

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Biofunktionalität der Lebensmittel

Identifizierung zellulärer Stressantworten in
intestinalen Epithelzellen mittels funktioneller
Proteomanalyse – Bedeutung der Wechselwirkung
zwischen Bakterien und Wirt

Anja Messlik

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigte Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. H. Daniel
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. D. Haller
2. Univ.-Prof. Dr. S. Scherer

Die Dissertation wurde am 05.05.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 02.08.2010 angenommen.

Wenn es zutr effen sol l te, dass ich nicht nur weiß,
was schl imm und hässl ich, sonder n auch
was schön ist, so ver danke ich
diese Gabe dem Gl ück, in
Dr esden aufgewachsen
zu sein.
(Erich Kästner)

Für meine außergewöhnl iche Famil ie

Die Dr esdner
fragen einen gar nicht,
ob einem die S tadt gefäl l t.
Sie sagen es einem. (Umber to Eco)

PUBLIKATIONEN

1. Martin FP, Rezzi S, Philippe D, Tornier L, **Messlik A**, Hölzlwimmer G, Baur P, Quintanilla-Fend L, Loh G, Blaut M, Blum S, Kochhar S, Haller D. Metabolic assessment of gradual development of moderate experimental colitis in IL-10 deficient mice.
J Proteome Res. 2009 May;8(5):2376-87.
2. **Messlik A**, Schmechel S, Kisling S, Bereswill S, Heimesaat MM, Fischer A, Göbel U, Haller D. Loss of Toll-like receptor 2 and 4 leads to differential induction of endoplasmic reticulum stress and proapoptotic responses in the intestinal epithelium under conditions of chronic inflammation.
J Proteome Res. 2009 Oct;8(10):4406-17.
3. Hoffmann M, **Messlik A**, Kim SC, Sartor RB, Haller D. Impact of a probiotic *Enterococcus faecalis* in a gnotobiotic mouse model of experimental colitis.
Molecular Nutrition & Food Research [accepted]

PUBLIZIERTE ABSTRACTS

1. **Messlik A**, Shkoda A, Ruiz PA, Kim SC, Rogler G, Sartor RB, Haller D. Endoplasmic reticulum and energy stress response mechanisms in intestinal epithelial cells: Inhibitory effects of interleukin 10
Gastroenterology 2007 132 (4): A550-A551.
2. **Messlik A**, Rath E, Berger E, Fromme T, Klingenspor M, Hoogenraad N, Kim SC, Liu B, Sartor RB, Haller D. Signal Integration of Endoplasmic Reticulum and Mitochondrial Unfolded Protein Stress Responses in Intestinal Epithelial Cells of Patients with Ulcerative Colitis and Murine Models of Immune-Mediated Colitis: Inhibitory Mechanisms of Interleukin 10
Gastroenterology 2009 136 (5): A-700

VORTRÄGE

1. **Messlik A**, Ruiz PA, Sartor RB, Haller D. Induction and regulation of endoplasmatic reticulum stress in intestinal epithelial cells under chronic inflammation. 44. wissenschaftlichen Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung, Halle 8.-9. März 2007
2. **Messlik A**, Ruiz PA, Kim SC, Sartor RB, Haller D. Endoplasmatic reticulum and energy stress response mechanism in intestinal epithelial cells under chronic inflammation: inhibitory effects of Interleukin 10. Stress07, Budapest, Ungarn, 23.-26. August 2007
3. **Messlik A**, Kim SC, Klingenspor M, Sartor RB, Haller D. Interleukin 10 inhibits endoplasmatic reticulum and mitochondrial unfolded protein response in the intestinal epithelium: impact on chronic inflammation. 1. Meeting der Fachgruppe "microbiota and host" der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Seeon, 2.-4. Mai 2008

POSTERPRÄSENTATIONEN

Ruiz PA, **Messlik A**, Haller D. Functional diversity of flavonoids to inhibit pro-inflammatory gene expression in intestinal epithelial cells by differentially targeting the NF- κ B, IRF and Akt signaling pathways. Inflammatory Bowel Disease, Münster, 2.-3. September 2005

STIPENDIEN

Reisestipendium von der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG) für den Kongress Stress07, Budapest, Ungarn, 23.-26. August 2007

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	6	
ABSTRACT	7	
1	EINLEITUNG	8
1.1	Entwicklung und Ökologie der Mikrobiota des Gastrointestinaltraktes	8
1.1.1	Bedeutung der intestinalen Mikroflora	9
1.1.2	Das intestinale Epithel und seine Rolle im Immunsystem	10
1.2	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	11
1.2.1	Colitis Ulzerosa und Morbus Crohn	12
1.2.2	Ursachen von CED	13
1.2.3	Zytokine und CED	15
1.2.4	Tiermodelle für CED	16
1.3	Toll-like Rezeptoren	18
1.3.1	TLR2	19
1.3.2	TLR4	20
1.3.3	TLR-vermittelte Signaltransduktion	22
1.4	Zelluläre Stressmechanismen	24
1.4.1	<i>Unfolded protein response</i> aus dem endoplasmatischen Retikulum	24
1.4.2	<i>Unfolded protein response</i> aus dem Mitochondrium	28
1.5	Zielsetzung	29
2	MATERIAL & METHODEN	30
1.1	Material	30
1.1.1	Chemikalien und Reagenzien	30
1.1.2	Antikörper, Zytokine und andere Stimulatoren	32
1.1.3	Synthetische Oligonukleotid-Primer	33
1.1.4	<i>Small interference</i> RNA Sequenz	34
1.1.5	Geräte und Zubehör	34
1.1.6	Software und Datenbanken	35
1.2	Methoden	36
1.2.1	Mausmodelle und deren bakterielle Kolonisierung	36
1.2.1.1	TLR2-, TLR4-, IL-10-, IL-10XTLR2- und IL-10XTLR4-defiziente Mäuse	36
1.2.1.2	Keimfreie IL-10-defiziente Mäuse	36
1.2.2	Isolierung primärer intestinaler Epithelzellen	37
1.2.3	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay	38

1.2.4	Zellkultur	39
1.2.4.1	Kultivierung und Konservierung	39
1.2.4.2	Zellzählung und Vitalitätsbestimmung	40
1.2.5	Zellstimulation	40
1.2.6	Isolierung von Gesamt-DNA	40
1.2.7	Polymerase-Kettenreaktion (Real Time-PCR)	40
1.2.8	Agarose-Gelelektrophorese	41
1.2.9	Transformation des Plasmid OTC Δ in kompetente Bakterien	42
1.2.10	Plasmidpräparation von OTC Δ	42
1.2.11	Transiente Transfektion von OTC Δ bzw. siRNA	42
1.2.12	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)	43
1.2.13	Isolierung von Mitochondrien	44
1.2.14	Messung des Sauerstoffverbrauchs mittels der Clark-Elektrode	44
1.2.15	Co-Immunopräzipitation	46
1.2.16	Eindimensionale Gelelektrophorese	46
1.2.16.1	Probenaufarbeitung	46
1.2.16.2	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacryllamid-Gelelektrophorese	47
1.2.16.3	Western Blot	48
1.2.17	Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-PAGE) und Proteomanalyse	49
1.2.17.1	Erste Dimension (Isoelektrische Fokussierung)	49
1.2.17.2	Herstellung der SDS-Gele für die zweite Dimension	50
1.2.17.3	Zweite Dimension	51
1.2.17.4	Kolloidale Coomassie-Färbung	52
1.2.17.5	Auswertung der 2D-PAGE-Gele mit ProteomWeaver	52
1.2.18	Massenspektrometrie	53
1.2.18.1	Waschen und enzymatischer Verdau der Proteinspots	53
1.2.18.2	Analyse der Peptidextrakte per MALDI-TOF MS	54
1.2.19	Statistik	54
3	ERGEBNISSE	55
3.1	Defizienz von TLR2 und TLR4 unter SPF-Bedingungen	55
3.1.1	Histologische Analyse	55
3.1.2	Reinheitsprüfung der isolierten intestinalen Epithelzellen	56
3.1.3	Proteomanalyse der intestinalen Epithelzellen mit TLR2 bzw. TLR4 Defizienz	57

3.1.3.1	Proteomanalyse der intestinalen Epithelzellen mit TLR2 bzw. TLR4 Defizienz unter nicht entzündlichen Bedingungen	58
3.1.3.2	Proteomanalyse der intestinalen Epithelzellen mit TLR2 bzw. TLR4 Defizienz unter entzündlichen Bedingungen	65
3.1.4	Bibliometrische Analyse	71
3.2	Mono- bzw. Dualassoziierung mit <i>E.faecalis</i> und/oder <i>E.coli</i> von keimfreien Wildtyp- und IL-10 ^{-/-} Mäusen	72
3.2.1	Histologische Analyse	72
3.2.2	Reinheitsprüfung der isolierten intestinalen Epithelzellen	73
3.2.3	Proteomanalyse von intestinalen Epithelzellen der IL-10-defizienten Mäuse mono-/dualassoziert mit <i>E.faecalis</i> und/oder <i>E.coli</i>	74
3.2.4	Bibliometrische Analyse	79
3.3	Gesamt Protein-Protein Netzwerk von unterschiedlichen Mausmodellen	80
3.4	ER- und mitochondriale Stressantwort unter Bedingungen chronischer Entzündung in verschiedenen Mausmodellen	82
3.5	ER- und mitochondriale Stressantwort in CED-Patienten	85
3.6	Funktionelle Charakterisierung Stress assoziierter Proteine	86
3.6.1	Induktion zellulären Stresses mittels Tunicamycin und OTC Δ	86
3.6.2	ER- bzw. mitochondrialer Stress in Mode-K/IL-10R Zellen	88
3.6.3	Abbau der Kreatinkinase unter ER-Stress	89
3.6.4	Molekulare Verbindung von ER- und mitochondrialem Stress	90
3.6.5	Knock-down von Chaperonin 60	92
4	DISKUSSION	94
4.1	ER- und mitochondrialer Stress unter chronischer Entzündung in verschiedenen Mausmodellen	94
4.2	Molekulare Verbindung zwischen ER- und mitochondrialem Stress	101
5	LITERATURVERZEICHNIS	105
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	115
	TABELLENVERZEICHNIS	117
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	119
	DANKSAGUNG	122
	LEBENS LAUF	123
	ERKLÄRUNG	124

ZUSAMMENFASSUNG

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Morbus Crohn und Colitis Ulzerosa) sind immunvermittelte Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes, welche durch Störungen des Darmgleichgewichtes charakterisiert sind. Die Kommunikation zwischen Wirt und der intestinalen Mikrobiota ist dabei von großer Bedeutung. So werden Mustererkennungsrezeptoren, wie die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLR), mit chronischer Darmentzündung in Verbindung gebracht.

In dieser Arbeit wurden molekulare Mechanismen in intestinalen Epithelzellen im Hinblick auf die Wechselwirkungen zwischen Wirt und Bakterien unter Bedingungen chronischer Entzündung untersucht. Mittels Proteomanalyse wurde ermittelt, inwieweit eine Defizienz von TLR2, TLR4 unter nicht entzündlichen und unter entzündlichen Bedingungen Einfluss auf das Proteinexpressionsprofil von intestinalen Epithelzellen hat. Hierfür wurden spezifisch-pathogenfrei-kolonisierte TLR2-, TLR4-, IL-10XTLR2- und IL-10XTLR4-defiziente Mäuse im Alter von 1, 8 und 16 Wochen untersucht. Des Weiteren wurden keimfreie IL-10-defiziente Mäuse mit den kommensalen Mikroorganismen *Enterococcus faecalis* und *Escherichia coli* für 1 und 6 Wochen mono- bzw. dualassoziiert. Nach bibliometrischer Analyse beider Proteinexpressionsprofile kristallisierte sich besonders grp-78, das Hauptchaperon der ER-Stressantwort, und Chaperonin 60, welches im mitochondrialen Stress involviert ist, heraus. Aufgrund dessen und der Tatsache, dass ein Zusammenhang zwischen ER-Stress in intestinalen Epithelzellen und chronischer Darmerkrankungen mehrfach diskutiert wird, wurde im zweiten Teil der Arbeit die ER- als auch die mitochondriale Stressantwort in intestinalen Epithelzellen eingehender untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Induktion einer ER-Stressantwort mittels Tunicamycin neben grp-78 Expression auch eine erhöhte Expression von Chaperonin 60 hervorruft. Es ist bereits bekannt, dass das Protein CHOP in beiden Stressantworten involviert ist. CHOP konnte nach weiteren Analysen und mit Hilfe Chromatin-Immunopräzipitationen als Verbindungsglied zwischen ER- und mitochondrialem Stress identifiziert werden.

Darüber hinaus wurden isolierte intestinale Epithelzellen von Morbus Crohn als auch Colitis Ulzerosa Patienten auf die Aktivierung der ER- und mitochondrialen Stressantwort hin untersucht. Mittels Western Blot Analysen konnte eine deutliche Aktivierung beider Stressantworten in den intestinalen Epithelzellen der entzündeten Darmregionen nachgewiesen werden.

ABSTRACT

Inflammatory bowel diseases (Crohn's disease and Ulcerative colitis) are immune-mediated diseases which are characterized by an overreaction of the intestinal immune system and disturbances of the gut homeostasis. Thereby the interaction between host and intestinal microbiota plays an important role. Pattern recognition receptors like family of Toll-like receptors (TLR) are discussed in the pathogenesis of chronic intestinal inflammation. The present thesis was focused on molecular mechanisms in intestinal epithelial cells regarding the interaction between host and intestinal bacteria under conditions of chronic inflammation. Proteome analysis was used to characterize the effect of TLR2 or TLR4 deficiency on the protein expression profile from intestinal epithelial cells under noninflamed and inflamed conditions using specific-pathogen-free-colonized TLR2- and TLR4-deficient mice and TLR^{-/-} cross-bred IL-10-deficient mice at the age of 1, 8 and 16 weeks. In addition, germfree IL-10-deficient mice were mono-/dual-associated with colitogenic *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli* for 1 and 6 weeks. Bibliometric analysis revealed ER stress-associated grp-78 and mitochondrial stress-associated Chaperonin 60 as major target proteins. Based on these results and the fact that ER stress in intestinal epithelial cells is discussed in context to chronic intestinal inflammation, the second part of this thesis was focused on ER as well as mitochondrial stress responses in intestinal epithelial cells. The *in vitro* studies showed that the induction of grp-78 protein expression by the ER stressor tunicamycin also lead to enhanced expression of chaperonin 60. It is already known that CHOP is involved in ER stress response as well as in mitochondrial stress response. Chromatin-immunoprecipitation revealed CHOP as the link between both types of cell stress responses.

Furthermore, Western blot analysis of isolated intestinal epithelial cells from inflamed regions of Inflammatory bowel disease patients revealed activation of both types of stress response compared to non-inflamed controls.

1 EINLEITUNG

1.1 Entwicklung und Ökologie der Mikrobiota des Gastrointestinaltraktes

Der Gastrointestinaltrakt stellt ein komplexes und dynamisches Ökosystem dar, das eine extrem komplexe und dynamische Population an Mikroorganismen beherbergt. Bei einem Erwachsenen übersteigt die Anzahl der intestinalen Bakterien die Anzahl der körpereigenen Zellen; 10^{14} Bakterien verglichen zu 10^{13} Körperzellen [1, 2].

Der heranwachsende Fötus ist im Mutterleib keimfrei, doch bereits während der Geburt nimmt das Neugeborene Keime aus dem Geburtskanal und der Umgebung auf [3]. Enterobakterien, insbesondere *Escherichia coli*, und Laktobazillen gehören zu den Erstbesiedlern des Darms. Aber auch verschiedene Staphylokokken und Enterokokken, die als fakultative Anaerobier oder aerotolerante Bakterien den vorhandenen Sauerstoff im Darm verbrauchen bzw. tolerieren können [4, 5]. Bei gestillten Säuglingen überwiegen Bifidobakterien, wie *Bifidobacterium infantis*, *B. breve* und *B. longum* [6, 7]. Diese Dominanz wird von den Inhaltsstoffen der Muttermilch gefördert. Es handelt sich hierbei um eine Mischung aus Oligosacchariden, welche aus D-Glukose, D-Galaktose, N-Acetylglucosamin, N-Acetylneuraminsäure und L-Fuctose zusammengesetzt sind, stimulieren bevorzugt das Wachstum der Bifidobakterien [8, 9, 10]. Weitere wichtige Bestandteile in der Muttermilch ist zum Einen das sekretorische Immunglobulin sIgA, das Enzym Lysozym, welches Peptidoglykane bakterieller Zellwände angreift, und zum Anderen Lactoferrin, welches die Konzentration des frei verfügbaren Eisens niedrig hält [11].

Die letztendliche Zusammensetzung der Mikrobiota ist individuell und hängt von verschiedenen Faktoren wie den Ernährungsgewohnheiten ab. Die intestinale Mikrobiota umfasst ein weites Spektrum an Bakterienarten. Durch molekulare Analysen der 16S ribosomalen DNA stiegen die bisherigen kulturabhängigen Schätzungen von 200-300 Spezies auf bis zu 1.800 Genera mit bis zu 36.000 Spezies [12]. Dabei werden das Darmlumen, die Muzinschicht und die mukosalen Oberflächen besiedelt. Bis zu 99% der intestinalen Mikrobiota setzt sich aus vier Abteilungen zusammen: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria und Actinobacteria [12, 13]. Die Bakterienanzahl reicht von $10^1 - 10^3$ KBE/ml im Magen über $10^4 - 10^8$ KBE/ml im Ileum bis zu $10^{10} - 10^{12}$ KBE/ml im Kolon [14].

1.1.1 Bedeutung der intestinalen Mikroflora

Die Ökologie des Darms wird durch das Zusammenspiel verschiedener Faktoren, wie Mikroorganismen, intestinales Epithel, mukosales Immunsystem und intestinales Nervensystem, gestaltet. Das Verhältnis zwischen Wirt und seinen Darmbakterien kann in Kommensalismus, Symbiose und Pathogenität unterteilt werden. Das kommensale Verhältnis beinhaltet die Förderung von einem Partner, aber ohne Beeinträchtigung bzw. Schädigung des Anderen [15]. Die symbiotische Beziehung dient beiden Partnern in gleicher Weise. So können zum Beispiel angesiedelte Mikroorganismen durch die Produktion von kurzkettigen Fettsäuren positiven Einfluss auf die Differenzierung und Proliferation der intestinalen Epithelzellen nehmen und andere metabolische Prozesse fördern. Diese metabolische Aktivität stellt wichtige Energie und absorbierbare Substrate für den Wirt zur Verfügung und bietet gleichzeitig Energie und Nahrung für das Wachstum der kommensalen Bakterien [16]. Wohingegen eine pathogene Beziehung durch die Ausbeutung des einen Partner durch den Anderen gekennzeichnet ist [15].

Es ist schwer das wahre Ausmaß der mikrobiellen Diversität im Darm zu bestimmen. Nicht nur weil zwischen ansässigen und flüchtigen Spezies zu unterschieden werden muss, sondern auch weil bisher noch nicht möglich war alle Spezies *ex vivo* zu kultivieren [17]. Des Weiteren ist es durch die Komplexität der intestinalen Mikrobiota schwer nachzuvollziehen, welche biologischen Prozesse von welchen Bakterien durchgeführt werden. Um diesen Punkt und ebenso die Kommunikation zwischen intestinalen Bakterien und Wirt zu untersuchen, werden so genannte gnotobiotische Tiere (meist Mäuse) herangezogen. Diese Tiere kommen unter sterilen Bedingungen per Kaiserschnitt zur Welt und wachsen in einer sterilen Umgebung auf. Die Gnotobiologie bietet die Möglichkeit mehr Erkenntnisse über die Zusammensetzung der Mikrobiota und deren Funktionen zu erhalten. Des Weiteren können keimfreie Mäuse gezielt mit einzelnen Bakterienspezies kolonisiert werden, um Informationen über deren Rolle in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase und zum assoziierten Immunsystem zu erhalten [18, 19]. Bereits bei einem Vergleich zwischen keimfreien und besiedelten Versuchstieren zeigte sich, dass die bakterielle Mikrobiota einen dramatischen Einfluss auf die Physiologie, Morphologie, Biochemie und Entwicklung des Immunsystems des Darms hat [20]. So wurde zum Beispiel in Studien von *Bäckhed et al.* beobachtet, dass eine Kolonisierung die Glukoseaufnahme im Darm ansteigen lässt und keimfreie Tiere eine höhere Dosis an Kalorien benötigen um ein normales Körpergewicht zu erreichen [8].

1.1.2 Das intestinale Epithel und seine Rolle im intestinalen Immunsystem

Das intestinale Epithel bildet die Barriere zwischen dem Darmlumen und dem Wirt. Neben seinen Funktionen in der Verdauung, dem Nahrungstransport, dem Wasser- und Elektrolytaustausch sowie der Hormonproduktion überwacht das Epithel die Interaktionen mit kommensalen und pathogenen Mikroorganismen.

Das intestinale Epithel ist einschichtig und formt Millionen von Villi und Krypten aus, so dass sich eine Gesamtoberfläche von etwa 400 m² ergibt. Es unterliegt einer rapiden und kontinuierlichen Erneuerung durch pluripotente Stammzellen, die am Grund der Krypten lokalisiert sind. Ebenfalls in den Krypten zu finden, sind Paneth-Zellen, die anti-mikrobielle Defensine produzieren. Des Weiteren findet man in der intestinalen Epithelschicht Mukus sezernierende Becherzellen (Goblet-Zellen), M-Zellen, die spezialisierte Epithelzellen des Follikelassoziierten Epithels darstellen und absorbierende Enterozyten, die den größten Teil (ca. 90%) dieser Barriere zwischen Mikrobiota und Wirt bilden. Zusätzlich beinhaltet das intestinale Epithel enteroendokrine Zellen, welche Serotonin und andere Hormone produzieren [22].

Obwohl der Dün- als auch der Dickdarm zur Absorption von Nährstoffen genutzt wird, unterscheidet sich deren Morphologie. Die Oberfläche des Dünndarms wird durch die makroskopische Auffaltung der Mukosa in Villi und Krypten und der mikroskopischen Auffaltung in Mikrovilli, die den Bürstensaum der Epithelzellen bilden, um ein Vielfaches vergrößert [18, 23].

Neben ihrer physikalischen Barrierefunktion produzieren aktivierte Epithelzellen ein großes Spektrum an pro-inflammatorischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren, um die Integrität des Epithels aufrechtzuerhalten. Die Kommunikation zum Immunsystem ist außerordentlich wichtig, um zwischen „Gut und Böse“ unterscheiden zu können. Somit nimmt das Epithel aktiv an der Induktion des angeborenen und adaptiven Immunsystems teil. Im menschlichen Körper repräsentiert das MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*) die meisten lymphatischen Strukturen. Es übernimmt eine wesentliche Rolle in der Immunantwort gegen Pathogene und induziert eine Toleranz gegenüber den kommensalen Bakterien und den unzähligen weiteren Antigenen, die mit der Nahrung das Epithel passieren.

Das im Gastrointestinaltrakt vorherrschende lymphatische Gewebe wird als GALT (*gut-associated lymphoid tissue*) bezeichnet. Es wird in zwei funktionelle Bereiche unterteilt: die induktive und effektive Seite (Abbildung 1). Die induktive Seite umfasst die Peyerschen Plaques und lymphoiden Follikel und ist reich an Antigenpräsentierenden dendritischen Zellen, T-Zellen, welche die Immunantwort regulieren, und B-Zellen, welche nach Aktivierung zu Antikörper sezernierenden Plasmazellen proliferieren. Im Follikelassoziierten Epithel, das

über den Peyerschen Plaques liegt, sind M-Zellen zu finden, die luminalen Antigene oder Bakterien abfangen und in den subepithelialen Raum der Peyerschen Plaques transportieren, wo sie zur Erkennung den dendritischen Zellen vorgeführt werden. Dendritische Zellen können in den Peyerschen Plaques, den lymphoiden Follikel und den mesenterialen Lymphknoten eine Immunantwort initiieren. Der ausführende Teil des Darmimmunsystems beinhaltet das Epithel und die Lamina propria. Im Epithel kontrollieren einzelne intraepitheliale Lymphozyten epitheliale Schäden. Während die Lamina propria eine große Anzahl von T-Zellen, IgA-produzierenden Plasmazellen, Makrophagen und dendritischen Zellen beherbergt. Diese dendritischen Zellen tasten den luminalen Bereich durch Ausdehnung ihrer Dendriten ab, wandern über die Lympflüssigkeit in die mesenterialen Lymphknoten, um den T-Zellen Antigene zu präsentieren [24, 25].

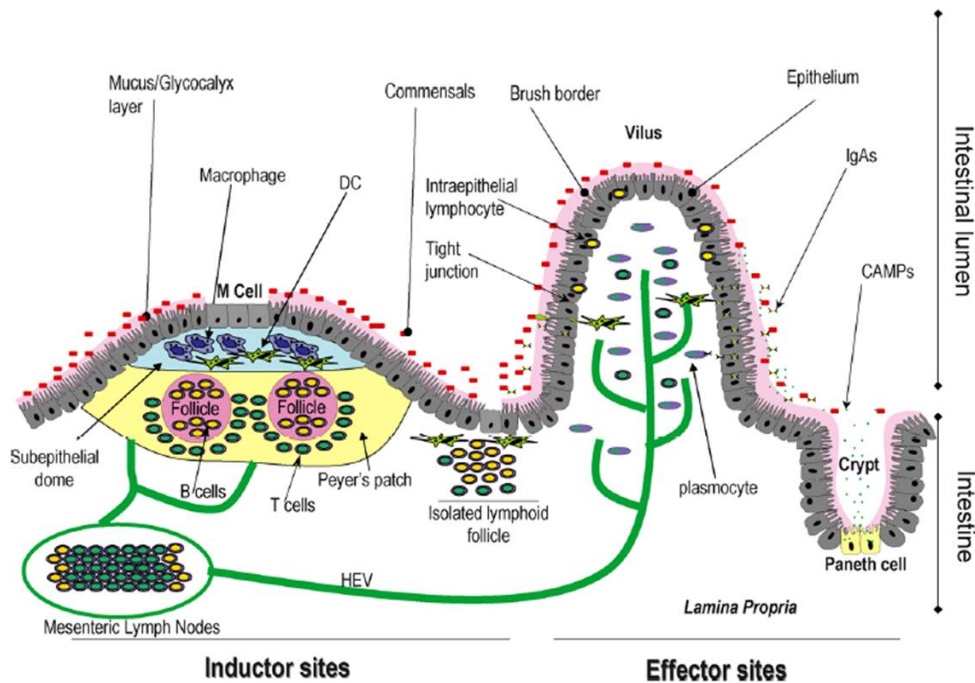


Abbildung 1: Das intestinale Immunsystem [25].

DC = dendritische Zellen; CAMP's = cationic antimicrobial peptides; HEV = high endothelial vessels

1.2 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) sind Störungen, die durch eine immunvermittelte Entzündung des Gastrointestinaltraktes charakterisiert sind. Die beiden wichtigsten Vertreter sind Colitis Ulzerosa und Morbus Crohn. Die Prävalenz dieser Erkrankungen liegt vor allem in den Industriestaaten von Europa und Nordamerika bei 10-200 Fällen pro 100.000 Einwohner [26].

1.2.1 Colitis Ulzerosa und Morbus Crohn

Der Hauptunterschied von Colitis Ulzerosa zu Morbus Crohn liegt in den Entzündungsorten im Darm (Abbildung 2). So beginnt bei Colitis Ulzerosa Patienten die Entzündung meist im Rektum (Proktitis), wobei sich in einigen Fällen die Entzündung auf den gesamten Dickdarm (Pancolitis) ausbreiten kann. Hauptsächlich ist die oberste Gewebeschicht (Mukosa) bei einer Entzündung betroffen und geht mit einer Infiltration von Lymphozyten und Granulozyten in die Lamina propria und einem Verlust der Goblet-Zellen einher. Neben Kryptenabszessen und Geschwüren kann es auch zu starken Blutungen kommen [27].

Im Gegensatz zur Colitis Ulzerosa kann bei Morbus Crohn Patienten der gesamte Verdauungstrakt vom Mund bis zum Anus betroffen sein. Am häufigsten sind dabei das terminale Ileum, das Zäkum und der Kolon betroffen. Meist wechseln sich die entzündeten Stellen mit nicht entzündeten Stellen ab, sog. *skip lesions* [28]. Die Entzündung durchzieht die gesamte Darmwand. Im Detail kommt es zu einer massiven Infiltration von Lymphozyten und Makrophagen in die Lamina propria. Eine Folge dessen sind typischerweise Stenosen, Abszesse und Fisteln. Blutungen kommen bei Morbus Crohn Patienten eher seltener vor.

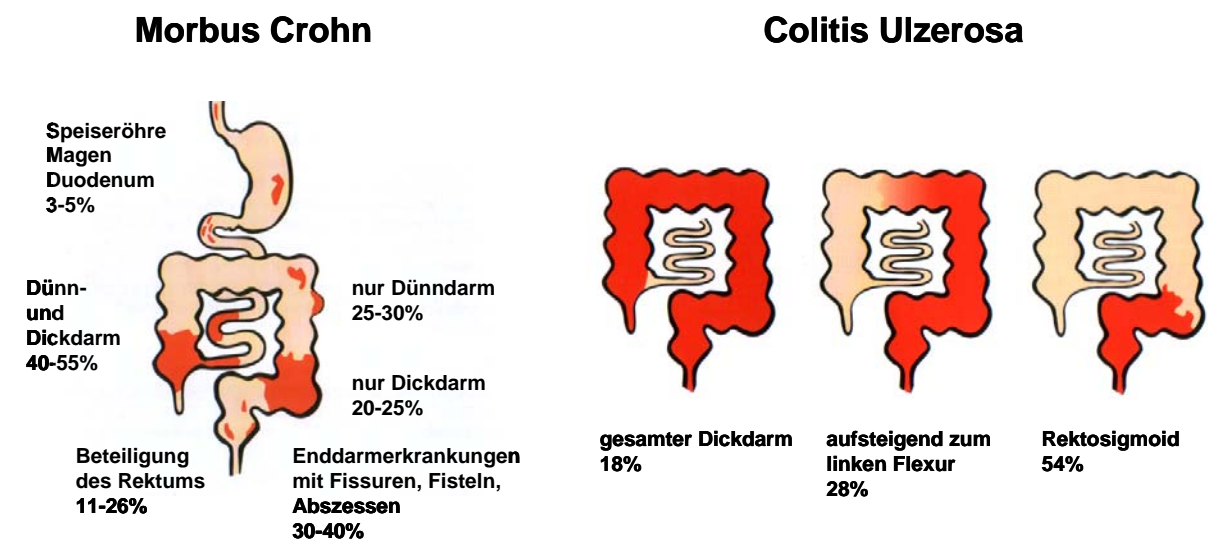


Abbildung 2: Morbus Crohn und Colitis Ulzerosa.

Lokalisierung der Entzündungsprozesse im Gastrointestinaltrakt. Morbus Crohn kann sich im gesamten Verdauungstrakt manifestieren; Colitis Ulzerosa ist zu 95% auf den Dickdarm beschränkt. [modifiziert nach www.kompetenznetz-ced.de]

Obwohl sich die Wissenschaft über eine genaue Pathogenese noch im Unklaren ist, konnten bereits einige Strategien zur Behandlung von CED-Patienten entwickelt werden. Die derzeitigen Behandlungsmethoden sind momentan darauf ausgerichtet, die Entzündung einzudämmen, eine bereits chronische Entzündung abklingen zu lassen und die beschwerdefreien Zeiträume (Remissionsphasen) möglichst lange zu erhalten.

1.2.2 Ursachen von CED

Die genaue Ätiologie der CED ist bis heute noch weitgehend unbekannt. Jedoch weiß man, dass auf der einen Seite eine genetische Prädisposition mit gleichzeitig gestörter Immunregulierung für die Entwicklung der CED verantwortlich ist [29-31]. Auf der anderen Seite kann eine Erkrankung durch Umweltfaktoren ausgelöst werden. Zusätzlich ist die Zusammensetzung der intestinalen Bakterien von großer Bedeutung [32, 33].

In den letzten Jahren rückte vor allem das Darmepithel in der Pathogenese der CED stärker in den Vordergrund. Das Darmepithel besteht aus einer einzelligen Epithelzellschicht, welche durch *tight junctions* verbunden ist. Das Darmepithel ist ständig einer Vielzahl von Nahrungskomponenten, Antigenen, Pathogenen und kommensalen Bakterien ausgesetzt. Die Epithelzellen und Immunzellen reagieren fortwährend auf diese verschiedenen Komponenten. Der Darm befindet sich dadurch unter einer Art kontrollierter Entzündung [34, 35]. Doch unter CED reagieren die Epithelzellen unter anderem exzessiv auf die kommensale Mikroflora, was zu einer Schwächung oder Verlust der Barrierefunktion des Epithels führt. Diese Instabilität bzw. erhöhte intestinale Permeabilität des Darms tritt besonders bei Morbus Crohn Patienten auf [36].

Die Kommunikation zwischen den Bakterien des Darmlumens, den Zellen der Immunabwehr und die Erkennung von Pathogenen erfolgt unter anderem über Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*) wie Toll-like Rezeptoren und die NOD-Rezeptoren (*nucleotide-binding oligomerization domain*), welche essentielle Bestandteile der unspezifischen Immunantwort darstellen [37-40]. Eines der ersten Gene, die im Zusammenhang mit Morbus Crohn identifiziert wurden, ist das Gen *CARD15/NOD2* (*caspase recruitment domain family member 15*) [30, 31]. Drei Mutationen wurden in der *leucin-rich-repeat* Region von *CARD15/NOD2*, welche für die Erkennung von Bakterien verantwortlich ist, identifiziert. Im Einzelnen sind das zwei *missense* Mutationen (Arg702Trp und Gly908Arg) und eine *frameshift* Mutation (Leu1007fsincC). Diese Mutationen in *CARD15/NOD2* sind vor allem mit einer Ausbreitung von Morbus Crohn im distalen Ileum assoziiert. Aber auch bei einigen Patienten mit Stenosen konnten diese Mutationen nachgewiesen werden [30, 33]. *CARD15/NOD2* kodiert das Protein NOD2, welches durch die Eliminierung von invasiven Bakterien zu der Aufrechterhaltung der mukosalen Barriere in Epithelzellen beiträgt [41]. NOD2 erkennt die peptidoglykanhaltige Komponente (Muramyldipeptid) aus der Bakterienzellwand und wird von Antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen und besonders von intestinalen Paneth-Zellen exprimiert. Durch die Bindung von Muramyldipeptid an die *leucin-rich-repeat* Region von NOD2 wird der Signalweg über den Transkriptionsfaktor NF- κ B (*nuclear factor- κ B*) aktiviert und die Expression verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine stimuliert. NOD2 ist auch in die

Aktivierung weiterer Signalwege, welche über die MAP (*mitogen-activated protein*) Kinasen JNK, ERK oder p-38 vermittelt werden, involviert [42, 43]. Bei einer Mutation in *CARD15/NOD2* kann eine optimale Bakterienerkennung nicht mehr gewährleistet werden, was eine bakterielle Diffusion durch die Epithelschicht zur Folge haben kann. Eine *CARD15/NOD2* Mutation bei Morbus Crohn Patienten ist meist mit einer geringeren Genexpression von Defensinen, vor allem in ilealen Paneth-Zellen, verbunden [44-46]. Defensine schützen Membranen vor bakteriellen Invasionen durch endogene antimikrobielle Peptide. Besonders die Expression der Defensine HBD-2, HBD-3 und HBD-4 (*human beta defensins B2, B3 und B4*) zeigen ein anderes Profil unter CED [44, 47].

Neben diesen und anderen genetischen Prädispositionen kann insbesondere auch eine Störung der epithelialen Barriere, was zum direkten Kontakt von kommensalen Bakterien mit Immunzellen führt, eine unkontrollierte Immunantwort auslösen. In beiden Krankheitsbildern (Morbus Crohn und Colitis Ulzerosa) zeigt sich eine aktivierte angeborene und erworbene Immunantwort und ein Zusammenbruch der Toleranz gegenüber den kommensalen Darmmikroorganismen. Normalerweise wird Toleranz gegenüber der Mikrobiota durch regulatorische T-Zellen, natürliche Killer T-Zellen, B-Zellen und dendritische Zellen und deren Zytokinen wie zum Beispiel TGF β (*transforming growth factor β*) und IL-10 (Interleukin-10) erreicht. Sowohl bei Morbus Crohn als auch bei Colitis Ulzerosa ist die Anzahl der aktivierten Makrophagen und dendritischen Zellen in der Lamina propria erhöht und es kommt zu einer vermehrten Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen [48, 49].

Die zelluläre adaptive Immunantwort wird über T-Zellen vermittelt. Nach ihrer Aktivierung differenzieren die naiven T-Zellen zu den T-Helferssubtypen Typ 1 (Th1), Typ 2 (Th2) oder Typ 17 (Th17) aus. Th1-Zellen produzieren überwiegend IFN γ , TNF und IL-2, welche zur Bekämpfung intrazellulärer Infektionen benötigt werden. Aber andererseits sind sie für die Zerstörung des Gewebes bei CED mitverantwortlich. Im Gegensatz dazu sezernieren Th2-Zellen IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13. Diese Zytokine sind zur Bekämpfung parasitärer Erkrankungen notwendig und spielen ebenfalls bei allergischen Erkrankungen eine Rolle [50-52]. Th17 sezerniert IL-17A, IL-17F und IL-22 und scheinen zur Entzündung beizutragen [53]. Bei der Erkrankung Morbus Crohn liegt vor allem eine Th1-Typ vermittelte Immunantwort vor. Aber ebenfalls scheint die Th17 vermittelte Immunantwort eine wichtige Rolle in der Pathogenese von CED einzunehmen [53]. Die aktivierten T-Zellen differenzieren nach Stimulation von Makrophagen- und dendritischen Zellen- produziertem IL-12 und IL-18 zu Th1-Zellen aus. Diese sind in ihrem differenzierten Zustand durch eben diese Zytokine gegen Apoptose geschützt und erhalten somit den Entzündungsprozess aufrecht [49, 54, 55]. Bei Colitis Ulzerosa findet man eine Th2 vermittelte Immunantwort. Allerdings ist der Anstieg der für Th2-Zellen typischen Zytokine IL-4 oder IL-5 nicht permanent im

erkrankten Gewebe detektierbar. Von daher wird bei Colitis Ulzerosa meist eine atypische Th2 vermittelte Immunantwort beschrieben, bei der natürliche Killer T-Zellen IL-13 sezernieren, in dessen Folge es zu einem zytotoxischen Epithelschaden im Kolon kommt [56, 57].

1.2.3 Zytokine und CED

Das Immunsystem bedient sich einer Reihe von Mediatoren wie pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-1, TNF oder $IFN\gamma$) oder aber auch die Rekrutierung von zirkulierenden Leukozyten, um eine Infektion zu beseitigen oder zumindest einzudämmen. Aktivierte Immunzellen benötigen einen negativen Rückkopplungsmechanismus, um die pro-inflammatorische Immunantwort zu beenden. Hierfür nutzt das Immunsystem u. a. anti-inflammatorische Zytokine wie IL-4, IL-13, TGF β oder IL-10, wobei letztere eine große Bedeutung in der Entwicklung der CED haben. Ein wichtiges Merkmal der chronischen Entzündung ist die andauernde Aktivierung von Leukozyten, was auf eine Störung in den regulatorischen Mechanismen hindeutet. Eine Hemmung von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie TNF, wird bereits erfolgreich in der Behandlung von CED angewandt. Zytokine werden vor allem von T-Zellen oder Makrophagen sezerniert, wobei Fibroblasten oder Epithelzellen ebenfalls in der Lage sind Zytokine zu produzieren. Die Signale werden nach dem Binden an die jeweiligen Rezeptoren hauptsächlich über die Transkriptionsfaktoren NF- κ B, Smads, STATs (*signal transducer and activator of transcription*) oder IRFs (*IFN regulatory factor*) weitergeleitet.

Signaltransduktion von Interleukin-10

Zytokine sind stark regulatorische Moleküle, die von Zellen des Immunsystems sezerniert werden. Interleukin-10 (IL-10) wird von zahlreichen Zellen wie regulatorische T-Zellen, Th2-Zellen, Makrophagen, dendritische Zellen und Epithelzellen produziert bzw. sezerniert. IL-10 ist ursprünglich als Inhibitor der Th1-Zellaktivität identifiziert worden [58]. Das anti-inflammatorische IL-10 beeinflusst Antigenpräsentierende Zellen wie Makrophagen oder Monozyten, indem es die Zytokinproduktion von u. a. IL-1, IL-6 oder TNF inhibiert und so die Aktivierung und Vermehrung der Th1-Zellen verhindert [59]. Obwohl IL-10 als multifunktionales Zytokin auch Effekte auf Zellwachstum und Differenzierung von diversen Zelltypen hat, ist seine prinzipielle Funktion auf pro-inflammatorische Prozesse beschränkt [60]. Frühe *in vivo* Experimente zeigten, dass IL-10-defiziente Mäuse eine starke Entzündung im Kolon entwickeln [61]. Des Weiteren wurde in Studien mit CED-Patienten festgestellt, dass IL-10 als auch sein Rezeptor Polymorphismen in CED-Patienten aufweisen

[62, 63]. Die damit verbundene Verringerung der IL-10 Sekretion führt somit zur Reduzierung des anti-inflammatorischen Effektes, was wiederum das Risiko für eine Entzündung deutlich erhöht [64].

Der Rezeptor für IL-10 (IL-10R) besteht aus zwei Untereinheiten (Abbildung 3). Untereinheit α (IL-10R1) ist ein 110 kDa Polypeptid, welches eine essentielle Rolle in der Bindung von Liganden und in der Signaltransduktion spielt. Die zweite Untereinheit β (IL-10R2) ist 40 kDa groß und lediglich in der Signaltransduktion involviert [65-68]. Die Signalweiterleitung erfolgt über den JAK-STAT Signalweg (Abbildung 3). Die Rezeptoruntereinheit IL-10R1 ist mit JAK1 (*receptor-associated Janus kinase*) assoziiert, wobei IL-10R2 mit Tyk2 (*tyrosine kinase*) verbunden ist. Die Bindung von IL-10 an die extrazelluläre Domäne von IL-10R induziert die Phosphorylierung von JAK1 und Tyk2, welche die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 induziert [69]. Diese Aktivierung beinhaltet die Bildung eines Dimers, welches in den Nukleus transloziert und an die SBE (*STAT-binding elements*) in den Promotoren der auf IL-10 reagierenden Genen bindet [70]. Der JAK/STAT Signalweg ist an verschiedenen Signalweiterleitungen von weiteren Zytokinen oder Wachstumsfaktoren wie IL-6 beteiligt [71].

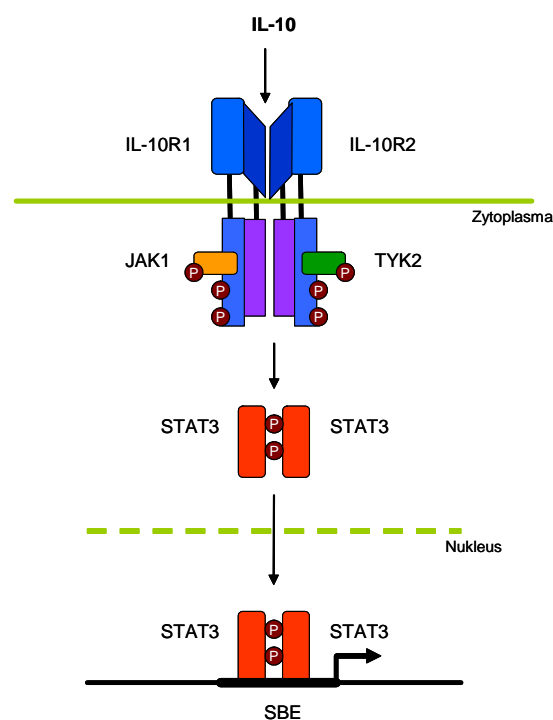


Abbildung 3: Signaltransduktion von Interleukin-10.

1.2.4 Tiermodelle für CED

Aus Tiermodellen können wichtige Erkenntnisse zur Pathogenese der CED gewonnen werden. CED-Tiermodelle sind ebenfalls durch chronische oder wiederkehrende Entzündung des Gastrointestinaltraktes wie bei humanen CED gekennzeichnet [72].

Die Zahl der Tiermodelle für CED stieg seit 1993 stetig an und umfasst momentan mehr als 100 Modelle [72]. Die Entzündung kann in verschiedener Weise induziert werden und daher in (i) Antigen-spezifische und bakterielle, (ii) chemisch induzierbare, (iii) genetische, (iv) adaptive Transfer- und (v) spontane Modelle unterteilt [72]. Die Bedeutung der T-Zellen bzw. T-Zellantwort ist in der Entwicklung einer CED besonders hoch. Der T-Zellantwort von Th1 ist vor allem in der Pathogenese von Morbus Crohn zu finden. Wohingegen die Antwort von Th2 mit Colitis Ulzerosa assoziiert wird [73-77]. Seit kurzem wird ein weiterer T-Zelltyp Th17 mit dem Entzündungsverlauf von Morbus Crohn in Verbindung gebracht [78-80].

