

Untersuchungen zur Funktion enterischer Gliazellen bei der Vermittlung der angeborenen Immunantwort

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von: Anja Schnabel

geboren am: 05.05.1984 in Meißen

angefertigt am: Universitätsklinikum Leipzig

Department für Innere Medizin, Neurologie und Dermatologie

Fachbereich Internistische Intensivmedizin

Klinik und Poliklinik für Gastroenterologie und Rheumatologie

Betreuer: Prof. Dr. med. Lothar Engelmann

PD Dr. med. habil. Matthias Pierer

Dr. med. Eike Hollenbach

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 22.07.2014

Meiner Familie gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

	Bibliographische Beschreibung	
	Abkürzungsverzeichnis	
	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	
1	Einleitung	1
1.1	Die Darmbarriere	1
1.2	Die Rezeptoren der angeborenen Immunantwort	3
1.3	Der IKK / NF- κ B-Signalweg	6
1.4	Die Bedeutung der enterischen Gliazellen in der intestinalen Immunabwehr ...	8
2	Zielstellung	10
3	Material	11
3.1	Geräte	11
3.2	Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	12
3.3	Stimulanzien	13
3.4	Primer	14
3.5	Antikörper und Kits	14
4	Methoden	16
4.1	Zellkultur	16
4.1.1	Isolierung von enterischen Gliazellen	16
4.1.2	Kultivierung von enterischen Gliazellen	17
4.1.3	Bestimmung der Zellzahl und Vitalität mit Trypanblaufärbung	18
4.1.4	Einfrieren und Revitalisieren von enterischen Gliazellen	18
4.1.5	Zellstimulation	18
4.2	Molekularbiologische Methoden	19
4.2.1	RNA-Isolierung aus enterischen Gliazellen	19
4.2.2	RNA-Qualitätskontrolle mittels Agarose-Gelelektrophorese	20
4.2.3	DNase Verdau und cDNA-Synthese mittels Reverser Transkription ...	21
4.2.4	Primerdesign	22
4.2.5	Polymerase-Kettenreaktion	22
	4.2.5.1 Quantitative Standard PCR	23
	4.2.5.2 <i>Real-time</i> PCR	24
	4.2.5.3 cDNA-Mikroarray	25

4.3	Proteinbiochemische Methoden	27
4.3.1	Gesamtproteinextraktion aus enterischen Gliazellen	27
4.3.2	Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration	27
4.3.3	Westernblot	28
4.3.3.1	Gelelektrophorese	29
4.3.3.2	Transfer auf die PVDF-Membran	29
4.3.3.3	Antikörper und Proteindetektion	30
4.3.3.4	Stripping und Ladekontrolle	30
4.3.4	Extraktion nukleärer Proteine	31
4.3.5	Bestimmung der Zellkern- und Zytoplasmaproteinkonzentration	32
4.3.6	Transkriptionsfaktorassay	32
4.4	Statistische Analyse	34
5	Ergebnisse	35
5.1	Expression von <i>Toll-like</i> - und <i>NOD</i> -Rezeptoren der angeborenen Immunantwort in nativen enterischen Gliazellen	35
5.2	Einfluss exogener Stimuli auf die mRNA-Expression von Rezeptoren der angeborenen Immunantwort	38
5.2.1	mRNA-Expression der <i>Toll-like</i> -Rezeptoren und CD 14	38
5.2.2	mRNA-Expression der <i>NOD</i> -Rezeptoren	42
5.3	Expression von intrazellulären Signaltransduktionsmolekülen in enterischen Gliazellen nach TLR-Aktivierung auf mRNA-Ebene	44
5.4	Einfluss TLR-spezifischer Liganden auf die Proteinexpression von Rezeptoren der angeborenen Immunantwort	46
5.4.1	Expression der <i>Toll-like</i> -Rezeptoren auf Proteinebene	47
5.4.2	Expression von RICK nach Exposition mit LPS auf Proteinebene	49
5.5	Analyse des IKK / NF- κ B-Signalweges in enterischen Gliazellen	50
5.5.1	Regulation des I κ B-Kinase-Komplexes und I κ B auf mRNA-Ebene	50
5.5.2	Regulation der NF- κ B Dimere auf mRNA-Ebene	51
5.5.3	Degradierung von I κ B- α nach Aktivierung durch LPS	54
5.5.4	Einfluss pro-inflammatorischer Zytokine auf die DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B im Zellkern	55
5.6	Expression von Interleukinen und Chemokinen in enterischen Gliazellen	57
6	Diskussion	61
6.1	Gegenstand der vorliegenden Arbeit	61
6.2	Funktionelle Analyse der Rezeptoren der angeborenen Immunantwort in enterischen Gliazellen	63
6.3	Die intrazelluläre Signaltransduktion über IKK / NF- κ B in enterischen Gliazellen	71
6.4	Enterische Gliazellen besitzen die Immunkompetenz zur Expression von Interleukinen, TNF- α und Chemokinen	75

6.5	Enterische Gliazellen als Schnittstelle zwischen der angeborenen und erworbenen Immunantwort.	78
6.6	Die Bedeutung der enterischen Gliazellen in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.	80
6.7	Ausblick	83
7	Zusammenfassung	85
8	Literaturverzeichnis	88

Eigenständigkeitserklärung

Lebenslauf

Danksagung

Bibliographische Beschreibung

Schnabel, Anja

Untersuchungen zur Funktion enterischer Gliazellen bei der Vermittlung der angeborenen Immunantwort

Universität Leipzig, Dissertation

97 Seiten, 168 Literaturangaben, 22 Abbildungen, 26 Tabellen

Referat

Die Gliazellen des enterischen Nervensystems galten lange Zeit lediglich als Packmaterial der Neuronen. Erst in den letzten Jahren rückte dieser Zelltyp in das Interesse der Forschung, weil mehrere Studien eine Schlüsselrolle bei der Erhaltung der Darmwandintegrität postulierten. Da bisher wenig über die immunphysiologischen Eigenschaften der enterischen Gliazellen bekannt war, wurde in dieser Arbeit deren Bedeutung bei der angeborenen intestinalen Immunantwort untersucht. Hierfür wurden Primärkulturen von enterischen Gliazellen eingesetzt, welche aus dem Plexus myentericus adulter Ratten stammten. Es wurde erstmalig nachgewiesen, dass enterische Gliazellen über *Toll-like*- und *NOD*-Rezeptoren (TLR 2, TLR 4, TLR 6, TLR 7, TLR 9, NOD 1, NOD 2) pathogene bakterielle Muster (*PAMPs*) erkennen. Dabei zeigte sich, dass eine enge Vernetzung zwischen den *Toll-like*-Rezeptoren besteht. Einerseits findet eine Liganden-spezifische Regulierung der *Toll-like*-Rezeptoren statt, andererseits beeinflussen TLR-spezifische Liganden die mRNA-Expression weiterer *Toll-like*-Rezeptoren. In der Analyse der intrazellulären Signalweiterleitung konnte die Existenz verschiedener Adaptor- und Interaktionsmoleküle wie RICK und Myd88 sowie der IKK / NF- κ B-Signalweg mit Degradierung von I κ B- α nach Aktivierung durch LPS belegt werden. Aktivierte enterische Gliazellen sind eine Quelle für pro- und anti-inflammatorische Interleukine (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12), TNF- α und Chemokine (Ccl-2, Cxcl-9, Cxcl-10). Sie können somit weitere immunkompetente Zellen rekrutieren und agieren vermutlich als Schnittstelle zwischen der angeborenen und erworbenen Immunantwort. Die Ergebnisse dieser Arbeit implizieren, dass es sich bei enterischen Gliazellen um einen zusätzlichen immunregulatorischen Zelltyp im Darm handelt, welcher aktiv bei der angeborenen Immunabwehr mitwirkt. Neben pro-inflammatorischen Eigenschaften tragen enterische Gliazellen auch zur Darmprotektion während Entzündungsprozessen bei. Daraus ergibt sich eine komplexe Funktionalität der enterischen Gliazellen bei der immunologischen Homöostase im Darm.

Abkürzungsverzeichnis

AP-1	Aktivator Protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
BAFF	<i>B-cell-activating factor belonging to TNF family</i>
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
bidest.	bidestilliert
BLC	<i>B-lymphocyte chemoattractant</i>
BLP	bakterielles Lipoprotein
Bp	Basenpaare
CARD	<i>caspase recruitment domain</i>
Ccl	Chemokin (C-C Motiv) Ligand
cDNA	complementary DNA
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CpG	-C-Phosphat-G- (DNA-internes Dinukleotid)
Cxcl	Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand
CXCR	C-X-C Motiv-Chemokinrezeptor
d.h.	das heißt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay</i>
ENS	enterisches Nervensystem
ERK	extrazellulär regulierende Kinase
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Fsl-1	Fibroblasten-stimulierendes Lipopeptid-1
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDNF	<i>glial cell-derived neurotrophic factor</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GSNO	S-Nitrosoglutathion

Abkürzungsverzeichnis

h	Stunden
HCl	Salzsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
iE-DAP	<i>γ-D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid</i>
IFN	Interferon
IκB	<i>inhibitor of nuclear factor kappa-B</i>
IKK-α/-β	<i>inhibitor of nuclear factor kappa-B Kinase-Komplex</i>
IL-	Interleukin
IP-10	<i>interferon induced protein von 10 kDA</i>
IRAK	IL-1 Rezeptor assoziierte Kinase
IRF	<i>interferon regulatory transcription factor</i>
I-TAC	<i>interferon inducible T cell alpha chemoattractant</i>
JNK	c-Jun-NH ₂ -terminale Kinase
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>leucin-rich repeat</i>
LTβ-R	Lymphotoxin β-Rezeptor
MAL	<i>MyD88-adaptor-like protein</i>
MALP-2	Makrophagen-aktivierendes Lipopeptid-2
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein-1</i>
MD 2	Lymphozytenantigen 96
MDP	Muramyl-dipeptid
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MIG	<i>monokine induced by gamma-interferon</i>
min	Minuten
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Myd88	<i>myeloid differentiation primary-response gene</i>
NaCl	Natriumchlorid
NEMO	<i>NF-κB essential modulator</i> (Synonym IKK γ)
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NF-κB 1	Genbezeichnung für NF-κB (Proteinname p105 / p50)
NF-κB 2	Genbezeichnung für NF-κB (Proteinname p100 / p52)
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
NP-40	Nonidet P-40
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i> (krankheitsassoziierte molekulare Muster)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGN	Peptidoglykane
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid

Abkürzungsverzeichnis

RICK	<i>Rip-like interacting caspase-like apoptosis-regulatory protein kinase</i> (Synonym Rip2, CARDIAK, RIPK2)
Rel	Genbezeichnung für NF- κ B (Proteinname p65)
rRNA	ribosomale RNA
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEMED	Tetramethyldiamin
TGF- β 1	<i>transforming growth factor beta 1</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i> (Toll-ähnlicher Rezeptor)
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TICAM-1/ -2	<i>Toll-interleukin 1 receptor domain (TIR)-containing adaptor molecule-1/ -2</i>
TIR	Toll/ IL-1 Rezeptor Domäne
TRAF 6	TNF Rezeptor assoziierter Faktor 6
TRAM	<i>Toll-like receptor adaptor molecule</i> (Synonym TICAM-2)
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
UV	ultraviolett
V	Volt
ZNS	zentrales Nervensystem

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abbildung 1.1** Dünndarmaufbau als Querschnitt (a) und als Ausschnitt mit Darstellung der Darmbarriere (b)
- Abbildung 1.2** Schematische Darstellung des intrazellulären Signalweges NF- κ B über die Aktivierung von *Toll-like*- und *NOD*-Rezeptoren
- Abbildung 1.3** Der klassische und alternative NF- κ B-Signalweg
- Abbildung 1.4** Enterische Gliazellen
- Abbildung 4.1** Versuchsaufbau im Überblick
- Abbildung 4.2** RNA-Gelelektrophorese mit Darstellung der rRNA
- Abbildung 4.3** Nachweis der reinen Separation zytoplasmatischer (P) und nukleärer (N) Proteine anhand I κ B- α
- Abbildung 5.1** Nachweis von *Toll-like*-, *NOD*-Rezeptoren, RICK und CD 14 in nativen enterischen Gliazellen auf mRNA-Ebene
- Abbildung 5.2** Nachweis von *Toll-like*-, *NOD*-Rezeptoren und RICK in nativen enterischen Gliazellen und nach Exposition mit TLR 2- und TLR 4-Liganden auf Proteinebene
- Abbildung 5.3** mRNA-Expression von *Toll-like*-Rezeptoren und CD 14 nach Exposition mit TLR 2-, TLR 4- und TLR 9-Liganden in enterischen Gliazellen
- Abbildung 5.4** mRNA-Expression von *NOD*-Rezeptoren nach Exposition mit TLR 2-, TLR 4- und TLR 9-Liganden in enterischen Gliazellen
- Abbildung 5.5** mRNA-Expression von RICK nach Exposition mit TLR 2-, TLR 4- und TLR 9-Liganden in enterischen Gliazellen
- Abbildung 5.6** mRNA-Expression der intrazellulären Signaltransduktionsmoleküle nach Exposition mit TLR 2-, TLR 4- und TLR 9-Liganden in enterischen Gliazellen
- Abbildung 5.7** Zeitabhängige Proteinexpression der *Toll-like*-Rezeptoren, CD 14 und NOD 1 nach Exposition mit TLR-spezifischen Liganden in enterischen Gliazellen
- Abbildung 5.8** Zeitabhängige Proteinexpression von RICK nach Exposition mit LPS in enterischen Gliazellen
- Abbildung 5.9** mRNA-Expression von Komponenten des NF- κ B-Signalweges nach Stimulation mit TLR-Liganden in enterischen Gliazellen
- Abbildung 5.10** mRNA-Expression der NF- κ B Untereinheiten NF- κ B 1, p65 und c-Rel nach Stimulation mit TLR-Liganden in enterischen Gliazellen
- Abbildung 5.11** mRNA-Expression von NF- κ B 1 nach Stimulation mit LPS und pro-inflammatorischen Zytokinen in enterischen Gliazellen
- Abbildung 5.12** Degradierung von I κ B- α nach Aktivierung von TLR 4 durch LPS in enterischen Gliazellen

- Abbildung 5.13** DNA-Bindungsaktivität der NF- κ B Untereinheiten nach Stimulation mit LPS und pro-inflammatorischen Zytokinen an Zellkernextrakten von enterischen Gliazellen
- Abbildung 5.14** Einfluss der TLR 2-, TLR 4- und TLR 9-Liganden auf die mRNA-Expression von Interleukinen, Chemokinen und TNF- α in enterischen Gliazellen
- Abbildung 5.15** Einfluss von LPS und pro-inflammatorischen Zytokinen auf die mRNA-Expression von IL-6, dessen Rezeptor IL-6 R und Cxcl-9 in enterischen Gliazellen
-
- Tabelle 1.1** Zusammensetzung der NF- κ B Untereinheiten
- Tabelle 3.1** Geräte
- Tabelle 3.2** Verbrauchsmaterialien
- Tabelle 3.3** Chemikalien
- Tabelle 3.4** Stimulanzen
- Tabelle 3.5** Primersequenzen
- Tabelle 3.6** Primäre Antikörper
- Tabelle 3.7** Sekundäre Antikörper
- Tabelle 3.8** Reaktionssysteme
- Tabelle 4.1** Zusammensetzung des Kulturmediums
- Tabelle 4.2** Stimulationszeiträume
- Tabelle 4.3** Stimulanzen
- Tabelle 4.4** Zusammensetzung des 2 % Agarosegels
- Tabelle 4.5** Zusammensetzung des 25 x TAE-Puffers (pH 8,5)
- Tabelle 4.6** DNase Verdau
- Tabelle 4.7** cDNA-Synthese Ansatz
- Tabelle 4.8** Mastermix für einen PCR-Ansatz
- Tabelle 4.9** Reaktionsschritte der PCR
- Tabelle 4.10** SYBR Green Mastermix für *Real-time* PCR
- Tabelle 4.11** Mastermix für cDNA-Mikroarray
- Tabelle 4.12** Lysepuffer für die Gesamtproteinextraktion
- Tabelle 4.13** Puffer für Westernblot
- Tabelle 4.14** Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele
- Tabelle 4.15** Puffer für die Extraktion nukleärer Proteine
- Tabelle 4.16** TransAM Transkriptionsfaktorassay NF- κ B
- Tabelle 4.17** Puffer für den Transkriptionsfaktorassay NF- κ B

1 Einleitung

1.1 Die Darmbarriere

Mit einer Oberfläche von ca. 200 m² bildet der Darm die größte Kontaktfläche zur Außenwelt im menschlichen Körper. Die Darmschleimhaut baut sich aus einer einschichtigen Epithelzellschicht, einer Bindegewebs- und Muskelschicht auf (Abbildung 1.1) und ist für die Resorption von Nahrungsbestandteilen, Wasser und Elektrolyten aus dem Darminhalt zuständig (Ashida et al., 2012). Neben der Nahrung befindet sich im Darmlumen die physiologische Darmflora mit ca. 100 Trillionen Bakterien, die für die Verdauung dringend notwendig ist (Goto und Kiyono, 2012). Das Nebeneinander einer Vielzahl harmloser Antigene der Nahrung und der normalen Darmflora einerseits, pathogene Mikroorganismen und toxische Substanzen andererseits, erfordern eine ausgesprochen differenzierte Antwort des intestinalen Immunsystems. Die Hauptaufgabe des Darm-assoziierten Immunsystems besteht also darin, zwischen pathogenen (fremden) und harmlosen Mikroorganismen zu unterscheiden. Dazu ist es nicht ausreichend, das Eigene prinzipiell als gut einzustufen und alles Fremde als gefährlich anzusehen. Beispielsweise stellt die Nahrung im Darm als körperfremde Substanz keine Gefahr für den menschlichen Körper dar und sollte nicht angegriffen werden. Geschieht dies dennoch, können Nahrungsmittelunverträglichkeiten oder Allergien entstehen. Hingegen muss die Darmschleimhaut in der Lage sein, das Eindringen potentiell gefährlicher Mikroorganismen über das Darmlumen nach innen effektiv zu verhindern. Hierfür steht ein mehrstufiges Barriersystem im Darm zur Verfügung (Abbildung 1.1): die luminale Darmflora, die Mucusschicht (Schleim), die intakte Epithelzellschicht und das intestinale Immunsystem (Ashida et al., 2012). Die luminale Darmflora hat neben digestiven Funktionen Einfluss auf die Epithelzellproliferation sowie die intestinale Immunabwehr und konkurriert mit pathogenen Mikroorganismen um die Kolonisation im Darmlumen (Lupp et al., 2007; Stecher und Hardt, 2011). Als nächste Schutzbarriere ist das intestinale Epithel von einer dicken Schleimschicht (Mucus) überzogen, die bioaktive Moleküle wie Muzin, Glykoproteine, antimikrobielle Peptide und sekretorisches IgA enthält (McGuckin et al., 2011). Die Epithelzellschicht spielt eine essentielle Rolle als mechanische Barriere mit engen Zell-Zellverbindungen über *tight junctions*, was die Translokation von Bakterien in die subepithelialen Schichten verhindern soll. Zudem übernehmen diese Zellen neben der Detektion von Antigenen, der Sekretion anti-mikrobieller Stoffe und der Initiierung der Immunantwort weitere immunologische Funktionen (Artis, 2008). Die Störung dieses Barriersystems führt zur Invasion von pathogenen und

kommensalen Bakterien. Dadurch kann es über Entzündungsprozesse zur Zerstörung des Verdauungstraktes mit nachfolgender Infektion oder zur Entwicklung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen kommen.

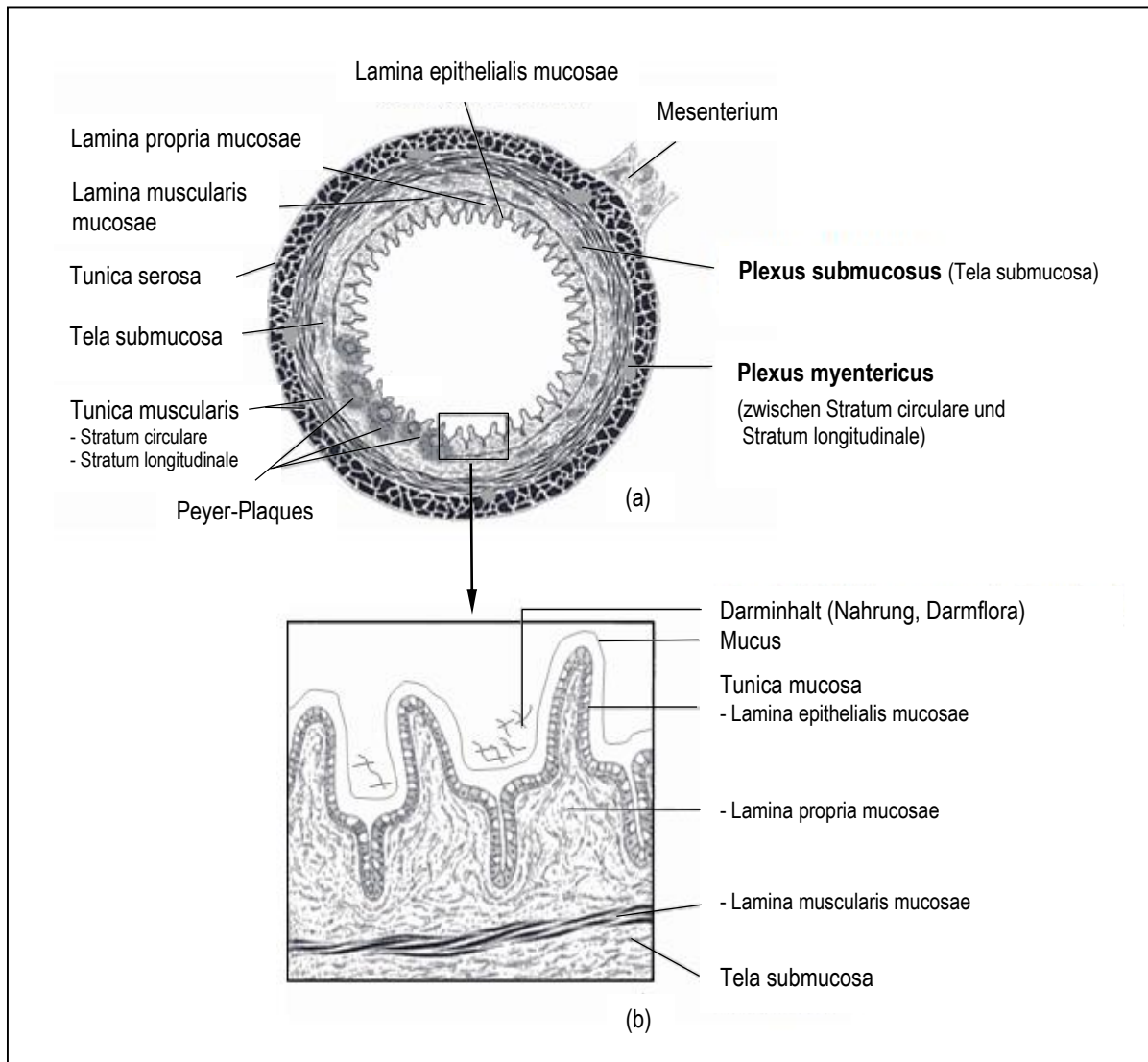


Abbildung 1.1 Dünndarmaufbau als Querschnitt (a) und als Ausschnitt mit Darstellung der Darmbarriere (b) (modifiziert nach Linß et al., 1998)

1.2 Die Rezeptoren der angeborenen Immunantwort

Das angeborene Immunsystem stellt ein evolutionär altes und hochkonserviertes Abwehrsystem dar, welches in fast allen mehrzelligen Organismen zu finden ist (Hoffmann et al., 1999; Fearon und Locksley, 1996). Es dient im Darm als Schutzbarriere gegen die darmeigene Mikroflora und eindringende pathogene Bakterien (Medzhitov und Janeway, 1997). So hängt die Homöostase im Darm von der Balance der aktiven Immunabwehr, der Unterscheidung zwischen pathogenen und nicht-pathogenen Darmorganismen und der Interaktion verschiedener Zelltypen ab. Dazu zählen in den oberflächlichen Darmschichten die intestinalen Epithelzellen, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen (Rescigno et al., 2008). Im Fall einer Infektion koordinieren diese Zellen die frühe angeborene Immunantwort. Dabei wird eine kontrollierte Entzündungsreaktion angeschaltet, die in der Regel die eingedrungenen Erreger eliminiert. Es kann sich aber auch eine überschießende Entzündungsreaktion entwickeln, welche im weiteren Verlauf durch eine fehlregulierte Toleranz gegen die darmeigene Mikroflora zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen führt (Nenci et al., 2007). Die Erkennung fremder Mikroorganismen im Darm erfolgt über sogenannte krankheitsassoziierte molekulare Muster (*pathogen associated molecular patterns, PAMPs*). Diese werden durch spezifische Rezeptoren der angeborenen Immunantwort (*pattern recognition receptors, PRRs*) erkannt (Kawai und Akira, 2010; Akira et al., 2006; Medzhitov und Janeway, 1997). Da sich die *PAMPs* nur auf Mikroben und nicht auf wirtseigenen Zellen befinden, ist normalerweise die Unterscheidung zwischen pathogenen fremden und nicht-pathogenen eigenen Strukturen möglich. Zu den *PRRs* der angeborenen Immunantwort gehören zum einen die Membran-gebundenen *Toll-like-Rezeptoren (TLR)*, welche für die Erkennung von extrazellulären Mikroben verantwortlich sind (Beutler et al., 2003; Takeda und Akira, 2005). Zum anderen zählen hierzu die zytoplasmatischen *NOD-Rezeptoren*. *NOD-Rezeptoren* kooperieren über ihre *CARD-Domäne* mit *RICK* und sind somit für die Signalweiterleitung von intrazellulären pathogenen Strukturen (wie *MDP*, *iE-DAP*) verantwortlich (Inohara et al., 2002).

Toll-like-Rezeptoren sind Transmembranmoleküle. Sie bestehen aus einer extrazellulären leucinreichen Domäne (*leucine-rich repeat [LRR] domain*) und einem zytoplasmatischen Teil, welcher dem Interleukin-1 Rezeptor (*Toll / IL-1 receptor [TIR] domain*) ähnelt. Wie der Abbildung 1.2 zu entnehmen ist, erkennen *Toll-like-Rezeptoren* mittels ihrer extrazellulären Domäne selektiv Bakterienkomponenten, nachdem Pathogene die Epithelbarriere durchbrochen haben. Beispielsweise werden bakterielle Lipoproteine (*BLP*) und Peptidoglykane (*PGN*) von grampositiven Bakterien über *TLR 2* oder *CpG* enthaltene bakterielle DNA über *TLR 9* erkannt. Während die meistens *Toll-like-*

Rezeptoren als Homodimere funktionieren, bildet TLR 2 Heterodimere mit TLR 1 oder TLR 6 (Abbildung 1.2). Der *Toll-like*-Rezeptor 4 benötigt Effektormoleküle, um einen funktionierenden Rezeptorkomplex zu bilden. So erkennt TLR 4 seinen spezifischen Liganden LPS, ein Lipopolysaccharid aus der Zellwand gramnegativer Bakterien, nur im Komplex mit dem LPS-bindenden Protein (LBP), dem Zelloberflächen-Glykoprotein CD 14 und dem Lymphozytenantigen 96 (MD 2). Die Aktivierung der zytosmatischen Toll / IL-1 R Domäne der *Toll-like*-Rezeptoren über extrazelluläre Signale induziert die Rekrutierung von intrazellulären Adaptorproteinen. Bei der intrazellulären Signalweiterleitung wird im Allgemeinen zwischen einem Myd88-abhängigen und Myd88-unabhängigen Weg unterschieden. Beim Ersten werden weitere Interaktionsmoleküle, wie IRAK (Interleukin-1 Rezeptor assoziierte Kinase) und TRAF 6 (TNF Rezeptor assoziierte Faktor 6), für die Aktivierung weiterer Kinasen benötigt (Beutler et al., 2003; Cao et al., 1996; Wesche et al., 1997; Aderem et al., 2000). Dies führt - wie in der Abbildung 1.2 dargestellt - über die Translokation von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B in den Zellkern zur Freisetzung von inflammatorischen Interleukinen und Chemokinen und damit zur Rekrutierung von immunkompetenten Zellen. Dieser Signalweg wird von den meisten *Toll-like*-Rezeptoren (TLR 2 bis 9, mit Ausnahme von TLR 3) bestritten. Der *Toll-like*-Rezeptor TLR 4 (und TLR 3) verfolgt zudem den Myd88-unabhängigen Weg der Signalvermittlung. Hierfür werden die Adaptorproteine TRIF (*TIR-domain-containing adaptor inducing IFN β*) und TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) benötigt (O'Neill und Bowie, 2007). Über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 erfolgt die Freisetzung von Interferon β (Yamamoto et al., 2003 a und b, Takeda und Akira, 2005).

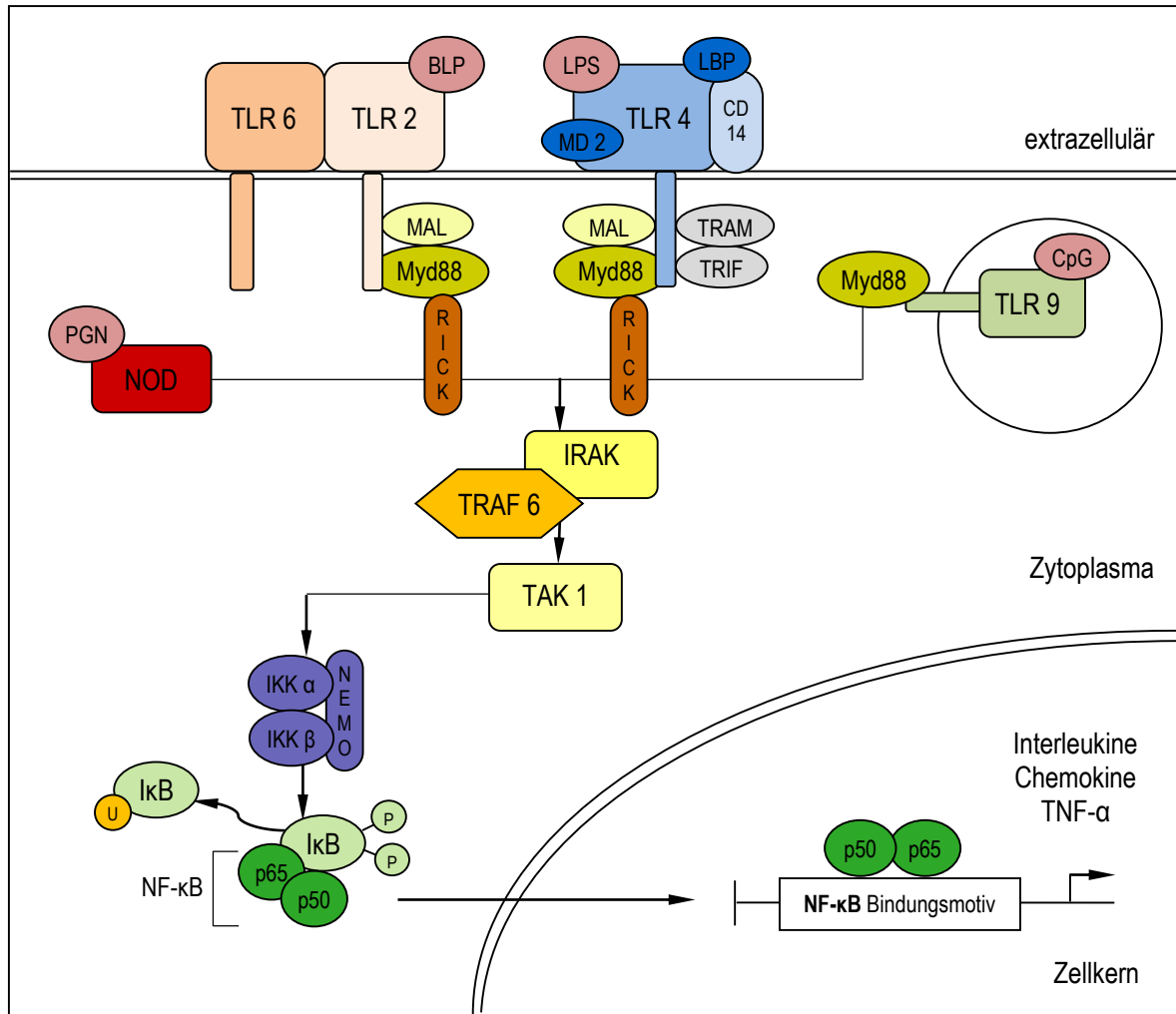


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung des intrazellulären Signalweges NF-κB über die Aktivierung von Toll-like- und NOD-Rezeptoren (modifiziert nach O'Neill und Bowie, 2007; Dixit und Mak, 2002).

TLR, Toll-like-Rezeptor; NOD, Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein; BLP, bakterielles Lipoprotein; LPS, Lipopolysaccharid; CpG, CpG Oligonukleotid; PGN, Peptidoglykan; MD 2, Lymphozyten-Antigen 96; CD 14, cluster of differentiation 14; LBP, Lipopolysaccharid-bindendes Protein; Myd88, myeloid differentiation primary-response gene 88; MAL, Myd88-adaptor-like protein; TRAM, Toll-like receptor adaptor molecule; TRIF, TIR-domain-containing adaptor protein including IFN-β; RICK, Receptor-interacting serine / threonine-protein kinase 2; IRAK, IL-1-receptor associated kinase; TRAF 6, TNF-receptor-associated factor 6; TAK 1, TGF-β-activated protein kinase 1; IKK, inhibitor of NF-κB kinase; NEMO, NF-κB essential modulator; IκB, inhibitor of NF-κB; NF-κB, nuclear factor-κB mit den Untereinheiten p50 / p65, NF-κB Untereinheiten; U, Ubiquitinierung

1.3 Der IKK / NF- κ B-Signalweg

NF- κ B ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor für die Induktion von Genen, welche die angeborene und erworbene Immunantwort vermitteln (Karin et al., 2002). Zudem spielt NF- κ B eine Schlüsselfunktion für die pro-inflammatorische Immunantwort bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Schreiber et al., 1998).

Die Aktivierung von NF- κ B erfolgt durch verschiedene pro-inflammatorische und Stress-assoziierte Stimuli. Dazu gehört zum einen die Stimulation über bakterielle Toxine, wie beispielsweise Lipopolysaccharide oder virale Produkte, die über *Toll-like*- und *NOD*-Rezeptoren vermittelt werden. Zum anderen erfolgt eine direkte Stimulation von NF- κ B durch Zytokine, UV-Licht und freie Sauerstoffradikale (Karin et al., 2000). Das NF- κ B System setzt sich aus funktionellen Homo- und Heterodimeren zusammen, welche gebunden an das inhibitorische I κ B-Protein im Zytoplasma zurückgehalten werden (Dixit und Mak, 2002; Baeuerle und Baltimore, 1989). Dazu gehören folgende fünf NF- κ B Proteine: NF- κ B 1 (p50 mit dem Präkursor p105), NF- κ B 2 (p52 mit dem Präkursor p100), Rel A (p65), Rel B und c-Rel. Allen NF- κ B Proteinen ist eine *Rel Homology Domain* am N-terminalen Ende gemein. Diese ist für die Dimerisierung, die DNA-Bindung und die Interaktion mit dem I κ B-Protein zuständig und enthält die NF- κ B Kern-Lokalisations-Sequenz 5'-GGGACTTCC-3'. Im Gegensatz zu p105 und p100, welche posttranslational zu p50 und p52 prozessiert werden, besitzen RelA (p65), RelB und c-Rel zusätzlich eine Transkriptionsaktivierungsdomäne (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1 Zusammensetzung der NF- κ B Untereinheiten (May et al., 1997; Bonizzi et al., 2004)

Rel-Proteine	Größe [kDa]	Precursor I κ B-Protein	Transkriptions-aktivator	NF- κ B Signalweg
p50 (NF- κ B 1)	50	p105	nein	klassisch
p52 (NF- κ B 2)	52	p100	nein	alternativ
p65 (Rel A)	65		ja	klassisch
Rel B	68		ja	alternativ
c-Rel	69		ja	klassisch

In *Knock-out* Studien wurden unterschiedliche Funktionen in der Transkriptionsaktivierung durch Rel-Proteine beschrieben. So wirkt p50 / p65 aufgrund der Beteiligung von p65 im Heterodimer aktivierend auf die Transkription von Genen, während Homodimere aus p50 (NF- κ B 1) oder p52 (NF- κ B 2) - aufgrund des Fehlens einer Transaktivierungsdomäne - die Transkription hemmen können (Baeuerle und Baltimore, 1989; Karin et al., 2000; Ghosh et al., 1998).

Im Allgemeinen wird zwischen dem klassischen und dem alternativen NF- κ B-Signalweg unterschieden. Im klassischen NF- κ B-Signalweg kommt es über die Aktivierung des I κ B-Kinase-Komplexes, bestehend aus den katalytischen Untereinheiten IKK- α und IKK- β sowie der regulatorischen Untereinheit IKK- γ (auch NEMO genannt), zur Degradierung von I κ B- α (Abbildung 1.2) (Bonizzi et al., 2004). Die Aktivierung des I κ B-Kinase-Komplexes (IKK) führt zur Phosphorylierung und Polyubiquitinierung von I κ B- α , wodurch I κ B- α für die proteolytische Degradierung im 26 S Proteasom markiert wird. Das ungebundene NF- κ B Dimer, meist bestehend aus p50 / p65 (RelA), kann nun über das demaskierte nukleäre Lokalisationssignal in den Zellkern wandern und an die spezifische DNA-Sequenz seines Zielgenes binden (Bonizzi et al., 2004). Der klassische Signalweg scheint wesentlich für die schnelle Aktivierung von NF- κ B bei Entzündungen, Infektionen und zellulärem Stress zu sein. Daher enthalten Gene für inflammatorische Zytokine, Akute-Phase-Proteine und Zell-Adhäsionsmoleküle κ B-Sequenzen in ihrer Promotorregion (Ghosh et al., 1998; Karin et al., 2000).

