

# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

II. Medizinische Klinik und Poliklinik  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid)

## Untersuchungen zur zelltypspezifischen Funktion der IκB- Kinasen in verschiedenen murinen Modellen für chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Tim Nebelsiek

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen  
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. F. R. Greten

2. Univ.-Prof. Dr. M. Ebert

3. Univ.-Prof. Dr. B. Holzmann

Die Dissertation wurde am 06.10.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät am 27.1.2010 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen - Meilensteine	6
1.2 NF- $\kappa$ B - ein Schlüsselmolekül bei der Regulation von Immun- und Entzündungsreaktionen	10
1.3 Wege der NF- $\kappa$ B-Aktivierung	12
1.4 Mausmodelle für chronisch entzündliche Darmerkrankungen	15
1.5 Inhibition der klassischen NF- $\kappa$ B-Aktivierung - eine neue Strategie bei der Behandlung von immunologischen und rheumatologischen Krankheitsbilder?	18
<b>2 ZIELSETZUNG</b>	<b>20</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Mausmodelle</b>	<b>21</b>
3.1.2 Chemische Induktion einer akuten Kolitis	21
<b>3.1.3 Zellkultur</b>	<b>22</b>
3.1.4 Pharmakologische IKK $\beta$ Inhibition	22
<b>3.2 Genotypisierung</b>	<b>22</b>
3.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	22
3.2.3 Oligonukleotidsequenzen	23
<b>3.3 Histologie</b>	<b>24</b>
3.3.1 Hämatoxylin/Eosin-Färbung	24
3.3.2 Histologische Scores zur Auswertung des Gewebeschadens	25
<b>3.5 Protein und DNA Analyse</b>	<b>26</b>
3.5.1 Isolierung von Gesamtgewebe	26
3.5.2 Isolierung von intestinalen Epithelzellen	26
<b>3.6 RNA-Isolierung und Analyse</b>	<b>27</b>
3.6.1 Realtime Reverse Transkriptase (RT)-PCR	27
3.6.2 cDNA- Synthese	28
3.6.3 Real-Time RT-PCR	28
3.6.4 Delta CT Methode	29
3.6.5 Oligonukleotidsequenzen	30
3.6.7 Microarray Analyse	34

<b>3.7 Proteinbiochemie</b>	<b>34</b>
3.7.1 Gewinnung von Proteinextrakten aus Epithel bzw. SW480 Zellen	34
3.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	35
3.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Immunoblot	35
3.7.4 Immunoblotanalyse	37
3.7.6 Verwendete Antikörper	38
3.7.7 Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA)	39
3.7.8 Radioaktive Markierung der Oligonukleotidsonden	39
3.7.9 EMSA Oligo Sequenzen	39
<b>4 ERGEBNISSE</b>	<b>41</b>
<b>4.1 IKK<math>\beta</math> fördert die epitheliale Regeneration im Rahmen von akut-ulzerierenden Entzündungsprozessen im Gastrointestinaltrakt der Maus</b>	<b>41</b>
<b>4.2 Pharmakologische IKK<math>\beta</math>-Inhibition in der Initiation der Heilungsphase resultiert in einer verminderten epithelialen Expression von NF-<math>\kappa</math>B und STAT3 Zielgenen</b>	<b>49</b>
<b>4.3 Inhibition der IKK<math>\beta</math>-abhängigen NF-<math>\kappa</math>B-Aktivierung verhindert eine suffiziente Rekrutierung von inflammatorischen Zellen und vermindert die Expression der zytoprotektiven Interleukine 11 und 22</b>	<b>54</b>
<b>4.4 Epithelspezifische Deletion von <i>Ikk<math>\beta</math></i> nach Initiation der Heilungsphase hat keinen Einfluss auf den Heilungsprozess</b>	<b>60</b>
<b>4.5 Inhibition der IKK<math>\beta</math>-abhängigen NF-<math>\kappa</math>B-Aktivierung in intestinalen Epithelzellen hat keinen Einfluss auf den Verlauf einer T-Zell-assoziierten chronischen Kolitis</b>	<b>63</b>
<b>4.6 Verlust von IKK<math>\beta</math> in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten mildert den Verlauf und verlängert das Überleben in T-Zell-assoziierten Entzündungsprozessen</b>	<b>66</b>
<b>5 DISKUSSION</b>	<b>69</b>
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>80</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>81</b>

# Abkürzungsverzeichnis

CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CED	Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSS	Dextran Sodium Sulfat
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
g	Gramm
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
HSP70	Heat Shock Protein 70
IEC	Intestinale Epithelzellen
IKK	I $\kappa$ B Kinase
I $\kappa$ B	Inhibitor of kappa B
IL	Interleukin
IFN	Interferon
IRF	Interferon regulierender Faktor
KO	Knock Out
LPS	Lipopolysaccharid
$\mu$ g	Mikrogramm
NEMO	NF- $\kappa$ B Essential Modulator
NF- $\kappa$ B	Nukleärer Tanskriptionsfaktor kappa B
PCR	Polymerase Chain Reaction
PNK	Polynukleotid Kinase
RT-Real-Time PCR	Reverse Transkriptase Realtime Polymerase Chain Reaction
RHD	Rel homology domain
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3

STAT3	Signal Transducer and Activator of Transkription 3
TH-Zellen	T-Helfer-Zellen
T-reg. Zellen	regulatorische T-Zellen
TNBS	Trinitrobenzolsulfonsäure
TNF	Tumornekrosefaktor
WT	Wildtyp

# 1 Einleitung

Entzündungs- und Immunreaktionen stellen eine elementare physiologische Reaktion auf bakterielle und virale Infektionen dar. Gesteuert werden diese durch das Immunsystem. Durch das Zusammenspiel verschiedener Zelltypen und inflammatorischer Zytokine sind Lebewesen in der Lage die Integrität und damit die Funktionen des Organismus aufrecht zu erhalten. Inadäquate Aktivierung des Immunsystems stellt einen wichtigen Schritt in der Pathogenese verschiedenster immunologischer und rheumatologischer Krankheitsbilder dar. Diese sind durch chronisch-destruierende Entzündungsprozesse ohne den Nachweis einer konkreten Infektion durch Viren oder Bakterien charakterisiert. Beispiele sind zahlreich und finden sich in nahezu jedem Organsystem. Zu den wichtigsten gehören die Rheumatoide Arthritis, Spondyloarthritiden, Vaskulitiden, Multiple Sklerose, Kollagenosen, Vitiligo und chronisch entzündliche Darmerkrankungen.

## 1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen - Meilensteine

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) sind gekennzeichnet durch schwere persistierende Entzündungen im Bereich des Gastrointestinaltraktes in Abwesenheit von derzeitig bekannten mikrobiellen Pathogenen. Unter dem Begriff werden die beiden Krankheitsbilder Morbus Crohn und Colitis ulcerosa zusammengefasst. Die Inzidenz der beiden Erkrankungen ist steigend und liegt bei jährlich etwa 4 Fällen pro 100000 Einwohner mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr. Frauen sind häufiger betroffen als Männer.

Die Colitis ulcerosa ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung der oberflächlichen Kolonmukosa, die sich vom Rektum kontinuierlich auf proximale Dickdarmabschnitte ausbreitet. Der Entzündungsprozess, der durch die von T-Lymphozyten und Makrophagen freigesetzten Zytokine aufrechterhalten wird, ist dabei vorwiegend auf die Mukosa begrenzt und breitet sich nur im akuten Schub der Erkrankung auf submukosale Bereiche aus. Tiefere Wandschichten wie die Muskularis propria sind nicht betroffen. Histologisch zeigt sich in aktiven Krankheitsverläufen eine deutliche Hyperämie, mit massiver lymphozytäre Infiltration des Stromas und eine ungleichmäßige Kryptenstruktur. Der Nachweis von Kryptenabszessen ist ebenfalls typisch für Colitis ulcerosa und ist ein differentialdiagnostisches Kriterium zum Morbus Crohn.

Der Morbus Crohn kann sich hingegen im gesamten Verdauungstrakt vom Mund bis zum After manifestieren. Die Entzündung beschränkt sich dabei auch nicht auf die oberflächlichen Wandabschnitte, sondern breitet sich transmural auf alle Wandschichten aus. Charakteristisch ist ein diskontinuierlich-segmentaler Befall mit histologisch nachweisbaren Epitheloidzellgranulomen. Hauptmanifestationsort ist das terminale Ileum. Während bei der Colitis ulcerosa das Zytokinmuster für eine durch TH2 Zellen mediierte Erkrankung spricht, dominiert beim Morbus Crohn eine TH1 gewichte Entzündungsreaktion.

Beide Erkrankungen weisen einen schubweise rezidivierenden Verlauf auf, in dem sich Perioden der Exazerbation mit Perioden kompletter klinischer Beschwerdefreiheit abwechseln. Das klinische Bild ist von Patient zu Patient verschieden. Leitsymptome sind kolikartige abdominelle Schmerzen mit zum Teil blutiger Diarrhö. Begleitet wird die Symptomatik von Fieber, Gewichtsverlust und extraintestinalen Symptomen, wie z.B. Hautveränderungen und Gelenkbeschwerden. Außerdem sind beide Krankheitsbilder mit einem vermehrten Auftreten von anderen Autoimmunerkrankungen, wie z.B. ankylosierende Spondylitis, Uveitis oder primär sklerosierenden Cholangitis assoziiert. Zu den wichtigsten Komplikationen zählen bei der Colitis ulcerosa das toxische Megakolon und Kolitis-assoziierte Karzinome. Beim Morbus Crohn stehen Stenose, Strikturen, Fisteln und Abszesse im Vordergrund (Baumgart and Sandborn, 2007).

Die exakte Ätiologie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist weiterhin unbekannt. Sowohl der Morbus Crohn als auch die Colitis ulcerosa sind durch das Vorhandensein verschiedener genetischer Abnormalitäten charakterisiert. So weisen 50% der Morbus Crohn Patienten Mutationen im NOD2 Gen auf Chromosom 16 auf. Heterozygote Patienten haben ein 2,5-fach erhöhtes Risiko an Morbus Crohn zu erkranken, bei Homozygotie ist das Risiko bis 100-fach erhöht. Die Mutation ist mit einer verminderten Expression von Defensinen in intestinalen Epithelzellen verbunden und führt zu einer erhöhten Anfälligkeit der Schleimhaut gegenüber bakteriellen Infektionen. Des Weiteren deutet vieles darauf hin, dass bei einem Teil der Morbus Crohn Patienten die Barriere zwischen Darmlumen und Organismus defekt ist. Bei der Analyse der epithelialen Zellkontakte zeigt sich, dass bei Patienten, die unter CED leiden, eine erhöhte Permeabilität der Darmschleimhaut vorliegt, die sowohl auf eine verminderte Anzahl als auch auf eine gestörte Funktion assoziierter Proteine zurückgeführt werden konnte.

Neben genetischen Abnormalitäten und Umweltfaktoren stellt die pathologische Aktivierung des Immunsystems einen zentralen Aspekt bei der Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen dar. Unter physiologischen Bedingungen kontrolliert das mukosale Immunsystem das Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Mediatoren, so dass eine effektive Abwehr gegen luminale Pathogene gewährleistet ist, ohne dass es zu einer überschießenden Immunreaktion gegenüber harmlosen Antigenen kommt. Sowohl bei Morbus Crohn als auch bei der Colitis ulcerosa ist genau dieses Gleichgewicht gestört. Unbekannte Stimuli provozieren hier eine aggressive T-Zell Immunantwort, die mit einer exzessiven Freisetzung von proinflammatorischen Entzündungsmediatoren assoziiert ist und zur Ausbildung von lokalen Erosionen, Nekrosen und Ulzerationen. Als potentielle Auslöser dieser inadäquaten Immunantwort werden neben physiologischen und pathogenen Darmbakterien auch rein autoimmunologische Phänomene diskutiert (Sartor, 2006; Xavier and Podolsky, 2007).

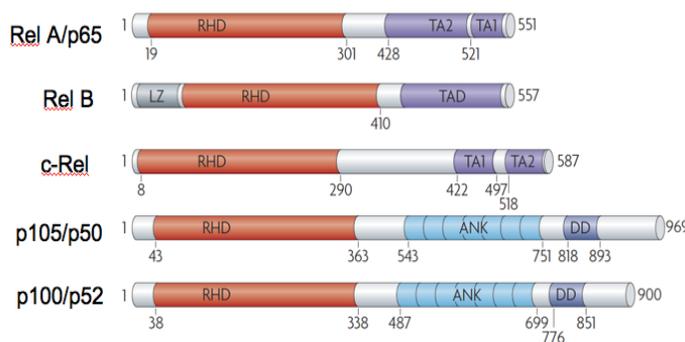
Aufgrund des mangelhaften Verständnisses der pathophysiologischen Hintergründe der Erkrankung, beschränken sich die heutigen Therapieansätze auf eine eher unspezifische Suppression des Immunsystems. Zur Anwendung kommen Immunmodulatoren wie z.B. Sulfasalazin, Glukokortikoide oder Azathioprin, hochpotente Immunsuppressiva wie Cyclosporin A und spezifische Antikörper gegen TNF- $\alpha$ . Die Nebenwirkung der immunsupprimierenden Therapie sind allerdings zahlreich und der therapeutische Erfolg ist häufig nicht zufriedenstellend, so dass bei schweren Verlaufsformen, bei denen Komplikationen, wie z.B. Abszesse, Strikturen oder Fisteln das klinische Bild bestimmen, eine chirurgische Intervention mit Resektion der betroffenen Darmabschnitte unumgänglich wird.

Ziel der heutigen Therapiestrategie ist es deshalb, die Erkrankung im Stadium der Remission zu halten und Exazerbationen durch frühestmögliche medikamentöse Intervention zu vermeiden bzw. schnell entgegenzuwirken (Stange and Travis, 2008; Travis et al., 2006).

Zwar besitzen Patienten die unter CED leiden bei guter ärztlicher Betreuung im Vergleich zur Normalbevölkerung keine signifikant erniedrigte Lebenserwartung, trotzdem handelt es sich um zwei hochgradig chronische Krankheitsbilder mit teils sehr schweren Verläufen, die mit einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität und zahlreichen therapiebedingten Komplikationen einhergehen (Itzkowitz and Present, 2005). Fatale Verläufe ergeben sich aus den assoziierten Komplikationen, wie z.B. Perforationen der Darmwand in akuten Entzündungsschüben oder aus notwendigen chirurgischen Eingriffen (Berg et al., 2002).

## 1.2 NF- $\kappa$ B - ein Schlüsselmolekül bei der Regulation von Immun- und Entzündungsreaktionen

Der nukleäre Transkriptionsfaktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) besitzt eine zentrale Funktion bei der Regulation von Entzündungs- und Immunreaktionen. Dieses gilt auch für chronisch entzündlichen Darmkrankheiten. Hier konnte gezeigt werden, dass die Aktivität NF- $\kappa$ Bs mit dem Schweregrad und Verlauf der Erkrankung korreliert (Atreya et al., 2008). Unter der Kontrolle von NF- $\kappa$ B stehen eine Vielzahl von Genen, die für proinflammatorische Zytokine, diverse Chemokine, Adhäsionsmoleküle und angiogenetische Faktoren kodieren (Karin and Lin, 2002). Neben der Regulation von Entzündungs- und Immunreaktionen kontrolliert NF- $\kappa$ B weitere entscheidende Funktionen der Zelle wie z.B. Differenzierung, Proliferation und Apoptose (Sartor, 2006; Viemann et al., 2004). NF- $\kappa$ B setzt sich aus Mitgliedern der Rel-Transkriptionsfaktor-Familie zusammen. Bisher wurden fünf verschiedene Untereinheiten identifiziert, die als Homo- oder Heterodimere an das  $\kappa$ B DNA Motif binden können: RelA/p65, RelB, c-Rel, NF- $\kappa$ B1/p50 und NF- $\kappa$ B2/p52 (Ghosh et al., 1998).

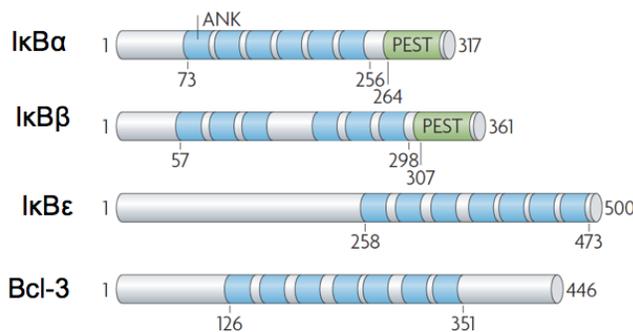


**Abb.1 Die NF- $\kappa$ B Familie**

Schematische Darstellung des Aufbaus der Untereinheiten: RHD=Rel Homology Domain; LZ= Leucine Zipper; DD= Death Domain; ANK= Ankyrin Repeat Motifs; TAD=Transcriptional Activation Domain; TA Rel A Tasactivation Domain

Abgeändert nach N.D. Perkins, Mol. Cell Biology 2007

Während p65, RelB und c-Rel eine eigene Transaktivations-Domänen besitzen und damit transkriptionell aktiv werden können, sind p50 und p52 Homodimere dazu nicht in der Lage. Die zur Rel-Familie gehörenden Proteine sind durch eine Rel homology domain (RHD) gekennzeichnet. Diese erlaubt die Bindung der verschiedenen Untereinheiten an die DNA und ermöglicht zugleich die Interaktion mit spezifischen Inhibitoren des Transkriptionsfaktors ( $\text{I}\kappa\text{Bs}$ ).  $\text{I}\kappa\text{Bs}$  maskieren dabei durch so genannten Ankyrin-Repeats die Kernlokalisationssequenz auf der RHD der NF- $\kappa\text{B}$  Untereinheiten. Eine Translokation in den Kern wird dadurch verhindert, so dass NF- $\kappa\text{B}$  transkriptionell inaktiv im Komplex mit seinem Inhibitor im Zytoplasma verbleibt (Atreya et al., 2008; Hayden and Ghosh, 2004; Huang et al., 2000; Johnson et al., 1999).



Abgeändert nach N.D. Perkins,  
Mol. Cell Biology 2007

**Abb.2 Die  $\text{I}\kappa\text{B}$  Familie**

Schematische Darstellung des Aufbaus der Untereinheiten: ANK=Ankyrin; PEST=domain rich in Proline, glutamate, serine, threonine

### 1.3 Wege der NF-κB-Aktivierung

Bisher sind drei verschiedene Signalwege beschrieben, die zur Aktivierung von NF-κB führen: Man unterscheidet zwischen dem klassischen, dem alternativen und dem atypischen Signalweg.

Der klassische NF-κB Signalweg wird durch eine Vielzahl von proinflammatorischen Stimuli induziert. Zytokine wie z.B. Interleukin 1 (IL-1), Tumornekrosefaktor-α (TNF-α), virale Proteine und bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) initiieren über membranständige Rezeptoren die Signalkaskade. Die NF-κB Aktivität wird durch den IκB Kinase (IKK) Komplex reguliert, bei dem die rezeptorvermittelten Stimuli zusammenlaufen (Hayden and Ghosh, 2004).

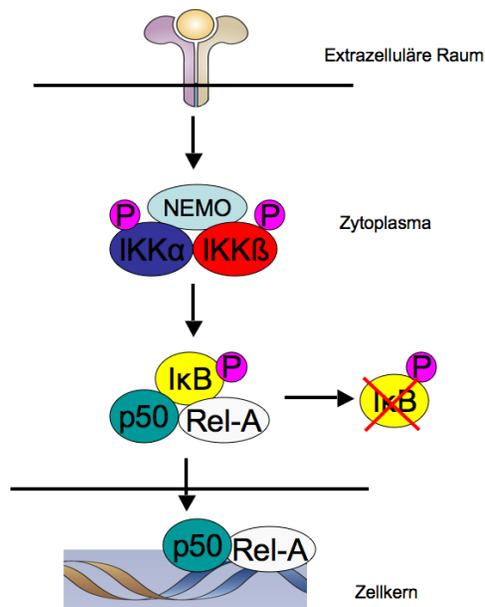
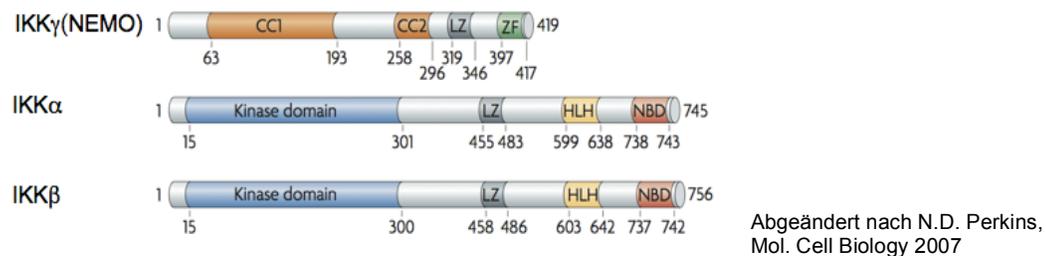


Abb.3 Die klassische NF-κB-Aktivierung

Der IKK Komplex setzt sich aus den zwei katalytischen Untereinheiten, IKK $\alpha$  und IKK $\beta$ , und dem NF- $\kappa$ B essential Modulator (NEMO), auch bekannt als IKK $\gamma$ , zusammen. Die katalytischen Einheiten treten dabei jeweils einzeln, die regulatorische Untereinheit NEMO in einer variierenden Anzahl auf. IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  sind Serin/Threonin-Kinasen. Beim klassischen Signalweg kommt es zur IKK $\beta$ -vermittelten Phosphorylierung von I $\kappa$ B Proteinen, was wiederum die konsekutive Poly-Ubiquitinierung durch die E3-Ligase einleitet. Es folgt die rasche proteasomale Degradation des Inhibitors, so dass freies NF- $\kappa$ B in seiner häufigsten Form als RelA/p50 Dimer in den Nukleus transloziert, dort an DNA bindet und Zielgene transkribiert (Hayden and Ghosh, 2004).



#### Abb.4 Die I $\kappa$ B Kinase Familie

Schematische Darstellung des Aufbaus der I $\kappa$ B Kinase Familie: HLH=Helix-Loop-Helix; CC1/2=coiled-coil; LZ=Leucine Zipper; LF=Leucine Finger; NBD=NEMO-Binding-Domain

Für eine suffiziente Aktivierung von NF- $\kappa$ B über den klassischen Signalweg sind IKK $\beta$  und NEMO essentiell. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Inhibition von IKK $\beta$  oder der Verlust von NEMO zur Ablation der klassischen NF- $\kappa$ B-Aktivierung und damit auch der Transkription von NF- $\kappa$ B Zielgenen führt.

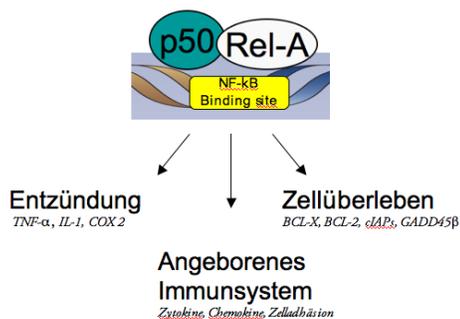


Abb.5 Zielgene klassischer NF- $\kappa$ B-Aktivierung

Einige Stimulatoren des klassischen Signalweges, wie der zur TNF-Rezeptorfamilie gehörende CD40 Rezeptor, sind zusätzlich in der Lage NF- $\kappa$ B über einen alternativen Signalweg zu aktivieren.

Im Gegensatz zur klassischen NF- $\kappa$ B Signalkaskade ist dieser von IKK $\beta$  und IKK $\gamma$  unabhängig. Stimulation von membranständigen Rezeptoren führt über die NF- $\kappa$ B induzierende Kinase (NIK) zur Phosphorylierung und Aktivierung von IKK $\alpha$  Homodimeren. Es folgt eine ubiquitinabhängige Prozessierung des Vorläuferproteins p100 zum transkriptionell aktiven p52. Zusammen mit RelB kann p52 als Dimer mit hoher Affinität an bestimmte  $\kappa$ B DNA-Domänen binden und die Expression von NF- $\kappa$ B-Zielgenen steuern (Senftleben et al., 2001).