Tabelle 1: Häufig genutzte CED-Tiermodelle.

Die Entzündung der meisten CED-Tiermodelle wird über Th1 vermittelt und beschränkt sich in den genannten Modellen weitgehend auf den Kolon.

DSS = dextran sodium sulphate; Gi = G-Protein; MDR = multi drug resistance; SCID = severe combined immuno-deficiency; TCR = T cell receptor; Tg = transgene; WASP = Wiskott-Aldrich-Syndrom Protein

Th1-vermittelte Modelle	Th2-vermittelte Modelle
IL-10 ^{-/-}	TCR ^{-/-}
MDR1 α ^{-/-}	WASP ^{-/-}
Gi2 α ^{-/-}	Oxazalone
T-bet Tg	
IL-7 Tg	
DSS	
SCID-transfer	
Tg ϵ 26	
TGF β RII negative Tg	

Genetisch induziertes Tiermodell für CED: IL-10^{-/-} Maus

Genetische Tiermodelle werden in transgene und knock-out Modelle unterteilt. Transgene Mäuse werden durch das Einschleusen von bestimmten Genen in das Erbgut generiert. Hingegen wird in den knock-out Modellen ein bestimmtes Gen deletiert. Die ersten genetischen Tiermodelle für CED wurden bereits 1993 beschrieben. Diese knock-out Modelle entwickeln eine spontane Kolitis. Es handelt sich hierbei entweder um eine Zytokindefizienz (IL-2^{-/-} und IL-10^{-/-}) [61, 81] oder ein T-Zelldefekt (α TCR^{-/-}, β TCR^{-/-}, MHC-II^{-/-}). Seit dieser Zeit ist die Anzahl von genetischen Modellen für CED rapide angestiegen. Aber nicht alle genetische CED-Modelle entwickeln eine spontane Kolitis. Bei einigen ist ein zusätzlicher Stimulus notwendig. Des Weiteren können diese Modelle mit anderen CED-Modellen wie z. B. dem adaptiven Transfermodell kombiniert werden, um eine genauere Analyse der Signalwege des Immunsystems durchzuführen.

Das IL-10^{-/-} Mausmodell ist ein weit verbreitetes Tiermodell, um die Prozesse chronischer Darmentzündung zu analysieren. Diese Mäuse entwickeln insbesondere eine chronische Kolitis; jedoch unter konventioneller Tierhaltung können sie ebenfalls eine Ileitis entwickeln [61]. Bei einer Haltung unter spezifisch-pathogenfreien Bedingungen beschränkt sich die Entzündung auf den Kolon. Unter keimfreien Bedingungen bleiben die IL-10^{-/-} Mäuse komplett entzündungsfrei [82]. Neben den Haltungsbedingungen ist auch der genetische Hintergrund für den Schweregrad der Entzündung ausschlaggebend. So ist die IL-10^{-/-} Maus mit dem genetischen Hintergrund 129SvEv anfälliger als die IL-10^{-/-} Maus mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6 [83]. Die keimfreien IL-10^{-/-} Mäuse werden für Studien genutzt, die sich mit der Assoziierung einzelner kommensaler Bakterien beschäftigt. Dadurch ist es möglich, einen Einblick zu bekommen, welche im Darmlumen vorkommenden Bakterien in einer Entzündung involviert sind. Es wurde bereits gezeigt, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendeten kommensalen Bakterien *Enterococcus faecalis* und *Escherichia coli* eine Kolitis induzieren. Diese Applikation führt zu verschiedenen Phänotypen der Kolitis. *E.coli* als Gram-negatives Bakterium induziert bereits nach drei Wochen Monoassoziiierung in der IL-10^{-/-} Maus eine milde Entzündung. Hingegen verursacht *E.faecalis* erst nach 10-12 Wochen Monoassoziiierung eine Kolitis [84]. Aber nicht jedes Bakterium, das in dem Darmlumen vorkommt, löst eine Entzündung in der IL-10^{-/-} Maus aus. So zeigten Tierstudien, dass das Bakterium *Bacteroides vulgatus* keine Entzündung in diesem Tiermodell initiiert, jedoch in keimfreien transgenen Ratten (HLA-B27tg) [82-85]. Diese Studien lassen erahnen, welche Bedeutung das Zusammenspiel zwischen der genetischen Prädisposition des Menschen und der Zusammensetzung der humanen Mikrobiota für die Entwicklung von CED hat.

1.3 Toll-like Rezeptoren

Mittels so genannter Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*), die hoch konservierte mikrobielle Strukturen (PAMPs - *pathogen-associated molecular patterns*) erkennen, ist es dem Immunsystem möglich ein breites Spektrum von Pathogenen schnell und präzise zu erkennen [86, 87]. Zu den Mustererkennungsrezeptoren gehört unter anderem die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLR), die maßgeblich an der Induktion einer Immunantwort gegen Pathogene beteiligt ist [88, 89]. Diese Induktion wird durch die Erkennung von PAMPs Gram-positiver Bakterien (Lipoteichonsäuren) [90], Gram-negativer Bakterien (Lipopolysacchariden) [91], Mycobakterien (Glykolipide) [92] als auch von Viren (ssRNA und dsRNA) [93] vermittelt. Die TLR befinden sich auf der Zelloberfläche als auch in intrazellulären Kompartimenten, wie den Endosomen. Sie werden von vielen Zelltypen exprimiert. Jedoch exprimieren die meisten Zelltypen nur einzelne dieser Rezeptoren.

Zelltypen der angeborenen Immunantwort wie Makrophagen oder dendritische Zellen exprimieren das größte Spektrum an TLR.

Der erste Zusammenhang zwischen der angeborenen Immunantwort und den Mustererkennungsrezeptoren wurde in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* beschrieben. Es wurde gezeigt, dass der Toll Rezeptor essentiell für die durch Pilzinfektion ausgelöste Immunantwort ist [94]. Schon kurz darauf wurde in Säugetieren ein Rezeptor homolog zum Toll Rezeptor aus der Fruchtfliege identifiziert, der heute als TLR4 bekannt ist [37]. Auf der Basis des ersten humanen TLR wurden weitere Proteine mit strukturellen Ähnlichkeiten zu TLR4 identifiziert [38] (Tabelle 2). Bis heute wurden 13 verschiedene TLR in Säugern, 13 in der Maus und 10 im Menschen, beschrieben [88, 95, 96]. Maus und Mensch besitzen beide die TLR1-9. Wohingegen TLR10 nur beim Menschen zu finden ist und TLR11 nur mit der Maus assoziiert ist. Obwohl die Familie der TLR in den letzten 20 Jahren eingehend untersucht wurde, ist die genaue Funktion der TLR 10, 12 und 13 noch unbekannt. Jedoch sind die Liganden und die Signalweiterleitungen von TLR1-9 und 11 bereits entdeckt und genauestens untersucht wurden. Die jeweiligen Signalweiterleitungen induzieren die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die wiederum die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen initiieren.

Die schnelle Erkennung durch TLR und die damit verbundene Immunantwort kann auch mit negativen Konsequenzen für den Wirt behaftet sein. Beispielsweise kann bei einer systemischen Infektion eine unkontrollierte Aktivierung der TLR ausgelöst werden und dies zu einer unkontrollierten Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen führen. Die damit verbundenen Auswirkung auf den Wirt, wie Erhöhung der Blutgefäße oder Produktion von Sauerstoffradikalen, können nicht nur Schäden im Gewebe hervorrufen sondern auch ein komplettes Organ schädigen [97]. In Autoimmunkrankheiten wie Diabetes mellitus Typ I [98, 99] oder chronischer Entzündungen wie Asthma oder Arthritis [100-103] wird die Rolle von TLR verstärkt diskutiert.

1.3.1 TLR 2

TLR2 wird mit der Erkennung einer Vielzahl an unterschiedlichen molekularen Oberflächenstrukturen von Mikroorganismen in Verbindung gebracht. TLR2 erkennt vor allem Peptidoglykane und Lipoteichonsäuren, die Zellwandbestandteile Gram-positiver Bakterien sind [90, 104]. Weitere Liganden des TLR2 sind u. a. Lipoarabinomannan von Mykobakterien [105], *glycoinositolphospholipide anchors* von *Trypanosoma cruzi* [106], Zymosan aus Pilzen [107] oder Lipoproteine Gram-negativer Bakterien und anderer Mikroorganismen [108]. Das breite Erkennungsspektrum erklärt sich damit, dass TLR2 sowohl mit TLR1 als auch mit TLR6 als Dimer vorkommt [109]. Makrophagen von

TLR6-defizienten Mäusen produzieren nach Stimulation mit Diacyl-Lipopeptiden von Mykobakterien keine inflammatorischen Zytokine, zeigen jedoch eine normale inflammatorische Zytokinproduktion nach Stimulation mit Triacyl-Lipopeptiden von Gram-negativen Bakterien [110]. Im Gegensatz dazu zeigen Makrophagen von TLR1-defizienten Mäusen eine normale Immunantwort auf Diacyl-Lipopeptide, aber eine ausgeprägte Immunantwort auf Triacyl-Lipopeptiden [111]. Diese Experimente zeigen deutlich, dass die funktionelle Verbindung von TLR2 zu TLR1 bzw. TLR6 der Zelle erlauben, auch die kleinsten Unterschiede wie zwischen Diacyl- und Triacyl-Lipopeptide in der Bakterienzellwand zu erkennen [112].

1.3.2 TLR 4

TLR4 stellt den essentiellen Rezeptor für die Erkennung von Lipopolysacchariden (LPS) dar, die ein Bestandteil der äußeren Zellwand von Gram-negativen Bakterien sind. In zwei verschiedenen Mausstämmen (C3H/HeJ und C57BL10/ScCr), die für ihre Reaktionslosigkeit auf LPS bekannt sind, wurden Mutationen in dem *Tlr4* Gen gefunden [91, 113]. Der Mausstamm C3H/HeJ besitzt eine Punktmutation in der zytoplasmatischen Region des *Tlr4* Gens, was zum Austausch eines hoch konservierten Prolins mit Histidin an Position 712 führt. Dieser Mutation folgt eine Generation, die keine Immunantwort auf LPS gibt. Die C57BL10/ScCr Maus besitzt eine Null-Mutation im *Tlr4* Gen. Des Weiteren wurde bereits beobachtet, dass eine TLR4-defiziente Maus hyporeaktiv auf LPS reagiert, was die Rolle von TLR4 als Rezeptor für LPS verstärkt [114]. Zusätzlich zu LPS konnte bereits gezeigt werden, dass TLR4 auch für die Erkennung von endogenen Liganden verantwortlich ist. Zu diesen Liganden gehören Hitzeschockproteine [115], oligomere Fragmente der Hyaluronsäure [116], die *extra domain A* des Fibronectins [117], Fibrinogen [118] und Polysaccharide des Proteoglycans Heparansulfat [119].

Die Erkennung dieser Liganden erfolgt nicht von TLR4 allein, sondern von mehreren Molekülen; CD14 und MD-2 (Abbildung 4). Studien haben gezeigt, dass sich nach LPS Stimulation die physikalische Lage zwischen CD14 und TLR4 veränderte, was auf die Interaktion von CD14 und TLR4 in der Erkennung von LPS hinweist [120, 121]. MD-2 wurde als Molekül identifiziert, welches mit dem extrazellulären Teil von TLR4 assoziiert ist [122]. Es zeigte sich, dass unter MD-2 Defizienz der TLR4 nicht mehr in der Lage ist, den Golgi Apparat zu verlassen und seine Position an der Zelloberfläche einzunehmen. MD-2 scheint entscheidend in den intrazellulären Weg des TLR4 einzugreifen [123].

Tabelle 2: Familie der TLR und deren Liganden. [124]

TLR	Ligand	Ursprung des Liganden
TLR1/2	Triacylierte Lipopeptide (Pam3CSK4) Lösliche Faktoren OspA Porin ProB	Bakterien, Mycobakterien <i>Neisseria meningitides</i> <i>Borrelia burgdorferi</i> <i>Neisseria meningitides</i>
TLR2	Lipoprotein/Lipopeptide Diacylierte Lipopeptide (Pam2CSK4, MALP2SK4) Peptidoglycan Lipoteichonsäure Lipoarabinomannan Modulin Glycoinositolphospholipide Glycolipide Porine Zymosan Atypisches LPS Atypisches LPS HSP 70 Hyaluronan LcrV Lyso-Phosphatidylserin Hemagglutinin Virusbestandteile	Verschiedene Pathogene Synthetisch Gram-positive Bakterien Gram-positive Bakterien Mycobakterien <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Treponema maltophilum</i> <i>Neisseria meningitidis</i> Pilze <i>Leptispira interrogans</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> Wirtseigen Wirtseigen Yersinia <i>Schistosoma mansoni</i> Masern Virus Herpes simplex Virus, Varizella-Zoster-Virus
TLR2/6	Diacylierte Lipopetide	Mycoplasmen
TLR3	PolyI:C, dsRNA	Viren
TLR4	LPS Flavolipin ER-112022, E5564, E5531 Taxol HSP60 HSP60 HSP70 TyplIII Extradomäne A von Fibronektin Oligosaccharide der Hyaluronsäure Fibrinogen Polysaccharid Fragmente von Heparansulfat α A Crystallin und HSPB8 virale Hüllproteine	Gram-negative Bakterien <i>Flavobakterium meningosepticum</i> Synthetisch Pflanzen <i>Chlamydia pneumoniae</i> Wirtseigen Wirtseigen Wirtseigen Wirtseigen Wirtseigen Wirtseigen Wirtseigen Wirtseigen Wirtseigen RSV, MMTV
TLR5	Flagellin	Bakterien
TLR7	Imidazoquinoline (Imiquimod, R-848) Bropirimine Guanosin Analoge ssRNA	Synthetisch Synthetisch Synthetisch RNA Viren
TLR8	R-848 ssRNA	Synthetisch RNA Viren
TLR9	Unmethylierte CpG DNA Chromatin-IgG Komplexe Hemozoin	Bakterien, Viren, Hefe, Insekten Wirtseigen Plasmodium
TLR10	-	
TLR11	Profilin-ähnliche Strukturen	<i>Toxoplasma gondii</i>
TLR12	-	
TLR13	-	

1.3.3 TLR-vermittelte Signaltransduktion

TLR werden von vielen unterschiedlichen Zelltypen konstitutiv oder induziert exprimiert [88]. Dabei befinden sich einige TLR an der Zelloberfläche, andere in der Membran von Endosomen oder anderen intrazellulären Organellen [125]. TLR kann man nicht nur in Immunzellen wie Monozyten/Makrophagen [126, 127], dendritischen Zellen [128] oder Mastzellen [129] finden, sondern auch in Endothelzellen [130] und Myofibroblasten [131] sowie in Epithelzellen der Lunge [132], der Niere [133] und des Gastrointestinaltraktes [134, 135].

Ortega-Cava et al. untersuchten die Verteilung von TLR2 und TLR4 im murinen Gastrointestinaltrakt [136]. Es zeigte sich, dass sich die Expression von TLR2 und TLR4 in den verschiedenen Teilen des Gastrointestinaltraktes unterscheiden. TLR4 wurde vor allem im Magen und im distalen Kolon gefunden, TLR2 im medialen und proximalen Kolon. Im Ileum hingegen war die Expression beider Rezeptoren sehr gering. Induzierte man bei Mäusen eine Kolitis durch Gabe von *Dextran Sodium Sulfate* (DSS), führte dies zu einer Erhöhung der Expression von TLR2 bzw. TLR4, deren Expressionsmuster jedoch gleich blieb [136]. Eine weitere Studie konnte durch Immunhistochemie an gesunden humanen Epithelzellen aus dem Kolon nachweisen, dass TLR2 und TLR4 ausschließlich in den Krypten der Epithelzellschicht exprimiert werden [137]. Interessanterweise zeigen diese Rezeptoren bei CED-Patienten eine unterschiedliche Expression. TLR4 wird in den intestinalen Epithelzellen verstärkt hochreguliert, wohingegen die TLR2 Expression unverändert bleibt [135].

Die Familie der TLR sind Typ I transmembrane Rezeptoren, die durch eine extrazelluläre und eine intrazelluläre Domäne charakterisiert sind (Abbildung 4). Die extrazelluläre Domäne umfasst eine divergente Ligand-Bindungsdomäne mit *leucine-rich repeats* (LRR); die intrazelluläre hingegen eine konservierte zytoplasmatische Toll/Interleukin 1 Rezeptor (TIR) Domäne. Die TIR Domäne weist Ähnlichkeiten zur Interleukin 1 Rezeptor Familie auf und spielt eine wichtige Rolle bei der Initiierung der TLR-vermittelte Signaltransduktion [87, 88].

Die TLR-vermittelte Signaltransduktion führt über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B oder IRF zur Expression einer Reihe von pro-inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Effektormolekülen wie IL-1 β , TNF, IL-6 oder IP-10 [138] (Abbildung 4). Die Aktivierung der verschiedenen Signalwege hängt von zytoplasmatischen Adapterproteinen ab, die mit der TIR Domäne in Wechselwirkung treten [139]. Bei einer Bindung der spezifischen Liganden an den extrazellulären Teil des TLR2 bzw. TLR4 wird die intrazelluläre TIR Domäne veranlasst, an das Adaptermolekül TIRAP (*TIR domain-containing adapter protein*) zu binden und ein weiteres Adapterprotein MyD88 (*Myeloid differentiation*

primary response protein) zu rekrutieren [140]. Durch diese Wechselwirkung werden Mitglieder der IRAK (*IL-1R associated kinase*) Familie rekrutiert, wobei IRAK-4 die wichtigste Rolle in dem TLR Signalweg spielt [141]. IRAK-4 assoziiert mit dem Adapterprotein TRAF6 (*TNF-receptor-associated factor 6*), welches die Kinase TAK1 (*TGF β -activated kinase*) aktiviert. TAK1 aktiviert wiederum den IKK-Komplex (I κ B), der den NF- κ B Inhibitor I κ B phosphoryliert. I κ B dissoziiert dadurch von NF- κ B und wird degradiert. Der nun aktivierte Transkriptionsfaktor NF- κ B transloziert in den Nukleus und induziert die Genexpression pro-inflammatorischer Zytokine. Neben NF- κ B können auch MAP Kinasen wie p38 oder JNK (*cJun N-terminal kinase*) aktiviert werden [87, 138].

Das Adapterprotein TIRAP ist essentiell für die MyD88 abhängige TLR2 bzw. TLR4 vermittelte Signaltransduktion; während TRIF (*TIR domain-containing adapter protein inducing IFN- β*) und TRAM (*TRIF related adapter molecule*) den Signalweg von TLR4 auch MyD88 unabhängig aktivieren können. TRAM tritt in Wechselwirkung mit TRIF, welches über TRAF6 NF- κ B aktivieren kann [142]. Der TRAM-TRIF-Komplex kann außerdem die Kinasen IKK ϵ (I κ B kinase) und TBK1 (*TANK-binding kinase*) aktivieren, welche den Transkriptionsfaktor IRF3 phosphorylieren. IRF3 transloziert in den Nukleus und induziert u. a. die Genexpression von IFN β [87, 95].

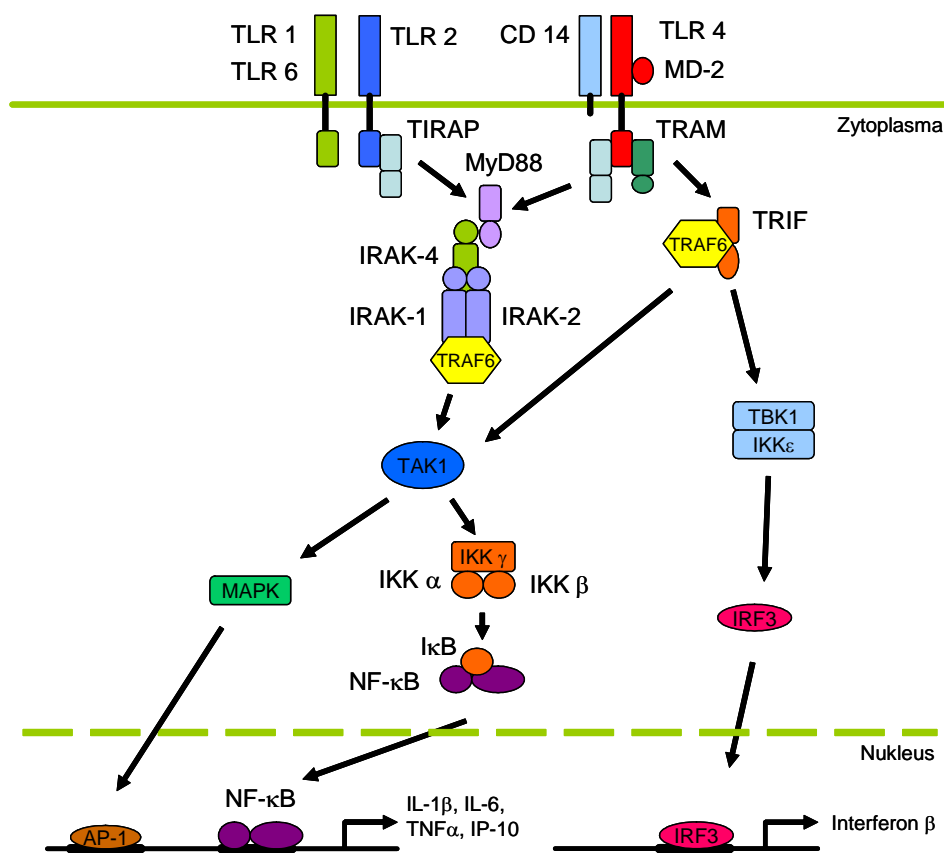


Abbildung 4: TLR2- bzw. TLR4-vermittelte Signaltransduktion. [modifiziert nach 95]

Neben der Erkennung von Pathogenen sind TLR auch bedeutend für die Erkennung von kommensalen Mikroorganismen im Darm. Unter normalen Bedingungen wird die Aktivierung der TLR durch Proteine wie Tollip, PPAR γ , A20 oder SIGIRR inhibiert [143-146]. Eine Reihe von Studien zeigte, dass die basale Aktivierung der TLR durch kommensale Bakterien eine entscheidende Rolle für die Aufrechterhaltung der Homöostase in der intestinalen Mukosa spielt. *Rakoff-Nahoum et al.* zeigten, dass die Entstehung einer Kolitis unter IL-10 Defizienz von einem intakten TLR-MyD88 Signalweg abhängt [147]. Die histologische Analyse des Kolons von TLR4-defizienten Mäusen nach Behandlung mit 2,5% DSS zeigten, dass unter TLR4 Defizienz keine neutrophile Infiltration nachzuweisen ist. Des Weiteren findet eine erhöhte Translokation von Gram-negativen Bakterien aus dem Darmlumen hin zu mesenterialen Lymphknoten in TLR4-defizienten Mäusen statt [148].

Bei Ausfall von regulatorischen Mechanismen tragen die kommensalen Bakterien zur Entzündung im Darm bei. Man geht seit Längerem davon aus, dass die intestinale Mikrobiota einen wichtigen Punkt in der Pathogenese der CED darstellt [34]. Die erhöhte TLR4 Expression in CED-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen gibt Hinweise darauf, dass die TLR in der Pathogenese von CED involviert sein können [135].

1.4 Zelluläre Stressmechanismen

In der Entwicklung einer chronischen Entzündung im Darm spielen viele Faktoren eine Rolle. Die intestinale Epithelzellschicht als Barriere zwischen den intestinalen Bakterien und dem Immunsystem rückt dabei in den Mittelpunkt. Durch ihr adaptives Zusammenspiel mit den intestinalen Bakterien und den Immunzellen zeigte sich, dass die Epithelzellschicht essentiell für die mukosale Homöostase ist. Das Wissen über die zellulären Mechanismen in den intestinalen Epithelzellen unter Entzündung ist in den letzten Jahren rapide gewachsen und das Zellorganell endoplasmatisches Retikulum (ER) gewann dabei an Aufmerksamkeit. *Shkoda et al.* zeigten zum ersten Mal, dass CED-Patienten als auch entzündete IL-10-defiziente Mäuse eine verstärkte Expression des ER-Stress Chaperons grp-78 (*glucose-related protein-78*) aufweisen [149]. Diese Beobachtung impliziert eine bestehende Verbindung zwischen der Entstehung chronischer Entzündung und ER-Stress.

1.4.1 *Unfolded protein response* aus dem endoplasmatischen Retikulum

Das endoplasmatische Retikulum (ER) ist ein verzweigtes Kanalsystem flächiger Hohlräume (Zisternen), das von Membranen umschlossen ist. Seine Hauptfunktionen beinhalten die Synthese von Proteinen und deren post-translationalen Modifizierung, Faltung und Sekretion. Zudem dient es als intrazellulärer Kalziumspeicher [150]. Faktoren wie ATP, Kalzium oder

ein prooxidatives Milieu unterstützen das ER bei der optimalen Faltung der Proteine [151]. Das ER reagiert sehr sensibel auf physiologische und biochemische Veränderungen wie Verschiebung des Redox-Gleichgewichts oder des Kalziumspiegels, Mangel an ATP und Glukose, veränderte Proteinglykosylierung, Hypoxie oder mikrobielle Infektionen. Unter diesen Bedingungen ist die Kapazität der Proteinfaltung im ER reduziert und es kommt in Folge dessen zu einer Akkumulation von ungefalteten Proteinen. Dieser Zustand wird als ER-Stress bezeichnet. Als Antwort auf den ER-Stress wird die so genannte *unfolded protein response* (UPR) aktiviert (Abbildung 5). Die UPR führt zu einer Reduktion der ungefalteten Proteine, hervorgerufen durch die Inhibierung der Translation und die Förderung der Proteinfaltung, -sekretion und -degradierung. Kann die Homöostase im ER jedoch nicht wiederhergestellt werden, führt eine dauerhaft aktivierte UPR zur Apoptose [152].

Die aktivierte UPR wird über drei transmembrane Rezeptoren, PERK (*pancreatic ER kinase-like ER-associated kinase*), ATF6 α (*activating transcription factor 6*) und IRE1 (*inositol requiring enzyme 1*), vermittelt. Unter normalen Bedingungen liegen die luminalen Domänen der Rezeptoren gebunden an das Chaperon grp-78 vor und werden so inaktiv gehalten. Sobald ungefaltete oder falsch gefaltete Proteine im ER akkumulieren, dissoziiert grp-78 von den Rezeptoren und aktiviert so die UPR [152, 153].

Dissoziiert grp-78 von PERK, wird dessen Homodimerisierung und die Autophosphorylierung der Kinase induziert [154]. Diese PERK Aktivierung führt zur Phosphorylierung von eIF2 α (*eukaryotic translation initiation factor 2*), in Folge dessen die Proteintranslation inhibiert wird [153]. Allerdings kann dieser translationale Stopp von einigen Genen umgangen werden; dazu gehört ATF4 (*activating transcription factor 4*). ATF4 bindet an ARE (*antioxidant response elements*) und induziert die Transkription von Proteinen, die am Aminosäuremetabolismus, an Redoxreaktionen, an der Resistenz gegenüber oxidativem Stress oder an der Proteinsekretion beteiligt sind [155]. Neben der Aktivierung der anti-apoptotischen Signale induziert ATF4 auch den Transkriptionsfaktor CHOP (*CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein*), welcher pro-apoptotisch wirkt [156]. Als negativer Feedbackmechanismus wird durch die Bindung von ATF4 an ARE auch die Expression von GADD34 (*growth-arrest DNA damage gene 34*) induziert, welcher eIF2 α dephosphoryliert und somit inhibiert [157, 158]. Durch die PERK Aktivierung kann ein weiterer Transkriptionsfaktor, NRF-2 (*nuclear respiratory factor 2*), phosphoryliert werden, welcher die Expression von Proteinen initiiert, die in die Regulation der oxidativen Stressantwort involviert sind und für das Überleben der Zelle sorgen [159].

Der zweite ER-assoziierte Rezeptor ATF6 α wird ebenfalls durch die Dissoziation von grp-78 aktiviert. Daraufhin wird ATF6 α in Vesikeln zum Golgi-Apparat transportiert. Im Golgi-Apparat wird die zytoplasmatische Domäne von ATF6 α durch *site-1* und *site-2* Proteasen abgespalten, woraufhin das funktionelle Fragment von ATF6 α ins Zytosol gelangt und in den

Nukleus transloziert. Es bindet an ERSE (*ER-stress response elements*) und aktiviert die Transkription von *grp-78* oder CHOP [156].

Nach der Dissoziation von *grp-78* wird der dritte ER-assoziierte Rezeptor IRE1 durch Homodimerisierung und Autophosphorylierung aktiviert [154]. Die Endonuklease von IRE1 entfernt ein 26-Nukleotid Intron aus der naiven mRNA von XBP-1 (*X-box binding protein 1*), dessen Transkription durch ATF6 α veranlasst wird. Die entstandene Spleißvariante der XBP-1 mRNA (*sXBP-1*) codiert einen stabilen Transkriptionsfaktor, der in den Nukleus transloziert [160]. *sXBP-1* bindet an die UPRE (*unfolded protein response elements*) und initiiert die Transkription von ER Chaperonen. D. h. von Proteinen, die in die Proteindegradierung involviert sind oder von dem Hitzeschockprotein 40 (P58^{IPK}) [161]. P58^{IPK} bindet und inhibiert PERK und löst auf diese Weise einen zweiten negativen Feedbackmechanismus für den PERK Signalweg und dessen damit verbundenen translationalen Block aus [162]. Für die anderen beiden Signalwege ist bisher noch kein Feedbackmechanismus bekannt.

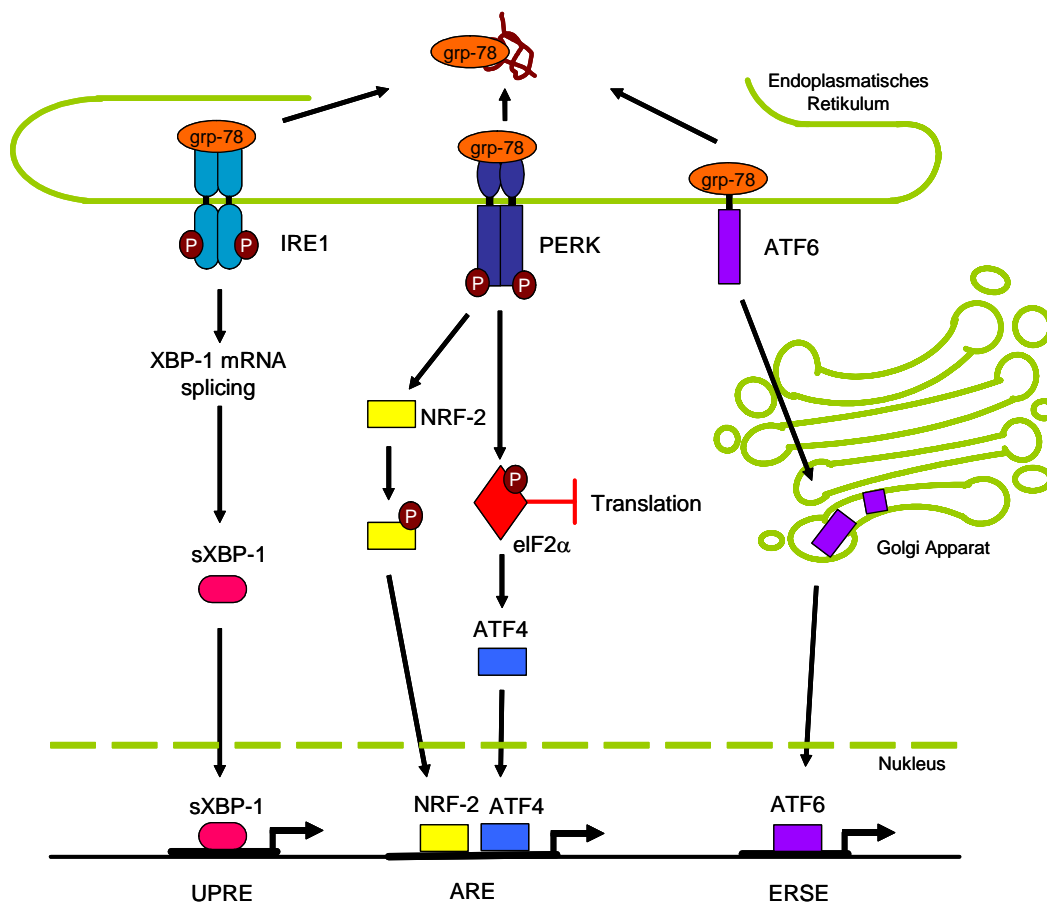


Abbildung 5: ER-Stress assoziierte *unfolded protein response*. [modifiziert nach 153]

Kommt es im ER zu einer lang anhaltenden Akkumulation von ungefalteten Proteinen, wird zelluläre Apoptose induziert, um das Überleben des Organismus zu sichern. CHOP übernimmt die Rolle des Vermittlers in der ER-Stress induzierten Apoptose. Der genaue

Mechanismus ist jedoch noch nicht bekannt [156]. Ein weiterer Signalweg zur Apoptose wird über IRE1 aktiviert. Der zytoplasmatische Teil von IRE1 bindet an das Adapterprotein TRAF2; beide formen zusammen mit der MAPKK Kinase ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*) einen Komplex. Dieser Komplex phosphoryliert und aktiviert JNK, welcher die pro-apoptotischen Signalwege induziert [163].

Man ist sich noch nicht im Klaren darüber, ob die lang anhaltende ER-Stressantwort die primäre Ursache oder die Folge von Krankheiten darstellt [152]. Erkrankungen, die mit ER-Stress in Verbindung gebracht werden, sind u. a. neurodegenerative Krankheiten, Diabetes mellitus, kardiovaskuläre Krankheiten, zerebrale Ischämie, Krebs und virale Infektionen [164-170]. Durch Studien wie von *Shkoda et al.* gewinnt der ER-Stress auch in der Entwicklung der chronischen Entzündung im Darm zusehend an Bedeutung [149]. Es konnte bereits beobachtet werden, dass es unter einer XBP-1 Defizienz zum Verlust von Paneth-Zellen und zur Reduktion von Goblet-Zellen kommt. Der apoptotische Verlust der Paneth-Zellen ist mit einer verstärkten Expression des pro-apoptotischen ER-Stress Transkriptionsfaktors CHOP verbunden, was somit die Risiken für eine chronische Entzündung im Darm ansteigen lässt [171]. In diesem Kontext zeigte eine weitere Studie, dass eine Störung der Muzinproduktion durch den Verlust von Goblet-Zellen mit einer erhöhten Expression des ER Chaperons grp-78 und intestinaler Entzündung zusammenhängt [172]. Eine verminderte grp-78 Expression wurde hingegen in CHOP-defizienten Mäusen nachgewiesen, die gleichzeitig weniger sensitiv in Bezug auf eine DSS-induzierte Kolitis sind als die Wildtypmäuse [173]. Des Weiteren ist die Abwesenheit des ER-Stress Transkriptionsfaktors IRE1 β mit einer höheren Sensibilität gegenüber einer DSS-induzierten Kolitis verbunden [174]. Über die Rolle von TLR in der Aktivierung von ER-Stress ist derzeit nur wenig bekannt. Bisher beschrieben *Endo et al.*, dass es in Lungenzellen von LPS-stimulierten Mäusen zu einer Aktivierung von CHOP und somit zur Aktivierung von ER-Stresses kommt, was zur Apoptose der Lungenzellen führt [175, 176]. Des Weiteren wurde in einer kürzlich veröffentlichten Studie gezeigt, dass eine Aktivierung des TLR Signalweges den ER-assoziierten Rezeptor IRE1 α und dessen Transkriptionsfaktor XBP-1 aktiviert. Die TLR-vermittelte Aktivierung von XBP-1 ist für eine optimale und fortwährende Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen in Makrophagen notwendig [177]. All diese Studien implizieren deutlich, dass der ER-Stress einen essentiellen Einfluss auf die Pathogenese von CED zu haben scheint. Darüber hinaus unterhält das ER auch Signalwege zu anderen Zellorganellen wie dem Zellkern oder dem Mitochondrium. Diese Verbindungen dürfen bei der Betrachtung der Entwicklung einer Entzündung nicht außer Acht gelassen werden. Vor allem das Mitochondrium, als zellulärer Energieproduzent, rückt im Kontext zu dem Energieverbrauchenden Prozess ER-Stress in den Mittelpunkt.

1.4.2 *Unfolded protein response* aus dem Mitochondrium

Das Mitochondrium ist ein von einer Doppelmembran umschlossenes Zellorganell mit eigener DNA, welches in fast allen Eukaryoten in großer Anzahl vorkommt. In dem Mitochondrium läuft die Energieliefernde Zellatmung, β -Oxidation und die ATP-Bildung ab. Es wird daher auch häufig als „Kraftwerk der Zelle“ bezeichnet. Die Mehrheit der mitochondrialen Proteine ist im Nukleus kodiert. Sie werden in ihrer primären Proteinstruktur zum bzw. ins Mitochondrium transportiert, um in der mitochondrialen Matrix in ihre Endform gefaltet zu werden. Die wenigen mitochondrialen Proteine, die im mitochondrialen Genom kodiert sind, werden direkt in der mitochondrialen Matrix synthetisiert und als Baustein in die Atmungskettenkomplexe, in der inneren Membran sitzend, integriert [178, 179]. Wie auch im ER kann durch ungefaltete oder falsch gefaltete Proteine im Mitochondrium eine UPR initiiert werden. Die mitochondriale Matrix beinhaltet ein Set an Chaperonen, die in den Proteinimport und in die Proteinfaltung involviert sind. Zu diesen Chaperonen gehört unter anderem Chaperonin 60, Chaperonin 10, grp-75 und Tid-1 (mtDnaJ) [179]. Der genaue Mechanismus der mitochondrialen Stressantwort ist noch unbekannt. *Zhao et al.* nutzten eine genetisch veränderte Mutante des mitochondrialen Proteins Ornithin-Transcarbamylase, um gezielt im Mitochondrium eine UPR auszulösen. Sie fanden dabei heraus, dass der Transkriptionsfaktor CHOP in die Aktivierung der mitochondrialen UPR involviert ist [179]. Weitere Studien, die das mutierte mitochondriale Protein als Stressor verwendeten, zeigten ebenfalls, dass CHOP in der Induzierung von Proteinen der mitochondrialen UPR eine wichtige Rolle spielt. Es stellte sich heraus, dass neben den bereits genannten mitochondrialen Chaperone noch weitere mitochondriale UPR assoziierte Proteine (MPP β , Trx2, ClpP, YME1L1, Tim17A, NDUFB2, *endonuclease G*, *cytochrome C reductase*) eine Zielsequenz für CHOP beinhalten [180, 181].

Die Frage, ob es ein Zusammenspiel zwischen ER-Stress und mitochondrialem Stress existiert, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Auch die Rolle der mitochondrialen UPR in der Entwicklung chronischer Darmerkrankungen ist bisher noch nicht beschrieben worden.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Bei der Entwicklung chronischer Darmentzündung spielen Faktoren wie die Kommunikation zwischen Wirt und Mikrobiota eine Rolle. Die intestinale Epithelzellschicht als Barriere zwischen intestinalen Mikroorganismen und dem Immunsystem rückt dabei in den Mittelpunkt. Zahlreiche Mustererkennungsrezeptoren ermöglichen dem Immunsystem schnell und präzise auf pathogene Mikroorganismen zu reagieren.

Diese Arbeit befasste sich mit der Untersuchung von molekularen Mechanismen chronischer Entzündung in intestinalen Epithelzellen im Hinblick auf die Wechselwirkungen zwischen Wirt und Bakterien.

Im ersten Teil der Arbeit wurde mittels Proteomanalyse die Auswirkung einer TLR2 bzw. TLR4 Defizienz in der Kommunikation mit dem intestinalen Epithel unter nicht entzündlichen und entzündlichen Bedingungen untersucht. Hierfür wurden SPF-kolonisierte TLR2-, TLR4-, IL-10XTLR2- und IL-10XTLR4-defiziente Mäuse im Alter von 1, 8 und 16 Wochen verwendet. Weiterführend wurden keimfreie IL-10-defiziente Mäuse mit den kommensalen Bakterien *E.faecalis* und *E.coli* für 1 und 6 Wochen mono- bzw. dualassoziert, um die unterschiedlichen Effekte von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien in der Interaktion mit dem Darmepithel unter Bedingung chronischer Entzündung darzustellen. Auch hier wurde mittels funktioneller Proteomanalyse ein Proteinexpressionsprofil erstellt. Die Proteomanalysen ergaben signifikant regulierte Proteine, welche bei ER Stress eine Rolle spielen. Studien diskutieren ER Stress in IEZ in Verbindung mit der Pathogenese von CED. Aufgrund dieser Tatsache wurde im zweiten Teil der Arbeit die ER- bzw. mitochondrialen Stressantwort untersucht. Die Verbindung zwischen dem ER-Stress und mitochondrialem Stress stand dabei im Vordergrund.

2 MATERIAL & METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Soweit nicht anders angegeben, wurden die aufgelisteten Chemikalien von in Deutschland ansässigen Firmen bezogen.

Chemikalien	Hersteller/Lieferant
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
2-Propanol	Roth, Karlsruhe
Aceton	Merck, Darmstadt
Acetonitril	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe
alpha-cyano-4hydroxy-cinnamic acid (HCCA)	Roth, Karlsruhe
Antibiotika/Antimykotika	Roth, Karlsruhe
Ammoniumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
Ammonium-Persulfat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	AppliChem, Darmstadt
Biuret-Reagenz	Waldeck, Münster
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Carbonyl Cyanid	
p-Trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP)	Sigma Aldrich, Steinheim
CHAPS	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie [®] Brillant Blau G250	Roth, Karlsruhe
DEPC-Wasser	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe
dNTPs	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
EGTA	AppliChem, Darmstadt
Entwickler	Agfa-Gevaert, Mertsel
Essigsäure 100%	Roth, Karlsruhe

Ethanol \geq 96%	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe
Fixierer	Agfa-Gevaert, Mertsel
Forene (Narkosemittel)	Abbott, Wiesbaden
Formalin	Sigma Aldrich, Steinheim
Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Becton Dickinson, Heidelberg
Hepes	AppliChem, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Jodacetamid	Sigma Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Mercaptaethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol \geq 99,9%	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
MMLV-Puffer (5x)	Invitrogen, Karlsruhe
MMLV-Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumazid	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Pharmalyte pH 3-10	GE Healthcare, München
Phosphataseinhibitor	Roche Diagnostics, Mannheim
Phosphorsäure	Roth, Karlsruhe
PBS (ohne Ca/Mg)	Invitrogen, Karlsruhe
Percoll	Amersham, Buckinghamshire
Plus One DryStrip Cover Fluid	Amersham, Buckinghamshire
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Protease-Inhibitor	Roche Diagnostics, Mannheim
Protein Assay Dye Reagenz (Bradford)	BioRad Laboratories, München
Random Hexamer	Invitrogen, Karlsruhe
RNAlater	Qiagen, Hilden
RNase-Inhibitor	Invitrogen, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe

Saccharose	AppliChem, Darmstadt
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
SDS	Merck, Darmstadt
Silicon DC 200 fluid 10ct	Serva, Heidelberg
Succinat	Sigma Aldrich, Steinheim
Temed	Roth, Karlsruhe
Thioharnstoff	Roth, Karlsruhe
Trifluoressigsäure	Roth, Karlsruhe
Tris-Base	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Gibco, Eggenstein
Trypsin	Promega, Mannheim
Tween 20	Sigma Aldrich, Steinheim
Tryptikase Pepton	Becton Dickinson, Heidelberg

2.1.2 Antikörper, Zytokine und andere Stimulatoren

Primärantikörper	Hersteller/ Lieferant
β -Actin	MP Biomedicals, Aurora
cleaved caspase 3	Cell Signaling, Frankfurt
CD3	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
CD19	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Chaperonin 60	Cell Signaling, Frankfurt
CHOP	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
ClpP	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Kreatinkinase	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Cytocrome C Oxidase	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
E-Cadherin	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
grp-75	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
grp-78	Sigma Aldrich, Steinheim
Integrin α X	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
OTC	Sigma Aldrich, Steinheim
P-eIF2 α	Cell Signaling, Frankfurt
Tid-1	Cell Signaling, Frankfurt

Sekundärantikörper

Anti-Goat IgG (HRP-linked)

Anti-Mouse IgG (HRP-linked)

Anti-Rabbit IgG (HRP-linked)

Hersteller/ Lieferant

Santa Cruz, Santa Cruz, USA

Dianova, Hamburg

Dianova, Hamburg

Zytokine

Interleukin-10 (murin)

R&D Systems, Heidelberg

Sonstige

Tunicamycin

Sigma Aldrich, Steinheim

2.1.3 Synthetische Oligonukleotid-Primer

Alle Primer wurden bei MWG Biotech AG in einer Konzentration von 100 pmol/μl bestellt und mit einer Endkonzentration von 20 pmol/μl eingesetzt.