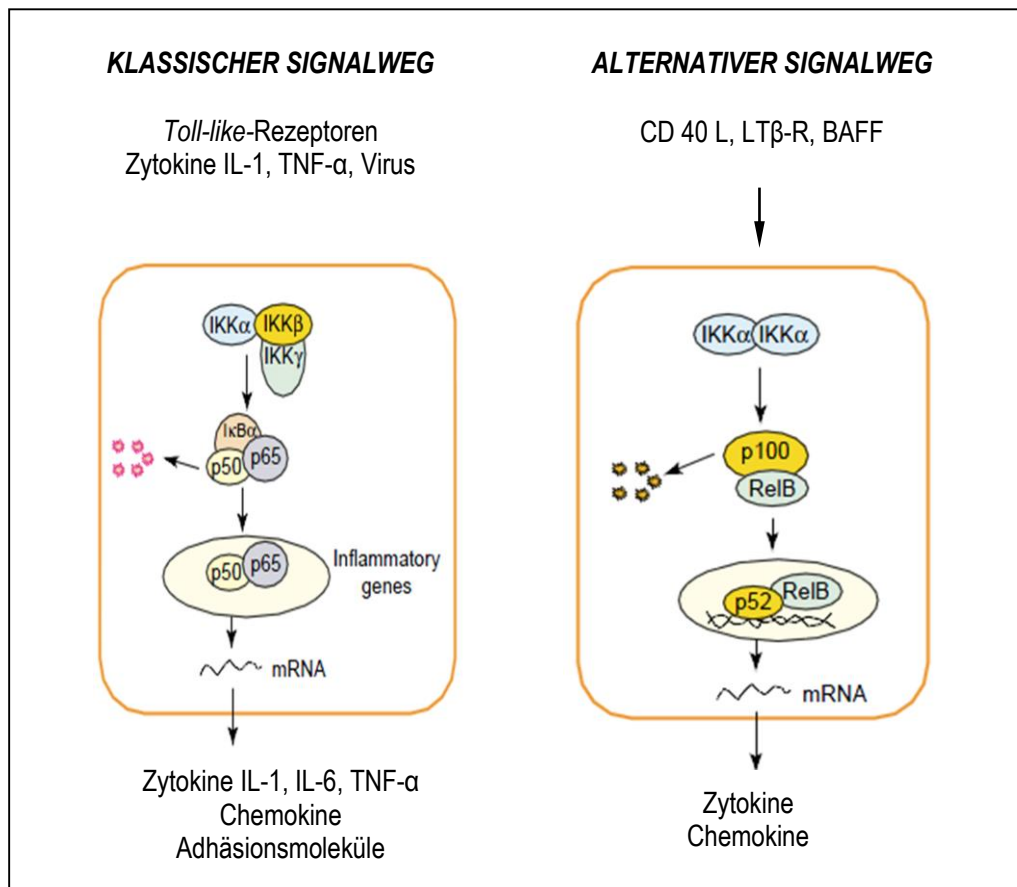


Abbildung 1.3 Der klassische und alternative NF- κ B-Signalweg (Bonizzi et al., 2004).

IKK, *inhibitor of NF- κ B kinase*; I κ B, *inhibitor of NF- κ B*; NF- κ B, nuclear factor- κ B mit den Untereinheiten p50, p65, p52 (mit dem Vorläuferprotein p100), Rel B; CD 40 L, CD 40 Ligand; LT β -R, Lymphotoxin β -Rezeptor; BAFF, *B-cell-activating factor belonging to TNF family*

Der alternative NF- κ B-Signalweg ist hingegen strikt von IKK- α Homodimeren abhängig (Senftleben et al., 2001). Er wird beispielsweise in B-Lymphozyten über den CD 40 Ligand (Coope et al., 2002) und in nicht-lymphatischen Zellen über Lymphotoxin- β -Rezeptoren aktiviert (Ganeff et al., 2011). Im Unterschied zum klassischen Signalweg wird dieser nicht über I κ B- α vermittelt, sondern der IKK- α -Komplex phosphoryliert p100. Dies ist entscheidend für die Prozessierung des höhermolekularen p100-Vorläufers zu p52 (Abbildung 1.3). Auf diese Weise kann das NF- κ B Dimer, welches sich hier meist aus p52 / Rel B zusammensetzt, in den Zellkern translozieren. Der alternative Signalweg erfordert jedoch eine *de novo* Proteinsynthese und spielt wahrscheinlich in sekundären lymphatischen Organen eine Rolle.

1.4 Die Bedeutung der enterischen Gliazellen in der intestinalen Immunabwehr

Während intestinale Epithelzellen, enterische Neuronen, immunkompetente Zellen und mesenchymale Zellen des Gastrointestinaltraktes gut erforscht sind, ist über die enterische Glia nur wenig bekannt. Historisch wurde die enterische Glia eher als Packmaterial gesehen, die das enterische Nervensystem zusammenhält. Daher stammt das Wort *glia* von dem griechischen Begriff *glue* - für Klebstoff - ab (Rühl, 2005). Das enterische Nervensystem (ENS) mit dem Plexus myentericus (Auerbach'scher Plexus) und Plexus submucosus (Meissner'scher Plexus) (Abbildung 1.1) kontrolliert entscheidende gastrointestinale Funktionen, wie Motilität, Sekretion, Nährstoffaufnahme, Durchblutung, immunologische und inflammatorische Prozesse (Rühl, 2005). Zwar ist das ENS bestens als komplexes Netzwerk aus Neuronen (ca. 100 Millionen) im Darm bekannt, jedoch bildet die enterischen Glia mit 400 bis 1000 Millionen Zellen den häufigsten Zelltyp (Schemann und Neunlist, 2004).

Enterische Gliazellen stammen von pluripotenten Vorläuferzellen der Neuralleiste ab (Le Douarin und Teillet, 1973). Sie zeigen sowohl morphologisch als auch funktionell Ähnlichkeiten mit den embryologisch verwandten Astrozyten des zentralen Nervensystems. Beiden Zelltypen ist gemeinsam: die Morphologie mit sternförmig verlaufenden Zellfortsätzen (Abbildung 1.4), die Kommunikation mit benachbarten Zellen über *gap junctions*, die Interaktion mit Blutgefäßen und der Nachweis des Gliamarkers GFAP (Gutnick et al., 1981; Maudlej und Hanani, 1992; Jessen und Mirsky, 1980; Rühl et al., 2004). Desweiteren ähneln sich Astrozyten des ZNS und enterische Gliazellen des ENS in ihren immunmodulatorischen Fähigkeiten, da beide Zelltypen zur Phagozytose und zur Sekretion von Botenstoffen fähig sind (Dong und Benveniste, 2001; Rühl et al., 2001 b). Hollenbach

et al. belegten, dass enterische Gliazellen aktiv Phagozytose betreiben, indem eine intrazelluläre Aufnahme von kleinen Vesikeln mit Flurescein-Isothiocyanat (FITC)-markiertem Dextran im Zytoplasma nachzuweisen war (Hollenbach et al., eingereicht). Rühl et al. zeigten durch die Expression von Interleukin 6 in enterischen Gliazellen, dass der Plexus myentericus eine potentielle Quelle für Zytokine im Darm ist. Dies steht im Einklang mit den Untersuchungen von Khan und Collins, die eine starke Aktivierung von IL-1 α , IL-1 β und IL-6 im myenterischen Plexus in einer durch *Trichinella spiralis* induzierten Colitis entdeckten (Khan und Collins, 1994). Interessanterweise ist dieser Plexus einer der Hauptlokalisationsorte von enterischen Gliazellen. Daraus schlussfolgernd sind enterische Gliazellen möglicherweise über die Produktion von Zytokinen an der frühen immunregulierenden Signalauslösung der intestinalen Immunabwehr beteiligt. Eine weitere Gemeinsamkeit von Astrozyten und enterischen Gliazellen ist die Fähigkeit, bei der Aktivierung der erworbenen, d.h. zellvermittelten Immunantwort mitzuwirken. Beide Zelltypen exprimieren MHC II und ICAM-1 Moleküle in Situationen der Inflammation (Dong und Benveniste, 2001; Geboes et al., 1992). Sie haben zudem das Potential Antigene an T-Zellen zu präsentieren und damit Antigen-spezifisch eine Aktivierung von CD4+ T-Zellen herbeizuführen (Hollenbach et al., eingereicht).

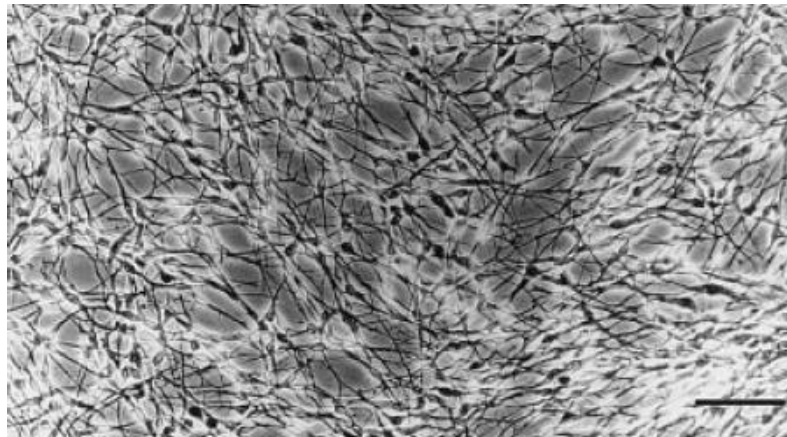


Abbildung 1.4 Enterische Gliazellen

Purifizierte enterische Gliazellen im Phasenkontrast-Mikroskop (Skala 40 μm). Die enterischen Gliazellen wurden ursprünglich von Rühl et al. aus dem Plexus myentericus von adulten, männlichen Sprague-Dawley Ratten isoliert (Abbildung aus Rühl et al., 2001 a).

2 Zielstellung

Im Rahmen der Grundlagenforschung zur Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen rückt das enterische Nervensystem immer weiter in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Mehrere Studien vermuteten eine Schlüsselrolle der enterischen Gliazellen bei der Regulierung der Barrierefunktion, Darmhomöostase und angeborenen intestinalen Immunantwort (Cornet et al., 2001; Rühl et al., 2004; Savidge et al., 2007). Obwohl enterische Gliazellen anzahlmäßig eine erhebliche Zellpopulation im Gastrointestinaltrakt darstellen, ist bisher wenig über deren immunphysiologische Eigenschaften bekannt.

Die vorliegende Arbeit soll zur Klärung der Frage beitragen, ob enterische Gliazellen aktiv an der angeborenen Immunabwehr im Darm beteiligt sind. Hierfür sollte eine systematische Untersuchung der enterischen Gliazellen erfolgen, beginnend bei der Erkennung von Bakterienkomponenten durch *Toll-like*-Rezeptoren an der Zellmembran und *NOD*-Rezeptoren im Zytoplasma, über die intrazelluläre Signalweiterleitung mit Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Zellkern und anschließender Freisetzung von inflammatorischen Abwehrmolekülen (Darstellung der Signalvermittlung in Abbildung 1.2). Daraus ergaben sich folgende Fragestellungen für diese Arbeit:

1. Expressieren enterische Gliazellen *Toll-like*- und *NOD*-Rezeptoren auf mRNA- und Proteinebene?
2. Wie beeinflussen exogene Stimuli die TLR- und NOD-Expression in enterischen Gliazellen?
3. Kann durch die Stimulation mit TLR-spezifischen Liganden und Zytokinen der intrazelluläre IKK / NF- κ B-Signalweg in enterischen Gliazellen aktiviert werden?
4. Beeinflussen exogene Stimuli die Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B auf Zellkernebene?
5. Reagieren enterische Gliazellen auf die Stimulation mit TLR-spezifischen Liganden und Zytokinen mit der Expression von Interleukinen und Chemokinen?

3 Material

3.1 Geräte

Tabelle 3.1 Geräte

Geräte	Modell	Firma
Autoklav	Sanoclav	Wolf, Bad Überkingen
Blottingapparatur	Criterion Blotter, Mini Protean II	Bio-Rad, München
Brutschrank	CO ₂ Inkubator IG 150	Jouan, Dreieich
Elektrophoresekammern		
Agarose-Gele	Mini-Sub® Cell GT	Bio-Rad, München
	Sub® Cell Model 192	Bio-Rad, München
SDS-Page-Gele	Criterion™ Cell	Bio-Rad, München
ELISA Reader	Synergy™ HT	Bio-Tek, Bad Friedrichshall
Filmkassette	Biomax Cassette MS Film	Kodak, Stuttgart
Geldokumentationssystem	Multimage® Light Cabinet	Alpha Innotech, Kasendorf
Heizblock	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Kühlschränke		
+ 4°C / - 20°C	Premium	Liebherr, Biberach
- 80°C	Hera freeze	Heraeus Instruments, Hanau
Mehrkanalpipette	Finnpipette® 50 – 300 µl	Thermo Labsystems, Egelsbach
Einfachpipetten	Reference® 0,5 – 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
	Pipetman P 2 – P 1000	Gibson, Limburg-Offheim
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann, Eberstadt
PCR-Geräte		
Standard PCR	Mastercycler® gradient	Eppendorf, Hamburg
	Gene Amp PCR System 9600	PerkinElmer, Weiterstadt
<i>Real-Time</i> PCR	7500 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Mikroskope	Axiostar	Carl Zeiss, Jena
	CK 30	Olympus, Hamburg
pH-Meter	Accumet Basic	Fischer Scientific, Schwerte
Schüttler	Rotamax 120	Heidolph, Schwabach
Spannungsquellen	Power Pac 200 / 300	Bio-Rad, München
Spektralphotometer	Genesys 10 UV scanning	Thermo Electron, Karlsruhe
Sterilwerkbank	Hera safe	Heraeus Instruments, Hanau
UV Transilluminator	CL 1	Biometra, Göttingen
Vortexapparaturen	REAX 2000	Heidolph, Schwabach
	Vortex-Genie® 2	Scientific Industries, München
Feinwaagen	440-45	Kern, Balingen
	AC 211 P	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Isotemp 215	Fischer Scientific, Schwerte
Zählkammer	Neubauer	Heinz Herenz, Hamburg
Zentrifugen	Megafuge 1.0 RS / R	Heraeus Instruments, Hanau
	5417 R	Eppendorf, Hamburg

3.2 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Tabelle 3.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Firma
Criterion Tris-HCl Gel 8-16%	Bio-Rad, München
Glaspipetten (10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Glasgefäße	VWR International, Darmstadt
Kodak BioMax Light Film	PerkinElmer, Weiterstadt
Kodak Entwickler	Sigma, Steinheim
Kodak Fixierer	Sigma, Steinheim
Kryoröhrchen	Greiner-Bio-One, Frickenhausen
Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Schwabach
MikroAmp 8 Strip Reaktion Tubus	Applied Biosystems, Darmstadt
MikroAmp Optical 96 well plate	Applied Biosystems, Darmstadt
Mikrotiterplatte	Nunc, Roskilde, Dänemark
Optical Caps	Applied Biosystems, Darmstadt
Pipettenspitzen mit Filter	Sarstedt, Nümbrecht
Qia Shredder Säulen	Qiagen, Hilden
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter	Sarstedt, Nümbrecht
Verschlussfolie (Parafilm)	Roth, Karlsruhe
Whatman® Gel Blotting Paper GB003	Schleicher & Schuell, Dassel
Whatman® Westran S 0,2 µm PVDF Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturflaschen mit Filter (25 cm ³ , 75 cm ³)	Dr. Ilona Schubert, Leipzig
Zellschaber	Dr. Ilona Schubert, Leipzig
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner-Bio-One, Frickenhausen

Tabelle 3.3 Chemikalien

Chemikalien	Firma
Acrylamid	Bio-Rad, München
Agarose	Invitrogen, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Aqua dest.	Braun, Melsungen
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich, Seelze
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt
Complete Proteaseinhibitor	Roche, Mannheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Seelze
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Dithiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Seelze
DMEM:F12 (1X) 1:1 (mit L-Alanyl-L-Glutamin)	Invitrogen, Darmstadt
DNase	Fermentas, St. Leon-Rot
EDTA, Titriplex® III	Merck, Darmstadt
Essigsäure (Eisessig)	Merck, Darmstadt
Ethanol	VWR International, Darmstadt

Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Darmstadt
Glycerol 85 %	Fluka, Buchs, Schweiz
Glycerol-2-Phosphat	Sigma-Aldrich, Seelze
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Hepes Puffer (1 M)	Sigma-Aldrich, Seelze
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Loading Dye (6 x)	Promega, Mannheim
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Seelze
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem, Darmstadt
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
Natriumvanadat	Sigma-Aldrich, Seelze
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich, Seelze
PBS	PAA, Cölbe
PCR-Marker	Promega, Mannheim
Penicillin / Streptomycin	Invitrogen, Darmstadt
PMSF	Fluka, Buchs, Schweiz
Salzsäure (37 %, rauchend)	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
SDS-Page Prestained Standard Proteinmarker	Bio-Rad, München
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Bio-Rad, München
Tris	AppliChem, Darmstadt
Triton X-100 pure	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Seelze
Trypsin-EDTA	Invitrogen, Darmstadt
Tween20	Sigma-Aldrich, Seelze

3.3 Stimulanzen

Tabelle 3.4 Stimulanzen

Bezeichnung	Firma
LPS (E. coli O55:B5)	Sigma-Aldrich, Seelze
BLP	EMC micro-Collections GmbH, Tübingen
CpG 1668 ODN	MWG-Biotech AG, Ebersberg
Interleukin 1 β	R&D Systems, Wiesbaden
TNF- α	R&D Systems, Wiesbaden
MDP	Invivogen, San Diego, USA
iE-DAP	Invivogen, San Diego, USA
Fsl-1	Invivogen, San Diego, USA

3.4 Primer

Tabelle 3.5 Primersequenzen

Gensymbol	Primersequenzen (5' → 3') Sense (S), Antisense (A)	Produktgröße [bp]	Annealing [°C]	Anzahl der PCR-Zyklen
TLR 2	S: ggagactctggaagcaggtg A: cgctaagagcaggatcaac	245	62	40
TLR 4	S: gaggactgggtgagaaacga A: agatacaccaacggctctgg	193	60	30
TLR 5	S: gccagagccagattgaagtc A: tgtaatctcgttgccagag	168	60	40
TLR 6	S: gtctcccacttcatccaga A: agagccctcagcttggtga	156	62	35
TLR 7	S: agctctgttctcctccacca A: catgggtgttgctatcg	194	60	40
TLR 9	S: tgcaggagctgaacatgaac A: attggacaggccacaaagc	176	60	40
CD 14	S: cgtttgcattctctctggtt A: agcaccgatggacaactttc	193	58	30
RICK	S: aagcagcccattgtgtatcc A: gtgcggaattgaacggagt	193	60	35
NOD 1	S: cgatgtctttctgctggta A: agatccccttctgcagttt	213	60	33
NOD 2	S: agtgaaggcaaattgactgg A: tctgtccgcagctctaaggt	219	60	40
GAPDH	S: atgggaagctggatcaaac A: gtggttcacacccatcaca	221	60	35

3.5 Antikörper und Kits

Tabelle 3.6 Primäre Antikörper

Primäre Antikörper (Herkunft)	Firma	
anti-TLR 2	<i>rabbit</i> , polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
anti-TLR 4	<i>rabbit</i> , polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
anti-TLR 6	<i>rabbit</i> , polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
anti-TLR 9	<i>rabbit</i> , polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
anti-CD 14	<i>rabbit</i> , polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
anti-IkB- α	<i>rabbit</i> , polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
anti-RIP 2	<i>rabbit</i> , polyklonal	Abcam, Cambridge, UK
anti-NOD 1	<i>rabbit</i> , polyklonal	Cell Signaling, Danvers, USA
anti-NOD 2	<i>goat</i> , polyklonal	Everest Biotech, Oxfordshire, UK
anti-ERK 2	<i>rabbit</i> , polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA

Tabelle 3.7 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Firma
<i>goat- anti-rabbit</i> IgG HRP	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
<i>rabbit-anti-goat</i> IgG HRP	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA

Tabelle 3.8 Reaktionssysteme

Bezeichnung	Firma
AmpliTaq® DNA Polymerase System	Applied Biosystems, Darmstadt
BCA-Protein Assay	Pierce, Bonn
Chemiluminiszenz Western Lightning	Perkin Elmer, Weiterstadt
Nuclear Extract Kit	Active Motif, Rixenart, Belgien
Quick Start Bradford Assay	Bio-Rad, München
Reverse Transkription System	Promega, Mannheim
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RT ² PCR Array First Strand Synthesis Kit	SuperArray, Frederick, USA
RT ² Profiler PCR Array	SuperArray, Frederick, USA
RT ² Real-Time SYBR Green/ ROX PCR Master Mix	SuperArray, Frederick, USA
SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
TransAM NFκB family Kit	Active Motif, Rixenart, Belgien

4 Methoden

Das nachfolgende Kapitel umfasst eine detaillierte Darstellung der in dieser Arbeit angewandten Methoden. Diese beinhalten neben der Zellkulturarbeit, Isolierungsverfahren für mRNA, Gesamtproteine und fraktionierte Zellkern-Zytoplasmaproteine sowie molekularbiologische und proteinbiochemische Verfahren. Zur Wahrung der Übersicht ist in Abbildung 4.1 die Reihenfolge des Versuchablaufes dargestellt.

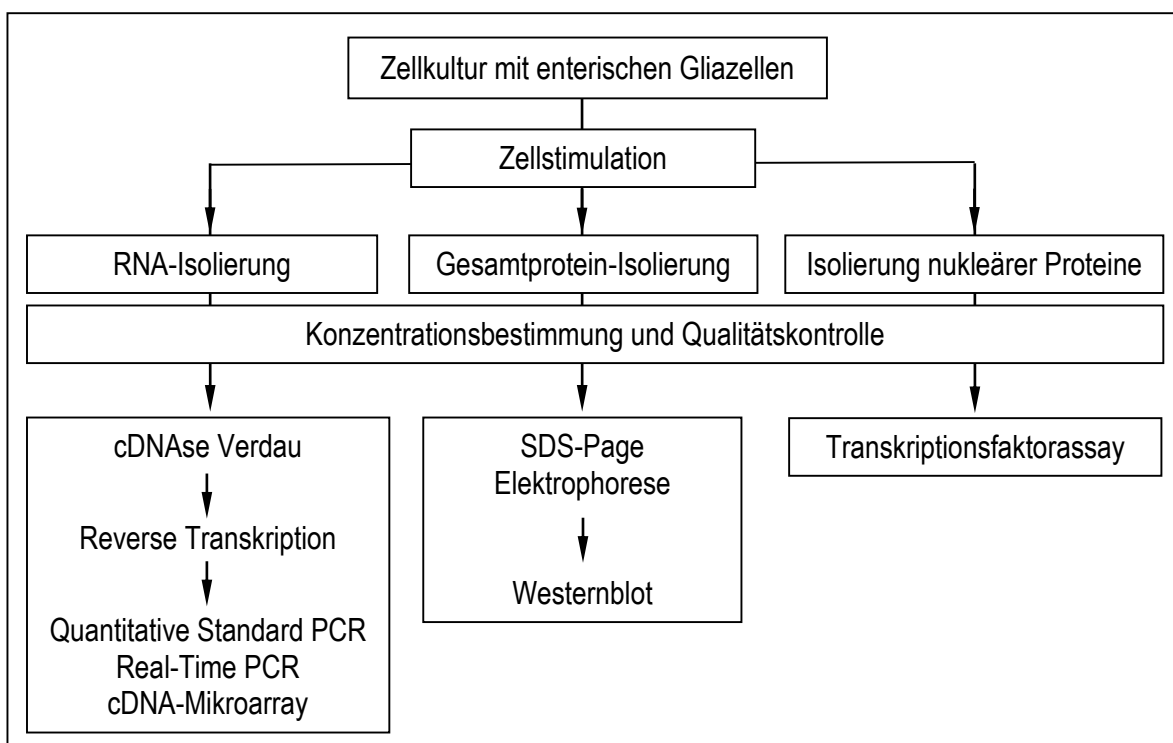


Abbildung 4.1 Versuchsaufbau im Überblick

4.1 Zellkultur

4.1.1 Isolierung von enterischen Gliazellen

Für die *in vitro* Untersuchungen wurden Primärkulturen von enterischen Gliazellen verwendet, welche von der Arbeitsgruppe um Frau PD Dr. med. Anne Rühl (Innere Medizin IV, Universitätsklinikum Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurden. Für die Generierung von primären enterischen Gliazellen führte die Arbeitsgruppe um Frau PD Dr. med. Anne Rühl folgende Schritte durch (Rühl et al., 2001 a):

Zunächst wurde das gesamte Jejunum von adulten, männlichen *Sprague-Dawley* Ratten entnommen und anschließend mittels Dissektionspinzette die longitudinale Muskelschicht zusammen mit dem Plexus myentericus von der darunterliegenden Ringmuskulatur gelöst und enzymatisch dissoziiert. Die dabei entstandene Mischkultur aus glatten Muskelzellen, Fibroblasten und enterischen Gliazellen wurde von potentiell kontaminierenden Fibroblasten über eine Komplement-vermittelte Lyse und die schnell-teilenden Myofibroblasten durch antimetabolisch wirksame Cytosin-Arabinoside befreit. Purifizierte enterische Gliazellen wurden morphologisch mittels Phasenkontrast-Mikroskopie charakterisiert. Desweiteren erfolgten immunhistochemische Verfahren, wobei Zelltyp-spezifische Antikörper eingesetzt wurden. Dabei wurden purifizierte enterische Gliazellen über die vorhandene Immunreaktivität (GFAP und S-100 als Marker für enterische Glia) und das Fehlen der Immunreaktivität (Thy 1.1 (Fibroblasten), Desmin und α -Aktin (glatte Muskelzellen) sowie Ox-42 (peritoneale Makrophagen)) identifiziert.

4.1.2 Kultivierung von enterischen Gliazellen

Die adhärent wachsenden enterischen Gliazellen wurden in Dulbeccos Kulturmedium unter dem Zusatz der in Tabelle 4.1 aufgeführten Reagenzien bei 37°C und 5 % CO₂-Sättigung kultiviert. Die Zellen wurden bei 70 % Konfluenz zweimal wöchentlich im Verhältnis 1:3 gesplittet, wobei die Zellkulturen zuvor mikroskopisch hinsichtlich ihrer Morphologie beurteilt wurden. Nach dem Verwerfen des Kulturmediums wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen, um das restliche verbrauchte Kulturmedium zu entfernen. Anschließend wurden die adhärenen Zellen durch Inkubation mit 2 ml Trypsin-EDTA für 2 min bei 37°C vom Boden der Kulturflaschen gelöst. Dieser Vorgang wurde durch die Zugabe des Kulturmediums gestoppt. Im nächsten Schritt erfolgte die Zentrifugation für 8 min bei 1400 rpm und 22°C. Nach der Resuspendierung in 12 ml frischem DMEM-Medium schloss sich die Zellzahlbestimmung mithilfe der Neubauer Zählkammer an. Im Anschluß daran wurden die Gliazellen für Versuchsansätze oder zur Weiterkultivierung erneut in Kulturflaschen ausgesät. Das Medium wurde 3 Mal pro Woche erneuert.

Tabelle 4.1 Zusammensetzung des Kulturmediums

Reagenzien	
DMEM:F12 (1 x) 1:1 (mit L-Alanyl-L-Glutamin)	1000 ml
Fetales Kälberserum (inaktiviert)	100 ml
Antibiotika / Antimykotika-Lösung (Penicillin / Streptomycin)	10 ml
Hepes Puffer (1 M)	10 ml

4.1.3 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität mit Trypanblaufärbung

Mithilfe des Farbstoffs Trypanblau war es möglich, zwischen lebenden Zellen mit intakter Zellmembran und geschädigten Zellen zu unterscheiden. Zur Bestimmung der Vitalitäts- und Gesamtzellzahl wurden 10 µl Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau vermischt. Anschließend wurde unter dem Phasenkontrast-Mikroskop die Anzahl ungefärbter vitaler und blau-gefärbter geschädigter Zellen mithilfe der Neubauer Zählkammer in vier großen Quadranten bestimmt. Dies musste innerhalb weniger Minuten erfolgen, da Trypanblau selbst eine zytotoxische Wirkung zeigte. Über den Mittelwert der nicht angefärbten Zellen konnte mithilfe der folgenden Formel die Lebendzellzahl pro ml ermittelt werden:

$$\text{Lebendzellzahl / ml} = \text{Lebende Zellen pro Großquadrat} * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{Kammerfaktor}$$

Über das Verhältnis lebender Zellen zur Gesamtzellzahl ließ sich die Vitalität [%] in der Zellkultur bestimmen.

4.1.4 Einfrieren und Revitalisieren von enterischen Gliazellen

Zum Einfrieren wurden im Kulturmedium befindliche enterische Gliazellen verwendet. Dazu wurde jeweils das Zellpellet mit ca. 20 Millionen enterischen Gliazellen in 1,8 ml kaltem Einfriermedium (10 % Dimethylsulfoxid in FCS) resuspendiert, in 4°C kalte Kryoröhrchen überführt und bei - 80°C gelagert. Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen zügig bei 37°C erwärmt und in je 10 ml 37°C warmem Kulturmedium aufgenommen. Die Suspension wurde sofort zentrifugiert, das Pellet in frischem Medium resuspendiert und auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Nach 24 h erfolgte der erste Mediumwechsel, um mögliche Reste des zytotoxischen Dimethylsulfoxids zu entfernen.

4.1.5 Zellstimulation

Es wurden 72 h vor der Gesamtprotein- und RNA-Extraktion jeweils 25 cm³ Zellkulturflaschen mit je 3 Millionen enterischen Gliazellen und für die nukleäre Proteinextraktion jeweils 75 cm³ Zellkulturflaschen mit je 15 Millionen enterischen Gliazellen bestückt. Die Zellen wurden bis zur Subkonfluenz kultiviert. Entsprechend der Stimulationszeiten von 0 bis 24 h (Tabelle 4.2) erfolgte nach dem Mediumwechsel die Inkubation mit einem Stimulus oder der Kombination mehrerer Stimulanzen (Tabelle 4.3). Unstimulierte Zellen wurden mit dem entsprechenden Carrierprotein der

Stimulationslösung inkubiert. Zum Zeitpunkt Null wurden alle Zellkulturflaschen auf Eis gesetzt und somit die weitere Stimulation unterbunden. Die anschließende Extraktion von Gesamt-RNA, Gesamt-Protein beziehungsweise Zellkernprotein erfolgte nach den in den Abschnitten 4.2.1, 4.3.1 und 4.3.4 beschriebenen Prinzipien. Für die Stimulationsanalysen der enterischen Gliazellen wurden bakterielle Produkte und Zytokine verwendet, die vermutlich in der Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine wichtige Rolle spielen.

Tabelle 4.2 Stimulationszeiträume

Stimulierung von	Stimulationsdauer
mRNA	0, 1, 2, 4, 8, 16 und 24 h
Gesamtprotein	0, 2, 4, 8, 16 und 24 h
I κ B- α	0, 15, 30, 45, 60 min, 2, 4, und 8 h
nukleäre Protein	0, 90 min

Tabelle 4.3 Stimulanzen

Liganden	Rezeptor	Konzentration
LPS	TLR 4, CD 14	10 μ g/ml
BLP	TLR 2	100 ng/ml
CpG	TLR 9	10 μ g/ml
Fsl-1	TLR 2, TLR 6	2,5 μ g/ml
Imiquimod	TLR 7	40 μ g/ml
MDP	NOD 2	100 μ g/ml
iE-DAP	NOD 1	100 μ g/ml
Zytokine		
IL-1 β		100 ng/ml
TNF- α		10 ng/ml

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 RNA-Isolierung aus enterischen Gliazellen

Für die RNA-Isolierung wurden 72 h vor Experimentbeginn jeweils 3 Millionen enterische Gliazellen in 25 cm³ Kulturflaschen ausgesät und für 0 bis 24 h mit LPS (10 μ g/ml), BLP (100 ng/ml), CpG (10 μ g/ml), IL-1 β (100 ng/ml) und / oder TNF- α (10 ng/ml) stimuliert. Die RNA-Isolierung erfolgte mittels *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden) entsprechend des Herstellerprotokolls. Zunächst wurden die enterischen Gliazellen mit 3,5 ml eiskaltem PBS gewaschen, mit 350 μ l RLT Puffer (1 % Mercaptoethanol) lysiert und mittels Zellschaber vom Boden der Kulturflasche gelöst. Anschließend erfolgte die Homogenisierung auf Qia-Shredder-Säulen für 2 min bei 13.000 rpm. Das Homogenisat

wurde mit 350 µl 75 %-igem Ethanol versetzt und auf eine *RNeasy*-Säule überführt. Im Weiteren schlossen sich mehrere Waschschrte (1 x mit 700 µl im Kit enthaltene RW 1 sowie 2 x mit 500 µl RPE Lösung) an, jeweils gefolgt von einer Zentrifugation für 15 sec bei 13.000 rpm. Im letzten Schritt wurde die RNA durch Zugabe von 30 µl RNase freiem Wasser aus der Säule gelöst und eluiert. Die Bestimmung der RNA-Konzentration und der RNA-Reinheit erfolgte spektrophotometrisch mit dem Genesys 10 UV durch die Absorptionsmessung bei 260 nm und 280 nm. Die Methode basiert darauf, dass die aromatischen Pyridin- und Pyrimidinringe der Nukleinsäurebasen ihr Absorptionsmaximum für UV-Licht bei 260 nm haben, die aromatischen Aminosäuren der Proteine jedoch bei 280 nm. So gilt eine RNA-Probe als hoch rein (ohne Proteinkontamination), wenn das Verhältnis der optischen Dichte (OD) bei 260 nm zu 280 nm bei 1,9 bis 2,1 liegt. Bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht eine OD-Ratio von 1,0 einer Menge von 40 µg RNA. Als Referenz diente DEPC-Wasser (Diethylpyrocarbonat) in einer Quarzküvette.

4.2.2 RNA-Qualitätskontrolle mittels Agarose-Gelelektrophorese

Neben der spektrophotometrischen Bestimmung der RNA-Reinheit wurde anhand von Stichproben die RNA-Qualität mittels RNA-Gelelektrophorese in 2 % Agarosegel (Tabelle 4.4) getestet. Zur Herstellung des Agarosegels wurde das Agarosepulver zusammen mit dem 25 x TAE-Puffer und Aqua dest. aufgekocht und beim Abkühlen auf 65°C 2 µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Das flüssige Gel wurde in die Elektrophoresekammer gegossen. Nachdem es polymerisiert war, konnte die Kammer mit 1 x TAE-Puffer (Tabelle 4.5) aufgefüllt werden.

Tabelle 4.4 Zusammensetzung des 2 % Agarosegels

Reagenzien	
Agarose	1 g
25 x TAE-Puffer	2 ml
Aqua dest.	50 ml
Ethidiumbromid	2 µl

Tabelle 4.5 Zusammensetzung des 25 x TAE-Puffers (pH 8,5)

Reagenzien	
Eisessig (konz. Essigsäure)	28,6 ml
EDTA	18,6 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Die Geltaschen wurden mit den RNA-Proben, bestehend aus 1 μl RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 15 μl Aqua dest. und 4 μl 6 x Loading Dye bestückt. Die Elektrophorese erfolgte konstant bei 70 V für 1 Stunde. Durch Einlagerung von Ethidiumbromid konnte die gelelektrophoretische Auftrennung der RNA in 18 S und 28 S rRNA, die bis zu 95 % der RNA ausmacht, mittels UV-Licht sichtbar gemacht werden (Abbildung 4.2). Anhand eines parallel aufgetragenen PCR-Markers als Größenstandard (Promega, Mannheim) konnte die Fragmentlänge qualitativ beurteilt werden.

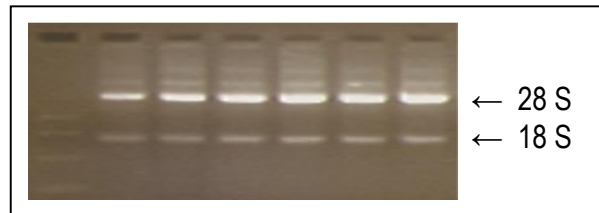


Abbildung 4.2 RNA-Gelelektrophorese mit Darstellung der rRNA

4.2.3 DNase Verdau und cDNA-Synthese mittels Reverser Transkription

Um mögliche genomische DNA zu eliminieren, wurde vor der Synthese der komplementären DNA ein DNase Verdau durchgeführt. Dazu wurden die RNA-Proben mit DNase (Fermentas, St. Leon-Rot) in dem in Tabelle 4.6 zusammengefassten Ansatz versetzt:

Tabelle 4.6 DNase Verdau

Reagenzien	40 μl Ansatz
DNase	2 μl
10 x DNase Puffer	2 μl
RNA	3 μg
Aqua dest.	ad 18 μl

Für einen Ansatz von 40 μl wurden 3 μg RNA verwendet und dieser zunächst für 15 min bei Raumtemperatur belassen. Durch die Zugabe von 2 μl EDTA wurde die Enzymaktivität der DNase gestoppt. Anschließend erfolgte die Inkubation für 10 min bei 65°C im Heizblock.

Tabelle 4.7 cDNA-Synthese Ansatz

Reagenzien	40 μl Ansatz
MgCl ₂	8 μl
Reverse Transkription 10 x Puffer	4 μl
dNTP Mixture	4 μl
RNase Inhibitor	1 μl
Reverse Multiscribe Transkriptase	1,5 μl
Random-Hexamer	2 μl
RNA	19,5 μl

Unter Verwendung des *Reversen Transkription System* von Promega wurde entsprechend des Herstellerprotokolls aus einzelsträngiger RNA als Matrize ein komplementärer DNA-Strang (cDNA) synthetisiert (Tabelle 4.7). Der Ansatz wurde zunächst für 10 min bei Raumtemperatur, dann 20 min bei 42°C und anschließend 5 min bei 95°C inkubiert. Die cDNA wurde bis zur Verwendung bei - 80°C gelagert.

4.2.4 Primerdesign

Für die Primerherstellung wurde die mRNA-Sequenz des entsprechenden Gens spezifisch für Ratten in der Online Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) auf der Internetseite <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Stand: September 2008) ermittelt. Anschließend konnte mithilfe des Online Programms Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>, Stand: September 2008) die geeignete Primersequenz gesucht und über die Firma BioTeZ GmbH (Berlin) synthetisiert werden. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Primer Exon-Exongrenzen überspannen, da die zwischen den Exons (kodierende Genabschnitte) liegenden Introns beim Spleißen der RNA zu mRNA eliminiert werden. Zudem sollten die synthetisch hergestellten Primer folgende Kriterien erfüllen: eine Länge von 18 - 22 Basenpaaren, einen GC-Gehalt von 40 - 60 % und eine Schmelztemperatur zwischen 55 - 62°C. Außerdem sollten sie keine komplementären Sequenzen besitzen, um die Bildung von Primer-Dimeren und internen Sekundärstrukturen wie *hairpins* zu vermeiden (Dieffenbach et al., 1993; Debnath et al., 2010). Die verwendeten Primersequenzen sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst.

4.2.5 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Quantifizierung von PCR-Produkten wurde in dieser Arbeit die Methode der quantitativen PCR, der *Real-time* PCR und der cDNA-Mikroarray-Analyse angewendet. Dabei wurde als Ausgangsmaterial (Template) die bei der Reversen Transkription gewonnene cDNA verwendet.

Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist es möglich, spezifische Sequenzbereiche der DNA *in vitro* zu amplifizieren. Nach wiederholtem Durchlaufen eines Zyklus, bestehend aus Denaturierung, Annealing und Elongation, erhält man die exponentielle Kopienanzahl der Zielsequenz (Target-DNA), welche somit der weiterführenden Analytik zugänglich wird (Mullis und Faloona, 1987). Die Phasen eines Zyklus laufen temperaturabhängig ab. Zuerst wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen in Einzelstränge aufgeschmolzen (Denaturierung). Beim anschließenden Abkühlen hybridisieren die Sequenz-spezifischen Oligonukleotidprimer an die komplementären Abschnitte der DNA-Einzelstränge (Annealing). Von den Primern ausgehend in 5'- 3'-Richtung verlängert die

hitze stabile Taq-Polymerase im letzten Schritt komplementär den zweiten DNA-Einzelstrang aus im Überschuss zugegebenen Desoxyribonukleotiden (Elongation).

4.2.5.1 Quantitative Standard PCR

Die quantitative PCR wurde standardmäßig mit dem *AmpliTaq® DNA Polymerase System* (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. Als Template dienten jeweils 2 µl der betreffenden cDNA, welche mit 23 µl PCR Mastermix versetzt wurde (Tabelle 4.8).