Der dritte, so genannte atypische NF- $\kappa$ B Signalweg steht im Zusammenhang mit DNA-Doppelstrangbrüchen. DNA-Schaden initiiert hier die Translokation von NEMO und ATM aus dem Zellkern in das Zytoplasma. Hier kommt es zur Aktivierung des IKK-Komplex und damit der klassischen NF- $\kappa$ B Signalkaskade. Durch die Induktion von zytoprotektiven Faktoren wird so das Gleichgewicht zwischen apoptotischen und anti-apoptotischen Signalen aufrechterhalten (Wu et al., 2006).

## 1.4 Mausmodelle für chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Momentan existieren rund 25 bis 30 verschiedene Maus- bzw. Rattenmodelle für intestinale Entzündungsprozesse. Diese lassen sich vereinfacht in drei Hauptkategorien gliedern. Man unterscheidet chemisch induzierbare von spontanen Kolitismodellen, die auf spezifischen genetischen Defekten im Bereich verschiedenster Signalwege beruhen. Außerdem existieren so genannte Transfermodelle, die durch eine künstlich erzeugte Störung im Bereich der T-Zell-Homöostase zu gastrointestinalen Entzündungsprozessen führen. Obwohl keines dieser Modelle für sich allein das klinische und histopathologische Bild chronisch entzündlicher Darmerkrankungen in seiner Komplexität ganzheitlich erfasst, eignen sich die unterschiedlichen Modelle jedoch sehr gut um die einzelnen Teilaspekte der Pathogenese der Erkrankung genauer zu charakterisieren (Elson et al., 2005).

Induzierbare Modelle basieren auf der Applikation von chemischen Noxen. Die Induktion der Kolitis ist dabei von T-Zellen unabhängig. Die orale Gabe von Dextran Sulfat Natrium (DSS) im Trinkwasser führt in der Maus innerhalb von wenigen Tagen zu einer ulzerierenden Kolitis. DSS wirkt dabei direkt toxisch auf die intestinalen Epithelzellen an der Basis der Krypte und zerstört so die mukosale Barriere. Dadurch kommen inflammatorische Zellen, wie z.B. Makrophagen, mit luminalen Antigenen in Kontakt und leiten so die Entzündungsreaktion ein. Das histologische Bild wird von Ulzerationen und massiver Infiltration von Makrophagen und lymphozytären Zellen dominiert. Klinisch zeigen die Mäuse blutige Diarrhö und Gewichtsverlust. Der Verlauf der Kolitis ist dabei durch deutlich erhöhte Level von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-2, IL-4 und IL-6 charakterisiert. Der Ausprägungsgrad –akut, chronisch oder lethal- ist dabei stark vom genetischen Hintergrund der Maus abhängig (Mahler et al., 1998; Okayasu et al., 1990; Ostanin et al., 2009; Wirtz et al., 2007). Das Modell erweist sich als besonders nützlich zur Analyse von epithelialen Reparaturmechanismen in der initialen Phase der Entstehung von CED und anderen akuten Entzündungsprozessen im Gastrointestinaltrakt. Neben DSS kann auch durch Gabe von

Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) in Ethanol eine Kolitis im Darm der Maus hervorgerufen werden. Eine durch TNBS in Ethanol induzierte Kolitis ist durch eine transmurale granulomatöse Entzündung mit starker Diarrhö und Gewichtsverlust und Verdickung der Darmwand gekennzeichnet. Das chronische Stadium ist mit einer Infiltration von CD4 positiven T-Zellen in die Lamina propria assoziiert. Mit Hilfe des TNBS Kolitismodells gelang es, pathologische Zytokinsekretionsmuster und Störungen der Zelladhäsion aufzuzeigen und so entscheidende Erkenntnisse im Bereich der Immunotherapie zu gewinnen (Williams et al., 2001; Wirtz et al., 2007).

Neben den induzierbaren Modellen gibt es, wie bereits angesprochen, eine Vielzahl von genetischen Modellen von denen sich allerdings nur eine kleine Anzahl etablieren konnte. IL-10 defiziente Mäuse sind das mit Abstand am weitesten verbreitete Modell. Die Versuchstiere entwickeln in einem Alter von 2- 4 Monaten eine spontane chronische Enterokolitis, die von einer massiven Infiltration der Mukosa mit Lymphozyten, aktivierten Makrophagen und neutrophilen Granulozyten begleitet wird (Berg et al., 1996; Kuhn et al., 1993). IL-10 ist ein bekannter Suppressor der TH1-Zellantwort und verschiedenster Makrophagenfunktionen. Via IL-12 und TNF- $\alpha$  inhibiert das Interleukin die T-Zell Proliferation. Auf der anderen Seite fördert IL-10 die Entstehung von pathologischen T-Zellen. IL-10- defiziente Versuchstiere haben sich besonders als Modell für die chronisch nicht-ulzerierende Entzündungsprozesse etabliert (Groux et al., 1997).

Auch die spezifische Inhibition des Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) Gens in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten der Maus führt zur Entstehung einer transmural ulzerierenden Enterokolitis. STAT3 übernimmt in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten eine wichtige Position bei der Signaltransduktion von IL-10. IL-10 vermittelt hier seinen wichtigen antiinflammatorischen Charakter durch Hemmung der Makrophagen- und Granulozytenfunktion, die einer ständigen Stimulation durch die luminale physiologische Bakterienflora ausgesetzt sind. Es gibt einschlägige Hinweise, dass Störungen im Bereich dieser Signalkaskade auch pathophysiologisch ursächlich für die Entstehung von chronischen entzündlichen Darmerkrankungen beim Menschen sind (Takeda et al., 1999).

Ein weiteres wichtiges Modell basiert auf dem Transfer von naiven T-Zellen, was zu einer Störung der T-Zell-Homöostase führt. Damit weist das Modell starke Parallelen zur Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beim Menschen auf, wo chronische Entzündungsprozesse häufig von autoreaktiven T-Zellen aufrechterhalten werden (Sartor, 2006).  $CD4^+ CD45RB^{high}$  naive T-Zellen werden dabei aus Wildtypmäusen isoliert und in syngene Versuchstiere, die keine T- und B-Zellen besitzen, transplantiert. 5 bis 8 Wochen nach dem T-Zelltransfer kommt es zur Induktion einer Enterokolitis mit transmuraler Infiltration von Immunzellen, Hyperplasie der Epithelzellen und Formation von Kryptenabszessen, die von schweren epithelialen Erosionen begleitet werden. In Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund der Maus kommt es zur unterschiedlich starken Ausprägung von Gewichtsverlust und Diarrhö.

Bei einem neueren Ansatz werden naive T-Zellen in Rekombinase Activating Gene-1 ( $RAG^{-/-}$ ) defiziente Mäuse transferiert. Hier kommt es zu einer chronischen Entzündung des gesamten GI-Traktes. Das Modell eignet sich daher besonders zu Untersuchungen des M. Crohn. Ein weiteres Argument für T-Zell Transfermodelle ist, dass es ähnlich wie das  $IL-10^{-/-}$  Modell auf einen Großteil immunologischer und antibiotischer Behandlungskonzepte anspricht und sich damit auch für pharmakologische Studien eignet. (Ostanin et al., 2009; Powrie et al., 1994).

### **1.5 Inhibition der klassischen NF- $\kappa$ B-Aktivierung - eine neue Strategie bei der Behandlung von immunologischen und rheumatologischen Krankheitsbildern?**

In verschiedenen Tiermodellen für entzündungsassoziierte Krankheitsbilder, wie z.B. rheumatoide Arthritis, entzündungsvermittelte Osteoporose und allergisch bedingten Atemwegserkrankungen, bei denen inadäquate Entzündungs- und Immunreaktionen das Krankheitsbild aufrechterhalten, wirkt sich die Inhibition von IKK $\beta$  durch eine verminderte Synthese und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen positiv auf den Krankheitsverlauf aus (Broide et al., 2005; Karin et al., 2004; McIntyre et al., 2003; Ruocco et al., 2005). Ähnliche Ergebnisse konnten im Rahmen von Studien zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erzielt werden. Die direkte Inhibition von NF- $\kappa$ B mittels gegenläufiger Oligonukleotide gegen RelA/p65 oder die Verwendung verschiedener IKK $\beta$ -Inhibitoren wirkte chronischen Entzündungsprozessen im Gastrointestinaltrakt entgegen (Lawrence et al., 2003; MacMaster et al., 2003; Neurath et al., 1996). Die Ergebnisse bestätigen die zentrale Funktion, die NF- $\kappa$ B bei der Regulation von Immun- und Entzündungsreaktionen besitzt. Ferner demonstrieren sie den potentiellen Nutzen einer pharmakologischen NF- $\kappa$ B-Inhibition bei der Therapie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.

Im Gegensatz zu den oben postulierten Daten stehen jedoch die im Jahr 2004 von Greten et al publizierte Ergebnisse. Hier führte die konditionelle Ablation von IKK $\beta$  in intestinalen Epithelzellen der Maus zur Exazerbation einer chemisch induzierten ulzerierenden Kolitis (Greten et al., 2004). Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass bei gewebsspezifischem Verlust von IKK $\gamma$  im Darmepithel die Entstehung einer spontanen Kolitis provoziert wird (Nenci et al., 2007). Auch ist bekannt, dass IKK $\beta$ -abhängige NF- $\kappa$ B-Aktivierung in myeloischen Zellen die Prozessierung und Sekretion von wichtigen proinflammatorischen Zytokinen, wie z.B IL-1 $\beta$  hemmt. IL-1 $\beta$  reguliert zentrale Elemente der lokalen Entzündungs- und systemischen Immunreaktion, wie z.B. die Körpertemperatur, Granulozytenproliferation, verschiedene Akute-Phase-Proteine,

sowie zahlreiche andere Interleukine (Greten et al., 2007). Untersuchungen im Rahmen von Kolitis-assoziiierter Karzinomentstehung deuten darauf hin, dass IKK $\beta$  in myeloischen Zellen durch Kontrolle der Produktion von Wachstumsfaktoren, wie z.B. IL-6, Tumorentstehung und Wachstum beeinflusst (Becker et al., 2004; Karin and Greten, 2005).

Diese zum Teil widersprüchlich erscheinenden Ergebnisse demonstrieren die Komplexität entzündungsassoziierter NF- $\kappa$ B Aktivierung und veranschaulichen die Problematik, die hinter einer therapeutischen Anwendung von pharmakologischen IKK $\beta$ -Inhibitoren steht.

## 2 Zielsetzung

Eine dysregulierte Produktion und Sekretion von Zytokinen durch immunkompetente Zellen ist ein zentrales Element bei der Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B nimmt in diesem komplexen Szenario eine entscheidende Position bei der Regulation der Immunantwort ein. Bei Patienten, die an Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa erkrankt sind, ist die NF- $\kappa$ B Aktivität in Epithelzellen und Makrophagen in den entzündlich veränderten Darmabschnitten signifikant gesteigert und korreliert deutlich mit dem Schweregrad der Entzündung (Neurath et al., 1996; Rogler et al., 1998). NF- $\kappa$ B-Aktivierung in Makrophagen führt dabei zu einer vermehrten Produktion und Sekretion der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12 und IL-23. Während in Makrophagen der proinflammatorische Charakter NF- $\kappa$ Bs überwiegen soll, dominieren in Epithelzellen durch die vermehrte Transkription von antiapoptotischen Genen die protektiven Eigenschaften (Becker et al., 2003; Neurath et al., 1996).

Untersuchungen zum therapeutischen Effekt genetischer bzw. pharmakologischer IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B Inhibition in verschiedenen Modellen für intestinale Entzündungsprozesse führten bislang aber zu widersprüchlichen Ergebnissen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Funktion der klassischen IKK $\beta$ -abhängigen NF- $\kappa$ B-Aktivierung im Rahmen von akut-ulzerierenden und chronisch nicht-ulzerierenden Entzündungsprozessen im Kolon der Maus zu klären. Dazu sollen mit Hilfe von verschiedenen Mausmodellen die zelltypspezifischen Funktionen NF- $\kappa$ Bs in Epithelzellen und inflammatorischen Zellen unter Berücksichtigung der Ausprägung der Entzündungsreaktion genau charakterisiert werden. Weiterführend sollen Interaktionsmechanismen der verschiedenen beteiligten Zelltypen aufgezeigt werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Mausmodelle

Eine epithelspezifische *Ikkβ* Deletion (*Ikkβ<sup>ICE</sup>*) wurde mit Hilfe des Cre/loxP-System verwirklicht. Dazu wurden Mäuse mit geflochtenen *Ikkβ* Allelen (*Ikkβ<sup>FF</sup>*) mit Mäusen, die die Cre Rekombinase unter der Kontrolle des *Villin* Promotors exprimieren, auf einem C57BL/6;129 Hintergrund verkreuzt (el Marjou et al., 2004; Madison et al., 2002). *Ikkβ<sup>mye</sup>* Tiere weisen eine spezifische Deletion von *Ikkβ* in der myeloischen Zellreihe auf. Im Gegensatz zum oben genannten epithelspezifischen Modell steht die Cre Recombinase hier unter der Kontrolle des Lysozym-Promotors (Clausen et al., 1999). Für eine epithelspezifische, induzierbare Ablation von IKKβ wurden *villin-Cre-ERT2*-Mäuse mit *Ikkβ<sup>FF</sup>* Tieren verkreuzt. Die Deletion von *Ikkβ* erfolgte durch die orale Gabe von 1mg Tamoxifen in einem Ethanol/Sonnenblumenöl-Gemisch an fünf aufeinander folgenden Tagen (el Marjou et al., 2004). *Il-10<sup>-/-</sup>* Mäuse (Berg et al., 1996), bezogen von The Jackson Laboratory, wurden für die entsprechenden Versuche mit *Ikkβ<sup>ICE</sup>* und *Ikkβ<sup>mye</sup>* verpaart. Das Auftreten einer spontanen Kolitis in IL-10 Mutanten, und damit auch der Endpunkt des krankheitsfreien Überlebens wurde bei einem Gewichtsverlust von >20% des Versuchstieres im Vergleich zum vorher bestimmten Maximalgewicht definiert. Die erkrankten Versuchstiere wurden zu den angegebenen Zeitpunkten euthanasiert.

#### 3.1.2 Chemische Induktion einer akuten Kolitis

Die Induktion einer akuten Kolitis erfolgte durch fünf- bis sechs-tägige Applikation von 3% Dextran Sulfat Natrium (DSS, MP Biomedicals) im Trinkwasser.

### 3.1.3 Zellkultur

Bei den verwendeten SW480 Zellen handelt es sich um humane Kolonkarzinom Zelllinie. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM Medium (GIBCO) versetzt mit 10% fätalem Rinder Serum und 1% Streptomycin und Penicillin, bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub>.

### 3.1.4 Pharmakologische IKK $\beta$ -Inhibition

Zur spezifischen pharmakologischen Inhibition der IKK $\beta$ -abhängigen NF- $\kappa$ B-Aktivierung wurde der IKK $\beta$ -Inhibitor ML120B von Millennium Pharmaceuticals zur Verfügung gestellt. Für *in vivo* Experimente erfolgte die Gabe des Inhibitors zweimal täglich oral in Methylzellulose gelöst, in einer Konzentration von 80mg/kg. Für *in vitro* durchgeführte Experimente wurde ML120B in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst appliziert.

## 3.2 Genotypisierung

### 3.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Bei der PCR handelt es sich um ein Nachweisverfahren, bei dem eine definierte Nukleinsäuresequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäuren amplifiziert werden kann. Dabei nutzt man die Eigenschaft von DNA-Polymerasen, aus einem DNA-Einzelstrang DNA-Doppelstränge zu synthetisieren, wenn ihnen ein kurzer doppelsträngiger Bereich als Primer und genügend Oligonukleotide zur Verfügung gestellt werden. Die PCR basiert auf einem dreiteiligen Zyklus, der zur exponentiellen Amplifikation der gewünschten Sequenz führt: Primeranlagerung am 5' Ende der zu amplifizierenden Sequenz, enzymatische Elongation und anschließender Denaturierung zu Einzelsträngen.

Durch mehrfache Wiederholung des Zyklus kommt es zur exponentiellen Vervielfältigung der gewünschten Sequenz. Die Verwendung von thermostabilen DNA-Polymerasen ermöglicht eine automatisierte Durchführung in Thermoblöcken.

Der einfache *PCR Ansatz* (20µl) beinhaltet:

10xPuffer	(2µl)
50mM MgCl <sub>2</sub>	(0,8µl)
100mM dNTP	(0,4µl)
TaqPolymerase (5u/µl)	(0,15µl)
DNA (20-100ng)	(1µl)
20mM Primer Forward	(1µl)
20mM Primer Reverse	(1µl)
H <sub>2</sub> O	(13,65µl)

### 3.2.3 Oligonukleotidsequenzen

IKKβ-144-F	CACAGTGCCCACATTATTTAGATAGG
IKKβ-321-R	GTCTTCAACCTCCCAAGCCTT
Cre-370-F	ACCTGAAGATGTTTCGCGATTATCT
Cre-370-R	ACCGTCAGTACGTGAGATATCTT
IL 10 WT/KO IMR87 F	GCC TTC AGT ATA AAA GGG GGA CC
IL10 WT/IMR86 R	GTG GGT GCA GTT ATT GTC TTC CCG
IL10 WT/IMR88 R	CCT GCG TGC AAT CCA TCT TG

### 3.3 Histologie

Zur mikroskopisch-morphologischen Charakterisierung des Kolons wurden Paraffinschnitte angefertigt. Dazu wurde das Kolon direkt nach der Präparation longitudinal eröffnet und spannungsfrei um Holzspatel gewickelt, so dass die unterschiedlichen Abschnitte des Kolons in Form einer Rolle übereinander zum Liegen kamen. Die Fixierung erfolgte in 4%iger Paraformaldehydlösung für 12 Stunden bei 4°C. Anschließend wurde das Gewebe dehydriert und in flüssigem Paraffin eingebettet. Mit einem Mikrotom (Mikrom HM355S) wurden 3µm dünne Paraffinschnitte angefertigt.

#### 3.3.1 Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin/Eosin-Färbung eignet sich besonders gut für eine möglichst unverfälschte morphologische Darstellung des Gewebes. Dabei färbt Hämatoxylin alle sauren bzw. basophilen Strukturen, wie z.B. Zellkerne mit den enthaltenen Desoxyribonukleinsäuren und das raue endoplasmatische Retikulum, blau. Eosin hingegen färbt vor allem Plasmaproteine, die sich durch ihre Azidophilie bzw. Eosinophilie auszeichnen, rot. Nach Deparaffinisierung der trockenen Paraffin-Schnitte durch das Intermedium Xylol für 10 Minuten wird das Präparat in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 80%, 70% und 50%) in jeder Verdünnung jeweils 3 Minuten in ein wässriges Milieu überführt. Zunächst wird für 60 Sekunden mit Hämatoxylin, anschließend für 15-30 Sekunden mit 1% Eosin gefärbt. Daraufhin folgte in aufsteigender Alkoholreihe (50%, 70%, 80%, 96%, und 100%) für jeweils 20 Sekunden die Dehydrierung des Präparates mit anschließender Entfernung des Alkohols durch eine erneute Inkubation in Xylol für 5 Minuten. Die Konservierung der Paraffin-Schnitte erfolgte mit VectaMount Medium (Vecto Labs) und einem Deckglas.

### 3.3.2 Histologische Scores zur Auswertung des Gewebeschadens

#### 3.3.2.1 Epithelialer Schaden

0 - Normal

1 - epitheliale Hyperproliferation

2 - Verlust der Krypte <50%

3 - Verlust der Krypte 50-90%

4 - Kompletter Verlust der Krypte

5 - Kleine bis mittlere Ulzerationen (Ausdehnung <10 Krypten)

6 - Große Ulzerationen (Ausdehnung  $\geq$ 10 Krypten)

#### 3.3.2.2 Infiltration von Immun- und Entzündungszellen

Mukosa	Submukosa	Muskularis/Serosa
0 - keine	0 - keine	0 - keine
1 - mild	1 - moderat	1 - moderat bis schwer
2 - moderat	2 - schwer	
3 - starke		

#### 3.3.2.3 Berechnung des Gesamtscores

Pro Versuchstier wurden die drei am schwersten betroffenen Darmabschnitte nach dem oben beschriebenen Score bewertet. Der durchschnittlich erreichte Score (0-12) wurde graphisch dargestellt.

### **3.5 Protein und DNA Analyse**

#### **3.5.1 Isolierung von Gesamtgewebe**

Nach Resektion des distalen Kolons erfolgte eine sofortige Konservierung eines circa 2 x 2 mm großen Stückes in flüssigem Stickstoff. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei -80° gelagert.

#### **3.5.2 Isolierung von intestinalen Epithelzellen**

Zur Gewinnung von intestinalen Epithelzellen (IEC) wurde den Versuchstieren nach Tötung durch atlanto-occipitale Dislokation das Colon entnommen, mit PBS gespült und in ca. 2-3 mm große Stücke zerkleinert. Daraufhin wurden die Darmfragmente in einem 50 ml Falcon mit 10ml HBSS 30mM EDTA-Lösung auf einem Schüttler bei 100rpm und 37°C für 8 Minuten inkubiert und anschließend für 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit gevortext. Das EDTA interferiert dabei mit Zell-Zell-Kontakten, so dass es zur Ablösung der Epithelzellen von der Lamina Propria kommt. Die sich nun in Lösung befindlichen Epithelzellen wurden in ein neues Falcon überführt und bei 4°C und 1700rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Epithelzellpellet mit 2,5ml, 4°C kaltem PBS gewaschen und zu je 800µl in Eppendorf Tubes transferiert. Diese wurden bei 4°C und 5000rpm für weitere 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Epithelzellpellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Aufbewahrung erfolgte bei -80°C.

### 3.6 RNA-Isolierung und Analyse

Die Gewinnung von RNA aus Epithelzellen erfolgte mit Hilfe der Qiagen Shredder und RNeasy Kits. Dabei wird die RNA mit einem Hochsalzpuffer an eine Membran in einer Plastiksäule gebunden, mehrfach gewaschen und anschließend eluiert. Die Isolierung erfolgte anhand des Protokolls des Herstellers bei Raumtemperatur:

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Epithelzellpellets wurden mit 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzten RLT-Puffer (600 $\mu\text{l}$ ) mit Hilfe einer Pipette lysiert und in die vorgesehenen Qiagen-Säulen des Shredder Kits überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 10000rpm für 2 Minuten bei Raumtemperatur (RT). Dem Zentrifugat wurde 600 $\mu\text{l}$  70% Ethanol beigemischt. Die homogene Lösung wurde darauf in eine Qiagen RNeasy-Säule transferiert und für 15 Sekunden bei 10000rpm bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Es folgt der erste Waschschrift mit 700 $\mu\text{l}$  RWI Puffer mit anschließender Zentrifugation bei 10000rpm für 15 Sekunden. Der Überstand wurde verworfen und es folgten zwei weitere Waschschriffe mit jeweils 500 $\mu\text{l}$  RPE-Waschpuffer. Die Zentrifugation erfolgte zwischen den Waschschriffen wie zuvor bei 10000rpm für 15 Sekunden bei RT. Vor der Elution der RNA durch Zugabe von 30 $\mu\text{l}$  RNase free water wurde die Membran der Qiagen Säule durch einminütige Zentrifugation bei 13000rpm getrocknet. Die Elution erfolgte bei 10000rpm für eine Minute. Die RNA wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 3.6.1 Realtime Reverse Transkriptase (RT)-PCR

Um die Transkription eines Genes nachzuweisen, muss die transkribierte RNA analysiert werden. Die Real-Time RT-PCR dient dabei zur Quantifizierung der Genexpression und ist eine Kombination aus zwei Methoden:

### 3.6.2 cDNA- Synthese

Aus der isolierten Gesamt-RNA muss zunächst mit Hilfe einer reversen Transkriptase cDNA synthetisiert werden, da die anschließende PCR auf DNA-spezifischen DNA-Polymerasen beruht. Die Synthese der cDNA erfolgte anhand des Protokolls des Herstellers (Invitrogen) der reversen Transkriptase:

Bei einem einfachen Ansatz beträgt das gesamte Reaktionsvolumen 20 $\mu$ l:

1 $\mu$ g RNA, 1 $\mu$ l 40 $\mu$ M OligodT Primer und 1 $\mu$ l 100 mM dNTP wurden durch die Zugabe von H<sub>2</sub>O auf ein Reaktionsvolumen von 13 $\mu$ l gebracht und bei 65°C für 5 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte durch Zugabe von SSRT 5xPuffer(4 $\mu$ l), 0,1M DTT(1 $\mu$ l), RNase Inhibitor out 40U/ $\mu$ l (1 $\mu$ l) und des Enzyms SSRT 200U/ $\mu$ l (1 $\mu$ l) die katalytische Umwandlung von RNA in cDNA bei 50°C für 60 Minuten. Die Lagerung erfolgte in 1:4 Verdünnung bei -20°C.

