26). Diese Effektorzellen können dann über ihre Homing-Rezeptoren in den Darm zurückkehren und Entzündungsprozesse initiieren (21 - 23, 25). Neueste Erkenntnisse zeigen, dass GALT-Strukturen zur Initiierung und Aufrechterhaltung eines Entzündungsprozesses keineswegs mehr nötig sind, sobald naive T-Zellen einmal zu T<sub>H</sub>1- oder T<sub>H</sub>17-Effektorzellen polarisiert wurden (21, 27). Man muss somit davon ausgehen, dass MLN eine enorm wichtige Rolle bei der Etablierung und Aufrechterhaltung von Immunabwehr und Toleranz im intestinalen Immunsystem spielen (21, 28).

Die Milz ist zwar kein Bestandteil des GALT, zählt aber wie die GALT-Strukturen zu den sekundären lymphatischen Organen und besitzt somit wichtige Aufgaben für den Antigenkontakt und die klonale Vermehrung von Immunzellen im Rahmen der spezifischen Immunabwehr. Die Milz besteht aus einem retikulären Fasergerüst sowie einem Parenchym, das sich in rote und weiße Pulpa einteilen lässt. Während die rote Pulpa von einem Labyrinth weitlumiger venöser Blutsinus durchzogen ist und vor allem der Aussonderung alter und veränderter Blutzellen (Blutzellmauserung) dient, stellt die weiße Pulpa das eigentliche lymphatische Milzgewebe dar und dient mit seinen T- und B-Zellen sowie APCs der Auslösung einer spezifischen Immunreaktion gegen Antigene, die im Blut zirkulieren (18, 29).

### 1.2.2 Die Erkennung mikrobieller Motive durch das angeborene Immunsystem

Kommt es zum Eindringen von Mikroorganismen in den menschlichen Organismus, so ist in einem ersten Schritt eine schnelle und zielgerichtete Abwehrreaktion durch das angeborene Immunsystem erforderlich. Die Identifizierung von derartigen Mikroorganismen erfolgt dabei über Strukturen, die nicht auf Wirtszellen vorkommen und gleichzeitig meist essentiell für Vitalität oder Pathogenität der Erreger sind - den sogenannten PAMPs. Diese hochkonservierten Strukturelemente sind in der Regel charakteristisch für ein breites Spektrum an Mikroorganismen und beinhalten unter anderem pathogene Oberflächenantigene, bakterielle Zellwandkomponenten oder Nukleinsäuren von Viren oder Bakterien. Zur Erkennung dieser Struktur motive bedienen sich vor allem die phagozytierenden Zellen des angeborenen Immunsystems sogenannter PRRs (6, 10, 30 - 32). Diese Keimbahn-kodierten PRRs befinden sich bevorzugt in den Zellmembranen oder im Zellinneren der jeweiligen Immunzellen und nur wenige PRRs kommen als lösliche Form im Blutplasma vor (10, 30, 33). Da Viren und einige Bakterien in das intrazelluläre Kompartiment eindringen können, spielen besonders intrazellulär-zytosolische PRRs eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunabwehr (34). Die wichtigsten der zytosolischen PRRs stellen die 23 bis heute identifizierten Mitglieder der Familie der nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) like receptors (NLRs) dar, deren Funktion bis dato noch weitgehend unbekannt ist (33, 35). Die zweite große Gruppe der zytosolischen PRRs bildet die Familie der Retinoic acid inducible gene-1 (RIG-I) like receptors (RLRs), welche zytosolische, doppelsträngige RNA (dsRNA) bestimmter Viren erkennen können (32). In der Erkennung und Bekämpfung von Pathogenen durch das angeborene Immunsystem existieren zahlreiche Verbindungen zwischen den intrazellulären NLRs und RLRs und den membranständigen Toll-like-Rezeptoren (TLRs) (36, 37). TLRs sind klassische transmembranäre Proteine und ihre 13 Mitglieder gehören zu den besterforschten und bekanntesten Vertretern der PRRs (30, 33, 38). Membranständige PRRs sind für den Großteil der PAMP-Erkennung zuständig. Zu der Gruppe der membranständigen PRRs werden auch die Scavenger-Rezeptorfamilie (SRs) und die Familie der C-type lectin receptors (CLRs) gerechnet (30, 39).

### 1.2.3 Ein Überblick über die Gruppe der Toll-like Rezeptoren

Das Protein „Toll“ ist ein Typ-I Transmembran-Rezeptor, welcher erstmalig in der Taufliede *Drosophila melanogaster* beschrieben wurde. Aufgrund der hohen Homologie zum Protein „Toll“ wird die wahrscheinlich bekannteste Gruppe der PRRs als TLRs bezeichnet (40 - 43). TLRs selbst gehören zum angeborenen Immunsystem. Die Erkennung von Pathogenen mittels TLRs stellt jedoch einen wichtigen Schritt zur Aktivierung, Entwicklung und Modulation Antigen-spezifischer Immunität im Rahmen des erworbenen Immunsystems dar (30, 31, 44, 45). Die 90-115 kDa schweren TLRs bestehen aus insgesamt drei Komponenten: einer Leucinreichen extrazellulären Domäne, einer transmembranären Domäne und einer intrazellulären TIR-Domäne (38, 46). Da die intrazelluläre Domäne von TLRs und Rezeptoren der IL-1-Familie große Ähnlichkeit aufweist, spricht man von einer Toll/IL-1-Rezeptor (TIR) Domäne und fasst beide Gruppen zu einer Toll/IL-1-Rezeptor Superfamilie zusammen. Diese zytosolische TIR-Domäne ist wichtig für die Signalübertragung (44, 47). Während IL-1-Rezeptoren jedoch Immunglobulin-ähnliche extrazelluläre Domänen besitzen, so weist die extrazelluläre Domäne der TLRs hier 19-25 Kopien eines Leucin-reichen Motivs (leucine rich repeat, LRR) auf (31, 38, 47, 48). Die extrazelluläre LRR-Domäne der TLRs wird von charakteristischen N- und C-terminalen Strukturen flankiert und dient der Pathogenerkennung (38, 46). Bisher wurden 13 Mitglieder der TLR-Familie identifiziert, wobei TLR1-TLR10 beim Menschen und bei Mäusen vorkommen, TLR11-TLR13 jedoch nur bei Mäusen (38). Man findet TLRs vor allem auf Monozyten/Makrophagen und DCs, aber auch auf bestimmten T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Epithelzellen und Fibroblasten (31). Während TLR1, 2, 4, 5, 6 und 11 ihre Liganden an der Zelloberfläche erkennen und somit zu den extrazellulären TLRs zählen, gehören TLR3, 7, 8 und 9 zu den intrazellulären TLRs (38). TLR2 scheint das weiteste Spektrum an mikrobiellen Strukturen zu identifizieren. Dazu gehören unter anderem Lipoproteine und -peptide zahlreicher Pathogene, Peptidoglykan und Lipoteichonsäure (LTA) gram-positiver Bakterien sowie viele weitere Strukturelemente von Bakterien, Pilzen und Parasiten (31, 43, 49, 50), wobei jedoch nur das starke Ansprechen auf Lipopeptide und Lipoproteine gesichert scheint (51, 52). Die Tatsache, dass TLR2 ein so weites Spektrum an pathogenen Strukturen erkennen kann, könnte auch damit zusammenhängen, dass TLR2 zusammen mit TLR1, TLR6 und TLR10 Heterodimere an der Zelloberfläche bilden kann (30, 31, 43, 53 - 55).

Anders als beim Menschen ist TLR10 bei Mäusen funktionsunfähig (30). TLR4 ist ein Rezeptor sowohl für Lipopolysaccharid (LPS), einem Bestandteil der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien (30, 43, 56), als auch für körpereigene Produkte wie Fibronektin, Fibrinogen, Hyaluronsäure- und Heparansulfatfragmente sowie die Hitzeschockproteine Hsp60 und Hsp70 (31, 43, 57 - 61). TLR5 vermittelt die Erkennung von Flagellin gram-negativer Bakterien (30, 31, 43, 62). Virale Replikation innerhalb infizierter Zellen führt meist zu der Produktion von dsRNA, welche von TLR3 erkannt wird (30, 31, 43, 63). TLR7 und TLR8 stellen strukturell hochkonservierte Proteine dar und sind für die Erkennung von Imidazoquinolinen sowie von Guanosin- oder Uridin-reicher einzelsträngiger RNA (ssRNA) verantwortlich (31, 43, 64 - 66). TLR9 ist ein Rezeptor für unmethylierte CpG-Motive (30, 31, 43), der sich in Zellen des Immunsystems sowie in intestinalen Epithel- und Panethzellen findet (67, 68).

#### **1.2.4 TLR9 und CpG-Motive bakterieller DNA**

Dass bakterielle Bestandteile immunstimulatorisch wirken können, ist seit mehr als 120 Jahren bekannt (69). Dass auch die bakterielle DNA - im Gegensatz zur DNA von Wirbeltieren oder Pflanzen - für sich alleine genommen immunstimulatorische Effekte besitzt, konnte jedoch erst ab den 1980er Jahren gezeigt werden (69, 70, 71). Erst Mitte der 1990er Jahre wurde nachgewiesen, dass unmethylierte Cytosin-Guanosin-Dinukleotide (CpGs) flankiert von einer kurzen Abfolge weiterer Basen als die entscheidenden Vermittler der immunstimulatorische Wirkung bakterieller DNA anzusehen sind. Der optimale Stimulationseffekt wurde damals bei CpG-Dinukleotiden beobachtet, die am 5'-Ende von zwei Purinen (vor allem GpA-Dinukleotide) und am 3'-Ende von zwei Pyrimidinen (vor allem TpC- oder TpT-Dinukleotide) eingerahmt wurden (69, 72). Während CpG-Motive mit der erwarteten, zufälligen Häufigkeit von 1/16 und in weitgehend nicht-methylierter Form in den meisten Prokaryonten auftreten, so kommen CpG-Motive in der DNA von Wirbeltieren drei- bis viermal seltener vor (Häufigkeit von etwa 1/60) und sind an der 5'-Position des Cytosins weitgehend methyliert (zu etwa 80%) und somit wirkungslos (sogenannte CpG-Suppression) (69, 73 - 76). Diese strukturellen Unterschiede führen dazu, dass bakterielle DNA einen mindestens 20-fach höheren Gehalt an immunstimulatorischen CpG-Motiven enthält als Vertebraten-DNA und somit eine

spezifische Erkennung prokaryontischer DNA ermöglicht (75, 77, 78). Weitere Untersuchungen zeigten, dass synthetische CpG-Oligodeoxynukleotide (CpG-ODN), welche immunstimulatorische CpG-Motive beinhalten, den Effekt bakterieller DNA simulieren können. Bei der Synthese dieser Oligonukleotide verwendet man - zum Schutz vor einer Degradation durch Nukleasen - ein Phosphorothioat-Rückgrat, welches eine immunstimulatorische Eigenkomponente besitzt (72, 79). Aufgrund ihrer Hauptwirkung lassen sich drei Gruppen von CpG-ODN unterscheiden: CpG-A/D mit hoher IFN- $\alpha$ -Induktion in plasmazytoiden DCs (pDCs), CpG-B/K mit potenter Aktivierung von B-Zellen sowie CpG-C, welches die Eigenschaften von CpG-A/D und -B/K kombiniert (31, 80 - 82). Die immunstimulatorische Komponente von CpG-Sequenzen weist außerdem Spezies-spezifische Unterschiede auf (83). Beim Menschen scheint 5'-GTCGTT-3', bei der Maus hingegen 5'-GACGTT-3' das CpG-Motiv mit der höchsten immunstimulatorischen Wirkung zu sein (84). Die zentrale Wirkung von CpG-Motiven scheint in der direkten Aktivierung von APCs zu liegen, wodurch es zu einer vermehrten Sekretion von IL-6, IL-12, TNF und IFN- $\gamma$  und somit zu einer stark TH<sub>1</sub>-gewichteten Immunantwort kommt (69, 85 - 87). CpG-ODN sind auch in der Lage, B-Zellen zu vermehrter Proliferation, IgM-Produktion und CD40-Expression anzustoßen sowie MHC I, MHC II, CD80 und CD86 vermehrt auf APCs exprimieren zu lassen, sodass eine wichtige Voraussetzung zur Induktion einer spezifischen Immunabwehr erfüllt ist (69, 71, 88). Außerdem scheinen CpG-Motive in der Lage zu sein, die Differenzierung naiver T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen zu vermitteln (89). Eine Aktivierung von NK- und T-Zellen durch CpG-Motive scheint größtenteils auf indirektem Wege zu erfolgen (69). Vor über zehn Jahren konnte TLR9 als der PRR für CpG-ODN - und somit für bakterielle und virale DNA - identifiziert werden. TLR9 erkennt dabei neben unmethylierten CpG-Motiven auch das bloße DNA-Zuckergerüst aus 2'-Desoxyribose sowie das vom Malariaerreger *Plasmodium falciparum* gebildete, kristalline Hämoglobin-Abbauprodukt Hämозoin (30, 90 - 93).

### **1.2.5 Die Signaltransduktion des TLR9**

Neben TLR3, 7 und 8 gehört auch TLR9 zu den vorwiegend intrazellulären TLRs und ist überwiegend in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums (ER) zu finden - vermutlich als Schutz vor der Erkennung endogener DNA und daraus

resultierender Autoimmunität (30, 38, 90, 94). Zur Erkennung bakterieller und viraler DNA muss diese zunächst in Endolysosomen transloziert werden, sodass es durch das saure und reduzierende Milieu zur Degradation von dsDNA zu einzelsträngigen CpG-Motiven kommt (94 - 97). Damit TLR9 dann von seinen Liganden aktiviert werden kann, muss TLR9 vom ER zu den Endolysosomen rekrutiert werden (30, 31). Der genaue Mechanismus dieser TLR9-Rekrutierung ist noch weitgehend unklar, jedoch scheint das ER-Protein UNC93B1 eine Rolle dabei zu spielen (30, 98, 99). Nach Rekrutierung von TLR9 zum Endolysosom ist eine weitere Prozessierung von TLR9 nötig, welche die Anwesenheit von Cathepsin B, K und L sowie Asparaginendopeptidase erfordert (31, 100 - 104). In pDCs scheint auch das am Aufbau des Autophagosoms beteiligte Protein ATG5 eine Rolle zu spielen (30). Nach Stimulation und Dimerisierung von TLR9 kommt es dann zur Rekrutierung von Adaptermolekülen und diversen Proteinkinasen mit konsekutiver Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren (siehe Abb. 1.2). Wie alle bisher entdeckten TLRs - mit Ausnahme von TLR3 - benutzt auch TLR9 zur Signaltransduktion das Adapterprotein myeloid differentiation primary-response protein 88 (MyD88), welches mit seiner C-terminalen TIR-Domäne mit der intrazellulären TIR-Domäne der TLRs interagieren kann (31, 105, 106). MyD88 kann dann mit seiner N-terminalen Death-Domäne eine Gruppe von Serin/Threonin-Kinasen rekrutieren, welche unter dem Namen IRAKs (IL-1 receptor-associated kinases) 1, 2 und 4 bekannt sind und ebenfalls eine Death-Domäne besitzen (31, 43, 105 - 108). Über mehrere Zwischenschritte kommt es dadurch zur Phosphorylierung und Aktivierung der MAP3-Kinase (mitogen-activated protein 3-kinase) TAK1 (TGF- $\beta$  activated kinase-1), welche somit in die Lage versetzt wird, sowohl den IKK-Komplex (inhibitor of NF- $\kappa$ B [I $\kappa$ B] kinase complex), als auch über Zwischenschritte die p38-Kinase und JNKs (Jun N-terminal kinases) zu phosphorylieren und aktivieren (38, 105, 107 - 111). In der Signaltransduktion von TLR-2, -3, -7 und -9 ist außerdem eine Phosphorylierung und Aktivierung von ERKs (extracellular signal regulated kinases) möglich, wenn statt TAK-1 alternative Kinasen beteiligt sind (111, 112). Über den aktivierten IKK-Komplex kommt es letztendlich zur Freisetzung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B), welcher im Zytoplasma an I $\kappa$ B gebundenen vorliegt (43, 38, 105, 107, 113, 114). Das von I $\kappa$ B losgelöste NF- $\kappa$ B kann dann aus dem Zytoplasma in den Zellkern translozieren und nach Bindung an entsprechende DNA-Motive die Transkription von Zielgenen ausführen (30, 31, 38,



105 - 107). NF- $\kappa$ B ist dabei nur ein Sammelbegriff für induzierbare, dimere Transkriptionsfaktoren, die sich aus den 5 Mitgliedern der NF- $\kappa$ B/Rel-Familie - nämlich NF- $\kappa$ B1/p50 (samt Vorstufe p105), NF- $\kappa$ B2/p52 (samt Vorstufe p100), c-Rel, RelA/p65 und RelB - zusammensetzen, wobei nur RelA/p65, RelB und c-Rel über ihre Transaktivierungsdomäne die transkriptionelle Aktivierung der DNA vermitteln können und p50 und p52 primär als Untereinheiten zur DNA-Bindung fungieren (113, 115). Über die drei aktivierten MAPKs p38, JNK und ERK ist eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der AP1-Familie (activator protein-1) sowie die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB (cAMP response element [CRE] binding protein) möglich (43, 38, 105, 107, 111, 116, 117). CREB wird durch die Phosphorylierung an Serin-133 aktiviert und kann dann Homodimere bilden, die durch Bindung an die CRE-Promotorsequenz die Transkription von Zielgenen initiieren (118). Die Aktivierung von AP-1 und NF- $\kappa$ B führt schließlich zur Transkription von Genen, die für proinflammatorische Zytokine und Chemokine (wie TNF, IL-6, IL-8 und IL-1 $\beta$ ) kodieren (31, 105, 107, 119, 120). Eine Aktivierung von CREB hingegen führt mitunter zur erhöhten Expression antiinflammatorischer Zytokine (wie IL-10) (121, 122). Neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass noch weitere Proteine wie Akt/PKB (protein kinase B) MyD88-abhängig phosphoryliert und aktiviert werden können (106). Phosphoryliertes Akt hat dann Bedeutung in der Phosphorylierung der RelA/p65-Transaktivierungsdomäne (106). In der MyD88-abhängigen Signaltransduktion von TLR7 und TLR9 kommt es - zumindest in pDCs - außerdem zu einer IRAK1-vermittelten Phosphorylierung und Aktivierung von IRF7 (IFN regulatory factor 7), die zur Produktion von IFN- $\alpha$  führt (30, 38, 94, 123, 124). IRF5 scheint bei fast allen TLRs über die MyD88-abhängige Signaltransduktion ebenfalls zur Produktion proinflammatorischer Zytokine zu führen (38, 125) und IRF1 könnte in der MyD88-abhängigen Signaltransduktion von TLR9 eine Rolle bei der IFN- $\beta$ -Genexpression in myloiden DCs (mDCs) spielen (30, 38, 126, 127). IRF4 ist - neben seiner Aufgabe in der Etablierung einer TH<sub>2</sub>-Differenzierung naiver T-Zellen - in der Lage, mit IRF5 um eine MyD88-Interaktion zu konkurrieren und in Makrophagen die LPS-induzierte Produktion proinflammatorischer Zytokine zu reduzieren, und zeigt somit negativ-regulatorische Eigenschaften in der TLR-Signaltransduktion (128 - 132). IRF3 spielt hingegen lediglich in der MyD88-unabhängigen Signaltransduktion von TLR3 und 4 eine Rolle bei der Expression von IFN- $\beta$  und - über eine vermehrte TNF-Expression - bei der verzögerten Aktivierung

von NF-κB und MAPKs (30, 31, 38, 105, 107, 108, 133 - 137). Alle Vertreter der IRF-Familie vermitteln dabei ihre transaktivierende Wirkung durch Bindung an die „IFN-stimulated response element“-DNA-Sequenz (ISRE) (138).

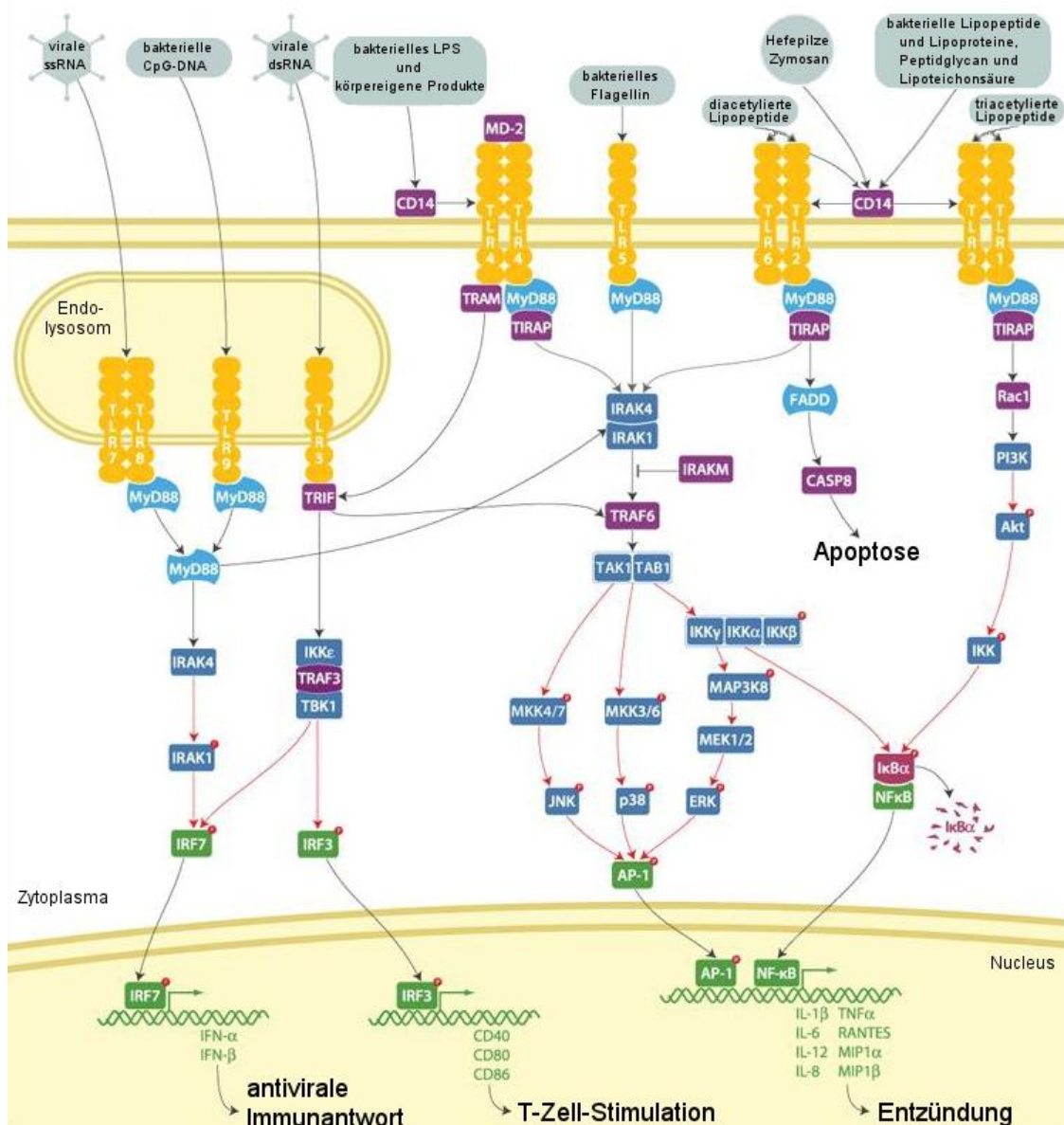


Abbildung 1.2: Die Signaltransduktion humaner TLRs [adaptiert nach (139)].

### 1.3 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)

Wie oben dargestellt stellen TLRs sowohl im angeborenen als auch erworbenen Immunsystem eine wichtige Gruppe innerhalb der PRRs dar und spielen dementsprechend eine bedeutende Rolle in intestinalen Entzündungsprozessen wie beispielsweise den CED (140).

### 1.3.1 Morbus Crohn und Colitis ulcerosa

Zu den CED im engeren Sinne werden die beiden Erkrankungen Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) gezählt (141). Bis in die 1970er Jahre stieg die Inzidenz beider Erkrankungen kontinuierlich an und hält sich in Deutschland seitdem weitgehend stabil bei etwa 5-15/100000/Jahr (142). Derzeit sind in Deutschland etwa 320 000 Menschen betroffen (143). Während die CU weder Männer noch Frauen bevorzugt, sind Frauen seltener von MC betroffen (1 zu 1,1-1,8). Das Erstmanifestationsalter liegt meist zwischen dem 15. und 30. Lebensjahr (5).

MC kann alle Teile des Gastrointestinaltraktes vom Mund bis zum After befallen. Von den 75% der MC-Patienten mit Dünndarmbefall ist in 90% das terminale Ileum (Ileitis terminalis) betroffen (5). Die Erkrankung breitet sich bevorzugt diskontinuierlich und oft analwärts aus (142), wobei das Rektum häufig ausgespart bleibt (5). Typisch ist ein segmentaler Befall mit unauffälliger Schleimhaut zwischen betroffenen Darmabschnitten („skip lesions“) (5, 142). Der Entzündungsprozess umfasst meist die gesamte Darmwand (transmurale Erkrankung), wobei die Infiltration in den tieferen Schichten oft ausgeprägter ist (disproportionierte Infiltration) (142, 144). Es bildet sich ein lymphoplasmazelluläres, teils granulozytäres Entzündungsinfiltrat gegebenfalls mit nicht-verkäsenden Granulomen. Endoskopisch ist die milde MC-Form durch Aphthen oder kleine oberflächliche Exulzerationen charakterisiert (5). Bei höherer Krankheitsaktivität imponieren tiefgreifende, bizarr oder landkartenförmig konfigurierte Ulzera („Schneckenfraßulzera“). Endoskopisches zeigt sich das typische Erscheinungsbild des „Pflastersteinreliefs“ (5, 142). Durch Vernarbungs- und Schrumpfungsprozessen kann es zu lokalen Komplikationen wie Analfissuren, Fisteln, lokalen Abszessen, Perforationen, Strikturen und Stenosen sowie Blutungen kommen (142, 145). Typische klinische Manifestationen des MC sind krampfartige, unspezifische Abdominalschmerzen, eine meist unblutige Diarrhoe sowie Flatulenzen, Fieber und Zeichen der Malabsorption (144). Ein Konglomerattumor im rechten Unterbauch kann tastbar werden (146). Weiterhin kommen häufig schmerzhaft Ulzera und Aphthen in der Mundhöhle vor (144). Auch extraintestinale Krankheitsmanifestationen sind möglich (142). Die Diagnosestellung erfolgt aufgrund endoskopischer, radiologischer und histologischer Befunde. Die Therapie ist vorrangig konservativ und umfasst hauptsächlich entzündungshemmende und immunsuppressive Medikamente, wobei eine Heilung nicht erzielt wird. Eine

chirurgische Therapie kommt bei Versagen der medikamentösen Therapie und bei Komplikationen zur Anwendung (144). Die Lebenserwartung bei MC-Patienten ist nahezu normal, das Karzinomrisiko jedoch höher als in der Normalbevölkerung (144, 142).

CU als mukosale Erkrankung beginnt meist im Rektum und kann sich kontinuierlich oralwärts ausbreiten (5, 142). Der Entzündungsprozess bleibt auf die Mukosa und die oberflächliche Submukosa beschränkt. Tiefere Wandschichten werden nur bei fulminanter Erkrankung erfasst. Die pathologischen Veränderungen beginnen mit Degeneration der subepithelialen Retikulinfasern (142). Es kommt zu einer Störung der Kryptenarchitektur im Kolon (Kryptenverlust) mit basalen Plasmazellinfiltraten und multiplen Kryptenabszessen sowie einer entzündlichen Infiltration der Lamina propria (5, 144). Typisch sind Becherzellschwund und Epitheldysplasien (147, 142). Bei leichter Entzündung findet sich makroskopisch nur eine diffus gerötete, vermehrt verletzte Mukosa mit feingranulierter Oberfläche (5, 142). Bei schwerer Entzündung kommt es zu Schleimhautödemen mit punktförmige Erosionen, Spontan- und Kontaktblutungen sowie Ulzera und entzündlichen Pseudopolypen (5, 142, 146, 148). Die Mukosa erscheint atroph-abgeflacht (Haustrenverlust) und das gesamte Kolon verkürzt und verengt (5, 142). Ist die Schleimhaut zirkulär zerstört, kommt es zum Bild des „ausgebrannten Fahrradschlauches“ (148). Hauptsymptome der CU sind je nach Krankheitsausdehnung Durchfälle oder Obstipation, rektaler Blut- und Schleimabgang, Tenesmen und milde krampfartige Bauchschmerzen sowie seltener Fieber, Appetitlosigkeit, Übelkeit, Erbrechen, Anämie, Tachykardie, Hypoproteinämie, beschleunigte Blutsenkung, ausgeprägter Gewichtsverlust und extraintestinale Krankheitsmanifestationen wie Arthritis oder Uveitis (5, 142, 146, 147). Das endoskopische Bild und der klinische Verlauf korrelieren dabei gut mit dem Kolonbefall. Die konservative Therapie besteht neben diätetischen und supportiven Maßnahmen in der oralen oder gegebenenfalls rektalen Gabe von entzündungshemmenden und immunsuppressiven Medikamenten (148, 149). Eine operative Therapie ist bei Komplikationen, Versagen der konservativen Therapie, zur Karzinomprävention bei mehrjährigem Krankheitsverlauf sowie bei Nachweis von höhergradigen Dysplasien indiziert, wobei die gesamte Kolonschleimhaut entfernt werden muss, um zu einer Heilung der Erkrankung mit normaler Lebenserwartung zu gelangen (142, 149). Insgesamt ist die Mortalität von CU-Patienten etwa 1,7-fach erhöht (142). Das Karzinomrisiko des Kolons ist signifikant erhöht, wobei hier die

Erkrankungsdauer und die Ausdehnung des Kolonbefalls sowie das Alter bei Erstdiagnose von Bedeutung sind (147, 148).

Zu den CED im weiteren Sinne gehören neben MC und CU auch die kollagene und die lymphozytäre Colitis, welche nur histologisch unterscheidbar sind und daher als mikroskopische Colitis zusammengefasst werden (145).

### **1.3.2 Die Ätiologie und Pathogenese der CED**

Trotz intensiver Forschung bleibt die genaue Ätiologie und Pathogenese der CED noch weitgehend unklar. Ein definitiver Auslöser konnte bis heute nicht identifiziert werden. Vielmehr muss von einer multifaktoriellen Genese ausgegangen werden: neben einer genetisch-prädisponierten Suszeptibilität und diversen Umwelteinflüssen müssen auch mikrobielle Faktoren inklusive der lokalen Darmflora sowie die Bereitschaft zur überschießenden und dysregulierten Immunantwort im Darm berücksichtigt werden (141, 150, 151).

Für MC und CU besteht dabei eine geographische und ethnische Häufung mit Bevorzugung von Nordamerikanern sowie Nord- und Mitteleuropäern gegenüber Bewohnern südlicher Länder (142). Beide Erkrankungen zeigen des Weiteren eine familiäre Häufung auf (5, 141). Genomweite Untersuchungen zur familiären Häufung und genetischen Prädisposition haben dabei 99 Gen-Loci aufgedeckt, die mit einem erhöhten Risiko für CED assoziiert sind, wobei mindestens 28 dieser Loci (wie Gen-Loci für IL23R, IL10, JAK2, STAT3 und TNFSF15) sowohl mit CU als auch mit MC assoziiert sind. Die 47 mit CU assoziierten Risiko-Gen-Loci (wie HNF4A, IL1R2 und IRF5) können jedoch nur 16% und die 71 mit MC assoziierten Risiko-Gen-Loci (wie NOD2/Card15, IL2RA und SP140) können lediglich 23,2% der Vererblichkeit der jeweiligen Erkrankung erklären (150, 152). Weiterhin ist für diverse Umweltfaktoren ein Zusammenhang mit CED vermutet und teilweise auch nachgewiesen worden, beispielsweise für das Rauchen. Für Raucher beträgt dabei das Risiko, an CU zu erkranken, nur 40% des Risikos für Nichtraucher. Im Gegensatz dazu ist Rauchen mit einem zweifach höheren Risiko für MC assoziiert als das Nicht-Rauchen (5). Die Prävalenz der CED ist darüber hinaus in der städtischen Bevölkerung und in höheren sozioökonomischen Schichten erhöht (5). Die in den letzten Jahrzehnten verbesserten hygienischen Verhältnisse der Industrieländer und die daraus

resultierenden qualitativen Veränderungen der intestinalen Flora und Immunantwort scheinen dabei eine wesentliche Bedeutung für die steigende Inzidenz der CED zu haben (sogenannte Hygiene-Hypothese) (141, 153).

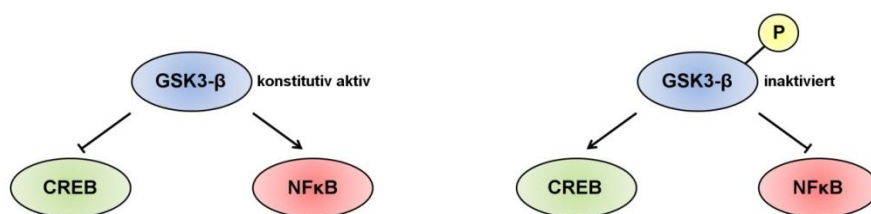
Eine wesentliche Voraussetzung für das Zustandekommen von CED ist die lokale intestinale Flora. Bei keimfrei aufgezogenen Versuchstieren kann in diversen Colitismodellen keine intestinale Entzündung induziert werden (154 - 156). Am ileozökalen Übergang und im Rektumbereich - die beiden Orte der höchsten Bakteriendicht im menschlichen Darm - hingegen manifestieren sich CED am häufigsten (141, 157). Weiterhin zeigen CED-Patienten im Gegensatz zu Gesunden eine fehlende Toleranz gegenüber eigenen Darmbakterien (158), sodass T-Zell-Klone isoliert werden konnten, die gegen intestinale Bakterien spezifisch reagieren (159). Untersuchungen an verschiedenen Tiermodellen konnten dabei umfangreiche Erkenntnisse über die Rolle des intestinalen Immunsystems bei CED liefern, die für eine Dysregulation zwischen pro- und antiinflammatorischen Einflüssen auf mukosaler Ebene sprechen. Auf Seiten der proinflammatorischen Komponenten stehen hier die TH<sub>1</sub>- und TH<sub>17</sub>-spezifischen Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF, IL-1, -6, -12, -23 und -17 im Vordergrund, wobei das histopathologische Bild derartiger TH<sub>1</sub>-dominierter Tiermodelle (wie das Tiermodell der DSS-induzierten Colitis) am ehesten der Histopathologie des MC gleicht (20, 160 - 164). Eine Neutralisation von IL-6 und IL-23 kann dementsprechend in zahlreichen Tiermodellen vor einer Enterocolitis schützen (160). Aber auch TH<sub>2</sub>-Zytokine (wie IL-4, -5, -13) können in bestimmten Tiermodellen (wie im Tiermodell der Oxazolol-induzierte Colitis) maßgeblich an der Entzündungsreaktion beteiligt sein (165, 166), wobei derartige Entzündungsreaktion eher dem Muster der CU ähneln (161). IL-10 und TGF- $\beta$  regulatorischer T-Zellpopulationen vermögen in TH<sub>1</sub>- und TH<sub>2</sub>-Colitismodellen eine intestinale Entzündung zu hemmen (161, 167 - 174), wohingegen IL-10-defiziente Mäuse unter pathogenfreien Bedingungen eine spontane Enterocolitis entwickeln (175, 176). Ebenso entwickeln TGF- $\beta$  RII dominant negative transgene und somit TGF- $\beta$  insensitive Mäuse eine spontane Colitis (177). Regulatorische T-Zellen können ihre Effekte darüber hinaus auch über Zellkontakte (wie negativ kostimulatorische Moleküle) vermitteln (178). Bei CED muss also von einer gestörten Homöostase des intestinalen Immunsystems zugunsten einer proinflammatorischen (TH<sub>1</sub>-, TH<sub>2</sub>- oder TH<sub>17</sub>-gerichteten) Immunantwort ausgegangen werden. Dies erklärt auch die Behandlungserfolge mit immunsuppressiven und antiinflammatorischen Therapeutika

(wie 5-Aminosalicylsäure), welche potente Inhibitoren dieser proinflammatorischen Zytokine auf Ebene der Transkription nukleärer Faktoren (wie NF- $\kappa$ B) sind (5).

### 1.3.3 CpG-Motive und CED

Es zeigte sich, dass insbesondere CpG-Motive bakterieller DNA unter bestimmten Umständen in der Lage sind, im intestinalen Immunsystem Toleranzmechanismen zu durchbrechen, wobei ebenso erwähnt werden muss, dass eine Interaktion mit Bestandteilen der intestinalen Flora auch protektive Effekte auf Epithelzellen und die regionale Immunfunktion zu haben scheint (140, 179, 180). Tatsächlich konnte in Mausmodellen nachgewiesen werden, dass die Stimulation von TLR9 mit CpG-Motiven sowohl während der akuten als auch insbesondere in der chronischen Phase einer DSS-induzierten Colitis zu einem deutlich proinflammatorischen Effekt mit massiv verstärkter IL-12-, IFN- $\gamma$ - und TNF-Produktion führt (179, 181 - 183). Verglichen mit der apikalen TLR9-Stimulation, zeigt die Stimulation an der basolateralen Epithelzellseite eine noch stärkere Entzündungsreaktion mit erhöhter NF- $\kappa$ B-Aktivierung, sodass dieser Effekt bei der ohnehin gestörten chronisch entzündeten Epithelzellbarriere zum Fortschreiten der CED beitragen könnte (179, 184). Eine „prophylaktische“ TLR9-Aktivierung durch CpG-Motive bakterieller DNA vor Induktion einer Entzündung - also im gesunden Gewebe - zeigte jedoch in verschiedenen Mausmodellen schützende Effekte mit verringerter IFN- $\gamma$ - und erhöhter IL-10-Produktion (179, 182, 185 - 188). Die Induktion regulatorischer T-Zellen scheint dabei an der Ausbildung dieser schützenden intestinalen Immuntoleranz beteiligt zu sein (171, 179, 187, 188). Zur Induktion entsprechender regulatorischer T-Zellen ist die Interaktion von TLR9 mit endogener bakterieller DNA oder exogenen CpG-Motiven eine notwendige Voraussetzung und Typ-I-Interferon (wie IFN- $\alpha$ ), TGF- $\beta$  und DCs spielen dabei eine wichtige Rolle (89, 171, 179, 187 - 190). TLR9-abhängige Mechanismen sind somit entscheidend für die intestinale Immunfunktionen, da sie sowohl an der Aufrechterhaltung von Toleranzmechanismen (191), als auch - unter bisher noch unklaren Umständen - am Verlust der intestinalen Homöostase beteiligt zu sein scheinen (192). Auch für andere TLR-Liganden konnten ähnlich paradoxe Effekte wie für die CpG-Motive beschrieben werden (140, 179). Der Grund für diese paradoxen Effekte liegt möglicherweise in einer differenzierten Regulation des TLR-Signalwegs im chronisch entzündlichen

Milieu verglichen mit der Regulation im gesunden Milieu. Neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass die konstitutiv aktive Glykogen-Synthase-Kinase 3- $\beta$  (GSK3- $\beta$ ) ein derartiges Regulatorprotein sein könnte (121, 179, 193). Die GSK3- $\beta$  scheint dabei für ihr regulatorisches Potential die Konkurrenz um das im Zellkern begrenzt vorhandene p300/CBP (CREB-binding protein) auszunutzen, da p300/CBP für die phosphorylierten Formen von CREB und NF- $\kappa$ B ein essentieller Co-Faktor ist (121, 194 - 196). GSK3- $\beta$  in ihrer aktiven Form vermindert die Aktivität und DNA-Bindefähigkeit von CREB, sodass die Serin-276-phosphorylierte p65-Untereinheit von NF- $\kappa$ B und CBP interagieren können und es somit zu einer erhöhten Sekretion proinflammatorischer Zytokine (wie IL-6, IL-12 oder TNF) kommt (121, 193, 197). Die Stimulation bestimmter TLRs (unter anderem TLR2, 4, 5 und 9) hingegen führt über die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und der konsekutiven Akt-Phosphorylierung zur Phosphorylierung von GSK3- $\beta$  an Serin-9, wodurch GSK3- $\beta$  inaktiviert wird (121, 198 - 203). Viele „downstream“-Kinasen der MAPK-Kaskade (wie ERKs und p38) sind ebenfalls in der Lage, GSK3- $\beta$  an Serin-9 zu phosphorylieren und somit zu inaktivieren (204). GSK3- $\beta$ -Inhibition führt dabei über eine erhöhte Assoziation von Serin-133-phosphoryliertem CREB mit CBP und einer erhöhten CREB-DNA-Bindefähigkeit zu einer vermehrten Sekretion antiinflammatorischer Zytokine (wie IL-10) und einer reduzierten NF- $\kappa$ B-Aktivität (120, 193) (siehe Abb. 1.3). Die GSK3- $\beta$  erfüllt somit alle Voraussetzungen, um als Regulatorprotein am Scheideweg zwischen „proinflammatorischer“ NF- $\kappa$ B- und „antiinflammatorischer“ CREB-Dominanz zu gelten (121).



**Abbildung 1.3:** Die Regulation der CREB- und NF- $\kappa$ B-Aktivität durch die GSK3- $\beta$ .

Man nimmt an, dass noch weitere derartige Regulatorproteine existieren, welche die TLR-abhängige Signaltransduktion und somit letztendlich die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren je nach zugrunde liegendem Milieu - nämlich gesund oder chronisch entzündlich - differenziert beeinflussen. Dabei scheint der Milieu-abhängigen Modifikation der TLR9-Signaltransduktion eine große Bedeutung zuzukommen (179, 183, 184, 186, 187).



## 2 Arbeitsziele

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, die Milieu-abhängige Modifikation der TLR9-Signaltransduktion zu untersuchen. Dazu wurde die TLR9-abhängige Aktivierung von Transkriptionsfaktoren in intestinalen Immunzellen unter gesunden und chronisch entzündlichen Bedingungen verglichen.

In einem ersten Schritt sollte dabei herausgearbeitet werden, wie sich der Verlust der intakten TLR9-Signaltransduktion im gesunden Organismus auswirkt. Hierfür wurden TLR9-intakte, wildtypische (wt) Versuchstiere und TLR9-defiziente (TLR9<sup>-/-</sup>) Versuchstiere im gesunden Milieu hinsichtlich Genexpression, DNA-Bindungsaffinität und Zellmenge/Zellkernmenge ausgewählter Zytokine, Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren verglichen.

In einem nächsten Schritt sollten die Effekte bestimmt werden, die durch eine CpG-vermittelte TLR9-Stimulation im gesunden Milieu ausgelöst werden. Gesunde wt Versuchstiere wurden dazu mit CpG-ODN behandelt und anschließend den Kontrolltieren im Hinblick auf Genexpression, DNA-Bindungsvermögen und Zellmenge ausgewählter Zytokine, Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren gegenübergestellt.

In einem dritten Schritt sollte die basale Genexpression, DNA-Bindungsaffinität und Zellmenge ausgewählter Zytokine, Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren in gesunden und in chronisch entzündeten wt Versuchstieren verglichen werden. Hierzu wurde in den entsprechenden Versuchstieren eine chronische DSS-Colitis induziert.

In einem weiteren Schritt sollten - analog zu den Untersuchungen im gesunden Milieu - die Effekte einer CpG-induzierten TLR9-Aktivierung im chronisch entzündlichen Milieu herausgearbeitet werden. Hierzu wurde in wt Versuchstieren zunächst eine chronische DSS-Colitis induziert. Anschließend wurde ein Teil der chronisch erkrankten Versuchstiere mit CpG-ODN behandelt und mit den chronisch erkrankten Kontrolltieren hinsichtlich Genexpression, DNA-Bindungsvermögen und Zellmenge ausgewählter Zytokine, Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren verglichen.