Tabelle 4.8 Mastermix für einen PCR-Ansatz

Reagenzien	25 µl Ansatz
10 x PCR Puffer	2 µl
dNTP's	1,6 µl
MgCl ₂	1 µl
Primer Sense (25 µM)	0,4 µl
Primer Antisense (25 µM)	0,4 µl
Taq Polymerase	0,2 µl
cDNA	2 µl
Aqua dest.	12,4 µl

Die Amplifizierung erfolgte im Mastercycler® Gradient (Eppendorf, Hamburg) entsprechend des folgenden Programms:

Tabelle 4.9 Reaktionsschritte der PCR

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	94°C	2 min
Denaturierung	35 - 40 Zyklen $\left\{ \begin{array}{l} \rightarrow 94^\circ\text{C} \\ 58-62^\circ\text{C} \\ \leftarrow 72^\circ\text{C} \end{array} \right.$	30 sec
Annealing		30 sec
Elongation		30 sec
Finale Elongation	72°C	7 min
Ende	4°C	-

Dem ersten Zyklus wurde eine 2-minütige initiale Denaturierungsphase bei 94°C vorangesetzt. Nach dem letzten Zyklus schloss sich eine 7-minütige terminale Elongationsphase an, um die Synthese unvollendeter PCR-Produkte zu beenden. Die Anzahl der Zyklen lagen je nach Zielsequenz zwischen 30 und 40. Zur quantitativen Auswertung wurden die PCR-Produkte, wie unter 4.2.2 beschrieben, mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Als Negativkontrolle wurden Ansätze mit Aqua dest. anstelle von cDNA verwendet.

4.2.5.2 Real-time PCR

Im Unterschied zur quantitativen PCR bei der eine Endpunktanalyse stattfindet, kann bei der *Real-time* PCR die DNA-Menge nach jedem PCR-Zyklus in Echtzeit bestimmt werden. Die Quantifizierung der Produktmenge erfolgt indirekt über einen Fluoreszenzfarbstoff (*SYBR Green*), dessen Signalintensität proportional zur DNA-Menge steigt. Der Farbstoff interkaliert zwischen den Basen der DNA-Doppelstränge und wird bei einer Wellenlänge von 530 nm zur Fluoreszenz angeregt. Die Fluoreszenz nimmt dabei proportional zur Menge des PCR-Produkts zu. Da die Amplifikationseffizienz nur in der exponentiellen Phase der PCR konstant ist, wird der Anfang dieser Phase zur Quantifizierung genutzt. Dies geschieht mithilfe des C_t -Wertes (*Threshold Cycle*, „Schwellenwert-Zyklus“). Dieser beschreibt die Zykluszahl in der sich das *SYBR Green* Fluoreszenzsignal gerade über die Hintergrund-Fluoreszenz hebt, jedoch noch unterhalb der Sättigungsphase liegt (Heid et al., 1996). Das bedeutet, dass je größer die ursprüngliche cDNA Menge ist, desto früher kann das akkumulierte PCR-Produkt detektiert werden und desto niedriger ist der C_t -Wert.

Für die *Real-time* PCR wurden pro Ansatz 2 μ l cDNA mit dem nachfolgenden Mastermix versetzt, so dass sich ein Gesamtvolumen von 25 μ l ergab (Tabelle 4.10):

Tabelle 4.10 *SYBR Green* Mastermix für *Real-time* PCR

Reagenzien	25 μ l Ansatz
2 x PCR SYBR Puffer	12,5 μ l
Sense Primer	1 μ l
Antisense Primer	1 μ l
Aqua dest.	8,5 μ l

Die *Real-time* PCR wurde mit dem Gerät 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystem, Darmstadt) mit den folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt: Aufheizen (initiale Denaturierung) bei 95°C für 10 min, gefolgt von 40 Zyklen der drei Reaktionsschritte Denaturierung bei 95°C für 15 sec, Annealing bei 60°C für 60 sec und Elongation bei 72°C für 60 sec. Im Anschluss wurde mithilfe der Schmelzkurven die Spezifität der Primer analysiert und die Größe des PCR-Produkts elektrophoretisch auf 2 % Ethidiumbromid-Agarosegel bestimmt. Um eine Kontamination mit Fremd-DNA auszuschließen, wurden für jeden Primer zusätzlich zwei Negativkontrollen mitgeführt: eine „Nicht-Reverse-Transkription-Kontrolle“ und eine „Nicht-Template-Kontrolle“ mit Aqua dest.. Zur Bestimmung der relativen Expression eines Zielgens mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode ist eine Normalisierung auf einen internen Standard erforderlich (Vandesompele et al., 2002), um mögliche Konzentrationsunterschiede zwischen den cDNA-Proben auszugleichen. Dazu werden sogenannte

Haushaltsgene (*housekeeping genes*) verwendet, deren Expression unabhängig vom Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen ist. In dieser Arbeit wurde dafür die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) eingesetzt. Die $\Delta\Delta C_t$ -Methode setzt eine optimale Amplifikationseffizienz des Ziel- und Haushaltsgens von 100 % voraus, bei dem sich mit jedem Zyklus die DNA-Produktmenge verdoppelt (Wittwer et al., 1997).

Zur Auswertung der *Real-time* PCR Daten wurden die C_t -Werte der Probe des Zielgenes ($C_{t,P}$) zunächst auf das Haushaltsgen ($C_{t,H}$) normalisiert (Livak et al., 2001):

$$\Delta C_t = C_{t,P} - C_{t,H}$$

Im nächsten Schritt wurde der $\Delta\Delta C_t$ -Wert gebildet, welcher aus der Differenz der normalisierten Proben mit Stimulation ($C_{t,P1}$) und ohne Stimulation ($C_{t,P2}$) entsteht:

$$\Delta\Delta C_t = C_{t,P1} - C_{t,P2}$$

Für die Berechnung der tatsächlichen Expressionsunterschiede der Zielgene mit und ohne Stimulation wurde die relative Genexpressionsrate (R) bestimmt.

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

4.2.5.3 cDNA-Mikroarray

Das RT² Profiler™ PCR Array System basiert auf einer quantitativen *Real-time* PCR im 96-Well-Format, in denen genspezifische Primerpaare bereits vorpipettiert sind. Dies ermöglicht die gleichzeitige Expressionsanalyse von 84 verschiedenen Genen. Die restlichen 12 Wells verteilen sich wie folgt: Haushaltsgene (β -Actin, Laktat-Dehydrogenase A, Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase 1, ribosomales Protein L13A und P1), genomische DNA-Kontaminationskontrolle, Reverse-Transkription-Kontrollen (3-fach) und PCR-Effizienz-Kontrollen (3-fach). In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Signalweg-spezifische PCR Array Systeme der Firma SuperArray Bioscience Corporation (Frederick, MD, USA) verwendet: *rat Toll-Like-Receptor Signaling Pathway* PCR Array (#APRN-018A) und *rat JAK / STAT Signaling Pathway* PCR Array (#APRN-039A).

Für die cDNA-Mikroarrays wurden enterischen Gliazellen zunächst für 4 h mit den TLR-Agonisten LPS (10 μ g/ml), BLP (100 ng/ml) und CpG (10 μ g/ml) inkubiert. Anschließend wurde die RNA-Isolierung, wie unter 4.2.1 beschrieben, vorgenommen. Die RT² Profiler™ PCR Arrays wurden entsprechend des Herstellerprotokolls durchgeführt. Mithilfe des RT² PCR Array *First Strand* Kit (SuperArray, Frederick, MD, USA) wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde zunächst genomische DNA eliminiert,

indem 1,5 µg RNA mit 2 µl 5 x *genomic DNA Elimination Buffer* versetzt wurde. Anschließend wurde der Ansatz mit RNase freiem Wasser auf ein Zielvolumen von 10 µl gebracht und für 5 min bei 42°C inkubiert. Diesem Ansatz wurden die verschiedenen Puffer und Primer für die Reverse Transkription (Tabelle 4.11) zugesetzt, zunächst für 15 min bei 42°C und anschließend für 5 min bei 95°C inkubiert. Die cDNA Proben wurden mit 91 µl Aqua bidest. auf ein Endvolumen von 111 µl gebracht.

Tabelle 4.11 Mastermix für cDNA-Mikroarray (pro 96 Well-Platte)

Reagenzien	10 µl Ansatz
5 x RT Buffer 3	4 µl
Primer & External Control Mix	1 µl
RT Enzyme Mix 3	2 µl
RNase freies Wasser	3 µl

Für einen PCR-Array (1 x 96-Well-Platte) wurden 102 µl cDNA mit 1173 µl Aqua bidest. und 1275 µl 2 x RT² SYBR Green / ROX qPCR Master Mix versetzt. Von diesem Ansatz wurden jeweils 25 µl pro Well pipettiert und mit einer Kappe dicht verschlossen. Die qRT-PCR wurde am Gerät ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystem) nach dem 2-Schritt *Real-time* PCR-Programm durchgeführt: Aktivierung der *HotStart DNA Polymerase* bei 95°C für 10 min für einen Zyklus, gefolgt von 40 Zyklen in der Abfolge: Denaturierung bei 95°C für 15 sec und Annealing bei 60°C für 1 min mit anschließender Ermittlung der Schmelzkurven.

Die Rohdaten der 84 Gene wurden mithilfe des RT² Profiler PCR Array *Data Analysis Template Version 3.0* auf die Haushaltsgene normalisiert und auf Basis der $\Delta\Delta C_T$ -Methode analysiert. Somit konnten die relativen Expressionsunterschiede zwischen nicht stimulierten und mit TLR-Liganden stimulierten Proben ermittelt werden. Das verwendete *PCR Array Data Analysis Web Portal* findet sich unter <http://www.superarray.com/pcrarraydataanalysis.php> (Stand: Juli 2009).

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 Gesamtproteinextraktion aus enterischen Gliazellen

Für die Gesamtproteinextraktion aus enterischen Gliazellen wurde ein Lysepuffer entsprechend der in Tabelle 4.12 aufgeführten Zusammensetzung verwendet.

Tabelle 4.12 Lysepuffer für die Gesamtproteinextraktion

		10 ml Ansatz
<i>Stammlösung</i>	Tris (pH 7.5)	50 mM
	EDTA	5 mM
	NaCl	100 mM
	Triton X-100 pure	1 %
	Glycerol	10 %
	NP-40	0,5 %
	Dikaliumhydrogenphosphat	10 mM
<i>vor Gebrauch</i>	Natriumvanadat	1 mM
	Natriumfluorid	20 mM
	<i>Complete</i> Proteaseinhibitor	1,0 ml
	Glycerol-2-Phosphat	20 mM
	PMSF	1 mM

Die Zellkulturflaschen wurden wie unter 4.1.5 beschrieben mit 3 Millionen enterischen Gliazellen pro Zellkulturflasche bestückt, für 0 bis 24 h stimuliert und nach Ablauf der Stimulationszeit auf Eis gesetzt. Anschließend wurde das Kulturmedium entfernt und die Gliazellen 3 x mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 250 µl 4°C kaltem Lysepuffer konnten die Gliazellen mittels Zellschaber gelöst werden. Das Zellysate wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt, mittels Vortexer für 30 sec geschüttelt und für 15 min bei 4°C belassen. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation der Proben bei 13.000 rpm für 15 min bei 4°C. Die im Überstand enthaltene Proteinfraction wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei - 80°C gelagert.

4.3.2 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte mittels BCA-Protein Assay (Pierce, Bonn) mit folgender Konzentrationsreihe für Bovines Serumalbumin (BSA) als Proteinstandard: 2000 µg/ml, 1500 µg/ml, 1000 µg/ml, 750 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 25 µg/ml und 0 µg/ml. Die Bestimmung der Proben erfolgte in doppelter Ausführung. Zur Verdünnung wurde ausschließlich Lysepuffer verwendet. Für die Reagenzlösung wurden entsprechend des Herstellerprotokolls 50 Teile

vom BCA-Reagenz A mit einem Teil BCA-Reagenz B gemischt und je 200 µl zu den in der Mikrotiterplatte befindlichen 25 µl Standards beziehungsweise 25 µl Proben gegeben. Nach Inkubation bei 37°C für 30 min wurde bei 570 nm die Absorption im Mikroplatten-Reader bestimmt. Über die Erstellung der Standardkurve wurde eine lineare Eichkurve interpoliert, anhand derer die Proteinkonzentrationen (µg/ml) kalkuliert wurden.

4.3.3 Westernblot

Der direkte Nachweis von Proteinen erfolgte mittels Westernblot nach folgendem Prinzip. Die Proteine wurden zunächst durch Elektrophorese in einem Polyacrylamidgel nach ihrer Molekülgröße getrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Freie Bindungsstellen auf der Membran wurden blockiert, um den spezifischen Nachweis von Antigenen zu ermöglichen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper, der gegen ein spezifisches Protein gerichtet war und mit diesem einen Antigen-Antikörper-Komplex bildete. Die Sichtbarmachung der Proteine gelang mithilfe eines zweiten Antikörpers, der an den Ersten andockte (Anti-Antikörper) und zugleich an ein Meerretticherperoxidase-Enzym gekoppelt war. Dadurch wurde eine Chemilumineszenz-Reaktion katalysiert, welche mittels Röntgenfilmen sichtbar gemacht wurde.

Tabelle 4.13 Puffer für Westernblot

	Reagenzien	Ansatz	
<i>SDS-Page Laufpuffer (10 x)</i>	Tris	30,28	g
	Glycin	144	g
	SDS	10	g
	Aqua dest.	ad 1000	ml
<i>Transferpuffer (10 x)</i>	Tris	30,28	g
	Glycin	144	g
	Aqua dest.	ad 1000	ml
<i>Transferpuffer (1 x)</i>	Aqua dest.	1200	ml
	Transferpuffer (10 x)	150	ml
	Methanol	150	ml
<i>TBS-Puffer (10 x) pH 7,6</i>	Tris	24,2	g
	NaCl	80	g
	Aqua dest.	ad 1000	ml
<i>Lämmli-Puffer (5 x)</i>	Trislösung 0,5 M, pH 6,8	3,33	ml
	Glycerol (85 %)	3,14	ml
	SDS	0,53	g
	DTT	0,42	g
	Bromphenolblau	Messerspitze	
<i>Stripping-Puffer (1 x)</i>	Tris pH 6,8	62,5	ml
	β-Mercaptoethanol (100 %)	6,98	ml
	SDS (2 %)	200	ml
	Aqua dest.	ad 1000	ml

4.3.3.1 Gelelektrophorese

Abhängig von der molekularen Größe der nachzuweisenden Proteine wurden 12 % (50 - 80 kDa) beziehungsweise 8 % (> 80 kDa) Trenngel (Tabelle 4.14) oder 8-16 % Gradientengele (Criterion, Bio-Rad, München) verwendet. Zunächst wurde das Trenngel bis 2 cm unterhalb des Kammeinsatzes gegossen und mit Isopropanol überschichtet, bis es nach 20 min auspolymerisiert war. Nach Entfernen des Isopropanol wurde auf das Trenngel das Sammelgel (Tabelle 4.14) gegossen und der Probenkamm eingesetzt (Polymerisationszeit 30 min). Der Pufferbehälter der Elektrophoresekammer wurde nun mit 1 x SDS-Page Laufpuffer (Tabelle 4.13) gefüllt.

Tabelle 4.14 Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele

	Trenngel		Sammelgel
	12 %	8 %	5 %
Aqua dest.	2,45 ml	3,45 ml	2,1 ml
30 % Acrylamid-Mix	3,0 ml	2,0 ml	0,5 ml
1,5 M Tris (pH 8.8)	1,9 ml	1,9 ml	380 µl
10 % SDS	75 µl	75 µl	30 µl
10 % APS	75 µl	75 µl	30 µl
TEMED	3 µl	4,5 µl	3 µl

Pro Kammtasche wurde je 10 µg Proteinprobe aufgetragen, welche zuvor mit 5 x Lämmli-Puffer (Tabelle 4.13) im Verhältnis 4:1 bei 95°C für 5 min im Thermocycler inkubiert wurde. Als Molekulargewichtsmarker wurde ein SDS-Page Prestained Standard Proteinmarker (Bio Rad, München) verwendet. Zunächst wurde die Elektrophorese für 30 min bei 60 V durchgeführt, bis das Bromphenolblau des Lämmli-Puffers den Übergang von Sammel- zum Trenngel erreicht hatte. Anschließend erfolgte die Elektrophorese für 60 min bei 150 V. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn sich die blaue Lauffront 1 cm oberhalb des Gelendes befand.

4.3.3.2 Transfer auf die PVDF-Membran

Im nächsten Schritt wurden die Proteine vom SDS-Page Gel auf eine PVDF-Membran transferiert (*Tankblot*-Verfahren). Dazu wurde das Trenngel aus der Elektrophoresekammer ausgebaut und kurz in 1 x Transferpuffer (Tabelle 4.13) unter leichtem Schütteln gewaschen. Die zugeschnittene PVDF-Membran wurde für 15 sec in Methanol aktiviert. Anschließend erfolgte der Aufbau des Blotting-Sandwichs nach dem Prinzip:

Schwamm – Filterpapier – PVDF-Membran – Trenngel – Filterpapier – Schwamm

Nachdem das Blotting-Sandwich in der Blot-Apparatur positioniert war, wurde diese mit 1 x Transferpuffer aufgefüllt und die Proteine bei 150 mA über 90 min auf die PVDF-Membran transferiert. Danach wurde die PVDF-Membran für 5 min in 1 x TBS / 0,1 % Tween-20-Puffer gewaschen, um anschließend freie Bindungsstellen auf der Membran durch die Inkubation in 5 % Magermilchlösung für 1 bis 2 h zu blockieren. Danach wurde die Membran 4 x 5 min in 1 x TBS / 0,1 % Tween-20-Puffer gewaschen.

4.3.3.3 *Antikörper und Proteindetektion*

Die Inkubation der PVDF-Membran in der primären Antikörperlösung, bestehend aus 1 x TBS / 0,2 % Tween-20-Puffer und 5 % BSA, erfolgte unter leichtem Schütteln für 1 h beziehungsweise über Nacht bei 4°C. Abhängig vom verwendeten Antikörper wurde dieser zwischen 1:500 und 1:2000 verdünnt. Anschließend wurde die Membran 3 x 5 min in 1 x TBS / 0,1 % Tween-20-Puffer gewaschen. Die Verdünnung des zweiten Antikörpers erfolgte 1:10.000 in 5 % Magermilchlösung. Die Membran wurde darin für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und wiederum 3 x 5 min in 1 x TBS / 0,1 % Tween-20-Puffer gewaschen.

Zum enzymatischen Nachweis der erfolgten Antikörperreaktion wurden die ECL-Detektionslösungen A und B (Chemilumineszenz-Western Lightning, Perkin Elmer) nach Herstellerprotokoll im Verhältnis 1:1 gemischt und für 1 min auf die PVDF-Membran gegeben. Die Membran wurde anschließend in der Dunkelkammer mit einem ECL-Röntgenfilm (Kodak Biomax Light Film) bedeckt und je nach nachzuweisendem Protein, Antikörper und Qualität des Westernblots zwischen 10 sec und 30 min exponiert. Zur Filmentwicklung wurde der Film im letzten Schritt für 10 sec in einer Entwicklerlösung geschwenkt, mit Wasser abgespült und in eine Fixierlösung gelegt.

4.3.3.4 *Stripping und Ladekontrolle*

Um festzustellen, ob die Membran mit der gleichen Proteinmenge beladen war, wurde nach jedem Proteinnachweis eine Kontrolle mit dem primären Antikörper ERK 2 in einer Verdünnung von 1:1000 durchgeführt. Zur Wiederverwendung der PVDF-Membran wurde diese durch die Inkubation in Stripping-Puffer (Tabelle 4.13) bei 50°C für 7 min und anschließender Waschung 6 x 5 min in 1 x TBS / 0,1 % Tween-20-Puffer von vorher verwendeten Antikörpern befreit. Anschließend erfolgte die Blockierung freier Bindungsstellen in 5 % Magermilchlösung über 30 min.

4.3.4 Extraktion nukleärer Proteine

Für die Extraktion nukleärer Proteine wurde das *Nuclear Extract* Kit von Active Motif (Rixensart, Belgien) verwendet. Dazu wurden jeweils 15 Millionen enterischen Gliazellen pro Zellkulturflasche ausgesät und mit TLR-, NOD-Liganden oder Zytokinen für 90 min inkubiert. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden die Zellkulturflaschen auf Eis gesetzt und mit 6 ml eiskaltem PBS / Phosphatase Inhibitor Puffer (Tabelle 4.15) gewaschen. Anschließend wurden die Gliazellen von der Zellkulturflasche abgeschabt und die Zellsuspension für 5 min bei 500 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde nun in 500 µl hypotonem Puffer (Tabelle 4.15) resuspendiert und für 15 min bei 4°C inkubiert, um den Zellinnendruck zu erhöhen und die Zellmembranen anschwellen zu lassen. Die anschließende Zugabe von 25 µl Detergenz führte zur Perforation der Zellmembran. Während der folgenden Zentrifugation für 30 sec bei 12.000 rpm und 4°C erfolgte die Anreicherung der zytoplasmatischen Proteinfraction im Überstand, welcher abpipettiert und bei - 80°C eingefroren wurde. Zur klaren Trennung von zytoplasmatischen und nukleären Proteinen wurden drei Waschschrte mit je 250 µl 1 x hypotonem Puffer durchgeführt, die Suspension jeweils zentrifugiert (12.000 rpm, 30 sec, 4°C) und der entstandene Überstand verworfen. Das nun verbliebene Zellpellet enthielt ausschließlich Zellkerne mit intakter Membran. Es wurde in 100 µl *Complete* Lysepuffer (Tabelle 4.15) aufgenommen und für 30 min bei 300 rpm und 4°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (12.000 rpm, 10 min, 4°C) erhielt man den Überstand mit der nukleären Proteinfraction. Dieser wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung für die Transkriptionsfaktorassays bei - 80°C gelagert.

Tabelle 4.15 Puffer für die Extraktion nukleärer Proteine

	Reagenzien	Ansatz	
<i>PBS / Phosphatase Inhibitor Puffer</i>	10 x PBS	1,6	ml
	Phosphatase Inhibitor	0,8	ml
	Aqua dest.	13,6	ml
<i>1x hypotoner Puffer</i>	10 x hypotoner Puffer	100	µl
	Aqua dest.	0,9	ml
<i>Complete Lysepuffer</i>	10 mM DTT	10	µl
	Lysepuffer AM 1	89	µl
	Protease Inhibitor Cocktail	1	µl

Zum Nachweis der reinen Trennung von zytoplasmatischen und nukleären Proteinen wurde mit beiden Fraktionen eine SDS-Page Elektrophorese durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und mittels ECL-System die Immunodetektion mit dem primären

Antikörper I κ B- α durchgeführt. Zur Detektion wurde der primäre Antikörper I κ B- α verwendet, da sich der Inhibitor von NF- κ B nur im Zytoplasma, nicht jedoch im Zellkern befindet und bei Aktivierung proteolytisch wird. Wie erwartet, konnte das I κ B- α Protein nur in der zytoplasmatischen Proteinfraction nachgewiesen werden. Die Zellkern-Zytoplasmaprotein-Trennung wurde durch den Einbau zwei weiterer Waschschrirte (nicht im ursprünglichen Herstellerprotokoll vorgesehen) mit 1 x hypotonem Puffer optimiert (Abbildung 4.3).

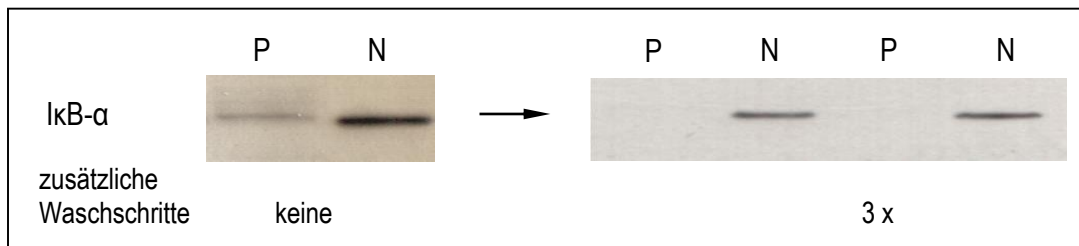


Abbildung 4.3 Nachweis der reinen Separation zytoplasmatischer (P) und nukleärer (N) Proteine anhand I κ B- α

4.3.5 Bestimmung der Zellkern- und Zytoplasmaproteinkonzentration

Für die Bestimmung der Zellkernproteinkonzentration wurde der *Quick Start Bradford Assay* (Bio-Rad, München) verwendet. Hierfür waren im Vergleich zum BCA-Protein Assay (Pierce, Bonn), das für die Gesamtproteinbestimmung verwendet wurde, nur 5 μ l Proteinlysate anstelle von 25 μ l nötig. Die Bovine Serumalbumin Standardreihe wurde mit *Complete* Lysepuffer (Tabelle 4.15) hergestellt: 2000 μ g/ml, 1500 μ g/ml, 1000 μ g/ml, 750 μ g/ml, 500 μ g/ml, 250 μ g/ml, 125 μ g/ml und 0 μ g/ml. Die Proben mit nukleären Proteinen wurden entsprechend der Standardreihe im Verhältnis 1:4 mit *Complete* Lysepuffer auf Konzentrationen zwischen 0 - 2000 μ g/ml vorverdünnt. Nach Inkubation von 5 μ l Probenverdünnung sowie der Standardreihe (Doppelbestimmung) mit 250 μ l Bradford Reagenz (auf Raumtemperatur) bei Raumtemperatur für 10 min erfolgte die Absorptionsmessung bei 595 nm im ELISA-Reader.

4.3.6 Transkriptionsfaktorassay

Für den Nachweis des aktivierten Transkriptionsfaktors NF- κ B wurde ein TransAM Kit von Active Motif (Rixensart, Belgien) verwendet. Dieses auf dem ELISA-Prinzip basierende System ermöglicht eine quantitative Analyse aktivierter Transkriptionsfaktoren aus nukleären Proteinen. Das TransAM Kit enthält eine 96-Well-Platte, welche mit einer zweisträngigen Oligonukleotidprobe beschichtet ist. Die

Oligonukleotide beinhalten je nach Transkriptionsfaktor eine spezielle Konsensus-Bindungssequenz, welche für NF- κ B 5' - GGGACTTCC - 3' darstellt. Die aktivierte und translozierte Form des Transkriptionsfaktors bindet an die entsprechende Konsensus-Bindungssequenz und wird durch einen primären anti-Transkriptionsfaktor-Antikörper (Tabelle 4.16) erkannt. Durch die Zugabe des Meerrettichperoxidase-konjugierten Sekundärantikörpers wurde mithilfe des Substrates ein Farbumschlag erzielt. Die Extinktion wurde spektrophotometrisch gegen einen Leerwert bestimmt und war zum gebundenen Transkriptionsfaktor direkt proportional.

Tabelle 4.16 TransAM Transkriptionsfaktorassay NF- κ B

	Verdünnung	primäre anti-Transkriptionsfaktor-Antikörper	Positivkontrolle
NF- κ B	1:1000	NF- κ B 1, p65, c-Rel	Nukleäre Extrakt Raji

Entsprechend der Herstellerangaben wurden zunächst zur Bindung des Transkriptionsfaktors an die Konsensus-Bindungssequenz jeweils 30 μ l Bindungspuffer pro Well gegeben und 20 μ g nukleäres Protein hinzugefügt. Für die Negativkontrolle (*Blank*) wurden 20 μ l *Complete* Lysepuffer und als Positivkontrolle je 5 μ g Kernextrakt Raji eingesetzt. Es erfolgte bei allen Proben eine Doppelbestimmung. Die Platten wurden zunächst 60 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler bei 100 rpm inkubiert, dann 3 x mit je 200 μ l 1 x Waschpuffer (Tabelle 4.17) gewaschen und auf Filterpapier ausgeklopft. Für die Bindung des primären anti-Transkriptionsfaktor-Antikörpers wurden jeweils 100 μ l des 1:1000 mit 1 x Antikörper-Bindungspuffer verdünntem Antikörper (Tabelle 4.16) in jedes Well gegeben. Dieser Ansatz wurde wiederum für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 3 x mit 200 μ l 1 x Waschpuffer gewaschen.

Tabelle 4.17 Puffer für den Transkriptionsfaktorassay NF- κ B

	Reagenzien	Ansatz
<i>Bindungspuffer NF-κB</i>	DTT	6,5 μ l
	Heringsspermien DNA	32,4 μ l
	Bindungspuffer AM 3	3,2 ml
<i>1 x Waschpuffer</i>	10 x Waschpuffer AM 2	21,6 ml
	Aqua dest.	194,4 ml
<i>1 x Antikörper Bindungspuffer</i>	10 x Antikörper Bindungspuffer AM 2	2,16 ml
	Aqua dest.	19,44 ml

Als sekundärer Antikörper wurde anti-*rabbit* HRP-konjugiertes IgG (Verdünnung 1:1000 in 1 x Antikörper-Bindungspuffer) verwendet und je 100 µl pro Well hinzugefügt. Anschließend erfolgte erneut die Inkubation für 60 min bei Raumtemperatur gefolgt von 4 Waschungen mit 1 x Waschpuffer. Für die kolorimetrische Reaktion wurden 100 µl Entwicklungslösung (auf Raumtemperatur) hinzugefügt und die Farbentwicklung für 2 - 10 min beobachtet bis die Positivkontrolle von mittel- zu dunkelblau umschlug. Dann wurde die Reaktion mit 100 µl Stopp-Lösung beendet und mit dem *Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader* (BioTek, USA) bei 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 650 nm gemessen und mittels *Gen5* Datenanalyse Software ausgewertet. Die Absorptionen wurden gegen die mitgeführten *Blank*-Werte abgeglichen und somit entsprechend der Hintergrundsignale korrigiert.

4.4 Statistische Analyse

Jedes Experiment wurde mindestens dreifach wiederholt und als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die statistischen Analysen wurden mithilfe des Student'schen T-Tests durchgeführt. Alle Ergebnisse wurden mit der *SmallStata 12* Software (StataCorp LP, USA) kalkuliert. Als statistisch signifikant wurden Daten mit $p < 0,05$ gewertet. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mithilfe des Programmes *Microsoft Office Excel 2007* (Microsoft Corp., Redmond, USA) berechnet und graphisch dargestellt. Die Abbildungen wurden mit dem Programm *Adobe Photoshop 5.0* (Adobe Systems Inc., San Jose, USA) bearbeitet.

5 Ergebnisse

5.1 Expression von *Toll-like-* und *NOD*-Rezeptoren der angeborenen Immunantwort in nativen enterischen Gliazellen

Um die Bedeutung von enterischen Gliazellen bei immunologischen Prozessen herauszustellen, wurde zunächst in nativen enterischen Gliazellen die Expression von *Toll-like-* und *NOD*-Rezeptoren untersucht. Diese stellen die Hauptvertreter der Rezeptoren für die Bakterienerkennung in der angeborenen Immunantwort dar. Im ersten Schritt wurde das Vorhandensein der Rezeptoren mittels quantitativer Standard PCR auf mRNA-Ebene geprüft. Dabei konnte erstmalig mRNA der Membran-gebundenen *Toll-like*-Rezeptoren TLR 2, TLR 4, TLR 6, TLR 7 und TLR 9 in enterischen Gliazellen nachgewiesen werden (Abbildung 5.1 a-e). Es zeigte sich keine Evidenz für das Vorhandensein von TLR 5 mRNA. Jedoch gelang der Nachweis von CD 14 mRNA, dem Korezeptor von TLR 4, welcher der Erkennung von Lipopolysacchariden aus der Zellwand gram-negativer Bakterien dient (Abbildung 5.1 f). Im Folgenden wurden die im Zytoplasma befindlichen *NOD*-Rezeptoren der angeborenen Immunantwort untersucht. Dabei konnte die Existenz von NOD 1 und NOD 2 auf mRNA-Ebene in nicht stimulierten enterischen Gliazellen dokumentiert werden (Abbildung 5.1 g-h). Zudem gelang im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch der Nachweis von RICK mRNA in nativen enterischen Gliazellen (Abbildung 5.1 i).

Im nächsten Schritt erfolgte der funktionelle Nachweis dieser Rezeptoren und Adaptormoleküle durch Expressionsanalysen auf Proteinebene. Mittels Westernblot konnte in nativen enterischen Gliazellen erstmalig die Existenz von Proteinen der Membran-gebundenen *Toll-like*-Rezeptoren TLR 2, TLR 4, TLR 6 und TLR 9 demonstriert werden (Abbildung 5.2 a-d). Der Nachweis von TLR 7 gelang auf Proteinebene nicht. Aufgrund des hohen Hintergrundsignals im Westernblot gestaltete sich die Detektion der intrazellulären Proteine von NOD 1 und NOD 2 in nicht stimulierten enterischen Gliazellen deutlich schwieriger (Abbildung 5.2 e-f). Hingegen gelang der Nachweis der sowohl für die Signalweiterleitung der angeborenen als auch erworbenen Immunantwort wichtigen Kinase RICK auf Proteinebene gut (Abbildung 5.2 g).

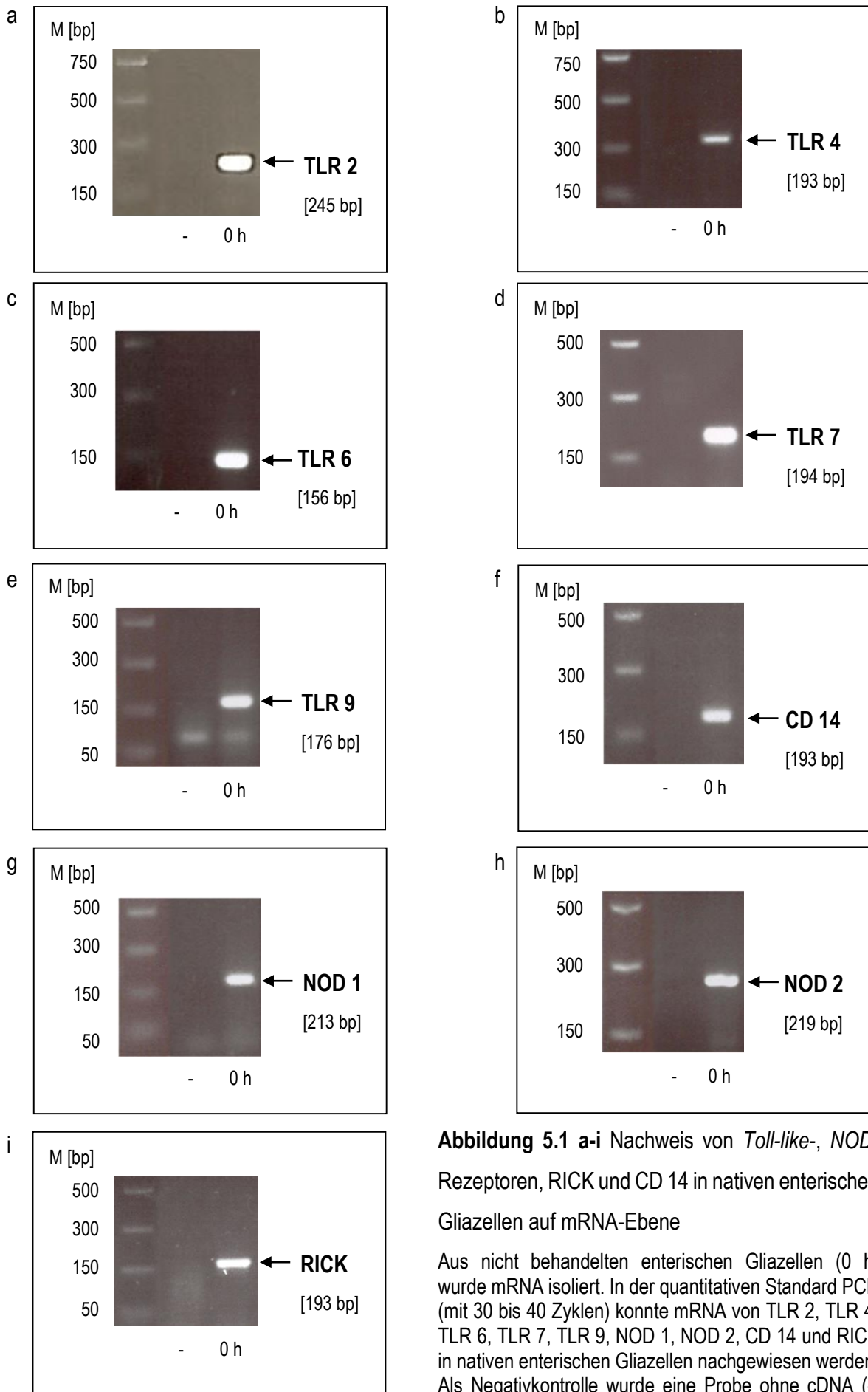


Abbildung 5.1 a-i Nachweis von *Toll-like*-, *NOD*-Rezeptoren, *RICK* und *CD 14* in nativen enterischen Gliazellen auf mRNA-Ebene

Aus nicht behandelten enterischen Gliazellen (0 h) wurde mRNA isoliert. In der quantitativen Standard PCR (mit 30 bis 40 Zyklen) konnte mRNA von TLR 2, TLR 4, TLR 6, TLR 7, TLR 9, NOD 1, NOD 2, CD 14 und RICK in nativen enterischen Gliazellen nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle wurde eine Probe ohne cDNA (-) eingesetzt. M = Marker.

