

MASTERARBEIT | MASTER'S THESIS

Titel | Title

Einfluss von Tlr9 auf die Entstehung altersassoziierter Leberschäden bei Mäusen

verfasst von | submitted by

Greta Anna Kugel B.Sc.

angestrebter akademischer Grad | in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Master of Science (MSc)

Wien | Vienna, 2025

Studienkennzahl lt. Studienblatt |
Degree programme code as it appears on the
student record sheet:

UA 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt | Degree
programme as it appears on the student
record sheet:

Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreut von | Supervisor:

Univ.-Prof. Dipl. oec. troph. Dr. Ina Bergheim
Privatdoz.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich sehr herzlich bei Frau Prof. Dr. Ina Bergheim für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe sowie die engagierte Betreuung meiner Masterarbeit bedanken. Besonders dankbar bin ich für die investierte Zeit, die kontinuierliche wissenschaftliche Unterstützung während der Durchführung meiner Arbeit sowie für die zahlreichen konstruktiven Anregungen und Hilfestellungen.

Ein riesiges Dankeschön möchte ich Dr. Annette Brandt aussprechen, die mir während meiner gesamten Zeit in der Arbeitsgruppe Bergheim zur Hilfe stand und immer ein offenes Ohr für egal welcher meiner Fragen hatte. Ich bin sehr dankbar für all das, was ich von Ihr lernen durfte!

Ich möchte mich auch bei der gesamten Arbeitsgruppe, bei Dr. Anja Baumann, Katharina Burger, Katja Csarmann, Beate Gärtner, Raphaela Staltner, Alessio Colucci, Anar Batzorig und Spela Kotar für die liebe Aufnahme ins Team bedanken. Danke auch für die stetige Hilfsbereitschaft im Labor und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ein besonderer Dank gilt Carolin Schilp, eine Studienkollegin oder eher Wegbegleiterin, die mich seit 3 Jahren durchs Leben und besonders durch den Master, inklusive den Prozess der Thesis, in der Arbeitsgruppe Bergheim begleitet hat. Vielen Dank für deine tägliche Unterstützung und immerwährenden aufmunternden Worte, ob privat in der Arbeit oder der Uni. Ohne dich wäre diese Zeit nicht annähernd so erträglich, schön und lustig gewesen, ich freue mich auf alle weiteren Jahre mit dir!

Ebenso möchte ich mich bei den Menschen in meinem Leben bedanken, die mir jeden Tag das Leben versüßen und mir das Masterstudium in Wien erleichtert haben.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Tabellenverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Folgen des demografischen Alterns	1
1.1.1 Folgen des Alterns auf die Leber	2
1.2 Der Toll like Rezeptor 9 (Tlr9) Signalweg: Charakterisierung, Expression und Funktion von TLR9.....	4
1.3 Altern und der TLR9.....	7
1.4 Fragestellung	9
2 Materialien.....	10
2.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Geräte	10
2.2 Histologische und Immunhistochemische Färbungen	11
2.3 Sirius Red Färbung	13
2.4 Ly6G Färbung.....	13
2.5 Cleaved Caspase 3 Färbung	13
2.6 Triglycerid-Extraktion + Proteinbestimmung nach Bradford	14
2.7 cDNA-Synthese	15
2.8 Real-time qPCR	15
2.9 ELISA (IL1 β und PAI1)	16
2.10 Software zur Ergebnisauswertung.....	17
3 Methodik.....	18
3.1 Versuchsdesign	18
3.2 Histologische Gewebepräparation und Paraffineinbettung	19
3.3 Histologische Sirius Red Färbung der Leber	19
3.4 Immunhistochemische Ly6G- und Cleaved Caspase 3 Färbung der Leber.....	20
3.5 Triglycerid Extraktion + Proteinbestimmung nach Bradford der Leber.....	23
3.5.1 Proteinbestimmung nach Bradford	24
3.6 cDNA-Synthese	25
3.7 Real-time qPCR	25
3.8 ELISA.....	26
3.9 Statistische Auswertung.....	28
4 Ergebnisse	29
4.1 Der Einfluss eines TLR9 ^{-/-} auf das Körpergewicht und das Leber-/Körpergewichts Ratio	29