In einem letzten Schritt wurden Genexpression, DNA-Bindungsaffinität und Zellmenge ausgewählter Zytokine, Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren bei CpG-getragener TLR9-Stimulation im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu miteinander verglichen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

##### 3.1.1.1 Allgemeine Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien

Gerät	Bezugsquelle
Abzug Variolab Mobilien VV90	Waldner, Wangen
Analysenwaage, MC-1, Analytic AC210S	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Flockeneisbereiter AF 20	Williams Scotsman, Baltimore, USA
Gefrierschrank (-80°C) HERAfreeze	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gefrierschrank (-20°C) GS 3183	Liebherr, Bulle, Schweiz
Inkubator BB 6220	Heraeus Holding, Hanau
Kühlschrank KT1630	Liebherr, Bulle, Schweiz
Lichtmikroskop DMIL	Leica Microsystems, Wetzlar
Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Schwabach
Mikropipette, Reference (var.), 0,5-10 µl	Eppendorf, Hamburg
Mikropipette, Reference (var.), 10-100 µl	Eppendorf, Hamburg
Mikropipette, Reference (var.), 10-100 µl	Eppendorf, Hamburg
Mikropipette, Reference (var.), 0,1-1 ml	Eppendorf, Hamburg
Mikropipette, Research (var.), 2,0-20 µl	Eppendorf, Hamburg
Mikropipette, Research (var.), 20-200 µl	Eppendorf, Hamburg
Mikroprozessor-pH-Meter CG 840	Schott SI Analytics, Mainz
Multipipette, Transferpette-8, 20-200 µl	Brand, Wertheim
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe PIPETBOY acu	INTEGRA Biosciences, Fernwald
Schüttelapparat 3016	GFL, Burgwedel
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Waage, MC-1, Laboratory LC6200S	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Wasseraufbereitungssystem, Milli-Q Advantage A10	Merck Millipore, Billerica, USA
Zeitmesser TR 118	Oregon Scientific, Tualatin, USA
Zentrifuge, Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, Heraeus Biofuge Fresco 17 R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge, Heraeus Megafuge 1.0R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge, Heraeus Multifuge 3SR	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge, Sprout Mini-Centrifuge	Heathrow Scientific, Vernon Hills, USA

Software	Bezugsquelle
ImageQuant Version 5.2	Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA
SD System (SDS) Software Version 2.3	Life Technologies, Carlsbad, USA
SigmaPlot Version 11.0	Systat Software, San Jose, USA
SoftMax Pro Microplate Data Acquisition & Analysis Software Version 2.34	Molecular Devices, Sunnyvale, USA

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
BD Falcon Tube, 15 ml	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
BD Falcon Tube, 50 ml	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Combitips plus, 2,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Combitips plus, 5 ml	Eppendorf, Hamburg
Corning Costar 96-well-Mikrotiterplatten	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Pipette, Corning Costar Stripette, 5 ml	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Pipette, Corning Costar Stripette, 10 ml	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Pipette, Corning Costar Stripette, 25 ml	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Pipette, Corning Costar Stripette, 50 ml	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Pipettenspitze (Eppendorf) farblos, 10 µl	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitze (Eppendorf) gelb, 20 µl	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitze (Eppendorf) gelb, 200 µl	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitze (Eppendorf) blau, 1000 µl	Sarstedt, Nürnberg
Safe-Lock-Gefäß 3810X, 1,5 ml, farblos	Eppendorf, Hamburg
Standardreaktionsgefäß 3810X, 1,5 ml, farblos bzw. ambra (Lichtschutz)	Eppendorf, Hamburg

### 3.1.1.2 Spezielle Materialien und Chemikalien für die Versuchstierbehandlung

Versuchstiere	Bezugsquelle
Versuchsmäuse, BALB/c	Janvier, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich
Versuchsmäuse, C57BL/6	Janvier, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich
Versuchsmäuse, C57BL/6 TLR9 <sup>-/-</sup>	Transgene Eigenzucht

Chemikalie	Bezugsquelle
Dextransulfat Natriumsalz (DSS)	MP Biomedicals, Solon, USA
DPBS (1x) PAA, ohne Ca <sup>2+</sup> / Mg <sup>2+</sup> , steril	GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB

Oligodesoxynukleotid	Sequenz	Bezugsquelle
CpG-Motiv, ODN 1668 (Tm 58,0) (MW 6364)	5'-TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT-3'	Metabion, Martinsried
GpG-Motiv, ODN 1668G (Tm 58,0) (MW 6404)	5'-TCC ATG AGG TTC CTG ATG CT-3'	Metabion, Martinsried

### 3.1.1.3 Spezielle Geräte und Chemikalien für die Zellisolation sowie für die Herstellung und Quantifizierung von Protein- und RNA-Lysaten

Gerät	Bezugsquelle
EMax <sup>®</sup> Endpoint ELISA Microplate Reader	Molecular Devices, Sunnyvale, USA

Chemikalie	Bezugsquelle
Bicinchoninsäure-Lösung	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Bio-Rad Protein-Assay Dye-Reagent	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
BSA, Fraktion V	Biomol, Hamburg
CHAPS, BioXtra, ≥98% (TLC)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Complete Mini, protease inhibitor cocktail	Roche, Basel, Schweiz
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O, ≥99,5 %, p.a.	Roth, Karlsruhe
Ethanol (absolut), ≥99,9%	Mallinckrodt Baker, Griesheim
FBS, 0,2 µm steril gefiltert, Cos-zertifiziert	PAN-Biotech, Aidenbach
Flüssigmedium, VLE-RPMI 1640, mit stabilem Glutamin, mit 2,0 g/l NaHCO <sub>3</sub>	Biochrom, Berlin
HEPES, PUFFERAN, ≥99,5 %, p.a.	Roth, Karlsruhe
KCl, EMSURE	Merck, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , EMSURE, ISO	Merck, Darmstadt
Kupfer(II)-sulfat-Lösung, 4 % (w/v)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
2-Mercaptoethanol, ≥99,0%, p.a., ACS	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
NaCl, ≥99,5 %, p.a., ACS, ISO	Roth, Karlsruhe
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> , ≥90% (Titration)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
DPBS (1x) PAA, ohne Ca <sup>2+</sup> / Mg <sup>2+</sup> , steril	GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB
DPBS PAA, mit MgCl <sub>2</sub> / CaCl <sub>2</sub> , steril	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Penicillin/Streptomycin (100x) PAA	GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB
PMSF, ≥98,5% (GC)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
RIPA Buffer	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Saccharose	Merck, Darmstadt

Biochemikalienfertigkombination	Bezugsquelle
Aktivitätsassays, TransAM <sup>®</sup> IRF7 / NF-κB p65 / pCREB Transcription Factor ELISA Kits	Active Motif, Carlsbad, USA
DNase, RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNA-Isolationssystem, RNeasy <sup>®</sup> Mini Kit	Qiagen, Hilden

### 3.1.1.4 Spezielle Geräte, Materialien und Chemikalien für die Untersuchungen mittels quantitativer TaqMan<sup>®</sup> Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

Gerät	Bezugsquelle
ABI Prism 7900HT SD System	Life Technologies, Carlsbad, USA
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen
NanoPhotometer	Implen, München

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Filterpipettenspitzen (steril), Filter Tip, A20S, 0,5-20µl	Kisker Biotech, Steinfurt
Filterpipettenspitzen (steril), SafeGuard Filterspitzen 0,1-10 µl	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen

Filterpipettenspitzen (steril), SafeGuard Filterspitzen 1-100 µl	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Filterpipettenspitzen (steril), SafeGuard Filterspitzen 100-1000 µl	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Gewebehomogenisierer, QIAshredder™	Qiagen, Hilden
Polypropylen-PCR-Mikroplatte, Thermo-well GOLD PCR Plate, 384 Well, klar	Corning, Corning, USA
Versiegelfolie, Absolute™ QPCR Seal	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Chemikalie	Bezugsquelle
Arbeitsflächenreiniger, RNaseZAP™	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Brilliant II QPCR Master Mix High ROX	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
DEPC behandeltes Wasser, Nuklease-frei, steril-filtriert, autoklaviert	Roth, Karlsruhe
Ethanol (absolut), ≥99,9%	Mallinckrodt Baker, Griesheim

Primer/Sonde	Sequenz	Bezugsquelle
IFN-γ forward primer	5'-TGC TGA TGG GAG GAG ATG TCT-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
IFN-γ reverse primer	5'-TGC TGT CTG GCC TGC TGT TA-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
IFN-γ Sonde	5'-CAC TCC GGG CCA GC-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
TNF forward primer	5'-CAC AAG ATG CTG GGA CAG TGA-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
TNF reverse primer	5'-TCC TTG ATG GTG GTG CAT GA-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
TNF Sonde	5'-CTG GAC TGT GGG CCT-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
IL-6 forward primer	5'-CCA CGG CCT TCC CTA CTT C-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
IL-6 reverse primer	5'-TGG GAG TGG TAT CCT CTG TGA A-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
IL-6 Sonde	5'-CAA GTC CGG AGA GGA G-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
IL-10 forward primer	5'-GAG AAG CTG AAG ACC CTC AGG AT-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
IL-10 reverse primer	5'-GCT CCA CTG CCT TGC TCT TAT T-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
IL-10 Sonde	5'-CTG AGG CGC TGT CAT CGA TTT CTC CC-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
IRF4 forward primer	5'-GAA GCC TTG GCG CTC TCA-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
IRF4 reverse primer	5'-CAC GAG GAT GTC CCG GTA AT-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
IRF4 Sonde	5'-ACT GCC GGC TGC ATA TCT GCC TG-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg

IRF7 forward primer	5'-CAG CCT TGG GTT CCT GGA T-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
IRF7 reverse primer	5'-CCC ACC ACT GCC TGT AGC-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
IRF7 Sonde	5'-TGA CCA TCA TGT ACA AGG GCC GCA-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
IRF5 forward primer	5'-CTG TAC AGG TGG TAC CTG TTG CA-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
IRF5 reverse primer	5'-GTG TGC CGA CCA AGA AAG CT-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
IRF5 Sonde	5'-CCC GGT TGC TGG AGA TGT TCT-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
IRF1 forward primer	5'-GTG TCA CCC ATG CCT TCC A-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
IRF1 reverse primer	5'-TCT TCG GCT ATC TTC CCT TCC T-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
IRF1 Sonde	5'-ACT GCC GGC TGC ATA TCT GCC TG-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg

### 3.1.1.5 Spezielle Geräte, Materialien und Chemikalien für die Untersuchungen mittels DNA-Bindungsaktivitäts-Assays

Gerät	Bezugsquelle
EMax <sup>®</sup> Endpoint ELISA Microplate Reader	Molecular Devices, Sunnyvale, USA

Biochemikalienfertigungskombination	Bezugsquelle
Aktivitätsassays, TransAM <sup>®</sup> IRF7 / NF-κB p65 / pCREB Transcription Factor ELISA Kits	Active Motif, Carlsbad, USA

### 3.1.1.6 Spezielle Geräte, Materialien und Chemikalien für die Untersuchungen mittels Gelelektrophorese, Western Blot und Immundetektion der Proteine

Gerät	Bezugsquelle
Elektrophoresegerät Power Ease 500	Life Technologies, Carlsbad, USA
Elektrophoresemodul, XCell SureLock™ Mini-Cell mit XCell II™ Blot- Modul-Kit	Life Technologies, Carlsbad, USA
Entwicklungsmaschine CURIX 60	Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgien
Entwicklungskassette, Amersham Hypercassette™ (Standardtiefe), 8 x 10 "	GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB
Personal Densitometer SI, Model 375A	Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Elektrophoreseigel, NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gel 1,0 mm, 10 und 12 well	Life Technologies, Carlsbad, USA
Nitrozellulosemembran, Filterpapier-Sandwich, 0,45 µm Porengröße	Life Technologies, Carlsbad, USA
Pipettenspitzen, Prot/Elec Pipet Tips	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

Chemikalie	Bezugsquelle
Antioxidanz, NuPAGE Antioxidant	Life Technologies, Carlsbad, USA
Bromphenolblau (Natriumsalz)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
BSA, Fraktion V	Biomol, Hamburg
DMSO, ≥99,5%	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS), LAB	Merck, Darmstadt
PAGE-Laufpuffer, NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (für Bis-Tris Gele) (20x)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Entwicklerlösung, G153 A Developer	Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgien
Entwicklerlösung, G153 B Developer	Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgien
EDTA, ≥99 %, p.a., ACS	Roth, Karlsruhe
Film, Amersham Hyperfilm ECL 18x24cm	GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB
Film, CL-Xposure™ X-Ray Film 18x24cm	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Fixiererlösung, G354 Rapid Fixer	Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgien
Glycerin, EMSURE, ACS, Ph Eur	Merck, Darmstadt
Luminol Natriumsalz, ≥98% (Titration)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Magermilchpulver	TSI Sucofin, Zeven
2-Mercaptoethanol, ≥99,0%, p.a., ACS	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Methanol, EMSURE, ACS, ISO, Ph Eur	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid, ≥99,5 %, p.a., ACS, ISO	Roth, Karlsruhe
p-Cumarisäure, ≥98,0% (HPLC)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
TWEEN 20 viscous liquid	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Ponceau S, Standard Fluka	Sigma-Aldrich Fluka, Saint Louis, USA
Salzsäure, rauchend, 37%, EMSURE, ACS, ISO, Ph Eur	Merck, Darmstadt
Streptavidin-HRP	Hycult Biotech, Uden, Niederlande
Striplösung, ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution, 10x	Merck Millipore Chemicon, Billerica, USA
TRIS/Base, PUFFERAN, ≥99,9 %, Ultra	Roth, Karlsruhe
TRIS/HCl, PUFFERAN, ≥99 %, p. a.	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid, 30%, stabilisiert, EMPROVE exp, Ph Eur, BP, USP	Merck, Darmstadt
Western Blot-Transferpuffer, NuPAGE Transfer Buffer (20x)	Life Technologies, Carlsbad, USA

Marker	Bezugsquelle
RPN756V High-Range Rainbow Molecular Weight Markers (14,3-220kDa) Amersham	GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB
RPN 800E Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers (12-225kDa) Amersham	GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB

Primärer Antikörper	Konjugat	Spender-organismus	Klon	Bezugsquelle
Anti-Actin		Maus	C4	Merck Millipore Chemicon, Billerica, USA
Anti- $\beta$ -Actin	HRP	Maus	AC-15	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Anti-GSK3- $\beta$		Kaninchen	27C10	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-IRF1		Ziege	polykl.	R&D Systems, Minneapolis, USA
Anti-IRF3		Kaninchen	polykl.	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-IRF4 (P173)		Kaninchen	polykl.	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-IRF5		Kaninchen	polykl.	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-IRF7		Kaninchen	polykl.	US Biological, Swampscott, USA
Anti-Phospho-Akt (Ser473)		Kaninchen	D9E	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-Phospho-CREB (Ser133)		Kaninchen	87G3	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-Phospho-CREB (Ser133)	Biotin	Kaninchen	87G3	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)		Kaninchen	polykl.	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-Phospho-GSK3- $\beta$ (Ser9)		Kaninchen	5B3	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-Phospho-NF- $\kappa$ B p65 (Ser536)		Maus	7F1	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-Phospho-NF- $\kappa$ B p65 (Ser536)	Biotin	Kaninchen	93H1	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)		Kaninchen	polykl.	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-TBP		Maus	1TBP18	Abcam, Cambridge, Großbritannien

Sekundärer Antikörper	Konjugat	Spender-organismus	Klon	Bezugsquelle
Anti-Kaninchen-IgG	HRP	Ziege	polykl.	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Anti-Maus-IgG	HRP	Ziege	polykl.	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Anti-Ziege-IgG	HRP	Esel	polykl.	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA



### 3.1.2 Puffer und Lösungen

#### 3.1.2.1 Puffer und Lösungen für die Zellisolation, Herstellung von Protein- und RNA-Lysaten sowie Proteinkonzentrationsbestimmung

<b>CHAPS-Lysepuffer</b>		<b>pH 7,4</b>
HEPES		2,3831 g
Saccharose		10 g
CHAPS		100 mg
PMSF-Lösung 0,1 M		1 ml
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>		1 ml
Complete Mini, protease inhibitor cocktail		10 Tabletten
DTT 1M		100 µl
Milli-Q-H <sub>2</sub> O		ad 100 ml

<b>Isolationsmedium</b>	
VLE-RPMI 1640	500 ml
FBS	50 ml
2-Mercaptoethanol-Lösung 1:500	500 µl
Penicillin/Streptomycin-Lösung	5 ml

#### **2-Mercaptoethanol-Lösung 1:500**

2-Mercaptoethanol	100 µl
Milli-Q-H <sub>2</sub> O	49,9 ml

<b>Phosphate Buffered Saline (PBS) (1x)</b>		<b>pH 7,4</b>
NaCl		8,0 g
KCl		0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O		1,44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		0,2 g
Milli-Q-H <sub>2</sub> O		ad 1 l

#### **Penicillin/Streptomycin-Lösung**

Penicillin/Streptomycin (100x)	1 ml
PBS (steril)	99 ml

#### **PMSF-Lösung 0,1 M**

PMSF	1,7419 g
Ethanol (absolut)	ad 100 ml

#### **RNA-Lysepuffer**

Buffer RLT	10 ml
2-Mercaptoethanol	100 µl

### 3.1.2.2 Puffer und Lösungen für die Untersuchungen mittels quantitativer TaqMan® Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

#### DNase I Stammlösung

lyophilisierte DNase I	1500 Kunitz-Einheiten
RNase-freies Wasser	550 µl

#### Ethanol 70%

Ethanol (absolut)	7 ml
DEPC-Wasser	3 ml

#### Reverse Transkriptase AffinityScript

#### 2-facher Ansatz

Random Primers (0,1 µg/µl)	6 µl
AffinityScript RT Puffer (10x)	4 µl
100 mM dNTPs (25 mM je dNTP)	1,6 µl
RNase Block Ribonuklease Inhibitor (40U/µl)	1 µl
Oligo(dT) Primer (0,5 µg/µl)	2 µl

#### TaqMan-PCR-Mastermix

#### 3-facher Ansatz (70 µl)

Brilliant II QPCR Master Mix High ROX	35 µl
Forward Primer Zielgen (18 µM)	0,5 µl
Reverse Primer Zielgen (18 µM)	0,5 µl
TaqMan-Sonde Zielgen (5 µM)	5 µl
Forward Primer GAPDH (10 µM)	0,75 µl
Reverse Primer GAPDH (10 µM)	0,75 µl
TaqMan-Sonde GAPDH (20 µM)	0,5 µl
cDNA-Probe (50 ng/µl)	27 µl

### 3.1.2.3 Puffer und Lösungen für die Untersuchungen mittels Gelelektrophorese, Western Blot und Immundetektion der Proteine

#### Detektionslösung

Wasserstoffperoxid 30%	3,05 µl
ECL-Mix Gesamtlösung	10 ml

#### ECL-Mix

##### Lösung 1

Luminol Natriumsalz	99,57 mg
DMSO	2 ml

##### Lösung 2

p-Cumarisäure	14,7744 mg
DMSO	1 ml

<b>Lösung 3</b>	
Tris/HCl-Lösung 1 M pH 8,5	20 ml
<b>Gesamtlösung</b>	
Lösung 1	2 ml
Lösung 2	0,89 ml
Lösung 3	20 ml
Milli-Q-H <sub>2</sub> O	177,11 ml

### **EDTA-Lösung 0,5 M**

EDTA	146,125 g
Milli-Q-H <sub>2</sub> O	ad 1 l

### **Gelelektrophorese-Laufpuffer**

NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (20x)	25 ml
Milli-Q-H <sub>2</sub> O	475 ml

### **Inkubationslösung 5%**

BSA oder Magermilchpulver	5 g
Waschpuffer	ad 100 ml

### **Laemmli-Puffer (6x)**

TRIS/HCl-Lösung 1,5 M pH 6,8	2,5 ml
SDS-Lösung 20%	3 ml
EDTA-Lösung 0,5 M	0,24 ml
Glycerin	2 ml
Milli-Q-H <sub>2</sub> O	2,26 ml
Bromphenolblau (Natriumsalz)	1 Spatelspitze
2-Mercaptoethanol	0,2 ml

### **NaCl-Lösung 5 M**

NaCl	146,1 g
Milli-Q-H <sub>2</sub> O	ad 500 ml

### **SDS-Lösung 20%**

SDS	20 g
Milli-Q-H <sub>2</sub> O	ad 100 ml

### **Strip-Lösung**

ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution, 10x	2 ml
Milli-Q-H <sub>2</sub> O	ad 18 ml

<b>Tris/HCl-Lösung 1,5 M</b>		<b>pH 6,8</b>
TRIS/HCl		236,34 g
Milli-Q-H <sub>2</sub> O		ad 1 l

<b>Tris/HCl-Lösung 1 M</b>		<b>pH 8,5</b>
TRIS/HCl		157,56 g
Milli-Q-H <sub>2</sub> O		ad 1 l

<b>Tris/HCl-Lösung 0,5 M</b>		<b>pH 6,8</b>
TRIS/HCl		19,695 g
TRIS/Base		15,1425 g
Milli-Q-H <sub>2</sub> O		ad 500 ml

<b>Waschpuffer</b>	
Tris/HCl-Lösung 0,5 M pH 6,8	20 ml
NaCl-Lösung 5 M	20 ml
TWEEN 20	1 ml
Milli-Q-H <sub>2</sub> O	ad 959 ml

<b>Western Blot Transferpuffer</b>	
NuPAGE Transfer Buffer (20x)	20 ml
Methanol	50 ml
NuPAGE Antioxidant	0,5 ml
Milli-Q-H <sub>2</sub> O	429 ml

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Die Behandlung von Versuchstieren

Für alle im Folgenden beschriebenen Tierversuche wurden ausschließlich weibliche Versuchsmäuse verwendet und im Tierlabor des Universitätsklinikums Regensburg (Forschungsbau H1) unter standardisierten Bedingungen gehalten. Die Haltung der Versuchstiere erfolgte in einzelbelüfteten Käfigen (Individually Ventilated Cage, IVC) bei konstanter Luftfeuchtigkeit (etwa 70%) und Temperatur ( $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) mit einem zwölfstündigen Licht-Dunkel-Wechsel. Das Futter- und Trinkwasserangebot an die Versuchstiere erfolgte ad libitum einmal wöchentlich. Der Käfigwechsel erfolgte ebenfalls regelmäßig in einem einwöchigen Abstand.

Die Versuchstierhaltung und die Tierexperimente erfolgten durch qualifiziertes Personal in den der Aufsichtsbehörde benannten Räumlichkeiten (gemäß und vorbehaltlich einer erteilten Erlaubnis nach §8 und §11 TschG) mit Genehmigung der Bezirksregierung Oberpfalz und der zuständigen Ethikkommission.

Die Behandlung der Versuchstiere begann stets nach etwa vier Wochen Käfighaltung, nachdem die Tiere ein Ausgangsgewicht von mindestens 20 g erreicht hatten.

### **3.2.1.1 Die Untersuchungen an TLR9<sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäusen**

Die TLR9<sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäuse stammten aus einer Eigenzucht und wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Shizuo Akira (Universität Osaka) überlassen. Die Erzeugung der transgenen Mauslinie erfolgte hierbei durch homologe Rekombination an embryonalen Stammzellen von wt C57BL/6 Mäusen der Firma Janvier. Der gewünschte Erfolg der transgenen Rekombination wurde durch Genotypisierung kontrolliert. Die TLR9<sup>-/-</sup> Mäuse zeichnen sich durch das Fehlen eines intakten TLR9-Gens in parenchymatischen Gewebezellen und zirkulierenden Immunzellen aus.

Als Vergleichsgruppe dienten wt C57BL/6 Mäuse der Firma Janvier.

Die Versuchstiere verblieben bei oben beschriebenem Futter- und Trinkwasserangebot unbelassen. Sobald die Versuchstiere das nötige Ausgangsgewicht erreicht hatten beziehungsweise nach einer gewissen Dauer der Käfighaltung, wurden die Tiere getötet und weiterverarbeitet.

### **3.2.1.2 Die Untersuchungen an wt C57BL/6 Mäusen**

Sobald die wt C57BL/6 Mäuse das nötige Ausgangsgewicht erreicht hatten, wurde in einem Teil der Versuchstiere vor der eigentlichen Behandlung eine chronische DSS-Colitis induziert, während der andere Teil der Versuchstiere bis zur eigentlichen Behandlung unbelassen verblieb.

Die Induktion einer chronischen Colitis mit Hilfe von Dextransulfat Natriumsalz (dextrane sulfate sodium salt, DSS) verlief in vier identischen Zyklen von je 14 Tagen Dauer. Bei jedem Zyklus wurde den Versuchsmäusen während der ersten sieben

Zyklustage 1,5% DSS in das Trinkwasser gegeben. In der zweiten Zykluswoche erhielten die Tiere normales Trinkwasser. Nach Vollendung des letzten Zyklus erhielten die nun chronisch erkrankten Tiere für vier weitere Wochen normales Trinkwasser.

Der erste Teil der chronisch erkrankten Versuchstiere und der erste Teil der gesund belassenen Versuchstiere erhielten im Anschluss fünf Tage lang jeweils einmal pro Tag eine intraperitoneale Injektion von 10 µg des CpG-Motivs (ODN 1668) gelöst in 100 µl sterilem PBS (1x). Der zweite Teil der chronisch erkrankten Versuchstiere und der zweite Teil der gesund belassenen Versuchstiere erhielten anstelle des CpG-Motivs 10 µg des GpG-Motivs (ODN 1668G) gelöst in 100 µl sterilem PBS (1x) täglich an fünf aufeinanderfolgenden Tagen intraperitoneal appliziert. Beim dritten Teil der chronisch erkrankten Versuchstiere und beim dritten Teil der gesund belassenen Versuchstiere erfolgte die tägliche intraperitoneale Applikation von lediglich 100µl sterilem PBS (1x) an fünf konsekutiven Tagen. Der vierte Teil der chronisch erkrankten Versuchstiere und der vierte Teil der gesund belassenen Versuchstiere verblieben während dieser fünf Tage unbehandelt.

Die Tötung und Weiterverarbeitung aller Versuchstiere erfolgte am sechsten Tag nach Behandlungsbeginn.

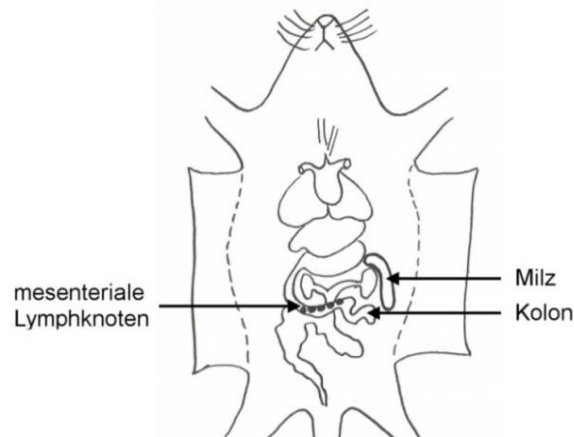
Bei dem verwendeten CpG-Motiv (ODN 1668) handelte es sich um ein Typ-B/K-CpG-Motiv mit Spezifität für den murinen TLR9. Das verwendete GpG-Motiv (ODN 1668G) unterschied sich vom CpG-Motiv (ODN 1668) dabei lediglich durch den Austausch von Cytosin durch Guanin an Position 8 der Oligonukleotidkette.

### **3.2.2 Die Zellisolation und die Herstellung von Protein- und RNA-Lysaten**

#### **3.2.2.1 Die Aufarbeitung muriner Gewebeprobe**

Zur Gewinnung von Zellen wurden die Tiere mittels CO<sub>2</sub>-Begasung bis zur Erstickung betäubt und anschließend seziiert. Je nach Versuchsablauf wurden die Milz, das gesamte Kolon sowie die mesenterialen Lymphknoten (MLN) entlang des Darmpaketes entnommen (siehe Abb. 3.1) und in Kulturmedium bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C aufbewahrt. Im Anschluss erfolgte die Isolation der murinen Splenozyten, Lamina propria Lymphozyten (LPL) und MLN-Zellen aus den jeweiligen Gewebearten

gemäß standardisierter Protokolle. Die dabei gewonnenen Zellisolate wurden in Isolationsmedium resuspendiert und standen dann zur Gewinnung von Gesamtzelllysaten, Zellkernextrakten und RNA-Lysaten zur Verfügung.



**Abbildung 3.1:** Übersicht der entnommenen Gewebearten [adaptiert nach (205)].

### 3.2.2.2 Die Herstellung von Protein- und RNA-Lysaten

Zur Gewinnung von Gesamtzelllysaten, Zellkernextrakten und RNA-Lysaten kamen standardisierter Protokolle zur Anwendung. Bei der Herstellung von GZ wurde CHAPS-Lysepuffer verwendet, bei der Erzeugung von ZK hingegen Complete Lysis Buffer (CLB) aus den TransAM<sup>®</sup>-Assays der Firma Active Motif. Die Herstellung von RNA-Lysaten erfolgte mit RNA-Lysepuffer.

### 3.2.3 Die Konzentrationsbestimmung in Proteinlysaten

#### 3.2.3.1 Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Gesamtzelllysaten

Der Proteingehalt in den Gesamtzelllysaten wurde mit Hilfe der Methode von Smith *et. al.* (1985) photometrisch ermittelt (206). Dazu wurden je 10 µl der Gesamtzelllysate auf eine 96-well-Mikrotiterplatte in Doppelbestimmung aufgetragen. Pro Mikrotiterplatte wurden zusätzlich je 10 µl einer BSA-Proteinstandardeihe bekannter Konzentration als Referenz sowie je 10 µl reiner Lysepuffer als Leerwert jeweils in Doppelbestimmung mitgeführt. Anschließend wurden pro Mikrotiterplattenvertiefung 200µl Entwicklungsreagenz - bestehend aus einem Volumenteil Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat-Lösung (4%) und 50 Volumenteilen Bicinchoninsäure-Lösung - zugegeben und für 30 Minuten im Dunklen bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> inkubiert. Bei

diesem Inkubationsschritt komplexierten die nachzuweisenden Proteine über ihre Peptidbindungen mit den Kupfer(II)-Ionen (Biuretreaktion) und reduzierten diese dann zu Kupfer(I)-Ionen. Die Kupfer(I)-Ionen wurden daraufhin in einem stabileren Komplex blau-violetter Farbe von je zwei Molekülen Bicinchoninsäure gebunden (206 - 208). Die Absorption dieses Farbkomplexes wurde dann bei Raumtemperatur und einer Wellenlänge von 540 nm gemessen. Nach Abzug des Leerwerts wurde anhand des BSA-Proteinstandards eine Eichgerade erstellt, die es erlaubte, den Proteingehalt des jeweiligen Gesamtzelllysates zu berechnen.

### **3.2.3.2 Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Zellkernextrakten**

Die Proteinkonzentration der Zellkernextrakte wurde photometrisch mit Hilfe des BIO-RAD Protein Assays bestimmt, welcher auf der Methode von Bradford *et. al.* (1976) beruht (209). Bei diesem Assay macht man sich die Tatsache zunutze, dass bei der Bindung des Triphenylmethanfarbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau G-250 (CBBG) an Proteine in saurer Lösung ein Farbumschlag von Rot nach Blau beobachtet werden kann und sich dabei das Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm verschiebt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist somit ein Maß für die Proteinkonzentration der Probenlösung (210 - 212). Zur praktischen Durchführung wurden jeweils 800 µl einer BSA-Verdünnungsreihe bekannter Konzentration sowie 800 µl eines Leerwerts von reiner PBS-Lösung in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Von den Zellkernisolaten wurde je 1 µl in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 799 µl PBS-Lösung versetzt. Zu allen Reaktionsgefäßen wurden dann 200 µl des CBBG-haltigen BIO-RAD-Farbstoffs gegeben und der Inhalt des Reaktionsgefäßes solange durchmischt bis eine homogene Farblösung entstand. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden aus jedem Reaktionsgefäß 200 µl Inhalt entnommen und in Doppelbestimmung auf eine 96-well-Mikrotiterplatte übertragen. Dann wurde die jeweilige Absorption photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt und anschließend des Leerwerts bereinigt. Anhand der BSA-Verdünnungsreihe ließ sich dann eine Eichgerade erstellen, mit deren Hilfe der Proteingehalt der Zellkernextrakte ermittelt werden konnte.



### **3.2.4 Die Untersuchungen mittels quantitativer TaqMan<sup>®</sup> Echtzeit-Polymerasekettenreaktion**

#### **3.2.4.1 Die Isolation der RNA aus RNA-Lysaten**

Zunächst wurden die RNA-Gewebelysate homogenisiert, in dem diese bei 16100 rpm für zwei Minuten durch eine QIAshredder<sup>™</sup>-Spinsäule zentrifugiert wurden. Anschließend erfolgte die Isolation der RNA aus RNA-Gewebelysaten mit Hilfe des RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit der Firma Qiagen gemäß dem Herstellerprotokoll. Das erhaltene RNA-Isolat wurde im Anschluss quantifiziert.

#### **3.2.4.2 Die Bestimmung der RNA-Konzentration in den RNA-Isolaten**

Die Menge an Nukleinsäuren in den RNA-Isolaten wurde mit dem Nanophotometer von IMPLEN spektrophotometrisch quantifiziert. Nach Eichung des Geräts und Ermittlung eines Leerwerts aus RNase-freiem Wasser, wurde durch Auftragung von 1 µl der jeweiligen RNA-Isolate auf das Detektionsfeld der Messküvette die Absorption bei 260 nm bestimmt und auf die entsprechende RNA-Menge zurückgerechnet.

#### **3.2.4.3 Das Umschreiben der RNA-Isolate in cDNA**

Zur Durchführung der quantitativen Echtzeit-PCR war es notwendig, die vorhandene RNA mittels reverser Transkription in cDNA zu überführen. Dazu wurden pro RNA-Isolat 2 µg RNA in ein Reaktionsgefäß vorgelegt und mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 25,4 µl gebracht. Nach Zugabe von 14,6 µl AffinityScript Reverse Transkriptase wurde für zehn Sekunden abzentrifugiert und die Probenansätze mit Hilfe des T3-Thermocycler von Biometra in cDNA umgeschrieben. Dabei erfolgte eine 15-minütige Inkubation bei 42°C und eine 5-minütige Inkubation bei 99°C. Die erhaltene cDNA wurde dann bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### **3.2.4.4 Die Durchführung der TaqMan<sup>®</sup> Real-Time-PCR**

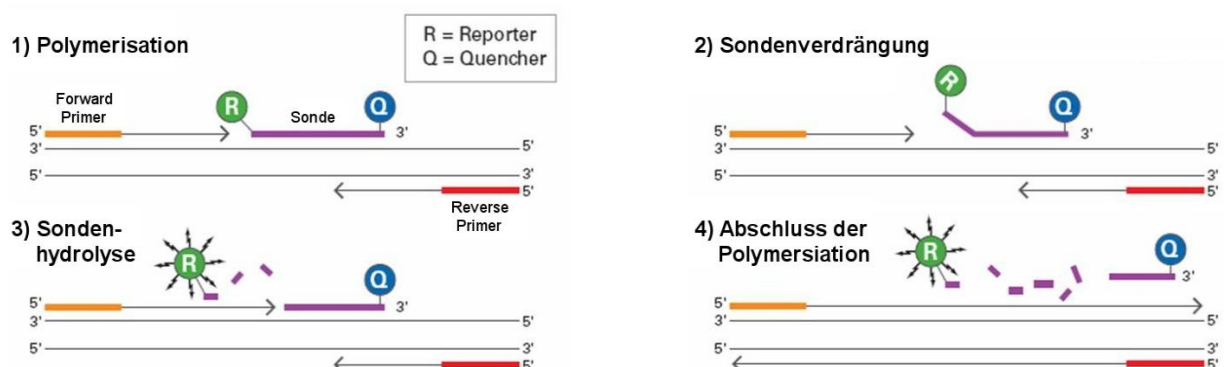
Die quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) mit Hilfe von TaqMan-Sonden (Hydrolysesonden) und einer Lasersystem-gestützten Fluoreszenz-

messung ermöglichte es, die in-vitro-Amplifikation von spezifischen DNA-Abschnitten in Echtzeit zu verfolgen und zu quantifizieren.

Die DNA-Replikation während eines TaqMan-PCR-Zyklus verlief dabei in folgenden vier Schritten ab (siehe folgende Tabelle).

TaqMan <sup>®</sup> Real-Time-PCR-Protokoll (9600 Emulation, 40 Zyklen)	
Denaturierung	15 Sekunden, 95°C
Annealing der TaqMan <sup>®</sup> -Sonde	1 Minuten, 60°C
Annealing des Primerpaares	2 Minuten, 50°C
Elongation	10 Minuten, 95°C

Zunächst wurde der DNA-Doppelstrang bei 95°C für 15 Sekunden aufgeschmolzen (Denaturierung). An die entstehenden DNA-Einzelstrangmoleküle lagerten sich bei 60°C innerhalb von einer Minute die passenden TaqMan-Sonden an, welche an ihrem 5'-Ende einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (FAM) und an ihrem 3'-Ende einen Quencher-Fluoreszenzfarbstoff (TAMRA) tragen. Bei intakten TaqMan-Sonden und somit räumlicher Nähe unterdrückt der Quencher die Fluoreszenzemission des Reporters. Bei 50°C lagerten sich innerhalb von zwei Minuten zusätzlich die beiden gegenläufig orientierten Primer-Oligonukleotide (forward und reverse primer) an die jeweilig komplementäre DNA-Sequenz an (Annealing). Die zehninütige Verlängerung der zwischen den Primern liegenden Zielsequenz fand dann bei 95°C mit Hilfe der Taq-Polymerase statt (Elongation). Dabei wurden die gebundenen TaqMan-Sonden vom 5'-Ende her durch die Taq-Polymerase hydrolysiert. Somit wurden Quencher und Reporter räumlich getrennt und die Emissionsunterdrückung aufgehoben, sodass nach jedem Zyklus eine steigende Reporter-Fluoreszenz gemessen wurde (siehe Abb. 3.2). Das Fluoreszenzsignal wurde dabei auf einen Referenzfarbstoff (ROX) normiert, um Volumenschwankungen auszugleichen.



**Abbildung 3.2:** Prinzip der TaqMan<sup>®</sup> Real-Time-PCR [adaptiert nach (213)].

Für einen vollständigen qRT-PCR-Lauf wurde der beschriebene TaqMan-PCR-Zyklus 40-mal wiederholt. Der qRT-PCR-Lauf gliederte sich dabei in eine Startphase, eine exponentielle Phase und eine abschließende Plateauphase. Nur während der exponentiellen Phase verdoppelte sich die Zielsequenz pro TaqMan-PCR-Zyklus, sodass der Anfang dieser exponentiellen Phase zur Quantifizierung genutzt werden konnte. Von Interesse war dabei der sogenannte Schwellenwertzyklus (CT-Wert), an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt.

Als interne Kontrolle wurde in jedem Reaktionsansatz das externe Referenzgen (housekeeping Gen) GAPDH parallel bestimmt und dessen CT-Wert gemessen. Die GAPDH-TaqMan-Sonden besaßen dabei im Gegensatz zu den Zielgen-TaqMan-Sonden einen Reporter, der mit VIC anstatt FAM versehen ist. Die Expression des Zielgens wurde dann in Relation zu diesem Referenzgen gesetzt, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten cDNA-Probe auszugleichen (214).

Zur praktischen Durchführung der Taqman-PCR wurde zunächst der TaqMan-PCR-Reaktionsansatz (70 µl) für jede zu vermessende cDNA-Probe erstellt. Zusätzlich wurde ein Leerwert vorbereitet, bei dem die cDNA-Probe durch RNase-freies Wasser ersetzt wurde. Der Reaktionsansatz jeder cDNA-Probe und des Leerwerts wurde daraufhin auf jeweils drei Mikrotiterplattenvertiefungen einer 384-well-Mikrotiterplatte à 20 µl verteilt. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte versiegelt und für fünf bis zehn Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Die Proben wurden dann mit dem ABI Prism 7900HT SD System von Life Technologies in 40 Zyklen amplifiziert. In jedem Zyklus wurde dabei die freiwerdende Menge der Reporter-Farbstoffe (FAM und VIC) vermessen und deren Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl aufgetragen. Die daraus abgelesenen CT-Werte wurden dann mit Hilfe der SDS 2.3 Software automatisch ermittelt.

Für die Berechnung der relativen Genexpression von Zielgenen in Gewebeproben von Versuchstieren mit unterschiedlicher Behandlung respektive unterschiedlichem genetischen Hintergrund wurde für jede Probe der CT-Wert des Referenzgens (GAPDH) vom CT-Wert des Zielgens abgezogen ( $\Delta CT$ ). Aus den  $\Delta CT$ -Werten der Dreifachbestimmung wurde dann der Mittelwert gebildet.

$$\Delta CT = CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{Referenzgen}}$$

Der  $\Delta\text{CT}$ -Mittelwert der Kontrollgruppe wurde daraufhin vom  $\Delta\text{CT}$ -Mittelwert der Untersuchungsgruppe abgezogen und somit der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert ermittelt.

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}_{\text{Untersuchungsgruppe}} - \Delta\text{CT}_{\text{Kontrollgruppe}}$$

Mit Hilfe des  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werts ließ sich zuletzt die relative Expression (Ratio) berechnen.

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

Die relative Expression wurde dann statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt.

### 3.2.5 Die Ermittlung der DNA-Bindungsaktivität mittels TransAM<sup>®</sup>-Assays

Zur Messung der DNA-Bindungsaktivität von pCREB, NF- $\kappa$ B (p65) und IRF7 wurden die TransAM<sup>®</sup> Transcription Factor ELISA Kits der Firma Active Motif verwendet, die auf dem ELISA-Prinzip (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) basieren und somit ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren darstellen. Die einzelnen Vertiefungen einer 96-well-Mikrotiterplatte sind dabei mit einem Oligonukleotid beschichtet, welches eine für den jeweiligen Transkriptionsfaktor spezifische Konsensussequenz beinhaltet (215).

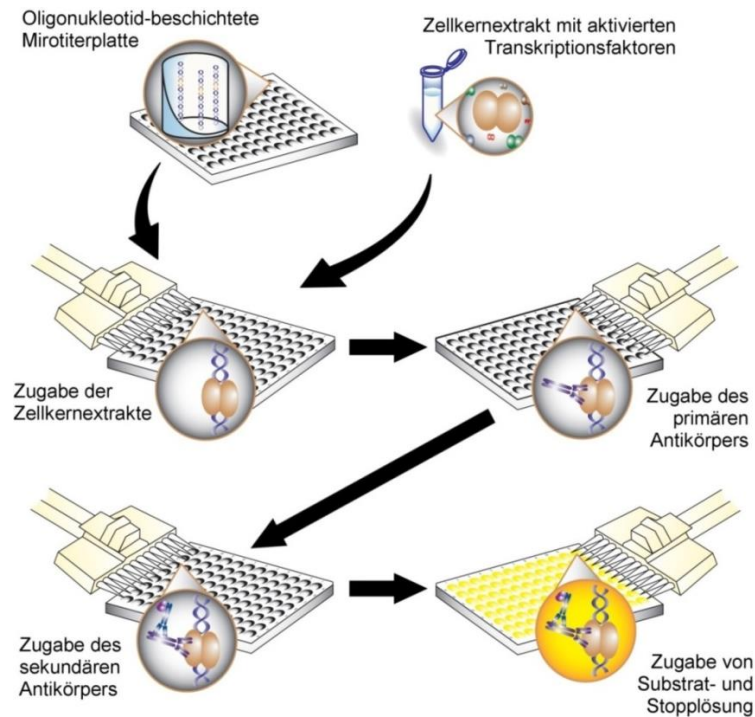
#### Konsensussequenz

IRF7	5'-GAA AGC AAA AAG AGA AGT AGA AAG TAA-3'
pCREB	5'-TGA CGT CA-3'
NF- $\kappa$ B (p65)	5'-GGG ACT TTC C-3'

Die praktische Umsetzung der TransAM<sup>®</sup>-Assays wurde gemäß den entsprechenden Herstellerprotokollen durchgeführt.

Hierbei erfolgte die Auftragung der Zellkernextrakte inklusive Positivkontroll- und Leerwertansatz mit anschließender Inkubation. Nach einem Waschschrift wurde mit dem entsprechenden Primärantikörper inkubiert. Es erfolgte ein erneuter Waschschrift mit darauffolgender Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Nach einem weiteren Waschschrift wurde Substratlösung zugegeben und die blaue Farbreaktion nach entsprechender Inkubationszeit mit Stopplösung beendet (siehe

Abb. 3.1). Die Absorption des sich ergebenden gelben Farbumschlags wurde dann innerhalb von fünf Minuten bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 650 nm vermessen.



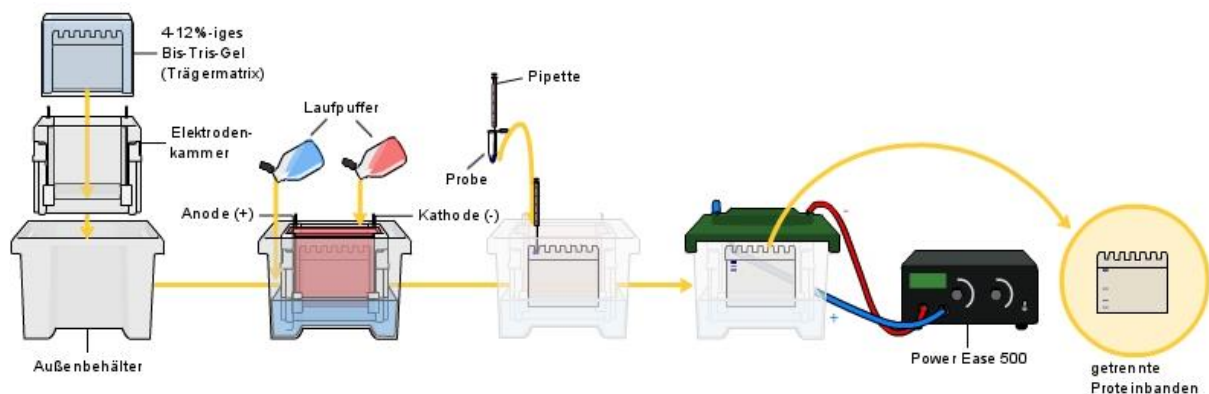
**Abbildung 3.3:** Prinzip des TransAM<sup>®</sup>-Assays [adaptiert nach (216)].

### 3.2.6 Die Untersuchungen mittels Gelelektrophorese, Western Blot und Immundetektion der Proteine

#### 3.2.6.1 Die Durchführung der Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) war es möglich, die einzelnen Komponenten eines Proteingemisches entsprechend dem Molekulargewicht aufzutrennen. Dazu mussten die entsprechenden Proteinkomponenten zunächst unter Zugabe von Laemmli-Puffer für fünf Minuten bei 95°C denaturiert und linearisiert werden. Das anionische Detergens SDS im Laemmli-Puffer lagerte sich dann an die denaturierten Proteinketten an und maskierte deren Eigenladung proportional zum Molekulargewicht negativ (217). Die derart modifizierten Proteine wurden dann in die Geltaschen eines 4-12%-igen Bis-Tris-Gels (Trägermatrix) aufgetragen und nach Anlegen einer Spannung von 180 V und einer Stromstärke von 90 mA für eine Stunde elektrophoretisch in einem mit Laufpuffer gefüllten Kammersystem gemäß dem Molekulargewicht aufgetrennt (siehe

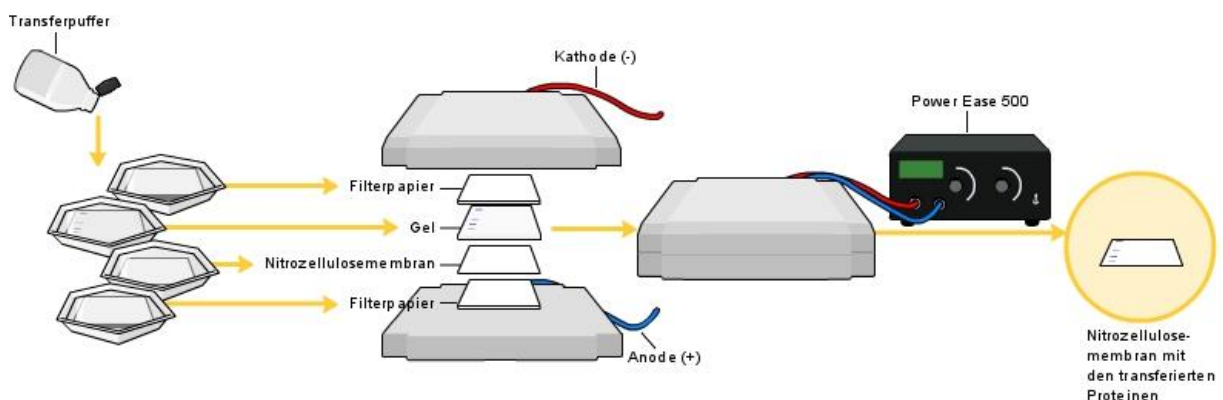
Abb. 3.4.). Als Referenz wurde parallel dazu ein Proteinstandard mit Proteinen bekannten Molekulargewichts mitaufgetrennt.



**Abbildung 3.4:** Prinzip der Gelelektrophorese [adaptiert nach (218)].

### 3.2.6.2 Die Durchführung des Western Blots

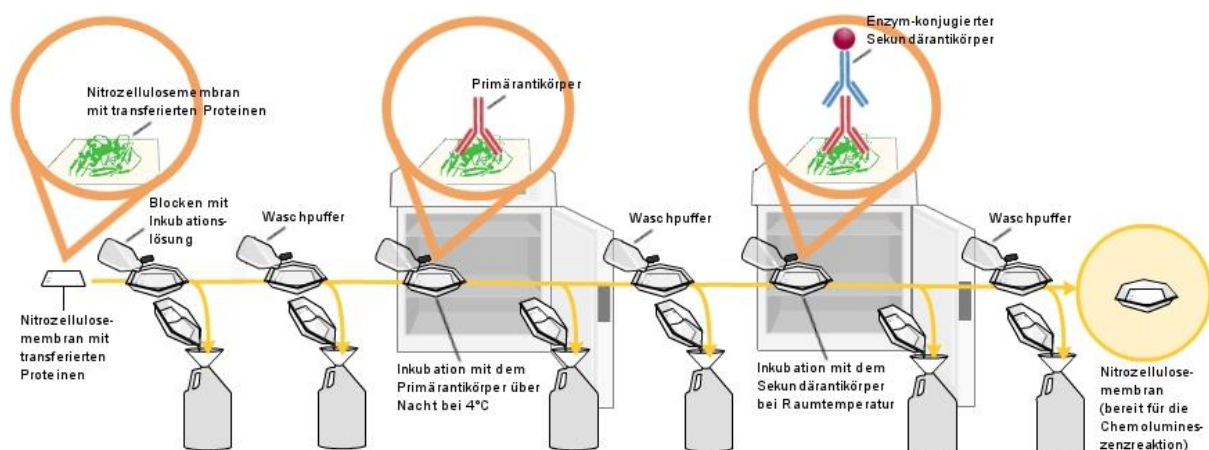
Die in der Trägermatrix elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe des Western Blots auf eine Trägermembran (Nitrozellulosemembran) übertragen, um dort mittels ionischer Wechselwirkungen haften zu bleiben. Dieser Transfer geschah wiederum mittels Elektrophorese, wobei in diesem Falle jedoch ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld mit einer Spannung von 20V und einer Stromstärke von 220 mA in einem mit Laufpuffer gefüllten Kammersystem für 1,5 Stunden angelegt wurde (sogenanntes Tank-Blot-System) (208). Innerhalb dieses Kammersystems wurde dabei eine Sandwich-Anordnung aus zwei mit Transferpuffer getränkten Schwämmen und darauffolgend eine Schicht aus je einer Lage Whatman-Filterpapier, Polyacrylamidgel, Nitrozellulosemembran, Whatman-Filterpapier und zwei weiteren getränkten Schwämmen hergestellt (siehe Abb. 3.5).



**Abbildung 3.5:** Prinzip des Western Blots [adaptiert nach (219)].

### 3.2.6.3 Die Durchführung der Immundetektion von Proteinen

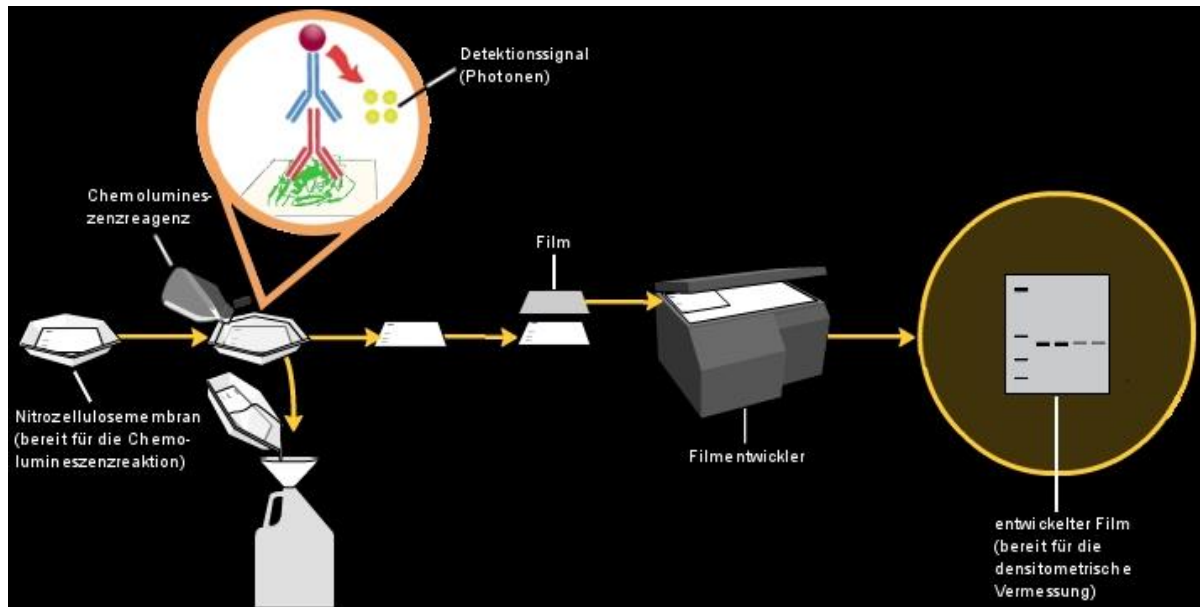
Bei der Immundetektion werden Proteine, die elektrophoretisch getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen wurden, mit Hilfe von spezifischen Antikörpern und einer Chemolumineszenzreaktion selektiv zur Darstellung gebracht. Dazu mussten zunächst unspezifische Bindungsstellen auf der geblotteten Nitrozellulosemembran blockiert werden, indem diese für eine Stunde in 25 ml Inkubationslösung bewegt wird. Anschließend erfolgte ein Waschschrift der geblockten Nitrozellulosemembran. Dabei wurde die Nitrozellulosemembran jeweils drei- bis sechsmal für fünf bis zehn Minuten in jeweils frischem Waschpuffer bewegt. Die geblockte und gewaschene Nitrozellulosemembran wurde dann mit einem spezifischen Primärantikörper, der gemäß den Herstellerangaben in 10 ml Inkubationslösung verdünnt wurde, über Nacht bei 4°C unter sanfter Bewegung inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Nitrozellulosemembran in 10 ml Inkubationslösung und einem darin gemäß den Herstellerangaben verdünnten HRP-konjugiertem Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur bewegt. Der verwendete Sekundärantikörper war dabei gegen den selektiv gebundenen Primärantikörper gerichtet (siehe Abb. 3.6). Dieser Schritt war jedoch nur nötig, falls es sich um einen unkonjugierten Primärantikörper handelte, der noch nicht mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert gewesen ist.



**Abbildung 3.6:** Prinzip der Immundetektion [adaptiert nach (220, 221)].

Anschließend erfolgte eine fünfminütige Inkubation der gewaschenen Nitrozellulosemembran in Luminol-haltiger Entwicklerlösung. Das HRP-Substrat Luminol wurde dabei oxidiert und löste dadurch eine Chemolumineszenzreaktion, welche mit Hilfe eines Röntgenfilms detektiert wurde (siehe Abb. 3.7). Nach Entwicklung des Rönt-

genfilms wurde die Nitrozellulosemembran erneut gewaschen und die gebundenen Antikörper während einer zehnmütigen Inkubation mit Striplösung abgelöst. Nach einem Waschschrift konnte die Membran für eine erneute Immundetektion in Inkubationslösung blockiert werden. Mit Hilfe der Immundetektion war es zudem möglich, die gleichmäßige Proteinladung der einzelnen Probenspuren zu überprüfen. Dafür fand bei den Gesamtzelllysaten ein Primärantikörper gegen  $\beta$ -Actin und bei den Zellkernextrakten ein Primärantikörper gegen TATA-binding protein (TBP) Verwendung.



**Abbildung 3.7:** Prinzip der Chemolumineszenz [adaptiert nach (221, 222)].

#### 3.2.6.4 Die densitometrische Quantifizierung der Immundetektion

Um quantifizierende und statistische Aussagen bezüglich der einzelnen, mittels spezifischer Antikörper detektierten Proteine machen zu können, wurden die Röntgenfilme mit Hilfe des Personal Densitometer SI der Firma Molecular Dynamics mit einer digitalen Auflösung von 16 Bits/Pixel bei einer Pixelgröße von 50 Microns und einer Scan-Auflösung von 200 dots/cm hochauflösend eingescannt. Anschließend wurde mit Hilfe der Software ImageQuant die Intensität der einzelnen Proteinsignale der Röntgenfilme vermessen und auf die Intensität des Signals der Proteinladungskontrolle bezogen.



### 3.2.7 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Sigma Plot 11.0 der Firma Systat Software. Der Student's t-test fand Anwendung bei normalverteilten, homoskedastischen Variablen, der Mann-Whitney rank sum test bei nicht-normalverteilten, heteroskedastischen Variablen. Bei einem p-Wert  $\leq 0,05$  wurden die Unterschiede als statistisch signifikant gewertet.

