

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin der
Universität Tübingen

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

**Cystatin C vermittelte Regulation der Proteinkinase C δ :
Ein neuer Weg zum Erhalt intestinaler Homöostase?**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Münzner, Tobias

2020

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. J.-S. Frick
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. F. Graepler

Tag der Disputation: 06.05.2020

1. Einleitung	6
1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen.....	6
1.2 Die Mikrobiota des intestinalen Trakts.....	8
1.3 Das Immunsystem der Darmmukosa	9
1.4 Dendritische Zellen	10
1.5 <i>Escherichia coli</i> mpk und <i>Bacteroides vulgatus</i> mpk als Induktoren von Maturation und Semimaturation in dendritischen Zellen.....	13
1.6 Toll-like Rezeptor 4 und dessen Interaktion mit Lipopolysacchariden	13
1.7 Cystatin C	15
1.8 Proteine der 14-3-3 Familie und die Isoform 14-3-3ζ.....	16
1.9 Proteinkinase Cδ.....	18
1.10 Induzierbare Stickstoff Synthase (iNOS)	22
1.11 Induktion regulatorischer T-Zellen	23
1.12 Zielsetzung	24
2. Material und Methoden.....	27
2.1 Material	27
2.1.1 Geräte	27
2.1.2 Verbrauchsgegenstände	28
2.1.3 Zelllinien	29
2.1.4 Bakterienstämme.....	29
2.1.5 Mäuse.....	29
2.1.6 Chemikalien und Medien für Zellkulturen.....	30
2.1.7 Medien für Bakterienkulturen	31
2.1.8 Co-Immunopräzipitationen: Antikörper, Chemikalien und Puffer	31
2.1.9 Kits.....	32
2.1.10 Primer	33
2.1.11 Durchflusszytometrie: Antikörper und Chemikalien	33
2.2 Methoden	34
2.2.1 Kultivierung und Quantifizierung von Bakterien.....	34
2.2.2 Generierung knochenmarksgereifter dendritischer Zellen	34
2.2.3 Bestimmung der Zellzahl	35
2.2.4 Stimulation CD11c+ knochenmarksgereifter dendritischer Zellen	35

2.2.5 Proteinbestimmung nach Bechtold Pierce.....	36
2.2.6 SDS-PAGE	36
2.2.7 Western Blot.....	37
2.2.8 Induktion von Apoptose unter Inhibition verschiedener Proteasen	37
2.2.9 Co-Immunopräzipitation.....	38
2.2.10 Aktivitätsmessung von Proteinkinase C δ	39
2.2.11 Quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion.....	39
<u>2.2.11.1 RNA-Isolierung und Quantifizierung</u>	<u>40</u>
<u>2.2.11.2 DNase Verdau</u>	<u>41</u>
<u>2.2.11.3 Reverse Transkription und Echtzeit PCR mit SybrGreen</u>	<u>41</u>
2.2.12 Durchflusszytometrie	42
<u>2.2.12.1 Fixierung von Zellen für die intrazelluläre Färbung.....</u>	<u>42</u>
<u>2.2.12.2 Färbung von Oberflächenproteinen und intrazellulären Proteinen für die Durchflusszytometrie</u>	<u>42</u>
<u>2.2.12.4 Messung der Aktivität von Aldehyddehydrogenase in CD11c⁺ knochenmarksgereiften Zellen.....</u>	<u>43</u>
2.2.13 Quantifizierung.....	44
<u>2.2.13.1 Quantifizierung der Ergebnisse der Western Blots</u>	<u>44</u>
<u>2.2.13.2 Quantifizierung der Co-Immunopräzipitation</u>	<u>44</u>
<u>2.2.13.3 Quantifizierung der Aktivitätsmessung von Proteinkinase Cδ... 45</u>	<u>45</u>
<u>2.2.13.4 Quantifizierung der Quantitativen Echtzeit Polymerasekettenreaktion</u>	<u>45</u>
<u>2.2.13.5 Quantifizierung der Durchflusszytometrie</u>	<u>46</u>
2.2.14 graphische Darstellung und statistische Auswertung	46
<u>3. Ergebnisse</u>	<u>47</u>
<u>3.1 Bestimmung der Proteinkinase Cδ Aktivität in CD11c⁺ knochenmarksgereiften dendritischen Zellen aus Wildtyp Mäusen.....</u>	<u>47</u>
<u>3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration von Proteinkinase Cδ und pThr505 Proteinkinase Cδ in CD11c⁺ knochenmarksgereiften dendritischen Zellen aus Wildtyp Mäusen.....</u>	<u>49</u>
<u>3.3 Bestimmung der 14-3-3ζ Konzentration in CD11c⁺ knochenmarksgereiften dendritischen Zellen aus Wildtyp Mäusen und dessen Bindung an Cystatin C</u>	<u>52</u>
3.4.1 Proteinkonzentration von PKC δ in CD11c ⁺ knochenmarksgereiften dendritischen Zellen aus Wildtyp Mäusen und Cst3 ^{-/-} Mäusen	55

3.4.2 Proteinkonzentration von pThr505 PKC δ in CD11c+ knochenmarksgereiften dendritischen Zellen aus Wildtyp im Vergleich mit Zellen aus <i>Cst3</i> ^{-/-} Mäusen.....	57
3.4.3 Proteinkonzentration von 14-3-3 ζ in CD11c+ knochenmarksgereiften dendritischen Zellen aus Wildtyp im Vergleich mit Zellen aus <i>Cst3</i> ^{-/-} Mäusen.....	58
<u>3.5 Bestimmung der Konzentration von 14-3-3ζ in CD11c+ knochenmarksgereiften dendritischen Zellen aus Wildtyp Mäusen.....</u>	<u>60</u>
<u>3.6 Vergleich der Aktivität von Proteinkinase Cδ in CD11c+ knochenmarksgereiften dendritischen Zellen aus Wildtyp und <i>Cst3</i>^{-/-} Mäusen.....</u>	<u>61</u>
<u>3.7 Quantitative Bestimmung der iNOS mRNA und durchflusszytometrische Analyse von iNOS in CD11c+ knochenmarksgereiften dendritischen Zellen aus Wildtyp und <i>Cst3</i> defizienten Mäusen</u>	<u>63</u>
<u>3.8 Bestimmung der Konzentration eines PKCδ Fragments nach Induktion von Apoptose unter Inhibition verschiedener Proteaseinhibitoren</u>	<u>67</u>
<u>3.9 Quantitative Bestimmung der ALDH mRNA Expression und durchflusszytometrische Analyse der ALDH Aktivität in CD11c+ knochenmarksgereiften dendritischen Zellen</u>	<u>69</u>
<u>4. Diskussion</u>	<u>73</u>
<u>4.1 Stimulation von KGDZ mit intestinalen Pathobionten führt zu einer höheren PKCδ Aktivität als Stimulation mit intestinalen Symbionten ...</u>	<u>73</u>
<u>4.2 Cystatin C bindet an 14-3-3ζ</u>	<u>74</u>
<u>4.3 Cystatin C hat einen Einfluss auf die Konzentration von 14-3-3ζ, aber nicht auf die Proteinkonzentration von PKCδ</u>	<u>76</u>
<u>4.4 Cystatin C reguliert die Aktivität von Proteinkinase Cδ über 14-3-3ζ</u>	<u>79</u>
<u>4.5 Cystatin C Expression beeinflusst die Expression der <i>Nos2</i> mRNA in CD11c+ KGDZ aus <i>Cst3</i>^{-/-} Mäusen</u>	<u>81</u>
<u>4.6 Symbionten enthaltende Probiotika als Behandlungsoption chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.....</u>	<u>83</u>
<u>4.7 Cystatin C verhindert die Spaltung von Proteinkinase Cδ.....</u>	<u>88</u>
<u>4.8 Cystatin C hat signifikanten Einfluss auf die Aktivität von Retinal Dehydrogenase in CD11c+ KGDZ.....</u>	<u>89</u>
<u>5. Zusammenfassung</u>	<u>92</u>

<u>6. Veröffentlichungen</u>	<u>96</u>
<u>7. Literaturverzeichnis</u>	<u>97</u>
<u>8. Erklärung zum Eigenanteil.....</u>	<u>111</u>
<u>9. Danksagung.....</u>	<u>112</u>

1. Einleitung

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) sind komplexe Erkrankungen. Die wichtigsten beiden Vertreter sind Colitis Ulcerosa und Morbus Crohn. Ihre Ätiologie ist noch weitgehend unbekannt und die Inzidenz dieser Erkrankungen steigt weltweit [2]. Vor allem bei jungen Personen nimmt die Häufigkeit im Vergleich zu älteren zu [3]. Die höchsten Inzidenzen können hierbei mit bis zu 16 pro 100.000 Personen in westlichen Industrieländern beobachtet werden [2, 4]. Europa weist die höchste Prävalenz auf, wo durchschnittlich 4 von 1000 Personen betroffen sind [5].

CED-Patienten zeigen Symptome wie Diarrhö, abdominale Schmerzen und rektale Blutungen [6]. Außerdem kommt es in 25% der Fälle zu extraintestinalen Manifestationen in Gelenken, Nieren, Augen und der Haut [4, 7, 8]. Des Weiteren haben Patienten mit CED ein erhöhtes Risiko an anderen chronischen Immunerkrankungen wie Psoriasis, ankyloisierende Spondylitis und primär sklerosierender Cholangitis zu erkranken [9]. Wie diese Erkrankungen auch, werden chronisch entzündliche Darmerkrankungen mit genetischen Risikofaktoren assoziiert. Mittlerweile konnten mehr als 200 Genloci identifiziert werden, die mit CED im Zusammenhang stehen [10-12]. Weiterhin konnte bei monozygoten Zwillingen mit Colitis ulcerosa eine Konkordanzrate von ca. 20% und bei Morbus Crohn von 50% gezeigt werden [12, 13]. Allerdings wird anhand dieser Daten ersichtlich, dass nicht allein die genetische Prädisposition für die Manifestation dieses Krankheitskomplexes ursächlich sein kann. Der Anstieg der Inzidenzrate über die vergangenen Jahrzehnte war zu rapide, um rein genetischen Ursprungs zu sein, da der Genpool sich in so kurzer Zeit nicht entscheidend ändern kann [13]. Obgleich die Ätiologie nicht bekannt ist, gibt es Faktoren, die nachweislich im Zusammenhang mit der Erkrankung stehen oder den Verlauf der Erkrankung beeinflussen. Neben der schon erwähnten genetischen Prädisposition, spielen dabei auch Umweltfaktoren sowie die Zusammensetzung der Mikrobiota im Darm eine wichtige Rolle. Zusammenhänge zwischen CED und Rauchen, der Einnahme von

Kontrazeptiva, unterschiedlicher Diäten, die zunehmende Industrialisierung und sozioökonomische Entwicklung können dieses Fortschreiten zumindest teilweise erklären [2, 10, 13, 14]. Sehr wichtig ist aber auch, dass ein Teil auf die unterschiedliche Zusammensetzung der Mikrobiota zurückgeht. Diesbezüglich konnten in verschiedenen Studien Unterschiede zwischen Personen mit CED und gesunden Personen festgestellt werden. Diese beschreiben eine allgemeine Reduktion der Mikrobiotadiversität [13, 15, 16] sowie einen Rückgang des Anteils verschiedener Kommensaler aus den Phyla *Firmicutes* und *Bacteroidetes*. Bakterien, die zu den *Enterobacteriaceae* bzw. den *Proteobacteria* gehören, sind dagegen vermehrt in Patienten mit CED zu finden [16-18]. Diese veränderte Zusammensetzung der Mikrobiota stellt eine Störung des Gleichgewichts im Darm dar und wird Dysbiose genannt. Aufgrund der defekten Epithelbarriere im Darm und der erhöhten Permeabilität, herrscht in CED Patienten eine verstärkte Interaktion zwischen der Mikrobiota und dem Immunsystem des Wirts, was eine verstärkte Immunreaktion begünstigt [19-21]. Unterstützt wird dies durch extrinsische Faktoren. Es kommt zu einer genetisch prädisponierten dysregulierten Immunantwort gegenüber den Kommensalen [21, 22]. Auf diesen inflammatorischen Aspekt stützt sich momentan die symptomatische medikamentöse Behandlung. Es kommen Mesalazin, Sulfasalazin, Corticosteroide, Immunsuppressiva wie Azathioprin und Biopharmazeutika wie TNF α -Antikörper zum Einsatz [23]. Des Weiteren bezieht sich die Therapie auf die Risikofaktoren, weshalb auch Änderungen in der Lebensweise z.B. Diäten dazugehören. Man kann dabei beobachten, dass verschiedene Diäten einen direkten Einfluss auf die Zusammensetzung der Mikrobiota haben [16, 23, 24]. Menschen mit westlicher Ernährungsweise zeigen beispielsweise einen geringeren Anteil an *Bacteroidetes* im Vergleich zu Menschen mit anderen Ernährungsgewohnheiten [25]. Schränkt die Krankheitsaktivität den Patienten trotz Änderungen der Lebensweise zu sehr ein, so kann der betroffene Teil des Darms chirurgisch entfernt werden. Bei Colitis ulcerosa kann dies zur Heilung der Krankheit führen, bei Morbus Crohn ist dies jedoch nicht der Fall [26]. Die chirurgische Intervention stellt demnach für Morbus Crohn nur eine vorübergehende Lösung dar, dennoch benötigen die meisten Patienten innerhalb von 20 Jahren diese Option [27, 28].

Daran ist zu erkennen, dass es wichtig ist, mehr über die Pathogenese und Ätiologie von CEDs in Erfahrung zu bringen, um das Spektrum der bisherigen Therapiemöglichkeiten zu verbessern. Ein Ansatz könnte beispielsweise die Biomodulation der Mikrobiota sein, wozu jedoch ein genaueres Wissen über die Interaktion zwischen einem spezifischen Wirt und den Darmkommensalen wichtig ist. Diese Doktorarbeit wird sich daher mit dem Einfluss der Mikrobiota auf das mukosale Immunsystem beschäftigen.

1.2 Die Mikrobiota des intestinalen Trakts

Die Mikrobiota des intestinalen Trakts ist ein komplexes Ökosystem, welches aus Pilzen, Parasiten, Viren, Archaeen und zum größten Teil aus Bakterien besteht. 10^{14} Bakterien befinden sich im Darm, mit einem Gesamtgewicht von ca. 1,5 kg. Sie sind zusammengesetzt aus mehr als 1000 Spezies, wobei die meisten obligat oder fakultativ anaerob sind [29]. Trotz dieser enormen Speziesdiversität gehören über 80% der intestinalen Bakterien zu den Phyla *Bacteroidetes* und *Firmicutes* [1, 29, 30]. Die restlichen Spezies können hauptsächlich vier weiteren Phyla zugeteilt werden, den *Actinobacteria*, den *Fusobacteria*, den *Proteobacteria* und den *Verrucomicrobia*.

Die häufigsten Gattungen sind *Bacteroides* (Phylum der *Bacteroidetes*), *Faecalibacterium* (Phylum der *Firmicutes*) und *Bifibacterium* (Phylum der *Actinobacteria*) [1]. Trotzdem besteht eine hohe Diversität innerhalb des Mikrobioms, welche sich erst auf Artenebene ergibt [30]. Die Zusammensetzung ist dabei für jedes Individuum spezifisch und bleibt in gesunden Personen ohne Intervention über längere Zeitperioden stabil [31-

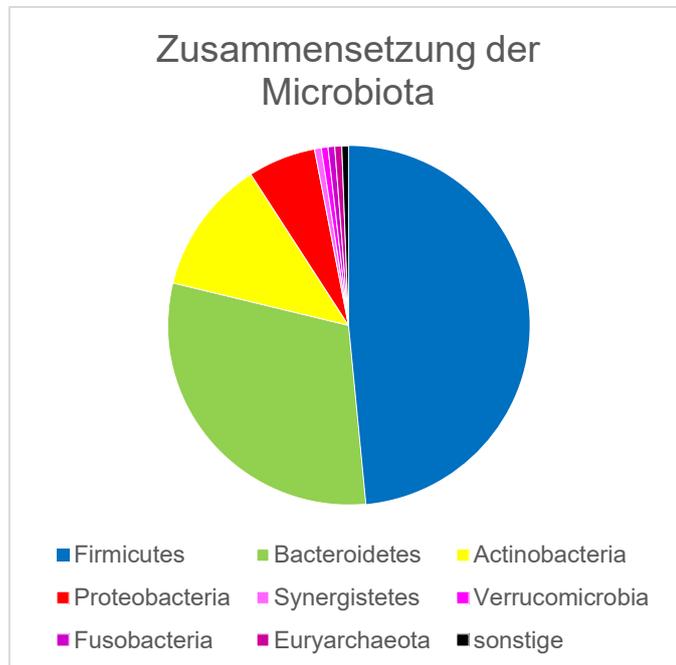


Abbildung 1: Zusammensetzung der Microbiota im Darm

Die Abbildung zeigt die ungefähre Mengenverteilung der verschiedenen Bakterienphyla im gesunden Darm. Dabei nehmen die Phyla der Firmicutes und Bacteroidetes mehr als 80% der Mikrobiota ein [1].

34]. Umweltfaktoren können zwar den relativen Anteil der einzelnen Bakterienspezies verändern, jedoch bleibt der individuell spezifische „core“ erhalten [31, 33]. Dies ist wichtig, da die Mikrobiota eine Schlüsselrolle beim Erhalt der Homöostase spielt. Kommensale haben dabei verschiedene Funktionen. Eine dieser Aufgaben ist, die Kolonisation des Darms durch Pathogene zu verhindern. Des Weiteren beeinflussen sie die Verdauung und den Metabolismus, da sie beispielsweise sog. „short chain fatty acids“ (SCFA) produzieren können [35, 36]. Bakterielle SCFA haben antiinflammatorische Eigenschaften und ihre Konzentration ist nachweislich in Patienten mit CEDs vermindert [16]. Außerdem führen Darmkommensale zu einer verminderten Expression bestimmter Virulenzfaktoren in Pathogenen und beeinflussen auf diese Art die Maturation und Entwicklung des mukosalen und systemischen Immunsystems [37, 38].

1.3 Das Immunsystem der Darmmukosa

Der Darm stellt die größte Fläche des Körpers dar, die mit exogenen Antigenen in Kontakt kommt. Daher ist eine intakte Barriere essentiell, um zu verhindern, dass Pathogene in den Körper eindringen können. Auf diese Weise kann die Entstehung von Krankheiten effektiv abgewendet werden. Eine erste Barriere bildet die Mucinschicht, welche größtenteils aus von Becherzellen sezernierten Mucinen und daran gebundenem Wasser besteht. Eine zweite Barriere bildet das Darmepithel selbst. Dieses besteht aus verschiedenen Zellen, welche sich in Dün- und Dickdarm unterscheiden. So nimmt die Anzahl der mucinbildenden Becherzellen von Duodenum nach aboral zu und ist im Colon am größten, während die Anzahl an Paneth-Zellen, welche antimikrobielle Peptide sezernieren, im Verlauf abnimmt. Im Colon sind sie nur noch im ascendierenden Teil vorhanden. Außerdem kommen im gesamten Darm Enterozyten vor, welche wichtig für die Nährstoffaufnahme sind und somit ständig im Austausch mit dem Darmlumen stehen [39]. Diese Epithelzellen exprimieren sogenannte „pattern recognition receptors“ (PRRs). Sie erkennen konservierte Oberflächenstrukturen von Bakterien, die „microbe-associated molecular patterns“ (MAMPs), welche je auf einem breiten Spektrum an Bakterien zu finden sind. Bei Kontakt von PRRs mit MAMPs werden u.a. antimikrobielle Peptide ins Darmlumen sezerniert und

verschiedene intrazelluläre Signalwege aktiviert [40]. Die bekanntesten PRRs sind Toll-like Rezeptoren (TLR) [41]. Sie können zur vermehrten Expression von Zytokinen und Chemokinen führen, die sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkung haben können. Beispielsweise führt die Bindung von Lipopolysacchariden (LPS) an den TLR4/MD-2 Rezeptorkomplex zur Ausschüttung von Typ1 Interferonen [42]. Zusätzlich befindet sich in der Darmmukosa ein Teil des sog. „*mucosa-associated lymphoid tissue*“ (MALT), welcher als „*gut-associated lymphoid tissue*“ (GALT) bezeichnet wird. Es besteht aus dicht unterhalb des Epithels liegenden Lymphfollikeln, die aus B-Zellen mit einem Keimzentrum bestehen. Diese B-Zellzone ist wiederum von einer T-Zellzone umgeben [39, 43]. Lymphfollikel sind im gesamten Darm verteilt und können in organisierten Plaques gruppiert vorkommen, wie zum Beispiel in den im Dünndarm befindlichen Peyer Plaques, oder auch vereinzelt [44]. Das Epithel über den Peyer Plaques ist besonders, da es im Gegensatz zum restlichen Gewebe, welches zu 10-20% aus Becherzellen besteht, keine Zellen dieser Art aufweist. Außerdem fehlt die typische villöse Struktur. Zuletzt befinden sich in den angrenzenden Krypten weniger Paneth-Zellen, die antimikrobielle Peptide sezernieren [45-47]. Diese sich über den Peyer Plaques befindliche Zellschicht wird Follikel assoziiertes Epithel genannt [48, 49]. Hier kommen stattdessen Microfold Zellen (M-Zellen) vor. Sie transportieren dauerhaft Antigene mittels Transcytose aus dem Darmlumen nach basal. Dort weisen M-Zellen eine taschenartige Ausbuchtung auf, in der Lymphozyten und antigenpräsentierende Zellen wie dendritische Zellen (DZ) sitzen [44, 49-52]. Intestinale DZ sind essentiell, um mit der folgenden Immunantwort entweder Inflammation zu induzieren oder Homöostase zu erhalten [53].

1.4 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DZ) stellen eine heterogene Leukozytenpopulation dar, welche vor allem von dendritischen Vorläuferzellen im Knochenmark abstammen. In Anwesenheit von GM-CSF differenzieren sie zu dendritischen Zellen [54]. Sie gehören zum angeborenen Immunsystem und sind spezialisierte antigenpräsentierende Zellen. Durch die Präsentation von Antigenen an Zellen des erworbenen Immunsystems verknüpfen sie angeborenes und erworbenes

Immunsystem miteinander [55, 56]. Über die Interaktion mit Zellen des erworbenen Immunsystems können sie verschiedene Immunreaktionen initialisieren und spielen damit eine große Rolle beim Erhalt von Homöostase und der Toleranz gegenüber eigenen Antigenen. So führt das Fehlen von dendritischen Zellen unter anderem zu ausgeprägter Autoimmunität [57, 58]. DZ durchwandern nahezu alle lymphatischen und nicht-lymphatischen Gewebe, um dort Antigene aufzunehmen. Im Darm existieren verschiedene Möglichkeiten, wie DZ mit Antigenen in Kontakt kommen können, und zwar, wie bereits beschrieben, zunächst durch Mithilfe von M-Zellen. Diese transportieren Antigene aus dem Darmlumen zu darunter liegenden DZ [44, 50-52]. Des Weiteren ist es möglich, dass Becherzellen lösliche Antigene mit niedrigem molekularem Gewicht zu DZ transportieren [59]. Drittens konnte gezeigt werden, dass DZ Antigene über *gap junctions* von Makrophagen erhalten können [60]. Jedoch können DZ auch selbst mit Antigenen in Kontakt kommen, da ihre Dendriten zwischen den Zellen des Epithels bis ins Darmlumen reichen können [61]. Die Erkennung dieser Antigene erfolgt v.a. über Kontakt von PRRs, wie Toll-like Rezeptoren (TLRs), mit PAMPs. Bevor sie in Kontakt mit Antigenen gekommen sind, zeigen DZ einen immaturren Phänotyp. Charakteristika dieses Zustands sind beispielsweise, dass viele PRRs an ihrer Oberfläche exprimiert werden. Gleichzeitig zeigen sie nur eine geringe Expression von major histocompatibility complex II (MHC-II) Molekülen, die zur Präsentation von aus Antigenen generierten Peptiden dienen. Ebenso werden nur wenige kostimulatorische Moleküle, die zur Aktivierung von T-Zellen essentiell sind, exprimiert [62, 63]. Immature DZ (iDZ) sind wichtig für Homöostase, da sie in der Lage sind, regulatorische T-Zellen (Treg) zu induzieren und allgemein die Aktivität von T-Zellen herabzusetzen [63, 64]. Kommt es jedoch zum Kontakt mit einem Antigen wird ein Maturationsmechanismus induziert. Diese maturaen dendritischen Zellen (mDZ) exprimieren vermehrt costimulatorische Moleküle zur T-Zell Aktivierung, wie z.B. CD40, CD80 und CD86 (cluster of differentiation) und MHC-II an der Zelloberfläche, um eine Immunantwort durch T-Zellen auszulösen. Zusätzlich werden proinflammatorische Moleküle und Zytokine ausgeschüttet (iNOS, TNF- β , IL-1 β , IL-6 und IL-12), welche wiederum Immunzellen wie T-Zellen,

Makrophagen und neutrophile Granulozyten aktivieren [64-66]. Diese können dann keine Antigene mehr aufnehmen und verarbeiten [62]. Deshalb wandern mDZ danach in sekundär lymphatische Organe, um dort die phagozytierten Antigene naiven T-Zellen zu präsentieren [55, 56]. DZ können so die proinflammatorischen T-Zelltypen Th1, Th2 und Th17 induzieren. Allerdings sind dendritische Zellen auch in der Lage, Differenzierung zu regulatorischen T-Zellen zu initiieren. Welcher Zelltyp entsteht, hängt davon ab, welche Zytokine sich in der Umgebung befinden. Dies wird wiederum direkt durch den Phänotyp der vorliegenden DZ bestimmt [67]. Zusätzlich zu den bereits erwähnten DZ Phänotypen, existiert ein sogenannter semi-maturer Phänotyp, der je nach Quelle unterschiedlich definiert ist. Diese semi-maturen DZ (smDZ) sind, im Gegensatz zu mDZ v.a. wegen eines anderen Zytokinprofils, welches sie sezernieren, nicht dazu in der Lage proinflammatorische T1 und Th17 Zellen zu induzieren. Sie entstehen ebenfalls nach Kontakt mit bestimmten Antigenen, unterscheiden sich aber stark in der Expression von Oberflächenproteinen und der Rolle innerhalb des Immunsystems von mDZ [68]. So präsentieren sie zwar ebenfalls Antigene via MHC-II an ihrer Oberfläche, jedoch in geringerem Maße als mDZ, v.a. besitzen sie aber weniger costimulatorische Moleküle zur T-Zellaktivierung (CD80/CD86) [64]. Wichtig für die Funktion von smDZ ist einerseits ihre Toleranz gegenüber sekundären Stimuli, da sie so nach ihrer Differenzierung zu smDZ ihren Phänotyp nicht mehr ändern, und ihre charakteristischen Eigenschaften beibehalten [69, 70]. Andererseits besitzen sie tolerogene Eigenschaften durch die aktive Induktion von Tregs. Diese inhibieren inflammatorische Antworten von T-Zellen oder machen sie gänzlich unempfindlich für Stimuli. Außerdem können sie die Apoptose von T-Zellen fördern [57]. Die Mechanismen, die zur Ausbildung dieser verschiedenen Phänotypen führen, sind noch nicht vollständig verstanden. Jedoch konnte gezeigt werden, dass einzelne Bakterien hauptsächlich mithilfe von bestimmten Oberflächenstrukturen und deren Bindung an PRRs zur Ausdifferenzierung der bestimmten DZ Phänotypen führen [71-73].

1.5 *Escherichia coli* mpk und *Bacteroides vulgatus* mpk als Induktoren von Maturation und Semimaturation in dendritischen Zellen

Sogenannte Pathobionten führen zu einem murenen Phänotyp in DZ. Pathobionten sind dadurch definiert, dass sie unter bestimmten Voraussetzungen, wie z.B. genetischer Prädisposition des Wirts oder bei Mikrobiotadysbiose, pathogene Eigenschaften entwickeln können, obwohl sie normalerweise apathogene Kommensale sind [38, 74]. *Escherichia coli* mpk aus dem Phylum der *Proteobacteria* ist ein solches Bakterium, da bewiesen wurde, dass es einerseits zu einem murenen Phänotyp in DZ führt und andererseits in der Lage ist, bei Monokolonisation von IL2^{-/-} Mäusen eine Colitis auszulösen [71, 72]. Im Gegensatz dazu stehen Symbionten, welche nicht nur keine pathogenen, sondern sogar protektive Eigenschaften besitzen. So ist *Bacteroides vulgatus* mpk aus dem Phylum der *Bacteroidetes* dazu in der Lage, eine durch *E. coli* induzierte Colitis zu verhindern [71, 72]. *Bacteroides vulgatus* mpk ist ein Kommensal und gehört damit zur normalen Flora des Darms der Maus. *B. vulgatus* mpk wurde aus dem Kot einer gesunden Maus isoliert [72] und das Genom des Bakteriums wurde vollständig sequenziert. Es dient somit als Modellsymbiont [75]. Als Symbiont führt *B. vulgatus* mpk zur Semimaturation dendritischer Zellen. Obwohl beide Bakterien, *E. coli* mpk und *B. vulgatus* mpk, apathogene gram-negative Kommensale sind, unterscheiden sie sich demnach erheblich in ihrer immunologischen Wirkung. Dieser Unterschied kommt hauptsächlich durch Unterschiede in der Zusammensetzung der Lipopolysaccharidstruktur zustande [76], welche auf der Oberfläche der beiden Bakterien exprimiert werden und TLR4-abhängige Signalkaskaden in Wirtszellen beeinflussen [77].

1.6 Toll-like Rezeptor 4 und dessen Interaktion mit Lipopolysacchariden

TLR4 ist einer von zehn TLRs beim Menschen, bzw. einer von 12 bekannten TLRs bei Mäusen [78]. Die verschiedenen TLRs werden jeweils mit bestimmten Liganden assoziiert. So bindet TLR2, als Heterodimer mit TLR1 oder TLR6, an Lipopeptide gram-negativer Bakterien und Mycoplasmen, TLR5 an bakterielles Flagellin, TLR3 an virale dsRNA, TLR7 und TLR8 an virale oder bakterielle ssRNA und TLR9 an CpG-reiche unmethylierte DNA. TLR4 selbst bindet

Lipopolysaccharide [79, 80]. Dieser Rezeptor besteht aus einer intrazellulären Toll/IL1 Rezeptor (TIR) Domäne, einer transmembranen Domäne und einer Ektodomäne. Diese Ektodomäne besteht aus 21 „leucine-rich repeats (LRR)“ [81, 82]. Die Interaktion zwischen TLR4 und LPS wird durch verschiedene Mechanismen ermöglicht. Hierzu gehört die Freisetzung von LPS bei Tod des Bakteriums sowie die aktive Lösung von LPS aus der bakteriellen Zellhülle durch das Lipid A bindende Protein (LBP) [80, 83, 84]. Anschließend erfolgt die Bindung von LPS an CD14, welches gelöst oder membranständig vorkommen kann. Mit Hilfe von CD14 wird es zum TLR4 Rezeptorkomplex transportiert, welcher als Dimer über Wasserstoffbrückenbindungen gebunden an MD-2 vorliegt [81]. Der Transport durch CD14 erhöht die Affinität von LPS zu MD-2 um den Faktor 10 [85]. Durch die Bindung von LPS an das MD-2/TLR4 Heterodimer kommt es zu einer Komplexbildung mit einem zweiten MD-2/TLR4 Heterodimer zu einem funktionellen Heterotetramer. Dies hat die Aktivierung einer intrazellulären Signalkette zur Folge. Welche Wirkung diese Signalkette hat, hängt stark von der genauen Struktur des LPS ab. Hierbei ist die Phosphorylierung, die Anzahl und die Struktur, wie die Länge, der Lipidketten der Lipid A Untereinheit am wichtigsten. Je nachdem ändert sich die Immunogenität des LPS [86, 87]. So hat LPS mit 6 Lipidketten stark proinflammatorische Eigenschaften, im Gegensatz zu LPS mit lediglich 5, da es nur schwach proinflammatorisch wirkt. Liegen nur 4 Acylketten im Lipid A vor, zeigt LPS eher antagonistische Effekte [88]. Dies erklärt, weshalb *E. coli* in der Lage ist, eine inflammatorische Kaskade via TLR4 zu initiieren und Maturation in dendritischen Zellen zu induzieren [89, 90]. Als Bakterium mit sechs Acylketten ist es eines der potentesten Agonisten des menschlichen Immunsystems [91, 92]. Die Entzündungsantwort, welche durch LPS ausgelöst wird, erfolgt zunächst über das sogenannte „TIR-containing adaptor protein (TIRAP)“, das direkt mit TLR4 assoziiert ist. TIRAP bindet Proteinkinase C δ (PKC δ) [93, 94], was zu einer Aktivierung des Nukleären Faktors κ B (NF κ B) führt. Die Folge ist eine erhöhte Expression und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und Stickstoffmonoxid (NO) [95, 96]. Der genaue Mechanismus ist bisher noch nicht ergründet. Ein weiterer Effekt der Aktivierung von TLR4 mittels LPS ist die intrazelluläre Entstehung von reaktiven

Sauerstoffspezies (ROS) [97, 98]. Die intrazelluläre ROS-Konzentration ist dafür bestimmend, ob das regulatorische Wirtsprotein Cystatin C (CysC) als Dimer oder Monomer vorliegt. Dieser Bindungszustand von CysC hat wiederum einen starken Einfluss auf dessen Fähigkeit, Zielproteine zu binden [99].

1.7 Cystatin C

Cystatine bilden eine große Proteinfamilie, welche in höher entwickelten Tieren vorkommen. Sie werden in drei Gruppen eingeteilt. Typ 1 bilden die Stefine, Cystatin A und B, welche keine Signalpeptide besitzen. Typ 2 umfasst die vorrangig sekretierten Cystatine C, D, E, F, S, SN und SA, während Typ 3 Kininogene hohen und niedrigen molekularen Gewichts enthält [100]. Cystatin C ist ein Molekül, bestehend aus 120 Aminosäuren [101], dessen Transkription durch die Transkriptionsfaktoren PU.1 und IRF-8 reguliert wird [102]. Als Teil der sekretorischen Gruppe der Cystatine kommt es in den meisten Körperflüssigkeiten vor [103], ist aber auch innerhalb der Zelle zu finden [104]. In welchem Oligomerisierungszustand es innerhalb der Zelle vorliegt, hängt jedoch von der intrazellulären ROS-Konzentration ab. Mit steigender Konzentration, steigt die Wahrscheinlichkeit, dass CysC, statt als Monomer, als Homodimer vorliegt [99]. Dieser Zusammenhang ist wichtig für die Rolle von CysC innerhalb der Zelle, wo es, abhängig vom Dimerisationszustand, als Inhibitor von Proteasen der Cystein- und Legumainfamilie fungiert [99]. Unter diesen Proteasen sind die Cathepsine B, H, K, L und S, welche durch hochaffine nicht kovalente Bindung mit dem CysC Monomer inhibiert werden [105]. Liegt CysC allerdings als Homodimer vor, befindet sich die Bindungsdomäne an der Stelle, an der sich die beiden CysC Moleküle gegenseitig binden und wird dadurch verdeckt. Dadurch können keine Proteasen mehr gebunden und auf diese Art und Weise inhibiert werden [102, 106]. *Steimle et al.* konnten in diesem Zusammenhang eine Rolle von CysC im Maturationsprozess und Semimaturationsprozess von DZ zeigen, da es via Cathepsin S an der Antigenpräsentation über MHC-II mitwirkt [107]. Dies ist jedoch nicht der einzige Signalweg, da Cystatine unter anderem auch die Sekretion von inflammatorischen Zytokinen und Stickstoffmonoxid beeinflussen. Das wird beispielsweise dadurch bestätigt, dass die Gabe von Cystatin zu erhöhten Konzentrationen von Stickstoffmonoxid und infolgedessen einer

vermehrten T-Zellantwort führt [108, 109]. Außerdem wurde bei hohen Konzentrationen von Cystatin eine erhöhte Produktion des Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) und IL-10, gefolgt von einer erhöhten Synthese von Stickstoffmonoxid durch Makrophagen gezeigt [110]. Welche Kaskade dieser Wirkung zugrunde liegt, ist bisher unklar. Vorausgegangene Arbeiten und bisher unveröffentlichte Daten lassen vermuten, dass es sich um eine Interaktion mit dem Protein 14-3-3 ζ handeln könnte. Hierbei wurde eine intrazelluläre Protein-Protein-Interaktion zwischen CysC und 14-3-3 ζ festgestellt. Die Physiologische oder pathologische Rolle dieser Interaktion soll im Folgenden in Bezug auf den Erhalt der Immunhomöostase, vermittelt durch Kommensale, untersucht werden.