### 3.6.3 Real-Time RT-PCR

Die Real-Time PCR basiert auf einem speziell fluoreszierenden Farbstoff, SYBR® Green (Applied Bioscience) der nur doppelsträngige DNA färbt. Die entstehende Fluoreszenz des amplifizierten Produktes wird kontinuierlich während der einzelnen PCR-Zyklen detektiert. Am so genannten Schwellenwertzyklus bzw. Ct-Wert kommt es zur ersten signifikanten Zunahme der Fluoreszenz. Hier übersteigt das „echte“ Fluoreszenzsignal das Hintergrundrauschen der Fluoreszenz. Dieser Wert dient bei der Auswertung mittels der  $\Delta$  Ct Methode als relativer Vergleichspunkt unter den getesteten Genen.

Einfacher Ansatz (25 $\mu$ l):

cDNA	(0,5 $\mu$ l)
H <sub>2</sub> O	(9,5 $\mu$ l)
2x SYBR MIX	(12,5 $\mu$ l)
Forward Primer (20mM)	(1,25 $\mu$ l)
Reverse Primer (20mM)	(1,25 $\mu$ l)

### 3.6.4 Delta CT Methode

Die unterschiedliche Genexpression wurde mit Hilfe des  $\Delta$ -Ct-Wertes angegeben. Dabei wird die Expression des zu untersuchenden Gens gegenüber einem Housekeeping Gen, das in jeder Zelle gleichermaßen exprimiert und nicht reguliert wird, normalisiert. Die Differenz zwischen dem Housekeeping und zu untersuchendem Gen ergibt den  $\Delta$ Ct Wert. Da es sich bei PCR -wie zuvor beschrieben- um eine exponentielle Methode handelt verdoppelt sich mit jedem Replikationszyklus der DNA Gehalt. Das heißt, dass ein Unterschied im Ct-Wert sich exponentiell auf die Menge der replizierten DNA Menge auswirkt. Die verwendete Gleichung zur Bestimmung des absoluten Expression war demnach  $2^{-\Delta Ct}$ . Die Mittelwerte der einzelnen Gruppen und der Standardfehler (Standardabweichung/Wurzel der Anzahl der Proben) wurden graphisch gegeneinander aufgetragen.

### 3.6.5 Oligonukleotidsequenzen

Die verwendeten Primer zur Analyse der Mausgene wurden mit Hilfe der Software PrimerExpress 1.0 erstellt. Primer Dimere und unspezifische Produkte wurden durch vorherige PCR-Analysen ausgeschlossen.

CCL6-F	AACCCAGGTCTGTGCCGAC
CCL6-R	TGGGCCTTGCTTCAGGG
CCL20-F	TGGCAAGCGTCTGCTCTTC
CCL20-R	TTGCTGCTTCTGCCTGGC
CD49B-F	TGGCGAGTCCCATGATGG
CD49B-R	TGCCGAACCTCAGTATCTCGT
CD4-F	GAGGCTCAGATTCCCAACCA
CD4-R	GCAGCAAGCGCCTAAGAGAG
CD8-F	CGTGGTGGTGCATGCCT
CD8-R	CCTCGAACTCAGAGAGATCCGC
Claudin2 F	TGCGACACACAGCACAGGCATCACC
Claudin2 R	TCAGGAACCAGCGGCGAGTAGAA
Claudin3 F	AGCATCATCACGGCGCA
Claudin3 R	TGCTCTGCCCACGCAGT

---

Claudin4 F	CCTGGACCGCTCACAACG
Claudin4 R	CCAGCCGACGTAAAGCGA
Claudin5 F	TTAAGGCACGGGTAGCACTCACG
Claudin5 R	TTAGACATAGTTCTTCTTGTCGTAATCG
Claudin6 F	ACTATGCTGCGCCTGCTCTTCTGG
Claudin6 R	GATATTCGGAGGGTCCCCGAGA
Claudin11 F	TCAGGTGGTGGGTTCGTCA
Claudin11 R	CCAGAACGGAGGCAGCAATCA
Claudin12 F	CAGCCACCGTCCTGTCCTT
Claudin12 R	GTGATCAGCCGCAGTTTCCT
Claudin19 F	CGGTCATATCCAGTCAGCACGA
Claudin 19R	AGACCTGCCAAGAGGAAGAGAGCA
Claudin 20 F	CAGCTCCTTGCTTTCATCCTG
Claudin 20 R	CAGACTCCTCCAGCAAAGGAA
CXCL1-F	TATCGCCAATGAGCTGCG
CXCL1-R	GGATGTTCTTGAGGTGAATCCC

---

CXCL5-F	TCCATCTCGCCATTCATGC
CXCL5-R	GATGCTGCGGCAGCGGCAGCGT
CYCLO-F	ATGGTCAACCCCACCGTGT
CYCLO-R	TTCTGCTGTCTTTGGA ACTTTGTC
F4/80-F	CTTTGGCTATGGGCTTCCAGTC
F4/80-R	GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG
FOXP3-F	TAGGAGCCGCAAGCTAAAAGC
FOXP3-R	TCCTTGTTTTGCGCTGAGAGT
GR1-F	GCAATGCAGCAGTTCCCACT
GR1-R	ATTGAATGGATCATCAGAGAAAGGTC
IL-1 $\beta$ -F	GTG GCT GTG GAG AAG CTG TG
IL-1 $\beta$ -R	GAA GGT CCA CGG GAA AGA CAC
I $\kappa$ B $\alpha$ -F	CCA GAA CAA CCT GCA GAC
I $\kappa$ B $\alpha$ -R	GCT CAG GAT CAC AGC CAG CTT
IFN $\alpha$ -F	TGTACCTGAGAGAGAAGAAACACAGC
IFN $\alpha$ -R	GGAAGACAGGGTTCTCCAGACTT
IFN $\beta$ -F	AGCTCCAAGAAAGGACGAACAT
IFN $\beta$ -R	GCCCTGTAGGTGAGGTTGATCT
IFN $\gamma$ -F	TTACTGCCACGGCACAGTCA
IFN $\gamma$ -R	AGTTCCTCCAGATATCCAAGAAGAGA

IL-6-F	GTATGAACAACGATGATGCACTTG
IL-6-R	ATGGTACTCCAGAAGACCAGAGGA
IL-10-F	GGTTGCCAAGCCTTATCGGA
IL-10-R	ACCTGCTCCACTGCCTTGCT
IL-11-F	CTGCACAGATGAGAGACAAATTCC
IL-11-R	GAAGCTGCAAAGATCCCAATG
IL-12p40-F	AAACCAGACCCGCCCAAGAAC
IL-12p40-R	AAAAAGCCAACCAAGCAGAAGACAG
MIP2-F	ATCCAGAGCTTGAGTGTGACGC
MIP2-R	AAGGCAAACCTTTTGGACCGCC
Occludin F	GTGAGCTGTGATGTGTGTTGAGCT
Occludin R	GTGGGGAACGTGGCCGATATAATG
SOCS3-F	CTTCCCATGCCGCTCACA
SOCS3-R	CCCAGCCCCATACCTGACTT

### 3.6.7 Microarray Analyse

Genexpressionsprofile der Epithelzellen wurden unter Verwendung des Affymetrix Gene ST GeneChip (circa 28000 Gene aus der Maus) durchgeführt. Als Proben wurde RNA verwendet, die zuvor wie beschrieben aus den Epithelzellen des Kolons isoliert wurde. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der SAM 3.0 Software.

## 3.7 Proteinbiochemie

### 3.7.1 Gewinnung von Proteinextrakten aus Epithel bzw. SW480 Zellen

IEC Zellpellets wurden in gefrorenem Zustand mit Hilfe eines Pistills in 200µl Lysepuffer lysiert, für 15 Minuten bei 4°C inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 13000rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Tube überführt und zur Proteinanalyse eingesetzt.

#### *Protein-Lysepuffer:*

Lysepuffer Stock: 50mM Tris HCl pH 7,5; 250mM NaCl; 3mM EDTA; 3mM EGTA; 1% Triton; 0,5% NP40; 10% Glycerol; 25mM Natrium Pyrophosphat

plus

eine Tablette Protease-Inhibitoren (Roche) auf 50ml Lysepuffer (Inhibition gegen Chymotrypsin, Pankreas Extract, Papain, Pronase, Thermolysin, Trypsin)

plus

Phosphatase Inhibitor für 10ml Lysepuffer Komplett: 8,2 ml Lysepuffer inklusive Protease-Inhibitoren; 10µl 1M DTT; 500µl 1M β-Glycerolphosphat; 500µl 500mM NaF; 200µl 100mM Na PMSF; 500µl 100mM Na Orthovanadat.

### 3.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe eines Photospektrometers nach Bradford bestimmt. Die Methode nutzt die Eigenschaft des Farbstoffes „Coomassie Brilliant Blue G250“ sich an Proteine zu binden und deren Absorptionsmaximum von rot (595nm) nach blau (465nm) zu verschieben. Die Erhöhung der Absorption korreliert in einem begrenzten Konzentrationsbereich mit der Proteinmenge. Die Absorption wurde bei 595 nm gemessen. Die Proteinmenge konnte anhand zuvor erstellter Eichgrade mit bekannten Albumin Konzentrationen von 2 bis 0,0625mg/ml ermittelt werden. Es wurde das Protein Assay Kit der Firma Biorad verwendet.

### 3.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Immunoblot

Ziel dieser beiden aufeinander aufbauenden Methoden ist ein qualitativer bzw. quantitativer Proteinnachweis. Neben der relativen Proteinmenge kann durch spezifische Antikörper auch der Aktivierungszustand des Proteins detektiert werden.

Mittels SDS-Page werden denaturierte Proteine elektrophoretisch ihrer Größe nach aufgetrennt. Dabei binden die Proteine an im Überschuss vorhandenes SDS und erhalten dadurch eine negative Ladung, die proportional zu ihrem Molekulargewicht ist. Die elektrophoretische Beweglichkeit hängt damit von der Größe des Proteins ab, so dass die SDS-Protein-Komplexe in der Gelmatrix entsprechend der Molmasse separiert werden.

Bei der verwendeten Methode nach Lämmli wurden zunächst die relativen Proteinmengen der Proben bestimmt und untereinander angeglichen. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 15µl Lämmli-Puffer incl. 5%  $\beta$ -Mercaptoethanol zum Proteingemisch.

*Lämmli-Puffer*: 3,55ml H<sub>2</sub>O dest; 1,25ml Tris HCl 0,5M pH6,8; 2,5ml Glycerol; 2ml 10% SDS; 0,2 ml Bromphenol Blau

plus  $\beta$ -Mercaptoethanol (Endkonzentration 5%)

Die Proteine wurden anschließend für fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in vertikal aufgerichteten Gel-Apparaturen der Firma "BioRad". Für Sammel- bzw. Trenngel wurden entsprechend dem Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins unterschiedliche Acrylamidkonzentrationen zwischen 10% und 15% verwendet.

Konzentration des Gels	Acrylamide-bisacrylamide (40%) in ml	Lauf- bzw. Trenngel puffer in ml	Destilliertes H <sub>2</sub> O in ml	TEMED in Lauf-/Trenngel in $\mu$ l	10% APS in $\mu$ l
8%	2	2.5	5.5	5/10	50
10%	2.5	2.5	5	5/10	50
12%	3	2.5	4.5	5/10	50
15%	3.75	2.5	3.75	5/10	50

Ein 12%- Gel enthielt beispielsweise bei einem 10ml Ansatz 2,5ml 40% Acrylamid, 4,4ml H<sub>2</sub>O, 0,1ml SDS und 2,5ml Sammel- bzw. Trenngel-Puffer. Die individuelle Polymerisation der beiden Gele wurde durch Zugabe von 50 $\mu$ l 10% Ammoniumpersulfat und 5 $\mu$ l bzw. 10 $\mu$ l TEMED erreicht. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V in vertikalen mit 1x Laufpuffer gefüllten Gelkammern für ca. 90 Minuten.

Die aufgetragenen Proben wurden dabei zunächst im Sammelgel konzentriert und anschließend im Trenngel aufgetrennt. Zur Bestimmung des Molekulargewichts dienten 10 $\mu$ l eines gefärbten Proteingemischs mit bekannten Molekulargewichtsgrößen (Precision Plus Protein Standard All Blue, BioRad). Unmittelbar darauf erfolgte der elektrophoretische Transfer der Proteine auf eine zuvor in Methanol aktivierte Proteinbindende Membran (Immobilon TM Transfer Membran; Millipore).

Dabei wurde das Acrylamidgel luftblasenfrei einerseits von Membran, Filterpapier,

Zelluloseschwamm und andererseits ausschließlich von Filterpapier und Zelluloseschwamm bedeckt. Diese Anordnung wurde in eine Halterung eingespannt und vertikal in eine mit 4°C kalten 1X Transferpuffer gefüllte Blotkammer überführt. Die Orientierung wurde so gewählt, dass das Gel zur Kathode und die Membran zur Anode ausgerichtet waren, so dass die negativ geladenen Proteine durch Anlegen einer Stromstärke von 400mA bei 4°C in 60 Minuten auf die Membran transferiert werden konnten. Sowohl bei der SDS-PAGE als auch beim Immunoblot wurden vertikale Elektrophorese-Apparaturen der Firma „BioRad“ benutzt.

Verwendete Puffer:

*10xLaufpuffer:* 30,3g Tris; 144,1g Glycin; 10g SDS in 1000ml H<sub>2</sub>O

*1xTransferpuffer:* 100ml 10xTransferpuffer; 200ml Methanol; 700ml H<sub>2</sub>O

*10xTransferpuffer:* 14,5g Tris (12mM); 72g Glycin (96mM) in 1000ml H<sub>2</sub>O

Konzentration in 1xTransferpuffer

### 3.7.4 Immunoblotanalyse

Zur Absättigung unspezifischer Antikörperbindungsstellen wurde die Membran nach dem Transfer mit 3% Magermilch in PBS Tween 0,1% für 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper erfolgte in einer Verdünnung von 1:500 bis 1:1000 in 3% Rinderalbuminserum oder Magermilch in PBS Tween 0,1% über Nacht bei 4°C. Im Anschluss wurde die Membran 3x5 Minuten in PBS Tween 0,1% gewaschen. Als Sekundärantikörper dienten Peroxidase konjugierte anti-Maus bzw. anti-Hase IgG Antikörper (ECL Anti Rabbit bzw Anti Mouse IgG Horseradish Peroxidase; GE Healthcare). Der entsprechende Sekundärantikörper wurde 1: 3000 - 1:5000 in 3% Magermilch in PBS Tween 0,1% verdünnt und für 45 Minuten mit der Membran inkubiert. Zur Detektion der gebundenen Sekundärantikörper wurde nach erneutem Waschen der Membran das

SuperSignal ECL-Detektionskit der Firma Pierce verwendet. Dazu wurde die Membran mit je 2,5ml der Lösung A und B für 5 Minuten inkubiert. Die antikörpergebundene Peroxidase oxidiert dabei ein im Kit vorhandenes Substrat. Die bei der enzymatischen Reaktion entstehende Chemilumineszenz wurde mit Hilfe eines Röntgenfilms detektiert. Alle Inkubations- und Waschschrte wurden, wenn nicht anders erwähnt, auf einem Schüttler bei Raumtemperatur durchgeführt.

### 3.7.6 Verwendete Antikörper

#### **Primärantikörper:**

anti-RelA/p65; 1:1000 in 3% BSA; Santa Cruz

anti-cRel; 1:1000 in 3% BSA; Santa Cruz

anti-p50; 1:1000 in 3% BSA; Santa Cruz

anti-IKK $\alpha$ ; 1:1000 in 3%BSA; Imgenex

anti-IKK $\beta$ ; 1:1000 in 3% BSA; UBI

anti- $\beta$ -Actin; 1:1500 in 3% Skim Milk; Sigma

anti-Hsp70; 1:1000 in 3% BSA; Cell Signaling

anti-STAT3; 1:1000 in 3% BSA; Cell Signaling

anti-phospho STAT3; 1:1000 in 3% BSA; Cell Signaling

**Sekundär-Antikörper:**

anti-mouse IgG; 1:3000 in 3% Milch; GE Healthcare

anti-rabbit IgG; 1:5000 in 3% Milch; GE Healthcare

**3.7.7 Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA)**

Diese Methode dient dem Nachweis von Protein-DNA-Interaktion, wie z.B. die Bindung eines Transkriptionsfaktors an spezifische DNA-Sequenzen, mittels nicht-denaturierender Gelelektrophorese. Die Interaktion des Transkriptionfaktors an eine radioaktiv markierte Oligonukleotidsonde bewirkt eine Verlangsamung der Migrationsgeschwindigkeit im Vergleich zur ungebundenen Sonde im Polyacrylamidgel. Im Autoradiogramm zeigen sich Banden, deren Intensität mit der Stärke der Protein-DNA-Interaktion korreliert.

**3.7.8 Radioaktive Markierung der Oligonukleotidsonden**

100ng doppelsträngiges Oligonukleotid wurden in 20µl Reaktionsvolumen mit 2µl 10x T4 Polynukleotid Kinase (PNK) Puffer, 1µl T4 PNK sowie 1µl [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Daraufhin erfolgte die Aufreinigung des markierten Oligonukleotides mit Hilfe der Amersham Mircospin Säule. Das Zentrifugat enthielt das markierte Oligonukleotid. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

**3.7.9 EMSA Oligo Sequenzen**

NF-κB: Forward: 5' AGT TGA GGG GAC TT CCC AGG C 3'

Reverse: 5' GCC TGG GAA AGT CCC CTC AAC T 3'

### 3.7.10 Nachweis der DNA-Bindung

10µg einer aus IEC gewonnenen Proteinprobe wurden in 20µl Reaktionsvolumen mit 5µl 10x EMSA Puffer, 1µl 20mM DTT, 2µg Poly dI/dc (0,5mg/ml) und 0,2µl der markierten Oligonukleotidsonde für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 2x EMSA Loading Dye erfolgte die Auftrennung im Polyacrylamidgel in einer mit 0,5x TBE Laufpuffer gefüllten vertikalen Gel-Elektrophoresenapparatur bei einer konstanten Spannung von 200 Volt. Nach Trocknung des Gels auf Filterpapier bei 80°C unter Vakuum für ca. 60 Minuten erfolgte die Auswertung via Autoradiogramm mittels eines Röntgenfilms.

Verwendete Puffer:

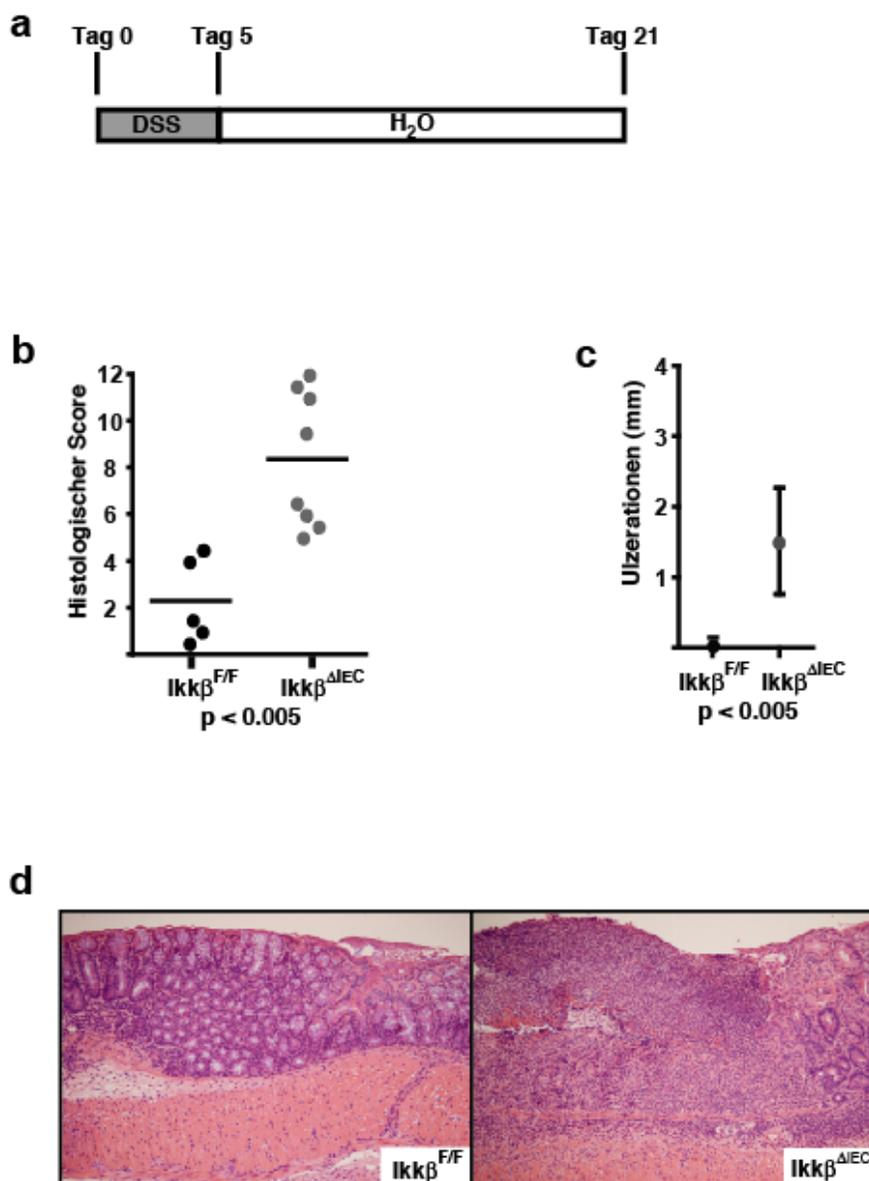
<i>10x EMSA Puffer:</i>	0,1 M Tris HCl pH 7,6; 0,5 KCl; 0.01M EDTA; 50% Glycerol
<i>10x EMSA Ladepuffer:</i>	250mM Tris HCl pH7,5; 40% Glycerol; 0,2% Bromophenol Blau
<i>5x TBE Puffer:</i>	Tris 54g; Borsäure 27,5g; EDTA 2,92g in 1000ml H <sub>2</sub> O
<i>EMSA Polyacrylamidgel:</i>	33,75ml H <sub>2</sub> O; 10ml 5xTBE; 6,25ml 40% Acrylamid; 337µl 10% APS

## 4 Ergebnisse

### 4.1 IKK $\beta$ fördert die epitheliale Regeneration im Rahmen von akut-ulzerierenden Entzündungsprozessen im Gastrointestinaltrakt der Maus

IKK $\beta$  vermittelt in Epithelzellen wichtige protektive Effekte, die es der Zelle ermöglichen, auf verschiedenste Formen von Stress adäquat zu reagieren (Chen et al., 2003; Egan et al., 2004). Durch IKK $\beta$ -abhängige NF- $\kappa$ B-Aktivierung in frühen Stadien der akuten Kolitis kann durch die Induktion von anti-apoptotischen Genen die epitheliale Integrität und intestinale Barriere aufrechterhalten werden (Greten et al., 2004). Außerdem konnte in Zellkulturexperimenten gezeigt werden, dass NF- $\kappa$ B eine Schlüsselposition bei der Kontrolle der Zellmigration besitzt. Zellmigration ist ein wichtiger Aspekt bei der Regeneration nach Epithelschaden (Egan et al., 2003). Inwiefern IKK $\beta$  Einfluss auf die frühe Heilungsphase nach akuten entzündlichen Prozessen im Kolon nimmt, wurde bisher nicht untersucht.