Die Messwerte wurden in das Verhältnis zum Median der jeweiligen Vergleichsgruppe gesetzt und anschließend in Form von Box-Whisker-Plots als Median mit unterem und oberem Quartil (0,25- und 0,75-Quartil) sowie Minimum und Maximum (kleinster und größter Datenwert) dargestellt. Der Median der Werte aus der Vergleichsgruppe erhielt somit den Wert 1 und der Median der Werte aus der Untersuchungsgruppe stand dazu in entsprechendem Verhältnis (siehe Abb. 3.8).

Kapitel	Vergleichsgruppe	Untersuchungsgruppe
4.1	C57BL/6 Mäuse (gesund; wt) unbehandelt	C57BL/6 Mäuse (gesund; TLR9 <sup>-/-</sup> ) unbehandelt
4.2	C57BL/6 Mäuse (gesund; wt) PBS- oder GpG-behandelt	C57BL/6 Mäuse (gesund; wt) CpG-behandelt
4.3	C57BL/6 Mäuse (gesund; wt) unbehandelt	C57BL/6 Mäuse (DSS-Colitis; wt) unbehandelt
4.4	C57BL/6 Mäuse (DSS-Colitis; wt) PBS- oder GpG-behandelt	C57BL/6 Mäuse (DSS-Colitis; wt) CpG-behandelt
4.5	C57BL/6 Mäuse (gesund; wt) CpG-behandelt	C57BL/6 Mäuse (DSS-Colitis; wt) CpG-behandelt

**Abbildung 3.8:** Übersicht über die Zusammensetzung der Vergleichs- und Untersuchungsgruppen in den Kapiteln 4.1 bis 4.5.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Vergleich von gesunden wt und TLR9<sup>-/-</sup> Versuchstieren

Zunächst wurde untersucht, inwiefern sich der Verlust von TLR9 auf die Signaltransduktion im gesunden Milieu auswirkt. Deshalb wurden unbehandelte wt C57BL/6 Mäuse mit intaktem TLR9 und unbehandelte transgene, TLR9<sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäuse im gesunden Milieu miteinander verglichen.

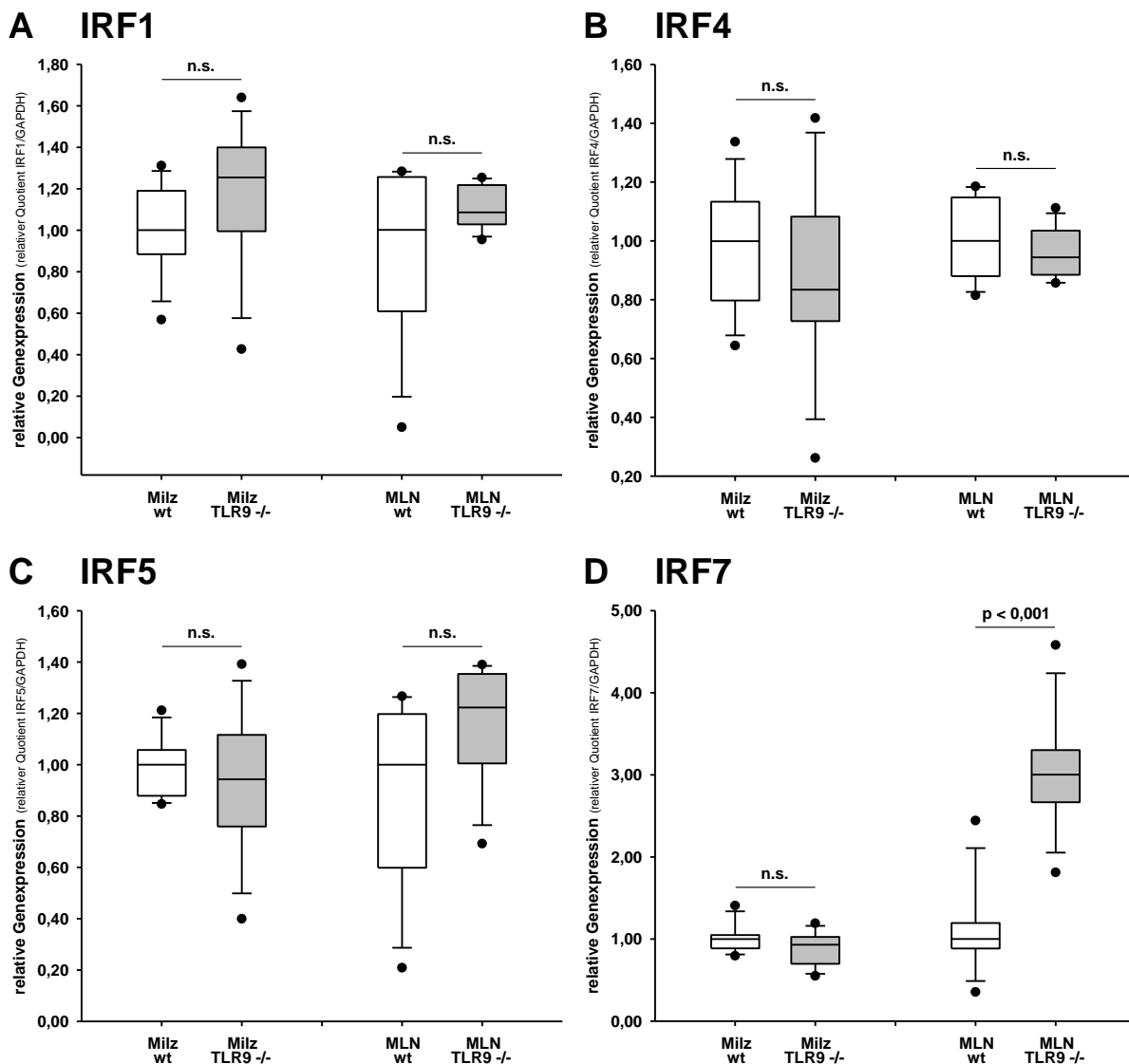
#### 4.1.1 Untersuchung mittels TaqMan<sup>®</sup> Real-Time-PCR

In einem ersten Schritt wurden die Auswirkungen einer fehlenden TLR9-Signaltransduktion auf Ebene der Genexpression mithilfe der qRT-PCR untersucht. Als Untersuchungsmaterial dienten RNA-Lysate von Milz- und MLN-Zellen von je acht wt und TLR9<sup>-/-</sup> Versuchstieren.

##### 4.1.1.1 TLR9-Defizienz und Expression von IRF-Genen im gesunden Milieu

Einzelne Vertreter der IRF-Familie übernehmen vielfältige Funktionen in der TLR9-vermittelten Signalübertragung (siehe Kapitel 1.2.5). Daher war es zunächst Gegenstand der Betrachtung, welche Veränderungen im gesunden Milieu auf Ebene der Genexpression dieser IRFs durch eine TLR9-Defizienz im Tiermodell verursacht werden.

Im Vergleich zwischen wt und TLR9<sup>-/-</sup> Versuchstieren zeigten sich dabei weder in Milz- noch in MLN-Zellen relevante Unterschiede im Expressionsverhalten des IRF1- und IRF4-Gens (Abb. 4.1.1.1 A und B). Auch für das IRF5- und das IRF7-Gen waren in Milzzellen keine nennenswerten Veränderungen auf Ebene der Genexpression beim Vergleich von wt zu TLR9<sup>-/-</sup> Versuchstieren nachweisbar (Abb. 4.1.1.1 C und D). Jedoch führte die TLR9-Defizienz in den MLN-Zellisolaten der transgenen C57BL/6 Mäuse zu einer tendenziell höheren Expression des IRF5-Gens ( $p = 0,112$ ) sowie einer signifikant verstärkten IRF7-Genexpression ( $p < 0,001$ ) jeweils im Vergleich zu den wt C57BL/6 Mäusen (Abb. 4.1.1.1 C und D).



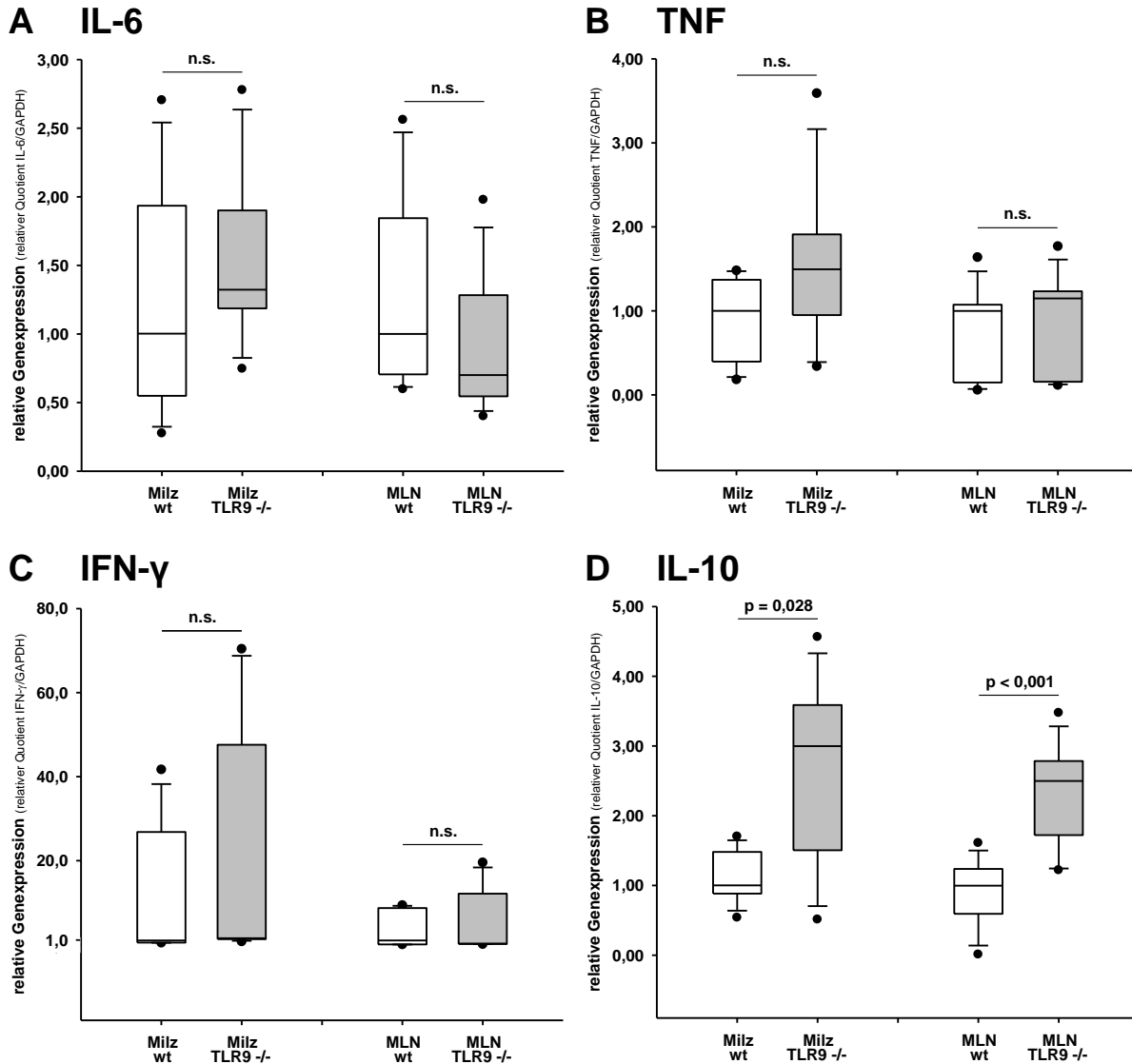
**Abbildung 4.1.1.1:** Die Veränderung der Expression ausgewählter IRF-Gene bei TLR9-Defizienz im gesunden Milieu. RNA-Lysate aus Milz- und MLN-Zellisolaten von wt und TLR9<sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäuse wurden mittels TaqMan<sup>®</sup> Real-Time-PCR hinsichtlich der relativen Expression der Gene für (A) IRF1, (B) IRF4, (C) IRF5 und (D) IRF7 verglichen. Die dargestellten Werte der Zielgene (relative Geneexpression) sind stets auf das jeweilige Referenzgen (GAPDH) bezogen und in Relation zum Median der wt Genexpression im jeweiligen Gewebetyp aufgetragen. n = 8.

#### 4.1.1.2 TLR9-Defizienz und Expression von Genen pro- und anti-inflammatorischer Zytokine im gesunden Milieu

Die TLR9-vermittelten Effekte auf Ebene der pro- und antiinflammatorischen Zytokine sind vielfältig und - je nach zugrunde liegendem Milieu - divergent (siehe Kapitel 1.3.2). Daher bestand auch auf Zytokinebene ein Interesse an der Untersuchung des veränderten Expressionsverhaltens ausgewählter Zytokine bei Fehlen eines intakten TLR9 im gesunden Milieu.

In Milz- und MLN-Zellen von wt und TLR9<sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäusen ließen sich keine nennenswerten Unterschiede im Expressionsmuster des IL-6-, TNF- und IFN- $\gamma$ -Gens

nachweisen (Abb. 4.1.1.2 A - C). Das IL-10-Gen wurde bei TLR9-Defizienz sowohl in Milzzellen ( $p = 0,028$ ) als auch in MLN-Zellen ( $p < 0,001$ ) signifikant stärker exprimiert als in wt Zellen mit intaktem TLR9 (Abb. 4.1.1.2 D).



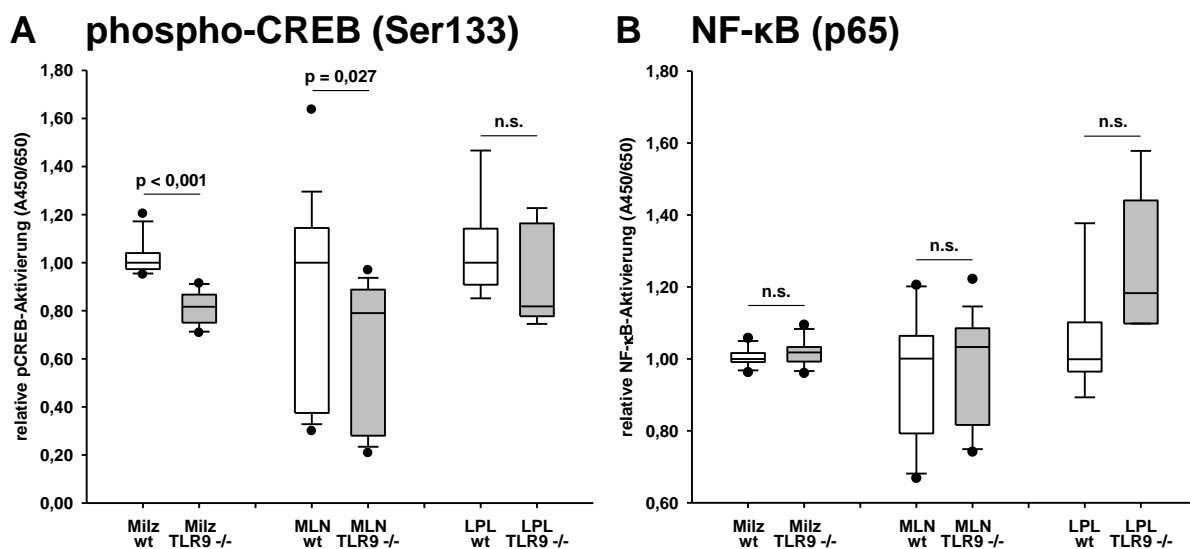
**Abbildung 4.1.1.2:** Die Veränderung der Expression von Genen pro- und antiinflammatorischer Zytokine bei TLR9-Defizienz im gesunden Milieu. RNA-Lysate aus Milz- und MLN-Zellisolaten von wt und TLR9<sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäuse wurden mittels TaqMan® Real-Time-PCR hinsichtlich der relativen Expression der Gene der proinflammatorischen Zytokine (A) IL-6, (B) TNF und (C) IFN- $\gamma$  sowie des antiinflammatorischen Zytokins (D) IL-10 verglichen. Die dargestellten Werte der Zielgene (relative Genexpression) sind stets auf das jeweilige Referenzgen (GAPDH) bezogen und in Relation zum Median der wt Genexpression im jeweiligen Gewebetyp aufgetragen. n = 8.

#### 4.1.2 Untersuchung mittels Transkriptionsfaktor-Aktivierungsassays - CREB- und NF- $\kappa$ B-Aktivität in wt und TLR9<sup>-/-</sup> Versuchstieren im gesunden Milieu

Die Produktion pro- und antiinflammatorischer Zytokine wird durch Transkriptionsfaktoren wie CREB und NF- $\kappa$ B reguliert (siehe Kapitel 1.2.5). In einem zweiten Schritt wurden daher die Auswirkungen der TLR9-Defizienz auf die Aktivität dieser beiden

Transkriptionsfaktoren im gesunden Milieu untersucht. Dazu wurden Zellkernextrakte von Milz-, MLN- sowie LPL-Isolaten von je acht wt und TLR9<sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäusen gewonnen und hinsichtlich ihrer DNA-Bindungsaffinität der Serin-133-phosphorylierten CREB-Form (pCREB) und der NF-κB-Untereinheit RelA/p65 (NF-κB p65) untersucht.

Es zeigte sich, dass bei den TLR9<sup>-/-</sup> Versuchstieren die DNA-Bindung von pCREB sowohl in Milzzellen ( $p < 0,001$ ) als auch in MLN-Zellen ( $p = 0,027$ ) signifikant niedriger war als bei den wt Vergleichstieren. In den LPL-Isolaten hingegen führte die Abwesenheit von TLR9 bei den transgenen Versuchstieren im Vergleich zur wt Kontrolle zu keinen nennenswerten Unterschieden in der pCREB-Aktivierung (Abb. 4.1.2 A). Im Hinblick auf die RelA/p65-DNA-Bindungsaffinität zeigten sich in den Milz-, MLN- und LPL-Isolaten im Vergleich zur wt Kontrolle keine signifikanten Veränderungen bei TLR9-Defizienz der C57BL/6 Mäuse (Abb. 4.1.2 B).



**Abbildung 4.1.2:** Die DNA-Bindungsaffinität von aktiviertem CREB und NF-κB in wt und TLR9<sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäusen im gesunden Milieu. Zellkernextrakte aus Milz-, MLN- und LPL-Isolaten von wt und TLR9<sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäuse wurden mittels TransAM<sup>®</sup>-Assays hinsichtlich der DNA-Bindungsaffinität von (A) pCREB (Ser133) und (B) NF-κB (RelA/p65) untersucht. Alle Messwerte wurden nach Abzug des entsprechenden Leerwertes auf die dazugehörige Positivkontrolle bezogen. Die dargestellten Werte entsprechen der DNA-Bindungsaffinität (relative Aktivierung) und sind stets in Relation zum Median der wt DNA-Bindungsaffinität des jeweiligen Gewebetyps aufgetragen. n = 8.

### 4.1.3 Untersuchung mittels Western Blot

In einem dritten Schritt sollten ausgewählte Signalmoleküle des TLR9-Signalwegs für einen Vergleich zwischen wt und TLR9<sup>-/-</sup> Versuchstieren im gesunden Milieu dargestellt werden. Dazu wurden die jeweiligen Zielproteine in Gesamtzell- und

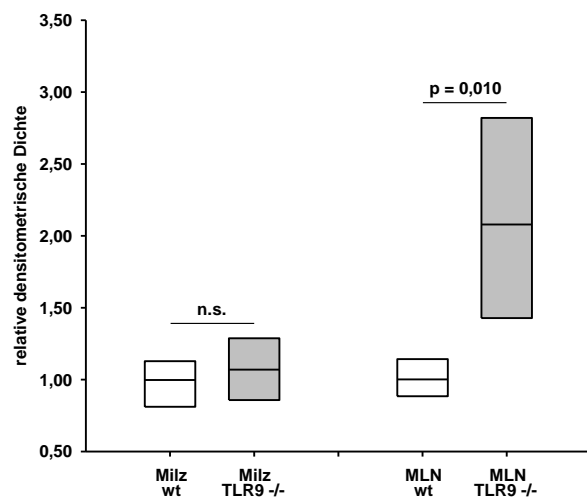
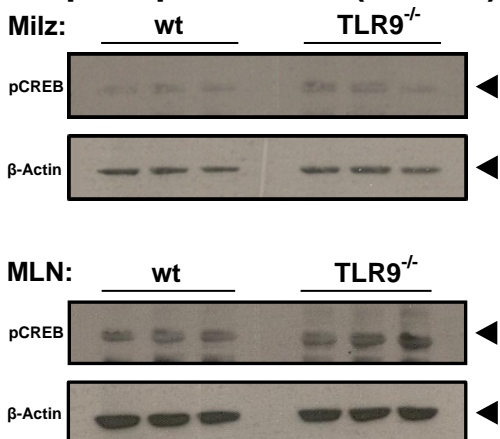
Zellkernextrakten von Milz- und MLN-Isolaten aus je drei wt und TLR9<sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäusen durch Immundetektion mittels spezifischer Antikörper bestimmt.

#### 4.1.3.1 Aktivierung von CREB und NF-κB in Milz- und MLN-Zellen von wt und TLR9<sup>-/-</sup> Versuchstieren im gesunden Milieu

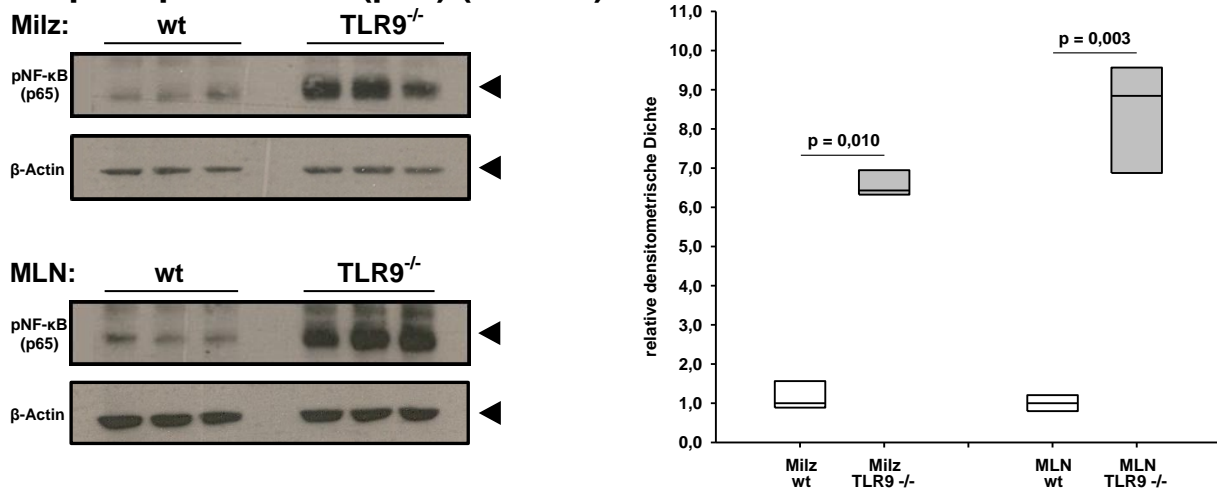
Sowohl CREB als auch RelA/p65 müssen für eine effektive DNA-Bindung im Rahmen ihrer transkriptionsfördernden Funktion in phosphorylierter Form vorliegen (siehe Kapitel 1.3.2). Daher wurde in den Milz- und MLN-Gesamtzelllysaten pCREB und die Serin-536-phosphorylierte Form von RelA/p65 (pNF-κB p65) für den Vergleich von wt und TLR9<sup>-/-</sup> Mäusen im gesunden Milieu detektiert.

Die MLN-Zellen der TLR9<sup>-/-</sup> Versuchstiere zeigten dabei einen signifikant höheren Gehalt an pCREB ( $p = 0,010$ ) als die wt Vergleichstiere. In den Milzzellen war hingegen kein pCREB-Unterschied im Vergleich von wt zu TLR9<sup>-/-</sup> Tieren sichtbar (Abb. 4.1.3.1 A). Das Fehlen eines intakten TLR9 bei den transgenen Versuchstieren war jedoch mit einem signifikant erhöhten Gehalt an pNF-κB (p65) sowohl in den Milzzellen ( $p = 0,010$ ) als auch in den MLN-Lysaten ( $p = 0,003$ ) verbunden (Abb. 4.1.3.1 B).

#### A phospho-CREB (Ser133)



## B phospho-NF- $\kappa$ B (p65) (Ser536)



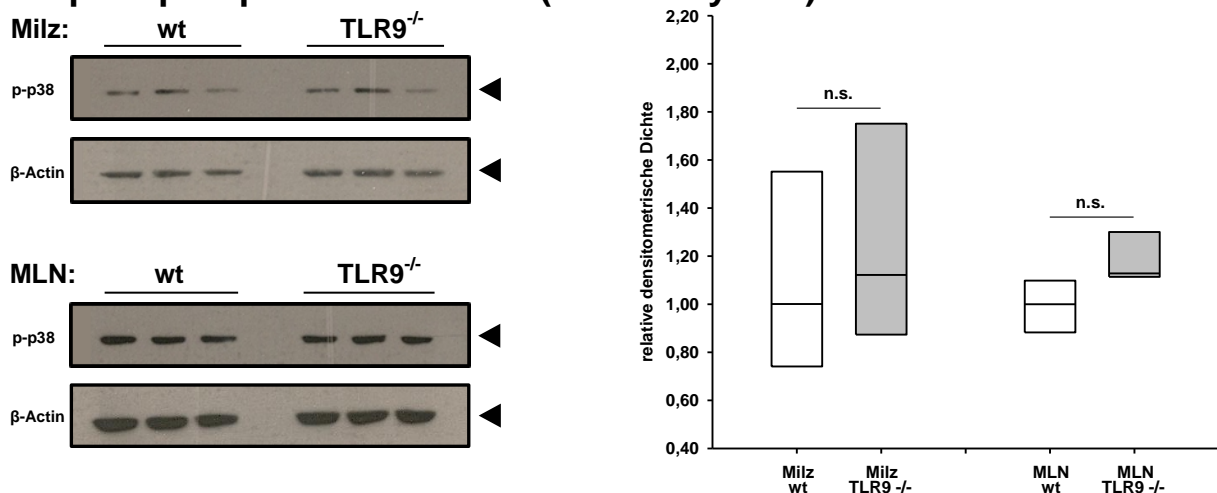
**Abbildung 4.1.3.1:** Die Aktivierung von CREB und NF- $\kappa$ B in Gesamtzelllysaten von wt und TLR9<sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäusen im gesunden Milieu. Die einzelnen Proteinkomponenten der Gesamtzelllysate aus Milz- und MLN-Isolaten von wt und TLR9<sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäusen wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot der Immundetektion zugänglich gemacht. Die Immundetektion von (A) pCREB (Ser133) und (B) pNF- $\kappa$ B (RelA/p65) (Ser536) erfolgte mit spezifischen Antikörpern und einer Chemolumineszenzreaktion. Alle erhaltenen Lumineszenzsignale wurden densitometrisch quantifiziert und auf die jeweilige Ladungskontrolle ( $\beta$ -Actin) bezogen. Die dargestellten Werte (relative densitometrische Dichte) stellen ein Maß für die in der Zelle enthaltene Menge des zu untersuchenden Proteins dar und sind stets in Relation zum Median der wt densitometrischen Dichte des jeweiligen Gewebetyps aufgetragen. n = 3.

### 4.1.3.2 Aktivierung von Proteinkinasen in Milz- und MLN-Zellen von wt und TLR9<sup>-/-</sup> Versuchstieren im gesunden Milieu

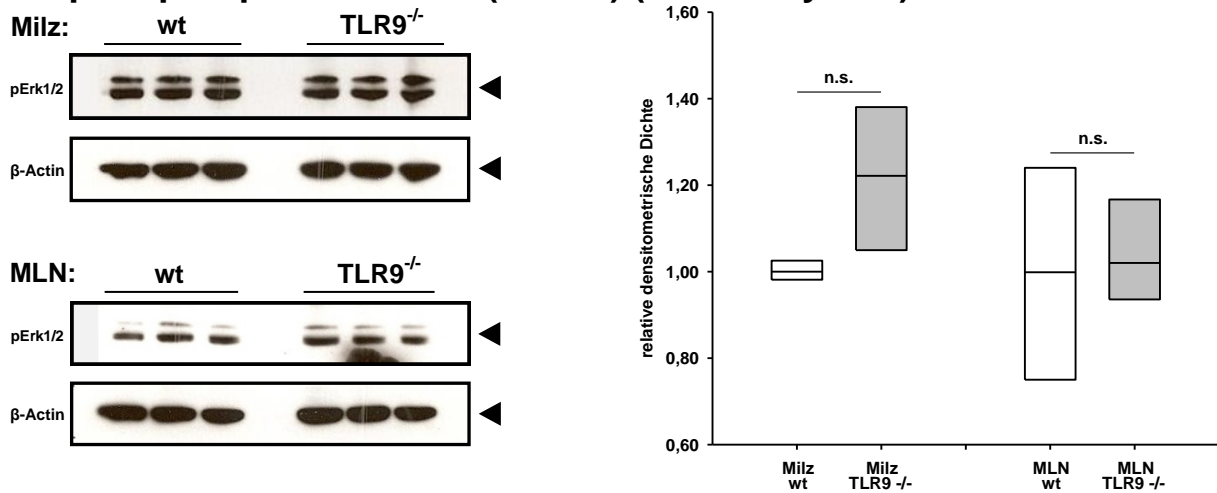
Die aktivierende Phosphorylierung von ERK1/2, p38 sowie Akt stellen mechanistisch relativ frühe Ereignisse im TLR9-Signalweg dar, welche zu den späteren Ereignissen der CREB- und NF- $\kappa$ B-Aktivierung führen (siehe Kapitel 1.2.5). Entsprechend wurden für den Vergleich von wt und TLR9<sup>-/-</sup> Mäusen im gesunden Milieu die phosphorylierte Form von ERK1/2, p38 und Akt in Milz- und MLN-Gesamtzelllysaten ermittelt.

Dabei zeigte der Vergleich von wt und TLR9<sup>-/-</sup> Tieren für p-p38, pAkt und pERK1/2 in Milz- und MLN-Zellen keine Unterschiede im Zellgehalt (Abb. 4.1.3.2 A - C).

## A phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182)



## B phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)



## C phospho-Akt (Ser473)

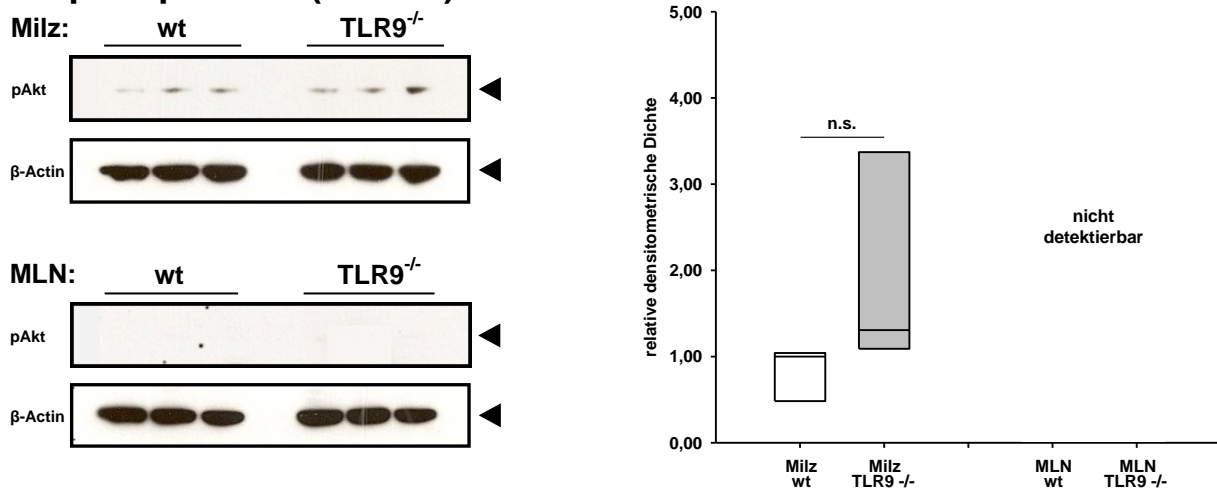


Abbildung 4.1.3.2: Die Aktivierung von p38, Erk1/2 und Akt in Gesamtzelllysaten von wt und TLR9<sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäusen im gesunden Milieu. Die einzelnen Proteinkomponenten der Gesamtzelllysate aus Milz- und MLN-Isolaten von wt und TLR9<sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäusen wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot der Immundetektion zugänglich gemacht. Die Immundetektion von (A) p-p38 MAPK (Thr180/Tyr182), (B) pErk1/2 (Thr202/Tyr204) und (C) pAkt (Ser473) erfolgte mit spezifischen Antikörpern und einer Chemolumineszenzreaktion. Alle erhaltenen Lumineszenzsignale wurden densitometrisch quantifiziert und auf die jeweilige Ladungskontrolle (β-Actin) bezogen. Die dargestellten Werte (relative densitometrische Dichte) stellen ein Maß für die in der Zelle enthaltene Menge des zu untersuchenden Proteins dar und sind stets in Relation zum Median der wt densitometrischen Dichte des jeweiligen Gewebetyps aufgetragen. n = 3.

### 4.1.3.3 Aktivierung von CREB und NF-κB in Milz- und MLN-Zellkernen von wt und TLR9<sup>-/-</sup> Versuchstieren im gesunden Milieu

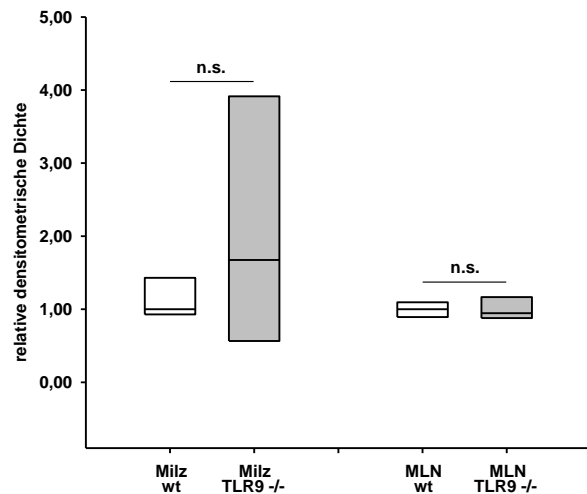
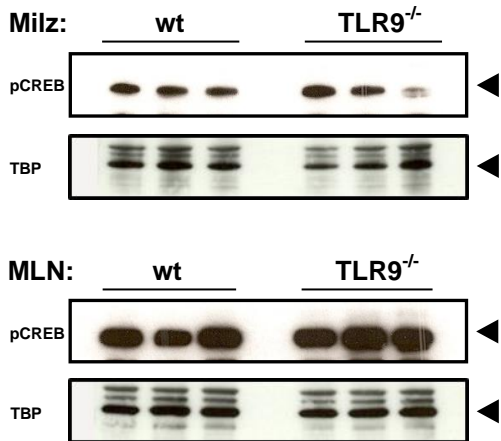
Die DNA-Bindung und Promotion der Zielgentranskription findet sowohl für pCREB als auch für pNF-κB (p65) im Zellkern statt (siehe Kapitel 1.3.2). Daher wurden für die einzelnen Milz- und MLN-Gewebeproben Zellkernextrakte hergestellt und auf die vorhandene Menge an pNF-κB (p65) und pCREB untersucht.

Im Gegensatz zu den Gesamtzelllysaten fanden sich hinsichtlich der Menge von pCREB jedoch weder in den Zellkernen der Milzzellen noch in denen der MLN-

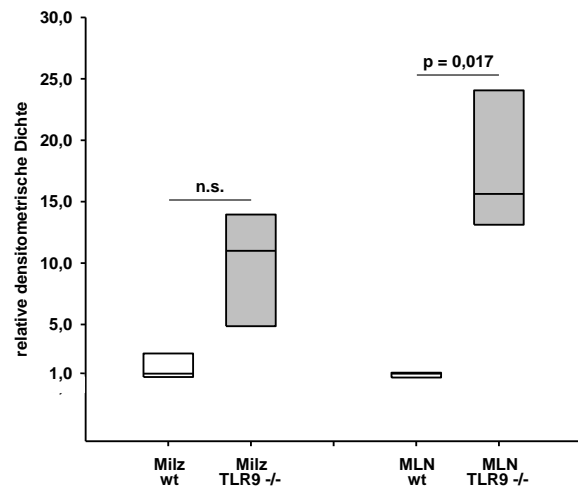
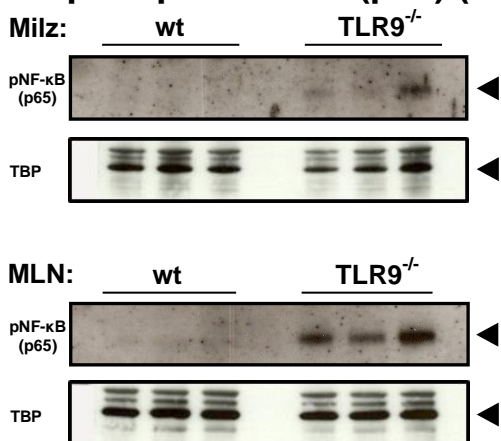


Isolate relevante Unterschiede zwischen gesunden wt und TLR9<sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäusen (Abb. 4.1.3.3 A). Für pNF-κB (p65) zeigten sich aber in den MLN-Zellkernextrakten den MLN-Gesamtzelllysaten vergleichbare Ergebnisse: ein Fehlen eines intakten TLR9 bei den transgenen Tieren erhöhte die vorhandene Menge an pNF-κB (p65) in MLN-Zellen signifikant ( $p = 0,017$ ) im Vergleich zu den wt Kontrollen. In den Zellkernen der Milzzellen zeigten sich hingegen zwischen gesunden wt und TLR9<sup>-/-</sup> Tieren keine signifikanten Unterschiede im pNF-κB-Gehalt (Abb. 4.1.3.3 B).

### A phospho-CREB (Ser133)



### B phospho-NF-κB (p65) (Ser536)



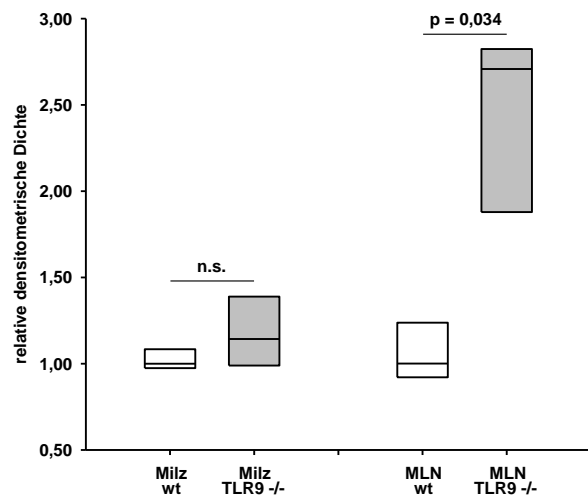
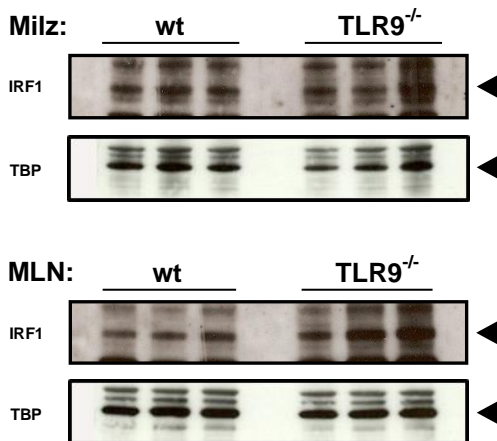
**Abbildung 4.1.3.3: Der Nachweis von pCREB und pNF-κB in Zellkernextrakten von wt und TLR9<sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäusen im gesunden Milieu.** Die einzelnen Proteinkomponenten der Zellkernextrakte aus Milz- und MLN-Isolaten von wt und TLR9<sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäusen wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot der Immundetektion zugänglich gemacht. Die Immundetektion von (A) pCREB (Ser133) und (B) pNF-κB (RelA/p65) (Ser536) erfolgte mit spezifischen Antikörpern und einer Chemolumineszenzreaktion. Alle erhaltenen Lumineszenzsignale wurden densitometrisch quantifiziert und auf die jeweilige Ladungskontrolle (TBP) bezogen. Die dargestellten Werte (relative densitometrische Dichte) stellen ein Maß für die im Zellkern enthaltene Menge des zu untersuchenden Proteins dar und sind stets in Relation zum Median der wt densitometrischen Dichte des jeweiligen Gewebetyps aufgetragen. n = 3.

#### 4.1.3.4 IRFs in Milz- und MLN-Zellkernen von wt und TLR9<sup>-/-</sup> Versuchstieren im gesunden Milieu

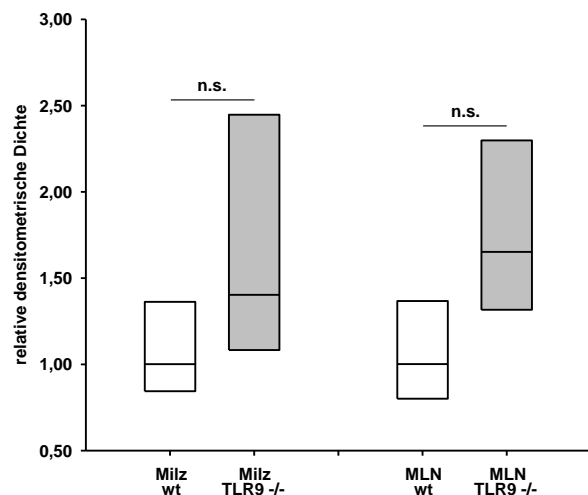
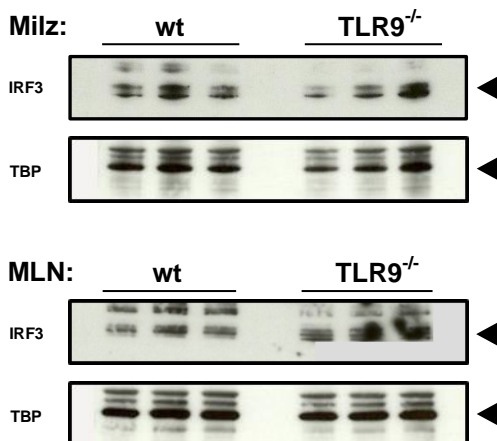
Auch die Vertreter der IRF-Genfamilie entfalten ihre transkriptionsfördernde Wirkung im Zellkern. Dementsprechend wurde der Milz- und MLN-Zellkerngehalt ausgewählter IRFs mittels Immundetektion bestimmt.

In den MLN-Zellkernen von TLR9<sup>-/-</sup> Mäusen war signifikant mehr IRF1 ( $p = 0,034$ ) nachweisbar als in wt Vergleichsproben. In Milzzellproben ließen sich hingegen zwischen wt und TLR9<sup>-/-</sup> Tieren keine nennenswerten Unterschiede in der IRF1-Zellkernmenge nachweisen (Abb. 4.1.3.4 A). Auch bei IRF3, -4, -5 und -7 zeigten sich bei TLR9<sup>-/-</sup> und wt Versuchstieren sowohl in Milz- als auch in MLN-Zellen keine relevanten Unterschiede hinsichtlich der detektierbaren Kernmenge (Abb. 4.1.3.4 B - E).

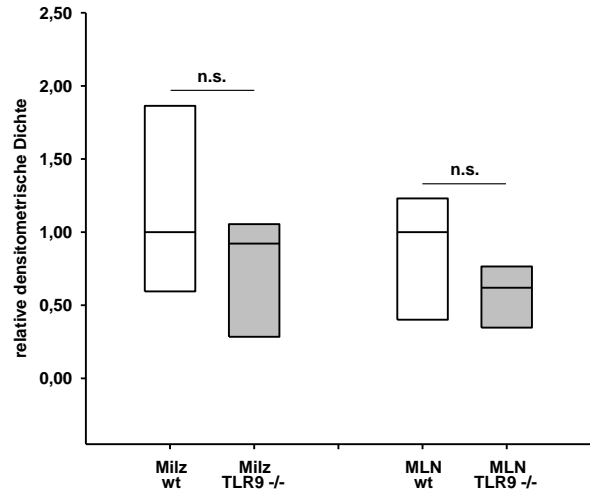
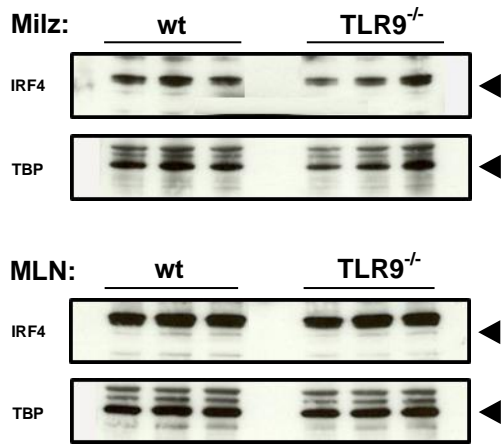
##### A IRF1



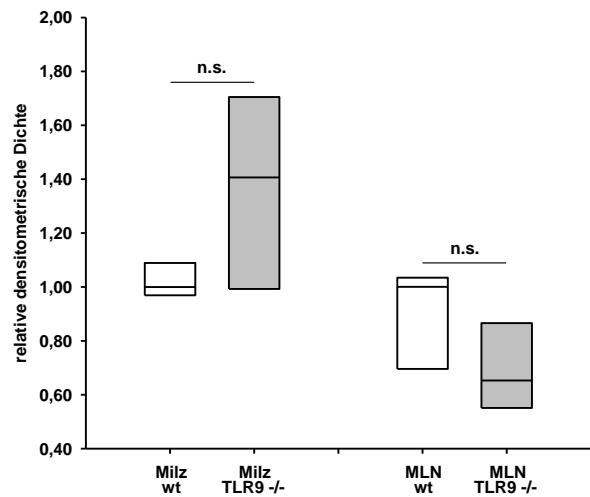
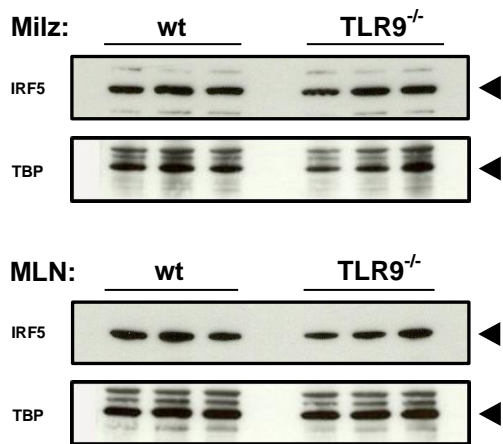
##### B IRF3



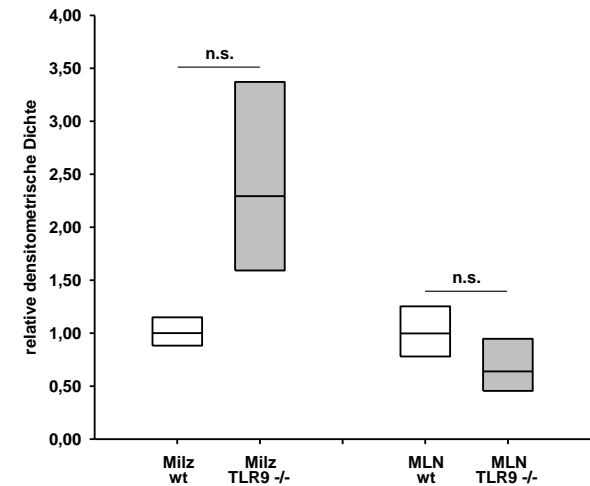
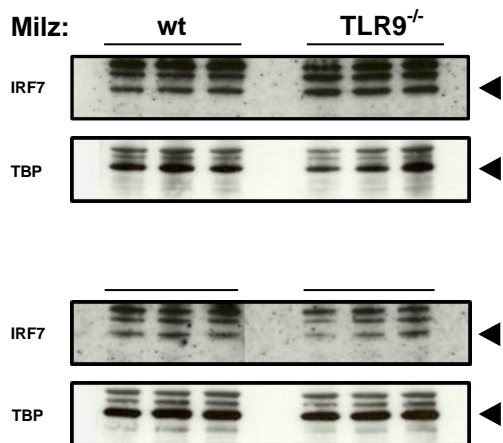
**C IRF4**



**D IRF5**



**E IRF7**



**Abbildung 4.1.3.4: Der Nachweis von IRF1, -3, -4, -5 und -7 in Zellkernextrakten von wt und TLR9<sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäusen im gesunden Milieu.** Die einzelnen Proteinkomponenten der Zellkernextrakte aus Milz- und MLN-Isolaten von wt und TLR9<sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäusen wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot der Immundetektion zugänglich gemacht. Die Immundetektion von (A) IRF1, (B) IRF3, (C) IRF4, (D) IRF5 und (E) IRF7 erfolgte mit spezifischen Antikörpern und einer Chemolumineszenzreaktion. Alle erhaltenen Lumineszenzsignale wurden densitometrisch quantifiziert und auf die jeweilige Ladungskontrolle (TBP) bezogen. Die dargestellten Werte (relative densitometrische Dichte) stellen ein Maß für die im Zellkern enthaltene Menge des zu untersuchenden Proteins dar und sind stets in Relation zum Median der wt densitometrischen Dichte des jeweiligen Gewebetyps aufgetragen. n = 3.

## **4.2 Stimulation des TLR9 in gesunden wt Versuchstieren**

Die Effekte einer CpG-vermittelten TLR9-Aktivierung auf die intestinale Immunbalance scheinen dichotom und Milieu-abhängig zu sein. Im gesunden Milieu steht dabei eine antiinflammatorische Wirkung auf das intestinale Immunsystem im Vordergrund (siehe Kapitel 1.3.2).

Der folgende Teil befasst sich mit den Auswirkungen einer CpG-vermittelten TLR9-Stimulation auf das intestinale Immunsystem von gesunden wt C57BL/6 Mäusen. Dazu wurde eine Testgruppe mit PBS-gelösten CpG-Motiven behandelt. Eine erste Kontrollgruppe erhielt reines PBS und eine zweite Kontrollgruppe PBS-gelöste GpG-Motive verabreicht, um einen unspezifischen Effekt des PBS oder des Oligonukleotidrückgrates ausschließen zu können. Anschließend erfolgte ein Vergleich der Test- mit den beiden Kontrollgruppen.