1.8 Proteine der 14-3-3 Familie und die Isoform 14-3-3 ζ

14-3-3 bezeichnet eine Familie von Proteinen, die in allen eukaryoten Organismen vorkommen [111]. Sie sind sich sehr ähnlich, werden aber auf unterschiedlichen Genen kodiert. Die Familie umfasst die Isoformen α – η , wobei jedoch α und δ die phosphorylierte Form der Isoformen β und ζ sind [112]. 14-3-3 Proteine sind saure Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa [113]. Ursprünglich wurden sie im Gehirn vorgefunden, wo sie 1% des löslichen Proteins ausmachen [111, 114]. Mittlerweile wurde jedoch nachgewiesen, dass sie in fast allen Geweben, wie Herz, Leber und Intestinum vorkommen [115]. In welchen Geweben bzw. in welcher Konzentration die einzelnen Isoformen vorkommen, ist jedoch für das entsprechende Molekül spezifisch. So kommt 14-3-3 ζ v.a. im zentralen Nervensystem vor, aber auch in Zellen des Ösophagus, des Kolons und des Dünndarms [115]. Intrazellulär befinden sich die 14-3-3 Proteine v.a. im Zytoplasma, konnten aber auch an der Plasmamembran und an Intrazellulären Organellen, wie dem Nukleus und dem Golgi Apparat festgestellt werden [116, 117]. Dabei können sie mit 0,6% des menschlichen Proteoms interagieren [118]. Man nimmt an, dass Liganden an eine amphipathische Bindungsstelle von 14-3-3 binden, welche in allen Isoformen vorkommt. Daher können viele Bindungspartner an alle 14-3-3 Proteine binden [119]. 14-3-3s binden mit dieser Struktur primär an Aminosäuresequenzen, welche Phosphoserin enthalten [113, 120-122]. Aufgrund der notwendigen Phosphorylierung kann die Interaktion zwischen 14-3-3 und verschiedenen Proteinen mithilfe von intrazellulären Kinasen und

Phosphatasen kontrolliert werden [123, 124]. Ebenfalls ist bekannt, dass 14-3-3 Proteine, wie im Fall von Raf-1, auch an unphosphorylierte Partner binden können [113, 125]. Daher gibt es neben der Phosphorylierung des Liganden auch andere Mechanismen, zur Kontrolle des Bindungsverhaltens, wie Isoform Spezifität, posttranskriptionale Modifikationen und das Expressionslevel von 14-3-3 [123, 126]. Isoformspezifische Bindung kommt durch Reste in und in der Nähe der Bindungsfurche zustande [126, 127]. Isoformspezifische Wirkungen entstehen dagegen, durch unterschiedliche Proteinlevels in verschiedenen Geweben und posttranskriptionale Modifikation [123, 126]. Letztere spielt auch eine Rolle bei der Höhe der 14-3-3 Konzentration, da dabei unter anderem die Stabilität der 14-3-3 mRNA durch microRNAs festgelegt wird [128, 129]. Außerdem wird die intrazelluläre Konzentration von 14-3-3 über den proteasomvermittelten Abbau reguliert [130]. Des Weiteren beeinflusst die Bildung von Dimeren die Funktion von 14-3-3, obwohl der genaue biologische Effekt noch nicht bekannt ist [113, 124, 131]. Gesichert ist jedoch, dass die Phosphorylierung der 14-3-3 Moleküle an Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten eine wichtige Rolle für die Bindung anderer Moleküle spielt [124, 132, 133]. Bei der Isoform 14-3-3ζ sind bisher drei Phosphorylierungsstellen bekannt: S58, S184 und T232 [112, 133]. Anhand der unterschiedlichen Regulationsmechanismen sieht man, dass 14-3-3 Proteine viele verschiedene Aufgaben innerhalb der Zelle haben. So sind sie unter anderem an Signaltransduktion, Apoptose und der Entstehung von Inflammation beteiligt [129, 134, 135]. Dabei beeinflussen 14-3-3 Proteine die Struktur ihrer Interaktionspartner sowie deren intrazelluläre Lokalisation [129, 136-138]. Welchen Effekt 14-3-3 auf den Liganden hat, hängt unter anderem von der Information ab, die im Partnerprotein in der Nähe der Bindungsregion codiert ist [126, 139]. Alternativ kann 14-3-3 auch nur als Verbindungsprotein agieren, indem es Interaktionen zwischen Proteinen ermöglicht, die nicht direkt miteinander in Kontakt treten können [111]. Zu den Liganden von 14-3-3 gehören Raf-1, KSR-1, Bcr und Proteinkinasen C [123, 140, 141]. So interagiert auch die Isoform 14-3-3ζ mit PKC. 14-3-3ζ übt einen aktivierenden Effekt auf einige der Isoformen aus [141, 142]. Dazu gehört auch die Proteinkinase Cδ [143]. Man nimmt an, dass diese Interaktion über die Zinkfinger Domäne von PKCδ stattfindet [116].

1.9 Proteinkinase Cδ

Proteinkinase Cδ gehört zur Gruppe der Proteinkinasen C (PKCs). Es handelt sich dabei um Serin- und Threoninkinasen, die eine zentrale Rolle bei der intrazellulären Signaltransduktion spielen. Sie werden in 3 Subfamilien eingeteilt: (1) Konventionelle PKCs, (2) neue PKCs und (3) atypische PKCs. Die Einteilung erfolgt anhand der Moleküle, die zur Aktivierung der Kinasen nötig sind. So benötigen konventionelle PKCs Ca^{2+} , Diacylglycerol und Phosphatidylserin, neue PKCs lediglich die beiden Letzteren und atypische nur Phosphatidylserin zur Aktivierung [144, 145]. Als Teil der „neuen“ Subfamilie wurde PKCδ 1986 erstmals beschrieben. PKCδ weist ein molekulares Gewicht von 78 kDa bei 676 Aminosäuren auf [145-148]. PKCδ besteht einerseits aus einer katalytischen Domäne (C3, C4), die ATP und zur Aktivierung nötige Substrate binden kann [148, 149]. Andererseits besitzt PKCδ eine regulatorische Domäne (C1, C2), wobei C1 zur Bindung von hydrophoben Interaktionspartnern dient, z.B. der Zellmembran oder Diacylglycerol [148, 150]. Des Weiteren befindet sich zwischen C1 und C2 ein Pseudosubstrat, welches PKCδ in einer inaktiven Konformation behält, indem es den Zugang zur Substratbindungsdomäne blockiert [149, 151].

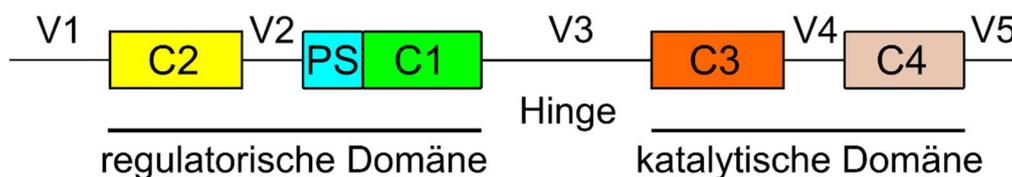


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus der Proteinkinase Cδ

Die konservierten Domänen C1-C4 sind verbunden durch variable Domänen V1-V5. C1 und C2 bilden die regulatorische Domäne, wobei C1 zur Bindung von Diacylglycerol dient. Zwischen C1 und C2 sitzt ein Pseudosubstrat (PS), welches die Substratbindungsdomäne blockiert. Die katalytische Domäne besteht aus C3 und C4. Sie ist durch eine Hinge Region mit der regulatorischen Domäne verbunden [149].

PKCδ wird durch das *PRKCD* bzw. *Pkcd* Gen kodiert, befindet sich auf dem Chromosom 3 des Menschen bzw. auf dem Chromosom 14 der Maus [148, 152] und wird ubiquitär in fast allen Zellen des Körpers exprimiert [148, 153]. Einen

Einfluss auf die Expression hat unter anderem PKC α , welche für eine erhöhte Proteinkonzentration an PKC δ sorgt, indem es die Transkription des *Pkcd* Gens erhöht und somit ebenfalls das PKC δ mRNA Level [154]. Des Weiteren beeinflussen miRNAs die PKC δ Expression posttranskriptional durch Bindung an PKC δ mRNA [155]. Im Anschluss kann PKC δ auf verschiedene Arten aktiviert werden. Ein möglicher Weg ist der sogenannte Kanonische Weg. Hierbei erfolgt die Aktivierung durch Bindung von Diacylglycerin an die C1 Domäne und anschließende Translokation an die Zellmembran [156].

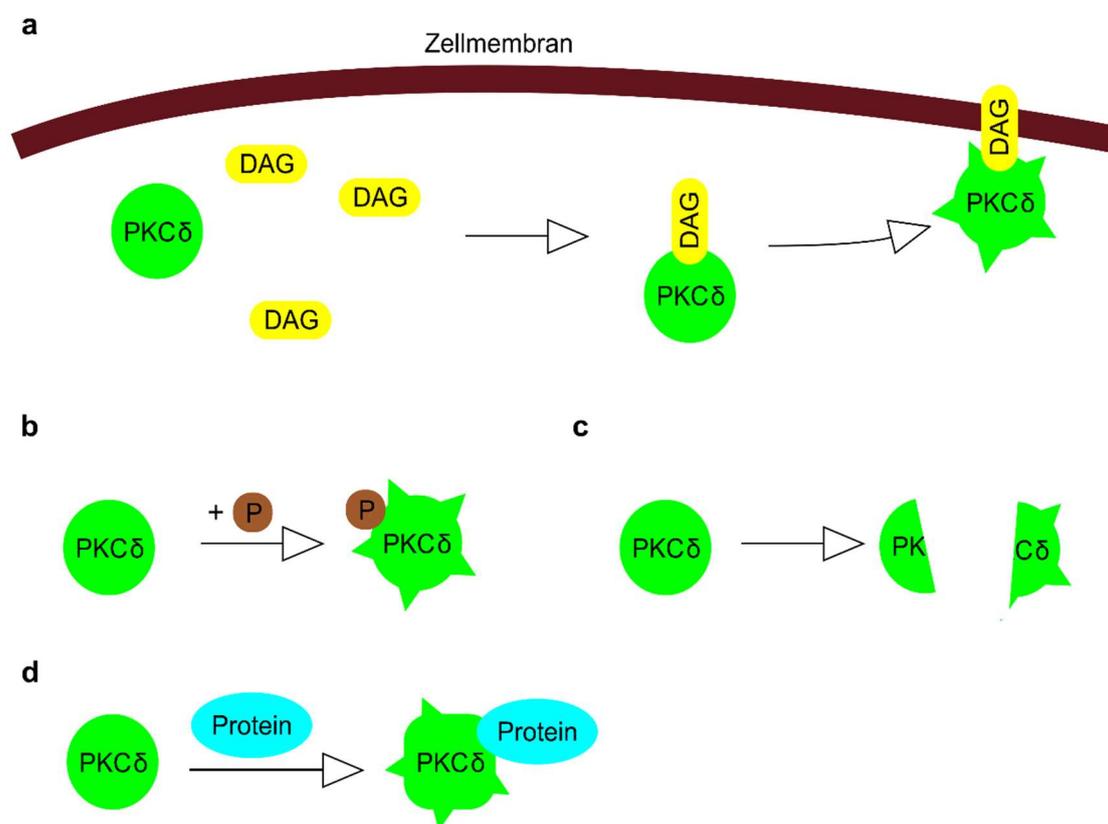


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Aktivierungsmechanismen von Proteinkinase C δ

Abbildung 3a zeigt den kanonischen Aktivierungsmechanismus. Dabei bindet Proteinkinase C δ (PKC δ) an Diacylglycerin (DAG) und wird im Folgenden an die Zellmembran transloziert. Dies führt zur Aktivierung.

Die Abbildungen 3b-d stellen die nicht kanonischen Aktivierungsmechanismen dar. In 2b wird PKC δ phosphoryliert (P), was PKC δ aktiviert. 2c zeigt die Aktivierung von PKC δ durch Spaltung. 2d bildet die allosterische Aktivierung von PKC δ durch Bindung an ein Protein ab.

Andere Aktivierungsmechanismen werden unter den nicht kanonischen Wegen zusammengefasst. Hierzu gehören die allosterische Aktivierung durch Bindung

eines Proteins sowie die Aktivierung durch Phosphorylierung oder Abspaltung der regulatorischen Domäne [156].

Letzterer Aktivierungsmechanismus spielt bei Apoptose eine Rolle. Hierbei werden Tyrosin-311 und -332 auf proapoptotische Signale hin phosphoryliert, was die Spaltung von PKC δ durch Caspase 3 zur Folge hat. PKC δ wird in der sogenannten Gelenkregion gespalten, welche die katalytische mit der regulatorischen Domäne verbindet [148, 157, 158]. Es entsteht ein ca. 40 kDa großes, katalytisch aktives Fragment, welches dann zum Nucleus oder zu den Mitochondrien transloziert [148, 150, 159, 160]. Weiterhin wichtig für die Aktivität ist die Phosphorylierung von PKC δ an Serin, Threonin und Tyrosinresten. Man nimmt an, dass diese schon kurz nach der Synthese des Proteins phosphoryliert werden [161-164]. Dafür sind Kinasen der Src Familie, Rezeptoren für Wachstumsfaktoren sowie die Pyruvatdehydrogenase Kinase 1 verantwortlich. Es sind aber auch Stellen bekannt, die durch PKC δ selbst phosphoryliert werden [148, 165-167]. Zu den Phosphorylierungsstellen, die für maximale Kinaseaktivität benötigt werden, gehören Ser-643, Ser-662 und Thr-505 [148, 159, 168, 169]. Außerdem kann PKC δ , auch unabhängig von Lipiden, mittels Phosphorylierung aktiviert werden [170, 171]. Jedoch wird nicht nur die Kinaseaktivität dadurch moduliert. Gong *et al.* konnten zeigen, dass sich bei Phosphorylierung von Tyrosinresten, durch unterschiedliche intramolekulare Interaktionen die Substratspezifität von PKC δ verändert [172]. So wird auch bei Vorliegen eines phosphorylierten Threonin-505 die Aktivität von PKC δ spezifischer für bestimmte Substrate, wie NF κ B oder Troponin I [163, 170]. Wichtig für die Substratspezifität ist allerdings auch die explizite intrazelluläre Lokalisation von PKC δ in der Zelle. Dies hängt einerseits von der Aktivierung durch Lipide ab, andererseits aber auch von der Phosphorylierung an bestimmten Stellen [159, 164, 173]. So ist beispielsweise die Stelle Tyr155 wichtig für die Translokation zum Nucleus [174]. Für die Translokation selbst, sind weitere Moleküle wichtig. Hierzu zählen die Rezeptoren für aktivierte C-Kinasen (RACK), die C-Kinase interagierenden Proteine (C-KIPS) und die A-Kinase Ankerproteine (AKAP) [156, 175-179]. Wie der Name bereits sagt, transportieren RACKs PKC, nachdem sie aktiviert wurde, zu ihrem Bestimmungsort in

der Zelle. Dabei werden PKCs nicht nur zur Plasmamembran transportiert, sondern können an viele verschiedene zelluläre Orte, wie dem Nucleus oder dem Golgi Apparat translozieren [156, 180]. Man geht davon aus, dass es spezifische RACKs für die unterschiedlichen Isoenzyme gibt und damit, zumindest teilweise, deren Funktion bestimmt wird [156, 176, 181]. Dies gilt ebenfalls für C-KIPs, welche auch inaktive PKCs binden können, um sie an Orte zu bringen, an denen sie anschließend aktiviert werden [156, 178]. AKAPs wiederum werden mit dem Transport zu Enzymkomplexen, die NMDA und AMPA Rezeptoren kontrollieren, in Zusammenhang gebracht [156, 179]. Dies sowie der Einfluss durch 14-3-3 Proteine [182, 183], wie bereits in 1.8 erwähnt, zeigen wie wichtig Protein-Protein Bindungen für die Funktionen von PKC δ sind. PKC δ wird über unterschiedliche Rezeptoren aktiviert, wie dem p60 Tumor Nekrose Faktor Rezeptor, dem Insulin Rezeptor und auch bestimmten Toll-like Rezeptoren [184-187]. Daraufhin werden verschiedene Faktoren, wie PU.1, p21 und Signal Transducers and Activators of Transcription 3 (STAT3), phosphoryliert [188-190]. Sie wirkt also an einigen Signalwegen innerhalb der Zelle mit. Bekannt sind unter anderem Zellwachstum und -differenzierung, Apoptose, Motilität und Sekretion. Durch die Vielfalt an Funktionen, kann PKC δ mit vielen verschiedenen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht werden [191-198]. Dazu gehören auch einige inflammatorische und mit Autoimmunität in Zusammenhang gebrachte Erkrankungen [199-201]. So wurde beobachtet, dass *Pkcd*^{-/-} Mäuse bzw. solche mit einer inaktiven Form der Kinase zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen mit lupusähnlichen Symptomen neigen [201-204]. Dass es sich jedoch vermutlich um eine proinflammatorische Rolle von PKC δ handelt, zeigen Untersuchungen mit PKC δ Inhibitoren, zur Behandlung von Inflammation bei akuten Lungenerkrankungen und bei Atherosklerose [205-207]. Der inhibitorische Effekt geht dabei auf eine gesenkte Aktivierung von NF κ B und die damit zusammenhängende verringerte Chemokin Sekretion zurück [208-211]. Dies steht im Einklang mit Publikationen von verschiedenen Forschungsgruppen, die zeigen konnten, dass die Inhibition der Proteinkinase zu verminderter Aktivierung von NF κ B, weniger Sekretion von Zytokinen und einer niedrigeren Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) in Zellen des angeborenen

Immunsystems führt. Es wird angenommen, dass dieser Signalweg über TLR4 Rezeptoren und deren Interaktion mit TIR enthaltenden Adapter Proteinen (TIRAP) verläuft [93, 94, 212]. Des Weiteren kann PKC δ mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in Zusammenhang gebracht werden [213, 214]. Sie interagiert hierbei mit der induzierbaren Stickstoffmonoxid Synthase (iNOS) und hat dadurch direkten Einfluss auf die Produktion von NO. Außerdem beeinträchtigt sie die Bildung von Zell-Zellkontakten. Diese beiden Mechanismen verringern die intestinale Zellbarriere und begünstigen somit den Kontakt des Immunsystems mit dem Mikrobiom [215, 216]. PKC δ spielt demnach eine wichtige Rolle in der Homöostase des Darms.

1.10 Induzierbare Stickstoff Synthase (iNOS)

Es gibt mindestens vier verschiedene Formen von Stickstoff Synthasen (NOS): Die endotheliale NOS, die induzierbare NOS (iNOS), die neuronale NOS und die mitochondriale NOS [217]. iNOS kommt teils konstitutiv vor, wird aber v.a. durch Zytokine oder bakterielle Bestandteile induziert [218-220]. Normalerweise liegt sie gelöst im Zytosol vor und ist nur aktiv, wenn sie als Dimer vorliegt [218, 221]. Die Konzentration von NO und die intrazelluläre iNOS Konzentration wird vor allem auf transkriptionalem Level reguliert. Dabei führen je nach Stimulus verschiedene Signalwege zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren. An diesen Wegen sind beispielsweise Janus Kinasen, Mitogen aktivierte Protein Kinasen (MAP Kinasen) oder auch PKC beteiligt [222-226]. Eine dieser Signalkaskaden verläuft, ausgelöst durch LPS, über den TLR4/CD14 Rezeptorkomplex zur Aktivierung von NF κ B, das wiederum zur Expression von iNOS führt [227, 228]. Alternativ kann auch Interferon- γ die iNOS Transkription über den Jak-STAT Signalweg steigern [229]. Bei physiologischen Konzentrationen inhibiert NO proinflammatorische Plättchenaggregation, Integrin vermittelte Adhäsion und die Induktion von proinflammatorischen Genen [230, 231]. Kommt es zur Stimulation, erhöht sich die Konzentration. In diesem Fall dient NO zur Abwehr von bakteriellen und viralen Pathogenen [232, 233]. Dies kann auch bei inadäquaten Stimuli, wie durch LPS von kommensalen Bakterien des Darms, passieren. Auf diese Art und Weise wird NO zum Mediator einer pathologischen Entzündungsreaktion [233-235]. Es konnte gezeigt werden, dass auch bei inflammatorischen

Erkrankungen, wie Atherosklerose, rheumatoider Arthritis oder Multipler Sklerose, die NO Produktion erhöht ist [236-238]. Hierbei ist die immunologische Homöostase gestört, in dessen Rahmen es zu einer autoimmunen Erkrankung kommt, was die Wichtigkeit der am Erhalt der Homöostase beteiligten Mechanismen aufzeigt.

1.11 Induktion regulatorischer T-Zellen

Wie PKC δ sind auch regulatorische T-Zellen (Treg) essentiell für den Erhalt der Homöostase im Darm, indem sie antiinflammatorische Zytokine, wie IL-10, ausschütten [239-241]. Damit jedoch naive T-Zellen zu Tregs differenzieren können, sind verschiedene Zytokine nötig. Der Transforming Growth Factor β (TGF- β) induziert die Differenzierung der naiven T-Zellen zu Tregs. Des Weiteren werden IL-2 und der Vitamin A Metabolit Retinsäure benötigt, um die T-Zellen zu Tregs ausreifen zu lassen [241-243]. Die notwendigen Faktoren werden von DZ im Darm sezerniert, wobei Retinsäure in DZ mithilfe einer Aldehyddehydrogenase (ALDH), der Retinal Dehydrogenase, produziert wird. Diese ALDH wird durch das Gen *Aldh1a2* kodiert [244-246]. Eine Schlüsselfunktion der Retinsäure ist außerdem, dass sie die Expression von Darm Homing Rezeptoren an der Oberfläche von T-Zellen bedingt [241, 247]. Wie wichtig Tregs für das Gleichgewicht im Darm sind wird in Versuchsmodellen gezeigt, in denen sie nicht vorhanden sind. Mäuse ohne Tregs entwickeln entzündliche Darmerkrankungen aufgrund von starken Immunreaktionen auf das kommensale Mikrobiom [248, 249]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Tregs eine wichtige Rolle bei der Heilung von Colitiden in Mausversuchsmodellen spielen [250, 251].

1.12 Zielsetzung

Semimature dendritische Zellen (smDZ) können starke entzündliche Prozesse effektiv verhindern, eindämmen oder zum Erliegen bringen. Sie sind somit wichtig für den Erhalt der intestinalen Immunhomöostase und für Immunreaktionen im Rahmen von intestinalen Erkrankungen wie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED). SmDZ vermitteln Toleranz gegenüber kommensalen Bakterien, zu welchen unter anderem der Symbiont *B. vulgatus* und der Pathobiont *E. coli* gehören. Sie sind Teil der Bakterienphyla, welche bekannterweise bei Patienten mit CEDs in veränderter Menge vorliegen. Die molekularen Mechanismen, die der Entstehung von smDZ zugrunde liegen, sind nur unzureichend bekannt. iNOS spielt eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen und könnte somit in smDZ im Vergleich zu muren DZ in geringerer Konzentration vorliegen. Aus verschiedenen Publikationen geht hervor, dass die Expression von iNOS indirekt durch PKC δ erhöht wird, welches wiederum durch 14-3-3 ζ aktiviert wird. Auf Grundlage vorausgegangener Arbeiten sollte eine direkte Bindung zwischen 14-3-3 ζ und Cystatin C bestätigt werden. CysC ist als Protein bekannt, das in smDZ und mDZ in unterschiedlicher Konfiguration vorkommt. In mDZ liegt es vermehrt als Homodimer (siehe Abb. 4 Signalweg a) vor, in smDZ jedoch vermehrt als Heterodimer (siehe Abb. 4 Signalweg b) und ist als solches an ein weiteres Protein gebunden, das daraufhin, wie im Beispiel von 14-3-3 ζ , nicht mehr in der Lage ist an PKC δ zu binden und das Enzym zu aktivieren. Deshalb sollte gezeigt werden, dass die Aktivität von Proteinkinase C δ mittels Cystatin C reguliert wird. Ziel dieser Arbeit war demnach die Untersuchung der PKC δ Aktivität in murinen, semi-muren und muren dendritischen Zellen in Abhängigkeit von Cystatin C und deren Einfluss via 14-3-3 ζ auf die Expression von iNOS. Es konnte bereits gezeigt werden, dass dendritische Zellen auf Stimulation mit dem symbiontischen Kommensal *B. vulgatus*, einen semimuren und, nach Stimulation mit dem Pathobionten *E. coli*, einen muren Phänotyp zeigen. Dadurch hat *B. vulgatus* das Potential, maßgeblich am Erhalt der Homöostase im Darm beteiligt zu sein. Weiterhin ist klar, dass CysC bezüglich des molekularen Mechanismus eine wichtige Rolle spielt, indem es über Cathepsine die Antigenpräsentation auf MHCII Molekülen kontrolliert.

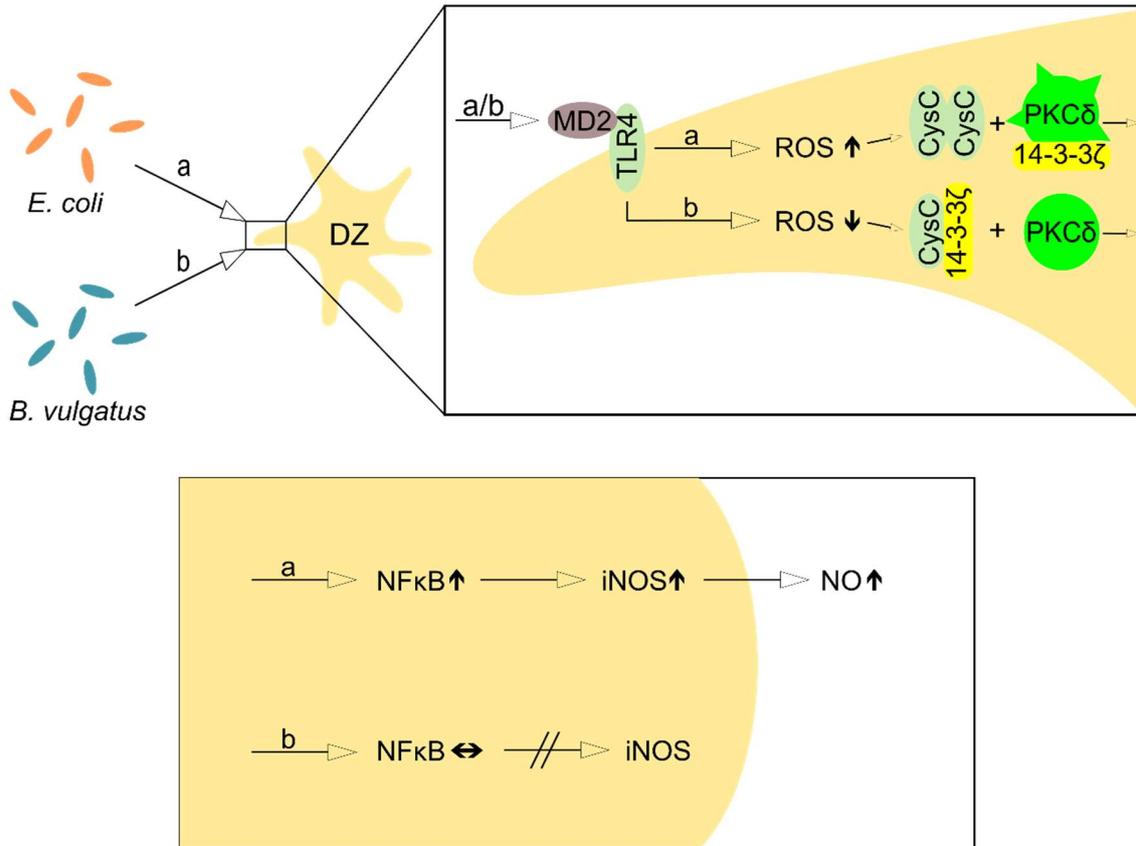


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines neuen Regulationsmechanismus via Cystatin C, 14-3-3ζ und PKCδ

Signalweg a: Bei Kontakt von *E. coli* mit dem TLR4/MD2 Komplex knochenmarksgereifter dendritischer Zellen (DZ) entstehen erhöhte Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) innerhalb der Zelle. Mit steigender ROS Konzentration bildet Cystatin C (CysC) Homodimere, welche aufgrund ihrer blockierten Bindungsdomäne kein 14-3-3ζ binden können. Freies 14-3-3ζ aktiviert Proteinkinase Cδ (PKCδ) durch Bindung an dessen Zinkfingerdomäne. PKCδ induziert anschließend indirekt die Synthese von induzierbarer Stickstoffsynthase (iNOS) über den Transkriptionsfaktor NFκB. iNOS produziert Stickstoffmonoxid (NO), das an der nachfolgenden Entzündungsreaktion beteiligt ist.

Signalweg b: Kontakt von *B. vulgatus* mit dem TLR4/MD2 Komplex von DZ führt zu niedrigen ROS Konzentrationen in der Zelle. Daher liegt CysC als Monomer vor und bindet freies 14-3-3ζ. Dadurch kann PKCδ nicht mehr durch Bindung von 14-3-3ζ aktiviert werden, weshalb die Induktion der iNOS Produktion via NFκB ausbleibt.

Zusätzlich soll in dieser Arbeit eine Interaktion von CysC mit 14-3-3ζ, einem Protein, welches Einfluss auf die Aktivität von PKCδ hat, gezeigt werden. PKCδ wiederum ist bekannt als proinflammatorisches Enzym, da es über NFκB die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und vor allem die Aktivität von

iNOS reguliert. iNOS synthetisiert NO das an der Entstehung der Pathologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen beteiligt ist.

Um die genannten Zusammenhänge zu untersuchen, wurde zunächst die PKC δ Aktivität in dendritischen Zellen aus Wildtyp Mäusen, nach Stimulation mit je einem Symbionten (*B. vulgatus*) oder einem Pathobionten (*E. coli* mpk), gemessen. Danach wurde selbiges in Abwesenheit von funktionellem CysC untersucht. Dies wurde erreicht, indem man die Aktivitätsmessung in dendritischen Zellen aus CysC defizienten Mäusen wiederholte. Anschließend wurde überprüft, ob es sich bei den etwaigen PKC δ -Aktivitätsunterschieden um Änderungen des Aktivitätsniveaus von PKC δ handelte oder ob es sich um Differenzen der Proteinkonzentration von PKC δ bzw. pThr505 PKC δ handelte. Da die Interaktion zwischen CysC und PKC δ laut Hypothese über die Bindung von 14-3-3 ζ stattfand, wurde auch dessen Konzentration bestimmt. Des Weiteren wurde gezeigt, ob CysC direkt an 14-3-3 ζ bindet. Abschließend wurde ein biologisches Read out mithilfe einer Messung der iNOS-Expression durchgeführt. Auf diese Art und Weise wurde der Einfluss von Pathobionten und Symbionten einerseits auf die Expression von PKC δ , 14-3-3 ζ sowie auf die Aktivität von PKC δ untersucht und andererseits ihr Einfluss auf die Protein-Protein-Interaktion zwischen CysC, 14-3-3 ζ und PKC δ gezeigt. Schlussendlich wurde außerdem die biologische Relevanz durch Messung des Effekts der Kommensale auf die iNOS Expression aufgezeigt.

Da die genauen Mechanismen des Erhalts von Homöostase im Darm noch weitestgehend unklar und die derzeitigen Therapiemöglichkeiten chronisch entzündlicher Darmerkrankungen unzureichend sind, könnte die Aufdeckung eines neuen Signalwegs die therapeutischen Optionen zur Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erweitern und das Verständnis des Effekts von Darmkommensalen auf das Immunsystem verbessern.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Name	Hersteller
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena
Zentrifuge Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge mini Spin plus	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank	Heraeus, Hanau
ELISA-Reader infinite F50 Photometer	Tecan Group Ltd, Crailsheim
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Anaerobier-Topf	Merck, Darmstadt
Neubauer-Zählkammer	Superior, Lauda-Königshofen
Pipetten: Eppendorf Research (1, 10, 20, 200 und 1000 µL)	Eppendorf, Hamburg
Pipettier-Hilfe	Eppendorf, Hamburg
Schüttelinkubatoren	Infors, Bottmingen
Steril-Arbeitsbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Vortexer	Heidolph Instruments, Schwabach
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Durchflusszytometer LSR Fortessa	BD, Heidelberg
Licor Odyssey Infrared Imager	Licor
SDS-Page Ausrüstung	BioRad

2.1.2 Verbrauchsgegenstände

Tabelle 2: Verbrauchsgegenstände

Name	Hersteller
Anaerobier-Beutel	Oxoid, Basingstoke, UK
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Glaskolben	Schott Duran, Mainz
Mikrotiter-Platten (Flachboden, Rundboden, Spitzboden)	Freiner Bio-One, Frickenhausen
Pasteurpipetten	WU-Mainz
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 mL)	Eppendorf, Hamburg
Spitzboden-Röhrchen (15 mL)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Spitzboden-Röhrchen (50 mL)	BD Falcon, Heidelberg
Zellkulturflaschen (75 cm ² , 250 mL)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-, 96-well)	BD Falcon, Heidelberg
Zellfilter 100 µL	BD Falcon, Heidelberg
Zellschaber	Corning Inc, Corning, NY, USA
Petri-Schalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Rundboden-Röhrchen (14 mL)	BD Falcon, Heidelberg
Pipettenspitzen (10 µL)	Starlab GmbH, Hamburg
Pipettenspitzen (200 µL)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (1000 µL)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Einmalspritzen (10 mL)	ALMO-Erzeugnisse Erwin-Busch GmbH, Bad Arolsen
Pipetten (5, 10, 25, 50 mL)	Corning Inc, Corning, NY, USA

2.1.3 Zelllinien

Tabelle 3: Zelllinien

Name	Hersteller
Knochenmarksgereifte dendritische Zellen (BMDCs)	eigene Kultivierung aus Knochenmark von Mäusen
HEK-293	InVivoGen, San Diego, CA, USA
HEK-293-mTLR 4-MD2-CD14	InVivoGen, San Diego, CA, USA

2.1.4 Bakterienstämme

Tabelle 4: Bakterienstämme

Name	Hersteller
<i>Bacteroides vulgatus</i> mpk (isoliert aus Fäces von gesunder SPF-Maus)	Max-von-Pettenkofer Institut, München
<i>Escherichia coli</i> mpk 2 (isoliert aus Fäces von gesunder SPF-Maus)	Max-von-Pettenkofer Institut, München

2.1.5 Mäuse

Tabelle 5: Mäuse

Name	Hersteller
C57BL/6	Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA
<i>Cst3</i> ^{-/-}	Eigene Zucht

2.1.6 Chemikalien und Medien für Zellkulturen

Tabelle 6: Chemikalien und Medien für Zellkulturen

Name	Hersteller
B-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
GM-CSF	Eigenproduktion, Institut für Mikrobiologie, Tübingen
DMEM-Medium (mit Glutamin)	Life Technologies (gipco), Carsbad, CA, USA
Nicht essentielle Aminosäuren	Biochrom, Berlin
PBS (phosphate buffered saline) Dulbecco (mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	Life Technologies (gipco), Carlsbad, CA, USA
Penicillin-Streptomycin (10000 units/mL)	Life Technologies (gipco), Carlsbad, CA, USA
Trypan-Blau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypsin/EDTA	Life Technologies (gipco), Carlsbad, CA, USA
VLE RPMI-1640	Biochrom, Berlin

Tabelle 7: Medien für Zellkulturen

Medium	Zusammensetzung
HEK-Medium	DMEM-Medium 500mL
	Fetales Kälberserum (FCS) 10% (v/v)
	Penicillin-Streptomycin 1% (v/v)
DC-Medium	VLE RPMI-1640 500mL
	FCS (hitzeinaktiviert) 10% (v/v)
	GM-CSF 2% (v/v)
	L-Glutamin 1% (v/v)
	Nicht essentielle Aminosäuren 1% (v/v)
	β-Mercaptoethanol 0,5% (v/v)
	Penicillin-Streptomycin 1% (v/v)

2.1.7 Medien für Bakterienkulturen

Tabelle 8: Medien für Bakterienkulturen

Medium	Zusammensetzung
LB (Luria-Bertani) Medium pH 7,5	Trypton 10 g L ⁻¹ Hefeextrakt 5 g L ⁻¹ NaCl 10 g L ⁻¹ Fertigpulver von BD, Heidelberg
BHI (brain-heart-infusion) Medium 7,4 pH	Nährsubstrat 27,5 g L ⁻¹ D(+)-Glucose 2,0 g L ⁻¹ NaCl 5 g L ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ 2,5 g L ⁻¹ Fertigpulver von Merck, Darmstadt

2.1.8 Co-Immunopräzipitationen: Antikörper, Chemikalien und Puffer

Tabelle 9: Antikörper und Chemikalien für Co-Immunopräzipitationen

Name	Hersteller
Protein G Dynabeads	Life Technologies (Novex), Carlsbad, CA, USA
EDTA	Serva, Heidelberg
Pierce Protease Inhibitor	ThermoScientific, Karlsruhe
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Phosphatase Inhibitor Cocktail 3	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
PBS (phosphate buffered saline) Dulbecco (mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	Life Technologies (gipco), Carlsbad, CA, USA
Tween 20	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
PKC δ Antikörper #2058	Cell Signaling Technology, Cambridge
Maus Cystatin C Antikörper	R&D Systems, Wiesbaden
Ratte Cystatin C Antikörper	R&D Systems, Wiesbaden
Trizma Base	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glycin Pufferan	Roth, Karlsruhe
HCl 1M	Merck, Darmstadt

Tabelle 10: Puffer und Lösungen für Co-Immunopräzipitationen

Name	Zusammensetzung	
Waschpuffer	PBS 0,01% Tween 20	
Eluierungspuffer	Glycin pH 2,5	0,1M
Neutralisierungspuffer	Tris/HCl pH 8,0	1M
Lysepuffer	Tris/HCl pH 7,4	50mM
	NaCl	150mM
	Nonidet P-40	1% (v/v)
	EDTA	1mM
	Pierce Protease Inhibitor (10x Stock)	1x
	Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	20 µL
	Phosphatase Inhibitor Cocktail 3	60 µL
	H ₂ O	1316 µL

2.1.9 Kits

Tabelle 11: Kits

Kit	Hersteller
Pierce BCA Protein Assay Reagent	ThermoScientific, Karlsruhe
PKC Kinase Activity Kit	Enzo Life Sciences, Farmingdale
RNeasy-Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
Aldefluor-Kit #01700	Stemcell, Vancouver, Kanada

2.1.10 Primer

Tabelle 12: Primer

Protein	Gen	Forward Primer	Reverse Primer
β -Actin	<i>Actb</i>	CCCTGTGCTGCTCACCGA	ACAGTGTGGGTGACCCCGTC
Aldehyd- dehydro- genase	<i>Aldh1a2</i>	AAGACACGAGCCCATTGGAG	GGAAAGCCAGCCTCCTTGAT
iNOS	<i>Nos2</i>	GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA	GTGGACGGGTCGATGTCAC

2.1.11 Durchflusszytometrie: Antikörper und Chemikalien

Tabelle 13: Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antigen	Fluorophor	Wirt	Klon	Hersteller
CD11c	APC	Hamster	HL3	BD
iNOS/Nos2	FITC	Maus	6	BD

Tabelle 14: Chemikalien für die Durchflusszytometrie

Name	Hersteller
Fc-Block	Eigene Herstellung
Cytofix/Cytoperm	BD
Perm/Wash	Herstellung aus PBS, 1% FCS und 0.1% Saponin

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung und Quantifizierung von Bakterien

Zur Kultivierung von *B. vulgatus* mpk wurden 50 µL Cryo-Stock in ca. 5 mL Brain Heart Infusion (BHI)- Medium gegeben, welches ein Stück Leber enthielt. Das Medium wurde dann bei 37 °C anaerob gelagert. Nach drei Tagen wurden der Kultur 5 mL entnommen, zu 45 mL BHI-Medium gegeben und über Nacht bei 37 °C anaerob inkubiert.

Für das Ansetzen der *E. coli* mpk Kultur wurden 50 µL eines Cryo-Stocks zu 5 mL Luria Bertani (LB-)Medium gegeben. Diese wurde über Nacht bei 37 °C aerob und schüttelnd kultiviert, bis man 300 µL dieser Suspension in 20 mL frisches LB-Medium gibt und für weitere 2,5 h bei 37 °C schütteln lässt.