ND6

Forward-Primer: 5' GGG TTT GGT GGA TCG TTT TT 3'

Reverse-Primer: 5' ACC AAT CTC CCA AAC CAT CA 3'

VLDLR

Forward-Primer: 5' TTC CTA TTG GCA GCA AAT CC 3'

Reverse-Primer: 5' CAC CAG TCC TGT GCC TTT TT 3'

grp-78 Promotor

Forward-Primer: 5' CAT TGG TGG CCG TTA AGA ATG AC 3'

Reverse-Primer: 5' AGT ATC GAG CGC GCC GTC GC 3'

Chaperonin 60 Promotor

Forward-Primer: 5' TGA AAG AAC GAG CCC C 3'

Reverse-Primer: 5' GCA ATG AGC CCG AGT C 3'

CHOP Promotor (Targetsequenz von cJun)

Forward-Primer: 5' GCG GCT TCG CGG AGG AGG 3'

Reverse-Primer: 5' CGG TTG CCA AAC ATT GCA TCA T 3'

CHOP Promotor (Targetsequenz von ATF6 α)

Forward-Primer: 5' CCT CCT CCG CGA AGC CGC 3'

Reverse-Primer: 5' TGT TAG GCT CAA GAT AAC TGA CCT 3'

CHOP Promotor (Targetsequenz von ATF4)

Forward-Primer: 5' GCA CCT AGA GTT GCC A 3'

Reverse-Primer: 5' ATA GAC CTC AAG TCC GC 3'

2.1.4 *Small interference RNA* Sequenz

Die siRNA wurde von Qiagen GmbH (Hilden) bezogen und in einer Endkonzentration von 6 pmol verwendet.

Chaperonin 60

Target Sequenz: 5' CTG GTT TCC TTT GAC GAT ATA 3'

2.1.5 Geräte und Zubehör**Gerät/ Zubehör**

Analysewaage APX-1502

Autoflex 1 MALDI-TOF MS

BioPhotometer

Clark-Elektrode

CO₂-Inkubator

Durchlichtmikroskop

Ettah IPGphor 3

GeneFlash

Horizontalschüttler

Light Cycler

Magnetrührer IKAMAG[®] RCT basic

Multiscan CS-800

pH-Meter inoLab pH Level 1

Power Supply Standard Power Pack P25

PROTEAN[®] Mini CellPROTEAN[®] plus Dudeca[™] Cell

Röntgenkassette

Spekrophotometer Nanodrop ND-1000

Hersteller/ Lieferant

Denver Instrument, Göttingen

Bruker Daltonics, Bremen

Eppendorf AG, Hamburg

ADInstruments, Spechbach

Binder, Tuttlingen

Leica Microsystems, Wetzlar

GE Healthcare, Freiburg

Syngene, Cambridge, UK

UniEquip, München

Roche Diagnostics, Mannheim

IKA, Staufen

BioRad Laboratories, München

WTW, Weilheim

Biometra, Göttingen

BioRad Laboratories, München

BioRad Laboratories, München

Rego, Augsburg

Peqlab Biotechnologie, Erlangen

Sterilbank	Kojair Tech Oy, Vilppula
Thermocycler	Thermo Electron, Karlsruhe
Thermo Classic™	Thermo Electron, Karlsruhe
Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg
Thermoshake	C. Gerhardt, Königswinter
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad Laboratories, München
Ultraschallprozessor UP 200S	Dr. Hielscher, Teltow
Vortex-Schüttler MS 2 Minishaker	IKA, Staufen
Wasserbad	Thermo Electron, Karlsruhe
Wippschüttler Rocky	Fröbel, Lindau
Zentrifugen	Sigma Laborzentrifugen, Osterode

2.1.6 Software und Datenbanken

Software

BiblioSphere Software
 Flex Analysis Software
 Flex Control Software
 ProteomWeaver
 SigmaPlot 9.0

Hersteller/ Lieferant

Genomatix, München
 Bruker Daltonics, Bremen
 Bruker Daltonics, Bremen
 Definiens, München
 Statcon, Witzhausen

Datenbank

Swiss-Prot (www.expasy.ch/sprot/)

Hersteller/ Lieferant

Amos Bairoch, Universität Genf, Schweiz
 und European Bioinformatics Institute,
 EBI, Hixton, UK

2.2 Methoden

2.2.1 Mausmodelle und deren bakterielle Kolonisierung

2.2.1.1 TLR2-, TLR4-, IL-10-, IL-10XTLR2- und IL-10XTLR4-defiziente Mäuse

Die TLR2- und TLR4-defizienten Mäuse (C57BL/10-ScSn) wurden aus der Zucht des Max-Planck-Instituts für Immunbiologie (Prof. Marina Freudenberg, Freiburg) zur Verfügung gestellt. Diese wurden mit den IL-10-defizienten Mäusen (129SvJ, Prof. R. Balfour Sartor, University of North Carolina, Chapel Hill, USA) viermal rückgekreuzt, um die IL-10XTLR2^{-/-} und IL-10XTLR4^{-/-} Mäuse zu generieren. Die Versuchstiere wurden in dem Forschungsinstitut für Experimentelle Medizin der Charité Universitätsmedizin in Berlin untergebracht und wuchsen unter spezifisch-pathogenfreien (SPF) Bedingungen auf und wurden im Alter von 1, 8 und 16 Wochen getötet. Die Wildtypmaus (C57BL/10-ScSn) bzw. IL-10^{-/-} Maus wurden als Kontrollen genutzt.

2.2.1.2 Keimfreie IL-10-defiziente Mäuse

Die keimfreien IL-10^{-/-} Mäuse (129SvEv TAC, bereitgestellt von Dr. Edward Balish, University of Wisconsin, Madison, USA) und die dazugehörigen Wildtypmäuse wurden im Alter von ca. 12 Wochen mit einem humanen oralen Isolat des *Enterococcus faecalis* Stammes OG1RF (bereitgestellt von M. Huycki, University of Oklahoma, Oklahoma City, OK, USA) und einem murinen Stamm des *Escherichia coli* (Isolat aus einer unter SPF-Bedingungen aufgewachsenen Wildtypmaus) mono- bzw. dualassoziiert. Die Mäuse wurden in der Tierzucht des „National Gnotobiotic Rodent Resource Center“ der University of North Carolina (Prof. R. Balfour Sartor, Chapel Hill, USA) gehalten. Die Assoziierung der Bakterienstämme erfolgte oral und rektal. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden Bakterienkulturen (aerob und anaerob) der Stuhlproben in regelmäßigen Abständen und nach dem Töten der Mäuse angefertigt. Die Mäuse wurden 1 bzw. 6 Wochen nach dem Beginn der Kolonisierung getötet.

Die oben genannten Versuchstiere wurden zur histologischen Untersuchung Abschnitte des Zäkums sowie des proximalen und distalen Kolons entnommen und in 10% neutral gepufferten Formalin fixiert. Das fixierte Gewebe wurde in Paraffin eingebettet. Die histologische Analyse erfolgte durch eine unabhängige Bewertung des Grads der

Zellinfiltration in die Lamina propria, der Kryptenhyperplasie, des Abbaus der Goblet-Zellen und der Gewebsmorphologie [182].

2.2.2 Isolierung primärer intestinaler Epithelzellen

Lösungen:

Kulturmedium	88,4% DMEM 10% (v/v) FCS 0,8% (v/v) Glutamin
20% Percoll-Lösung	20% Percoll 80% Kulturmedium
40% Percoll-Lösung	40% Percoll 60% 1xPBS
Lysispuffer	7 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 1 M DTT 2% CHAPS 2% Pharmalyte (pH 3-10) 4% Proteaseinhibitor 4% Phosphataseinhibitor

Die Mäuse wurden mittels Narkotisierungsmittel Forene getötet und der gesamte Darm entnommen. Für die histologischen Untersuchungen wurden ca. 0,5 cm große Gewebestücke vom distalen Kolon und der Zäkumspitze abgetrennt und in 10% Formaldehyd fixiert. Der Rest des Kolons und Zäkums wurden longitudinal aufgeschnitten und der Darminhalt mit einer Impföse entfernt. Der aufgeschnittene Darm wurde in 1x PBS (Ca^{2+} -/ Mg^{2+} -frei) gewaschen und in 0,5 cm große Stücke geschnitten. Die Gewebestücke wurden in Kulturmedium versetzt mit 1 mM DTT für 30 min bei 37°C inkubiert. Hierbei dient DTT zur Reduktion der Disulfidbrücken und unterstützt das Lösen der Zellen aus dem Gewebe. Vor, zwischen und nach der Inkubation wurde die Lösung mit den enthaltenen Darmstücken für jeweils 1 min gevortext und anschließend mittels eines Teesiebes filtriert. Die filtrierte Lösung wurde für 7 min bei 300g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das entstandene Pellet in 5 ml Kulturmedium resuspendiert. Die im Filter zurückgebliebenen Gewebestücke wurden in 1x PBS überführt und nach Zugabe von

1,5 mM EDTA für 1 min gevortext und bei 37°C für 10 min inkubiert. Das EDTA löst die Calciumbindung zwischen den Zellen durch Komplexbildung mit den Kationen, wodurch weitere Zellen aus dem Gewebe gelöst werden. Nach der Inkubation wurde die Lösung erneut für 1 min gevortext, die sich in der Lösung befindlichen Gewebestücke mittels Teesieb herausgefiltert und das Filtrat für 7 min bei 300g zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in dem in Kulturmedium resuspendierten Pellet aus dem ersten Isolierungsschritt aufgenommen. Zur Isolierung der in Kulturmedium befindlichen Epithelzellen wurde diese Lösung auf einen diskontinuierlichen 20%/40% Percoll-Dichtegradienten gegeben und für 30 min bei 600g zentrifugiert. Durch diesen Zentrifugationsschritt sammelten sich die Epithelzellen zwischen den beiden Percollphasen an und wurden mit etwas Medium in zwei Reaktionsgefäße überführt und für 2 min bei 1000g zentrifugiert. Die Pellets wurden einerseits in 200 µl Lysispuffer für die weitere Proteomanalyse und andererseits in 800 µl Trizol für die weitere RNA-Analyse aufgenommen.

Bei den 1-Wochen-alten Mäusen wurde aufgrund der kleinen Größe des Darms und der dadurch bedingt geringeren Ausbeute an primären intestinalen Epithelzellen der gesamte Darm (Jejunum, Ileum und Kolon) verwendet.

2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay

Die in Lysispuffer resuspendierten primären intestinalen Epithelzellen wurden mittels 10 Ultraschallimpulsen (Amplitude 35, Zyklus 0,5) homogenisiert, 30 min auf Eis für eine vollständige Lyse ruhen gelassen und anschließend bei 1100g für 3 min bei 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford [183] mittels Bradford Protein Assay (BioRAD Laboratories, München). Zur Erstellung einer Eichgeraden dienten BSA-Konzentrationen von 2, 4, 8, 10, 15, 20 und 25 µg/µl als Standards. 2 µl der Probe bzw. BSA wurden zu 800 µl 1x PBS gegeben und zuletzt 200 µl Bradford Reagenz hinzugefügt. Die spektralphotometrische Messung der Extinktionen und Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte bei einer Wellenlänge von 600 nm mittels des Eppendorf BioPhotometers.

2.2.4 Zellkultur

2.2.4.1 Kultivierung und Konservierung

Lösungen:

Kulturmedium	88,4% DMEM 10% FCS 0,8% Antibiotika/Antimykotika 0,8% Glutamin Neomycin (Endkonzentration 1µg/ml)
Einfriermedium	10% DMSO 90% FCS

Das Kulturmedium, 1x PBS und Trypsin/EDTA wurden vor der Verwendung auf 37°C temperiert. Das Einfriermedium wurde vor Gebrauch auf 4°C vorgekühlt. Alle Arbeiten fanden unter sterilen Bedingungen statt.

Kultivierung

In die murine Zelllinie Mode-K (zur Verfügung gestellt von Ingo Authenrieth, Universität Tübingen) wurde mittels stabiler Transfektion der IL-10 Rezeptor (IL-10R) integriert [149]. Die Zelllinie Mode-K/IL-10R wurde unter den Standardbedingungen (5% CO₂, 37°C und Wasserdampfgesättigte Atmosphäre) in 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Eine Subkultivierung erfolgte zweimal in der Woche. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA versetzt. Die Trypsinierung (ca. 5 min bei 37°C) wurde mit einer Zugabe von 9 ml Kulturmedium gestoppt. Ein Aliquot dieser Zellsuspension wurde mit frischem Medium in einer neuen Zellkulturflasche ausgesät.

Konservierung

Die Zellen wurden zunächst wie bei der Kultivierung trypsiniert. Nach einer Zentrifugation der Zellsuspension (5 min bei 300g) und der Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml eiskaltem Einfriermedium resuspendiert. Die Zellen wurden in Einfrierröhrchen (1x10⁶ Zellen/ml) bei -80°C für mindestens 24 h eingefroren und danach in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.4.2 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung

Eine Zellzählung erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer, wobei die Zellsuspension 1:1 mit 0,13%igem Trypanblau gemischt wurde. Trypanblau ist ein blauer DNA-Farbstoff, welcher nur bei Verlust der Membranintegrität in die Zelle eindringen kann und damit nur nekrotische Zellen anfärbt. Die Auswertung erfolgte mittels Durchlichtmikroskopie, wobei die nekrotischen Zellen blau gefärbt sind und vitale Zellen durchsichtig erscheinen.

2.2.5 Zellstimulation

Die Zelllinie Mode-K/IL-10R wurde mit verschiedenen Zytokinen bzw. chemischen Substanzen stimuliert.

Die Zellen wurden mit Interleukin-10 in einer Endkonzentration von 50 ng/ml für 24 h präinkubiert, um anschließend mit Tunicamycin in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml für 6 h stimuliert zu werden.

2.2.6 Isolierung von Gesamt-DNA

Die Isolierung der Gesamt-DNA erfolgte mit Wizard[®]SV Genomic DNA Purification System (Promega, Mannheim) gemäß nach den Angaben des Herstellers. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch mit Hilfe des Nanodrops. Für die Verhältnisbestimmung zwischen nukleärer und mitochondrialer DNA wurde eine Real Time-PCR durchgeführt.

2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (Real Time-PCR)

Die Real Time-PCR bietet die Möglichkeit, durch Fluoreszenzmessungen während oder am Ende jedes Zyklus die Amplifikate zu quantifizieren. Die Quantifizierung basiert auf der direkt proportionalen Zunahme der Fluoreszenz zur Menge der Amplifikate.

Die Real Time-PCR wurde mit dem LightCycler[®] 2.0 System von Roche Diagnostics durchgeführt. VLDLR (nukleär) diente als Referenzgen und ND6 (mitochondrial) als Zielgen. Zum Zielgen wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Für jede DNA-Probe wurden 10 µl Master Mix (FastStart DNA Master SYBR Green I von Roche Diagnostics), bestehend aus 6,4 µl PCR-Wasser, 1,2 µl MgCl₂ (4 mM), je 0,2 µl des antisense- bzw. sense-Primers (20 µM) des jeweiligen Gens sowie 1 µl SYBR Green in eine Glaskapillare pipettiert und 1 µl DNA (~25 ng) zugegeben. Das Protokoll der Real Time-PCR ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Protokoll der Real Time-PCR

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min:sec)	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	10:00	1
Denaturierung	95	00:15	45
Amplifizierung (Annealing)	60	00:10	
Amplifizierung (Elongation)	72	00:20	

Den Abschluss der Real Time-PCR bildet die Schmelzkurve (Temperaturanstieg bis 99°C-0,1°C/s). Die Quantifizierung erfolgte anhand der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode [184]. Dabei wurde der CT-Wert des Referenzgens vom CT-Wert des jeweiligen Zielgens subtrahiert (ΔCT). Die beiden ΔCT -Werte der einzelnen Gruppen wurden anschließend voneinander abgezogen ($\Delta\Delta\text{CT}$).

2.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

Lösungen:

50x TAE-Puffer

2 M Tris-Base
57,1 ml Eisessig
100 ml 0,5 M EDTA
zu 1 l mit dest. Wasser auffüllen

1x TAE-Puffer

20 ml 50x TAE-Puffer
zu 1 l mit dest. Wasser auffüllen

Agarose-Gellösung

1% Agarose
0,002% Ethidiumbromid

DNA-Probenmarker

40% Sacchrose
0,002% Bromphenolblau

Die Synthese des richtigen PCR-Produktes wurde mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Hierzu wurden die PCR-Produkte der Real Time-PCR mit jeweils 2 μl DNA-Probenmarker versetzt. Als Größenmarker wurde der 100bp Plus DNA ladder (Invitrogen, Karlsruhe). Die Elektrophorese erfolgte in einer mit 1x TAE-Puffer gefüllten Gelelektrophoresekammer (EasyCast™ Horizontal System B1A, Peqlab, Erlangen) für ca. 45 min bei einer konstanten Spannung von 100 V. Die im Gel aufgetrennten PCR-

Produkte wurden nachfolgend mit Hilfe eines Geldokumentationsgeräts (GeneFlash, Syngene, Cambridge, UK) sichtbar gemacht.

2.2.9 Transformation des Plasmids OTC Δ in kompetente Bakterien

Lösung:

LB-Medium	5 g NaCl
	5 g Hefeextrakt
	10 g Trypticase Pepton
	zu 1 l mit dest. Wasser auffüllen

Die Ornithin-Transcarbamylase ist ein mitochondriales Matrixprotein. Dessen Mutante (OTC Δ) enthält eine Deletion in der Substratbindestelle und es kann somit keine vollständige Proteinfaltung durchgeführt werden. Durch dieses fehlt gefaltete Protein wird im Mitochondrium Stress ausgelöst. Das Plasmid wurde unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise von N.J. Hoogenraad (Department of Biochemistry, La Trobe University, Melbourne, Australia) zur Verfügung gestellt.

Für die Amplifizierung des Plasmids OTC Δ wurde der klonierte Vektor in kompetente Bakterien (*E.coli* pCAGGS) transformiert. Die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Bakterien wurde dabei durch einen kurzen Hitzeschock (30 s, 42°C) induziert. Die transformierten Bakterien wurden auf Ampicillinhaltigem Agar-Nährboden selektiert. Einzelne Klone wurden anschließend gepickt und in Flüssigkulturen vermehrt.

2.2.10 Plasmidpräparation von OTC Δ

Zu Beginn wurde eine Bakterienkultur (400 ml LB-Medium) mit dem Stamm *E.coli* pCAGGS angesetzt und diese für ca. 24 h unter Schütteln inkubiert. Danach erfolgte die Präparation aus der *E.coli*-Kultur unter Verwendung des QAIGEN Plasmid Maxi Kits (Qiagen, Hilden). Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.2.11 Transiente Transfektion von OTC Δ bzw. siRNA

Die Zellen wurden am Vortag ausgesät, so dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine 50%ige Konfluenz aufwiesen. Die Transfektion erfolgte mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Karlsruhe). Durch das Aufnehmen des Plasmids in die Lipidtröpfchen und deren Verschmelzen mit der Zellmembran wird eine hohe

Transfektionseffizienz bei geringer Toxizität erreicht. Pro Ansatz wurde OTC Δ bzw. siRNA Chaperonin 60 in 50 μ l DMEM (ohne Zusätze) und 1 μ l Lipofectamine RNAiMAX in 50 μ l DMEM (ohne Zusätze) angesetzt. Beide Ansätze wurden vereinigt und für 10 min inkubiert, bevor der Transfektionsansatz (100 μ l) auf die Zellen gegeben wurde. Die Endkonzentration von OTC Δ betrug 10 ng/ml und die Chaperonin 60 siRNA wurde in einer Endkonzentration von 6 pmol verwendet.

2.2.12 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Für die ChIP-Analyse wurden die Mode-K/IL-10R in Zellkulturflaschen (175 cm²) ausgesät. Dabei waren pro Behandlung zwei Zellkulturflaschen nötig um genügend Zellen zu haben. Die Zellen wurden u. a. mit IL-10 für 24 h präinkubiert und folgend mit Tunicamycin für 6 h stimuliert bzw. mit OTC Δ für 32 h transfiziert. Die ChIP-Analyse wurde anschließend mit Hilfe des ChIP-IT™ Enzymatic Kits (Active Motif, Weilheim) den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Es wurden folgende Antikörper für die ChIP Analyse verwendet: anti-ATF6 α , anti-ATF4, anti-cJun, anti-CHOP.

Die nachfolgende Analyse mittels RT-PCR wurde sowohl mit der immunopräzipitierten DNA, als auch mit der Gesamt-DNA (Input-Kontrolle) durchgeführt. Die RT-PCR wurde mit dem LightCycler® 2.0 System von Roche Diagnostics durchgeführt. Für jede cDNA-Probe wurden 10 μ l Master Mix (FastStart DNA Master SYBR Green I von Roche Diagnostics) bestehend aus 1,4 μ l PCR-Wasser, 1,2 μ l MgCl₂ (4 mM), je 0,2 μ l des antisense- bzw. sense-Primers (20 μ M) des Zielgens sowie 1 μ l SYBR Green in eine Glaskapillare pipettiert und 6 μ l cDNA zugegeben. Das Protokoll der Real Time-PCR ist in Tabelle 3 dargestellt.

Die Reaktion wurde jeweils bei dem Zyklus abgebrochen, bei welchem ein deutlicher Unterschied zwischen Kontrollproben und den stimulierten Proben sichtbar war. Nach der Amplifikation wurden die Proben mit jeweils 2 μ l Probenmarker versetzt, auf ein 1%iges Agarose-Gel geladen und eine Gelelektrophorese bei 100 V durchgeführt.

2.2.13 Isolierung der Mitochondrien

Lösung:

STE-Puffer	250 mM Saccharose
	5 mM Tris-Base
	2 mM EGTA
	pH 7,4 bei 4°C mit HCl einstellen

Die Mode-K/IL-10R wurden für die Mitochondrienisolierung in Zellkulturflaschen (175 cm²) ausgesät. Pro Behandlung wurden acht dieser Zellkulturflaschen benötigt. Nach der jeweiligen Stimulation wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit kaltem STE-Puffer einmal gewaschen, um anschließend mit neu zugesetztem STE-Puffer abgeschabt zu werden. Insgesamt wurden 10 ml STE-Puffer für eine Behandlung verwendet. Anschließend wurden die Zellen in einen Glaspotter überführt und durch siebenmalige auf-und-ab-Bewegung des Glasstempels homogenisiert um die Mitochondrien aus den Zellen herauszulösen. Die Zellysate/Mitochondrienmischung wurde mit 1.000g für 3 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet wurde erneut mit STE-Puffer versetzt und der Vorgang mit dem Glaspotter und der Zentrifugation wiederholt. Anschließend wurden die Überstände aus beiden Zentrifugationsschritten vereinigt und erneut mit 11.600g für 10 min zentrifugiert. Das entstandene Mitochondrienpellet wurde nach Augenmaß mit einem handelsüblichen Pinsel von Verunreinigungen befreit und in 1 ml STE-Puffer aufgenommen. Die gesamte Mitochondrienisolierung erfolgte bei 4°C. Bis zur Messung des Sauerstoffverbrauchs wurden die Mitochondrien auf Eis gelagert. Für die Western Blot Analyse wurden die isolierten Mitochondrien in STE-Puffer nochmals zentrifugiert und das Pellet in 100 µl Lämmli-Puffer aufgenommen.

2.2.14 Messung des Sauerstoffverbrauchs mittels der Clark-Elektrode

Lösung:

KHE-Puffer	120 mM Kaliumchlorid
	5 mM Kaliumdihydrogenphosphat
	3 mM Hepes
	1 mM EGTA

Der Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien wurde polarographisch mittels einer Sauerstoffelektrode (Rank Brothers Ltd, Cambridgeshire, England), auch Clark-Elektrode genannt, ermittelt. Es handelt sich dabei um einen elektrochemischen Sauerstoffsensoren zur

Bestimmung der Sauerstoffkonzentration in einer Lösung. Die Sauerstoffelektrode befand sich in einer Messkammer, die durch umgebendes Wasser auf 37°C temperiert wurde. Die Sauerstoffelektrode besteht aus zwei Elektroden, Platin-Kathode und Silber/Silber-Chlorid-Anode, welche durch eine Elektrolytlösung (3 M KCl) in Verbindung stehen und durch eine sauerstoffpermeable Teflonmembran getrennt werden. Die angelegte Spannung von 0,6 V bewirkt eine Reduktion des Sauerstoffes an der Kathode unter Bildung von Wasser. Die Chloridanionen wandern zur Anode und geben Elektronen ab, wodurch ein messbarer Elektronenfluss zwischen Kathode und Anode entsteht, der sich proportional zum Sauerstoffpartialdruck der Messlösung verhält. Die von der Sauerstoffkonzentration abhängigen Spannungsänderungen an den Elektroden werden über das PowerLab an den Computer weitergeleitet und mit dem Programm „Chart5 for Windows“, ähnlich einem y-t-Schreibers, aufgezeichnet.

Die Aussaat der Mode-K/IL-10R Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen (175 cm²). Es wurden acht Flaschen pro Stimulation benötigt. Es wurde mit Tunicamycin für 6 h stimuliert bzw. mit OTC Δ für 32 h transfiziert. Die Mitochondrien wurden, wie in Abschnitt 2.2.11 beschrieben, isoliert, in 1 ml STE-Puffer aufgenommen und anschließend mit Hilfe des Biuret-Assays die Proteinkonzentration bestimmt.

Vor jeder Messung wurde die Elektrode geeicht. Es wurde eine Spatelspitze Natriumdithionit in die mit dest. Wasser gefüllte Messkammer gegeben, um einen sauerstofffreien Messpuffer zu erhalten. Der Messwert für den sauerstoffgesättigten Messpuffer (KHE-Puffer) wurde als 100% definiert und über den Sensitivitätsregler eingestellt. Die Messung erfolgte mit 10 mg Mitochondrien. In der Messkammer befand sich ein Gesamtvolumen von 1 ml (Mitochondriensuspension und KHE-Puffer). Nach dem Befüllen der Messkammer wurde diese mit dem Stöpsel verschlossen, so dass kein Sauerstoff mehr in die Kammer eindringen konnte. In der ersten Messung erfolgte eine Zugabe von 1 mM Succinat (Endkonzentration) um den normalen Sauerstoffverbrauch zu initiieren und gefolgt von der Zugabe von 1 μ M FCCP (Endkonzentration) um den maximalen Sauerstoffverbrauch zu erreichen.

Die Sauerstoffkonzentration des Messpuffers bei Sättigung wurde als 250 nmol O₂ angenommen. Während der Messungen nahm die Sauerstoffkonzentration ab und von dieser Abnahme wurde die Steigung ermittelt. Die Steigung entspricht der Verbrauchsrate der Mitochondrien nach Zugabe von Succinat bzw. FCCP. Der Verbrauch wurde zum Schluss auf die eingesetzte Mitochondrienmenge bezogen (pMol O₂/Sekunde/10 mg Mitochondrienprotein).

2.2.15 Co-Immunopräzipitation

Die Mode-K/IL-10R Zellen wurden in 6-well Platten ausgesät. Nach der Präinkubation mit IL-10 für 24 h und der folgenden Stimulation mit Tunicamycin für 6 h wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurde 600 µl 1x Cell Lysis Buffer (Cell Signaling, Frankfurt) mit 1 mM PMSF auf die Zellen gegeben und diese mit einem Zellschaber abgeschabt. Es folgte eine 10-minütige Inkubation auf Eis. Danach wurde das Lysat bei 1.400g zentrifugiert um die Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde mit dem Antikörper gegen grp-75 (Verdünnung 1:200) versetzt und inkubiert für 3 h unter Schütteln bei 4°C. Währenddessen wurden die Agarose-Beads (Protein A/G Plus Agarose, Santa Cruz, USA) zweimal mit 1x Cell Lysis Buffer gewaschen. Anschließend wurden die Agarose-Beads und der mit dem Antikörper versetzte Überstand vereinigt. Nach einer erneuten Inkubation bei 4°C über Nacht wurde das Protein-Bead-Gemisch für 5 min zentrifugiert (8000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Bead-Antikörper-Protein-Gemisch zweimal mit 1x Cell Lysis Buffer gewaschen. Das Pellet wurde mit 100 µl Lämmli-Puffer versetzt und bei 95°C erhitzt. Die nun abgetrennten Agarose-Beads wurden verworfen und der Überstand ging in die Western Blot Analyse ein.

2.2.16 Eindimensionale Gelelektrophorese

2.2.16.1 Probenaufbereitung

Lösung:

Lämmli-Puffer	0,4 M Tris-Base
	1,6 % SDS
	1,7 M Glycerol
	5 mM DTT
	0,0125% Bromphenolblau

Nach beendeter Stimulationszeit wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen wurden pro 12-well mit jeweils 100 µl bzw. pro 24-well mit jeweils 50 µl Lämmli-Puffer versetzt. Die Proben wurden für 5 min bei 95°C erhitzt und danach kurz zentrifugiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.2.16.2 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacryllamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Lösungen:

1x SDS-Laufpuffer	20 mM Tris-Base
	0,2 M Glycin
	1% (w/v) SDS

Tabelle 4: Zusammensetzung der Sammelgele (Ansatz für zwei Gele)

	7%	10%	15%
bidest. Wasser	2,55 ml	2,05 ml	1,2 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (Rotiphorese)	1,15 ml	1,65 ml	2,5 ml
0,5 M Tris-Hypochlorid (pH 6,8)	1,25 ml		
10% SDS	50 µl		
25% APS	25 µl		
Temed	5 µl		

Tabelle 5: Zusammensetzung der Trenngele (Ansatz für zwei Gele)

	7%	10%	15%
bidest. Wasser	5,1 ml	4,1 ml	2,4 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (Rotiphorese)	2,3 ml	3,3 ml	5,0 ml
1,5 M Tris-Hypochlorid (pH 8,8)	2,5 ml		
10% SDS	100 µl		
25% APS	50 µl		
Temed	5 µl		

Es wurden 0,75 mm dicke Gele, bestehend aus Trenngel und Sammelgel, in einer Größe von 9 cm x 8 cm gegossen. Pro Geltasche wurden 25 µg Protein aufgetragen. Der Molekulargewichtsmarker Page Ruler Prestained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot) wurde als Marker verwendet. Die SDS-PAGE in dem System PROTEAN® Mini Cell (BioRad Laboratories, München) erfolgte bei 15 mA pro Gel für ca. 60 min je nach Größe des nachzuweisenden Proteins.

2.2.16.3 Western Blot

Lösungen:

<i>semi dry</i> -Puffer	20 mM Tris-Base 20 mM Glycin 20% (w/v) Methanol
Ponceau-S-Färbelösung	0,5 % (w/v) Ponceau S 1% (v/v) Essigsäure
1x TBS/T	20 mM Tris-Base 140 mM NaCl 0,1% (w/v) Tween 20
Milchpuffer	5% (w/v) Magermilchpulver in TBS/T

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die im Gel enthaltenen Proteine mit Hilfe der *semi dry* Methode auf eine PVDF-Membran transferiert.

Die Membran wurde zunächst mit 100% Methanol für ca. 1 min, danach im *semi dry* Puffer äquilibriert. Filterpapiere (zwei pro Gel) wurden ebenfalls im *semi dry* Puffer äquilibriert und ein Filterpapier auf die Anodenseite der Western Blot Apparatur Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad Laboratories, München) gelegt. Auf das Filterpapier wurde die Membran und das Gel gelegt und mit dem zweiten Filterpapier abgedeckt. Der Transfer wurde mit einer Spannung von 24 V für 45 min durchgeführt. Im Anschluss folgte eine reversible Proteinfärbung mit Ponceau-S-Färbelösung.

Um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren erfolgte eine Inkubation (1 h bei RT) der Membran in Milchpuffer. Nach dreimaligem Waschen für je 10 min mit 1x TBS/T schloss sich die Inkubation mit dem Primärantikörper (über Nacht bei 4°C) an. Die Membran wurde erneut dreimal für 10 min mit 1x TBS/T gewaschen und anschließend für 1 h in der Sekundärantikörperlösung inkubiert. Es folgten wieder die drei 10-minütigen Waschschrte mit 1x TBS/T.

Der HRP- (*horseradish peroxidase*) gekoppelte Sekundärantikörper wurde mittels dem Chemolumineszenz-Reagenz ECL-Detection Kit (GE Healthcare, München) nachgewiesen. Dazu wurde die Membran für 1 min nach den Angaben des Herstellers mit der Gebrauchslösung inkubiert, in eine Folie und Röntgenkassette gelegt. Nach der Belichtung folgte die Entwicklung des Films.

Die jeweilige Verdünnung der Primärantikörper ist in der nachfolgenden Tabelle 6 zu finden. Die Sekundärantikörper wurden jeweils 1:1000 eingesetzt. Verdünnt wurden die Antikörper in 5%igem Milchpuffer.

Tabelle 6: Verwendete Verdünnungen des jeweiligen Primärantikörpers

Primärantikörper	Verdünnung	Primärantikörper	Verdünnung
β -Actin	1:4000	E-Cadherin	1:400
cleaved caspase 3	1:1000	grp-75	1:200
CD3	1:1000	grp-78	1:4000
CD19	1:200	Integrin α X	1:500
CHOP	1:1000	OTC	1:500
ClpP	1:100	P-eIF2 α	1:1000
Kreatinkinase	1:200	Tid-1	1:1000
Cytocrome C oxidase	1:1000		

2.2.17 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-PAGE) und Proteomanalyse

Die Durchführung der 2D-PAGE erfolgte mit geringen Modifizierungen nach der Methode von Görg *et al.* [185].

2.2.17.1 Erste Dimension (Isoelektrische Fokussierung)

Lösungen:

Rehydrierungspuffer	8 M Harnstoff
	0,5% (w/v) CHAPS
	0,5% (v/v) Pharmalyte (pH 3-10)
	0,008% (w/v) DTT
	0,002% (w/v) Bromphenolblau

In der ersten Dimension werden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt. Die isoelektrische Fokussierung (IEF) wurde mit dem System Ettah IPGphor 3 (GE Healthcare, München) durchgeführt.

Verwendet wurden Gelstreifen (18 cm) mit linearen immobilisiertem pH-Gradienten von pH 3-10 (Immobiline™ DryStrip, GE Healthcare, München). Diese wurden mit 350 μ l Rehydrierungspuffer über Nacht und bei Raumtemperatur in einer speziellen Vorrichtung (Resweling Tray) rehydriert und dabei mit Silikonöl (Cover fluid) zur Vermeidung von Austrocknung und Kristallisation bedeckt. Die gequollenen Gelstreifen wurden in eine

spezielle Keramischale gelegt und wieder mit Silikonöl überschichtet, um eine Austrocknung während der IEF zu verhindern. Am anodischen Ende wurden die Proben mittels Cup Loading aufgebracht, d.h. die Proben wurden in speziellen Probenkammern (Sample Cups) pipettiert. Pro Probenkammer bzw. Steifen wurden 250 µg Protein appliziert. Die IEF erfolgte bei 20°C mit 50 µA pro Gelstreifen. Nach der Fokussierung und bis zur zweiten Dimension lagerten die Gelstreifen bei -80°C.

Tabelle 7: Programmabfolge der Isoelektrischen Fokussierung

Schritt	Betriebsart	Spannung (V)	Zeit (min)	Voltstunden (Vh)
1	Gradient	500	1	
2	Gradient	4000	90	
3	Step-n-Hold	8000	-	28000

2.2.17.2 Herstellung der SDS-Gele für die zweite Dimension

Lösungen:

Gelpuffer

1,5 M Tris-Base
0,4% (w/v) SDS
mit HCl auf pH 8,6 einstellen

Gellösung

365,14 ml (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid
225 ml Gelpuffer
45 ml (v/v) Glycerin
4,5 ml 10%iges (w/v) APS
42,43 µl (v/v) Temed

Für die zweite Dimension wurden 12,5%ige SDS-Gele mit einer Größe von 25 x 20,5 x 0,1 cm (H x B x T) gegossen. Hierzu wurde die Gelgießkammer PROTEAN plus® Multi-Casting Chamber verwendet. Die Gele wurden mit bidest. Wasser überschichtet und konnten nach ca. 24 h verwendet werden.

2.2.17.3 Zweite Dimension

Lösungen:

Äquilibriumspuffer I	6 M Harnstoff 0,8% (w/v) SDS 50 mM Tris-Hydrochlorid, pH 8,8 1% (w/v) DTT 0,002% Bromphenolblau
Äquilibriumspuffer II	6 M Harnstoff 0,8% (w/v) SDS 50 mM Tris-Hydrochlorid, pH 8,8 4% Jodacetamid 0,002% Bromphenolblau
Agaroselösung	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS 0,5% (w/v) Agarose 0,002% Bromphenolblau
1x SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS

In der zweiten Dimension werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die aufgetauten Gelstreifen aus der ersten Dimension wurden zunächst äquilibriert. Hierzu inkubierten die Streifen unter leichtem Schütteln jeweils für 15 min in Äquilibriumspuffer I und anschließend in Äquilibriumspuffer II. Im folgenden Schritt wurden die äquilibrierten Streifen kurz in 1x SDS-Laufpuffer getaucht und auf die 12,5%igen SDS-Gele aufgelegt. Um eine genaue Aussage über das Molekulargewicht der Proteinspots machen zu können, wurde zusätzlich ein mit Proteinmarker getränktes Filterpapier neben dem Gelstreifen aufgebracht. Anschließend wurden die Streifen zur Fixierung mit warmer Agaroselösung bedeckt. Die zweite Dimension erfolgte in der Gelelektrophoresekammer PROTEAN® plus Dodeca™ Cell (BioRad Laboratories, München), welche mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllte wurde, bei 20°C mit 5 mA pro Gel für 2 h und anschließend mit 13 mA pro Gel über Nacht.

Der Lauf galt als beendet, sobald sich die Bromphenolblau-Lauffront ca. 1 cm vom unteren Gelende befand.

2.2.17.4 Kolloidale Coomassie-Färbung

Lösungen:

Fixierungslösung	40% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Essigsäure
Färbelösung	0,1% (w/v) CBB G-250 25% (v/v) Methanol 10% (w/v) Ammoniumsulfat 1% (v/v) Phosphorsäure

Um eine Visualisierung der Proteinspots zu ermöglichen, wurde in dieser Arbeit eine kolloidale Coomassie-Färbung angewandt.

Nach der Auftrennung der Proteine mittels der 2D-PAGE inkubierten die Gele über Nacht in Fixierungslösung. Anschließend wurden die fixierten Gele für 24 h in Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Die Entfärbung erfolgte mit Aqua dest. bis der Gelhintergrund fast transparent war.

Zur Aufbewahrung wurden die Gele in 7%iger Essigsäure in Folie eingeschweißt.

2.2.17.5 Auswertung der 2D-PAGE-Gele mit ProteomWeaver

Vor dem Auswerten der Proteinprofile wurden die CBB-gefärbten 2D-PAGE-Gele mit dem Multiscan CS-800 der Firma BioRad im Durchlichtmodus eingescannt (16 bit Graustufen, 300 dpi).

Zur Identifizierung möglicher Regulierungen zwischen Kontrollmäusen und Knockout-Mäusen wurden die Gele mit Hilfe der ProteomWeaver Software (Version 4.0) analysiert. Die Spotdetektion, die Quantifizierung der Spotintensitäten, die Überlagerung der 2D-PAGE-Bilddateien von Kontroll- und jeweiliger Knockout-Maus (sog. *matching*) sowie die Normalisierung der Spotintensitäten erfolgten automatisch. Eine manuelle Korrektur wurde gegebenenfalls durch den Benutzer vorgenommen, falls durch die Software Spots fehlerhaft detektiert oder fehlerhaft gematcht wurden. Es wurden nur Spots berücksichtigt, die in mehr als der Hälfte der zu analysierenden Gele vorhanden waren. Ein weiteres Auswahlkriterium war ein Regulationsfaktor von mindestens 1,3 des durchschnittlichen Expressionslevels mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ (Mann-Whitney-U Test).

2.2.18 Massenspektrometrie

2.2.18.1 Waschen und enzymatischer Verdau der Proteinspots

Lösungen:

Waschlösung	50 mM NH_4HCO_3
Entfärbelösung	50 mM NH_4HCO_3 50% (v/v) Acetonitril
Dehydrierungslösung	100% (v/v) Acetonitril
Trypsinlösung	20 ng/ μl Trypsin (Promega Sequencing Grade) 20 μl Trypsin Suspensionspuffer 10 mM NH_4HCO_3
Aufnahmepuffer	1% (v/v) Trifluoressigsäure

Die ermittelten regulierten Proteinspots wurden mit Hilfe eines Biopsiestanzers aus dem Gel ausgestochen und in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß überführt. Im ersten Schritt wurden die Proteinspots mit 50 μl der Waschlösung für 15 min unter Schütteln gewaschen. Anschließend wurde die Waschlösung entfernt und die Spots, unter den gleichen Bedingungen, mit 50 μl der Entfärbelösung versetzt. Diese beiden Waschschrte wurden wiederholt. Abschließend wurden die Spots mittels 50 μl der Dehydrierungslösung dehydriert.

Für den Verdau wurden 6 μl der Trypsinlösung zu jedem getrocknetem Proteinspot gegeben. Diese Spots wurden 1-2 h bei 4°C quellen gelassen und anschließend bei 37°C über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine Zugabe von 7 μl des Aufnahmepuffers. Um die Peptidfragmente aus dem Gel herauszulösen, wurden die Spots 10 min mit Ultraschall behandelt. Der Überstand wurde in ein neues 0,2 ml Reaktionsgefäß überführt und konnte für die Analyse mittels der *Matrix-assisted-laser desorption ionisation time of flight* Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) verwendet werden.

2.2.18.2 Analyse der Peptidextrakte per MALDI-TOF MS

Lösungen:

Matrixlösung	0,003% (v/v) Trifluoressigsäure 97% (v/v) Aceton
Waschlösung	0,1% (v/v) Trifluoressigsäure

Die Analyse der Peptidextrakte erfolgte mit der MALDI-TOF MS. Für diese Analyse wurde eine Matrix, bestehend aus 450 µl Matrixlösung und einer Spatelspitze HCCA, hergestellt. Die Matrix wurde für 10 min mit Ultraschall behandelt und 1 min bei 3000g zentrifugiert. Anschließend wurde 1 µl der Matrix auf das Target (AnchorChip™ 600-384) pipettiert. Die Peptidextrakte (2,5 µl) wurden für ca. 10 min aufgetragen. Für die Kalibrierung während der Messungen wurde 1 µl des Peptidstandards (Bruker Daltonics, Bremen) ebenfalls auf das Target aufgetragen. Danach wurden diese mit 2 µl der Waschlösung wieder abgenommen. Die Messung erfolgte mit einer Autoflex MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Bremen) nach Angaben des Herstellers.

Die ermittelten Massenspektren wurden mit Autoflex Analysis Software analysiert, die Proteine mit Mascot Server 1.9 (Bruker Daltonics) und BioTools Software identifiziert, wobei nur murine Proteinsequenzen (*mus musculus*) eingeschlossen wurden. Die Suchparameter erlaubten eine Modifizierung von Cysteinresten durch Carboxyamidomethylierung, einen unvollständigen Verdau durch Trypsin (*missed cleavage*) ≤ 1 und eine Massengenauigkeit von ± 100 ppm. Als signifikant wurden Proteine mit einem Mascot-Score von > 61 angesehen. Des Weiteren waren für die Identifizierung auch die Größe und der isoelektrische Punkt der Proteine sowie die Lage im Gel ausschlaggebend.

Zur weiteren Auswertung wurde die Datenbank Swiss-Prot (www.expasy.ch/sprot/) herangezogen.

2.2.19 Statistik

Die Daten wurden als Durchschnitt \pm Standardabweichung dargestellt. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels unpaired t-test oder One-Way ANOVA gefolgt vom Turkey's test. (SigmaPlot 9.0 – Systat Software). Die Signifikanz wurde wie folgt dargestellt: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

3 ERGEBNISSE

3.1 Untersuchungen an TLR2-, TLR4- und IL-10-defizienten Mäusen unter SPF-Bedingungen

Die unter SPF-Bedingungen aufgewachsenen Wildtyp- und TLR2-, TLR4-, IL-10-, IL-10XTLR2- und IL-10XTLR4-defizienten Mäuse wurden im Alter von 1, 8 bzw. 16 Wochen getötet. Die Auswirkung einer TLR2 bzw. TLR4 Defizienz auf Darmepithelzellen wurde unter nicht entzündlichen und unter entzündlichen Bedingungen analysiert. Die histologische Analyse wurde vom distalen Kolon durchgeführt. Die primären IEZ des Zäkums sowie des Kolons wurden isoliert, gepoolt und Protein bzw. RNA für die weiteren Experimente isoliert. Eine schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus ist in Abbildung 6 zu sehen.