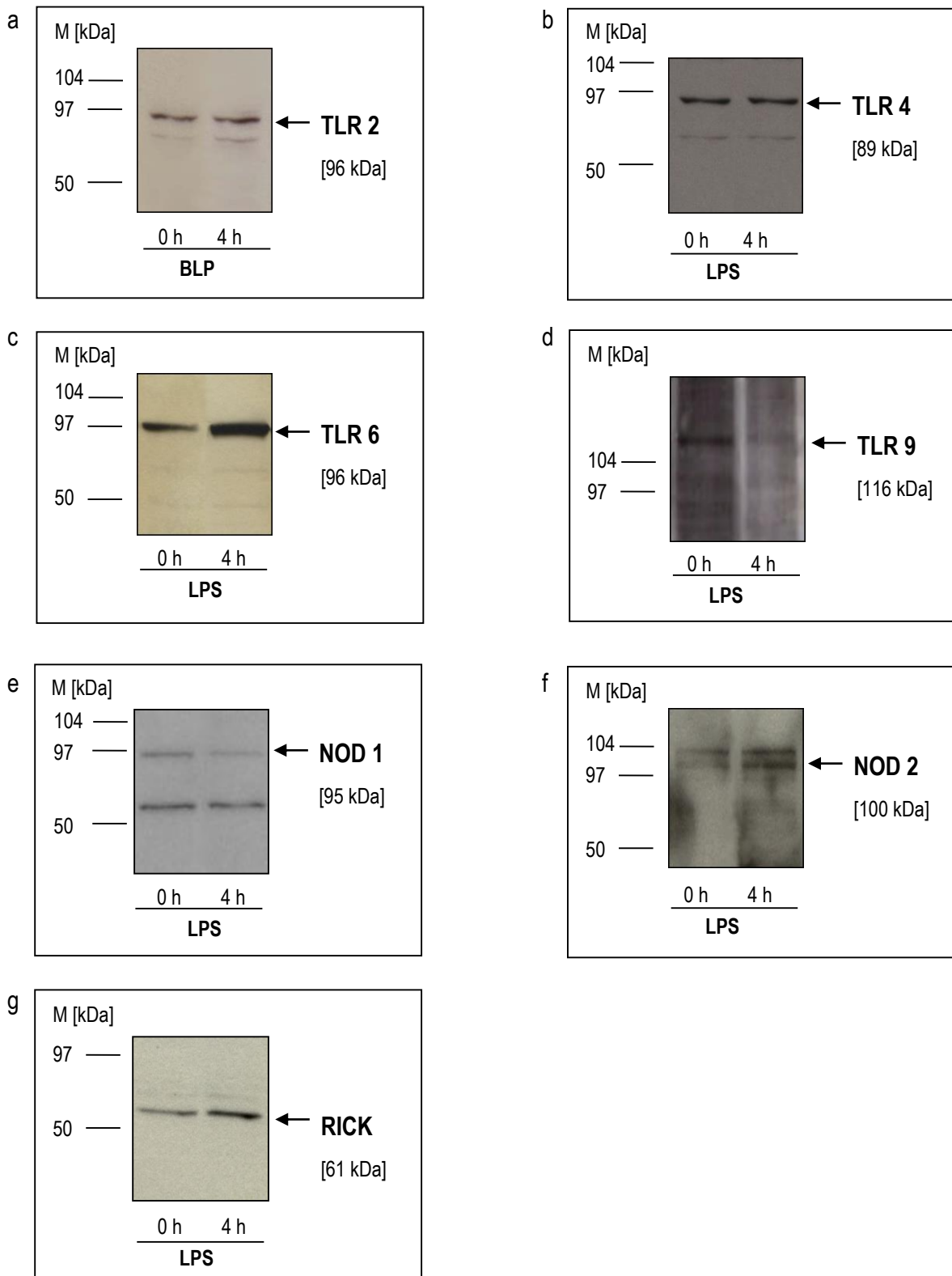


Abbildung 5.2 a-g Nachweis von *Toll-like*-, *NOD*-Rezeptoren und RICK in nativen enterischen Gliazellen und nach Exposition mit TLR 2- und TLR 4-Liganden auf Proteinebene

Die enterischen Gliazellen wurden unbehandelt gelassen (0 h) oder für 4 h mit 100 ng/ml BLP oder 10 µg/ml LPS stimuliert. Nach Isolierung von Gesamtproteinen erfolgte die Durchführung des Westernblots, wobei die Gesamtproteinexpression von TLR 2, TLR 4, TLR 6, TLR 9, NOD 1, NOD 2 und RICK in enterischen Gliazellen nachgewiesen werden konnte. M = Marker.

5.2 Einfluss exogener Stimuli auf die mRNA-Expression von Rezeptoren der angeborenen Immunantwort

Einige bisher publizierte Studien weisen darauf hin, dass enterische Gliazellen eine Schlüsselfunktion in der Erhaltung der Immunhomöostase des Magen-Darmtrakts spielen (Bush et al., 1998; Cornet et al., 2001). Der zugrunde liegende Mechanismus scheint jedoch weitgehend unbekannt. Auf Grundlage der Hypothese, dass dies über *Toll-like*- und *NOD*-Rezeptoren der angeborenen Immunantwort erfolgt, wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Bakterienkomponenten auf die mRNA-Expression der genannten Rezeptoren in Primärkulturen von enterischen Gliazellen untersucht. Dafür wurden die enterischen Gliazellen für 0, 2, 4, 8, 16 und 24 Stunden mit bakteriellem Lipoprotein (BLP 100 ng/ml), Lipopolysaccharid (LPS 10 µg/ml) oder CpG ODN (CpG 10 µg/ml) inkubiert. Während das bakterielle Lipoprotein (BLP) als spezifischer Ligand von TLR 2 bekannt ist, handelt es sich bei TLR 4 um den Sensor für das Lipopolysaccharid (LPS). TLR 9 spielt bei der Erkennung von CpG (DNA Oligonukleotid) in der angeborenen Immunantwort eine tragende Rolle.

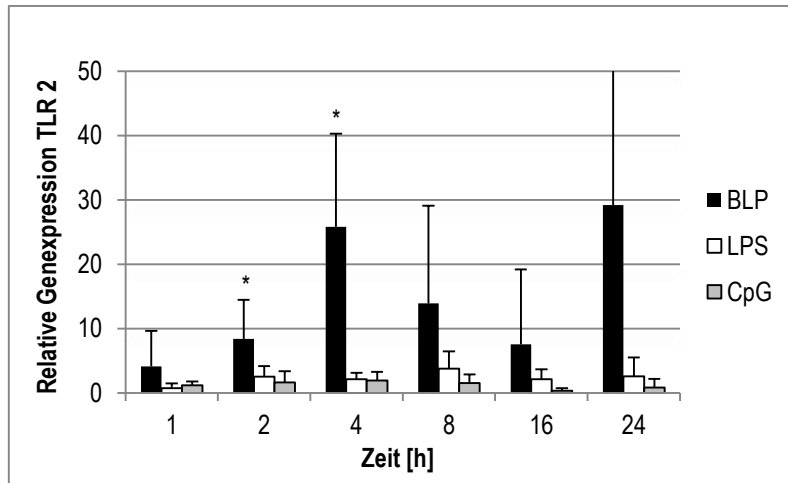
Wie in den Abbildungen 5.3 und 5.4 dargestellt, wurde mittels *Real-time* PCR Analysen nicht nur der Einfluss eines Liganden auf die mRNA-Expression seines spezifischen Rezeptors, wie beispielsweise BLP auf TLR 2, sondern auch auf die Regulierung weiterer Rezeptoren untersucht. Die Expressionsanalysen enthalten Daten über den Einfluss von BLP, LPS und CpG auf die *Toll-like*-Rezeptoren TLR 2, TLR 4, TLR 6, TLR 9, die *NOD*-Rezeptoren NOD 1, NOD 2 sowie CD 14. Alle erhobenen Daten wurden in Relation zu nicht stimulierten, nativen enterischen Gliazellen angegeben, welche dem Wert 1 beziehungsweise 100 % entsprechen.

5.2.1 mRNA-Expression der *Toll-like*-Rezeptoren und CD 14

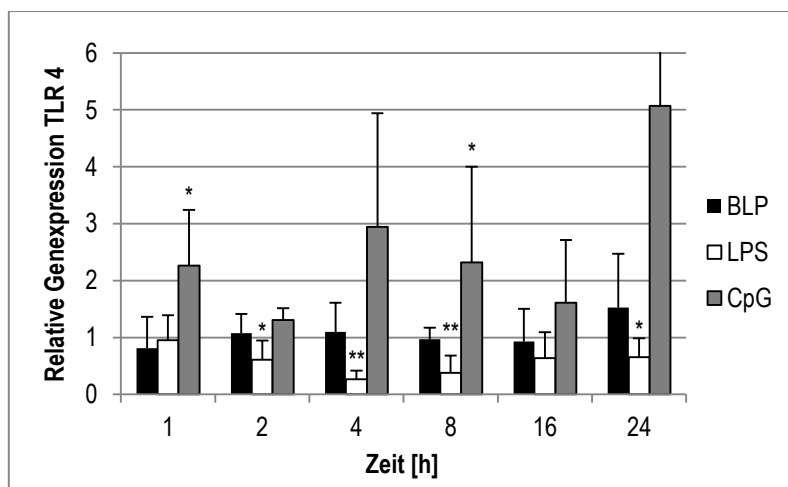
Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das bakterielle Lipoprotein BLP vornehmlich die Expression seines Liganden-spezifischen Rezeptors TLR 2 in enterischen Gliazellen beeinflusste. So kam es bereits nach 2-stündiger Stimulation der Zellen mit BLP zu einer 8-fachen Steigerung der mRNA-Expression von TLR 2 ($p < 0,05$) (Abbildung 5.3 a). Die Inkubation mit BLP für 4 Stunden führte zu einer weiteren signifikanten Expressionssteigerung von TLR 2 auf das 25-fache im Vergleich zu nativen enterischen Gliazellen ($p < 0,05$). Die TLR 2 Expression unter BLP erreichte ihren Höhepunkt nach 4 Stunden und war bis zum Zeitpunkt von 16 Stunden wieder rückläufig. Bei der mRNA-Expression von TLR 4 zeigten sich während der 1 bis 24-stündigen Inkubation mit BLP keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu nicht behandelten Gliazellen. Für die Erkennung von

Bakterien benötigt der *Toll-like*-Rezeptor 4 unter anderem das auf der Zelloberfläche lokalisierte Glykoprotein CD 14. Die vorliegenden Daten belegen, dass die Transkription von CD 14 im Gegensatz zu TLR 4 durch das bakterielle Lipoprotein BLP beeinflusst wurde. So wurde durch BLP die mRNA-Expression von CD 14 nach 2 und 8 Stunden signifikant um über 40 % reduziert ($p < 0,05$) (Abbildung 5.3 c). Auch bei TLR 6 scheint BLP eine Hemmung der mRNA-Expression zu bewirken. Nach 16-stündiger Exposition der enterischen Gliazellen mit BLP konnte eine signifikante Reduktion von TLR 6 um über 40 % auf Transkriptionsebene beobachtet werden ($p < 0,05$) (Abbildung 5.3 d). Die Expressionshemmung bei TLR 6 trat im Vergleich zu CD 14 zu einem deutlich späteren Zeitpunkt auf.

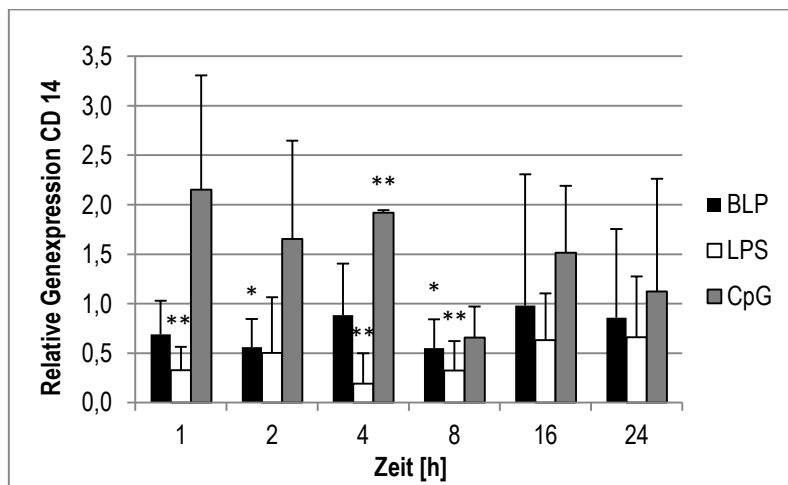
Das Lipopolysaccharid aus der äußeren Membran von gram-negativen bakteriellen Zellwänden, wie beispielsweise *Escherichia coli*, stellt den Hauptliganden des *Toll-like*-Rezeptors TLR 4 dar. Die vorliegenden Daten zeigen, dass eine signifikante Hemmung der mRNA-Expression von TLR 4 durch das bakterielle Lipopolysaccharid in enterischen Gliazellen eintrat. Wie im Einzelnen der Abbildung 5.3 b entnommen werden kann, war bereits nach 2-stündiger Inkubation der Gliazellen mit LPS eine Hemmung der TLR 4 Transkription um fast 40 % zu erkennen ($p < 0,02$). Die maximale Reduktion der relativen mRNA-Expression von TLR 4 im Vergleich zu nativen enterischen Gliazellen konnte nach 4-stündiger Exposition mit LPS beobachtet werden. Dabei wurde TLR 4 durch LPS auf Transkriptionsebene um mehr als 70 % gehemmt ($p < 0,0001$, Abbildung 5.3 b). Dieser Suppressionseffekt durch LPS auf die mRNA von TLR 4 zeigte eine lang anhaltende Wirkung über einen Zeitraum von 24 Stunden. So konnte nach 8 Stunden noch eine Hemmung von 62 % ($p < 0,01$) und nach 24 Stunden von 30 % ($p < 0,05$) im Vergleich zu nativen Gliazellen beobachtet werden. In den Expressionsanalysen von CD 14 zeigte sich durch LPS ein annähernd gleicher Hemmungseffekt wie bei TLR 4 (Abbildung 5.3 c). Während der Beginn der mRNA-Expressionshemmung bei CD 14 um 65 % ($p < 0,01$) bereits nach 1-stündiger Inkubation mit LPS zu beobachten war, wurde die maximale Reduktion auf Transkriptionsebene ähnlich wie bei TLR 4 nach 4 Stunden erreicht. Hierbei konnte sogar eine Hemmung von über 80 % verzeichnet werden ($p < 0,01$, Abbildung 5.3 c).



a



b



c

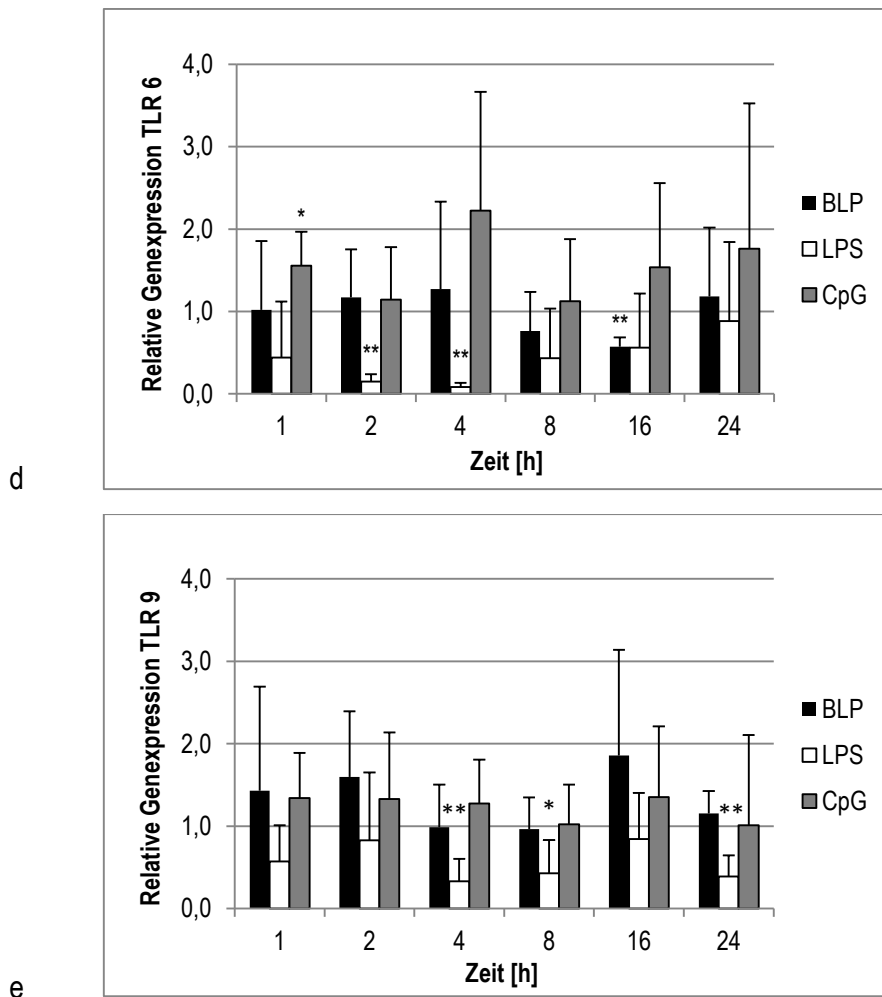


Abbildung 5.3 a-e mRNA-Expression von *Toll-like*-Rezeptoren und CD 14 nach Exposition mit TLR 2-, TLR 4- und TLR 9-Liganden in enterischen Gliazellen

Die enterischen Gliazellen wurden unbehandelt gelassen oder für 1 bis 24 h mit 100 ng/ml BLP, 10 µg/ml LPS oder 10 µg/ml CpG stimuliert. Es erfolgte die RNA-Isolierung und Durchführung der *Real-time* PCR mit 40 Zyklen und einer *Annealing* Temperatur von 60°C. Die Expression von TLR 2 (a), TLR 4 (b), CD 14 (c), TLR 6 (d) und TLR 9 (e) wurde auf das Haushaltsgen GAPDH normalisiert. Die Daten wurden als Mittelwerte ± SEM aus 3 unabhängigen Versuchen dargestellt und als relative Expression auf unbehandelte enterische Gliazellen bezogen, welche auf den Wert 1 gesetzt wurden. Das Symbol * zeigt einen signifikanten Unterschied zu nativen enterischen Gliazellen an (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Zu beachten ist die unterschiedliche Beschriftung der y-Achse.

Die Daten dieser Arbeit zeigen einen deutlichen Einfluss von LPS auf die Regulation von TLR 6. So führte die 2-stündige Inkubation der enterischen Gliazellen mit LPS zu einer Minimierung der mRNA-Expression von TLR 6 um 85 % und nach 4 Stunden um über 90 % (Abbildung 5.3 d, $p < 0,05$). Eine ähnlich signifikante, wenn auch in geringerer Ausprägung vorhandene Hemmung war nach 16-stündiger Stimulation durch LPS bei TLR 6 sichtbar ($p < 0,05$). Der Einfluss von Fsl-1 auf TLR 6 wurde im Rahmen dieser Studie nur auf Proteinebene untersucht (Abbildung 5.7).

Bemerkenswert erscheint, dass CpG als spezifischer Ligand von TLR 9 auf mRNA-Ebene in enterischen Gliazellen keine Rolle bei der Regulation seines eigenen Rezeptors spielt. So konnte im Vergleich zu nicht stimulierten Gliazellen kein signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression von TLR 9 durch CpG beobachtet werden. Im Gegensatz dazu, wurde die Transkription von TLR 9 durch LPS deutlich gehemmt. Die Exposition der enterischen Gliazellen mit LPS über einen Zeitraum von 4 bis 24 Stunden bewirkte eine signifikante Suppression der mRNA von TLR 9 um 55 % ($p < 0,01$) - 65 % ($p < 0,05$) (Abbildung 5.3 e). Der TLR 9 Ligand CpG zeigte insgesamt nur einen mäßigen Einfluss auf die mRNA-Expression der *Toll-like*-Rezeptoren in enterischen Gliazellen. Es kam bei TLR 4 und TLR 6 zu einer signifikanten Steigerung der mRNA-Expression nach 1-stündiger Inkubation mit CpG um das 1,5-2-fache ($p < 0,05$). Ein ähnlich stimulierender Effekt wurde bei CD 14 beobachtet, bei dem sich nach 4-stündiger Stimulation die relative Expression im Vergleich zu nativen enterischen Gliazellen um das 1,9-fache erhöhte ($p < 0,01$). CpG konnte keine signifikante Änderung der mRNA-Expression von TLR 2 bewirken.

Aus den *Real-time* PCR Analysen mit enterischen Gliazellen nach Stimulation mit Komponenten der darmeigenen Mikroflora sind zusammenfassend folgende Punkte zu erwähnen: Während BLP zu einer starken Expressionssteigerung seines Rezeptors TLR 2 führte, kam es durch den spezifischen TLR 4-Ligand LPS zu einer deutlichen mRNA-Hemmung von TLR 4. Daneben inhibierte LPS signifikant die Transkription von CD 14, TLR 6 und TLR 9. Hingegen zeigte sich durch CpG eine nahezu unveränderte mRNA-Expression von TLR 9 im Vergleich zu nativen enterischen Gliazellen.

5.2.2 mRNA-Expression der *NOD*-Rezeptoren

Während die Membran-gebundenen *Toll-like*-Rezeptoren vor allem für die Erkennung von extrazellulären Mikroorganismen verantwortlich sind, gehören die zytoplasmatischen *NOD*-Rezeptoren NOD 1 und NOD 2 zu den intrazellulären *Pattern Recognition Receptors* (PRRs). Ein besonderes Augenmerk gilt diesen Rezeptoren, da in den letzten Jahren ein Zusammenhang zwischen Mutationen im NOD 2 Gen (CARD 15) und dem Auftreten von Morbus Crohn gesichert werden konnte (Hugot et al., 2001; Hampe et al., 2001).

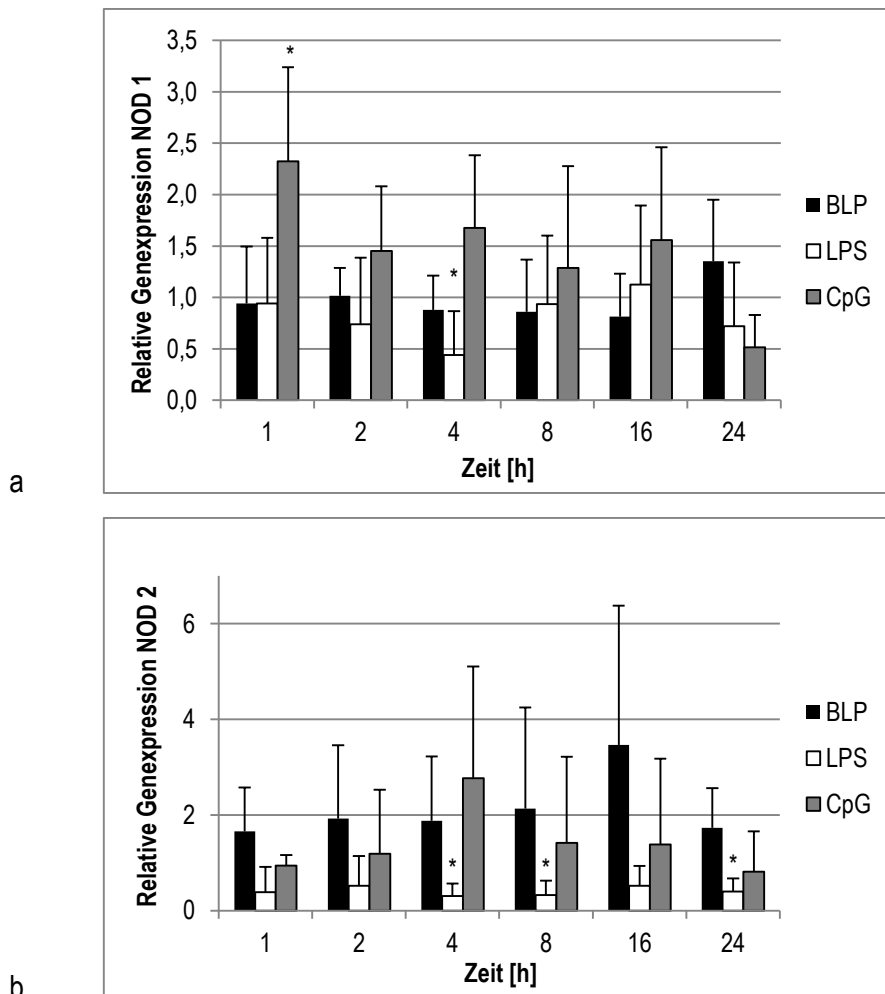


Abbildung 5.4 a-b mRNA-Expression von *NOD*-Rezeptoren nach Exposition mit TLR 2-, TLR 4- und TLR 9-Liganden in enterischen Gliazellen

Die enterischen Gliazellen wurden unbehandelt gelassen oder für 1 bis 24 h mit 100 ng/ml BLP, 10 µg/ml LPS oder 10 µg/ml CpG stimuliert. Es erfolgte die RNA-Isolierung und Durchführung der *Real-time* PCR mit 40 Zyklen und einer *Annealing* Temperatur von 60°C. Die Expression von NOD 1 (a) und NOD 2 (b) wurde auf das Haushaltsgen GAPDH normalisiert. Die Daten wurden als Mittelwerte ± SEM aus 3 unabhängigen Versuchen dargestellt und als relative Expression auf unbehandelte enterische Gliazellen bezogen, welche auf den Wert 1 gesetzt wurden. Das Symbol * zeigt einen signifikanten Unterschied zu nativen enterischen Gliazellen an (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Zu beachten ist die unterschiedliche Beschriftung der y-Achse.

In der vorliegenden Arbeit erfolgten Transkriptionsanalysen an NOD 1 und NOD 2 mittels *Real-time* PCR nach Inkubation der enterischen Gliazellen mit BLP, LPS oder CpG über 1 bis 24 Stunden. Wie der Abbildung 5.4 a-b zu entnehmen ist, hatte der TLR 2-Ligand BLP auf Transkriptionsebene weder auf die Expression von NOD 1 noch auf die von NOD 2 Einfluss. Im Gegensatz dazu, bewirkte der TLR 4-Ligand LPS eine signifikante Reduktion der mRNA beider *NOD*-Rezeptoren. Während LPS bei NOD 1 lediglich zu einer kurzzeitigen, aber signifikanten Hemmung der mRNA-Expression ($p < 0,05$) auf 44 % nach 4 Stunden führte, kam es bei NOD 2 durch LPS zu einer länger anhaltenden

mRNA-Suppression. Es zeigte sich über den Untersuchungszeitraum von 4 bis 24 Stunden eine signifikante Reduktion der mRNA von NOD 2 um 60 - 69 % ($p < 0,05$) im Vergleich zur mRNA nativer enterischer Gliazellen (Abbildung 5.4 b). Daten über den Zeitraum von mehr als 24 Stunden wurden in dieser Arbeit nicht erhoben. Anders als es bei BLP und LPS zu beobachten war, führte der TLR 9-Ligand CpG bereits innerhalb der ersten Stunde nach Stimulationsbeginn zu einer signifikanten, aber nur kurzweiligen Steigerung der mRNA-Expression von NOD 1 (Abbildung 5.4 a). Dieses Phänomen konnte auch bei den *Toll-like*-Rezeptoren TLR 4 und TLR 6 beobachtet werden.

5.3 Expression von intrazellulären Signaltransduktionsmolekülen in enterischen Gliazellen nach TLR-Aktivierung auf mRNA-Ebene

Für die *TLR*- und *NOD*-vermittelte Signalweiterleitung bedarf es verschiedener intrazellulärer Kinasen und Transduktionsmoleküle. Bedeutend für die Interaktion mit den intrazellulären *NOD*-Rezeptoren ist vor allem RICK, ein Mitglied der Rezeptorfamilie der Serin-Threonin-Proteinkinasen. In der aktuellen Literatur finden sich keine Angaben über das Vorhandensein und die Funktion von RICK in enterischen Gliazellen. Mit den vorliegenden Daten konnte erstmals, wie in den Abbildungen 5.1 i und 5.2 g dargestellt, die Existenz von RICK in enterischen Gliazellen sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Im Folgenden wurden quantitative Analysen über den Einfluss der TLR-Liganden BLP, LPS und CpG auf die mRNA-Expression von RICK mittels *Real-time* PCR in enterischen Gliazellen durchgeführt (Abbildung 5.5). Dabei zeigte sich, dass BLP als TLR 2-Ligand im Vergleich zu nicht stimulierten Gliazellen keinen signifikanten Einfluss auf die mRNA-Expression von RICK ausübte. Hingegen war bei der Inkubation mit CpG eine kurzzeitig stimulierende Wirkung auf die mRNA von RICK innerhalb der ersten Stunde mit einem Anstieg der mRNA-Expression auf 220 % ($p < 0,05$) zu verzeichnen (Abbildung 5.5). LPS scheint von den untersuchten TLR-Liganden bei der Kinase RICK den stärksten aufregulierenden Effekt auf Transkriptionsebene zu besitzen. So kam es im Vergleich zu nativen enterischen Gliazellen nach 2 bis 4-stündiger Inkubation mit LPS zu einer signifikanten Steigerung der mRNA-Expression von RICK auf über 275 % ($p < 0,05$).

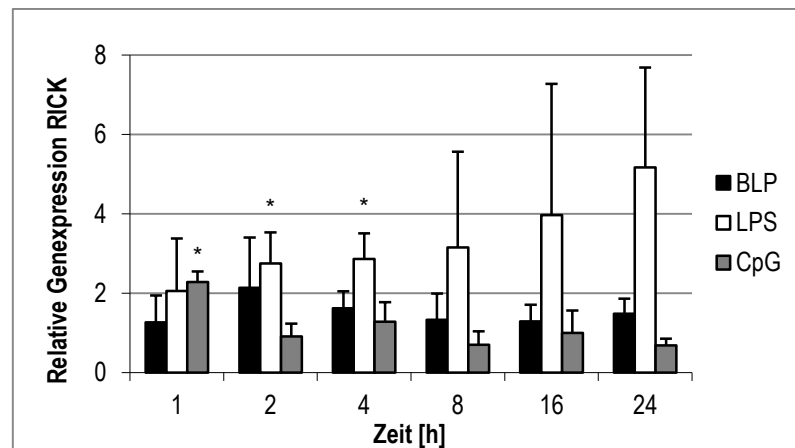


Abbildung 5.5 mRNA-Expression von RICK nach Exposition mit TLR 2-, TLR 4- und TLR 9-Liganden in enterischen Gliazellen

Die enterischen Gliazellen wurden unbehandelt gelassen oder für 1 bis 24 h mit 100 ng/ml BLP, 10 µg/ml LPS oder 10 µg/ml CpG stimuliert. Es erfolgte die RNA-Isolierung und Durchführung der *Real-time* PCR mit 40 Zyklen und einer *Annealing* Temperatur von 60°C. Die Expression von RICK wurde auf das Haushaltsgen GAPDH normalisiert. Die Daten wurden als Mittelwerte ± SEM aus 3 unabhängigen Versuchen dargestellt und als relative Expression auf unbehandelte enterische Gliazellen bezogen, welche auf den Wert 1 gesetzt wurden. Das Symbol * zeigt einen signifikanten Unterschied zu nativen enterischen Gliazellen an (* p < 0,05).

In der Signalvermittlung der angeborenen Immunantwort sind neben RICK noch weitere intrazelluläre Adaptor- und Interaktionsmoleküle von Bedeutung. Über extrazelluläre Signale kommt es zur Aktivierung der zytoplasmatischen Toll / IL-1 R Domäne der *Toll-like*-Rezeptoren und damit zum Anlocken von intrazellulären Adaptorproteinen. Ziel ist es, durch die Signalweiterleitung über NF-κB zum Zellkern, mit einer vermehrten Expression von Zytokin-kodierenden Genen zu reagieren.

Da über das Vorhandensein von intrazellulären Signaltransduktionsmolekülen der angeborenen Immunantwort in enterischen Gliazellen keine Daten vorliegen, wurden folgende potentielle Signalmoleküle mittels cDNA-Mikroarray (SuperArray Bioscience Corporation, Frederick, MD, USA) analysiert: *Myeloid differentiation primary response gene 88* (Myd88), Interleukin-1 Rezeptor assoziierte Kinase (IRAK 1, IRAK 2), TNF-Rezeptor assoziierter Faktor 6 (TRAF 6), *MyD88-adaptor-like protein* (MAL), *TIR-domain-containing adaptor inducing IFN-β* (TRIF) und *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM). Dabei zeigte sich lediglich bei der Kinase IRAK 2 eine signifikante Veränderung der mRNA-Expression nach Aktivierung von TLR 2 und TLR 4 durch die Rezeptor-spezifischen Liganden BLP sowie LPS (Abbildung 5.6). Während BLP im Vergleich zu nativen enterischen Gliazellen zu einer Suppression von IRAK 2 auf mRNA-Ebene um 23 % (p < 0,01) führte, war LPS in der Lage, die mRNA-Expression von IRAK 2 um 250 % zu steigern (p < 0,01). Für alle anderen analysierten Adaptor- und Interaktionsmoleküle zeigte sich keine signifikante Regulierung der mRNA durch die TLR 2-, TLR 4- und TLR 9-Liganden.

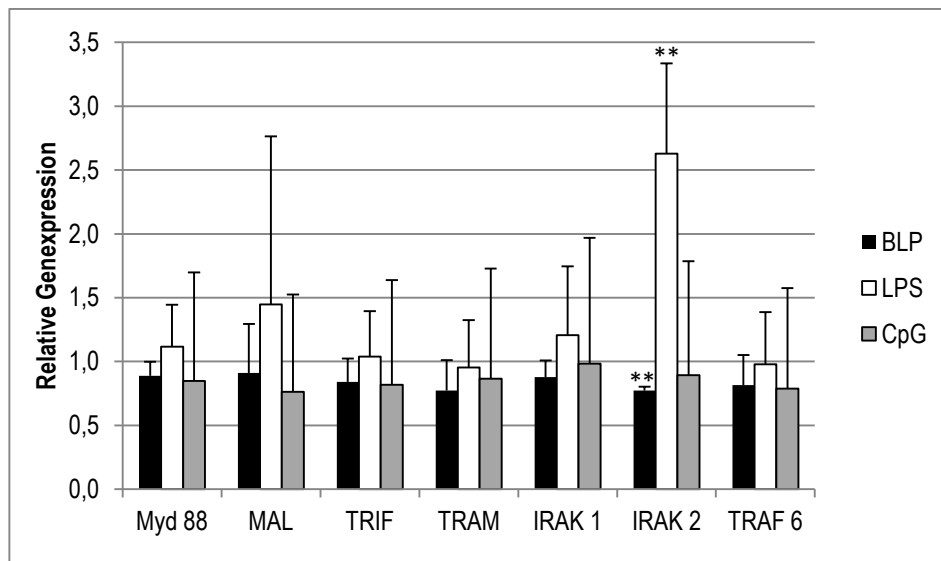


Abbildung 5.6 mRNA-Expression der intrazellulären Signaltransduktionsmoleküle nach Exposition mit TLR 2-, TLR 4- und TLR 9-Liganden in enterischen Gliazellen

Die enterischen Gliazellen wurden unbehandelt gelassen oder für 4 h mit 100 ng/ml BLP, 10 µg/ml LPS oder 10 µg/ml CpG stimuliert. Es erfolgte die RNA-Isolierung und Durchführung der *Real-time* PCR mittels cDNA-Mikroarray mit 40 Zyklen und einer *Annealing* Temperatur von 60°C. Die Expression von Myd88, MAL, TRIF, TRAM, IRAK 1, IRAK 2 und TRAF 6 wurde auf den Mittelwert mehrerer Haushaltsgene normalisiert. Die Daten wurden als Mittelwerte ± SEM aus 3 unabhängigen Versuchen dargestellt und als relative Expression auf unbehandelte enterische Gliazellen bezogen, welche auf den Wert 1 gesetzt wurden. Das Symbol * zeigt einen signifikanten Unterschied zu nativen enterischen Gliazellen an (** p < 0,01).

5.4 Einfluss TLR-spezifischer Liganden auf die Proteinexpression von Rezeptoren der angeborenen Immunantwort

Nachdem der Einfluss von exogenen bakteriellen Stimulanzen auf die Expression von *Toll-like*-, *NOD*-Rezeptoren und RICK auf mRNA-Ebene analysiert wurde, sollte im nächsten Teil dieser Arbeit untersucht werden, ob sich die beobachteten Effekte auf der Proteinebene auswirken. Für diese Analyse wurden die enterischen Gliazellen mit folgenden Rezeptor-spezifischen Liganden über einen Zeitraum von 0 bis maximal 24 Stunden inkubiert: BLP 100 ng/ml (TLR 2), LPS 10 µg/ml (TLR 4), Fsl-1 2,5 µg/ml (TLR 6), Imiquimod 40 µg/ml (TLR 7), CpG 10 µg/ml (TLR 9), iE-DAP 100 µg/ml (NOD 1) und MDP 100 µg/ml (NOD 2). Nach Ablauf der jeweiligen Stimulationszeit wurden für jeden Stimulus zelluläre Lysate gewonnen. Die darin enthaltene Gesamtproteinmenge für einen spezifischen *pattern recognition* Rezeptor (PPR) wurde mittels Westernblot mit einem Lysat aus unbehandelten enterischen Gliazellen verglichen. Anhand der anschließenden Ladekontrollen mit ERK 2 konnte eine vergleichbare Beladung der SDS-Page-Gele mit zellulärem Lysat sichergestellt werden.

5.4.1 Expression der *Toll-like*-Rezeptoren auf Proteinebene

Die vorliegenden Daten zeigten nach Stimulation der enterischen Gliazellen mit dem Rezeptor-spezifischen Liganden BLP eine mäßige, dennoch sukzessive Steigerung der Proteinexpression von TLR 2 mit einem Maximum bei 16 Stunden (Abbildung 5.7). Diese Ergebnisse stimmen mit den Daten von TLR 2 auf mRNA-Ebene überein (Abbildung 5.3 a). Hierbei war das Maximum der Stimulation mit BLP bereits nach 4 Stunden erreicht. Bei TLR 4 fiel nach 4-stündiger Inkubation mit LPS eine schwache und nach 24 Stunden eine stärkere Hemmung der Proteinexpression im Vergleich zur Proteinexpression nach 1 bis 2 Stunden auf (Abbildung 5.7). Auf Transkriptionsebene zeigte sich eine wesentlich stärkere Reduktion der mRNA von TLR 4 nach 4 bis 8-stündiger Stimulation mit LPS (Abbildung 5.3 b).

Wie bereits beschrieben, bildet TLR 4 für die Erkennung von LPS zusammen mit dem Lymphozyten-Antigen 96 (MD 2) und CD 14 den sogenannten Lipopolysaccharid-Rezeptor, was den Anlass gab, auch die Regulation von CD 14 durch LPS auf Proteinebene zu untersuchen. Dabei ließ sich auf dem Westernblot eine Herabregulation der Proteinexpression von CD 14 bei 4 Stunden vermuten, was jedoch aufgrund des hohen Hintergrundsignals nur eingeschränkt verwertbar war (Abbildung 5.7). Eine Herabregulation der CD 14 mRNA durch LPS konnte auch auf Transkriptionsebene gezeigt werden (Abbildung 5.3 c).

Die Stimulation mit dem in Mykoplasmen enthaltenen Lipopeptid Fsl-1 bewirkte eine kräftige, zeitabhängige Aufregulierung der Proteinexpression von TLR 6 mit einem Maximum bei 16 Stunden (Abbildung 5.7). Auf mRNA-Ebene liegen diesbezüglich keine Daten vor. Aus diesem Grund erfolgte neben der Untersuchung der Proteinexpression von TLR 6 durch Fsl-1 auch die Stimulation mit LPS. Es zeigte sich überraschenderweise eine deutliche Steigerung von TLR 6 mit einem Maximum bei 4 Stunden und keine Induktionshemmung, wie auf mRNA-Ebene beobachtet. Im Weiteren erfolgten Induktionsanalysen von TLR 7 mit Imiquimod und TLR 9 mit CpG. Dabei gelang jedoch keine ausreichend gute Detektion, um die Zeitabhängigkeit dieser Rezeptoren darstellen zu können (Daten nicht gezeigt).

Bei den Untersuchungen von NOD 1 und NOD 2 mittels Westernblot zeigte sich auf Translationsebene eine scheinbar schwache Herunterregulierung von NOD 1 durch seinen Rezeptor-spezifischen Liganden iE-DAP (Abbildung 5.7). Damit konnte die suppressive Wirkung von iE-DAP auf die Expression von NOD 1 Proteinen belegt werden.