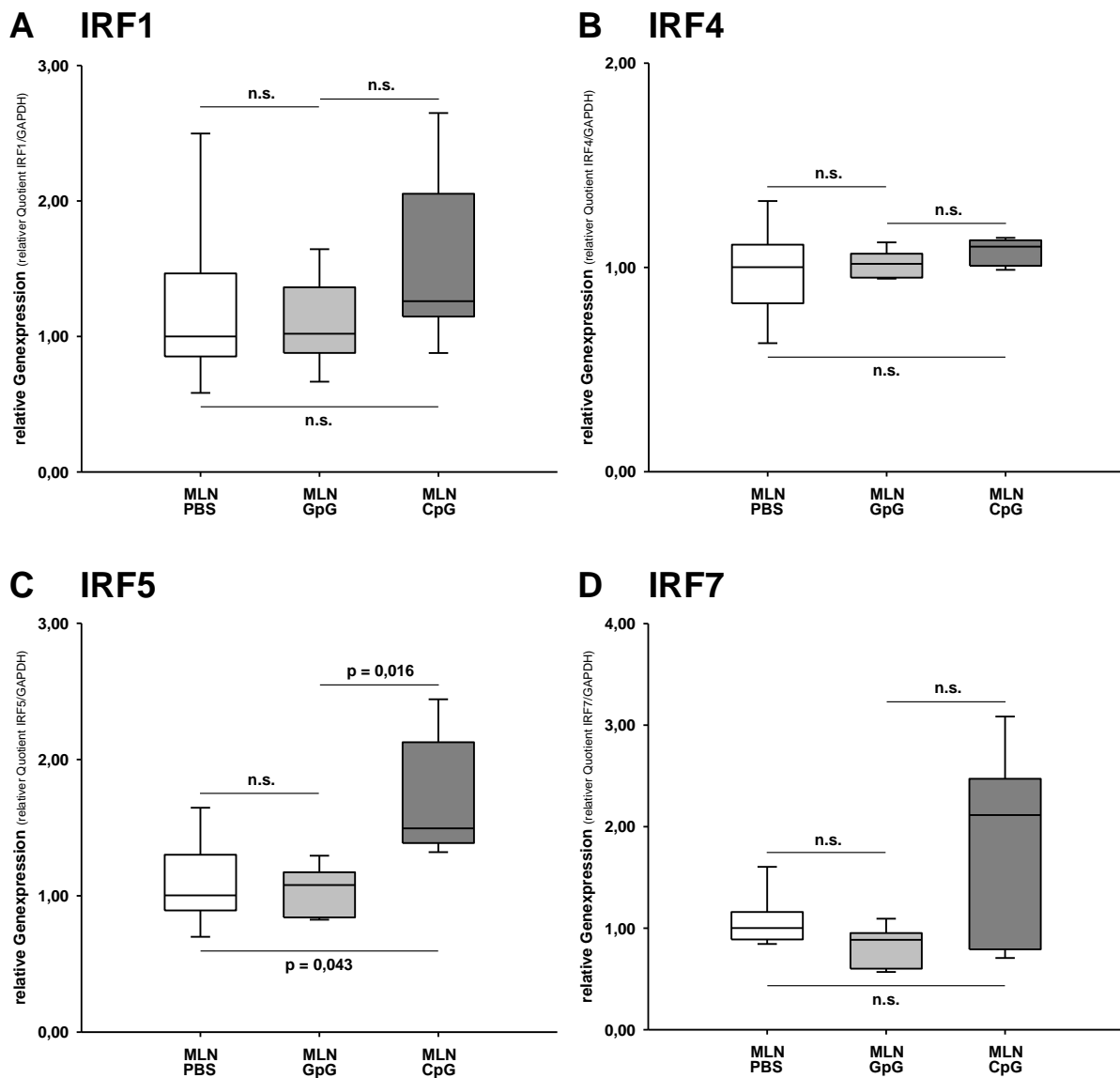
### **4.2.1 Untersuchung mittels TaqMan<sup>®</sup> Real-Time-PCR**

Zunächst wurden die Auswirkungen einer CpG-vermittelten TLR9-Stimulation im gesunden Milieu auf Ebene der Genexpression analysiert. Dazu wurden RNA-Lysate isolierter MLN-Zellen von je fünf gesunden wt Mäusen der beiden Kontroll- sowie der Testgruppe mithilfe der qRT-PCR untersucht.

#### **4.2.1.1 CpG-vermittelte TLR9-Stimulation und Expression von IRF-Genen im gesunden Milieu**

In einem ersten Schritt wurden die Auswirkungen einer TLR9-Stimulation auf die Expression der Gene von IRF1, -4, -5 und -7 im gesunden Milieu analysiert.

Für das IRF1-, IRF4- und IRF7-Gen zeigten sich in den MLN-Isolaten keine signifikanten Expressionsveränderungen zwischen CpG-, GpG- oder PBS-behandelten Mäusen (Abb. 4.2.1.1 A, B und D). Eine CpG-Behandlung führte in den Versuchstieren jedoch zu einer signifikant verstärkten Expression des IRF5-Gens verglichen mit den PBS- ( $p = 0,043$ ) beziehungsweise GpG-behandelten Tieren ( $p = 0,016$ ) (Abb. 4.2.1.1 C).

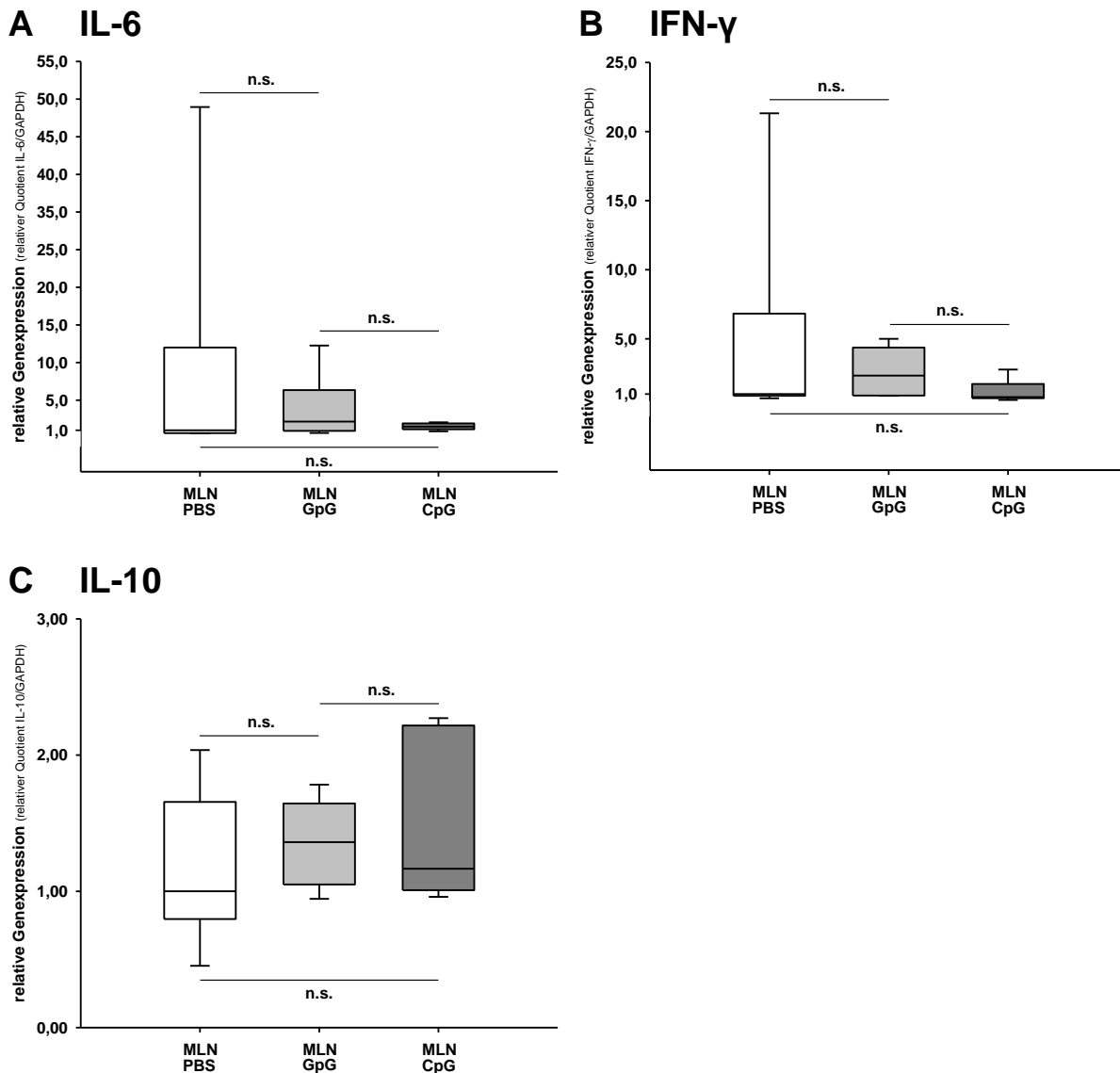


**Abbildung 4.2.1.1: Die Expression ausgewählter IRF-Gene nach TLR9-Stimulation im gesunden Milieu.** RNA-Lysate aus MLN-Zellisolaten von gesunden wt C57BL/6 Mäusen, die mit PBS, GpG-ODN oder CpG-ODN behandelt worden waren, wurden mittels TaqMan<sup>®</sup> Real-Time-PCR hinsichtlich der relativen Expression der Gene für (A) IRF1, (B) IRF4, (C) IRF5 und (D) IRF7 verglichen. Die dargestellten Werte der Zielgene (relative Genexpression) sind stets auf das jeweilige Referenzgen (GAPDH) bezogen und in Relation zum Median der Genexpression in den PBS-behandelten Versuchstieren aufgetragen. n = 5.

#### 4.2.1.2 CpG-vermittelte TLR9-Stimulation und Expression von Genen pro- und antiinflammatorischer Zytokine im gesunden Milieu

In einem zweiten Schritt sollten die Auswirkungen einer TLR9-Stimulation auf die Expression von ausgewählten Genen pro- und antiinflammatorischer Zytokine im gesunden Milieu untersucht werden.

Für das IL-6-, das IFN- $\gamma$ - und das IL-10-Gen zeigten sich in den MLN-Zellen keine nennenswerten Expressionsunterschiede beim Vergleich CpG-, GpG- und PBS-behandelter Versuchstiere (Abb. 4.2.1.2 A - C).

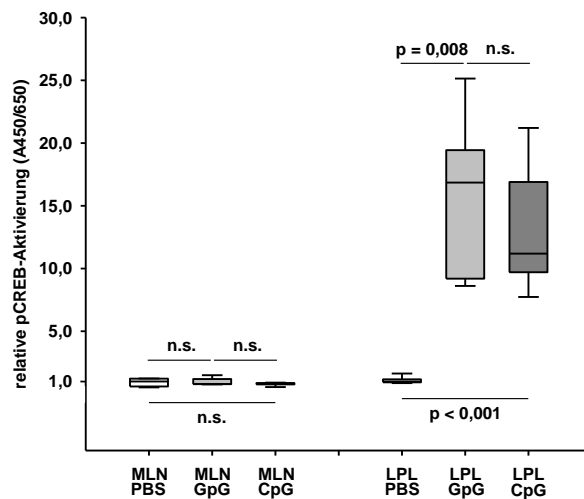
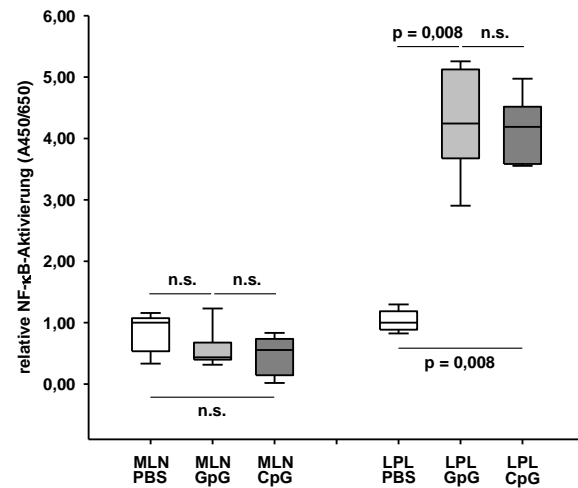
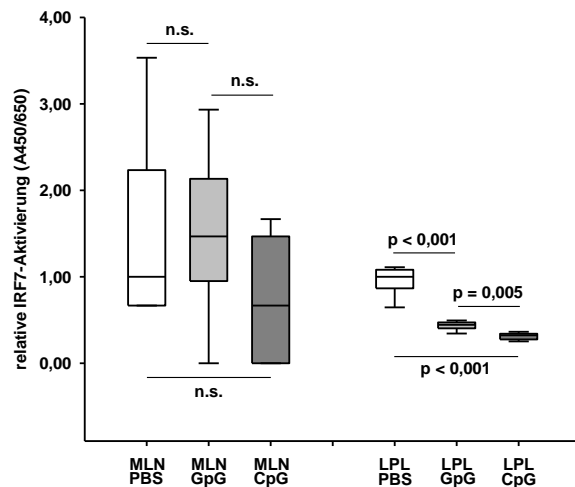
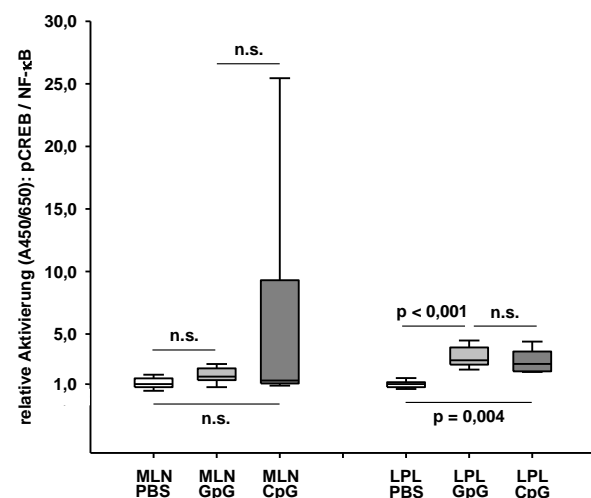


**Abbildung 4.2.1.2: Die Expression von Genen pro- und antiinflammatorischer Zytokine nach TLR9-Stimulation im gesunden Milieu.** RNA-Lysate aus MLN-Zellisolaten von gesunden wt C57BL/6 Mäusen, die mit PBS, GpG-ODN oder CpG-ODN behandelt worden waren, wurden mittels TaqMan® Real-Time-PCR hinsichtlich der relativen Expression der Gene der proinflammatorischen Zytokine (A) IL-6 und (B) IFN- $\gamma$  sowie des antiinflammatorischen Zytokins (C) IL-10 verglichen. Die dargestellten Werte der Zielgene (relative Genexpression) sind stets auf das jeweilige Referenzgen (GAPDH) bezogen und in Relation zum Median der Genexpression in den PBS-behandelten Versuchstieren aufgetragen.  $n = 5$ .

#### 4.2.2 Untersuchung mittels Transkriptionsfaktor-Aktivierungsassays - CREB-, NF- $\kappa$ B- und IRF7-Aktivität bei CpG-vermittelter TLR9-Stimulation im gesunden Milieu

Um die Auswirkungen einer CpG-vermittelten TLR9-Stimulation auf die Transaktivierung der drei Transkriptionsfaktoren pCREB, NF- $\kappa$ B (p65) und IRF7 im gesunden Milieu zu untersuchen, wurden MLN- und LPL-Zellkernextrakte der CpG-behandelten Testgruppe sowie der beiden Kontrollgruppen hinsichtlich ihrer DNA-Bindungsaffinität analysiert. Pro Gruppe wurden dabei fünf gesunde wt C57BL/6 Mäuse analysiert.

Dabei fand sich in den MLN-Zellen PBS-, GpG- und CpG-behandelter Versuchstiere keine relevanten Unterschiede in der pCREB-DNA-Bindungsaffinität (Abb. 4.2.2 A). In den LPL-Isolaten hingegen resultierte die CpG-vermittelte TLR9-Aktivierung in einer signifikant verstärkten ( $p < 0,001$ ) DNA-Bindungsaffinität von pCREB gegenüber den PBS-behandelten Kontrollen. Jedoch zeigten auch die GpG-behandelten Kontrollen gegenüber den PBS-behandelten Kontrollen eine signifikant verstärkte ( $p = 0,008$ ) DNA-Bindung von pCREB. Ein relevanter Unterschied zwischen CpG- und GpG-behandelten Tieren war deshalb nicht sichtbar (Abb. 4.2.2 A). Die DNA-Bindungsaffinität von RelA/p65 wiederum zeigte in den MLN-Zellen CpG-stimulierter Testtiere und PBS- oder GpG-stimulierter Kontrolltiere keine nennenswerte Unterschiede (Abb. 4.2.2 B). In den LPL-Isolaten hingegen zeigte sich im Vergleich zur PBS-Kontrolle eine signifikant verstärkte ( $p = 0,008$ ) RelA/p65-DNA-Bindung bei CpG-getragener TLR9-Stimulation. Auch hier zeigte die GpG-Kontrolle eine signifikant stärkere ( $p = 0,008$ ) RelA/p65-DNA-Bindung als die PBS-Kontrolle. Ein relevanter Unterschied zwischen GpG- und CpG-Behandlung konnte in LPL-Isolaten daher nicht festgestellt werden (Abb. 4.2.2 B). Das Verhältnis der pCREB-DNA-Bindungsaffinität zur RelA/p65-DNA-Bindungsaffinität unter PBS-, GpG- und CpG-Behandlung unterschied sich in den Zellkernextrakten der MLN-Zellen nicht signifikant voneinander (Abb. 4.2.2 D). In den LPL-Isolaten war die pCREB/NF- $\kappa$ B-Transaktivierungsrate unter CpG-Behandlung jedoch signifikant ( $p = 0,004$ ) höher als unter PBS-Kontrollbehandlung. Ein relevanter Unterschied zwischen CpG- und GpG-Behandlung zeigte sich hierbei jedoch nicht (Abb. 4.2.2 D). Die CpG-vermittelte TLR9-Aktivierung führte in MLN-Zellen im Vergleich zu den Kontrollgruppen zu keinen Auswirkungen auf die DNA-Bindung von IRF7 ( $p = 0,256$  gegenüber der PBS-respektive  $p = 0,231$  gegenüber der GpG-Kontrolle) (Abb. 4.2.2 C). In den LPL-Isolaten hingegen führte die CpG-Stimulation sowohl gegenüber der PBS- ( $p < 0,001$ ) als auch der GpG-Kontrolle ( $p = 0,005$ ) zu einer signifikant abgeschwächten IRF7-DNA-Bindung. Unterschiede bestanden jedoch auch innerhalb der beiden LPL-Kontrollen: die GpG-Kontrollgruppe ging dabei mit einer signifikant schwächeren ( $p < 0,001$ ) IRF7-DNA-Bindung einher als die PBS-Kontrollgruppe (Abb. 4.2.2 C).

**A phospho-CREB (Ser133)****B NF-κB (p65)****C IRF7****D pCREB/NF-κB-Ratio**

**Abbildung 4.2.2: Die DNA-Bindungsaffinität von aktiviertem CREB, NF-κB und IRF7 nach TLR9-Stimulation im gesunden Milieu.** Zellkernextrakte aus MLN- und LPL-Isolaten von gesunden, wt C57BL/6 Mäusen, die mit PBS, GpG-ODN oder CpG-ODN behandelt worden waren, wurden mittels TransAM<sup>®</sup>-Assays hinsichtlich der DNA-Bindungsaffinität von (A) pCREB (Ser133), (B) NF-κB (RelA/p65) und (C) IRF7 untersucht. Alle Messwerte wurden nach Abzug des entsprechenden Leerwertes auf die dazugehörige Positivkontrolle bezogen. Die dargestellten Werte entsprechen der DNA-Bindungsaffinität (relative Aktivierung) und sind stets in Relation zum Median der DNA-Bindungsaffinität im jeweiligen Gewebetyp der PBS-behandelten Versuchstiere aufgetragen. Die relative Aktivierung von pCREB und NF-κB (RelA/p65) wurde anschließend in das entsprechende Verhältnis zueinander gesetzt und auf den Median der pCREB/NF-κB-Ratio der PBS-behandelten Versuchstiere bezogen (D). n = 5.

**4.2.3 Untersuchung mittels Western Blot**

In einem weiteren Schritt wurden ausgewählte Signalmoleküle des TLR9-Signalwegs auf ihr mengenmäßiges Vorkommen in der Zelle untersucht. Dazu wurden die entsprechenden Zielproteine in MLN-Gesamtzelllysaten von CpG-behandelten Versuchstieren und von PBS- respektive GpG-behandelten Kontrolltieren durch Immundetektion mittels spezifischer Antikörper dargestellt. Jede Versuchstiergruppe bestand dabei aus fünf gesunden wt C57BL/6 Mäusen.

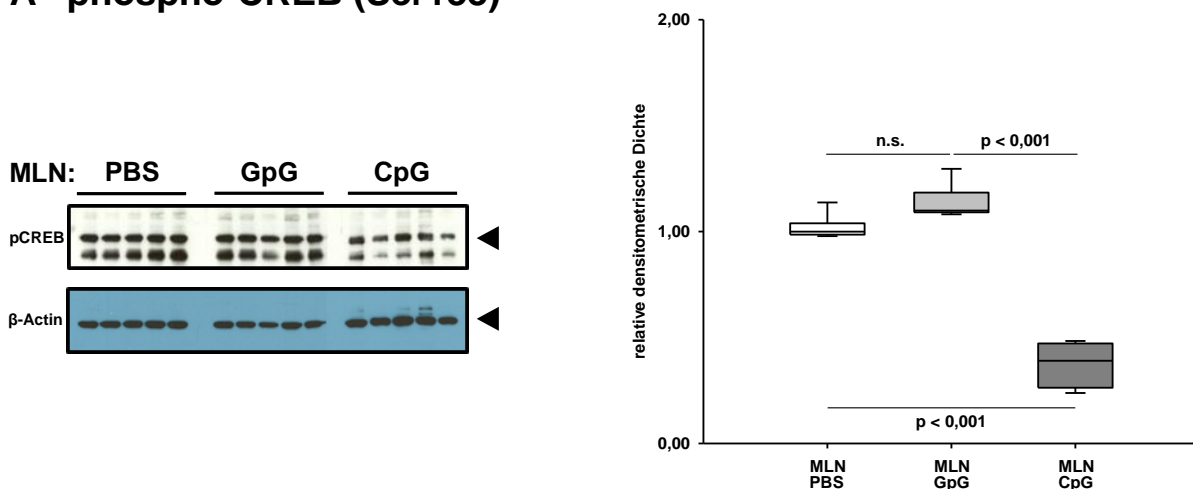


#### 4.2.3.1 Aktivierung von Transkriptionsfaktoren in MLN-Zellen bei CpG-vermittelter TLR9-Stimulation im gesunden Milieu

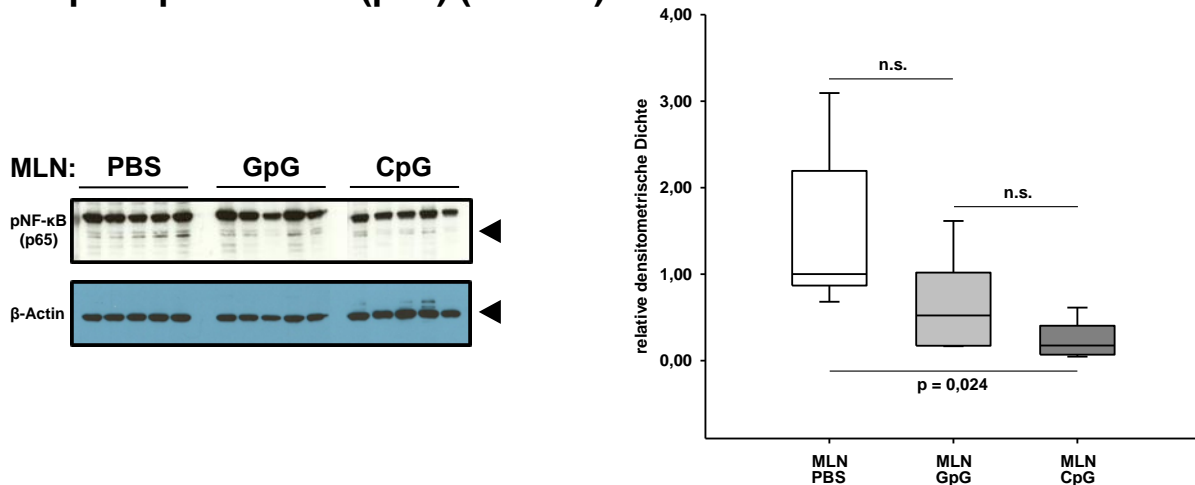
Die Auswirkungen einer CpG-vermittelten TLR9-Stimulation auf die Aktivierung der drei Transkriptionsfaktoren CREB, NF- $\kappa$ B (p65) und IRF7 im gesunden Milieu wurden zunächst sichtbar gemacht, indem der Zellgehalt an phosphoryliertem CREB und RelA/p65 sowie der Zellgehalt an IRF7 im Immunoblot analysiert wurde.

Dabei zeigten die MLN-Zellen der CpG-behandelten Versuchstiere einen signifikant verringerten pCREB-Gehalt verglichen mit den beiden Kontrollen (jeweils  $p < 0,001$ ) (Abb. 4.2.3.1 A). Auch der Gehalt an pNF- $\kappa$ B (p65) sank bei CpG-vermittelter TLR9-Aktivierung im gesunden Milieu verglichen mit der PBS-Kontrolle signifikant ( $p = 0,024$ ). Relevante Unterschiede im pNF- $\kappa$ B-Zellgehalt zwischen CpG-behandelten Testtieren und GpG-behandelten Kontrolltieren zeigten sich genauso wenig wie entsprechende Unterschiede zwischen den PBS- und GpG-behandelten Kontrolltieren (Abb. 4.2.3.1 B). Für IRF7 war aufgrund von Artefakten eine Detektion in der PBS- und GpG-Kontrollgruppe nicht möglich, sodass keine Aussagen über mögliche Unterschiede zwischen der CpG-Testbehandlung und der PBS- respektive GpG-Kontrollbehandlung beziehungsweise über mögliche Unterschiede innerhalb der beiden Kontrollgruppen getroffen werden können (Abb. 4.2.3.1 C).

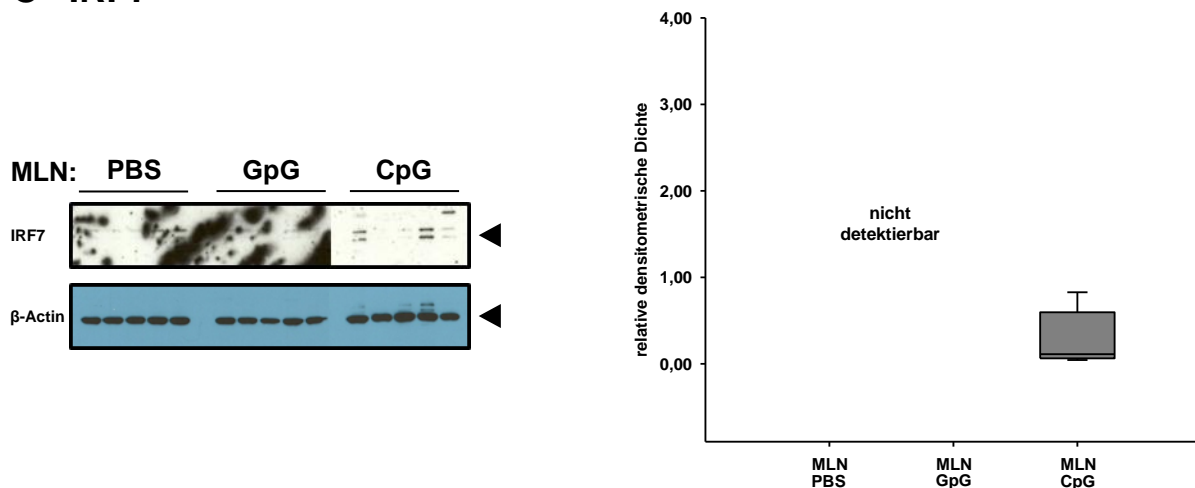
#### A phospho-CREB (Ser133)



## B phospho-NF- $\kappa$ B (p65) (Ser536)



## C IRF7



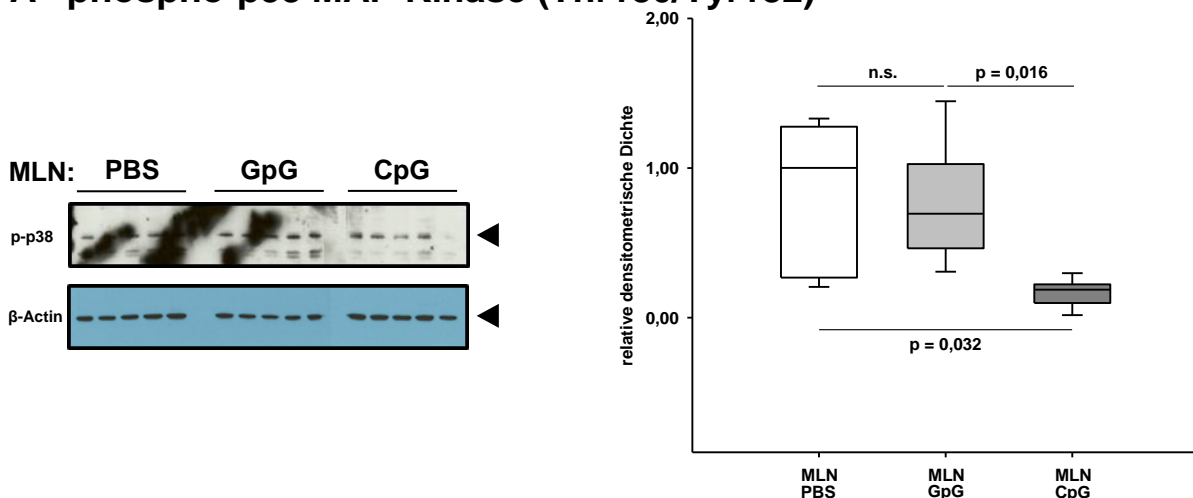
**Abbildung 4.2.3.1: Der Zellgehalt an pCREB, pNF- $\kappa$ B und IRF7 in Gesamtzelllysaten von wt C57BL/6 Mäusen nach TLR9-Stimulation im gesunden Milieu.** Die einzelnen Proteinkomponenten der Gesamtzelllysate aus MLN-Zellisolaten von gesunden wt C57BL/6 Mäusen, die mit PBS, GpG-ODN oder CpG-ODN behandelt worden waren, wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot der Immundetektion zugänglich gemacht. Die Immundetektion von (A) pCREB (Ser133), (B) pNF- $\kappa$ B (RelA/p65) (Ser536) und (C) IRF7 erfolgte mit spezifischen Antikörpern und einer Chemolumineszenzreaktion. Alle erhaltenen Lumineszenzsignale wurden densitometrisch quantifiziert und auf die jeweilige Ladungskontrolle ( $\beta$ -Actin) bezogen. Die dargestellten Werte (relative densitometrische Dichte) stellen ein Maß für die in der Zelle enthaltene Menge des zu untersuchenden Proteins dar und sind stets in Relation zum Median der densitometrischen Dichte in den PBS-behandelten Versuchstieren aufgetragen. n = 5.

### 4.2.3.2 Aktivierung von Proteinkinasen in MLN-Zellen bei CpG-vermittelter TLR9-Stimulation im gesunden Milieu

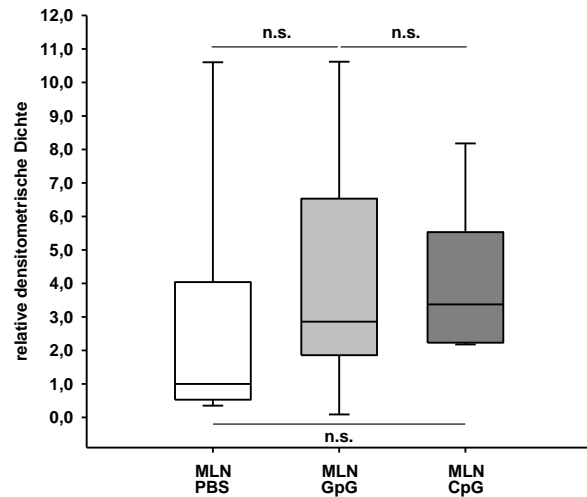
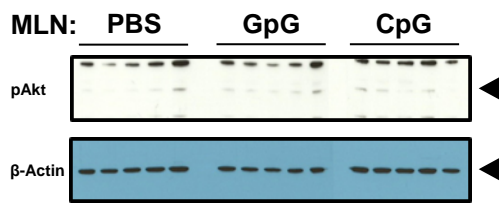
Da die Proteinkinasen p38 MAPK, Akt und GSK3- $\beta$  im Rahmen der TLR9-vermittelten Aktivierung von CREB und NF- $\kappa$ B eine wichtige Rolle spielen (siehe Kapitel 1.2.5 und 1.3.2), wurden auch die Auswirkungen einer CpG-vermittelten TLR9-Stimulation im gesunden Milieu auf den Zellgehalt an p-p38, pAkt und pGSK3- $\beta$  sowie Gesamt-GSK3- $\beta$  durch Immundetektion ermittelt.

Eine CpG-vermittelte TLR9-Stimulation führte zu einer signifikant verringerten Zellmenge an p-p38 im Vergleich zu den Kontrollen ( $p = 0,032$  gegenüber der PBS- und  $p = 0,016$  gegenüber der GpG-Kontrolle) (Abb. 4.2.3.2 A). Hinsichtlich des Zellgehalts an pAkt konnten im gesunden Milieu keine relevanten Unterschiede zwischen PBS-, GpG- und CpG-behandelten Mäusen ausgemacht werden (Abb. 4.2.3.2 B). Die MLN-Zellen CpG-behandelter Mäuse hingegen enthielten signifikant niedrigere Mengen an GSK3- $\beta$  verglichen mit den PBS-behandelten Kontrollen ( $p = 0,004$ ). Jedoch enthielten auch die MLN-Zellen der GpG-behandelten Kontrollen eine signifikant niedrigere Menge an totaler GSK3- $\beta$  verglichen mit den PBS-behandelten Kontrollen ( $p = 0,013$ ). Ein nennenswerter Unterschied zwischen CpG-behandelten Testtieren und GpG-behandelten Kontrolltieren war im gesunden Milieu dabei nicht erkennbar. Der Zellgehalt an inaktivierter pGSK3- $\beta$  war unter CpG-Behandlung ebenfalls signifikant geringer als bei den PBS-Kontrollen ( $p = 0,008$ ). Auch im Vergleich zu den GpG-Kontrollen führte eine CpG-Behandlung zu signifikant geringeren pGSK3- $\beta$ -Mengen in den MLN-Isolaten ( $p = 0,016$ ). Dementsprechend war das MLN-Zellmengenverhältnis von pGSK3- $\beta$  zu Gesamt-GSK3- $\beta$  (pGSK3- $\beta$  / Gesamt-GSK3- $\beta$ ) unter CpG-Behandlung im gesunden Milieu signifikant geringer als unter PBS- ( $p < 0,001$ ) respektive GpG-Kontrollbehandlung ( $p = 0,001$ ) (Abb. 4.2.3.2 C).

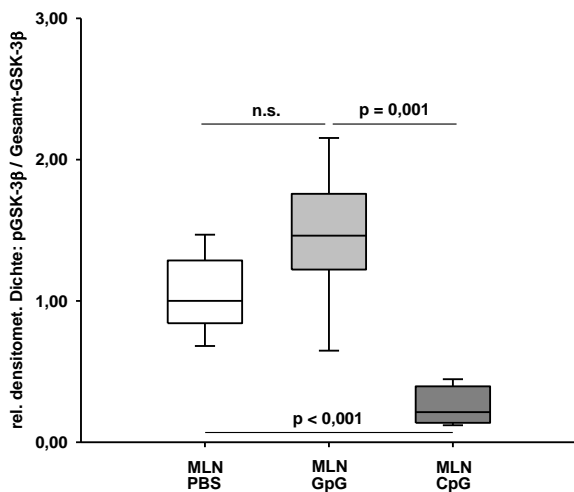
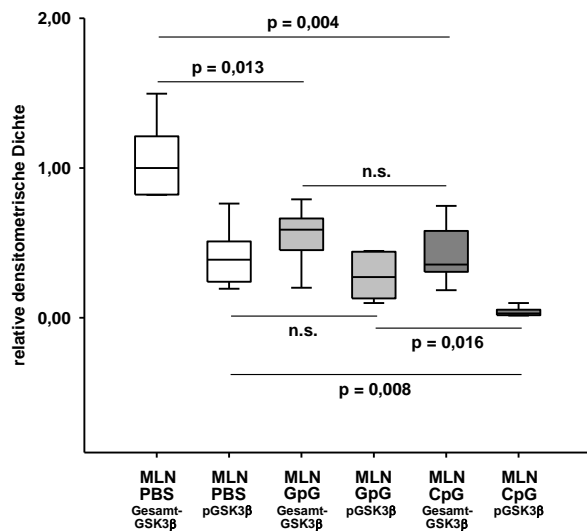
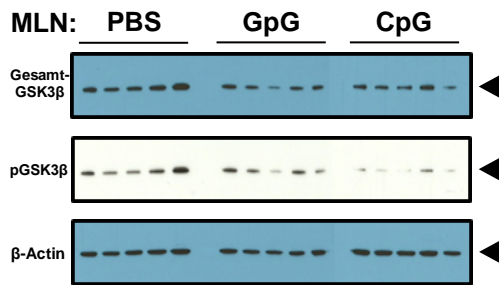
### A phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182)



### B phospho-Akt (Ser473)



### C Gesamt-GSK3-β und phospho-GSK3-β (Ser9)



**Abbildung 4.2.3.3:** Der Zellgehalt an p-p38, pAkt, Gesamt-GSK3-β und pGSK3-β in Gesamtzelllysaten von wt C57BL/6 Mäusen nach TLR9-Stimulation im gesunden Milieu. Die einzelnen Proteinkomponenten der Gesamtzelllysate aus MLN-Zellisolaten von gesunden wt C57BL/6 Mäusen, die mit PBS, GpG-ODN oder CpG-ODN behandelt worden waren, wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot der Immundetektion zugänglich gemacht. Die Immundetektion von (A) p-p38 MAPK (Thr180/Tyr182), (B) pAkt (Ser473), (C) Gesamt-GSK3-β und pGSK3-β erfolgte mit spezifischen Antikörpern und einer Chemolumineszenzreaktion. Alle erhaltenen Lumineszenzsignale wurden densitometrisch quantifiziert und auf die jeweilige Ladungskontrolle (β-Actin) bezogen. Die dargestellten Werte (relative densitometrische Dichte) stellen ein Maß für die in der Zelle enthaltene Menge des zu untersuchenden Proteins dar und sind stets in Relation zum Median der densitometrischen Dichte in den PBS-behandelten Versuchstieren aufgetragen. Die relative densitometrische Dichte von pGSK3-β und Gesamt-GSK3-β wurde anschließend in das entsprechende Verhältnis zueinander gesetzt und auf den Median der pGSK3-β/Gesamt-GSK3-β-Ratio der PBS-behandelten Versuchstiere bezogen. n = 5.

### **4.3 Auswirkungen einer DSS-induzierten chronischen Colitis in wt Versuchstieren**

Die Effekte einer CpG-getragenen TLR9-Aktivierung auf das intestinale Immungleichgewicht sind je nach zugrunde liegendem Milieu divergent. Im gesunden Milieu steht dabei eine antiinflammatorische Wirkung, im chronisch entzündlichen Milieu hingegen eine proinflammatorische Wirkung im Vordergrund (siehe Kapitel 1.3.2).

Um zu verstehen, inwieweit diese divergenten Effekte durch eine Milieu-abhängige Modifikation der TLR9-Signaltransduktion zustande kommen oder lediglich Ausdruck prinzipieller - und somit möglicherweise TLR9-unabhängiger - Unterschiede zwischen dem gesunden und dem chronisch entzündlichen Milieu sind, wurden im Folgenden unbehandelte wt C57BL/6 Mäuse im gesunden Zustand und im Zustand einer chronischen DSS-Colitis miteinander verglichen.

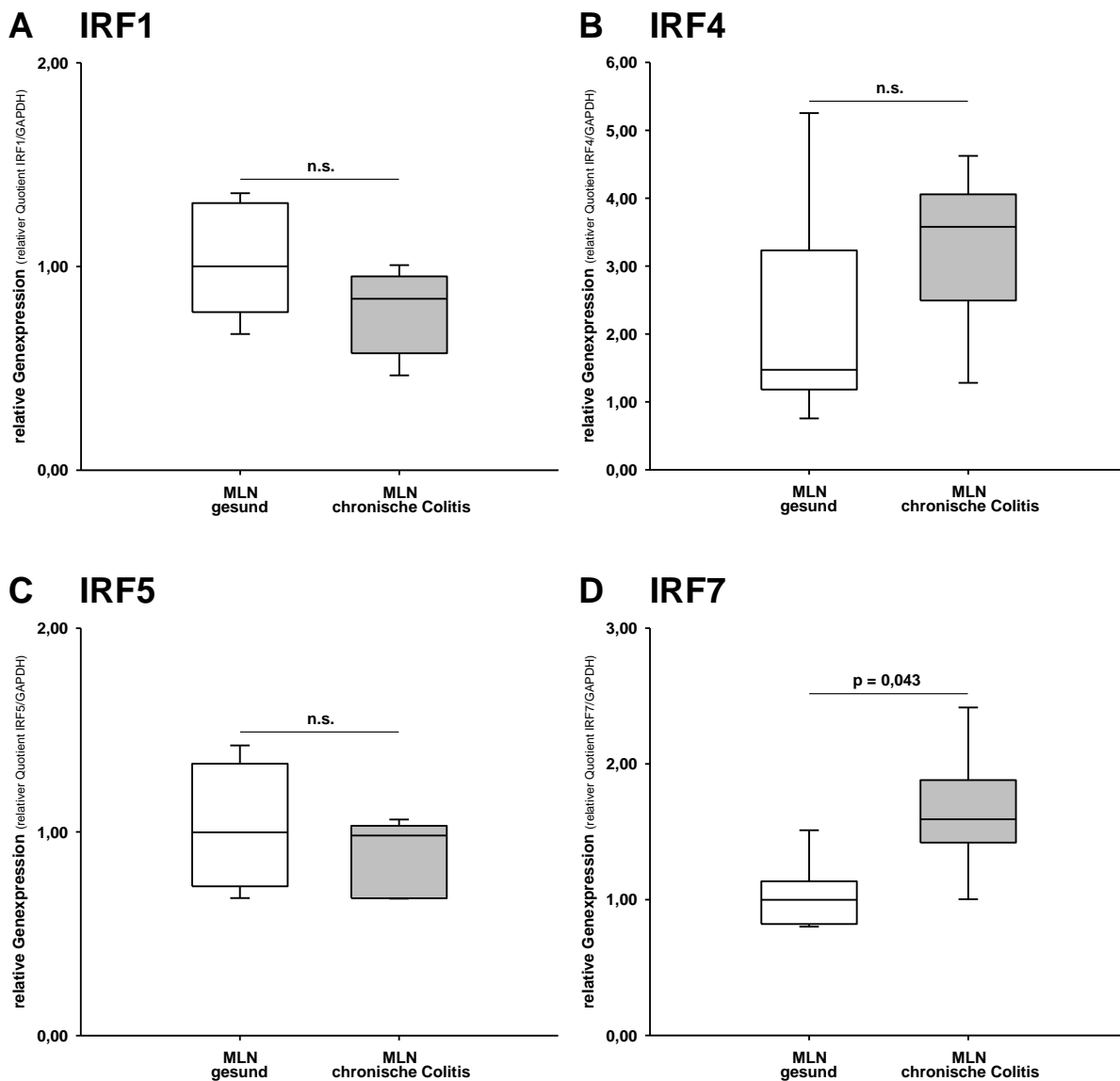
#### **4.3.1 Untersuchung mittels TaqMan<sup>®</sup> Real-Time-PCR**

Zunächst wurde die Expression ausgewählter Zytokin- und IRF-Gene im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu bestimmt und miteinander verglichen. Mithilfe der qRT-PCR wurden dazu RNA-Lysate von MLN-Zellen aus je fünf gesunden und fünf an einer DSS-induzierten chronischen Colitis erkrankten C57BL/6 wt Mäusen untersucht.

##### **4.3.1.1 Expression von IRF-Genen im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu**

Zunächst war es Gegenstand der Betrachtung, welche Veränderungen auf Ebene der IRF-Genexpression in MLN-Zellen durch das zugrunde liegende Milieu hervorgerufen werden.

Für das IRF1-, IRF4- und IRF5-Gen waren beim Vergleich gesunder Versuchstiere mit chronisch DSS-entzündeten Versuchstieren keine relevanten Expressionsveränderungen erkennbar (Abb. 4.3.1.1 A - C). Jedoch führte der Zustand der chronischen DSS-Colitis im Vergleich zu den gesunden Tieren zu einer signifikant höheren IRF7-Genexpression ( $p = 0,043$ ) in den MLN-Zellen (Abb. 4.3.1.1 D).

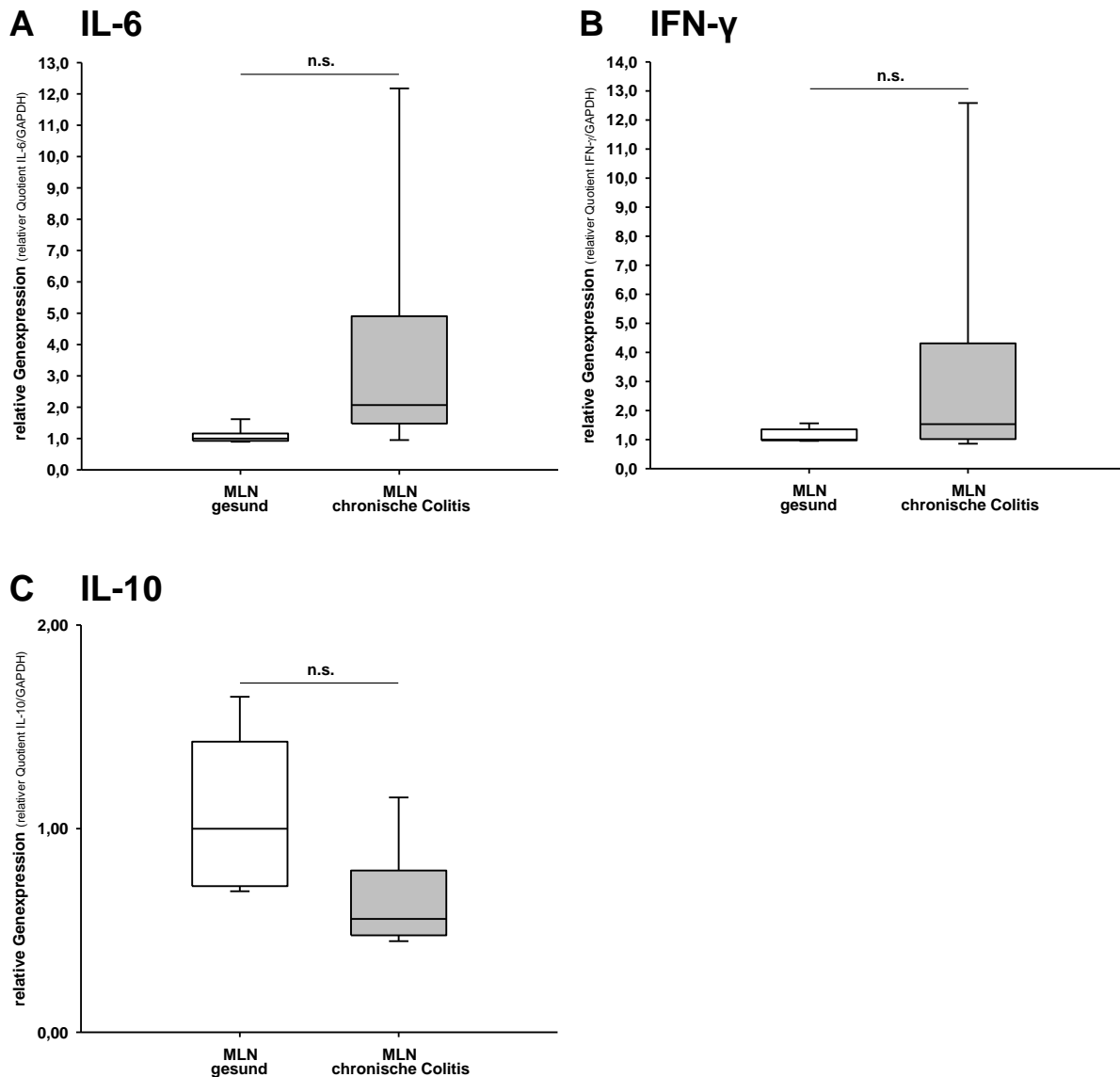


**Abbildung 4.3.1.1:** Die Expression ausgewählter IRF-Gene im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu. RNA-Lysate aus MLN-Zellisolaten von wt C57BL/6 Mäusen, die entweder gesund oder an einer DSS-induzierten chronischen Colitis erkrankt waren, wurden mittels TaqMan® Real-Time-PCR hinsichtlich der relativen Expression der Gene für (A) IRF1, (B) IRF4, (C) IRF5 und (D) IRF7 verglichen. Die dargestellten Werte der Zielgene (relative Genexpression) sind stets auf das jeweilige Referenzgen (GAPDH) bezogen und in Relation zum Median der Genexpression in den gesunden Versuchstieren aufgetragen. n = 5.

#### 4.3.1.2 Expression von Genen pro- und antiinflammatorischer Zytokine im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu

In einem nächsten Schritt wurde die Expression ausgewählter Zytokingene in MLN-Zellen von unbehandelten wt Mäusen sowohl im gesunden Zustand als auch im Zustand der chronischen DSS-Colitis bestimmt und miteinander verglichen.

Für das IL-6-, das IFN- $\gamma$ - und das IL-10-Gen waren dabei zwischen den MLN-Zellen gesunder und chronisch DSS-entzündeter Versuchstiere keine relevanten Expressionsunterschiede erkennbar (Abb. 4.3.1.2 A - C).



**Abbildung 4.3.1.1:** Die Expression von Genen pro- und antiinflammatorischer Zytokine im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu. RNA-Lysate aus MLN-Zellisolaten von wt C57BL/6 Mäusen, die entweder gesund oder an einer DSS-induzierten chronischen Colitis erkrankt waren, wurden mittels TaqMan<sup>®</sup> Real-Time-PCR hinsichtlich der relativen Expression der Gene der proinflammatorischen Zytokine (A) IL-6 und (B) IFN- $\gamma$  sowie des antiinflammatorischen Zytokins (C) IL-10 verglichen. Die dargestellten Werte der Zielgene (relative Genexpression) sind stets auf das jeweilige Referenzgen (GAPDH) bezogen und in Relation zum Median der Genexpression in den gesunden Versuchstieren aufgetragen. n = 5.