4.2	TLR9 mRNA Expression in der Leber im Verlauf des Alterns	29
4.3	Der Einfluss der genetischen Deletion von TLR9 auf die altersbedingte histologische Veränderung in der Leber: allgemeine Histologie, Fetteinlagerung, Entzündungsmarker und Marker für Fibrose	30
4.4	Der Einfluss der genetischen Deletion von Tlr9 auf Marker der Apoptose und der Seneszenz im Lebergewebe von jungen und alten Mäusen.....	34
5	Diskussion	37
5.1	Das Mausmodell zur Untersuchung der altersassoziierten Leberschädigung	37
5.2	Der Einfluss einer genetischen Deletion von Tlr9 auf die altersbedingten histologischen Veränderungen der Leber im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen	39
5.2.1	Fibrose	42
5.3	Der Einfluss einer genetischen Deletion von Tlr9 auf die altersbedingte Apoptose und Seneszenz in der Leber im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen	43
5.3.1	Seneszenz Marker	43
6	Fazit und Ausblick	46
7	Zusammenfassung.....	47
8	Summary	48
9	Literaturverzeichnis	I
10	Anhang.....	IX

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Entparaffinierung und Rehydrierung bei der Sirius Red Färbung.....	19
Tabelle 2: Dehydrierung bei der Sirius Red Färbung	20
Tabelle 3: Entparaffinierung und Rehydrierung bei der Ly6G- und Cleaved Caspase 3 Färbung	21
Tabelle 4: Gegenfärbung mit Hämatoxylin bei der Ly6G- und Cleaved Caspase 3 Färbung ..	21
Tabelle 5: Dehydrierung bei der Ly6G- und Cleaved Caspase 3 Färbung.....	22
Tabelle 6: Herstellung der Standardverdünnungsreihe.....	24
Tabelle 7: Temperaturprofil der real-time qPCR	26
Tabelle 8: Verwendete Verdünnungen für die ELISA	28
Tabelle 9: Daten zum Körpergewicht und Leber-/Körpergewichts-Ratio der 4 und 20 Monate alten BL6 und Tlr9-/- Mäusen. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert $\pm$ SEM, Anzahl (n) = 8 in der 4 Monate alten Gruppe, n = 10 in der 20 Monate alten Gruppe.	29
Tabelle 10: Zusammensetzung Tris-EDTA-Puffer	IX
Tabelle 11: Zusammensetzung Mono-Natriumcitrat	IX
Tabelle 12: Zusammensetzung 10x PBS	IX
Tabelle 13: Zusammensetzung PBST.....	IX
Tabelle 14: Verwendete Verdünnungsfaktoren und Extraktionspuffer der Methoden	X
Tabelle 15: Zusammensetzung der benötigten Lösungen für die ELISA	X

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Folgen des Alterns auf die Leber.	3
Abbildung 2: Mitglieder der Toll like Rezeptoren (Tlr) -Familie erkennen unterschiedliche pathogenassoziierte molekulare Muster (PAMPs) auf einzelnen Mikroorganismen.....	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Tlr9 Signalwegs.....	6
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Studiendesign.	18
Abbildung 5: Tlr9 mRNA Expression im Lebergewebe verschiedenen Alters der C57BL/6 Mäuse.	30
Abbildung 6: Leberentzündungs-Score und Histologische Bilder des Lebergewebes in 4 und 20 Monate alten BL6 und Tlr9 ^{-/-} Mäusen.....	31
Abbildung 7: Triglyceridkonzentration im Lebergewebe in 4 und 20 Monate alten BL6 und Tlr9 ^{-/-} Mäusen.	32
Abbildung 8: Marker der Leberinflammation in 4 und 20 Monate alten BL6 und Tlr9 ^{-/-} Mäusen.	33
Abbildung 9: Marker der Leberfibrose in 4 und 20 Monate alten BL6 und Tlr9 ^{-/-} Mäusen.	34
Abbildung 10: Marker der Apoptose im Lebergewebe von 4 und 20 Monate alten BL6 und Tlr9 ^{-/-} Mäusen.	35
Abbildung 11: Marker der Seneszenz im Lebergewebe von 4 und 20 Monate alten BL6 und Tlr9 ^{-/-} Mäusen.	36

Abkürzungsverzeichnis

µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
Alpha-sma	alpha-Smooth Muscle Actin
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
BAD	Bcl-2-associated agonist of cell death
BL6	C57BL/6J-Wildtypmäuse
BMBWF	Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft und Forschung
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
d H ₂ O	Destilliertes Wasser
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DALY	Disability-Adjusted Life Years
DAMPs	Schadens-assoziierte molekulare Muster
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ER	endoplasmatisches Retikulum
h	Stunde
H&E	Hämatoxylin und Eosin Färbung
HALE	Healthy Life Expectancy
HSCs	Hepatische Sternzellen
IFN-α, IFN-β	Interferon-α, Interferon-β
IL-1β	Interleukin-1β
IRF	Interferon Regulatory Factor
kg	Kilogramm
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharide
mg	Milligramm
min	Minuten
mL	Milliliter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mtDNA	mitochondriale DNA
MW	Mittelwert
MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88
n	Anzahl