Um die Bakterienkulturen zu quantifizieren, wurden 20 mL entnommen und bei 4000 *rpm* für 5 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 10 mL steriler PBS Lösung resuspendiert. Hiervon wurden 50 µL mit 950 µL PBS in eine Küvette gegeben und deren OD₆₀₀ bestimmt. Dabei entspricht eine Extinktion von 1,0 einer Anzahl von 5×10^8 Bakterien pro Milliliter.

2.2.2 Generierung knochenmarksgereifter dendritischer Zellen

In den Versuchen dieser Doktorarbeit wurden dendritische Zellen (DZ) verwendet. Hierfür wird aus mindestens 6 Wochen alten Mäusen Knochenmark entnommen. Danach wurden Femur und Tibia entnommen, um die Markhöhle mit sterilem PBS zu durchspülen, wobei sich die darin enthaltenen Stammzellen lösen. Die so gewonnene Lösung wurde anschließend mit einem Sieb, das eine Maschenweite von 100 µm hat, gefiltert und bei 400 x *g* für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 mL DC-Medium resuspendiert. Nach Ermittlung der Zellzahl wurden je 2×10^6 Zellen in Petrischalen mit je 10 mL DC-Medium verteilt und in einem Brutschrank bei 37 °C inkubiert. 3 Tage später wurden in jede Petrischale 10 mL Medium zugegeben, welches an Tag 6 wieder entnommen wurde. Um hierbei einen übermäßigen Zellverlust zu verhindern, wurde das entnommene Medium mit den Zellen einer Maus bei 400 x *g* 5 Minuten zentrifugiert, das Zellpellet mit 10 mL Medium in einem 50 mL Falcon gesammelt und wieder auf die Petrischalen verteilt. Danach

wurden die Zellkulturen mit 10 mL DC-Medium aufgefüllt. Nach 7 Tagen waren die Zellen zu dendritischen Zellen ausdifferenziert und konnten mit einem Zellschaber vorsichtig von der Petrischale gelöst werden. Der gesamte Inhalt der Petrischalen wurde entnommen und bei 400 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Nun konnten die Zellen wiederum resuspendiert und gezählt werden, um sie für Versuche zu verwenden.

2.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Anzahl der Zellen wurde mithilfe einer Neubauerkammer ermittelt. Hierzu wurden 10 µL der Zellsuspension mit 90 µL Trypanblau 1:10 verdünnt und in die Zählkammer eingegeben. Trypanblau färbt tote Zellen blau. Unter einem Lichtmikroskop, konnten nun die Zellen in den einzelnen Quadraten ausgezählt werden. Die so ermittelte Zellzahl geteilt durch die Anzahl der Großquadrate ergibt, unter Berücksichtigung der Verdünnung, den Zellgehalt der Lösung mal 10^4 .

$$\text{Zellzahl in Lösung} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{\text{Anzahl der Quadrate}} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4$$

2.2.4 Stimulation CD11c+ knochenmarksgereifter dendritischer Zellen

In den Versuchen dieser Doktorarbeit wurden CD11c+ knochenmarksgereifte dendritische Zellen KGDZ, die mit *Bacteroides vulgatus* mpk stimuliert wurden, verglichen mit unstimulierten und mit CD11c+ KGDZ, die mit *E. coli* mpk stimuliert wurden. Deshalb wurden von den in 2.2.2 beschriebenen generierten Zellen jeweils 2×10^6 Zellen in 6-Well Platten ausgesät und auf ein Volumen von 2 mL mit DC-Medium aufgefüllt. Nach einer Stunde Inkubationszeit bei 37 °C wurden die Zellen stimuliert. Für die Stimulation galt MOI = 1, weshalb zur Stimulation mit *E. coli* mpk und *B. vulgatus* mpk die jeweiligen Wells mit 2×10^6 Bakterien beimpft wurden. Die Kontrolle blieb unbeimpft. Um eine Überkolonisation mit Bakterien zu verhindern, wurden außerdem nach einer Stunde 2 µL Gentamycin hinzugegeben, um die Bakterien abzutöten. Nach Ablauf der Stimulation nach 2 h, 3 h, 4 h oder 20 h wurden die Zellen mit einem Zellschaber aus den Wells gelöst, zentrifugiert und je nach Versuch weiterverwendet.

2.2.5 Proteinbestimmung nach Bechtold Pierce

Zur Proteinbestimmung nach Bechtold Pierce wurde das Kit „Pierce BCA Protein Assay Reagent“ verwendet. Dieses beruht auf dem Bicinchoninsäure-Assay, bei dem Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert wird und Cu^+ mit Bicinchinon einen Farbkomplex bildet, dessen Absorptionsmaximum bei 562 nm liegt.

Zur Durchführung wurden Standards mit einer Proteinkonzentration von 1000, 800, 600, 400, 200, 100 und 0 mg/mL verwendet und die Proben 1:20 auf ein Gesamtvolumen von 10 μL verdünnt. Für die Farbreaktion wurden anschließend 190 μL Reaktionslösung zugegeben. Diese wurde aus 200 μL der Lösung A und 4 μL der Lösung B des Kits hergestellt. Nach einer halben Stunde Inkubationszeit wird anhand der Standardkurve im ELISA-Reader infinite F50 Photometer die Konzentration der Proben ermittelt.

2.2.6 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) dient zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Durch das im Gel enthaltene SDS (sodium dodecyl sulfate) werden alle Proteine denaturiert und erhalten dieselbe negative Ladung pro Masseneinheit. Daher wandert ein Protein umso schneller durch ein Gel, je kleiner es ist und je größer die Porengröße des Gels ist. Die Porengröße eines Gels hängt von der Konzentration des darin enthaltenen Acrylamids ab.

Zur besseren Vergleichbarkeit wurde vorab die Proteinkonzentration, wie in 2.2.5 beschrieben, bestimmt und jeweils die gleiche Menge in die Taschen des Gels eingegeben. Sobald ein elektrisches Feld angelegt wurde, durchliefen die Proteine zunächst das sogenannte Sammelgel. Als Sammelgel wird der Teil des Gels bezeichnet der weniger engmaschig ist. Dies geschieht bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA. Damit man erkennen konnte, wo sich die Proben auf dem Gel befinden, wurden sie mit reduzierendem Lämmli-Puffer versetzt. Dieser ist als blaue Front während der Elektrophorese sichtbar. Außerdem wurde zusätzlich zu den Proben PageRuler Prestained Protein Ladder als Größenstandard aufgetragen. Sobald die Lauffront das engmaschigere Trenngel erreichte, wurde die Stromstärke auf 60mA erhöht. Sobald das untere Ende des Gels erreicht worden war, wurde die Gelelektrophorese beendet.

2.2.7 Western Blot

Der Western Blot schließt sich der SDS-PAGE an und wird zur Übertragung der im Gel enthaltenen Proteine auf eine Nitrocellulosemembran verwendet, um die aufgetrennten Proben mittels Antikörper sichtbar machen zu können. Hierzu wurde das Gel zwischen zwei Schwämmen und Whatmanpapieren auf eine Membran gelegt und zusammengepresst. In einen Blotpuffer getaucht wurde nun wiederum für 90 Minuten eine Stromstärke von 300 mA angelegt. Um einen adäquaten Nachweis mit Antikörpern zu ermöglichen, musste die Membran zunächst mit 5 mL Odyssey Blocking Buffer geblockt werden. Dies verhinderte die unspezifische Bindung von Antikörpern an die Membran. Anschließend wurde die Membran für 30 Minuten mit 0,1% PBS/Tween gewaschen, bevor die Membran dann mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Antikörper Rabbit Anti-PKC δ und Rabbit Anti-pPKC δ (Thr505) wurden im Verhältnis 1:1000 mit Odyssey Blocking Buffer und 0,2% Tween 20 verdünnt zugegeben. Der Maus Cystatin C und der anti-h14-3-3 ζ Antikörper wurden dagegen 1:5000, mit denselben Substanzen verdünnt, mit der Membran inkubiert. Der Ratte Cystatin C Antikörper wurde im Verhältnis 1:334 verdünnt. Am nächsten Tag erfolgte ein weiterer Waschschrift, danach wurde der Sekundärantikörper aufgetragen. Dieser wurde 1:10000 in Odyssey Blocking Buffer, 0,2% Tween 20 und 0,04% SDS verdünnt und 2 h auf der Membran belassen. Abschließend wurde drei Mal für zehn Minuten mit 0,1% PBS/Tween und zwei Mal 20 Minuten mit PBS gewaschen. Nun konnte mithilfe des Licor Odyssey Infrared Imager das fluoreszierende Bandenmuster und dessen Intensität ausgelesen werden.

2.2.8 Induktion von Apoptose unter Inhibition verschiedener Proteasen

Zunächst wurden je 2 x 10⁶ Zellen in 5 der Wells einer 6-Well Platten ausgesät. Anschließend wurde in je ein Well der irreversible Cathepsin S Inhibitor LHVS (4 μ M), der Cathepsin B Inhibitor Ca074-Me (25 μ M) und der Caspase 3 Inhibitor Z-DEVD-FMK (50 μ M) gegeben. Nach einer Stunde wurde zur Apoptoseinduktion Staurosporin (1 μ M) hinzugegeben [252]. Außerdem wurden zwei Negativkontrollen hergestellt. Eine ohne Zusatz und eine mit Staurosporin. Im Anschluss wurden eine Gelelektrophorese und ein Western Blot gegen PKC δ durchgeführt.

2.2.9 Co-Immunopräzipitation

Die Co-Immunopräzipitation (CoIP) dient dazu, mithilfe von magnetischen Beads, die über ein G-Protein an Antikörper gekoppelt sind, aus einer Probe ein Protein zu isolieren. Dadurch entsteht eine Lösung, die fast ausschließlich dieses Protein enthält. Die CoIP wurde mit Antikörpern gegen Proteinkinase C δ (PKC δ) und Cystatin C (CysC) durchgeführt.

Bevor eine Co-Immunopräzipitation durchgeführt werden konnte, musste eine Zellyse erfolgen, da intrazelluläre Protein-Protein-Interaktionen untersucht werden sollten. Hierzu wurde das gewonnene Zellpellet mit Lysepuffer schaumig resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nun wurde bei 1000 x g für 10 Minuten erneut zentrifugiert und der Überstand bei -80 °C eingefroren.

Für die CoIP wurde nach dem Auftauen die Proteinkonzentration der Probe bestimmt. Um das Protein aus dem Lysat zu isolieren, wurden 50 μ L Protein G Dynabead in einem Reaktionsgefäß an einen Magneten gehalten, um die Lösungsflüssigkeit zu entfernen. Im Anschluss wurden 600 μ L PBS/Tween (0,01%) mit 25 μ L (PKC δ Antikörper) oder 50 μ L (Maus Cystatin C Antikörper) Antikörper zu den Dynabeads gegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur rollend inkubiert. Anschließend wurde die Bead-Antikörper-Verbindung an einem Magneten vom Überstand getrennt und mit 200 μ L PBS/Tween (0,01%) durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gewaschen. Nachdem der Überstand mithilfe des Magneten erneut entfernt wurde, wurde das Zelllysate hinzugegeben und bei 4 °C eine Stunde rollend inkubiert. Dieser Schritt dient zur Bindung des Antigens an den Antikörper.

Danach wurde die Bead-Antikörper-Antigen Verbindung vom Rest der Lösung isoliert und dreimal mit 600 μ L PBS/Tween gewaschen bevor sie in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Dadurch wurde die unspezifische Bindung verschiedener Moleküle an die Wand des Reaktionsgefäßes verhindert, sodass sie nicht in das Eluat gelangen konnten. Im Folgeschritt wurde Glycin 0,1 M pH 2,5 hinzugegeben, wodurch die Bindung des G-Proteins an den Beads zum Fc-Teil der Antikörper aufgelöst wurde. Jetzt wurde das Untersuchungsmaterial an einen Magneten gehalten und der Überstand in einen neuen Behälter überführt, wo er mit 10 μ L Tris/HCl 1,0M pH 8,0 neutralisiert wurde.

2.2.10 Aktivitätsmessung von Proteinkinase C δ

Die Aktivitätsmessung von PKC δ erfolgte mit dem PKC Kinase Activity Kit von Enzo Life Science. Dabei wurde eine 96-well Platte verwendet, deren Boden mit einem Proteinkinase C (PKC) Substrat beschichtet ist. Wird also eine Probe, die PKC enthält, und ATP hinzugegeben, wird das Substrat phosphoryliert. Nach 90 Minuten wurde die Reaktion beendet und ein Antikörper hinzugegeben, der spezifisch das phosphorylierte Peptid bindet. Um die Menge der Phosphorylierungen sichtbar zu machen, wurde ein sekundärer peroxidase konjugierter Antikörper hinzugegeben, der den Primärantikörper band. Wurde nun Tetramethylbenzidin beigemischt, kam es zu einer Verfärbung, die proportional zur Phosphotransferaseaktivität von PKC war. Diese Reaktion wurde mithilfe von „acid stop solution“ angehalten. Die abschließende photometrische Messung wurde mit dem ELISA-Reader infinite F50 Photometer bei 450nm Wellenlänge durchgeführt.

Bei den aufgeführten Versuchen, wurde stets eine Negativkontrolle mitgeführt. So wurde wie bei einer CoIP ein Gemisch aus 10 μ L Tris/HCl 1,0 M pH 8,0 mit 20 μ L Glycin 0,1 M pH 2,5 hergestellt. Dieses wurde wiederum 1:100 verdünnt und mit 5 μ L Kinase Assay Dilution Buffer in einem der Wells auf 30 μ L aufgefüllt. Das leitet sich aus der Zusammensetzung der Proben her, welche bei der vorangestellten CoIP in 10 μ L Tris/HCl 1,0 M pH 8,0 und 20 μ L Glycin 0,1 M pH 2,5 gelöst wurden und danach ebenfalls 1:100 verdünnt wurden. Davon wurden 25 μ L zu 5 μ L „Kinase Assay Dilution Buffer“ gegeben und in das entsprechende Well pipettiert. Ansonsten erfolgte der Versuch nach dem Protokoll des PKC Kinase Activity Kits von Enzo Life Sciences.

2.2.11 Quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde mit dem Marker SybrGreen durchgeführt. Im ersten Schritt wurde durch Reverse Transkriptase ein DNA-Abbild der zu untersuchenden RNA hergestellt. Dies geschah bei 50 °C für 10 Minuten. Danach erfolgte ein Denaturierungsschritt bei 95 °C für 5 Minuten, in welchem die entstandenen Doppelstränge und die Bindung zwischen RNA und Reverser Transkriptase aufgetrennt wurden. Die Reverse Transkriptase liegt nun inaktiviert vor. Außerdem bildet die DNA-abhängige DNA-Polymerase einen

Komplex mit einem Antikörper, wodurch sie aktiviert wird. Um die DNA im Folgenden zu vervielfältigen wurde zunächst eine Temperatur eingestellt, bei der sich die Primer an die DNA anlagern und die DNA polymerisiert werden kann (60 °C). Anschließend wurden die entstandenen Doppelstränge bei 95 °C wieder voneinander getrennt. Dieser Prozess wurde 40 Mal wiederholt, wobei sich die DNA in jedem Zyklus exponentiell vermehrte. Sichtbar gemacht wurde dies durch den Marker SybrGreen, welcher sich an Doppelstrang-DNA anlagert und im LightCycler photometrisch gemessen werden kann. Somit kann nach jedem Zyklus die DNA quantifiziert werden. Da SybrGreen nicht spezifisch bindet, wird nach jeder PCR eine Schmelzkurve angefertigt, indem die Temperatur stetig von 46 °C auf 95 °C erhöht wird. Jede Schmelzkurve ist spezifisch für die Länge und Zusammensetzung der DNA. Somit kann anhand dieser Kurve verifiziert werden, dass es sich um die gesuchte DNA bzw. RNA handelt.

2.2.11.1 RNA-Isolierung und Quantifizierung

Zur Isolierung der RNA wurde das Qiagen-Kit verwendet. Zunächst wurden die stimulierten Zellen zentrifugiert, um sie vom Medium zu trennen. Dann wurden je 2×10^6 Zellen mit 350 µL RLT/ β -Mercaptoethanol (1%) vermengt, bis eine Trübung eintrat. Das diente der Lyse der Zellen. Lysate wurden bei -20°C gelagert. Zur Aufreinigung der RNA wurden 350 µL Ethanol (70%) zum Zelllysat aus 2×10^6 Zellen gegeben und das gesamte Volumen auf eine Säule (RNeasy Mini Column) in einem Sammelröhrchen gegeben. Im Folgenden wurde für 20 Sekunden bei 8000 x g zentrifugiert, das Sammelgefäß entleert und 700 µL RW1-Puffer auf die Säule gegeben. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt bei 8000 x g für 20 Sekunden wurde das Sammelröhrchen ausgewechselt und die Säule mit 500 µL RPE Puffer gefüllt. Nachdem man diesen Schritt einmal wiederholt hatte, wurde die Probe wiederum bei 8000 x g für 2 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und es folgte eine Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 1 Minute. Die nun trockene Probensäule wurde in ein Reaktionsgefäß gestellt und mit 40 µL nucleasefreiem Wasser bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 8000 x g wurde die Säule entsorgt und das entstandene Eluat im

Nanodrop quantifiziert. Dazu wurde ein Programm zur Quantifizierung von ssRNA bei einem Lid-Faktor von 50 verwendet.

2.2.11.2 DNase Verdau

Aus der nun quantifizierten RNA musste im Folgenden die DNA entfernt werden. Dazu wurde ein DNase Verdau durchgeführt. Dazu wurden 5 µg RNA verwendet. Das berechnete Volumen wurde mit nucleasefreiem Wasser auf 50 µL aufgefüllt. Anschließend wurde die Probe mit 5 µL DNase-Puffer (10x), 2 µL DNase sowie 1 µL rRNasin versetzt und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Nun wurden 6 µL DNase Inaktivierung hinzugegeben und 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei mussten die Proben gevortext werden. Anschließend wurde bei 10000 *rpm* für 1 Minute zentrifugiert. Die klare Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und je nach weiterem Verfahren auf Eis oder bei -80 °C gelagert.

2.2.11.3 Reverse Transkription und Echtzeit PCR mit SybrGreen

Zunächst wurde eine Standardreihe zur Überprüfung der PCR-Qualität und zur Bestimmung der Amplifikationseffizienz hergestellt. Hierzu wurde aus drei Proben Material entnommen, das zuerst in einem separaten Reaktionsgefäß gesammelt und danach für jede Verdünnungsstufe 1:5 mit nucleasefreiem Wasser verdünnt wurde.

Nun wurde 1 µL jeder Probe, jedes Standards sowie einer Kontrolle in ein eigenes Well der Lightcycler Platte gegeben. Im Anschluss wurde für jedes Primerpaar ein Mastermix aus 5 µL QuantiFast SybrGreen (2x), 3,7 µL nucleasefreiem Wasser, 0,1 µL QuantiFast Reverse Transkriptase Mix und 0,1 µL des jeweiligen forward und reverse Primers hergestellt. Zu jeder Probe wurden 9 µL dieser Lösung hinzugegeben. Danach wurde die Platte mit einer Folie luftdicht verschlossen und 1 Minute bei 1000 x *g* zentrifugiert. Zur Messung wurde der LightCycler 480 Roche verwendet.

2.2.12 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient zur qualitativen Auswertung und Charakterisierung von Zellpopulationen. Zum einen werden Proben anhand ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) unterschieden, zum anderen kann die Emission verschiedener fluoreszierender Moleküle gemessen werden. Hierbei werden Oberflächenmoleküle, intrazelluläre oder extrazelluläre Moleküle mithilfe von spezifischen fluoreszierenden Antikörpern markiert. Die Messung dieser Antikörper ermöglicht zusätzlich eine quantitative Angabe über das Untersuchungsmaterial. Hierbei können mehrere verschiedene Fluoreszenzen gleichzeitig eingesetzt werden. Um Signalinterferenzen zu verhindern, wird kompensiert. Falsch positive Signale entstehen durch Autofluoreszenz der Zellen und ähnliche Emission der Antikörper. Die Kompensation erfolgt anhand von Negativkontrollen.

2.2.12.1 Fixierung von Zellen für die intrazelluläre Färbung

Da die intrazelluläre Färbung der Zellen zur Untersuchung nicht direkt nach der Stimulation erfolgte, wurden die Zellen fixiert. Dazu wurden die Zellen, die zuvor in 12-Well Platten ausgesät und stimuliert worden waren, abgekratzt und in Reaktionsgefäße übertragen. Nun wurden die Zellen und das Medium durch Zentrifugation bei 400 x g für fünf Minuten voneinander getrennt. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 100 µL Fc-Block resuspendiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei 4 °C wurde bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, in 200 µL Cytifix/Cytoperm resuspendiert und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dies diente zur Fixierung der Zellen. Zuletzt wurde bei 400 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 100 µL PBS/FCS (1%) resuspendiert. Luftdicht verschlossen konnten die Zellen für eine Woche bei 4 °C gelagert werden.

2.2.12.2 Färbung von Oberflächenproteinen und intrazellulären Proteinen für die Durchflusszytometrie

Zur intrazellulären Färbung wurden die Zellen zunächst bei 400 x g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in 100 µL Perm/Wash pro Färbung

resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine 96-Well Platte übertragen, wobei ein Teil jeder Probe in Zellpools für die Kontrollfärbungen gesammelt wurde. Nun wurden pro Sample zur Färbung von Oberflächenproteinen 0,5 µL und zur Färbung von intrazellulären Proteinen 1 µL des jeweiligen Antikörpers zu 50 µL Perm/Wash gegeben. Aus dieser Lösung wurden 50 µL zu jeder Probe gegeben. Hierbei wurden jeweils Kontrollen hergestellt, die einen Antikörper weniger bzw. keinen Antikörper enthielten. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 4 °C wurde erneut bei 400 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 100 µL PBS/FCS (1%) resuspendiert und in FACS-Röhrchen für die Durchflusszytometrie übertragen. Die so vorbereiteten Zellen wurden im Durchflusszytometer LSR Fortessa gemessen. Als Oberflächenmarker wurde CD11c verwendet, als intrazelluläres Protein wurde iNOS untersucht.

2.2.12.4 Messung der Aktivität von Aldehyddehydrogenase in CD11c⁺ knochenmarksgereiften Zellen

Die Aktivität des Enzyms Aldehyddehydrogenase (ALDH) wurde mit dem Aldefluor-Kit (Stemcell) gemessen. Dabei erfolgte die Durchführung dem Herstellerprotokoll entsprechend. Das Prinzip basiert auf der Herstellung zweier Proben vom selben Untersuchungsmaterial, wobei eine als Kontrolle dient. Diese enthält einen ALDH Inhibitor. Es wurde jeweils ein ALDH Substrat hinzugegeben und die Reaktion nach 30 bis 60 Minuten gestoppt. Nach Zentrifugation bei 250 x g und 4 °C für 5 Minuten wurden die Zellen entnommen und in 500 µL Aldefluor Puffer (im Kit enthalten) resuspendiert. Um die ALDH Aktivität in knochenmarksgereiften dendritischen Zellen zu messen, wurde im Anschluss 1 µL eines Antikörpers gegen CD11c hinzugegeben und mit der Probe für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Direkt im Anschluss musste die Menge des umgesetzten Substrats im Durchflusszytometer LSR Fortessa gemessen werden.

2.2.13 Quantifizierung

2.2.13.1 Quantifizierung der Ergebnisse der Western Blots

Zur Messung der Bandenintensität der Western Blots wurde das Programm „Image Studio Ver 3.1“ verwendet.

Um die Western Blots, die mit Zelllysate durchgeführt wurden, quantifizieren zu können, wurde zusätzlich einer mit einem Antikörper gegen das Housekeepingprotein β -Actin durchgeführt. Die erhaltenen Bandenintensitäten des untersuchten Proteins wurden dann auf die entsprechende Bandenintensität von β -Actin derselben Probe normiert.

$$\text{Bandenintensität}_{\text{Probe1 normiert}} = \frac{\text{Bandenintensität}_{\text{Prob untersuchtes Protein}}}{\text{Bandenintensität}_{\text{Probe1 } \beta\text{-Actin}}}$$

Des Weiteren wurde jeder normierte Stimulus auf den normierten Durchschnittswert aller Negativkontrollen der Wildtypen (WT) normiert.

$$\emptyset_{\text{mock normiert}} = \frac{\sum \text{Bandenintensität}_{\text{mock WT normiert}}}{\text{Anzahl}_{\text{mock WT normiert}}}$$

$$\text{Stimulus}_{\text{normiert auf } \emptyset_{\text{mock WT normiert}}} = \frac{\text{Stimulus}_{\text{normiert}}}{\emptyset_{\text{mock WT normiert}}}$$

2.2.13.2 Quantifizierung der Co-Immunopräzipitation

Auf die CoIP folgte ein Western Blot zur Evaluation der CoIP Effizienz. Nach einer CoIP gegen PKC δ wurde das Eluat gegen den verwendeten Antikörper geblottet. Bei einer CoIP gegen Cystatin C folgte ein Western Blot gegen das präzipitierte Protein. Die Bandenintensitäten, die bei letzterem entstanden, wurden zur Normierung von Western Blots gegen 14-3-3 ζ im CoIP Eluat verwendet.

2.2.13.3 Quantifizierung der Aktivitätsmessung von Proteinkinase Cδ

Die dimensionslosen Werte der Aktivitätsmessung von PKCδ wurden auf die Bandenintensität des Western Blots gegen den PKCδ Antikörper im CoIP Eluat normiert.

$$Aktivität_{Probe \text{ normiert}} = \frac{Aktivität_{Probe}}{Bandenintensität_{Probe1}}$$

Zusätzlich wurden die Werte auf die jeweilige Negativkontrolle normiert.

$$Aktivität_{Probe \text{ normiert auf Negativkontrolle}} = \frac{Aktivität_{Pro} \text{ normiert}}{Aktivität_{Negativkontroll} \text{ normiert}}$$

2.2.13.4 Quantifizierung der Quantitativen Echtzeit Polymerasekettenreaktion

Zur Normierung wurden die sogenannten „cycle threshold“ (Ct) Werte herangezogen. Diese geben an, in welchem Zyklus die Fluoreszenz durch Anlagerung an Doppelstrang DNA das erste Mal über die Hintergrundfluoreszenz steigt. Mithilfe der Standardkurve für jedes untersuchte Gen, wurde die Effizienz (E) der PCR eruiert. Bei jeder PCR wurde das Referenzgen *Actb*, das für β-Actin transkribiert, miterfasst. Unter Einbeziehung der Effizienz wurde ein Verhältnis (R) aus den gemessenen Werten des untersuchten Gens und den Werten für β-Actin gebildet, normiert auf die jeweilige Negativkontrolle:

$$R = \frac{E^{Ct_{Mock \text{ Testgen}} - Ct_{Stimulus \text{ Testgen}}}}{E^{Ct_{Mock \beta-Acti} - Ct_{Stimulus \beta-Acti}}}$$

Für den Vergleich zwischen CysC-Knock-out Mäusen und WT wurden die Messungen auf den Durchschnitt der Wildtyp Negativkontrollen normiert. Dazu wurde zunächst der Ct Wert eines Stimulus auf alle Wildtyp Negativkontrollen einzeln normiert. Danach wurde davon der Durchschnitt gebildet ($\emptyset R_{Stimulus}$).

2.2.13.5 Quantifizierung der Durchflusszytometrie

Die Quantifizierung der Durchflusszytometrie wurde mit dem Programm „FlowJo“ durchgeführt. Zellfragmente und zusammenhängende Zellen wurden im Forward/Sideward-Scatter herausgefiltert. Danach wurde die Population der dendritischen Zellen über das Oberflächenprotein CD11c zur weiteren Untersuchung ausgewählt. Abschließend wurde ein Gate zur Erfassung des ALDH Substrats bzw. der iNOS Konzentration gesetzt. Zur Abbildung wurde ein Histogramm gewählt (Abbildung 9, 11), aus welchem der Mean entnommen wurde.

2.2.14 graphische Darstellung und statistische Auswertung

Zur graphischen Darstellung und statistischen Auswertung wurde die Software „GraphPad Prism“ verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student-t-Test. Signifikanzen wurden wie folgt bezeichnet: ns \triangleq nicht signifikant; * \triangleq $p < 0,05$; ** \triangleq $p < 0,01$; *** \triangleq $p < 0,001$; **** \triangleq $p < 0,0001$. Außerdem wird der Mean \pm SEM verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Bestimmung der Proteinkinase C δ Aktivität in CD11c+ knochenmarksgereiften dendritischen Zellen aus Wildtyp Mäusen

Proteinkinase C δ (PKC δ) ist ein proinflammatorisches Enzym. Eine Erhöhung der PKC δ Aktivität führt über NF κ B Aktivierung zur Ausschüttung von Zytokinen und der Aktivierung von iNOS [215, 253]. Das Ziel dieser Arbeit ist der Vergleich der intrazellulären Mechanismen in semi-maturen und maturen CD11c+ knochenmarksgereiften dendritischen Zellen mit besonderem Schwerpunkt auf der Aktivität von PKC δ in Abhängigkeit vom Vorhandensein von funktionellem CysC und der damit zusammenhängenden Vermittlung proinflammatorischer Reaktionen. Stimulation von CD11c+ knochenmarksgereiften dendritischen Zellen (KGDZ) mit dem Modellsymbionten *B. vulgatus* mpk führt zur Induktion eines semi-maturen DZ Phänotyps, während Stimulation mit dem Modellpathobionten *E. coli* mpk zu vollständiger Maturation führt [69]. Es wurde bereits gezeigt, dass smDZs eine wichtige Rolle beim Erhalt von intestinaler Immunhomöostase spielen [64, 68]. Da eine Erhöhung der PKC δ -Aktivität in KGDZ eine proinflammatorische Immunreaktion zur Folge hat, sollte erörtert werden, ob und wie eine *B. vulgatus*-induzierte Semimaturation bzw. eine *E. coli*-induzierte Maturation die Aktivität von PKC δ beeinflusst.

Wie in Abbildung 5a zu sehen ist, wurden zunächst dendritische Zellen mit *E. coli* mpk oder *B. vulgatus* mpk stimuliert. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle ohne Stimulus mitgeführt (Mock). Nach 2 Stunden Stimulationszeit wurden die Zellen lysiert. Da die Methode zur Aktivitätsbestimmung von PKC δ unspezifisch die Kinaseaktivität aller im Lysat vorhandenen PKC Isoformen detektiert, wurde zunächst PKC δ mithilfe einer Ko-Immunopräzipitation aus dem Lysat präzipitiert. Mit dem Eluat der CoIP, welches aus PKC δ und direkt assoziierten Interaktionspartnern bestand, wurde anschließend die PKC Aktivitätsbestimmung durchgeführt, die somit der spezifischen Kinaseaktivität von PKC δ entspricht. Wie in Abb. 5a zu sehen, wurde dazu dem PKC δ Eluat ein Substrat zugegeben, das dann durch PKC δ phosphoryliert wurde.

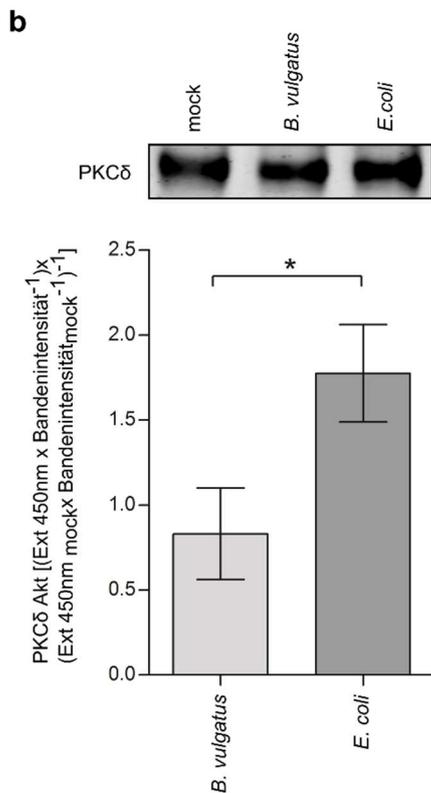
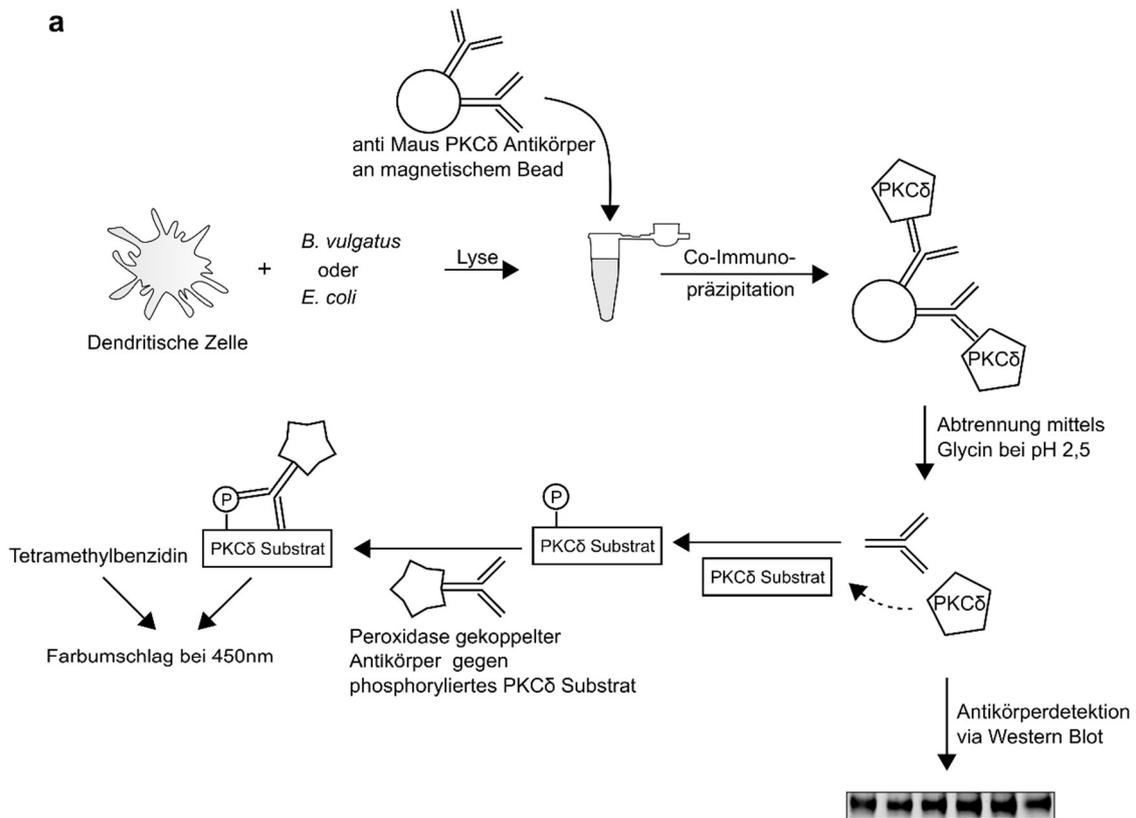


Abbildung 5: Bestimmung der PKCδ Aktivität in CD11c+ knochenmarksgereiften dendritischen Zellen aus Wildtyp Mäusen

Abb. 5a: Schematische Darstellung der Stimulation (2 h Dauer) CD11c+ knochenmarksgereifter dendritischer Zellen nach der Erläuterung in 2.2.4. Des Weiteren wird eine CoIP, wie in 2.2.10, der Aktivitätsassay, wie in 2.2.11 sowie die Antikörperdetektion, wie in 2.2.6 und 2.2.7 beschrieben, gezeigt. Der PKCδ Antikörper ist über ein G Protein an das magnetische Bead gekoppelt.

Abb. 5b: Repräsentativer Western Blot zur Antikörperdetektion im CoIP Eluat. Im Balkendiagramm ist die normierte Aktivität von PKCδ nach 2 h Stimulation CD11c+ KGDZ aus Wildtyp Mäusen mit *E. coli* mpk im Vergleich zu *B. vulgatus* mpk abgebildet. Die Normierung fand nach der Beschreibung in 2.2.13.3 statt. ($n_{B. vulgatus} = 5$; $n_{E. coli} = 7$).

Im Anschluss wurde ein an Peroxidase gekoppelter Antikörper, welcher an das phosphorylierte Substrat bindet, hinzugefügt. Um nun die Menge umgesetzten PKC δ Substrats zu messen, wurde Tetramethylbenzidin zur Lösung gegeben, was aufgrund der Umsetzung durch die gekoppelte Peroxidase zu einem Farbumschlag führte. Die im Photometer gemessene Extinktion ist somit direkt proportional zur Konzentration von katalytisch aktiver PKC δ im Zelllysat. Die erhaltenen Werte entsprechen der PKC δ Aktivität in Abhängigkeit der Qualität der Ko-Immunopräzipitation. Zur Kontrolle des Präzipitationserfolges wurde deshalb die relative Proteinmenge von PKC δ mithilfe eines Western Blots visualisiert. So konnte die gemessene PKC δ Aktivität auf die Bandenintensität des α -PKC δ Western Blots normiert werden. Dabei wird davon ausgegangen, dass die im Eluat enthaltene Menge Antikörper direkt proportional zur Menge des präzipitierten Proteins ist. Die Proteinmenge selbst konnte nicht zur Normierung herangezogen werden, da der Proteinanteil im Eluat für eine adäquate Messung zu gering war. Die Durchführung der Experimente erfolgte wie in 2.2 beschrieben.

Abbildung 5 b stellt die Aktivität von PKC δ nach 2 h Stimulation mit *E. coli* und *B. vulgatus* normiert auf die nicht stimulierte Kontrolle dar. Dabei ist eine signifikante Erhöhung der Aktivität, um ca. 20% bei Stimulation mit *E. coli* mpk gegenüber der Stimulation mit *B. vulgatus* mpk festzustellen ($p < 0,05$). Die Aktivität von PKC δ ist dementsprechend nach Stimulation mit einem Pathobionten in dabei entstehenden maturaen Zellen höher als in semi-maturaen Zellen.