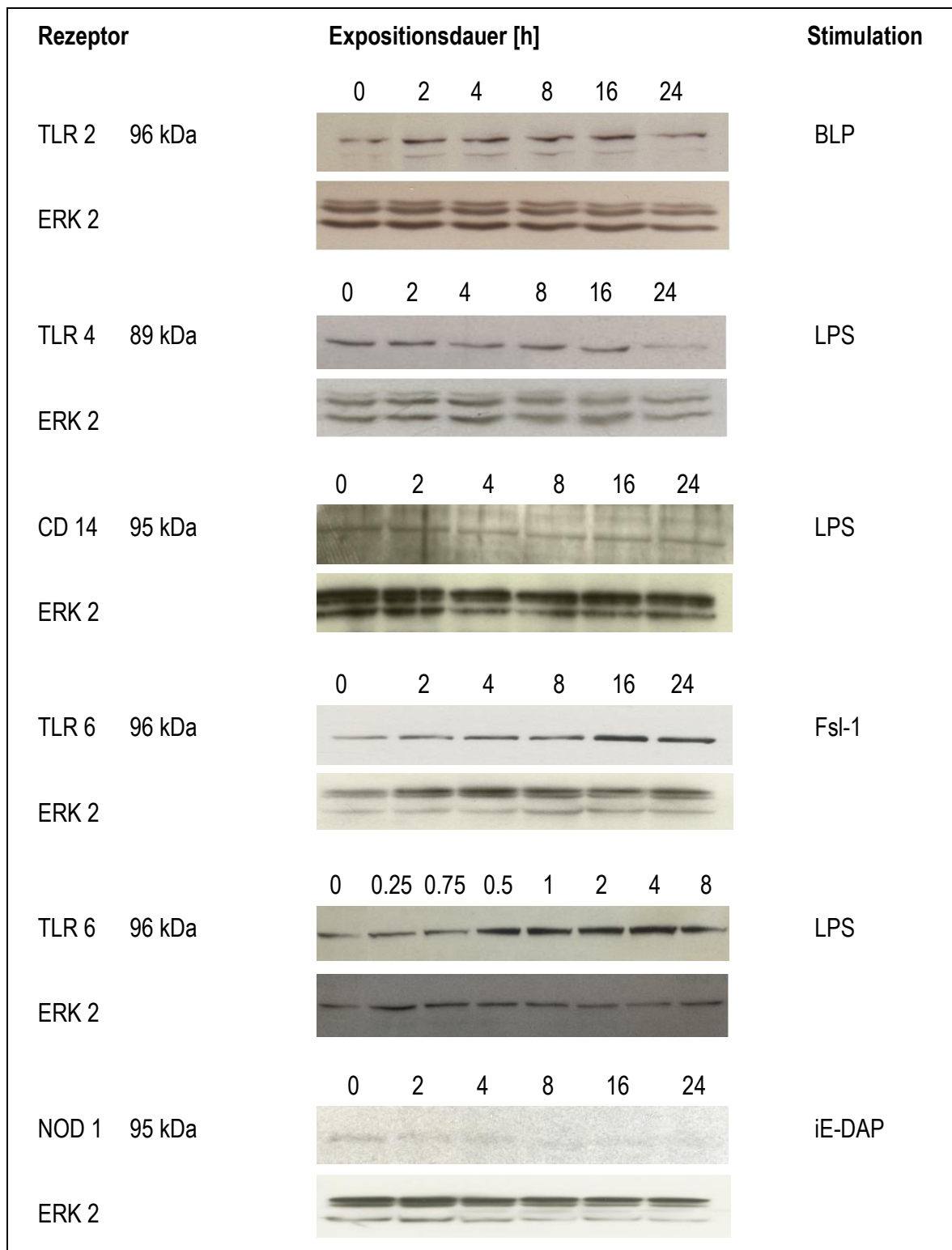


Abbildung 5.7 Zeitabhängige Proteinexpression der *Toll-like*-Rezeptoren, CD 14 und NOD 1 nach Exposition mit TLR-spezifischen Liganden in enterischen Gliazellen

Die enterischen Gliazellen wurden unbehandelt gelassen (0 h) oder für 15 min bis 24 h mit den jeweils rezeptorspezifischen Liganden BLP 100 ng/ml (TLR 2), LPS 10 µg/ml (TLR 4), Fsl-1 2,5 µg/ml (TLR 6) und iE-DAP 100 µg/ml (NOD 1) stimuliert. Es erfolgte die Gesamtproteinisolierung und die Durchführung des Westernblots. Die Proteinexpression nach Exposition mit Rezeptor-spezifischen Liganden wurde in Relation zu nicht behandelten Proteinen gemessen. Zur Ladekontrolle gleicher Proteinmengen wurde ERK 2 (42 / 44 kDa) verwendet.

Dennoch sollten diese Ergebnisse mit Vorsicht interpretiert werden, da die Detektion der Proteine von NOD 1 und NOD 2 im Westernblot bei einem hohen Hintergrundsignal schwierig war. Mögliche Gründe dafür könnten eine niedrige Konzentration der *NOD*-Proteine in enterischen Gliazellen oder ein nicht optimales Wirkungsverhältnis der Antikörper sein. Das bakterielle Muramyldipeptid (MDP), ein spezifischer NOD 2-Ligand, konnte keine Induktion des *NOD 2*-Rezeptors auslösen (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt kann festgehalten werden, dass sich die beobachteten Effekte nach Stimulation mit bakteriellen Komponenten auf mRNA-Ebene bei der Expression von *Toll-like*- und *NOD*-Rezeptoren auch auf die Proteinebene auswirken. Dies ist jedoch nur unter Vorbehalt zu werten, da die Expressionsunterschiede auf mRNA-Ebene wesentlich stärker ausfielen als die der dazugehörigen Proteine.

5.4.2 Expression von RICK nach Exposition mit LPS auf Proteinebene

Bei gleicher Versuchsführung wurde ebenfalls der Einfluss der exogenen Stimulation mit LPS auf die Proteinexpression der *Receptor-interacting serine / threonine kinase* RICK über einen Zeitraum von 0 bis 24 Stunden untersucht. Dabei konnte im Vergleich zu unbehandelten enterischen Gliazellen eine kräftige Steigerung der Proteinmenge von RICK bereits nach 4 Stunden beobachtet werden, welche bis zum Zeitpunkt von 16 Stunden anhielt (Abbildung 5.8). Nach 24 Stunden ging die Proteinexpression annähernd zum Ausgangslevel zurück. Die auf Transkriptionsebene vorliegenden Daten (Abbildung 5.5) über die zeitabhängige, sukzessiv stimulierende Wirkung von LPS auf RICK lassen sich hiermit auf der Ebene der Proteinexpression bestätigen.

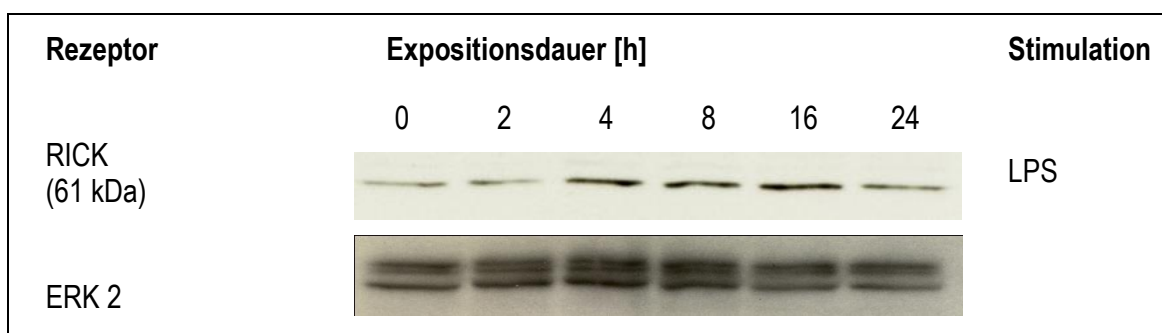


Abbildung 5.8 Zeitabhängige Proteinexpression von RICK nach Exposition mit LPS in enterischen Gliazellen

Die enterischen Gliazellen wurden unbehandelt gelassen (0 h) oder für 2 bis 24 h mit LPS 10 µg/ml stimuliert. Es erfolgte die Gesamtproteinisolierung und die Durchführung des Westernblots. Die Proteinexpression nach Exposition mit LPS wurde in Relation zu nicht behandelten Proteinen gemessen. Zur Ladekontrolle gleicher Proteinmengen wurde ERK 2 (42/44 kDa) verwendet.

5.5 Analyse des IKK / NF- κ B-Signalweges in enterischen Gliazellen

Im Magen-Darm-Trakt befindet sich eine Vielzahl von Bakterien, welche durch *Toll-like*-Rezeptoren erkannt werden. Daraus ergab sich die Überlegung, ob es möglich ist, den NF- κ B-Signalweg über die Membran-gebundenen *Pattern Recognition Receptors* (PRR) der enterischen Gliazellen zu aktivieren. In nicht aktivierten Zellen befindet sich NF- κ B im Zytoplasma und ist dort an das inhibitorische I κ B-Protein gebunden. Erst durch die Erkennung von Pathogenen über TLR und NOD erfolgt die Aktivierung des I κ B-Kinase-Komplexes (IKK), welcher zur Degradierung des NF- κ B-Inhibitors I κ B und zur Translokation der NF- κ B Untereinheiten in den Zellkern führt (Maniatis et al., 1999).

Die enterischen Gliazellen wurden mit den spezifischen Liganden von TLR 2 (BLP), TLR 4 (LPS) und TLR 9 (CpG) stimuliert. Die Untersuchung des IKK / NF- κ B-Signalweges in enterischen Gliazellen erfolgte systematisch, wie folgend aufgeführt (Abbildung 1.2):

- (A) Regulation des I κ B-Kinase-Komplexes IKK- α / - β sowie des inhibitorischen I κ B- α / - β mittels cDNA-Mikroarray
- (B) Degradierung von I κ B- α nach Aktivierung von TLR 4 durch LPS mittels Westernblot-Analyse
- (C) Transkriptionelle Regulation der NF- κ B Untereinheiten mittels cDNA-Mikroarray
- (D) DNA-Bindungsaktivitäten der NF- κ B Untereinheiten im Zellkern mittels Transkriptionsfaktorassay

5.5.1 Regulation des I κ B-Kinase-Komplexes und I κ B auf mRNA-Ebene

Zunächst erfolgten Untersuchungen über die transkriptionelle Regulation der am Anfang der IKK / NF- κ B-Signalkaskade stehenden I κ B-Kinase-Komplexe IKK- α und IKK- β sowie deren Zielstrukturen I κ B- α und I κ B- β . In der hierfür durchgeführten *Real-time* PCR (cDNA-Mikroarray) konnte keine direkte Regulation von IKK- α und IKK- β nach 4-stündiger Aktivierung der TLR 2, TLR 4 und TLR 9 Rezeptoren über die bakteriellen Stimulanzen BLP, LPS und CpG in enterischen Gliazellen beobachtet werden (Abbildung 5.9).

Im Gegensatz dazu zeigte sich auf mRNA-Ebene nach 4-stündiger Stimulation von TLR 4 mit LPS eine signifikante Aufregulierung von I κ B- α über das 15-fache ($p < 0,002$) und I κ B- β auf das 2-fache ($p < 0,001$) bezogen auf nicht stimulierte enterische Gliazellen (Abbildung 5.9). Eine Aktivierung von I κ B- α und I κ B- β nach Stimulation von TLR 2 und TLR 9 ließ sich in enterischen Gliazellen auf mRNA-Ebene nicht beobachten.

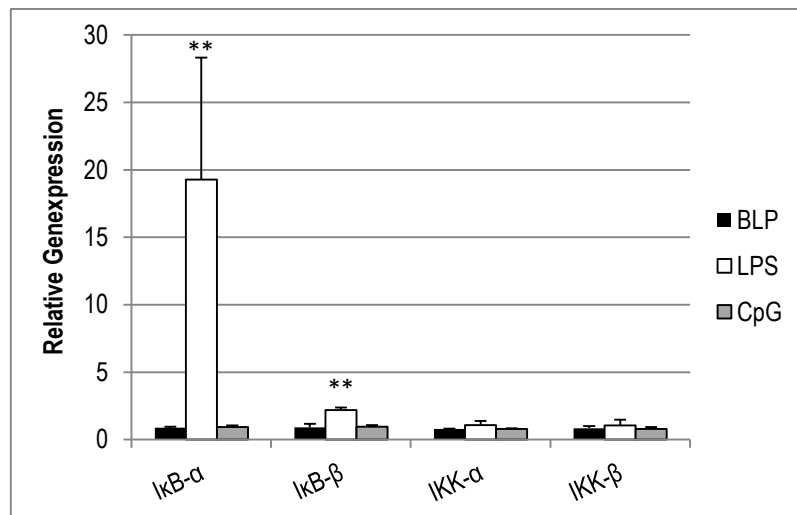


Abbildung 5.9 mRNA-Expression von Komponenten des NF-κB-Signalweges nach Stimulation mit TLR-Liganden in enterischen Gliazellen

Die enterischen Gliazellen wurden unbehandelt gelassen oder für 4 Stunden mit 100 ng/ml BLP, 10 µg/ml LPS oder 10 µg/ml CpG stimuliert. Es erfolgte die RNA-Isolierung und Durchführung der *Real-time* PCR mittels cDNA-Mikroarray mit 40 Zyklen und einer *Annealing* Temperatur von 60°C. Die Expression von IκB-α, IκB-β, IKK-α und IKK-β wurde auf den Mittelwert mehrerer Haushaltsgene normalisiert. Die Daten wurden als Mittelwerte ± SEM aus 3 unabhängigen Versuchen dargestellt und als relative Expression auf unbehandelte enterische Gliazellen bezogen, welche auf den Wert 1 gesetzt wurden. Das Symbol * zeigt einen signifikanten Unterschied zu nativen enterischen Gliazellen an (** $p < 0,01$).

5.5.2 Regulation der NF-κB Dimere auf mRNA-Ebene

Der Transkriptionsfaktor NF-κB setzt sich aus den fünf Proteinen NF-κB 1, NF-κB 2, Rel A (p65), Rel B und c-Rel zu funktionellen Homo- oder Heterodimeren zusammen. In Abhängigkeit des Vorhandenseins einer Transaktivierungsdomäne können die NF-κB-Dimere aktivierend (p65, Rel B und c-Rel) oder hemmend (NF-κB 1 und NF-κB 2) auf die Genexpression im Zellkern wirken. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden beispielhaft die Rel-Proteine p65, c-Rel und NF-κB 1 mittels *Real-time* PCR untersucht. Dafür erfolgte eine exogene Stimulation der enterischen Gliazellen mit BLP 100 ng/ml (TLR 2), LPS 10 µg/ml (TLR 4) und CpG 10 µg/ml (TLR 9) über 4 Stunden. Es zeigte sich, dass die Rel-Proteine p65 (RelA) und c-Rel des klassischen Signalweges keine Regulierung auf Transkriptionsebene über die Aktivierung der *Toll-like*-Rezeptoren zulassen. Hingegen war bei NF-κB 1 ($p < 0,05$) eine signifikante Hochregulierung der mRNA-Expression auf über 300 % nach 4-stündiger Stimulation mit LPS bezogen auf nicht stimulierte enterische Gliazellen zu beobachten (Abbildung 5.10). Ähnlich wie die Inhibitoren IκB-α / -β wurde auch der Transkriptionsfaktor NF-κB nicht durch die Aktivierung von TLR 2 und TLR 9 auf Transkriptionsebene beeinflusst.

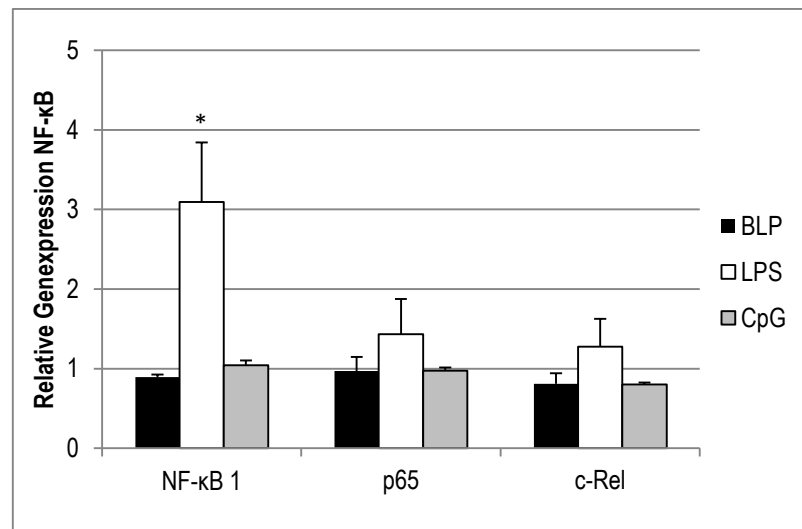


Abbildung 5.10 mRNA-Expression der NF-κB Untereinheiten NF-κB 1, p65 und c-Rel nach Stimulation mit TLR-Liganden in enterischen Gliazellen

Die enterischen Gliazellen wurden unbehandelt gelassen oder für 4 h mit 100 ng/ml BLP, 10 µg/ml LPS oder 10 µg/ml CpG stimuliert. Es erfolgte die RNA-Isolierung und Durchführung der *Real-time* PCR mittels cDNA-Mikroarray mit 40 Zyklen und einer *Annealing* Temperatur von 60°C. Die Expression von NF-κB 1, p65 und c-Rel wurde auf den Mittelwert mehrerer Haushaltsgene normalisiert. Die Daten wurden als Mittelwerte ± SEM aus 3 unabhängigen Versuchen dargestellt und als relative Expression auf unbehandelte enterische Gliazellen bezogen, welche auf den Wert 1 gesetzt wurden. Das Symbol * zeigt einen signifikanten Unterschied zu nativen enterischen Gliazellen an (* $p < 0,05$).

Neben bakteriellen Pathogenmustern zählen zu den Stimuli der NF-κB Aktivierung auch zahlreiche Zytokine. So wurde die Versuchsreihe erweitert und der Effekt der für chronisch entzündliche Darmerkrankungen relevanten Zytokine IL-1β und TNF-α allein oder in Kombination mit LPS auf die Regulation der mRNA von NF-κB 1 mittels cDNA-Mikroarray untersucht. Da sich bei den Voruntersuchungen lediglich bei NF-κB 1 ein stimulativer Effekt durch LPS auf Transkriptionsebene zeigte (Abbildung 5.10), wurde ausschließlich dieses Rel-Protein weiter untersucht.

Es zeigte sich, dass im Vergleich zu unbehandelten enterischen Gliazellen eine starke Expressionssteigerung von NF-κB 1 mRNA durch die alleinige Aktivierung durch LPS auf das 3-fache ($p < 0,05$) und durch TNF-α auf das 4-fache induziert werden konnte (Abbildung 5.11). Das pro-inflammatorische Zytokin IL-1β hatte hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die Transkription von NF-κB 1 (Abbildung 5.11). Daher ist davon auszugehen, dass die vermehrte mRNA-Expression von NF-κB 1 nach Stimulation mit den Interleukinen IL-1β und LPS und / oder TNF-α am wahrscheinlichsten auf die alleinige Wirkung von LPS oder TNF-α zurückzuführen ist ($p < 0,005$). Auch die Kombination aus IL-1β und / oder LPS und / oder TNF-α bewirkte eine signifikante Aktivierung der mRNA von NF-κB 1 auf mindestens das 3-fache im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit IL-1β oder nativen enterischen Gliazellen ($p < 0,001$). Die Kombination von TNF-α und LPS schien einen, wenn

auch nur geringen additiven Stimulationseffekt auf die mRNA-Expression von NF- κ B 1 mRNA zu haben ($p < 0,001$). Zusammenfassend stellten von den untersuchten pro-inflammatorischen Stimulanzen LPS und TNF- α allein oder in Kombination die stärksten Induktoren für die Aktivierung des Rel-Proteins NF- κ B 1 auf Transkriptionsebene dar.

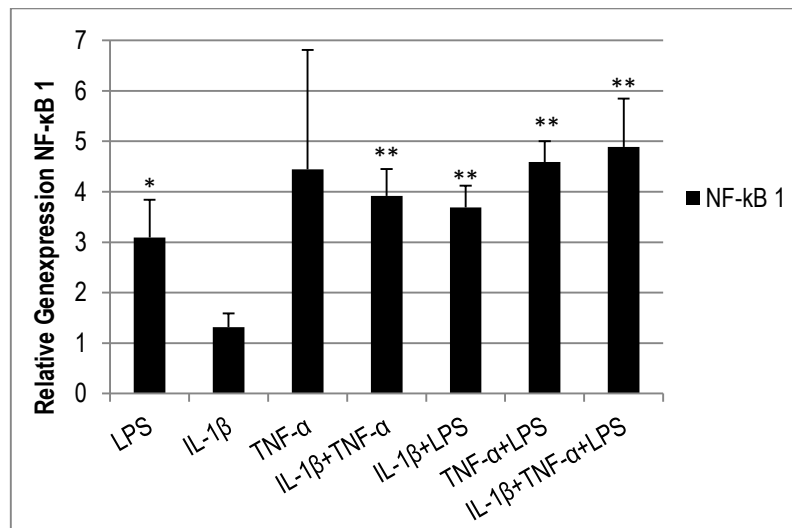


Abbildung 5.11 mRNA-Expression von NF- κ B 1 nach Stimulation mit LPS und pro-inflammatorischen Zytokinen in enterischen Gliazellen

Die enterischen Gliazellen wurden unbehandelt gelassen oder für 4 h mit 10 μ g/ml LPS, 100 ng/ml IL-1 β , 10 ng/ml TNF- α stimuliert. Es erfolgte die RNA-Isolierung und Durchführung der *Real-time* PCR mittels cDNA-Mikroarray mit 40 Zyklen und einer *Annealing* Temperatur von 60°C. Die Expression von NF- κ B 1 wurde auf den Mittelwert mehrerer Haushaltsgene normalisiert. Die Daten wurden als Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Versuchen dargestellt und als relative Expression auf unbehandelte enterische Gliazellen bezogen, welche auf den Wert 1 gesetzt wurden. Das Symbol * zeigt einen signifikanten Unterschied zu nativen enterischen Gliazellen an (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

5.5.3 Degradierung von I κ B- α nach Aktivierung durch LPS

Der aktivierte I κ B-Kinase-Komplex (IKK) phosphoryliert I κ B- α , den Inhibitor von NF- κ B, wodurch dieser polyubiquiniert, umgehend der Proteolyse zugeführt und damit degradiert wird (Yaron et al., 1998; Alkalay et al., 1995). Da NF- κ B somit in den Zellkern translozieren kann und die Transkription spezifischer Zielgene bewirkt, stellt die Degradierung von I κ B- α im Zytoplasma ein verlässliches Maß für die NF- κ B Aktivierung dar.

Mittels der Westernblot-Analyse erfolgte der Nachweis von I κ B- α in enterischen Gliazellen über einen Zeitraum von 0 bis 8 Stunden nach Stimulation von TLR 4 durch LPS. Dabei zeigte sich ein eindeutiger Höhepunkt in der Degradierung von I κ B- α nach 30 min bis 1 h nach dem Beginn der TLR 4 Stimulation (Abbildung 5.12). Bei der Stimulation von TLR 2 durch BLP beziehungsweise TLR 9 durch CpG konnte keine I κ B- α Degradierung in enterischen Gliazellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

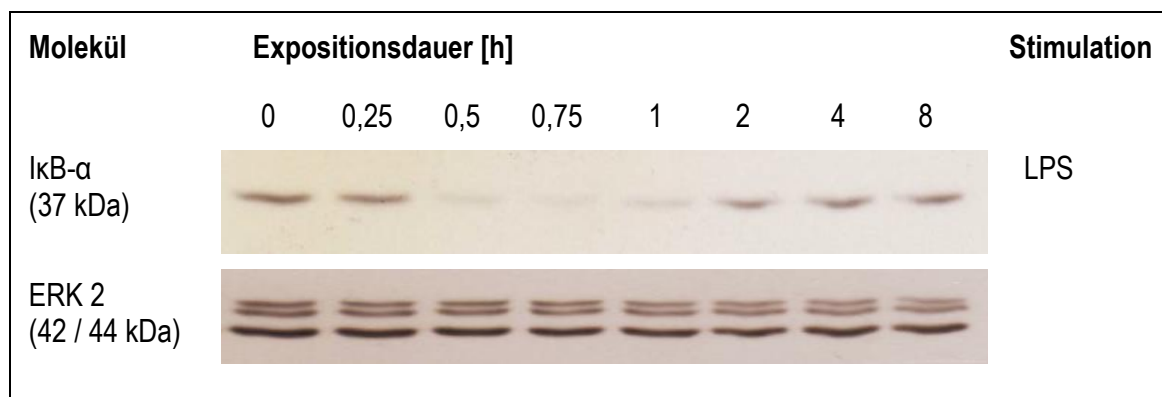


Abbildung 5.12 Degradierung von I κ B- α nach Aktivierung von TLR 4 durch LPS in enterischen Gliazellen

Die enterischen Gliazellen wurden unbehandelt (0 h) gelassen oder für 15 min bis 8 h mit LPS 10 μ g/ml stimuliert. Es erfolgte die Isolierung der Gesamtproteine und die Durchführung des Westernblot. Zur Ladekontrolle gleicher Proteinmengen wurde ERK 2 (42 / 44 kDa) verwendet.

5.5.4 Einfluss pro-inflammatorischer Zytokine auf die DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B im Zellkern

Um die Kaskade von der extrazellulären Pathogenerkennung über die Signalweiterleitung intrazellulär bis hin zur Translokation der Transkriptionsfaktoren in den Zellkern zu verfolgen, wurden mithilfe des Transkriptionsfaktorassays Untersuchungen auf Zellkernebene abgeschlossen. Im Mittelpunkt stand hierbei NF- κ B als wesentlicher Transkriptionsfaktor der angeborenen Immunantwort. Durch die Erkennung der DNA-bindenden NF- κ B-Konsensussequenz 5' - GGGACTTCC - 3' über die primären anti-Transkriptionsfaktor-Antikörper NF- κ B 1, p65 und c-Rel konnte auf die DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors geschlossen werden. Für diese Analyse wurde aus den enterischen Gliazellen nukleäres Protein isoliert, nachdem die Zellen für 90 min mit LPS (10 μ g/ml), IL-1 β (100 ng/ml) und TNF- α (10 ng/ml) stimuliert wurden. Als Positivkontrolle wurde das im Kit enthaltene nukleäre Extrakt Raji verwendet.

Die Analyse der ELISA-Daten ergab, dass p65 im Gegensatz zu NF- κ B 1 und c-Rel in den nukleären Proteinen in nativen, nicht stimulierten enterischen Gliazellen nicht nachgewiesen werden konnte. Erst nach Stimulation mit LPS, IL-1 β und TNF- α wurde die DNA-Bindung von p65 stark aktiviert. So zeigte sich nach 90-minütiger Inkubation der enterischen Gliazellen mit LPS oder TNF- α eine 8-fache Steigerung der DNA-Bindungsaktivität von p65 ($p < 0,05$, Abbildung 5.13 a). Die Kombination der beiden pro-inflammatorischen Stimuli LPS und TNF- α wies einen synergistischen Effekt auf, da eine Aktivierung der DNA-Bindungsaktivität von p65 um das 11-fache ($p < 0,03$, Abbildung 5.13 b) im Vergleich zu nicht stimulierten enterischen Gliazellen registriert wurde. Von den verwendeten Stimulanzien stellten LPS und TNF- α die stärksten Induktoren der p65-abhängigen NF- κ B Aktivierung im Zellkern dar. Die Stimulation mit IL-1 β führte hingegen lediglich zu einer Steigerung der NF- κ B Bindungsaktivität von p65 um 180 % ($p < 0,05$). Die DNA-Bindungsaktivität des Rel-Proteins NF- κ B 1 wurde durch die Stimulation mit LPS, IL-1 β und / oder TNF- α allein oder in Kombination nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 5.13 a-b). Bei c-Rel zeigte sich eine minimale Aktivierung der DNA-Bindung nach Stimulation mit TNF- α und LPS beziehungsweise IL-1 β (Abbildung 5.13 b). Der Transkriptionsfaktorassay mit NF- κ B wurde im Rahmen dieser Arbeit nur nach einer Stimulationszeit von 90 min durchgeführt. Es ist daher nicht möglich, Aussagen über andere Zeiträume zu treffen.

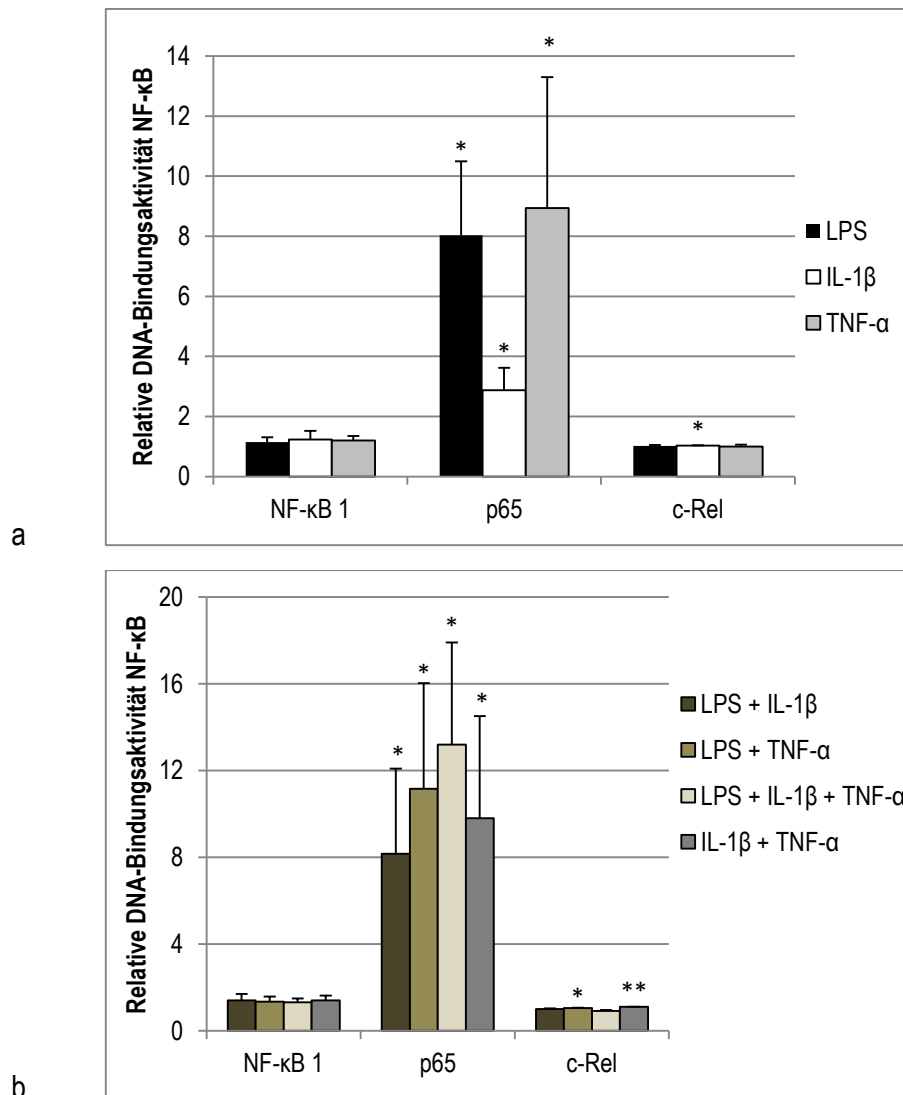


Abbildung 5.13 a-b DNA-Bindungsaktivität der NF-κB Untereinheiten nach Stimulation mit LPS und pro-inflammatorischen Zytokinen an Zellkernextrakten von enterischen Gliazellen

Die enterischen Gliazellen wurden unbehandelt gelassen (0 h) oder für 90 min mit 10 µg/ml LPS, 100 ng/ml IL-1β und 10 ng/ml TNF-α stimuliert. Zur Bestimmung der DNA-Bindung wurden jeweils 20 µg nukleäres Protein eingesetzt und der auf dem ELISA-Prinzip basierende Transkriptionsfaktor Assay durchgeführt. Dabei wurden die NF-κB Untereinheiten mithilfe von primären anti-NF-κB-Antikörpern detektiert und über einen sekundären HRP-konjugierten Antikörper kolorimetrisch quantifiziert. Die DNA-Bindungsaktivitäten der NF-κB Untereinheiten wurden im Vergleich zu unbehandelten enterischen Gliazellen relativ dargestellt, welche auf den Wert 1 gesetzt wurden. Gezeigt wird der Mittelwert ± Standardabweichung von drei unabhängig durchgeführten Versuchen. Das Symbol * zeigt einen signifikanten Unterschied zu nativen enterischen Gliazellen an (* p < 0,05, ** p < 0,01). Zu beachten ist die unterschiedliche Beschriftung der y-Achse.

5.6 Expression von Interleukinen und Chemokinen in enterischen Gliazellen

Abschließend wurde untersucht, ob im Falle einer bakteriellen Infektion die Signalweiterleitung über die *Toll-like*-Rezeptoren letztlich immunregulatorische Konsequenzen hat und zu einer Transkriptionssteigerung der Entzündungsmediatoren führt. Dabei wurde die mRNA-Expression der folgenden Zytokin-Hauptgruppen in enterischen Gliazellen untersucht: pro- und anti-inflammatorische Interleukine (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10 und IL-12), Chemokine (Ccl-2, Cxcl-9, Cxcl-10), Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) und Interferon gamma (IFN- γ). Die enterischen Gliazellen wurden hierfür unbehandelt gelassen oder für 4 Stunden mit den Liganden BLP (TLR 2), LPS (TLR 4) oder CpG (TLR 9) stimuliert. Es erfolgten *Real-time* PCR Analysen mittels cDNA-Mikroarray (RT² Profiler™ PCR Array System, SuperArray, Frederick, USA), um zu untersuchen, ob und in welchem Maß die *Toll-like*-Rezeptoren TLR 2, TLR 4 und TLR 9 die Genexpression der genannten Zytokine beeinflusst. Dabei zeigte sich, dass enterische Gliazellen fähig sind mRNA von IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, Ccl-2, Cxcl-9, Cxcl-10, TNF- α und IFN- γ zu exprimieren.

Bei den Stimulationsanalysen stellte sich heraus, dass durch die Exposition der enterischen Gliazellen gegenüber BLP und CpG keine signifikanten Veränderungen der mRNA-Expression der Interleukine IL-1 α , IL-6, IL-10, Cxcl-10 sowie des Tumornekrosefaktors alpha (TNF- α) zu beobachten waren (Abbildung 5.14). Hingegen führte die Stimulation der enterischen Gliazellen mit LPS zu einer starken Hochregulierung der mRNA-Expression der drei pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 α , IL-6 und TNF- α . Im Vergleich zu nicht stimulierten enterischen Gliazellen wurde die mRNA auf Transkriptionsebene von IL-1 α auf das 35-fache ($p < 0,01$), von IL-6 auf über das 5-fache ($p < 0,001$) und von TNF- α auf das 8-fache ($p < 0,01$) durch LPS gesteigert (Abbildung 5.14). Die mit Abstand stärkste Expressionssteigerung auf Transkriptionsebene wurde in der Gruppe der Chemokine beobachtet. Hier zeigte sich bei Ccl-2 (C-C Motiv Ligand 2) nach Exposition der enterischen Gliazellen mit LPS eine bemerkenswerte Erhöhung der mRNA-Expression auf das 72-fache ($p < 0,0005$, Abbildung 5.14) bezogen auf native Kontrollzellen. Auch bei dem Chemokin Cxcl-10 war nach 4-stündiger Stimulation mit LPS eine deutliche Steigerung der mRNA-Expression auf über das 5-fache zu verzeichnen ($p < 0,01$, Abbildung 5.14). Hingegen konnte bei Interferon γ (IFN- γ) keine signifikante Regulierung durch LPS auf Transkriptionsebene gezeigt werden (Daten nicht abgebildet).

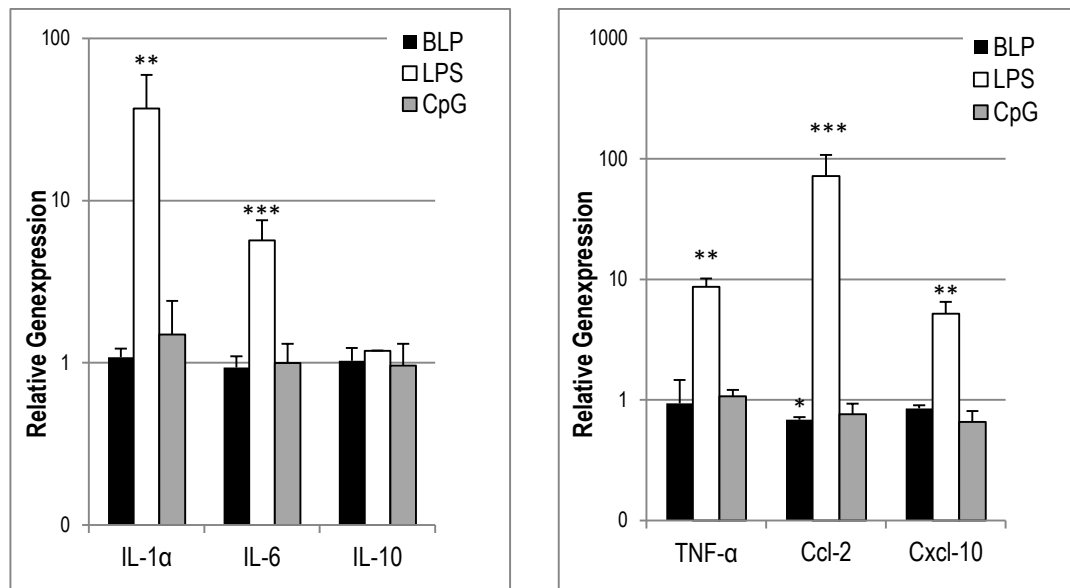


Abbildung 5.14 Einfluss der TLR 2-, TLR 4- und TLR 9-Liganden auf die mRNA-Expression von Interleukinen, Chemokinen und TNF- α in enterischen Gliazellen

Die enterischen Gliazellen wurden unbehandelt gelassen (0 h) oder für 4 h mit 100 ng/ml BLP, 10 μ g/ml LPS oder 10 μ g/ml CpG stimuliert. Es erfolgte die RNA-Isolierung und Durchführung der *Real-time* PCR mittels cDNA-Mikroarray mit 40 Zyklen und einer *Annealing* Temperatur von 60°C. Die Expression von IL-1 α , IL-6, IL-10, TNF- α , Ccl-2, Cxcl-10 wurde auf den Mittelwert mehrerer Haushaltsgene normalisiert. Die Daten wurden als Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Versuchen dargestellt und als relative Expression auf unbehandelte enterische Gliazellen bezogen, welche auf den Wert 1 gesetzt wurden. Das Symbol * zeigt einen signifikanten Unterschied zu nativen enterischen Gliazellen an (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Zu beachten ist die unterschiedliche Beschriftung der y-Achse.