In der Maus verursacht die Applikation von DSS in Trinkwasser eine akut-ulzerierende Kolitis mit einer reproduzierbaren maximalen Ausprägung ab Tag 5. Um den Effekt von IKK $\beta$  auf die Heilungsphase zu charakterisieren, wurde epithelspezifischen IKK $\beta$ -Knock-Out-Mäusen (*Ikk $\beta$ <sup>IEC</sup>*) und einer Kontrollgruppe 5 Tage lang 3% DSS-haltiges Trinkwasser zugeführt. 16 Tage nach DSS Applikation erfolgte die histologische Analyse in der Heilungsphase an Tag 21. Im Vergleich zu Wildtyptieren weisen IKK $\beta$ -defiziente Tiere deutlich mehr und auch höhergradig entzündlich-ulzerös veränderte Darmwandareale auf.



**Abb.6** Deletion von *Ikkβ* in IEC im Rahmen einer akut-ulzerierenden Kolitis führt zur Beeinträchtigung der Heilungsphase

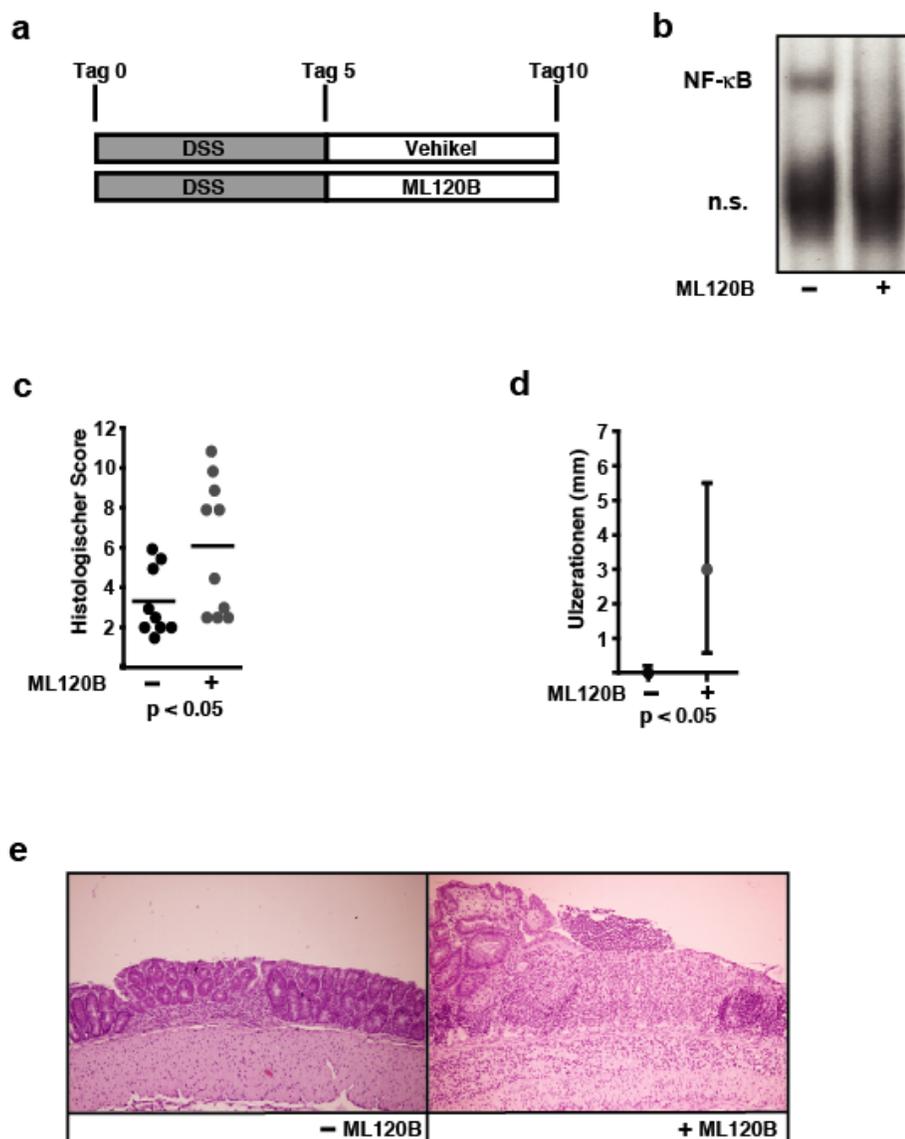
(a) Orientierende Darstellung des verwendeten Schemas zur Induktion einer Kolitis durch DSS in *Ikkβ<sup>F/F</sup>* und *Ikkβ<sup>ΔIEC</sup>* Versuchstieren; Histologische Analyse des Schweregrades der Entzündung (b) und der (c) Größe der Ulzerationen im Kolon; (d) Repräsentative H&E Färbung von *Ikkβ<sup>F/F</sup>* und *Ikkβ<sup>ΔIEC</sup>* Mäusen in der späten Heilungsphase an Tag 21.

Eine definitive Aussage, ob der beobachtete Unterschied in der Heilungsphase das Resultat vermehrter Epithelschädigung in Initialphase der Kolitis darstellt oder ob IKK $\beta$  zusätzlich zu seiner anti-apoptischen Wirkung weitere Funktionen besitzt, die den Verlauf der Entzündung positiv beeinflussen, lässt das Experiment nicht zu.

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass der gestörte Heilungsprozess in *Ikk $\beta$ <sup>IEC</sup>* Tieren auf eine höhergradige initiale epitheliale Schädigung zurückzuführen ist, wurde zunächst in unbehandelten Wildtyp-Tieren durch die 5-tägige Gabe von DSS eine akute ulzerierende Kolitis induziert. Daraufhin wurde ein Teil dieser Tiere mit dem spezifischen IKK $\beta$ -Inhibitor, ML120B (Nagashima et al., 2006), behandelt, während dem anderen Teil lediglich der Vehikel verabreicht wurde. Der initiale epitheliale Schaden war damit in beiden Gruppen identisch und nicht durch eine kompromitierte NF- $\kappa$ B Aktivierung beeinträchtigt.

Die pharmakologische Inhibition von IKK $\beta$  war hochgradig effektiv. Die Analyse der NF- $\kappa$ B-DNA-Interaktion durch EMSA zeigte im Vergleich zu den Kontrolltieren eine fast vollständige Hemmung der NF- $\kappa$ B Bindeaktivität im entzündlich veränderten Kolon. Die anschließende histologische Analyse zu Beginn der Heilungsphase, 10 Tage nach DSS Applikation, zeigte in ML120B behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutlich schwerere Ausprägung der Kolitis. Die Ergebnisse unterstützen damit die These, dass IKK $\beta$  unabhängig seines zytoprotektiven Effekts in der frühen Entzündungsphase weitere antiinflammatorische Funktionen besitzt, welche die Heilungsphase positiv beeinflussen.

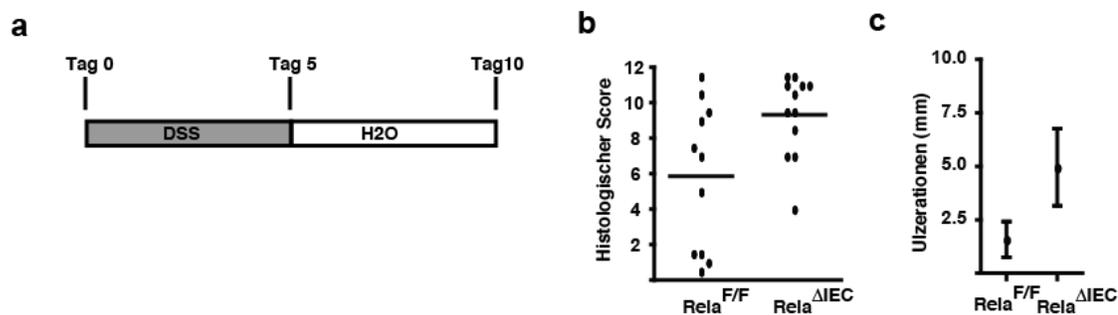
Sowohl die pharmakologische IKK $\beta$ -Inhibition als auch die genetische epithelspezifische Deletion von *Ikk $\beta$*  führen letztendlich zu einer Exazerbation von akuten Entzündungsprozessen im Kolon der Maus.



**Abb.7** IKK $\beta$  vermittelt unabhängig seiner anti-apoptotischen Funktion zytoprotektive Effekte in der frühen Heilungsphase einer akuten Kolitis

(a) Orientierendes Schema zur Induktion einer Kolitis. (b) NF- $\kappa$ B DNA Bindeaktivität in Kolon-Gesamt mukosaextrakten an Tag 10; (c) Histologische Analyse des Schweregrades der Entzündung und der Größe der Ulzerationen (d); (e) vergleichende H&E Färbung von ML120B und Vehikel behandelten Wildtypen an Tag 10 nach Induktion einer akuten Kolitis durch DSS

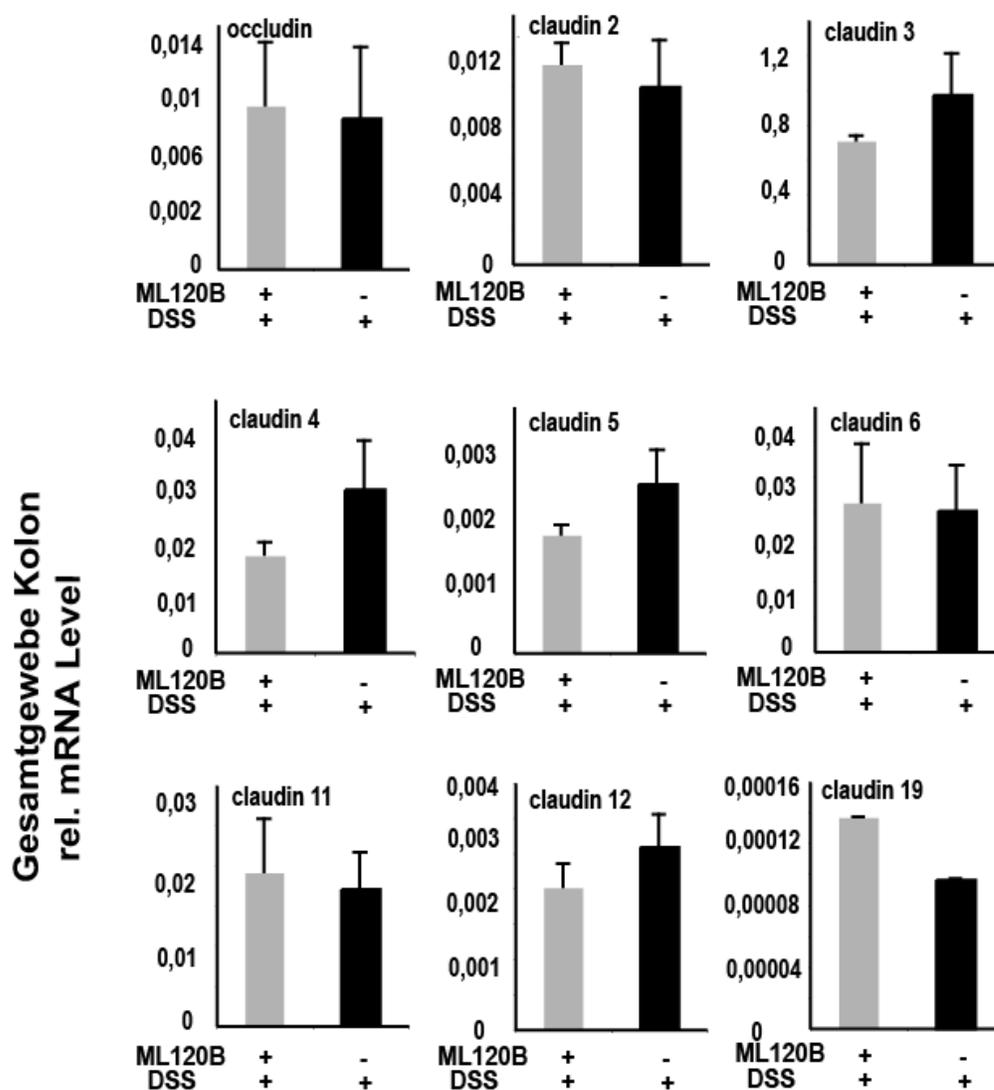
Die angeführten Ergebnisse stehen jedoch im Widerspruch zu den von Neurath et al postulierten Daten. Durch die Inhibition der klassischen NF- $\kappa$ B Aktivierung, mittels antisense Oligonukleotiden gegen eine der NF- $\kappa$ B Untereinheiten, RelA/p65, konnte dort ein Rückgang der Entzündung beobachtet werden (Neurath et al., 1996). Um die Möglichkeit auszuschließen, dass RelA/p65 und IKK $\beta$  unterschiedliche Funktionen im Rahmen einer akuten Kolitis besitzen, wurde in induzierbaren epithelspezifischen RelA KO Mäusen, *villin Cre ERT2/RelA<sup>IEC</sup>*, ebenfalls durch die Applikation von DSS, eine Kolitis induziert. Ähnlich wie bei *Ikk $\beta$ <sup>IEC</sup>* Tieren zeigte sich in der histologischen Analyse, dass es beim epithelialen Verlust von RelA/p65 im Zuge einer akut-ulzerierenden Kolitis zu einer Exazerbation der Entzündungsreaktion mit deutlich gesteigerter Ausprägung der Ulzerationen kommt. Die Ergebnisse unterstreichen damit, den protektiven Charakter einer suffizienten klassischen IKK $\beta$ -abhängigen NF- $\kappa$ B-Aktivierung im Epithel während der Initialphase einer Kolitis.



**Abb.8 IKK $\beta$  und RelA/p65 vermitteln sich ergänzende zytoprotektive Eigenschaften während akuter intestinaler Entzündungsprozesse**

- (a) Schematische Darstellung der Induktion einer Kolitis in *villin Cre ERT2/RelA<sup>IEC</sup>* Tieren und Kontrollen.  
 (b) Histologische Analyse des Schweregrades der Entzündung und der (c) Größe der Ulzerationen

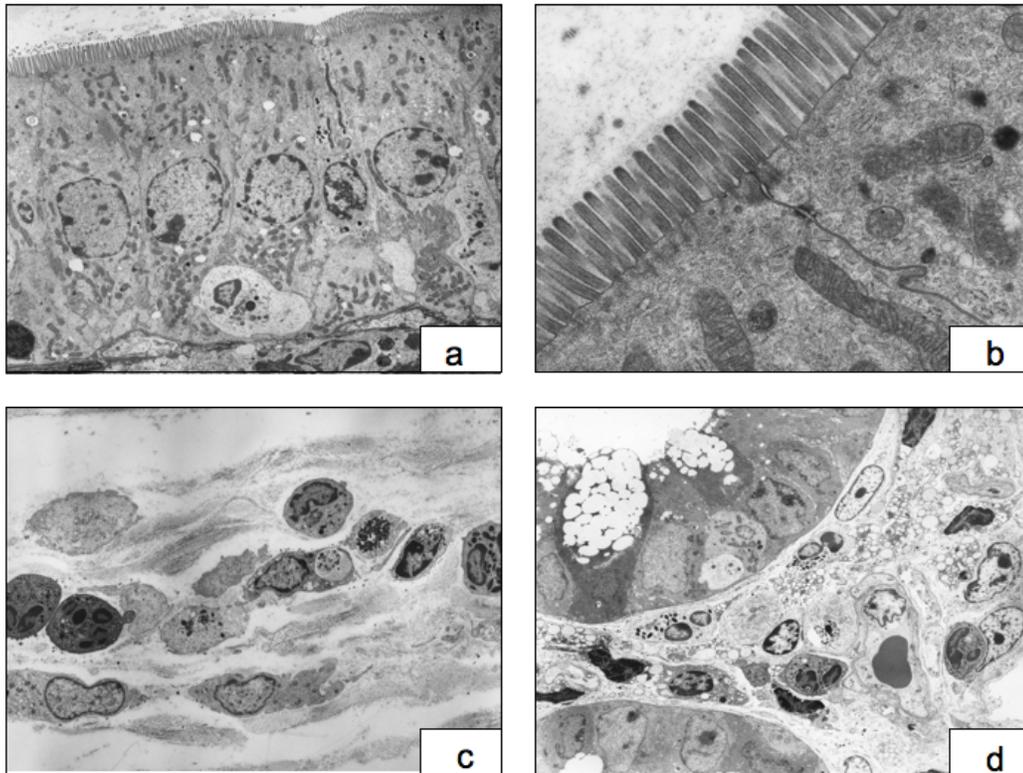
In den verschiedenen Theorien über die Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nimmt die Barrierefunktion der intestinalen Schleimhaut eine zentrale Stellung ein. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B ist mit der Regulation einer Reihe von Genen, die für Zelladhäsionsproteine kodieren, assoziiert (Karin and Lin, 2002). Eine durch die Inhibition von IKK $\beta$  gestörte Aktivierung von NF- $\kappa$ B könnte folglich mit einer quantitativ oder qualitativ fehlerhaften Transkription von Proteinen verbunden sein, die für die Funktion von Zellkontakten und damit für eine intakte epitheliale Barrierefunktion essentiell sind. Um festzustellen, ob die Transkription von zellkontaktassoziierten Proteinen und damit die Barrierefunktion beeinflusst ist, wurden IEC aus dem distalen Kolon an Tag 7 nach Beginn der DSS-Applikation isoliert. An Tag 7 findet sich die maximale Ausprägung des Gewebes Schadens. Außerdem stellt dieser Zeitpunkt den Beginn der frühen Heilungsphase dar. Verglichen wurden Vehikel und ML120B behandelte Tiere. Die quantitative mRNA-Analyse von insgesamt 25 NF- $\kappa$ B assoziierten Zellkontaktproteinen zeigte keine signifikante Einschränkung der Transkription in ML120B behandelten Tieren, die auf eine gestörte Barrierefunktion Hinweis geben könnte.



**Abb.9 Pharmakologische IKK $\beta$ -Inhibition hat keinen signifikanten Einfluss auf die Transkription von Zelladhäsionsproteinen**

Quantitative mRNA Analyse von NF- $\kappa$ B assoziierten Zelladhäsionsproteinen in Wildtyp Mäusen an Tag 10 nach 5 Tagen DSS mit anschließender pharmakologischer IKK $\beta$  Inhibition

Die zusätzliche morphologische Analyse der epithelialen Zellkontakte mittels Elektronenmikroskopie zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Auffällig war allerdings eine ausgeprägte Neutrophilie in ML120B behandelten Versuchstieren.



**Abb.10 Elektronenmikroskopische Darstellung der Morphologie der Zellkontakte und der beobachteten Neutrophilie in ML120B behandelten Tieren**

Übersicht (a) und stärkere Vergrößerung (b) der Morphologie der Zellkontakte in ML120B behandelten Wildtypen an Tag 10 nach DSS Applikation. (c) und (d) Charakteristische Neutrophilie in ML120B behandelten Versuchstieren

## 4.2 Pharmakologische IKK $\beta$ -Inhibition in der Initiation der Heilungsphase resultiert in einer verminderten epithelialen Expression von NF- $\kappa$ B und STAT3 Zielgenen

Um den zu Grunde liegenden Mechanismus für die Störungen im epithelialen Heilungsprozess in IKK $\beta$ -Inhibitor behandelten Tieren näher zu charakterisieren, wurde RNA aus IEC an Tag 7 isoliert und einer Microarray-Analyse unterzogen. Da davon auszugehen ist, dass die Inhibition von IKK $\beta$  und dem daraus resultierenden Phänotyp eher mit einem Verlust an protektiven Funktionen, als mit einer gesteigerten Transkription von destruktiven Faktoren assoziiert ist, konzentrierte sich die Analyse Microarrays auf die Gene, die in ML120B behandelten Tieren um den Faktor 2,5 geringer exprimiert waren. Circa 100 Gene erfüllten dieses Kriterium und über 30% dieser Gene stellten spezifische NF- $\kappa$ B- Zielgene dar, die als Mediatoren an Entzündungsreaktionen beteiligt sind.