3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration von Proteinkinase C δ und pThr505 Proteinkinase C δ in CD11c+ knochenmarksgereiften dendritischen Zellen aus Wildtyp Mäusen

Die in 3.1 gemessenen Änderungen der PKC δ Aktivität können durch verschiedene Mechanismen zustande kommen. Zu diesen gehören neben der Interaktion mit anderen Proteinen und unterschiedlicher Transkription des *Pkcd* Gens unter anderem die Konzentration des Proteins sowie dessen Phosphorylierung. Die Phosphorylierung von PKC δ steigert je nach Phosphorylierungsstelle dessen Aktivität. Daher wurde die intrazelluläre

Expression von PKC δ in mit *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk stimulierten CD11c+ KGDZ mithilfe von Western Blots detektiert. Einerseits wurde die Gesamtkonzentration von PKC δ gemessen, andererseits die Konzentration von bei Threonin 505 phosphorylierter PKC δ (pThr505 PKC δ). Threonin 505 ist eine Phosphorylierungsstelle von PKC δ , welche in der Aktivierungsschleife liegt. Die Aktivierungsschleife ist eine Region in der katalytischen Domäne von Enzymen und muss bei den meisten PKC phosphoryliert werden, damit sie aktiviert werden können. Während bei anderen Vertretern aus der Familie der Proteinkinasen C eine Phosphorylierung in der Aktivierungsschleife essentiell ist für deren Aktivität, muss PKC δ nicht phosphoryliert werden. Jedoch ist pThr505 PKC δ spezifischer für die Aktivierung von NF κ B [163]. Daher sollte mithilfe des Western Blots außerdem festgestellt werden, ob die Konzentration von pThr505 PKC δ bei verschiedenen Stimuli variiert.

Es wurden CD11c+ KGDZs für 2 h, 3 h, 4 h und 20 h mit entweder *B. vulgatus* oder *E. coli* mpk stimuliert und anschließend die PKC δ , bzw. die pThr505 PKC δ Konzentration untersucht. Die in Abbildung 6a dargestellten Western Blots zeigen die Gesamtexpression von PKC δ unabhängig von deren Phosphorylierungsstatus sowie die jeweils zugehörige Expression des Housekeepingproteins β -Actin. Dieses wurde zur Quantifizierung herangezogen, wie in 2.2.13.1 beschrieben.

In der Abbildung ist zu sehen, dass es weder zwischen den verschiedenen Stimuli signifikante Unterschiede der Proteinkonzentrationen von PKC δ gibt, noch zu den unterschiedlichen Zeitpunkten.

In Abbildung 6b sind Western Blots mit einem Antikörper gegen pThr505 PKC δ und die zugehörigen Blots gegen β -Actin dargestellt. Auch in diesem Fall sind keine signifikanten Unterschiede zwischen der Proteinkonzentration nach Stimulation mit entweder *B. vulgatus* oder *E. coli* mpk sowie der Negativkontrolle (mock) zu erkennen.

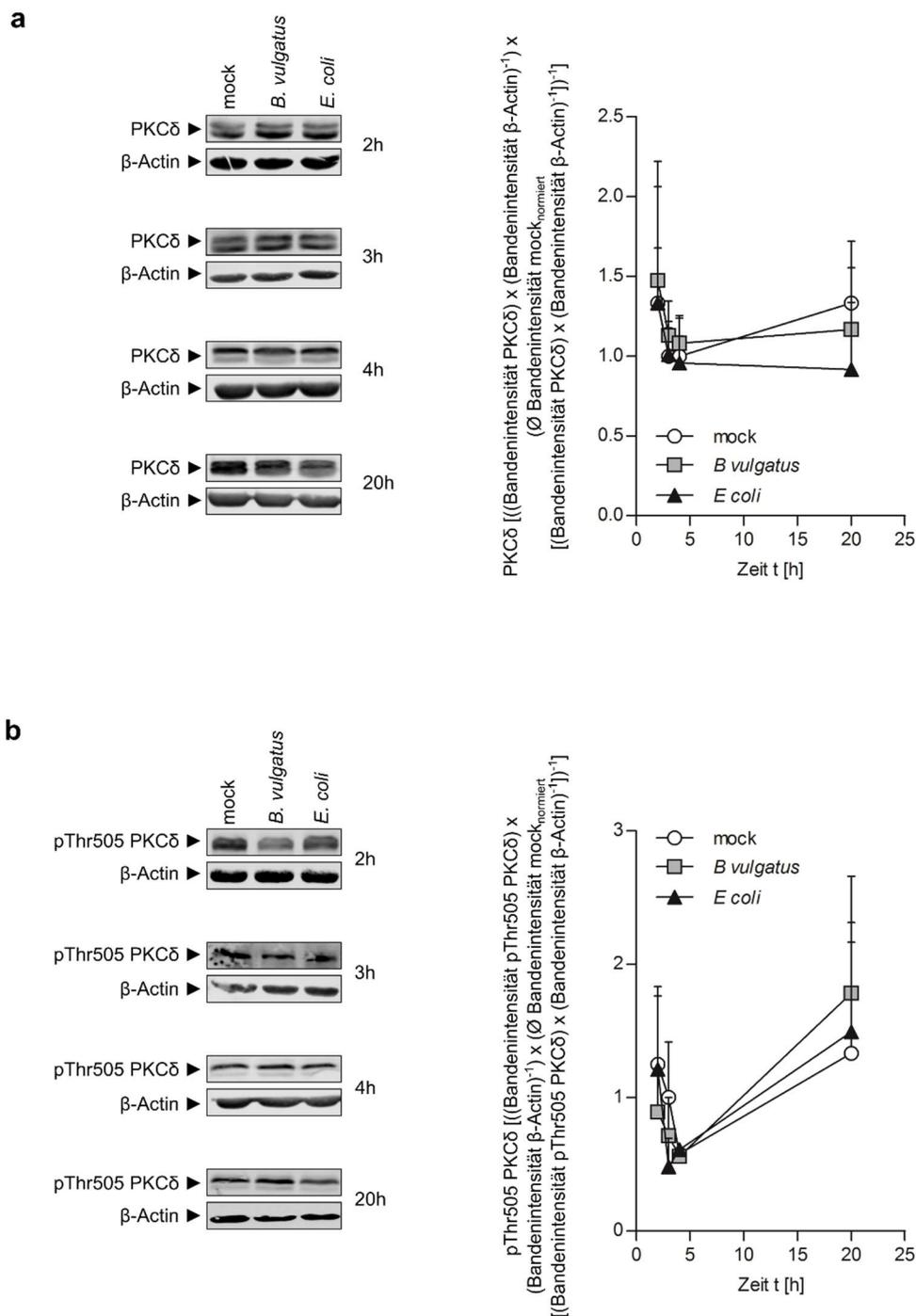


Abbildung 6: Bestimmung der Proteinkonzentration von Proteinkinase Cδ und pThr505 Protein-kinase Cδ in CD11c+ knochenmarksgereiften dendritischen Zellen aus Wildtyp Mäusen

Abbildung 6a: Darstellung repräsentativer Banden eines Western Blots gegen PKCδ. Von links nach rechts sind eine Negativkontrolle sowie Stimulationen CD11c+ KGDZ mit *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk aufgetragen. Von oben nach unten werden die verschiedenen Stimulationszeiträume 2 h, 3 h, 4 h und 20 h angegeben. Unter der jeweiligen Antikörperbande befindet sich der zugehörige Western Blot gegen β-Actin

zur Normierung. Der Zeitverlauf der PKC δ Konzentration nach verschiedenen Stimuli wird graphisch dargestellt. (2 h: n = 3; 3 h: n = 4; 4 h: n = 3; 20 h: n = 3)

Abbildung 6b: Der Aufbau der Abbildung, die Stimulationszeiten und die Stimuli entsprechen Abbildung 6a. Es werden repräsentative Banden gegen p505Thr PKC δ gezeigt. Der Zeitverlauf der pThr505 PKC δ Konzentration nach verschiedenen Stimuli wird graphisch dargestellt. (2 h: n = 4; 3 h: n = 4; 4 h: n = 1; 20 h: n = 3)

Somit lassen sich keine signifikanten Unterschiede, weder in der Konzentration von pThr505 PKC δ , noch in der Gesamtexpression von PKC δ nachweisen. Demnach hängen Änderungen der PKC δ Aktivität, nicht mit Unterschieden der PKC δ Konzentration zusammen, unabhängig von Zeit und Stimulus.

3.3 Bestimmung der 14-3-3 ζ Konzentration in CD11c+ knochenmarksgereiften dendritischen Zellen aus Wildtyp Mäusen und dessen Bindung an Cystatin C

Als weiterer Mechanismus zur Beeinflussung der PKC δ Aktivität kommt eine Regulation durch Interaktion mit anderen Proteinen oder Peptiden in Betracht. Ein solches Protein könnte das Protein 14-3-3 ζ sein, da gezeigt werden konnte, dass 14-3-3 ζ die Aktivität von PKC δ steigert [143]. Weiterhin konnte eine direkte physische Interaktion zwischen 14-3-3 ζ und dem Protein Cystatin C in vorausgegangenen und noch nicht publizierten Arbeiten beobachtet werden. Die physiologische Rolle dieser Interaktion ist allerdings bisher nicht klar. Nach der Hypothese, die dieser Arbeit zugrunde liegt, führt diese Bindung zu einer Regulation von PKC δ und damit zur Modulation einer folgenden Immunantwort. Wichtig ist dabei zu wissen, auf welche Art und Weise diese Regulation stattfindet. Dazu sollte einerseits bestätigt werden, dass Cystatin C an 14-3-3 ζ bindet und andererseits sollte untersucht werden, ob die Menge gebundenen 14-3-3 ζ abhängig vom Stimulus variiert und so die Aktivität von PKC δ beeinflusst wird. Daher sollte außerdem die Konzentration von 14-3-3 ζ gemessen werden, um den Einfluss von Konzentrationsschwankungen auf PKC δ Aktivitätsunterschiede abschätzen zu können.

Zunächst sollte gezeigt werden welche 14-3-3 ζ Konzentration in CD11c+ KGDZ nach unterschiedlichen Stimuli vorliegt. Hierzu wurden CD11c+ KGDZ für 2 h mit

B. vulgatus mpk und *E. coli* mpk stimuliert und auf β -Actin und die Negativkontrolle (Mock) normiert.

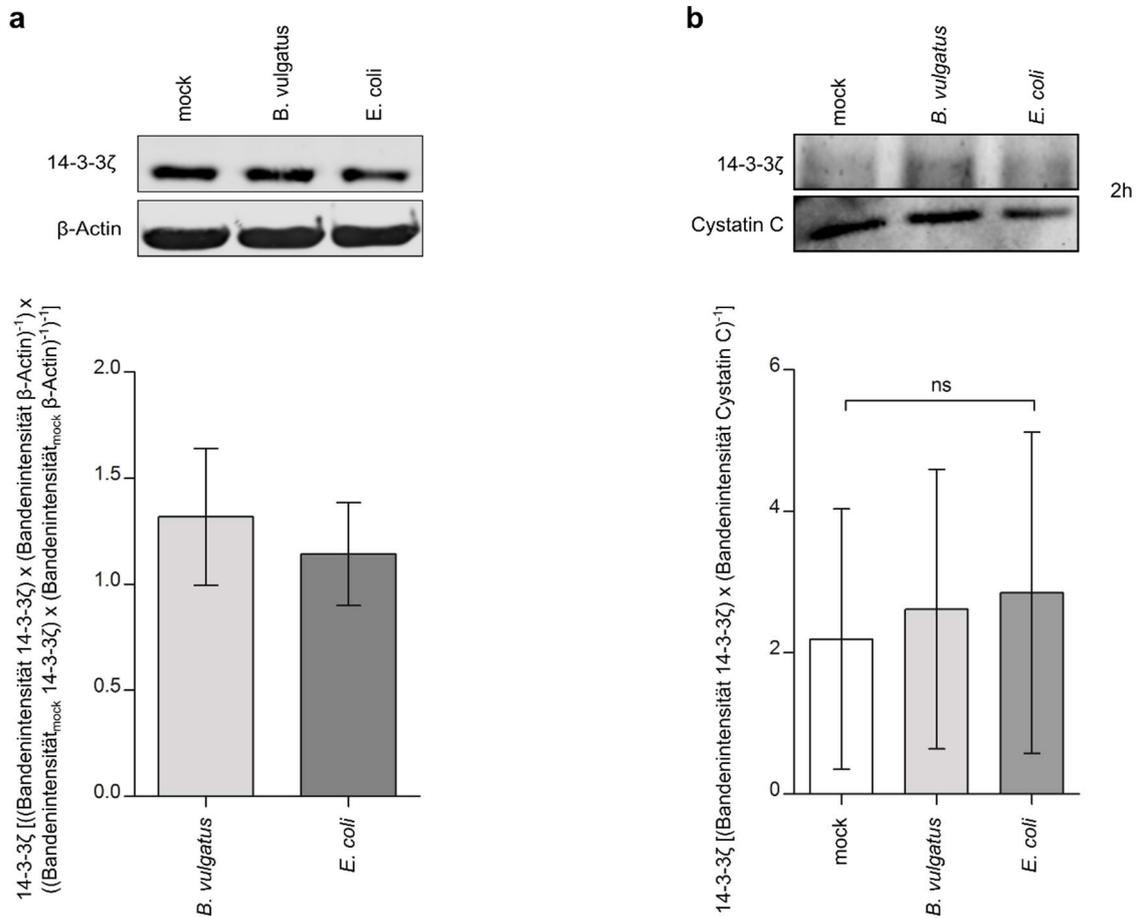


Abbildung 7: Bestimmung der 14-3-3 ζ Konzentration in CD11c⁺ knochenmarksgereiften dendritischen Zellen aus Wildtyp Mäusen und dessen Bindung an Cystatin C

Abbildung 7a zeigt repräsentative Western Blots gegen 14-3-3 ζ und das dazugehörige β -Actin. Aufgetragen sind eine Negativkontrolle sowie Stimulationen mit *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk mit einer Stimulationsdauer von 2 h. Die normierten Bandenintensitäten von *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk werden in einem Balkendiagramm dargestellt. Die Normierung erfolgte auf β -Actin und die Negativkontrolle. (*B. vulgatus*: n = 4; *E. coli*: n = 4)

In Abbildung 7b sind zwei repräsentative Western Blots des Eluats der CoIP gegen Cystatin C zu sehen. Es wurden Antikörper gegen 14-3-3 ζ und Cystatin C verwendet. Dargestellt sind je Blot drei Banden der Negativkontrolle sowie der Stimulationen mit *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk mit 2 h Stimulationsdauer. Die Intensitäten des Western Blots gegen 14-3-3 ζ wurden auf die Bandenintensitäten des Western Blot gegen Cystatin C normiert. Die berechneten Werte werden in einem Balkendiagramm dargestellt. (mock: n = 3; *B. vulgatus*: n = 3; *E. coli*: n = 3)

Hierbei ist die relative Proteinkonzentration bezogen auf mock nach Stimulation mit *E. coli* gleich hoch, wie nach Stimulation mit *B. vulgatus*. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede der 14-3-3ζ Konzentration nach verschiedenen Stimuli (siehe Abb. 7a). Somit wird die Konzentration von 14-3-3ζ in KGDZ nicht durch Stimulation mit Symbionten und Pathobionten beeinflusst.

Um im Folgenden eine Bindung von Cystatin C an 14-3-3ζ zu bestätigen, wurden zunächst CD11c+ KGDZ mit entweder *B. vulgatus* oder *E. coli* für 2 h stimuliert. Nach erfolgter Zellyse, wurde dann Cystatin C und direkt mit diesem Protein assoziierte Interaktionspartner mithilfe einer Ko-Immunopräzipitation gegen Cystatin C isoliert. Mit dem entstandenen Eluat wurde ein Western Blot gegen CysC und einer gegen 14-3-3ζ durchgeführt. Die Bandenintensitäten des Western Blots gegen 14-3-3ζ wurden auf die des Western Blots gegen CysC normiert.

Wie in Abbildung 7b zu sehen, zeigen die Werte weder nach Stimulation mit dem Pathobionten *E. coli*, noch nach Stimulation mit dem Symbionten *B. vulgatus* eine Veränderung. Es können demnach keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Konzentration von 14-3-3ζ im CysC Eluat nach unterschiedlichen Stimuli festgestellt werden.

Die 14-3-3ζ Konzentration ändert sich nicht abhängig von der Stimulation von 2 h Dauer mit *E. coli* mpk oder *B. vulgatus* mpk gegenüber der in CD11c+ KGDZ ohne Stimulation. Des Weiteren zeigt Abb. 7b, dass sich 14-3-3ζ zwar im CoIP Eluat gegen CysC nachweisen lässt, aber keine signifikanten Unterschiede in der Konzentration von 14-3-3ζ nach 2h Stimulation mit verschiedenen Kommensalen festzustellen sind.

3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration von PKCδ und pThr505 PKCδ in CD11c+ knochenmarksgereiften dendritischen Zellen aus Wildtypen im Vergleich zu Zellen aus *Cst3*^{-/-} Mäusen

In den folgenden Versuchen sollte erörtert werden, ob ein Fehlen von Cystatin C Änderungen der Proteinexpression von PKCδ bzw. pThr505 PKCδ und 14-3-3ζ zur Folge hat. Dazu wurden KGDZ aus *Cst3*^{-/-} Mäuse verwendet. Fehlt das Gen

Cst3, kann kein funktionelles Cystatin C synthetisiert werden. Cystatin C liegt nach Stimulation mit dem Pathobionten *E. coli* vermehrt als Dimer, nach Stimulation mit dem Symbionten *B. vulgatus* jedoch vermehrt als Monomer vor [99, 107]. Nach der Hypothese, die dieser Arbeit zugrunde liegt, beeinflusst CysC 14-3-3ζ durch Bindung des Peptids, was wiederum zu Änderungen der Aktivität von PKCδ führt. Durch Western Blots, vergleichend in Wildtypen und CysC-Knock-out Mäusen, sollte daher gezeigt werden ob Cystatin C einen Einfluss auf die Expression der oben genannten Proteine in der Zelle hat. Untersucht wurden die Zeitpunkte 2 h und 20 h nach Stimulation mit *B. vulgatus*, *E. coli* und mock.

3.4.1 Proteinkonzentration von PKCδ in CD11c+ knochenmarksgereiften dendritischen Zellen aus Wildtyp Mäusen und *Cst3*^{-/-} Mäusen

Zunächst wurde die intrazelluläre Konzentration von PKCδ in CD11c+ KGDZ nach 2 h und 20 h Stimulation mit entweder *B. vulgatus* mpk oder *E. coli* mpk untersucht. Die Bandenintensitäten der Western Blots gegen PKCδ in CD11c+ KGDZ wurden auf die Bandenintensitäten von β-Actin normiert. Im Anschluss wurde der Durchschnittswert der Negativkontrollen aus Wildtyp Mäusen berechnet und die normierten Bandenintensitäten der Western Blots gegen PKCδ in CD11c+ KGDZ wurden nochmals auf diesen Durchschnittswert normiert (siehe Kapitel 2.2.13.1). Dadurch sollten PKCδ Konzentrationsunterschiede in CD11c+ KGDZ nach Stimulation im Vergleich zu den Negativkontrollen deutlich gemacht werden.

Wie in Abbildung 8a zu sehen, sind hierbei keine signifikanten Unterschiede der PKCδ Konzentration feststellbar. Die Konzentration variiert dabei weder in Abhängigkeit vom Stimulus noch von CysC. Die PKCδ Konzentration wird daher nicht von CysC oder durch Stimulation mit Patho- oder Symbionten beeinflusst.

In Abb. 8b können ebenfalls keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Auch nach 20 h Stimulation von CD11c+ KGDZ mit entweder einem Pathobionten oder einem Symbionten sind keine Konzentrationsunterschiede von PKCδ feststellbar. Die Konzentration ist dabei unabhängig von CysC, da sich keine signifikanten Unterschiede in CD11c+ KGDZ aus Wildtyp Mäusen im Vergleich zu CD11c+ KGDZ aus *Cst3*^{-/-} Mäusen zeigen.

Somit ist die Konzentration von PKC δ unabhängig von der Stimulation mit den verwendeten Kommensalen und deren Stimulationsdauer. Außerdem zeigt CysC keinen Einfluss auf die Expression von PKC δ .

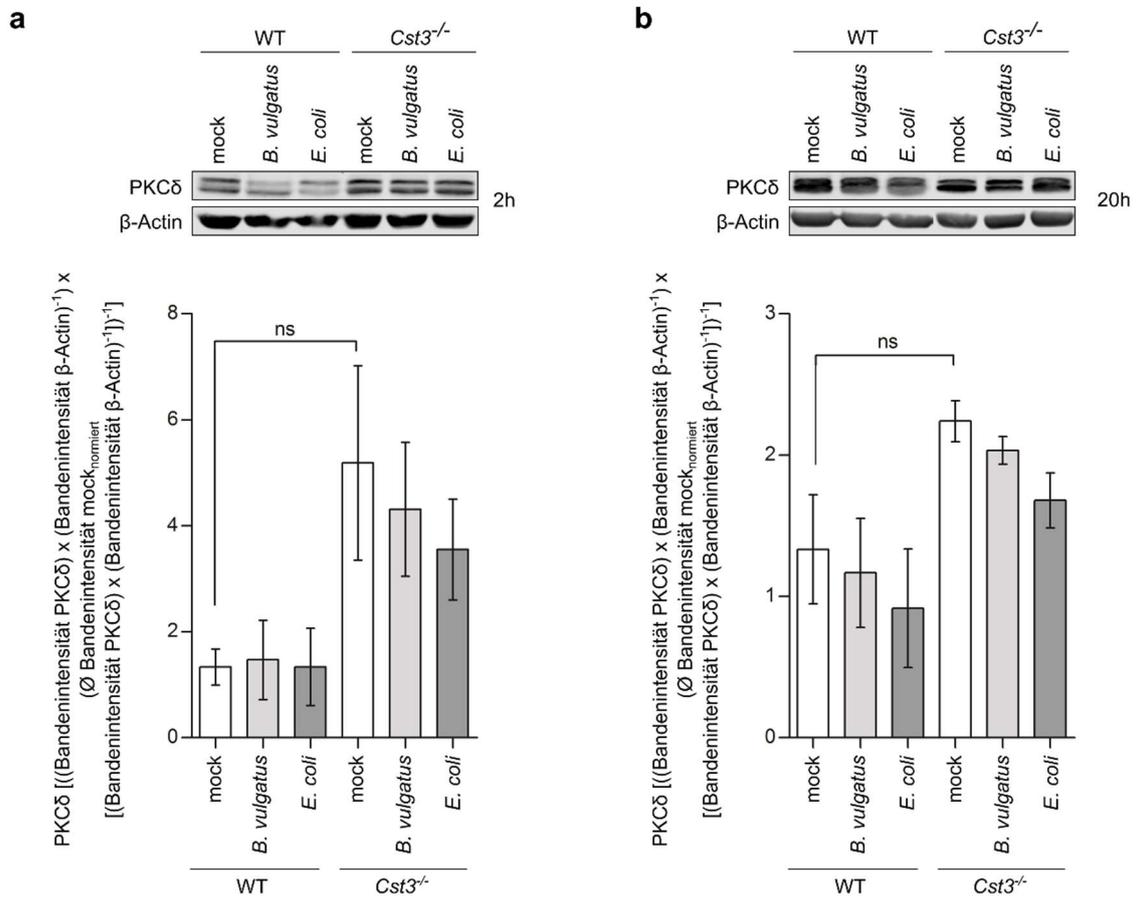


Abbildung 8: Proteinkonzentration von PKC δ in CD11c+ knochenmarksgereiften dendritischen Zellen aus Wildtyp Mäusen und *Cst3*^{-/-} Mäusen

Abbildung 8a zeigt einen repräsentativen Western Blot gegen PKC δ nach 2 h Stimulation. Es sind jeweils Stimulationen mit *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk sowie eine Negativkontrolle (mock) von CD11c+ KGDZ aus Wildtyp Mäusen aufgetragen und außerdem die entsprechenden Stimulationen von CD11c+ KGDZ aus *Cst3*^{-/-} Mäusen. Ebenfalls dargestellt ist repräsentativ der komplementäre Western Blot gegen β -Actin. Ein Balkendiagramm zeigt die Bandenintensitäten, normiert auf β -Actin und den Durchschnittswert der mock Wildtypen. (WT: mock: n = 3; *B. vulgatus*: n = 3; *E. coli*: n = 3; *Cst3*^{-/-}: mock: n = 4; *B. vulgatus*: n = 4; *E. coli*: n = 4)

Abbildung 8b zeigt die Stimulationen aus Abbildung 4a, mit einer Stimulationszeit von 20 h. (WT: mock: n = 3; *B. vulgatus*: n = 3; *E. coli*: n = 3; *Cst3*^{-/-}: mock: n = 3; *B. vulgatus*: n = 3; *E. coli*: n = 3)

3.4.2 Proteinkonzentration von pThr505 PKCδ in CD11c+ knochenmarksgereiften dendritischen Zellen aus Wildtyp im Vergleich mit Zellen aus *Cst3*^{-/-} Mäusen

Zur Untersuchung der Unterschiede bei pThr505 PKCδ wurde mithilfe von Western Blots gegen pThr505 PKCδ das gleiche Vorgehen gewählt wie in 3.4.2 beschrieben.

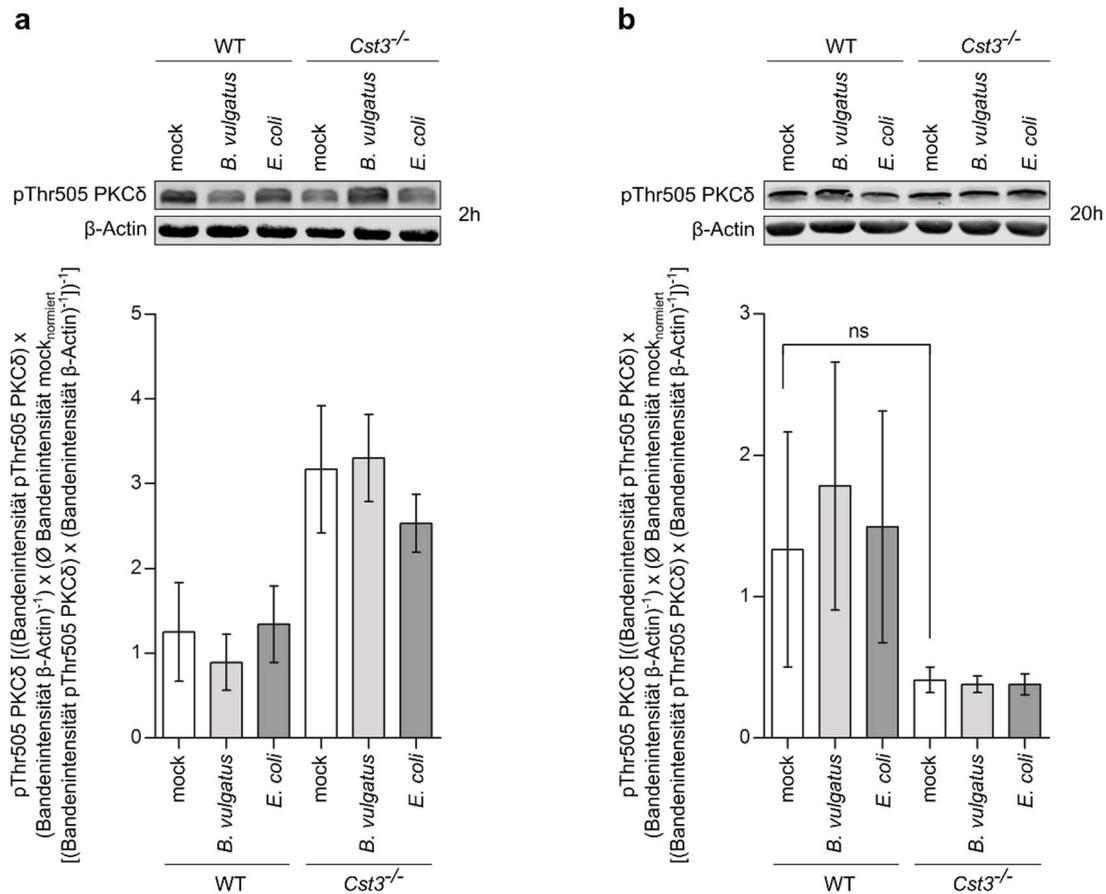


Abbildung 9: Proteinkonzentration von pThr505 PKCδ in CD11c+ knochenmarksgereiften dendritischen Zellen aus Wildtyp im Vergleich mit Zellen aus *Cst3*^{-/-} Mäusen

Abbildung 9a zeigt repräsentativ zwei Western Blots gegen β-Actin und pThr505 PKCδ nach 2 h Stimulation von CD11c+ KGDZ aus Wildtyp Mäusen sowie *Cst3* defizienten Mäusen mit je *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk sowie eine Negativkontrolle (mock). Im Balkendiagramm sind die Ergebnisse der Western Blots, normiert auf β-Actin und den Durchschnittswert der mock Wildtypen dargestellt. (WT: mock: n = 4; *B. vulgatus*: n = 4 *E. coli*: n = 4; *Cst3*^{-/-}: mock: n = 4; *B. vulgatus*: n = 4; *E. coli*: n = 4)

Abbildung 9b zeigt die Stimulationen aus Abbildung 9a, mit einer Stimulationszeit von 20 h. (WT: mock: n = 3; *B. vulgatus*: n = 3; *E. coli*: n = 3; *Cst3*^{-/-}: mock: n = 3; *B. vulgatus*: n = 3; *E. coli*: n = 3)

Wie in Abb. 9 zu sehen wurden Western Blots gegen pThr505 PKC δ mit CD11c+ KGDZ durchgeführt. Diese wurden zuvor mit den Kommensalen *B. vulgatus* mpk oder *E. coli* mpk für 2 h bzw. 20 h stimuliert. Die dabei erhaltenen Bandenintensitäten wurden danach auf die jeweiligen Bandenintensitäten des zugehörigen Western Blots gegen β -Actin normiert.

In Abbildung 9a zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Konzentration von pThr505 PKC δ nach 2 h Stimulation mit den genannten Kommensalen. Des Weiteren lässt sich kein signifikanter Konzentrationsunterschied in CD11c+ KGDZ aus *Cst3* defizienten Mäusen im Vergleich zu CD11c+ KGDZ aus Wildtypen feststellen

Ebenso zeigen die in Abb. 9b dargestellten Ergebnisse keine signifikanten Unterschiede. Weder die Art des Stimulus führt zu einem signifikanten Konzentrationsunterschied von pThr505 PKC δ in CD11c+ KGDZ aus Wildtypen oder *Cst3*^{-/-} Mäusen, noch hat CysC einen Einfluss auf die Konzentration des Proteins gemessen nach 20 h Stimulationszeit.

Die Stimulation von CD11c+ KGDZ mit *B. vulgatus* mpk oder *E. coli* mpk für 2 h und 20 h zeigen keine Auswirkung auf die Konzentration von pThr505 PKC δ . Weder in Wildtyp, noch in *Cst3* defizienten Mäusen können statistisch signifikante Unterschiede festgestellt werden. Auch CysC zeigt keinen Einfluss auf die pThr505 PKC δ Konzentration. CysC beeinflusst demnach nicht die Expression von PKC δ und dessen Phosphorylierungszustand an Thr505.

3.4.3 Proteinkonzentration von 14-3-3 ζ in CD11c+ knochenmarksgereiften dendritischen Zellen aus Wildtyp im Vergleich mit Zellen aus *Cst3*^{-/-} Mäusen

Die Messung von 14-3-3 ζ verlief nach demselben Prinzip wie in 3.4.1 und 3.4.2 mit einem Antikörper gegen 14-3-3 ζ . Es wurden CD11c+ KGDZ aus Wildtypen und *Cst3* defizienten Mäusen mit entweder *B. vulgatus* mpk oder *E. coli* mpk für je 2 h oder 20 h stimuliert. Die erhaltenen Bandenintensitäten wurden auf β -Actin sowie auf den Durchschnittswert der Wildtyp Negativkontrolle normiert. Hierbei ergibt sich nach 2 h Stimulation, wie in Abbildung 10a zu sehen, ein deutlicher

Unterschied zwischen der 14-3-3ζ Konzentration in CD11c+ KGDZ aus Wildtypen im Vergleich zu CD11c+ KGDZ aus *Cst3*^{-/-} Mäusen. Alle CD11c+ KGDZ aus Wildtypen nach den 3 Stimulationen beinhalten mehr Protein als CD11c+ KGDZ aus *Cst3* defizienten Mäusen. Die 14-3-3ζ Konzentration ist bei ersteren in der Negativkontrolle und nach Stimulation mit *E. coli* mpk in etwa 4-fach erhöht im Gegensatz zu CD11c+ KGDZ aus *CysC*-Knock-out Tieren nach der jeweiligen Stimulation. Nach Stimulation mit *B. vulgatus* mpk liegt die Proteinkonzentration ca. 5-fach erhöht vor.

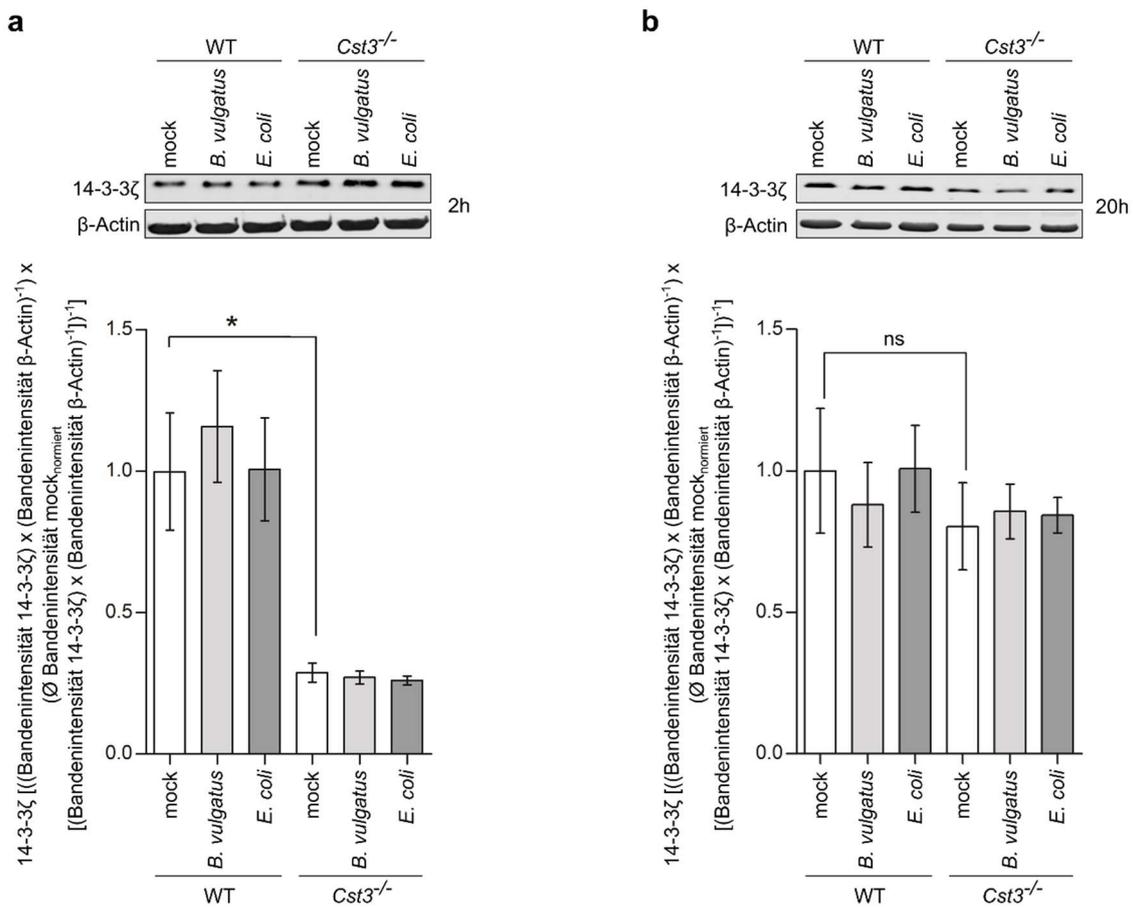


Abbildung 10: Proteinkonzentration von 14-3-3ζ in CD11c+ KGDZ aus Wildtyp im Vergleich mit Zellen aus *Cst3*^{-/-} Mäusen

Abbildung 10a stellt zwei repräsentative Western Blots mit Antikörpern gegen β-Actin und 14-3-3ζ nach 2 h Stimulation dar. Die Negativkontrolle (mock) sowie die Stimuli *B. vulgatus* und *E. coli* sind je für Wildtyp Mäuse und *Cst3*^{-/-} Mäuse aufgetragen. Im Balkendiagramm sind die Bandenintensitäten der Western Blots gegen 14-3-3ζ normiert auf β-Actin und den Durchschnittswert der Negativkontrollen von CD11c+ KGDZ aus Wildtypen dargestellt. (WT: mock: n = 5; *B. vulgatus*: n = 5 *E. coli*: n = 5; *Cst3*^{-/-}: mock: n = 4; *B. vulgatus*: n = 4; *E. coli*: n = 4)

Abbildung 10b zeigt die Stimulationen aus Abbildung 10a, mit einer Stimulationsdauer von 20 h. (WT: mock: n = 4; *B. vulgatus*: n = 4; *E. coli*: n = 4; *Cst3*^{-/-}: mock: n = 3; *B. vulgatus*: n = 3; *E. coli*: n = 3)

Der Unterschied der 14-3-3ζ Konzentration in den Negativkontrollen ist dabei mit $p < 0,05$ signifikant. Die Konzentrationsunterschiede in CD11c+ KGDZ nach Stimulation mit entweder *B. vulgatus* mpk oder *E. coli* mpk sind mit $p < 0,01$ signifikant.

Nach 20 h Stimulation sind diese Konzentrationsunterschiede nicht feststellbar. Die 14-3-3ζ-Konzentration ist, wie in Abbildung 10b zu sehen, unabhängig vom Stimulus. Des Weiteren zeigt sich kein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen CD11c+ KGDZ aus Wildtyp Mäusen und solchen aus *Cst3* defizienten Mäusen.

Zusammenfassend kann also ein statistisch signifikanter Unterschied in der 14-3-3ζ Konzentration zwischen den CD11c+ KGDZ aus Wildtyp Mäusen und denen aus *Cst3*^{-/-} Mäusen nach 2 h Stunden Stimulation festgestellt werden. CysC hat also einen Einfluss auf die Expression von 14-3-3ζ. Die Stimulation mit Pathobionten oder Symbionten hat hingegen keinen Einfluss auf die Expression von 14-3-3ζ. Nach 20 h Stimulationsdauer sind keine Unterschiede zu beobachten.