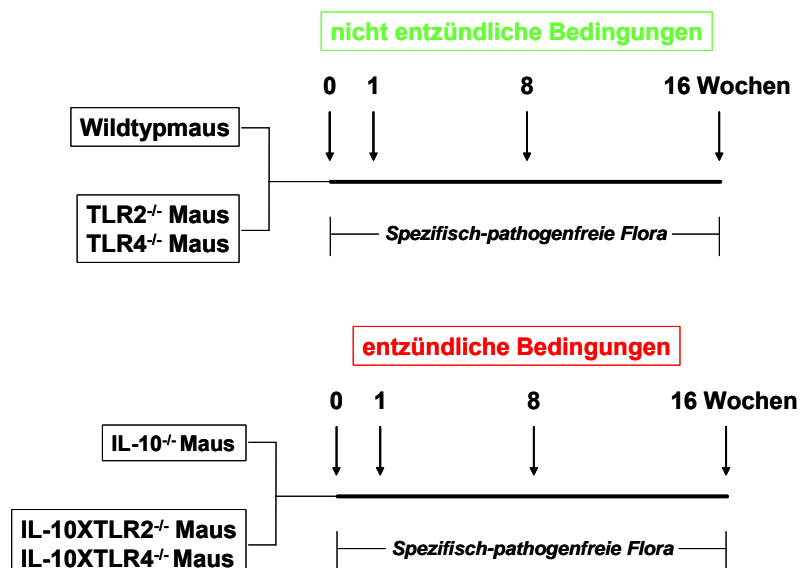


Abbildung 6: Experimenteller Aufbau zur Fragestellung, welche Effekte eine TLR2 bzw. TLR4 Defizienz unter nicht entzündlichen und entzündlichen Bedingungen hat.

3.1.1 Histologische Analyse

Für die histologische Untersuchung wurde ein Teil des distalen Kolons in 10% PBS-gepuffertem Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die Beurteilung des Entzündungsgrads (histologischer Score) der kodierten Proben erfolgte durch Frau Dr. Sigrid Kisling. Die Beurteilung beinhaltet folgende Kriterien: mononukleärer Zellinfiltration in die Lamina propria, Abbau der Goblet-Zellen, Kryptenhyperplasie und Epithelzellzerstörung [182]. Bei einem histologischen Score unter 2 ist keine Pathologie festzustellen.

Die histologische Überprüfung zeigte, dass eine TLR2 oder TLR4 Defizienz unter SPF-Bedingungen keine Entzündung im Kolon auslösen kann (Abbildung 7). Im Gegensatz zur IL-10^{-/-} Maus, welche dafür bekannt ist, eine spontane Entzündung im Kolon zu entwickeln. Die IL-10-defizienten Mäuse entwickelten mit zunehmenden Alter eine moderate Entzündung (8 Wochen: 2,3 ± 0,89; 16 Wochen: 3,96 ± 0,91). Das gleiche Muster konnte bei den IL-10XTLR2-defizienten Mäusen beobachtet werden. Auch hier nahm der moderate Entzündungsgrad mit dem Alter zu (8 Wochen: 3,21 ± 1,45; 16 Wochen: 4,88 ± 1,94). Beide Gendefektvarianten führten zu einer moderaten Kolitis. Im Gegensatz scheint eine Defizienz von TLR4 unter entzündlichen Bedingungen (IL-10XTLR4 Defizienz) protektiv zu sein. Die IL-10XTLR4^{-/-} Mäuse zeigten zu keinem Alter Anzeichen einer Entzündung im Kolon.

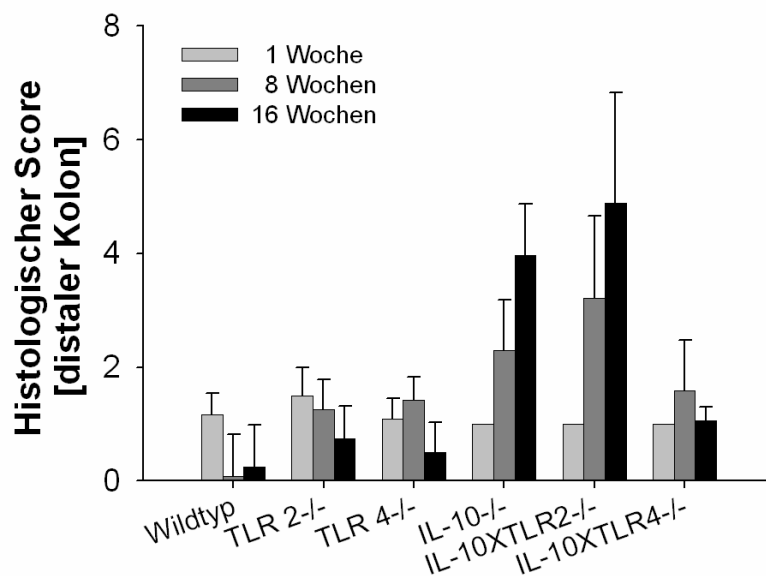


Abbildung 7: Histologische Analyse der in Paraffin eingebetteten Gewebestücke vom distalen Kolon der Wildtypmäuse und der TLR2-, TLR4-, IL-10-, IL-10XTLR2- und IL-10XTLR4-defizienten Mäuse. (Score von 0 - 12; Scoresystem von Katakura [186])

3.1.2 Reinheitsüberprüfung der isolierten intestinalen Epithelzellen

Die Reinheit der isolierten IEZ konnte durch die Abwesenheit von CD3-positiven T-Zellen, CD19-positiven B-Zellen und Integrin α X-positiven Makrophagen mittels Western Blot Analyse bestätigt werden. E-Cadherin wurde als Marker für Epithelzellen genutzt (Abbildung 8).

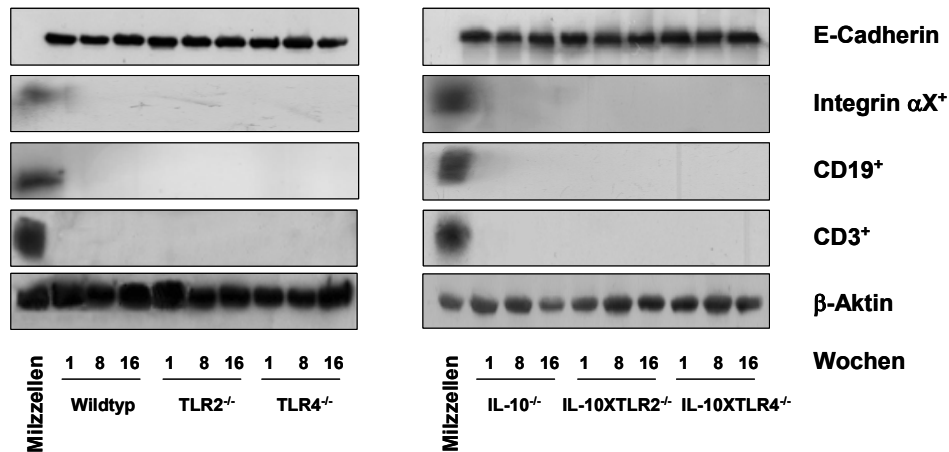


Abbildung 8: Reinheitskontrolle isolierter IEZ.

Die Wildtypmäuse und TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, IL-10^{-/-}, IL-10XTLR2^{-/-} und IL-10XTLR4^{-/-} Mäuse (n=6) wurden im Alter von 1, 8 bzw. 16 Wochen getötet. Die Western Blot Analyse erfolgte mit 25 µg Gesamtprotein aus isolierten IEZ bzw. Milzzellen. Mittels spezifischer Antikörpern gegen CD3, CD19 und Integrin αX wurden die isolierten IEZ auf Verunreinigung durch CD3⁺ T-Zellen, CD19⁺ B-Zellen und Integrin αX⁺ Makrophagen überprüft. E-Cadherin diente hierbei als Marker für IEZ.

3.1.3 Proteomanalyse von intestinalen Epithelzellen mit TLR2 bzw. TLR4 Defizienz

Die Rolle der Toll-like Rezeptoren TLR2 und TLR4 wurde unter nicht entzündlichen und entzündlichen Bedingungen untersucht. Die Mäuse wuchsen unter SPF-Bedingungen auf und wurden im Alter von 1, 8 bzw. 16 Wochen getötet. Das Gesamtprotein der IEZ aus Kolon und Zäkum wurde isoliert und eine Proteomanalyse von jedem Alter angefertigt. Folgende Vergleiche wurden durchgeführt (jeweils n=3).

- nicht entzündliche Bedingungen: Wildtypmaus vs. TLR2^{-/-} Maus
Wildtypmaus vs. TLR4^{-/-} Maus
- entzündliche Bedingungen: IL-10^{-/-} Maus vs. IL-10XTLR2^{-/-} Maus
IL-10^{-/-} Maus vs. IL-10XTLR4^{-/-} Maus

Die Tabellen 8-19 geben einen Überblick über die identifizierten Proteine und deren theoretisches Molekulargewicht, isoelektrischen Punkt, Regulationsfaktor, und Sequenzabdeckung sowie Spotfrequenz in den Gelen.

3.1.3.1 Proteomanalyse von intestinalen Epithelzellen mit TLR2 bzw. TLR4 Defizienz unter nicht entzündlichen Bedingungen

In der Proteomanalyse der 1-Wochen-alten TLR2^{-/-} Mäuse, verglichen mit den Wildtypmäusen, konnten 18 unterschiedlich regulierte Proteine identifiziert werden (Tabelle 8, Abbildung 9). 33% dieser Proteine sind im Energiemetabolismus (UMP-CMP Kinase, Aldolase 2, Kreatinkinase, Electron Transferring Flavoprotein, Nucleoside-Disphosphate Kinase B) und in der Glykolyse (Triosephosphate Isomerase) beteiligt. Des Weiteren haben 22% der regulierten Proteine Funktionen im Zytoskelett (Cytokeratin 19, LIM and SH3 Protein 1, Cofilin, Tropomyosin alpha 3-chain). Es konnten außerdem 2 Proteine detektiert werden, welche in die Regulation von Stressantworten involviert sind: das ER-Stress assoziierte Chaperon grp-78 und das dem oxidativen Stress zugehörige Peroxiredoxin 6. Im Vergleich Wildtypmaus mit TLR4^{-/-} Mäusen konnten hingegen nur 7 regulierte Proteine identifiziert werden (Tabelle 9). Hauptsächlich sind diese mit dem Energiemetabolismus (Aldolase A), der Glykolyse (Triosephosphate Isomerase) und der mitochondrialen Stressantwort (Chaperonin 60) assoziiert.

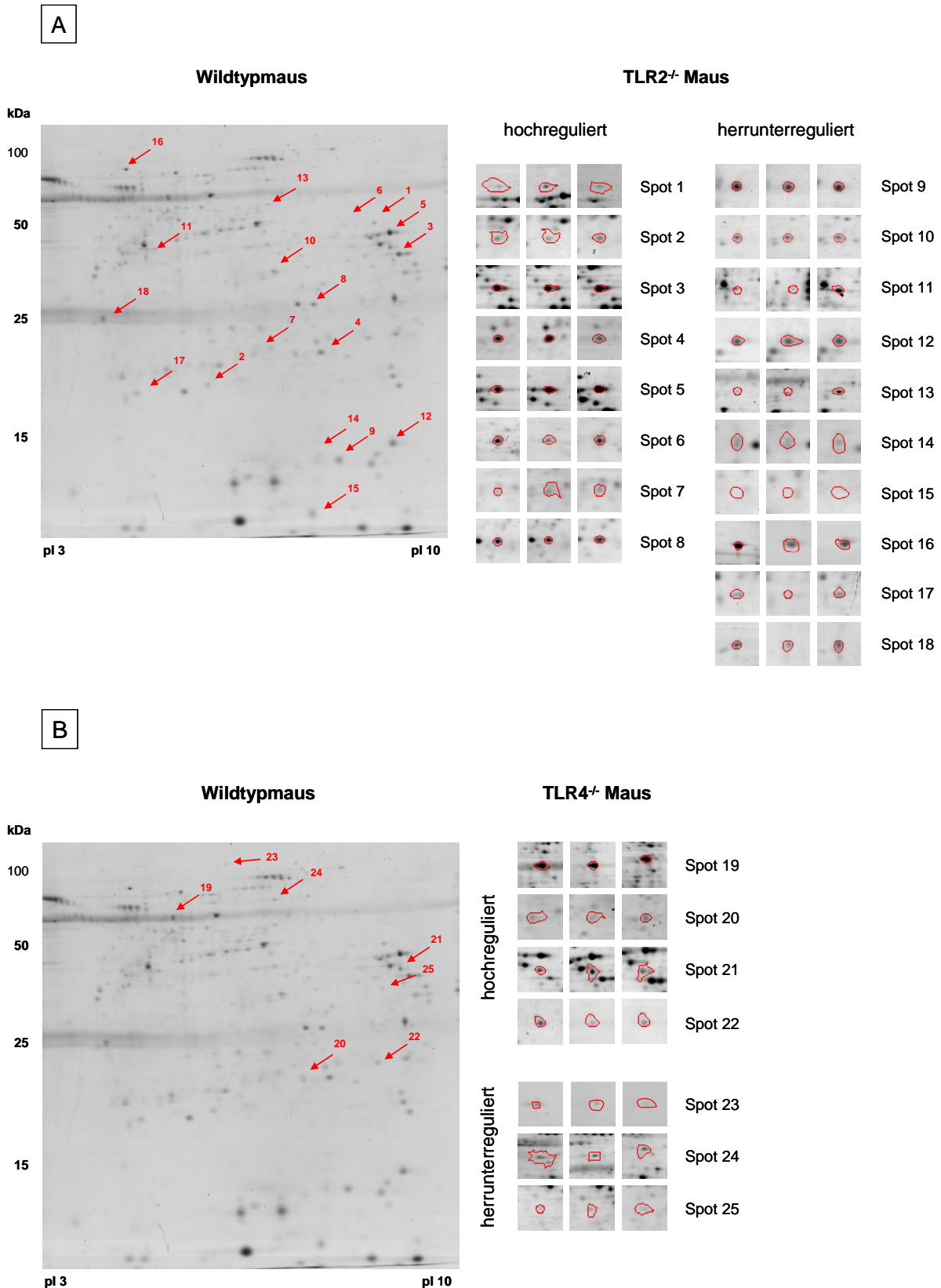


Abbildung 9: Proteomanalyse der primären IEZ der TLR2^{-/-} bzw. TLR4^{-/-} Mäuse verglichen zu Wildtypmäusen zum Zeitpunkt von 1 Woche.

Das Protein der IEZ des Kolons von Wildtypmäusen, TLR2^{-/-} bzw. TLR4^{-/-} Mäuse wurde extrahiert, je 250 µg des Proteinlysats wurden mittels IEF und nachfolgend durch SDS-PAGE in 12,5%igen Gelen aufgetrennt. Die Gele wurden Coomassie gefärbt, eingescannt und mittels ProteomWeaver Software ausgewertet. Die Wildtypmäuse wurden als Kontrolle verwendet. Dargestellt sind die Referenzgele der Wildtypmäuse und der dazugehörige Proteinspot der TLR2^{-/-} bzw. TLR4^{-/-}Mäuse.

Tabelle 8: Übersicht der regulierten Proteine aus IEZ der TLR2^{-/-} Mäuse verglichen zu Wildtypmäusen zum Zeitpunkt von 1 Woche.

MrM = theoretisches Molekulargewicht; pI = Isoelektrischer Punkt; SCov = Sequenzabdeckung; RF = Regulationsfaktor; F = Spotfrequenz in den Gelen

Nr.	Accession Nummer	Protein	MrM	pI	SCov	RF	F
1	AAH06048	Fumarate hydrogenase, mitochondrial (precursor)	54564	9,72	27	2,15	6/6
2	BAB23595	UMP-CMP kinase	22379	5,68	47	2,03	5/6
3	ALDOB	Fructose-bisphosphate aldolase B	39807	9,44	42	1,93	5/6
4	TPIS	Triosephosphate isomerase	26907	7,80	57	1,90	5/6
5	BAC34067	Acetyl-CoA acyltransferase	42260	9,30	67	1,73	6/6
6	S24612	Kreatinkinase, mitochondrial	47373	9,28	36	1,47	5/6
7	Q6GT24	Peroxiredoxin 6	24925	5,96	43	1,47	5/6
8	Q4V9X5	Electron transferring flavoprotein	35330	9,74	47	1,46	5/6
9	PPIA	Rotamase A	18000	9,16	32	-1,23	6/6
10	Q543N3	LIM and SH3 protein 1	16796	6,74	35	-1,27	5/6
11	JQ0028	Cytokeratin 19	44515	5,15	57	-1,28	5/6
12	S12584	Cofilin	12631	9,13	56	-1,49	6/6
13	Q9CZS1	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial (precursor)	58087	6,66	33	-1,49	5/6
14	S29241	Nucleoside-disphosphate kinase B	17466	6,97	55	-1,52	6/6
15	BAB24987	Galectin 2	14984	7,92	72	-1,56	6/6
16	BAC36166	Grp-78 (precursor)	72492	4,92	39	-2,08	4/6
17	PEBP	Phosphatidylethanolamin binding protein 1	20857	5,19	61	-2,38	6/6
18	S11390	Tropomyosin alpha 3-chain	29231	4,75	54	-3,57	5/6

Tabelle 9: Übersicht der regulierten Proteine aus IEZ der TLR4^{-/-} Mäuse verglichen zu Wildtypmäusen zum Zeitpunkt von 1 Woche.

MrM = theoretisches Molekulargewicht; pI = Isoelektrischer Punkt; SCov = Sequenzabdeckung; RF = Regulationsfaktor; F = Spotfrequenz in den Gelen

Nr.	Accession Nummer	Protein	MrM	pI	SCov	RF	F
19	CAA37653	Chaperonin 60, mitochondrial (precursor)	59004	5,35	43	3,15	4/6
20	TIPS	Triosephosphate isomerase	26907	7,08	52	3,12	5/6
21	ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A	39656	9,26	32	2,03	4/6
22	Q8BH95	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial (precursor)	31853	9,70	33	1,70	4/6
23	VILI	Villin 1	93125	5,66	21	-2,22	4/6
24	BAC40389	Stress-induced-phosphoprotein 1	63170	6,42	21	-2,33	6/6
25	A54932	Quinone oxidoreductase	35531	8,18	39	-4,55	5/6

Zum Zeitpunkt der 8 Wochen wurden in den TLR2-defizienten Mäusen 7 Proteine identifiziert (Tabelle 10, Abbildung 10). Der größte Teil dieser Proteine ist Bestandteil des Zytoskeletts (Cytokeratin Endo A, Cytokeratin 19, Cytokeratin 20). Unter TLR4 Defizienz wurden 10 unterschiedlich regulierte Proteine detektiert (Tabelle 11). Interessanterweise sind darunter wieder 2 Proteine, die in die mitochondriale Stressantwort involviert sind (Chaperonin 60, grp-75).

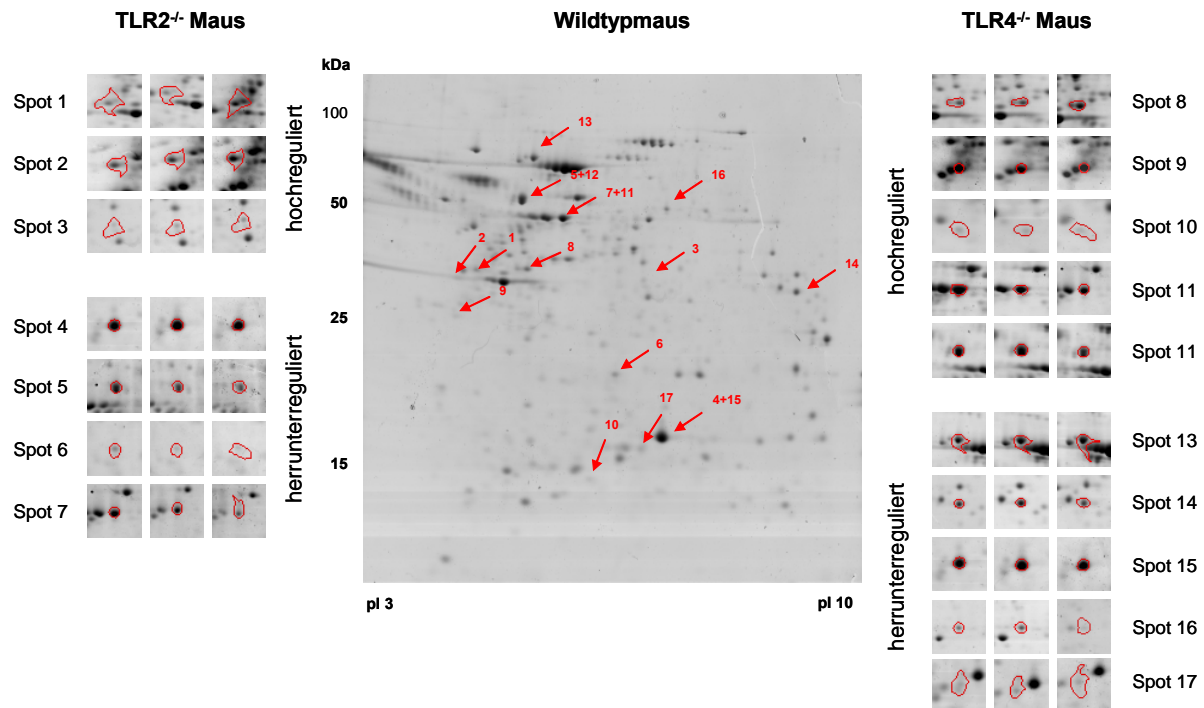


Abbildung 10: Proteomanalyse der primären IEZ der TLR2^{-/-} bzw. TLR4^{-/-} Mäuse verglichen zu Wildtypmäusen zum Zeitpunkt von 8 Wochen.

Das Protein der IEZ des Kolons von Wildtypmäusen, TLR2^{-/-} bzw. TLR4^{-/-} Mäusen wurde extrahiert, je 250 µg des Proteinlysats wurden mittels IEF und nachfolgend durch SDS-PAGE in 12,5%igen Gelen aufgetrennt. Die Gele wurden Coomassie gefärbt, eingescannt und mittels ProteomWeaver Software ausgewertet. Die Wildtypmäuse wurden als Kontrolle verwendet. Dargestellt sind die Referenzgele der Wildtypmäuse und der dazugehörige Proteinspot der TLR2^{-/-} bzw. TLR4^{-/-}Mäuse.

Tabelle 10: Übersicht der regulierten Proteine aus IEZ der TLR2^{-/-} Mäuse verglichen zu Wildtypmäusen zum Zeitpunkt von 8 Wochen.

MrM = theoretisches Molekulargewicht; pI = Isoelektrischer Punkt; SCov = Sequenzabdeckung; RF = Regulationsfaktor; F = Spotfrequenz in den Gelen

Nr.	Accession Nummer	Protein	MrM	pI	SCov	RF	F
1	Q9D312	Keratin 20	49061	5,17	47	2,28	4/6
2	JQ0028	Cytokeratin 19	44515	5,15	35	2,25	4/6
3	BAB23751	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial (precursor)	46596	9,17	23	2,13	4/6
4	CAH1	Carbonic anhydrase 1	28229	6,47	63	-1,79	6/6
5	Q8C2C7	Chaperonin 60, mitochondrial	59004	5,35	70	-1,79	6/6
6	THTM	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	33100	6,12	20	-1,82	5/6
7	AAA37551	Cytokeratin Endo A	53210	5,42	58	-2,44	6/6

Tabelle 11: Übersicht der regulierten Proteine aus IEZ der TLR4^{-/-} Mäuse verglichen zu Wildtypmäusen zum Zeitpunkt von 8 Wochen.

MrM = theoretisches Molekulargewicht; pI = Isoelektrischer Punkt; SCov = Sequenzabdeckung; RF = Regulationsfaktor; F = Spotfrequenz in den Gelen

Nr.	Accession Nummer	Protein	MrM	pI	SCov	RF	F
8	Begin	Brain-enriched guanylate kinase-associated protein	65839	5,61	25	4,05	6/6
9	JQ0028	Cytokeratin 19	44515	5,15	67	3,76	5/6
10	Q03265	ATP synthase subunit α , mitochondrial (precursor)	59830	9,70	69	1,78	5/6
11	AAA37551	Cytokeratin Endo A	53210	5,42	62	1,51	6/6
12	Q8C2C7	Chaperonin 60, mitochondrial	59004	5,35	27	1,40	4/6
13	BAA01862	Grp-75, mitochondrial	73768	5,85	48	-1,30	5/6
14	ALDOA	Fructose bisphosphate aldolase A	39656	9,26	40	-1,59	5/6
15	CAH1	Carbonic anhydrase 1	28229	6,47	54	-1,59	6/6
16	Q99LD3	Dihydrolipoamide dehydrogenase	54751	8,97	37	-2,04	4/6
17	Q4FJX4	Cystein+glycine-rich protein 1	21425	9,98	29	-2,17	6/6

Zum letzten Zeitpunkt (16 Wochen) wurden 14 Proteine in TLR2^{-/-} (Tabelle 12) bzw. 4 Proteine in TLR4^{-/-} Mäusen (Tabelle 13, Abbildung 11) identifiziert. Die regulierten Proteine zu diesem Zeitpunkt sind hauptsächlich am Energiemetabolismus (Fructose bisphosphate Aldolase A) und Zytoskelett (Cytokeratin Endo A, Cytokeratin 19, Destrin, Tropomyosin alpha 3-chain) beteiligt. Des Weiteren wurden 2 Proteine aus der ER-Stressantwort (grp-78) und der mitochondrialen Stressantwort (grp-75) detektiert.

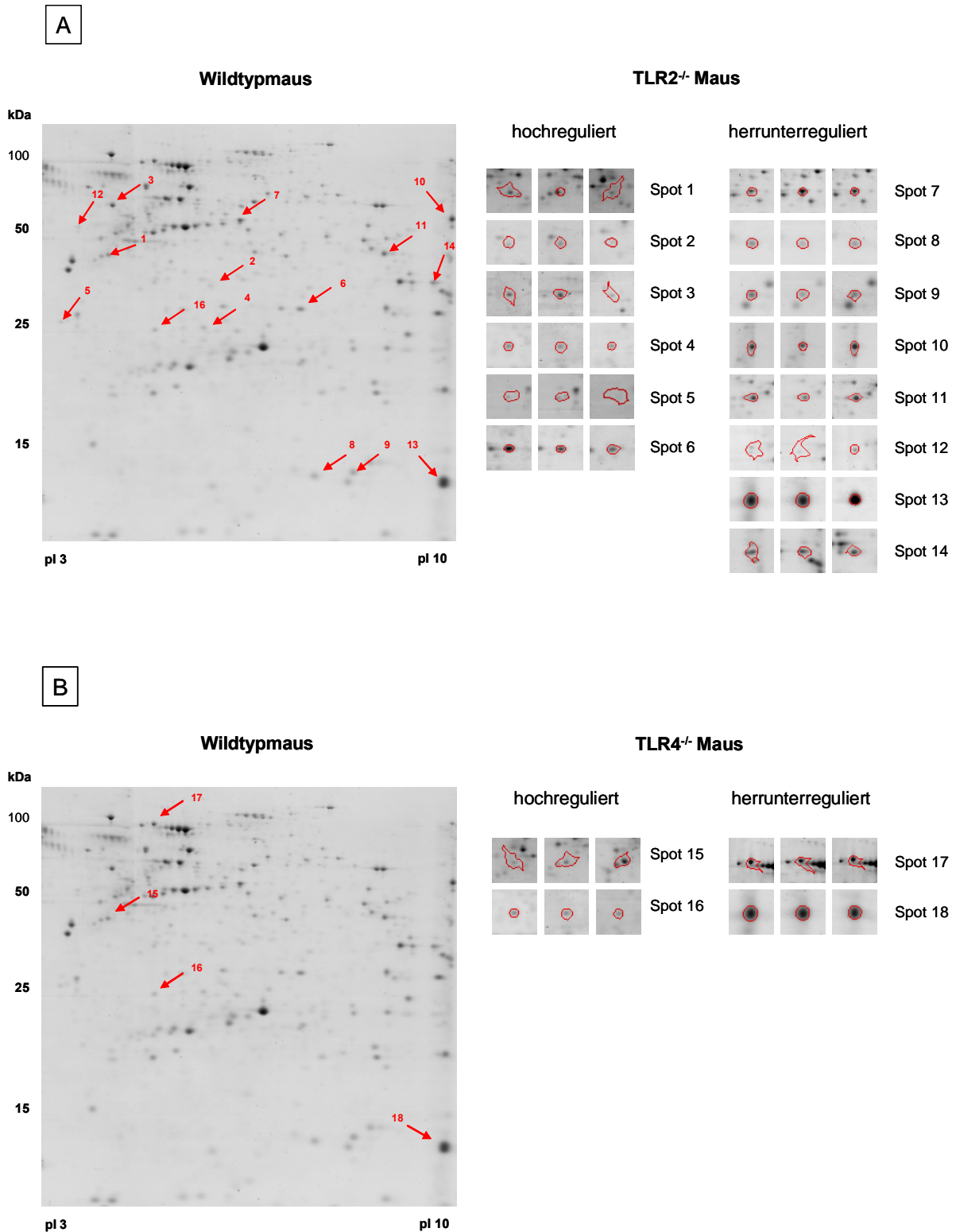


Abbildung 11: Proteomanalyse der primären IEZ der TLR2^{-/-} bzw. TLR4^{-/-} Mäuse verglichen zu Wildtypmäusen zum Zeitpunkt von 16 Wochen.

Das Protein der IEZ des Kolons von Wildtypmäusen, TLR2^{-/-} bzw. TLR4^{-/-} Mäusen wurde extrahiert, je 250 µg des Proteinlysats wurden mittels IEF und nachfolgend durch SDS-PAGE in 12,5%igen Gelen aufgetrennt. Die Gele wurden Coomassie gefärbt, eingescannt und mittels ProteomWeaver Software ausgewertet. Die Wildtypmäuse wurden als Kontrolle verwendet. Dargestellt sind die Referenzgele der Wildtypmäuse und der dazugehörige Proteinspot der TLR2^{-/-} bzw. TLR4^{-/-}Mäuse.

Tabelle 12: Übersicht der regulierten Proteine aus IEZ der TLR2^{-/-} Mäuse verglichen zu Wildtypmäusen zum Zeitpunkt von 16 Wochen.

MrM = theoretisches Molekulargewicht; pI = Isoelektrischer Punkt; SCov = Sequenzabdeckung; RF = Regulationsfaktor; F = Spotfrequenz in den Gelen

Nr.	Accession Nummer	Protein	MrM	pI	SCov	RF	F
1	JQ0028	Cytokeratin 19	44515	5,28	62	3,59	6/6
2	AAH11417	Inorganic pyrophosphatase 2, mitochondrial (precursor)	38546	6,56	45	1,94	5/6
3	Q91X87	Selenium binding protein 1	53051	5,85	40	1,86	4/6
4	Q5SQG5	Prohibitin (fragment)	23042	5,97	52	1,65	6/6
5	S11390	Tropomyosin alpha 3 chain	29231	4,75	39	1,26	6/6
6	Q99LC5	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	35360	9,50	37	1,24	4/6
7	ENOA	Enolase A	47322	6,36	60	-1,47	6/6
8	PPIA	Rotamase A	18000	7,88	63	-1,67	6/6
9	DEST	Destrin	18721	8,20	48	-1,67	6/6
10	BAC36446	Elongation factor 1 alpha	50428	9,10	37	-1,92	6/6
11	ALDOA	Fructose bisphosphate aldolase A	39656	8,39	72	-2,04	6/6
12	BAC36166	Grp-78 (precursor)	72492	4,92	23	-2,44	6/6
13	BAB25181	Anterior gradient protein 2 homolog	19965	9,05	49	-2,94	6/6
14	Q91ZR9	Heterogenous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	36014	8,67	56	-3,13	6/6

Tabelle 13: Übersicht der regulierten Proteine aus IEZ der TLR4^{-/-} Mäuse verglichen zu Wildtypmäusen zum Zeitpunkt von 16 Wochen.

MrM = theoretisches Molekulargewicht; pI = Isoelektrischer Punkt; SCov = Sequenzabdeckung; RF = Regulationsfaktor; F = Spotfrequenz in den Gelen

Nr.	Accession Nummer	Protein	MrM	pI	SCov	FC	F
15	JQ0028	Cytokeratin 19	44515	5,15	72	2,61	6/6
16	Q5SQG5	Prohibitin (fragment)	23042	5,97	52	2,60	6/6
17	P38647	Grp-75, mitochondrial	73768	5,80	39	-1,96	6/6
18	BAB25181	Anterior gradient protein 2 homolog	19965	9,04	60	-2,22	6/6

3.1.3.2 Proteomanalyse von intestinalen Epithelzellen mit TLR2 bzw. TLR4 Defizienz unter entzündlichen Bedingungen

Die histologische Untersuchung zeigte, dass IL-10XTLR2^{-/-} und IL-10XTLR4^{-/-} Mäuse im Alter von 1 Woche noch keine Entzündungsmerkmale aufweisen. In den IL-10XTLR2^{-/-} Mäusen wurden 5 unterschiedlich regulierte Proteine detektiert (Tabelle 14). Dabei war lediglich 1 Protein hochreguliert, welches Funktionen im Zytoskelett ausübt (Cytokeratin 19).

Im Gegensatz zeigte die Proteomanalyse der IL-10XTLR4^{-/-} Mäuse 8 signifikant regulierte Proteine (Tabelle 15) auf. Interessanterweise sind 2 dieser Proteine in der ER-Stressantwort (grp-78) und in die mitochondriale Stressantwort (Chaperonin 60) involviert. Der Großteil der regulierten Proteine aus beiden Vergleichen zum 1-Wochen-Zeitpunkt ist mit dem Energiemetabolismus und der Proteinfaltung assoziiert.

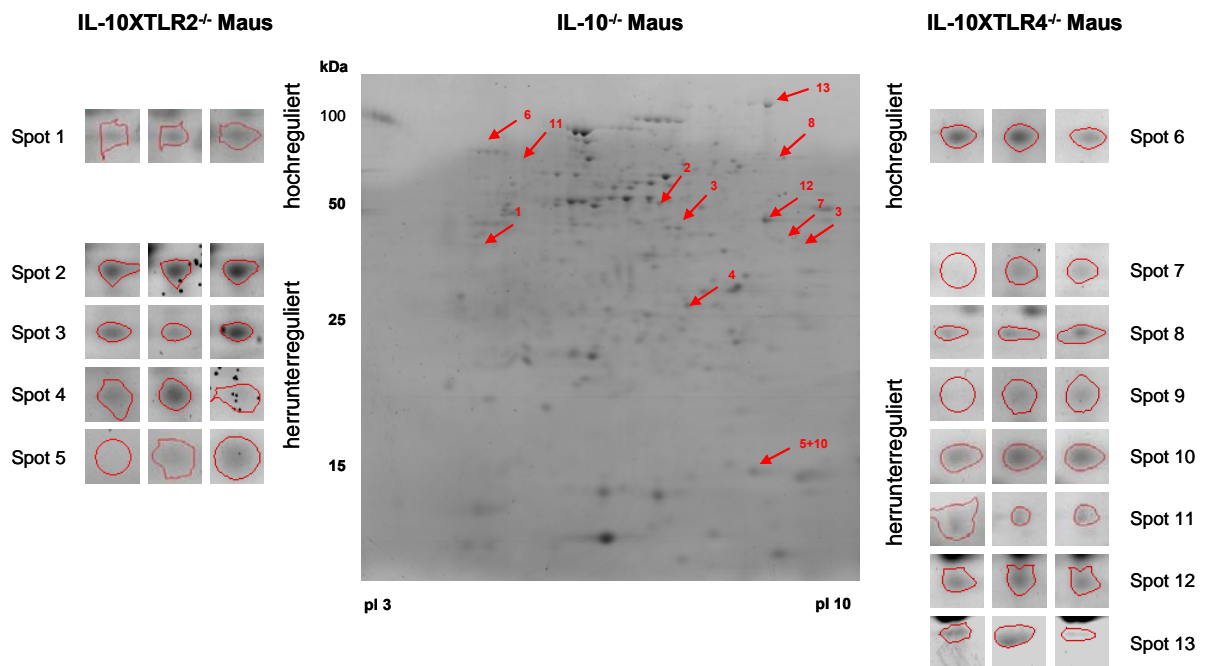


Abbildung 12: Proteomanalyse der primären IEZ der IL-10XTLR2^{-/-} bzw. IL-10XTLR4^{-/-} Mäuse verglichen zu IL-10^{-/-} Mäusen zum Zeitpunkt von 1 Woche.

Das Protein der IEZ des Kolons von IL-10^{-/-}, IL-10XTLR2^{-/-} bzw. IL-10XTLR4^{-/-} Mäusen wurde extrahiert, je 250 µg des Proteinlysats wurden mittels IEF und nachfolgend durch SDS-PAGE in 12,5%igen Gelen aufgetrennt. Die Gele wurden Coomassie gefärbt, eingescannt und mittels ProteomWeaver Software ausgewertet. Die IL-10^{-/-} Mäuse wurden als Kontrolle verwendet. Dargestellt sind die Referenzgele der IL-10^{-/-} Mäuse und der dazugehörige Proteinspot der IL-10XTLR2^{-/-} bzw. IL-10XTLR4^{-/-} Mäuse.

Tabelle 14: Übersicht der regulierten Proteine aus IEZ der IL-10XTLR2^{-/-} Mäuse verglichen zu IL-10^{-/-} Mäusen zum Zeitpunkt von 1 Woche.

MrM = theoretisches Molekulargewicht; pI = Isoelektrischer Punkt; SCov = Sequenzabdeckung; RF = Regulationsfaktor; F = Spotfrequenz in den Gelen

Nr.	Accession Nummer	Protein	MrM	pI	SCov	RF	F
1	K1C19	Cytokeratin 19	44515	5,28	105	2,38	5/6
2	EFTU	Elongation factor Tu, mitochondrial precursor	49876	7,23	128	-2,00	5/6
3	DHSO	Sorbitol dehydrogenase	40636	6,60	71	-2,38	5/6
4	GSTO1	Glutathione S-transferase omega-1	27708	6,92	80	-2,50	5/6
5	PPIA	Rotamase A	18131	7,74	69	-2,70	5/6

Tabelle 15: Übersicht der regulierten Proteine aus IEZ der IL-10XTLR4^{-/-} Mäuse verglichen zu IL-10^{-/-} Mäusen zum Zeitpunkt von 1 Woche.

MrM = theoretisches Molekulargewicht; pI = Isoelektrischer Punkt; SCov = Sequenzabdeckung; RF = Regulationsfaktor; F = Spotfrequenz in den Gelen

Nr.	Accession Nummer	Protein	MrM	pI	SCov	RF	F
6	GRP78	Grp-78	72492	5,07	61	2,17	5/6
7	ROA3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	39856	9,10	75	-2,56	4/6
8	CATA	Catalase	60013	7,72	79	-3,03	4/6
9	MDHM	Malate dehydrogenase, mitochondrial precursor	36030	8,83	94	-3,70	4/6
10	PPIA	Rotamase A	18131	7,74	106	-3,23	5/6
11	CH60	Chaperonin 60	61088	5,91	92	-4,76	4/6
12	KCRU	Kreatinkinase, mitochondrial precursor	47373	8,36	110	-5,00	6/6
13	ACON	Aconitate hydratase, mitochondrial precursor	86151	8,08	116	-5,88	5/6

Zum 8-Wochen-Zeitpunkt wurden 7 signifikant regulierte Proteine in den moderat entzündeten IL-10XTLR2^{-/-} Mäusen identifiziert (Tabelle 16). Von den 7 hochregulierten Proteinen sind 3 im Energiemetabolismus (UDP-Glucose-6-Dehydrogenase, Adenylate Kinase Isomerase 1, Electron Transferring Flavoprotein) und 1 Protein an der Glykolyse (Enolase A) involviert. Außerdem stehen 2 Proteine mit der Zellstressantwort (grp-78, dihydrolipoyl Dehydrogenase) in Verbindung.

In der Proteomanalyse der IL-10XTLR4^{-/-} Mäuse wurden ebenfalls Proteine identifiziert, welche mit dem Energiemetabolismus (Kreatinkinase, Electron Transferring Flavoprotein) und der zellulären Stressantwort (grp-78, grp-75, Chaperonin 60) in Zusammenhang stehen (Tabelle 17). Interessanterweise zeigten die IL-10XTLR4^{-/-} Mäuse keine Anzeichen einer Entzündung.

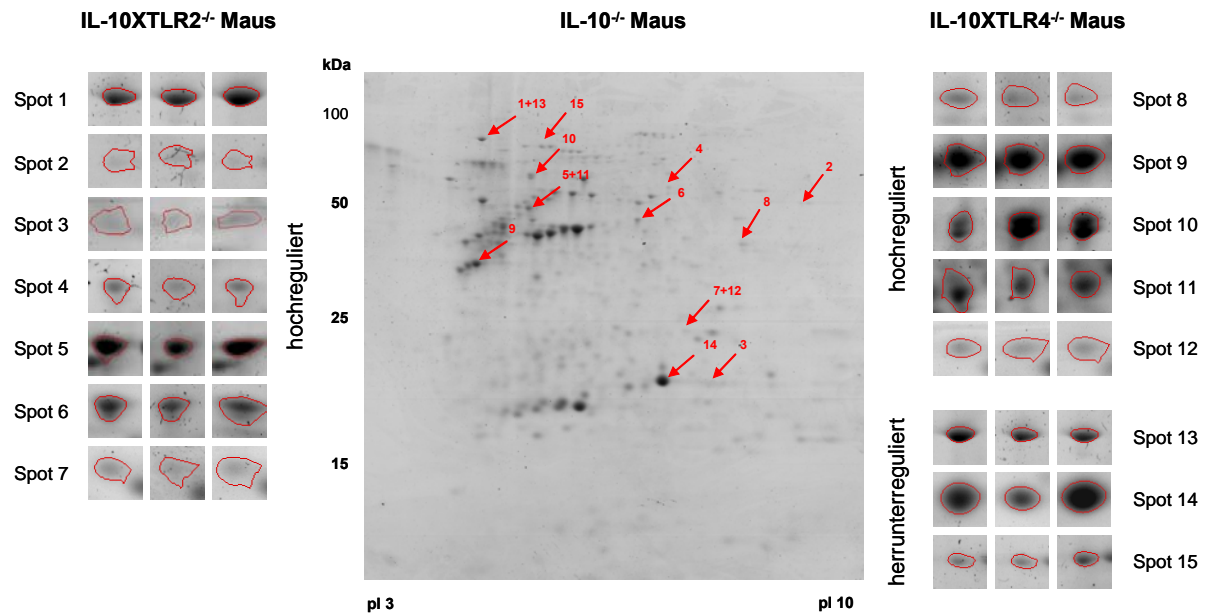


Abbildung 13: Proteomanalyse der primären IEZ der IL-10XTLR2^{-/-} bzw. IL-10XTLR4^{-/-} Mäuse verglichen zu IL-10^{-/-} Mäusen zum Zeitpunkt von 8 Wochen.

Das Protein der IEZ des Kolons von IL-10^{-/-}, IL-10XTLR2^{-/-}, IL-10XTLR4^{-/-} Mäusen wurde extrahiert, je 250 µg des Proteinlysats wurden mittels IEF und nachfolgend durch SDS-PAGE in 12,5%igen Gelen aufgetrennt. Die Gele wurden Coomassie gefärbt, eingescannt und mittels ProteomWeaver Software ausgewertet. Die IL-10^{-/-} Mäuse wurden als Kontrolle verwendet. Dargestellt sind die Referenzgele der IL-10^{-/-} Mäuse und der dazugehörige Proteinspot der IL-10XTLR2^{-/-} bzw. IL-10XTLR4^{-/-} Mäuse.

Tabelle 16: Übersicht der regulierten Proteine aus IEZ der IL-10XTLR2^{-/-} Mäuse verglichen zu IL-10^{-/-} Mäusen zum Zeitpunkt von 8 Wochen.

MrM = theoretisches Molekulargewicht; pI = Isoelektrischer Punkt; SCov = Sequenzabdeckung; RF = Regulationsfaktor; F = Spotfrequenz in den Gelen

Nr.	Accession Nummer	Protein	MrM	pI	SCov	RF	F
1	GRP78	Grp-78	72492	5,07	249	2,94	6/6
2	UGDH	UDP-glucose-6-dehydrogenase	55482	7,49	175	2,61	4/6
3	KAD2	Adenylate kinase isomerase 1, mitochondrial	25817	6,97	71	2,40	6/6
4	DLDH	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial precursor	54751	7,99	63	2,31	4/6
5	K2C8	Cytokeratin Endo A	54531	5,70	184	2,19	5/6
6	ENOA	Enolase A	47453	6,37	153	2,16	5/6
7	ETFA	Electron transferring flavoprotein subunit α , mitochondrial precursor	35360	8,62	143	2,09	5/6

Tabelle 17: Übersicht der regulierten Proteine aus IEZ der IL-10XTLR4^{-/-} Mäuse verglichen zu IL-10^{-/-} Mäusen zum Zeitpunkt von 8 Wochen.