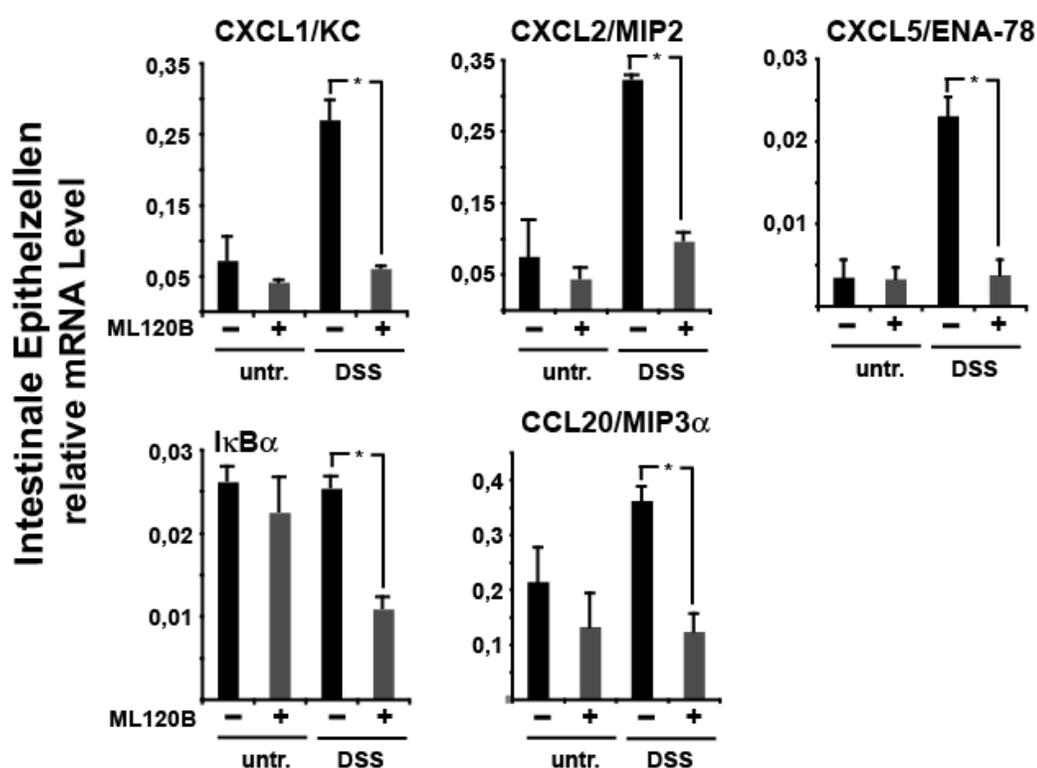
Gene Title	Gene Symbol	treated vs untreated
2'-5' oligoadenylate synthetase 3	Oas3	-3,113888889
2'-5' oligoadenylate synthetase-like 2	Oasl2	-3,024390244
ADP-ribosyltransferase 2a	Art2a	-2,65060241
amylase 2, pancreatic	Amy2 /// 1810008N23Rik	-7,507246377
carboxypeptidase A3, mast cell	Cpa3	-4,309314587
CD177 antigen	Cd177	-2,694408554
CD74 antigen	Cd74	-6,308876387
CD8 antigen	Cd8a	-2,638709677
CEA-related cell adhesion molecule 12	Ceacam12	-3,572815534
chemokine (C-C motif) ligand 20	Ccl20	-4,953566622
chemokine (C-C motif) ligand 5	Ccl5	-5,345407503
chemokine (C-C motif) ligand 7	Ccl7	-2,614609572
chemokine (C-C motif) ligand 8	Ccl8	-4,960490463
chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Cxcl1	-17,26627219
chemokine (C-X-C motif) ligand 10	Cxcl10	-4,39800995
chemokine (C-X-C motif) ligand 2	Cxcl2	-6,986590038
chemokine (C-X-C motif) ligand 5	Cxcl5	-7,55942623
chemokine (C-X-C motif) ligand 9	Cxcl9	-3,752136752
class II transactivator	C2ta	-2,922764228
complement component 3	C3	-5,720121029
complement component factor h	Cfh	-9,66
cytoskeleton-associated protein 4	Ckap4	-3,030018332
elastase 3, pancreatic /// similar to elastase 3B, pancreatic	Ela3 /// LOC638418	-3,227513228
fatty acid desaturase 1	Fads1	-3,911721432
Fc receptor, IgE, high affinity I, alpha polypeptide	Fcer1a	-5,670391061
granzyme A	Gzma	-5,876422764
granzyme B	Gzmb	-4,952522255
guanylate nucleotide binding protein 4	Gbp4	-2,542158516

Gene Title	Gene Symbol	treated vs untreated
heat shock protein 1A	Hspa1a	-6,670653174
heat shock protein 1B	Hspa1b	-4,444552766
heat shock protein 8	Hspa8	-2,518084066
histocompatibility 2, class II antigen A, alpha	H2-Aa	-12,39298072
histocompatibility 2, class II antigen A, beta 1	H2-Ab1	-7,105045872
histocompatibility 2, class II antigen E beta	H2-Eb1	-7,849143915
histocompatibility 2, class II, locus DMa	H2-DMa	-5,019281915
histocompatibility 2, class II, locus Mb1	H2-DMb1	-4,198694706
hypothetical protein LOC677168	LOC677168	-2,593159775
hypoxia up-regulated 1	Hyou1	-2,767744333
immunoglobulin kappa chain variable 28	Igk-V28 /	-3,040904198
indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase	Indo	-3,17923959
intercellular adhesion molecule	Icam1	-4,878318584
interferon gamma induced GTPase	Igtp	-4,124364191
interferon gamma inducible protein 47	Ifi47	-4,136403128
interferon induced transmembrane protein 1	Ifitm1	-4,279359431
interferon induced transmembrane protein 3	Ifitm3	-2,909956786
interferon inducible GTPase 1	Iigp1	-13,68364198
interferon inducible GTPase 2	Iigp2	-2,983791402
interferon-induced protein 44	Ifi44	-3,547520661
interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	Ifit1	-2,665951743
keratin complex 1, acidic, gene 5	Krt1-5	-2,843659245
lipopolysaccharide binding protein	Lbp	-2,698243507
lysosomal-associated protein transmembrane 5	Laptm5	-2,865871833
macrophage activation 2 like	Mpa2l	-2,943462898
malic enzyme, supernatant	Mod1	-2,586153846
mast cell protease 1	Mcpt1	-7,062800384
mast cell protease 2	Mcpt2	-6,809510003
mast cell protease 9 /// chymase 2, mast cell	Mcpt9 /// Cma2	-8,089392133
meiosis-specific nuclear structural protein 1	Mns1	-2,71686747
peroxiredoxin 2	Prdx2	-3,323809524
phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)	Pla2g2a	-7,710619755
Protein tyrosine phosphatase 4a2	Ptp4a2	-2,621976132
proteoglycan 1, secretory granule	Prg1	-2,705270706
ras homolog gene family, member J	Rhoj	-2,634146341
retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1	Rpgrip1	-3,623611923
retinoic acid early transcript 1, alpha/beta/gamma/E	Raet1a /// Raet1b /// Raet1c	-3,078378378
RIKEN cDNA 9030408N13 gene	9030408N13Rik	-3,035714286
S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	S100a8	-2,599003172
S100 calcium binding protein G	S100g	-2,728571429
serum amyloid A 3	Saa3	-3,648381788
similar to H-2 class I histocompatibility antigen	LOC630509 /// LOC674192	-5,252150893
similar to spectrin alpha 1	LOC630963	-18,30687831
small proline-rich protein 2H	Sprr2h	-6,109204368
spectrin alpha 1 /// similar to spectrin alpha 1	Spna1 /// LOC630963	-11,13907285
stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	Scd1	-3,406976744
suppressor of cytokine signaling 3	Socs3	-4,443687557
T-cell specific GTPase	Tgtp	-20,74230146
transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	Tap1	-2,573458185
tripartite motif protein 30	Trim30	-3,318681319
ubiquitin D	Ubd	-6,889112903
ubiquitin specific peptidase 18	Usp18	-3,466127401

Abb.11 Ergebnisse der Microarray-Daten:

Alphabetische Auflistung der Gene, die in ML120B behandelten Tieren im Vergleich zu Kontrollen um den Faktor  $\geq 2,5$  geringer exprimiert waren. Die in Bezug auf diese Arbeit relevanten NF- $\kappa$ B und Stat3 Zielgene wurden rot unterlegt.

*Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl20*, *Ccl5*, *Ccl8*, *Icam1* und *Pla2g2a* stellen wichtige NF- $\kappa$ B assoziierte Zytokine dar und sind entscheidend an der Regulation von Entzündungsreaktionen beteiligt (Li et al., 2002; Wu and Chakravarti, 2007). Die verminderte Transkription dieser Gene in mit IKK $\beta$ -Inhibitor behandelten Tieren konnte durch Real-Time PCR validiert werden. Sie besitzen jedoch weitgehend proinflammatorische Eigenschaften, so dass die beobachtete Exazerbation der Entzündung dadurch nicht erklärt werden kann.



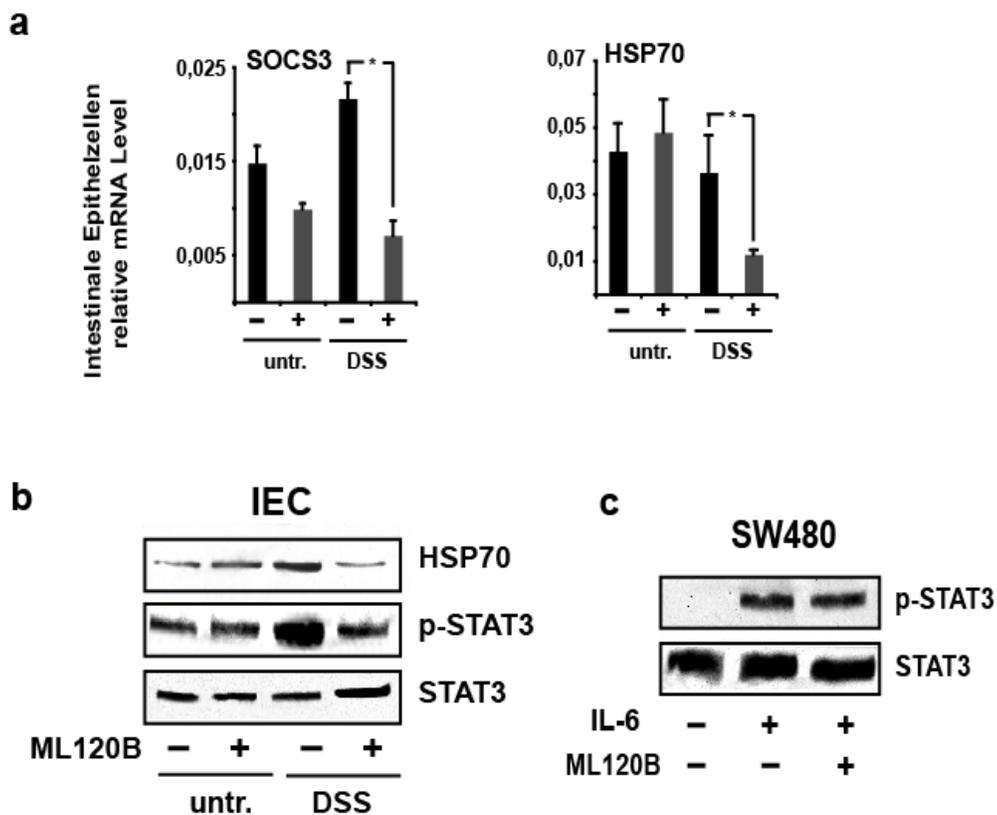
**Abb.12 IKK $\beta$ -Inhibition in der frühen Heilungsphase führt zur verminderten Transkription von NF- $\kappa$ B Zielgenen**

Bestimmung relativer mRNA-Level mittels Real-Time PCR in isolierten intestinalen Epithelzellen von Wildtypmäußen, die nach Ende einer 5-tägigen DSS Applikation 2 Tage mit IKK $\beta$ -Inhibitor bzw. Vehikel behandelt wurden.

Neben dem NF- $\kappa$ B assoziierten Gencluster ließ sich in der Microarray-Analyse eine weitere Gruppe von Genen abgrenzen, die durch die Transkriptionsfaktorgruppe STAT/IRF kontrolliert werden und keine bekannten NF- $\kappa$ B Zielgene darstellen. Im Vergleich zu Kontrolltieren war die Expression von folgenden Genen in ML120B behandelten Versuchstieren um den Faktor 2,5 vermindert: *Hspa1a*, *Tgtp*, *Ifitm1*, *Igtp*, *Ifi47*, *H2-Aa*, *H2-Ab1* und *Socs3*. Die Ergebnisse konnten in einer quantitativen mRNA Analyse bestätigt werden. Besondere Bedeutung kommt *Hspa1a* zu. Dieses Gen, kodiert für das induzierbare Hitze-Schock-Protein 70 und vermittelt zentrale zytoprotektive Funktionen im Darmepithel während akut-ulzerierenden Entzündungsprozessen (Tanaka et al., 2007).

Die quantitative Proteinbestimmung im Westernblot von Epithelzellextrakten zeigte eine fast vollständige Abwesenheit von Hspa1a in IKK $\beta$ -Inhibitor behandelten Tieren. Unterstützend fand sich eine verminderte Stat3-Aktivierung in Epithelzellen des Kolons. STAT3 reguliert wichtige Schritte bei der Transkription und Aktivierung von *Hspa1a*. Unterschiede in der Aktivierung bzw. Phosphorylierung von STAT1 ließen sich nicht nachweisen.

Um unspezifische off-target Effekte, bzw. einen direkten Effekt des IKK $\beta$ -Inhibitors auf STAT3 auszuschließen, wurden Zellen aus der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie SW480 mit ML120B vorbehandelt und anschließend mit IL-6, einem direkten Aktivator des STAT3 Signalweges, stimuliert (Sugimoto, 2008). Im Vergleich mit Zellen, die lediglich mit dem Vehikel vorbehandelt wurden, zeigte sich kein Unterschied in der STAT3-Aktivierung.



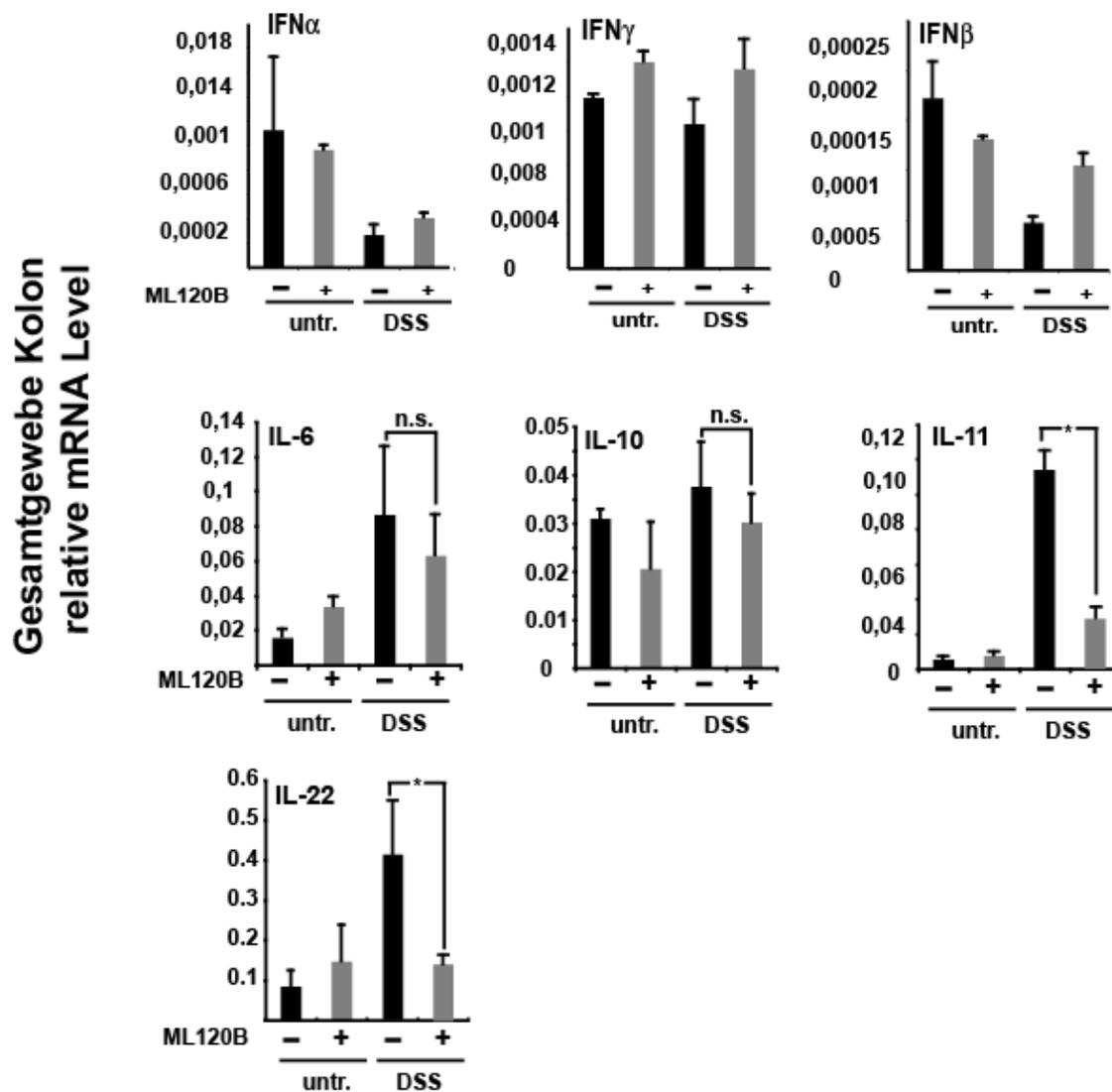
**Abb.13 IKK $\beta$  beeinflusst die Transkription von STAT3 Zielgenen**

(a) Bestimmung relativer mRNA Expression von STAT3 Zielgenen in IEC mittels Real-Time. Vergleich der Versuchstiere an Tag 7 nach 5-tägigem DSS-Zyklus und anschließender Behandlung mit ML120B bzw. Vehikel für 2 weitere Tage. (b) Immunoblotanalyse zum Nachweis von HSP70-Expression und Stat3-Aktivierung in IEC; (c) Nachweis der Spezifität des IKK $\beta$  Inhibitors ML120B. STAT3-Aktivierung in ML120B behandelten SW480 Kolonkarzinomzellen nach IL-6 Stimulation (50ng/ml für 30 Min).

### **4.3 Inhibition der IKK $\beta$ -abhängigen NF- $\kappa$ B-Aktivierung verhindert eine suffiziente Rekrutierung von inflammatorischen Zellen und vermindert die Expression der zytoprotektiven Interleukine 11 und 22**

Eine verminderte Synthese des protektiven Hitzeschock-Proteins Hspa1a in IKK $\beta$ -defizienten Epithelzellen könnte auf eine verminderte Expression von STAT3-aktivierenden Mediatoren zurückzuführen sein.

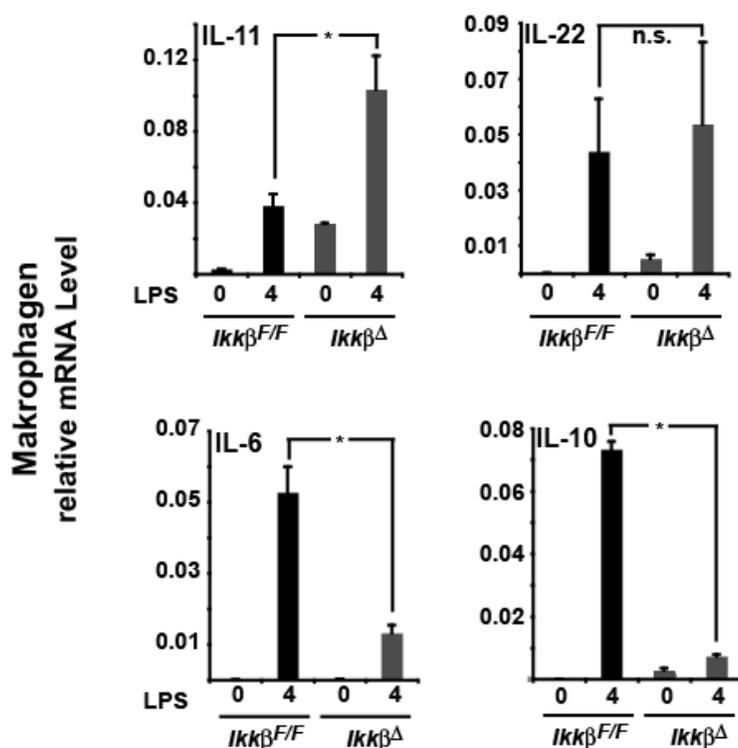
Um die Hypothese zu prüfen, ob IKK $\beta$  im Modell der DSS-induzierten Kolitis die Expression von STAT3-Aktivatoren in der Kolonmukosa beeinflusst, wurde RNA aus der Gesamtmukosa des Kolons isoliert. Der Isolation erfolgte an Tag 7 nach Induktion einer akut-ulzerierenden Kolitis durch DSS und anschließender Behandlung des Versuchstieres mit ML120B bzw. dem Vehikels über zwei Tage. Die quantitative Analyse der mRNA Expression mittels RT-Realtime PCR beinhaltete neben Typ I und Typ II-Interferonen auch die Zytokinfamilie IL-6 und IL-10. Die mRNA-Expression von IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  und IL-10 zeigte in IKK $\beta$ -Inhibitor behandelten Versuchstieren keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bemerkenswerterweise verhindert die Inhibition von IKK $\beta$  durch ML120B jedoch die bei einer Kolitis zu erwartende gesteigerte Transkription der zytoprotektiven Gene für *Il-11*, *Il-22* und *Il-6*.



**Abb.14 IKK $\beta$ -Inhibition führt zur verminderten Transkription der zytoprotektiven Interleukine 11 und 22**

Bestimmung relativer mRNA Level von Typ I und Typ II Interferonen und der Zytokinfamilien IL-6 und IL-10 in der Gesamtmukosa des Kolons mittels Real-Time-PCR. Vergleich der Versuchstiere an Tag 7 nach 5-tägigem DSS-Zyklus und anschließender Behandlung mit ML120B bzw. Vehikel.

Um zu prüfen, ob die fehlende Induktion von IL-11 und IL-22 direkt NF- $\kappa$ B abhängig ist, wurden Kontroll- und IKK $\beta$ -Knock-Out Knochenmarkmakrophagen 4 Stunden mit LPS stimuliert, um anschließend die mRNA-Level von *Il-11* und *Il-22* quantitativ mittels Real-Time PCR zu analysieren. LPS-Stimulation führte sowohl in Wildtyp, als auch in IKK $\beta$  defizienten Makrophagen zur Induktion von *Il-11* und *Il-22*. Die Induktion von *Il-11* war in IKK $\beta$  KO Makrophagen sogar signifikant höher als in den Wildtypen. NF- $\kappa$ B scheint damit in Makrophagen nicht direkt für die Induktion von *Il-11* und *Il-22* notwendig zu sein. Die Expression von *Il-6* und *Il-10*, beides bekannte NF- $\kappa$ B-Zielgene, in IKK $\beta$ -defizienten Makrophagen wie erwartet signifikant vermindert.



**Abb.15 Verminderte Expression von IL-11 und IL-22 in Knochenmarkmakrophagen ist NF- $\kappa$ B-unabhängig**

Bestimmung relativer mRNA- Level mittels Real-Time PCR in IKK $\beta$  WT und KO Knochenmarkmakrophagen vor und nach 4-stündiger LPS-Stimulation (100ng/ $\mu$ l)

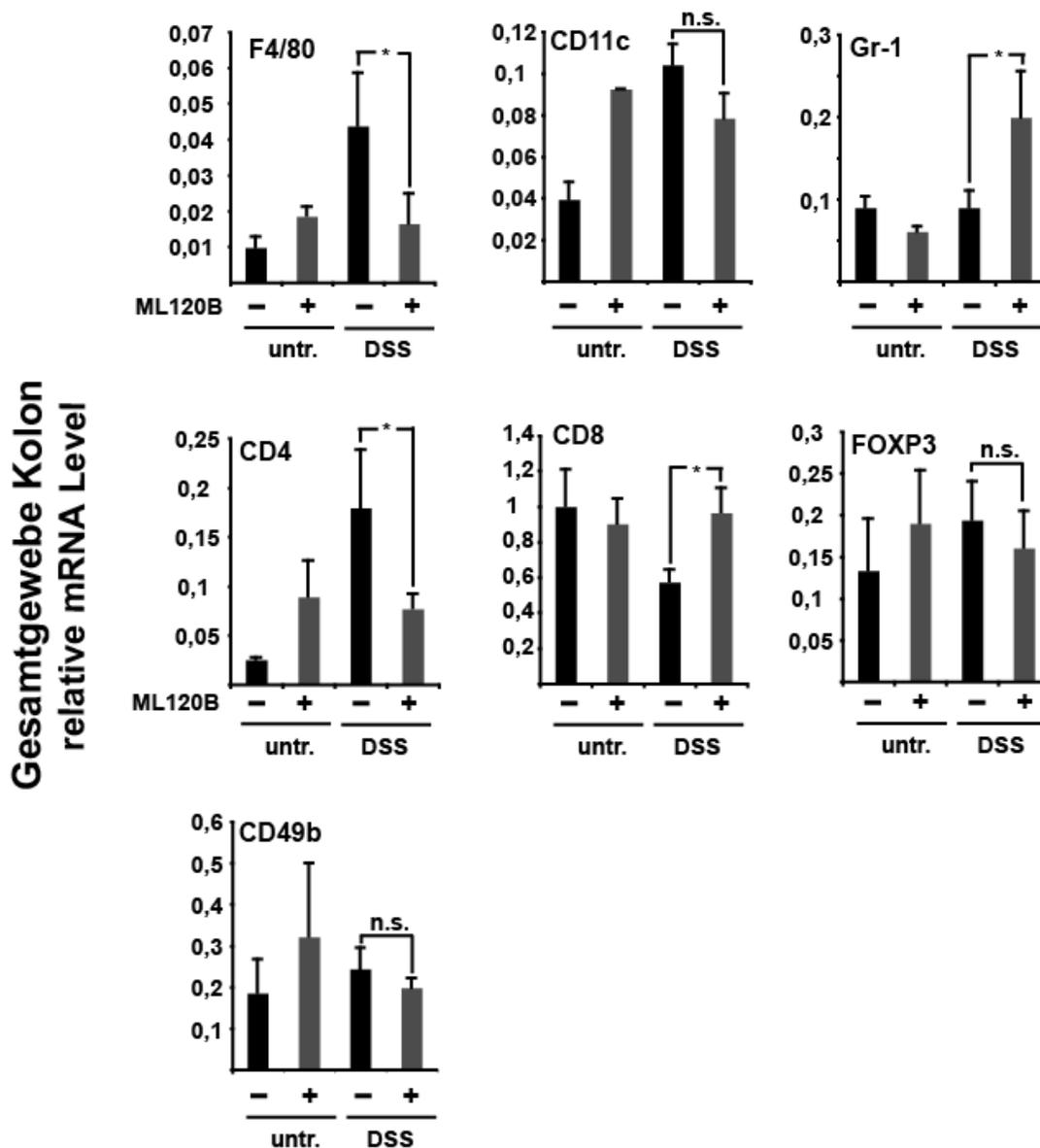
Da eine direkte Regulation von *Il-11* und *Il-22* durch NF- $\kappa$ B ausgeschlossen werden konnte, sollte untersucht werden, ob die fehlende Zytokinexpression in IKK $\beta$ -defizienten Tieren Ausdruck einer gestörten Rekrutierung von immunkompetenten Zellen ist. Diese Hypothese wurde durch die Analyse der Microarray-Daten unterstützt, die eine deutlich eingeschränkte Expression verschiedenster Chemokine in IEC von ML120B behandelten Versuchstieren zeigte. Da verschiedenste Zellpopulationen in der Lage sind, diese Botenstoffe parakrin freizusetzen, wurde zunächst die Expression von spezifischen Oberflächenmarkern immunkompetenter Zellen in der Gesamtmukosa mittels Real-Time PCR analysiert.