3.5 Bestimmung der Konzentration von 14-3-3ζ in CD11c+ knochenmarksgereiften dendritischen Zellen aus Wildtyp Mäusen

Da nach 2 h und 20 h Stimulation keine Unterschiede in der Konzentration festgestellt werden konnten, sollte überprüft werden, ob abhängig vom Stimulus, bzw. vom Zustand der CD11c+ KGDZ, die Konzentration von 14-3-3ζ im Zeitraum dazwischen variiert. Die Stimulationszeitpunkte 2 h, 3 h, 4 h und 20 h wurden untersucht. Die Bandenintensitäten wurden stets auf das β-Actin normiert.

Wie bereits in den in Abbildung 11a dargestellten Western Blots zu sehen ist, gibt es weder zwischen den verschiedenen Stimuli noch zwischen den unterschiedlichen Stimulationsdauern Unterschiede. Dies zeigt sich auch im in Abbildung 11b dargestellten Zeitverlauf. Die Expression von 14-3-3ζ in CD11c+ KGDZ nach Stimulation mit entweder *B. vulgatus* mpk oder *E. coli* mpk zeigt über den gesamten Zeitraum keine Veränderung, genauso wie die Proteinkonzentration in den Negativkontrollen. Die 14-3-3ζ Konzentration ist dabei unabhängig vom Stimulus.

Es zeigt sich demnach, dass die Expression von 14-3-3ζ in CD11c+ KGDZ aus Wildtyp Mäusen von der Stimulation mit Pathobionten und Symbionten nicht beeinflusst wird und die Proteinkonzentration auch bei längerer Stimulationsdauer konstant bleibt.

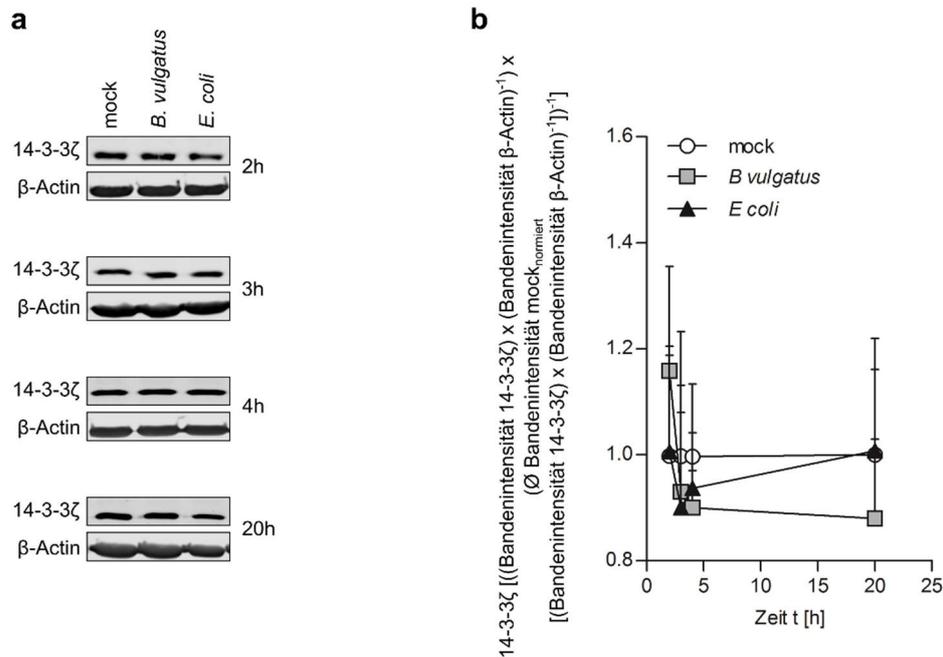


Abbildung 11: Bestimmung der Konzentration von 14-3-3ζ in CD11c+ Knochenmarksgereiften dendritischen Zellen aus Wildtyp Mäusen

In Abbildung 11a sind Western Blots gegen 14-3-3ζ und β-Actin zu sehen. Zu den Zeitpunkten 2 h, 3 h, 4 h und 20 h ist ein repräsentativer Blot zu sehen mit je drei Banden. Die Banden stellen die Negativkontrolle und die beiden Stimulationen mit *B. vulgatus* und *E. coli* dar.

Abbildung 11b zeigt den Zeitverlauf der normierten 14-3-3ζ Bandenintensitäten der drei Stimulationsmodi mock, *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk. (2 h: n = 5; 3 h: n = 4; 4 h: n = 3; 20 h: n = 4)

3.6 Vergleich der Aktivität von Proteinkinase Cδ in CD11c+ Knochenmarksgereiften dendritischen Zellen aus Wildtyp und *Cst3*^{-/-} Mäusen

Mit den bisherigen Versuchen sollte einerseits die Interaktion zwischen 14-3-3ζ und Cystatin C und andererseits ein Zusammenhang zwischen 14-3-3ζ und PKCδ gezeigt werden. Um abschließend nachzuweisen, dass CysC einen Einfluss auf die Aktivität von PKCδ hat, wurde nochmals die PKCδ Aktivität in CD11c+ KGDZ aus *Cst3*^{-/-} Mäusen gemessen. Die Zellen wurden mit *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk für 2 h stimuliert und wie in 3.1 beschrieben lysiert. Danach

wurde eine CoIP gegen PKC δ durchgeführt und das Eluat zur Aktivitätsbestimmung von PKC δ verwendet. Außerdem wurde ein Western Blot gegen PKC δ im CoIP Eluat durchgeführt, um im Folgenden die gemessene Aktivität auf die bestimmte Konzentration des PKC δ Antikörpers im Eluat zu normieren.

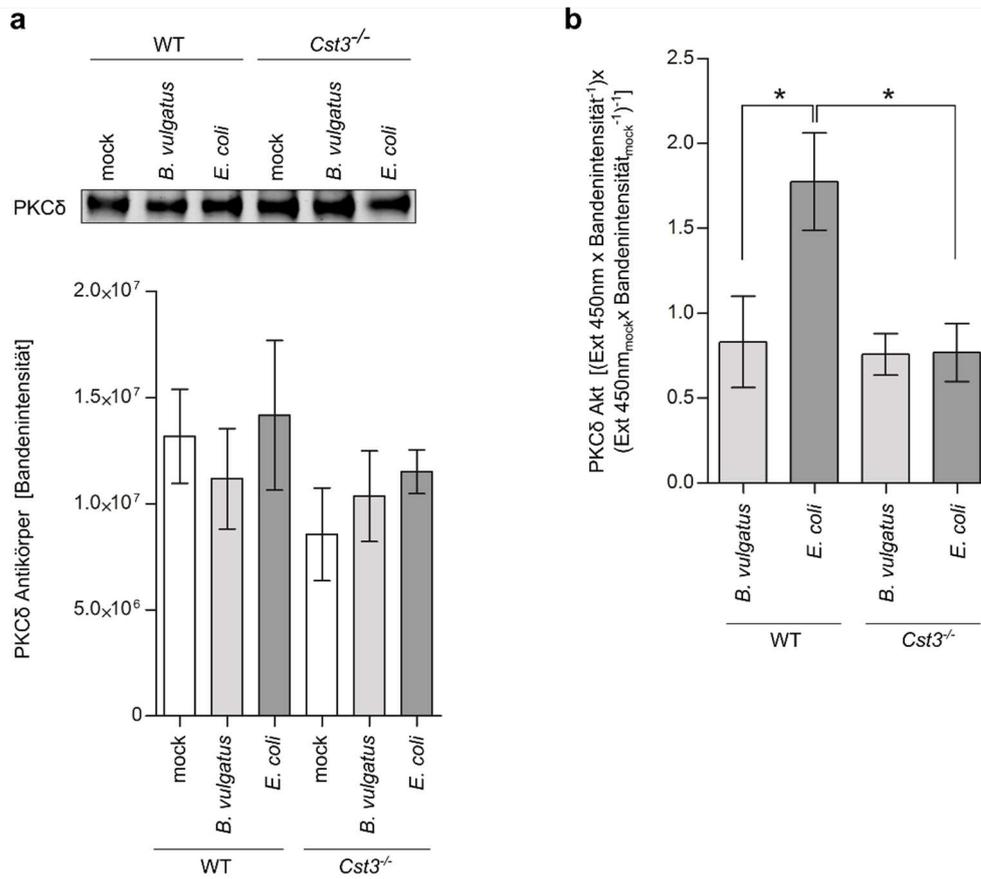


Abbildung 12: Vergleich der Aktivität von Proteinkinase C δ in CD11c+ KGDZ aus Wildtyp und *Cst3*^{-/-} Mäusen

Abbildung 12a zeigt einen repräsentativen Western Blot gegen den PKC δ Antikörper des Eluats der CoIP gegen PKC δ sowie die quantitative Auswertung der Bandenintensität, dargestellt in einem Balkendiagramm. Es werden Stimulationen von 2 h Dauer mit *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk in CD11c+ KGDZ aus Wildtypen und *Cst3*^{-/-} Mäusen abgebildet. Sie enthalten je eine Negativkontrolle (mock). (WT: mock: n = 7; *B. vulgatus*: n = 7; *E. coli*: n = 5; *Cst3*^{-/-}: mock: n = 7; *B. vulgatus*: n = 4; *E. coli*: n = 4)

In Abbildung 12b ist ein Balkendiagramm dargestellt, in welchem die PKC δ Aktivität nach Stimulation mit *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk in CD11c+ KGDZ aus Wildtyp und *Cst3*^{-/-} Mäusen aufgetragen ist. Die Aktivitäten wurden auf die jeweilige Negativkontrolle (mock) und die zugehörige Bandenintensität des Western Blots gegen PKC δ im Eluat normiert. (WT: *B. vulgatus*: n = 7; *E. coli*: n = 5; *Cst3*^{-/-}: *B. vulgatus*: n = 4; *E. coli*: n = 4)

In Abbildung 12a kann man sehen, dass es keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Konzentration des PKC δ Antikörpers in CD11c+ KGDZ aus Wildtyp Mäusen und *Cst3* defizienten Mäusen gibt. Nach Normierung der PKC δ Aktivität auf mock, kann man in Abbildung 12b erkennen, dass die PKC δ Aktivität in CD11c+ KGDZ aus *Cst3*^{-/-} Mäusen unabhängig von der Stimulation auf demselben Niveau ist, es also keinen Unterschied gibt. Des Weiteren gibt es keinen statistisch signifikanten Unterschied in der PKC δ Aktivität in CD11c+ KGDZ aus Wildtypen nach Stimulation mit *B. vulgatus* mpk im Vergleich zur Aktivität von PKC δ in CD11c+ KGDZ aus *Cst3*^{-/-} Mäusen, unabhängig vom Stimulus. Nach Stimulation mit *E. coli* mpk von CD11c+ KGDZ aus Wildtyp Mäusen, zeigt sich jedoch, wie bereits in 3.1 beschrieben, eine statistisch signifikant erhöhte PKC δ Aktivität von 120% im Vergleich zu der nach Stimulation mit *B. vulgatus* mpk. Gegenüber der Aktivität in *Cst3*^{-/-} Mäusen sowohl nach Stimulation mit *B. vulgatus* mpk als auch nach Stimulation mit *E. coli* mpk, ist die Aktivität um 130% erhöht. Diese Unterschiede sind statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Insgesamt zeigt sich also eine signifikant erhöhte PKC δ Aktivität nach Stimulation von CD11c+ KGDZ aus Wildtyp Mäusen mit *E. coli* mpk im Vergleich zur Aktivität in CD11c+ KGDZ aus CysC-Knock-out Mäusen nach demselben Stimulus. Außerdem ist sie erhöht im Vergleich zur Stimulation mit *B. vulgatus* mpk, unabhängig von der Herkunft der CD11c+ KGDZ, bzw. unabhängig von CysC. Die PKC δ Aktivität in CD11c+ KGDZ aus *Cst3* defizienten Mäusen unterscheidet sich unterdessen nicht in Abhängigkeit vom Stimulus. CysC beeinflusst demnach die Aktivität von PKC δ abhängig vom Stimulus.

3.7 Quantitative Bestimmung der iNOS mRNA und durchflusszytometrische Analyse von iNOS in CD11c+ knochenmarksgereiften dendritischen Zellen aus Wildtyp und *Cst3* defizienten Mäusen

Nachdem nicht nur die unterschiedliche Expression der Proteine CysC, 14-3-3 ζ und PKC δ nach verschiedenen Stimulationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten und in Abhängigkeit von CysC untersucht wurde, sondern auch die Aktivität von PKC δ unter den verschiedenen Umständen, ist es nun wichtig zu zeigen, welche immunologische Rolle PKC δ spielt. Dies dient dazu, eine Aussage über die

Auswirkungen der gemessenen Unterschiede treffen zu können. Hierzu wurde das Enzym induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase (iNOS) verwendet, da dessen Synthese indirekt über NFκB durch PKCδ induziert wird [208-210]. iNOS synthetisiert Stickstoffmonoxid (NO), welches bekanntermaßen an Entzündungsreaktionen beteiligt ist [220, 221]. Die NO Konzentration ist dabei direkt abhängig von der iNOS Konzentration, da sie konstitutiv aktiv ist und somit die NO Produktion vorrangig auf transkriptionaler Ebene reguliert wird [223, 254, 255]. Um einen Anhaltspunkt über die Neusynthese von iNOS zu erhalten, wurde mithilfe der quantitativen Echtzeit Polymerasekettenreaktion (qtPCR) die Menge der mRNA bestimmt, die aus dem Gen *Nos2* transkribiert wird. iNOS ist das Enzym, welches aus der untersuchten mRNA translatiert wird. So sollte gezeigt werden, dass Aktivitätsunterschiede von PKCδ zu einem unterschiedlichen inflammatorischen Endergebnis führen, in Form von variierenden iNOS Konzentrationen je nach Stimulus. Im Vergleich sollte also nach Stimulation mit *E. coli* mpk mehr iNOS bzw. *Nos2* mRNA vorhanden sein als nach Stimulation mit *B. vulgatus* mpk.

Um die mRNA quantifizieren zu können, wurden zunächst CD11c+ KGDZ aus Wildtyp Mäusen und aus *Cst3* defizienten Mäusen mit *B. vulgatus* mpk oder *E. coli* mpk für je 2 h und 18 h stimuliert und danach die mRNA (*Nos2*) aus den Zellen isoliert. Mithilfe der qtPCR wurden Ct Werte generiert, wie in Kapitel 2.2.13.4 beschrieben. Diese wurden sowohl auf jede Wildtyp Negativkontrolle normiert als auch auf die mitgeführte Untersuchung der mRNA (*Actb*), aus der β-Actin translatiert wird. Danach wurde aus den berechneten Werten der Mittelwert gebildet. Wie in Abbildung 13a zu sehen ist, ist nach 2 h Stimulation mit *E. coli* mpk oder *B. vulgatus* mpk kein Unterschied in der *Nos2* mRNA Expression in CD11c+ KGDZ aus Wildtyp Mäusen zu erkennen. Nach 18 h steigt die mRNA Expression nach Stimulation mit *E. coli* mpk auf mehr als das 3000-fache der Grundexpression. Im Gegensatz dazu bleibt die *Nos2* mRNA Expression bei Stimulation mit *B. vulgatus* mpk nach 18 h nahezu unverändert. Der Unterschied der *Nos2* mRNA Expression in CD11c+ KGDZ aus Wildtyp Mäusen nach Stimulation mit *E. coli* mpk im Vergleich zu der nach Stimulation mit *B. vulgatus*

mpk ist statistisch signifikant ($p < 0,001$). Im Folgenden wurde die *Nos2* mRNA Expression in Wildtypen und *Cst3*^{-/-} Mäusen verglichen.

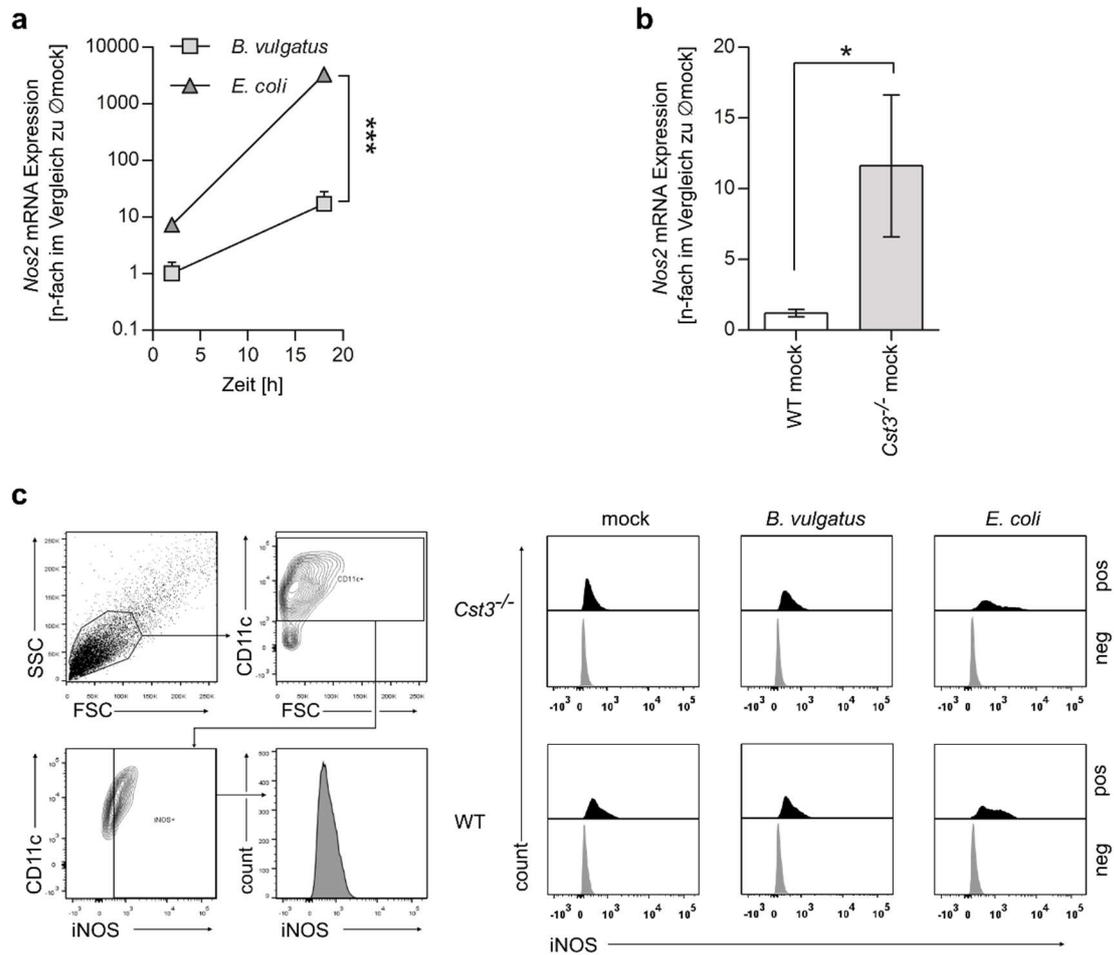


Abbildung 13: Quantitative Bestimmung der iNOS mRNA und durchflusszytometrische Analyse von iNOS in CD11c+ knochenmarksgereiften dendritischen Zellen aus Wildtyp und *Cst3* defizienten Mäusen

Abbildung 13a: Graphische Darstellung der *Nos2* mRNA Expression in CD11c+ KGDZ aus Wildtypen und *Cst3*^{-/-} Mäusen nach 2 h und 18 h Stimulation mit *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk. Die angegebenen Werte sind genormt auf die durchschnittliche Wildtyp Negativkontrolle (mock). (2 h: n = 5; 18 h: n = 5)

Abbildung 13b Vergleich *Nos2* Expression in *Cst3*^{-/-} Mäusen und Wildtypen in einem Balkendiagramm. Die angegebenen Werte sind genormt auf den durchschnittlichen Wildtyp mock. (WT mock: n = 5; KO mock: n = 3)

Abbildung 13c: Durchflusszytometrische Untersuchung CD11c⁺ KGDZ auf das Protein iNOS. Darstellung der Gating Strategie wie in 2.2.13.5 beschrieben. Außerdem werden exemplarisch Histogramme zu den verschiedenen Stimuli, nämlich zur Negativkontrolle (mock), zu *B. vulgatus* mpk und zu *E. coli* mpk. Die x-Achse stellt den Mean der Fluoreszenz Intensität (MFI) der Antikörper gegen iNOS dar. In den Histogrammen der oberen Reihe sind die Ergebnisse der Untersuchungen in *Cst3*^{-/-} Mäusen aufgezeigt, in der unteren die aus Wildtyp Mäusen. Innerhalb der Histogramme findet eine Aufteilung zwischen mit iNOS gefärbten (pos) und ungefärbten (neg) Zellen statt. Außerdem zeigt ein Balkendiagramm den Mean der Fluoreszenz Intensität von iNOS der jeweils drei Stimuli (Negativkontrolle (mock), *B. vulgatus* und *E. coli*) CD11c⁺ KGDZ aus Wildtyp und CysC-Knock-out Mäusen. (WT: mock: n = 7; *B. vulgatus*: n = 7; *E. coli*: n = 7; *Cst3*^{-/-}: mock: n = 7; *B. vulgatus*: n = 7; *E. coli*: n = 7)

Die Ergebnisse wurden auf die *Actb* mRNA Expression und danach auf die durchschnittliche *Nos2* mRNA Expression in Zellen der Negativkontrolle normiert (siehe 2.2.13.4). Dabei sollte erörtert werden, ob es bereits ohne Stimulus einen Unterschied zwischen der Expression von *Nos2* mRNA in CD11c⁺ KGDZ aus Wildtypen und denen aus CysC-Knock-out Mäusen gibt, sprich ob sich bereits die Grundexpression ohne Stimulus in Abhängigkeit von CysC unterscheidet. In Abbildung 13b zeigt sich, dass die Expression von *Nos2* mRNA in CD11c⁺ KGDZ aus *Cst3*^{-/-} Mäusen 11-fach erhöht ist im Vergleich zu der in Zellen aus Wildtypen. Dieser Unterschied zwischen der *Nos2* mRNA Expression in CD11c⁺ KGDZ aus Wildtypen und der in Zellen aus CysC-Knock-out Mäusen ist statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Da die Methode der qtPCR nur die mRNA misst und nicht die Menge des translatierten und funktionellen Proteins (iNOS), wurde zusätzlich eine durchflusszytometrische Untersuchung zur Quantitätsbestimmung von iNOS durchgeführt. Hierbei sollte die iNOS Konzentration in CD11c⁺ KGDZ bestimmt werden. Dazu wurde eine Färbung gegen CD11c durchgeführt, da sich dieses Oberflächenprotein v.a. auf KGDZ befindet [68, 256]. Des Weiteren wurde eine intrazelluläre Färbung zur Quantifizierung von iNOS⁺ Zellen durchgeführt. Das Gating erfolgte wie in 2.2.13.5 beschrieben und in Abbildung 13c zu sehen. Es wurden drei verschiedene Stimulationen durchgeführt: mock, *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk. Die Stimulationsdauer betrug 20 h. Zum Vergleich wurden DZ aus dem Knochenmark von Wildtyp Mäusen und *Cst3*^{-/-} Mäusen generiert.

In Abbildung 13c ist zu erkennen, dass in CD11c+ KGDZ nach Stimulation mit *E. coli* mpk mehr iNOS nachweisbar ist als in CD11c+ KGDZ der anderen beiden Stimulationen (Mock und *B. vulgatus* mpk). Dies gilt sowohl für CD11c+ KGDZ aus Wildtypen, als auch für CD11c+ KGDZ aus *Cst3* defizienten Mäusen. Die dargestellten Unterschiede sind mit $p < 0,05$ signifikant. Die Mean Fluorescence Intensity (MFI) steigt in CD11c+ KGDZ aus Wildtypen nach Stimulation mit *E. coli* mpk um 64% gegenüber der Negativkontrolle und in CD11c+ KGDZ aus CysC-Knock-out Mäusen um 55% gegenüber der Negativkontrolle. Keine Unterschiede lassen sich hingegen nach Stimulation mit *B. vulgatus* mpk sowie im Vergleich der verschiedenen Stimulationen in CD11c+ KGDZ aus Wildtypen mit Zellen aus *Cst3* defizienten Mäusen erkennen.

Demnach zeigen die Ergebnisse, dass die Stimulation von CD11c+ KGDZ aus Wildtyp Mäusen mit *E. coli* mpk stets zu einer erhöhten Expression von *Nos2* mRNA sowie dem funktionellen Protein iNOS im Vergleich zur Stimulation mit *B. vulgatus* mpk, bzw. zur Negativkontrolle, führt. Jedoch kann der beobachtete Unterschied der Expression von *Nos2* mRNA zwischen CD11c+ KGDZ aus Wildtyp Mäusen und *Cst3*^{-/-} Mäusen ohne Stimulus nicht auf Proteinebene festgestellt werden. Hier zeigt sich lediglich eine erhöhte iNOS Konzentration nach Stimulation mit *E. coli* in CD11c+ KGDZ aus Wildtyp sowie in Zellen aus *Cst3* defizienten Mäusen. Allerdings ist kein Unterschied abhängig vom Vorliegen von funktionellem Cystatin C feststellbar.

3.8 Bestimmung der Konzentration eines PKC δ Fragments nach Induktion von Apoptose unter Inhibition verschiedener Proteaseinhibitoren

Während der Apoptose einer Zelle kann die Gelenkregion spezifischer Proteinkinasen C durch Caspasen gespalten werden [148, 157, 158]. Im Prozess der Apoptose spielt v.a. das abgespaltene Fragment von PKC δ eine wichtige Rolle [257], da es ohne Phosphorylierung in der Aktivierungsschleife aktiv sein kann [163]. Im Western Blot gegen PKC δ ist dieses Fragment bei ca. 41 kDa zu sehen.

Bei der Bestimmung von PKC δ in CD11c+ KGDZ aus *Cst3*^{-/-} Mäusen kann man eine zusätzliche Bande oberhalb der 40kDa Markierung erkennen (siehe Abbildung 14a), welche in Western Blots gegen PKC δ aus CD11c+ KGDZ aus

Wildtypen nicht zu sehen ist. Um festzustellen welcher Zusammenhang zwischen Cystatin C und der proteolytischen Spaltung von PKC δ besteht, wurden dem Zellmedium zunächst verschiedene Proteaseinhibitoren hinzugegeben, um danach Apoptose mittels Staurosporin zu induzieren. Bei den Proteasen, die inhibiert wurden, handelte es sich einerseits um Cathepsin S und B mittels LHVS (irreversibler Cathepsin S Inhibitor) und Ca074-Me (Cathepsin B Inhibitor), bei denen bekannt ist, dass sie durch Cystatin C reguliert werden [105, 258, 259]. Andererseits wurde Caspase 3 mittels Z-DEVD-FMK (Caspase 3 Inhibitor) inhibiert, die nach heutigem Kenntnisstand PKC δ bei Apoptose spaltet [148, 157, 158]. Dies wurde vergleichend mit CD11c+ KGDZ aus *Cst3*^{-/-} Mäusen und aus Wildtyp Mäusen durchgeführt. Es sollte gezeigt werden, dass die gesuchte Bande bei Induktion von Apoptose mittels Staurosporin auch in CD11c+ KGDZ aus Wildtypen nachweisbar ist. Außerdem sollte die erfolgreiche Inhibition der Protease, die für die Spaltung von PKC δ verantwortlich ist, dargestellt werden.

Wie in Abb. 14a zu sehen, erscheint in CD11c+ KGDZ aus *Cst3* defizienten Mäusen im Western Blot gegen PKC δ eine Bande bei ca. 45 kDa, unabhängig vom Stimulus. Dies ist bei CD11c+ KGDZ aus Wildtyp Mäusen nicht zu beobachten. Abb. 14b zeigt, dass sich diese Bande auch unter Induktion von Apoptose mittels Staurosporin nicht in CD11c+ KGDZ aus Wildtyp Mäusen reproduzieren lässt. Daher zeigt sich auch in den Versuchen mit Proteaseinhibitoren keine Bande bei 45 kDa. Ca074-Me markiert zwei Banden, da beim Befüllen des Gelelektrophoresegels ein Teil des Untersuchungsmaterials in eine zweite Tasche gelangte. Anders verhält es sich in CD11c+ KGDZ aus *Cst3*^{-/-} Mäusen. Ohne Stimulus sowie unter Apoptoseinduktion mittels Staurosporin zeigt sich unverändert eine Bande bei 45 kDa. Auch die Inhibition mithilfe des Caspase 3 Inhibitors Z-DEVD-FMK verhindert die Entstehung des Fragments nicht. Lediglich die Inhibition der Proteasen Cathepsin B und S führt zu einer verminderten Konzentration des Fragments. Bei Inhibition mit Ca074-Me ist es in geringerer Konzentration und bei Inhibition mit LHVS nicht nachweisbar.

Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass in CD11c+ KGDZ aus *Cst3*^{-/-} Mäusen ein PKCδ Fragment mit einer Größe von ca. 45 kDa nachweisbar ist, welches in Zellen aus Wildtypen weder unter physiologischen Bedingungen, noch unter apoptotischen Verhältnissen vorhanden ist. Die Entstehung des Fragments ist unter Inhibition der Protease Cathepsin S nicht und unter Inhibition von Cathepsin B nur in verringerter Konzentration detektierbar.

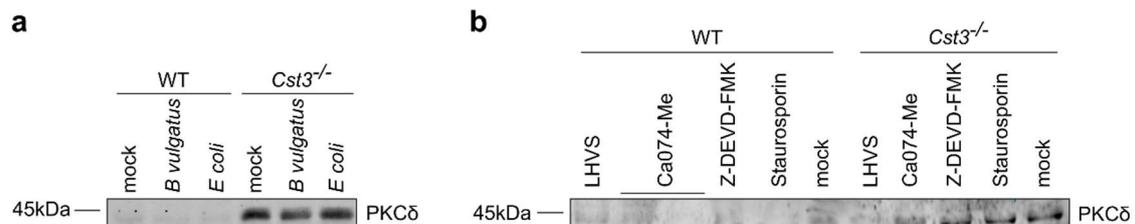


Abbildung 14: Bestimmung der Konzentration eines PKCδ Fragments nach Induktion von Apoptose unter Inhibition verschiedener Proteaseinhibitoren

Abbildung 14a zeigt einen Western Blot gegen PKCδ bei ca. 45 kDa. Es werden je drei Stimuli bei CD11c+ KGDZ aus Wildtypen und *Cst3*^{-/-} Mäusen gezeigt. Diese sind eine Negativkontrolle (mock) sowie *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk.

Abbildung 14b: Darstellung eines Western Blots gegen PKCδ in CD11c+ KGDZ aus Wildtyp und *Cst3*^{-/-} Mäusen unter Induktion von Apoptose mittels Staurosporin. Außerdem erfolgte bei je drei Banden in Wildtypen und *Cst3* defizienten Mäusen eine Inhibition verschiedener Proteasen zusätzlich zur Apoptose-induktion. Es wurde ein Caspase 3 (Z-DEVD-FMK), ein Cathepsin S (LHVS) und ein Cathepsin B Inhibitor (Ca074-Me) verwendet. Zusätzlich gibt es eine Negativkontrolle (mock). Die Banden liegen bei ca. 45kDa.

3.9 Quantitative Bestimmung der ALDH mRNA Expression und durchflusszytometrische Analyse der ALDH Aktivität in CD11c+ knochenmarksgereiften dendritischen Zellen

Eine Population, die wichtig für den Erhalt von Homöostase im Darm ist, ist die der regulierenden T-Zellen (Treg). Sie werden in Anwesenheit von Retinsäure von tolerogenen DZ induziert [241, 242]. Dazu ist das Enzym Aldehyddehydrogenase wichtig, da es benötigt wird, um aus dem Vitamin A Derivat Retinol Retinsäure herzustellen [244-246]. In diesem Experiment sollte gezeigt werden, dass CD11c+ KGDZ, die mit *B. vulgatus* mpk stimuliert wurden und somit semi-maturiert sind, durch das Vorhandensein von ALDH in der Lage sind, Tregs zu induzieren und Homöostase zu erhalten. Außerdem sollte gezeigt werden, dass CD11c+ KGDZ nach Maturation durch Stimulation mit *E. coli* mpk

diese Eigenschaft nicht besitzen. Schließlich sollten diese Eigenschaften von CD11c+ KGDZ aus Wildtyp Mäusen mit denen aus *Cst3*^{-/-} Mäusen verglichen werden.

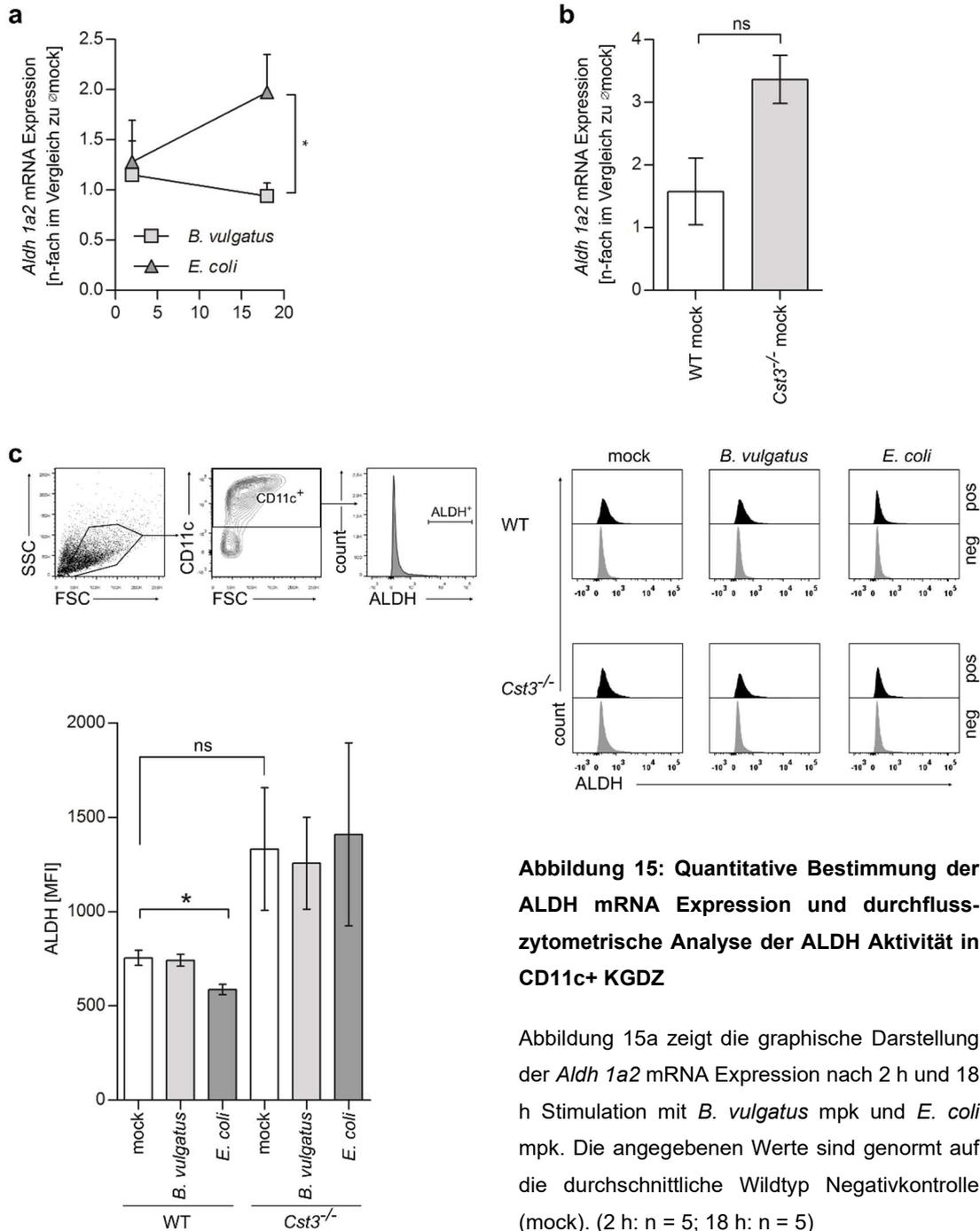


Abbildung 15: Quantitative Bestimmung der ALDH mRNA Expression und durchflusszytometrische Analyse der ALDH Aktivität in CD11c+ KGDZ

Abbildung 15a zeigt die graphische Darstellung der *Aldh 1a2* mRNA Expression nach 2 h und 18 h Stimulation mit *B. vulgatus* mpk und *E. coli* mpk. Die angegebenen Werte sind genormt auf die durchschnittliche Wildtyp Negativkontrolle (mock). (2 h: n = 5; 18 h: n = 5)

Abbildung 15b: Vergleich der *Aldh 1a2* Expression in CD11c+ KGDZ aus *Cst3*^{-/-} Mäusen und Wildtypen in einem Balkendiagramm. Die angegebenen Werte sind genormt auf den durchschnittlichen Wildtyp mock. (WT mock: n = 5; KO mock: n = 3)

Abbildung 15c: Darstellung der durchflusszytometrischen Untersuchung CD11c⁺ KGDZ auf die Aktivität des Proteins ALDH. Darstellung der Gating Strategie wie in 2.2.13.5 beschrieben. Außerdem werden exemplarisch Histogramme zu den verschiedenen Stimuli gezeigt, nämlich zur Negativkontrolle (mock), zu *B. vulgatus* mpk und zu *E. coli* mpk. Die x-Achse stellt den Mean der Fluoreszenz Intensität (MFI) der Antikörper gegen umgesetztes ALDH Substrat dar. In den Histogrammen der oberen Reihe sind die Ergebnisse der Untersuchungen in Wildtyp Mäusen aufgezeigt, in der unteren die aus *Cst3*^{-/-} Mäusen. Innerhalb der Histogramme findet eine Aufteilung zwischen Zellen statt, denen ein ALDH Inhibitor zugegeben wurde (pos) und Zellen, denen kein Inhibitor gegeben wurde (neg). Außerdem zeigt ein Balkendiagramm den Mean der Fluoreszenz Intensität der ALDH Aktivität nach den jeweils drei Stimuli (Negativkontrolle (mock), *B. vulgatus* und *E. coli*) bei CD11c⁺ KGDZ aus Wildtyp und CysC-Knock-out Mäusen. (WT: mock: n = 3; *B. vulgatus*: n = 3; *E. coli*: n = 3; *Cst3*^{-/-}: mock: n = 3; *B. vulgatus*: n = 3; *E. coli*: n = 3)

Hierzu wurde zunächst eine quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion durchgeführt, um die Expression des Gens *Aldh 1a2* zu untersuchen. Dazu wurden CD11c⁺ KGDZ aus Wildtyp und *Cst3* defizienten Mäusen nach 2 h und 16 h Stimulation mit *B. vulgatus* mpk oder *E. coli* mpk verwendet. Des Weiteren wurde die ALDH Aktivität durchflusszytometrisch bestimmt, indem ein in bestimmter Zeit umgesetztes Substrat mit einem Antikörper detektiert wurde. Hierbei wurden CD11c⁺ KGDZ aus Wildtypen sowie aus CysC-Knockout Mäusen mit denselben Bakterienstämmen (*E. coli* mpk oder *B. vulgatus* mpk) für 18 h stimuliert.