NF- κ B	nukleärer Faktor kappa B
nm	Nanometer
NTC	Non-Template-Control
ODN	Oligodeoxynukleotide
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBA	PBS mit 1 % BSA
PBS	phosphatgepufferter Salzlösung
PBST	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pDCs	plasmacytoide dendritische Zellen
PRRs	pattern recognition receptors
qPCR	quantitative PCR
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SASP	seneszenz-assoziiierter sekretorischer Phänotyp
sec	Sekunden
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SPF	spezifisch pathogenfreien
TGF β 1	Transforming Growth Factor beta 1
Tlrs	Toll-like-Rezeptoren
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRIF	TIR-Domänen-haltigen Adapter, der Interferon- β induziert
Tris-EDTA	Tris(hydroxymethyl)aminomethan Ethylendiamintetraessigsäure

1 Einleitung

1.1 Folgen des demografischen Alterns

In den letzten Jahren ist die durchschnittliche Lebenserwartung weltweit stetig gestiegen (Dattani et al., 2023), so hat sie sich in den vergangenen 120 Jahren in den Industrieländern sowohl bei Männern als auch bei Frauen nahezu verdoppelt. In Österreich lag die durchschnittliche Lebenserwartung im Jahr 2021 bei der Geburt für Frauen bei 84,1 Jahren und für Männer bei 79,2 Jahren. Die *Global Burden of Disease Study* unterscheidet jedoch zwischen der durchschnittlichen Lebenserwartung und der gesunden Lebenserwartung (*Healthy Life Expectancy*, HALE). Diese Kennzahl gibt an, wie viele Lebensjahre bei guter Gesundheit verbracht werden. Für Österreich wurde die HALE im Jahr 2022 mit 71,5 Jahren für Frauen und 70,3 Jahren für Männer berechnet. Dies verdeutlicht, dass die HALE nicht im gleichen Maße wie die durchschnittliche Lebenserwartung zunimmt. Aus der Differenz zwischen beiden Werten lassen sich die Jahre ableiten, die in schlechter Gesundheit verbracht werden (Disability-Adjusted Life Years, DALY) (Global Burden of Disease Study, 2021).

Alter und der Prozess des Alterns sind unterschiedlich zu definieren. Während Alter zunächst lediglich eine Zahl darstellt, beschreibt Altern einen fortschreitenden biologischen Prozess, der mit dem Verlust physiologischer Unversehrtheit, funktionellen Beeinträchtigungen und einer erhöhten Sterblichkeit verbunden ist (López-Otín et al., 2013). Altern wird zudem als Zustand einer geringgradigen, chronischen Entzündung betrachtet, die auch ohne das Vorliegen einer offensichtlichen Infektion auftritt und als „inflammaging“ bezeichnet wird (Franceschi & Campisi, 2014). Charakteristisch für *inflammaging* sind erhöhte Spiegel zirkulierender proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-6, Tumornekrosefaktor- α und Interleukin-1 β (Ferrucci & Fabbri, 2018). Die Frage, wie, wann und auf welche Weise das Altern die Gewebe- und Zellfunktionen beeinträchtigt und dadurch zu *inflammaging* führt, ist trotz zahlreicher Studien bisher nicht abschließend geklärt (Baumann et al., 2021).

Obwohl die Bevölkerung immer älter wird, tritt der Zustand dieser geringgradigen Entzündung nicht verzögert ein. Vielmehr führt dieser aufgrund einer immer besser werdenden medizinischen Versorgung, zu einer Zunahme der Lebenszeit, die in Krankheit verbracht wird (Global Burden of Disease Study, 2020).

Altern ist ein multifaktorieller und komplexer biologischer Prozess (López-Otín et al., 2013). Nach López-Otín et al. (2013) werden die mit dem Altern assoziierten Prozesse unter dem Begriff „Hallmarks of Aging“ zusammengefasst. Ursprünglich wurden neun dieser Kennzeichen beschrieben, mittlerweile wurde ihre Zahl auf zwölf erweitert (López-Otín et al., 2023). Dazu

zählen: genomische Instabilität, Telomerverkürzung, epigenetische Veränderungen, Verlust der Proteinhomöostase, beeinträchtigte Autophagie, deregulierte Nährstoffsensoren, mitochondriale Dysfunktion, zelluläre Seneszenz, Erschöpfung von Stammzellen, gestörte interzelluläre Kommunikation, chronische Entzündung und Dysbiose.