MrM = theoretisches Molekulargewicht; pI = Isoelektrischer Punkt; SCov = Sequenzabdeckung; RF = Regulationsfaktor; F = Spotfrequenz in den Gelen

Nr.	Accession Nummer	Protein	MrM	pI	SCov	RF	F
8	KCRU	Kreatinkinase, mitochondrial precursor	47373	8,36	83	2,89	5/6
9	K1C19	Cytokeratin 19	44515	5,28	226	2,61	5/6
10	CH60	Chaperonin 60	61088	5,91	209	2,43	5/6
11	K2C8	Cytokeratin Endo A	54531	5,70	145	2,22	6/6
12	ETFA	Electron transferring flavoprotein subunit α , mitochondrial precursor	35360	8,62	154	2,13	6/6
13	GRP78	Grp-78	72492	5,07	227	-2,13	5/6
14	CAH1	Carbonic anhydrase 1	28360	6,44	90	-2,44	6/6
15	GRP75	Grp-75	73768	5,91	181	-2,44	5/6

Die Histologie der IL-10XTLR2^{-/-} Mäuse im Alter von 16 Wochen zeigte eine ähnlich moderate Entzündung des Kolons, wie im Alter von 8 Wochen. Die Analyse des Proteinexpressionsprofils dieser Mäuse ergab 15 unterschiedlich regulierte Proteine, wobei 12 herunterreguliert und 3 Proteine hochreguliert waren (Tabelle 18). Im Gegensatz zu den IL-10XTLR2^{-/-} Mäusen im Alter von 8 Wochen sind lediglich 2 der hochregulierten Proteine in den Energiemetabolismus (Pyruvatkinase Isozym M2) bzw. in die Glykolyse (Triosephosphate Isomerase) involviert. Interessanterweise fungieren 3 der 9 hochregulierten Proteine als Helferproteine während der Proteinfaltung (heat shock cognate 71kDa, grp-75, T-complex Protein subunit β), welche unter Stressbedingungen induzierbar sind. Des Weiteren sind 3 der hochregulierten Proteine (Glutamat Dehydrogenase 1, Dihydrolipoyl Dehydrogenase, Glutathione Reductase) am Abwehrmechanismus gegen oxidativen Stress beteiligt.

Zum Zeitpunkt der 16 Wochen wurden 13 signifikant regulierte Proteine in den IL-10XTLR4^{-/-} Mäusen detektiert (Tabelle 19, Abbildung 14). Obwohl diese Mäuse keine Anzeichen einer Entzündung zeigten, weist das Proteom ähnlich regulierte Proteine auf wie bei den IL-10XTLR2^{-/-} Mäusen. Dies umfasst Proteine, die Funktionen in der Proteinfaltung (T-complex Protein subunit ζ , grp-75) und in der Stressantwort (grp-58, Glutathione S-Transferase P1, Glutamat Dehydrogenase 1) ausüben. Zusätzlich sind Proteine aus dem Energiemetabolismus (UDP-glucose-6-dehydrogenase, ATP Synthase subunit α) in den primären IEZ der IL-10XTLR4^{-/-} Mäusen hochreguliert.

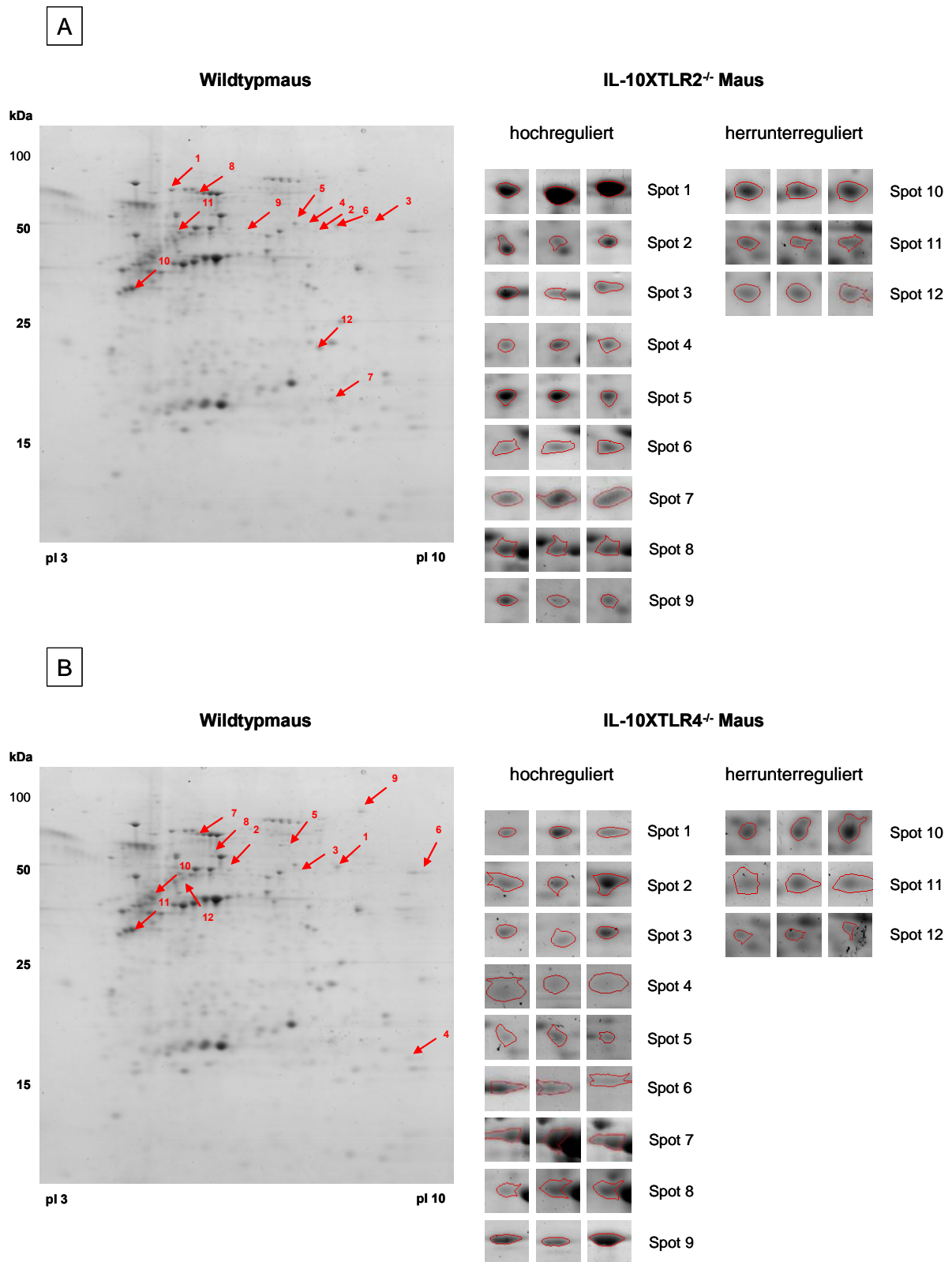


Abbildung 14: Proteomanalyse der primären IEZ der IL-10XTLR2^{-/-} bzw. IL-10XTLR4^{-/-} Mäuse verglichen zu IL-10^{-/-} Mäusen zum Zeitpunkt von 16 Wochen.

Das Protein der IEZ des Kolons von IL-10^{-/-}, IL-10XTLR2^{-/-}, IL-10XTLR4^{-/-} Mäuse wurde extrahiert, je 250 µg des Proteinlysats wurden mittels IEF und nachfolgend durch SDS-PAGE in 12,5%igen Gelen aufgetrennt. Die Gele wurden Coomassie gefärbt, eingescannt und mittels ProteomWeaver Software ausgewertet. Die IL-10^{-/-} Mäuse wurden als Kontrolle verwendet. Dargestellt sind die Referenzgele der IL-10^{-/-} Mäuse und der dazugehörige Proteinspot der IL-10XTLR2^{-/-} bzw. IL-10XTLR4^{-/-} Mäuse.

Tabelle 18: Übersicht der regulierten Proteine aus IEZ der IL-10XTLR2^{-/-} Mäuse verglichen zu IL-10^{-/-} Mäusen zum Zeitpunkt von 16 Wochen.

MrM = theoretisches Molekulargewicht; pI = Isoelektrischer Punkt; SCov = Sequenzabdeckung; RF = Regulationsfaktor; F = Spotfrequenz in den Gelen

Nr.	Accession Nummer	Protein	MrM	pI	SCov	RF	F
1	HSP7C	Heat Shock Cognate 71kDa	71055	5,37	180	2,91	6/6
2	DHE3	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial precursor	61640	8,05	78	2,86	5/6
3	KPYM	Pyruvate kinase isozyme M2	58420	7,18	188	2,79	5/6
4	AMPL	Cytosol aminopeptidase	56505	7,62	131	2,49	5/6
5	DLDH	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial precursor	54751	7,99	74	2,45	6/6
6	GSHR	Glutathione reductase, mitochondrial precursor	54256	8,19	153	2,18	6/6
7	TPIS	Triosephosphate isomerase	27038	6,90	88	2,16	6/6
8	GRP75	Grp-75	73768	5,91	91	2,12	4/6
9	TCPB	T-complex protein 1 subunit β	57783	5,97	167	2,09	4/6
10	K1C19	Cytokeratin 19	44515	5,28	263	-2,13	6/6
11	K2C8	Cytokeratin Endo A	54531	5,70	212	-2,27	6/6
12	ETFA	Electron transferring flavoprotein subunit α , mitochondrial precursor	35360	8,62	82	-2,38	5/6

Tabelle 19: Übersicht der regulierten Proteine aus IEZ der IL-10XTLR4^{-/-} Mäuse verglichen zu IL-10^{-/-} Mäusen zum Zeitpunkt von 16 Wochen.

MrM = theoretisches Molekulargewicht; pI = Isoelektrischer Punkt; SCov = Sequenzabdeckung; RF = Regulationsfaktor; F = Spotfrequenz in den Gelen

Nr.	Accession Nummer	Protein	MrM	pI	SCov	RF	F
13	UGDH	UDP-glucose-6-dehydrogenase	55482	7,49	141	5,04	5/6
14	SBP2	Selenium binding protein 2	53165	5,78	113	3,44	6/6
15	DHE3	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial precursor	61640	8,05	102	3,36	5/6
16	GSTP1	Glutathione S-transferase P1	23765	7,68	79	3,20	5/6
17	TCPZ	T-complex protein 1 subunit zeta	58424	6,63	70	2,74	4/6
18	ATPA	ATP synthase subunit α , mitochondrial precursor	59830	9,22	183	2,69	4/6
19	GRP75	Grp-75	73768	5,91	91	2,37	5/6
20	PDIA3	Grp-58	57042	5,98	140	2,07	5/6
21	ACON	Aconitate hydratase, mitochondrial precursor	86151	8,08	112	2,00	6/6
22	TXND5	Thioredoxin domain-containing protein 5 precursor	47070	5,51	67	-2,38	5/6
23	K1C19	Cytokeratin 19	44515	5,28	225	-2,86	6/6
24	K2C8	Cytokeratin Endo A	54531	5,70	193	-2,94	6/6

3.1.4 Bibliometrische Analyse

Auf Basis von Kozitationen in der Literatur (NCBI Pubmed) wurde mit Hilfe des Programms Bibliosphere Software (Genomatix Software, München) ein Protein-Protein Netzwerk generiert. Die Verbindungslinien zwischen den Proteinen spiegeln mindestens eine Kozitation wider. Abbildung 15 veranschaulicht den Zusammenhang zwischen den unterschiedlich regulierten Proteinen aus den Proteomanalysen der primären IEZ von TLR2-, TLR4-, IL-10XTLR2-, IL-10XTLR4-defizienten Mäusen, wobei 52 Proteine über mindestens eine Kozitation im direkten Zusammenhang stehen. Lediglich 4 Proteine (Cysteine and Glycine-rich Protein, mt. Enoyl-CoA Hydratase, Phosphatidylethanolamine binding protein, Galektin 2) stehen nicht mit dem Netzwerk über eine Kozitation in Verbindung (Abbildung 15). Auffallend dabei ist, dass das mitochondriale Protein Chaperonin 60 eine zentrale Rolle innerhalb des Netzwerks einnimmt.

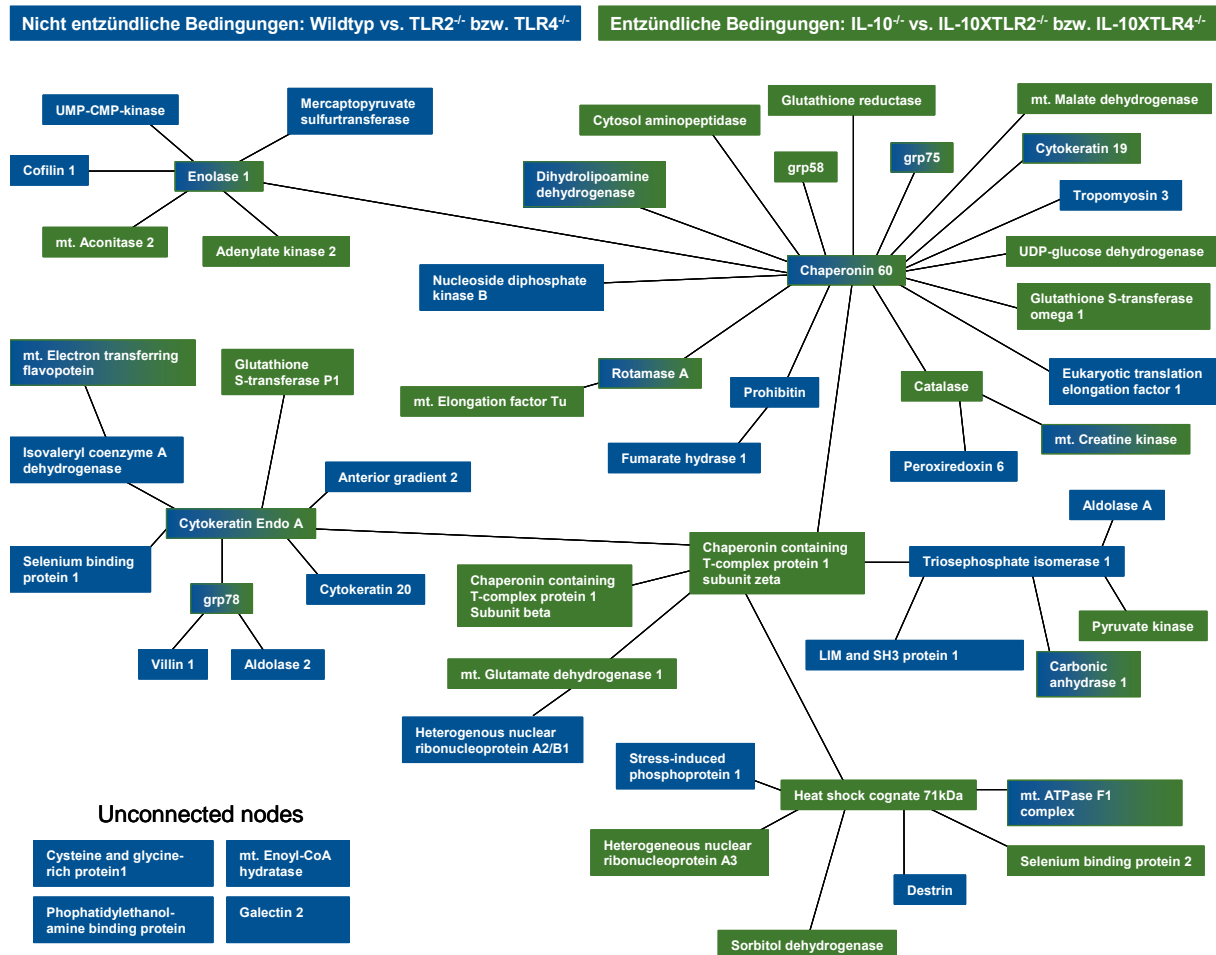


Abbildung 15: Bibliosphere Analyse der regulierten Proteine.

Unter Benutzung des Programms Bibliosphere Software (Genomatix) wurde ein Protein-Protein Netzwerk generiert. Die Vergleiche unter nicht entzündlichen Bedingungen (Wildtypmaus vs. TLR2^{-/-} bzw. TLR4^{-/-} Maus, blaue Boxen) und entzündlichen Bedingungen (IL-10^{-/-} vs. IL-10XTLR2^{-/-} bzw. IL-10XTLR4^{-/-} Maus, grüne Boxen) sind in diesem Netzwerk dargestellt.

3.2 Mono- bzw. Dualassoziierung mit *E.faecalis* und/oder *E.coli* von keimfreien Wildtyp- und IL-10^{-/-} Mäusen

Zusätzlich zu den Studien der TLR2 bzw. TLR4 Defizienz unter nicht entzündlichen und entzündlichen Bedingungen, wurden keimfreie Wildtyp- und IL-10-defizienten Mäuse im Alter von 12 Wochen mit *E.faecalis* und/oder *E.coli* mono- bzw. dualassoziert. Nach 1 bzw. 6 Wochen bakterieller Kolonisierung wurden die Mäuse getötet. Die histologische Analyse wurde vom distalen Kolon durchgeführt. Die primären IEZ des Zäkums und des Kolons wurden isoliert, gepoolt und Protein bzw. RNA für weitere Experimente isoliert. Eine schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus ist in Abbildung 16 zu sehen.

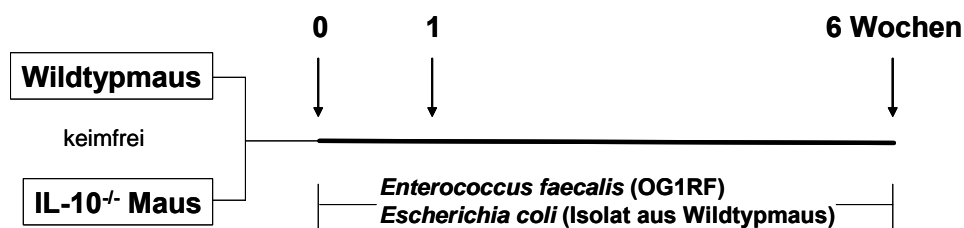


Abbildung 16: Experimenteller Aufbau zur Fragestellung, welche Effekte Gram-positive bzw. Gram-negative kommensale Bakterien auf die ER-Stressantwort unter entzündlichen Bedingungen haben können.

3.2.1 Histologische Analyse

Zur histologischen Untersuchung wurden jeweils die Spitze des Zäkums und ein Teil des distalen Kolons in 10% PBS-gepuffertem Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die Beurteilung des Entzündungsgrads der kodierten Proben erfolgte durch Frau Dr. Sigrid Kisling. Die Beurteilung beinhaltet folgende Kriterien: mononukleären Zellinfiltration in die Lamina propria, Abbau der Goblet-Zellen, Kryptenhyperplasie und Epithelzellzerstörung [182].

In den Wildtypmäusen konnte weder im Zäkum noch im Kolon eine Entzündung festgestellt werden. Hingegen entwickelten die IL-10-defizienten Mäuse eine Kolitis. *E.faecalis* gehört zu den Bakterien, welche eine Entzündung spät auslösen [84]. In Abbildung 17 ist deutlich zu erkennen, dass *E.faecalis* nach 6-wöchiger Monoassoziierung lediglich eine milde Kolitis in den IL-10-defizienten Mäusen induzierte ($1,4 \pm 0,13$). *E.coli* initiiert eine Entzündung früher als *E.faecalis* [84]. Die histologischen Untersuchungen zeigten nach 6-wöchiger Monoassoziierung mit *E.coli* einen höheren Entzündungsgrad ($2,15 \pm 0,49$) in den IL-10-defizienten Mäusen. Die Einzeleffekte der beiden Bakterienstämme auf die Histopathologie verstärken sich nach der Dualassoziierung ($2,78 \pm 0,22$).

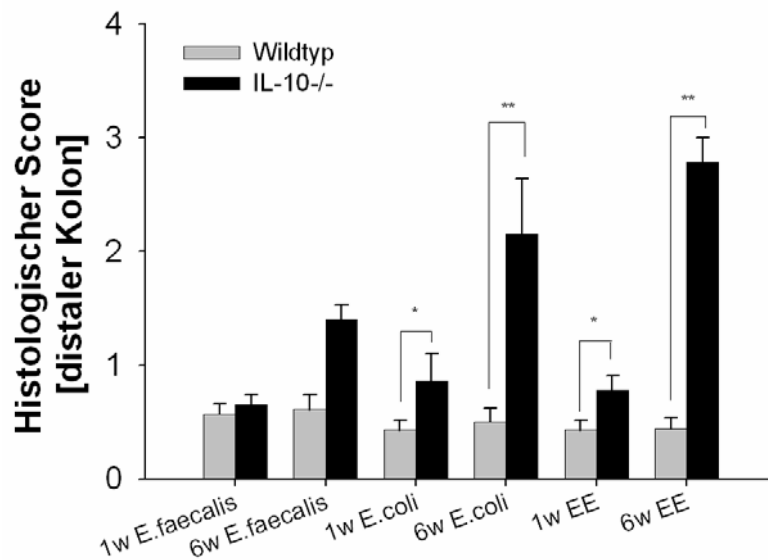


Abbildung 17: Histologische Analyse der in Paraffin eingebetteten Gewebestücke vom distalen Kolon der Wildtyp- und IL-10-defizienten Mäuse, mono- bzw. dualassoziert mit *E.faecalis* und/oder *E.coli* für 1 und 6 Wochen. (Score von 0 - 4; Scoresystem von Berg [83])

3.2.2 Reinheitsüberprüfung der isolierten intestinalen Epithelzellen

Die Reinheit der isolierten IEZ konnte durch die Abwesenheit von CD3-positiven T-Zellen, CD19-positiven B-Zellen und Integrin α X-positiven Makrophagen mittels Western Blot Analyse bestätigt werden. E-Cadherin wurde als Marker für Epithelzellen genutzt (Abbildung 18).

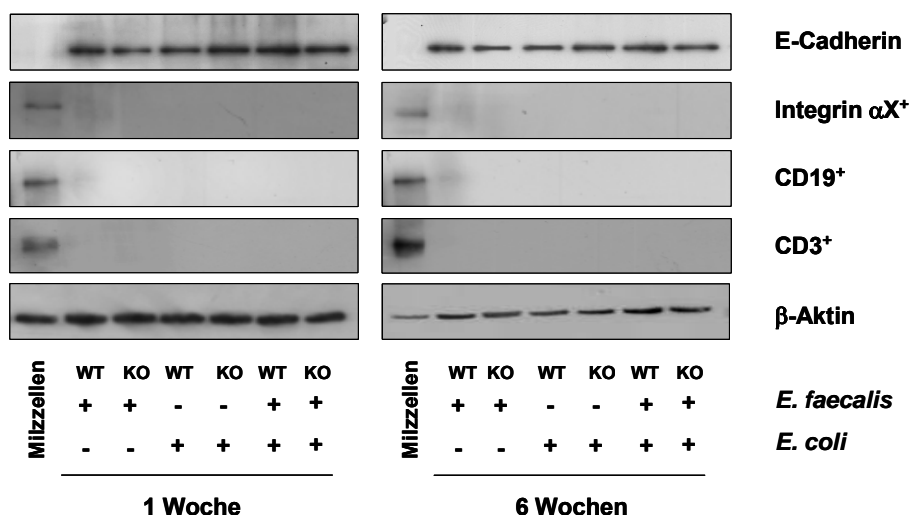


Abbildung 18: Reinheitskontrolle isolierter IEZ.

Die Wildtypmäuse und IL-10^{-/-} Mäuse (n=5) wurden nach 1 bzw. 6 Wochen nach bakterieller Kolonisierung mit *E.faecalis* und/oder *E.coli* getötet. Die Western Blot Analyse erfolgte mit 25 μ g Gesamtprotein aus isolierten IEZ bzw. Milzzellen. Mittels spezifischer Antikörper gegen CD3, CD19 und Integrin α X wurden die isolierten IEZ auf Verunreinigung durch CD3⁺ T-Zellen, CD19⁺ B-Zellen und Integrin α X⁺ Makrophagen überprüft. E-Cadherin diente hierbei als Marker für IEZ.

3.2.3 Proteomanalyse von intestinalen Epithelzellen der IL-10-defizienten Mäuse mono-/ dualassoziiert mit *E.faecalis* und/oder *E.coli*

Die Proteomanalyse erfolgte von primären Epithelzellen der Wildtyp- und IL-10^{-/-} Mäuse nach 6-wöchiger Mono- bzw. Dualassoziiierung mit *E.faecalis* und/oder *E.coli*. Wie bereits erwähnt, wurden die keimfreien Wildtyp- und IL-10^{-/-} Mäuse für 1 und 6 Wochen mit *E.faecalis* und *E.coli* mono- bzw. dualassoziiert. In die Proteomanalyse ging lediglich die 6-wöchige Mono- bzw. Dualassoziiierung ein, da zu diesem Zeitpunkt die IL-10^{-/-} Mäuse jedoch nicht die Wildtypmäuse eine deutliche Entzündung nach der bakteriellen Kolonisierung zeigten.

Die Analyse des Proteinexpressionsprofils erfolgte wie im Methodenteil (siehe Kapitel 2.2.17) beschrieben, wobei ein 2D-Gel für eine individuelle Maus stand. Folgende Vergleiche wurden durchgeführt (jeweils n=3):

- *E.faecalis* assoziierte Wildtypmaus versus *E.faecalis* assoziierte IL-10^{-/-} Maus
- *E.coli* assoziierte Wildtypmaus versus *E.coli* assoziierte IL-10^{-/-} Maus
- *E.faecalis* und *E.coli* assoziierte Wildtypmaus versus *E.faecalis* und *E.coli* assoziierte IL-10^{-/-} Maus

Insgesamt konnten 30 regulierte Proteine in den entzündeten IL-10^{-/-} Mäusen mittels Proteomanalyse und Massenspektrometrie identifiziert werden (Abbildungen 19-21).

Die dazugehörigen Tabellen 20-22 geben einen Überblick über die identifizierten Proteine, deren theoretisches Molekulargewicht, isoelektrischen Punkt, Regulationsfaktor, Sequenzabdeckung sowie Spottfrequenz in den Gelen.

Die Anzahl der identifizierten Proteine variierte zwischen den bakteriellen Kolonisierungen. In den mit *E.faecalis* assoziierten IL-10^{-/-} Mäusen wurden 10 regulierte Proteine gefunden; die Mehrzahl davon sind herunterregulierte Proteine (7 Proteine). Nach der 6-wöchigen Assoziierung mit *E.coli* wurden in den IEZ der IL-10^{-/-} Mäuse 20 Proteine (15 herunterreguliert, 5 hochreguliert) identifiziert. Die Proteomanalyse der Dualassoziiierung mit *E.faecalis* und *E.coli* ergab lediglich 6 unterschiedlich regulierte Proteine (5 herunterreguliert, 1 hochreguliert). Auffallend dabei ist, dass nur in den herunterregulierten Proteinen Übereinstimmungen zwischen den einzelnen Kolonisierungen zu finden sind. In allen 3 Vergleichen ist die Carbonic anhydrase 1 herunterreguliert. Mehrere Übereinstimmungen gibt es zwischen der Monoassoziiierung mit *E.faecalis* und *E.coli*. Neben der Carbonic anhydrase 1 konnten 3 weitere Proteine (Laktat Dehydrogenase, Annexin 2, mitochondriale Kreatinkinase) in beiden Assoziierungen detektiert werden. Interessanterweise haben die Mehrzahl der hochregulierten Proteine ihre Funktion im Mitochondrium. Darunter sind vor allem Chaperone, wie Chaperonin 10 oder Chaperonin 60.

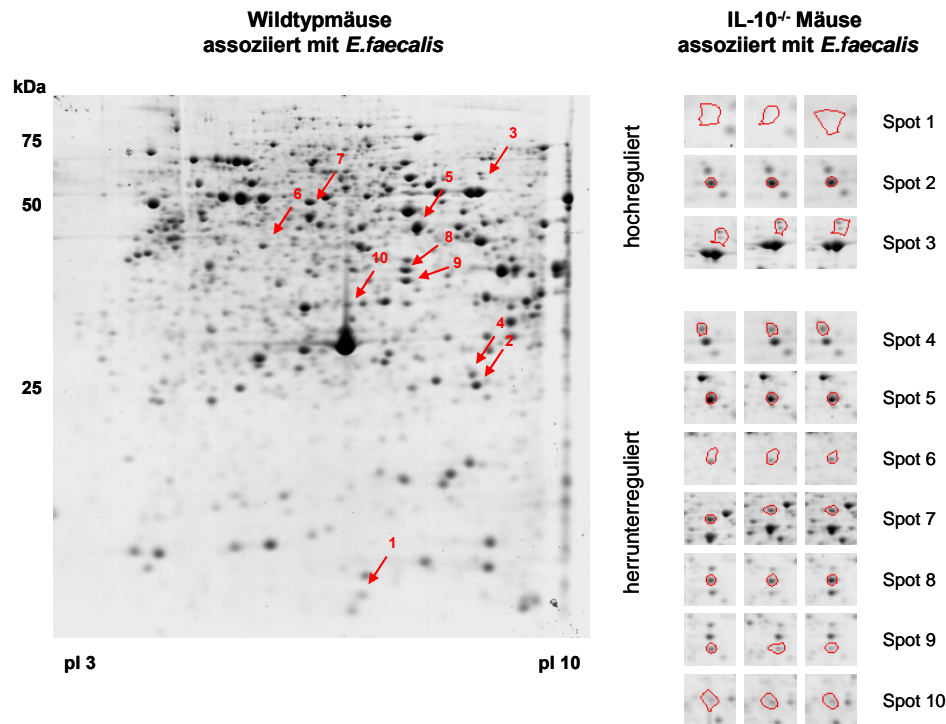


Abbildung 19: Proteomanalyse der primären IEZ von IL-10^{-/-} Mäuse, verglichen zu Wildtypmäusen, assoziiert mit *E. faecalis* (6 Wochen).

Das Protein der IEZ des Kolons wurde extrahiert und je 250 µg des Proteinlysats wurden mittels IEF und nachfolgend durch SDS PAGE in 12,5%igen Gelen aufgetrennt. Die Gele wurden Coomassie gefärbt, eingescannt und mittels Proteomeaver Software ausgewertet. Wildtypmaus kolonisiert mit *E. faecalis* diente als Kontrolle.

Tabelle 20: Übersicht der regulierten Proteine aus IEZ der IL-10^{-/-} Mäuse, verglichen zu Wildtypmäusen, assoziiert mit *E. faecalis* (6 Wochen).

MrM = theoretisches Molekulargewicht; pI = Isoelektrischer Punkt; SCov = Sequenzabdeckung; RF = Regulationsfaktor; F = Spotsfrequenz in den Gelen

Nr.	Accession Nummer	Protein	MrM	pI	SCov	RF	F
1	CH10	Chaperonin 10, mitochondrial	10825	8,18	65	4,13	6/6
2	Q91VU2	Transgelin 2	22552	8,39	77	3,77	6/6
3	BAC27176	Choline Dehydrogenase, mitochondrial	67057	8,78	55	2,07	6/6
4	GSTP1	Glutathion S-transferase P1	23634	8,13	62	-1,32	6/6
5	S24612	Kreatinkinase, mitochondrial precursor	47373	8,39	52	-1,47	6/6
6	Q9D154	Serine (Orcystein) Dehydrogenase Inhibitor	42719	5,85	37	-1,47	6/6
7	I48966	Aldehyde Dehydrogenase (NAD)	57015	7,53	46	-1,59	6/6
8	ANXA2	Annexin 2	38806	7,53	55	-2,00	6/6
9	LDHA	L-lactate Dehydrogenase A	36686	7,77	43	-2,13	6/6
10	CAH1	Carbonic anhydrase 1	28229	6,47	58	-2,63	6/6

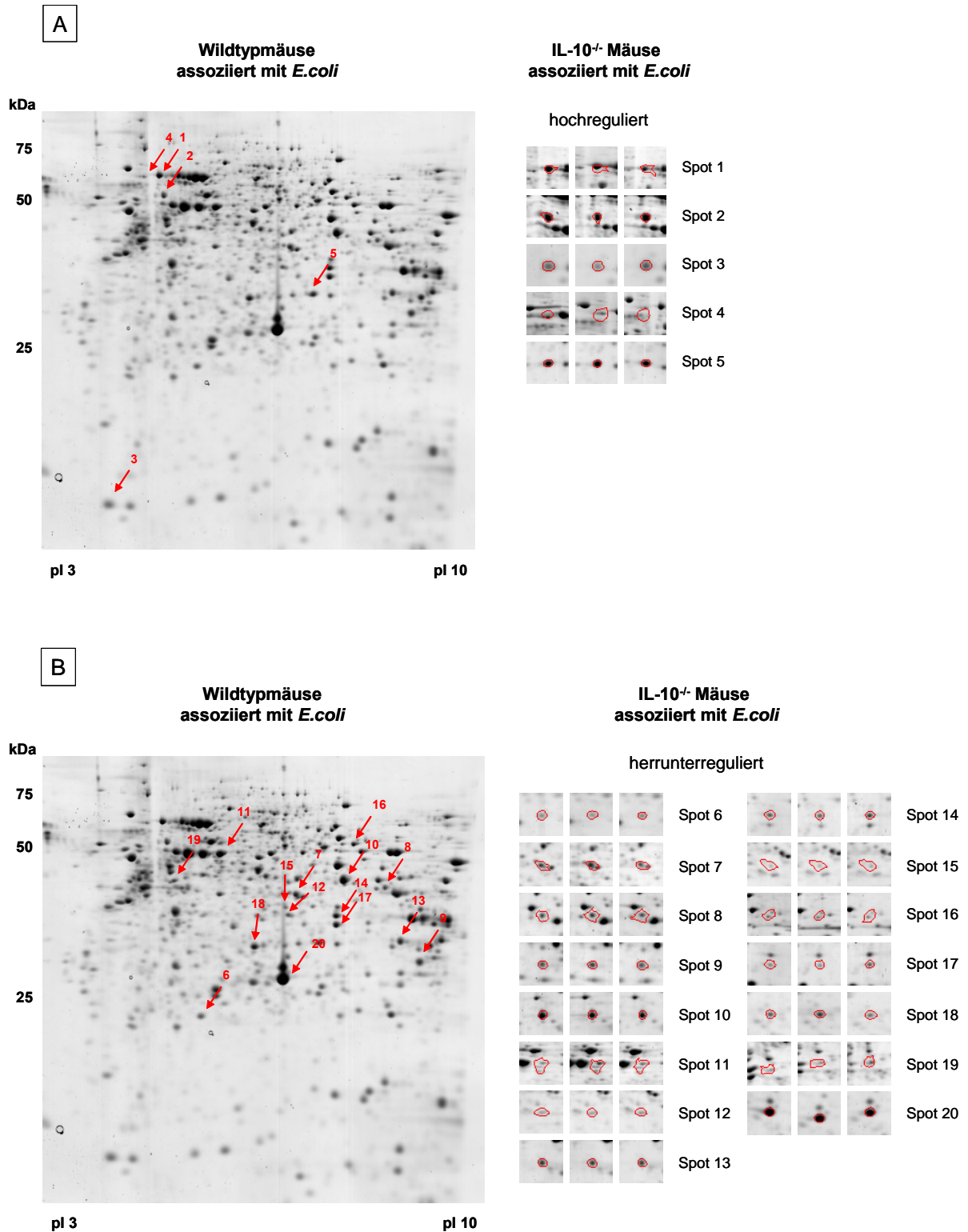


Abbildung 20: Proteomanalyse der primären IEZ von IL-10^{-/-} Mäuse, verglichen zu Wildtypmäusen, assoziiert mit *E.coli* (6 Wochen).

Das Protein der IEZ des Kolons wurde extrahiert und je 250 µg des Proteinlysats wurden mittels IEF und nachfolgend durch SDS PAGE in 12,5%igen Gelen aufgetrennt. Die Gele wurden Coomassie gefärbt, eingescannt und mittels Proteomweaver Software ausgewertet. Die Wildtypmaus diente als Kontrolle.

Tabelle 21: Übersicht der regulierten Proteine aus IEZ der IL-10^{-/-} Mäuse, verglichen zu Wildtypmäusen, assoziiert mit *E.coli* (6 Wochen).

MrM = theoretisches Molekulargewicht; pI = Isoelektrischer Punkt; SCov = Sequenzabdeckung; RF = Regulationsfaktor; F = Spotfrequenz in den Gelen

Nr.	Accession Nummer	Protein	MrM	pI	SCov	RF	F
1	A45935	Heat shock cognate 71kDa	71021	5,37	31	2,26	6/6
2	Q8C2C7	Chaperonin 60	61089	5,67	63	2,11	6/6
3	THIO	Thioredoxin (ADF)	11879	4,80	92	2,02	6/6
4	S25197	Valosin containing protein	89936	5,14	51	1,67	6/6
5	Q78MH6	Voltage-dependent anionchannel 2	32340	7,44	62	1,21	6/6
6	BAB23595	UMP-CMT kinase	22379	5,68	62	-1,49	6/6
7	I49605	Acyl-CoA Dehydrogenase	45203	8,96	50	-1,49	6/6
8	BAC27697	Acetyl-CoA Acetyltransferase	45129	8,71	50	-1,61	6/6
9	LEG3	Galactin 3	27481	8,50	27	-1,64	6/6
10	S24612	Kreatinkinase, mitochondrial precursor	47373	8,39	50	-1,85	6/6
11	Q91X97	Selenium binding protein 1	53051	5,87	61	-1,92	6/6
12	Q54A37	Dihydrodiol Dehydrogenase	37590	6,67	67	-208	6/6
13	Q8K149	Hadhsc protein	31970	7,23	39	-2,22	6/6
14	ANXA2	Annexin 2	38806	7,53	62	-2,22	6/6
15	Q52KM4	Transaldolase 1	37534	6,57	33	-2,27	6/6
16	AAC36096	UDP-glucose-6-Dehydrogenase	55482	7,49	60	-2,38	6/6
17	LDHA	L-lactate Dehydrogenase A	36686	7,77	60	-2,38	6/6
18	THTM	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	33100	6,12	61	-2,50	6/6
19	BAC38380	Succinate-CoA ligand	50424	6,57	35	-2,63	6/6
20	CAH1	Carbonic anhydrase 1	28229	6,47	53	-3,23	6/6

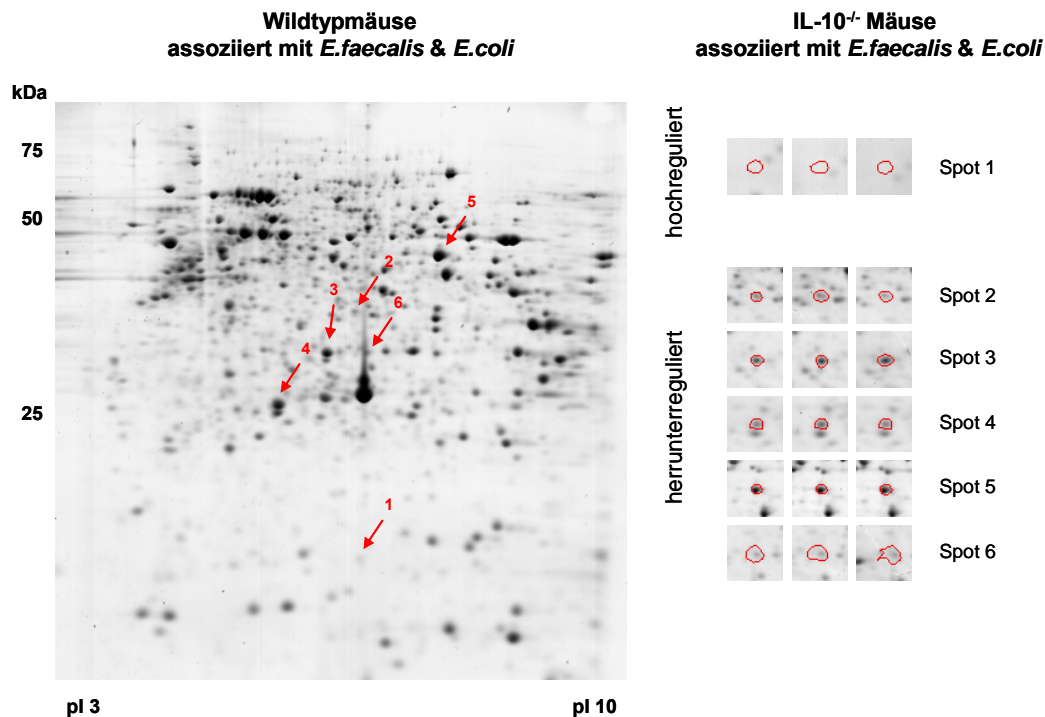


Abbildung 21: Proteomanalyse der primären IEZ von $IL-10^{-/-}$ Mäusen, verglichen zu Wildtypmäusen, assoziiert mit *E.faecalis* und *E.coli* (6 Wochen).

Das Protein der IEZ des Kolons wurde extrahiert und je 250 μ g des Proteinlysats wurden mittels IEF und nachfolgend durch SDS PAGE in 12,5%igen Gelen aufgetrennt. Die Gele wurden Coomassie gefärbt, eingescannt und mittels Proteomweaver Software ausgewertet. Die Wildtypmaus diente als Kontrolle.

Tabelle 22: Übersicht der regulierten Proteine aus IEZ der $IL-10^{-/-}$ Mäuse, verglichen zu Wildtypmäusen, assoziiert mit *E.faecalis* und *E.coli* (6 Wochen).

MrM = theoretisches Molekulargewicht; pI = Isoelektrischer Punkt; SCov = Sequenzabdeckung; RF = Regulationsfaktor; F = Spotfrequenz in den Gelen

Nr.	Accession Nummer	Protein	MrM	pI	SCov	RF	F
1	RS12	40S ribosomal protein S12	14727	7,01	42	2,25	6/6
2	Q543N3	LIM and SH3 protein 1	30374	6,61	45	-2,00	6/6
3	Q505N7	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	33247	6,11	64	-2,04	6/6
4	PRDX6	Peroxiredoxin 6	24838	5,72	79	-2,13	6/6
5	B55729	Hydroxymethylglutaryl-CoA Synthase	53115	7,46	47	-3,03	6/6
6	CAH1	Carbonic anhydrase 1	28229	6,47	55	-3,03	6/6

3.2.4 Bibliometrische Analyse

Auf Basis von Kozitationen in der Literatur (NCBI Pubmed) wurde auch in dieser *in vivo* Studie mit Hilfe des Programms Bibliosphere Software (Genomatix, München) ein Protein-Protein Netzwerk generiert. Die Verbindungslinien zwischen den Proteinen spiegeln mindestens eine Kozitation wider. Der Zusammenhang zwischen den einzelnen bakteriellen Assoziationen ist in Abbildung 22 dargestellt. Es stehen 18 Proteine über mindestens eine Kozitation in direkter Verbindung. 6 Proteine (Transgelin 2, Choline Dehydrogenase, Transaldolase 1, Dihydrodiol Dehydrogenase, Peroxiredoxin 6, Hydroxymethylglutaryl-CoA Synthase) sind dabei nicht im Netzwerk involviert. Besonders stark im Netzwerk vertreten sind Proteine, die nach der Assoziation mit *E.coli* in den IL-10^{-/-} Mäusen als reguliert gefunden wurden. Galectin 3 und das mitochondriale Protein Chaperonin 60 und nehmen eine zentrale Rolle innerhalb des Netzwerks ein.