Zu den getesteten Markern gehörten CD11c für dendritische Zellen, F4/80 als Makrophagen-spezifisches Oberflächenmolekül, CD4 und CD8 als T-Zell-Marker, Gr1 für neutrophile Granulozyten, CD49 für natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Foxp3, charakteristisch für regulatorische T-Zellen (T-reg-Zellen).

Oberflächenantigen	Zelltyp
CD11c	Dendritische Zellen
F4/80	Makrophagen
CD4	T-Zellen
CD8	T-Zellen
GR1	Neutrophile
CD49	Natürliche Killerzellen
Foxp3	Regulatorische T-Zellen

**Abb.16 Zusammenstellung von Oberflächenmarkern immunkompetenter Zelltypen**

Die Auswertung der quantitativen mRNA Analyse zeigte, dass nach DSS-Applikation in Inhibitor-behandelten Tieren die Expression der Oberflächenmarker für Makrophagen, neutrophile Granulozyten und CD4-positive T-Zellen signifikant reduziert war. Die Expression der Marker für NK Zellen, CD8- positive T-Zellen und regulatorische T-Zellen war nicht beeinflusst. Gr-1, ein charakteristisches Oberflächenmolekül der neutrophilen Granulozyten, war in ML120B behandelten Tieren erhöht. Diese Beobachtung passt zu der in der Literatur bereits beschriebenen Entwicklung einer Neutrophilie bei Applikation des Inhibitors (Greten et al., 2007; Nagashima et al., 2006) und der im Zuge dieser Arbeit gemachten Beobachtung in der Elektronenmikroskopie (siehe auch Abb. 9).



**Abb.17 Pharmakologische IKK $\beta$ -Inhibition resultiert in einer insuffizienten Rekrutierung von inflammatorischen Zellen**

Bestimmung relativer mRNA Level von Oberflächenmarkern immunkompetenter Zellen in der Gesamtmukosa des Kolons mittels Real-Time-PCR. Vergleich der Versuchstiere an Tag 7 nach 5-tägigem DSS-Zyklus und anschließender Behandlung mit ML120B bzw. Vehikel.

#### 4.4 Epithelspezifische Deletion von *Ikkβ* nach Initiation der Heilungsphase hat keinen Einfluss auf den Heilungsprozess

Um zu bestätigen, dass eine eingeschränkte Rekrutierung von Entzündungszellen in IKKβ-defizienten Tieren die Initiation der Heilungsphase beeinträchtigt, wurde ein Mausmodell etabliert, das eine induzierbare *Ikkβ*-Deletion in intestinalen Epithelzellen ermöglicht. Diese Mäuse besitzen eine durch Tamoxifen induzierbare Cre-Recombinase, die unter der Kontrolle des enterozyten-spezifischen Villin-Promoters steht. Nach Verkreuzung mit *Ikkβ<sup>fl/fl</sup>* Tieren, führt die orale Gabe von Tamoxifen an 5 aufeinander folgenden Tagen zur epithelspezifischen Deletion von *Ikkβ*. Die Expression von IKKβ in der Lamina propria und allen anderen getesteten Geweben unterscheidet sich bei diesem Modell nicht von Wildtyp-Tieren.

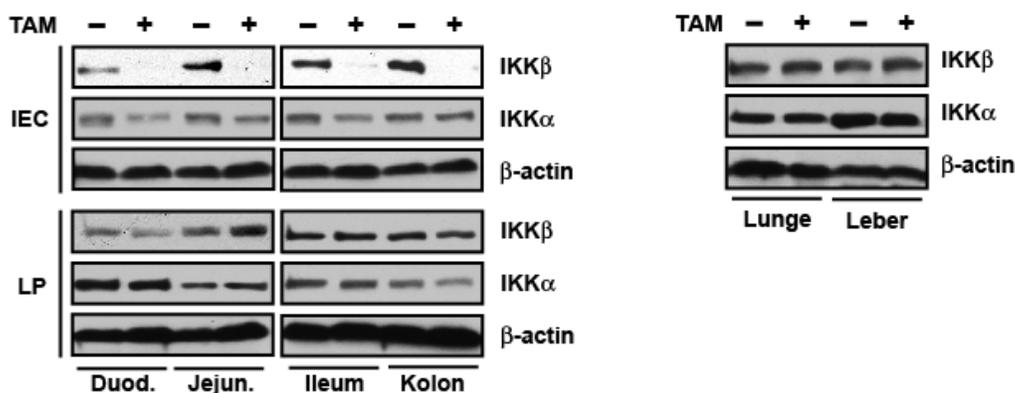
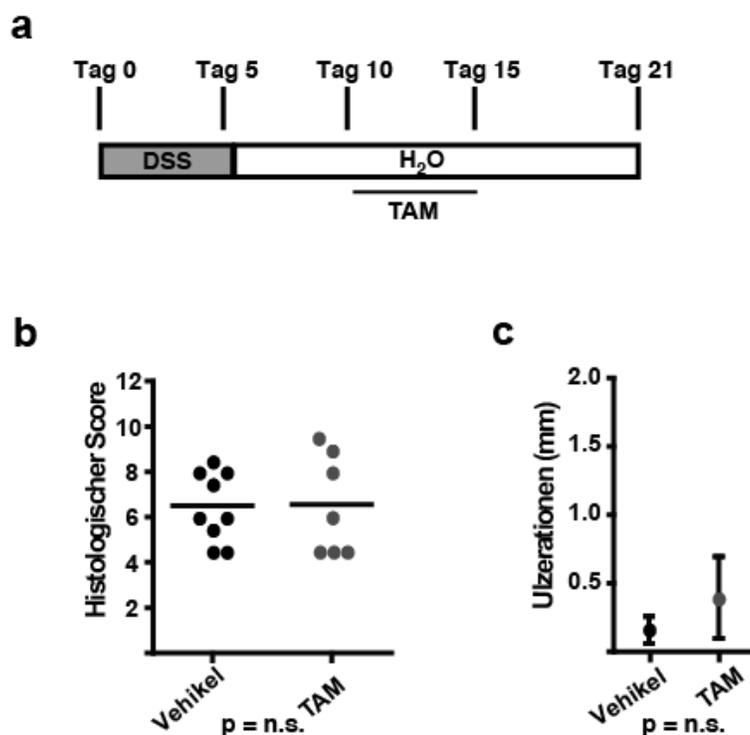


Abb.18 IKKβ Expression in *Villin Cre ERT2 Ikkβ<sup>ΔIEC</sup>* Mäusen

Immunoblot Analyse zum Nachweis der selektiven Ablation von IKKβ in intestinalen Epithelzellen im Duodenum, Jejunum, Ileum, Kolon in *villin Cre ERT2 Ikkβ<sup>ΔIEC</sup>* Versuchstieren nach Induktion der Cre-Recombinase durch 1mg Tamoxifen (TAM) für 5 Tage.

In den oben beschriebenen *Villin Cre ERT2 Ikkβ<sup>IEC</sup>* Mäusen wurde nach 5-tägiger Applikation von DSS im Trinkwasser an Tag 10 durch die Gabe von Tamoxifen eine epithelspezifische Deletion von *Ikkβ* induziert. Mit Beginn der Deletion an Tag 10 war die Initiation der Heilungsphase bereits abgeschlossen. Anders als in den konstitutiven *Ikkβ<sup>IEC</sup>* Tieren zeigten diese Mäuse in der histologischen Analyse an Tag 21 keinen signifikanten Unterschied im Ergebnis des Heilungsprozesses bzw. im Schweregrad der Entzündung.



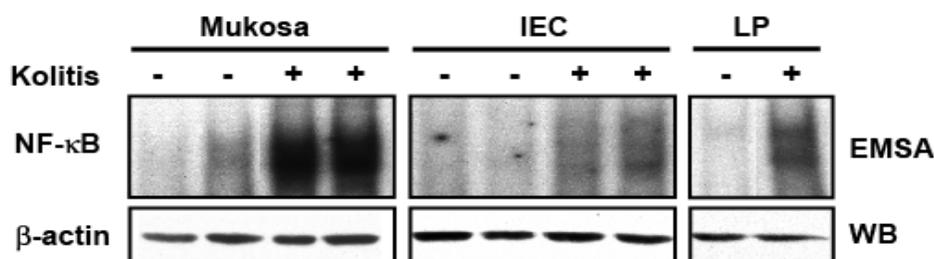
**Abb.19** Deletion von *Ikkβ* in IEC nach Initiation der Heilungsphase hat keinen Einfluss auf den Heilungsprozess

(a) Schematischer Überblick der DSS und Tamoxifen Applikation in *Villin-Cre-ERT2/Ikkβ<sup>IEC</sup>* Mäusen. (b) histologische Analyse des Schweregrades der Entzündung und der Größe der Ulzerationen (c) 21 Tage nach Beginn der DSS-Gabe in *Villin-Cre-ERT2/Ikkβ<sup>IEC</sup>* Tieren.

Im Zusammenhang mit den Ergebnissen aus den anderen Mausmodellen zeigt dieser Versuch, dass die für die Initiation der Heilungsphase wichtige Rekrutierung von Immunzellen bereits in der frühen Phase der Entzündung stattgefunden haben muss. Die für den Verlauf der Heilungsphase wichtige parakrine Freisetzung von IL-11 und IL-22 durch immunkompetente Zellen und die damit assoziierte Aktivierung epithelialer Schutzmechanismen via HSP70 verläuft dann im Gegensatz zur Rekrutierung der entsprechenden Zelltypen NF- $\kappa$ B unabhängig.

#### 4.5 Inhibition der IKK $\beta$ -abhängigen NF- $\kappa$ B-Aktivierung in intestinalen Epithelzellen hat keinen Einfluss auf den Verlauf einer T-Zell-assoziierten chronischen Kolitis

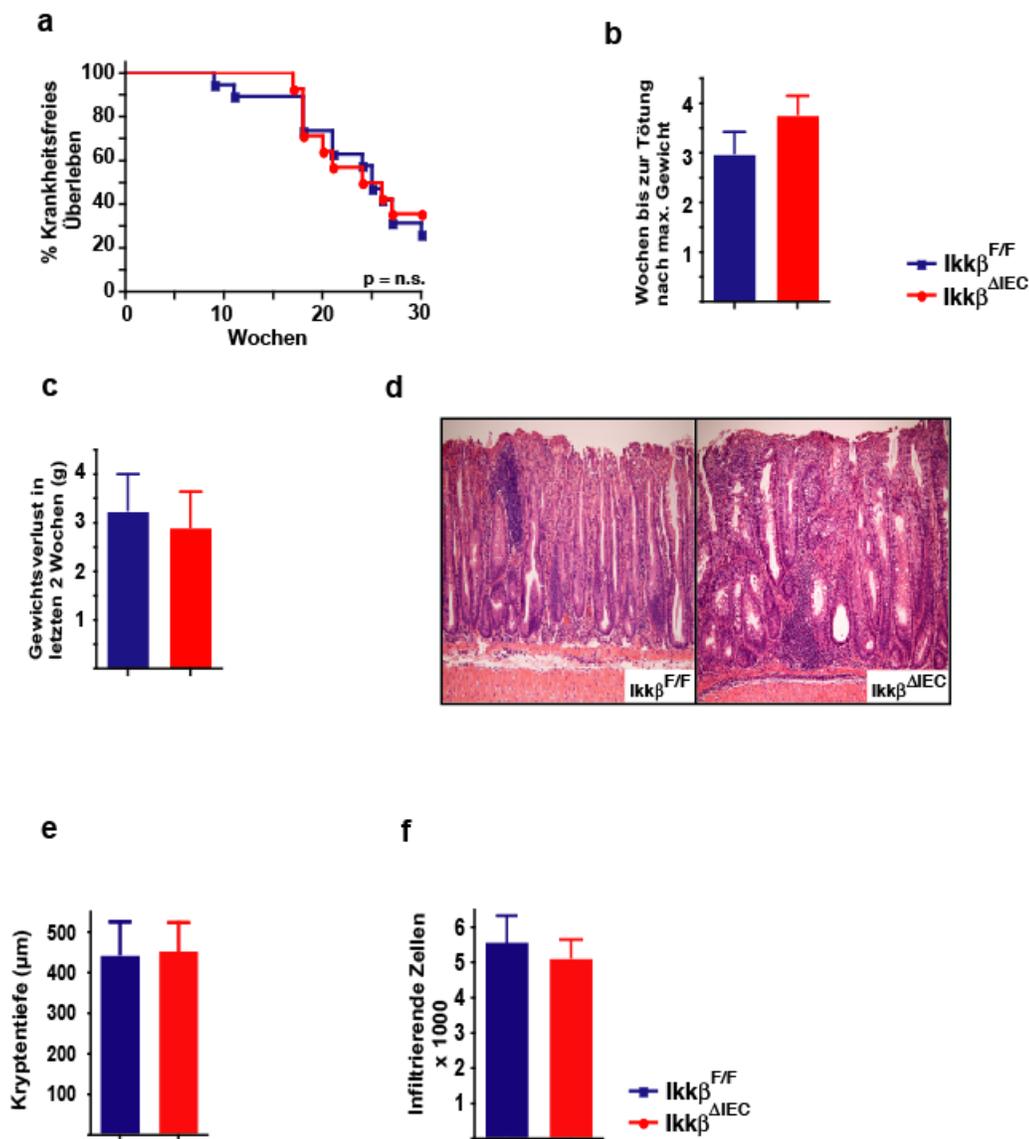
Um die Funktion von IKK $\beta$  im Rahmen von nicht-ulzerierenden Entzündungsprozessen im Gastrointestinaltrakt zu untersuchen wurde ein T-Zell-assoziiertes Kolutismodell verwendet. IL-10 defiziente Mäuse entwickeln über Monate eine spontane nicht-ulzerierende Enterokolitis, die von einer massiven Infiltration der Schleimhaut mit Lymphozyten, aktivierten Makrophagen und neutrophilen Granulozyten begleitet wird (Kuhn et al., 1993). Die Analyse der entzündlich veränderten Darmschleimhaut mittels EMSA zeigte sowohl in Epithelzellen, als auch in der Lamina propria der Kolonschleimhaut eine deutliche NF- $\kappa$ B-Aktivierung.



**Abb.20 Spontane Enterokolitis in IL-10 defizienten Mäusen ist mit einer gesteigerten NF- $\kappa$ B-Aktivierung in Epithelzellen und der Lamina propria assoziiert**

Analyse der NF- $\kappa$ B DNA-Bindeaktivität in intestinalen Epithelzellen, Lamina propria und Gesamtmukosa des Kolons von *Il-10*<sup>-/-</sup>Mäusen mit und ohne klinische Zeichen einer Kolitis

Um festzustellen, inwiefern epithelspezifische NF-κB-Aktivierung auch im Rahmen einer T-Zell-assoziierten Kolitis Einfluss auf den Verlauf der Entzündungsreaktion nimmt, wurden *Il-10*<sup>-/-</sup> Mäuse mit konditionalen *Ikkβ*<sup>ΔIEC</sup>-Mäusen verpaart. Als Kontrollen dienten IL-10-defiziente Mäuse mit geflochtenen *Ikkβ*-Allelen (*Ikk*<sup>F/F</sup>) und keine Cre-Rekombinase exprimieren. Im Vergleich zu dieser Kontrollgruppe zeigten *Il-10*<sup>-/-</sup>/*Ikkβ*<sup>ΔIEC</sup> Tiere keinen signifikanten Unterschied im klinischen Verlauf der Kolitis. Unabhängig vom Genotyp verloren die Tiere circa 20% ihres maximalen Körpergewichts im gleichen Zeitintervall. Auch der Gewichtsverlust in den letzten 2 Wochen vor Krankheitsbeginn -definiert durch einen Gewichtsverlust von 20% in Bezug auf das Maximalgewicht- war nicht signifikant verschieden. Die histologische Analyse zeigte ebenfalls keine relevanten Unterschiede in der Ausprägung bzw. im Schweregrad der Entzündung im Kolon. Die beobachtete vermehrte NF-κB-Aktivierung in den Epithelzellen scheint damit das Modell nicht maßgeblich zu beeinflussen.



**Abb.21 Epitheliale Inhibition der IKK $\beta$ -abhängigen NF- $\kappa$ B-Aktivierung hat keinen Einfluss auf den Verlauf einer T-Zell-assoziierten Kolitis**

(a)Kaplan Meier-Überlebenskurven von  $Ikk^{F/F}$  bzw.  $Ikk\beta^{\Delta IEC}$  Versuchstieren auf einem IL-10 defizienten Hintergrund; (b) Wochen bis zur Tötung der Versuchstiere nach maximalen Gewichtsverlust; (c) Gewichtsverlust in g während der letzten 2 Wochen vor Krankheitsbeginn - definiert durch Gewichtsverlust von 20% bezogen auf das Maximalgewicht der Maus); (d)Repräsentative H&E Färbung von  $Ikk\beta^{F/F}/Il-10^{-/-}$  und  $Ikk\beta^{\Delta IEC}/Il-10^{-/-}$ -Mäusen; (e)Analyse der Kryptentiefe und Anzahl der infiltrierenden Zellen (f).

#### 4.6 Verlust von IKK $\beta$ in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten mildert den Verlauf und verlängert das Überleben im T-Zell-assoziierten Entzündungsprozessen

Um zu prüfen, ob die beobachtete gesteigerte NF- $\kappa$ B-Aktivität auf eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung in inflammatorischen Zellen in der Lamina propria zurückzuführen ist und diese so Einfluss auf den Verlauf der Kolitis nehmen, wurden IL-10-defiziente Mäuse mit *Ikk $\beta$ <sup>mye</sup>* Mäusen verkreuzt. In *Ikk $\beta$ <sup>mye</sup>* Mäusen ist *Ikk $\beta$*  selektiv in Zellen der myeloiden Zellreihe deletiert. Die Abwesenheit von IKK $\beta$  in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in IL-10 defizienten Tieren führte zu einer signifikanten Verlängerung des Überlebens. Die spezifische Inhibition der klassischen IKK $\beta$ -abhängigen NF- $\kappa$ B-Aktivierung in inflammatorischen Zellen im Rahmen von T-Zell-assoziierten chronischen Entzündungsprozessen im Gastrointestinaltrakt hat damit im Gegensatz zur epithelialen Inhibition einen deutlichen antiinflammatorischen Effekt.

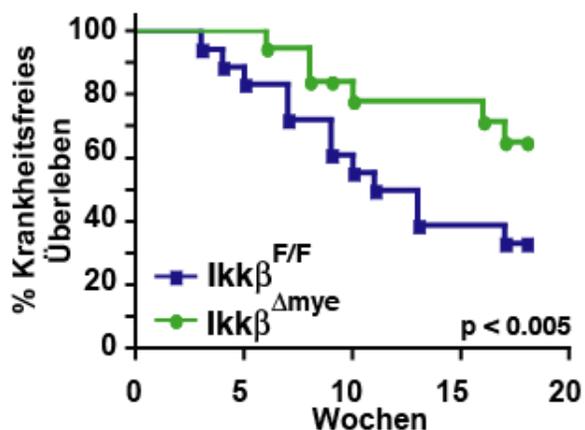
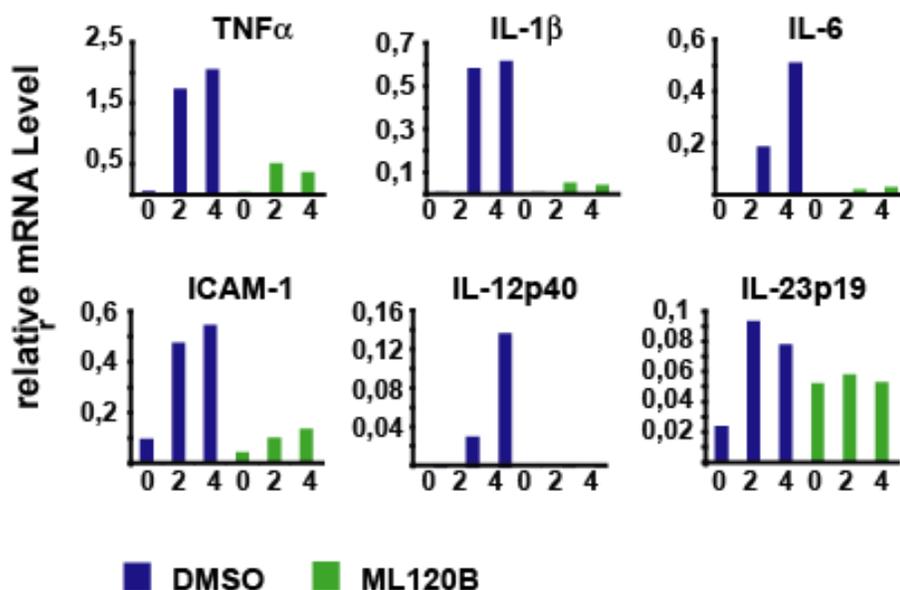


Abb.22 Ablation von IKK $\beta$  in myeloiden Zellen verlängert das Überleben im Rahmen einer T-Zell-assoziierten Kolitis

Kaplan-Meier-Überlebenskurven von *Ikk $\beta$ <sup>mye</sup>* verglichen mit *Ikk $\beta$ <sup>F/F</sup>* Versuchstieren

In der Literatur ist eine Vielzahl von inflammatorischen Zytokinen beschrieben, die im Verlauf einer chronischen Kolitis eine wichtige Rolle spielen und den chronischen Entzündungsprozess aufrechterhalten. Zu den wichtigsten gehören neben TNF- $\alpha$  und IL-1, IL-6, IL-12 und IL-23 (Baumgart and Carding, 2007; Rogler et al., 1998). Um zu klären, ob die Deletion von IKK $\beta$  in myeloiden Zellen Einfluss auf die Transkription diverser Zytokine hat, wurden Knochenmarkmakrophagen aus IL-10 defizienten Tieren isoliert und anschließend mit LPS stimuliert. Daraufhin wurde mittels Real-Time PCR die mRNA Expression für *Tnf- $\alpha$* , *Il-1 $\beta$* , *Il-6*, *Icam-1*, *Il12-p40* und *Il23-p19* untersucht. Während die alleinige Stimulation mit LPS zu einer deutlichen Induktion der untersuchten Zytokine führte, blieb diese bei vorheriger Inhibition von IKK $\beta$  durch ML120B aus.