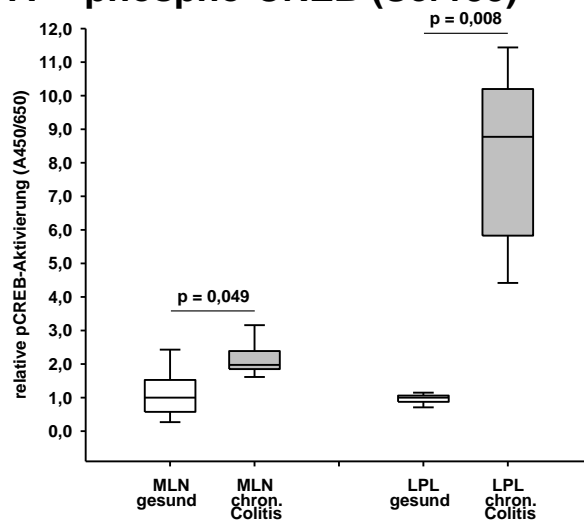
#### 4.3.2 Untersuchung mittels Transkriptionsfaktor-Aktivierungsassays - CREB-, NF- $\kappa$ B- und IRF7-Aktivität im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu

In einem weiteren Schritt wurden die Auswirkungen des zugrunde liegenden Milieus auf die Aktivität der Transkriptionsfaktoren pCREB, NF- $\kappa$ B (p65) und IRF7 untersucht. MLN- und LPL-Zellkernextrakte aus je fünf unbehandelten wt C57BL/6 Mäusen, die gesund oder an einer DSS-Colitis chronisch erkrankt waren, wurden

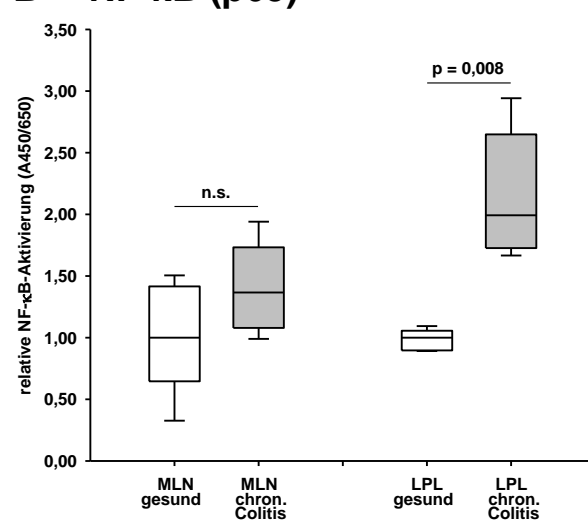
dazu im Hinblick auf die DNA-Bindungsaffinität des entsprechenden Transkriptionsfaktors untersucht und verglichen.

Im Vergleich zu den gesunden Versuchstieren war die DNA-Bindung von pCREB in den MLN- ( $p = 0,049$ ) und LPL-Isolaten ( $p = 0,008$ ) aus Mäusen mit einer chronischen DSS-Colitis signifikant erhöht (Abb. 4.3.2 A). Auch für NF- $\kappa$ B (p65) zeigte sich in den LPL-Isolaten aus den Tieren mit einer chronischen DSS-Colitis eine im Vergleich zur gesunden Kontrolle signifikant höhere ( $p = 0,008$ ) DNA-Bindungsaffinität, während in den MLN-Isolaten keine relevanten Unterschiede zwischen gesunden und chronisch DSS-entzündeten Tieren sichtbar war (Abb. 4.3.2 B). Das Verhältnis der pCREB-DNA-Bindungsaffinität zur RelA/p65-DNA-Bindungsaffinität war dabei im chronisch entzündlichen Milieu im Vergleich zum gesunden Milieu sowohl in den MLN- ( $p = 0,038$ ) als auch in den LPL-Zellkernextrakten ( $p = 0,008$ ) signifikant in Richtung der pCREB-Transaktivierung verschoben (Abb. 4.3.2 D). Die IRF7-DNA-Bindungsaffinität in den MLN-Zellen ergab keine relevanten Unterschiede zwischen gesunden und chronisch DSS-entzündeten Mäusen. In den LPL-Isolaten war jedoch erkennbar, dass der Zustand einer chronischen DSS-Colitis in den MLN-Zellen der Versuchstiere zu einer signifikant schwächeren ( $p < 0,001$ ) DNA-Bindung von IRF7 führt als der gesunde Zustand (Abb. 4.3.2 C).

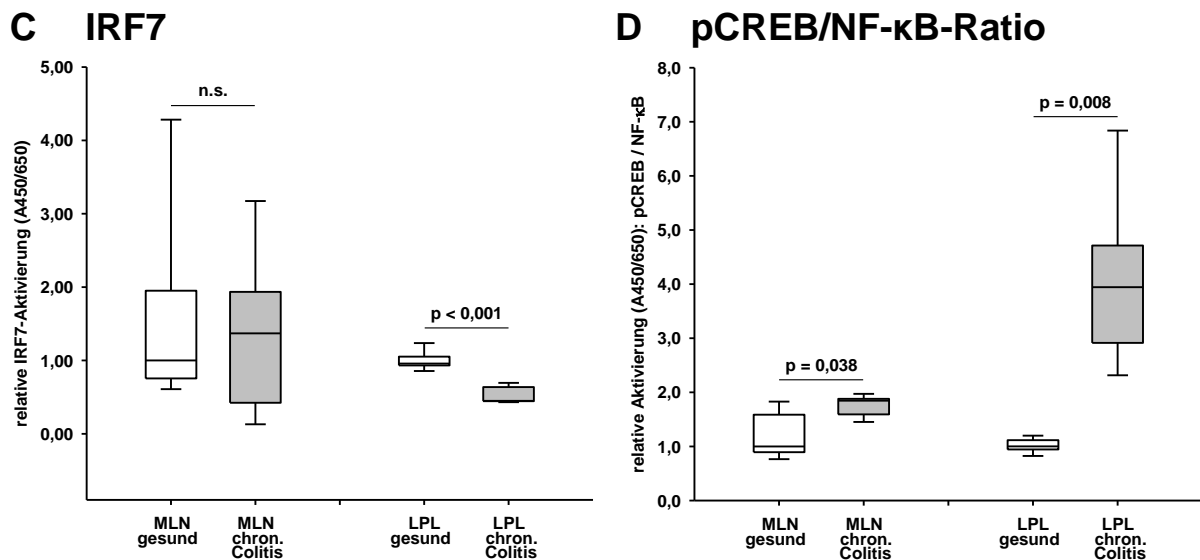
### A phospho-CREB (Ser133)



### B NF- $\kappa$ B (p65)







**Abbildung 4.3.2: Die DNA-Bindungsaffinität von aktiviertem CREB, NF-κB und IRF7 im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu.** Zellkernextrakte aus MLN- und LPL-Isolaten von wt C57BL/6 Mäusen, die gesund oder an einer DSS-induzierten chronischen Colitis erkrankt waren, wurden mittels TransAM<sup>®</sup>-Assays hinsichtlich der DNA-Bindungsaffinität von (A) pCREB (Ser133), (B) NF-κB (RelA/p65) und (C) IRF7 untersucht. Alle Messwerte wurden nach Abzug des entsprechenden Leerwertes auf die dazugehörige Positivkontrolle bezogen. Die dargestellten Werte entsprechen der DNA-Bindungsaffinität (relative Aktivierung) und sind stets in Relation zum Median der DNA-Bindungsaffinität im jeweiligen Gewebetyp der gesunden Versuchstiere aufgetragen. Die relative Aktivierung von pCREB und NF-κB (RelA/p65) wurde anschließend in das entsprechende Verhältnis zueinander gesetzt und auf den Median der pCREB/NF-κB-Ratio der gesunden Versuchstiere bezogen (D). n = 5.

### 4.3.3 Untersuchung mittels Western Blot

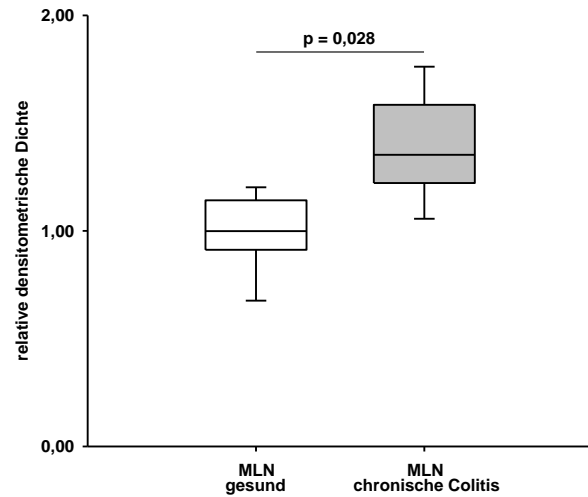
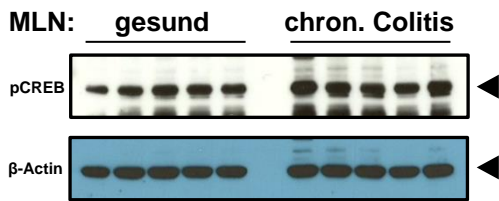
In einem dritten Schritt wurden MLN-Gesamtzelllysate von je fünf gesunden und fünf an einer chronischen DSS-Colitis erkrankten C57BL/6 wt Mäusen mittels Immunoblot auf das mengenmäßige Vorkommen ausgewählter Signalmoleküle untersucht.

#### 4.3.3.1 Aktivierung von Transkriptionsfaktoren in MLN-Zellen im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu

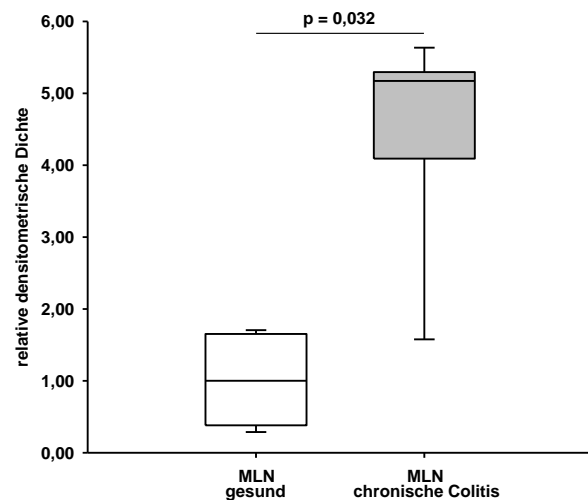
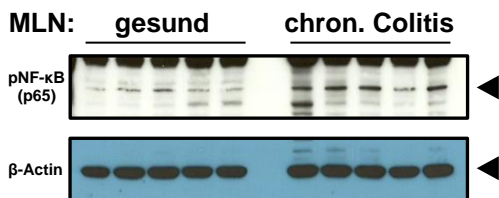
Zunächst wurden MLN-Zellen von gesunden und chronisch DSS-entzündeten wt Mäusen hinsichtlich der Zellmenge an phosphoryliertem und somit aktiviertem CREB und NF-κB (p65) sowie hinsichtlich der Zellmenge an IRF7 verglichen.

Im Vergleich zu den gesunden Kontrollen führte eine DSS-induzierte chronische Colitis in den MLN-Isolaten der Versuchstiere zu signifikant erhöhten ( $p = 0,028$ ) Zellmengen an pCREB (Abb. 4.3.3.1 A). Auch der Gehalt an pNF-κB (p65) stieg in den MLN-Zellen der Mäuse mit chronischer DSS-Colitis signifikant an ( $p = 0,032$ ) (Abb. 4.3.3.1 B). Die Menge an IRF7 war in den MLN-Zellen der Versuchstiere mit einer chronischen DSS-induzierten Colitis ebenfalls signifikant höher ( $p = 0,008$ ) als in den MLN-Zellen der gesunden Versuchstiere (Abb. 4.3.3.1 C).

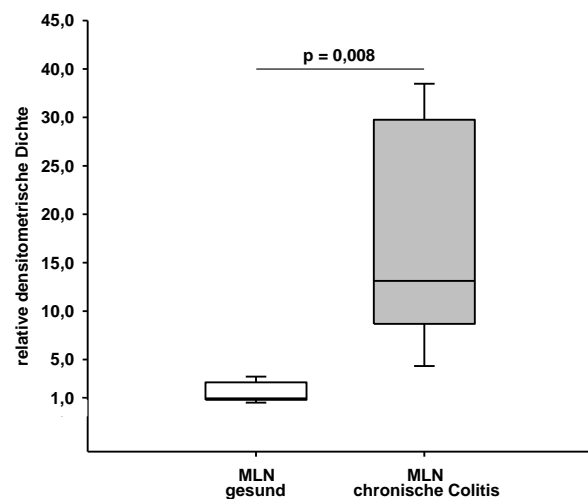
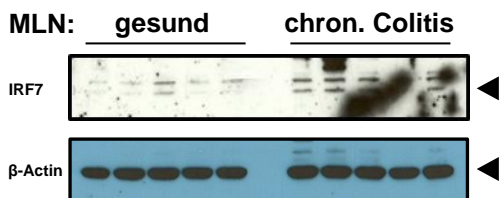
### A phospho-CREB (Ser133)



### B phospho-NF- $\kappa$ B (p65) (Ser536)



### C IRF7



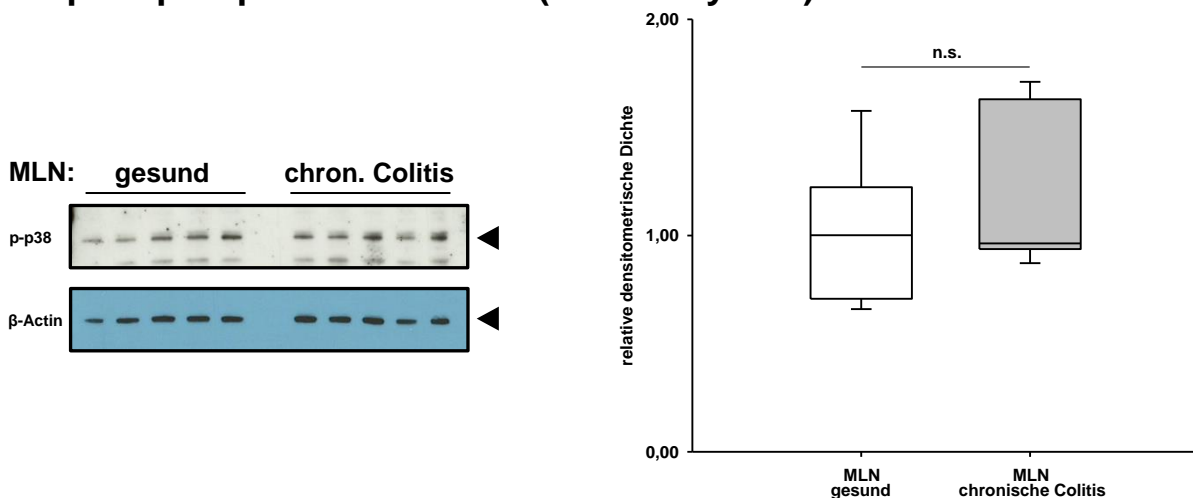
**Abbildung 4.3.3.1:** Der Zellgehalt an pCREB, pNF- $\kappa$ B und IRF7 in Gesamtzelllysaten von wt C57BL/6 Mäusen im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu. Die einzelnen Proteinkomponenten der Gesamtzelllysate aus MLN-Zellisolaten von wt C57BL/6 Mäusen, die gesund oder an einer DSS-induzierten chronischen Colitis erkrankt waren, wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot der Immundetektion zugänglich gemacht. Die Immundetektion von (A) pCREB (Ser133), (B) pNF- $\kappa$ B (RelA/p65) (Ser536) und (C) IRF7 erfolgte mit spezifischen Antikörpern und einer Chemolumineszenzreaktion. Alle erhaltenen Lumineszenzsignale wurden densitometrisch quantifiziert und auf die jeweilige Ladungskontrolle ( $\beta$ -Actin) bezogen. Die dargestellten Werte (relative densitometrische Dichte) stellen ein Maß für die in der Zelle enthaltene Menge des zu untersuchenden Proteins dar und sind stets in Relation zum Median der densitometrischen Dichte in den gesunden Versuchstieren aufgetragen. n = 5.

#### 4.3.3.2 Aktivierung von Proteinkinasen in MLN-Zellen im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu

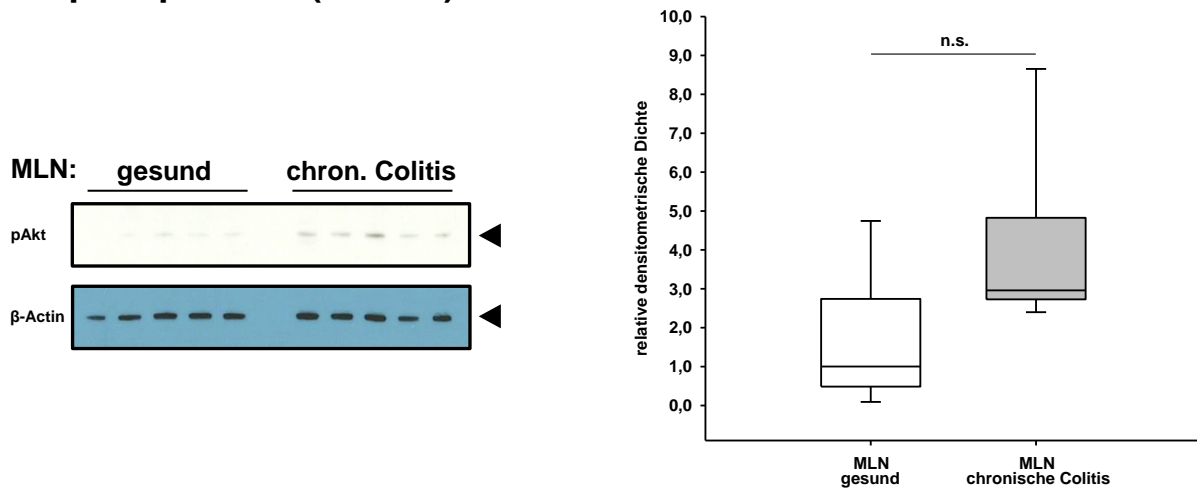
Proteinkinasen wie p38 MAPK, Akt und GSK3- $\beta$  spielen im Rahmen der TLR9-Signaltransduktion eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von CREB und NF- $\kappa$ B (siehe Kapitel 1.2.5 und 1.3.2). Um die Milieu-abhängige Aktivierung dieser Proteinkinasen darzustellen, wurde der Zellgehalt an pAkt und p-p38 sowie an totaler und phosphorylierter GSK3- $\beta$  in MLN-Zellen von gesunden und chronisch DSS-entzündeten wt C57BL/6 Mäusen untersucht und miteinander verglichen.

Dabei ergaben sich in den MLN-Zellen hinsichtlich der Menge an p-p38 MAPK und pAkt keine nennenswerten Unterschiede zwischen den an einer chronischen DSS-Colitis erkrankten Versuchstieren und den gesunden Kontrollen (Abb. 4.3.3.2 A und B). Die Menge an Gesamt-GSK3- $\beta$  war in den MLN-Zellen von gesunden und von chronisch DSS-entzündeten Versuchstieren unverändert. Der Zellgehalt an inaktivierter pGSK3- $\beta$  war jedoch in den MLN-Zellen der chronisch DSS-entzündeten Versuchstiere signifikant höher ( $p = 0,008$ ) als in den MLN-Zellen der gesunden Kontrolltiere. Das MLN-Zellmengenverhältnis von pGSK3- $\beta$  zu Gesamt-GSK3- $\beta$  war dementsprechend im chronisch entzündlichen Milieu im Vergleich zum gesunden Milieu signifikant ( $p = 0,036$ ) in Richtung von pGSK3- $\beta$  verschoben (Abb. 4.3.3.2 C).

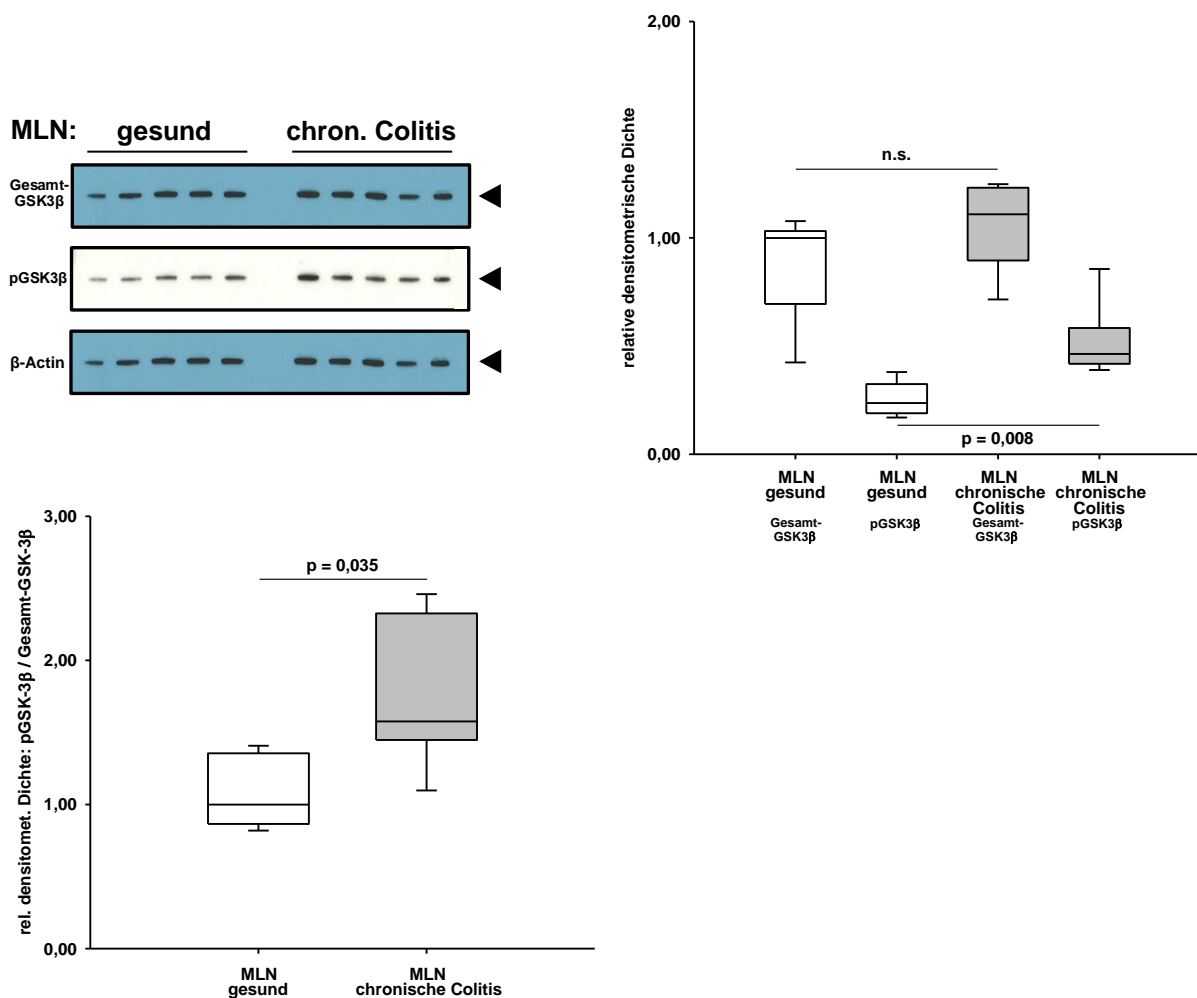
#### A phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182)



## B phospho-Akt (Ser473)



## C Gesamt-GSK3- $\beta$ und phospho-GSK3- $\beta$ (Ser9)



**Abbildung 4.3.3.3: Der Zellgehalt an p-p38, pAkt, Gesamt-GSK3- $\beta$  und pGSK3- $\beta$  in Gesamtzelllysaten von wt C57BL/6 Mäusen im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu.** Die einzelnen Proteinkomponenten der Gesamtzelllysate aus MLN-Zellisolaten von wt C57BL/6 Mäusen, die gesund oder an einer DSS-induzierten chronischen Colitis erkrankt waren, wurden mittels SDS- und Western Blot der Immundetektion zugänglich gemacht. Die Immundetektion von (A) p-p38 MAPK (Thr180/Tyr182), (B) pAkt (Ser473), (C) Gesamt-GSK3- $\beta$  und pGSK3- $\beta$  erfolgte mit spezifischen Antikörpern und einer Chemolumineszenzreaktion. Alle erhaltenen Lumineszenzsignale wurden densitometrisch quantifiziert und auf die jeweilige Ladungskontrolle ( $\beta$ -Actin) bezogen. Die dargestellten Werte (relative densitometrische Dichte) stellen ein Maß für die in der Zelle enthaltene Menge des zu untersuchenden Proteins dar und sind stets in Relation zum Median der densitometrischen Dichte in den gesunden Versuchstieren aufgetragen. Die relative densitometrische Dichte von pGSK3- $\beta$  und Gesamt-GSK3- $\beta$  wurde anschließend in das entsprechende Verhältnis zueinander gesetzt und auf den Median der pGSK3- $\beta$ /Gesamt-GSK3- $\beta$ -Ratio der gesunden Versuchstiere bezogen. n = 5.

## **4.4 Stimulation des TLR9 in chronisch entzündeten wt Versuchstieren**

Die Behandlung mit CpG-Motiven führt zu einer Stimulation von TLR9 und induziert anschließend Milieu-abhängig pro- oder antiinflammatorische Immuneffekte (siehe Kapitel 1.3.2).

In Abschnitt 4.2 wurden die Auswirkungen einer CpG-vermittelten TLR9-Stimulation in gesunden C57BL/6 wt Mäusen untersucht. Im folgenden Abschnitt sollten die Auswirkungen einer CpG-vermittelten TLR9-Stimulation in chronisch entzündeten C57BL/6 wt Mäusen analysiert werden. Nach Etablierung einer chronischen DSS-Colitis wurde dazu eine C57BL/6-Testgruppe mit PBS-gelösten CpG-Motiven behandelt, eine erste Kontrollgruppe hingegen mit reinem PBS und eine zweite Kontrollgruppe mit in PBS gelösten GpG-Motiven.

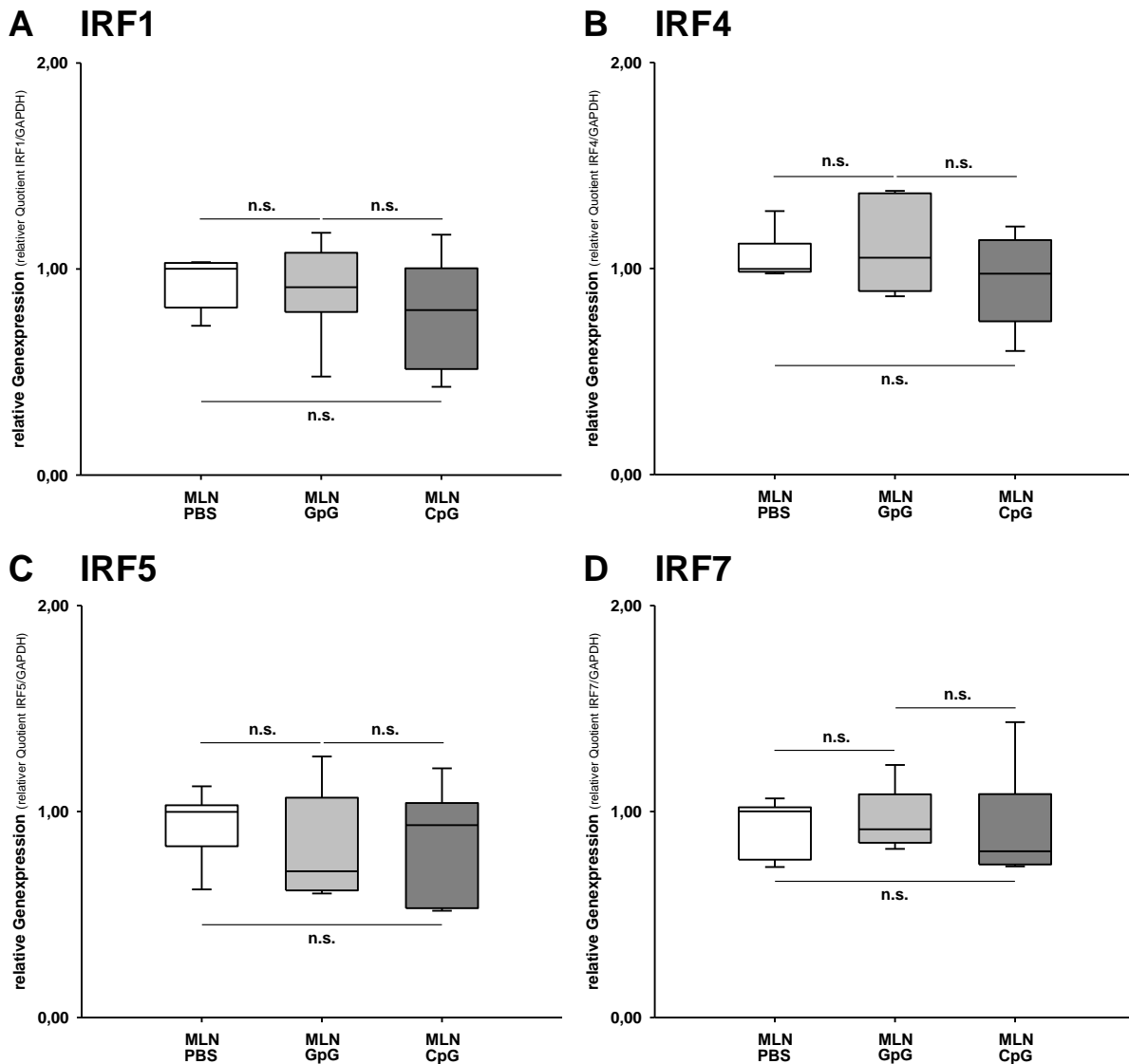
### **4.4.1 Untersuchung mittels TaqMan<sup>®</sup> Real-Time-PCR**

Die Auswirkungen der TLR9-Stimulation im chronisch entzündlichen Milieu wurden in einem ersten Schritt auf Ebene der Genexpression mithilfe der qRT-PCR untersucht. Verglichen wurden dabei RNA-Lysate isolierter MLN-Zellen aus je fünf wt C57BL/6 Mäusen der PBS- respektive GpG-Kontrollgruppe sowie der CpG-Testgruppe.

#### **4.4.1.1 CpG-vermittelte TLR9-Stimulation und Expression von IRF-Genen im chronisch entzündlichen Milieu**

Zunächst wurde die Expression von IRF-Genen bei TLR9-Stimulation im chronisch entzündlichen Milieu der DSS-Colitis analysiert.

Dabei zeigte sich im Zustand der DSS-induzierten chronischen Colitis jedoch für keines der untersuchten IRF-Gene ein relevanter Unterschied zwischen den MLN-Zellen der CpG-, GpG- beziehungsweise PBS-behandelten C57BL/6 wt Mäuse (Abb. 4.4.1.1 A - D).



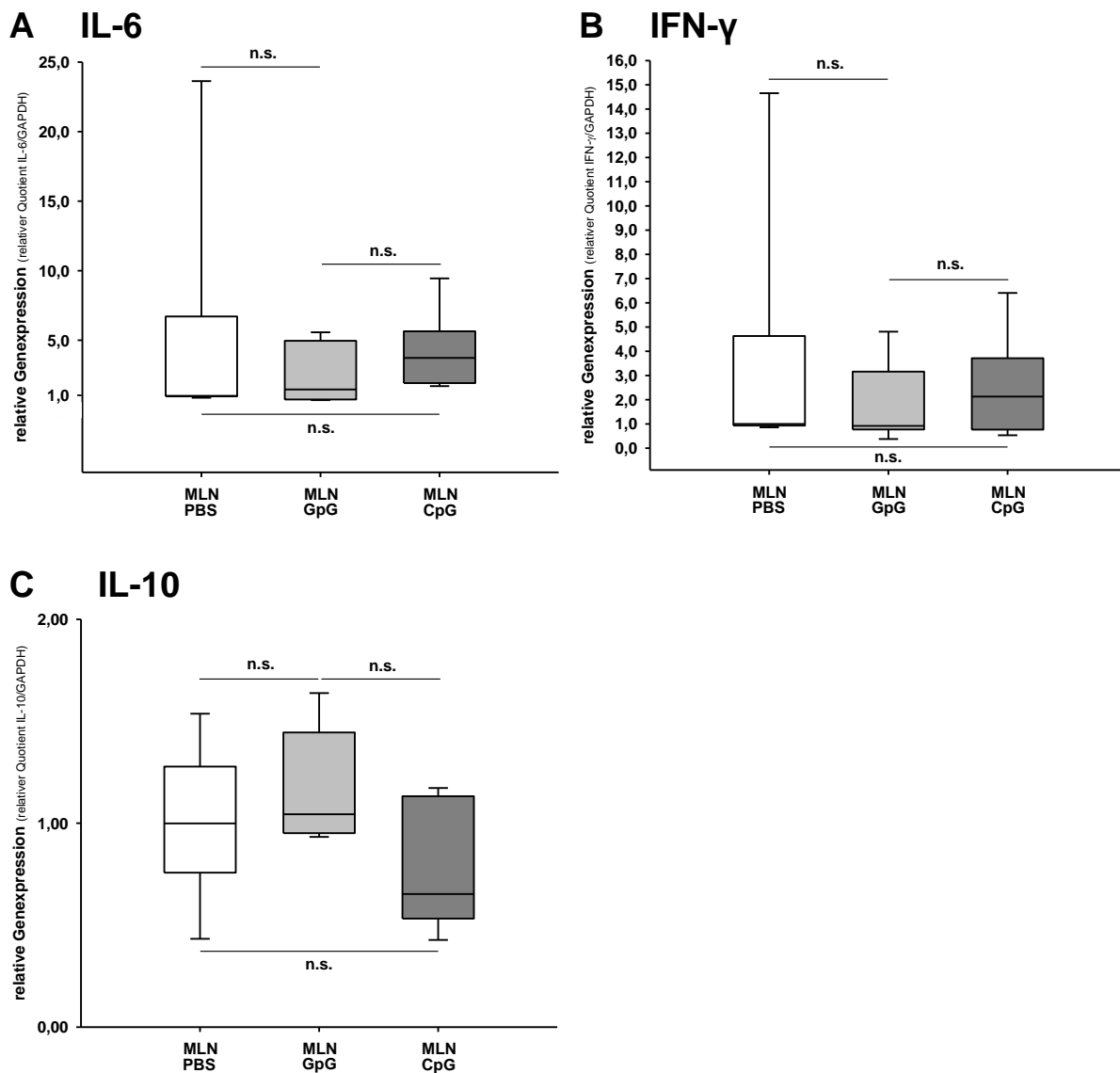
**Abbildung 4.4.1.1:** Die Expression ausgewählter IRF-Gene nach TLR9-Stimulation im chronisch entzündlichen Milieu. RNA-Lysate aus MLN-Zellisolaten von wt C57BL/6 Mäusen, die im Zustand einer chronischen DSS-Colitis mit PBS, GpG-ODN oder CpG-ODN behandelt worden waren, wurden mittels TaqMan® Real-Time-PCR hinsichtlich der relativen Expression der Gene für (A) IRF1, (B) IRF4, (C) IRF5 und (D) IRF7 verglichen. Die dargestellten Werte der Zielgene (relative Genexpression) sind stets auf das jeweilige Referenzgen (GAPDH) bezogen und in Relation zum Median der Genexpression in den PBS-behandelten Versuchstieren aufgetragen. n = 5.

#### 4.4.1.2 CpG-vermittelte TLR9-Stimulation und Expression von Genen pro- und antiinflammatorischer Zytokine im chronisch entzündlichen Milieu

Die Auswirkungen der TLR9-Stimulation auf die Expression ausgewählter Gene pro- und antiinflammatorischer Zytokine wurden im Kapitel 4.2.1.2 bereits im gesunden Milieu untersucht. Eine analoge Bestimmung fand dementsprechend auch im chronisch entzündlichen Milieu der DSS-Colitis statt.

Für das IL-6-, das IFN- $\gamma$ - und das IL-10-Gen waren dabei im Zustand der chronischen DSS-Colitis auf Expressionsebene keine nennenswerten Unterschiede

in den MLN-Zellen beim direkten Vergleich der drei Versuchsgruppen erkennbar (Abb. 4.4.1.2 A - C).



**Abbildung 4.4.1.2:** Die Expression von Genen pro- und antiinflammatorischer Zytokine nach TLR9-Stimulation im chronisch entzündlichen Milieu. RNA-Lysate aus MLN-Zellisolaten von wt C57BL/6 Mäusen, die im Zustand einer chronischen DSS-Colitis mit PBS, GpG-ODN oder CpG-ODN behandelt worden waren, wurden mittels TaqMan<sup>®</sup> Real-Time-PCR hinsichtlich der relativen Genexpression der proinflammatorischen Zytokine (A) IL-6 und (B) IFN- $\gamma$  sowie des antiinflammatorischen Zytokins (C) IL-10 verglichen. Die dargestellten Werte der Zielgene (relative Genexpression) sind stets auf das jeweilige Referenzgen (GAPDH) bezogen und in Relation zum Median der Genexpression in den PBS-behandelten Versuchstieren aufgetragen. n = 5.

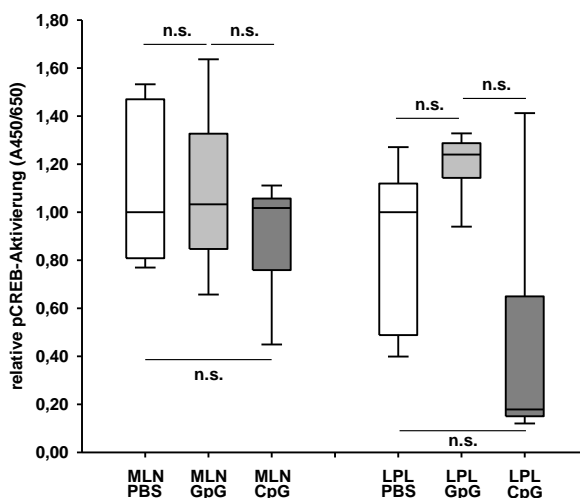
#### 4.4.2 Untersuchung mittels Transkriptionsfaktor-Aktivierungsassays - CREB-, NF- $\kappa$ B- und IRF7-Aktivität bei CpG-vermittelter TLR9-Stimulation im chronisch entzündlichen Milieu

Im Kapitel 4.2.2 wurde bereits im gesunden Milieu die Aktivierung ausgewählter Transkriptionsfaktoren nach TLR9-Stimulation untersucht. Zur Durchführung einer

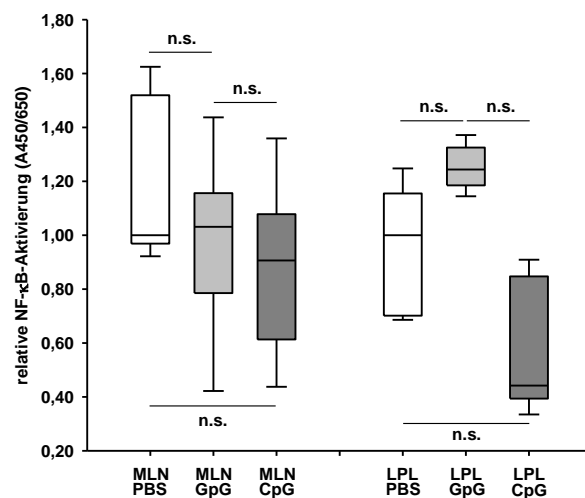
entsprechenden Analyse im chronisch entzündlichen Milieu wurden MLN- und LPL-Zellkernextrakte hinsichtlich der DNA-Bindungsaffinität von pCREB, NF- $\kappa$ B (p65) und IRF7 untersucht, wobei jede Gruppe aus je fünf chronisch DSS-entzündeten wt C57BL/6 Mäusen bestand.

Bei der Untersuchung der MLN- und LPL-Isolate im chronisch entzündlichen Milieu ergaben sich in den CpG-, GpG- und PBS-behandelten Versuchstieren keine signifikanten Unterschiede in der pCREB- und in der RelA/p65-DNA-Bindungsaffinität (Abb. 4.4.2 A und B). Das Verhältnis der DNA-Bindungsaffinität von pCREB zu derjenigen von pNF- $\kappa$ B (p65) zeigte daher in den Zellkernextrakten der MLN- und LPL-Isolate innerhalb der drei Gruppen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (Abb. 4.4.2 D). Hinsichtlich der DNA-Bindungsaffinität von IRF7 waren im chronisch entzündlichen Milieu beim direkten Vergleich CpG-, GpG- und PBS-behandelter Mäuse keine relevanten Unterschiede in den MLN-Zellen sichtbar (Abb. 4.4.1.2 C). In den LPL-Isolaten hingegen führte die CpG-vermittelte TLR9-Aktivierung gegenüber den GpG-Kontrollen zu einer signifikant verstärkten ( $p = 0,047$ ) IRF7-DNA-Bindungsaffinität im chronisch entzündlichen Milieu (Abb. 4.4.2 C), während gegenüber den PBS-Kontrollen wiederum keine nennenswerten Unterschiede sichtbar waren.

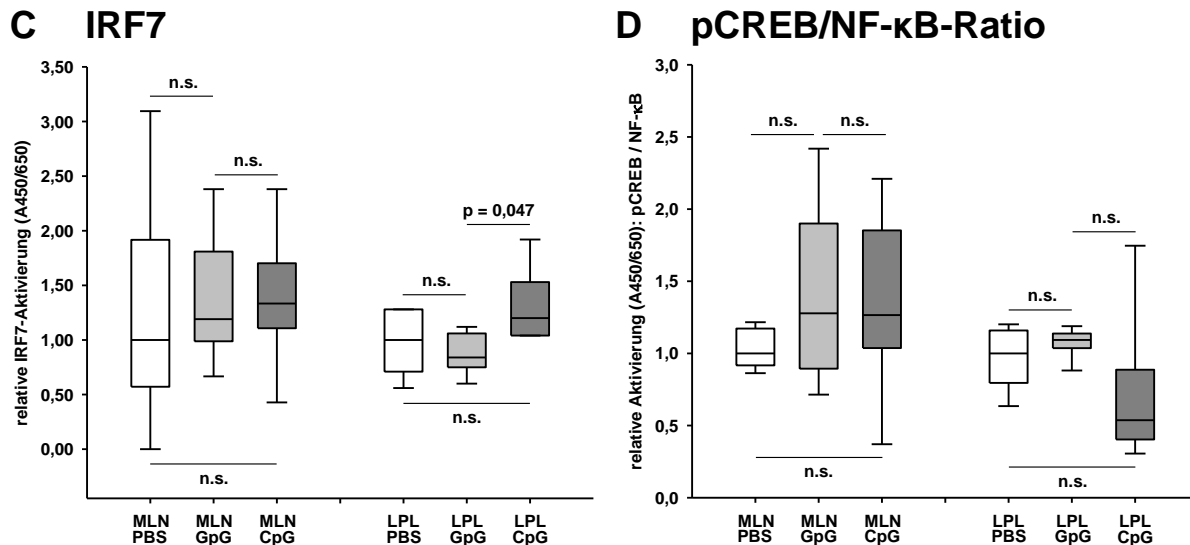
### A phospho-CREB (Ser133)



### B NF- $\kappa$ B (p65)







**Abbildung 4.4.2: Die DNA-Bindungsaffinität von aktiviertem CREB, NF-κB und IRF7 nach TLR9-Stimulation im chronisch entzündlichen Milieu.** Zellkernextrakte aus MLN- und LPL-Isolaten von wt C57BL/6 Mäusen, die im Zustand einer chronischen DSS-Colitis mit PBS, GpG-ODN oder CpG-ODN behandelt worden waren, wurden mittels TransAM®-Assays hinsichtlich der DNA-Bindungsaffinität von (A) pCREB (Ser133), (B) NF-κB (RelA/p65) und (C) IRF7 untersucht. Alle Messwerte wurden nach Abzug des entsprechenden Leerwertes auf die dazugehörige Positivkontrolle bezogen. Die dargestellten Werte entsprechen der DNA-Bindungsaffinität (relative Aktivierung) und sind stets in Relation zum Median der DNA-Bindungsaffinität im jeweiligen Gewebetyp der PBS-behandelten Versuchstiere aufgetragen. Die relative Aktivierung von pCREB und NF-κB (RelA/p65) wurde anschließend in das entsprechende Verhältnis zueinander gesetzt und auf den Median der pCREB/NF-κB-Ratio der PBS-behandelten Versuchstiere bezogen (D). n = 5.

#### 4.4.3 Untersuchung mittels Western Blot

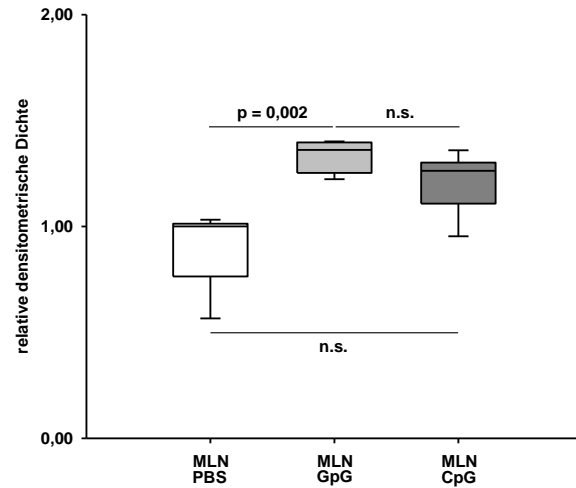
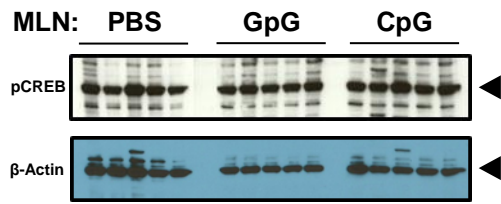
Auch im chronisch entzündlichen Milieu wurden die Auswirkungen der TLR9-Stimulation auf die Aktivierung ausgewählter Signalmoleküle im Immunoblot untersucht. Zu diesem Zweck wurden je fünf MLN-Gesamtzelllysate von CpG-behandelten als auch von PBS- respektive GpG-behandelten wt C57BL/6 Mäusen während einer chronischen DSS-Colitis verglichen.

##### 4.4.3.1 Aktivierung von Transkriptionsfaktoren in MLN-Zellen bei CpG-vermittelter TLR9-Stimulation im chronisch entzündlichen Milieu

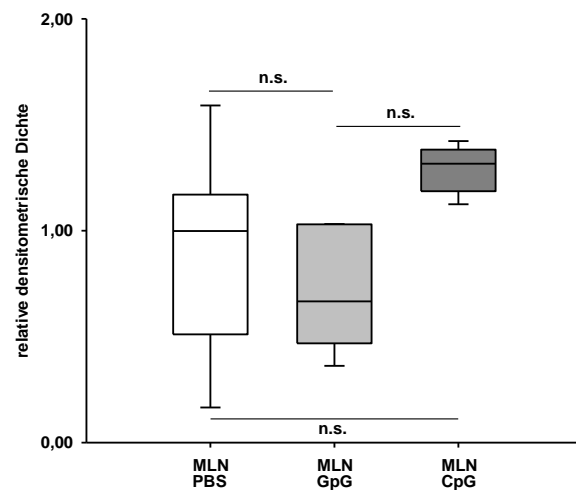
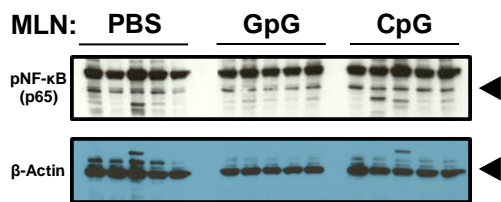
Um den Einfluss der TLR9-Stimulation im chronisch entzündlichen Milieu auf die Aktivierung der drei Transkriptionsfaktoren CREB, NF-κB (p65) und IRF7 darzustellen, wurde der Zellgehalt an phosphoryliertem CREB und RelA/p65 sowie an IRF7 bestimmt.

Im Zustand der chronischen DSS-Colitis zeigten sich dabei in den MLN-Isolaten keine Unterschiede in der pCREB-, der pNF-κB- und der IRF7-Menge zwischen CpG- und PBS- respektive GpG-behandelten Versuchstieren (Abb. 4.4.3.1 A - C).

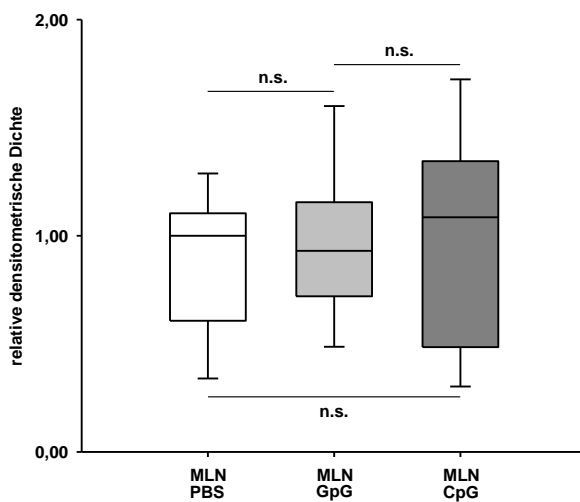
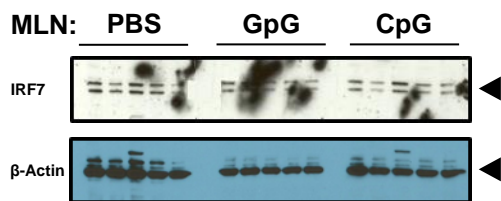
### A phospho-CREB (Ser133)



### B phospho-NF-κB (p65) (Ser536)



### C IRF7



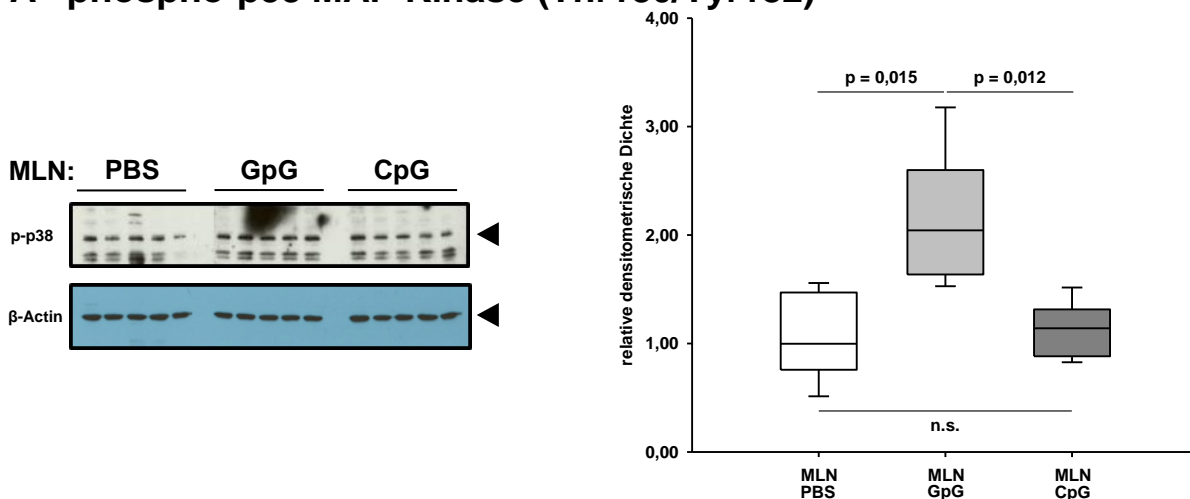
**Abbildung 4.4.3.1: Der Zellgehalt an pCREB, pNF-κB und IRF7 in Gesamtzelllysaten von wt C57BL/6 Mäusen nach TLR9-Stimulation im chronisch entzündlichen Milieu.** Die einzelnen Proteinkomponenten der Gesamtzelllysate aus MLN-Zellisolaten von wt C57BL/6 Mäusen, die im Zustand einer chronischen DSS-Colitis mit PBS, GpG-ODN oder CpG-ODN behandelt worden waren, wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot der Immundetektion zugänglich gemacht. Die Immundetektion von (A) pCREB (Ser133), (B) pNF-κB (RelA/p65) (Ser536) und (C) IRF7 erfolgte mit spezifischen Antikörpern und einer Chemolumineszenzreaktion. Alle erhaltenen Lumineszenzsignale wurden densitometrisch quantifiziert und auf die jeweilige Ladungskontrolle (β-Actin) bezogen. Die dargestellten Werte (relative densitometrische Dichte) stellen ein Maß für die in der Zelle enthaltene Menge des zu untersuchenden Proteins dar und sind stets in Relation zum Median der densitometrischen Dichte in den PBS-behandelten Versuchstieren aufgetragen. n = 5.