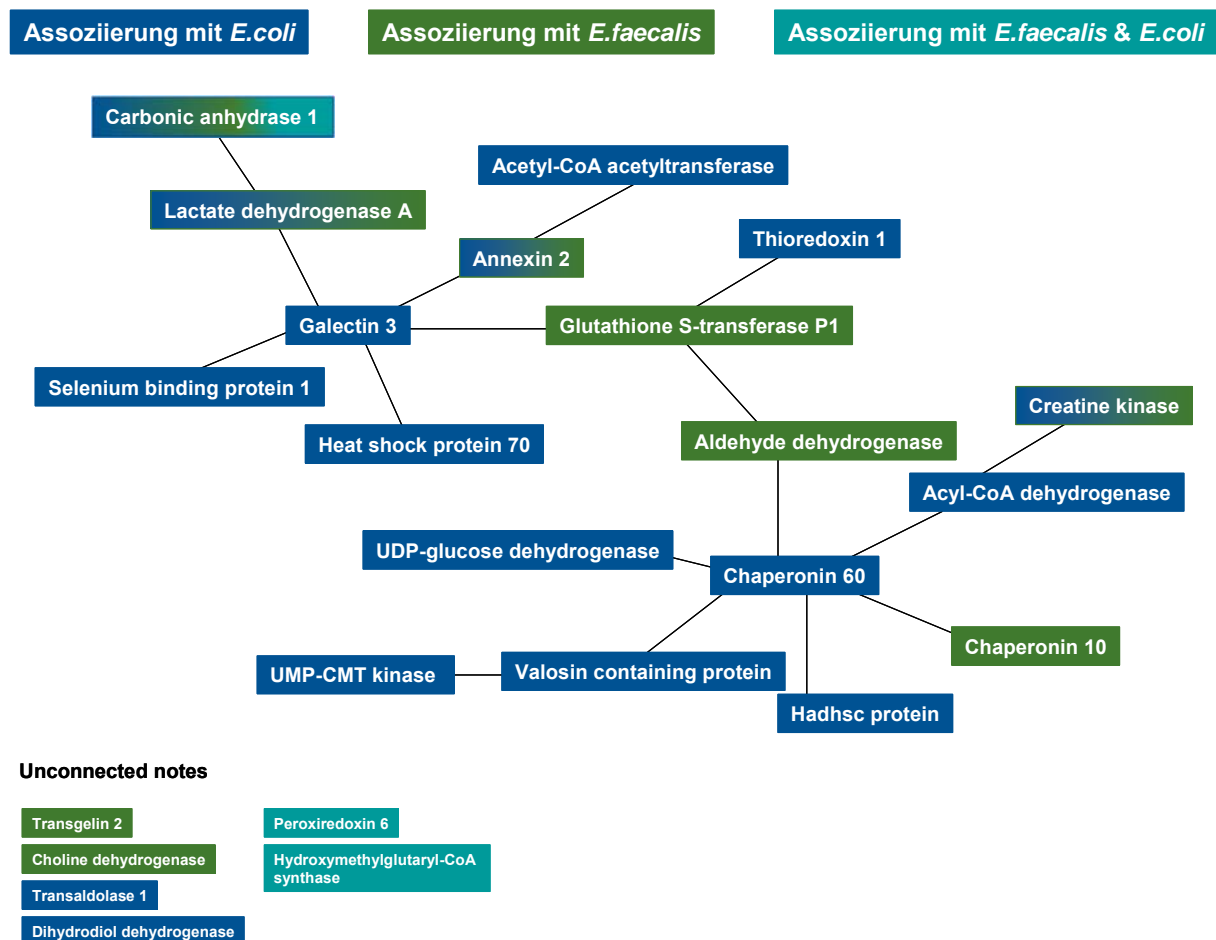


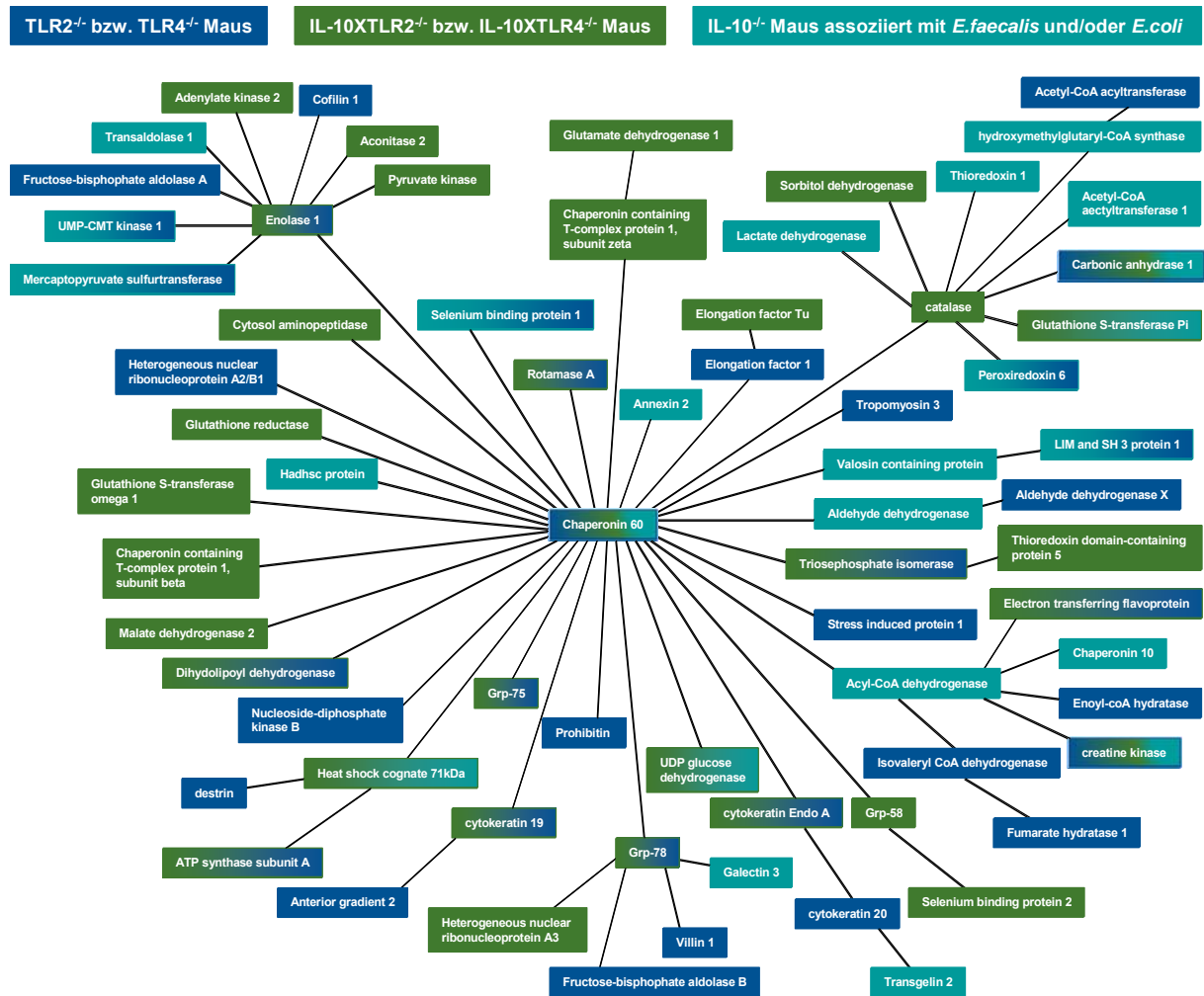
Abbildung 22: Bibliosphere Analyse der regulierten Proteine.

Unter Benutzung des Programms Bibliosphere Software (Genomatix) wurde ein Protein-Protein Netzwerk generiert.

3.3 Gesamt Protein-Protein Netzwerk von unterschiedlichen Mausmodellen

In den bisherigen *in vivo* Studien dieser Arbeit wurden bereits Protein-Protein Netzwerke mittels der Bibliosphere Software (Genomatix, München) generiert, welche vor allem die Bedeutung des mitochondrialen Stresschaperons Chaperonin 60 unterstreichen.

In Abbildung 23, welche ein Netzwerk der gesamten identifizierten Proteine darstellt, spiegeln die Verbindungslinien zwischen den Proteinen wie in den vorangegangenen Netzwerken mindestens eine Kozitation wider. In diese Gesamtanalyse sind 75 Proteine eingegangen; wobei lediglich 6 Proteine (cystein+glycine-rich protein 1, galectin 2, phosphatidylethanolamin binding protein 1, inorganic pyrophosphatase 2, Choline Dehydrogenase, Dihydrodiol Dehydrogenase) nicht mit dem Netzwerk in Verbindung stehen. Im Mittelpunkt steht Chaperonin 60, welches in allen Proteomanalysen der 3 *in vivo* Studien als signifikant reguliert identifiziert wurde. Neben Chaperonin 60 konnten noch 2 weitere Proteine in diesen 3 Proteomanalysen detektiert werden: Carbonic Anhydrase 1 und ebenso die mitochondriale Kreatinkinase. Eine zentrale Rolle in sich abgrenzenden kleineren Netzwerken übernehmen Enolase 1 und Catalase.



Unconnected notes

- Cystein+glycine-rich protein 1
- Choline dehydrogenase
- Galectin 2
- Dihydrodiol dehydrogenase
- Phosphatidylethanolamin binding protein 1
- Inorganic pyrophosphatase 2

Abbildung 23: Biblioshere Gesamtanalyse der regulierten Proteine.

Unter Benutzung des Programms Biblioshere Software (Genomatix) wurde ein Gesamt-Protein-Protein Netzwerk generiert. Die Vergleiche unter nicht entzündlichen Bedingungen (Wildtypmaus vs. TLR2^{-/-} bzw. TLR4^{-/-} Maus, blaue Boxen) und entzündlichen Bedingungen (IL-10^{-/-} vs. IL-10XTLR2^{-/-} bzw. IL-10XTLR4^{-/-} Maus, grüne Boxen) sind in diesem Netzwerk dargestellt.

3.4 ER- und mitochondriale Stressantwort unter Bedingung chronischer Entzündung in verschiedenen Mausmodellen

In der Proteomanalyse der IL-10-defizienten Mäuse wurden bereits Stress assoziierte Proteine nach 6-wöchiger Mono-/ Dualassoziierung mit *E.faecalis* und/oder *E.coli* detektiert. Besonders das mitochondriale Protein Chaperonin 60 scheint unter Entzündung eine wichtige Rolle zu spielen. Mittels Western Blot Technik wurde neben der Proteinexpression von Chaperonin 60 auch die Induktion des ER-Stressproteins grp-78 und der mitochondrialen Kreatinkinase untersucht.

Das mitochondriale Protein Chaperonin 60 gehört zu der Familie der Chaperone und ist im Transport von Proteinen ins Mitochondrium sowie bei der Faltung von Proteinen involviert ist. Abbildung 24A zeigt, dass unter Entzündung Chaperonin 60 verstärkt exprimiert wurde. In der Proteomanalyse wurde es lediglich nach der Kolonisierung mit *E.coli* identifiziert. Die Expression scheint unabhängig von der bakteriellen Assoziierung zu sein, da diese mit dem Entzündungsgrad einhergeht. Ebenso ist das zentrale Chaperon in der ER-Stressantwort grp-78 unter Entzündung induziert. Ähnlich wie bei Chaperonin 60 ist die Expression unabhängig von der bakteriellen Kolonisierung. Lediglich der Entzündungsgrad der IL-10^{-/-} Mäuse scheint die Expression von grp-78 zu beeinflussen. Eine verstärkte Expression von grp-78 ist nach der Monoassoziierung mit *E.coli* ($2,15 \pm 0,49$) bzw. Dualassoziierung ($2,78 \pm 0,22$) zu erkennen; im Gegensatz zur Assoziierung mit *E.faecalis* ($1,4 \pm 0,13$).

Die mitochondriale Kreatinkinase stellt eines der Hauptenzyme im Energiemetabolismus der Mitochondrien dar. Diese Kinase ist an der Generierung von Phospho-Kreatin und ATP beteiligt [187]. Eine Störung dieses Prozesses kann zur Apoptose führen. In den entzündeten IL-10^{-/-} Mäusen konnte ein deutlicher Abbau der Kreatinkinase im Vergleich zu den nicht entzündeten Wildtypmäusen, unabhängig von der bakteriellen Assoziierung, nachgewiesen werden.

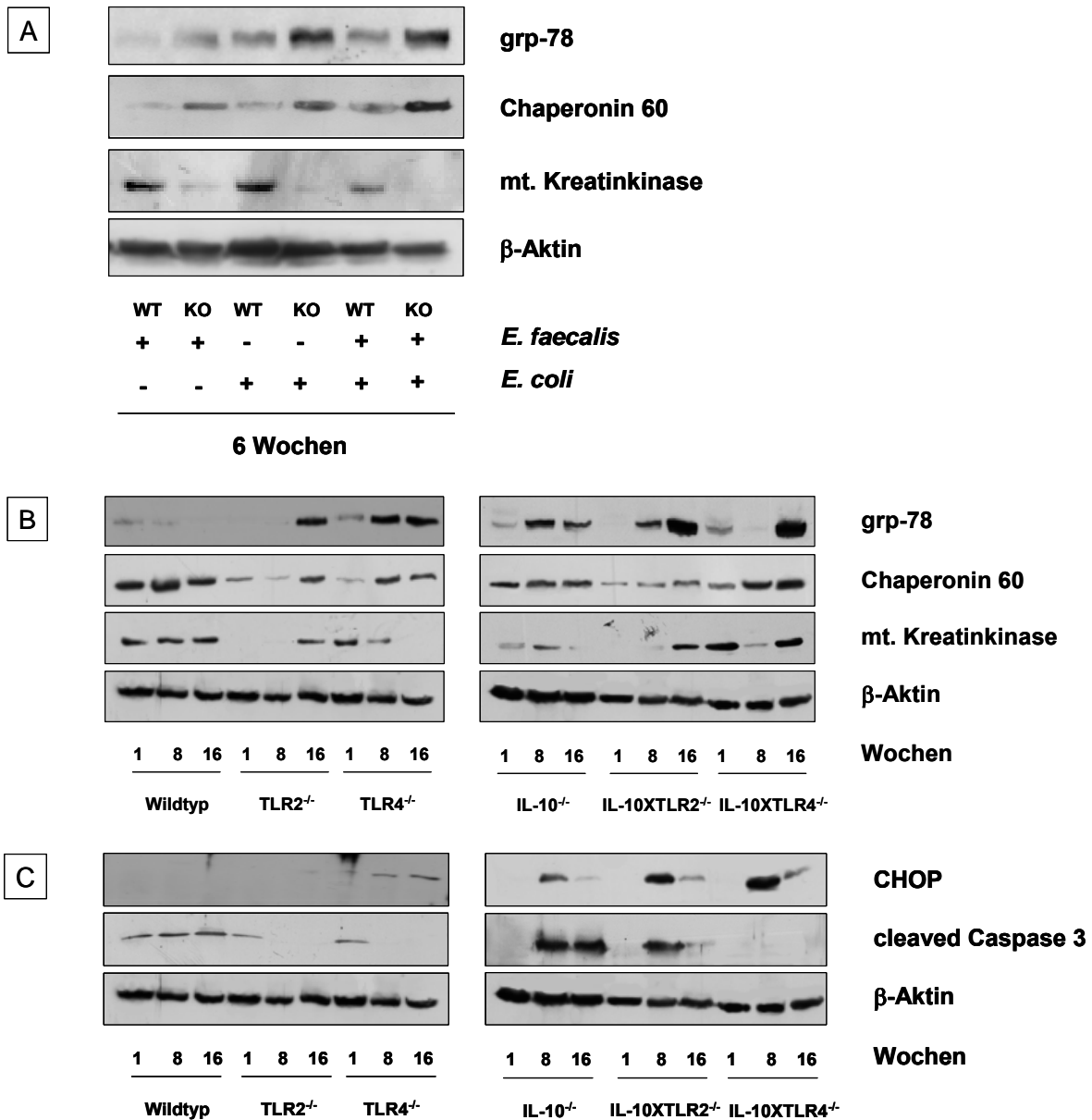


Abbildung 24: Expression von Stress und Apoptose assoziierten Proteinen.

(A) Die Wildtypmäuse (WT) und IL-10^{-/-} Mäuse (KO) (n=5) wurden nach 1 bzw. 6 Wochen Assoziierung mit *E. faecalis* und/oder *E. coli* getötet. (B&C) Die Wildtypmäuse und TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, IL-10^{-/-}, IL-10XTLR2^{-/-} und IL-10XTLR4^{-/-} Mäuse (n=6) wurden im Alter von 1, 8 bzw. 16 Wochen getötet. Die Western Blot Analyse erfolgte mit 25 μ g der isolierten IEZ, mittels spezifischen Antikörpern gegen grp-78, Chaperonin 60, mt. Kreatinkinase, CHOP und cleaved caspase 3 wurden die unterschiedlichen Expressionsprofile ermittelt; β -Aktin diente hierbei als Ladekontrolle.

Ebenfalls zeigen die weiteren Proteomanalysen, dass eine Defizienz von TLR2 bzw. TLR4 den Mechanismus der ER-Stressantwort modulieren kann. Aufgrund dessen wurde mit Hilfe der Western Blot Technik die Proteinexpression von grp-78, Chaperonin 60 und der mitochondrialen Kreatinkinase untersucht.

In Abwesenheit von TLR2 wurde eine Proteinexpression von grp-78 lediglich in den primären IEZ der 16 Wochen alten Mäuse detektiert (Abbildung 24B). In den TLR4-defizienten Mäusen war bereits zu dem frühen Zeitpunkt eine Expression von grp-78 zu erkennen,

welche sich zu den späteren Zeitpunkten verstärkte. Unter entzündlichen Bedingungen zeigten die IEZ der IL-10^{-/-} und IL-10XTLR2^{-/-} Mäuse eine grp-78 Expression lediglich im Alter von 8 und 16 Wochen. Hingegen war in den nicht entzündeten IL-10XTLR4^{-/-} Mäusen grp-78 bereits nach 1 Woche exprimiert, nach 8 Wochen nicht detektierbar und stark induziert zum letzten Zeitpunkt von 16 Wochen.

Das mitochondriale Stresschaperon Chaperonin 60 wurde bereits in den 1-Wochen-alten TLR2^{-/-} als auch in den TLR4^{-/-} Mäusen induziert. In den TLR2^{-/-} nahm das Expressionsniveau zum 8-Wochen-Zeitpunkt ab (Abbildung 24). Jedoch wurde Chaperonin 60 zum 16-Wochen-Zeitpunkt wieder verstärkt induziert. Im Gegensatz dazu verstärkte sich die Expression von Chaperonin 60 in den primären IEZ der TLR4^{-/-} Mäuse bereits nach 8 Wochen und blieb zum 16-Wochen-Zeitpunkt bestehen. Unter entzündlichen Bedingungen war eine Chaperonin 60 Expression in den IEZ der IL-10^{-/-} Mäuse zu allem Zeitpunkt detektierbar. Weniger stark wurde Chaperonin 60 unter IL-10 und TLR2 Defizienz jedoch zu allen drei Zeitpunkten induziert. In den isolierten IEZ der nicht entzündeten IL-10XTLR4^{-/-} Mäusen wurde eine Expression von Chaperonin 60 bereits nach 1 Woche induziert, welche sich zu den späteren Zeitpunkten verstärkte.

In den IEZ der TLR2^{-/-} Mäusen war die mitochondriale Kreatinkinase lediglich nach 16 Wochen detektierbar (Abbildung 24B). Im Gegensatz dazu wurde die Kreatinkinase unter TLR4 Defizienz bereits nach 1 Woche exprimiert, nahm zum 8-Wochen-Zeitpunkt ab und konnte nach 16 Wochen nicht mehr detektiert werden. Ein ähnliches Muster zeigte sich bei den IL-10^{-/-} Mäusen. Die Expression der Kreatinkinase wurde nach 1 Woche induziert und erhöhte sich nach 8 Wochen. Zum 16- Wochen-Zeitpunkt hin konnte die Kreatinkinase in den entzündeten IL-10^{-/-} Mäusen nicht mehr detektiert werden. Wohingegen die Kreatinkinase bei den IL-10XTLR2^{-/-} Mäusen im nicht entzündeten Zustand (1 Woche) nicht exprimiert wurde, jedoch zum 16-Wochen-Zeitpunkt, bei dem die IL-10XTLR2^{-/-} Mäuse eine Entzündung aufwiesen. Die nicht entzündeten IL-10XTLR4^{-/-} Mäusen zeigten eine Expression der Kreatinkinase nach 1 Woche auf. Diese nahm zum 8-Wochen-Zeitpunkt ab und verstärkte sich jedoch nach 16 Wochen.

Der Transkriptionsfaktor CHOP spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der ER-Stress induzierten Apoptose und in der mitochondrialen Stressantwort [153, 156, 181]. Interessanterweise wurde CHOP unter nicht entzündlichen Bedingungen lediglich in den TLR4^{-/-} Mäuse induziert, aber nicht in den Wildtyp- oder in den TLR2^{-/-} Mäusen (Abbildung 24C). Unter entzündlichen Bedingungen wurde CHOP nach 8 Wochen in den IL-10^{-/-}, IL-10XTLR2^{-/-} und IL-10XTLR4^{-/-} Mäusen stark exprimiert. Dieses Expressionslevel nahm zum 16-Wochen-Zeitpunkt hin ab.

Obwohl CHOP unter entzündlichen Bedingungen in allen Mutantenmäusen exprimiert war, konnte eine Aktivierung der Apoptose assoziierten Caspase 3 nur in den IL-10^{-/-} und IL-10XTLR2^{-/-} Mäusen detektiert werden (Abbildung 24C), im Gegensatz zu den nicht entzündeten IL-10XTLR4^{-/-} Mäusen, welche trotz Expression von grp-78 keine Anzeichen einer Apoptose zeigten.

3.5 ER- und mitochondriale Stressantwort in CED-Patienten

Um die bisherigen Ergebnisse zu validieren, wurden zusätzlich zu den Untersuchungen am Mausmodell IEZ aus dem Kolon von CED-Patienten auf die Aktivierung der ER- und mitochondrialen Stressantwort mittels Westen Blot Analyse untersucht. Die 2 nicht entzündeten Kontrollen stammen von Patienten mit Kolonkarzinom. Die IEZ der Kontrollpatienten wurden von einem Gewebestück isoliert, welches ca. 5 cm von dem Tumor entfernt war.

Das ER-Stresschaperon grp-78 als auch das mitochondriale Stresschaperon Chaperonin 60 wurden in IEZ der Colitis Ulzerosa Patienten exprimiert. Die verminderte Expression der Kreatinkinase unter Entzündung bzw. unter Aktivierung von ER-Stress konnte in dieser Patientengruppe ebenfalls nachgewiesen werden (Abbildung 25). Der Vergleich von nicht entzündeter und entzündeter Region aus dem gleichen Patienten (Colitis Ulzerosa Patient Nummer 6) zeigte eine Induktion von grp-78 und Chaperonin 60. Zusätzlich wurde eine deutlich geringere Expression der mitochondrialen Kreatinkinase in den isolierten IEZ der entzündeten Region des Colitis Ulzerosa Patienten detektiert (Abbildung 25). In den isolierten IEZ der Morbus Crohn Patienten zeigte sich das gleiche Expressionsmuster wie in den IEZ der Colitis Ulzerosa Patienten. Grp-78 und Chaperonin 60 waren induziert mit gleichzeitiger Herunterregulierung der Kreatinkinase. Patient Nummer 7 zeigte keine eindeutige Induktion der beiden Chaperone, obwohl dieser Patient einen ähnlichen Entzündungsgrad (floride Entzündung) wie Patient Nummer 8 hatte.

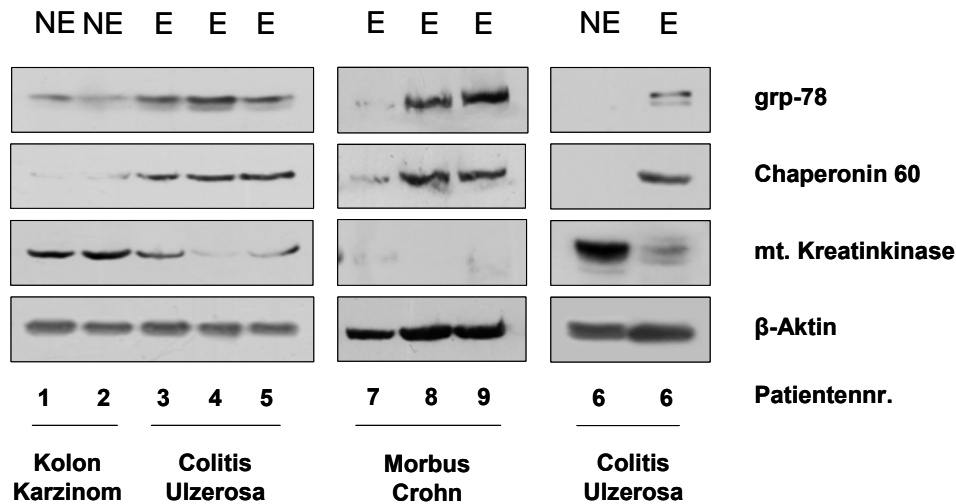


Abbildung 25: Expression von Stress assoziierten Proteine.

Die Western Blot Analyse erfolgte mit 50 µg der isolierten IEZ von entzündeten Geweberegionen von Patienten mit Morbus Crohn bzw. Colitis ulcerosa. Als Kontrolle wurden isolierte IEZ von Patienten mit Kolonkarzinom verwendet. Des Weiteren wurden die isolierten IEZ aus einem Colitis Ulzerosa Patienten mit nicht entzündeten und entzündeten Geweberegionen verwendet. Mittels spezifischen Antikörpern gegen grp-78, Chaperonin 60 und mitochondrialer Kreatinkinase wurden die unterschiedlichen Expressionsprofile ermittelt; β-Aktin diente hierbei als Ladekontrolle. NE = nicht entzündet; E = entzündet

3.6 Funktionelle Charakterisierung Stress assoziierter Proteine

Zur Untersuchung der Funktion der Stresschaperone grp-78 und Chaperonin 60 wurden *in vitro* Studien durchgeführt. Hierfür wurde die murine Zelllinie Mode-K/IL-10R verwendet. Die Proteinlysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Proteinnachweis auf der Membran erfolgte durch Immunodetektion des jeweiligen Proteins.

3.6.1 Induktion zellulären Stresses mittels Tunicamycin und OTCΔ

Für die Induktion von ER- bzw. mitochondrialem Stress wurden 2 verschiedene Stressoren verwendet. Tunicamycin ist ein chemisches Reagenz, welches die Glykosylierung der Proteine im ER verhindert und somit eine ER-Stressantwort hervorruft. Um die optimale Stimulationszeit zu ermitteln, wurden 6 verschiedene Zeitpunkte (1, 3, 6, 9, 12 und 24 h) gewählt. Mit Hilfe dieser Zeitkinetik konnte deutlich gezeigt werden, dass nach 6 Stunden Stimulation mit Tunicamycin die ER-Stressantwort in Form der Expression von grp-78 induziert wurde (Abbildung 26A).

Die Induktion des mitochondrialen Stresses erfolgte mit dem genetisch veränderten Protein OTC (OTCΔ). OTCΔ ist ein mitochondriales Protein, welches durch eine Deletion in der Substratbindestelle nicht mehr korrekt gefaltet werden kann und somit mitochondrialen Stress auslöst. Da dieses Plasmid transfiziert werden muss, wurden längere

Stimulationszeitpunkte (14, 24, 32, 47 und 65 h) gewählt. Die optimale Transfektionszeit wurde über das Expressionslevel von Chaperonin 60 ausgetestet und ergab 32 h als Optimalzeitpunkt (Abbildung 26B). In den folgenden Experimenten wurden die ermittelten Zeitpunkte 6 h bzw. 32 h als Standardzeitpunkte verwendet.

Des Weiteren wurde überprüft, ob OTC Δ nach der Transfektion in der Zelle vorhanden ist. Hierfür wurden Mitochondrien nach der Stimulation mit IL-10 (24 h Präinkubation) und der Transfektion mit OTC Δ isoliert und eine Western Blot Analyse durchgeführt. Die obere Bande in Abbildung 26C zeigt OTC ohne Deletion in der Substratbindestelle. Das veränderte OTC (OTC Δ) ist ca. 100 Basenpaare kleiner und liegt nach der 32-stündigen Transfektion in den Mitochondrien der Mode-K/IL-10R vor. Da OTC ein mitochondriales Protein ist und bereits im Mitochondrium vorliegt, ist es auch in den mitochondrialen Lysaten detektierbar, welche nicht mit OTC Δ transfiziert worden sind.

Um auszuschließen, dass die Mitochondrien unter dem induzierten Stress nicht funktionsuntüchtig und womöglich abgebaut werden, wurde das Verhältnis zwischen mitochondrialer und nukleärer DNA gemessen.

Die Zelllinie Mode-K/IL-10R wurde in einer 6-well Platte ausgesät, für 6 h mit Tunicamycin stimuliert bzw. mit OTC Δ (32 h) transfiziert. Nach DNA Isolierung und anschließender PCR, wurde das Verhältnis zwischen mitochondrialer und nukleärer DNA ermittelt. Weder unter mit Tunicamycin induziertem ER-Stress noch unter mit OTC Δ induziertem mitochondrialem Stress konnte eine klare Änderung der mitochondrialen DNA im Vergleich zur nukleären DNA detektiert werden (Abbildung 26D).

Dieses Experiment hat gezeigt, dass kein Abbau der Mitochondrien unter Stress vorliegt. Dennoch ist es möglich, dass zellulärer Stress in die Energieversorgung der Zelle eingreift, da zellulärer Stress ein Energieverbrauchender Prozess ist.

Die Messung des Sauerstoffverbrauchs der Mode-K/IL-10R Zellen nach der Initiierung von ER- bzw. mitochondrialem Stress wurde mittels der Clark-Elektrode ermittelt. Mit Hilfe eines pharmalogischen Entkopplers (FCCP), welcher eine maximale Atmung im Mitochondrium ohne Synthese von ATP erzwingt, wurde der maximale Sauerstoffverbrauch initiiert. Der maximale Sauerstoffverbrauch der jeweiligen Kontrollzellen wurde auf 100% gesetzt (Abbildung 26E). Im Vergleich dazu sind die Mitochondrien unter ER-Stress nicht mehr zu dem gleichen maximalen Sauerstoffverbrauch in der Lage. Der Sauerstoffverbrauch lag im Vergleich zur Kontrolle lediglich bei ca. 77%. Ein ähnliches Muster zeigte sich nach Induktion von mitochondrialem Stress. Die isolierten Mitochondrien erreichten lediglich einen maximalen Sauerstoffverbrauch von ca. 55%.

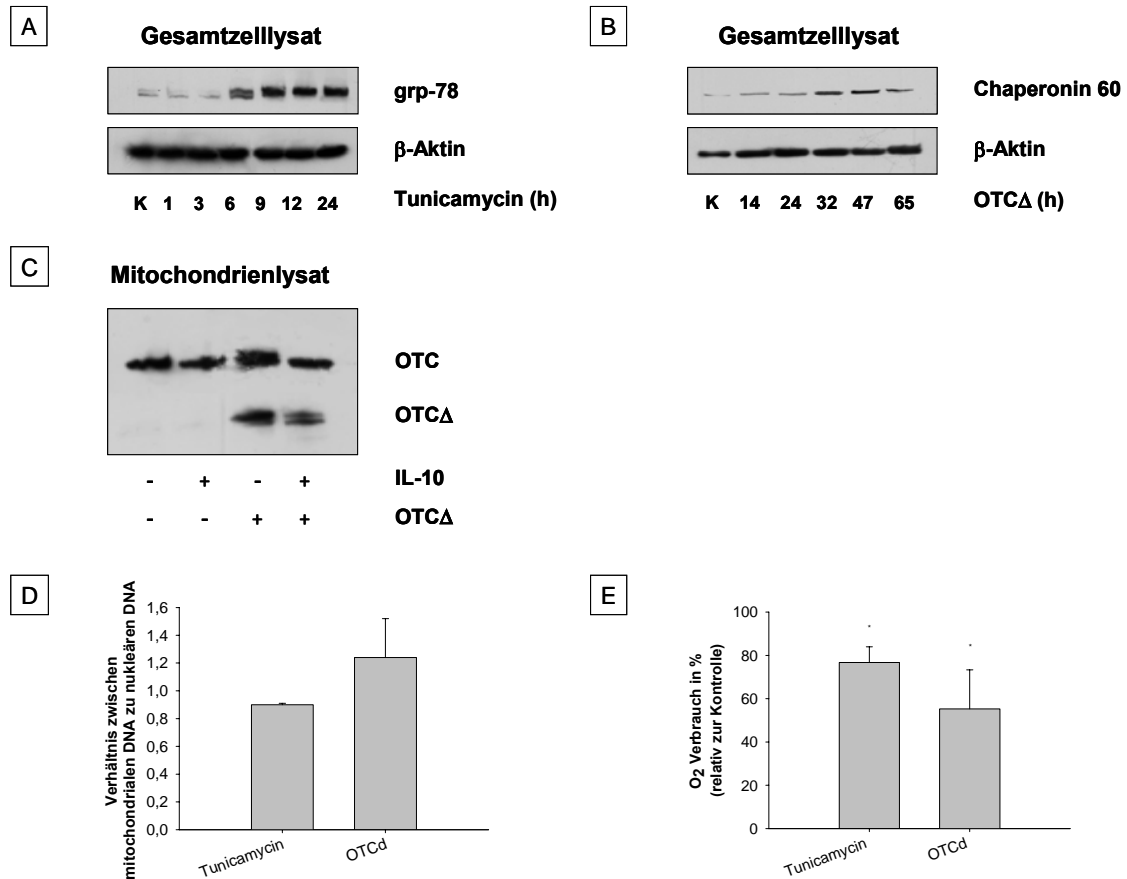


Abbildung 26: ER- und mitochondrialer Stress in der murinen Zelllinie Mode-K/IL-10R.

(A) veranschaulicht die Expression von OTCΔ nach dessen Transfektion in Mode-K/IL-10R. (B) und (C) zeigen die zeitabhängige Expression von grp-78 und Chaperonin 60. Die Western Blot Analyse erfolgte mit 50 µg des Proteinlysats; spezifische Antikörper gegen grp-78, Chaperonin 60 und OTC wurden verwendet; β-Aktin diente hierbei als Ladekontrolle. In (D) wird das Verhältnis zwischen mitochondrialer und nukleärer DNA in der Zelle dargestellt. Die Mode-K/IL-10R wurden mit Tunicamycin (6 h) stimuliert bzw. mit OTCΔ (32 h) transfiziert. Mittels Real-Time PCR und unter Verwendung spezifischer Primer für murines ND6 (mitochondrial) sowie für murines VLDLR (nukleär) amplifiziert (MW ± SD). (E) zeigt die Messung des Sauerstoffverbrauchs der Mode-K/IL-10R. Die Mode-K/IL-10R wurden mit Tunicamycin (6 h) stimuliert bzw. mit OTCΔ (32 h) transfiziert. Es folgten Mitochondrienisolierung, Proteinbestimmung mittels Biuret-Reagenz und Messung des Sauerstoffverbrauchs mittels Clark-Elektrode erfolgten nach Initiierung der maximalen Atmung mittels FCCP.

3.6.2 ER- bzw. mitochondrialer Stress in Mode-K/IL-10R Zellen

Die Zelllinie Mode-K/IL-10R wurde mit IL-10 für 24h präinkubiert, gefolgt von der 6-stündigen Stimulation mit ER-Stressor Tunicamycin bzw. von der Transfektion mit OTCΔ für 32 h.

ER-Stressor Tunicamycin induzierte deutlich die Expression von grp-78 nach 6 h im Gesamtzelllysat (Abbildung 27). IL-10 wirkte inhibierend auf die grp-78 Expression. In den isolierten Mitochondrien nach Stimulation mit Tunicamycin konnte ebenfalls die Expression von Chaperonin 60 unter ER-Stress detektiert werden. Im Gegensatz zur Expression von grp-78 zeigte IL-10 keinen inhibierenden Effekt auf die Expression von Chaperonin 60. Des

Weiteren wurde in den isolierten Mitochondrien der Abbau der Kreatinkinase detektiert. Hierbei zeigte sich, dass durch Präinkubation mit IL-10 dieser Abbau verhindert wurde.

Nach der Induktion von mitochondrialem Stress konnte in den mitochondrialen Lysaten eine deutliche Induktion von Chaperonin 60 detektiert werden (Abbildung 27). Entgegen der Erwartung wurde unter Bedingungen des mitochondrialen Stresses ebenfalls grp-78 exprimiert. Der inhibierende Effekt des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 ist bei beiden Chaperonen zu erkennen. IL-10 griff sowohl bei der Expression von Chaperonin 60 als auch bei der Expression von grp-78 nach induziertem mitochondrialem Stress inhibierend ein. In *in vivo* Studien wurde Chaperonin 60 als hochreguliert und Kreatinkinase als herunterreguliert detektiert. Nach Induktion des mitochondrialen Stresses *in vitro* lässt sich sagen, dass der Abbau der Kreatinkinase nicht im Zusammenhang mit dem mitochondrialen Stress steht. Die Transfektion mit OTC Δ zeigte keinen Effekt auf die Regulierung der Kreatinkinase (Abbildung 27).

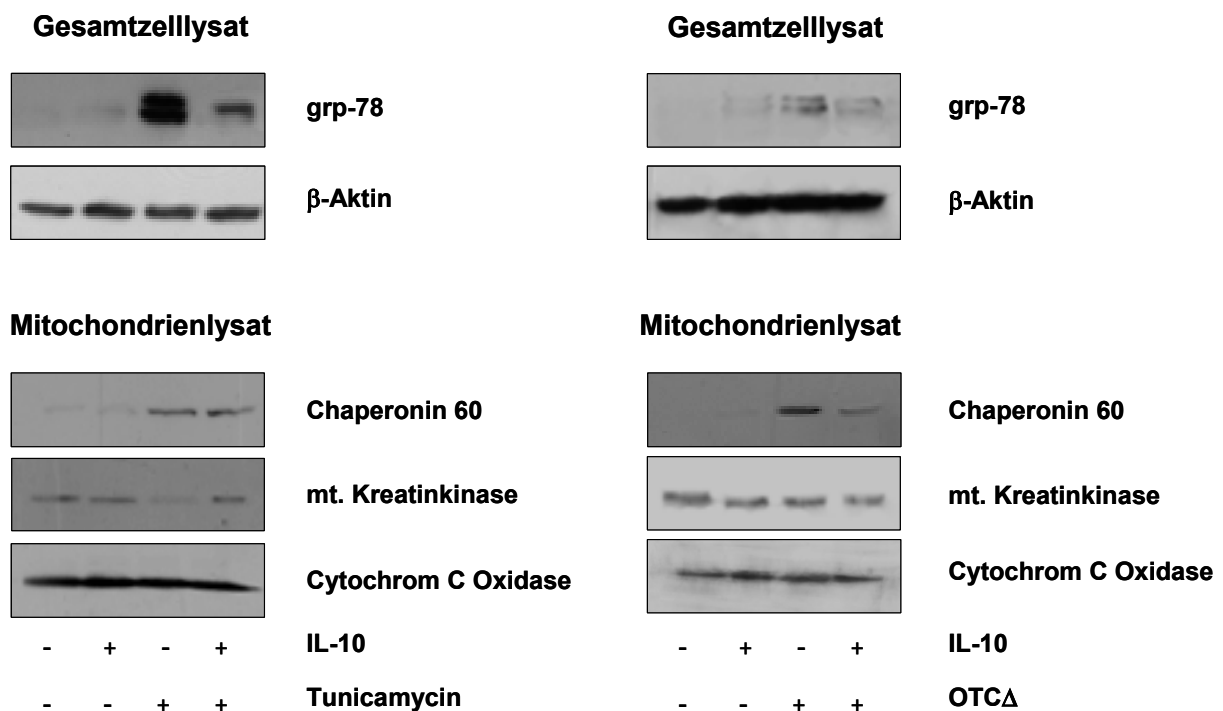


Abbildung 27: ER- bzw. mitochondrialer Stress in der murinen Zelllinie Mode-K/IL-10R.

Die Mitochondrien wurden nach Stimulation mit IL-10 (24 h) und Tunicamycin (6 h) bzw. Transfektion mit OTC Δ (32 h) isoliert. Die Western Blot Analyse erfolgte mit 50 μ g des jeweiligen Lysats. Es wurden spezifische Antikörper gegen grp-78, Chaperonin 60, mitochondriale Kreatinkinase verwendet. β -Aktin und Cytochrome C Oxidase dienen hierbei als Ladekontrolle.

3.6.3 Abbau der Kreatinkinase unter ER-Stress

In den vorangegangenen Experimenten zeigte sich, dass die mitochondriale Kreatinkinase lediglich unter ER-Stressbedingungen abgebaut wird, aber nicht unter mitochondrialen Stressbedingungen. Der Abbau der Kreatinkinase sollte mittels Immunopräzipitation nachgewiesen werden. Die Zelllinie Mode-K/IL-10R wurde mit Tunicamycin für lediglich 2 h

stimuliert, damit während des Abbaus die beteiligten Proteine detektiert werden können. Es folgte die Immunopräzipitation der Kreatinkinase, SDS-PAGE und Immunodetektion des jeweiligen Proteins.

Wie bereits die vorangegangenen Ergebnisse zeigten, wurde die Expression von grp-75 unter Bedingungen des ER-Stresses induziert. Neben der Hilfestellung bei Proteinfaltungen ist grp-75 ebenso beim Proteinabbau im Mitochondrium beteiligt. In Abbildung 28 ist die Rekrutierung von grp-75 an die Kreatinkinase zu deutlich erkennen. Zur weiteren Charakterisierung des Abbaus wurde die Expression von Tid-1 und ClpP untersucht. Tid-1 ist ebenfalls ein Helferchaperon des Proteinabbaus im Mitochondrium, ebenso wie die Protease ClpP, welche u. a. falsch gefaltete Proteine abbaut. Sowohl Tid-1 als auch ClpP wurden unter Bedingungen des ER-Stresses zur Kreatinkinase rekrutiert. Somit scheinen auch diese am Abbau der Kreatinkinase beteiligt zu sein.

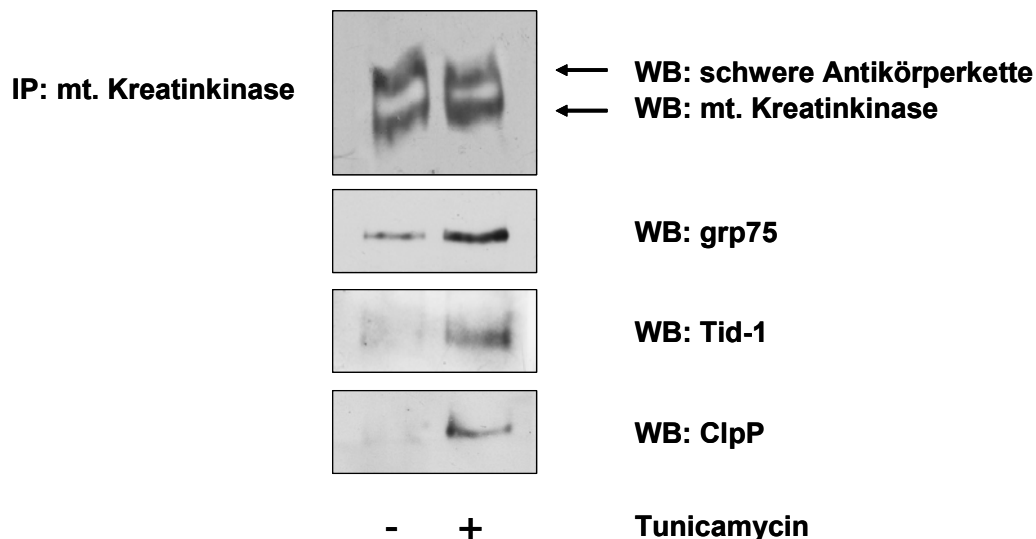


Abbildung 28: Abbau der mitochondrialen Kreatinkinase unter ER-Stress.

Die Mitochondrien wurden nach Stimulation mit Tunicamycin (2 h) isoliert und eine Immunopräzipitation für die mt. Kreatinkinase durchgeführt. Die Western Blot Analyse erfolgte mit 50 µg des Mitochondrienlysats und mittels spezifischer Antikörper wurden die an die mt. Kreatinkinase gebundenen Proteine (grp-75, Tid-1 und ClpP) nachgewiesen. IP = Immunopräzipitation; WB = Western Blot

3.6.4 Molekulare Verbindung von ER- und mitochondrialem Stress

Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass ein gezielt gesetzter Stress ausgehend vom ER bzw. Mitochondrium die jeweilige Stressantwort der anderen Zellorganellen beeinflussen kann. Dies weist auf eine Verbindung zwischen diesen beiden Stressarten hin. In der ER- und mitochondrialen Stressantwort agiert CHOP sowohl als Transkriptionsfaktor als auch als Effektorprotein. Ob CHOP somit eine Verbindung zwischen ER und Mitochondrium darstellt, sollte mittels Chromatin-Immunopräzipitationen untersucht werden.

Mode-K/IL-10R Zellen wurden mit IL-10 (24 h) präinkubiert, anschließend mit Tunicamycin (6 h) stimuliert bzw. mit OTC Δ (32 h) transfiziert. In den Chromatin-Immunopräzipitationen sollte die Bindung der Transkriptionsfaktoren ATF6 α , ATF4, cJun und CHOP an die Promotoren von grp-78, Chaperonin 60 und CHOP untersucht werden.