Wie in Abb. 15a zu sehen, ist die *Aldh 1a2* mRNA Expression nach 2 h unabhängig vom Stimulus gleich. Nach 18 h jedoch zeigt sich, dass die Expression von *Aldh 1a2* mRNA in CD11c⁺ KGDZ nach Stimulation mit dem Pathobionten *E. coli* mpk statistisch signifikant höher ist als nach Stimulation mit dem Symbionten *B. vulgatus* mpk ($p < 0,05$). Die Expression von *Aldh 1a2* mRNA ist nach Stimulation mit *E. coli* mpk ca. doppelt so hoch wie nach Stimulation mit *B. vulgatus* mpk.

Im Vergleich der *Aldh 1a2* mRNA Expression ohne Stimulus zwischen CD11c⁺ KGDZ aus Wildtyp Mäusen und aus *Cst3* defizienten Mäusen zeigt sich kein signifikanter Unterschied, wie in Abb. 15b zu sehen. Demnach hat CysC keinen Einfluss auf die *Aldh 1a2* mRNA Expression in CD11c⁺ KGDZ ohne vorherigen Stimulus.

Wie in Abb. 15c zu sehen, wurde zur Bestimmung der ALDH Aktivität in der Durchflusszytometrie zunächst nach CD11c gated und danach nach ALDH+ KGDZ. Dabei stellt sich heraus, dass die MFI von ALDH+ CD11c+ KGDZ aus Wildtypen nach 18 h Stimulation mit *E. coli* mpk um ca. 20% geringer ist im Vergleich zur Negativkontrolle (Mock) und zu Zellen nach Stimulation mit dem Symbionten *B. vulgatus* mpk. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($p < 0,05$). Im Gegensatz dazu lässt sich bei ALDH+ CD11c+ KGDZ aus *Cst3* defizienten Mäusen kein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit vom Stimulus feststellen. Die MFI ist in KGDZ der Negativkontrolle gleich hoch wie in KGDZ nach Stimulation mit *B. vulgatus* mpk oder *E. coli* mpk. Außerdem lässt sich kein Unterschied in Abhängigkeit von CysC feststellen. Die Aktivität von ALDH in KGDZ aus *Cst3*^{-/-} Mäusen ist unverändert im Vergleich zu der in KGDZ aus Wildtypen.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die Expression der *Aldh 1a2* mRNA nach 16 h Stimulation von CD11c+ KGDZ mit *E. coli* mpk doppelt so hoch ist, wie die nach Stimulation mit *B. vulgatus* mpk. Außerdem zeigt sich kein Unterschied in der Expression von *Aldh 1a2* mRNA im Vergleich zu unstimulierten CD11c+ KGDZ aus Wildtyp Mäusen und denen aus CysC-Knockout Mäusen. In der durchflusszytometrischen Aktivitätsmessung von ALDH zeigt sich, dass CD11c+ KGDZ aus Wildtyp Mäusen nach 18 h Stimulation mit *E. coli* mpk eine ca. 20% geringere ALDH Aktivität aufweisen als solche ohne Stimulus oder nach Stimulation mit *B. vulgatus* mpk. Im Vergleich zu CD11c+ KGDZ aus *Cst3* defizienten Mäusen zeigen sich unabhängig vom Stimulus keine signifikanten Unterschiede in der ALDH MFI.

4. Diskussion

4.1 Stimulation von KGDZ mit intestinalen Pathobionten führt zu einer höheren PKC δ Aktivität als Stimulation mit intestinalen Symbionten

Die Bindung eines Agonisten an Toll-like Rezeptoren dendritischer Zellen (DZ) führt in der Regel zu deren Maturation. In vorausgegangenen Arbeiten konnte allerdings gezeigt werden, dass nicht immer eine Maturation resultiert. Beispielsweise nehmen CD11c+ KGDZ bei Stimulation mit symbiontischen Kommensalen wie *B. vulgatus* mpk einen semi-maturen Phänotyp ein. Diese DZ sind tolerant gegenüber weiteren Antigenen und tolerogen in Bezug auf T-Zellen, da sie aktiv regulatorische T-Zellen (Treg) induzieren können. Auf diese Art und Weise sind sie in der Lage, aktiv pathologische proinflammatorische Immunreaktionen im Intestinum zu verhindern [57, 58, 69, 70]. Im Gegensatz dazu resultiert ein maturer Phänotyp aus der Stimulation mit Pathobionten wie *E. coli* mpk. Dieser Phänotyp ist nicht tolerogen und bewirkt eine inflammatorische Antwort bei Kontakt mit Antigenen [69]. Außerdem ist eine erhöhte Aktivität von PKC δ bei intestinaler Inflammation unter anderem in Zellen des Mukosaepithels seit längerem bekannt [213, 214]. Aus diesem Zusammenhang ergab sich die Fragestellung, ob intestinale kommensale Bakterien differentiell die Aktivität von PKC δ des Wirts und so, über DZ die Immunantwort an mukosalen Grenzflächen beeinflussen.

Die in 3.2 abgebildeten Daten zeigen, dass diese Aktivitätssteigerung nicht mit einer vermehrten Expression von PKC δ zusammenhängt, da keine Konzentrationsunterschiede von PKC δ sowie von pThr505 PKC δ nach unterschiedlichen Stimuli festzustellen sind.

Den Aktivitätsunterschieden liegt also vielmehr eine vermehrte Aktivierung oder eine Erhöhung der Aktivität der bereits translatierten Enzyme zugrunde, da weder Unterschiede in der PKC δ Konzentration noch in der pThr505 PKC δ Konzentration nach verschiedenen Stimulationen nachzuweisen sind. In dieser Arbeit wurde lediglich die Aktivität nach 2 h erhoben, wobei eine erhöhte Aktivität bei maturen DZ, sprich nach Stimulation mit dem Pathobionten *E. coli* mpk, festgestellt werden konnte. Allerdings sollten in folgenden Arbeiten Messungen

nach längeren Stimulationszeiten durchgeführt werden, um einen Überblick über den zeitlichen Verlauf zu erhalten. Dabei könnte erörtert werden, ob die Aktivität von PKC δ ein kurzzeitiges Maximum hat oder ob sie dauerhaft erhöht bleibt.

Insgesamt kann aber gesagt werden, dass die PKC δ Aktivität in CD11c+ KGDZ aus Wildtyp Mäusen nach 2 h Stimulation mit *E. coli* mpk, sprich in maturen DZ gegenüber immaturren und semi-maturren DZ, nach Stimulation mit *B. vulgatus* mpk erhöht ist. Pathobionten erhöhen demnach die PKC δ Aktivität in CD11c+ KGDZ im Gegensatz zu Symbionten, welche keinen Einfluss auf die Aktivität der Kinase haben und erhöhen damit auch die Wahrscheinlichkeit einer proinflammatorischen Antwort des Immunsystems als Reaktion auf Kontakt mit Antigenen.

4.2 Cystatin C bindet an 14-3-3 ζ

Welche molekularen Mechanismen bei Kontakt mit dem Pathobionten *E. coli* mpk mit DZ zu einer erhöhten PKC δ Aktivität führen, ist bisher nicht vollständig bekannt. Jedoch sind einige Proteine bekannt, die mit PKC interagieren. Zu diesen Proteinen gehören 14-3-3 Proteine, insbesondere 14-3-3 ζ [141, 142]. 14-3-3 ζ führt vermutlich durch Bindung an PKC δ zu dessen Aktivierung [143]. Noch unveröffentlichte Ergebnisse vergangener Experimente wiesen auf eine direkte physische Interaktion von 14-3-3 ζ mit Cystatin C in KGDZ hin. Das Protein Cystatin C (CysC) ist bisher lediglich bekannt als Inhibitor verschiedener Cystein Proteasen der Papain Familie und Legumain [103, 104], nicht aber als endogener Regulator von Kinasen, wie PKC δ . Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob Kommensale die Aktivität von PKC δ über CysC beeinflussen. Die Inhibition der genannten Proteasen kommt zustande durch eine enge, nicht-kovalente Bindung von CysC an die Enzyme [102]. Allerdings können bei hohen Konzentrationen von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in der Zelle auch CysC Homodimere gebildet werden [99]. Dadurch ist eine Bindung von CysC an Proteasen und somit ebenfalls deren Inhibition nicht mehr möglich [102, 106]. Dieser Zusammenhang lässt vermuten, dass auch im Fall der Regulation von PKC δ CysC eine Rolle spielt, indem es bei hohen ROS Konzentrationen als Homodimer vorliegt, in Abwesenheit von ROS jedoch, wie bereits bei der Inhibition von Proteasen, als

Monomer an 14-3-3 ζ bindet und dessen aktivierende Wirkung auf PKC δ inhibiert, da es die Bindung von 14-3-3 ζ an die Kinase verhindert. Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von DZ mit *B. vulgatus* mpk zu niedrigen Konzentrationen an ROS führt, die Stimulation mit *E. coli* mpk hingegen zu hohen. Die höchste ROS Konzentration wurde hierbei nach 2 h Stimulation gemessen [107].

Nach der Hypothese, die dieser Arbeit zugrunde liegt, könnte 14-3-3 ζ bei hohen ROS Konzentrationen in CD11c+ KGDZ, wie nach Stimulation mit dem Pathobionten *E. coli* mpk, PKC δ binden und dessen Aktivität erhöhen, da CysC also Homodimer vorläge und dessen Bindungsdomäne blockiert wäre. Bei niedrigen Konzentrationen von ROS in CD11c+ KGDZ nach Stimulation mit *B. vulgatus* mpk läge CysC jedoch als Monomer vor und verhinderte durch Bindung an 14-3-3 ζ dessen aktivierende Wirkung auf PKC δ .

Mit den in 3.3 dargestellten Ergebnissen konnte bestätigt werden, dass Cystatin C 14-3-3 ζ bindet, da eine CoIP mit einem spezifischen Antikörper gegen Cystatin C aus Zelllysat dendritischer Zellen durchgeführt wurde und im darauffolgenden Western Blot des Eluats 14-3-3 ζ festgestellt werden konnte. Liegt im Eluat der CoIP noch 14-3-3 ζ vor, bedeutet dies, dass 14-3-3 ζ an CysC gebunden war und so aus dem Zelllysat herauspräzipitiert werden konnte. Ein Zusammenhang zwischen bestimmten Stimuli und der Menge gebundenen 14-3-3 ζ konnte nicht gezeigt werden. Allerdings ist CysC, obgleich es auch in der Zelle vorkommt, wie von *Steimle et al.* gezeigt [107], vor allem ein extrazellulär vorliegendes Protein [103, 260]. Möglich ist daher, dass nach der CoIP nur wenig CysC im Präzipitat nachweisbar war. Dies erschwerte die Quantifizierung von 14-3-3 ζ , weshalb die Ergebnisse bezüglich eines Zusammenhangs zwischen Stimulus und gebundenem 14-3-3 ζ durch CysC nur eingeschränkt zu interpretieren sind. Für eine quantitative Auswertung sollte das Experiment bei erhöhter Zellzahl wiederholt werden, um die Proteinkonzentration im Zelllysat zu erhöhen. Ein Unterschied in der Konzentration von 14-3-3 ζ nach verschiedenen Stimuli konnte nicht beobachtet werden, was eine Regulation der Proteinkonzentration als Reaktion auf die Stimulation von CD11c+ KGDZ mit Symbionten und Pathobionten unwahrscheinlich macht. Eine Möglichkeit, die dieses Ergebnis verfälscht

haben könnte, wäre die Dimerisierung von 14-3-3 ζ . Dies würde zur Arbeit von Jones et al. Passen, die beschreibt, dass 14-3-3 Proteine natürlicherweise als Homo- und Heterodimere vorliegen [261]. Zur Auswertung wurde die 27 kDa Bande verwendet. Dimere, die durch das SDS Gel daher nicht aufgetrennt worden wären, würden allerdings bei 54 kDa laufen und würden somit nicht bei der Quantifizierung erfasst. Um die Dimerbildung zu verhindern, wurden die Proben vor dem Western Blot für fünf Minuten bei 90 °C gekocht. Jedoch konnte selbst nach dem Kochen noch eine schwache Bande bei 54kDa festgestellt werden. Zwar ist eine quantitative Analyse des Bindungsverhaltens erschwert, eine Schlussfolgerung über eine generelle Bindung zwischen CysC und 14-3-3 ζ kann jedoch trotzdem getätigt werden.

So bleibt zwar unklar, ob 14-3-3 ζ nach Stimulation von CD11c+ KGDZ mit Symbionten oder Pathobionten unterschiedlich an CysC bindet, die prinzipielle Bindung der beiden Moleküle konnte jedoch gezeigt werden. Dies macht eine Interaktion zwischen CysC und 14-3-3 ζ unter physiologischen Bedingungen sehr wahrscheinlich. Somit ist auch eine Beeinflussung der PKC δ Aktivität durch CysC über 14-3-3 ζ möglich.

4.3 Cystatin C hat einen Einfluss auf die Konzentration von 14-3-3 ζ , aber nicht auf die Proteinkonzentration von PKC δ

Da CysC mit 14-3-3 ζ interagiert, wäre es möglich, dass CysC auch Einfluss auf dessen Proteinkonzentration hat, beispielsweise indem es das Protein bindet und damit die Konzentration des freien Proteins sinkt, was eine Hochregulation der Proteinexpression zur Folge haben könnte. Ähnliches wäre für die PKC δ Konzentration möglich, da, wie bereits erwähnt, bekannt ist, dass 14-3-3 Proteine mit Proteinkinase C interagieren [183] und die Aktivität von PKC *in vitro* durch 14-3-3 ζ gesteigert wird [141, 142]. So steigert 14-3-3 ζ auch die Aktivität von PKC δ [143]. Um einen Einfluss von CysC auf die Proteinexpression von PKC δ , pThr505 PKC δ und 14-3-3 ζ auszuschließen, wurden CD11c+ KGDZ aus *Cst3*^{-/-} Mäusen verwendet. Eine Regulation der Proteinkonzentration dieser Proteine durch CysC ist bisher nicht bekannt. Daher sollte gezeigt werden, dass es keinen solchen Unterschied zwischen CD11c+ KGDZ aus Wildtyp und *Cst3* defizienten

Mäusen gibt. Es konnte bereits gezeigt werden und wurde, wie in 3.5 beschrieben, bestätigt, dass die Proteinkonzentration nach unterschiedlichen Stimuli gleichbleibt. Dies gilt auch für 14-3-3ζ.

Zunächst wurde die Proteinkonzentration von PKCδ und pThr505 PKCδ in CD11c+ KGDZ aus Wildtypen und CysC-Knock-outs verglichen. Um die Ergebnisse interpretieren zu können, sind die bekannten Einflüsse auf die PKCδ Konzentration wichtig. Die Regulation von PKCδ ist komplex und von verschiedenen Faktoren, wie Organ und Geschlecht, abhängig. So ist beispielsweise die Expression von PKCδ in der Leber von Ratten bei Weibchen zweimal so groß wie bei Männchen [262]. Ein Mechanismus wurde bei UV-induzierter Apoptose beschrieben. Hierbei steigt die Synthese von PKCδ über NFκB und RelA, die an die Promotorregion von PKCδ binden [263]. Der Hypothese nach liegt in DZ ohne CysC 14-3-3ζ frei vor und kann dementsprechend die Aktivität von PKCδ erhöhen. Bekannt ist wiederum, dass PKCδ dafür sorgt, dass NFκB in den Nukleus translozieren kann, was unter anderem zur Folge hat, dass PKCδ vermehrt synthetisiert wird [209, 253, 264]. Wäre dieser Mechanismus korrekt, müsste jedoch auch die Proteinexpression in DZ steigen, die mit *E. coli* mpk stimuliert wurden. Ein Anstieg dieser Art ist nicht festzustellen. Allgemein gibt es keine signifikanten Unterschiede der PKCδ Proteinkonzentration nach den verschiedenen Stimuli und im Vergleich zwischen CD11c+ KGDZ aus Wildtypen und *Cst3*^{-/-} Mäusen, wie in 3.5 beschrieben. Ebenso verhält es sich bei pThr505 PKCδ. Daraus kann geschlossen werden, dass die Proteinkonzentration von PKCδ sowie von pThr505 PKCδ in CD11c+ KGDZ, unabhängig von CysC ist.

Anders verhält es sich bei 14-3-3ζ im Vergleich zwischen CD11c+ KGDZ aus *Cst3*^{-/-} Mäusen und Wildtyp Mäusen. In CD11c+ KGDZ aus *Cst3* defizienten Mäusen liegt signifikant weniger Protein vor als in Zellen aus Wildtypen nach 2 h Stimulation. Dieses Resultat ist unabhängig vom Stimulus. Dies legt nahe, dass CysC entweder einen Einfluss auf die Expression von 14-3-3ζ hat oder auf dessen Abbau, was wiederum Auswirkung auf die Aktivität von PKCδ hat.

Zur Änderung der Proteinkonzentration von 14-3-3ζ sind bisher drei verschiedene Mechanismen bekannt. Einer dieser Wege ist die post-transkriptionale

Modifikation der Stabilität von 14-3-3 Proteinen. Dabei spielen micro RNAs eine wichtige Rolle [128, 129]. Ein weiterer Weg ist eine Änderung auf der Ebene des Genoms. Dieser Weg wird v.a. mit Krebsentstehung und dem Überleben von Krebszellen in Verbindung gebracht und beinhaltet epigenetisches „silencing“ und Genamplifikation [265]. Zuletzt gibt es Daten, die zeigen, dass 14-3-3 σ über das Proteasom abgebaut wird [130]. Eine Theorie könnte sein, dass durch das fehlende CysC mehr 14-3-3 ζ frei in der Zelle vorliegt. Dies könnte dazu führen, dass über eine negative Feedbackschleife die Synthese von 14-3-3 ζ herunterreguliert wird. Dieser Hypothese widerspricht allerdings das Ergebnis, dass die Proteinkonzentration in CD11c+ KGDZ aus Wildtyp Mäusen nach Stimulation mit *E. coli* nicht ebenfalls vermindert ist. Da in diesem Fall die Bindung von 14-3-3 ζ durch hohe ROS und Dimerisierung von CysC aufgehoben sein sollte. Außerdem zeigt sich der Unterschied in der Proteinkonzentration lediglich nach 2 h Stimulation, nicht aber nach 20 h. Hier gibt es keinen Unterschied in der 14-3-3 ζ Konzentration zwischen CD11c+ KGDZ aus Wildtypen und *Cst3*^{-/-} Mäusen. Der Umstand, dass die Proteinkonzentration in Zellen aus CysC-Knock-out Mäusen unabhängig vom Stimulus ist, trotzdem aber unterschiedlich ist nach unterschiedlicher Stimulationsdauer, könnte für einen Fehler bei der Generierung der Daten sprechen bzw. ein Produkt der Ungenauigkeit des Analyseverfahrens sein. Dies gilt auch für die Analyse der pThr505 PKC δ Konzentration. Mögliche Fehlerquellen liegen beispielsweise in der Dauer des Western Blots bei Übertragung des Untersuchungsmaterials auf die Membran oder im Fall von 14-3-3 ζ in der Zeit des Erhitzens der Proben zur Aufspaltung von Dimeren. Diese Variablen beeinträchtigen ebenfalls die allgemeine Genauigkeit des Verfahrens.

Nach Abwägung der verschiedenen Möglichkeiten ist davon auszugehen, dass eine Regulation der Proteinkonzentration von PKC δ und pThr505 PKC δ unwahrscheinlich ist. Allerdings zeigen die Ergebnisse, signifikante Unterschiede der 14-3-3 ζ Konzentration im Vergleich von CD11c+ KGDZ aus Wildtypen und *Cst3* defizienten Mäusen. Deshalb kann gesagt werden, dass die Konzentration von 14-3-3 ζ durch CysC beeinflusst wird. Welcher Mechanismus jedoch zugrunde liegt, muss in folgenden Arbeiten untersucht werden.

4.4 Cystatin C reguliert die Aktivität von Proteinkinase C δ über 14-3-3 ζ

Die Ergebnisse aus der Messung der PKC δ Aktivität in CD11c+ KGDZ aus Wildtypen und *Cst3* defizienten Mäusen zeigen, dass CysC nicht nur Einfluss auf die Konzentration von 14-3-3 ζ nimmt. Der Vergleich der Aktivitäten von PKC δ in CD11c+ KGDZ aus Wildtypen und *Cst3*^{-/-} Mäusen, zeigt, dass Cystatin C, direkt oder indirekt, die Aktivität von PKC δ beeinflusst. Nach Stimulation mit *E. coli* mpk für 2 h von CD11c+ KGDZ aus Wildtypen steigt die PKC δ Aktivität im Vergleich zur unstimulierten mock Kontrolle und der Stimulation mit *B. vulgatus* mpk um ca. 120%. Dies ist jedoch nicht bei CD11c+ DZ, die aus dem Knochenmark von CysC defizienten Mäusen generiert wurden, zu beobachten. Bei *Cst3*^{-/-} CD11c+ KGDZ konnten unabhängig vom Stimulus keine PKC δ -Aktivitätsunterschiede detektiert werden. CysC scheint also entscheidend für die Regulation der PKC δ Aktivität in CD11c+ KGDZ zu sein. Nur in Anwesenheit von CysC ist die PKC δ Aktivität nach Stimulation mit einem Pathobionten erhöht. Fehlt es, kann die Aktivität der Kinase nicht in Abhängigkeit vom Stimulus verändert werden und eine inflammatorische Immunreaktion kann nicht ausgelöst werden. Auf diese Art und Weise ist eine DZ ohne funktionelles CysC gegenüber weiteren Antigenen tolerogen.

Dieses Ergebnis kann in Zusammenhang gebracht werden, mit den in 3.4.3 beschriebenen 14-3-3 ζ Konzentrationen. Diese sind in CD11c+ KGDZ aus *Cst3*^{-/-} Mäusen sehr viel niedriger als in solchen aus Wildtypen. Die 14-3-3 ζ Moleküle liegen zwar ungebunden in der Zelle vor und können PKC δ aktivieren, aufgrund der niedrigen Konzentration an 14-3-3 ζ fällt die Aktivität dadurch allerdings genauso hoch aus wie in Zellen aus Wildtyp Mäusen nach Stimulation mit *B. vulgatus* mpk bzw. ohne Stimulus. Diese Beobachtung unterstützt die These, dass CysC wichtig ist für die Regulation inflammatorischer Antworten auf einen Stimulus hin.

Des Weiteren ist es wichtig zu wissen, auf welche Art und Weise 14-3-3 ζ und PKC δ miteinander interagieren. Van der Hoeven et al. gehen dabei von einer unspezifischen Aktivierung aus, die allein durch den sauren Charakter der 14-3-3 Proteine zustande kommt [183]. Die Dimere binden an Aminosäuresequenzen von Proteinen mit phosphoryliertem Serin- oder Threoninrest [113, 120, 121].

Daher könnte eine Aktivierung von PKC δ nur im phosphorylierten Zustand an bestimmten Stellen des Proteins stattfinden. Im Falle von fehlender Phosphorylierung an den benötigten Stellen von PKC δ würde dies bedeuten, dass trotz vorhandener 14-3-3 ζ Moleküle keine Aktivitätssteigerung möglich bzw. nachweisbar wäre. Da sich die bisher bekannten Aminosäuresequenzen, die für die Bindung von 14-3-3 ζ wichtig sind, allerdings nicht in der Aminosäuresequenz von PKC δ wiederfinden lassen, ist dies eher unwahrscheinlich. Vielmehr ist von einer Aktivierung über die Zinkfinger Domäne der Kinase auszugehen, da dieser Interaktionsmechanismus für 14-3-3 ζ bereits vermutet wird und PKC δ über eine solche Domäne verfügt [116, 125].

Vermutlich führt also die Bindung von 14-3-3 ζ an PKC δ über dessen Zinkfingerdomäne zu einer Aktivitätssteigerung von PKC δ . Diese Steigerung wird über Cystatin C vermittelt, da in CD11c+ KGDZ aus CysC defizienten Mäusen keine Aktivitätsunterschiede abhängig vom Stimulus nachweisbar sind. Die Aktivität der Kinase steigt dabei in CD11c+ KGDZ aus *Cst3* defizienten Mäusen nicht unabhängig vom Stimulus an. Obwohl 14-3-3 ζ ungebunden vorliegt, ist die Konzentration von 14-3-3 ζ in diesen Zellen ungleich niedriger als in CD11c+ KGDZ aus Wildtyp Mäusen. Es kann daher gesagt werden, dass in DZ ohne funktionelles CysC nach Stimulation mit Pathobionten, wie *E. coli* mpk, keine Aktivitätssteigerung von PKC δ ausgelöst werden kann. Demnach erfolgt auch keine Entzündungsreaktion, vermittelt durch die Synthese der induzierbaren Stickstoffmonoxid Synthase (iNOS) über NF κ B Aktivierung. Die DZ ist tolerogen gegenüber weiteren Stimuli.

4.5 Cystatin C Expression beeinflusst die Expression der *Nos2* mRNA in CD11c+ KGDZ aus *Cst3*^{-/-} Mäusen

Nos2 ist das Gen, aus welchem die Synthase iNOS exprimiert wird. iNOS wiederum synthetisiert Stickstoffmonoxid (NO), ein Molekül das direkt an der Entstehung von Entzündungsreaktionen beteiligt ist [220, 221]. Die Konzentration von NO und iNOS wird vor allem auf translativer Ebene über NFκB, reguliert [222, 254, 255]. Dieser nukleäre Transkriptionsfaktor wird durch PKCδ induziert [208-210]. Eine Aktivitätssteigerung von PKCδ führt demnach zunächst zur Induktion von NFκB und später zu einer Konzentrationssteigerung von iNOS und NO. Aufgrund dieses Mechanismus ist die Messung der *Nos2* mRNA und des Proteins iNOS ein guter Marker, um zu überprüfen, ob eine durch Stimulation mit Patho- oder Symbionten herbeigeführte PKCδ Aktivitätsveränderung zu einer vermehrten oder verminderten Entzündungsreaktion über NO führt.

In CD11c+ KGDZ aus Wildtyp Mäusen ist die mRNA des Gens *Nos2* nach Stimulation mit *E. coli* für 18 h um das 3000-fache erhöht. Diese Beobachtung spiegelt sich auch in der quantitativen Bestimmung des Proteins in der Zelle wider. Stimulation von CD11c+ KGDZ durch Pathobionten führt also zu einer Steigerung der iNOS Konzentration und lässt auf eine deutliche Entzündungsreaktion schließen. Vergleicht man dies mit CD11c+ KGDZ aus *CysC* defizienten Mäusen, so stellt sich heraus, dass zwar die mRNA Expression ohne Stimulus höher ist als in den Negativkontrollen der CD11c+ KGDZ aus Wildtypen, die Menge von exprimiertem iNOS jedoch unverändert ist. Ein Teil der gemessenen mRNA wurde also nicht translatiert. Diese Differenzen entstehen in der Regel durch posttranskriptionale Modifikation der mRNA, wie z.B. alternatives Splicing.

Wie bereits erwähnt, spielt NO eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Entzündungsreaktionen [233]. Außerdem wird die Produktion von iNOS über NFκB durch Proteinkinase Cδ moduliert [95, 96, 253]. Somit sollte die Messung von iNOS den Einfluss von PKCδ auf den entzündlichen Prozess verdeutlichen. Die Stimulation dendritischer Zellen mit einem Pathobionten führt zu einer gesteigerten PKCδ Aktivität. Die Kinase wiederum induziert indirekt über NFκB die Expression von *Nos2* mRNA. Daher steigt, wie in Abbildung 12a und 12c

gezeigt, die Expression von *Nos2* mRNA sowie die iNOS Konzentration nach Stimulation mit *E. coli* mpk. Die Stimulation von CD11c+ KGDZ aus *Cst3*^{-/-} Mäusen mit dem Pathobionten führt jedoch zu keiner Aktivitätssteigerung von PKC δ . Die Quantifizierung von iNOS in CD11c+ KGDZ aus *Cst3* defizienten Mäusen zeigt jedoch eine unveränderte Steigerung der iNOS Konzentration nach Stimulation der DZ mit *E. coli* mpk.

Die Tatsache, dass der Unterschied der MFI von iNOS bei Stimulation von CD11c+ KGDZ aus Wildtypen mit *E. coli* mpk zur iNOS MFI in unstimulierten DZ und mit *B. vulgatus* mpk stimulierten KGDZ in Zellen aus *Cst3* defizienten Mäusen nicht verschwindet, lässt sich damit erklären, dass offensichtlich ein weiterer Signalweg an der Induktion von iNOS beteiligt ist. Der hier beschriebene Mechanismus wird durch Bindung von LPS induziert. Über die LPS-abhängige Aktivierung des TLR4/MD-2 Rezeptorkomplex wird die Translokation von cytosolischem NF κ B in den Nukleus ermöglicht, wo es als Transkriptionsfaktor die Transkription des für iNOS codierenden *Nos2*-Gens induziert [227, 228]. Alternativ kann die Synthese von iNOS aber auch unabhängig von TLR-4, CysC und PKC δ gesteuert werden nämlich durch Interferon- γ (IFN- γ). Hierbei wird die Synthese von iNOS über den Jak-STAT Signalweg reguliert [229].

Es kann also gesagt werden, dass die Transkription der *Nos2* mRNA vermutlich durch Cystatin C beeinflusst wird, dieser Signalweg aber nicht der einzige ist und daher der Effekt fehlenden CysCs abgeschwächt wird.

Um den weiteren Verlauf der iNOS Produktion abschätzen zu können, sollte in folgenden Arbeiten die Enzymkonzentration auch zu anderen Zeitpunkten untersucht werden. Denn wäre es möglich über die Beeinflussung von CysC die Produktion von iNOS zu senken, so könnte dies zur Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beitragen. Physiologische NO Werte können proinflammatorische Plättchenaggregation, Integrin vermittelte Adhäsion und proinflammatorisch induzierte Genexpression inhibieren. Diese Faktoren sind beteiligt an der Kontrolle vaskulärer Inflammation und oxidativer Verletzungen [230, 231]. Unter Umständen könnte also dieser ambivalente Effekt, einerseits pro- andererseits antiinflammatorisch, von NO auch zur Behandlung von

chronisch entzündlichen Darmerkrankungen genutzt werden, indem die NO Konzentration auf ein physiologisches Level gesenkt wird.

4.6 Symbionten enthaltende Probiotika als Behandlungsoption chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Ob die Immunantwort auf ein Antigen immunogen oder tolerant ist, hängt entscheidend von den dort vorkommenden dendritischen Zellen ab [266, 267]. Um durch Kommensale verursachte pathologische intestinale Entzündungsreaktionen zu verhindern, ist es wichtig, dass DZ kommensale Bakterien als solche erkennen. Geschieht dies nicht, ist eine stetige inflammatorische Aktivität die Folge. Wie bereits in 4.1 erwähnt führt der Kontakt mit Lipopolysacchariden (LPS) von *E. coli* mpk zu einem murenen und der Kontakt mit LPS von *B. vulgatus* mpk zu einem semi-murenen Phänotyp bei DZ in der Maus [69]. Dies entspricht einem Zwei-Klassen-Modell, dass zur Einteilung der Mikrobiota verwendet werden kann. Hierbei wird einerseits in die Gruppe der Pathobionten eingeteilt, die grundsätzlich keine pathogene Wirkung haben, unter bestimmten Voraussetzungen allerdings pathologische Reaktionen auslösen können. Die zweite Klasse bilden Symbionten, welche unabhängig von den Voraussetzungen apathogene Eigenschaften haben. Das bedeutet, dass die Zusammensetzung der Mikrobiota unter begünstigenden Voraussetzungen, wie beispielsweise genetischer Prädisposition und bestimmten Umweltfaktoren, direkt mit der Entwicklung einer Colitis zusammenhängt. Ist der relative Anteil von Bacteroides hoch im Vergleich zur Norm und der der Enterobacteriaceae niedrig, so ist dies ein präventiver Faktor für die Entstehung einer Colitis beim Menschen sowie bei der Maus [16]. Im Gegensatz dazu begünstigt ein relativ niedriger Anteil von Bacteroides bei gleichzeitig hohem Anteil von Enterobacteriaceae die Entstehung der Krankheit. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass der Symbiont *B. vulgatus* in der Lage ist in Mäusen vor der Entstehung einer Colitis zu schützen [72, 77].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PKC δ sowie die Konzentration von iNOS in murenen CD11c⁺ KGDZ durch Stimulation mit einem Pathobiont, im Gegensatz zur Konzentration in semi-murenen CD11c⁺ KGDZ nach Stimulation

mit einem Symbionten, erhöht ist und dass diese Steigerung dem Einfluss von CysC unterliegt. CysC bindet das PKC δ aktivierende Protein 14-3-3 ζ und hemmt damit indirekt die Aktivität von PKC δ und damit auch die Induktion von iNOS. Daher liegt die Annahme nah, dass man nicht nur mithilfe von Pharmaka die involvierten Proteine (CysC, 14-3-3 ζ , PKC δ) beeinflussen und somit eine inflammatorische Antwort und unter Umständen sogar die Maturation der DZ verhindern könnte, sondern dass dies vor allem auch mit Symbionten möglich sein sollte.

Hierbei ist es wichtig zu wissen, was über die therapeutische Wirkung durch Beeinflussung der einzelnen Proteine bekannt ist, um abschätzen zu können was die Benefits und das Potenzial der Modulation des Signalwegs mittels Symbionten enthaltenden Probiotika sind. Medikamentöse Angriffspunkte wären eine Inhibition der hemmenden Wirkung von CysC, eine Hemmung der aktivierenden Wirkung von 14-3-3 ζ auf PKC δ oder eine Inhibition der PKC δ Aktivität selbst. In Mäusen wurde bereits gezeigt, dass Inhibition von PKC δ die Synthese von iNOS erfolgreich hemmen konnte [215]. Des Weiteren konnte, die Effektivität einer anti-inflammatorischen Behandlung mithilfe eines PKC δ Inhibitors nachgewiesen werden. Diese bisher jedoch lediglich bei akuter Entzündung der Lunge in *in vivo* Versuchen an Ratten sowie an humanen Zellen *in vitro*, weshalb weitere Untersuchungen angestellt werden müssen, um die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf Immunreaktionen in Mäusen zu prüfen [205, 206]. Die Notwendigkeit weiterer Experimente zeigt auch die Beobachtung, dass PKC δ nicht nur proinflammatorische Eigenschaften besitzt. Scheinbar ist eine bestimmte PKC δ Konzentration für die Toleranzvermittlung gegenüber eigenen Antigenen nötig. Da Versuche in B-Zellen aufzeigten, dass PKC δ defiziente Mäuse nach einiger Zeit an Autoimmunerkrankungen sterben [202-204]. Dennoch hatte ein PKC δ inhibitorisches Peptid in Ratten eine niedrige Toxizität und wurde in Tier Modellen gut toleriert [268, 269]. Ähnliches zeigt sich auch nach einer klinischen Phase I/II Studie am Menschen eines PKC δ Inhibitorpeptids [195, 270]. Die Inhibition der PKC δ Aktivität zeigt also ein hohes Potential zur Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. Insbesondere bestätigt dies aber die Möglichkeit der Therapie mit Symbionten

enthaltenden Probiotika, da sie nicht das Risiko eines selektiven Pharmakons bei vollständiger Inhibition der Kinase darstellen. Des Weiteren haben Symbionten einen antiinflammatorischen Effekt durch Beeinflussung unterschiedlicher Signalwege, wohingegen die selektive Inhibition eines Proteins dessen verschiedene Qualitäten alterniert. Das heißt, dass die pharmakologische Inhibition nicht nur Auswirkungen auf dessen antiinflammatorische Eigenschaften, sondern auf sämtliche andere Signalwege des Proteins hat, was zu ausgeprägten Nebenwirkungen führen könnte.

Da die Ergebnisse dieser Arbeit einen Einfluss von 14-3-3 ζ auf die Aktivität von PKC δ vermuten lassen, kommt auch die Inhibition dieses Proteins in Frage, bzw. die Modulation dessen Fähigkeit zur Protein-Protein-Interaktion. Hierbei sind zwei Inhibitoren bekannt. Einerseits das Protein R18, welches an 14-3-3 Proteine bindet und dessen Interaktion mit anderen Proteinen verhindert [115, 271]. Andererseits gibt es die „Fourteen-three-three small molecule inhibitors“ (FOBISIN), welche 14-3-3 Proteine durch kovalente Bindung an deren Bindungsdomäne kompetitiv hemmen [115, 272]. Bisher ist die Untersuchung des inhibitorischen Effekts stark fokussiert auf die Tumorbehandlung [115]. Daher wäre eine Untersuchung der Inhibition von 14-3-3 ζ im Zusammenhang mit CEDs sinnvoll. Allerdings sind die genannten Inhibitoren nicht spezifisch und hemmen somit alle 14-3-3 Isoformen. Da 14-3-3 Proteine potenziell mit 0,6% des menschlichen Proteoms interagieren können [118], sind die Nebenwirkungen schwer abzuschätzen. Als Alternative gäbe es noch small interfering RNAs (siRNA) als spezifische Inhibitoren, die die Proteinsynthese in Zellen verschiedener Säugetiere u.a. menschlichen verhindern [115, 273], aber auch hier können unerwartete Einflüsse auf andere Proteine vorkommen [274]. Diese Schwierigkeit der medikamentösen Beeinflussung von 14-3-3 ζ ohne schwerwiegende Nebenwirkungen zeigt auf, welches Potenzial die Behandlung von CEDs mit Symbionten wie *B. vulgatus* hat. Durch Immunmodulation mithilfe von Symbionten besteht die Möglichkeit Immunreaktionen über 14-3-3 ζ zu beeinflussen ohne das Nebenwirkungsspektrum einer Pharmakotherapie.