Aufgrund der außerordentlich starken mRNA-Hochregulierung in der Gruppe der Interleukine und Chemokine wurden die Stimulationsanalysen erweitert. Anhand der Beispiele IL-1, IL-6 und IL-10 sowie deren Rezeptoren IL-1 R, IL-6 R, IL-10 R und Cxcl-9 (Chemokine (C-X-C Motiv) Ligand 9) wurde der Einfluss von IL-1 β und TNF- α und / oder LPS auf deren Genexpression untersucht. Die *Real-time* PCR Analyse zeigte keine signifikante Veränderung der mRNA-Expression für IL-1 / IL-1 R sowie IL-10 / IL-10 R nach 4-stündiger Inkubation der enterischen Gliazellen mit IL-1 β und / oder TNF- α und / oder LPS (Daten nicht abgebildet). Hingegen konnte für IL-6 eine deutliche Hochregulierung der Genexpression durch IL-1 β und TNF- α beobachtet werden (Abbildung 5.15 a). Im Einzelnen erwies sich IL-1 β im Vergleich zu LPS und TNF- α als ein relativ schwacher Stimulus auf das kodierende Gen von IL-6. Die Kombination von zwei oder mehreren Stimulanzen bewirkte bei IL-6 eine gegenseitige Steigerung der mRNA-Expression. Das bedeutete im Detail, dass LPS, IL-1 β oder TNF- α allein maximal eine Expressionssteigerung von IL-6 um das 5-fache ($p < 0,005$) erzielten, während alle drei zusammen die mRNA-Expression von IL-6 auf über das 12-fache ($p < 0,02$) steigerten (Abbildung 5.15 a). Im Gegensatz dazu konnte dieser synergistische Effekt bei dem Rezeptor IL-6 R nicht

beobachtet werden. Hierbei zeigte sich, unabhängig ob LPS, IL-1 β und TNF- α allein oder in Kombination verwendet wurde, maximal eine Verdopplung der mRNA-Expression von IL-6 R im Vergleich zu nicht behandelten enterischen Gliazellen ($p < 0,02$). Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die Genexpression von IL-6 wesentlich stärker durch die Zytokine IL-1 β , TNF- α und LPS beeinflusst wird, als die des dazugehörigen Rezeptors IL-6 R (Abbildung 5.15 a).

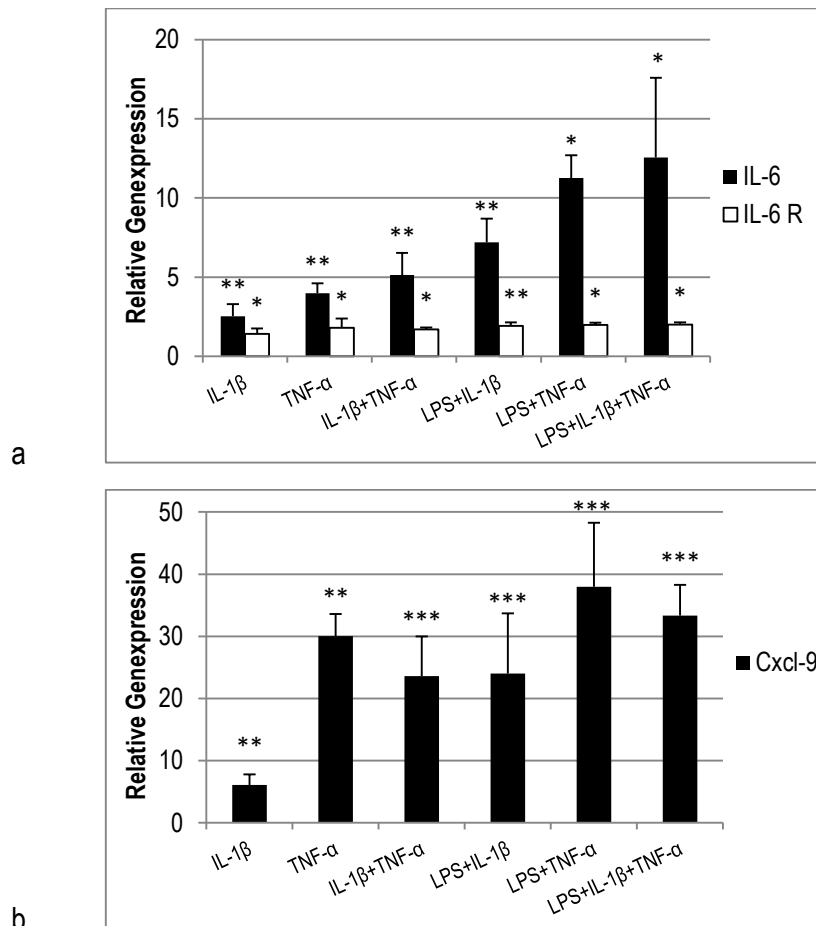


Abbildung 5.15 a-b Einfluss von LPS und pro-inflammatorischen Zytokinen auf die mRNA-Expression von IL-6, dessen Rezeptor IL-6 R und Cxcl-9 in enterischen Gliazellen

Die enterischen Gliazellen wurden unbehandelt gelassen (0 h) oder für 4 h mit 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS, 100 ng/ml IL-1 β und/ oder 10 ng/ml TNF- α stimuliert. Es erfolgte die RNA-Isolierung und Durchführung der *Real-time* PCR mittels cDNA-Mikroarray mit 40 Zyklen und einer *Annealing* Temperatur von 60°C. Die Expression von IL-6, IL-6 R und Cxcl-9 wurde auf den Mittelwert mehrerer Haushaltsgene normalisiert. Die Daten wurden als Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Versuchen dargestellt und als relative Expression auf unbehandelte enterische Gliazellen bezogen, welche auf den Wert 1 gesetzt wurden. Das Symbol * zeigt einen signifikanten Unterschied zu nativen enterischen Gliazellen an (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Zu beachten ist die unterschiedliche Beschriftung der y-Achse.

Neben dem Chemokin Ccl-2 fiel bei den Expressionsanalysen im cDNA-Mikroarray eine außergewöhnliche Erhöhung der mRNA des Chemokines Cxcl-9 nach Stimulation mit pro-inflammatorischen Zytokinen auf. Die endgültige Funktion von Cxcl-9 konnte bisher noch nicht geklärt werden. Es scheint jedoch für die Aktivierung von T-Lymphozyten und damit für die erworbene Immunabwehr von Bedeutung zu sein (Farber, 1993). In dieser Arbeit konnte erstmalig der Beweis erbracht werden, dass auch enterische Gliazellen nach Stimulation mit LPS, IL-1 β und / oder TNF- α in der Lage sind, chemotaktisch wirksames Cxcl-9 auf mRNA-Ebene zu exprimieren (Abbildung 5.15 b). Hierbei führte bereits die alleinige Stimulation mit TNF- α zu einer 30-fachen Steigerung der mRNA im Vergleich zu nicht behandelten enterischen Gliazellen ($p < 0,001$). Nach Exposition mit TNF- α und LPS konnte die mRNA-Expression von Cxcl-9 auf das 37-fache gesteigert werden ($p < 0,001$). Im Gegensatz zu TNF- α stellte sich IL-1 β mit einer Erhöhung der mRNA-Expression von Cxcl-9 um das 6-fache als relativ schwacher Stimulus dar ($p < 0,002$). Zusammenfassend konnte mit den vorliegenden *Real-time* PCR Daten der Nachweis erbracht, dass enterische Gliazellen in der Lage sind Interleukine, Chemokine und TNF- α auf mRNA-Ebene zu exprimieren und die Produktion dieser Entzündungsmediatoren sowohl über die Aktivierung durch LPS, als auch durch die Zytokine selbst zu regulieren.

6 Diskussion

6.1 Gegenstand der vorliegenden Arbeit

Die intestinale antimikrobielle Abwehr besteht aus angeborenen und erworbenen Elementen. Die angeborene Abwehr beinhaltet die Epithelbarriere, Defensine, Zytokine sowie verschiedene Rezeptoren, die für die Erkennung pathogener Muster (*PAMPs*) von eindringenden Bakterien zuständig sind (Medzhitov, 2007; Beutler et al., 2003). Unter normalen Bedingungen werden Bakterien im Darmlumen durch die Mukosabarriere vom Eindringen in die Darmwand abgehalten. Wenn pathogene Bakterien die Mukosabarriere überqueren, werden sie durch spezifische Zelloberflächen- und intrazelluläre Rezeptoren wie *Toll-like*-Rezeptoren oder *NOD*-Proteine erkannt und induzieren die angeborene Immunantwort (Strober et al., 2006; Akira et al., 2006). Die Signaltransduktion von extrazellulären Pathogenen zur zytoplasmatischen Toll-IL-1R (TIR) Domäne der *TLRs* führt zur Rekrutierung TIR-enthaltender intrazellulärer Adaptorproteine wie MyD88 und TRIF (O'Neill und Bowie, 2007; Fitzgerald et al., 2001). Die *NOD*-Proteine NOD 1 und NOD 2 hingegen werden durch intrazelluläre Mikroben aktiviert (Girardin et al., 2003 a und b; Strober et al., 2006). Anschließend kommt es zur Aktivierung der nachgeschalteten Signalkomponenten wie dem Inhibitor des NF- κ B-Kinase-Komplexes (IKK). Dies führt wiederum zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Bonizzi et al., 2004). Über die Bindung des Transkriptionsfaktors an spezifische DNA-Sequenzen wird letztlich eine Vielzahl von Genen reguliert, welche für Entzündung und Zellproliferation zuständig sind. In der Literatur findet sich eine zunehmende Anzahl an Publikationen, welche die Rolle des enterischen Nervensystem, bestehend aus Neuronen und enterischen Gliazellen, bei der intestinalen Immunantwort und der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen untersuchten (Rühl, 2005; Cabarrocas et al., 2003). Enterische Gliazellen bilden ein weit verzweigtes Netz in allen Regionen und allen Schichten des Darmtrakts, deren Anzahl mengenmäßig in etwa der Glia im Rückenmark entspricht (Straub, 2007). Interessanterweise sind enterische Gliazellen in den epithelialen Krypten der intestinalen Mukosa lokalisiert, wo sie im engen Kontakt mit den Epithelzellschichten und Bakterien stehen (Neunlist et al., 2007; Hollenbach et al., eingereicht). Basierend auf deren Lokalisation stellen enterische Gliazellen eine zelluläre Kopplungsstelle zwischen enterischen Neuronen und nicht neuronalen Zellen des Darmes dar und sind höchstwahrscheinlich in neuroinflammatorische sowie neurodegenerative intestinale Pathologien involviert (Rühl, 2005).

Die enterischen Gliazellen weisen mit ihren sternförmig verzweigten Ausläufern nicht nur morphologisch, sondern auch aufgrund ihrer immunmodulierenden Fähigkeiten, eine große Ähnlichkeit mit den embryologisch verwandten Astrozyten des zentralen Nervensystems (ZNS) und den Makrophagen, als Vertretern des Immunsystems, auf. So sind stimulierte enterische Gliazellen ähnlich wie Makrophagen fähig, Phagozytose zu betreiben (Hollenbach et al., eingereicht), und ähnlich wie Astrozyten in der Lage, Zytokine zu produzieren (Rühl et al., 2001 b). Diese Entzündungsmediatoren führen zur Rekrutierung und Aktivierung immunkompetenter Leukozyten und somit zur Initiierung der erworbenen Immunantwort (Hollenbach et al., eingereicht).

Die Daten der vorliegenden Arbeit sollen demonstrieren, dass enterische Gliazellen nicht nur aktiv zur erworbenen, sondern auch zur angeborenen Immunantwort über die Expression von *Toll-like*- und *NOD*-Rezeptoren und der Produktion verschiedener Zytokine beitragen.

Den enterischen Gliazellen wird aufgrund der bereits genannten prädisponierenden Lokalisation, der Morphologie sowie deren Rolle bei der Erhaltung der Darmwandintegrität (Bush et al., 1998) eine Schlüsselfunktion bei der Darmhomöostase und der Modulation von intestinalen Entzündungsprozessen zugesprochen. Diese Hypothese wurde durch die Arbeiten von Bush und Cornet gestützt (Bush et al., 1998; Cornet et al., 2001). Sie zeigten in zwei transgenetischen Mäusemodellen, dass der komplette Verlust enterischer Glia zum Zusammenbruch der Epithelbarriere und zur Entwicklung einer fulminanten Kolitis mit tödlichem Ausgang führte. In beiden Tiermodellen lässt sich eine schwere transmurale Entzündung der betroffenen Darmabschnitte nachweisen, die histopathologisch an die von Morbus Crohn Patienten erinnert. In diesem Zusammenhang beschrieb Cornet et al. eine verminderte Anzahl von GFAP+-enterischen Gliazellen im Darm von Morbus Crohn Patienten (Cornet et al., 2001; Cabarrocas et al., 2003). Der zugrunde liegende Mechanismus ist nicht vollständig bekannt.

Die Ätiologie und Pathophysiologie der chronisch entzündlichen Darmerkrankung ist bisher letztlich ungeklärt. Es werden Einflüsse der immunologischen Dysfunktion, der genetischen Suszeptibilität und verschiedener Umweltbedingungen vermutet (Ogura et al., 2001 a; Podolsky 2002). Aufgrund des geringen pathophysiologischen Verständnis existieren keine kurativen Therapieansätze und die Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen leiden unter rezidivierenden Durchfällen, abdominellen Schmerzen, Blutungen, Gewichtsverlust und deren Komplikationen wie Fisteln, Abszessen, Stenosen oder Malignomen. Trotz der scheinbar enormen Bedeutung der enterischen Gliazellen in der Pathophysiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen existieren bisher wenige grundlegende Studien über deren immunphysiologische Eigenschaften. Auch die zugrunde liegenden Mechanismen die Darmhomöostase zu erhalten und die teils tödlich endende

Darmentzündung zu verhindern, sind nicht bekannt. Dies erscheint von großer Wichtigkeit, zumal die Klärung dieser Aspekte möglicherweise zur Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten führt. So wurde die Frage, ob und inwieweit enterische Gliazellen zur Initialisierung und Vermittlung der angeborenen Immunantwort im Darm beitragen, zum Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

6.2 Funktionelle Analyse der Rezeptoren der angeborenen Immunantwort in enterischen Gliazellen

Es erfolgte nach bestem Wissen nun erstmalig eine systematische Untersuchung der enterischen Gliazellen, beginnend bei der Erkennung von pathogenen Mustern (*PAMPs*) mittels *Toll-like*-Rezeptoren an der Zellmembran und *NOD*-Rezeptoren im Zytoplasma. Die dafür verwendeten enterischen Gliazellen stammten aus dem myenterischen Plexus des enterischen Nervensystems von adulten Rattendärmen (Rühl et al., 2001 a). Folgende Methoden kamen während der Versuchsreihen zum Einsatz: Zellkulturtechniken, Isolierungsverfahren zur Gewinnung von mRNA, Gesamtprotein sowie fraktioniertem Zellkern- und Zytoplasmprotein. Außerdem wurden molekularbiologische und proteinbiochemische Verfahren wie PCR (Quantitative Standard PCR und *Real-time* PCR), Westernblot-Analysen sowie ein ELISA-basierter Transkriptionsfaktorassay verwendet.

Die mRNA-Expression von Toll-like-Rezeptoren in enterischen Gliazellen wird durch bakterielle Produkte reguliert

Bis zum Beginn dieser Promotion war nicht bekannt, durch welche Mechanismen die intestinal angesiedelten enterischen Gliazellen bakterielle Pathogene erkennen. Unter der Annahme, dass enterische Gliazellen als Teil des angeborenen Immunsystems funktionieren, erfolgte zunächst eine systematische Überprüfung deren Hauptrezeptoren, den *Toll-like*- und *NOD*-Rezeptoren. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig der Beweis erbracht werden, dass native enterische Gliazellen einen stabilen Gehalt an mRNA von TLR 2, TLR 4, dessen Korezeptor CD 14, TLR 6, TLR 7, TLR 9, NOD 1, NOD 2 und dem Adaptormolekül RICK exprimieren. Auch auf funktioneller Ebene gelang der Nachweis dieser Rezeptorproteine mittels Westernblot in nicht stimulierten enterischen Gliazellen. Diese Ergebnisse belegen erstmalig das Vorhandensein von *Pattern Recognition Receptors (PRRs)* auf enterischen Gliazellen.

Anschließend wurde die Expression von *Toll-like*- und *NOD*-Rezeptoren kodierender mRNA nach der Stimulation mit den intestinal relevanten Liganden für TLR 2 (BLP), TLR 4 (LPS) und TLR 9 (CpG) über 24 Stunden untersucht. Dabei wurde die Hypothese zugrunde gelegt, dass die darmeigene Mikroflora für die Regulierung dieser Rezeptoren selbst verantwortlich ist. Es geht aus den Daten dieser Arbeit hervor, dass TLR 2 nur durch seinen spezifischen TLR 2 Liganden, das bakterielle Lipoprotein (BLP), auf mRNA-Ebene hochreguliert wurde, nicht jedoch durch den TLR 4 Liganden LPS. Ein Phänomen, das bereits Bowman et al. berichtete, der die Regulierung von TLR 2 auf Astrozyten von Mäusen untersuchte (Bowman et al., 2003). Diesbezüglich ist anzumerken, dass Astrozyten mit den enterischen Gliazellen embryologisch verwandt sind (Cabarrocas et al., 2003). Hingegen führte die Stimulation der enterischen Gliazellen mit LPS, einem Bestandteil der Zellmembran gram-negativer Bakterien, zu einer merklichen Expressionshemmung von TLR 4 auf mRNA-Ebene. Diese Ergebnisse stimmen mit den Daten anderer Studiengruppen überein, die eine Suppression von TLR 4 mRNA durch LPS in Makrophagen (Nhu et al., 2006; Medvedev et al., 2000) und in humanen Enterozyten (Palazzo et al., 2008) beobachteten. TLR 4 erkennt LPS als pathogen-assoziiertes Muster im Komplex mit dem Zelloberflächen-Glykoprotein CD 14, dem LPS-bindenden Protein (LBP) und dem Lymphozytenantigen 96 (MD 2) (Da Silva Correia et al., 2001). Aus diesem Grund wurde beispielhaft die mRNA-Expression von CD 14 in enterischen Gliazellen untersucht. Dabei zeigte sich identisch wie bei TLR 4 eine maximale Suppression von CD 14 nach 4-stündiger Stimulation mit LPS. In aktuellen Studien zeichnet sich ein erniedrigtes CD 14 und ein erhöhtes LBP als Aktivitätsmarker bei Patienten mit Morbus Crohn ab (Lakatos et al., 2011).

Diese Ergebnisse zeigen, dass bakterielle Pathogene in enterischen Gliazellen zu einer veränderten mRNA und Gesamtproteinexpression von *Toll-like*- und *NOD*-Rezeptoren führen. Ob dies in enterischen Gliazellen auch eine modifizierte Zelloberflächenexpression zur Folge hat, bleibt zum jetzigen Zeitpunkt unklar. Dafür müssten weitere Untersuchungen mittels FACS-Analysen erfolgen.

In enterischen Gliazellen existiert eine vernetzte Regulation zwischen verschiedenen Toll-like-Rezeptoren und ihren Liganden

Über die mRNA-Regulation der *Toll-like*-Rezeptoren in enterischen Gliazellen existieren in den gängigen Datenbanken wie PubMed oder Medline keine vergleichbaren Untersuchungen. Somit stellen die vorliegenden Stimulationsanalysen die ersten Daten dieser Art dar und zeigen, dass in enterischen Gliazellen eine ausgeprägte Vernetzung zwischen den verschiedenen *Toll-like*-Rezeptoren und ihren Liganden nach Stimulation mit mikrobiellen Produkten besteht. Die *Toll-like*-Rezeptoren sind nicht nur in der Lage ihre eigenen TLR-spezifischen Liganden, sondern auch verschiedene andere pathogen-assoziierte Muster (*PAMPs*) zu erkennen und mit einer mRNA-Expressionshemmung oder -stimulation ihrer Rezeptoren zu reagieren. Ein solches Netzwerk zwischen den *Toll-like*-Rezeptoren und ihren Liganden wurde bereits von Palazzo et al. beschrieben, welche die Expression von TLR 4, TLR 5, TLR 7 und TLR 9 in intestinalen Epithelzelllinien untersuchten (Palazzo et al., 2008). Anhand der vorliegenden Daten kann gezeigt werden, dass in enterischen Gliazellen beispielsweise durch den TLR 2-spezifischen Liganden BLP signifikant die Transkription von TLR 6 und durch den TLR 4 Liganden LPS die Transkription von CD 14, TLR 4, TLR 6 und TLR 9 gehemmt wird. Einen ähnlich hemmenden Effekt von LPS auf die mRNA-Expression von TLR 4 konnten bereits Nhu et al. in Makrophagen belegen (Nhu et al., 2006). Der TLR 9 Ligand CpG hingegen aktiviert den Rezeptor TLR 4 und dessen Korezeptor CD 14. Demnach scheint die Expression der *Toll-like*-Rezeptoren selektiv zu funktionieren, da manche Liganden einen inhibitorischen Effekt aufweisen, während sie die Expression anderer *Toll-like*-Rezeptoren steigern. Dieses fein abgestimmte Netzwerk dient einerseits durch die Aktivierung der angeborenen Immunantwort über die *Toll-like*-Rezeptoren zur Abwehr von potentiellen Pathogenen im Darmlumen. Andererseits könnte die Hemmung der TLR-Expression vor einer Überstimulation schützen und somit Teil eines Kontrollsystems zur Erhaltung der Darmhomöostase sein. Die vorliegenden Daten implizieren somit, dass enterische Gliazellen möglicherweise neben pro- auch anti-inflammatorische Eigenschaften besitzen.

Nachdem mittels *Real-Time* PCR nachgewiesen wurde, dass die Stimulation mit bakteriellen Produkten zu einer veränderten mRNA-Expression führte, wurde anschließend untersucht, ob dies auch mit einer Veränderung der Proteinmenge korreliert. Dabei zeigte sich ähnlich wie auf Transkriptionsebene, dass der Rezeptor-spezifische Ligand BLP zu einer mäßigen Aufregulation von TLR 2 im Westernblot führte. Der inhibitorische Effekt von LPS auf die Proteinexpression von TLR 4 und CD 14 konnte auch auf Translationsebene bestätigt werden, wenn auch in geringerer Ausprägung und bei TLR 4 nach einer längeren Stimulationsdauer. Die Darstellung des Stimulationsverlaufes bei

TLR 7, TLR 9, NOD 1 und NOD 2 durch ihre Rezeptor-spezifischen Liganden (Imiquimod, CpG, iE-DAP und MDP) gelang hingegen nicht, beziehungsweise nur sehr eingeschränkt. Mögliche Gründe dafür könnten eine niedrige Proteinkonzentration der Rezeptoren oder eine geringe Protein-Antikörper-Bindungsaffinität sein, wobei verschiedene Protein- und Antikörperkonzentrationen verwendet und eine Optimierung der Wasch- und Blockierungsschritte sowie der Transferzeiten vorgenommen wurde. Hingegen gelang die Darstellung des zeitlichen Verlaufes bei TLR 6 nach Stimulation mit dem Rezeptor-spezifischen Fsl-1 beziehungsweise LPS problemlos. Die Expressionssteigerung der TLR 6 Proteine war dabei unabhängig von den beiden verwendeten Stimuli. Daraus kann geschlossen werden, dass die Aufregulation von TLR 6 auf Proteinebene nicht von seinem spezifischen Liganden abhängig ist, sondern auch durch die Konfrontation mit anderen Pathogenen ausgelöst werden kann. Obwohl LPS in enterischen Gliazellen eine Hemmung von TLR 6 mRNA induzierte, führte es auf Proteinebene zu einer Stimulation von TLR 6. Dieses Phänomen suggeriert möglicherweise eine posttranskriptionelle Kontrolle der TLR 6 Expression. Allerdings existieren in der Literatur auch Studien, welche eine transkriptionelle Hochregulierung von TLR 1 - 3 und 6 - 9 durch LPS in professionell Antigen-präsentierenden Zellen wie Makrophagen belegen (Nhu et al., 2006). Ein weiterer Erklärungsansatz für die abweichenden Befunde auf mRNA- und Proteinebene bei den *Toll-like*-Rezeptoren stellen möglicherweise Kontrollmechanismen über posttranslationale Modifikationen dar. Diverse Studien zeigten, dass beispielsweise Phosphorylierungen vom Tyrosin bei TLR 2 bis TLR 5 essentiell für die Bildung von Multiprotein-Komplexen in der Zellmembran und der Initiierung der Signalweiterleitung über *Toll-like*-Rezeptoren sind (Sarkar et al., 2003; Ivson et al., 2007). Beispielsweise demonstrierten Arbibe et al., dass die Phosphorylierung von zwei Tyrosinresiduen (Tyr-616, Tyr-761) für die Aktivierung von NF- κ B nach Stimulation mit *Staphylococcus aureus* nötig ist (Arbibe et al., 2000). Neben der Phosphorylierung scheinen auch Ubiquitinierungen und De-Ubiquitinierungen bei der Modifikation von *Toll-like*-Rezeptoren und dessen Adaptormolekülen von Bedeutung zu sein (Dunne und O'Neill, 2005). Weitere Studien sind nötig, um die Komplexität der Proteine zu verstehen, welche für die posttranslationale Modifikation verantwortlich sind.

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass TLR 2 durch BLP sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene und TLR 6 durch Fsl-1 und LPS auf Proteinexpression hochreguliert wurden. Dies scheint bedeutsam, da verschiedene Pathogene nur durch den Komplex aus TLR 2 - TLR 6 in der Immunabwehr erkannt werden. Ihre Expression wird jedoch scheinbar durch unterschiedliche Stimulanzen reguliert. Takeuchi und Okusawa et al. beschrieben, dass mykoplasmales Lipopeptid, wie zum Beispiel Fsl-1 oder MALP-2 (Makrophagen-aktivierendes Lipopeptide-2), nur von einem Heterodimer aus TLR 2 - TLR 6 und bakterielles Lipoprotein (BLP) durch TLR 2 allein erkannt wird.

Dies liegt daran, dass der TLR 2 - TLR 6 Komplex *diacylierte* Lipopeptide (Fsl-1, MALP-2) und TLR 2 bakterielles Lipoprotein (BLP) bevorzugt, welches ein *triacylierten* Cysteinrest am N-Terminus aufweist (Takeuchi und Akira, 2001; Okusawa et al., 2004).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die mRNA-Expression der analysierten *Toll-like*-Rezeptoren nach Konfrontation der enterischen Gliazellen mit bakteriellen Lipoprotein (BLP), Lipopolysaccharid (LPS) und dem CpG-Oligonukleotid unterschiedlich gehemmt oder stimuliert wurde. Da diese mikrobiellen Produkte unterschiedlicher Natur sind, kann aus den vorliegenden Daten geschlussfolgert werden, dass das Erkennen eines potentiellen Pathogens mehrere, wenn nicht sogar alle exprimierten *Toll-like*-Rezeptoren auf mRNA-Ebene beeinflusst. So führt scheinbar der Kontakt zu einem Pathogen grundsätzlich zu einer Expressionsveränderung mehrerer *Toll-like*-Rezeptoren und nicht nur von demjenigen *Toll-like*-Rezeptor, der direkt an seiner Erkennung beteiligt ist. Für die Steuerung der angeborenen Immunantwort scheinen daher nicht die Regulation einzelner *Toll-like*-Rezeptoren, sondern die umgebenden Mikroben und die Interaktion zwischen den Rezeptoren ausschlaggebend zu sein. Diese Ergebnisse sind möglicherweise Hinweise dafür, dass die Expression von *Toll-like*-Rezeptoren auf enterischen Gliazellen dynamisch und abhängig von der umgebenen mikrobiellen Darmflora ist.

Enterische Gliazellen sind über die Expression von NOD-Rezeptoren Teil der intestinalen angeborenen Immunabwehr

Der nächste Teil der vorliegenden Arbeit befasste sich mit den intrazellulären *NOD-like*-Rezeptoren NOD 1 und NOD 2 (*Nuclear oligomerization domain*), welche für die Erkennung von Pathogenen im Zytosol verantwortlich sind (Ogura et al., 2001 b) und essentielle Regulatoren der immunologischen Homöostase im Darm darstellen (Rosenstiel und Schreiber, 2009). Dies schien von besonderer Bedeutung, da das NOD 2 Gen (CARD 15) im Jahr 2001 als erstes Suszeptibilitäts-gen für die chronisch entzündliche Darmerkrankung Morbus Crohn identifiziert wurde (Hugot et al., 2001). Die *NOD*-Proteine erkennen unterschiedliche Peptidoglykan-Fragmente, wobei NOD 1 iE-DAP- und NOD 2 MDP-Strukturen bindet (Chamaillard et al., 2003; Girardin et al., 2003 a und b). Während *NOD*-Rezeptoren bisher vornehmlich auf Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen und intestinalen Epithelzellen untersucht wurden (Ogura et al., 2001 b; Gutierrez et al., 2002), gelang in dieser Arbeit erstmalig der Nachweis von NOD 1 und NOD 2 mRNA in nativen enterischen Gliazellen. Mittels Westernblot konnte zudem die basale Proteinexpression von NOD 1 und NOD 2 demonstriert werden, auch wenn sich dies im Vergleich zu den *Toll-like*-Rezeptoren, aufgrund des hohen Hintergrundsignals, deutlich schwieriger gestaltete. Dies könnte in einer im Vergleich zu den *Toll-like*-

Rezeptoren möglicherweise niedrigeren Proteinkonzentration von NOD 1 und NOD 2 in enterischen Gliazellen oder in einem nicht optimalen Wirkungsverhältnisses der verwendeten Antikörper begründet sein. Bereits andere Arbeitsgruppen bemerkten, dass die NOD 2 Expression in intestinalen Epithelzellen, trotz stabiler mRNA-Expression, auf Proteinebene mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern nur sehr schwach oder nicht nachweisbar war (Hisamatsu et al., 2003).

Die anschließenden Stimulationsanalysen ergaben eine signifikante Herabregulation der mRNA von NOD 1 und NOD 2 nach Konfrontation der enterischen Gliazellen mit LPS. Der hemmende Effekt von LPS bestätigte sich bei NOD 1 auch auf Translationsebene in einer verminderten Proteinexpression nach 4-stündiger Stimulation. Diese Untersuchungsergebnisse weichen von zuvor publizierten Daten ab, in denen es durch LPS zu einer Expressionssteigerung NOD-spezifischer mRNA in Monozyten und Astrozyten kam (Sterka et al., 2006). Andere Autoren berichten jedoch, dass die Regulation der NOD-Expression nicht über eine direkte Stimulation der *NOD*-Rezeptoren mit bakteriellen Komponenten, sondern vielmehr sekundär über die Signalweiterleitung anderer Rezeptoren der angeborenen Immunantwort funktioniert. Die Expressionssteigerung von NOD 1 durch LPS lässt sich über eine TLR 4-abhängige Zunahme der NF- κ B Aktivierung erklären. Dabei induziert NF- κ B den *Interferon Regulatory Factor* (IRF 1), welcher wiederum über eine Bindungsstelle im CARD 4- / NOD 1-Promoter als Transkriptionsfaktor für NOD 1 wirkt (Hisamatsu et al., 2003, Negishi et al., 2006). Kontroverse Ergebnisse finden sich in der Literatur bezüglich der Erkennung von LPS über NOD. Während einige Autoren lediglich die Peptidoglykane MDP und iE-DAP als NOD-Liganden beschrieben, zeigten andere Autoren eine direkte Interaktion von NOD mit LPS (Ogura et al., 2001 a; Inohara et al., 2001). Diese Beobachtung konnte später widerlegt werden, da die fälschlicherweise angenommene NOD-abhängige LPS-Erkennung durch eine Verunreinigung der LPS-Präparation mit Peptidoglykan-Fragmenten erklärt wurde (Girardin et al., 2003 a und b; Chamillard et al., 2003). In dieser Arbeit gelang es nur bedingt den Einfluss von MDP und iE-DAP auf die Proteinexpression von NOD 1 und NOD 2 mittels Westernblot darzustellen. Während iE-DAP zu einer leichten Hemmung von NOD 1 auf Proteinebene führte, gelang es trotz mehrfacher Optimierungsschritte nicht, den Effekt von MDP auf die Proteinsynthese von NOD 2 darzustellen. Dies stimmt mit vorgehenden Studien überein, in denen die Rezeptor-spezifischen NOD-Liganden, wie zum Beispiel MDP, als relativ schwache Stimulanzen in Makrophagen beschrieben wurden (Pauleau et al., 2003).

Ähnlich wie die *Toll-like*-Rezeptoren aktivieren die *NOD*-Proteine den Transkriptionsfaktor NF- κ B über die nachgeschaltete Proteinkinase RICK (Park et al., 2007). In Voruntersuchungen wurde bereits durch Hollenbach et al. anhand eines *in vitro* Infektionsmodells gezeigt, dass in enterischen Gliazellen die Infektion durch *Helicobacter pylori* (vom Wildtyp H.p. 26695) zu einer I κ B- α Degradierung und

Translokation der NF- κ B Untereinheit p65 in den Zellkern führte (Hollenbach et al., eingereicht). Im Unterschied zur Mutante besaß nur der *Helicobacter pylori* vom Wildtyp ein funktionierendes Peptidoglykan-Translokationssystem, wobei Peptidoglykane (PGN) - als Bestandteil bakterieller Zellwände - Hauptliganden der NOD-Rezeptoren sind. Da es ausschließlich unter Infektion mit dem Wildtyp zu einer deutlichen Steigerung der RICK Kinase-Aktivität kam, liegt die Vermutung nah, dass die NF- κ B Aktivierung in enterischen Gliazellen über die Aktivierung der NOD-Rezeptoren geschieht. Dagegen konnte anhand von anderen Zelltypen, wie dermalen Fibroblasten und der Chondrosarkom-Zelllinie C3842, die mit *Helicobacter pylori* unter gleichen experimentellen Bedingungen infiziert wurden, keine RICK / NF- κ B Aktivierung nachgewiesen werden (Hollenbach et al., eingereicht). Diese Ergebnisse bestätigen Zelltyp-spezifisch, dass enterische Gliazellen über die Expression von NOD 1 und NOD 2 Teil des intestinalen angeborenen Immunsystems sind.

Enterische Gliazellen exprimieren Adaptormoleküle und RICK als nachgeschaltete Vermittler der LPS-abhängigen Signaltransduktion

In der Literatur existieren kontroverse Studien über die Funktion der Kinase RICK bei der Signalvermittlung in der angeborenen Immunantwort. So postulierten Kobayashi et al. eine essentielle Rolle von RICK für die Signalweiterleitung über die *Toll-like*-Rezeptoren TLR 2 und TLR 4 (Kobayashi et al., 2002). Neuere Studien an RICK-defizienten Mäusen zeigten hingegen eine wesentliche Funktion von RICK in der Signalweiterleitung über die NOD-Rezeptoren, nicht jedoch wie zuvor angenommen, bei der TLR-Antwort und T-Zellproliferation (Hall et al., 2008; Park et al., 2007).

Aus den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit geht hervor, dass RICK nicht nur über die NOD-Rezeptoren (Inohara et al., 2002), sondern auch über TLR 4 aktiviert wird. So zeigte sich auf Transkriptionsebene eine signifikante zeitabhängige Aufregulierung der RICK mRNA nach Aktivierung von TLR 4 durch LPS, was sich auf Proteinebene bestätigen ließ. Die Signalweiterleitung über RICK führt anschließend zur Aktivierung von NF- κ B (McCarthy et al., 1998), dem zentralen Transkriptionsfaktor für die Synthese von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie dem klinisch relevanten IL-6 und TNF- α (Kobayashi et al., 2002; Chin et al., 2002). Kobayashi et al. demonstrierten, dass RICK-defiziente Makrophagen, die zuvor mit dem TLR 4-Liganden LPS stimuliert wurden, mit einer deutlich herabgesetzten IL-6 und TNF- α Produktion reagieren. Diese Daten und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen die These, dass es sich bei RICK nicht nur um einen in der Signaltransduktion nachgeschalteten Vermittler von NOD, sondern auch von TLR 4 handelt.

Im Allgemeinen stellt die funktionelle Präsenz der *Toll-like*-Rezeptoren und NOD-Proteine in enterischen Gliazellen einen wichtigen Mechanismus dar, durch den dieser Zelltyp in der Lage ist auf

bakterielle Pathogene des Darms zu reagieren und die immunologische Homöostase aufrechtzuerhalten. Hollenbach et al. zeigten im Mausmodell mit TNBS-induzierter Kolitis eine signifikante Reduktion der intestinalen Entzündungsreaktion, der NF- κ B-Aktivität des klassischen Signalweges und der pro-inflammatorischen Zytokinausschüttung durch den Inhibitor SB203580. Dieser Effekt wurde vornehmlich auf die Hemmung von RICK im NF- κ B-Signalweg zurückgeführt (Hollenbach et al., 2005). Da RICK bei der Signalvermittlung von pathogenen bakteriellen Mustern bedeutend ist und Darmbakterien als Triggerfaktoren chronisch entzündlicher Darmerkrankungen vermutet werden, könnte die Hemmung von RICK eine neue Therapiestrategie darstellen.

Neben RICK spielen noch weitere Adapter- und Interaktionsmoleküle für die komplexe Signalweiterleitung von der Rezeptorbindung an der Zelloberfläche bis zur Effektorfunktion von NF- κ B in der angeborenen Immunantwort eine Rolle. Extrazelluläre bakterielle Liganden führen zur Aktivierung des zytoplasmatischen Teils der *Toll-like*-Rezeptoren und locken damit intrazelluläre Adaptorproteine an. Dazu gehören die vier *TIR-domain* enthaltenen Adaptormoleküle: MyD88, MAL, TRIF und TRAM. Wie bereits einleitend beschrieben, bestreiten die meisten *Toll-like*-Rezeptoren (TLR 2 bis TLR 9, mit Ausnahme von TLR 3) den Myd88-abhängigen Signalweg (frühe NF- κ B Antwort) (Fitzgerald et al. 2001; Takeda und Akira, 2004). Bei der Aktivierung von NF- κ B über TLR 4 wird die Komplexität dahingehend erhöht, dass neben der Myd88-abhängigen auch eine Myd88-unabhängige NF- κ B Antwort existiert (Yamamoto et al., 2003 a und b). Darüber wird zum einen die späte NF- κ B Antwort mit der Bildung inflammatorischer Zytokine und zum anderen die Expression von Interferon- β ausgelöst (Kawai und Akira, 2010).

Peritoneale Makrophagen von Myd88-defizienten Mäusen können nach Infektion mit *Staphylococcus aureus* keine messbaren Zytokine produzieren und damit nicht zur Immunabwehr beitragen (Takeuchi et al., 2000). Dies unterstreicht die Bedeutung des Adaptormoleküls Myd88 bei der intestinalen Immunantwort. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals mRNA sowohl der Adaptormoleküle der Myd88-abhängigen NF- κ B Antwort (MAL, IRAK, TRAF 6) als auch der Myd88-unabhängigen NF- κ B Antwort (TRIF, TRAM) in enterischen Gliazellen nachgewiesen werden. Eine Regulierung der genannten Adaptormoleküle (mit Ausnahme von IRAK) durch eine 4-stündige Stimulation mit den TLR-Liganden BLP (TLR 2), LPS (TLR 4) und CpG (TLR 9) findet jedoch auf Transkriptionsebene in enterischen Gliazellen nicht statt. Verschiedene Studien zeigen dafür Regulationsmechanismen über posttranslationale Modifikationen (Carpenter und O'Neill, 2009; Dunne und O'Neill, 2005). Diese Kontrollmechanismen in Form von Phosphorylierung, Ubiquitinierungen und De-Ubiquitinierungen sind für die Erhaltung der Homöostase nötig, da eine Überaktivierung der *Toll-like*-Rezeptoren über den NF- κ B-Signalweg zur Zytokinfreisetzung und damit zu inflammatorischen Erkrankungen führen kann.

Beispielsweise dienen MAL und TRAM nach Phosphorylierungsprozessen als „Brückenadapatoren“ für Myd88 und TRIF (Kagan und Medzhitov, 2006; Kenny und O’Neill, 2008). Ubiquitinierungen spielen bei der intrazellulären Signalweiterleitung über die I κ B-Degradierung mit nachfolgender NF- κ B Freisetzung eine Rolle (Scherer et al., 1995).