ATF6 α ist ein membranständiger Rezeptor des ER, welcher durch eine intermembrane Proteolyse aktiviert, in den Golgi Apparat transportiert und dort in seine aktive Form gespalten wird. Den Erwartungen entsprechend, erfolgte eine Bindung des ER-assoziierten Transkriptionsfaktors ATF6 α an den Promotor von grp-78 unter Tunicamycin induzierten ER-Stress. IL-10 zeigte einen inhibierenden Effekt auf die Bindung von ATF6 α an den grp-78 Promotor unter ER-Stress (Abbildung 29). Unter der Bedingung des mitochondrialen Stresses konnte keine Bindung von ATF6 α an den grp-78 Promotor detektiert werden. Des Weiteren konnte weder unter Tunicamycin induziertem ER-Stress noch unter OTC Δ induziertem mitochondrialen Stress eine Rekrutierung von ATF6 α an den Chaperonin 60 Promotor bzw. an den CHOP Promotor detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Der ER assoziierte Transkriptionsfaktor ATF4 wird über den Rezeptor PERK aktiviert. PERK ist ebenfalls membranständig und aktiviert über die Phosphorylierung von eIF2 α ATF4. Sowohl unter ER-Stress als auch unter mitochondrialem Stress erfolgte lediglich eine Rekrutierung von ATF4 an den CHOP Promotor. Im Gegensatz zu den Beobachtungen unter ER-Stress konnte die Bindung von ATF4 an den CHOP Promotor unter mitochondrialem Stress mittels IL-10 nicht inhibiert werden (Abbildung 29).

Der dritte ER-Stress assoziierte Signalweg verläuft über den membranständigen Rezeptor IRE1. Die Phosphorylierung von IRE1 ermöglicht die Aktivierung von cJun, welcher ein Teil des Transkriptionsfaktors AP-1 ist. Dieser kann ebenfalls über Signalwege des Mitochondriums aktiviert werden. Unter beiden Stresstypen wurde cJun zum grp-78 Promotor rekrutiert. Die Bindung an den grp-78 Promotor konnte durch eine Präinkubation mit IL-10 verhindert werden (Daten nicht gezeigt). Ähnlich wie in den vorangegangenen ChIP Analysen konnte nach der Präzipitierung von cJun keine Rekrutierung weder unter ER- noch unter mitochondrialem Stress an den Chaperonin 60 Promotor detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Sowohl unter ER- als auch unter mitochondrialem Stress wurde eine Rekrutierung von cJun an den CHOP Promotor detektiert. Allerdings ist unter mitochondrialem Stress die inhibierende Effekt von IL-10 auf die Bindung an die Promotorsequenz deutlicher zu erkennen als unter ER-Stress (Abbildung 29).

Wie bereits erwähnt, spielt CHOP nicht nur im ER-Stress als Transkriptionsfaktor eine Rolle, sondern auch in der mitochondrialen UPR. CHOP ist an der Aktivierung der mitochondrialen Stress assoziierten Gene bzw. Proteine beteiligt. In Abbildung 29 ist die Rekrutierung von CHOP an den Chaperonin 60 Promotor, unabhängig welche Stressart, deutlich zu erkennen.

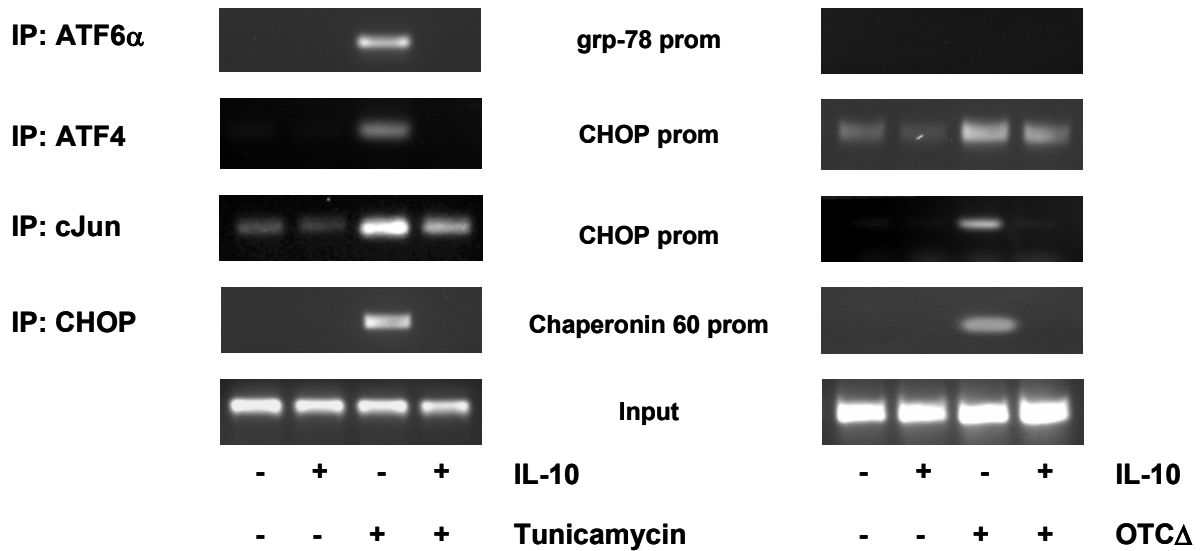


Abbildung 29: ChIP Analyse der Mode-K/IL-10R unter ER- und mitochondrialem Stress.

Mode-K/IL-10R wurden mit IL-10 (24 h) präinkubiert und mit Tunicamycin (6 h) stimuliert bzw. mit OTC Δ (32 h) transfiziert. Chromatin-Immunopräzipitation erfolgte wie in Material & Methoden beschrieben. Die PCR-Produkte wurden auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

3.6.5 Knock-down von Chaperonin 60

In den Proteomanalysen der *in vivo* Tierstudien kristallisierte sich Chaperonin 60 in der Entwicklung der CED heraus. Vor allem nach der bibliometrischen Gesamtanalyse rückte Chaperonin 60 in den Mittelpunkt. Weiterhin ergaben die *in vitro* Studien, dass Chaperonin 60 ebenfalls mit ER-Stress in Zusammenhang steht. Hieraus ergibt sich die Frage, welche Auswirkung eine Abwesenheit von Chaperonin 60 für die Ausprägung des ER-Stresses hat.

Bevor Mode-K/IL-10R Zellen mit IL-10 präinkubiert (24 h) und mit Tunicamycin stimuliert (6 h) wurden, wurde die Translation des Proteins Chaperonin 60 mittels siRNA inhibiert. Der Knock-down von Chaperonin 60 erfolgte für 24 h.

Die Inhibierung der Translation für Chaperonin 60 konnte in Abbildung 30 gezeigt werden. Aber eine deutliche Regulation von Chaperonin 60 unter ER-Stress konnte in diesen Gesamtzellsaten nicht detektiert werden. Grp-78 hingegen wurde nach der Stimulation mit Tunicamycin deutlich induziert. Die Expression von grp-78 verstärkte sich noch in Abwesenheit von Chaperonin 60. Das gleiche Muster konnte bei der Phosphorylierung von eIF2 α als auch bei CHOP beobachtet werden.

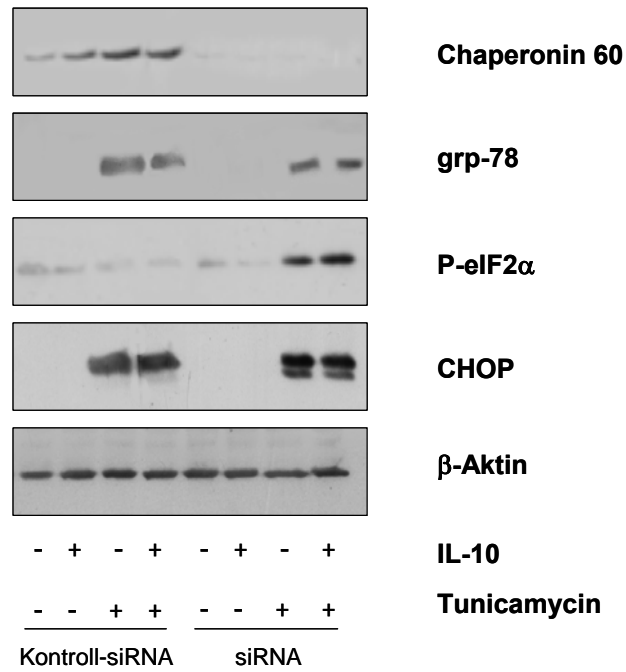


Abbildung 30: ER-Stressantwort in Abwesenheit von Chaperonin 60.

Mode-K/IL-10R wurden für 24 h mit siRNA für Chaperonin 60 transfiziert, mit IL-10 (24 h) präinkubiert und mit Tunicamycin (6 h) stimuliert. Die Western Blot Analyse erfolgte mit 50 μ g des Proteinlysats; spezifische Antikörper gegen Chaperonin 60, grp-78, P-eIF2 α und CHOP wurden verwendet. β -Aktin diente hierbei als Ladekontrolle.

4 DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der ER- und mitochondrialer Stressantwort unter chronischer intestinaler Entzündung in verschiedenen Mausmodellen. Die Rolle der *pattern recognition receptors* TLR2 und TLR4 in der Kommunikation mit dem Epithel sollte unter nicht entzündlichen und entzündlichen Bedingungen untersucht werden. Weiterführend wurden keimfreie IL-10-defiziente Mäuse mit den kommensalen Bakterien *E.faecalis* und *E.coli* mono- bzw. dualassoziiert, um die unterschiedlichen Effekte von Gram-positiven bzw. Gram-negativen Bakterien in der Interaktion mit dem Darmepithel unter entzündlichen Bedingungen darzustellen.

Die intestinale Zelllinie Mode-K/IL-10R wurde für die Charakterisierung der ER- und mitochondrialen Stressantwort herangezogen. Dabei stand die Verbindung bzw. Kommunikation zwischen ER-Stress und mitochondrialem Stress im Vordergrund. Das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 wurde ebenfalls in die Stressuntersuchungen integriert. Da seine hemmende Wirkung auf die ER-Stressantwort bereits bekannt ist, spielte IL-10 in den Analysen lediglich eine untergeordnete Rolle.

4.1 ER- und mitochondrialer Stress unter chronischer Entzündung in verschiedenen Mausmodellen

Die Ursachen für die Pathogenese der CED schließen genetische Prädispositionen des Menschen, Umweltfaktoren und Zusammensetzung der Mikrobiota ein [32, 33]. An CED-Tiermodellen wie die IL-10- bzw. IL-2-defiziente Maus oder der HLA-B27 transgener Ratte wurde bereits die spezifische Bedeutung intestinaler Bakterien in der Entwicklung chronischer Entzündungsprozesse demonstriert [74, 88].

Die Familie der TLR spielt bei der angeborenen Immunantwort, speziell bei der Erkennung von Mikroorganismen, eine essentielle Rolle. Sie detektieren mikrobielle Strukturen wie LPS (TLR4), Lipoteichonsäure oder Lipoproteine (TLR2). IEZ exprimieren TLR, da sie im ständigen Kontakt mit der intestinalen Mikrobiota stehen und tragen somit zur Aufrechterhaltung der Homöostase im Darm bei. Eine Störung dieses Gleichgewichts kann in der Epithelzelle zu Stressreaktionen führen. Hierzu zählt die durch ER-Stress induzierte UPR. Diese Stressantwort wird durch verschiedene Faktoren wie die Ansammlung von ungefalteten Proteinen oder Energiemangel ausgelöst [153]. ER-Stress wird unter anderem mit der Pathogenese von CED in Verbindung gebracht [149]. Ebenfalls steht die über intestinale Mikroorganismen aktivierte TLR Signalkaskade mit der Entstehung von CED im Zusammenhang [188]. Des Weiteren wurde in einer kürzlich veröffentlichten Studie gezeigt,

dass eine Aktivierung des TLR Signalweges den ER-assoziierten Rezeptor IRE1 α und dessen Transkriptionsfaktor XBP-1 aktiviert [177]. Dies macht deutlich, dass eine aktivierte TLR Signalkaskade Einfluss auf die Aktivierung des ER-Stresses nimmt und somit zur Entstehung chronischer Entzündung im Darm beitragen kann.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die Rolle einer TLR2 bzw. TLR4 Defizienz sowohl unter nicht entzündlichen als auch unter entzündlichen Bedingungen untersucht werden. Hierfür wurden TLR2- bzw. TLR4-defiziente Mäuse auf Mäuse mit IL-10-defizienten Hintergrund zurückgekreuzt. Die histologische Untersuchung zeigte, dass unter TLR2 bzw. TLR4 Defizienz keine Entzündung im Kolon initiiert wurde. Im Gegensatz dazu entwickelten die IL-10^{-/-} und IL-10XTLR2^{-/-} Mäuse mit steigendem Alter eine moderate Entzündung. Jedoch wurde bei den IL-10XTLR4^{-/-} Mäusen keine Zeichen entzündlicher Gewebeeränderungen festgestellt (Abbildung 7, Seite 56). Diese Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass die Signalwege der *pattern recognition receptors* in der Pathogenese von CED eine wichtige Rolle spielen, aber zugleich sich auf unterschiedlicher Weise auswirken können.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden keimfreie IL-10-defiziente Mäuse mit 2 kommensalen Bakterien (*E.faecalis* und *E.coli*) mono- bzw. dualassoziert. Monoassoziiierungen mit diesen Bakterien zeigten, dass *E.coli* bereits nach 3 Wochen eine aggressive Entzündung vor allem im Zäkum der IL-10^{-/-} Maus initiiert, wohingegen *E.faecalis* erst nach ca. 10-12 Wochen eine distale Kolitis hervorruft [84]. Des Weiteren führte eine Dualassoziierung mit diesen nicht-pathogenen Bakterien nach 7 Wochen zu einer aggressiven Pankolitis, welche mit einer Entzündung im Duodenum verbunden ist [189]. Die histologische Untersuchung der IL-10^{-/-} Mäuse ergab nach eine 6-wöchiger Mono- bzw. Dualassoziierung mit *E.faecalis* und/oder *E.coli* eine moderate bis schwere Kolitis (Abbildung 17, Seite 73). Die unterschiedliche Aggressivität der beiden Bakterien auf das Darmepithel wird bereits durch die histologische Analyse in Bezug auf die Pathogenese der CED verdeutlicht.

Es wurden Proteomanalysen (2D-SDS-PAGE und MALDI-TOF MS) und Western Blot Analysen durchgeführt. Die Proteomanalyse unter nicht entzündlichen Bedingungen umfasst den Vergleich der Wildtypmäuse zu den TLR2^{-/-} bzw. TLR4^{-/-} Mäusen. In diesen Vergleichen wurden 41 signifikant regulierte Proteine detektiert. Die Proteomanalyse unter entzündlichen Bedingungen beinhaltet den Vergleich der IL-10^{-/-} Mäusen zu den IL-10XTLR2^{-/-} bzw. IL-10XTLR4^{-/-} Mäusen. Hier wurden 33 unterschiedlich regulierte Proteine gefunden. Das Proteinexpressionsprofil unter nicht entzündlichen Bedingungen offenbarte unterschiedlich regulierte Proteine, die aber in ihrer Funktion Ähnlichkeiten aufweisen. Ebenso weisen alle Zeitpunkte eine Übereinstimmung von 8 der 41 gefundenen Proteine auf. Der Großteil der regulierten Proteine (29%) ist in den verschiedenen Bereichen des Energiemetabolismus wie

Glykolyse, Fettsäureoxidation und Kohlenhydratmetabolismus involviert. Des Weiteren sind 4 der 41 identifizierten Proteine an der Regulation der zellulären Stressantwort beteiligt. Interessanterweise konnten Proteine aus dem Energiemetabolismus vor allem in dem Vergleich Wildtypmaus zu TLR2^{-/-} Maus gefunden werden. Es scheint als würde das Fehlen des TLR4 zu einer besseren Adaptation hinsichtlich Energieverbrauchenden Prozessen im Epithel führen. Obwohl die TLR2^{-/-} bzw. TLR4^{-/-} Mäuse keine Anzeichen einer Entzündung im Kolon aufwiesen, zeigte sich auf zellulärer Ebene dennoch ein deutlicher Unterschied bei einem Verlust dieser Rezeptoren. Weiterführend wurden die verschiedenen Konsequenzen der TLR2 bzw. TLR4 Defizienz im Epithel unter entzündlichen Bedingungen untersucht. Ein wichtiger Unterschied wurde bereits bei der histologischen Analyse beobachtet. Die IL-10XTLR2^{-/-} Mäuse zeigten eine klare Entzündung im Kolon, im Gegensatz zu den IL-10XTLR4^{-/-} Mäusen. Dennoch offenbarte die Proteomanalyse keine neuen Erkenntnisse über die jeweiligen Proteinexpressionsprofile. Die Mehrzahl der regulierten Proteine sind ebenfalls in den Energiemetabolismus und die Regulation der zellulären Stressantwort involviert.

Eine weitere Proteomanalyse wurde von isolierten IEZ der Wildtyp- und IL-10-defizienten Mäusen, mono- bzw. dualassoziiert mit *E.faecalis* und/oder *E.coli*, durchgeführt. In dieser Analyse wurden insgesamt 30 signifikant regulierte Proteine identifiziert. Die Vergleiche der Mono- bzw. Dualassoziiierungen wiesen eine Übereinstimmung in lediglich einem Protein (carbonic anhydrase) auf. Hingegen wurden 3 der 30 Proteine nach Monoassoziiierung mit *E.faecalis* und nach Monoassoziiierung mit *E.coli* detektiert. Interessanterweise sind 7 der insgesamt 9 hochregulierten Proteine in die Regulation zellulärem Stress und Zellhomöostase involviert.

Nach der Betrachtung der vorangegangenen Proteomanalysen kristallisierte sich neben grp-78 besonders das mitochondriale Chaperonin 60 heraus. Es übt Funktionen im Import von Proteinen aus, wobei es Proteine mittels seinem hydrophoben Teil vor einer Konformationsänderung durch den transmembranen Transport verhindert [190]. Des Weiteren ist es eine wichtige Komponente im Proteinfaltungssystem des Mitochondriums [191]. Da die mitochondriale UPR durch ungefaltete bzw. falsch gefaltete Proteine initiiert wird, ist aufgrund dessen Chaperonin 60 eines der Hauptchaperone in der mitochondrialen Stressantwort. In der bibliometrischen Analyse der beiden Proteomanalysen wird die zentrale Rolle von Chaperonin 60 noch deutlicher (Abbildung 23, Seite 81). Es nimmt die zentrale Position im Gesamtnetzwerk ein. Dennoch ist die direkte Verbindung mit ER-Chaperon grp-78 deutlich zu erkennen. Dies lässt vermuten, dass ER und mitochondrialer Stress in Verbindung stehen.

Sowohl im Protein-Protein Netzwerk der mit *E.faecalis* und *E.coli* assoziierten IL-10-defizienten Mäuse (Abbildung 22, Seite 79) als auch die Mäuse mit TLR-Defizienz

(Abbildung 15, Seite 71) ist die Mehrheit der regulierten Proteine mit dem Mitochondrium assoziiert. Interessanterweise steht das mitochondriale Protein Chaperonin 60 bei beiden Netzwerken im Zentrum. Ein Zusammenhang zwischen CED und mitochondrialem Stress bzw. Chaperonin 60 ist nicht bekannt. Dennoch wurde in dieser Arbeit eine deutliche Induktion von Chaperonin 60 in Colitis Ulzerosa Patienten als auch in Morbus Crohn Patienten detektiert. Demnach scheint der mitochondriale Stress eine Rolle, ob als Auslöser oder Konsequenz, in der Entwicklung der CED einzunehmen. Möglicherweise ist dysregulierter mitochondrialer Stress, ähnlich wie lang anhaltender ER-Stress, ein Apoptose induzierender Prozess in der Zelle. Im Gegensatz dazu wird in vielen Studien beschrieben, dass Chaperonin 60 unter Stress- oder toxischen Bedingungen essentiell für das Überleben der Zelle ist [192]. In Herzmuskelzellen, die einer Ischämie bzw. Sauerstoffentzug ausgesetzt sind, schützt eine erhöhte Expression von Chaperonin 60 und dessen Helferchaperon Chaperonin 10 vor Apoptose [193]. Des Weiteren ist eine erhöhte Expression von Chaperonin 60 mit Tumorerkrankungen assoziiert. Zum Beispiel wurde in Prostatakrebszellen ein höheres Chaperonin 60 Level detektiert als in normalen Prostatazellen. Diese signifikante Erhöhung konnte in *in vitro* als auch *in vivo* Studien beobachtet werden [194, 195]. Bei Dickdarmkrebs tritt eine verstärkte Expression von Chaperonin 60 ebenfalls auf, welche mit dem Tumorstadium und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen korreliert [196, 197]. Es ist bereits bekannt, dass Dickdarmkrebs im Krankheitsverlauf von Colitis Ulzerosa involviert sein kann [198, 199]. Möglicherweise ist dies in den hier verwendeten Proben der Colitis Ulzerosa Patienten der Fall und die Induktion von Chaperonin 60 ist nicht direkt in die Entwicklung einer CED involviert, sondern ist eine Folge der Entzündung.

Trotz dessen, eine Verbindung zwischen mitochondrialem und ER-Stress unter CED konnte bisher nicht hergestellt werden. Bei anderen Krankheiten, wie Parkinson, ist bereits bekannt, dass die Interaktion zwischen ER und Mitochondrium in Nervenzellen zur Apoptose führen kann [200]. Dennoch scheint zwischen den beiden Stressarten und einer Darmentzündung ein Zusammenhang zu bestehen; sowohl mitochondrialer als auch ER-Stress konnte in CED-Patienten als auch in entzündeten IL-10^{-/-} Mäusen detektiert werden.

In einer vorangegangenen Studie, in der ebenfalls keimfreie IL-10^{-/-} Mäuse verwendet wurden, konnte nach 14 Wochen Monoassoziiierung mit *E.faecalis* eine Aktivierung des ER-Stresses anhand der Expression von grp-78 in IEZ beobachtet werden [149]. In der vorliegenden Arbeit konnte grp-78 in der Proteomanalyse der mit *E.faecalis* und *E.coli* assoziierten IL-10-defizienten Mäuse nicht detektiert werden. Jedoch wurde die grp-78 Expression mittels Western Blot Analyse in den entzündeten IL-10^{-/-} Mäusen nachgewiesen. Dabei zeigte sich, dass die Intensität des ER-Stresses scheinbar mit der Stärke des

Entzündungsgrads in Verbindung steht. Die Expression von grp-78 ist nach Monoassoziiierung mit *E.faecalis* deutlich geringer als nach Monoassoziiierung mit *E.coli* (Abbildung 24, Seite 83). Analog zu *Shkoda et al.* wurde in dieser Arbeit ebenfalls die Aktivierung von ER-Stress in isolierten IEZ von CED-Patienten untersucht. Eine Induktion konnte in den Morbus Crohn bzw. Colitis Ulzerosa Patienten als auch in dem Colitis Ulzerosa Einzelpatienten mit nicht entzündeter und entzündeter Region detektiert werden. Weitere Studien manifestieren die Verbindung zwischen ER-Stress und CED. Eine XBP-1 Defizienz führt zum Verlust von Paneth-Zellen und zur Reduktion von Goblet-Zellen und die damit verbundene erhöhte Expression des pro-apoptotischen ER-Stress Transkriptionsfaktors CHOP lässt das Risiko für eine Entzündung im Darm ansteigen [171]. IRE1 aktiviert XBP-1 durch Spaltung in seine aktive Form, damit dieser die Transkription für protektive Gene induzieren kann. Neben der XBP-1 Defizienz konnten Polymorphismen im *xbp-1* Gen in für CED prädispositionierten Menschen identifiziert werden [171]. Diese Beobachtungen implizieren, dass Veränderungen im *xbp-1* Gen ein genetisches Risiko für CED-Patienten darstellen. Ebenfalls wurde bereits gezeigt, dass eine Störung der Muzinproduktion durch den Verlust von Goblet-Zellen mit einer erhöhten Expression von grp-78 und intestinaler Entzündung zusammenhängt [172]. Die Gesamtheit dieser Beobachtungen lassen den Rückschluss zu, dass eine außer Kontrolle geratene ER-Stressantwort in der Pathogenese von CED eine Rolle spielt.

Die Proteomanalysen brachten ein weiteres mitochondriales Protein, die Kreatinkinase, zum Vorschein. Diese wurde sowohl nach Monoassoziiierung mit *E.faecalis* als auch mit *E.coli* als herunterreguliert identifiziert. Die Kreatinkinase ist ein zentrales Kontrollprotein in der zellulären Energiehomöostase. Durch die reversible Umwandlung von Kreatin zu Phospho-Kreatin bildet die Kreatinkinase einen großen Pool an schnell verfügbarem Phospho-Kreatin, um Änderungen im ATP-Spiegel abpuffern zu können [187]. Die Kreatinkinase ist im Intermembranraum des Mitochondriums lokalisiert und trägt somit auch zur Stabilität bei. Das Zusammenspiel zwischen zytosolischer und mitochondrialer Kreatinkinase übt viele Funktionen im Energiemetabolismus der Zelle aus [201-203]. Neben der Ansammlung intrazellulärem Phospho-Kreatin, limitieren sie ebenfalls die freie Diffusion kleinerer Moleküle innerhalb der Zelle wie Adeninnukleotide [202]. Mittels Western Blot Analyse konnte der Abbau der Kreatinkinase ebenfalls in entzündeten IL-10-defizienten Mäusen detektiert werden (Abbildung 24, Seite 83). Gleichzeitig konnte eine Phosphorylierung der AMP-Kinase in entzündeten IL-10^{-/-} Mäusen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die AMP-Kinase ist ein Sensor für Änderungen im Energielevel der Zelle und wird z. B. durch Absinken des ATP-Spiegels durch Phosphorylierung aktiviert [204]. Interessanterweise zeigen die entzündeten IL-10XTLR2^{-/-} Mäuse eine entgegengesetzte Regulation der Kreatinkinase.

Zum Zeitpunkt der 16 Wochen, wo diese Mäuse die stärkste Entzündung aufwiesen, wurde die Kreatinkinase als hochreguliert detektiert. Die Abwesenheit des TLR2 scheint einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität der Kreatinkinase zu nehmen. Es scheint, dass die Kreatinkinase trotz einer bestehenden Entzündung vor einem Abbau bewahrt wird. In diversen Studien zu Krebserkrankungen wurde die mitochondriale Kreatinkinase als hochreguliert detektiert; vor allem bei Tumorerkrankungen mit schlechter Prognose [205-207]. Die erhöhte Expression der Kreatinkinase in den bösartigen Zellen scheint ein Teil der metabolischen Adaptation der Krebszellen zu sein, um eine hohe Wachstumsrate unter Glucose- und Sauerstoffeinschränkung zu erreichen, was typisch für Tumorzellen ist [208]. Ein Nebeneffekt der Erhaltung des hohen Energiebedarfs durch die Kreatinkinase scheint protektiv gegenüber Stresssituationen wie Hypoxie zu sein und schützt so eventuell die Zellen vor Apoptose. Transgene Mäuse mit Kreatinkinasen-Überexpression zeigen eine klare Reduktion von nekrotischem und apoptotischem Zelltod verglichen zu den Kontrollen [209]. Wenn die Kreatinkinase Tumorzellen vor einer Apoptose schützt, könnte dies eine Erklärung sein, warum besonders in Tumorpatienten mit aggressiven Tumoren und schlechter Prognose ein hohes Expressionslevel der Kreatinkinase detektiert wird.

Zur Validierung dieser Ergebnisse wurde das Expressionsprofil der Kreatinkinase in isolierten IEZ der CED-Patienten untersucht. Morbus Crohn Patienten wiesen eine geringere Expression der Kreatinkinase auf verglichen zu Kontrollpatienten. Colitis Ulzerosa Patienten wiesen eine unterschiedliche Expression der Kreatinkinase auf. In einer Pilotstudie wurde von einem Colitis Ulzerosa Patienten Epithelzellen aus nicht entzündeten und entzündeten Regionen isoliert und eine Proteomanalyse durchgeführt [210]. Im Gegensatz zu den Daten des Einzelpatienten aus dieser Arbeit wurde dabei die Kreatinkinase in der Proteomanalyse der Pilotstudie als hochreguliert detektiert. Jedoch weiß man seit einigen Jahren, dass der Krankheitsverlauf von Colitis Ulzerosa mit Kolonkarzinom assoziiert ist [198, 199]. Es ist denkbar, dass die Entzündung dieser Patienten aus der Pilotstudie fortgeschrittener war als die Entzündung der untersuchten Patienten in dieser Arbeit. Unterstützt wird diese Annahme durch eine weitere Proteomanalyse von Tumorpatienten. *Polley et al.* identifizierten in Patienten mit kolorektalem Neoplasma die Kreatinkinase als herunterreguliert [211]. Das Entzündungsstadium scheint ein möglicher Grund für die unterschiedliche Expression in Colitis Ulzerosa Patienten zu sein. Der Verlust der Kreatinkinase und die damit verbundene Energiedefizienz in entzündeten IL-10^{-/-} Mäusen als auch in CED-Patienten ist möglicherweise eine der Ursachen von zellulärem Stress und scheint somit eine wichtige Rolle in der Entwicklung einer CED zu spielen. Welche Rolle der Verlust der Kreatinkinase in der mitochondrialen bzw. ER-Stressantwort einnimmt, sei es als Konsequenz oder als Auslöser, sollte mittels *in vitro* Experimente untersucht werden.

Beim Betrachten der Ergebnisse der TLR-defizienten Mäuse ist besonders auffällig, dass die ER-Stressantwort sowohl unter nicht entzündlichen als auch unter entzündlichen Bedingungen aktiviert wurde. Zum Zeitpunkt der 8 und 16 Wochen wurde eine deutlich erhöhte Expression von grp-78 unter TLR4 Defizienz detektiert (Abbildung 24, Seite 83). Auch unter entzündlichen Bedingungen konnte eine klare Expression von grp-78 zum Zeitpunkt 8 und 16 Wochen detektiert werden. Doch konnte gleichzeitig in den IL-10^{-/-}TLR2^{-/-} Mäusen die Aktivierung der proapoptotischen Caspase 3 beobachtet werden. Dabei ist zu beachten, dass die Aktivierung des ER-Stresses ein wichtiger adaptiver Bestandteil der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase ist. Jedoch kann lang anhaltender ER-Stress zur Apoptose führen [212]. Der durch ER-Stress induzierte apoptotische Signalweg wird über den Transkriptionsfaktor CHOP vermittelt, welcher über die ER transmembranen Rezeptoren ATF6 α und PERK induziert wird [213]. Alle drei Tiermodelle mit IL-10-defizientem Hintergrund wiesen eine Expression von CHOP zum Zeitpunkt 8 Wochen auf. Die CHOP Expression tritt zum späteren Zeitpunkt (16 Wochen) lediglich vermindert auf. Dies lässt auf einen CHOP unabhängigen Mechanismus zur Induktion der apoptotischen Signalwege schließen, welche zur Aktivierung der Caspase 3 führen [214-216]. *Seimon et al.* zeigte nach einer Stimulation mit dem ER-Stressor Thapsigargin eine Induktion des Zelltodes in murinen Makrophagen. Interessanterweise waren die Makrophagen ohne TLR4 nach einer kombinierten Stimulation mit Thapsigargin und Fucoidan, ein Ligand für den Makrophagen *type A scavenger receptor* (SRA), komplett vor der Induktion der Apoptose geschützt. Das Zusammenspiel zwischen TLR4 und dem zweiten *pattern recognition receptor* scheint essentiell für die Aktivierung der TLR4 vermittelten Apoptose zu sein [217]. Analog zu diesen Beobachtungen scheint die hier verwendete IL-10-defiziente Maus weniger anfällig für eine chronische Entzündung zu sein, wenn sie gleichzeitig eine TLR4 Defizienz besitzt. Trotz dessen wurden die Mechanismen des ER-Stresses in Abwesenheit von TLR4 aktiviert. Weiterführend dazu hat eine kürzlich veröffentlichte Studie beobachtet, dass über den TLR4 Signalweg die Expression von CHOP und dessen Aktivator ATF4 unterdrückt werden kann. Speziell der TRIF-vermittelte TLR Signalweg schwächt die translationale Aktivierung von ATF4 und seinem nachgeschalteten Zielgen CHOP ab [218]. Möglicherweise fördert dieser Mechanismus das Überleben der TLR exprimierenden Zellen gegen lang anhaltenden ER-Stress.

CHOP ist ebenfalls in die Aktivierung der Gene der mitochondrialen UPR involviert. Diese Stressantwort wird durch eine Akkumulation ungefalteter Proteine in der mitochondrialen Matrix initiiert und führt zur Aktivierung der im Nukleus kodierten mitochondrialen Chaperone und Proteasen, die die Wiederherstellung der Proteinfunktionen durch Neufaltung oder Entfernen der ungefalteten Proteine ermöglichen [179, 180, 219, 220]. In der Proteomanalyse wurden 2 der mitochondrialen Chaperone (Chaperonin 60 und grp-75)

identifiziert. Die genaue Funktion der mitochondrialen Stressantwort in Verbindung mit chronischer Entzündung ist unbekannt. Aber in Anbetracht der hohen Anzahl an signifikant regulierten Proteinen aus dem Mitochondrium scheinen mitochondriale Proteine in Entzündungsprozessen höchst relevant zu sein. Vor allem Chaperonin 60 scheint eine zentrale Rolle einzunehmen.

Eine TLR Defizienz in IEZ kann zelluläre Stressmechanismen aktivieren, doch ist die Konsequenz der jeweiligen Defizienz komplett verschieden. So wurde in den entzündeten IL-10XTLR2^{-/-} Mäusen eine Induktion der ER-Stressantwort detektiert, die mit einer Apoptose der IEZ assoziiert war. Im Gegensatz konnte in den nicht entzündeten IL-10XTLR4^{-/-} Mäusen keine Apoptose nachgewiesen werden, aber die Aktivierung der ER-Stressantwort. Durch die TLR4 Defizienz scheinen im Epithel ER-Stress assoziierte adaptive Prozesse abzulaufen, die zum Schutz vor einer intestinalen Entzündung beitragen.

4.2 Molekulare Verbindung zwischen ER- und mitochondrialem Stress

In der Proteom- als auch in der Western Blot Analyse der mono- bzw. dualassozierten IL-10^{-/-} Mäuse wurde die Kreatinkinase verglichen zu den mono- bzw. dualassozierten Wildtypmäusen mit geringerem Expressionslevel detektiert. Als Teil des Energiemetabolismus kann der Abbau der Kreatinkinase in der Zelle zu einer Energiedefizienz führen und somit zellulären Stress initiieren. In den *in vitro* Studien wurde der zelluläre Stress mittels Tunicamycin und OTC Δ induziert. Interessanterweise konnte ein Abbau der Kreatinkinase unter ER-Stress aber nicht unter mitochondrialem Stress beobachtet werden. In der Proteomanalyse der TLR2- bzw. TLR4-defizienten Mäuse wurde bereits grp-75 identifiziert, welches in die mitochondriale UPR als auch in den Proteinabbau im Mitochondrium involviert ist. Aufgrund dessen wurde eine Immunopräzipitation der Kreatinkinase unter ER-Stress Bedingungen durchgeführt. Diese zeigte, dass die Kreatinkinase unter ER-Stress mittels grp-75 und dessen Helferchaperon Tid-1 zur mitochondrialen Protease ClpP transportiert und von dieser abgebaut wird. Der ER-Stress initiiert somit den Abbau der Kreatinkinase. Möglicherweise ist dies eine Konsequenz eines lang anhaltenden ER-Stresses. Des Weiteren stabilisiert die Kreatinkinase durch ihre Position im intermembranen Raum das Mitochondrium [187]. Bei deren Abwesenheit müsste ein Verlust an Mitochondrien zu verzeichnen sein. Das Verhältnis mitochondrialer DNA zu nukleärer DNA ist jedoch unter ER-Stress nicht verändert. Mitochondrien wurden nicht abgebaut. Ebenfalls wurde keine Expression von Apoptose assoziierten Proteinen detektiert. Dies allerdings widerspricht der Studie von *Lenz et al.*, welche mittels siRNA die Translation der Kreatinkinase inhibierten und dabei eine starke Abnahme der Zellviabilität und

Zellproliferation beobachten konnten. Des Weiteren wurde unter Abwesenheit der Kreatinkinase eine beträchtliche Änderung in der Mitochondrienmorphologie und in deren Membranstruktur verbunden mit erhöhter Apoptose sichtbar [221].

Ein mitochondrialer Zusammenbruch scheint unter ER-Stress nicht der Fall zu sein. Jedoch ist die mitochondriale Atmung sowohl unter ER-Stress als auch unter mitochondrialem Stress beeinträchtigt. Es scheint, dass die beiden Stresstypen mehr Energie verbrauchen als die Zelle über Zellatmung zur Verfügung stellen kann. Zusätzlich scheint mitochondrialer Stress die Zellatmung deutlich stärker zu beeinträchtigen als ER-Stress. *Ishikawa et. al* beobachteten nach einer Blockierung der Atmungskette mittels Rotenon, welches den Elektronentransport des Komplex I inhibiert, eine Induktion von CHOP, die zur Aktivierung einer mitochondrialen Stressantwort führt [222]. In ersten Experimenten zur Aktivitätsmessung der β -Oxidation wurde mittels Zugabe von Oleinsäure (ungesättigte Fettsäure C18:1) in den mit Tunicamycin bzw. $OTC\Delta$ stimulierten Zellen eine verstärkte β -Oxidation hervorgerufen. Damit wird eine bessere Quantifizierung des Acylcarnitinspiegels mittels ESI-Tandem-Massenspektrometrie ermöglicht (unveröffentlichte Methode). Acylcarnitine werden für den Transport der langkettigen Fettsäuren ins Mitochondrium benötigt. Unter ER-Stress als auch unter mitochondrialem Stress scheint die β -Oxidation beeinträchtigt zu sein (Daten nicht gezeigt). Es konnten lediglich langkettige Fettsäuren detektiert werden. Das Fettsäuretransportsystem wurde möglicherweise durch den zellulären Stress beeinträchtigt.

Trotz verminderter Zellatmung, beeinträchtigter β -Oxidation und Hemmung des Energietransportproteins Kreatinkinase scheint der ATP-Spiegel unter ER-Stress nicht vermindert zu sein. Dennoch konnten viele Studien bereits einen verringerten Energiespiegel in CED-Patienten beobachten [149, 223, 224]. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde in Morbus Crohn als auch Colitis Ulzerosa Patienten ein eingeschränkter Kohlenhydrat- bzw. Proteinmetabolismus während des aktiven Entzündungsverlaufs detektiert. Hingegen wurden in der Remissionsphase lediglich die gleichen Metabolite wie bei den Kontrollpatienten gemessen [225].

Interessanterweise werden unter ER-Stress auch mitochondriale Stressproteine induziert. Mitochondrien und ER kommunizieren u. a. über den Kalziumspiegel in der Zelle [226, 227]. In diesem Zusammenhang gewinnen die Chaperone immer mehr an Bedeutung. Studien beobachteten, dass grp-75 nicht nur in der mitochondrialen Matrix zu finden ist, sondern auch außerhalb des Mitochondriums. Es greift in die Kommunikation über Kalzium ein. Das heißt, es fördert die Interaktion zwischen dem VDAC (*voltage-dependent anion channel*) und IP_3R (*inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor*), was zu einer gesteigerten Kalziumaufnahme in das Mitochondrium führt [228]. Eine weitere Studie belegt, dass grp-78 unter ER-Stress in

Mitochondrien translozieren kann. Es ist dort vor allem im intermembranen Raum, in der inneren Membran und in der Matrix zu finden; aber es ist nicht mit der äußeren Membran assoziiert [229, 230]. Möglicherweise ist diese Translokation verantwortlich für die Induktion von Proteinen des mitochondrialen Stresses unter ER-Stress.

Eine weitere gemeinsame Stresskomponente ist CHOP, das sowohl in die ER-Stressantwort als auch in die mitochondrialen Stressantwort involviert ist [153, 180]. Mittels Western Blot Analyse wurde lediglich eine Induktion unter ER-Stress detektiert (Daten nicht gezeigt). Chromatin-Immunopräzipitationen zeigten, dass CHOP sowohl unter ER-Stress als auch unter mitochondrialem Stress induziert wird. Seine Genexpression wurde jeweils von ATF4 bzw. cJun initiiert. *Horibe et al.* beschrieben bereits cJun als potentiellen Transkriptionsfaktor für CHOP unter mitochondrialem Stress [180]. Doch scheinbar induziert ER-Stress die Expression von CHOP ebenfalls über cJun, welcher über den ER-transmembranen Rezeptor IRE1 aktiviert wird (Abbildung 29, Seite 92). Nach seiner Aktivierung bindet CHOP als Transkriptionsfaktor an den Promotor von Chaperonin 60 unter ER- als auch mitochondrialem Stress. Im Gegensatz dazu bindet CHOP lediglich unter ER-Stress an den Promotor von grp-75. Die Transkriptionsfaktoren des ER sind nicht in der Lage, die mitochondrialen Stressproteine zu induzieren. CHOP ist somit der verbindende Faktor zwischen ER- und mitochondrialem Stress. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde eindrucksvoll gezeigt, dass Mäuse mit einem knock-out für das *chop* Gen weniger sensitiv in Bezug auf eine DSS-induzierte Kolitis sind als die Wildtypmäuse [173]. Des Weiteren konnte eine verminderte grp-78 Expression in $CHOP^{-/-}$ Mäusen nachgewiesen werden.

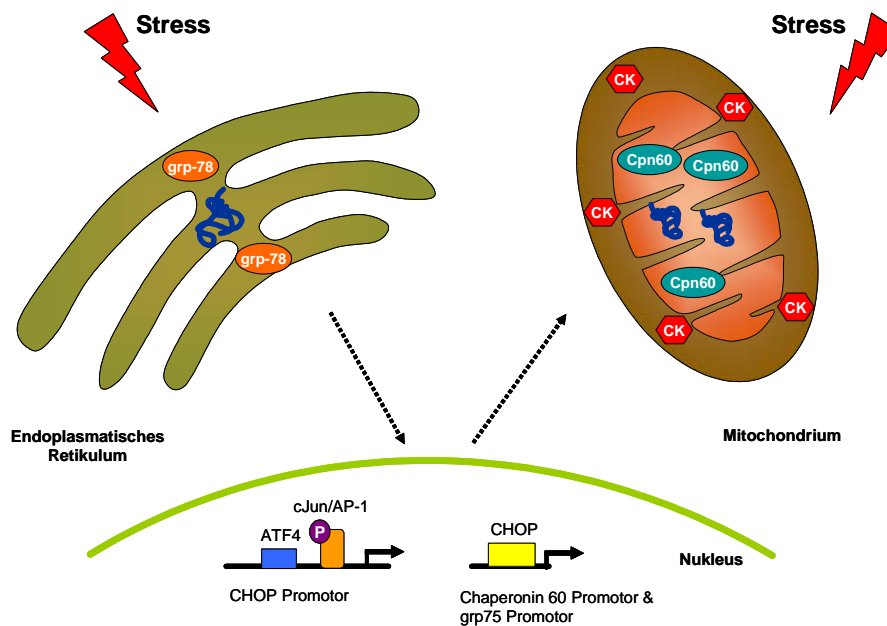


Abbildung 31: CHOP als mögliche Verbindung zwischen ER und mitochondrialem Stress

Die verschiedenen knock-out Mausmodelle für ER-Stressproteine in Bezug auf chronische Entzündung beweisen eindrucksvoll den Zusammenhang zwischen ER-Stress und der

Pathogenese von CED. In dieser Arbeit wurde ebenfalls der mitochondriale Stress mit CED in Verbindung gebracht. Mittels *in vitro* Studien stellte sich CHOP als Verbindungsglied zwischen ER- und mitochondrialem Stress heraus. Neben der CHOP-defizienten Maus könnte das knock-out Mausmodell für grp-75 ebenfalls einen Einblick in die Interaktion zwischen ER- und mitochondrialem Stress unter entzündlichen Bedingungen geben. Denn grp-75 ist maßgeblich für den Kalziumaustausch zwischen dem mitochondrialem Kalziumkanal VADC und dem ER-Kalziumkanal IP₃R beteiligt.

Darüber hinaus kristallisierte sich Chaperonin 60 besonders nach den bibliometrischen Analysen der TLR-defizienten Mäuse als auch der assoziierten IL-10-defizienten Mäuse heraus. Chaperonin 60 nimmt neben Tumorerkrankungen wahrscheinlich auch während einer Entzündung im Darm eine bedeutende Rolle ein. *In vitro* Studien sollten mittels der siRNA Technik die Funktion von Chaperonin 60 während einer ER-Stressantwort näher beleuchten. Entgegen den Erwartungen konnte in Abwesenheit von Chaperonin 60 keine starke Beeinträchtigung oder Verstärkung der ER-Stress assoziierten Proteine detektiert werden. Es zeigte sich, dass die Transfektion mit siRNA bereits ein Stressor für die Zelle darstellt. Für einen permanenten Chaperonin 60 knock-out wäre für *in vitro* Studien eine stabil transfizierte Zelllinie geeigneter. Jedoch um seine Rolle in der Entwicklung einer Entzündung zu verdeutlichen, wäre ein knock-out Mausmodell für Chaperonin 60 deutlich von Vorteil. Es könnte die Funktion von Chaperonin 60 unter ER-Stressbedingungen oder entzündlichen Bedingungen in IEZ genauer untersucht werden.