Zuletzt muss auch CysC als Ziel von Pharmaka in Betracht gezogen werden. Die gezeigten Ergebnisse sind diesbezüglich allerdings nicht eindeutig. Nach der Hypothese dieser Arbeit müsste die Induktion von CysC die inflammatorische Antwort mindern. Jedoch zeigen die Experimente, dass die PKC δ Aktivität in *Cst3^{-/-}* Mäusen nach Stimulation mit einem Pathobionten niedriger ist als in Wildtypen und dass das inflammatorische Äquivalent iNOS durch CysC, wenn überhaupt, nur wenig beeinflusst wird. Daher wäre es denkbar, dass auch eine Inhibition von CysC einen Erfolg zeigen könnte. Diese Annahme wird unterstützt von Experimenten, die zeigen, dass höhere Konzentrationen „Chicken Cystatin“ und auch Cystatin C die Produktion von NO sowie dem proinflammatorischen Zytokin Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) nach Induktion durch Interferon- γ (INF- γ) steigern. Außerdem führten geringere Konzentrationen der Cystatine bei Aktivierung von Makrophagen mit INF- γ zur Herabregulation von NF κ B [108, 110, 275, 276]. Geht man aber von der Theorie aus, dass CysC einen hemmenden Einfluss auf PKC δ hat, so müsste vielmehr eine Erhöhung der CysC Konzentration einen positiven Einfluss auf die Entzündung haben. So zeigte sich beispielsweise eine erhöhte Ausschüttung des anti-inflammatorischen Interleukin-10 durch Nematoden Cystatin [277, 278]. Des Weiteren konnte in Kolitis Tiermodellen eine Reduktion der Inflammation und des mucosalen Schadens sowie der Immunzelleinwanderung durch das Nematoden Cystatin AVCys festgestellt werden [279]. Aber auch eine verminderte Sekretion der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und Interleukin-1 β (IL-1 β) bei mit LPS (*E. coli*) stimulierten Makrophagen durch Verabreichung von humanem CysC konnte gezeigt werden [278]. Zusammengenommen könnte dies bedeuten, dass CysC nicht nur an einem Signalweg beteiligt ist, sondern an mehreren. So wäre es denkbar, dass bei Stimulation mit LPS CysC über die Hemmung von 14-3-3 ζ und PKC δ einen inhibitorischen Effekt auf den Entzündungsprozess ausübt und weiterhin bei Aktivierung mit IFN- γ eine entzündungsfördernde Rolle einnimmt. Wie bereits beschrieben, kann NF κ B ebenfalls über IFN- γ aktiviert werden. Um dies jedoch in Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit bringen zu können, müsste man davon ausgehen, dass eine gewisse Konzentration CysC für den proinflammatorischen Effekt nötig wäre. Wie hier beschrieben, ist die Rolle von

CysC bei Entzündungen komplex, weshalb mithilfe von *in vivo* Versuchen an Kolitis Tiermodellen der Effekt der CysC Konzentration untersucht werden sollte, um die Rolle des Proteins bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen besser verstehen zu können. Der Symbiont *B. vulgatus* zeigt hier bereits eine gute Möglichkeit auf, das Protein effektiv zu modulieren, um Maturation von CD11c+ KGDZ zu verhindern und deren Semi-maturation zu fördern.

Insgesamt zeigen die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente, dass PKC δ sowie 14-3-3 ζ und CysC eine wichtige Rolle bei der Maturation von DZ spielen und diese Proteine durch Kommensale unterschiedlich reguliert werden. Die Gabe *B. vulgatus* mpk enthaltender Probiotika stellt eine interessante Behandlungsoption dar, da die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass *B. vulgatus* oben genannte Proteine beeinflusst und auf diese Art und Weise in der Lage ist, Semi-maturation in CD11c+ KGDZ herbeizuführen. Außerdem wurde bereits gezeigt, dass die Modulation dieser Proteine eine Möglichkeit darstellt, Entzündungsreaktionen zu verhindern. Jedoch hat die Pharmakotherapie bisher große Nachteile, wie Nebenwirkungen und fehlende Targetspezifität. Dies hebt das Potenzial der Proteinmodulation zur Verhinderung von CEDs durch Symbionten enthaltende Probiotika hervor. Effektivere und Nebenwirkungsärmere Behandlungsoptionen sind wichtig, da momentan verwendete Medikamente meist mit starken unerwünschten Arzneimittelwirkungen einhergehen, aber vor allem auch, weil sie langfristig keine adäquate Behandlung gewährleisten können. Somit bleibt häufig nur eine chirurgische Intervention als letzte Behandlungsoption, wie beispielsweise bei der Behandlung des Morbus Crohn. Eine Heilung ist dadurch jedoch nicht erreichbar.

4.7 Cystatin C verhindert die Spaltung von Proteinkinase C δ

Eine bisher ungeklärte Interaktion besteht zwischen Cystatin C und PKC δ . Dies äußert sich nicht nur in einer Veränderung der PKC δ Aktivität in Abhängigkeit von CysC, sondern auch daran, dass sich in CD11c+ KGDZ aus *Cst3* defizienten Mäusen ein ca. 45 kDa großes Fragment nachweisen lässt, welches in CD11c+ KGDZ aus Wildtyp Mäusen nicht vorkommt. Dies deutet darauf hin, dass das Fehlen von CysC dazu führt, dass PKC δ gespalten wird. Zur Spaltung von PKC δ ist bekannt, dass sie im Rahmen von Apoptose auftreten kann [148]. Dabei wird sie in der Gelenkregion durch die Protease Caspase 3 in ein ca. 41 kDa großes Fragment gespalten [148, 280]. Für die Aktivität dieses Teilstücks ist keine vorherige Aktivierung nötig [163]. Experimente konnten zeigen, dass ohne PKC δ Apoptose verhindert werden kann [281]. Eine Regulation von Caspase 3 durch CysC ist bisher nicht bekannt.

Des Weiteren gibt es, wie bereits erwähnt, Proteasen wie Cathepsin B und S, welche durch CysC gehemmt werden [105, 258, 259]. Hierbei ist PKC δ jedoch nicht als Substrat bekannt. Um den Zusammenhang zwischen CysC und der Spaltung von PKC δ zu untersuchen, wurden die genannten Proteasen in CD11c+ KGDZ aus Wildtypen und aus *Cst3*^{-/-} Mäusen inhibiert. Danach wurde mithilfe von Staurosporin, einem unspezifischen Pankinaseinhibitor [282], Apoptose induziert. Mit diesen Zellen wurde ein Western Blot gegen PKC δ durchgeführt, wobei in Zellen, zu denen der Inhibitor für die Protease, die für die Spaltung von PKC δ verantwortlich ist, hinzugegeben wurde, kein Proteinfragment mit einer Größe von 41 kDa vorkommen sollte. Außerdem sollte im Western Blot von CD11c+ KGDZ aus Wildtyp Mäusen ohne Staurosporin ebenfalls kein PKC δ Fragment bei 41 kDa nachweisbar sein. In den Zellen, die zusätzlich nur Staurosporin enthielten, sollte PKC δ gespalten werden, genauso wie in der Negativkontrolle aus *Cst3*^{-/-} Zellen. Die Auswertung des Experiments zeigte, dass bei den Proben, die mit Staurosporin behandelt worden waren, neben der oben beschriebenen Bande eine zusätzliche Bande knapp oberhalb der 40 kDa zu sehen war. Diese neue Bande ist vermutlich die Bande, die in der Literatur im Zusammenhang mit Apoptose beschrieben wird, da die zunächst entdeckte Bande bei ca. 45 kDa läuft. Bei dem Fragment von PKC δ , das bei DZ aus CysC-

Knock-out Mäusen zu sehen ist, muss es sich also um ein bisher unbekanntes handeln. Die Entstehung dieses Fragments kann entweder auf eine Spaltung an einer anderen Stelle zurückgeführt werden, verursacht durch vorzeitigen Abbruch der Translation von PKC δ oder durch einen erhöhten Phosphorylierungsgrad, der das bereits bekannte Protein, welches bei Apoptose entsteht, vergrößert. Für die Spaltung spricht, dass, wie in Abbildung 10b zu sehen, keine Bande unter Inhibition mit LHVS, dem spezifischen Cathepsin S Inhibitor, bei 45 kDa läuft. Dies könnte bedeuten, dass PKC δ durch Cathepsin S gespalten wird und daher unter Inhibition der Protease kein 41 kDa großes Fragment entstehen kann. Es könnte jedoch auch darauf zurückzuführen sein, dass in dieser Probe nur sehr wenig Protein enthalten war und somit die Bande lediglich im Western Blot nicht nachweisbar war, da sie zu schwach ausgeprägt war. Somit kann keine abschließende Aussage über die Entstehung des genannten Teilfragments getätigt werden.

Insgesamt kann gesagt werden, dass CysC zwar die Spaltung von PKC δ verhindert, weshalb ein 41 kDa PKC δ Fragment entsteht, sobald kein funktionelles CysC vorhanden ist. Die biologische Relevanz dieses Vorgangs bleibt allerdings zu erörtern, da nicht gesagt werden kann, ob das entstehende Fragment katalytische Eigenschaften hat und daher die Folge der Spaltung nur schwer zu beurteilen ist. Des Weiteren kann keine Aussage darüber getroffen werden, wodurch oder an welcher Stelle PKC δ gespalten wird. Aus diesen Gründen sollten in Zukunft weitere Experimente durchgeführt werden, um den Entstehungsmechanismus, den Aufbau des Fragments und die biologische Relevanz des Vorgangs verstehen zu können.

4.8 Cystatin C hat signifikanten Einfluss auf die Aktivität von Retinal Dehydrogenase in CD11c+ KGDZ

Bisher wurde gezeigt, dass CysC einen Einfluss auf PKC δ hat, indem es die Spaltung der Kinase verhindert und zusätzlich dessen proinflammatorische Aktivität durch Bindung an 14-3-3 ζ indirekt hemmt. Welche weiteren immunogenen Auswirkungen CysC hat, sollte, in Bezug auf die Wirkung von CysC auf die Modulation der Aldehyddehydrogenase (ALDH) Aktivität und damit indirekt die

Wirkung auf die Induktion regulatorischer T-Zellen (Treg), untersucht werden. Regulatorische T-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei destruktiven entzündlichen Immunantworten [239, 240]. So können CD103 exprimierende Tregs Inflammation in der Colon Mucosa verhindern [250, 251]. Dies passt zu der Beobachtung, dass es bei fehlenden Tregs zu einer überschießenden Immunantwort auf kommensale Bakterien im Darm kommt [248, 249]. Tregs werden unter anderem in der Peripherie in Anwesenheit von TGF- β gebildet [241, 283]. Neben TGF- β ist für die durch CD103 DZ induzierte Differenzierung in mesenterialen Lymphknoten auch der Vitamin A Metabolit Retinsäure nötig [241, 244]. Die Kombination aus beiden sorgt außerdem dafür, dass Tregs homing Rezeptoren wie CCR9 und das Integrin $\alpha 4\beta 7$ exprimieren, welche spezifisch für den Darm sind [241, 247, 284]. Des Weiteren sekretieren diese Tregs das anti-inflammatorische Interleukin 10 [241]. TGF- β alleine sorgt dabei nur für die Differenzierung, es bestimmt jedoch nicht, ob Tregs oder proinflammatorische TH17 Zellen entstehen [241, 284]. Dies wird durch Retinsäure festgelegt. Sie wird durch die Retinal Dehydrogenase *aldh1a2* aus Retinal gebildet, welche unter anderem in DZ des Darms vorkommt [244]. Diese verschiedenen Eigenschaften zeigen, dass Tregs wichtig für den Erhalt von Homöostase im Darm sind und daher der Nachweis eines Einflusses durch CysC auf ihre Entstehung über die Aktivität von ALDH ein weiterer wichtiger Baustein für das Verständnis der immunologischen Rolle von CysC darstellen würde.

Dazu sollte zunächst gezeigt werden, dass in CD11c⁺ KGDZ aus Wildtyp Mäusen die *aldh1a2* mRNA Konzentration sowie die ALDH Aktivität nach Stimulation mit *E. coli* mpk geringer ist als in CD11c⁺ KGDZ anderer Stimulationsmodi. Außerdem sollte in Zellen aus *Cst3*^{-/-} Mäusen unabhängig vom Stimulus stets eine geringere Aktivität bzw. mRNA Konzentration nachweisbar sein. In Abbildung 14 fällt allerdings auf, dass die mRNA Konzentration in CD11c⁺ KGDZ aus Wildtyp Mäusen nach 20h Stimulation mit *E. coli* mpk doppelt so hoch ist wie nach Stimulation mit *B. vulgatus* mpk. Im Gegensatz dazu ergibt die FACS Analyse der CD11c⁺ KGDZ aus Wildtypen, dass die Expression nach Stimulation mit *E. coli* mpk geringer ist als die in Zellen der Negativkontrolle (mock) und denen nach Stimulation mit *B. vulgatus* mpk. Wichtig in Bezug auf die PCR Daten ist,

dass eine Verdoppelung der mRNA, obgleich signifikant, vermutlich keine biologische Relevanz hat. Durch die Variabilität epigenetischer Faktoren, wie beispielsweise der Halbwertszeit der mRNA, muss ein Unterschied dieser Größenordnung im Kontext mit der tatsächlichen Konzentration des exprimierten Proteins gesehen werden. Wie in der FACS Analyse zu sehen ist, überwiegt die schlussendliche Aktivität der ALDH. Offensichtlich ist die Aktivität trotz der höheren Anzahl an mRNA Kopien in der qPCR in CD11c+ KGDZ nach Stimulation mit *E. coli* mpk niedriger als nach Stimulation mit *B. vulgatus* mpk. Die schlussendlich gemessene Aktivität ist folglich als ausschlaggebend anzusehen, sie könnte aber auch darauf hindeuten, dass die vorhandene mRNA noch zu translatieren ist und daher die ALDH Aktivität zu einem späteren Zeitpunkt noch ansteigt. Eine Untersuchung des ALDH Substratumsatzes zu einem späteren Zeitpunkt wäre daher sinnvoll. Im Vergleich der Basisquantität der mRNA zwischen CD11c+ KGDZ aus Wildtypen zu denen aus *Cst3*^{-/-} Mäusen (Abb. 11b) ergibt sich kein Unterschied. Auch in der FACS Untersuchung stellt sich keine signifikante Differenz dar. Da sich aber zusätzlich bei der Stimulation der *Cst3*^{-/-} Zellen mit *E. coli* mpk kein anderes Ergebnis als in CD11c+ KGDZ der Negativkontrolle oder nach Stimulation mit *B. vulgatus* mpk zeigt, liegt die Annahme nahe, dass durch das Fehlen von CysC eine Deregulation stattgefunden hat. Allerdings ist die Analyse der Werte der CD11c+ KGDZ aus *Cst3* defizienten Mäusen erschwert, da sich kein Unterschied zwischen den beiden Stimulationen mit *E. coli* mpk feststellen lässt.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass CysC an der Regulation der ALDH Aktivität beteiligt ist, die Art der Regulation jedoch weiter untersucht werden muss. Somit kann keine Schlussfolgerung im Zusammenhang mit dem Einfluss auf die Entstehung von Tregs getroffen werden. Um die biologische Relevanz des Einflusses von CysC auf die Entstehung von Tregs einschätzen zu können, sind daher weitere Experimente notwendig.

5. Zusammenfassung

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen, wie Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa, sind komplexe Erkrankungen mit steigender Inzidenz aber bisher noch weitgehend unklarer Ätiologie. Daher ist die Therapie derzeit nicht ursächlich, sondern lediglich symptomatisch, was die Behandlung der Entzündung begrenzt. Dies ist unzureichend und kann den Krankheitsverlauf nicht aufhalten. Dabei gibt es bereits Faktoren, die bekanntermaßen mit CED in Zusammenhang stehen und neue Ansätze für die Therapie darstellen könnten. Zu diesen gehören v.a. genetische und Umweltfaktoren. Den vielversprechendsten Therapieansatz stellt allerdings, neben der Ernährung, die Modulation des Immunsystems des Wirts durch die Mikrobiota dar, da in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden konnte, dass in Patienten mit CED eine Mikrobiotadysbiose vorliegt. Die Diversität der Mikrobiota im Darm von CED Patienten ist vermindert, wobei die Anzahl der *Firmicutes* und *Bacteroidetes*, zu denen auch der Symbiont *Bacteroides vulgatus* gehört, vermindert ist, während die Anzahl der *Enterobacteriaceae* und *Proteobacteria*, zu denen der Pathobiont *E. coli* gehört, gesteigert ist.

In Versuchen an murinen dendritischen Zellen konnte des Weiteren gezeigt werden, dass der Pathobiont *E. coli* über Interaktion mit dem TLR4/MD2 Rezeptorkomplex dendritischer Zellen zu deren Maturation führt. Dieser mature Phänotyp induziert proinflammatorische Th1, Th2 und Th17 Zellen. Bei Kontakt von Antigenen von *B. vulgatus* mit dem TLR4/MD2 Rezeptorkomplex differenzieren immature DZ zu semi-maturen DZ. Diese können regulatorische T-Zellen, die der übermäßigen Entstehung von Inflammation entgegenwirken, induzieren. So konnte gezeigt werden, dass *E. coli* bei Monokolonisation IL2 defizienter Mäuse zur Entstehung von Colitis führt. Gleichmaßen jedoch, dass *B. vulgatus* in der Lage ist, diese Colitis zu verhindern. Dies unterstreicht das Potential der Mikrobiota als Ansatzpunkt zur Behandlung von CED. Dafür ist es allerdings essenziell, die molekularen Mechanismen zu verstehen, die an der Beeinflussung des Immunsystems durch Kommensale beteiligt sind.

Daher wurden in dieser Arbeit die Mechanismen untersucht, welche zur Entstehung semi-maturer bzw. maturer DZ, bei Kontakt mit den Kommensalen *B. vulgatus* (Symbiont) bzw. *E. coli* (Pathobiont) und der folgenden Immunantwort beitragen. So ist beispielsweise bekannt, dass Cystatin C (CysC) abhängig von der Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in der Zelle als Monomer oder als Homodimer vorkommt. Bei Stimulation von DZ mit dem Pathobionten *E. coli* mpk steigt die Konzentration von ROS innerhalb der Zelle, bei Stimulation mit dem Symbionten *B. vulgatus* mpk sinkt sie jedoch. Je höher die ROS Konzentration ist desto wahrscheinlicher liegt CysC als Homodimer vor. Da bei CysC Homodimeren dessen Bindungsdomäne verdeckt ist, ist es in diesem Zustand nicht in der Lage weitere Proteine zu binden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CysC an das Protein 14-3-3 ζ bindet und CysC außerdem an der Regulation der Proteinexpression von 14-3-3 ζ beteiligt ist. 14-3-3 ζ ist ein Protein, das bekanntermaßen mit Proteinkinase C δ (PKC δ), über dessen Zinkfingerdomäne interagiert. Bei Bindung der beiden Proteine steigt die Aktivität von PKC δ . Dies konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, da bei Stimulation von CD11c+ KGDZ aus Wildtypen mit *E. coli* mpk die Aktivität von PKC δ gegenüber der der Negativkontrolle und der in Zellen nach Stimulation mit *B. vulgatus* mpk, signifikant steigt. Bei Stimulation CysC defizienter CD11c+ KGDZ mit *E. coli* mpk zeigte sich allerdings kein Anstieg der Aktivität. Da sich zusätzlich kein Unterschied in der Proteinkonzentration von PKC δ nachweisen lies, muss eine Regulation der PKC δ Aktivität über CysC bestehen.

Dies bedeutet, dass bei Kontakt von CD11c+ KGDZ mit dem Pathobiont *E. coli* die Konzentration von ROS innerhalb der Zelle steigt, was eine Homodimerisierung von CysC zur Folge hat. Die Homodimerisierung von CysC führt dazu, dass 14-3-3 ζ in der Zelle frei vorliegt und somit PKC δ aktivieren kann. Die gesteigerte Aktivität führt zur Induktion der iNOS Synthese via NF κ B und schlussendlich zu einer Entzündungsreaktion (siehe Abb. 16 Signalweg a). Bei Stimulation mit dem Symbionten *B. vulgatus* hingegen ist die ROS Konzentration niedrig, weshalb CysC als Monomer vorliegt und an 14-3-3 ζ bindet. Dies hat zur Folge, dass PKC δ nicht vermehrt aktiviert und somit keine Entzündungsreaktion ausgelöst wird (siehe Abb. 16 Signalweg b). Da der Kontakt mit *B. vulgatus* zu

einem semi-maturen Phänotyp dendritischer Zellen führt, welche tolerogen gegenüber weiteren Stimuli sind, kann auch bei nachfolgendem Kontakt mit pathogenen Antigenen keine Entzündungsreaktion ausgelöst werden. Eine Inflammation ausgelöst durch pathobiontische Kommensale wird also durch Stimulation dendritischer Zellen mit *B. vulgatus* mpk verhindert.

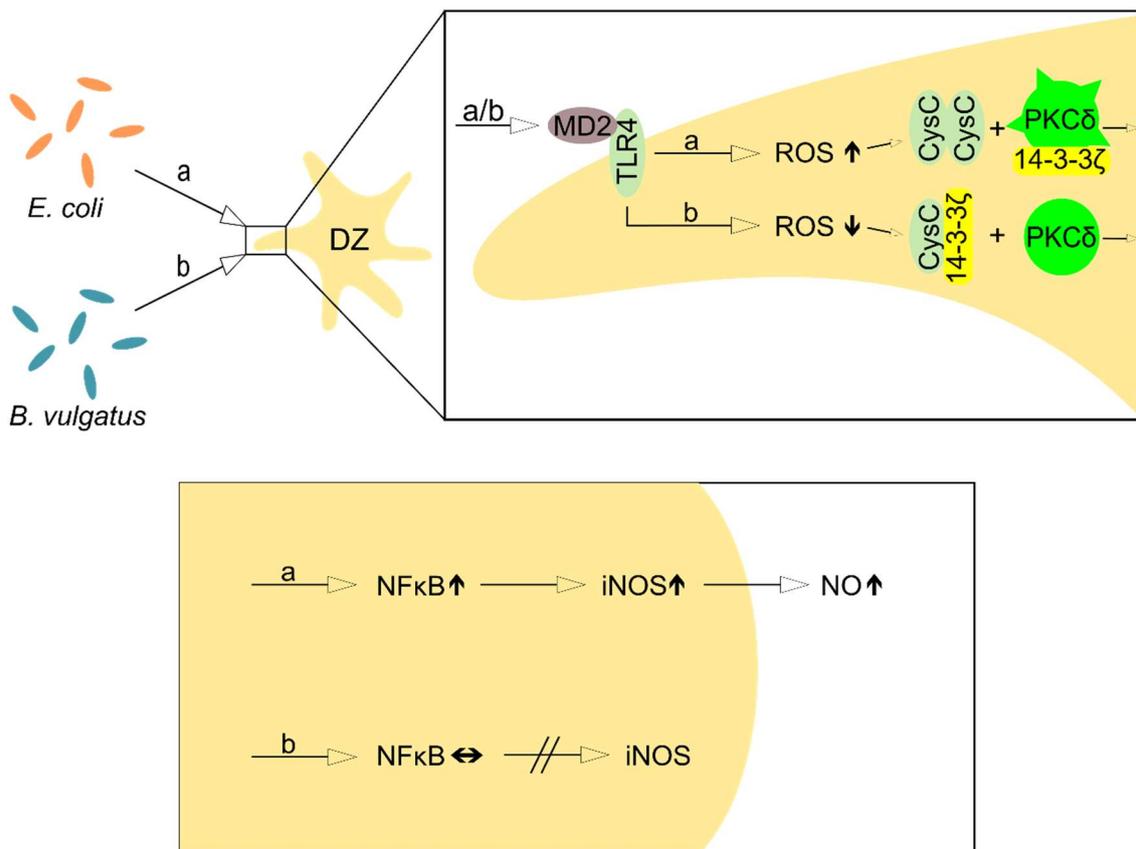


Abbildung 16: Schematische Darstellung eines neuen Regulationsmechanismus via Cystatin C, 14-3-3ζ und PKCδ

Signalweg a: Bei Kontakt von *E. coli* mit dem TLR4/MD2 Komplex knochenmarksgereifter dendritischer Zellen (DZ) entstehen erhöhte Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) innerhalb der Zelle. Mit steigender ROS Konzentration bildet Cystatin C (CysC) Homodimere, welche aufgrund ihrer blockierten Bindungsdomäne kein 14-3-3ζ binden können. Freies 14-3-3ζ aktiviert Proteinkinase Cδ (PKCδ) durch Bindung an dessen Zinkfingerdomäne. PKCδ induziert anschließend indirekt die Synthese von induzierbarer Stickstoffsynthase (iNOS) über den Transkriptionsfaktor NFκB. iNOS produziert Stickstoffmonoxid (NO), welches an der nachfolgenden Entzündungsreaktion beteiligt ist.

Signalweg b: Kontakt von *B. vulgatus* mit dem TLR4/MD2 Komplex von DZ führt zu niedrigen ROS Konzentrationen in der Zelle. Daher liegt CysC als Monomer vor und bindet freies 14-3-3ζ. Dadurch kann PKCδ nicht mehr durch Bindung von 14-3-3ζ aktiviert werden, weshalb die Induktion der iNOS Produktion via NFκB ausbleibt.

In Zukunft sollte geklärt werden, welchen Einfluss dieser neue, noch nicht gezeigte Regulationsmechanismus über CysC auf physiologische inflammatorische Reaktionen eines Organismus tatsächlich hat. In dieser Arbeit wurde dazu die Konzentration der induzierbaren Stickstoffmonoxid Synthase gemessen, allerdings konnten hier lediglich Veränderungen in DZ aus Wildtyp Mäusen nach Stimulation mit *E. coli* im Vergleich zur Negativkontrolle nachgewiesen werden, jedoch nicht in *Cst3* defizienten DZ. Trotzdem zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit deutlich das therapeutische Potential von *B. vulgatus* mpk als Modulator der Proteine PKC δ , CysC und 14-3-3 ζ in Bezug auf eine Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. Der in dieser Arbeit gezeigte neue Regulationsmechanismus der PKC δ Aktivität über CysC und 14-3-3 ζ verbessert das Verständnis über Immunmodulation durch Kommensale und stellt vielleicht sogar eine Möglichkeit für eine langfristig zufriedenstellende Therapieoption von CEDs dar. Nicht zuletzt, da die Modulation über CysC, wie gezeigt werden konnte, ebenfalls an der Regulation der ALDH Aktivität und damit an der Induktion regulatorischer T-Zellen beteiligt ist.

Der Symbiont kann somit die PKC δ Aktivität und die anschließende inflammatorische Reaktion in einem physiologischen Rahmen halten. *B. vulgatus* mpk moduliert dabei das Immunsystem effektiv und könnte somit auch im Fall chronisch entzündlicher Darmerkrankungen die Homöostase im Darm erhalten oder wiederherstellen.

6. Veröffentlichungen

Steimle, A., et al., *Weak Agonistic LPS Restores Intestinal Immune Homeostasis*. Mol Ther, 2019. **27**(11) [76]

7. Literaturverzeichnis

1. Arumugam, M., et al., *Enterotypes of the human gut microbiome*. Nature, 2011. **473**(7346): p. 174-80.
2. Kaplan, G.G., *The global burden of IBD: from 2015 to 2025*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2015. **12**(12): p. 720-7.
3. Shivashankar, R., et al., *Incidence and Prevalence of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis in Olmsted County, Minnesota From 1970 Through 2010*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2017. **15**(6): p. 857-863.
4. Bernstein, C.N., et al., *World Gastroenterology Organization Practice Guidelines for the diagnosis and management of IBD in 2010*. Inflamm Bowel Dis, 2010. **16**(1): p. 112-24.
5. Molodecky, N.A., et al., *Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, Based on Systematic Review*. Gastroenterology, 2012. **142**(1): p. 46-54.
6. Lonnfors, S., et al., *IBD and health-related quality of life -- discovering the true impact*. J Crohns Colitis, 2014. **8**(10): p. 1281-6.
7. Bernstein, C.N., et al., *The prevalence of extraintestinal diseases in inflammatory bowel disease: a population-based study*. Am J Gastroenterol, 2001. **96**(4): p. 1116-22.
8. Marineata, A., et al., *Extra intestinal manifestations and complications in inflammatory bowel disease*. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 2014. **118**(2): p. 279-88.
9. Bernstein, C.N., A. Wajda, and J.F. Blanchard, *The clustering of other chronic inflammatory diseases in inflammatory bowel disease: a population-based study*. Gastroenterology, 2005. **129**(3): p. 827-36.
10. Bernstein, C.N., et al., *Hospitalisations and surgery in Crohn's disease*. Gut, 2012. **61**(4): p. 622-9.
11. Degenhardt, F. and A. Franke, *Genetics of Crohn's disease and ulcerative colitis*. Wiener klinisches Magazin, 2018. **21**(1): p. 4-13.
12. Loddo, I. and C. Romano, *Inflammatory bowel disease: genetics, epigenetics, and pathogenesis*. Frontiers in Immunology, 2015. **6**.
13. Sheehan, D., C. Moran, and F. Shanahan, *The microbiota in inflammatory bowel disease*. J Gastroenterol, 2015. **50**(5): p. 495-507.
14. Ng, S.C., et al., *Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease*. Gut, 2013. **62**(4): p. 630-49.
15. Gevers, D., et al., *The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease*. Cell Host Microbe, 2014. **15**(3): p. 382-92.
16. Kostic, A.D., R.J. Xavier, and D. Gevers, *The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead*. Gastroenterology, 2014. **146**(6): p. 1489-99.
17. Frank, D.N., et al., *Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(34): p. 13780-5.
18. Fujimoto, T., et al., *Decreased abundance of Faecalibacterium prausnitzii in the gut microbiota of Crohn's disease*. J Gastroenterol Hepatol, 2013. **28**(4): p. 613-9.
19. Peeters, M., et al., *Clustering of increased small intestinal permeability in families with Crohn's disease*. Gastroenterology, 1997. **113**(3): p. 802-7.
20. Salim, S.Y. and J.D. Soderholm, *Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases*. Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(1): p. 362-81.
21. Matsuoka, K. and T. Kanai, *The gut microbiota and inflammatory bowel disease*. Semin Immunopathol, 2015. **37**(1): p. 47-55.

22. Abraham, C. and J.H. Cho, *Inflammatory bowel disease*. N Engl J Med, 2009. **361**(21): p. 2066-78.
23. Matsuoka, K., et al., *Evidence-based clinical practice guidelines for inflammatory bowel disease*. J Gastroenterol, 2018. **53**(3): p. 305-353.
24. Claesson, M.J., et al., *Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly*. Nature, 2012. **488**(7410): p. 178-84.
25. De Filippo, C., et al., *Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(33): p. 14691-6.
26. Fakhoury, M., et al., *Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments*. J Inflamm Res, 2014. **7**: p. 113-20.
27. Cosnes, J., et al., *Long-term evolution of disease behavior of Crohn's disease*. Inflamm Bowel Dis, 2002. **8**(4): p. 244-50.
28. Torres, J., et al., *Crohn's disease*. Lancet, 2017. **389**(10080): p. 1741-1755.
29. Donaldson, G.P., S.M. Lee, and S.K. Mazmanian, *Gut biogeography of the bacterial microbiota*. Nat Rev Microbiol, 2016. **14**(1): p. 20-32.
30. Eckburg, P.B., et al., *Diversity of the human intestinal microbial flora*. Science, 2005. **308**(5728): p. 1635-8.
31. Rajilic-Stojanovic, M., et al., *Long-term monitoring of the human intestinal microbiota composition*. Environ Microbiol, 2012. **15**(4): p. 1146-1159.
32. Zoetendal, E.G., A.D. Akkermans, and W.M. De Vos, *Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria*. Appl Environ Microbiol, 1998. **64**(10): p. 3854-9.
33. Faith, J.J., et al., *The long-term stability of the human gut microbiota*. Science, 2013. **341**(6141): p. 1237439.
34. Jeffery, I.B., D.B. Lynch, and P.W. O'Toole, *Composition and temporal stability of the gut microbiota in older persons*. ISME J, 2016. **10**(1): p. 170-82.
35. Tedelind, S., et al., *Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(20): p. 2826-32.
36. Morrison, D.J. and T. Preston, *Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism*. Gut Microbes, 2016. **7**(3): p. 189-200.
37. Kamada, N., et al., *Regulated virulence controls the ability of a pathogen to compete with the gut microbiota*. Science, 2012. **336**(6086): p. 1325-9.
38. Perez-Lopez, A., et al., *Mucosal immunity to pathogenic intestinal bacteria*. Nat Rev Immunol, 2016. **16**(3): p. 135-48.
39. Lüllmann-Rauch, R.A., Esther, *Taschenlehrbuch Histologie*. 6. Edition ed. 2019: Thieme. 752.
40. Sellge, G. and T.A. Kufer, *PRR-signaling pathways: Learning from microbial tactics*. Semin Immunol, 2015. **27**(2): p. 75-84.
41. Shang, L., et al., *Toll-like receptor signaling in small intestinal epithelium promotes B-cell recruitment and IgA production in lamina propria*. Gastroenterology, 2008. **135**(2): p. 529-38.
42. Di Gioia, M. and I. Zanoni, *Toll-like receptor co-receptors as master regulators of the immune response*. Mol Immunol, 2015. **63**(2): p. 143-52.
43. Min, Y.W. and P.L. Rhee, *The Role of Microbiota on the Gut Immunology*. Clin Ther, 2015. **37**(5): p. 968-75.
44. Orfi, E. and J. Szebeni, *The immune system of the gut and potential adverse effects of oral nanocarriers on its function*. Adv Drug Deliv Rev, 2016. **106**(Pt B): p. 402-409.

45. Giannasca, P.J., et al., *Regional differences in glycoconjugates of intestinal M cells in mice: potential targets for mucosal vaccines*. Am J Physiol, 1994. **267**(6 Pt 1): p. G1108-21.
46. Kraehenbuhl, J.P. and M.R. Neutra, *Epithelial M cells: differentiation and function*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. **16**: p. 301-32.
47. McCarthy, A.J. and R. Chetty, *Gut-associated lymphoid tissue or so-called "dome" carcinoma of the colon: Review*. World J Gastrointest Oncol, 2019. **11**(1): p. 59-70.
48. Neutra, M.R., E. Pringault, and J.P. Kraehenbuhl, *Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses*. Annu Rev Immunol, 1996. **14**: p. 275-300.
49. Reboldi, A. and J.G. Cyster, *Peyer's patches: organizing B-cell responses at the intestinal frontier*. Immunol Rev, 2016. **271**(1): p. 230-45.
50. Owen, R.L., *Uptake and transport of intestinal macromolecules and microorganisms by M cells in Peyer's patches--a personal and historical perspective*. Semin Immunol, 1999. **11**(3): p. 157-63.
51. Mabbott, N.A., et al., *Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium*. Mucosal Immunol, 2013. **6**(4): p. 666-77.
52. Kanaya, T. and H. Ohno, *The Mechanisms of M-cell Differentiation*. Biosci Microbiota Food Health, 2014. **33**(3): p. 91-7.
53. Schiavi, E., S. Smolinska, and L. O'Mahony, *Intestinal dendritic cells*. Curr Opin Gastroenterol, 2015. **31**(2): p. 98-103.
54. Helft, J., et al., *GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c(+)MHCII(+) Macrophages and Dendritic Cells*. Immunity, 2015. **42**(6): p. 1197-211.
55. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Regulation of adaptive immunity by the innate immune system*. Science, 2010. **327**(5963): p. 291-5.
56. Thaïss, C.A., et al., *The microbiome and innate immunity*. Nature, 2016. **535**(7610): p. 65-74.
57. Manicassamy, S. and B. Pulendran, *Dendritic cell control of tolerogenic responses*. Immunol Rev, 2011. **241**(1): p. 206-27.
58. Durai, V. and K.M. Murphy, *Functions of Murine Dendritic Cells*. Immunity, 2016. **45**(4): p. 719-736.
59. McDole, J.R., et al., *Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine*. Nature, 2012. **483**(7389): p. 345-9.
60. Mazzini, E., et al., *Oral tolerance can be established via gap junction transfer of fed antigens from CX3CR1(+) macrophages to CD103(+) dendritic cells*. Immunity, 2014. **40**(2): p. 248-61.
61. Farache, J., et al., *Luminal bacteria recruit CD103+ dendritic cells into the intestinal epithelium to sample bacterial antigens for presentation*. Immunity, 2013. **38**(3): p. 581-95.
62. Liu, J. and X. Cao, *Regulatory dendritic cells in autoimmunity: A comprehensive review*. J Autoimmun, 2015. **63**: p. 1-12.
63. Dhodapkar, M.V., et al., *Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells*. J Exp Med, 2001. **193**(2): p. 233-8.
64. Raker, V.K., M.P. Domogalla, and K. Steinbrink, *Tolerogenic Dendritic Cells for Regulatory T Cell Induction in Man*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 569.
65. Delamarre, L., H. Holcombe, and I. Mellman, *Presentation of exogenous antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II molecules is differentially regulated during dendritic cell maturation*. J Exp Med, 2003. **198**(1): p. 111-22.