#### 4.4.3.2 Aktivierung von Proteinkinasen in MLN-Zellen bei CpG-vermittelter TLR9-Stimulation im chronisch entzündlichen Milieu

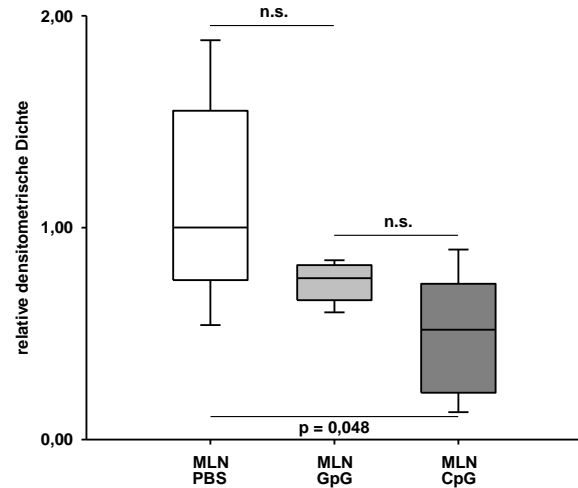
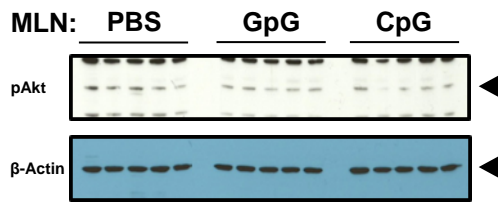
Analog zu den Untersuchungen im gesunden Milieu wurden auch im chronisch entzündlichen Milieu die Auswirkungen einer CpG-vermittelten TLR9-Stimulation auf die Aktivierung ausgewählter Proteinkinasen untersucht. Analysiert wurde dazu der MLN-Zellgehalt von pAkt und p-p38 sowie von totaler und phosphorylierter GSK3- $\beta$ .

Der MLN-Zellgehalt an p-p38 wies dabei im Zustand einer chronischen DSS-Colitis keine relevanten Unterschiede zwischen der CpG- und PBS-Behandlung auf. Jedoch zeigten die MLN-Zellen GpG-behandelter Versuchstiere einen signifikant höheren Gehalt an p-p38 als die PBS- ( $p = 0,015$ ) und CpG-behandelten ( $p = 0,012$ ) Tiere (Abb. 4.4.3.2 A). Eine CpG-vermittelte TLR9-Stimulation im chronisch entzündlichen Milieu zog im Vergleich zur PBS-behandelten Kontrolle eine signifikant verringerte ( $p = 0,048$ ) Zellmenge an pAkt nach sich. Im Vergleich zur GpG-stimulierten Kontrolle waren derartige CpG-Effekte jedoch nicht sichtbar (Abb. 4.2.3.2 B). Die MLN-Zellen von CpG- und PBS-behandelten Versuchstieren zeigten im Zustand einer chronischen DSS-Colitis keine nennenswerten Unterschiede im Zellgehalt an totaler GSK3- $\beta$ . Jedoch wiesen hierbei die MLN-Zellen der GpG-behandelten Kontrolltiere einen signifikant höheren Gesamt-GSK3- $\beta$ -Gehalt auf als die der PBS- ( $p = 0,009$ ) und die der CpG-behandelten ( $p = 0,002$ ) Tiere. Der Gehalt an pGSK3- $\beta$  war in MLN-Zellen aus CpG-behandelten Tieren im Vergleich zu den PBS- respektive GpG-behandelten Kontrollen unverändert. Das MLN-Zellmengenverhältnis von pGSK3- $\beta$  zu Gesamt-GSK3- $\beta$  zeigte dabei zwischen CpG-Behandlung und PBS- respektive GpG-Kontrollbehandlung keine relevante Unterschiede (Abb. 4.4.3.2 C).

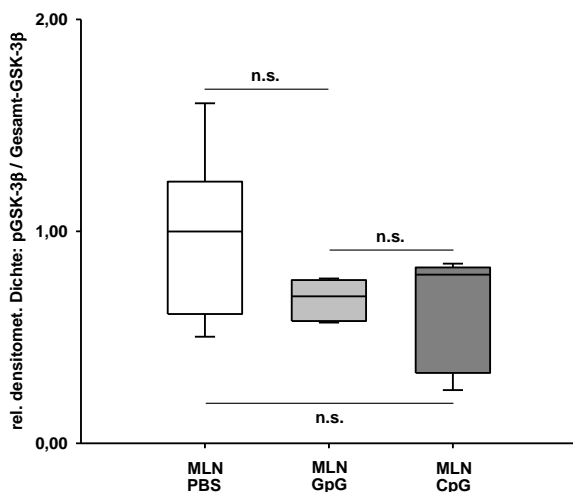
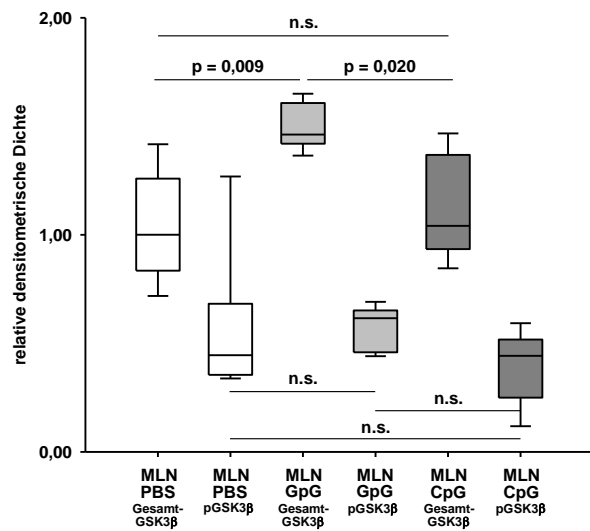
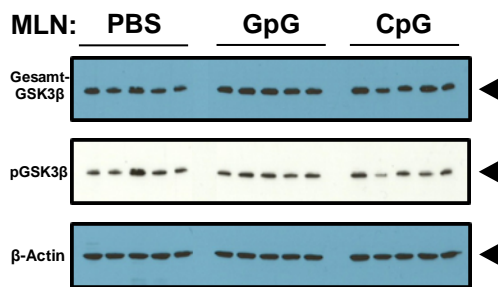
#### A phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182)



### B phospho-Akt (Ser473)



### C Gesamt-GSK3-β und phospho-GSK3-β (Ser9)



**Abbildung 4.4.3.3: Der Zellgehalt an p-p38, pAkt, Gesamt-GSK3-β und pGSK3-β in Gesamtzelllysaten von wt C57BL/6 Mäusen nach TLR9-Stimulation im chronisch entzündlichen Milieu.** Die einzelnen Proteinkomponenten der Gesamtzelllysate aus MLN-Zellisolaten von wt C57BL/6 Mäusen, die im Zustand der chronischen DSS-Colitis mit PBS, GpG-ODN oder CpG-ODN behandelt worden waren, wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot der Immundetektion zugänglich gemacht. Die Immundetektion von (A) p-p38 MAPK (Thr180/Tyr182), (B) pAkt (Ser473), (C) Gesamt-GSK3-β und pGSK3-β erfolgte mit spezifischen Antikörpern und einer Chemolumineszenzreaktion. Alle erhaltenen Lumineszenzsignale wurden densitometrisch quantifiziert und auf die jeweilige Ladungskontrolle (β-Actin) bezogen. Die dargestellten Werte (relative densitometrische Dichte) stellen ein Maß für die in der Zelle enthaltene Menge des zu untersuchenden Proteins dar und sind stets in Relation zum Median der densitometrischen Dichte in den PBS-behandelten Versuchstieren aufgetragen. Die relative densitometrische Dichte von pGSK3-β und Gesamt-GSK3-β wurde anschließend in das entsprechende Verhältnis zueinander gesetzt und auf den Median der pGSK3-β/Gesamt-GSK3-β-Ratio der PBS-behandelten Versuchstiere bezogen. n = 5.

## **4.5 Vergleich der Effekte der CpG-vermittelten TLR9-Stimulation im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu**

Um die Milieu-abhängigen dichotomen Effekte der CpG-vermittelten TLR9-Stimulation (siehe Kapitel 1.2.4 und 1.3.2) genauer zu beleuchten, waren in den Kapiteln 4.2 bis 4.4 ausgewählte Zytokine, Transkriptionsfaktoren und Proteinkinasen hinsichtlich ihrer Genexpression, Transaktivierung und Zellmenge untersucht worden.

In diesem Kapitel wurden nun abschließend die Effekte der CpG-getragenen TLR9-Stimulation im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu, die in den Kapiteln 4.2 und 4.4 dargestellt worden waren, aufgeführt und vergleichend gegenübergestellt.

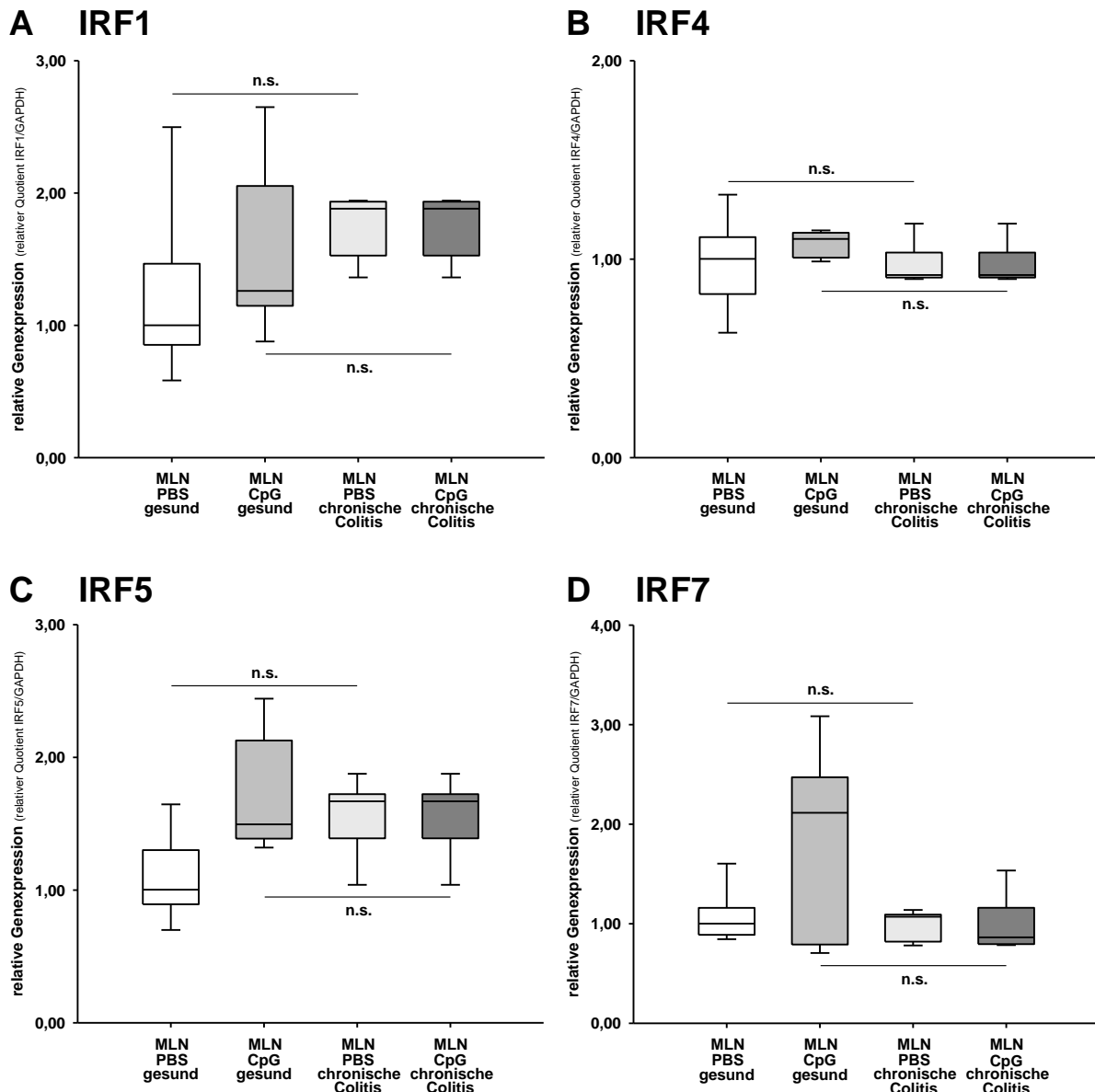
### **4.5.1 Vergleich mittels TaqMan<sup>®</sup> Real-Time-PCR**

In einem ersten Schritt wurden die Milieu-abhängigen Effekte der TLR9-Stimulation auf die Genexpression untersucht. Mittels qRT-PCR wurden dazu MLN-RNA-Lysate aus je fünf CpG-behandelten C57BL/6 wt Mäusen, die vor CpG-Behandlung entweder gesund oder an einer chronischen DSS-Colitis erkrankt waren, verglichen. Als Kontrolle dienten PBS-behandelte gesunde respektive chronisch DSS-entzündete Tiere.

#### **4.5.1.1 Effekt der CpG-vermittelten TLR9-Stimulation auf die Expression von IRF-Genen im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu**

Zunächst wurde die Expression von IRF-Genen bei CpG-vermittelter TLR9-Stimulation im gesunden respektive im chronisch erkrankten Milieu miteinander verglichen.

Für das IRF1-, IRF4-, IRF5- und IRF7-Gen war in den MLN-Zellen sowohl unter CpG-Stimulation als auch unter PBS-Kontrollbehandlung kein signifikanter Unterschied auf Expressionsebene zwischen gesunden und chronisch erkrankten wt C57BL/6-Mäusen nachweisbar. In Tendenz zeigte sich jedoch in den gesunden Tieren unter CpG-Behandlung ein Induktionseffekt in allen untersuchten IRF-Genen im Vergleich zur PBS-Kontrollbehandlung, wohingegen in den chronisch erkrankten Tieren dieser CpG-induzierte Effekt auf die IRF-Genexpression ausblieb (Abb. 4.5.1.1 A - D).

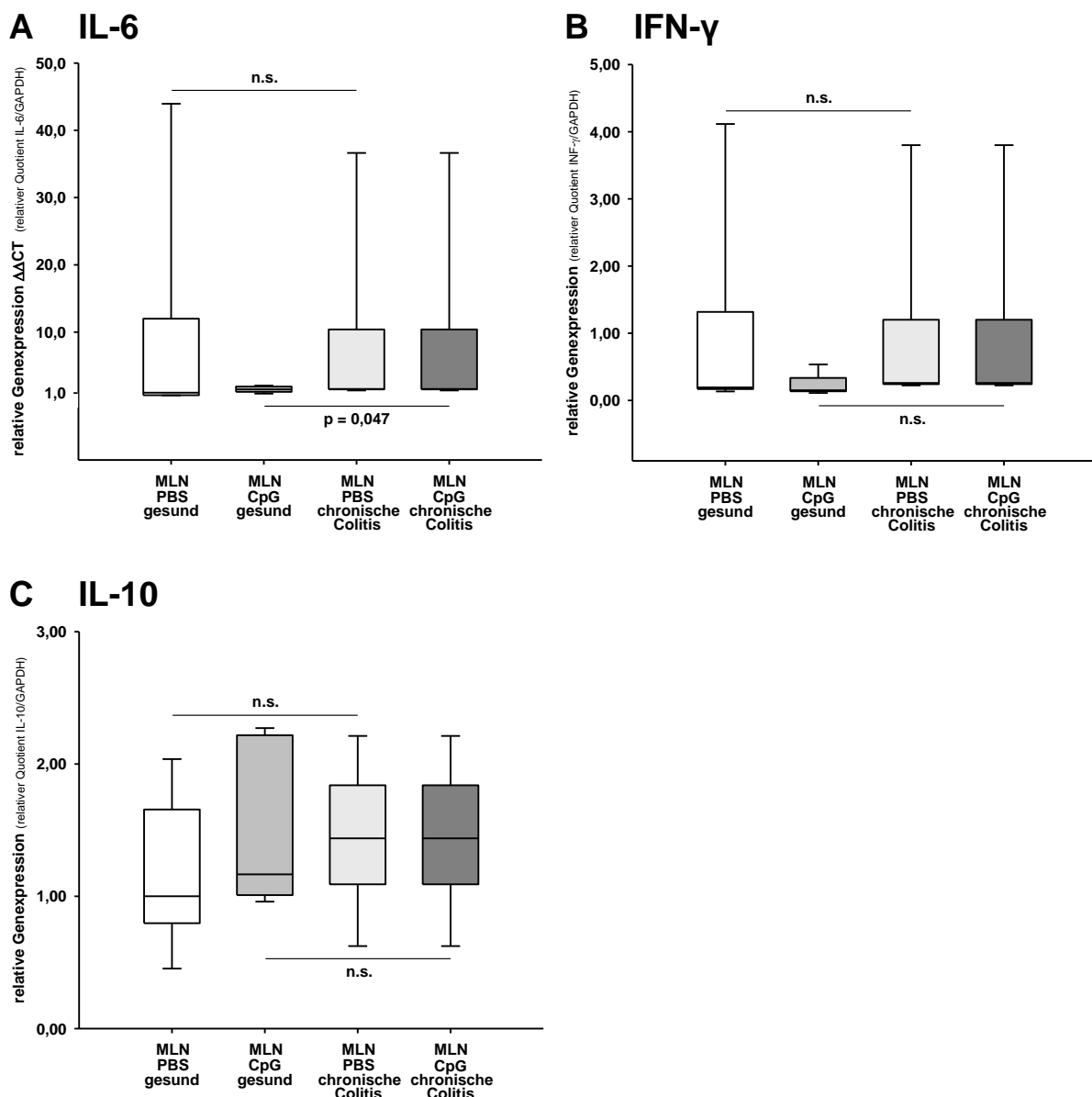


**Abbildung 4.5.1.1:** Die Expression ausgewählter IRF-Gene nach TLR9-Stimulation im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu. RNA-Lysate aus MLN-Zellisolaten von wt C57BL/6 Mäusen, die im gesunden Zustand oder im Zustand einer chronischen DSS-Colitis mit CpG-ODN behandelt worden waren, wurden mittels TaqMan®-Real-Time-PCR hinsichtlich der relativen Expression der Gene für (A) IRF1, (B) IRF4, (C) IRF5 und (D) IRF7 verglichen. Die dargestellten Werte der Zielgene (relative Genexpression) sind stets auf das jeweilige Referenzgen (GAPDH) bezogen und in Relation zum Median der Genexpression in den gesunden PBS-behandelten Versuchstieren aufgetragen. n = 5.

#### 4.5.1.2 Effekt der CpG-vermittelten TLR9-Stimulation auf die Expression von Genen pro- und antiinflammatorischer Zytokine im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu

Im Folgenden wurde die Expression ausgewählter Zytokingene bei CpG-vermittelter TLR9-Aktivierung im Zustand der Gesundheit und im Zustand der DSS-induzierten chronischen Colitis direkt gegenübergestellt und miteinander verglichen.

Die CpG-Behandlung chronisch DSS-entzündeter Versuchstiere führte in den MLN-Zellen zu einer signifikant höheren ( $p = 0,047$ ) Expression des IL-6-Gens im Vergleich zu der CpG-Behandlung gesunder Tiere (Abb. 4.5.1.2 A). Hinsichtlich der Expression des IFN- $\gamma$ - und IL-10-Gens zeigten sich keine nennenswerten Unterschiede zwischen der CpG-Behandlung chronisch entzündeter Mäuse und der CpG-Behandlung gesunder Mäuse (Abb. 4.5.1.2 B und C). Die PBS-behandelten Kontrollen zeigten bei allen drei untersuchten Zytokinen keine relevanten Unterschiede zwischen gesundem und chronisch entzündlichem Milieu (Abb. 4.5.1.2 A - C).



**Abbildung 4.5.1.2:** Die Expression von Genen pro- und antiinflammatorischer Zytokine nach TLR9-Stimulation im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu. RNA-Lysate aus MLN-Zellisolaten von wt C57BL/6 Mäusen, die im gesunden Zustand oder im Zustand einer chronischen DSS-Colitis mit CpG-ODN behandelt worden waren, wurden mittels TaqMan<sup>®</sup> Real-Time-PCR hinsichtlich der relativen Expression der Gene der proinflammatorischen Zytokine (A) IL-6 und (B) IFN- $\gamma$  sowie des antiinflammatorischen Zytokins (C) IL-10 verglichen. Die dargestellten Werte der Zielgene (relative Genexpression) sind stets auf das jeweilige Referenzgen (GAPDH) bezogen und in Relation zum Median der Genexpression in den gesunden PBS-behandelten Versuchstieren aufgetragen.  $n = 5$ .

#### **4.5.2 Vergleich mittels Transkriptionsfaktor-Aktivierungsassays - CREB-, NF- $\kappa$ B- und IRF7-Aktivität bei CpG-vermittelter TLR9-Stimulation im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu**

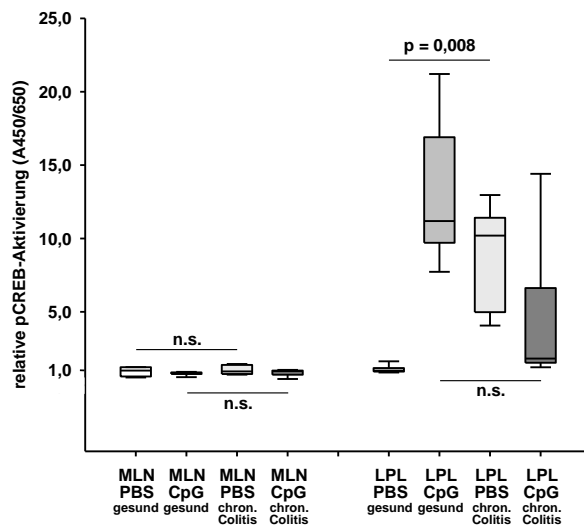
In einem zweiten Schritt wurde die Transaktivierung von pCREB, NF- $\kappa$ B (p65) und IRF7 in Zellkernen von MLN- und LPL-Zellisolationen aus je fünf CpG-behandelten C57BL/6 wt Mäusen im gesunden Zustand und im Zustand der chronischen DSS-Colitis verglichen. Als Kontrolle wurden je fünf PBS-behandelte gesunde respektive chronisch DSS-induzierte C57BL/6 wt Mäuse herangezogen.

Dabei zeigte sich in den MLN- und LPL-Isolaten CpG-behandelter Mäuse zwischen dem gesunden und dem chronisch DSS-induzierten Zustand kein relevanter Unterschied in der pCREB-DNA-Bindungsaffinität (Abb. 4.5.2 A). In den MLN-Zellen waren auch innerhalb der beiden PBS-Kontrollen keine nennenswerten Unterschiede sichtbar. Die LPL-Isolate PBS-behandelter Tiere mit chronischer DSS-Colitis zeigten hingegen ein signifikant höheres ( $p = 0,008$ ) pCREB-DNA-Bindungsvermögen als die LPL-Isolate PBS-behandelter gesunder Tiere (Abb. 4.5.2 A). Die DNA-Bindungsaffinität von NF- $\kappa$ B (p65) war in MLN-Zellen gesunder und chronisch DSS-entzündeter Versuchstiere sowohl nach PBS- als auch nach CpG-Behandlung unverändert (Abb. 4.5.2 B). In den LPL-Zellen hingegen führte die TLR9-Aktivierung im chronisch entzündlichen Milieu zu einer signifikant schwächeren ( $p = 0,001$ ) DNA-Bindung von RelA/p65 als die TLR9-Stimulation im gesunden Milieu. Die PBS-Behandlung der Versuchstiere im chronisch entzündlichen Milieu mündete hingegen in einer signifikant stärkeren ( $p = 0,008$ ) RelA/p65-DNA-Bindung als die PBS-Behandlung im gesunden Milieu (Abb. 4.5.2 B). Im Vergleich zum gesunden Milieu war das Verhältnis der pCREB-DNA-Bindungsaffinität zur RelA/p65-DNA-Bindungsaffinität somit nach CpG-Behandlung im chronisch entzündlichen Milieu in den LPL-Zellkernextrakten unverändert. Die pCREB/NF- $\kappa$ B-Transaktivierungsrate unter PBS-Kontrollbehandlung im chronisch entzündlichen Milieu war in den LPL-Isolaten hingegen signifikant ( $p = 0,001$ ) in Richtung der pCREB-Transaktivierung verschoben, verglichen mit der PBS-Kontrollbehandlung im gesunden Milieu (Abb. 4.5.2 D). In den MLN-Zellkernen zeigten sich hierbei zwischen dem gesunden und dem chronisch entzündlichen Milieu weder unter PBS- noch unter CpG-Behandlung relevante Unterschiede in der pCREB/NF- $\kappa$ B-Transaktivierungsrate (Abb. 4.5.2 D). Die MLN-Zellen chronisch erkrankter und gesunder Versuchstiere zeigten unter CpG-

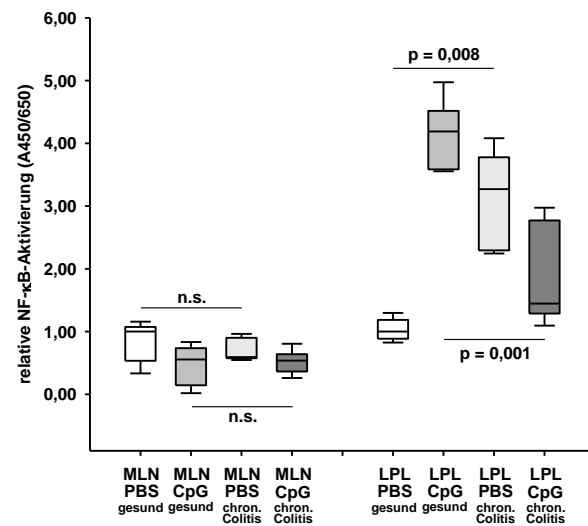


und PBS-Behandlung keine nennenswerten Differenzen im IRF7-DNA-Bindungsvermögen (Abb. 4.5.2 C). Der Vergleich der CpG-Behandlung im gesunden Milieu und im chronisch entzündlichen Milieu zeigte auch in den LPL-Zellen keine relevanten Unterschiede im Hinblick auf die IRF7-DNA-Bindungsaffinität, wohingegen unter PBS-Kontrollbehandlung die IRF7-DNA-Bindungsaffinität im gesunden Milieu signifikant höher ( $p < 0,001$ ) war als im chronisch entzündlichen Milieu (Abb. 4.5.2 C).

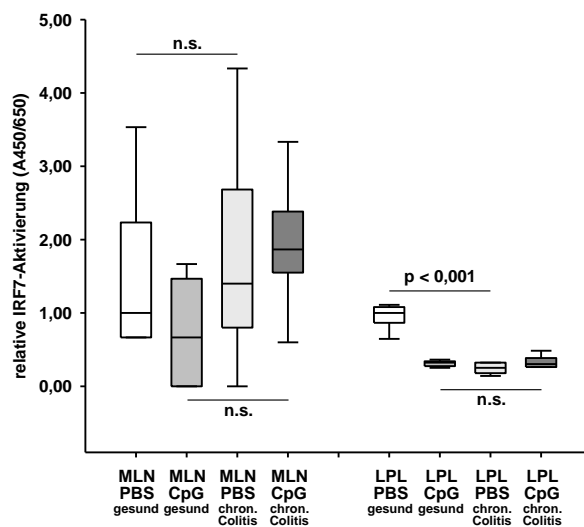
### A phospho-CREB (Ser133)



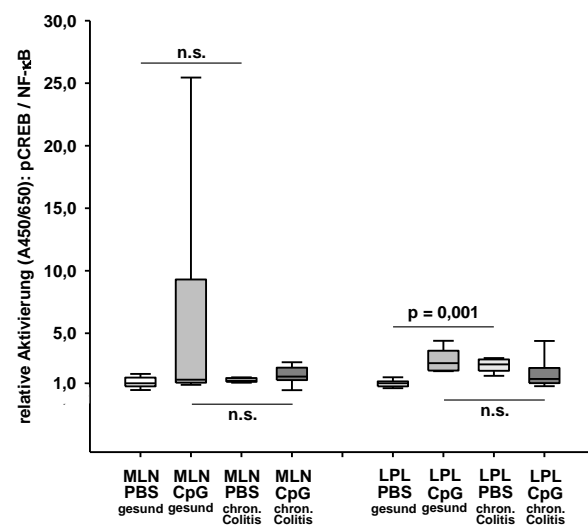
### B NF- $\kappa$ B (p65)



### C IRF7



### D pCREB/NF- $\kappa$ B-Ratio



**Abbildung 4.5.2: Die DNA-Bindungsaffinität von aktiviertem CREB, NF- $\kappa$ B und IRF7 nach TLR9-Stimulation im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu.** Zellkernextrakte aus MLN- und LPL-Isolaten von wt C57BL/6 Mäusen, die im gesunden Zustand oder im Zustand einer chronischen DSS-Colitis mit CpG-ODN behandelt worden waren, wurden mittels TransAM<sup>®</sup>-Assays hinsichtlich der DNA-Bindungsaffinität von (A) pCREB (Ser133), (B) NF- $\kappa$ B (RelA/p65) und (C) IRF7 untersucht. Alle Messwerte wurden nach Abzug des entsprechenden Leerwertes auf die dazugehörige Positivkontrolle bezogen. Die dargestellten Werte entsprechen der DNA-Bindungsaffinität (relative Aktivierung) und sind stets in Relation zum Median der DNA-Bindungsaffinität im jeweiligen Gewebetyp der gesunden PBS-behandelten Versuchstiere aufgetragen. Die relative Aktivierung von pCREB und NF- $\kappa$ B (RelA/p65) wurde anschließend in das entsprechende Verhältnis zueinander gesetzt und auf den Median der pCREB/NF- $\kappa$ B-Ratio der PBS-behandelten Versuchstiere bezogen (D). n = 5.

### 4.5.3 Vergleich mittels Western Blot

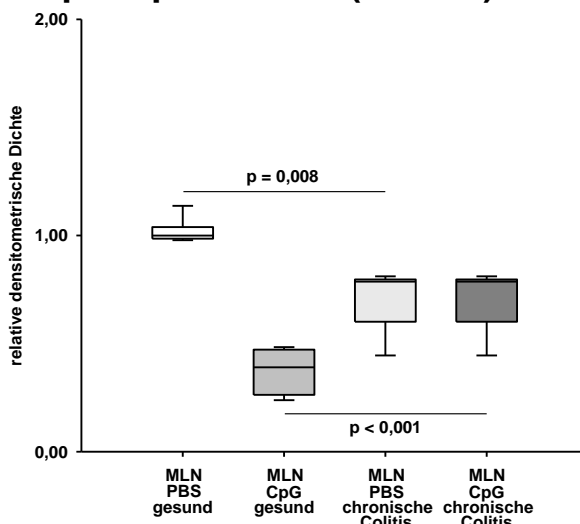
Abschließend wurden die Milieu-abhängigen Effekte der CpG-Stimulation auf Transduktionsebene analysiert. Hierfür wurden MLN-Lysate von je fünf CpG-behandelten C57BL/6 wt Mäusen im gesunden respektive DSS-induzierten Zustand hinsichtlich des Zellgehalts an ausgewählten Signalmolekülen im Immunoblot verglichen. Je fünf PBS-behandelte gesunde respektive chronisch erkrankte Tiere stellten die Kontrolle.

#### 4.5.3.1 Effekt der CpG-vermittelten TLR9-Stimulation auf die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu

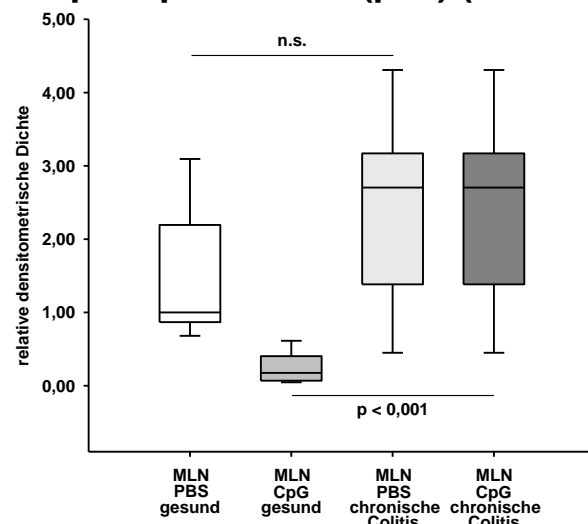
Zunächst wurde die CpG-Behandlung im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu hinsichtlich der MLN-Zellmenge an pCREB, pNF- $\kappa$ B (p65) sowie IRF7 verglichen.

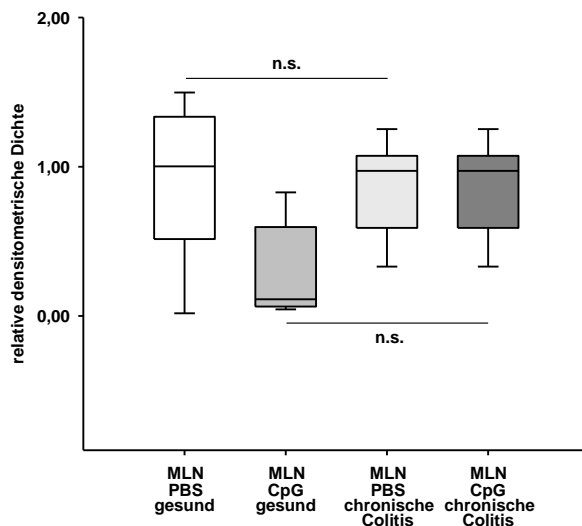
In den MLN-Zellen führte die CpG-Behandlung im Zustand der chronischen DSS-Colitis zu einem signifikant höheren ( $p < 0,001$ ) pCREB-Zellgehalt als die im gesunden Zustand, wohingegen die PBS-Behandlung im chronisch erkrankten Milieu mit einer signifikant geringeren ( $p = 0,008$ ) Menge an pCREB einherging als die im gesunden Milieu (Abb. 4.5.3.1 A). Ebenso war der NF- $\kappa$ B-Gehalt in den MLN-Zellen bei der CpG-Behandlung während der DSS-Colitis signifikant höher ( $p < 0,001$ ) als bei der im gesunden Zustand (Abb. 4.5.3.1 B). Eine TLR9-Aktivierung im chronisch entzündlichen Milieu führte in den MLN-Zellen hingegen zu keinen nennenswerten Unterschieden in der IRF7-Zellmenge im Vergleich zur CpG-Behandlung im gesunden Milieu (Abb. 4.5.3.1 C). Für pNF- $\kappa$ B und IRF7 zeigten sich dabei innerhalb der PBS-Kontrollen keine relevanten Zellmengenunterschiede (Abb. 4.5.3.1 B und C).

#### A phospho-CREB (Ser133)



#### B phospho-NF- $\kappa$ B (p65) (Ser536)



**C IRF7**

**Abbildung 4.5.3.1: Der Zellgehalt an pCREB, pNF- $\kappa$ B und IRF7 in Gesamtzelllysate von wt C57BL/6 Mäusen nach TLR9-Stimulation im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu.** Die einzelnen Proteinkomponenten der Gesamtzelllysate aus MLN-Zellisolaten von wt C57BL/6 Mäusen, die im gesunden Zustand oder im Zustand einer chronischen DSS-Colitis mit CpG-ODN behandelt worden waren, wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot der Immundetektion zugänglich gemacht. Die Immundetektion von (A) pCREB (Ser133), (B) pNF- $\kappa$ B (RelA/p65) (Ser536) und (C) IRF7 erfolgte mit spezifischen Antikörpern und einer Chemolumineszenzreaktion. Alle erhaltenen Lumineszenzsignale wurden densitometrisch quantifiziert und auf die jeweilige Ladungskontrolle ( $\beta$ -Actin) bezogen. Die dargestellten Werte (relative densitometrische Dichte) stellen ein Maß für die in der Zelle enthaltene Menge des zu untersuchenden Proteins dar und sind stets in Relation zum Median der densitometrischen Dichte in den gesunden PBS-behandelten Versuchstieren aufgetragen. n = 5.

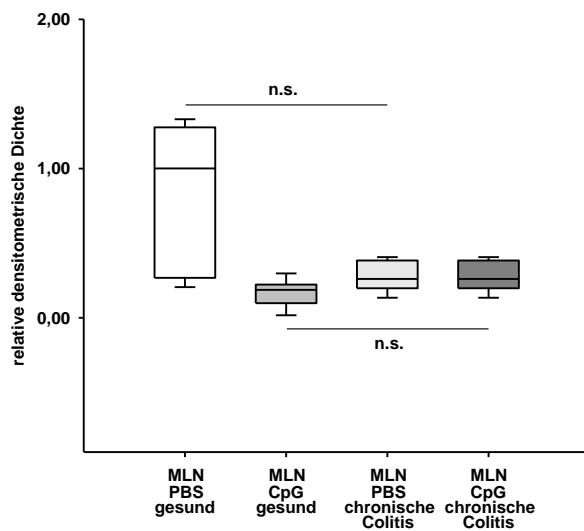
#### 4.5.3.3 Effekt der CpG-vermittelten TLR9-Stimulation auf die Aktivierung von Proteinkinasen im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu

Zum Abschluss wurde der Zellgehalt an p-p38 MAPK, pAkt, totaler GSK3- $\beta$  und pGSK3- $\beta$  in den MLN-Zellen von CpG-behandelten C57BL/6 wt Mäusen im gesunden Milieu und im chronisch entzündlichen Milieu der DSS-Colitis miteinander verglichen.

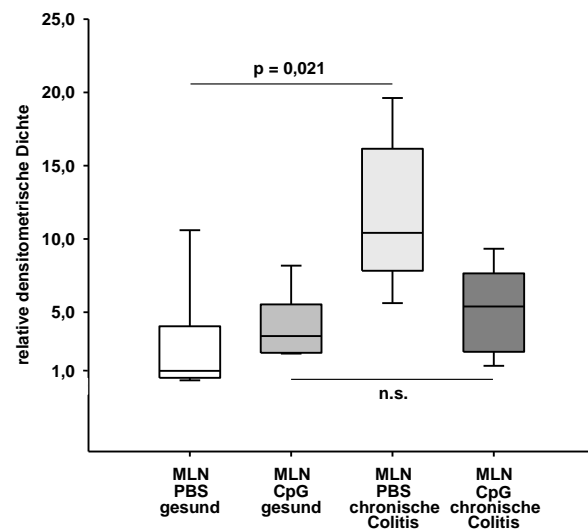
Die MLN-Zellen chronisch entzündeter Mäuse unterschieden sich hinsichtlich der Zellmenge an p-p38 MAPK weder unter CpG- noch unter PBS-Behandlung relevant von den gesunden Tieren (Abb. 4.5.3.2 A). Die Akt-Phosphorylierung war in den MLN-Zellen CpG-behandelter Tiere unabhängig vom Entzündungsstatus. Die PBS-Behandlung im chronisch entzündlichen Milieu ging jedoch mit einer signifikant höheren ( $p = 0,021$ ) pAkt-Menge einher als diejenige im gesunden Milieu (Abb. 4.5.3.2 B). Die Menge an totaler GSK3- $\beta$  war in den MLN-Zellen bei CpG-Behandlung im chronisch erkrankten Zustand signifikant höher ( $p = 0,008$ ) als bei derjenigen im gesunden Zustand, wohingegen diese bei PBS-Behandlung nicht vom Entzündungsstatus beeinflusst wurde. Der MLN-Zellgehalt an inaktivierter pGSK3- $\beta$  war bei CpG-Behandlung im chronisch entzündlichen Milieu signifikant höher ( $p =$

0,004) als bei derjenigen im gesunden Milieu. Hierbei zeigten sich keine nennenswerten Unterschiede innerhalb der beiden PBS-Kontrollen. Im chronisch entzündlichen Milieu war daher das MLN-Zellmengenverhältnis von pGSK3- $\beta$  zu Gesamt-GSK3- $\beta$  unter CpG-Behandlung signifikant ( $p = 0,001$ ) geringer als im gesunden Milieu. Unter PBS-Behandlung zeigten sich hierbei keine relevanten Unterschiede zwischen gesundem und chronisch entzündlichem Milieu (Abb. 4.5.3.2 C).

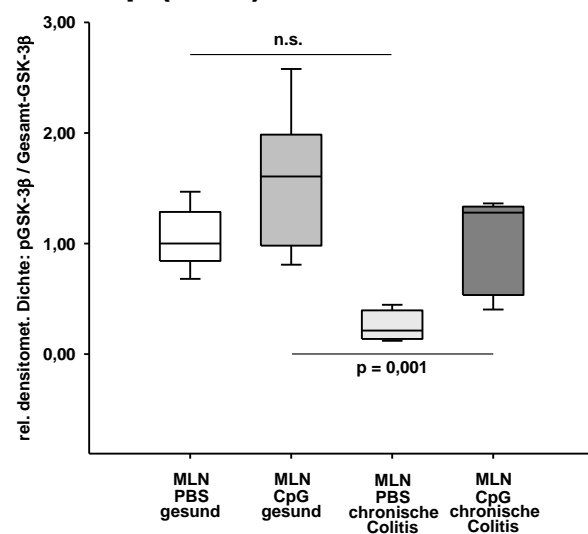
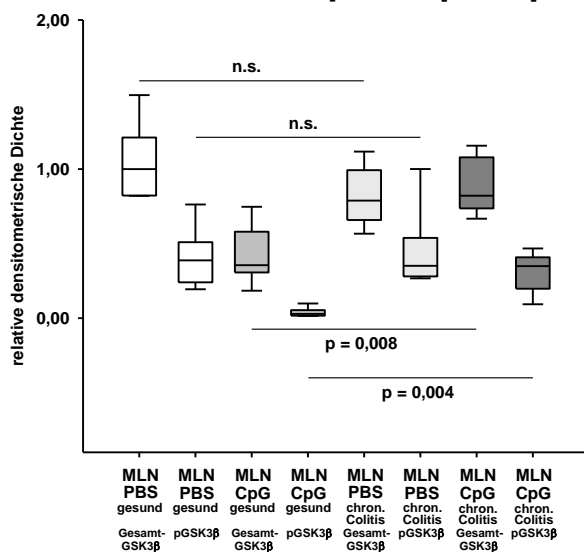
### A phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182)



### B phospho-Akt (Ser473)



### C Gesamt-GSK3- $\beta$ und phospho-GSK3- $\beta$ (Ser9)



**Abbildung 4.5.3.3: Der Zellgehalt an p-p38, pAkt, Gesamt-GSK3- $\beta$  und pGSK3- $\beta$  in Gesamtzelllysaten von wt C57BL/6 Mäusen nach TLR9-Stimulation im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu.** Die einzelnen Proteinkomponenten der Gesamtzelllysate aus MLN-Zellisolaten von wt C57BL/6 Mäusen, die im gesunden Zustand oder im Zustand einer chronischen DSS-Colitis mit CpG-ODN behandelt worden waren, wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot der Immundetektion zugänglich gemacht. Die Immundetektion von (A) p-p38 MAPK (Thr180/Tyr182), (B) pAkt (Ser473), (C) Gesamt-GSK3- $\beta$  und pGSK3- $\beta$  erfolgte mit spezifischen Antikörpern und einer Chemolumineszenzreaktion. Alle erhaltenen Lumineszenzsignale wurden densitometrisch quantifiziert und auf die jeweilige Ladungskontrolle ( $\beta$ -Actin) bezogen. Die dargestellten Werte (relative densitometrische Dichte) stellen ein Maß für die in der Zelle enthaltene Menge des zu untersuchenden Proteins dar und sind stets in Relation zum Median der densitometrischen Dichte in den gesunden PBS-behandelten Versuchstieren aufgetragen. Die relative densitometrische Dichte von pGSK3- $\beta$  und Gesamt-GSK3- $\beta$  wurde anschließend in das entsprechende Verhältnis zueinander gesetzt und auf den Median der pGSK3- $\beta$ /Gesamt-GSK3- $\beta$ -Ratio der PBS-behandelten Versuchstiere bezogen.  $n = 5$ .

## 5 Diskussion

Ein definitiver Auslöser der CED konnte bis dato nicht identifiziert werden und somit bleibt die genaue Ätiologie und Pathogenese der CED trotz zahlloser neuer Erkenntnisse in den vergangenen Jahren noch weitgehend im Verborgenen.

Meilensteine in der CED-Forschung der vergangenen Jahre waren die Erkenntnisse, dass die lokale intestinale Flora eine wesentliche Voraussetzung sowohl für das Zustandekommen von CED (154 - 156) als auch für die Ausbildung einer protektiven Immunhomöostase (140, 180) darstellt.

Unmethylierte CpG-Motive - die immunstimulatorische Komponente bakterieller DNA - zeigen dabei vom Prinzip her ein ganz ähnliches dichotomes Verhalten wie die intestinale Flora. Dieses paradoxe Verhalten ist hierbei stark vom zugrunde liegenden Milieu abhängig. Im gesunden Milieu entfaltet eine CpG-Stimulation eine vornehmlich antiinflammatorische Wirkung, im chronisch entzündlichen Milieu hingegen eine vornehmlich proinflammatorische Wirkung (179, 182).

Literaturdaten belegen, dass sowohl für die Aufrechterhaltung von Toleranzmechanismen, als auch - unter bisher noch unklaren Umständen - für den Verlust der intestinalen Immunhomöostase PRR- und insbesondere TLR-abhängige Mechanismen von entscheidender Rolle zu sein scheinen (33, 37, 90, 140, 179, 180, 191, 192).

Derartig dichotome Effekte sind insbesondere beim TLR9 - der PRR für die Erkennung unmethylierter CpG-Motive (30, 90, 91) - in verschiedenen Publikationen bestätigt worden (140, 179, 181 - 183, 185, 187).

Über die Vorgänge auf Ebene der Signaltransduktion und Aktivierung von Signalmolekülen und Transkriptionsfaktoren, welche für diese dichotomen CpG/TLR9-Effekte verantwortlich sind, ist jedoch bis heute nur wenig bekannt.

Um diese Milieu-abhängige Modifikation der TLR9-Signaltransduktion zu untersuchen, wurde in der hier vorliegenden Arbeit die TLR9-abhängige Aktivierung von Transkriptionsfaktoren in intestinalen Immunzellen unter gesunden und chronisch entzündlichen Bedingungen verglichen.

## 5.1 Vergleich von gesunden wt und TLR9<sup>-/-</sup> Versuchstieren

Milz- und MLN-Zellen aus C57BL/6 Mäusen, denen ein intakter TLR9 fehlte, zeigten sowohl in Gesamtzelllysaten als auch in Zellkernextrakten eine signifikant erhöhte Menge an aktiviertem NF-κB im Western Blot. Da die Bedeutung von NF-κB für die Induktion einer proinflammatorischen Immunantwort in der Literatur mehrfach bestätigt wurde (31, 105, 107), scheint die TLR9-Defizienz in Milz- und MLN-Isolaten entzündungsförderliche Effekte nach sich zu ziehen. Auf Ebene der DNA-Bindungsaffinität von NF-κB zeigten sich jedoch in Milz- und MLN-Isolaten keine entsprechenden Effekte. In den LPL-Isolaten hingegen war die NF-κB-DNA-Bindungsaffinität bei TLR9-Defizienz zumindest in Tendenz erhöht. Dies deckt sich mit bereits kürzlich publizierten Daten aus unserer Arbeitsgruppe, in denen sich unter einer höheren Fallzahl von n = 10 ein entsprechendes, signifikantes Ergebnis in LPMZ gesunder wt BALB/c-Mäuse gezeigt hatte (223). Auf mRNA-Ebene wiederum zeigte der Verlust eines intakten TLR9 in den MLN-Zellen transgener C57BL/6 Mäuse eine signifikant erhöhte Expression des Gens von IRF7, welches für die IFN-α-Produktion und die Immunabwehr gegen virale Krankheitserreger eine Rolle spielt (30, 123, 124).

Die DNA-Bindungsaffinität von aktiviertem CREB war in den Zellkernextrakten von Milz- und MLN-Isolaten aus TLR9<sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäusen signifikant geringer als in denen von wt C57BL/6 Mäusen. In LPL-Isolaten wurden derartige Unterschiede jedoch nicht sichtbar. Dies liegt möglicherweise an der relativ geringen Fallzahl von n = 8. In einer entsprechenden Untersuchung aus unserer Arbeitsgruppe an BALB/c-Mäusen mit einer höheren Fallzahl hatte sich jedoch auch in LPMZ-Zellen unter TLR9-Defizienz eine signifikant geringere pCREB-DNA-Bindungsaffinität gezeigt (223). CREB wird in der Literatur als kritische Komponente der antiinflammatorischen IL-10-Produktion beschrieben (121, 122), was wiederum die Beobachtung unterstreicht, dass der Verlust einer physiologischen CpG/TLR9-Interaktion die Transkriptionsfaktoraktivierung zu einem proinflammatorisch dominiertem Phänotyp verschiebt. Auf Proteinebene hingegen zeigte sich in den Milz- und MLN-Gesamtzelllysaten von TLR9<sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäusen ein signifikant erhöhter Zellgehalt an pCREB im Western Blot. Dies steht im Widerspruch zu den oben genannten Beobachtungen in den Transkriptionsfaktor-Aktivitätsassays mit den Milz- und MLN-Zellkernisolaten. Bei den Western-Blot-Untersuchungen wurde jedoch der Gehalt an

pCREB in Gesamtzelllysaten bestimmt. Somit lassen diese Daten keine Aussagen über die Zellkernmenge von pCREB zu. Die pCREB-Zellkernmenge ist jedoch von größerer Relevanz, da pCREB zur Entfaltung seiner Funktion als Transkriptionsfaktor im Zellkern in unmittelbarer Nähe zur DNA lokalisiert sein muss. Die entsprechenden Western-Blot-Untersuchungen der Zellkernextrakte, welche auch bei den pCREB-Transkriptionsfaktor-Aktivitätsassays Verwendung fanden, zeigten hinsichtlich der pCREB-Menge dabei keine Unterschiede zwischen TLR9<sup>-/-</sup> und wt C57BL/6 Mäusen. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass sich bei den Untersuchungen der Gesamtzell- und Zellkernextrakte mittels Western Blot die Versuchstiergruppen nur aus je drei C57BL/6 Mäusen zusammensetzte, sodass bei einer Fallzahl von n = 3 keine verlässliche statistische Auswertung möglich ist. Auf mRNA-Ebene zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression des IL-10-Gens in den Milz- und MLN-Zellen von TLR9<sup>-/-</sup> im Vergleich zu wt C57BL/6 Mäusen. In Anbetracht der wichtigen Rolle von CREB für die IL-10-Produktion (121, 122), stehen diese Ergebnisse im Einklang mit den Beobachtungen bei den Western-Blot-Untersuchungen des pCREB-Zellgehalts in Gesamtzelllysaten. Ein Fehlen der physiologischen CpG/TLR9-Interaktion im gesunden Milieu scheint demnach auch zu einer Erhöhung der Genexpression des antiinflammatorischen IL-10 zu führen und spiegelt möglicherweise das Resultat einer aufwendigen Gegenregulation gegen das Dominieren der proinflammatorischen Veränderungen bei Verlust eines intakten TLR9 im gesunden Milieu wider.