5 LITERATURVERZEICHNIS

1. Savage, D.C., Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol*, 1977. 31: p. 107-33.
2. Berg, R.D., The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol*, 1996. 4(11): p. 430-5.
3. Sonnenburg, J.L., L.T. Angenent, and J.I. Gordon, Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts become established in our intestine? *Nat Immunol*, 2004. 5(6): p. 569-73.
4. Rotimi, V.O. and B.I. Duerden, The development of the bacterial flora in normal neonates. *J Med Microbiol*, 1981. 14(1): p. 51-62.
5. Mackie, R.I., A. Sghir, and H.R. Gaskins, Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr*, 1999. 69(5): p. 1035S-1045S.
6. Sakata, S., et al., Culture-independent analysis of fecal microbiota in infants, with special reference to *Bifidobacterium* species. *FEMS Microbiol Lett*, 2005. 243(2): p. 417-23.
7. Hoermannsperger, G., et al., Post-translational inhibition of IP-10 secretion in IEC by probiotic bacteria: impact on chronic inflammation. *Plos One*, 2009. 4(2): p. e4365
8. Kunz, C., et al., Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annu Rev Nutr*, 2000. 20: p. 699-722.
9. Chaturvedi, P., et al., Survival of human milk oligosaccharides in the intestine of infants. *Adv Exp Med Biol*, 2001. 501: p. 315-23.
10. Coppa, G.V., et al., Characterization of oligosaccharides in milk and feces of breast-fed infants by high-performance anion-exchange chromatography. *Adv Exp Med Biol*, 2001. 501: p. 307-14.
11. Lonnerdal, B., Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am J Clin Nutr*, 2003. 77(6): p. 1537S-1543S.
12. Frank, D.N., et al., Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(34): p. 13780-5.
13. Eckburg, P.B. and D.A. Relman, The role of microbes in Crohn's disease. *Clin Infect Dis*, 2007. 44(2): p. 256-62.
14. Holdeman, L.V., I.J. Good, and W.E. Moore, Human fecal flora: variation in bacterial composition within individuals and a possible effect of emotional stress. *Appl Environ Microbiol*, 1976. 31(3): p. 359-75.
15. Hooper, L.V., T. Midtvedt, and J.I. Gordon, How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr*, 2002. 22: p. 283-307.
16. Shanahan, F., The host-microbe interface within the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2002. 16(6): p. 915-31.
17. Tannock, G.W., et al., A method for harvesting non-cultivable filamentous segmented microbes inhabiting the ileum of mice. *FEMS Microbiol Ecol*, 1987. 45: 329-32
18. Falk, P.G., et al., Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998. 62(4): p. 1157-70.
19. Gustafsson, B.E., Lightweight stainless steel systems for rearing germfree animals. *Ann N Y Acad Sci*, 1959. 78: p. 17-28.
20. Lindstedt, G., S. Lindstedt, and B.E. Gustafsson, Mucus in Intestinal Contents of Germfree Rats. *J Exp Med*, 1965. 121: p. 201-13.
21. Backhed, F., et al., The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(44): p. 15718-23.
22. Walker, W.A., Development of the intestinal mucosal barrier. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2002. 34 Suppl 1: p. S33-9.

23. Clayburgh, D.R., L. Shen, and J.R. Turner, A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease. *Lab Invest*, 2004. 84(3): p. 282-91.
24. Newberry, R.D. and R.G. Lorenz, Organizing a mucosal defense. *Immunol Rev*, 2005. 206: p. 6-21.
25. Magalhaes, J.G., I. Tattoli, and S.E. Girardin, The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin Immunol*, 2007. 19(2): p. 106-15.
26. Bouma, G. and W. Strober, The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*, 2003. 3(7): p. 521-33.
27. Baumgart, D.C. and S.R. Carding, Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*, 2007. 369(9573): p. 1627-40.
28. Silverberg, M.S., et al., Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol*, 2005. 19 Suppl A: p. 5-36.
29. Brant, S.R., et al., MDR1 Ala893 polymorphism is associated with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet*, 2003. 73(6): p. 1282-92.
30. Ogura, Y., et al., A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 2001. 411(6837): p. 603-6.
31. Hugot, J.P., et al., Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 2001. 411(6837): p. 599-603.
32. Sher, M.E., et al., The influence of cigarette smoking on cytokine levels in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 1999. 5(2): p. 73-8.
33. Sakamoto, N., et al., Dietary risk factors for inflammatory bowel disease: a multicenter case-control study in Japan. *Inflamm Bowel Dis*, 2005. 11(2): p. 154-63.
34. Podolsky, D.K., Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*, 2002. 347(6): p. 417-29.
35. Toms, C. and F. Powrie, Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Microbes Infect*, 2001. 3(11): p. 929-35.
36. Buhner, S., et al., Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut*, 2006. 55(3): p. 342-7.
37. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C.A. Janeway, Jr., A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 1997. 388(6640): p. 394-7.
38. Rock, F.L., et al., A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(2): p. 588-93.
39. Carneiro, L.A., L.H. Travassos, and D.J. Philpott, Innate immune recognition of microbes through Nod1 and Nod2: implications for disease. *Microbes Infect*, 2004. 6(6): p. 609-16.
40. Girardin, S.E., et al., CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO Rep*, 2001. 2(8): p. 736-42.
41. Ferguson, L.R., et al., Genes, diet and inflammatory bowel disease. *Mutat Res*, 2007. 622(1-2): p. 70-83.
42. Strober, W., et al., Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol*, 2006. 6(1): p. 9-20.
43. Kobayashi, K.S., et al., Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science*, 2005. 307(5710): p. 731-4.
44. Wehkamp, J., et al., NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut*, 2004. 53(11): p. 1658-64.
45. Lala, S., et al., Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology*, 2003. 125(1): p. 47-57.
46. Wehkamp, J., et al., Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(50): p. 18129-34.
47. Wehkamp, J. and E.F. Stange, NOD2 mutation and mice: no Crohn's disease but many lessons to learn. *Trends Mol Med*, 2005. 11(7): p. 307-9.
48. Sartor, R.B., Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 2006. 3(7): p. 390-407.

49. Macdonald, T.T. and G. Monteleone, Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science*, 2005. 307(5717): p. 1920-5.
50. Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher, Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 1996. 383(6603): p. 787-93.
51. Kamradt, T. and G.R. Burmester, Cytokines and arthritis: is the Th1/Th2 paradigm useful for understanding pathogenesis? *J Rheumatol*, 1998. 25(1): p. 6-8.
52. Infante-Duarte, C., et al., Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol*, 2000. 165(11): p. 6107-15.
53. Monteleone, I., F. Pallone, and G. Monteleone, Interleukin-23 and Th17 cells in the control of gut inflammation. *Mediators Inflamm*, 2009. 2009: p. 297645.
54. Monteleone, G., et al., Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *J Immunol*, 1999. 163(1): p. 143-7.
55. MacDonald, T.T. and G. Monteleone, IL-12 and Th1 immune responses in human Peyer's patches. *Trends Immunol*, 2001. 22(5): p. 244-7.
56. Fuss, I.J., et al., Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol*, 1996. 157(3): p. 1261-70.
57. Fuss, I.J., et al., Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest*, 2004. 113(10): p. 1490-7.
58. Fiorentino, D.F., M.W. Bond, and T.R. Mosmann, Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*, 1989. 170(6): p. 2081-95.
59. Fiorentino, D.F., et al., IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol*, 1991. 147(11): p. 3815-22.
60. Moore, K.W., et al., Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*, 2001. 19: p. 683-765.
61. Kuhn, R., et al., Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, 1993. 75(2): p. 263-74.
62. Fernandez, L., et al., Interleukin-10 polymorphisms in Spanish patients with IBD. *Inflamm Bowel Dis*, 2005. 11(8): p. 739-43.
63. Tedde, A., et al., Interleukin-10 promoter polymorphisms influence susceptibility to ulcerative colitis in a gender-specific manner. *Scand J Gastroenterol*, 2008. 43(6): p. 712-8.
64. van der Linde, K., et al., A Gly15Arg mutation in the interleukin-10 gene reduces secretion of interleukin-10 in Crohn disease. *Scand J Gastroenterol*, 2003. 38(6): p. 611-7.
65. Liu, Y., et al., Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor. *J Immunol*, 1994. 152(4): p. 1821-9.
66. Ho, A.S., et al., A receptor for interleukin 10 is related to interferon receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(23): p. 11267-71.
67. Spencer, S.D., et al., The orphan receptor CRF2-4 is an essential subunit of the interleukin 10 receptor. *J Exp Med*, 1998. 187(4): p. 571-8.
68. Kotenko, S.V., et al., Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex. *Embo J*, 1997. 16(19): p. 5894-903.
69. O'Farrell, A.M., et al., IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanisms: evidence for Stat3-dependent and -independent pathways. *Embo J*, 1998. 17(4): p. 1006-18.
70. Donnelly, R.P., H. Dickensheets, and D.S. Finbloom, The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. *J Interferon Cytokine Res*, 1999. 19(6): p. 563-73.
71. Hirano, T., K. Ishihara, and M. Hibi, Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene*, 2000. 19(21): p. 2548-56.

72. Hoffmann, J.C., et al., Animal models of inflammatory bowel disease: an overview. *Pathobiology*, 2002. 70(3): p. 121-30.
73. Elson, C.O., et al., Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunol Rev*, 2005. 206: p. 260-76.
74. Strober, W., I.J. Fuss, and R.S. Blumberg, The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol*, 2002. 20: p. 495-549.
75. Mizoguchi, A., E. Mizoguchi, and A.K. Bhan, Immune networks in animal models of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 2003. 9(4): p. 246-59.
76. Strober, W., I. Fuss, and P. Mannon, The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*, 2007. 117(3): p. 514-21.
77. Neurath, M.F., S. Finotto, and L.H. Glimcher, The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med*, 2002. 8(6): p. 567-73.
78. Yen, D., et al., IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest*, 2006. 116(5): p. 1310-6.
79. Hue, S., et al., Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med*, 2006. 203(11): p. 2473-83.
80. Elson, C.O., et al., Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice. *Gastroenterology*, 2007. 132(7): p. 2359-70.
81. Sadlack, B., et al., Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell*, 1993. 75(2): p. 253-61.
82. Sellon, R.K., et al., Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun*, 1998. 66(11): p. 5224-31.
83. Berg, D.J., et al., Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J Clin Invest*, 1996. 98(4): p. 1010-20.
84. Kim, S.C., et al., Variable phenotypes of enterocolitis in interleukin 10-deficient mice monoassociated with two different commensal bacteria. *Gastroenterology*, 2005. 128(4): p. 891-906.
85. Rath, H.C., K.H. Wilson, and R.B. Sartor, Differential induction of colitis and gastritis in HLA-B27 transgenic rats selectively colonized with *Bacteroides vulgatus* or *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 1999. 67(6): p. 2969-74.
86. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*, 2002. 296(5566): p. 298-300.
87. Kaisho, T. and S. Akira, Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. 117(5): p. 979-87; quiz 988.
88. Cario, E., Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut*, 2005. 54(8): p. 1182-93.
89. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira, Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*, 2003. 21: p. 335-76.
90. Schwandner, R., et al., Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem*, 1999. 274(25): p. 17406-9.
91. Poltorak, A., et al., Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 1998. 282(5396): p. 2085-8.
92. Opitz, B., et al., Toll-like receptor-2 mediates *Treponema glycolipid* and lipoteichoic acid-induced NF-kappaB translocation. *J Biol Chem*, 2001. 276(25): p. 22041-7.
93. Alexopoulou, L., et al., Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 2001. 413(6857): p. 732-8.
94. Lemaitre, B., et al., The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 1996. 86(6): p. 973-83.
95. Akira, S., Pathogen recognition by innate immunity and its signaling. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2009. 85(4): p. 143-56.
96. Beutler, B., Toll-like receptors and their place in immunology. Where does the immune response to infection begin? *Nat Rev Immunol*, 2004. 4(7): p. 498.

97. Riedemann, N.C., R.F. Guo, and P.A. Ward, The enigma of sepsis. *J Clin Invest*, 2003. 112(4): p. 460-7.
98. Kolek, M.J., et al., Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism is associated with reductions in vascular inflammation, angiographic coronary artery disease, and clinical diabetes. *Am Heart J*, 2004. 148(6): p. 1034-40.
99. Mohammad, M.K., et al., Dysregulated Toll-like receptor expression and signaling in bone marrow-derived macrophages at the onset of diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Int Immunol*, 2006. 18(7): p. 1101-13.
100. Eisenbarth, S.C., et al., Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med*, 2002. 196(12): p. 1645-51.
101. Redecke, V., et al., Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J Immunol*, 2004. 172(5): p. 2739-43.
102. Hirschfeld, M., et al., Cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. *J Immunol*, 1999. 163(5): p. 2382-6.
103. Sobek, V., et al., Direct Toll-like receptor 2 mediated co-stimulation of T cells in the mouse system as a basis for chronic inflammatory joint disease. *Arthritis Res Ther*, 2004. 6(5): p. R433-46.
104. Takeuchi, O., et al., Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, 1999. 11(4): p. 443-51.
105. Underhill, D.M., et al., Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(25): p. 14459-63.
106. Campos, M.A., et al., Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol*, 2001. 167(1): p. 416-23.
107. Underhill, D.M., et al., The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature*, 1999. 401(6755): p. 811-5.
108. Brightbill, H.D., et al., Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*, 1999. 285(5428): p. 732-6.
109. Underhill, D.M. and A. Ozinsky, Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol*, 2002. 14(1): p. 103-10.
110. Takeuchi, O., K. Hoshino, and S. Akira, Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol*, 2000. 165(10): p. 5392-6.
111. Takeuchi, O., et al., Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol*, 2000. 164(2): p. 554-7.
112. Takeuchi, O., et al., Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol*, 2001. 13(7): p. 933-40.
113. Qureshi, S.T., et al., Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med*, 1999. 189(4): p. 615-25.
114. Ruiz, P.A., et al., IL-10 gene-deficient mice lack TGF-beta/Smad signaling and fail to inhibit proinflammatory gene expression in intestinal epithelial cells after the colonization with colitogenic *Enterococcus faecalis*. *J Immunol*, 2005. 174(5): p. 2990-9.
115. Ohashi, K., et al., Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol*, 2000. 164(2): p. 558-61.
116. Termeer, C., et al., Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med*, 2002. 195(1): p. 99-111.
117. Okamura, Y., et al., The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*, 2001. 276(13): p. 10229-33.

118. Smiley, S.T., J.A. King, and W.W. Hancock, Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol*, 2001. 167(5): p. 2887-94.
119. Johnson, G.B., et al., Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J Immunol*, 2002. 168(10): p. 5233-9.
120. Jiang, Q., et al., Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B. *J Immunol*, 2000. 165(7): p. 3541-4.
121. da Silva Correia, J., et al., Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J Biol Chem*, 2001. 276(24): p. 21129-35.
122. Shimazu, R., et al., MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med*, 1999. 189(11): p. 1777-82.
123. Nagai, Y., et al., Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol*, 2002. 3(7): p. 667-72.
124. Gay, N.J. and M. Gangloff, Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu Rev Biochem*, 2007. 76: p. 141-65.
125. Trinchieri, G. and A. Sher, Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol*, 2007. 7(3): p. 179-90.
126. Smith, P.D., et al., Intestinal macrophages lack CD14 and CD89 and consequently are down-regulated for LPS- and IgA-mediated activities. *J Immunol*, 2001. 167(5): p. 2651-6.
127. Hausmann, M., et al., Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology*, 2002. 122(7): p. 1987-2000.
128. Muzio, M., et al., Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol*, 2000. 164(11): p. 5998-6004.
129. Supajatura, V., et al., Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. *J Immunol*, 2001. 167(4): p. 2250-6.
130. Maaser, C., et al., Human intestinal microvascular endothelial cells express Toll-like receptor 5: a binding partner for bacterial flagellin. *J Immunol*, 2004. 172(8): p. 5056-62.
131. Otte, J.M., I.M. Rosenberg, and D.K. Podolsky, Intestinal myofibroblasts in innate immune responses of the intestine. *Gastroenterology*, 2003. 124(7): p. 1866-78.
132. Wang, X., et al., Toll-like receptor 4 mediates innate immune responses to *Haemophilus influenzae* infection in mouse lung. *J Immunol*, 2002. 168(2): p. 810-5.
133. Wolfs, T.G., et al., In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation. *J Immunol*, 2002. 168(3): p. 1286-93.
134. Abreu, M.T., et al., Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol*, 2001. 167(3): p. 1609-16.
135. Cario, E. and D.K. Podolsky, Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun*, 2000. 68(12): p. 7010-7.
136. Ortega-Cava, C.F., et al., Strategic compartmentalization of Toll-like receptor 4 in the mouse gut. *J Immunol*, 2003. 170(8): p. 3977-85.
137. Furrie, E., et al., Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology*, 2005. 115(4): p. 565-74.
138. Armant, M.A. and M.J. Fenton, Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. *Genome Biol*, 2002. 3(8): p. REVIEWS3011.
139. Akira, S. and K. Takeda, Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 2004. 4(7): p. 499-511.

140. Yamamoto, M., et al., Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature*, 2002. 420(6913): p. 324-9.
141. Suzuki, N., S. Suzuki, and W.C. Yeh, IRAK-4 as the central TIR signaling mediator in innate immunity. *Trends Immunol*, 2002. 23(10): p. 503-6.
142. Yamamoto, M., et al., TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol*, 2003. 4(11): p. 1144-50.
143. Melmed, G., et al., Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut. *J Immunol*, 2003. 170(3): p. 1406-15.
144. Dubuquoy, L., et al., Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 2003. 124(5): p. 1265-76.
145. Boone, D.L., et al., The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol*, 2004. 5(10): p. 1052- 60.
146. Qin, J., et al., SIGIRR inhibits interleukin-1 receptor- and toll-like receptor 4-mediated signaling through different mechanisms. *J Biol Chem*, 2005. 280(26): p. 25233-41.
147. Rakoff-Nahoum, S., et al., Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 2004. 118(2): p. 229-41.
148. Fukata, M., et al., Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005. 288(5): p. G1055-65.
149. Shkoda, A., et al., Interleukin-10 blocked endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells: impact on chronic inflammation. *Gastroenterology*, 2007. 132(1): p. 190-207.
150. Schmitz, A. and V. Herzog, Endoplasmic reticulum-associated degradation: exceptions to the rule. *Eur J Cell Biol*, 2004. 83(10): p. 501-9.
151. Gaut, J.R. and L.M. Hendershot, The modification and assembly of proteins in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol*, 1993. 5(4): p. 589-95.
152. Zhao, L. and S.L. Ackerman, Endoplasmic reticulum stress in health and disease. *Curr Opin Cell Biol*, 2006. 18(4): p. 444-52.
153. Szegezdi, E., et al., Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep*, 2006. 7(9): p. 880-5.
154. Bertolotti, A., et al., Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*, 2000. 2(6): p. 326-32.
155. Harding, H.P., et al., An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell*, 2003. 11(3): p. 619-33.
156. Yoshida, H., ER stress and diseases. *Febs J*, 2007. 274(3): p. 630-58.
157. Novoa, I., et al., Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol*, 2001. 153(5): p. 1011-22.
158. Marciniak, S.J., et al., CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev*, 2004. 18(24): p. 3066-77.
159. Cullinan, S.B., et al., Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol Cell Biol*, 2003. 23(20): p. 7198-209.
160. Yoshida, H., et al., XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, 2001. 107(7): p. 881-91.
161. Lee, A.H., N.N. Iwakoshi, and L.H. Glimcher, XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol*, 2003. 23(21): p. 7448-59.
162. Yan, W., et al., Control of PERK eIF2alpha kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(25): p. 15920-5.
163. Nishitoh, H., et al., ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Mol Cell*, 1998. 2(3): p. 389-95.

164. Lindholm, D., H. Wootz, and L. Korhonen, ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ*, 2006. 13(3): p. 385-92.
165. Rao, R.V. and D.E. Bredesen, Misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration. *Curr Opin Cell Biol*, 2004. 16(6): p. 653-62.
166. Harding, H.P. and D. Ron, Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes: a review. *Diabetes*, 2002. 51 Suppl 3: p. S455-61.
167. Vasa-Nicotera, M., The new kid on the block: the unfolded protein response in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell Death Differ*, 2004. 11 Suppl 1: p. S10-1.
168. DeGracia, D.J. and H.L. Montie, Cerebral ischemia and the unfolded protein response. *J Neurochem*, 2004. 91(1): p. 1-8.
169. Ma, Y. and L.M. Hendershot, The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe? *Nat Rev Cancer*, 2004. 4(12): p. 966-77.
170. He, B., Viruses, endoplasmic reticulum stress, and interferon responses. *Cell Death Differ*, 2006. 13(3): p. 393-403.
171. Kaser, A., et al., XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell*, 2008. 134(5): p. 743-56.
172. Heazlewood, C.K., et al., Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. *PLoS Med*, 2008. 5(3): p. e54.
173. Namba, T., et al., Positive role of CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein, a transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response in the development of colitis. *Am J Pathol*, 2009. 174(5): p. 1786-98.
174. Bertolotti, A., et al., Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1beta-deficient mice. *J Clin Invest*, 2001. 107(5): p. 585-93.
175. Endo, M., et al., The ER stress pathway involving CHOP is activated in the lungs of LPS-treated mice. *J Biochem*, 2005. 138(4): p. 501-7.
176. Endo, M., et al., C/EBP homologous protein (CHOP) is crucial for the induction of caspase-11 and the pathogenesis of lipopolysaccharide-induced inflammation. *J Immunol*, 2006. 176(10): p. 6245-53.
177. Martinon, F., et al., TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. *Nat Immunol*. 2010.
178. Neupert, W., Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem*, 1997. 66: p. 863-917.
179. Zhao, Q., et al., A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *Embo J*, 2002. 21(17): p. 4411-9.
180. Horibe, T. and N.J. Hoogenraad, The chop gene contains an element for the positive regulation of the mitochondrial unfolded protein response. *PLoS One*, 2007. 2(9): p. e835.
181. Aldridge, J.E., T. Horibe, and N.J. Hoogenraad, Discovery of genes activated by the mitochondrial unfolded protein response (mtUPR) and cognate promoter elements. *PLoS One*, 2007. 2(9): p. e874.
182. Rath, H.C., et al., Normal luminal bacteria, especially *Bacteroides* species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats. *J Clin Invest*, 1996. 98(4): p. 945-53.
183. Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976. 72: p. 248-54.
184. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods*, 2001. 25(4): p. 402-8.
185. Gorg, A., W. Weiss, and M.J. Dunn, Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 2004. 4(12): p. 3665-85.
186. Katakura, K., et al., Toll-like receptor 9-induced type I IFN protects mice from experimental colitis. *J Clin Invest*, 2005. 115(3): p. 695-702

187. Schlattner, U., M. Tokarska-Schlattner, and T. Wallimann, Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochim Biophys Acta*, 2006. 1762(2): p. 164-80.
188. Gribar, S.C., et al., The role of epithelial Toll-like receptor signaling in the pathogenesis of intestinal inflammation. *J Leukoc Biol*, 2008. 83(3): p. 493-8.
189. Kim, S.C., et al., Dual-association of gnotobiotic IL-10^{-/-} mice with 2 nonpathogenic commensal bacteria induces aggressive pancolitis. *Inflamm Bowel Dis*, 2007. 13(12): p. 1457-66.
190. Koll, H., et al., Antifolding activity of hsp60 couples protein import into the mitochondrial matrix with export to the intermembrane space. *Cell*, 1992. 68(6): p. 1163-75.
191. Martin, J., Molecular chaperones and mitochondrial protein folding. *J Bioenerg Biomembr*, 1997. 29(1): p. 35-43.
192. Vargas-Parada, L., C.F. Solis, and J.P. Lacleste, Heat shock and stress response of *Taenia solium* and *T. crassiceps* (Cestoda). *Parasitology*, 2001. 122(Pt 5): p. 583-8.
193. Lin, K.M., et al., Combined and individual mitochondrial HSP60 and HSP10 expression in cardiac myocytes protects mitochondrial function and prevents apoptotic cell deaths induced by simulated ischemia-reoxygenation. *Circulation*, 2001. 103(13): p. 1787-92.
194. Tang, D., et al., Expression of heat shock proteins and heat shock protein messenger ribonucleic acid in human prostate carcinoma in vitro and in tumors in vivo. *Cell Stress Chaperones*, 2005. 10(1): p. 46-58.
195. Cappello, F., et al., Immunohistochemical evaluation of PCNA, p53, HSP60, HSP10 and MUC-2 presence and expression in prostate carcinogenesis. *Anticancer Res*, 2003. 23(2B): p. 1325-31.
196. Cappello, F., et al., 60KDa chaperonin (HSP60) is over-expressed during colorectal carcinogenesis. *Eur J Histochem*, 2003. 47(2): p. 105-10.
197. Cappello, F., et al., The expression of HSP60 and HSP10 in large bowel carcinomas with lymph node metastase. *BMC Cancer*, 2005. 5: p. 139.
198. Schottelius, A.J. and H. Dinter, Cytokines, NF-kappaB, microenvironment, intestinal inflammation and cancer. *Cancer Treat Res*, 2006. 130: p. 67-87.
199. Karin, M. and F.R. Greten, NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*, 2005. 5(10): p. 749-59.
200. Arduino, D.M., et al., Endoplasmic reticulum and mitochondria interplay mediates apoptotic cell death: relevance to Parkinson's disease. *Neurochem Int*, 2009. 55(5): p. 341-8.
201. Dzeja, P.P. and A. Terzic, Phosphotransfer networks and cellular energetics. *J Exp Biol*, 2003. 206(Pt 12): p. 2039-47.
202. Wallimann, T., et al., Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J*, 1992. 281 (Pt 1): p. 21-40.
203. Saks, V.A., R. Ventura-Clapier, and M.K. Aliev, Metabolic control and metabolic capacity: two aspects of creatine kinase functioning in the cells. *Biochim Biophys Acta*, 1996. 1274(3): p. 81-8.
204. Carling, D., AMP-activated protein kinase: balancing the scales. *Biochimie*, 2005. 87(1): p. 87-91.
205. Pratt, R., et al., Mitochondrial creatine kinase in cancer patients. *Pathology*, 1987. 19(2): p. 162-5.
206. DeLuca, M., et al., Creatine kinase isozymes in human tumors. *Biochem Biophys Res Commun*, 1981. 99(1): p. 189-95.
207. Kanemitsu, F., et al., Mitochondrial creatine kinase as a tumor-associated marker. *Clin Chim Acta*, 1984. 138(2): p. 175-83.
208. Dang, C.V. and G.L. Semenza, Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci*, 1999. 24(2): p. 68-72.

209. Hatano, E., et al., Inhibition of tumor necrosis factor-induced apoptosis in transgenic mouse liver expressing creatine kinase. *Liver Int*, 2004. 24(4): p. 384-93.
210. Shkoda, A., et al., Differential protein expression profile in the intestinal epithelium from patients with inflammatory bowel disease. *J Proteome Res*, 2007. 6(3): p. 1114-25.
211. Polley, A.C., et al., Proteomic analysis reveals field-wide changes in protein expression in the morphologically normal mucosa of patients with colorectal neoplasia. *Cancer Res*, 2006. 66(13): p. 6553-62.
212. Rutkowski, D.T., et al., Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biol*, 2006. 4(11): p. e374.
213. Malhotra, J.D. and R.J. Kaufman, The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin Cell Dev Biol*, 2007. 18(6): p. 716-31.
214. Shearwin-Whyatt, L.M. and S. Kumar, Caspases in developmental cell death. *IUBMB Life*, 1999. 48(2): p. 143-50.
215. Kumar, S., Mechanisms mediating caspase activation in cell death. *Cell Death Differ*, 1999. 6(11): p. 1060-6.
216. Grossmann, J., et al., Induction of apoptosis before shedding of human intestinal epithelial cells. *Am J Gastroenterol*, 2002. 97(6): p. 1421-8.
217. Seimon, T.A., et al., Combinatorial pattern recognition receptor signaling alters the balance of life and death in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(52): p. 19794-9.
218. Woo, C.W., et al., Adaptive suppression of the ATF4-CHOP branch of the unfolded protein response by toll-like receptor signalling. *Nat Cell Biol*, 2009.
219. Martinus, R.D., et al., Selective induction of mitochondrial chaperones in response to loss of the mitochondrial genome. *Eur J Biochem*, 1996. 240(1): p. 98-103.
220. Yoneda, T., et al., Compartment-specific perturbation of protein handling activates genes encoding mitochondrial chaperones. *J Cell Sci*, 2004. 117(Pt 18): p. 4055-66.
221. Lenz, H., et al., Inhibition of cytosolic and mitochondrial creatine kinase by siRNA in HaCaT- and HeLaS3-cells affects cell viability and mitochondrial morphology. *Mol Cell Biochem*, 2007. 306(1-2): p. 153-62.
222. Ishikawa, F., et al., Gene expression profiling identifies a role for CHOP during inhibition of the mitochondrial respiratory chain. *J Biochem*, 2009. 146(1): p. 123-32.
223. Roediger, W.E., The colonic epithelium in ulcerative colitis: an energy-deficiency disease? *Lancet*, 1980. 2(8197): p. 712-5.
224. Werner, T., A. Shkoda, and D. Haller, Intestinal epithelial cell proteome in IL-10 deficient mice and IL-10 receptor reconstituted epithelial cells: impact on chronic inflammation. *J Proteome Res*, 2007. 6(9): p. 3691-704.
225. Balasubramanian, K., et al., Metabolism of the colonic mucosa in patients with inflammatory bowel diseases: an in vitro proton magnetic resonance spectroscopy study. *Magn Reson Imaging*, 2009. 27(1): p. 79-86.
226. Szabadkai, G. and R. Rizzuto, Participation of endoplasmic reticulum and mitochondrial calcium handling in apoptosis: more than just neighborhood? *FEBS Lett*, 2004. 567(1): p. 111-5.
227. Berridge, M.J., M.D. Bootman, and H.L. Roderick, Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. 4(7): p. 517-29.
228. Szabadkai, G., et al., Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *J Cell Biol*, 2006. 175(6): p. 901-11.
229. Sun, F.C., et al., Localization of GRP78 to mitochondria under the unfolded protein response. *Biochem J*, 2006. 396(1): p. 31-9.
230. Ran, Q., et al., Extramitochondrial localization of mortalin/mthsp70/PBP74/GRP75. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. 275(1): p. 174-9.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Das intestinale Immunsystem	11
Abb. 2:	Morbus Crohn und Colitis Ulzerosa	12
Abb. 3:	Signaltransduktion von Interleukin-10	16
Abb. 4:	TLR2- bzw. TLR4-vermittelte Signaltransduktion	23
Abb. 5:	ER-Stress assoziierte <i>unfolded protein response</i>	26
Abb. 6:	Experimenteller Aufbau zur Fragestellung	55
Abb. 7:	Histologische Analyse der in Paraffin eingebetteten Gewebestücke vom distalen Kolon der Wildtypmäuse und der TLR2-, TLR4-, IL-10-, IL-10XTLR2- und IL-10XTLR4-defizienten Mäuse	56
Abb. 8:	Reinheitskontrolle isolierter IEZ	57
Abb. 9:	Proteomanalyse der primären IEZ der TLR2 ^{-/-} bzw. TLR4 ^{-/-} Mäuse verglichen zu Wildtypmäusen zum Zeitpunkt von 1 Woche	59
Abb. 10:	Proteomanalyse der primären IEZ der TLR2 ^{-/-} bzw. TLR4 ^{-/-} Mäuse verglichen zu Wildtypmäusen zum Zeitpunkt von 8 Wochen	61
Abb. 11:	Proteomanalyse der primären IEZ der TLR2 ^{-/-} bzw. TLR4 ^{-/-} Mäuse verglichen zu Wildtypmäusen zum Zeitpunkt von 16 Wochen	63
Abb. 12:	Proteomanalyse der primären IEZ der IL-10XTLR2 ^{-/-} bzw. IL-10XTLR4 ^{-/-} Mäuse verglichen zu IL-10 ^{-/-} Mäusen zum Zeitpunkt von 1 Woche	65
Abb. 13:	Proteomanalyse der primären IEZ der IL-10XTLR2 ^{-/-} bzw. IL-10XTLR4 ^{-/-} Mäuse verglichen zu IL-10 ^{-/-} Mäusen zum Zeitpunkt von 8 Wochen	67
Abb. 14:	Proteomanalyse der primären IEZ der IL-10XTLR2 ^{-/-} bzw. IL-10XTLR4 ^{-/-} Mäuse verglichen zu IL-10 ^{-/-} Mäusen zum Zeitpunkt von 16 Wochen	69
Abb. 15:	Bibliosphere Analyse der regulierten Proteine	71
Abb. 16:	Experimenteller Aufbau zur Fragestellung	72
Abb. 17:	Histologische Analyse der in Paraffin eingebetteten Gewebestücke vom distalen Kolon der Wildtyp- und IL-10-defizienten Mäuse, mono- bzw. dualassoziert mit <i>E.faecalis</i> und/oder <i>E.coli</i> für 1 und 6 Wochen	73
Abb. 18:	Reinheitskontrolle isolierter IEZ	73
Abb. 19:	Proteomanalyse der primären IEZ von IEZ der IL-10 ^{-/-} Mäuse, verglichen zu Wildtypmäusen, assoziiert mit <i>E.faecalis</i> (6 Wochen)	75
Abb. 20:	Proteomanalyse der primären IEZ von IEZ der IL-10 ^{-/-} Mäuse, verglichen zu Wildtypmäusen, assoziiert mit <i>E.coli</i> (6 Wochen)	76

Abb. 21:	Proteomanalyse der primären IEZ von IEZ der IL-10 ^{-/-} Mäuse, verglichen zu Wildtypmäusen, assoziiert mit <i>E. faecalis</i> und <i>E. coli</i> (6 Wochen)	78
Abb. 22:	Bibliosphere Analyse der regulierten Proteine	79
Abb. 23:	Bibliosphere Gesamtanalyse der regulierten Proteine	81
Abb. 24:	Expression von Stress und Apoptose assoziierten Proteinen	83
Abb. 25:	Expression von Stress assoziierten Proteine	86
Abb. 26:	ER- und mitochondrialer Stress in der murinen Zelllinie Mode-K/IL-10R	88
Abb. 27:	ER- bzw. mitochondrialer Stress in der murinen Zelllinie Mode-K/IL-10R	89
Abb. 28:	Abbau der mitochondrialen Kreatinkinase unter ER-Stress	90
Abb. 29:	ChIP Analyse der Mode-K/IL-10R unter ER- und mitochondrialem Stress	92
Abb. 30:	ER-Stressantwort in Abwesenheit von Chaperonin 60	93
Abb. 31:	CHOP als mögliche Verbindung zwischen ER und mitochondrialem Stress	104

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1:	Häufig genutzte CED-Tiermodelle	17
Tab. 2:	Familie der TLR und deren Liganden	21
Tab. 3:	Protokoll der Real Time-PCR	41
Tab. 4:	Zusammensetzung der Sammelgele (Ansatz für zwei Gele)	47
Tab. 5:	Zusammensetzung der Trenngele (Ansatz für zwei Gele)	47
Tab. 6:	Verwendete Verdünnungen des jeweiligen Primärantikörpers	49
Tab. 7:	Programmabfolge der Isoelektrischen Fokussierung	50
Tab. 8:	Übersicht der regulierten Proteine aus IEZ der TLR2 ^{-/-} Mäuse verglichen zu Wildtypmäusen zum Zeitpunkt von 1 Woche	60
Tab. 9:	Übersicht der regulierten Proteine aus IEZ der TLR4 ^{-/-} Mäuse verglichen zu Wildtypmäusen zum Zeitpunkt von 1 Woche	60
Tab. 10:	Übersicht der regulierten Proteine aus IEZ der TLR2 ^{-/-} Mäuse verglichen zu Wildtypmäusen zum Zeitpunkt von 8 Wochen	61
Tab. 11:	Übersicht der regulierten Proteine aus IEZ der TLR4 ^{-/-} Mäuse verglichen zu Wildtypmäusen zum Zeitpunkt von 8 Wochen	62
Tab. 12:	Übersicht der regulierten Proteine aus IEZ der TLR2 ^{-/-} Mäuse verglichen zu Wildtypmäusen zum Zeitpunkt von 16 Wochen	64
Tab. 13:	Übersicht der regulierten Proteine aus IEZ der TLR4 ^{-/-} Mäuse verglichen zu Wildtypmäusen zum Zeitpunkt von 16 Wochen	64
Tab. 14:	Übersicht der regulierten Proteine aus IEZ der IL-10XTLR2 ^{-/-} Mäuse verglichen zu IL-10 ^{-/-} Mäusen zum Zeitpunkt von 1 Woche	66
Tab. 15:	Übersicht der regulierten Proteine aus IEZ der IL-10XTLR4 ^{-/-} Mäuse verglichen zu IL-10 ^{-/-} Mäusen zum Zeitpunkt von 1 Woche	66
Tab. 16:	Übersicht der regulierten Proteine aus IEZ der IL-10XTLR2 ^{-/-} Mäuse verglichen zu IL-10 ^{-/-} Mäusen zum Zeitpunkt von 8 Wochen	67
Tab. 17:	Übersicht der regulierten Proteine aus IEZ der IL-10XTLR4 ^{-/-} Mäuse verglichen zu IL-10 ^{-/-} Mäusen zum Zeitpunkt von 8 Wochen	68
Tab. 18:	Übersicht der regulierten Proteine aus IEZ der IL-10XTLR2 ^{-/-} Mäuse verglichen zu IL-10 ^{-/-} Mäusen zum Zeitpunkt von 16 Wochen	70
Tab. 19:	Übersicht der regulierten Proteine aus IEZ der IL-10XTLR4 ^{-/-} Mäuse verglichen zu IL-10 ^{-/-} Mäusen zum Zeitpunkt von 16 Wochen	70
Tab. 20:	Übersicht der regulierten Proteine aus IEZ der IL-10 ^{-/-} Mäuse, verglichen zu Wildtypmäusen, assoziiert mit <i>E.faecalis</i> (6 Wochen)	75
Tab. 21:	Übersicht der regulierten Proteine aus IEZ der IL-10 ^{-/-} Mäuse, verglichen zu Wildtypmäusen, assoziiert mit <i>E.coli</i> (6 Wochen)	77

Tab. 22: Übersicht der regulierten Proteine aus IEZ der IL-10^{-/-} Mäuse,
verglichen zu Wildtypmäusen, assoziiert mit *E.faecalis* und *E.coli*
(6 Wochen)

78

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

-/-	defizient
2D-PAGE	Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese
APS	Ammoniumpersulfat
ARE	<i>antioxidant response elements</i>
ASK	<i>apoptosis signal-regulating kinase</i>
ATF	<i>activating transcription factor</i>
ATP	Adenosintriphosphat
B.	<i>Bifidobacterium</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CARD15	<i>caspase recruitment domain family member 15</i>
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CHOP	<i>CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein</i>
ClpP	<i>caseinolytic protease</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSS	<i>dextran sodium sulphate</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E.faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>)
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure (<i>Ethylene Glycol Tetraacetic Acid</i>)
eIF	<i>eukaryotic translation initiation factor</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
ERSE	<i>ER-stress response elements</i>
FCCP	p-Trifluoromethoxyphenylhydrazon
FCS	Fötales Kälberserum (<i>Fetal Calf Serum</i>)
GADD	<i>growth-arrest DNA damage gene</i>
GALT	<i>gut-associated lymphoid tissue</i>
grp	<i>glucose-related protein</i>
HCCA	<i>alpha-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid</i>
HBD	<i>human beta defensins</i>

IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEZ	intestinale Epithelzellen
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-10R	IL-10 Rezeptor
IP-10	IFN <i>inducible protein 10</i>
IP ₃ R	<i>inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor</i>
IRE	<i>inositol requiring enzyme</i>
IRF	IFN <i>regulatory factor</i>
IRAK	IL-1 <i>receptor associated kinase</i>
JAK	<i>receptor-associated Janus kinase</i>
JNK	<i>cJun N-terminal kinase</i>
KBE	Koloniebildende Einheiten
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>leucine-rich repeats</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted-laser desorption ionisation time of flight</i>
MALT	<i>mucosa-associated lymphoid tissue</i>
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MS	Massenspektrometrie
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response protein 88</i>
NRF	<i>nuclear respiratory factor</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor- κB</i>
NOD2	<i>nucleotide-binding oligomerization domain 2</i>
OTC	Ornithin-Transcarbamylase
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	Phosphatpuffer (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PERK	<i>pancreatic ER kinase-like ER-associated kinase</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
SBE	<i>STAT-binding elements</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid</i>)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SPF	spezifisch-pathogenfrei
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>

TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAK	TGF β - <i>activated kinase</i>
TANK	TRAF- <i>family-member-associated NF-κB activator</i>
TBK	<i>TANK-binding kinase</i>
TGF β	transforming growth factor β
TIR	Toll/Interleukin 1 Rezeptor
TIRAP	<i>TIR domain-containing adaptor protein</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TRAF	<i>TNF-receptor-associated factor</i>
TRAM	<i>TRIF related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN-β</i>
Tyr	<i>tyrosine kinase</i>
UPR	<i>unfolded protein response</i>
UPRE	<i>UPR elements</i>
VDAC	<i>voltage-dependent anion channel</i>
XBP	<i>X-box binding protein</i>

DANKSAGUNG

Mein erster Dank gilt Prof. Dirk Haller für seine stets offene Tür für wissenschaftliche Diskussionen und Anregungen, für die hervorragende Laborausstattung, die überragende finanzielle Unterstützung und seinen nie endenden Enthusiasmus.

Herrn Prof. Siegfried Scherer danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Frau Prof. Hannelore Daniel bedanke ich mich für die Übernahme des Vorsitzes in der Prüfungskommission und die Nutzung und die überaus freundliche Unterstützung bei der Benutzung der MALDI-TOF MS.

Für die Bereitstellung der verschiedenen Mausmodelle und der sehr guten Zusammenarbeit möchte ich mich besonders bei Prof. Stefan Bereswill und Dr. André Fischer aus Berlin und Prof. Balfour Sartor aus Chapel Hill bedanken. An dieser Stelle ein ebenso wichtiger Dank an alle 206 Mäuse, die für diese Arbeit ihre Leben lassen mussten.

Pedro Ruiz, Anna Shkoda, Micha Hoffmann, Tanja Werner, Gabi Hörmannspenger, Eva Rath, Thomas Clavel (ohne Zopf wäre der Mittwoch nur halb so schön), Katharina Rank, Marie Anne von Schillde, Natalie Steck, Emanuel Berger, Nico Gebhardt (Dy-na-moo!!), Katharina Heller, Benjamin Tiemann, Ingrid Schmöller, Sigrid Kisling, Job Mapesa, Susan Chang, Silvia Pitariu, Pia Baur, Stefan Wagner, Lisa Gruber, Anna Zhenchuk, Sonja Böhm und Brita Sturm....

.....Danke für die regen Diskussionen während der koffeinhaltigen und lustigen Pausen, für die Unterstützung bei Problemen aller Art und für die unterhaltsamen Abende; ob bei Sushi oder Burger, Cocktail oder Bier.

Bei meinen drei Masterstudentinnen Silke, Julia und Andrea bedanke ich mich für ihre ausgezeichnete Arbeit. Ein Dankeschön auch an alle Personen bzw. Institute, mit denen ich während dieser Arbeit eine hervorragende Zusammenarbeit hatte.

Mit einer dicken Umarmung möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken, insbesondere bei Anja & Tanja, Susi & Anni. Danke, dass ich euch zu meinen Freunden zählen kann.

Zuletzt bedanke ich mich bei meiner lieben Familie; auf dessen Unterstützung ich in Guten wie in Schlechten Zeiten zählen kann!!

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Messlik
Vorname: Anja
Geburtsdatum: 15.07.1980
Geburtsort: Dresden

Schulbildung

09/87 – 07/92 119. Polytechnische Oberschule in Dresden
09/92 – 07/99 Erich-Wustmann-Gymnasium in Dresden

Hochschulausbildung

10/99 – 03/05 Biologiestudium an der Justus-Liebig-Universität Gießen
05/05 – 12/09 Promotion am Lehrstuhl für Biofunktionalität der Lebensmittel
(TU München)

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Unterschrift