66. Rivollier, A., et al., *Inflammation switches the differentiation program of Ly6Chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon*. J Exp Med, 2012. **209**(1): p. 139-55.
67. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Control of adaptive immunity by the innate immune system*. Nat Immunol, 2015. **16**(4): p. 343-53.
68. Steimle, A. and J.S. Frick, *Molecular Mechanisms of Induction of Tolerant and Tolerogenic Intestinal Dendritic Cells in Mice*. J Immunol Res, 2016. **2016**: p. 1958650.
69. Frick, J.S., et al., *Colitogenic and non-colitogenic commensal bacteria differentially trigger DC maturation and Th cell polarization: an important role for IL-6*. Eur J Immunol, 2006. **36**(6): p. 1537-47.
70. Lutz, M.B., *Therapeutic potential of semi-mature dendritic cells for tolerance induction*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 123.
71. Muller, M., et al., *Intestinal colonization of IL-2 deficient mice with non-colitogenic B. vulgatus prevents DC maturation and T-cell polarization*. PLoS One, 2008. **3**(6): p. e2376.
72. Waidmann, M., et al., *Bacteroides vulgatus protects against Escherichia coli-induced colitis in gnotobiotic interleukin-2-deficient mice*. Gastroenterology, 2003. **125**(1): p. 162-77.
73. Maerz, J.K., et al., *Outer membrane vesicles blebbing contributes to B. vulgatus mpk-mediated immune response silencing*. Gut Microbes, 2018. **9**(1): p. 1-12.
74. Chow, J., H. Tang, and S.K. Mazmanian, *Pathobionts of the gastrointestinal microbiota and inflammatory disease*. Curr Opin Immunol, 2011. **23**(4): p. 473-80.
75. Lange, A., et al., *Extensive Mobilome-Driven Genome Diversification in Mouse Gut-Associated Bacteroides vulgatus mpk*. Genome Biol Evol, 2016. **8**(4): p. 1197-207.
76. Steimle, A., et al., *Weak Agonistic LPS Restores Intestinal Immune Homeostasis*. Mol Ther, 2019. **27**(11).
77. Gronbach, K., et al., *Endotoxicity of lipopolysaccharide as a determinant of T-cell-mediated colitis induction in mice*. Gastroenterology, 2014. **146**(3): p. 765-75.
78. Takeda, K. and S. Akira, *Toll-like receptors*. Curr Protoc Immunol, 2015. **109**: p. 14 12 1-10.
79. Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira, *Pathogen recognition in the innate immune response*. Biochem J, 2009. **420**(1): p. 1-16.
80. Brubaker, S.W., et al., *Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective*. Annu Rev Immunol, 2015. **33**: p. 257-90.
81. Kim, H.M., et al., *Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran*. Cell, 2007. **130**(5): p. 906-17.
82. Karnati, H.K., et al., *TLR-4 signalling pathway: MyD88 independent pathway up-regulation in chicken breeds upon LPS treatment*. Vet Res Commun, 2015. **39**(1): p. 73-8.
83. Hansen, G.H., et al., *Lipopolysaccharide-binding protein: localization in secretory granules of Paneth cells in the mouse small intestine*. Histochem Cell Biol, 2009. **131**(6): p. 727-32.
84. Miyake, K., *Roles for accessory molecules in microbial recognition by Toll-like receptors*. J Endotoxin Res, 2006. **12**(4): p. 195-204.
85. Wright, S.D., et al., *CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein*. Science, 1990. **249**(4975): p. 1431-3.
86. Rietschel, E.T., et al., *Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function*. FASEB J, 1994. **8**(2): p. 217-25.

87. Steimle, A., I.B. Autenrieth, and J.S. Frick, *Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens*. Int J Med Microbiol, 2016. **306**(5): p. 290-301.
88. Teghanemt, A., et al., *Molecular basis of reduced potency of underacylated endotoxins*. J Immunol, 2005. **175**(7): p. 4669-76.
89. Poltorak, A., et al., *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene*. Science, 1998. **282**(5396): p. 2085-8.
90. Su, H., et al., *Differential roles of Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide and Escherichia coli lipopolysaccharide in maturation and antigen-presenting functions of dendritic cells*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015. **19**(13): p. 2482-92.
91. Zahringer, U., B. Lindner, and E.T. Rietschel, *Molecular structure of lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides*. Adv Carbohydr Chem Biochem, 1994. **50**: p. 211-76.
92. Vatanen, T., et al., *Variation in Microbiome LPS Immunogenicity Contributes to Autoimmunity in Humans*. Cell, 2016. **165**(6): p. 1551.
93. Kubo-Murai, M., et al., *Protein kinase Cdelta binds TIRAP/Mal to participate in TLR signaling*. Mol Immunol, 2007. **44**(9): p. 2257-64.
94. Serrero, M., R. Planes, and E. Bahraoui, *PKC-delta isoform plays a crucial role in Tat-TLR4 signalling pathway to activate NF-kappaB and CXCL8 production*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 2384.
95. Kim, D.C., et al., *Effect of rottlerin, a PKC-delta inhibitor, on TLR-4-dependent activation of murine microglia*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **337**(1): p. 110-5.
96. Peng, X.X., et al., *Panax Notoginseng flower saponins (PNFS) inhibit LPS-stimulated NO overproduction and iNOS gene overexpression via the suppression of TLR4-mediated MAPK/NF-kappa B signaling pathways in RAW264.7 macrophages*. Chin Med, 2015. **10**: p. 15.
97. Jiang, S.L., et al., *[A method for registration of stomach movement of rabbits in chronic experiments]*. Sheng Li Xue Bao, 1986. **38**(1): p. 102-6.
98. Rocha, D.M., et al., *Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response*. Atherosclerosis, 2016. **244**: p. 211-5.
99. Xu, Y., et al., *Developmental regulation of synthesis and dimerization of the amyloidogenic protease inhibitor cystatin C in the hematopoietic system*. J Biol Chem, 2014. **289**(14): p. 9730-40.
100. Barrett, A.J., et al., *Nomenclature and classification of the proteins homologous with the cysteine-proteinase inhibitor chicken cystatin*. Biochem J, 1986. **236**(1): p. 312.
101. Grubb, A. and H. Lofberg, *Human gamma-trace, a basic microprotein: amino acid sequence and presence in the adenohypophysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(9): p. 3024-7.
102. Xu, Y., et al., *Cystatin C is a disease-associated protein subject to multiple regulation*. Immunol Cell Biol, 2015. **93**(5): p. 442-51.
103. Abrahamson, M., et al., *Isolation of six cysteine proteinase inhibitors from human urine. Their physicochemical and enzyme kinetic properties and concentrations in biological fluids*. J Biol Chem, 1986. **261**(24): p. 11282-9.
104. Pierre, P. and I. Mellman, *Developmental regulation of invariant chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells*. Cell, 1998. **93**(7): p. 1135-45.
105. Grzonka, Z., et al., *Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors*. Acta Biochim Pol, 2001. **48**(1): p. 1-20.
106. Ekiel, I. and M. Abrahamson, *Folding-related dimerization of human cystatin C*. J Biol Chem, 1996. **271**(3): p. 1314-21.

107. Steimle, A., et al., *Symbiotic gut commensal bacteria act as host cathepsin S activity regulators*. J Autoimmun, 2016. **75**: p. 82-95.
108. Das, L., et al., *Successful therapy of lethal murine visceral leishmaniasis with cystatin involves up-regulation of nitric oxide and a favorable T cell response*. J Immunol, 2001. **166**(6): p. 4020-8.
109. Yuan, J., et al., *Prognostic value of cystatin C in patients with nasopharyngeal carcinoma: a retrospective study of 1063 patients*. Clinics (Sao Paulo), 2016. **71**(6): p. 338-43.
110. Verdot, L., et al., *Chicken cystatin stimulates nitric oxide release from interferon-gamma-activated mouse peritoneal macrophages via cytokine synthesis*. Eur J Biochem, 1999. **266**(3): p. 1111-7.
111. Sluchanko, N.N. and N.B. Gusev, *Moonlighting chaperone-like activity of the universal regulatory 14-3-3 proteins*. FEBS J, 2017. **284**(9): p. 1279-1295.
112. Aitken, A., et al., *14-3-3 alpha and delta are the phosphorylated forms of raf-activating 14-3-3 beta and zeta. In vivo stoichiometric phosphorylation in brain at a Ser-Pro-Glu-Lys MOTIF*. J Biol Chem, 1995. **270**(11): p. 5706-9.
113. Obsilova, V., et al., *Mechanisms of the 14-3-3 protein function: regulation of protein function through conformational modulation*. Physiol Res, 2014. **63 Suppl 1**: p. S155-64.
114. Boston, P.F., P. Jackson, and R.J. Thompson, *Human 14-3-3 protein: radioimmunoassay, tissue distribution, and cerebrospinal fluid levels in patients with neurological disorders*. J Neurochem, 1982. **38**(5): p. 1475-82.
115. Aghazadeh, Y. and V. Papadopoulos, *The role of the 14-3-3 protein family in health, disease, and drug development*. Drug Discov Today, 2016. **21**(2): p. 278-87.
116. Freed, E., et al., *Binding of 14-3-3 proteins to the protein kinase Raf and effects on its activation*. Science, 1994. **265**(5179): p. 1713-6.
117. Jia, H., et al., *14-3-3 proteins: an important regulator of autophagy in diseases*. Am J Transl Res, 2017. **9**(11): p. 4738-4746.
118. Jin, J., et al., *Proteomic, functional, and domain-based analysis of in vivo 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization*. Curr Biol, 2004. **14**(16): p. 1436-50.
119. Liu, D., et al., *Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein*. Nature, 1995. **376**(6536): p. 191-4.
120. Muslin, A.J., et al., *Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine*. Cell, 1996. **84**(6): p. 889-97.
121. Yaffe, M.B., et al., *The structural basis for 14-3-3 : phosphopeptide binding specificity*. Cell, 1997. **91**(7): p. 961-971.
122. Rittinger, K., et al., *Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding*. Mol Cell, 1999. **4**(2): p. 153-66.
123. Fu, H., R.R. Subramanian, and S.C. Masters, *14-3-3 proteins: structure, function, and regulation*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2000. **40**: p. 617-47.
124. Gerst, F., et al., *Protein kinase Cdelta regulates nuclear export of FOXO1 through phosphorylation of the chaperone 14-3-3zeta*. Diabetologia, 2015. **58**(12): p. 2819-31.
125. Michaud, N.R., et al., *14-3-3 is not essential for Raf-1 function: identification of Raf-1 proteins that are biologically activated in a 14-3-3- and Ras-independent manner*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(6): p. 3390-7.
126. Uhart, M. and D.M. Bustos, *Protein intrinsic disorder and network connectivity. The case of 14-3-3 proteins*. Front Genet, 2014. **5**: p. 10.

127. Vincenz, C. and V.M. Dixit, *14-3-3 proteins associate with A20 in an isoform-specific manner and function both as chaperone and adapter molecules*. J Biol Chem, 1996. **271**(33): p. 20029-34.
128. Leivonen, S.K., et al., *Identification of miR-193b targets in breast cancer cells and systems biological analysis of their functional impact*. Mol Cell Proteomics, 2011. **10**(7): p. M110 005322.
129. Mathew, D.E., et al., *Expression of 14-3-3 transcript isoforms in response to ethanol exposure and their regulation by miRNAs*. Mol Cell Neurosci, 2016. **75**: p. 44-9.
130. Urano, T., et al., *Efp targets 14-3-3 sigma for proteolysis and promotes breast tumour growth*. Nature, 2002. **417**(6891): p. 871-5.
131. Zhang, S., H. Xing, and A.J. Muslin, *Nuclear localization of protein kinase U-alpha is regulated by 14-3-3*. J Biol Chem, 1999. **274**(35): p. 24865-72.
132. Furlanetto, R.W., et al., *14-3-3 proteins interact with the insulin-like growth factor receptor but not the insulin receptor*. Biochem J, 1997. **327** (Pt 3): p. 765-71.
133. Slone, S.R., et al., *Increased 14-3-3 phosphorylation observed in Parkinson's disease reduces neuroprotective potential of 14-3-3 proteins*. Neurobiol Dis, 2015. **79**: p. 1-13.
134. Kilani, R.T., et al., *Detection of high levels of 2 specific isoforms of 14-3-3 proteins in synovial fluid from patients with joint inflammation*. J Rheumatol, 2007. **34**(8): p. 1650-7.
135. Zhou, X.Y., et al., *14-3-3 Isoforms Differentially Regulate NFkappaB Signaling in the Brain After Ischemia-Reperfusion*. Neurochem Res, 2017. **42**(8): p. 2354-2362.
136. Tzivion, G., Y.H. Shen, and J. Zhu, *14-3-3 proteins; bringing new definitions to scaffolding*. Oncogene, 2001. **20**(44): p. 6331-8.
137. Sluchanko, N.N., et al., *Structural Basis for the Interaction of a Human Small Heat Shock Protein with the 14-3-3 Universal Signaling Regulator*. Structure, 2017. **25**(2): p. 305-316.
138. Teichmann, A., et al., *Characterization of 14-3-3 isoforms expressed in the Echinococcus granulosus pathogenic larval stage*. J Proteome Res, 2015. **14**(4): p. 1700-15.
139. Muslin, A.J. and H. Xing, *14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference*. Cell Signal, 2000. **12**(11-12): p. 703-9.
140. Uhart, M., G. Flores, and D.M. Bustos, *Controllability of protein-protein interaction phosphorylation-based networks: Participation of the hub 14-3-3 protein family*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 26234.
141. Tong, S., et al., *14-3-3zeta promotes lung cancer cell invasion by increasing the Snail protein expression through atypical protein kinase C (aPKC)/NF-kappaB signaling*. Exp Cell Res, 2016. **348**(1): p. 1-9.
142. Acs, P., et al., *Differential activation of PKC isozymes by 14-3-3 zeta protein*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **216**(1): p. 103-9.
143. Zhang, J., et al., *14-3-3zeta interacts with stat3 and regulates its constitutive activation in multiple myeloma cells*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e29554.
144. Newton, A.C., *Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm*. Biochem J, 2003. **370**(Pt 2): p. 361-71.
145. Igumenova, T.I., *Dynamics and Membrane Interactions of Protein Kinase C*. Biochemistry, 2015. **54**(32): p. 4953-68.
146. Gschwendt, M., W. Kittstein, and F. Marks, *A novel type of phorbol ester-dependent protein phosphorylation in the particulate fraction of mouse epidermis*. Biochem Biophys Res Commun, 1986. **137**(2): p. 766-74.
147. Ono, Y., et al., *Identification of three additional members of rat protein kinase C family: delta-, epsilon- and zeta-subspecies*. FEBS Lett, 1987. **226**(1): p. 125-8.

148. Salzer, E., et al., *Protein Kinase C delta: a Gatekeeper of Immune Homeostasis*. J Clin Immunol, 2016. **36**(7): p. 631-40.
149. Duquesnes, N., F. Lezoualc'h, and B. Crozatier, *PKC-delta and PKC-epsilon: foes of the same family or strangers?* J Mol Cell Cardiol, 2011. **51**(5): p. 665-73.
150. Cho, W., *Membrane targeting by C1 and C2 domains*. J Biol Chem, 2001. **276**(35): p. 32407-10.
151. Rosse, C., et al., *PKC and the control of localized signal dynamics*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(2): p. 103-12.
152. Huppi, K., et al., *Assignment of the protein kinase C delta polypeptide gene (PRKCD) to human chromosome 3 and mouse chromosome 14*. Genomics, 1994. **19**(1): p. 161-2.
153. Wetsel, W.C., et al., *Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes*. J Cell Biol, 1992. **117**(1): p. 121-33.
154. Romanova, L.Y., et al., *Cross-talk between protein kinase C-alpha (PKC-alpha) and -delta (PKC-delta): PKC-alpha elevates the PKC-delta protein level, altering its mRNA transcription and degradation*. Biochemistry, 1998. **37**(16): p. 5558-65.
155. Bartel, D.P., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. Cell, 2009. **136**(2): p. 215-33.
156. Reyland, M.E. and D.N. Jones, *Multifunctional roles of PKCdelta: Opportunities for targeted therapy in human disease*. Pharmacol Ther, 2016. **165**: p. 1-13.
157. Datta, R., et al., *Caspase-3-mediated cleavage of protein kinase C theta in induction of apoptosis*. J Biol Chem, 1997. **272**(33): p. 20317-20.
158. Emoto, Y., et al., *Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells*. EMBO J, 1995. **14**(24): p. 6148-56.
159. Steinberg, S.F., *Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase Cdelta*. Biochem J, 2004. **384**(Pt 3): p. 449-59.
160. Hurley, J.H. and S. Misra, *Signaling and subcellular targeting by membrane-binding domains*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2000. **29**: p. 49-79.
161. Newton, A.C., *The ins and outs of protein kinase C*. Methods Mol Biol, 2003. **233**: p. 3-7.
162. Parekh, D.B., W. Ziegler, and P.J. Parker, *Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation*. EMBO J, 2000. **19**(4): p. 496-503.
163. Liu, Y., et al., *Independence of protein kinase C-delta activity from activation loop phosphorylation: structural basis and altered functions in cells*. J Biol Chem, 2006. **281**(17): p. 12102-11.
164. Newton, A.C., *Protein kinase C: perfectly balanced*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2018. **53**(2): p. 208-230.
165. Basu, A. and D. Pal, *Two faces of protein kinase Cdelta: the contrasting roles of PKCdelta in cell survival and cell death*. ScientificWorldJournal, 2010. **10**: p. 2272-84.
166. Kikkawa, U., H. Matsuzaki, and T. Yamamoto, *Protein kinase C delta (PKC delta): activation mechanisms and functions*. J Biochem, 2002. **132**(6): p. 831-9.
167. Durgan, J., et al., *Novel phosphorylation site markers of protein kinase C delta activation*. FEBS Lett, 2007. **581**(18): p. 3377-81.
168. Kronfeld, I., et al., *Phosphorylation of protein kinase Cdelta on distinct tyrosine residues regulates specific cellular functions*. J Biol Chem, 2000. **275**(45): p. 35491-8.
169. Ziegler, W.H., et al., *Rapamycin-sensitive phosphorylation of PKC on a carboxy-terminal site by an atypical PKC complex*. Curr Biol, 1999. **9**(10): p. 522-9.
170. Sumandea, M.P., et al., *Tyrosine phosphorylation modifies protein kinase C delta-dependent phosphorylation of cardiac troponin I*. J Biol Chem, 2008. **283**(33): p. 22680-9.

171. Steinberg, S.F., *Mechanisms for redox-regulation of protein kinase C*. Front Pharmacol, 2015. **6**: p. 128.
172. Gong, J., et al., *The C2 Domain and Altered ATP-Binding Loop Phosphorylation at Ser(3)(5)(9) Mediate the Redox-Dependent Increase in Protein Kinase C-delta Activity*. Mol Cell Biol, 2015. **35**(10): p. 1727-40.
173. Rybin, V.O., et al., *Stimulus-specific differences in protein kinase C delta localization and activation mechanisms in cardiomyocytes*. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 19350-61.
174. Humphries, M.J., et al., *Tyrosine phosphorylation regulates nuclear translocation of PKCdelta*. Oncogene, 2008. **27**(21): p. 3045-53.
175. Mochly-Rosen, D., H. Khaner, and J. Lopez, *Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(9): p. 3997-4000.
176. Mochly-Rosen, D., *Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction*. Science, 1995. **268**(5208): p. 247-51.
177. Poole, A.W., et al., *PKC-interacting proteins: from function to pharmacology*. Trends Pharmacol Sci, 2004. **25**(10): p. 528-35.
178. Jaken, S. and P.J. Parker, *Protein kinase C binding partners*. Bioessays, 2000. **22**(3): p. 245-54.
179. Sanderson, J.L. and M.L. Dell'Acqua, *AKAP signaling complexes in regulation of excitatory synaptic plasticity*. Neuroscientist, 2011. **17**(3): p. 321-36.
180. Gomel, R., et al., *The localization of protein kinase Cdelta in different subcellular sites affects its proapoptotic and antiapoptotic functions and the activation of distinct downstream signaling pathways*. Mol Cancer Res, 2007. **5**(6): p. 627-39.
181. Mochly-Rosen, D., et al., *A protein kinase C isozyme is translocated to cytoskeletal elements on activation*. Cell Regul, 1990. **1**(9): p. 693-706.
182. Dai, J.G. and K. Murakami, *Constitutively and autonomously active protein kinase C associated with 14-3-3 zeta in the rodent brain*. J Neurochem, 2003. **84**(1): p. 23-34.
183. Van Der Hoeven, P.C., et al., *Protein kinase C activation by acidic proteins including 14-3-3*. Biochem J, 2000. **347 Pt 3**: p. 781-5.
184. Braiman, L., et al., *Insulin induces specific interaction between insulin receptor and protein kinase C delta in primary cultured skeletal muscle*. Mol Endocrinol, 2001. **15**(4): p. 565-74.
185. Kilpatrick, L.E., et al., *Serine phosphorylation of p60 tumor necrosis factor receptor by PKC-delta in TNF-alpha-activated neutrophils*. Am J Physiol Cell Physiol, 2000. **279**(6): p. C2011-8.
186. Tang, Y., et al., *Protein kinase C-delta inhibition protects blood-brain barrier from sepsis-induced vascular damage*. J Neuroinflammation, 2018. **15**(1): p. 309.
187. Soroush, F., et al., *Protein Kinase C-Delta (PKCdelta) Tyrosine Phosphorylation is a Critical Regulator of Neutrophil-Endothelial Cell Interaction in Inflammation*. Shock, 2019. **51**(5): p. 538-547.
188. De Vita, F., et al., *PKC-dependent phosphorylation of p27 at T198 contributes to p27 stabilization and cell cycle arrest*. Cell Cycle, 2012. **11**(8): p. 1583-92.
189. Siveen, K.S., et al., *Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: role of synthetic and natural inhibitors*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1845**(2): p. 136-54.
190. Kim, M.S., et al., *IL-32theta negatively regulates IL-1beta production through its interaction with PKCdelta and the inhibition of PU.1 phosphorylation*. FEBS Lett, 2014. **588**(17): p. 2822-9.
191. Ali, A.S., et al., *Exploitation of protein kinase C: a useful target for cancer therapy*. Cancer Treat Rev, 2009. **35**(1): p. 1-8.
192. Palaniyandi, S.S., et al., *Protein kinase C in heart failure: a therapeutic target?* Cardiovasc Res, 2009. **82**(2): p. 229-39.

193. Gonelli, A., et al., *Perspectives of protein kinase C (PKC) inhibitors as anti-cancer agents*. Mini Rev Med Chem, 2009. **9**(4): p. 498-509.
194. Bynagari-Settipalli, Y.S., et al., *Protein kinase C - possible therapeutic target to treat cardiovascular diseases*. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2010. **10**(4): p. 292-308.
195. Churchill, E., et al., *PKC isozymes in chronic cardiac disease: possible therapeutic targets?* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2008. **48**: p. 569-99.
196. Greene, M.W., et al., *Lipid metabolism, oxidative stress and cell death are regulated by PKC delta in a dietary model of nonalcoholic steatohepatitis*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e85848.
197. Marrocco, V., et al., *PKC and PKN in heart disease*. J Mol Cell Cardiol, 2019. **128**: p. 212-226.
198. Ma, J., et al., *Tumor suppressive role of rottlerin in cancer therapy*. Am J Transl Res, 2018. **10**(11): p. 3345-3356.
199. Cantley, J., et al., *Deletion of protein kinase Cdelta in mice modulates stability of inflammatory genes and protects against cytokine-stimulated beta cell death in vitro and in vivo*. Diabetologia, 2011. **54**(2): p. 380-9.
200. Ren, J., et al., *Protein kinase C-delta (PKCdelta) regulates proinflammatory chemokine expression through cytosolic interaction with the NF-kappaB subunit p65 in vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 2014. **289**(13): p. 9013-26.
201. Gorelik, G., et al., *T cell PKCdelta kinase inactivation induces lupus-like autoimmunity in mice*. Clin Immunol, 2015. **158**(2): p. 193-203.
202. Mecklenbrauker, I., et al., *Protein kinase Cdelta controls self-antigen-induced B-cell tolerance*. Nature, 2002. **416**(6883): p. 860-5.
203. Miyamoto, A., et al., *Increased proliferation of B cells and auto-immunity in mice lacking protein kinase Cdelta*. Nature, 2002. **416**(6883): p. 865-9.
204. Banninger, G.P., et al., *Loss of PKCdelta results in characteristics of Sjogren's syndrome including salivary gland dysfunction*. Oral Dis, 2011. **17**(6): p. 601-9.
205. Mondrinos, M.J., et al., *Pulmonary endothelial protein kinase C-delta (PKCdelta) regulates neutrophil migration in acute lung inflammation*. Am J Pathol, 2014. **184**(1): p. 200-13.
206. Kilpatrick, L.E., et al., *Protection against sepsis-induced lung injury by selective inhibition of protein kinase C-delta (delta-PKC)*. J Leukoc Biol, 2011. **89**(1): p. 3-10.
207. Bezy, O., et al., *PKCdelta regulates hepatic insulin sensitivity and hepatosteatosis in mice and humans*. J Clin Invest, 2011. **121**(6): p. 2504-17.
208. Kilpatrick, L.E., et al., *A role for PKC-delta and PI 3-kinase in TNF-alpha-mediated antiapoptotic signaling in the human neutrophil*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **283**(1): p. C48-57.
209. Cummings, R., et al., *Protein kinase Cdelta mediates lysophosphatidic acid-induced NF-kappaB activation and interleukin-8 secretion in human bronchial epithelial cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(39): p. 41085-94.
210. Jakkampudi, A., et al., *NF-kappaB in acute pancreatitis: Mechanisms and therapeutic potential*. Pancreatology, 2016. **16**(4): p. 477-88.
211. Pham, T.H., et al., *Fargesin exerts anti-inflammatory effects in THP-1 monocytes by suppressing PKC-dependent AP-1 and NF-kB signaling*. Phytomedicine, 2017. **24**: p. 96-103.
212. Loegering, D.J. and M.R. Lennartz, *Protein kinase C and toll-like receptor signaling*. Enzyme Res, 2011. **2011**: p. 537821.
213. Xu, X., et al., *Advanced oxidation protein products induce epithelial-mesenchymal transition of intestinal epithelial cells via a PKC delta-mediated, redox-dependent signaling pathway*. Antioxid Redox Signal, 2016.

214. Brown, J.F., et al., *Protein kinase C mediates experimental colitis in the rat*. Am J Physiol, 1999. **276**(3 Pt 1): p. G583-90.
215. Leppanen, T., et al., *Down-regulation of protein kinase Cdelta inhibits inducible nitric oxide synthase expression through IRF1*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e52741.
216. Banan, A., et al., *iNOS upregulation mediates oxidant-induced disruption of F-actin and barrier of intestinal monolayers*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **280**(6): p. G1234-46.
217. Litvinova, L., et al., *Nitric oxide and mitochondria in metabolic syndrome*. Front Physiol, 2015. **6**: p. 20.
218. Alderton, W.K., C.E. Cooper, and R.G. Knowles, *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition*. Biochem J, 2001. **357**(Pt 3): p. 593-615.
219. Mayer, B. and B. Hemmens, *Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells*. Trends Biochem Sci, 1997. **22**(12): p. 477-81.
220. Bogdan, C., *Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update*. Trends Immunol, 2015. **36**(3): p. 161-78.
221. Mattila, J.T. and A.C. Thomas, *Nitric oxide synthase: non-canonical expression patterns*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 478.
222. Lahti, A., H. Kankaanranta, and E. Moilanen, *P38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB203580 has a bi-directional effect on iNOS expression and NO production*. Eur J Pharmacol, 2002. **454**(2-3): p. 115-23.
223. Marks-Konczalik, J., S.C. Chu, and J. Moss, *Cytokine-mediated transcriptional induction of the human inducible nitric oxide synthase gene requires both activator protein 1 and nuclear factor kappaB-binding sites*. J Biol Chem, 1998. **273**(35): p. 22201-8.
224. Wang, B.S., J.K. Lin, and S.Y. Lin-Shiau, *Role of tyrosine kinase activity in 2,2',2''-tripyridine-induced nitric oxide generation in macrophages*. Biochem Pharmacol, 1999. **57**(12): p. 1367-73.
225. Momose, I., et al., *Phorbol ester synergistically increases interferon regulatory factor-1 and inducible nitric oxide synthase induction in interferon-gamma-treated RAW 264.7 cells*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1498**(1): p. 19-31.
226. Francisco, V., et al., *Biomechanics, obesity, and osteoarthritis. The role of adipokines: When the levee breaks*. J Orthop Res, 2018. **36**(2): p. 594-604.
227. Tun, X., K. Yasukawa, and K.I. Yamada, *Nitric Oxide Is Involved in Activation of Toll-Like Receptor 4 Signaling through Tyrosine Nitration of Src Homology Protein Tyrosine Phosphatase 2 in Murine Dextran Sulfate-Induced Colitis*. Biol Pharm Bull, 2018. **41**(12): p. 1843-1852.
228. Rafa, H., et al., *All-Trans Retinoic Acid Modulates TLR4/NF-kappaB Signaling Pathway Targeting TNF-alpha and Nitric Oxide Synthase 2 Expression in Colonic Mucosa during Ulcerative Colitis and Colitis Associated Cancer*. Mediators Inflamm, 2017. **2017**: p. 7353252.
229. Gao, Q., et al., *IL-17 intensifies IFN-gamma-induced NOS2 upregulation in RAW 264.7 cells by further activating STAT1 and NF-kappaB*. Int J Mol Med, 2016. **37**(2): p. 347-58.
230. Grisham, M.B., D. Jour'd'Heuil, and D.A. Wink, *Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation*. Am J Physiol, 1999. **276**(2 Pt 1): p. G315-21.
231. Ghimire, K., et al., *Nitric oxide: what's new to NO?* Am J Physiol Cell Physiol, 2017. **312**(3): p. C254-C262.
232. Bogdan, C., *Nitric oxide and the immune response*. Nat Immunol, 2001. **2**(10): p. 907-16.
233. Soufli, I., et al., *Overview of cytokines and nitric oxide involvement in immunopathogenesis of inflammatory bowel diseases*. World J Gastrointest Pharmacol Ther, 2016. **7**(3): p. 353-60.

234. McKenzie, S.J., et al., *Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease*. J Clin Invest, 1996. **98**(1): p. 136-41.
235. Keshavarzian, A., et al., *Excessive production of reactive oxygen metabolites by inflamed colon: analysis by chemiluminescence probe*. Gastroenterology, 1992. **103**(1): p. 177-85.
236. Lassmann, H. and J. van Horssen, *Oxidative stress and its impact on neurons and glia in multiple sclerosis lesions*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1862**(3): p. 506-10.
237. Forstermann, U., N. Xia, and H. Li, *Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis*. Circ Res, 2017. **120**(4): p. 713-735.
238. Dey, P., V. Panga, and S. Raghunathan, *A Cytokine Signalling Network for the Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Rheumatoid Arthritis*. PLoS One, 2016. **11**(9): p. e0161306.
239. Coombes, J.L., et al., *Regulatory T cells and intestinal homeostasis*. Immunol Rev, 2005. **204**: p. 184-94.
240. Arpaia, N., et al., *A Distinct Function of Regulatory T Cells in Tissue Protection*. Cell, 2015. **162**(5): p. 1078-89.
241. Bakdash, G., et al., *Retinoic acid primes human dendritic cells to induce gut-homing, IL-10-producing regulatory T cells*. Mucosal Immunol, 2015. **8**(2): p. 265-78.
242. Davidson, T.S., et al., *Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells*. J Immunol, 2007. **178**(7): p. 4022-6.
243. Kanamori, M., et al., *Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications*. Trends Immunol, 2016. **37**(11): p. 803-811.
244. Coombes, J.L., et al., *A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1757-64.
245. Raverdeau, M. and K.H. Mills, *Modulation of T cell and innate immune responses by retinoic Acid*. J Immunol, 2014. **192**(7): p. 2953-8.
246. Aliberti, J., *Immunity and Tolerance Induced by Intestinal Mucosal Dendritic Cells*. Mediators Inflamm, 2016. **2016**: p. 3104727.
247. Iwata, M., et al., *Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 527-38.
248. Singh, B., et al., *Control of intestinal inflammation by regulatory T cells*. Immunol Rev, 2001. **182**: p. 190-200.
249. Campbell, D.J., *Control of Regulatory T Cell Migration, Function, and Homeostasis*. J Immunol, 2015. **195**(6): p. 2507-13.
250. Uhlig, H.H., et al., *Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis*. J Immunol, 2006. **177**(9): p. 5852-60.
251. Kim, H.R., et al., *Attenuation of experimental colitis in glutathione peroxidase 1 and catalase double knockout mice through enhancing regulatory T cell function*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e95332.
252. Bertrand, R., et al., *Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine*. Exp Cell Res, 1994. **211**(2): p. 314-21.
253. Tepperman, B.L., Q. Chang, and B.D. Soper, *Protein kinase C mediates lipopolysaccharide- and phorbol-induced nitric-oxide synthase activity and cellular injury in the rat colon*. J Pharmacol Exp Ther, 2000. **295**(3): p. 1249-57.
254. Angelis, K., et al., *Global Dispersal Pattern of HIV Type 1 Subtype CRF01_AE: A Genetic Trace of Human Mobility Related to Heterosexual Sexual Activities Centralized in Southeast Asia*. J Infect Dis, 2015. **211**(11): p. 1735-44.

255. Iqbal, S., et al., *Inducible nitric oxide synthase (NOS-2) in subarachnoid hemorrhage: Regulatory mechanisms and therapeutic implications*. Brain Circ, 2016. **2**(1): p. 8-19.
256. Poltorak, M.P. and B.U. Schraml, *Fate mapping of dendritic cells*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 199.
257. Cui, Z.G., et al., *Molecular mechanisms of hyperthermia-induced apoptosis enhanced by docosahexaenoic acid: implication for cancer therapy*. Chem Biol Interact, 2014. **215**: p. 46-53.
258. Kumar Vr, S., et al., *Cathepsin S Cleavage of Protease-Activated Receptor-2 on Endothelial Cells Promotes Microvascular Diabetes Complications*. J Am Soc Nephrol, 2016. **27**(6): p. 1635-49.
259. Aggarwal, N. and B.F. Sloane, *Cathepsin B: multiple roles in cancer*. Proteomics Clin Appl, 2014. **8**(5-6): p. 427-37.
260. Vilar, E., et al., *Removal and rebound kinetics of cystatin C in high-flux hemodialysis and hemodiafiltration*. Clin J Am Soc Nephrol, 2014. **9**(7): p. 1240-7.
261. Jones, D.H., S. Ley, and A. Aitken, *Isoforms of 14-3-3 protein can form homo- and heterodimers in vivo and in vitro: implications for function as adapter proteins*. FEBS Lett, 1995. **368**(1): p. 55-8.
262. Zangar, R.C., J.J. Reiners, Jr., and R.F. Novak, *Gender-specific and developmental differences in protein kinase C isozyme expression in rat liver*. Carcinogenesis, 1995. **16**(10): p. 2593-7.
263. Liu, J., et al., *NF-kappaB is required for UV-induced JNK activation via induction of PKCdelta*. Mol Cell, 2006. **21**(4): p. 467-80.
264. Suh, K.S., et al., *Genomic structure and promoter analysis of PKC-delta*. Genomics, 2003. **82**(1): p. 57-67.
265. Zhang, C., et al., *Up-regulation of 14-3-3zeta expression in intrahepatic cholangiocarcinoma and its clinical implications*. Tumour Biol, 2015. **36**(3): p. 1781-9.
266. Takenaka, M.C. and F.J. Quintana, *Tolerogenic dendritic cells*. Semin Immunopathol, 2017. **39**(2): p. 113-120.
267. Dalod, M., et al., *Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming*. EMBO J, 2014. **33**(10): p. 1104-16.
268. Qi, X., et al., *Sustained pharmacological inhibition of deltaPKC protects against hypertensive encephalopathy through prevention of blood-brain barrier breakdown in rats*. J Clin Invest, 2008. **118**(1): p. 173-82.
269. Mondrinos, M.J., et al., *Biodistribution and Efficacy of Targeted Pulmonary Delivery of a Protein Kinase C-delta Inhibitory Peptide: Impact on Indirect Lung Injury*. J Pharmacol Exp Ther, 2015. **355**(1): p. 86-98.
270. Bates, E., et al., *Intracoronary KAI-9803 as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention for acute ST-segment elevation myocardial infarction*. Circulation, 2008. **117**(7): p. 886-96.
271. Wang, B., et al., *Isolation of high-affinity peptide antagonists of 14-3-3 proteins by phage display*. Biochemistry, 1999. **38**(38): p. 12499-504.
272. Zhao, J., et al., *Discovery and structural characterization of a small molecule 14-3-3 protein-protein interaction inhibitor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(39): p. 16212-6.
273. Elbashir, S.M., et al., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. Nature, 2001. **411**(6836): p. 494-8.
274. Scacheri, P.C., et al., *Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(7): p. 1892-7.

275. Frendeus, K.H., et al., *Macrophage responses to interferon-gamma are dependent on cystatin C levels*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(11): p. 2262-9.
276. Kopitar-Jerala, N., *Innate Immune Response in Brain, NF-Kappa B Signaling and Cystatins*. Front Mol Neurosci, 2015. **8**: p. 73.
277. Hartmann, S., et al., *A filarial cysteine protease inhibitor down-regulates T cell proliferation and enhances interleukin-10 production*. Eur J Immunol, 1997. **27**(9): p. 2253-60.
278. Gren, S.T., et al., *The protease inhibitor cystatin C down-regulates the release of IL-beta and TNF-alpha in lipopolysaccharide activated monocytes*. J Leukoc Biol, 2016.
279. Whelan, R.A., et al., *A transgenic probiotic secreting a parasite immunomodulator for site-directed treatment of gut inflammation*. Mol Ther, 2014. **22**(10): p. 1730-40.
280. Kishimoto, A., et al., *Limited proteolysis of protein kinase C subspecies by calcium-dependent neutral protease (calpain)*. J Biol Chem, 1989. **264**(7): p. 4088-92.
281. Morgan, S., et al., *Elevated protein kinase C-delta contributes to aneurysm pathogenesis through stimulation of apoptosis and inflammatory signaling*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(10): p. 2493-502.
282. Karaman, M.W., et al., *A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(1): p. 127-32.
283. Apostolou, I. and H. von Boehmer, *In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells*. J Exp Med, 2004. **199**(10): p. 1401-8.
284. Mucida, D., et al., *Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid*. Science, 2007. **317**(5835): p. 256-60.

8. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene unter Betreuung von Professor Dr. J.-S. Frick durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Dr. Alex Steimle, Wissenschaftlicher Mitarbeiter.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. Alex Steimle von mir eigenständig durchgeführt, zum Teil in Zusammenarbeit mit Dr. Alex Steimle. Hierzu gehören vor allem die Entnahme der Knochenmarkszellen, die FACS Analyse der ALDH Aktivität und der iNOS MFI.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung von Dr. Alex Steimle durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung durch Dr. Alex Steimle verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

9. Danksagung

Zunächst möchte ich Professor Dr. med. I. Autenrieth dafür danken, dass ich meine Dissertation am Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene machen konnte.

Dabei möchte ich auch Professor Dr. med. J.-S. Frick dafür danken, dass sie mich in ihre Arbeitsgruppe aufgenommen und mir die Möglichkeit gegeben hat dort zu arbeiten.

Insbesondere danke ich außerdem Dr. Alex Steimle für die enge Betreuung und durchgehende Unterstützung, sowohl während des experimentellen Teils als auch während der schriftlichen Erstellung dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Frick für die fortlaufende Unterstützung und die schöne Zeit im Institut.

Zuletzt möchte ich dem Sonderforschungsbereich 685, für die Unterstützung im Rahmen des Promotionsprogramms und der IRTG danken.