6.3 Die intrazelluläre Signaltransduktion über IKK / NF- κ B in enterischen Gliazellen

NF- κ B als zentraler Transkriptionsfaktor bei der Initiierung von Entzündungsprozessen in der angeborenen und erworbenen Immunantwort stellt die Endstrecke einer Reihe von Signaltransduktionswegen dar, die über *Toll-like*-Rezeptoren und *NOD*-Proteine angestoßen werden (Sen et al., 1986; Karin und Lin, 2002). Fehlregulationen im NF- κ B-Signalweg wurden mit verschiedenen Erkrankungen, wie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Tumoren, Arthritis, Asthma oder neurodegenerativen Prozessen, in Zusammenhang gebracht (Schreiber et al., 1998; Karin und Ben-Neriah, 2000).

Enterische Gliazellen wirken anti-inflammatorisch durch die gesteigerte Genexpression der inhibitorisch wirksamen NF- κ B Untereinheit NF- κ B 1 nach Stimulation mit LPS

Wie bereits einführend erläutert, setzt sich der Transkriptionsfaktor NF- κ B aus fünf Untereinheiten zu Hetero- und Homodimeren zusammen. Lediglich die Rel-Proteine Rel A (p65), Rel B und c-Rel besitzen eine Transaktivierungsdomäne (May und Ghosh, 1997). Aufgrund dieser Domäne wirken sie im Gegensatz zu den Nicht-Rel-Proteinen NF- κ B 1 und NF- κ B 2 aktivierend auf die Transkription im Zellkern. Homo- oder Heterodimere aus NF- κ B 1 (p50) und NF- κ B 2 (p52) führen *in vivo* zu einer Hemmung der κ B-abhängigen Transkription durch die Konkurrenz um die DNA-Bindungsstelle mit transkriptionell aktiven Dimeren (Lernbecher et al., 1993). In den vorliegenden Analysen der einzelnen NF- κ B Untereinheiten zeigte sich nach 4-stündiger Stimulation der enterischen Gliazellen durch LPS keine signifikante Regulierung der mRNA von p65 (Rel A) und c-Rel auf Transkriptionsebene. Dies könnte auf den späten Zeitpunkt der Analyse (nach 4 Stunden) zurückzuführen sein, da der Transkriptionsfaktor NF- κ B zu den „*immediate early genes*“ gezählt wird. Diese sind dadurch gekennzeichnet, dass sie in einem inaktiven Zustand vorhanden sind und ohne Aktivierung mittels *de novo* Proteinsynthese innerhalb weniger Minuten nach Zellstimulation transkribiert werden (Haskill

et al., 1991). Dies erlaubt den Transkriptionsfaktoren schnellstmöglich auf potentiell schädigende Stimuli zu reagieren.

Hingegen wurde bei der NF- κ B Untereinheit NF- κ B 1 (ohne Transaktivierungsdomäne) eine signifikante mRNA-Expressionssteigerung nach LPS Stimulation im Vergleich zu nicht stimulierten enterischen Gliazellen beobachtet. Im Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen, zeigten bereits de Wit et al. eine Steigerung der Expression von NF- κ B 1 und NF- κ B 2 mRNA in LPS-stimulierten humanen Monozyten, wobei auch hier kein Effekt auf die mRNA-Expression von p65 zu verzeichnen war (de Wit et al., 1996 und 1998). Interessanterweise werden die NF- κ B Untereinheiten NF- κ B 1 und NF- κ B 2 zur I κ B-Proteinfamilie gezählt und agieren selektiv als Inhibitoren von NF- κ B. Während NF- κ B generell als Schlüsselfaktor bei Entzündungsprozessen betrachtet wird, induziert LPS in NF- κ B 1 (p50)-defizienten Makrophagen, verglichen mit den Wildtypen, eine signifikant höhere Genexpression von Interferon- β (IFN- β) und des pro-inflammatorischen IL-12 (Cao et al., 2006; Tomczak et al., 2003; Yang et al., 2011). Daraus ergab sich die Hypothese, dass NF- κ B 1 möglicherweise ein Inhibitor entzündungsfördernder Gene darstellt. Dies wurde mit der Beobachtung bestätigt, dass NF- κ B 1-defiziente Mäuse anfällig für eine Mikroflora-induzierte Kolitis sind (Erdman et al., 2001; Tomczak et al., 2003). Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Stimulationsanalysen wurde die NF- κ B Untereinheit NF- κ B 1 mit LPS, TNF- α und / oder IL-1 β für 4 Stunden stimuliert. Dabei ergab sich die stärkste Aktivierung der mRNA-Expression von NF- κ B 1 durch LPS und TNF- α allein oder in Kombination; IL-1 β hatte hingegen keinen signifikanten Einfluss. Auch Perrot-Applanat et al. zeigten eine zeitabhängige Steigerung der Genexpression von NF- κ B 1 mit maximalen Ergebnissen nach 4-stündiger TNF- α Stimulation in humanen Endothelzellen (Perrot-Applanat et al., 2011).

Zusammenfassend war lediglich eine Hochregulierung der vermutlich inhibitorischen NF- κ B 1 Untereinheit, nicht aber der pro-inflammatorisch wirksamen p65 Untereinheit durch LPS nachzuweisen. Daraus kann geschlossen werden, dass enterische Gliazellen möglicherweise auch eine schützende, anti-inflammatorische Funktion bei Entzündungsprozessen ausüben und durch bisher unbekannte, fein abgestimmte Mechanismen zur Erhaltung der immunologischen Homöostase des Darms beitragen.

Der klassische I κ B- α abhängige NF- κ B-Signalweg ist in enterischen Gliazellen bedeutsam für die angeborene Immunabwehr nach Stimulation mit LPS

Da zu Beginn der Arbeit unklar war, ob der NF- κ B-Signalweg in enterischen Gliazellen existiert und nach Aktivierung der *Toll-like*-Rezeptoren bevorzugt der klassische oder alternative Signalweg durchlaufen wird, wurden die einzelnen Komponenten des NF- κ B-Signalweges untersucht. Die Analysen der I κ B-Kinase-Komplexe und I κ B-Inhibitoren nach Aktivierung von TLR 4 über LPS zeigten überraschenderweise eine starke und signifikante Aufregulierung der mRNA von I κ B- α auf das 15-fache im Vergleich zu nicht stimulierten enterischen Gliazellen. Dahinter lässt sich ein negativer Feedback-Mechanismus vermuten: Bei ausreichender NF- κ B Freisetzung wird über die Aufregulierung der NF- κ B Inhibitoren I κ B- α und I κ B- β eine weitere NF- κ B Translokation in den Zellkern und damit die Transkription entzündungsfördernder Gene verhindert. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Dagvadorj et al., die eine durch LPS-induzierte Erhöhung des Inhibitors I κ B- ξ auf Protein- und mRNA-Ebene in einer Makrophagen-Monozyten Zelllinie beobachteten. Diese wurde durch den Zusatz des anti-inflammatorischen IL-10 deutlich supprimiert (Dagvadorj et al., 2009). Dies bestärkt die Schlussfolgerung, dass enterische Gliazellen neben pro- auch anti-inflammatorische Eigenschaften besitzen und über die Stabilisierung von NF- κ B im Zytoplasma vermutlich als Schaltstelle bei Entzündungen agieren können. So basieren auch bewährte Therapieoptionen bei der Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen auf der Hemmung von NF- κ B. Während Salizylate die I κ B-Kinase und somit die Freisetzung von NF- κ B im Zytoplasma hemmen (Yin et al., 1998), aktivieren Kortikosteroide die I κ B-Synthese und verhindern darüber die Translokation von NF- κ B in den Zellkern (Auphan et al., 1995).

Da es erst durch die Degradierung von I κ B- α zu einer Translokation der NF- κ B Untereinheiten in den Zellkern mit nachfolgender Transkription spezifischer Zielgene kommt, stellt dies ein verlässliches Maß für die Aktivierung von NF- κ B dar. Daher wurden LPS, BLP und CpG in einem Zeitraum von 0 bis 8 Stunden auf ihre Fähigkeit hin überprüft, die Degradierung von I κ B- α und damit die Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in enterischen Gliazellen zu induzieren. Mehrere Studien demonstrierten bereits eine Aktivierung von NF- κ B durch LPS in humanen Monozyten und RAW 264.7 Zellen (Müller et al., 1993; Guha und Mackman, 2001). Mit den vorliegenden Daten konnte nun erstmalig auch eine Aktivierung der NF- κ B Signalkaskade über LPS in enterischen Gliazellen gezeigt werden. Dabei wurde nach 30 bis 60-minütiger Stimulation mit LPS eine deutlich sichtbare Degradierung von I κ B- α in enterischen Gliazellen im Westernblot beobachtet. Dies spricht dafür, dass enterische Gliazellen den klassischen - I κ B- α abhängigen - NF- κ B-Signalweg durchlaufen. Zu gleichen Ergebnissen kamen Fischer et al., welche die I κ B- α Degradierung in humanen Monozyten nach

Stimulation mit LPS und TNF- α untersuchten. Während die Stimulation mit LPS erst nach 60 min zu einer Phosphorylierung von I κ B- α führte, konnte diese bei TNF- α bereits nach 5 min beobachtet werden (Fischer et al., 1999). Damit erfolgt die I κ B- α Degradierung über LPS im Vergleich zu TNF- α verhältnismäßig langsam, was suggeriert, dass verschiedene intrazelluläre Signalwege bei der Aktivierung von IKK involviert sind.

p65 stellt die NF- κ B Untereinheit mit der stärksten DNA-Bindungsaktivität nach Stimulation mit LPS und TNF- α in enterischen Gliazellen dar

Für die Analyse der DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B wurde nukleäres Zelllysat von enterischen Gliazellen für 90 min mit LPS und / oder IL-1 β und / oder TNF- α stimuliert. Dabei stellte sich p65 (Rel A) im Vergleich zu den anderen NF- κ B Untereinheiten als das Rel-Protein mit der stärksten DNA-Bindungsaktivität in enterischen Gliazellen dar. Es zeigte sich, dass das nukleäre p65-Protein bei unstimulierten enterischen Gliazellen nicht nachgewiesen werden konnte. Erst durch die Stimulation mit LPS und den genannten pro-inflammatorischen Zytokinen über 90 Minuten konnte eine deutliche Steigerung der DNA-Bindungsaktivität mit bis zu 10-fachen Induktionswerten bezogen auf native enterische Gliazellen ausgelöst werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Daten von Hollenbach et al., wobei lebende *Helicobacter pylori* Bakterien zur Stimulation von NOD-Rezeptoren verwendet wurden und sich auch hier p65 als das Haupt-Rel-Protein mit der höchsten DNA-Bindungsaktivität erwies (Hollenbach et al., eingereicht). Dies suggeriert wiederum, dass der klassische Signaltransduktionsweg über p65 die entscheidende Rolle in enterischen Gliazellen nach Stimulation mit LPS und Zytokinen spielt. Im Vergleich zu IL-1 β stellten sich LPS und TNF- α als die mit Abstand stärksten Induktoren der p65-abhängigen NF- κ B-Aktivität dar. In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch bei den DNA-Bindungsanalysen keine Daten zu weiteren Stimulationszeiten als 90 Minuten erhoben, so dass möglicherweise bei einer anderen Stimulationsdauer oder der Verwendung anderer Konzentration abweichende Ergebnisse resultieren könnten.

6.4 Enterischen Gliazellen besitzen die Immunkompetenz zur Expression von Interleukinen, TNF- α und Chemokinen

Enterische Gliazellen sind eine potentielle Quelle für Zytokine im Darm

Am Ende der vorliegenden Arbeit war von Interesse, ob im Falle einer bakteriellen Translokation, die Erkennung pathogener Muster über *Toll-like*- und *NOD*-Rezeptoren mit der Signalweiterleitung über IKK immunmodulierende Konsequenzen hat und zur Expression von Entzündungsmediatoren führt. Anhand der vorliegenden Daten wurde der Beweis erbracht, dass enterische Gliazellen eine potentielle Quelle für Zytokine im Darm darstellen. Dazu zählen pro- und anti-inflammatorische Interleukine (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10 und IL-12), Chemokine (Ccl-2, Cxcl-9, Cxcl-10), der Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) und Interferon gamma (IFN- γ).

In der Literatur finden sich zahlreiche Studien, die eine verstärkte Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-6 bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen belegen (Hyams et al., 1993; Khan und Collins, 1994). Beispielsweise zeigten Khan und Collins in einem durch *Trichinella spiralis*-induzierten Modell für chronisch entzündliche Darmerkrankungen in Ratten eine Hochregulierung von IL-1 β , IL-6 und TNF- α im myenterischen Plexus, aus welchem die enterischen Gliazellen von Rühl et al. isoliert wurden (Khan und Collins, 1994). Dies deckt sich mit den Daten der vorliegenden Arbeit, in der eine bezeichnende Steigerung der mRNA-Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 α , IL-6 und TNF- α nach 4-stündiger Stimulation mit LPS nachweisbar war. Es lässt sich also vermuten, dass enterische Gliazellen möglicherweise über die Expression pro-inflammatorischer Zytokine eine chronische Darmentzündung unterhalten können, da beispielsweise Morbus Crohn durch eine hohe Sekretion von IL-1 β und TNF- α charakterisiert ist (Schreiber et al., 1999; Podolsky, 2002).

Bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen im akuten Schub scheint zudem eine Erhöhung der IL-6 Aktivität charakteristisch zu sein, welche vornehmlich auf die Produktion von Interleukinen durch Makrophagen und Epithelzellen im Kolon zurückzuführen ist (Kusugami et al., 1995). Atreya et al. identifizierten den zugrunde liegenden Mechanismus über den IL-6 zur Aufrechterhaltung der chronischen Darmentzündung beiträgt. Sie zeigten anhand eines *in vivo* Kolitis-Tiermodells, dass IL-6 zu einer Resistenz von T-Zellen gegenüber der Apoptose bei Morbus Crohn führt (Atreya et al., 2000). Als Fortführung dieser Ergebnisse postulierten Yamamoto et al. einen monoklonalen anti-IL-6-Rezeptor-Antikörper als mögliches therapeutisches Target bei Patienten mit Morbus Crohn (Yamamoto et al., 2000).

Die mRNA-Expression von IL-6 wird in enterischen Gliazellen durch Zytokine selbst reguliert

Das Zytokin IL-6 nimmt im zentralen Nervensystem eine komplexe Funktion ein. So ist IL-6 zum einen für die Neuroprotektion entscheidend, zum anderen aber auch als Mediator von Entzündungsprozessen und Demyelinisierungen bekannt (Van Wagoner und Benveniste, 1999). Hingegen ist die physiologische Bedeutung von IL-6 im enterischen Nervensystem weitgehend ungeklärt. Es fehlte bisher sogar an grundlegenden Informationen, ob und wie die mRNA-Expression von Zytokinen im enterischen Nervensystem reguliert wird. Daher erfolgten Untersuchungen, anhand der Beispiele IL-1, IL-6 und IL-10, über deren transkriptionelle Regulation durch Zytokine selbst. Dafür wurden enterische Gliazellen über 4 Stunden mit IL-1 β und TNF- α allein oder in Kombination inkubiert. Bezüglich der Interleukine IL-1 und IL-10 wurde festgestellt, dass diese nicht signifikant durch IL-1 β und TNF- α auf mRNA-Ebene reguliert wurden. Jedoch belegen die vorliegenden Ergebnisse eine signifikante Steigerung der mRNA von IL-6 sowohl durch IL-1 β als auch TNF- α allein oder in Kombination bis auf das maximal 5-fache verglichen mit nativen Kontrollzellen. Bereits Rühl et al. demonstrierten in enterischen Gliazellen eine gesteigerte Transkription von IL-6 durch IL-1 β (Rühl et al., 2001 b). Im Einklang damit existieren weitere Studien, in denen die embryologisch verwandten Astrozyten des ZNS IL-6 sowohl nach Stimulation mit IL-1 β als auch mit TNF- α synthetisieren (Norris et al., 1994; Benveniste et al., 1990). Hammond et al. zeigten anhand von Astrozyten, dass der Effekt von IL-1 β Rezeptor-vermittelt ist (Hammond et al., 1999). Diese Daten konnten durch Rühl et al. in enterischen Gliazellen bestätigt werden, da ein spezifischer IL-1-Rezeptor-Antagonist zur Hemmung der IL-1 β -induzierten Expression von IL-6 führte. Im Gegensatz dazu, zeigte sich bei enterischen Gliazellen eine signifikante Dosis-abhängige Hemmung der IL-6 mRNA durch exogen zugeführtes IL-6, während in den embryologisch verwandten Astrozyten die Expression von IL-6 erhöht wurde (Rühl et al., 2001 b). Dem scheint ein negativer Feedback-Mechanismus zugrunde zu liegen, so dass bei übermäßiger Freisetzung von IL-6 dessen eigene Expression auf mRNA-Ebene unterdrückt wird. Dies unterstreicht ein weiteres Mal, dass enterische Gliazellen womöglich anti-inflammatorisches Potential aufweisen und entscheidend bei der Regulation entzündlicher Prozesse im enterischen Nervensystem mitwirken. Dem sind die Fähigkeiten der enterischen Gliazellen zur LPS-induzierten massiven Expression pro-inflammatorischer Zytokine, wie IL-1 α und TNF- α , gegenüber zu stellen. Es scheint also auf ein exakt reguliertes Zusammenspiel bisher unbekannter Faktoren anzukommen, ob enterische Gliazellen in der immunstimulierten Umgebung eine Darm-protective Funktion einnehmen oder zur Entzündungsreaktion führen. Alles in allem unterstützen diese Ergebnisse die Hypothese, dass enterische Gliazellen als immunmodulierende Zellen im enterischen Nervensystem agieren.

Aktivierte enterische Gliazellen exprimieren chemotaktisch wirksames Cxcl-9 und Cxcl-10 für die Rekrutierung immunkompetenter Zellen

Bei den Expressionsanalysen fiel in besonderem Maße die immense mRNA-Expression von Cxcl-9, auch bekannt als MIG (*monokine induced by gamma-interferon*), nach Stimulation mit den Zytokinen IL-1 β und / oder TNF- α auf. Gasperini et al. zeigten bereits 1999, dass bei Entzündungsreaktionen Cxcl-9 durch Makrophagen nach der Induktion durch Interferon γ sezerniert wird, woraus sich die Namensgebung MIG ableitet (Gasperini et al., 1999). Im Rahmen dieser Studie konnte der Beweis erbracht werden, dass auch enterische Gliazellen in der Lage sind Cxcl-9 auf mRNA-Ebene zu exprimieren. Desweiteren belegen die Ergebnisse, dass die gesteigerte mRNA-Expression von Cxcl-9 bei enterischen Gliazellen durch IL-1 β und TNF- α induziert wird.

Bei dem Chemokin Cxcl-9 handelt es sich neben Cxcl-10 (IP-10, *interferon induced protein 10 kDA*) und Cxcl-11 (I-TAC, *interferon inducible T cell alpha chemoattractant*) um einen von drei Liganden des Chemokinrezeptors CXCR 3 (Colvin et al., 2004). In zahlreichen Studien konnte die Rolle von CXCR 3 in der Pathogenese von verschiedenen Autoimmunerkrankungen, wie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Rheumatoiden Arthritis, Atherosklerose und beim systemischen Lupus erythematodes sowohl am Menschen als auch im Mausmodell belegt werden (Singh et al., 2008; Mohan et al., 2007; Enghard et al., 2009). Durch den Einfluss spezifischer Zytokine, wie Interferon γ , werden native T-Lymphozyten zu CD4+ T-Helferzellen und zytotoxischen CD8+ T-Zellen differenziert, die in hohem Maße den Chemokinrezeptor CXCR 3 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Da sich die CXCR 3-Liganden Cxcl-9 und Cxcl-10 vorzugsweise an Orten mit entzündlichen Geschehen ansammeln (Liao et al., 1995), erfolgt über deren Bindung am CXCR 3-Rezeptor die entzündungsabhängige Rekrutierung aktivierter T-Zellen (Campanella et al., 2008). Daraus kann geschlossen werden, dass enterische Gliazellen über die Expression von chemotaktisch wirksamen Cxcl-9 und Cxcl-10 möglicherweise als effektive T-Zell-Chemoattractoren wirken. Aktuelle Studien zeigen eine Überexpression der CXCR 3-Achse in der entzündeten Kolonmukosa und in peripheren Plasmazellen bei Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa (Schröpf et al., 2010; Hosomi et al., 2011). Die Blockierung der Cxcl-10-CXCR 3-Achse stellt einen viel versprechenden Ansatz in der Behandlung von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und septischem Schock dar (Herzig et al., 2012). Im Mausmodell gelang es zu belegen, dass mittels monoklonalem anti-Cxcl-10 Antikörper die Kolitis über eine verminderte Rekrutierung von T-Helferzellen signifikant gehemmt wird (Hyun et al., 2005). Auch bei anderen Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise der Rheumatoiden Arthritis, wurden anti-Cxcl-10

Antikörper bereits erfolgreich in randomisierten, doppel-blinden Phase II Studien eingesetzt (Yellin et al., 2012).

Ob die entsprechenden Stimulationseffekte auf die mRNA-Expression von Interleukinen, Chemokinen und TNF- α letztlich auch in einer gesteigerten Proteinsynthese und Sekretion resultieren, bleibt zum jetzigen Zeitpunkt unklar. Dafür müssten weiterführende Experimente angeschlossen werden. Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass aktivierte enterische Gliazellen einerseits Ursprung für verschiedene Zytokine im myenterischen Plexus sind, welche Entzündungsprozesse in der Darmwand aufrechterhalten können. Andererseits sind enterische Gliazellen über die Fähigkeit zur Chemotaxis vermutlich zur Rekrutierung immunkompetenter Zellen fähig. Aufgrund der weit verbreiteten Lokalisation von enterischen Gliazellen in der intestinalen Mukosa ist es gut vorstellbar, dass dieser Zelltyp über die Ausschüttung von Zytokinen viele andere Zelltypen in deren Umgebung beeinflussen kann.

6.5 Enterische Gliazellen als Schnittstelle zwischen der angeborenen und erworbenen Immunantwort

Bei intestinalen Infektionen werden zur antimikrobiellen Abwehr Elemente des angeborenen und erworbenen Immunsystems eingesetzt. Wie in dieser Arbeit demonstriert, exprimieren enterische Gliazellen spezifische Zelloberflächen- und intrazelluläre Rezeptoren wie *Toll-like*-Rezeptoren oder *NOD*-Proteine und induzieren darüber die angeborene Immunität. Über die Rekrutierung von Adaptorproteinen wie Myd88 und IRAK erfolgt die Aktivierung der intrazellulären Signaltransduktion und Translokation von NF- κ B Dimeren in den Zellkern. Mit der Bindung an das DNA-Motiv wird die Gentranskription von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen reguliert. Über die Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie IL-1 α , IL-6 und TNF- α dienen enterische Gliazellen der schnellen, Erreger-unspezifischen Immunabwehr. Zur angeborenen Immunität zählt neben der Sekretion von Botenstoffen die Fähigkeit zur Phagozytose. Hollenbach et al. konnte in vorhergehenden Studien mittels intrazellulärer Aufnahme von Flurescein-Isothiocyanat (FITC)-markiertem Dextran belegen, dass enterische Gliazellen aktiv Phagozytose betreiben (Hollenbach et al., eingereicht).

Zum zellulären Teil der erworbenen Immunabwehr gehört die Aktivierung und Rekrutierung Antigen-spezifischer T-Zellen, die in CD4 $^{+}$ - und CD8 $^{+}$ -Lymphozyten unterteilt werden. Eine Reihe von Daten belegen, dass enterische Gliazellen beim Anlocken von Immunzellen maßgeblich beteiligt sind. So zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit, dass aktivierte enterische Gliazellen chemotaktisch wirksame Chemokine, wie Cxcl-9, Cxcl-10 und Ccl-2 (MCP-1, *Monozyte Chemoattractant Protein 1*),

exprimieren. Diese Botenstoffe sind in der Lage Monozyten, T-Zellen und dendritische Zellen zum Ort der Entzündung zu rekrutieren (Carr et al., 1994; Xu et al., 1996). Die Chemokine Cxcl-9 und Cxcl-10 binden am gemeinsamen Rezeptor CXCR 3, der überwiegend auf CD4+-TH1-Lymphozyten exprimiert wird, und spielen damit wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Rekrutierung Antigen-spezifischer T-Zellen (Zlotnik et al., 2000).

Die Erkennung der Antigene auf T-Lymphozyten erfolgt über spezifische T-Zell-Rezeptoren. Dafür müssen diese durch Antigen-präsentierende Zellen prozessiert und mithilfe des Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) präsentiert werden. Für die Aktivierung der CD4+-Lymphozyten (T-Helfer-Zellen) bedarf es des MHC II Komplexes, welcher durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen, als bekannteste Vertreter durch Makrophagen und dendritische Zellen, exprimiert wird. Anschließend differenzieren die CD4+-Lymphozyten zu TH 1- und TH 2-Effektorzellen und dienen über ein spezielles Zytokinexpressionsmuster der humoralen oder zellvermittelten Immunantwort. Die Antigenpräsentation für die Aktivierung der CD8+-Lymphozyten erfolgt hingegen durch MHC I. Diese können von allen Zellen exprimiert werden. CD8+-Lymphozyten differenzieren sich zu zytotoxischen T-Zellen. Das Konzept der Interaktion zwischen enterischen Gliazellen und immunkompetenten Zellen wird durch eine Reihe von vorhergehenden *in vitro* Untersuchungen bestätigt. So sind Zytokin-aktivierte enterische Gliazellen fähig MHC II sowie kostimulierende ICAM I Moleküle zu exprimieren, so dass sie damit als nicht professionelle Antigen-präsentierende Zellen für CD4+-T-Zellen dienen können (Hollenbach et al., eingereicht). Die Kokultivierung von Antigen-spezifischen T-Zellen aus mesenterialen Lymphknoten mit TNF- α und Interferon γ stimulierten enterischen Gliazellen führt im Beisein von spezifischen Antigenen zu einem beachtlichen Anstieg der T-Zell-Proliferation (Hollenbach et al., eingereicht). Hingegen wurde durch den Einsatz von neutralisierenden anti-MHC-II-Antikörpern die T-Zell-Proliferation unterbunden. Damit war der Beweis erbracht, dass die durch enterische Gliazellen induzierte T-Zell-Proliferation von der Zytokin-induzierten Expression des MHC II Komplexes abhängig ist (Hollenbach et al., eingereicht). Es wurde bereits in älteren immunhistochemischen Untersuchungen demonstriert, dass lymphozytäre Infiltrate im enterischen Nervensystem bei Patienten mit Morbus Crohn mit der glialen Expression von MHC II Molekülen assoziiert ist (Geboes et al., 1992; Koretz et al., 1987). Zusammenfassend stützen diese und die vorliegenden Daten die Theorie, dass aktivierte enterische Gliazellen als Antigen-präsentierende Zellen zur MHC II-abhängigen T-Zell-Aktivierung beitragen und somit eine Schnittstelle zwischen der angeborenen und erworbenen Immunität bilden. Welche Mechanismen für die Transformation von inaktiven zu immunkompetenten enterischen Gliazellen *in vivo* nötig sind, ist bisher unklar.

6.6 Die Bedeutung der enterischen Gliazellen in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Die Erkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa werden unter dem Begriff der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zusammengefasst. Trotz intensiver Forschung ist die Pathogenese dieses Krankheitsbildes weitgehend unbekannt. Epidemiologische Studien deuten auf eine multifaktorielle Genese hin, wobei Umweltfaktoren, die genetische Prädisposition und immunologische Dysfunktionen eine Rolle spielen (Podolsky, 2002; Bonen und Cho, 2003). Aufgrund des Fehlens spezifischer kurativer Therapieansätze mit limitierter Toxizität besteht ein enormer Bedarf in der Entwicklung effektiver Behandlungsoptionen. Diverse Studien belegen, dass das enterische Nervensystem eine Schlüsselrolle in der Erhaltung der Darmwandintegrität spielt und dass Veränderungen des ENS direkt mit der Entwicklung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen assoziiert sind (Cabarrocas et al., 2003; Savidge et al. 2007). Aus diesem Grund rückten die enterischen Gliazellen in den letzten Jahren in das Interesse der Forschung. Dies ist in besonderem Maße den Arbeiten von Bush und Cornet zu verdanken, die in zwei unabhängigen Mäusemodellen die Bedeutung von enterischen Gliazellen bei der Entstehung von Darmentzündungen untersuchten. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass eine verminderte Anzahl von enterischen Gliazellen zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Darmwand und damit zur Bakterientranslokation führt (Bush et al., 1998; Cornet et al., 2001). Dadurch kann es in der Darmschleimhaut zu gravierenden Entzündungsprozessen und Neoplasien kommen (Hermiston und Gordon, 1995). Beim kompletten Verlust der enterischen Gliazellen endet die transmurale Darmentzündung tödlich (Bush et al., 1998; Cornet et al., 2001). Ursache dafür ist der Zusammenbruch der intestinalen Epithelbarriere mit anschließend abnormer Immunreaktion auf die darmeigene Mikroflora (Cabarrocas et al., 2003). Das makro- und histopathologische Bild im Tiermodell von Bush und Cornet erinnert dabei an die intestinale Entzündungsreaktion von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Bush et al., 1998; Cornet et al., 2001; Cabarrocas et al., 2003). Damit einhergehend konnte im Darm von Morbus Crohn Patienten ein reduziertes enterisches Glia-Netzwerk nachgewiesen werden (Bush et al., 1998; Cornet et al., 2001). In einer aktuellen Arbeit von von Boyen et al. wurde die Verteilung von enterischen Gliazellen in entzündetem und nicht-entzündetem Kolongewebe von Patienten mit Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und infektiöser Colitis (durch *Clostridium difficile*) verglichen (von Boyen et al., 2011). Dabei zeigte sich eine starke Expression von GFAP (als Marker) und GDNF (als sezernierter Faktor aktivierter enterischer Gliazellen) in entzündeter Mukosa von Colitis ulcerosa und infektiöser Colitis sowie eine leicht vermehrte Expression in entzündeter Mukosa von Morbus Crohn-

Patienten. Hingegen konnte in nicht entzündeter Mukosa dieser Patienten im Unterschied zur gesunden Kontrollgruppe keine GDNF-Expression nachgewiesen werden. Es suggeriert ein defektes enterisches Glia-Netzwerk bei der Erkrankung Morbus Crohn. Pathophysiologisch lässt sich dies damit erklären, dass es sich bei Morbus Crohn um eine transmurale Entzündung mit Zerstörung des Plexus myentericus und Plexus submucosus handelt, während sich die Entzündung der Colitis ulcerosa vorwiegend in der Mukosa abspielt (von Boyen et al., 2011). Dies wiederum unterstreicht, dass es sich bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa um unterschiedliche Krankheitsentitäten handelt. Die Ursache des verminderten enterischen Glia-Netzwerkes bei Morbus Crohn-Patienten liegt nach Steinkamp et al. in einer erhöhten Apoptoserate dieses Zelltyps. Sie zeigten, dass die pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α und IFN- γ , wie sie bei Patienten mit Morbus Crohn nachzuweisen sind, zu einer durch Caspase 3-vermittelten Apoptose der enterischen Glia führen. Die Apoptose von enterischen Gliazellen konnte dramatisch erhöht werden, indem neutralisierende Antikörper gegen BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) eingesetzt wurden (Steinkamp et al., 2012 b). Daraus schlussfolgernd scheinen neurotrophe Faktoren im Darm eine entscheidende, annehmbar protektive Rolle, in der Regulierung der Darmhomöostase zu spielen. Interessanterweise sezernieren enterische Gliazellen anti-apoptotisch wirksame neurotrophe Faktoren wie den *glia cell-derived neurotrophic factor* (GDNF). Ein zerstörtes gliales Netzwerk mit reduzierter Sekretion von GDNF in Patienten mit Morbus Crohn hat daher eine erhöhte Apoptose-Anfälligkeit der Darmepithelzellen zur Folge. Dies führt wiederum zu einer erhöhten Durchlässigkeit der intestinalen Mukosa mit Translokation von Bakterien und einer Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine mit nachfolgender intestinaler Entzündungsreaktion (von Boyen et al., 2006). Enterische Gliazellen sind in der Lage, sich über eine „autokrine Schleife“ vor der eigenen Apoptose durch eine verstärkte Expression von GDNF zu schützen (Steinkamp et al., 2012 a) und somit protektiv zur Erhaltung der mukosalen Darmwandintegrität beizutragen.

Neben dem neurotrophen Faktor GDNF sezernieren enterische Gliazellen Endothelin, TGF- β 1 und S-Nitrosoglutathion (GSNO) (Steinkamp et al., 2003; von Boyen et al. 2006 und 2010; Neunlist et al., 2007; Savidge et al. 2007). Sie verhindern dadurch nicht nur die Apoptose von interstinalen Epithelzellen, sondern fördern neben deren Proliferation auch den interzellulären Zusammenhalt der Epithelzellen. Dies geschieht über eine Hochregulierung von *tight junction*-assoziierten Proteinen, wie Zonula occludens und Occludin, was zu einer verminderten Durchlässigkeit der Epithelbarriere führt (Savidge et al., 2007). Auch bei bakteriellen Infektionen wirken enterische Gliazellen protektiv auf die Mukosabarriere. Flamant et al. zeigten, dass glial-sezerniertes S-Nitroglutathione (GSNO) bei der Infektion mit *Shigella flexneri* vor einer Zerstörung der *tight junction* Epithelbarriere schützt und zu einer verminderten Sekretion von pro-inflammatorischen Interleukinen führt (Flamant et al., 2011).

Daneben finden sich in der Literatur mehrere Daten, welche die neuroprotektive Rolle von Gliazellen auf enterische Neuronen unterstreichen. Bereits 1998 zeigten Bush et al. einen signifikanten Untergang von enterischen Neuronen im myenterischen Plexus durch die *in vivo* Ablation von enterischen Gliazellen (Bush et al., 1998). Dieses Phänomen bestätigte sich auch in aktuellen Arbeiten. Hierbei demonstrierten Abdo et al. eine erhöhte Apoptose von Neuronen bei oxidativem Stress nach einer viral-vermittelten Ablation der enterischen Glia. Dies untermauernd, schützen enterische Gliazellen in der *in vitro* Kokultivierung von Neuronen und Glia über die Sekretion von reduziertem Glutathion (Antioxidanz) vor neurotoxischen Effekten, die durch oxidativen Stress ausgelöst wurden (Abdo et al., 2010).

Verschiedene *in vivo* und *in vitro* Studien implizieren eine pathogenetische Rolle der darmeigenen Mikroflora während der Initialisierungs- und Erhaltungsprozesse bei Darmentzündungen (Swidsinski et al., 2002; French et al., 2000). Beispielsweise wurde im Tiermodell nachgewiesen, dass IL-2-defiziente Mäuse unter normalen Bedingungen eine chronische Kolitis entwickelten, nicht jedoch im keimfreien Milieu (Sadlack et al., 1993). Damit einhergehend existieren in der Literatur verschiedene Placebo-kontrollierte Studien in denen Antibiotika wie Metronidazol und Ciprofloxacin oder Rifaximin zur Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen eingesetzt wurden (Prantera et al., 2012; Arnold et al., 2002). Eine große Metaanalyse von randomisiert kontrollierten Studien mit über 1000 Patienten konnte 2011 belegen, dass Antibiotika dem Placebo in der Remissionsinduktion bei Patienten mit Morbus Crohn überlegen sind (Khan et al., 2011). Als zugrunde liegende Mechanismen werden eine Verminderung der Bakterienanzahl im Darmlumen und eine damit einhergehende Reduktion der bakteriellen Translokation diskutiert. Auch diese Studien suggerieren eine Fehlregulation des angeborenen Immunsystems bei der Entwicklung chronischer Darmentzündungen. Im Jahr 2001 konnte erstmals in Genanalysen eine Suszeptibilitätsregion auf dem Chromosom 16 q im Gen NOD 2 / CARD 15 identifiziert werden, welches mit dem Auftreten von Morbus Crohn assoziiert ist (Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001 a). Infolge dieser Mutation sind immunkompetente Zellen nur eingeschränkt fähig, Bakterienwandbestandteile zu erkennen und den NF- κ B-Signalweg innerhalb des angeborenen Immunsystems zu aktivieren. Dieser Verlust führt sekundär über einen NOD 2 / CARD 15-unabhängigen Weg zu einer verstärkten NF- κ B Aktivierung, was letztendlich zu einer persistierenden intestinalen Entzündungsreaktion führt (Bonen und Cho, 2003; Rosenstiel et al., 2003).

Enterische Gliazellen sind weit verzweigt in allen Regionen und Schichten des Gastrointestinaltraktes zu finden. Sie stehen im engen Kontakt mit ihrer Umgebung (Rühl, 2005). So interagieren sie mit enterischen Neuronen, Endothelzellen, Makrophagen und intestinalen Epithelzellen, alles Zelltypen,

welche zur Pathogenese der CED beitragen. Untersuchungen an Kokulturen von Epithelzellen mit primären Kulturen enterischer Gliazellen zeigen eine gezielte Migration. Über die Ausbildung von pseudoganglionären Strukturen wandern enterische Gliazellen zu den Epithelzellnestern in Kultur (von Boyen und Steinkamp, 2010). Darüber hinaus bilden enterische Gliazellen aufgrund ihrer prädisponierten Lage in den Krypten des Darmepithels eine Kontaktstelle mit den intestinalen Mikroben (Neunlist et al., 2007). Unter normalen Bedingungen sind Bakterien im Darmlumen lokalisiert. Während im gesunden Darm die intestinalen Bakterien kaum die Möglichkeit haben, die Epithelbarriere zu durchbrechen, zeigt sich im entzündeten Kolongewebe von CED-Patienten eine deutlich vermehrte Bakterienansammlung in der Epithelzellschicht (Swidsinski et al., 2002). Auch Hollenbach et al. zeigten anhand eines *in vivo* *Salmonella typhimurium* Modells, dass Bakterien im Falle einer Kolitis die Epithelbarriere durchbrechen und in die unmittelbare Nähe von enterischen Gliazellen translozieren (Hollenbach et al., eingereicht). Dies sind weitere Indizien für die Hypothese, dass es sich bei enterischen Gliazellen nicht nur, wie einst angenommen, um Packmaterial handelt, sondern dass dieser Zelltyp aktiv an der intestinalen Immunabwehr teilnimmt und fähig ist mit Darmbakterien zu interagieren.

6.7 Ausblick

Durch die vorliegenden *in vitro* Versuche an enterischen Gliazellen konnte die Erkennung von Bakterienbestandteilen über *Toll-like*- und *NOD*-Rezeptoren, als eine entscheidende Funktion des angeborenen Immunsystems, nachgewiesen werden. Auf mRNA-Ebene erfolgten ausschließlich Stimulationsanalysen mit BLP (TLR 2), LPS (TLR 4) und CpG ODN (TLR 9). Daher wäre der Einsatz weiterer TLR-spezifischer Liganden wie Fsl-1 (TLR 6 / TLR 2), Glykolipide (TLR 2), dsRNA (TLR 3) beziehungsweise lebender *Escherichia coli* oder *Salmonella typhimurium*-Stämme für die Expressionsanalysen und dessen Regulationsmechanismen von Interesse.