Bezüglich der drei Proteinkinasen p-p38 MAPK, p-p44/42 MAPK (Erk1/2) und pAkt, welche allesamt in der TLR9-Signaltransduktion eine Rolle bei der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B, AP-1 und CREB spielen (38, 43, 105 - 107, 111, 116, 117), zeigten sich auf Gesamtzellproteinebene keine richtungsweisenden Veränderungen unter TLR9-Defizienz. Jedoch ist zu berücksichtigen, dass hierbei Phosphorylierungsereignisse in der Signaltransduktion in Gesamtzelllysaten von Milz- und MLN-Gewebe bestimmt wurden. Eventuelle Unterschiede, die in einzelnen spezifischen Zellpopulationen bestehen, können damit nicht erfasst werden. Ebenfalls können Phosphorylierungserscheinungen in der Signaltransduktion generell auch transientser Natur sein und wurden somit möglicherweise ebenso nicht erfasst.

Alles in allem ergab der durchgeführte Vergleich zwischen wt und TLR9<sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäusen Hinweise darauf, dass die physiologische CpG/TLR9-Interaktion im gesunden Milieu eine wichtige Funktion in der Aufrechterhaltung der intestinalen Immunhomöostase innezuhaben scheint. Diese Erkenntnis steht somit in Einklang mit kürzlich publizierten Daten aus unserer Arbeitsgruppe, die nahelegen, dass die Interaktion von TLR9 und bakterieller DNA offensichtlich notwendig ist, um antiinflammatorische Gegenregulationsmechanismen anzustoßen und das intestinale Immungleichgewicht zu wahren (223).

## 5.2 Stimulation des TLR9 in gesunden wt Versuchstieren

Untersuchungen in zahlreichen Tiermodellen belegen, dass eine CpG-vermittelte TLR9-Aktivierung im gesunden Milieu einen ausgeprägt antiinflammatorischen Effekt auf eine im späteren Verlauf induzierte Colitis anstößt (179, 182). Dieser schützende Effekt geht mit einer erniedrigten IFN- $\gamma$ - und einer erhöhten IL-10-Produktion während einer induzierten Colitis einher und scheint von einer TLR9-abhängigen Induktion regulatorischer T-Zellen getragen zu sein (89, 179, 182, 187, 188).

Von den unmittelbaren Auswirkungen einer CpG-vermittelten TLR9-Aktivierung in gesunden Versuchstieren im nicht-entzündlichen Milieu ist hingegen wenig bekannt.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die CpG-vermittelte TLR9-Aktivierung im gesunden, nicht-entzündeten Milieu zu einer Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren führt. Diese Transkriptionsfaktoraktivierung fällt dabei in Abhängigkeit vom untersuchten Gewebetyp unterschiedlich aus.

Eine CpG-Behandlung führte auf Proteinebene in den MLN-Zellen von gesunden wt C57BL/6 Mäusen gegenüber den PBS-Kontrollen zu einer signifikant erniedrigten Gesamtzellmenge an aktiviertem NF- $\kappa$ B. In den LPL-Zellkernisolaten hingegen ging die CpG-Behandlung gesunder Versuchstiere mit einer signifikant erhöhten NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaffinität gegenüber den PBS-behandelten Tieren einher. Entsprechende Effekte bezüglich der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaffinität zeigten sich in den MLN-Zellkernisolaten dabei nicht. Die Stimulation mit CpG-Motiven im gesunden Milieu induziert somit je nach zugrunde liegendem Gewebe dichotome Effekte



bezüglich der Aktivierung von NF- $\kappa$ B, welches als Schlüsselmolekül in der proinflammatorischen Immunantwort gilt (224).

Ähnliche gewebeabhängige Effekte zeigten sich auch bei der CREB-Aktivierung, welche ihrerseits wiederum als zentraler Schritt der antiinflammatorischen IL-10-Produktion gilt (121, 122): Auf Proteinebene führte die CpG-Behandlung im gesunden Milieu zu einem signifikant erniedrigten MLN-Gesamtzellgehalt an aktiviertem CREB gegenüber der PBS- und GpG-Kontrolle. Passend zu diesem Befund war auch der MLN-Gesamtzellgehalt an phosphorylierter p38 MAPK, welche eine Rolle in der TLR9-abhängigen Phosphorylierung und Aktivierung von CREB spielt (111, 225), unter CpG-Behandlung signifikant niedriger als unter PBS- oder GpG-Behandlung. Auf Ebene der pCREB-Transaktivierung war das DNA-Bindungsvermögen von pCREB in den LPL-Zellkernisolaten bei CpG-Behandlung im gesunden Milieu hingegen signifikant höher als bei PBS-Kontrollbehandlung. In den MLN-Zellkernisolaten waren bezüglich der pCREB-DNA-Bindungsaffinität wiederum keine entsprechenden Effekte sichtbar.

Die Stimulation mit CpG-Motiven in gesunden C57BL/6 Mäusen führte somit in den MLNs, deren Lymphfollikel zusammen mit den Peyer-Plaques als Induktionsort der intestinalen Immunantwort gelten (11), zu einer gleichermaßen verringerten Aktivierung sowohl von NF- $\kappa$ B als auch von CREB. In den Zellisolaten der Lamina propria, welche ihrerseits als Effektorort der intestinalen Immunantwort gilt (12), führte die CpG-Stimulation in gesunden C57BL/6 Mäusen hingegen zu einer deutlich erhöhten Transaktivierung sowohl von NF- $\kappa$ B als auch von CREB. In den Milzzellen blieb die CpG-Stimulation gesunder C57BL/6 Mäuse ohne relevante Auswirkungen auf die NF- $\kappa$ B- und CREB-Aktivierung.

Die CpG-vermittelte Transaktivierung von CREB in den LPL-Isolaten war jedoch deutlich stärker ausgeprägt als diejenige von NF- $\kappa$ B. Eine CpG-Behandlung im gesunden Milieu scheint somit zumindest in der Lamina propria ein Überwiegen der antiinflammatorischen CREB-Transaktivierung zu begünstigen.

Ob diese CpG-Effekte bezüglich der Transaktivierung von NF- $\kappa$ B und CREB in den LPL-Zellkernisolaten jedoch tatsächlich ausschließlich über eine CpG-vermittelte Aktivierung des TLR9 vermittelt ablaufen, kann abschließend nicht geklärt werden, denn auch die GpG-Kontrollbehandlung induzierte gegenüber der PBS-

Kontrollbehandlung signifikante Effekte, die in Qualität und Ausmaß denen der CpG-Behandlung glichen. Dies könnte möglicherweise ein Hinweis darauf sein, dass diese Effekte in Teilen auch durch einen unspezifischen Einfluss des Phosphorothioat-Rückgrats zustande kommen, welches sich die verwendeten CpG- und GpG-Motive teilen und welches in früheren Publikationen bereits eine immunstimulatorische Eigenkomponente zeigte (72, 79).

Ein wichtiges Regulatorprotein, welches in der TLR9-Signaltransduktion zwischen „proinflammatorischer“ NF- $\kappa$ B- und „antiinflammatorischer“ CREB-Dominanz vermittelt, ist die GSK3- $\beta$  (121). Der prozentuale Anteil der pGSK3- $\beta$ -Zellmenge an der gesamten GSK3- $\beta$ -Zellmenge sank in den MLN-Gesamtzelllysaten unter CpG-Behandlung in gesunden wt C57BL/6 Mäusen signifikant gegenüber der PBS-respektive GpG-Kontrollbehandlung. Von der konstitutiv aktiven GSK3- $\beta$  ist dabei aus zahlreichen Publikationen bekannt, dass sie - unter Beteiligung von CBP/p300 - die RelA/p65-abhängige Transkription von Zielgenen fördert (121, 197). Die phosphorylierte Form der GSK3- $\beta$  hingegen ist inaktiviert und unterstützt - ebenfalls unter Beteiligung von CBP/p300 - die CREB-abhängige Transkription von Zielgenen (121, 193). Zusammengefasst war in der hier vorliegenden Arbeit die CpG-Stimulation von wt C57BL/6 Mäusen im gesunden Milieu in den MLN-Gesamtzelllysaten mit einer verringerten relativen GSK3- $\beta$ -Inaktivierung assoziiert. Ein entsprechendes Überwiegen des konstitutiv aktiven GSK3- $\beta$ -Anteils und der damit verbundenen Förderung der RelA/p65-abhängigen und gleichzeitigen Hemmung der CREB-abhängigen Transkription auf DNA-Bindungsebene ist möglicherweise wiederum dafür mitverantwortlich, dass die pCREB/NF- $\kappa$ B-Transaktivierungsrate in MLN-Zellen unter CpG-Behandlung im gesunden Milieu nicht wie in den LPL-Isolaten gegenüber der PBS-Behandlung angestiegen war. Dies ist möglicherweise auch einer der Gründe, warum zumindest auf mRNA-Ebene in den MLN-Zellen gesunder C57BL/6 Mäuse keine Unterschiede bezüglich der Expression pro- und antiinflammatorischer Zytokingene sichtbar wurden.

In den LPL-Isolaten kam es - neben einem Überwiegen der antiinflammatorischen CREB-Transaktivierung - unter CpG-Behandlung im gesunden Milieu auch zu einer signifikanten Erniedrigung der DNA-Bindungsaffinität von IRF7, welches als bedeutender Typ-I-IFN-Regulator ein wichtiges Molekül bei der proinflammatorischen Immunantwort gegen virale Pathogene darstellt (124). Dies unterstreicht die

Erkenntnis, dass die CpG-Behandlung im gesunden Milieu zumindest in der Lamina propria ein Überwiegen antiinflammatorischer Prozesse zu begünstigen scheint. In den MLN-Zellen kam es unter CpG-Behandlung hingegen zu einer erhöhten Expression des proinflammatorisch wirkenden IRF5-Gens.

### **5.3 Auswirkungen einer DSS-induzierten chronischen Colitis in wt Versuchstieren**

Zahlreiche Versuche mit diversen Mausmodellen legen nahe, dass das zugrunde liegende Milieu entscheidenden Einfluss auf die CpG-vermittelte TLR9-Signaltransduktion nehmen kann (179, 183, 184, 186, 187). Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass auch ohne eine gezielte TLR9-Stimulation essentielle Unterschiede zwischen dem gesunden Milieu und dem chronisch entzündlichen Milieu der DSS-induzierten Colitis auf Ebene der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren bestehen, die Ausdruck prinzipieller TLR9-unabhängiger Unterschiede je nach zugrunde liegendem Milieu sind.

In der Literatur ist belegt, dass die DSS-induzierte Colitis mit einer direkten physikalischen Aktivierung von Makrophagen und einer damit verbundenen T<sub>H</sub>1- und im späteren Verlauf auch T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-getragenen Immunantwort (161) sowie einer konsekutiven Bildung proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$  und TNF einhergeht (161, 226, 227). Die DSS-induzierte Etablierung einer Colitis ist dabei auch unter keimfreien Bedingungen möglich und somit zu gewissen Teilen von der lokalen mikrobiellen Darmflora unabhängig (161, 228, 229). Da die Phosphorylierung und Aktivierung von NF- $\kappa$ B einer der zentralen Schritte in der konsekutiven Bildung proinflammatorischer Zytokine ist (30, 31, 106, 224), stehen die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse, dass die chronische DSS-Colitis in wt C57BL/6 Mäusen zu einer signifikant erhöhten NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität in den LPL-Zellkernextrakten führt, im Einklang mit der in der Literatur beschriebenen Induktion proinflammatorischer Zytokine in der DSS-Colitis. Auch die Zellmenge an aktiviertem pNF- $\kappa$ B war in den MLN-Gesamtzelllysaten der Versuchstiere im Zustand der chronischen DSS-Colitis signifikant höher als im gesunden Zustand.

Obwohl eine Erhöhung der proinflammatorischen Zytokine wie IL-6 und TNF im Modell der DSS-induzierten Colitis in der Literatur gesichert ist (161, 226, 227),

zeigten sich in der hier vorliegenden Arbeit zumindest auf mRNA-Ebene in den MLN-Zellen keine signifikanten Unterschiede zwischen dem gesunden Milieu und dem chronisch entzündlichen Milieu der DSS-Colitis hinsichtlich der Expression der Gene für die proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IFN- $\gamma$ . Dies ist am ehesten durch die geringe Fallzahl von  $n = 5$  Tieren in den Versuchstiergruppen zu erklären, sodass die in der Tendenz sichtbaren Effekte keine Signifikanz erreichen. Außerdem wird die Produktion von Zytokinen nicht ausschließlich über die Menge an produzierter mRNA, sondern unter anderem auch über die Modifikation von mRNA-Stabilität, Translationsraten und posttranslationalen Prozessierungen gesteuert, sodass allein anhand der mRNA-Menge nicht umfassend auf die tatsächliche Menge an produzierten Zytokinen geschlossen werden kann.

In der Literatur wurde des Weiteren beschrieben, dass es während einer DSS-induzierten Colitis auf mRNA-Ebene auch zu einer erhöhten Expression des Gens für das antiinflammatorisch wirkende IL-10 kommen kann (226). Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass in chronisch DSS-entzündeten Versuchstieren die pCREB-Zellmenge in den MLN-Gesamtzelllysaten signifikant höher war als in gesunden Versuchstieren, denn CREB gilt als kritische Komponente der IL-10-Produktion (121, 122). Auch die pCREB-DNA-Bindungsaffinität war sowohl in den MLN- als auch in den LPL-Zellkernextrakten der chronisch DSS-entzündeten Versuchstiere signifikant höher als in den der gesunden Versuchstiere.

Die Transaktivierung von pCREB war im chronisch entzündlichen Milieu dabei sowohl in den MLN- als auch in den LPL-Zellkernextrakten wesentlich stärker ausgeprägt als die Transaktivierung von NF- $\kappa$ B. Dieses Überwiegen der pCREB-Transaktivierung im chronisch entzündlichen Milieu der DSS-Colitis gegenüber dem gesunden Milieu ist dabei möglicherweise über die Regulation der GSK3- $\beta$  vermittelt. In der hier vorliegenden Arbeit war der Zellgehalt an pGSK3- $\beta$  in den MLN-Gesamtzelllysaten der chronisch DSS-entzündeten Versuchstiere signifikant größer als in den der gesunden Versuchstiere, wohingegen der Zellgehalt an Gesamt-GSK3- $\beta$  in den MLN-Gesamtzelllysaten der chronisch DSS-entzündeten und der gesunden Versuchstiere konstant war. Dementsprechend war das Verhältnis der pGSK3- $\beta$  an der Gesamt-GSK3- $\beta$  in den MLN-Gesamtzelllysaten der chronisch DSS-entzündeten Versuchstiere signifikant größer als in den der gesunden Versuchstiere, sodass im chronisch entzündeten Milieu der DSS-Colitis die inaktive GSK3- $\beta$ -Form

dominiert und somit von einer Weichenstellung in Richtung der pCREB- gegenüber der NF- $\kappa$ B-Transaktivierung auszugehen ist.

Möglicherweise spricht diese verstärkte Transaktivierung von pCREB während der chronischen DSS-Colitis für einen Mechanismus antiinflammatorischer Gegenregulation. Dass eine solche Gegenregulation jedoch nicht effektiv genug und ausreichend ist, zeigte sich in der hier vorliegenden Arbeit daran, dass es auf mRNA-Ebene nicht zu einem Anstieg der IL10-Genexpression während der chronischen DSS-induzierten Colitis kam, was man parallel zur verstärkten CREB-Transaktivierung erwartet hätte. Auch hierbei sind wiederum die geringe Fallzahl von  $n = 5$  Versuchstieren und die Tatsache, dass die Zytokinproduktion neben der bloßen mRNA-Menge zusätzlich auch von den oben genannten Parametern abhängt, zu erwähnen, die in der Interpretation dieser Ergebnisse berücksichtigt werden müssen.

Die DNA-Bindungsaffinität von IRF7, welches eine wichtige Rolle in der Produktion von IFN- $\alpha$  spielt (30, 123, 124), war in den LPL-Zellkernextrakten chronisch DSS-entzündeter Versuchstiere signifikant geringer als in den LPL-Zellkernextrakten gesunder Versuchstiere, wobei sich derartige Effekte in den MLN-Zellkernextrakten nicht zeigten. In den MLN-Gesamtzelllysaten war im Gegensatz dazu die IRF7-Zellmenge in den chronisch erkrankten Mäusen signifikant höher als in den gesunden Pendants. Auch auf Genexpressionsebene zeigten die MLN-Zellen chronisch entzündeter Tiere einen signifikant höheren IRF7-mRNA-Gehalt als die gesunde Vergleichsgruppe. Somit zeigten sich für IRF7 Milieu-abhängige Unterschiede, die einerseits abhängig vom Gewebe und andererseits abhängig vom untersuchten Zellkompartiment divergent waren.

Neben IRF7 spielt auch IRF1 eine Rolle in der Typ-I-IFN-Produktion, in dem es die IFN- $\beta$ -Genexpression beeinflussen kann (30, 38, 127). Die Expression des Gens für IRF1 war auf mRNA-Ebene in den MLN-Zellen der chronisch DSS-entzündeten wt C57BL/6 Mäuse signifikant geringer als in den der gesunden wt C57BL/6 Mäuse. Die Effekte des chronisch entzündlichen Milieus der DSS-Colitis scheinen für IFN- $\alpha$  und - $\beta$  somit - zumindest in den MLN-Zellen - divergent auszufallen.

## 5.4 Stimulation des TLR9 in chronisch entzündeten wt Versuchstieren

In der Literatur ist belegt, dass die CpG-vermittelte TLR9-Stimulation im akut oder chronisch entzündlichen Milieu zu deutlich proinflammatorischen Effekten mit erhöhter Sekretion proinflammatorisch wirkender Zytokine wie IL-6 und IFN- $\gamma$  führt (179, 181, 182), sodass eine CpG-getragene TLR9-Aktivierung im entzündlichen Milieu als entscheidender Faktor zum Fortbestand und zur Exazerbation einer bereits etablierten chronischen Entzündung beiträgt (179, 181, 183). Die aktivierende Phosphorylierung von NF- $\kappa$ B stellt dabei einen der zentralen Schritte in der konsekutiven Bildung proinflammatorischer Zytokine dar (30, 31, 106, 224).

Passend dazu zeigte sich in der hier vorliegenden Arbeit in den MLN-Gesamtzelllysaten der CpG-behandelten wt C57BL/6 Mäusen eine gegenüber den GpG-behandelten Pendants signifikant erhöhte pNF- $\kappa$ B-Zellmenge während der chronischen DSS-Colitis. Für die proinflammatorisch wirkenden Zytokine IL-6 und IFN- $\gamma$  zeigte sich jedoch zumindest auf mRNA-Ebene der entsprechenden Gene in den MLN-Zellen keine signifikanten Unterschiede zwischen einer CpG-Behandlung und einer PBS- oder GpG-Kontrollbehandlung im entzündlichen Milieu der chronischen DSS-Colitis. Hierbei ist davon auszugehen, dass die geringe Fallzahl von  $n = 5$  Tieren dafür verantwortlich ist, dass die in Tendenz sichtbaren Unterschiede nicht das erforderliche Signifikanzniveau erreichen. Außerdem wird die Zytokinproduktion nicht ausschließlich über die produzierte mRNA-Menge, sondern unter anderem auch über die mRNA-Stabilität, die Translationsrate und die posttranslationalen Prozessierungen gesteuert, was in der hier vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde.

Auf Ebene der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaffinität waren in den MLN-Zellkernextrakten keine signifikanten Unterschiede zwischen der CpG-Behandlung und der GpG- und PBS-Kontrollbehandlung im chronisch entzündlichen Milieu erkennbar. In den LPL-Zellkernextrakten war die NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaffinität bei CpG-Behandlung der chronisch DSS-entzündeten Mäuse hingegen signifikant niedriger als bei PBS- oder GpG-Kontrollbehandlung. Dieses Ergebnis steht somit in deutlichem Kontrast einerseits zu der auf Proteinebene erhöhten pNF- $\kappa$ B-Zellmenge in den MLN-Gesamtzelllysaten und andererseits zu Literaturdaten, welche eine deutliche Erhöhung der Sekretion proinflammatorischer Zytokinen bei CpG-Behandlung im

chronisch entzündlichen Milieu der DSS-Colitis aufzeigen (179, 181, 182) und dabei die NF- $\kappa$ B-Aktivierung als zentrales Element in der Bildung proinflammatorischer Zytokine beschreiben (30, 31, 106, 224).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass in den LPL-Zellkernextrakten der CpG-behandelten chronisch DSS-entzündeten Mäuse auch die DNA-Bindungsaffinität von pCREB signifikant geringer war als in den entsprechenden Proben der PBS- oder GpG-behandelten Kontrolltiere. In den MLN-Zellkernextrakten und -Gesamtzelllysaten waren derartigen Unterschiede hingegen nicht sichtbar, sodass die Effekte einer CpG-Behandlung im chronisch entzündlichen Milieu hinsichtlich der CREB-getragenen Entzündungsregulation in dem hier verwendeten Mausmodell streng gewebespezifisch auf die Lamina propria beschränkt zu sein scheinen.

In Tendenz zeigte sich dabei, dass in den LPL-Zellkernextrakten der chronisch DSS-entzündeten Mäuse unter CpG-Behandlung das Gleichgewicht von CREB- zu NF- $\kappa$ B-getragener Genaktivierung in Richtung der „proinflammatorischen“ NF- $\kappa$ B-getragenen verschoben wird. Derartige Tendenzen zeigten sich in den MLN-Zellkernextrakten der entsprechenden Versuchstiere nicht. Die CpG-Behandlung im chronisch entzündlichen Milieu der DSS-Colitis scheint somit - zumindest in Tendenz - gewebeabhängig in den Zellen der Lamina propria eine „proinflammatorischer“ NF- $\kappa$ B-Dominanz bei der Genaktivierung zu begünstigen.

In den LPL-Zellkernextrakten der CpG-behandelten DSS-entzündeten Versuchstiere war darüber hinaus die DNA-Bindungsaffinität von IRF7 gegenüber den GpG-behandelten Pendanten signifikant erhöht, wohingegen in den MLN-Zellkernextrakten keine derartigen Tendenzen erkennbar waren. Da IRF7 als bedeutender Regulator der Typ-I-IFN-Produktion und somit als wichtiges Molekül bei der proinflammatorischen Immunantwort gegen virale Pathogene gilt (124), unterstreicht dieses Ergebnis die Erkenntnis, dass die CpG-Behandlung im chronisch entzündlichen Milieu proinflammatorische Effekte bezüglich der Genaktivierung gewebeabhängig in den LPL-Zellen anstößt.

## 5.5 Vergleich der Effekte der CpG-vermittelten TLR9-Stimulation im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu

Literaturdaten belegen, dass eine CpG-vermittelte TLR9-Aktivierung im gesunden Milieu einen ausgeprägt antiinflammatorischen Effekt auf eine im späteren Verlauf induzierte Colitis anstößt (179, 182), im entzündlichen Milieu hingegen zu deutlich proinflammatorischen Effekten mit erhöhter Sekretion proinflammatorisch wirkender Zytokine wie IL-6 und IFN- $\gamma$  führt (179, 181, 182).

Entsprechend zeigte sich in der hier vorliegenden Arbeit, dass unter CpG-Behandlung im entzündlichen Milieu der DSS-induzierten Colitis in den MLN-Zellen das proinflammatorische IL-6-Gen signifikant stärker exprimiert wurde als unter CpG-Behandlung im gesunden Milieu. Passend dazu war die Zellmenge an aktiviertem NF- $\kappa$ B in den MLN-Gesamtzelllysaten unter CpG-Behandlung im Zustand der chronischen DSS-induzierten Colitis deutlich höher als unter CpG-Behandlung im gesunden Zustand.

Im Hinblick auf die GSK3- $\beta$  war darüber hinaus erkennbar, dass es unter CpG-Behandlung im chronisch entzündlichen Milieu der DSS-Colitis zu einem signifikanten Überwiegen der unphosphorylierten GSK3- $\beta$ -Form verglichen mit der CpG-Behandlung im gesunden Milieu kam. Anhand des parallel durchgeführten Vergleichs PBS-behandelter gesunder und chronisch DSS-entzündeter Versuchstiere konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei mit hoher Wahrscheinlichkeit um CpG-spezifische Effekte handelt, da sich keine der oben genannten Effekte unter der PBS-Kontrollbehandlung zeigte.

Ein Überwiegen der konstitutiv aktiven GSK3- $\beta$  unter CpG-Behandlung im chronisch entzündlichen Milieu lässt gemäß den Literaturdaten eine Förderung der RelA/p65-abhängigen Transkription von Zielgenen und eine Hemmung derjenigen von pCREB erwarten (121, 197). Auf Ebene der DNA-Bindungsaffinität konnten in den MLN-Zellkernextrakten jedoch keine Unterschiede zwischen der CpG-Behandlung gesunder und der chronisch DSS-entzündeter Versuchstiere festgestellt werden. In den LPL-Zellkernextrakten war die CpG-Behandlung während der chronischen DSS-Colitis sogar mit einer signifikant niedrigeren NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaffinität vergesellschaftet als die CpG-Behandlung im gesunden Zustand der Versuchsmäuse. Dennoch kam es in den LPL-Zellkernextrakten unter CpG-Behandlung der



Versuchstiere im chronisch entzündlichen Milieu der DSS-Colitis zu einem tendenziellen Absinken der pCREB/NF- $\kappa$ B-Transaktivierungsrate im Vergleich zur CpG-Behandlung im gesunden Milieu. Dies spricht somit - zumindest in Tendenz - für ein Überwiegen der proinflammatorischen NF- $\kappa$ B-Transaktivierung unter CpG-Behandlung während einer chronischen DSS-Colitis, verglichen mit der CpG-Behandlung im gesunden Zustand. Dass die hier lediglich in Tendenz sichtbare NF- $\kappa$ B-Dominanz bei der Genaktivierung keine Signifikanz erreichte, ist möglicherweise der geringen Fallzahl von  $n = 5$  geschuldet, kann jedoch auch Ausdruck dafür sein, dass andere Regulatorproteine als die GSK3- $\beta$  zwischen „proinflammatorischer“ NF- $\kappa$ B- und „antiinflammatorischer“ CREB-Dominanz vermitteln.

Auf Ebene der MLN-Gesamtzelllysate kam es unter CpG-Behandlung während der chronischen DSS-Colitis zu einer signifikant höheren Zellmenge an pCREB als unter CpG-Behandlung im gesunden Zustand, wobei die Signalkaskade hierbei vermutlich über die p38 MAPK verläuft. In den MLN-Zellen der CpG-behandelten chronisch entzündeten Mäuse war die Gesamtzellmenge an aktivierter p38 MAPK nämlich ebenfalls tendenziell höher als in denjenigen der CpG-behandelten gesunden Mäuse. Dies steht in Einklang mit Literaturdaten, die zeigen, dass die Aktivierung von MAPKs wie p38 über MSK1 und 2 zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB führen kann (111, 225). Dass es sich bei den hier beschriebenen Ergebnissen aller Wahrscheinlichkeit nach ebenfalls um CpG-spezifische Effekte handelt, zeigte der parallel durchgeführten Vergleich PBS-behandelter gesunder und chronisch DSS-entzündeter Versuchstiere. Die erhöhte pCREB-Gesamtzellmenge im Kompartiment der MLNs kann dabei als Versuch eines CpG-vermittelten Gegenregulationsmechanismus im chronisch entzündlichen Milieu interpretiert werden. Dieser Gegenregulationsmechanismus scheint jedoch nicht effektiv genug zu sein, um in den untersuchten MLN-Zellkernextrakten die pCREB-DNA-Bindungsaffinität und entsprechend die Expression antiinflammatorischer Zytokingene wie das IL-10-Gen zu beeinflussen.

Die Gesamtzellmenge des Typ-I-IFN-Regulators IRF7 war unter CpG-Behandlung in den MLN-Gesamtzelllysaten chronisch DSS-entzündeter Versuchstiere signifikant höher als in den MLN-Gesamtzelllysaten gesunder Tiere. Hierbei scheint es sich ebenfalls um CpG-spezifische Effekte zu handeln, da beim Vergleich PBS-behandelter gesunder und chronisch DSS-entzündeter Versuchstiere keine

derartigen Effekte beobachtet werden konnten. Da IRF7 als wichtiges Molekül bei der proinflammatorischen Immunantwort gegen virale Pathogene gilt (124), unterstreicht dies die Erkenntnis, dass die CpG-Behandlung im gesunden und chronisch DSS-induzierten Milieu unterschiedliche Effekte auf Transkriptionsfaktorebene auslöst, wobei die CpG-Behandlung im chronisch entzündlichen Milieu hierbei eher eine proinflammatorische Wirkung zeigt.

Dem proinflammatorischen Potential der CpG-Behandlung scheint im chronisch entzündlichen Milieu jedoch eine Grenze gesetzt zu sein. Denn während sich für das IRF1-, IRF4-, IRF5- und IRF7-Gen unter CpG-Behandlung in den gesunden Tieren in Tendenz noch ein Induktionseffekt im Vergleich zur PBS-Kontrollbehandlung zeigte, war die IRF-Genexpression in den chronisch DSS-entzündeten Tieren mittels CpG-Behandlung im Vergleich zur PBS-Kontrollbehandlung nicht mehr induzierbar.

## 6 Zusammenfassung

Das Hauptaugenmerk der hier vorliegenden Arbeit lag auf dem Vergleich der TLR9-abhängigen Aktivierung von Transkriptionsfaktoren in intestinalen Immunzellen unter gesunden und chronisch entzündlichen Bedingungen.

In einem ersten Schritt konnte nachgewiesen werden, dass der Verlust der intakten TLR9-Signaltransduktion im gesunden Milieu zu deutlich proinflammatorischen Effekten mit einer erhöhten Zell- und Kernmenge an aktiviertem NF- $\kappa$ B (p65) sowie mit einer erniedrigten DNA-Bindungsaffinität des antiinflammatorisch wirkenden pCREB in den Milz- und MLN-Isolaten führte. Der Verlust eines intakten TLR9 führte in den Milz- und MLN-Isolaten jedoch auch zu - möglicherweise kompensatorischen - antiinflammatorischen Effekten mit einer verstärkten IL-10-Genexpression.

Im nächsten Schritt konnte gezeigt werden, dass die CpG-vermittelte TLR9-Stimulation im gesunden Milieu gewebeabhängig unterschiedliche Effekte auslöst. Unter CpG-Stimulation im gesunden Milieu kam es dabei in den LPL-Isolaten auf Ebene der DNA-Bindungsaffinität zu einem Überwiegen der antiinflammatorischen CREB- gegenüber der proinflammatorischen NF- $\kappa$ B-Transaktivierung und einer Erniedrigung der proinflammatorischen IRF7-Transaktivierung. In den MLN-Isolaten zeigten sich auf Ebene der DNA-Bindungsaffinität hingegen keine derartigen CpG-Effekte, jedoch war die Zellmenge sowohl an aktiviertem NF- $\kappa$ B (p65) als auch an aktiviertem CREB unter CpG-Behandlung im gesunden Milieu verringert. Außerdem führte die gezielte CpG-vermittelte TLR9-Aktivierung in den MLN-Zellen zu einer verstärkten Expression des proinflammatorischen IRF5-Gens.

Beim Vergleich gesunder und chronisch DSS-entzündeter Versuchstiere konnte nachgewiesen werden, dass die Transaktivierung von pCREB im chronisch entzündlichen Milieu sowohl in den MLN- als auch in den LPL-Zellkernextrakten wesentlich stärker ausgeprägt war als die Transaktivierung von NF- $\kappa$ B. Dieses Überwiegen der antiinflammatorischen pCREB-Transaktivierung im chronisch entzündlichen Milieu der DSS-Colitis gegenüber dem gesunden Milieu ist dabei möglicherweise durch ein Überwiegen der inaktiven GSK3- $\beta$ -Form im GSK3- $\beta$ /pGSK3- $\beta$ -Gleichgewicht vermittelt. Für das proinflammatorische IRF7 waren die Milieu-bedingten Effekte gewebeabhängig: Die IRF7-DNA-Bindungsaffinität war in den LPL-Isolaten chronisch DSS-entzündeter Versuchstiere signifikant geringer als in

den gesunder Versuchstiere, wobei sich derartige Effekte in den MLN-Zellkernextrakten nicht zeigten. In den MLN-Zellen chronisch erkrankter Mäuse war im Gegensatz dazu die IRF7-Zellmenge und der IRF7-mRNA-Gehalt signifikant höher als in den MLN-Zellen gesunder Tiere.

Analog zu den Untersuchungen im gesunden Milieu wurde auch im entzündlichen Milieu der chronischen DSS-Colitis der Effekt einer CpG-induzierten TLR9-Aktivierung herausgearbeitet. In den LPL-Isolaten kam es dabei unter CpG-Behandlung während einer chronischen DSS-Colitis zu einer tendenziellen Verschiebung des Gleichgewichts zwischen CREB- und NF- $\kappa$ B-Transaktivierung in Richtung der proinflammatorischen NF- $\kappa$ B-Transaktivierung. Auch die DNA-Bindungsaffinität des antiviral wirkenden Typ-I-IFN-Induktors IRF7 war in den LPL-Isolaten unter CpG-Stimulation in chronisch DSS-entzündeten Mäusen erhöht. In den MLN-Zellkernextrakten wurden derartige Effekte auf DNA-Bindungsebene nicht sichtbar. Die pNF- $\kappa$ B-Zellmenge war in den MLN-Gesamtzelllysaten jedoch unter CpG-Behandlung erhöhte. Die CpG-Behandlung während einer chronischen DSS-Colitis führte somit zu deutlich proinflammatorischen Effekten.

Der abschließende Vergleich der CpG-Behandlung chronisch DSS-entzündeter und gesunder Versuchstiere bestätigte, dass die CpG-Behandlung während einer chronischen DSS-Colitis mit einem Überwiegen der proinflammatorischen Immunantwort assoziiert war. In den LPL-Isolaten zeigte sich unter CpG-Behandlung während einer chronischen DSS-Colitis ein tendenzielles Überwiegen der proinflammatorischen NF- $\kappa$ B- gegenüber der antiinflammatorischen CREB-Transaktivierung. In den MLN-Zellen zeigte sich darüber hinaus unter CpG-Stimulation im chronisch entzündlichen Milieu die Zellmenge an proinflammatorisch wirkendem IRF7 und pNF- $\kappa$ B deutlich erhöht und das proinflammatorische IL-6-Gen auf mRNA-Ebene signifikant stärker exprimiert. In den MLN-Zellen kam es unter CpG-Behandlung während der chronischen DSS-Colitis jedoch andererseits auch zu einer signifikant erhöhten pCREB-Zellmenge, wobei die Signalkaskade hierbei vermutlich über die p38 MAPK verläuft und als antiinflammatorischer Gegenregulationsmechanismus interpretiert werden kann.

In der folgenden Tabelle werden abschließend alle in der hier vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnissen aufgeführt:

Molekül	Analysemethode	wt vs. TLR9-/-			CpG vs. PBS/GpG (gesund)			cDSS-Colitis vs. gesund			CpG vs. PBS/GpG (cDSS-Colitis)			CpG (cDSS-Colitis) vs. CpG (gesund)		
		Milz	MLN	LPL	Milz	MLN	LPL	Milz	MLN	LPL	Milz	MLN	LPL	Milz	MLN	LPL
IL-6	qRT-PCR (mRNA)	↔	↔			↔			↔			↔			↑	
TNF	qRT-PCR (mRNA)	↔	↔													
IFN-γ	qRT-PCR (mRNA)	↔	↔			↔			↔			↔			↔	
IL-10	qRT-PCR (mRNA)	↑	↑			↔			↔			↔			↔	
pCREB	TransAM-Assay (ZK)	↓	↓	↔		↔	(↑)		↑	↑		↔	↔		↔	↔
	Western Blot (ZK)	↔	↔	↔												
	Western Blot (ZK)	↔	↑			↓			↑			↔			↑	
NF-κB (p65)	TransAM-Assay (ZK)	↔	↔	↔		↔	(↑)		↔	↑		↔	↓		↔	↓
pNF-κB (p65)	Western Blot (ZK)	↔	↑	↔												
	Western Blot (GZ)	↑	↑			↓			↑			↑			↑	
pCREB / NF-κB	TransAM-Assay (ZK)					↔	(↑)		↑	↑		↔	↔ / ↓		↔	↔ / ↓
IRF1	qRT-PCR (mRNA)	↔	↔			↔			↔			↔			↔	
	Western Blot (ZK)	↔	↑	↔												
IRF3	Western Blot (ZK)	↔	↔													
IRF4	qRT-PCR (mRNA)	↔	↔			↔			↔			↔			↔	
	Western Blot (ZK)	↔	↔													
IRF5	qRT-PCR (mRNA)	↔	↔			↑			↔			↔			↔	
	Western Blot (ZK)	↔	↔													
IRF7	qRT-PCR (mRNA)	↔	↑			↔			↑			↔			↔	
	TransAM-Assay (ZK)					↔	↓		↔	↓		↔	↑		↔	↔
	Western Blot (ZK)	↔	↔	↔												
	Western Blot (GZ)					↓			↑			↔			↑	
p-p38 MAPK	Western Blot (GZ)	↔	↔			↓			↔			↓			↔	
pErk1/2 (p44/42)	Western Blot (GZ)	↔	↔													
pAkt	Western Blot (GZ)	↔	↔			↔			↔			↓			↔	
Gesamt-GSK3-β	Western Blot (GZ)					↓			↔			↓			↑	
pGSK3-β	Western Blot (GZ)					↓			↑			↔			↑	

↔ = kein signifikanter Unterschied  
 ↔ / ↓ = tendenziell erniedrigt

↑ = signifikant erhöht  
 (↑) = unspezifisch signifikant erhöht

↓ = signifikant erniedrigt

**Abbildung 6:** Tabellarische Darstellung der in der hier vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse.

## 7 Ausblick

Die Zahl der Transkriptionsfaktoren sowie der Signal- und Effektormoleküle, die einerseits zur Aufrechterhaltung einer schützenden intestinalen Immuntoleranz und andererseits zur Induktion und Chronifizierung eines intestinalen Entzündungsgeschehens im Rahmen der TLR9-Signaltransduktion in intestinalen Immunzellen unter gesunden und chronisch entzündlichen Bedingungen aktiviert werden, ist groß und dementsprechend können bereits jeweils geringste Änderungen auf Ebene eines einzelnen Signal- oder Effektormoleküls in der Summe zu einem gesunden oder einem chronisch entzündlichen Phänotyp führen.

Die Untersuchung der TLR9- und Milieu-abhängigen Aktivierung der beiden Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und CREB scheint dabei vielversprechend zu sein und sollte in weiterführenden Untersuchungen mit einer größeren Fallzahl fokussiert werden. Eine Untersuchung weiterer Upstream-Signalmoleküle in der zur NF- $\kappa$ B- und CREB-Aktivierung führenden TLR9-Signalkaskade sowie des IKK-Komplex inklusive des Moleküls I $\kappa$ B könnte dazu beitragen, die Milieu-abhängige Modifikation der CpG-vermittelten NF- $\kappa$ B- und CREB-Aktivierung detaillierter zu beleuchten und einen weiteren Schritt bei der Aufklärung der Milieu-abhängigen dichotomen CpG-Effekte zu machen. In weiterführenden Analysen empfiehlt es sich, auch das proinflammatorisch wirkende IL-6 und das antiinflammatorisch wirkende IL-10 mit einzubeziehen. Hierfür sollten die bereits im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen auf Ebene der Expression der IL-6- und IL-10-Gene durch weitergehende Untersuchungen, welche auch funktionelle Assays zur Bestimmung der Zytokinproduktion beinhalten, vervollständigt und korreliert werden.

In der hier vorliegenden Arbeit konnten des Weiteren auch Hinweise dafür gewonnen werden, dass die Transkriptionsfaktoren und Signal- und Effektormoleküle je nach untersuchtem Gewebekompartiment oder Zelltyp differenziert reguliert werden. Im Rahmen dieser Dissertation wurden lediglich Isolate aus der Milz, den mesenterialen Lymphknoten und der Lamina propria gewonnen, welche sich jeweils aus einem breiten Spektrum an verschiedenen ortsständigen Zelltypen zusammensetzten. Um diese gewebeabhängigen Effekte genauer eingrenzen zu können, sollten in weiterführenden Untersuchungen die jeweiligen Gewebeisolate in ihre einzelnen

Zellpopulationen subklassifiziert werden und entsprechende Untersuchungen dann an einzelnen Immunzellpopulationen im Vergleich durchgeführt werden.

Die Untersuchungen in der hier vorliegenden Arbeit wurden außerdem allesamt am Mausmodell der chronischen DSS-induzierten Colitis gemacht, welches als TH<sub>1</sub>-dominiertes Tiermodell phänotypisch am ehesten der Histopathologie des Morbus Crohn gleicht (161). Weiterführende Analysen sollten in analoger Weise auch an anderen Colitis-Modellen durchgeführt werden, wie zum Beispiel am Tiermodell der Oxazolone-induzierten Colitis, welches phänotypisch eher dem Entzündungsmuster der Colitis ulcerosa gleicht (161). Weiterhin sollten die Untersuchungen nicht nur an Tiermodellen der induzierten Colitis erfolgen, sondern es sollten auch Tiermodelle der spontanen Colitis Anwendung finden, wie beispielsweise das IL-10-defiziente Mausmodell (175, 176).

Zusammenfassend zeigt die hier vorliegende Arbeit, dass die Transkriptionsfaktoren CREB und insbesondere NF- $\kappa$ B eine zentrale Rolle innerhalb der Milieu-abhängigen Modifikation der TLR9-Signaltransduktion spielen. Die CpG-Motive bakterieller und viral DNA scheinen während einer chronischen Colitis TLR9-vermittelt den proinflammatorischen Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B zu aktivieren und dementsprechend entzündungsfördernde Effekte anzustoßen. Eine Blockade der TLR9-Signaltransduktion könnte demzufolge möglicherweise diese NF- $\kappa$ B-vermittelten proinflammatorischen Effekte unterbinden, sodass man sich diesen Sachverhalt möglicherweise klinisch zur Behandlung von CED zu Nutzen machen könnte. Die tatsächlichen Folgen einer Blockade der TLR9-Signaltransduktion sind jedoch nur schwer abzuschätzen, denn vor allem im gesunden Milieu scheint die TLR9-Signaltransduktion wichtig für die intestinale Immunhomöostase zu sein.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Benninghoff, Alfred; Detlev Drenckhahn (Hg.) (2003): Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Band 1. Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem. 16. Aufl. München, Jena: Urban und Fischer (Band 1).
2. Boland, C. Richard; Feldman, Mark (Hg.) (1996): Gastroenterology and Hepatology; The Comprehensive Visual Reference. Volume 2, Colon, Rectum and Anus. New York [u.a.]: Churchill Livingstone.
3. Salomon, Franz-Viktor (Hg.) (2008): Anatomie für die Tiermedizin. 2., überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Enke.
4. Löffler, Georg; Petrides, Petro E.; Heinrich, Peter C. (Hg.) (2007): Biochemie und Pathobiochemie. Mit 1192 vierfarbigen Abbildungen und 192 Tabellen. 8. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
5. Dietel, Manfred; Suttrop, Norbert; Zeitz Martin (Hg.): Harrisons Innere Medizin. Band 2. 17. Aufl. New York, Berlin: McGraw-Hill, ABW Wissenschaftsverlag.
6. Rassow, Joachim; Hauser, Karin; Netzker, Roland; Deutzmann, Rainer (2006): Biochemie. 50 Tabellen. 1. Aufl. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe).
7. Löffler, Georg; Schölmerich, Jürgen (2008): Basiswissen Biochemie. Mit Pathobiochemie ; mit 139 Tabellen ; [jetzt mit Fällen]. 7. Aufl. Heidelberg: Springer.
8. Deetjen, Peter; Speckmann, Erwin-Josef; Hescheler, Jürgen (Hg.) (2005): Physiologie. Mit ... 88 Tabellen. 4. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer.
9. Schmidt, Robert F.; Lang, Florian; Thews, Gerhard (Hg.) (2005): Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie ; Mit 598 vierfarbigen Abbildungen in 1127 Einzeldarstellungen und 78 Tabellen; [neue Approbationsordnung]. 29. Aufl. Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch).
10. Janeway, Charles (Hg.) (2005): Immunobiology. The immune system in health and disease. 6. Aufl. New York, NY: Garland Science.
11. Mowat, A. M.; Viney, J. L. (1997): The anatomical basis of intestinal immunity. In: *Immunol. Rev.* 156, S. 145–166.
12. Wittig, B. M.; Zeitz, M. (2003): The gut as an organ of immunology. In: *Int J Colorectal Dis* 18 (3), S. 181–187.
13. Bull, D. M.; Bookman, M. A. (1977): Isolation and functional characterization of human intestinal mucosal lymphoid cells. In: *J. Clin. Invest.* 59 (5), S. 966–974.
14. Brandtzaeg, P.; Farstad, I. N.; Helgeland, L. (1998): Phenotypes of T cells in the gut. In: *Chem. Immunol.* 71, S. 1–26.
15. Schreiber, S.; MacDermott, R. P.; Raedler, A.; Pinnau, R.; Bertovich, M. J.; Nash, G. S. (1991): Increased activation of isolated intestinal lamina propria mononuclear cells in inflammatory bowel disease. In: *Gastroenterology* 101 (4), S. 1020–1030.
16. Fais, S.; Capobianchi, M. R.; Pallone, F.; Di Marco, P.; Boirivant, M.; Dianzani, F.; Torsoli, A. (1991): Spontaneous release of interferon gamma by intestinal lamina propria lymphocytes in Crohn's disease. Kinetics of in vitro response to interferon gamma inducers. In: *Gut* 32 (4), S. 403–407.
17. Drake, Richard; Vogl, A. Wayne; Mitchell, Adam W. M (2009): Gray's Anatomy for Students. 2nd Edition. Oxford: Elsevier Health Sciences.
18. Aumüller, Gerhard; Aust, Gabriela; Doll, Andreas; Engele, Jürgen; Kirsch, Joachim; Mense, Siegfried et al. (2007): Anatomie. 208 Tabellen. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe).
19. Welsch, Ulrich; Sobotta, Johannes (2006): Lehrbuch Histologie. Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie; mit 21 Tabellen. 2. Aufl. München, Jena: Elsevier, Urban und Fischer.



20. Yen, David; Cheung, Jeanne; Scheerens, Heleen; Poulet, Frédérique; McClanahan, Terrill; McKenzie, Brent et al. (2006): IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. In: *J. Clin. Invest.* 116 (5), S. 1310–1316.
21. Kobozev, Iurii; Karlsson, Fridrik; Grisham, Matthew B. (2010): Gut-associated lymphoid tissue, T cell trafficking, and chronic intestinal inflammation. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1207 Suppl 1, S. E86-93.
22. Coombes, Janine L.; Powrie, Fiona (2008): Dendritic cells in intestinal immune regulation. In: *Nat. Rev. Immunol.* 8 (6), S. 435–446.
23. Mowat, Allan Mcl; Millington, Owain R.; Chirido, Fernando G. (2004): Anatomical and cellular basis of immunity and tolerance in the intestine. In: *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 39 Suppl 3, S. S723-4.
24. Förster, Reinhold; Pabst, Oliver; Bernhardt, Günter (2008): Homeostatic chemokines in development, plasticity, and functional organization of the intestinal immune system. In: *Semin. Immunol.* 20 (3), S. 171–180.
25. Malmström, V.; Shipton, D.; Singh, B.; Al-Shamkhani, A.; Puklavec, M. J.; Barclay, A. N.; Powrie, F. (2001): CD134L expression on dendritic cells in the mesenteric lymph nodes drives colitis in T cell-restored SCID mice. In: *J. Immunol.* 166 (11), S. 6972–6981.
26. Weaver, Casey T.; Hatton, Robin D.; Mangan, Paul R.; Harrington, Laurie E. (2007): IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. In: *Annu. Rev. Immunol.* 25, S. 821–852.
27. Makita, Shin; Kanai, Takanori; Nemoto, Yasuhiro; Totsuka, Teruji; Okamoto, Ryuichi; Tsuchiya, Kiichiro et al. (2007): Intestinal lamina propria retaining CD4+CD25+ regulatory T cells is a suppressive site of intestinal inflammation. In: *J. Immunol.* 178 (8), S. 4937–4946.
28. Mowat, Allan Mcl (2003): Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. In: *Nat. Rev. Immunol.* 3 (4), S. 331–341.
29. Lüllmann-Rauch, Renate; Paulsen, Friedrich (2012): Taschenlehrbuch Histologie. 4. Aufl. Stuttgart: Thieme.
30. Takeuchi, Osamu; Akira, Shizuo (2010): Pattern recognition receptors and inflammation. In: *Cell* 140 (6), S. 805–820.
31. Takeda, Kiyoshi; Akira, Shizuo (2005): Toll-like receptors in innate immunity. In: *Int. Immunol.* 17 (1), S. 1–14.
32. Rosenberg, H. F. (2003): Human neutrophils and TLRs: 2, 4, and plenty more. In: *Blood* 102 (7), S. 2319.
33. Meylan, Etienne; Tschopp, Jürg; Karin, Michael (2006): Intracellular pattern recognition receptors in the host response. In: *Nature* 442 (7098), S. 39–44.
34. Janeway, Charles A.; Medzhitov, Ruslan (2002): Innate immune recognition. In: *Annu. Rev. Immunol.* 20, S. 197–216.
35. Sirard, Jean-Claude; Vignat, Cécile; Dessein, Rodrigue; Chamillard, Mathias (2007): Nod-like receptors: cytosolic watchdogs for immunity against pathogens. In: *PLoS Pathog.* 3 (12), S. e152.
36. Martinon, Fabio; Tschopp, Jürg (2005): NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. In: *Trends Immunol.* 26 (8), S. 447–454.
37. Creagh, Emma M.; O'Neill, Luke A. J. (2006): TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. In: *Trends Immunol.* 27 (8), S. 352–357.
38. Yamamoto, Masahiro; Takeda, Kiyoshi (2010): Current views of toll-like receptor signaling pathways. In: *Gastroenterol Res Pract* 2010, S. 240365.
39. Peiser, Leanne; Mukhopadhyay, Subhankar; Gordon, Siamon (2002): Scavenger receptors in innate immunity. In: *Curr. Opin. Immunol.* 14 (1), S. 123–128.
40. Hashimoto, C.; Hudson, K. L.; Anderson, K. V. (1988): The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. In: *Cell* 52 (2), S. 269–279.