**Abb.23 IKK $\beta$ -Inhibition führt zur reduzierten Transkription von inflammatorischen Zytokinen in IL-10 defizienten Knochenmarkmakrophagen**

Bestimmung relativer mRNA Level mittels Real-Time PCR in mit LPS (100ng/ml) behandelten IL-10-defizienten Knochenmarkmakrophagen mit und ohne ML120B-Stimulation (30 $\mu$ M) zu den angegebenen Zeitpunkten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass IKK $\beta$  im Rahmen einer chemisch induzierten akuten Kolitis, die mit einem massiven epithelialen Schaden assoziiert ist, im Epithel neben der Induktion von anti-apoptotischen Genen, über die Rekrutierung von Immunkompetenten Zellen wichtige epitheliale Schutzmechanismen vermittelt. Im Gegensatz dazu besitzt IKK $\beta$  bei nicht-ulzerierenden T-Zell-assoziierten Entzündungsprozessen proinflammatorischen Charakter. Dieser Effekt ist von der IKK $\beta$ -Aktivität in myeloischen Zellen abhängig. Hier kommt es zur NF- $\kappa$ B-abhängig zur vermehrten Transkription von proinflammatorischen Zytokinen, die den Entzündungsprozess aufrechterhalten. Epitheliale NF- $\kappa$ B-Aktivität beeinflusst hingegen den Verlauf und die Ausprägung der Erkrankung nicht.

## 5 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen den protektiven Charakter epithelialer NF- $\kappa$ B-Aktivierung im Rahmen von akut ulzerierenden Entzündungsprozessen im Gastrointestinaltrakt. Außerdem konnte die Hypothese eines parakrinen Modells bestätigt werden, indem die pharmakologische Inhibition von IKK $\beta$  die Zytokinexpression in Epithelzellen signifikant mindert und damit eine suffiziente Rekrutierung von inflammatorischen Zellen verhindert wird. Die Abwesenheit dieser Zellen resultiert einer eingeschränkten parakrinen Freisetzung von IL-11 und IL-22, beides Interleukine, die für eine epitheliale STAT3-abhängige Induktion des zytoprotektiv wirkenden Hitze Schock Proteins HSP70 entscheidend sind.

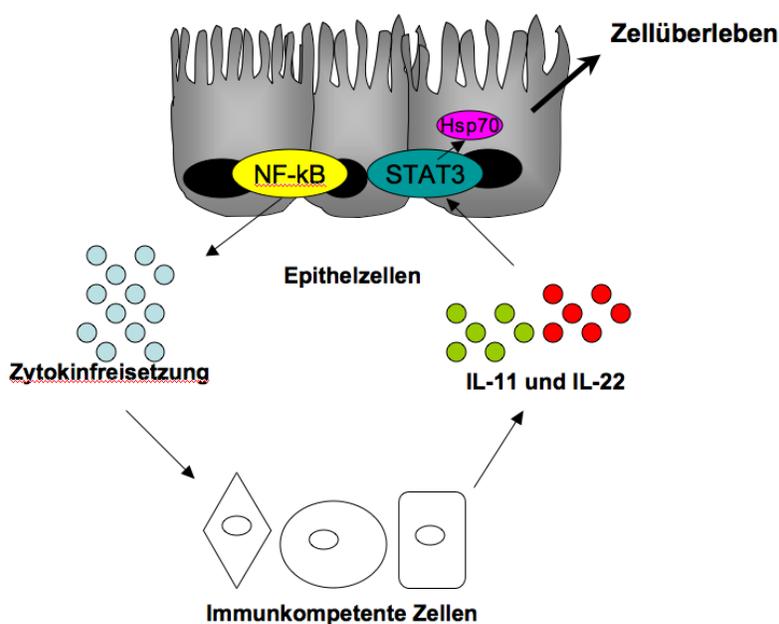


Abb.24 Schematische Darstellung des parakrinen Modells

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei chronischen nicht-ulzerierenden Entzündungsprozessen, die im Gegensatz zu akuten Verlaufsformen nicht mit einer exzessiven Schädigung der Mukosa einhergehen, die proinflammatorischen Eigenschaften NF- $\kappa$ Bs in myeloischen Zellen dominieren. Die Inhibition der IKK $\beta$ -abhängigen NF- $\kappa$ B-Aktivierung in myeloischen Zellen wirkte durch verminderte Transkription von proinflammatorischen Zytokinen der chronischen Entzündungsreaktion entgegen und verlängerte das Überleben der Versuchstiere. Durch eine zellspezifische und die Entzündungsphase berücksichtigende Analyse der NF- $\kappa$ B Funktion ist es gelungen, die scheinbar widersprüchlichen Daten im Rahmen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen zu relativieren (MacMaster et al., 2003; Neurath et al., 1996).

Greten et al. beobachteten, dass es durch den epithelspezifischen Verlust von IKK $\beta$  während der akuten Phase einer Kolitis zur Exazerbation der Entzündungsreaktion kommt (Greten et al., 2004). Ebenso ist die epithelspezifische Deletion von IKK $\gamma$  in der Maus mit einer schweren, sich spontan entwickelnden Enterokolitis assoziiert. Die Ablation der klassischen NF- $\kappa$ B Aktivierung führte in diesem Modell zu vermehrter Apoptose von intestinalen Epithelzellen und einer signifikant eingeschränkten Expression von antimikrobiellen Peptiden. Im Zusammenhang mit einem verstärkten epithelialen Defekt konnte auch eine vermehrte Translokation von Bakterien in die Mukosa beobachtet werden. Die im Anfangsstadium durch Makrophagen und Granulozyten dominierte Entzündungsreaktion wird im Verlauf der Erkrankung mehr und mehr durch das Auftreten von T-Zellen charakterisiert. Neben der Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren durch bakterielle Membranbestandteile konnte auch eine gesteigerte Sensibilität der Epithelzellen gegenüber TNF- $\alpha$  als Ursache für die Entstehung der Kolitis in diesem Modell identifiziert werden (Nenci et al., 2007).

Beide Publikationen unterstreichen den protektiven Effekt einer suffizienten klassischen NF- $\kappa$ B-Aktivierung während der Entstehungsphase einer Kolitis auf epithelialer Ebene. NF- $\kappa$ B vermittelt hier seine zytoprotektive Wirkung durch eine gesteigerte Transkription von anti-apoptotischen Genen wie z.B. *Bcl-x*. Über diesen bereits beschriebenen Mechanismus hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden,

dass NF- $\kappa$ B in Epithelzellen die Expression von Zytokinen reguliert, die für die Rekrutierung von inflammatorischen Zellen, wie z.B. Makrophagen und T-Zellen essentiell ist. Es ist bekannt, dass diese Zellen speziell im Rahmen einer chemisch induzierten akuten Kolitis wichtige antiinflammatorische Aufgaben übernehmen, indem sie zytoprotektive Zytokine, wie z.B. IL-11 und IL-22, freisetzen. Der zytoprotektive Effekt dieser Interleukine im Zusammenhang akuter Entzündungsprozesse im Darm konnte bereits durch die direkte Gabe oder durch lokale Genüberexpression *in vivo* demonstriert werden (Qualls et al., 2006; Sugimoto et al., 2008).

Peterson et al. zeigten, dass humanes rekombinantes Interleukin 11 die klinischen Symptome einer Kolitis im Tiermodell für chronisch entzündliche Darmerkrankungen signifikant mindert (Peterson et al., 1998). Real-Time PCR-Analysen demonstrierten, dass es durch die lokale Applikation des Interleukins zu einer signifikanten Suppression der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  kommt. Ferner kontrolliert IL-11 die Aktivität der Myeloperoxidase, ein Enzym in neutrophilen Granulozyten, dass bei der Regulation und Terminierung von Entzündungsreaktionen eine bedeutende Rolle spielt. Neben seiner antiinflammatorischen Funktion fördert IL-11 die Proliferation der Epithelzellen in der Krypte und fördert dadurch die Regeneration der Mukosa (Sugimoto, 2008).

Andere Studien haben gezeigt, dass Zytokine neben ihren immunmodulatorischen Effekten auch direkt gastrointestinale Funktionen, wie z.B. den intestinalen Wasser- und Ionentransport beeinflussen. So fördern antiinflammatorische Zytokine, wie z.B. IL-10 und IL-4 die intestinale Absorption von Natrium und Chlorid (Madsen et al., 1997; Zund et al., 1996), während proinflammatorischen Zytokine wie IL-1 und IL-3, die Chloridsekretion stimulieren (Chiossone et al., 1990). In einem Rattenmodell für chronisch entzündliche Darmerkrankungen konnte unterstützend gezeigt werden, dass die Wasser- und ElektrolytabSORption im Gastrointestinaltrakt IL-11 abhängig ist. Die Gabe von IL-11 führte zur Normalisierung der Stuhlkonsistenz und verminderte den Gewichtsverlust der Tiere signifikant (Keith et al., 1994).

Elektrolytverschiebungen stellen auch beim Menschen einen zentralen Aspekt bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen dar. Erkrankte Personen leiden unter schwerer Diarrhö und konsekutiver Malabsorption. Der assoziierte Gewichtsverlust führt schnell zu einer starken Verschlechterung des Allgemeinzustandes und reduziert damit entscheidend die Lebensqualität des Patienten deutlich.

Neben IL-11 ist auch die Expression von IL-22 im Rahmen von entzündlichen Prozessen signifikant gesteigert. Patienten, die unter chronisch entzündlichen Darmkrankheiten leiden, weisen deutlich erhöhte IL-22-Level in der intestinalen Schleimhaut auf (Andoh et al., 2005; Brand et al., 2006). Die genaue Funktion von IL-22 im Zuge von akuten und chronischen Entzündungen im Gastrointestinaltrakt bleibt allerdings noch unklar. Der IL-22-Rezeptor ließ sich bisher nur auf Zellen des angeborenen Immunsystems nachweisen. Zellen des erworbenen Immunsystems, wie z.B. T- und B-Lymphozyten, exprimieren den Rezeptor nicht. Interessanterweise besitzt IL-22 im Zuge von Entzündungsreaktionen in Abhängigkeit des Gewebes sowohl pro- als auch antiinflammatorischen Charakter. 2008 demonstrierten Sugimoto et al, dass die lokale Mikroinjektion des IL-22-Gens in entzündlich veränderte Darmareale mit einem Rückgang der Entzündungsreaktion assoziiert war.

In einem anderen Mausmodell für eine TH2-mediierte Kolitis führte die, durch Mikroinjektion induzierte, Überexpression des IL-22 Gens in Epithelzellen des Kolons zu einer gesteigerten STAT3-Aktivierung. Die darauf folgende STAT3-abhängig Expression von Mukosa-assoziierten Molekülen war mit einer deutlich schnelleren Regeneration mukusproduzierender Becherzellen assoziiert. Außerdem wiesen IL-22 behandelte Tiere eine gesteigerte Mukusproduktion auf, die für eine intakte Barrierefunktion essentiell ist und dessen Fehlen als ein wichtiger Aspekt bei der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen diskutiert wird.

Unterstützend wurde gezeigt, dass bei Überexpression des IL-22-bindenden Proteins die Regeneration der Becherzellen in der Heilungsphase einer durch DSS induzierten Kolitis deutlich eingeschränkt ist (Sugimoto et al., 2008). Die im Zuge dieser Arbeit angefertigte Analyse zur Zytokinexpression und deren Wirkung auf das Epithel während der unterschiedlichen Entzündungsphasen wies einschlägige Parallelen zu den oben

angeführten Ergebnissen auf. Sowohl die Expression von IL-11 als auch von IL-22 war in Gesamtmukosaextrakten signifikant vermindert und zudem mit einem nahezu kompletten Verlust des Hitze-Schock-Proteins 70 in Epithelzellen assoziiert.

Hitze-Schock-Proteine übernehmen in eukaryotischen Zellen elementare Aufgaben. Sie arbeiten jeweils mit ihrem eigenen Satz an assoziierten Proteinen, die ihnen helfen, andere Proteine zu falten bzw. entfalten. Die korrekte Konformation und damit auch die Funktion eines Proteins werden dabei durch eine spezielle Klasse von Proteinen, die man als molekulare Chaperone bezeichnet, ermöglicht. Chaperone sind feste Bestandteile der Hitze-Shock-Proteine, welche in großer Anzahl synthetisiert werden, wenn eine Zelle thermischem oder oxidativem Stress ausgesetzt wird. Dieser Prozess wirkt folgeschweren Fehlfaltungen von Proteinen entgegen und verhindert somit ihren proteasomalen Abbau (Bukau et al., 2000; Hartl and Hayer-Hartl, 2002; Mayer and Bukau, 2005).

HSP70 interagiert mit einer Vielzahl von zentralen Regulatoren von diversen Signaltransduktionswegen, die wichtige Funktionen der Zellhomöostase wie z.B. Proliferation, Differenzierung, und Apoptose kontrollieren (Bukau and Horwich, 1998). So wurde zum Beispiel gezeigt, dass HSP70 via Modulation von Caspasen Apoptose induzierende Signale inhibieren kann. Außerdem soll die Überexpression von HSP70 zu einer Resistenz gegenüber proapoptotischen Zytokinen und diversen Chemotherapeutika führen, während die Suppression von HSP70 durch Antisense-Technologie die Sensitivität gegenüber den oben genannten Stimuli erhöht (Jaattela, 1999; Jaattela et al., 1998; Mayer, 2005). Diese Beobachtungen stehen in Beziehung zu diversen pathologischen Prozessen in der Onkogenese. In verschiedensten Tumoren lassen sich erhöhte HSP70-Level nachweisen, die mit Malignität und Therapieresistenz des Tumors korrelieren. Niedrige Konzentrationen von HSP70 unterstützen hingegen Differenzierung und Apoptoseinduktion in Tumorzellen (Nylandsted et al., 2000).

Neben seiner bedeutenden Funktion in Tumoren soll HSP70 ebenfalls ein großes zytoprotektives Potential in intestinalen Epithelzellen besitzen. Es existieren einschlägige Daten, dass die transgene Expression von HSP70 in intestinalen Epithelzellen einer DSS-induzierten Kolitis entgegen wirkt (Laubitz et al., 2006; Sikora and Grzesiuk, 2007).

*Hspa1a* kodiert für HSP70 und steht unter Kontrolle des Transkriptionsfaktors STAT3 (Stephanou and Latchman, 1999). Der Promotor von *Hspa1a* besitzt keine NF- $\kappa$ B-Bindungsstellen und auch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt zu keiner Induktion von HSP-70, so dass nicht von einer direkten Regulation durch NF- $\kappa$ B ausgegangen werden kann. Wie in dieser Arbeit demonstriert werden konnte, kommt es durch epitheliale NF- $\kappa$ B-abhängige Zytokinfreisetzung zur Rekrutierung von myeloischen Zellen und T-Lymphozyten, die wiederum IL-11 und IL-22 in hohem Maße sezernieren können. Sowohl IL-11 als auch IL-22 führen via STAT3 zur Induktion von HSP70 (Nagalakshmi et al., 2004; Sugimoto, 2008). Die Rekrutierung von immunkompetenten Zellen ist NF- $\kappa$ B-abhängig und damit essentiell für die Induktion des zytoprotektiven HSP70 in intestinalen Epithelzellen.

Neue Untersuchungen über Funktion von STAT3 im Zusammenhang mit Kolitis assoziierter Tumorentstehung unterstreichen diesen zytoprotektiven Effekt des Transkriptionsfaktors. Enterozytenspezifische Deletion von *Stat3* führt in DSS stimulierten Mäusen zu einer deutlich schwereren Ausprägung der Kolitis. Es konnte gezeigt werden, dass STAT3-Aktivierung in Enterozyten vor Apoptoseinduktion schützen kann und somit die Wundheilung maßgeblich unterstützt. Während Wildtyptiere nach Absetzen des DSS schnell wieder an Gewicht zunehmen, erholen sich STAT3 defiziente Mutanten signifikant langsamer (Bollrath et al., 2009).

STAT3 wurde ebenfalls als ein wichtiges Bindeglied zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunantwort identifiziert und nimmt damit eine entscheidende Funktion bei der Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ein. Makrophagen in der Darmwand unterliegen einer ständigen Stimulation durch bakterielle Antigene. Die selektive Inhibition von STAT3 in Makrophagen provoziert eine chronische Kolitis im Darm der Maus. In STAT3 defizienten Mutanten befinden sich die Makrophagen

und neutrophile Granulozyten in einem konstitutiv aktiven Status und sezernieren als Antwort auf inflammatorische Stimuli großen Mengen an proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12 und IL-18 (Takeda et al., 1999).

Von entscheidender Bedeutung ist hier das Zytokin IL-10, das als Gegenspieler der Entzündung agiert. Unter physiologischen Verhältnissen wird IL-10 kontinuierlich aus Makrophagen und neutrophilen Granulozyten der Darmwand auto- bzw. parakrine freigesetzt und hemmt so durch Aktivierung von STAT3 eine überschießende Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen aus inflammatorischen Zellen. Dadurch vermittelt es wichtige antiinflammatorische Effekte und hält die Entzündungsreaktion im Gleichgewicht. IL-10 defiziente Mutanten besitzen diese Möglichkeit der Gegenregulation nicht, so dass entzündlich veränderte Areale durch eine hohe Konzentration von proinflammatorischen Zytokine gekennzeichnet sind. Ferner kommt es bei IL-10 Mutanten zur verstärkten Infiltration von T-Helferzellen in die Darmwand. Diese T-Zellpopulation wird von TH1 Zellen dominiert, die massiv TNF- $\alpha$  produzieren können. TNF- $\alpha$  stimuliert wiederum Makrophagen, die via Sekretion von IL-12 und IL-18 die Rekrutierung von weiteren TH-1 Zellen fördern und so die Entzündungsreaktion aufrecht erhalten (Takeda et al., 1999).

Auf der anderen Seite fördert STAT3 das Überleben von autoreaktiven T-Zellen. Diese Zellen besitzen bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen eine zentrale Position, indem sie ohne adäquaten Reiz inflammatorische Zytokine sezernieren und so eine Immunantwort auslösen. Die zum Teil gegensätzlichen Funktionen von STAT3 in den verschiedenen Zellpopulation machen therapeutische Ansätze derzeit sehr schwierig (Atreya et al., 2000; Sugimoto, 2008).

Im Gegensatz zur akuten ulzerierenden Kolitis beeinflusst die epitheliale IKK $\beta$ -Expression den Verlauf und die Ausprägung einer chronischen Kolitis nur unwesentlich. Der Motor der chronischen Kolitis ist im Vergleich zur akuten Kolitis nicht der direkte Epithelschaden, sondern eine immunologische Dysregulation. In IL-10-defizienten Versuchstieren unterhält ein Ungleichgewicht zwischen entzündungsprovozierenden T-Effektor-Zellen und entzündungshemmenden regulatorischen T-Zellen im die Entzündung (Kuhn et al., 1993). Epithelialer Schaden ist kein zentrales Charakteristikum und tritt erst spät im Verlauf als Folge der Einwanderung von inflammatorischen Zellen auf und ist dann eher durch epitheliale Hyperproliferation als durch die typischen Ulzerationen gekennzeichnet (Rennick and Fort, 2000). Zwar konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass es zu einer vermehrten NF- $\kappa$ B-Aktivierung im Epithel kommt, diese nimmt jedoch keinen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung nimmt.

Im Gegensatz dazu verlängert die Deletion von *Ikk $\beta$*  in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten das Überleben der Maus im Rahmen einer T-Zell-assoziierten chronischen Kolitis. Es konnte gezeigt werden, dass NF- $\kappa$ B in myeloiden Zellen in diesem Szenario verstärkt proinflammatorische Eigenschaften vermittelt und so entscheidend an der Aufrechterhaltung des Entzündungsprozesses beteiligt ist.

Die Daten knüpfen damit an zuvor veröffentlichte Ergebnisse anderer Autoren an und erklären den antiinflammatorischen Effekt von anti-sense Oligonukleotiden gegen NF- $\kappa$ B/RelA in anderen T-Zell-assoziierten Kolutismodellen. Neurath et al benutzten neben IL-10-defizienten Versuchstieren ein induzierbares 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) Modell, das stark abhängig von Hintergrund bzw. Genotyp der Maus, aber ebenfalls T-Zell-assoziiert ist. In beiden Modellen konnte eine starke NF- $\kappa$ B/p65-Aktivierung beobachtet werden. Lokale Administration von p65 antisense Oligonukleotiden führte zum Rückgang der klinischen und histologischen Merkmale der Kolitis und war effektiver als eine Glukokortikoidtherapie (Neurath et al., 1996).

Es wird deutlich, dass der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B einen essentiellen und zugleich sehr potenten Modulator von Entzündungsreaktionen darstellt. Neben einer Vielzahl von pro- und antiinflammatorischen Chemokinen und Zytokinen stehen auch diverse

anti-apoptotisch wirksame Proteine unter dem direkten Einfluss NF- $\kappa$ Bs (Karin and Lin, 2002). Gerade diese Tatsache macht die Signalkaskade für pharmakologische Therapieansätze äußerst attraktiv. Unter Berücksichtigung früherer Publikationen und der hier neu gewonnenen Erkenntnisse zeigte sich, dass die dominierende Funktion des Transkriptionsfaktors hochgradig zellspezifisch und auch maßgeblich vom zugrunde liegenden schädigenden Mechanismus abhängig ist. So besitzt NF- $\kappa$ B in intestinalen Epithelzellen im Zuge einer akuten ulzerierenden Kolitis eine Schlüsselfunktion bei der Vermittlung von Zellüberleben. Außerdem reguliert NF- $\kappa$ B die Expression von wichtigen Chemokinen, die zur Rekrutierung inflammatorischer Zellen führen. Während diese Zellen einerseits für proinflammatorische Zytokinexpression verantwortlich sind, aktivieren sie auf der anderen Seite über die Sekretion von IL-11 und IL-22 entscheidende epitheliale Schutzmechanismen. Bei chronischen Entzündungsprozessen, die auf einer Dysfunktion des Immunsystems beruhen und T-Zell-assoziiert sind, dominieren hingegen die proinflammatorischen Effekte der IKK $\beta$ -abhängigen NF- $\kappa$ B-Aktivierung in myeloischen Zellen.

Die Anwendung von pharmakologischen IKK $\beta$ -Inhibitoren in der akuten Phase der Kolitis, so wie sie von MacMaster und Neurath vorgeschlagen wird, erscheint in Anbetracht der hier gewonnenen Ergebnisse absolut kontraindiziert, da sich das akute Krankheitsbild durch Suppression der klassischen NF- $\kappa$ B-Aktivierung deutlich verschlechtern würde. MacMaster et al verwendeten bei ihren Studien allerdings einen anderen IKK-Inhibitor (BMS-345541). Dieser bindet im allosterischen Zentrum von IKK $\beta$  und blockiert nicht kompetitiv die ATP-Bindungsstelle. Eine spezifische Inhibition der NF- $\kappa$ B Aktivierung durch den Inhibitor konnte in der Arbeit auch nicht nachgewiesen werden, so dass der beobachtete Effekt nicht sicher auf eine NF- $\kappa$ B-Inhibition zurückgeführt werden kann. Die Möglichkeit so genannter off-target-Effekte ist daher nicht sicher auszuschließen (MacMaster et al., 2003).

Auch die protektiven Eigenschaften von p65 antisense Oligonukleotiden, die bei Neurath et al. zu einem Rückgang der Entzündungsreaktion führten, konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Epitheliale Deletion von *p65/RelA* in der akuten Phase der Entzündung verstärkte im DSS-Modell die Kolitis, so dass die von Neurath

beobachteten Effekte gegenläufiger p65 Oligonukleotide nicht auf einer Inhibition NF- $\kappa$ Bs im Epithel beruhen können (Neurath et al., 1996).