Ein zweiter Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit waren Untersuchungen der intrazellulären Signalkaskade IKK / NF- κ B in stimulierten enterischen Gliazellen. Dabei konnte der klassische NF- κ B-Signalweg über die Degradierung von I κ B- α im Zytoplasma und der Aktivierung von p65 bei der Initialisierung der angeborenen Immunantwort eine entscheidende Rolle zugesprochen werden. In der Literatur finden sich zahlreiche Studien, welche weitere, für die Immunabwehr bedeutsame, intrazelluläre Signalwege identifiziert haben. Dazu zählt beispielsweise die c-Jun NH 2 Proteinkinase (JNK) als eine der wichtigsten MAP-Kinasen (MAPK) (Kyriakis et al., 1994). Die JNK-Aktivierung scheint zudem bei der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen bedeutsam zu sein.

So zeigten Mitsuyama et al. und Hommes et al. in ihren Studien eine erhöhte Aktivität von JNK im Kolongewebe von Patienten mit moderatem bis schwerem Morbus Crohn (Mitsuyama et al., 2006; Hommes et al., 2002). Damit einhergehend konnten sowohl im Kolitis-Mausmodell als auch bei CED-Patienten spezifische JNK-Inhibitoren wie SP600125 erfolgreich als Therapiealternativen eingesetzt werden. Sie führten zu einer Reduktion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α und zu einer Abnahme entzündlicher Zellinfiltrate im Kolongewebe (Assi et al., 2006; Reinecke et al., 2012). In diesem Zusammenhang wären weiterführende Studien von Bedeutung, welche die Existenz und Regulation der MAPK-Signalkaskade über JNK und die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 in enterischen Gliazellen untersuchen.

Morbus Crohn Patienten weisen ein reduziertes Netzwerk enterischer Glia im Darm auf, was über einen nicht endgültig geklärten Mechanismus zu einer erhöhten Apoptoseanfälligkeit von Darmepithelzellen führt. Angesichts der Fähigkeit der enterischen Gliazellen neurotrophe Faktoren, wie GDNF, BDNF und TGF- β 1, zu sezernieren, die direkt die Epithelbarriere im Darm stabilisieren (von Boyen et al., 2006; Steinkamp et al., 2012 a), sollten diese unter therapeutischen Gesichtspunkten weiter untersucht werden. Zumal die Folgen des Verlustes der enterischen Glia als Zytokin-sezernierender Zelltyp im pathophysiologischen Verständnis der Erkrankung Morbus Crohn noch nicht adäquat eingeordnet werden können.

7 Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

Untersuchungen zur Funktion enterischer Gliazellen bei der Vermittlung der angeborenen Immunantwort

eingereicht von: Anja Schnabel

angefertigt am: Universitätsklinikum Leipzig
Department für Innere Medizin, Neurologie und Dermatologie
Fachbereich Internistische Intensivmedizin
Klinik und Poliklinik für Gastroenterologie und Rheumatologie

betreut von: Prof. Dr. med. Lothar Engelmann
PD Dr. med. habil. Matthias Pierer
Dr. med. Eike Hollenbach

eingereicht im: Februar 2014

Hintergrund: Lange Zeit wurde den enterischen Gliazellen als Bestandteil des enterischen Nervensystems wenig Bedeutung geschenkt und lediglich als Packmaterial der Neuronen angesehen. In den letzten Jahren hat das Interesse an diesem Zelltyp aufgrund von Tiermodellen und *in vitro* Kultivierungen beträchtlich zugenommen. Dies ist in besonderem Maße den Arbeiten von Bush und Cornet zu verdanken, welche im Mausmodell zeigten, dass der komplette Verlust von enterischer Glia zu einer letal endenden Jejuno-Ileitis führt (Bush et al., 1998; Cornet et al., 2001). Daneben finden sich zahlreiche Studien, die eine Schlüsselfunktion der enterischen Gliazellen bei der Erhaltung der Darmwandintegrität postulieren. Jedoch ist bisher wenig über deren immunphysiologische Eigenschaften bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob enterische Gliazellen aktiv bei der Vermittlung der angeborenen, intestinalen Immunabwehr beitragen. **Methoden:** Die Untersuchungen erfolgten an Primärkulturen von enterischen Gliazellen, welche aus dem Plexus myentericus von adulten Ratten stammten (Rühl et al., 2001 a). Für die Versuchsreihen wurden Zellkulturtechniken, Isolierungsverfahren für mRNA, Gesamtproteine und fraktionierte Zellkern-Zytoplasmaproteine, molekularbiologische und proteinbiochemische Verfahren wie PCR (Standard

und *Real-time* PCR), Westernblot sowie ein ELISA-basierter Transkriptionsfaktorassay angewendet.

Ergebnisse: Eine im angeborenen Immunsystem weit verbreitete Gruppe von Rezeptoren stellen die Membran-gebundenen *Toll-like*-Rezeptoren und die zytoplasmatischen *NOD*-Rezeptoren dar, die über *PAMPs* pathogene Strukturen von eingedrungenen Mikroorganismen erkennen. Im ersten Teil der Arbeit gelang es erstmals, die Expression der *Toll-like*-Rezeptoren TLR 2, TLR 4 (dessen Korezeptor CD 14), TLR 6, TLR 7, TLR 9 sowie der *NOD*-Rezeptoren NOD 1 und NOD 2 in nativen enterischen Gliazellen auf mRNA- und Proteinebene nachzuweisen. Unter der Annahme einer Expressionsregulierung der genannten Rezeptoren durch die darmeigene Mikroflora wurde anschließend der Einfluss von TLR-spezifischen Liganden (BLP von gram-positiven Bakterien, LPS von gram-negativen Bakterien und CpG enthaltende bakterielle DNA) untersucht. Dabei konnte einerseits eine Liganden-spezifische Regulierung der *Toll-like*-Rezeptoren, wie beispielsweise die Expressionssteigerung von TLR 2 mRNA durch BLP und die Expressionshemmung von TLR 4 mRNA durch LPS, gezeigt werden. Andererseits beeinflussen TLR-spezifische Liganden neben ihren eigenen Rezeptoren auch die mRNA-Expression anderer *Toll-like*-Rezeptoren. Dies lässt darauf schließen, dass eine enge Vernetzung zwischen den einzelnen *Toll-like*-Rezeptoren existiert und es sich bei der Aktivierung der angeborenen Immunantwort um einen dynamischen Prozess handelt. Hierbei scheint nicht die Regulation einzelner *Toll-like*-Rezeptoren, sondern die Interaktion zwischen den Rezeptoren und der umgebenden Darmflora ausschlaggebend zu sein. Der zweite Teil der Arbeit befasste sich nach der Erkennung pathogener Muster mit der intrazellulären Signalweiterleitung in enterischen Gliazellen. Es wurde erstmals die Existenz verschiedener Adaptor- und Interaktionsmoleküle und des IKK / NF- κ B-Signalweges in enterischen Gliazellen für die Vermittlung der angeborenen Immunantwort nachgewiesen. Ein besonderes Augenmerk galt der für die Signaltransduktion von *NOD*-Rezeptoren bedeutsamen Effektor kinase RICK. Hierbei zeigte sich eine zeitabhängige sukzessive Stimulation von RICK nach Stimulation mit LPS auf mRNA- und Proteinebene. Für die Translokation von NF- κ B in den Zellkern bedarf es der Aktivierung des I κ B-Kinase-Komplexes (IKK) mit nachfolgender Degradierung von I κ B- α . Eine solche Degradierung von I κ B- α konnte mittels Westernblot nach Aktivierung mit LPS nachgewiesen werden und ist als Maß der NF- κ B Aktivierung in enterischen Gliazellen zu werten. Hingegen fiel bei der Analyse von I κ B- α auf Transkriptionsebene eine deutliche Überexpression nach Stimulation mit LPS auf. Dies deutet entweder auf einen negativen Feedback-Mechanismus bei ausreichender NF- κ B Freisetzung oder auf eine Stabilisierung von NF- κ B im Zytoplasma hin. So agieren enterische Gliazellen als Schaltstelle bei der Regulierung der angeborenen intestinalen Immunantwort im Darm. Neben der Aktivierung des pro-inflammatorisch wirksamen NF- κ B über die I κ B- α Degradierung wirken enterische Gliazellen über eine Stabilisierung von NF- κ B möglicherweise auch anti-inflammatorisch. Die nukleäre Translokation der NF- κ B Untereinheiten führt zur Bindung an

das DNA-Motiv und damit zur verstärkten Transkription der davon abhängigen Gene, wie Entzündungsmediatoren oder Chemokinen. Dabei erwies sich p65 nach Stimulation der enterischen Gliazellen mit LPS, IL-1 β und / oder TNF- α als die NF- κ B Untereinheit mit der stärksten DNA-Bindungsaktivität. Dies impliziert, dass der klassische Signaltransduktionsweg über I κ B- α und p65 nach Stimulation mit pro-inflammatorischen Zytokinen in enterischen Gliazellen eine entscheidende Rolle spielt. Abschließend konnte im dritten Teil der Arbeit bewiesen werden, dass die Erkennung pathogener Muster über *Toll-like*-Rezeptoren in enterischen Gliazellen letztlich zu einer immunrelevanten Transkriptionssteigerung von Entzündungsmediatoren führt. So sind aktivierte enterische Gliazellen eine potentielle Quelle für pro- und anti-inflammatorische Interleukine (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10 und IL-12) sowie Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) im myenterischen Plexus und tragen zur schnellen, Erreger-unspezifischen Immunabwehr bei. Die Zytokinsynthese in enterischen Gliazellen wird über die Aktivierung von TLR 4 mit LPS und durch Zytokine wie IL-1 β und TNF- α selbst reguliert. Daneben exprimieren aktivierte enterische Gliazellen chemotaktisch wirksame Chemokine wie Ccl-2, Cxcl-9, Cxcl-10 und können somit immunkompetente Zellen der adaptiven Immunabwehr zum Ort der Entzündung rekrutieren. **Schlussfolgerung:** Die Daten dieser Arbeit implizieren, dass es sich bei den enterischen Gliazellen um einen zusätzlichen immunregulatorischen Zelltyp im Darm handelt, der aktiv zur angeborenen Immunantwort beiträgt. Die enterischen Gliazellen sind fähig pathogene Muster über funktionell aktive *Toll-like*- und *NOD*-Rezeptoren zu erkennen, ihre Signale intrazellulär über den IKK / NF- κ B-Signalweg in den Zellkern weiterzuleiten und Entzündungsmediatoren zu exprimieren. Auf diese Weise können enterische Gliazellen weitere immunkompetente Zellen rekrutieren und stellen somit eine Schnittstelle zwischen der angeborenen und erworbenen Immunantwort dar. Neben der Vermittlung von pro-inflammatorischen Reaktionen in der Darmwand spielen enterische Gliazellen scheinbar auch eine protektive, anti-inflammatorische Rolle bei der bakteriell- und Zytokin-induzierten Entzündung. Daraus ergibt sich eine komplexe Funktionalität der enterischen Gliazellen bei der Erhaltung der immunologischen Homöostase im Darm. Zur abschließenden Beurteilung der immunphysiologischen Eigenschaften dieser Zelltypes bedarf es weiterer Studien. Diese könnten sowohl zum ätiologischen Verständnis als auch zur Entwicklung neuer Therapiestrategien bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beitragen.

8 Literaturverzeichnis

1. Abdo H, Derkinderen P, Gomes P, et al. Enteric glial cells protect neurons from oxidative stress in part via reduced glutathione. *Faseb J* 2010;24(4):1082-94.
2. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000;406(6797):782-7.
3. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124(4):783-801.
4. Alkalay I, Yaron A, Hatzubai A, Orian A, Ciechanover A, Ben-Neriah Y. Stimulation-dependent I kappa B alpha phosphorylation marks the NF-kappa B inhibitor for degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(23):10599-603.
5. Arbibe L, Mira JP, Teusch N, et al. Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nat Immunol* 2000;1(6):533-40.
6. Arnold GL, Beaves MR, Pryjdun VO, Mook WJ. Preliminary study of ciprofloxacin in active Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2002;8(1):10-5.
7. Artis D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol* 2008;8(6):411-20.
8. Ashida H, Ogawa M, Kim M, Mimuro H, Sasakawa C. Bacteria and host interactions in the gut epithelial barrier. *Nat Chem Biol* 2012;8(1):36-45.
9. Assi K, Pillai R, Gomez-Munoz A, Owen D, Salh B. The specific JNK inhibitor SP600125 targets tumour necrosis factor-alpha production and epithelial cell apoptosis in acute murine colitis. *Immunology* 2006;118(1):112-21.
10. Atreya R, Mudter J, Finotto S, et al. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med* 2000;6(5):583-8.
11. Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 1995;270(5234):286-90.
12. Baeuerle PA, Baltimore D. A 65-kappaD subunit of active NF-kappaB is required for inhibition of NF-kappaB by I kappaB. *Genes Dev* 1989;3(11):1689-98.
13. Benveniste EN, Sparacio SM, Norris JG, Grenett HE, Fuller GM. Induction and regulation of interleukin-6 gene expression in rat astrocytes. *J Neuroimmunol* 1990;30(2-3):201-12.
14. Beutler B, Hoebe K, Du X, Ulevitch RJ. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J Leukoc Biol* 2003;74(4):479-85.

15. Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2003;124(2):521-36.
16. Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004;25(6):280-8.
17. Bowman CC, Rasley A, Tranguch SL, Marriott I. Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. *Glia* 2003;43(3):281-91.
18. Bush TG, Savidge TC, Freeman TC, et al. Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell* 1998;93(2):189-201.
19. Cabarrocas J, Savidge TC, Liblau RS. Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. *Glia* 2003;41(1):81-93.
20. Campanella GS, Medoff BD, Manice LA, Colvin RA, Luster AD. Development of a novel chemokine-mediated in vivo T cell recruitment assay. *J Immunol Methods* 2008;331(1-2):127-39.
21. Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 1996;383(6599):443-6.
22. Cao S, Zhang X, Edwards JP, Mosser DM. NF-kappaB1 (p50) homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem* 2006;281(36):26041-50.
23. Carpenter S, O'Neill LA. Recent insights into the structure of Toll-like receptors and post-translational modifications of their associated signalling proteins. *Biochem J* 2009;422(1):1-10.
24. Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, Springer TA. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(9):3652-6.
25. Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, et al. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol* 2003;4(7):702-7.
26. Chin AI, Dempsey PW, Bruhn K, Miller JF, Xu Y, Cheng G. Involvement of receptor-interacting protein 2 in innate and adaptive immune responses. *Nature* 2002;416(6877):190-4.
27. Colvin RA, Campanella GS, Sun J, Luster AD. Intracellular domains of CXCR3 that mediate CXCL9, CXCL10, and CXCL11 function. *J Biol Chem* 2004;279(29):30219-27.
28. Coope HJ, Atkinson PG, Huhse B, et al. CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. *Embo J* 2002;21(20):5375-85.
29. Cornet A, Savidge TC, Cabarrocas J, et al. Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(23):13306-11.
30. Da Silva Correia J, Soldau K, Christen U, Tobias PS, Ulevitch RJ. 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):21129-35.
31. Dagvadorj J, Naiki Y, Tumurkhuu G, et al. Interleukin (IL)-10 attenuates lipopolysaccharide-induced IL-6 production via inhibition of I kappa B-zeta activity by Bcl-3. *Innate Immun* 2009;15(4):217-24.

32. de Wit H, Hoogstraten D, Halie RM, Vellenga E. Interferon-gamma modulates the lipopolysaccharide-induced expression of AP-1 and NF-kappa B at the mRNA and protein level in human monocytes. *Exp Hematol* 1996;24(2):228-35.
33. de Wit H, Dokter WH, Koopmans SB, et al. Regulation of p100 (NFkB2) expression in human monocytes in response to inflammatory mediators and lymphokines. *Leukemia* 1998;12(3):363-70.
34. Debnath M, Prasad GBKS, Bisen PS. *Molecular Diagnostics: Promises and Possibilities*. Springer. 2010
35. Dieffenbach CW, Lowe TM, Dveksler GS. General concepts for PCR primer design. *PCR Methods Appl* 1993;3(3):S30-7.
36. Dixit V, Mak TW. NF-kappaB signaling. Many roads lead to madrid. *Cell* 2002;111(5):615-9.
37. Dong Y, Benveniste EN. Immune function of astrocytes. *Glia* 2001;36(2):180-90.
38. Dunne A, O'Neill L. New insights into the post-translational modification of Toll-like receptor signaling molecules. *J Endotoxin Res* 2005;11(6):325-32.
39. Enghard P, Humrich JY, Rudolph B, et al. CXCR3+CD4+ T cells are enriched in inflamed kidneys and urine and provide a new biomarker for acute nephritis flares in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum* 2009;60(1):199-206.
40. Erdman S, Fox JG, Dangler CA, Feldman D, Horwitz BH. Typhlocolitis in NF-kappa B-deficient mice. *J Immunol* 2001;166(3):1443-7.
41. Farber JM. HuMig: a new human member of the chemokine family of cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;192(1):223-30.
42. Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996;272(5258):50-3.
43. Fischer C, Page S, Weber M, Eisele T, Neumeier D, Brand K. Differential effects of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor on monocytic I kappa B kinase signalsome activation and I kappa B proteolysis. *J Biol Chem* 1999;274(35):24625-32.
44. Flamant M, Aubert P, Rolli-Derkinderen M, et al. Enteric glia protect against *Shigella flexneri* invasion in intestinal epithelial cells: a role for S-nitrosoglutathione. *Gut* 2011;60(4):473-84.
45. Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, et al. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 2001;413(6851):78-83.
46. French N, Pettersson S. Microbe-host interactions in the alimentary tract: the gateway to understanding inflammatory bowel disease. *Gut* 2000;47(2):162-3.
47. Ganef C, Remouchamps C, Boutaffala L, et al. Induction of the alternative NF-kappaB pathway by lymphotoxin alpha (LTalpha) relies on internalization of LTbeta receptor. *Mol Cell Biol* 2011;31(21):4319-34.
48. Gasperini S, Marchi M, Calzetti F, et al. Gene expression and production of the monokine induced by IFN-gamma (MIG), IFN-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC), and IFN-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokines by human neutrophils. *J Immunol* 1999;162(8):4928-37.

49. Geboes K, Rutgeerts P, Ectors N, et al. Major histocompatibility class II expression on the small intestinal nervous system in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1992;103(2):439-47.
50. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998;16:225-60.
51. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 2003 a;278(11):8869-72.
52. Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, et al. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 2003 b;300(5625):1584-7.
53. Goto Y, Kiyono H. Epithelial barrier: an interface for the cross-communication between gut flora and immune system. *Immunol Rev* 2012;245(1):147-63.
54. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 2001;13(2):85-94.
55. Gutierrez O, Pipaon C, Inohara N, et al. Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem* 2002;277(44):41701-5.
56. Gutnick MJ, Connors BW, Ransom BR. Dye-coupling between glial cells in the guinea pig neocortical slice. *Brain Res* 1981;213(2):486-92.
57. Hall HT, Wilhelm MT, Saibil SD, Mak TW, Flavell RA, Ohashi PS. RIP2 contributes to Nod signaling but is not essential for T cell proliferation, T helper differentiation or TLR responses. *Eur J Immunol* 2008;38(1):64-72.
58. Hammond EA, Smart D, Toulmond S, Suman-Chauhan N, Hughes J, Hall MD. The interleukin-1 type I receptor is expressed in human hypothalamus. *Brain* 1999;122 (Pt 9):1697-707.
59. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, et al. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 2001;357(9272):1925-8.
60. Haskill S, Beg AA, Tompkins SM, et al. Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes I kappa B-like activity. *Cell* 1991;65(7):1281-9.
61. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996;6(10):986-94.
62. Hermiston ML, Gordon JI. Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. *Science* 1995;270(5239):1203-7.
63. Herzig DS, Driver BR, Fang G, Toliver-Kinsky TE, Shute EN, Sherwood ER. Regulation of lymphocyte trafficking by CXC chemokine receptor 3 during septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185(3):291-300.
64. Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, Nadeau WJ, McCormick BA, Podolsky DK. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2003;124(4):993-1000.
65. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 1999;284(5418):1313-8.

66. Hollenbach E, Vieth M, Roessner A, Neumann M, Malfertheiner P, Naumann M. Inhibition of RICK/nuclear factor-kappaB and p38 signaling attenuates the inflammatory response in a murine model of Crohn disease. *J Biol Chem* 2005;280(15):14981-8.
67. Hollenbach E, Montero M, Zoeller M, Schnabel A, Lehmann J, Ryz N, Neumann M, Vallance BA, Ruehl A. A role for enteric glial cells in intestinal defense via innate and adaptive immune signaling. Eingereicht.
68. Hommes D, van den Blink B, Plasse T, et al. Inhibition of stress-activated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002;122(1):7-14.
69. Hosomi S, Oshitani N, Kamata N, et al. Increased numbers of immature plasma cells in peripheral blood specifically overexpress chemokine receptor CXCR3 and CXCR4 in patients with ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 2011;163(2):215-24.
70. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411(6837):599-603.
71. Hyams JS, Fitzgerald JE, Treem WR, Wyzga N, Kreutzer DL. Relationship of functional and antigenic interleukin 6 to disease activity in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1993;104(5):1285-92.
72. Hyun JG, Lee G, Brown JB, et al. Anti-interferon-inducible chemokine, CXCL10, reduces colitis by impairing T helper-1 induction and recruitment in mice. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11(9):799-805.
73. Inohara N, Ogura Y, Chen FF, Muto A, Nunez G. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem* 2001;276(4):2551-4.
74. Inohara N, Ogura Y, Nunez G. Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. *Curr Opin Microbiol* 2002;5(1):76-80.
75. Ivison SM, Khan MA, Graham NR, et al. A phosphorylation site in the Toll-like receptor 5 TIR domain is required for inflammatory signalling in response to flagellin. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;352(4):936-41.
76. Jessen KR, Mirsky R. Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature* 1980;286(5774):736-7.
77. Kagan JC, Medzhitov R. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell* 2006;125(5):943-55.
78. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 2000;18:621-63.
79. Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 2002;3(3):221-7.
80. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010;11(5):373-84.
81. Kenny EF, O'Neill LA. Signalling adaptors used by Toll-like receptors: an update. *Cytokine* 2008;43(3):342-9.
82. Khan I, Collins SM. Expression of cytokines in the longitudinal muscle myenteric plexus of the inflamed intestine of rat. *Gastroenterology* 1994;107(3):691-700.

83. Khan KJ, Ullman TA, Ford AC, et al. Antibiotic therapy in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2011;106(4):661-73.
84. Kobayashi K, Inohara N, Hernandez LD, et al. RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature* 2002;416(6877):194-9.
85. Koretz K, Momburg F, Otto HF, Moller P. Sequential induction of MHC antigens on autochthonous cells of ileum affected by Crohn's disease. *Am J Pathol* 1987;129(3):493-502.
86. Kusugami K, Fukatsu A, Tanimoto M, et al. Elevation of interleukin-6 in inflammatory bowel disease is macrophage- and epithelial cell-dependent. *Dig Dis Sci* 1995;40(5):949-59.
87. Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, et al. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 1994;369(6476):156-60.
88. Lakatos PL, Kiss LS, Palatka K, et al. Serum lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 are markers of disease activity in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17(3):767-77.
89. Le Douarin NM, Teillet MA. The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *J Embryol Exp Morphol* 1973;30(1):31-48.
90. Lernbecher T, Muller U, Wirth T. Distinct NF-kappa B/Rel transcription factors are responsible for tissue-specific and inducible gene activation. *Nature* 1993;365(6448):767-70.
91. Liao F, Rabin RL, Yannelli JR, Koniaris LG, Vanguri P, Farber JM. Human Mig chemokine: biochemical and functional characterization. *J Exp Med* 1995;182(5):1301-14.
92. Linß W, Fanghaenel J. Histologie. Zytologie, Allgemeine Histologie, Mikroskopische Anatomie. 1. Auflage, De Gruyter Lehrbuch, 1998.
93. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25(4):402-8.
94. Lupp C, Robertson ML, Wickham ME, et al. Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell Host Microbe* 2007;2(3):204.
95. Maniatis T. A ubiquitin ligase complex essential for the NF-kappaB, Wnt/Wingless, and Hedgehog signaling pathways. *Genes Dev* 1999;13(5):505-10.
96. Maudlej N, Hanani M. Modulation of dye coupling among glial cells in the myenteric and submucosal plexuses of the guinea pig. *Brain Res* 1992;578(1-2):94-8.
97. May MJ, Ghosh S. Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview. *Semin Cancer Biol* 1997;8(2):63-73.
98. McCarthy JV, Ni J, Dixit VM. RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase. *J Biol Chem* 1998;273(27):16968-75.
99. McGuckin MA, Linden SK, Sutton P, Florin TH. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat Rev Microbiol* 2011;9(4):265-78.

100. Medvedev AE, Kopydlowski KM, Vogel SN. Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression. *J Immunol* 2000;164(11):5564-74.
101. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 1997;9(1):4-9.
102. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007;449(7164):819-26.
103. Mitsuyama K, Suzuki A, Tomiyasu N, et al. Pro-inflammatory signaling by Jun-N-terminal kinase in inflammatory bowel disease. *Int J Mol Med* 2006;17(3):449-55.
104. Mohan K, Issekutz TB. Blockade of chemokine receptor CXCR3 inhibits T cell recruitment to inflamed joints and decreases the severity of adjuvant arthritis. *J Immunol* 2007;179(12):8463-9.
105. Müller JM, Ziegler-Heitbrock HW, Baeuerle PA. Nuclear factor kappa B, a mediator of lipopolysaccharide effects. *Immunobiology* 1993;187(3-5):233-56.
106. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;155:335-50.
107. Negishi H, Fujita Y, Yanai H, et al. Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(41):15136-41.
108. Nenci A, Becker C, Wullaert A, et al. Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature* 2007;446(7135):557-61.
109. Neunlist M, Aubert P, Bonnaud S, et al. Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;292(1):G231-41.
110. Nhu QM, Cuesta N, Vogel SN. Transcriptional regulation of lipopolysaccharide (LPS)-induced Toll-like receptor (TLR) expression in murine macrophages: role of interferon regulatory factors 1 (IRF-1) and 2 (IRF-2). *J Endotoxin Res* 2006;12(5):285-95.
111. Norris JG, Tang LP, Sparacio SM, Benveniste EN. Signal transduction pathways mediating astrocyte IL-6 induction by IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 1994;152(2):841-50.
112. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001 a;411(6837):603-6.
113. Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 2001 b;276(7):4812-8.
114. Okusawa T, Fujita M, Nakamura J, et al. Relationship between structures and biological activities of mycoplasmal diacylated lipopeptides and their recognition by toll-like receptors 2 and 6. *Infect Immun* 2004;72(3):1657-65.
115. O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2007;7(5):353-64.

116. Palazzo M, Gariboldi S, Zanobbio L, et al. Cross-talk among Toll-like receptors and their ligands. *Int Immunol* 2008;20(5):709-18.
117. Park JH, Kim YG, McDonald C, et al. RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs. *J Immunol* 2007;178(4):2380-6.
118. Pauleau AL, Murray PJ. Role of nod2 in the response of macrophages to toll-like receptor agonists. *Mol Cell Biol* 2003;23(21):7531-9.
119. Perrot-Applanat M, Vacher S, Toullec A, et al. Similar NF-kappaB gene signatures in TNF-alpha treated human endothelial cells and breast tumor biopsies. *PLoS One* 2011;6(7):e21589.
120. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002;347(6):417-29.
121. Prantera C, Lochs H, Grimaldi M, Danese S, Scribano ML, Gionchetti P. Rifaximin-extended intestinal release induces remission in patients with moderately active Crohn's disease. *Gastroenterology* 2012;142(3):473-481 e4.
122. Reinecke K, Eminel S, Dierck F, et al. The JNK inhibitor XG-102 protects against TNBS-induced colitis. *PLoS One* 2012;7(3):e30985.
123. Rescigno M, Lopatin U, Chieppa M. Interactions among dendritic cells, macrophages, and epithelial cells in the gut: implications for immune tolerance. *Curr Opin Immunol* 2008;20(6):669-75.
124. Rosenstiel P, Fantini M, Brautigam K, et al. TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2003;124(4):1001-9.
125. Rosenstiel P, Schreiber S. NOD-like receptors--pivotal guardians of the immunological integrity of barrier organs. *Adv Exp Med Biol* 2009;653:35-47.
126. Rühl A, Trotter J, Stremmel W. Isolation of enteric glia and establishment of transformed enteroglia cell lines from the myenteric plexus of adult rat. *Neurogastroenterol Motil* 2001 a;13(1):95-106.
127. Rühl A, Franzke S, Collins SM, Stremmel W. Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001 b;280(6):G1163-71.
128. Rühl A, Nasser Y, Sharkey KA. Enteric glia. *Neurogastroenterol Motil* 2004;16 Suppl 1:44-9.
129. Rühl A. Glial cells in the gut. *Neurogastroenterol Motil* 2005;17(6):777-90.
130. Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* 1993;75(2):253-61.
131. Sarkar SN, Smith HL, Rowe TM, Sen GC. Double-stranded RNA signaling by Toll-like receptor 3 requires specific tyrosine residues in its cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 2003;278(7):4393-6.
132. Savidge TC, Newman P, Pothoulakis C, et al. Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology* 2007;132(4):1344-58.
133. Schemann M, Neunlist M. The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 2004;16 Suppl 1:55-9.

134. Scherer DC, Brockman JA, Chen Z, Maniatis T, Ballard DW. Signal-induced degradation of I kappa B alpha requires site-specific ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(24):11259-63.
135. Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut* 1998;42(4):477-84.
136. Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J, et al. Tumour necrosis factor alpha and interleukin 1beta in relapse of Crohn's disease. *Lancet* 1999;353(9151):459-61.
137. Schröpf S, Kappler R, Brand S, et al. Strong overexpression of CXCR3 axis components in childhood inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16(11):1882-90.
138. Senftleben U, Cao Y, Xiao G, et al. Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 2001;293(5534):1495-9.
139. Singh UP, Singh S, Singh R, Cong Y, Taub DD, Lillard JW, Jr. CXCL10-producing mucosal CD4+ T cells, NK cells, and NKT cells are associated with chronic colitis in IL-10(-/-) mice, which can be abrogated by anti-CXCL10 antibody inhibition. *J Interferon Cytokine Res* 2008;28(1):31-43.
140. Stecher B, Hardt WD. Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. *Curr Opin Microbiol* 2011;14(1):82-91.
141. Steinkamp M, Geerling I, Seufferlein T, et al. Glial-derived neurotrophic factor regulates apoptosis in colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 2003;124(7):1748-57.
142. Steinkamp M, Gundel H, Schulte N, et al. GDNF protects enteric glia from apoptosis: evidence for an autocrine loop. *BMC Gastroenterol* 2012 a;12:6.
143. Steinkamp M, Schulte N, Spaniol U, et al. Brain derived neurotrophic factor inhibits apoptosis in enteric glia during gut inflammation. *Med Sci Monit* 2012 b;18(4):BR117-22.
144. Sterka D, Jr., Rati DM, Marriott I. Functional expression of NOD2, a novel pattern recognition receptor for bacterial motifs, in primary murine astrocytes. *Glia* 2006;53(3):322-30.
145. Straub, R. *Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen. Band 2, Spezielle Pathophysiologie, Psycho-Neuro-Endokrino-Immunologie.* 1. Auflage, Vandenhoeck und Ruprecht Verlag, 2007
146. Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol* 2006;6(1):9-20.
147. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122(1):44-54.
148. Takeda K, Akira S. Microbial recognition by Toll-like receptors. *J Dermatol Sci* 2004;34(2):73-82.
149. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005;17(1):1-14.
150. Takeuchi O, Hoshino K, Akira S. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol* 2000;165(10):5392-6.
151. Takeuchi O, Akira S. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int Immunopharmacol* 2001;1(4):625-35.

152. Tomczak MF, Erdman SE, Poutahidis T, et al. NF-kappa B is required within the innate immune system to inhibit microflora-induced colitis and expression of IL-12 p40. *J Immunol* 2003;171(3):1484-92.
153. Van Wagoner NJ, Benveniste EN. Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes. *J Neuroimmunol* 1999;100(1-2):124-39.
154. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3(7):RESEARCH0034.
155. von Boyen GB, Steinkamp M, Geerling I, et al. Proinflammatory cytokines induce neurotrophic factor expression in enteric glia: a key to the regulation of epithelial apoptosis in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12(5):346-54.
156. von Boyen G, Steinkamp M. The role of enteric glia in gut inflammation. *Neuron Glia Biol* 2010;6(4):231-6.
157. von Boyen GB, Schulte N, Pfluger C, Spaniol U, Hartmann C, Steinkamp M. Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. *BMC Gastroenterol* 2011;11:3.
158. Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 1997;7(6):837-47.
159. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997;22(1):130-1, 134-8.
160. Xu Y, Rojkind M, Czaja MJ. Regulation of monocyte chemoattractant protein 1 by cytokines and oxygen free radicals in rat hepatic fat-storing cells. *Gastroenterology* 1996;110(6):1870-7.
161. Yamamoto M, Yoshizaki K, Kishimoto T, Ito H. IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis. *J Immunol.* 2000;164(9):4878-82.
162. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003a;301(5633):640-3.
163. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 2003b;4(11):1144-50.
164. Yang HT, Wang Y, Zhao X, et al. NF-kappaB1 inhibits TLR-induced IFN-beta production in macrophages through TPL-2-dependent ERK activation. *J Immunol* 2011;186(4):1989-96.
165. Yaron A, Hatzubai A, Davis M, et al. Identification of the receptor component of the I kappa B alpha-ubiquitin ligase. *Nature* 1998;396(6711):590-4.
166. Yellin M, Paliienko I, Balanescu A, et al. A phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled study evaluating the efficacy and safety of MDX-1100, a fully human anti-CXCL10 monoclonal antibody, in combination with methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2012;64(6):1730-9.
167. Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature* 1998;396(6706):77-80.
168. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000;12(2):121-7.

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Dresden, 12. Februar 2014

Anja Schnabel

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name **ANJA SCHNABEL**
Geburtsdatum 05.05.1984 in Meissen

SCHUL- UND HOCHSCHULAUSBILDUNG

08/1994 – 06/2002 **GYMNASIUM FRANZISKANEUM MEISSEN**
Allgemeine Hochschulreife (Note 1.0)

10/2002 – 04/2010 **HUMANMEDIZIN AN DER UNIVERSITÄT LEIPZIG**
08/2004 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2.6)
04/2010 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2.0)

07/2005 – 08/2006 **HUMANMEDIZIN AN DER UNIVERSIDAD DE GRANADA (SPANIEN)**

PRAKTISCHES JAHR

08/2008 – 11/2008 **DIAKONISSENKRANKENHAUS LEIPZIG,**
Viszeral- und Unfallchirurgie

12/2008 – 01/2009 **UNIVERSITÄT LEIPZIG, Herzzentrum Leipzig**
Kardiologische Intensivmedizin

02/2009 – 03/2009 **UNIVERSITY OF NEWCASTLE (GROSSBRITANNIEN),** University Hospital
of North Tees, Emergency Assessment Unit

04/2009 – 07/2009 **UNIVERSITÄT ZÜRICH (SCHWEIZ),** Kantonsspital Winterthur
Kinder- und Jugendmedizin, Neonatologie

07/2009 – 08/2009 **UNIVERSITY OF KANSAS CITY (USA),** Medical Center
Kinder- und Erwachsenenrheumatologie

WISSENSCHAFTLICHER WERDEGANG

seit 01/2008 **EXPERIMENTELLE PROMOTIONSARBEIT**
Max-Bürger-Forschungszentrum sowie Klinik und Poliklinik für
Gastroenterologie und Rheumatologie, Universität Leipzig
Leitung: PD Dr. med. habil. Matthias Pierer

05/2008 – 09/2008 **WISSENSCHAFTLICHE HILFSKRAFT**
Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie, Leipzig
Leitung: Dr. med. Jörg Lehmann

BERUFLICHE WERDEGANG

- seit 06/2010 **ÄRZTIN IN WEITERBILDUNG FÜR KINDER- UND JUGENDMEDIZIN**
Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden
- seit 03/2011 **BETREUUNG DER KINDERRHEUMATOLOGISCHEN AMBULANZ**
Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden
- 02/2013 – 11/2013 **PRINCIPLE AND PRACTICE OF CLINICAL RESEARCH PROGRAMM**
Harvard Medical School, Boston (USA)
Auszeichnung: Clinical Research Scholar Award

PUBLIKATIONEN

Schnabel A, Hollenbach E, Lehmann J, Ruehl A, Pierer M. Functional analysis of receptors and signaling pathways of the innate immunity in enteric glial cells. In Preparation.

Schnabel A, Glutig K, Vogelberg C. Bridging bronchus - a rare cause of recurrent wheezy bronchitis. BMC Pediatr 2012;12(1):110.

Hofmann SR, Schwarz T, Moller JC, Morbach H, **Schnabel A**, Rosen-Wolff A, Girschick HJ, Hedrich CM. Chronic non-bacterial osteomyelitis is associated with impaired Sp1 signaling, reduced IL10 promoter phosphorylation, and reduced myeloid IL-10 expression. Clin Immunol 2011;141(3):317-27.

POSTERPRÄSENTATIONEN UND VORTRÄGE

Schnabel A, Bruck N, Fiebig B, Kamin G, Gahr M. Etanercept-Therapie in der Schwangerschaft. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, München, 2011.

Schnabel A, Bruck N, Hahn G, Berner R. Pyomyositis mit begleitender Synchrondritis ischiopubica als seltene Ursache für Hüftschmerzen im Kindesalter. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, Bochum, 2012.

Vortrag „Juvenile Dermatomyositis“, Pädiatrischer Fortbildungsabend
Universitätsklinikum Dresden, April 2013

Danksagung

Ich danke Herrn Dr. med. Eike Hollenbach für das Thema dieser Arbeit, die Bereitstellung der Arbeitsmaterialien und die konstruktiven Vorschläge, mit denen er mich bis zum Abschluss der experimentellen Arbeit unterstützte. Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. habil. Matthias Pierer und Frau PD Dr. med. habil. Anne Rühl für die Geduld, Hilfestellungen und die ständige Erreichbarkeit. Ohne sie wäre die Fertigstellung dieser Promotionsarbeit nicht möglich gewesen.

Ganz herzlich möchte ich auch Herrn Prof. Dr. med. Lothar Engelmann danken, der es mir ermöglichte, meine Promotion an der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig abzuschließen.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. med. Ulf Wagner für die Nutzung des Laboratoriums der Rheumatologie an der Universität Leipzig sowie den Mitarbeiterinnen Frau Cornelia Arnold, die mich im Bereich der Zellkultur und der Molekularbiologie unterstützte, Frau Dagmar Thamm und Frau Eva Kendzia für die Erlernung der Westernblot-Technik und die aufheiternden Gespräche. Die offene und freundliche Atmosphäre in ihrem Labor werde ich nie vergessen. Desweiteren gilt mein Dank Frau Büttner sowie Frau Wolff aus Magdeburg für die hilfreichen Tipps bei unlösbar scheinenden Problemen.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Michael Stummvoll, PD Dr. med. habil. Daniel Teupser sowie Wolfram Wilfert für die Bereitstellung der *Real-time* PCR Geräte bedanken.

Als letztes gilt mein großer Dank meiner Familie, die mir in der ganzen Zeit ein sorgenfreies Studium ermöglichten, Kraft für die Arbeit und für die Geburt unserer Tochter Selma Charlotte gaben und mich in jeder Lebenslage unterstützen.