41. Hoffmann, Jules A.; Reichhart, Jean-Marc (2002): Drosophila innate immunity: an evolutionary perspective. In: *Nat. Immunol.* 3 (2), S. 121–126.
42. Rock, F. L.; Hardiman, G.; Timans, J. C.; Kastelein, R. A.; Bazan, J. F. (1998): A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (2), S. 588–593.
43. Takeda, Kiyoshi; Kaisho, Tsuneyasu; Akira, Shizuo (2003): Toll-like receptors. In: *Annu. Rev. Immunol.* 21, S. 335–376.
44. Beutler, Bruce (2004): Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. In: *Nature* 430 (6996), S. 257–263.
45. Medzhitov, Ruslan (2008): Origin and physiological roles of inflammation. In: *Nature* 454 (7203), S. 428–435.
46. Zuo, Ling-ling; Wu, Yi-mou; You, Xiao-xing (2009): Mycoplasma lipoproteins and Toll-like receptors. In: *J Zhejiang Univ Sci B* 10 (1), S. 67–76.
47. Bowie, A.; O'Neill, L. A. (2000): The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. In: *J. Leukoc. Biol.* 67 (4), S. 508–514.
48. Matsushima, Norio; Tanaka, Takanori; Enkhbayar, Purevjav; Mikami, Tomoko; Taga, Masae; Yamada, Keiko; Kuroki, Yoshio (2007): Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. In: *BMC Genomics* 8, S. 124.
49. Aliprantis, A. O.; Yang, R. B.; Mark, M. R.; Suggett, S.; Devaux, B.; Radolf, J. D. et al. (1999): Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. In: *Science* 285 (5428), S. 736–739.
50. Schwandner, R.; Dziarski, R.; Wesche, H.; Rothe, M.; Kirschning, C. J. (1999): Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. In: *J. Biol. Chem.* 274 (25), S. 17406–17409.
51. Hashimoto, Masahito; Asai, Yasuyuki; Ogawa, Tomohiko (2004): Separation and structural analysis of lipoprotein in a lipopolysaccharide preparation from *Porphyromonas gingivalis*. In: *Int. Immunol.* 16 (10), S. 1431–1437.
52. Zähringer, Ulrich; Lindner, Buko; Inamura, Seiichi; Heine, Holger; Alexander, Christian (2008): TLR2 - promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity. In: *Immunobiology* 213 (3-4), S. 205–224.
53. Takeuchi, O.; Kawai, T.; Mühlradt, P. F.; Morr, M.; Radolf, J. D.; Zychlinsky, A. et al. (2001): Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. In: *Int. Immunol.* 13 (7), S. 933–940.
54. Takeuchi, Osamu; Sato, Shintaro; Horiuchi, Takao; Hoshino, Katsuaki; Takeda, Kiyoshi; Dong, Zhongyun et al. (2002): Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. In: *J. Immunol.* 169 (1), S. 10–14.
55. Hasan, Uzma; Chaffois, Claire; Gaillard, Claude; Saulnier, Virginie; Merck, Estelle; Tancredi, Sandra et al. (2005): Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. In: *J. Immunol.* 174 (5), S. 2942–2950.
56. Viriyakosol, S.; Kirkland, T.; Soldau, K.; Tobias, P. (2000): MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide. In: *J. Endotoxin Res.* 6 (6), S. 489–491.
57. Okamura, Y.; Watari, M.; Jerud, E. S.; Young, D. W.; Ishizaka, S. T.; Rose, J. et al. (2001): The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. In: *J. Biol. Chem.* 276 (13), S. 10229–10233.
58. Termeer, Christian; Benedix, Frauke; Sleeman, Jonathon; Fieber, Christina; Voith, Ursula; Ahrens, Thomas et al. (2002): Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. In: *J. Exp. Med.* 195 (1), S. 99–111.
59. Ohashi, K.; Burkart, V.; Flohé, S.; Kolb, H. (2000): Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. In: *J. Immunol.* 164 (2), S. 558–561.

60. Vabulas, Ramunas M.; Ahmad-Nejad, Parviz; Ghose, Sanghamitra; Kirschning, Carsten J.; Issels, Rolf D.; Wagner, Hermann (2002): HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. In: *J. Biol. Chem.* 277 (17), S. 15107–15112.
61. Johnson, Geoffrey B.; Brunn, Gregory J.; Kodaira, Yuzo; Platt, Jeffrey L. (2002): Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. In: *J. Immunol.* 168 (10), S. 5233–5239.
62. Hayashi, F.; Smith, K. D.; Ozinsky, A.; Hawn, T. R.; Yi, E. C.; Goodlett, D. R. et al. (2001): The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. In: *Nature* 410 (6832), S. 1099–1103.
63. Alexopoulou, L.; Holt, A. C.; Medzhitov, R.; Flavell, R. A. (2001): Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. In: *Nature* 413 (6857), S. 732–738.
64. Heil, Florian; Hemmi, Hiroaki; Hochrein, Hubertus; Ampenberger, Franziska; Kirschning, Carsten; Akira, Shizuo et al. (2004): Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. In: *Science* 303 (5663), S. 1526–1529.
65. Diebold, Sandra S.; Kaisho, Tsuneyasu; Hemmi, Hiroaki; Akira, Shizuo; Reis e Sousa, Caetano (2004): Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. In: *Science* 303 (5663), S. 1529–1531.
66. Lund, Jennifer M.; Alexopoulou, Lena; Sato, Ayuko; Karow, Margaret; Adams, Niels C.; Gale, Nicholas W. et al. (2004): Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (15), S. 5598–5603.
67. Rumio, Cristiano; Besusso, Dario; Palazzo, Marco; Selleri, Silvia; Sfondrini, Lucia; Dubini, Francesco et al. (2004): Degranulation of paneth cells via toll-like receptor 9. In: *Am. J. Pathol.* 165 (2), S. 373–381.
68. Pedersen, G.; Andresen, L.; Matthiessen, M. W.; Rask-Madsen, J.; Brynskov, J. (2005): Expression of Toll-like receptor 9 and response to bacterial CpG oligodeoxynucleotides in human intestinal epithelium. In: *Clin. Exp. Immunol.* 141 (2), S. 298–306.
69. Weiner, G. J. (2000): The immunobiology and clinical potential of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides. In: *J. Leukoc. Biol.* 68 (4), S. 455–463.
70. Tokunaga, T.; Yamamoto, T.; Yamamoto, S. (1999): How BCG led to the discovery of immunostimulatory DNA. In: *Jpn. J. Infect. Dis.* 52 (1), S. 1–11.
71. Yamamoto, S.; Yamamoto, T.; Shimada, S.; Kuramoto, E.; Yano, O.; Kataoka, T.; Tokunaga, T. (1992): DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. In: *Microbiol. Immunol.* 36 (9), S. 983–997.
72. Krieg, A. M.; Yi, A. K.; Matson, S.; Waldschmidt, T. J.; Bishop, G. A.; Teasdale, R. et al. (1995): CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. In: *Nature* 374 (6522), S. 546–549.
73. Burge, C.; Campbell, A. M.; Karlin, S. (1992): Over- and under-representation of short oligonucleotides in DNA sequences. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (4), S. 1358–1362.
74. Bird, Adrian (1987): CpG islands as gene markers in the vertebrate nucleus. In: *Trends in Genetics* 3, S. 342–347. Online verfügbar unter citeulike-article-id:2581612.
75. Schwartz, D. A.; Quinn, T. J.; Thorne, P. S.; Sayeed, S.; Yi, A. K.; Krieg, A. M. (1997): CpG motifs in bacterial DNA cause inflammation in the lower respiratory tract. In: *J. Clin. Invest.* 100 (1), S. 68–73.
76. Hartmann, Gunther; Endres, Stefan; Rothenfuß, Simon; Jahrsdörfer, Bernd; Krug, Anne (2001): CpG-Oligonukleotide: Immuntherapie nach dem Muster bakterieller DNA. In: *Dtsch Arztebl International* 98 (15), S. A-981. Online verfügbar unter <http://www.aerzteblatt.de/int/article.asp?id=26829>.
77. Lipford, G. B.; Sparwasser, T.; Bauer, M.; Zimmermann, S.; Koch, E. S.; Heeg, K.; Wagner, H. (1997): Immunostimulatory DNA: sequence-dependent production of potentially harmful or useful cytokines. In: *Eur. J. Immunol.* 27 (12), S. 3420–3426.
78. Zimmermann, S.; Egeter, O.; Hausmann, S.; Lipford, G. B.; Röcken, M.; Wagner, H.; Heeg, K. (1998): CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. In: *J. Immunol.* 160 (8), S. 3627–3630.

79. Sester, D. P.; Naik, S.; Beasley, S. J.; Hume, D. A.; Stacey, K. J. (2000): Phosphorothioate backbone modification modulates macrophage activation by CpG DNA. In: *J. Immunol.* 165 (8), S. 4165–4173.
80. Hartmann, Gunther; Battiany, Julia; Poeck, Hendrik; Wagner, Moritz; Kerkmann, Miren; Lubenow, Norbert et al. (2003): Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells. In: *Eur. J. Immunol.* 33 (6), S. 1633–1641.
81. Krug, A.; Rothenfusser, S.; Hornung, V.; Jahrsdörfer, B.; Blackwell, S.; Ballas, Z. K. et al. (2001): Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. In: *Eur. J. Immunol.* 31 (7), S. 2154–2163.
82. Verthelyi, D.; Ishii, K. J.; Gursel, M.; Takeshita, F.; Klinman, D. M. (2001): Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs. In: *J. Immunol.* 166 (4), S. 2372–2377.
83. Hartmann, G.; Krieg, A. M. (2000): Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. In: *J. Immunol.* 164 (2), S. 944–953.
84. Bauer, S.; Kirschning, C. J.; Häcker, H.; Redecke, V.; Hausmann, S.; Akira, S. et al. (2001): Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (16), S. 9237–9242.
85. Lipford, G. B.; Heeg, K.; Wagner, H. (1998): Bacterial DNA as immune cell activator. In: *Trends Microbiol.* 6 (12), S. 496–500.
86. Wagner, H. (1999): Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger. In: *Adv. Immunol.* 73, S. 329–368.
87. Krieg, A. M. (2000): Immune effects and mechanisms of action of CpG motifs. In: *Vaccine* 19 (6), S. 618–622.
88. Sparwasser, T.; Koch, E. S.; Vabulas, R. M.; Heeg, K.; Lipford, G. B.; Ellwart, J. W.; Wagner, H. (1998): Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. In: *Eur. J. Immunol.* 28 (6), S. 2045–2054.
89. Moseman, E. Ashley; Liang, Xueqing; Dawson, Amanda J.; Panoskaltis-Mortari, Angela; Krieg, Arthur M.; Liu, Yong-Jun et al. (2004): Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. In: *J. Immunol.* 173 (7), S. 4433–4442.
90. Hemmi, H.; Takeuchi, O.; Kawai, T.; Kaisho, T.; Sato, S.; Sanjo, H. et al. (2000): A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. In: *Nature* 408 (6813), S. 740–745.
91. Haas, Tobias; Metzger, Jochen; Schmitz, Frank; Heit, Antje; Müller, Thomas; Latz, Eicke; Wagner, Hermann (2008): The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. In: *Immunity* 28 (3), S. 315–323.
92. Coban, Cevayir; Ishii, Ken J.; Kawai, Taro; Hemmi, Hiroaki; Sato, Shintaro; Uematsu, Satoshi et al. (2005): Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. In: *J. Exp. Med.* 201 (1), S. 19–25.
93. Coban, Cevayir; Igari, Yoshikatsu; Yagi, Masanori; Reimer, Thornik; Koyama, Shohei; Aoshi, Taiki et al. (2010): Immunogenicity of whole-parasite vaccines against *Plasmodium falciparum* involves malarial hemozoin and host TLR9. In: *Cell Host Microbe* 7 (1), S. 50–61.
94. Akira, Shizuo; Uematsu, Satoshi; Takeuchi, Osamu (2006): Pathogen recognition and innate immunity. In: *Cell* 124 (4), S. 783–801.
95. Ahmad-Nejad, Parviz; Häcker, Hans; Rutz, Mark; Bauer, Stefan; Vabulas, Ramunas M.; Wagner, Hermann (2002): Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. In: *Eur. J. Immunol.* 32 (7), S. 1958–1968.
96. Latz, Eicke; Schoenemeyer, Annett; Visintin, Alberto; Fitzgerald, Katherine A.; Monks, Brian G.; Knetter, Cathrine F. et al. (2004): TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. In: *Nat. Immunol.* 5 (2), S. 190–198.
97. Häcker, H.; Mischak, H.; Miethke, T.; Liptay, S.; Schmid, R.; Sparwasser, T. et al. (1998): CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is

- preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. In: *EMBO J.* 17 (21), S. 6230–6240.
98. Kim, You-Me; Brinkmann, Melanie M.; Paquet, Marie-Eve; Ploegh, Hidde L. (2008): UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. In: *Nature* 452 (7184), S. 234–238.
  99. Tabeta, Koichi; Hoebe, Kasper; Janssen, Edith M.; Du, Xin; Georgel, Philippe; Crozat, Karine et al. (2006): The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. In: *Nat. Immunol.* 7 (2), S. 156–164.
  100. Ewald, Sarah E.; Lee, Bettina L.; Lau, Laura; Wickliffe, Katherine E.; Shi, Guo-Ping; Chapman, Harold A.; Barton, Gregory M. (2008): The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. In: *Nature* 456 (7222), S. 658–662.
  101. Park, Boyoun; Brinkmann, Melanie M.; Spooner, Eric; Lee, Clarissa C.; Kim, You-Me; Ploegh, Hidde L. (2008): Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. In: *Nat. Immunol.* 9 (12), S. 1407–1414.
  102. Asagiri, Masataka; Hirai, Toshiyuki; Kunigami, Toshihiro; Kamano, Shunya; Gober, Hans-Jürgen; Okamoto, Kazuo et al. (2008): Cathepsin K-dependent toll-like receptor 9 signaling revealed in experimental arthritis. In: *Science* 319 (5863), S. 624–627.
  103. Matsumoto, Fumi; Saitoh, Shin-Ichiroh; Fukui, Ryutaroh; Kobayashi, Toshihiko; Tanimura, Natsuko; Konno, Kazunori et al. (2008): Cathepsins are required for Toll-like receptor 9 responses. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367 (3), S. 693–699.
  104. Sepulveda, Fernando E.; Maschalidi, Sophia; Colisson, Renaud; Heslop, Lea; Ghirelli, Cristina; Sakka, Emna et al. (2009): Critical role for asparagine endopeptidase in endocytic Toll-like receptor signaling in dendritic cells. In: *Immunity* 31 (5), S. 737–748.
  105. Liew, Foo Y.; Xu, Damo; Brint, Elizabeth K.; O'Neill, Luke A. J. (2005): Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. In: *Nat. Rev. Immunol.* 5 (6), S. 446–458.
  106. Akira, Shizuo; Takeda, Kiyoshi (2004): Toll-like receptor signalling. In: *Nat. Rev. Immunol.* 4 (7), S. 499–511.
  107. West, A. Phillip; Koblansky, Anna Alicia; Ghosh, Sankar (2006): Recognition and Signaling by Toll-Like Receptors. In: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22 (1), S. 409–437.
  108. Heine, Holger; Lien, Egil (2003): Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity. In: *Int. Arch. Allergy Immunol.* 130 (3), S. 180–192.
  109. Chen, Zhijian J. (2005): Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. In: *Nat. Cell Biol.* 7 (8), S. 758–765.
  110. Wang, C.; Deng, L.; Hong, M.; Akkaraju, G. R.; Inoue, J.; Chen, Z. J. (2001): TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. In: *Nature* 412 (6844), S. 346–351.
  111. Banerjee, Ashish; Gerondakis, Steve (2007): Coordinating TLR-activated signaling pathways in cells of the immune system. In: *Immunol. Cell Biol.* 85 (6), S. 420–424.
  112. Banerjee, Ashish; Gugasyan, Raffi; McMahon, Martin; Gerondakis, Steve (2006): Diverse Toll-like receptors utilize Tpl2 to activate extracellular signal-regulated kinase (ERK) in hemopoietic cells. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (9), S. 3274–3279.
  113. Karin, M.; Ben-Neriah, Y. (2000): Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. In: *Annu. Rev. Immunol.* 18, S. 621–663.
  114. Deng, L.; Wang, C.; Spencer, E.; Yang, L.; Braun, A.; You, J. et al. (2000): Activation of the IkkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. In: *Cell* 103 (2), S. 351–361.
  115. Chen, Xufeng; Kandasamy, Karthikeyan; Srivastava, Rakesh K. (2003): Differential Roles of RelA (p65) and c-Rel Subunits of Nuclear Factor kappaB in Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand Signaling. In: *Cancer Research* 63 (5), S. 1059–1066.
  116. Karin, M. (1995): The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. In: *J. Biol. Chem.* 270 (28), S. 16483–16486.

117. Karin, M.; Liu, Z. g.; Zandi, E. (1997): AP-1 function and regulation. In: *Curr. Opin. Cell Biol.* 9 (2), S. 240–246.
118. Mayr, B.; Montminy, M. (2001): Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2 (8), S. 599–609.
119. Chen, Guoqing; Goeddel, David V. (2002): TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. In: *Science* 296 (5573), S. 1634–1635.
120. Hayden, Matthew S.; Ghosh, Sankar (2004): Signaling to NF-kappaB. In: *Genes Dev.* 18 (18), S. 2195–2224.
121. Martin, Michael; Rehani, Kunal; Jope, Richard S.; Michalek, Suzanne M. (2005): Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. In: *Nat. Immunol.* 6 (8), S. 777–784.
122. Platzer, C.; Fritsch, E.; Elsner, T.; Lehmann, M. H.; Volk, H. D.; Prösch, S. (1999): Cyclic adenosine monophosphate-responsive elements are involved in the transcriptional activation of the human IL-10 gene in monocytic cells. In: *Eur. J. Immunol.* 29 (10), S. 3098–3104.
123. Kawai, Taro; Sato, Shintaro; Ishii, Ken J.; Coban, Cevayir; Hemmi, Hiroaki; Yamamoto, Masahiro et al. (2004): Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. In: *Nat. Immunol.* 5 (10), S. 1061–1068.
124. Honda, Kenya; Yanai, Hideyuki; Negishi, Hideo; Asagiri, Masataka; Sato, Mitsuharu; Mizutani, Tatsuaki et al. (2005): IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. In: *Nature* 434 (7034), S. 772–777.
125. Takaoka, Akinori; Yanai, Hideyuki; Kondo, Seiji; Duncan, Gordon; Negishi, Hideo; Mizutani, Tatsuaki et al. (2005): Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. In: *Nature* 434 (7030), S. 243–249.
126. Negishi, Hideo; Fujita, Yasuyuki; Yanai, Hideyuki; Sakaguchi, Shinya; Ouyang, Xinshou; Shinohara, Masahiro et al. (2006): Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (41), S. 15136–15141.
127. Schmitz, Frank; Heit, Antje; Guggemoos, Simone; Krug, Anne; Mages, Jörg; Schiemann, Matthias et al. (2007): Interferon-regulatory-factor 1 controls Toll-like receptor 9-mediated IFN-beta production in myeloid dendritic cells. In: *Eur. J. Immunol.* 37 (2), S. 315–327.
128. Negishi, Hideo; Ohba, Yusuke; Yanai, Hideyuki; Takaoka, Akinori; Honma, Kiri; Yui, Katsuyuki et al. (2005): Negative regulation of Toll-like-receptor signaling by IRF-4. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (44), S. 15989–15994.
129. Honma, Kiri; Udono, Heiichiro; Kohno, Tomoko; Yamamoto, Kazuo; Ogawa, Asako; Takemori, Toshitada et al. (2005): Interferon regulatory factor 4 negatively regulates the production of proinflammatory cytokines by macrophages in response to LPS. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (44), S. 16001–16006.
130. Rengarajan, Jyothi; Mowen, Kerri A.; McBride, Kathryn D.; Smith, Erica D.; Singh, Harinder; Glimcher, Laurie H. (2002): Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression. In: *J. Exp. Med.* 195 (8), S. 1003–1012.
131. Lohoff, Michael; Mittrücker, Hans-Willi; Prectl, Stefan; Bischof, Susi; Sommer, Frank; Kock, Sonja et al. (2002): Dysregulated T helper cell differentiation in the absence of interferon regulatory factor 4. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (18), S. 11808–11812.
132. Tominaga, Norio; Ohkusu-Tsukada, Kozo; Udono, Heiichiro; Abe, Ryo; Matsuyama, Toshifumi; Yui, Katsuyuki (2003): Development of Th1 and not Th2 immune responses in mice lacking IFN-regulatory factor-4. In: *Int. Immunol.* 15 (1), S. 1–10.
133. Hoshino, Katsuaki; Kaisho, Tsuneyasu; Iwabe, Tomio; Takeuchi, Osamu; Akira, Shizuo (2002): Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation. In: *Int. Immunol.* 14 (10), S. 1225–1231.
134. Doyle, Sean; Vaidya, Sagar; O'Connell, Ryan; Dadgostar, Hajir; Dempsey, Paul; Wu, Ting et al. (2002): IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. In: *Immunity* 17 (3), S. 251–263.

135. Covert, Markus W.; Leung, Thomas H.; Gaston, Jahlionais E.; Baltimore, David (2005): Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation. In: *Science* 309 (5742), S. 1854–1857.
136. Werner, Shannon L.; Barken, Derren; Hoffmann, Alexander (2005): Stimulus specificity of gene expression programs determined by temporal control of IKK activity. In: *Science* 309 (5742), S. 1857–1861.
137. Ermolaeva, Maria A.; Michallet, Marie-Cécile; Papadopoulou, Nikoletta; Utermöhlen, Olaf; Kranidioti, Ksanthi; Kollias, George et al. (2008): Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory responses. In: *Nat. Immunol.* 9 (9), S. 1037–1046.
138. Honda, Kenya; Taniguchi, Tadatsugu (2006): IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. In: *Nat. Rev. Immunol.* 6 (9), S. 644–658.
139. Toll-like Receptor (TLR) | Life Technologies. Online verfügbar unter <http://de-de.invitrogen.com/site/de/de/home/Products-and-Services/Applications/Cell-Analysis/Signaling-Pathways/Toll-like-Receptor-TLR.html>, zuletzt geprüft am 19.04.2012.
140. Rakoff-Nahoum, Seth; Paglino, Justin; Eslami-Varzaneh, Fatima; Edberg, Stephen; Medzhitov, Ruslan (2004): Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. In: *Cell* 118 (2), S. 229–241.
141. Classen, Meinhard; Diehl, Volker; Kochsiek, Kurt (Hg.) (2009): Innere Medizin. 1200 Tabellen, 200 Kasuistiken, 450 Zusammenfassungen, 180 Praxisfragen. 6. Aufl. München [u.a.]: Elsevier Urban & Fischer.
142. Arastéh, Keikawus (Hg.) (2009): Innere Medizin. 1010 Abbildungen, 643 Tabellen. 2. Aufl. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe).
143. media, manguu; Rostock: Darmerkrankungen: Morbus Crohn und Colitis ulcerosa - Kompetenznetz Darmerkrankungen. Kompetenznetz chronisch entzündliche Darmerkrankungen e.V. Online verfügbar unter <http://www.kompetenznetz-ced.de/darmerkrankungen.html>, zuletzt geprüft am 25.03.2012.
144. Böcker, Werner; Aguzzi, Adriano (Hg.) (2008): Pathologie. Mit über 200 Tabellen. 4. Aufl. München [u.a.]: Elsevier Urban & Fischer.
145. Siegenthaler, Walter; Blum, Hubert E. (Hg.) (2006): Klinische Pathophysiologie. 239 Tabellen. 9. Aufl. Stuttgart: Thieme.
146. Piper, Wolfgang (2007): Innere Medizin. Mit 117 Tabellen. Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch).
147. Berchtold, Rudolf; Bruch, Hans-Peter; Trentz, Otmar (Hg.) (2008): Chirurgie. Mit 335 Tabellen und 343 Praxisfragen. 6. Aufl. München [u.a.]: Elsevier, Urban & Fischer.
148. Hirner, Andreas; Weise, Kuno; Ziegler, Markus (Hg.) (2008): Chirurgie. 234 Tabellen, 427 Textboxen mit vertiefendem Wissen ; [inklusive CD-ROM mit 36 Videofilmen]. 2. Aufl. Stuttgart: Thieme.
149. Siewert, Jörg R.; Allgöwer, Martin; Brauer, Robert Bernhard (Hg.) (2006): Chirurgie. Mit integriertem Fallquiz - 40 Fälle nach neuer AO ; mit 182 Tabellen. 8. Aufl. Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch).
150. Anderson, Carl A.; Boucher, Gabrielle; Lees, Charlie W.; Franke, Andre; D'Amato, Mauro; Taylor, Kent D. et al. (2011): Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. In: *Nat. Genet.* 43 (3), S. 246–252.
151. Xavier, R. J.; Podolsky, D. K. (2007): Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. In: *Nature* 448 (7152), S. 427–434.
152. Franke, Andre; McGovern, Dermot P. B.; Barrett, Jeffrey C.; Wang, Kai; Radford-Smith, Graham L.; Ahmad, Tariq et al. (2010): Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. In: *Nat. Genet.* 42 (12), S. 1118–1125.
153. Molodecky, Natalie A.; Kaplan, Gilaad G. (2010): Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. In: *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 6 (5), S. 339–346.

154. Schultz, M.; Tonkonogy, S. L.; Sellon, R. K.; Veltkamp, C.; Godfrey, V. L.; Kwon, J. et al. (1999): IL-2-deficient mice raised under germfree conditions develop delayed mild focal intestinal inflammation. In: *Am. J. Physiol.* 276 (6 Pt 1), S. G1461-72.
155. Sellon, R. K.; Tonkonogy, S.; Schultz, M.; Dieleman, L. A.; Grenther, W.; Balish, E. et al. (1998): Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. In: *Infect. Immun.* 66 (11), S. 5224–5231.
156. Rath, H. C.; Herfarth, H. H.; Ikeda, J. S.; Grenther, W. B.; Hamm, T. E.; Balish, E. et al. (1996): Normal luminal bacteria, especially Bacteroides species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats. In: *J. Clin. Invest.* 98 (4), S. 945–953.
157. Linskens, R. K.; Huijsdens, X. W.; Savelkoul, P. H.; Vandenbroucke-Grauls, C. M.; Meuwissen, S. G. (2001): The bacterial flora in inflammatory bowel disease: current insights in pathogenesis and the influence of antibiotics and probiotics. In: *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* (234), S. 29–40.
158. Duchmann, R.; Kaiser, I.; Hermann, E.; Mayet, W.; Ewe, K.; Zum Meyer Büschenfelde, K. H. (1995): Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). In: *Clin. Exp. Immunol.* 102 (3), S. 448–455.
159. Duchmann, R.; May, E.; Heike, M.; Knolle, P.; Neurath, M.; Zum Meyer Büschenfelde, K. H. (1999): T cell specificity and cross reactivity towards enterobacteria, bacteroides, bifidobacterium, and antigens from resident intestinal flora in humans. In: *Gut* 44 (6), S. 812–818.
160. Rakoff-Nahoum, Seth; Bousvaros, Athos (2010): Innate and adaptive immune connections in inflammatory bowel diseases. In: *Curr. Opin. Gastroenterol.* 26 (6), S. 572–577.
161. Strober, Warren; Fuss, Ivan J.; Blumberg, Richard S. (2002): The immunology of mucosal models of inflammation. In: *Annu. Rev. Immunol.* 20, S. 495–549.
162. Rogler, G.; Andus, T. (1998): Cytokines in inflammatory bowel disease. In: *World J Surg* 22 (4), S. 382–389.
163. Leppkes, Moritz; Becker, Christoph; Ivanov, Ivaylo I.; Hirth, Sebastian; Wirtz, Stefan; Neufert, Clemens et al. (2009): RORgamma-expressing Th17 cells induce murine chronic intestinal inflammation via redundant effects of IL-17A and IL-17F. In: *Gastroenterology* 136 (1), S. 257–267.
164. Elson, Charles O.; Cong, Yingzi; Weaver, Casey T.; Schoeb, Trenton R.; McClanahan, Terrill K.; Fick, Robert B.; Kastelein, Robert A. (2007): Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice. In: *Gastroenterology* 132 (7), S. 2359–2370.
165. Boirivant, M.; Fuss, I. J.; Chu, A.; Strober, W. (1998): Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. In: *J. Exp. Med.* 188 (10), S. 1929–1939.
166. Dohi, T.; Fujihashi, K.; Rennert, P. D.; Iwatani, K.; Kiyono, H.; McGhee, J. R. (1999): Hapten-induced colitis is associated with colonic patch hypertrophy and T helper cell 2-type responses. In: *J. Exp. Med.* 189 (8), S. 1169–1180.
167. Powrie, F.; Leach, M. W.; Mauze, S.; Menon, S.; Caddle, L. B.; Coffman, R. L. (1994): Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. In: *Immunity* 1 (7), S. 553–562.
168. Barrat, Franck J.; Cua, Daniel J.; Boonstra, André; Richards, David F.; Crain, Chad; Savelkoul, Huub F. et al. (2002): In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. In: *J. Exp. Med.* 195 (5), S. 603–616.
169. Mottet, Christian; Uhlig, Holm H.; Powrie, Fiona (2003): Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. In: *J. Immunol.* 170 (8), S. 3939–3943.
170. Singh, B.; Read, S.; Asseman, C.; Malmström, V.; Mottet, C.; Stephens, L. A. et al. (2001): Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. In: *Immunol. Rev.* 182, S. 190–200.



171. Levings, Megan K.; Bacchetta, Rosa; Schulz, Ute; Roncarolo, Maria Grazia (2002): The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. In: *Int. Arch. Allergy Immunol.* 129 (4), S. 263–276.
172. Roncarolo, M. G.; Levings, M. K. (2000): The role of different subsets of T regulatory cells in controlling autoimmunity. In: *Curr. Opin. Immunol.* 12 (6), S. 676–683.
173. Roncarolo, M. G.; Bacchetta, R.; Bordignon, C.; Narula, S.; Levings, M. K. (2001): Type 1 T regulatory cells. In: *Immunol. Rev.* 182, S. 68–79.
174. Coombes, Janine L.; Robinson, Nicholas J.; Maloy, Kevin J.; Uhlig, Holm H.; Powrie, Fiona (2005): Regulatory T cells and intestinal homeostasis. In: *Immunol. Rev.* 204, S. 184–194.
175. Kühn, R.; Löhler, J.; Rennick, D.; Rajewsky, K.; Müller, W. (1993): Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. In: *Cell* 75 (2), S. 263–274.
176. Rennick, D. M.; Fort, M. M.; Davidson, N. J. (1997): Studies with IL-10-/- mice: an overview. In: *J. Leukoc. Biol.* 61 (4), S. 389–396.
177. Hahm, K. B.; Im, Y. H.; Parks, T. W.; Park, S. H.; Markowitz, S.; Jung, H. Y. et al. (2001): Loss of transforming growth factor beta signalling in the intestine contributes to tissue injury in inflammatory bowel disease. In: *Gut* 49 (2), S. 190–198.
178. Liu, Z.; Geboes, K.; Hellings, P.; Maerten, P.; Heremans, H.; Vandenberghe, P. et al. (2001): B7 interactions with CD28 and CTLA-4 control tolerance or induction of mucosal inflammation in chronic experimental colitis. In: *J. Immunol.* 167 (3), S. 1830–1838.
179. Obermeier, Florian; Hofmann, Claudia; Falk, Werner (2010): Inflammatory bowel diseases: when natural friends turn into enemies-the importance of CpG motifs of bacterial DNA in intestinal homeostasis and chronic intestinal inflammation. In: *Int J Inflam* 2010, S. 641910.
180. Bouskra, Djahida; Brézillon, Christophe; Bérard, Marion; Werts, Catherine; Varona, Rosa; Boneca, Ivo Gomperts; Eberl, Gérard (2008): Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. In: *Nature* 456 (7221), S. 507–510.
181. Obermeier, Florian; Dunger, Nadja; Deml, Ludwig; Herfarth, Hans; Schölmerich, Jürgen; Falk, Werner (2002): CpG motifs of bacterial DNA exacerbate colitis of dextran sulfate sodium-treated mice. In: *Eur. J. Immunol.* 32 (7), S. 2084–2092.
182. Obermeier, F.; Dunger, N.; Strauch, U. G.; Grunwald, N.; Herfarth, H.; Schölmerich, J.; Falk, W. (2003): Contrasting activity of cytosin-guanosin dinucleotide oligonucleotides in mice with experimental colitis. In: *Clin. Exp. Immunol.* 134 (2), S. 217–224.
183. Obermeier, Florian; Dunger, Nadja; Strauch, Ulrike G.; Hofmann, Claudia; Bleich, Andre; Grunwald, Nicole et al. (2005): CpG motifs of bacterial DNA essentially contribute to the perpetuation of chronic intestinal inflammation. In: *Gastroenterology* 129 (3), S. 913–927.
184. Lee, Jongdae; Mo, Ji-Hun; Katakura, Kyoko; Alkalay, Irit; Rucker, Adam N.; Liu, Yu-Tsueng et al. (2006): Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. In: *Nat. Cell Biol.* 8 (12), S. 1327–1336.
185. Bleich, Andre; Janus, Lydia M.; Smoczek, Anna; Westendorf, Astrid M.; Strauch, Ulrike; Mähler, Michael et al. (2009): CpG motifs of bacterial DNA exert protective effects in mouse models of IBD by antigen-independent tolerance induction. In: *Gastroenterology* 136 (1), S. 278–287.
186. Katakura, Kyoko; Lee, Jongdae; Rachmilewitz, Daniel; Li, Gloria; Eckmann, Lars; Raz, Eyal (2005): Toll-like receptor 9-induced type I IFN protects mice from experimental colitis. In: *J. Clin. Invest.* 115 (3), S. 695–702.
187. Obermeier, F.; Strauch, U. G.; Dunger, N.; Grunwald, N.; Rath, H. C.; Herfarth, H. et al. (2005): In vivo CpG DNA/toll-like receptor 9 interaction induces regulatory properties in CD4+CD62L+ T cells which prevent intestinal inflammation in the SCID transfer model of colitis. In: *Gut* 54 (10), S. 1428–1436.
188. Strauch, U. G.; Obermeier, F.; Grunwald, N.; Gürster, S.; Dunger, N.; Schultz, M. et al. (2005): Influence of intestinal bacteria on induction of regulatory T cells: lessons from a transfer model of colitis. In: *Gut* 54 (11), S. 1546–1552.

189. Levings, M. K.; Sangregorio, R.; Galbiati, F.; Squadrone, S.; Waal Malefyt, R. de; Roncarolo, M. G. (2001): IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. In: *J. Immunol.* 166 (9), S. 5530–5539.
190. Hofmann, Claudia; Dunger, Nadja; Grunwald, Nicole; Hämmerling, Günter J.; Hoffmann, Petra; Schölmerich, Jürgen et al. (2010): T cell-dependent protective effects of CpG motifs of bacterial DNA in experimental colitis are mediated by CD11c+ dendritic cells. In: *Gut* 59 (10), S. 1347–1354.
191. Maynard, Craig L.; Hatton, Robin D.; Helms, Whitney S.; Oliver, James R.; Stephensen, Charles B.; Weaver, Casey T. (2009): Contrasting roles for all-trans retinoic acid in TGF-beta-mediated induction of Foxp3 and Il10 genes in developing regulatory T cells. In: *J. Exp. Med.* 206 (2), S. 343–357.
192. Hall, Jason A.; Bouladoux, Nicolas; Sun, Cheng Ming; Wohlfert, Elizabeth A.; Blank, Rebecca B.; Zhu, Qing et al. (2008): Commensal DNA limits regulatory T cell conversion and is a natural adjuvant of intestinal immune responses. In: *Immunity* 29 (4), S. 637–649.
193. Hofmann, Claudia; Dunger, Nadja; Schölmerich, Jürgen; Falk, Werner; Obermeier, Florian (2010): Glycogen synthase kinase 3-β: a master regulator of toll-like receptor-mediated chronic intestinal inflammation. In: *Inflamm. Bowel Dis.* 16 (11), S. 1850–1858.
194. Zhong, H.; Voll, R. E.; Ghosh, S. (1998): Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. In: *Mol. Cell* 1 (5), S. 661–671.
195. Parker, D.; Ferreri, K.; Nakajima, T.; LaMorte, V. J.; Evans, R.; Koerber, S. C. et al. (1996): Phosphorylation of CREB at Ser-133 induces complex formation with CREB-binding protein via a direct mechanism. In: *Mol. Cell. Biol.* 16 (2), S. 694–703.
196. Parry, G. C.; Mackman, N. (1997): Role of cyclic AMP response element-binding protein in cyclic AMP inhibition of NF-kappaB-mediated transcription. In: *J. Immunol.* 159 (11), S. 5450–5456.
197. Grimes, C. A.; Jope, R. S. (2001): CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 beta and facilitated by lithium. In: *J. Neurochem.* 78 (6), S. 1219–1232.
198. Cantley, Lewis C. (2002): The phosphoinositide 3-kinase pathway. In: *Science* 296 (5573), S. 1655–1657.
199. Martin, Michael; Schifferle, Robert E.; Cuesta, Natalia; Vogel, Stefanie N.; Katz, Jannet; Michalek, Suzanne M. (2003): Role of the phosphatidylinositol 3 kinase-Akt pathway in the regulation of IL-10 and IL-12 by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide. In: *J. Immunol.* 171 (2), S. 717–725.
200. Toker, A.; Cantley, L. C. (1997): Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. In: *Nature* 387 (6634), S. 673–676.
201. Lawlor, M. A.; Alessi, D. R. (2001): PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? In: *J. Cell. Sci.* 114 (Pt 16), S. 2903–2910.
202. Franke, T. F.; Kaplan, D. R.; Cantley, L. C.; Toker, A. (1997): Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. In: *Science* 275 (5300), S. 665–668.
203. Cross, D. A.; Alessi, D. R.; Cohen, P.; Andjelkovich, M.; Hemmings, B. A. (1995): Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. In: *Nature* 378 (6559), S. 785–789.
204. Frame, S.; Cohen, P. (2001): GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. In: *Biochem. J.* 359 (Pt 1), S. 1–16.
205. Holzlöhner, Pamela (2009): Die Rolle von CD44v7 bei der tolerisierenden und immunisierenden Immunantwort im Darm. Freie Universität, Berlin. Biologie, Chemie, Pharmazie.
206. Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D. et al. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. In: *Anal. Biochem.* 150 (1), S. 76–85.

207. Matissek, Reinhard; Steiner, Gabriele (Hg.) (2006): *Lebensmittelanalytik. Grundzüge, Methoden, Anwendungen*; mit 24 Tabellen. 3., vollst. überarb. Aufl. Berlin: Springer (Springer-Lehrbuch).
208. Lottspeich, Friedrich; Engels, Joachim W. (2006): *Bioanalytik*. 2. Aufl. München, Heidelberg: Elsevier, Spektrum, Akad. Verl.
209. Bradford, M. M. Keyword Binding Sites Keyword Colorimetry Keyword Methods Keyword Microchemistry Keyword Protein Binding Keyword Proteins/analysis Keyword Rosaniline Dyes Keyword Time Factors (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Anal. Biochem.* 72, S. 248–254.
210. Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Anal. Biochem.* 72, S. 248–254.
211. Compton, S. J.; Jones, C. G. (1985): Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. In: *Anal. Biochem.* 151 (2), S. 369–374.
212. Instruction Manual, Bio-Rad Protein Assay, Rev C (Bulletin-Nummer LIT33). Online verfügbar unter [http://www3.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin\\_9004.pdf](http://www3.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_9004.pdf), zuletzt geprüft am 12.05.2012.
213. Asuragen | AB TaqMan® Gene Expression Services. Online verfügbar unter [http://www.asuragen.com/services/services/gene\\_expression/ab\\_taqman.aspx](http://www.asuragen.com/services/services/gene_expression/ab_taqman.aspx), zuletzt geprüft am 19.05.2012.
214. Holzapfel, Bianca; Wickert, Lucia (2007): Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. In: *Biol. Unserer Zeit* 37 (2), S. 120–126.
215. Active Motif » TransAM Transcription Factor ELISAs (DNA binding of activated transcription factors). Online verfügbar unter <http://www.activemotif.com/catalog/180/transam-transcription-factor-elisas>, zuletzt geprüft am 20.05.2012.
216. Active Motif, Inc: Active Motif Manual, zuletzt geprüft am 29.11.2012.
217. Penna, Aubin; Cahalan, Michael (2007): Western Blotting using the Invitrogen NuPage Novex Bis Tris minigels. In: *J Vis Exp* (7), S. 264. Online verfügbar unter 18989435, zuletzt geprüft am 22.08.2014.
218. SDS-PAGE\_Electrophoresis.png (PNG-Grafik, 800 × 275 Pixel) (2013). Online verfügbar unter [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/46/SDS-PAGE\\_Electrophoresis.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/46/SDS-PAGE_Electrophoresis.png), zuletzt aktualisiert am 05.10.2013, zuletzt geprüft am 22.08.2014.
219. Western\_blot\_transfer.png (PNG-Grafik, 799 × 283 Pixel) (2013). Online verfügbar unter [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/93/Western\\_blot\\_transfer.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/93/Western_blot_transfer.png), zuletzt aktualisiert am 06.10.2013, zuletzt geprüft am 22.08.2014.
220. Western\_Blot\_binding.png (PNG-Grafik, 796 × 284 Pixel) (2013). Online verfügbar unter [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c5/Western\\_Blot\\_binding.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c5/Western_Blot_binding.png), zuletzt aktualisiert am 07.10.2013, zuletzt geprüft am 22.08.2014.
221. Technologies, Leinco: General Western Blot Protocol - Leinco Technologies. Online verfügbar unter [http://www.leinco.com/general\\_wb](http://www.leinco.com/general_wb), zuletzt geprüft am 02.12.2012.
222. Western\_blot\_chemiluminescent\_detection.png (PNG-Grafik, 800 × 254 Pixel) (2013). Online verfügbar unter [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/6e/Western\\_blot\\_chemiluminescent\\_detection.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/6e/Western_blot_chemiluminescent_detection.png), zuletzt aktualisiert am 05.10.2013, zuletzt geprüft am 22.08.2014.
223. Hofmann, Claudia; Dunger, Nadja; Doser, Kristina; Lippert, Elisabeth; Siller, Sebastian; Edinger, Matthias et al. (2014): Physiologic TLR9-CpG-DNA interaction is essential for the homeostasis of the intestinal immune system. In: *Inflamm. Bowel Dis.* 20 (1), S. 136–143.
224. Ghosh, Sankar; Hayden, Matthew S. (2008): New regulators of NF-kappaB in inflammation. In: *Nat. Rev. Immunol.* 8 (11), S. 837–848.
225. Wen, Andy Y.; Sakamoto, Kathleen M.; Miller, Lloyd S. (2010): The role of the transcription factor CREB in immune function. In: *J. Immunol.* 185 (11), S. 6413–6419.

226. Egger, B.; Bajaj-Elliott, M.; MacDonald, T. T.; Inglin, R.; Eysselein, V. E.; Büchler, M. W. (2000): Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate colitis: cytokine profile and dose dependency. In: *Digestion* 62 (4), S. 240–248.
227. Dieleman, L. A.; Palmén, M. J.; Akol, H.; Bloemena, E.; Peña, A. S.; Meuwissen, S. G.; van Rees, E. P. (1998): Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. In: *Clin. Exp. Immunol.* 114 (3), S. 385–391.
228. Axelsson L.G.; Midtvedt T.; Bylund-Fellenius A.C. (1996): The role of intestinal bacteria, bacterial translocation and endotoxin in dextran sodium sulfate-induced colitis in the mouse. In: *Microb. Ecol. Health Dis. (Microbial Ecology in Health and Disease)* (9), S. 225–237.
229. Tlaskalova H; Stepankova R; Hudcovic T; Kozakova H (1999): The role of bacterial microflora in development of dextran sodium sulfate (DSS) induced colitis in immunocompetent and immunodeficient mice. In: *Microb. Ecol. Health Dis. (Microbial Ecology in Health and Disease)* (11), S. 115–116 (Abstract).

## 9 Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematischer Aufbau der Darmwand	22
1.2	Die Signaltransduktion humaner TLRs	34
1.3	Die Regulation der CREB- und NF- $\kappa$ B-Aktivität durch die GSK3- $\beta$	40
3.1	Übersicht der entnommenen Gewebearten	55
3.2	Prinzip der TaqMan <sup>®</sup> Real-Time-PCR	58
3.3	Prinzip des TransAM <sup>®</sup> -Assays	61
3.4	Prinzip der Gelelektrophorese	62
3.5	Prinzip des Western Blots	62
3.6	Prinzip der Immundetektion	63
3.7	Prinzip der Chemolumineszenz	64
3.8	Übersicht über die Zusammensetzung der Vergleichs- und Untersuchungsgruppen in den Kapiteln 4.1 bis 4.5.	65
4.1.1.1	Die Veränderung der Expression ausgewählter IRF-Gene bei TLR9-Defizienz im gesunden Milieu	67
4.1.1.2	Die Veränderung der Expression von Genen pro- und antiinflammatorischer Zytokine bei TLR9-Defizienz im gesunden Milieu	68
4.1.2	Die DNA-Bindungsaffinität von aktiviertem CREB und NF- $\kappa$ B in wt und TLR9 <sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäusen im gesunden Milieu	69
4.1.3.1	Die Aktivierung von CREB und NF- $\kappa$ B in Gesamtzelllysaten von wt und TLR9 <sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäusen im gesunden Milieu	70
4.1.3.2	Die Aktivierung von p38, Erk1/2 und Akt in Gesamtzelllysaten von wt und TLR9 <sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäusen im gesunden Milieu	71
4.1.3.3	Der Nachweis von pCREB und pNF- $\kappa$ B in Zellkernextrakten von wt und TLR9 <sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäusen im gesunden Milieu	73
4.1.3.4	Der Nachweis von IRF1, -3, -4, -5 und -7 in Zellkernextrakten von wt und TLR9 <sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäusen im gesunden Milieu	74
4.2.1.1	Die Expression ausgewählter IRF-Gene nach TLR9-Stimulation im gesunden Milieu	77
4.2.1.2	Die Expression von Genen pro- und antiinflammatorischer Zytokine nach TLR9-Stimulation im gesunden Milieu	78
4.2.2	Die DNA-Bindungsaffinität von aktiviertem CREB, NF- $\kappa$ B und IRF7 nach TLR9-Stimulation im gesunden Milieu	80
4.2.3.1	Der Zellgehalt an pCREB, pNF- $\kappa$ B und IRF7 in Gesamtzelllysaten von wt C57BL/6 Mäusen nach TLR9-Stimulation im gesunden Milieu	81

4.2.3.2	Der Zellgehalt an p-p38, pAkt, Gesamt-GSK3- $\beta$ und pGSK3- $\beta$ in Gesamtzelllysaten von wt C57BL/6 Mäusen nach TLR9-Stimulation im gesunden Milieu	83
4.3.1.1	Die Expression ausgewählter IRF-Gene im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu	86
4.3.1.2	Die Expression von Genen pro- und antiinflammatorischer Zytokine im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu	87
4.3.2	Die DNA-Bindungsaffinität von aktiviertem CREB, NF- $\kappa$ B und IRF7 im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu	88
4.3.3.1	Der Zellgehalt an pCREB, pNF- $\kappa$ B und IRF7 in Gesamtzelllysaten von wt C57BL/6 Mäusen im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu	90
4.3.3.2	Der Zellgehalt an p-p38, pAkt, Gesamt-GSK3- $\beta$ und pGSK3- $\beta$ in Gesamtzelllysaten von wt C57BL/6 Mäusen im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu	91
4.4.1.1	Die Expression ausgewählter IRF-Gene nach TLR9-Stimulation im chronisch entzündlichen Milieu	94
4.4.1.2	Die Expression von Genen pro- und antiinflammatorischer Zytokine nach TLR9-Stimulation im chronisch entzündlichen Milieu	95
4.4.2	Die DNA-Bindungsaffinität von aktiviertem CREB, NF- $\kappa$ B und IRF7 nach TLR9-Stimulation im chronisch entzündlichen Milieu	96
4.4.3.1	Der Zellgehalt an pCREB, pNF- $\kappa$ B und IRF7 in Gesamtzelllysaten von wt C57BL/6 Mäusen nach TLR9-Stimulation im chronisch entzündlichen Milieu	98
4.4.3.2	Der Zellgehalt an p-p38, pAkt, Gesamt-GSK3- $\beta$ und pGSK3- $\beta$ in Gesamtzelllysaten von wt C57BL/6 Mäusen nach TLR9-Stimulation im chronisch entzündlichen Milieu	99
4.5.1.1	Die Expression ausgewählter IRF-Gene nach TLR9-Stimulation im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu	102
4.5.1.2	Die Expression von Genen pro- und antiinflammatorischer Zytokine nach TLR9-Stimulation im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu	103
4.5.2	Die DNA-Bindungsaffinität von aktiviertem CREB, NF- $\kappa$ B und IRF7 nach TLR9-Stimulation im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu	105
4.5.3.1	Der Zellgehalt an pCREB, pNF- $\kappa$ B und IRF7 in Gesamtzelllysaten von wt C57BL/6 Mäusen nach TLR9-Stimulation im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu	106
4.5.3.2	Der Zellgehalt an p-p38, pAkt, Gesamt-GSK3- $\beta$ und pGSK3- $\beta$ in Gesamtzelllysaten von wt C57BL/6 Mäusen nach TLR9-Stimulation im gesunden und chronisch entzündlichen Milieu	108

## **10 Anhang**

## Danksagung

Zum Gelingen meiner Dissertation haben viele Leute beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bedanken möchte.

Allem voran gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Schölmerich sowie seiner Nachfolgerin Frau Prof. Dr. med. Martina Müller-Schilling für die Möglichkeit und die großzügige Schaffung der Rahmenbedingungen zur Durchführung und Erstellung dieser wissenschaftlichen Arbeit an der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Regensburg.

Herrn Prof. Dr. med. Florian Obermeier möchte ich recht herzlich für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit, die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für die hervorragende Begleitung und für das Interesse am Fortgang meiner Arbeit sowie für die Bereitschaft, die fakultätsinterne Vertretung dieser Arbeit zu übernehmen, danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. rer. nat. Claudia Kunst für die hervorragende Betreuung meiner Dissertation, das stete Interesse am Fortgang meiner Arbeit, die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft und die große Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Experimente sowie bei allen wissenschaftlichen Fragestellungen. Gleicher Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Philipp Groß, der die Vertretung während der Abwesenheit von Frau PD Dr. rer. nat. Claudia Kunst übernahm.

Bei allen Arbeitskolleginnen und Arbeitskollegen aus dem Forschungsbau H1 möchte ich mich für die freundliche und produktive Zusammenarbeit bedanken. Ein ganz herzliches Dankeschön geht dabei an meine Kollegen aus der Arbeitsgruppe Obermeier/Kunst und der Arbeitsgruppe Falk/Groß. Mein spezieller Dank gilt Frau Andrea Dirmeier, Frau Nadja Dunger, Frau Nicole Grunwald, Frau Manuela Stieber-Gunckel und Herrn Massimiliano Caioni für die freundliche und tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Der größte Dank gebührt jedoch meinen Eltern, ohne deren großartigen Rückhalt mein Studium nicht möglich und diese Arbeit nicht entstanden wäre. Ihre stetige Unterstützung und Hilfe, ihre Aufmunterungen und ihr großes Interesse an meiner Arbeit haben entscheidend zu deren Gelingen beigetragen.



## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- oder Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 27.10.2014

---

(Sebastian Siller)