Trotz intensiver Bemühungen in der Grundlagenforschung zur Entstehung und Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gibt es bisher keinen überzeugenden kausalen Therapieansatz, so dass sich heutige Therapiekonzepte auf die unspezifische Suppression des Immunsystems und der Entzündungsreaktion konzentrieren. Sulfasalazin und Glukokortikoide sind zwei klinisch häufig verwendete Substanzen. Beide Pharmaka interagieren mit dem NF- $\kappa$ B Signalweg und sind in der Lage, diesen auf unterschiedliche Art und Weise zu hemmen. Sulfasalazin besitzt in der NF- $\kappa$ B Signalkaskade mehrere Angriffspunkte. Es ist beschrieben, dass Sulfasalazin die Translokation von RelA/p65 in den Nukleolus blockiert, die Degradation und Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  hemmt und außerdem direkten Einfluss auf die Transkription von NF- $\kappa$ B Zielgenen besitzt (Wahl et al., 1998). Glukokortikoide finden klinisch ebenfalls breite Anwendung. Im Gegensatz zu Sulfasalazin beeinflussen diese die Transkription von I $\kappa$ B $\alpha$ , was in einer Vergrößerung des Pools des Inhibitors resultiert und so die transkriptionelle Aktivität NF- $\kappa$ Bs im Nukleolus einschränkt (Auphan et al., 1995; Scheinman et al., 1995). Beide Substanzen besitzen leider auch zahlreiche unerwünschte Nebenwirkungen, da sie neben der Inhibition von NF- $\kappa$ B auch viele weitere zelluläre Funktionen beeinflussen (Domenech, 2006). Gerade diese Unspezifität und die Interaktion mit anderen Signalwegen scheint aber letztendlich auch die guten klinischen Ergebnisse herbeizuführen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass NF- $\kappa$ B in Abhängigkeit von Zelltyp sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften im Rahmen von Entzündungsprozessen im Gastrointestinaltrakt besitzen kann. Auch die Ausprägung der Entzündungsreaktion -ulzerierend versus nicht ulzerierend- und der Zeitpunkt der NF- $\kappa$ B-Inhibition spielen dabei eine entscheidende Rolle. Bei den meisten entzündlich geprägten Krankheitsbildern treten akute und chronische Stadien der Entzündung nebeneinander auf. Die Indikationsstellung für eine spezifische IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B-Inhibition gestaltet sich damit als äußerst schwierig. Während Patienten mit chronischen, nicht-ulzerierenden Verlaufsformen, bei denen eine Dysfunktion des Immunsystems im

Vordergrund der Erkrankung steht, durchaus von einer spezifischen IKK $\beta$ -abhängigen NF- $\kappa$ B-Inhibition profitieren könnten, würde eine Inhibition bei Patienten im akuten Schub zu einer Exazerbation der Kolitis führen. Ein akuter epithelialer Schaden müsste vor Einleitung der Therapie daher sicher ausgeschlossen sein und durch eine begleitende Diagnostik während der Therapie sichergestellt werden.

In Kombination mit einer differenzierten Diagnostik, oder eines spezifischen klinischen Markers zur Feststellung des beim Patienten vorherrschenden Entzündungsmusters, wäre eine präventive Anwendung es Inhibitors zur Remissionserhaltung bei Patienten mit chronisch stabilen Verlaufsformen durchaus denkbar. Speziell bei Patienten, die hohen Dosen von Glukokortikoiden zur Remissionserhaltung benötigen und unter therapielimitierenden Nebenwirkungen leiden, scheint die Anwendung eines spezifischen NF- $\kappa$ B-Inhibitors sinnvoll.

## 6 Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B reguliert eine Vielzahl von Genen, die im Zuge von Immun- und Entzündungsprozessen Schlüsselpositionen besetzen. Viele immunologische und rheumatologische Krankheitsbilder basieren auf einer inadäquaten Immunantwort und sind mit einer gesteigerten NF- $\kappa$ B-Aktivierung assoziiert. Der potentielle Nutzen einer spezifischen pharmakologischen NF- $\kappa$ B/IKK $\beta$ -Inhibition wird aufgrund der sowohl pro- als auch antiinflammatorischen Eigenschaften des Transkriptionsfaktors kontrovers diskutiert.

In dieser Arbeit kann in verschiedenen murinen Modellen für chronisch entzündliche Darmerkrankungen gezeigt werden, dass die spezifische Inhibition von NF- $\kappa$ B/IKK $\beta$  bei akuten Entzündungsprozessen zu einer Exazerbation der Entzündung führt, während bei chronischen Verlaufsformen ein Rückgang der Entzündung zu beobachten ist.

Im Rahmen einer akuten Kolitis reagieren Epithelzellen neben einer NF- $\kappa$ B-vermittelten Transkription von anti-apoptotischen Genen mit einer gesteigerten Freisetzung von Entzündungsmediatoren, welche die Rekrutierung von inflammatorischen Zellen initiieren. Diese rekrutierten Zellen sezernieren wichtige zytoprotektive Zytokine (u.a. IL-11 und IL-22), die wiederum parakrin in intestinalen Epithelzellen über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 eine suffiziente Regeneration der Darmmukosa fördern.

Im Gegensatz zu akuten Entzündungsprozessen im Gastrointestinaltrakt hat die selektive Inhibition von NF- $\kappa$ B/IKK $\beta$  in Epithelzellen in T-Zell-assoziierten chronischen Kolutismodellen keinen Einfluss auf den Verlauf der Entzündung. Die Inaktivierung des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalweges in myeloiden Zellen reduziert die Ausprägung der Entzündungsreaktion jedoch deutlich und verlängert das Überleben der Versuchstiere signifikant.

Die Ergebnisse unterstreichen das komplexe und zelltypspezifische Funktionsspektrum NF- $\kappa$ Bs im Rahmen von Immun- und Entzündungsreaktionen im Gastrointestinaltrakt. Überdies hinaus warnen sie vor einem unkritischen therapeutischen Gebrauch von spezifischen IKK $\beta$ -Inhibitoren bei akuten Entzündungsprozessen, wo eine strukturelle Schädigung der Mukosa im Vordergrund steht.

## 7 Literaturverzeichnis

- Andoh, A., Zhang, Z., Inatomi, O., Fujino, S., Deguchi, Y., Araki, Y., Tsujikawa, T., Kitoh, K., Kim-Mitsuyama, S., Takayanagi, A., Shimizu, N. and Fujiyama, Y. (2005) Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. *Gastroenterology*, **129**, 969-984.
- Atreya, I., Atreya, R. and Neurath, M.F. (2008) NF-kappaB in inflammatory bowel disease. *J Intern Med*, **263**, 591-596.
- Atreya, R., Mudter, J., Finotto, S., Mullberg, J., Jostock, T., Wirtz, S., Schutz, M., Bartsch, B., Holtmann, M., Becker, C., Strand, D., Czaja, J., Schlaak, J.F., Lehr, H.A., Autschbach, F., Schurmann, G., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Ito, H., Kishimoto, T., Galle, P.R., Rose-John, S. and Neurath, M.F. (2000) 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*, **6**, 583-588.
- Auphan, N., DiDonato, J.A., Rosette, C., Helmberg, A. and Karin, M. (1995) Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science*, **270**, 286-290.
- Baumgart, D.C. and Carding, S.R. (2007) Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*, **369**, 1627-1640.
- Baumgart, D.C. and Sandborn, W.J. (2007) Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet*, **369**, 1641-1657.
- Becker, C., Fantini, M.C., Schramm, C., Lehr, H.A., Wirtz, S., Nikolaev, A., Burg, J., Strand, S., Kiesslich, R., Huber, S., Ito, H., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Kishimoto, T., Galle, P.R., Blessing, M., Rose-John, S. and Neurath, M.F. (2004) TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity*, **21**, 491-501.
- Becker, C., Wirtz, S., Blessing, M., Pirhonen, J., Strand, D., Bechthold, O., Frick, J., Galle, P.R., Autenrieth, I. and Neurath, M.F. (2003) Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. *J Clin Invest*, **112**, 693-706.
- Berg, D.F., Bahadursingh, A.M., Kaminski, D.L. and Longo, W.E. (2002) Acute surgical emergencies in inflammatory bowel disease. *Am J Surg*, **184**, 45-51.
- Berg, D.J., Davidson, N., Kuhn, R., Muller, W., Menon, S., Holland, G., Thompson-Snipes, L., Leach, M.W. and Rennick, D. (1996) Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J Clin Invest*, **98**, 1010-1020.

- Bollrath, J., Phesse, T.J., von Burstin, V.A., Putoczki, T., Bennecke, M., Bateman, T., Nebelsiek, T., Lundgren-May, T., Canli, O., Schwitalla, S., Matthews, V., Schmid, R.M., Kirchner, T., Arkan, M.C., Ernst, M. and Greten, F.R. (2009) gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell*, **15**, 91-102.
- Brand, S., Beigel, F., Olszak, T., Zitzmann, K., Eichhorst, S.T., Otte, J.M., Diepolder, H., Marquardt, A., Jagla, W., Popp, A., Leclair, S., Herrmann, K., Seiderer, J., Ochsenkuhn, T., Goke, B., Auernhammer, C.J. and Dambacher, J. (2006) IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **290**, G827-838.
- Broide, D.H., Lawrence, T., Doherty, T., Cho, J.Y., Miller, M., McElwain, K., McElwain, S. and Karin, M. (2005) Allergen-induced peribronchial fibrosis and mucus production mediated by IkappaB kinase beta-dependent genes in airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 17723-17728.
- Bukau, B., Deuerling, E., Pfund, C. and Craig, E.A. (2000) Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell*, **101**, 119-122.
- Bukau, B. and Horwich, A.L. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, **92**, 351-366.
- Chen, L.W., Egan, L., Li, Z.W., Greten, F.R., Kagnoff, M.F. and Karin, M. (2003) The two faces of IKK and NF-kappaB inhibition: prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemia-reperfusion. *Nat Med*, **9**, 575-581.
- Chiossone, D.C., Simon, P.L. and Smith, P.L. (1990) Interleukin-1: effects on rabbit ileal mucosal ion transport in vitro. *Eur J Pharmacol*, **180**, 217-228.
- Clausen, B.E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R. and Forster, I. (1999) Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res*, **8**, 265-277.
- Domenech, E. (2006) Inflammatory bowel disease: current therapeutic options. *Digestion*, **73 Suppl 1**, 67-76.
- Egan, L.J., de Lecea, A., Lehrman, E.D., Myhre, G.M., Eckmann, L. and Kagnoff, M.F. (2003) Nuclear factor-kappa B activation promotes restitution of wounded intestinal epithelial monolayers. *Am J Physiol Cell Physiol*, **285**, C1028-1035.
- Egan, L.J., Eckmann, L., Greten, F.R., Chae, S., Li, Z.W., Myhre, G.M., Robine, S., Karin, M. and Kagnoff, M.F. (2004) IkappaB-kinasebeta-dependent NF-kappaB activation provides radioprotection to the intestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 2452-2457.

- el Marjou, F., Janssen, K.P., Chang, B.H., Li, M., Hindie, V., Chan, L., Louvard, D., Chambon, P., Metzger, D. and Robine, S. (2004) Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis*, **39**, 186-193.
- Elson, C.O., Cong, Y., McCracken, V.J., Dimmitt, R.A., Lorenz, R.G. and Weaver, C.T. (2005) Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunol Rev*, **206**, 260-276.
- Ghosh, S., May, M.J. and Kopp, E.B. (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*, **16**, 225-260.
- Greten, F.R., Arkan, M.C., Bollrath, J., Hsu, L.C., Goode, J., Miething, C., Goktuna, S.I., Neuenhahn, M., Fierer, J., Paxian, S., Van Rooijen, N., Xu, Y., O'Cain, T., Jaffee, B.B., Busch, D.H., Duyster, J., Schmid, R.M., Eckmann, L. and Karin, M. (2007) NF-kappaB is a negative regulator of IL-1beta secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKKbeta. *Cell*, **130**, 918-931.
- Greten, F.R., Eckmann, L., Greten, T.F., Park, J.M., Li, Z.W., Egan, L.J., Kagnoff, M.F. and Karin, M. (2004) IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*, **118**, 285-296.
- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J.E. and Roncarolo, M.G. (1997) A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, **389**, 737-742.
- Hartl, F.U. and Hayer-Hartl, M. (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, **295**, 1852-1858.
- Hayden, M.S. and Ghosh, S. (2004) Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*, **18**, 2195-2224.
- Huang, T.T., Kudo, N., Yoshida, M. and Miyamoto, S. (2000) A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of IkappaBalpha controls cytoplasmic localization of inactive NF-kappaB/IkappaBalpha complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 1014-1019.
- Itzkowitz, S.H. and Present, D.H. (2005) Consensus conference: Colorectal cancer screening and surveillance in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, **11**, 314-321.
- Jaattela, M. (1999) Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp Cell Res*, **248**, 30-43.
- Jaattela, M., Wissing, D., Kokholm, K., Kallunki, T. and Egeblad, M. (1998) Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *Embo J*, **17**, 6124-6134.
- Johnson, C., Van Antwerp, D. and Hope, T.J. (1999) An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of IkappaBalpha. *Embo J*, **18**, 6682-6693.
- Karin, M. and Greten, F.R. (2005) NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*, **5**, 749-759.

- Karin, M. and Lin, A. (2002) NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol*, **3**, 221-227.
- Karin, M., Yamamoto, Y. and Wang, Q.M. (2004) The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov*, **3**, 17-26.
- Keith, J.C., Jr., Albert, L., Sonis, S.T., Pfeiffer, C.J. and Schaub, R.G. (1994) IL-11, a pleiotropic cytokine: exciting new effects of IL-11 on gastrointestinal mucosal biology. *Stem Cells*, **12 Suppl 1**, 79-89; discussion 89-90.
- Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K. and Muller, W. (1993) Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, **75**, 263-274.
- Laubitz, D., Jankowska, A., Sikora, A., Wolinski, J., Zabielski, R. and Grzesiuk, E. (2006) Gut myoelectrical activity induces heat shock response in Escherichia coli and Caco-2 cells. *Exp Physiol*, **91**, 867-875.
- Lawrence, C., Shaffer, H.A., Jr. and Bickston, S.J. (2003) Image of the month. Bourne test, enterovesical fistulas. *Gastroenterology*, **125**, 291, 641.
- Li, X., Massa, P.E., Hanidu, A., Peet, G.W., Aro, P., Savitt, A., Mische, S., Li, J. and Marcu, K.B. (2002) IKKalpha, IKKbeta, and NEMO/IKKgamma are each required for the NF-kappa B-mediated inflammatory response program. *J Biol Chem*, **277**, 45129-45140.
- MacMaster, J.F., Dambach, D.M., Lee, D.B., Berry, K.K., Qiu, Y., Zusi, F.C. and Burke, J.R. (2003) An inhibitor of IkappaB kinase, BMS-345541, blocks endothelial cell adhesion molecule expression and reduces the severity of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Inflamm Res*, **52**, 508-511.
- Madison, B.B., Dunbar, L., Qiao, X.T., Braunstein, K., Braunstein, E. and Gumucio, D.L. (2002) Cis elements of the villin gene control expression in restricted domains of the vertical (crypt) and horizontal (duodenum, cecum) axes of the intestine. *J Biol Chem*, **277**, 33275-33283.
- Madsen, K.L., Lewis, S.A., Tavernini, M.M., Hibbard, J. and Fedorak, R.N. (1997) Interleukin 10 prevents cytokine-induced disruption of T84 monolayer barrier integrity and limits chloride secretion. *Gastroenterology*, **113**, 151-159.
- Mahler, M., Bristol, I.J., Leiter, E.H., Workman, A.E., Birkenmeier, E.H., Elson, C.O. and Sundberg, J.P. (1998) Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis. *Am J Physiol*, **274**, G544-551.
- Mayer, M.P. (2005) Recruitment of Hsp70 chaperones: a crucial part of viral survival strategies. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **153**, 1-46.
- Mayer, M.P. and Bukau, B. (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci*, **62**, 670-684.

- McIntyre, K.W., Shuster, D.J., Gillooly, K.M., Dambach, D.M., Pattoli, M.A., Lu, P., Zhou, X.D., Qiu, Y., Zusi, F.C. and Burke, J.R. (2003) A highly selective inhibitor of I kappa B kinase, BMS-345541, blocks both joint inflammation and destruction in collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum*, **48**, 2652-2659.
- Nagalakshmi, M.L., Rasclé, A., Zurawski, S., Menon, S. and de Waal Malefyt, R. (2004) Interleukin-22 activates STAT3 and induces IL-10 by colon epithelial cells. *Int Immunopharmacol*, **4**, 679-691.
- Nagashima, K., Sasseville, V.G., Wen, D., Bielecki, A., Yang, H., Simpson, C., Grant, E., Hepperle, M., Harriman, G., Jaffee, B., Ocain, T., Xu, Y. and Fraser, C.C. (2006) Rapid TNFR1-dependent lymphocyte depletion in vivo with a selective chemical inhibitor of IKKbeta. *Blood*, **107**, 4266-4273.
- Nenci, A., Becker, C., Wullaert, A., Gareus, R., van Loo, G., Danese, S., Huth, M., Nikolaev, A., Neufert, C., Madison, B., Gumucio, D., Neurath, M.F. and Pasparakis, M. (2007) Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature*, **446**, 557-561.
- Neurath, M.F., Pettersson, S., Meyer zum Buschenfelde, K.H. and Strober, W. (1996) Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat Med*, **2**, 998-1004.
- Nylandsted, J., Rohde, M., Brand, K., Bastholm, L., Elling, F. and Jaattela, M. (2000) Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7871-7876.
- Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y. and Nakaya, R. (1990) A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*, **98**, 694-702.
- Ostanin, D.V., Bao, J., Koboziev, I., Gray, L., Robinson-Jackson, S.A., Kosloski-Davidson, M., Price, V.H. and Grisham, M.B. (2009) T cell transfer model of chronic colitis: concepts, considerations, and tricks of the trade. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **296**, G135-146.
- Peterson, R.L., Wang, L., Albert, L., Keith, J.C., Jr. and Dorner, A.J. (1998) Molecular effects of recombinant human interleukin-11 in the HLA-B27 rat model of inflammatory bowel disease. *Lab Invest*, **78**, 1503-1512.
- Powrie, F., Correa-Oliveira, R., Mauze, S. and Coffman, R.L. (1994) Regulatory interactions between CD45RB<sup>high</sup> and CD45RB<sup>low</sup> CD4<sup>+</sup> T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity. *J Exp Med*, **179**, 589-600.
- Qualls, J.E., Kaplan, A.M., van Rooijen, N. and Cohen, D.A. (2006) Suppression of experimental colitis by intestinal mononuclear phagocytes. *J Leukoc Biol*, **80**, 802-815.

- Rennick, D.M. and Fort, M.M. (2000) Lessons from genetically engineered animal models. XII. IL-10-deficient (IL-10(-/-) mice and intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **278**, G829-833.
- Rogler, G., Brand, K., Vogl, D., Page, S., Hofmeister, R., Andus, T., Knuechel, R., Baeuerle, P.A., Scholmerich, J. and Gross, V. (1998) Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology*, **115**, 357-369.
- Ruocco, M.G., Maeda, S., Park, J.M., Lawrence, T., Hsu, L.C., Cao, Y., Schett, G., Wagner, E.F. and Karin, M. (2005) I{kappa}B kinase (IKK){beta}, but not IKK{alpha}, is a critical mediator of osteoclast survival and is required for inflammation-induced bone loss. *J Exp Med*, **201**, 1677-1687.
- Sartor, R.B. (2006) Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, **3**, 390-407.
- Scheinman, R.I., Cogswell, P.C., Lofquist, A.K. and Baldwin, A.S., Jr. (1995) Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science*, **270**, 283-286.
- Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F.R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S.C. and Karin, M. (2001) Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science*, **293**, 1495-1499.
- Sikora, A. and Grzesiuk, E. (2007) Heat shock response in gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol*, **58 Suppl 3**, 43-62.
- Stange, E.F. and Travis, S.P. (2008) The European consensus on ulcerative colitis: new horizons? *Gut*, **57**, 1029-1031.
- Stephanou, A. and Latchman, D.S. (1999) Transcriptional regulation of the heat shock protein genes by STAT family transcription factors. *Gene Expr*, **7**, 311-319.
- Sugimoto, K. (2008) Role of STAT3 in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, **14**, 5110-5114.
- Sugimoto, K., Ogawa, A., Mizoguchi, E., Shimomura, Y., Andoh, A., Bhan, A.K., Blumberg, R.S., Xavier, R.J. and Mizoguchi, A. (2008) IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest*, **118**, 534-544.
- Takeda, K., Clausen, B.E., Kaisho, T., Tsujimura, T., Terada, N., Forster, I. and Akira, S. (1999) Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity*, **10**, 39-49.
- Tanaka, K., Namba, T., Arai, Y., Fujimoto, M., Adachi, H., Sobue, G., Takeuchi, K., Nakai, A. and Mizushima, T. (2007) Genetic evidence for a protective role for heat shock factor 1 and heat shock protein 70 against colitis. *J Biol Chem*, **282**, 23240-23252.

- Travis, S.P., Stange, E.F., Lemann, M., Oresland, T., Chowers, Y., Forbes, A., D'Haens, G., Kitis, G., Cortot, A., Prantera, C., Marteau, P., Colombel, J.F., Gionchetti, P., Bouhnik, Y., Turet, E., Kroesen, J., Starlinger, M. and Mortensen, N.J. (2006) European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. *Gut*, **55 Suppl 1**, i16-35.
- Viemann, D., Goebeler, M., Schmid, S., Klimmek, K., Sorg, C., Ludwig, S. and Roth, J. (2004) Transcriptional profiling of IKK2/NF-kappa B- and p38 MAP kinase-dependent gene expression in TNF-alpha-stimulated primary human endothelial cells. *Blood*, **103**, 3365-3373.
- Wahl, C., Liptay, S., Adler, G. and Schmid, R.M. (1998) Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. *J Clin Invest*, **101**, 1163-1174.
- Williams, K.L., Fuller, C.R., Dieleman, L.A., DaCosta, C.M., Haldeman, K.M., Sartor, R.B. and Lund, P.K. (2001) Enhanced survival and mucosal repair after dextran sodium sulfate-induced colitis in transgenic mice that overexpress growth hormone. *Gastroenterology*, **120**, 925-937.
- Wirtz, S., Neufert, C., Weigmann, B. and Neurath, M.F. (2007) Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc*, **2**, 541-546.
- Wu, F. and Chakravarti, S. (2007) Differential expression of inflammatory and fibrogenic genes and their regulation by NF-kappaB inhibition in a mouse model of chronic colitis. *J Immunol*, **179**, 6988-7000.
- Wu, Z.H., Shi, Y., Tibbetts, R.S. and Miyamoto, S. (2006) Molecular linkage between the kinase ATM and NF-kappaB signaling in response to genotoxic stimuli. *Science*, **311**, 1141-1146.
- Xavier, R.J. and Podolsky, D.K. (2007) Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, **448**, 427-434.
- Zund, G., Madara, J.L., Dzus, A.L., Awtrey, C.S. and Colgan, S.P. (1996) Interleukin-4 and interleukin-13 differentially regulate epithelial chloride secretion. *J Biol Chem*, **271**, 7460-7464.

## Danksagung

Allen voran möchte ich mich bei Florian Greten für die intensive Betreuung im Rahmen dieses Projektes, das Vertrauen und die ganzheitliche Unterstützung während der letzten vier Jahre bedanken. Ich habe in dieser Zeit weit mehr gelernt als wissenschaftlich zu arbeiten und dafür bin ich sehr dankbar. Das gleiche gilt für Canan Arkan, die stets ein offenes Ohr für auftretende Probleme hatte und mich über die Zeit begleitet hat.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bedanken: Moritz Bennecke, Julia Bollrath, Alexander Fingerle, Birgit Wittig, Kristin Retzlaff, Özge Canli, Sarah Schwitalla, Arun Kumar Mankan, Serkan Göktuna, Manon Schulz und Cigdem Atay. Besonders zu erwähnen sind Julia Bollrath und Moritz Bennecke. Danke für Eure Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt auch Lars Eckmann, Department of Medicine, University of California, San Diego, USA für die enge Kooperation bei der Analyse der Funktion von IKK $\beta$  im T-Zell-assoziierten Kollitismodell.

Außerdem danke ich Roland Lang, Institut für Medizinische Mikrobiologie der Technischen Universität München für Durchführung des Microarrays und die Hilfe bei der Auswertung der Ergebnisse.

Ein großer Dank gebührt meinen Eltern Bärbel und Erhard Grünewald, die mir das Medizinstudium ermöglichen haben und mich immer liebevoll aus der Ferne unterstützt haben.