1.1.1 Folgen des Alterns auf die Leber

Die Leber ist ein zentrales Organ für den Stoffwechsel von Nährstoffen und die Ausscheidung von Abfallprodukten (Ozougwu & Eyo, 2014). Ihre Hauptaufgabe besteht darin, den Durchfluss und die Unbedenklichkeit der aus dem Verdauungstrakt aufgenommenen Substanzen zu kontrollieren, bevor diese in den systemischen Kreislauf gelangen (Allen, 2002).

Tierexperimentelle Studien zeigen, dass selbst ohne zusätzliche Intervention, wie einer unausgewogenen Ernährung, spezielle Diäten oder Alkoholkonsum das „gesunde“ Altern mit einem fortschreitenden Funktionsverlust der Organe (López-Otin et al., 2013), einschließlich der Leber, einhergeht (Jin et al., 2020). Die altersbedingten Veränderungen der Leber betreffen hierbei unterschiedliche Ebenen (Wang et al., 2023):

Auf zellulärer Ebene ist eine Vergrößerung der Hepatozyten zu beobachten, die mit einer Zunahme der Polyploidie zusammenhängt. Bei 20-Jährigen machen polyploide Zellen etwa 6–15 % der Hepatozyten aus, bei 80-Jährigen hingegen 25–42 % (Hoare et al., 2010; Wang et al., 2017). Polyploidie gilt daher als Zeichen zellulärer Seneszenz und als Schutzmechanismus, um die Vermehrung geschädigter Zellen zu begrenzen (He & Sharpless, 2017; Wang et al., 2014). Zudem nimmt sowohl die Anzahl der Mitochondrien als auch die mitochondriale Mitophagie ab. Senescente Zellen mit mitochondrialer Dysfunktion führen zu DNA-Schäden und Lipidperoxidation, was einen Teufelskreis aus verstärktem oxidativem Stress und erhöhter Empfindlichkeit gegenüber diesem Stress auslöst (Durand et al., 2018). Auch die Apoptose nimmt in der gealterten Leber zu. Für die Homöostase wäre der Abbau seneszenten Zellen über Apoptose günstig, doch in Zellkultur-Studien fand sich eine Resistenz dieser Zellen gegenüber Apoptose und diese setzen stattdessen entzündungsfördernde Botenstoffe frei (seneszenz-assoziiierter sekretorischer Phänotyp, SASP) (Salminen et al., 2010; Sikora et al., 2010) (siehe Abbildung 1). Eine weitere altersbedingte Veränderung, welche in Studien mit Mäusen beobachtet werden konnte, ist die erhöhte Anfälligkeit der Leber für Fibrose. Diese wird durch die Aktivierung von Immunzellen und erhöhte Spiegel proinflammatorischer Zytokine begünstigt. Gleichzeitig sinkt in Makrophagen die Anzahl von Phagophoren und Autophagosomen, was die Autophagie reduziert. Der Rückgang dieser Prozesse fördert nicht nur die Fibrose, sondern erschwert auch den Abbau geschädigter Zellbestandteile, was die Entzündungsneigung zusätzlich verstärkt (Mahrouf-Yorgov et al., 2011; Ilyas et al., 2015).

Auch morphologische und funktionelle Veränderungen treten im Alter auf. So schrumpft die Lebergröße mit zunehmendem Alter um etwa 20–40 %, wobei Frauen stärker betroffen sind als Männer (Durand et al., 2018). Außerdem verdickt sich die Wand der Leberarterie, die Fenestrierung der Endothelzellen nimmt ab, und sowohl der hepatische Blutfluss als auch die von Hepatozyten gebildete Menge an Gallensäuren verringern sich (siehe Abbildung 1) (Wang et al., 2023; Kim et al., 2015; Schmucker, 2005).

Auch der Stoffwechsel verändert sich im Alter: die hepatische Fähigkeit zur Gluconeogenese sinkt, gleichzeitig lagern sich vermehrt Lipide ein, wodurch es in der alternden Leber häufig zu einer Steatose kommt (Cook et al., 2003; Petersen et al., 2003; Slawik & Vidal-Puig, 2006).

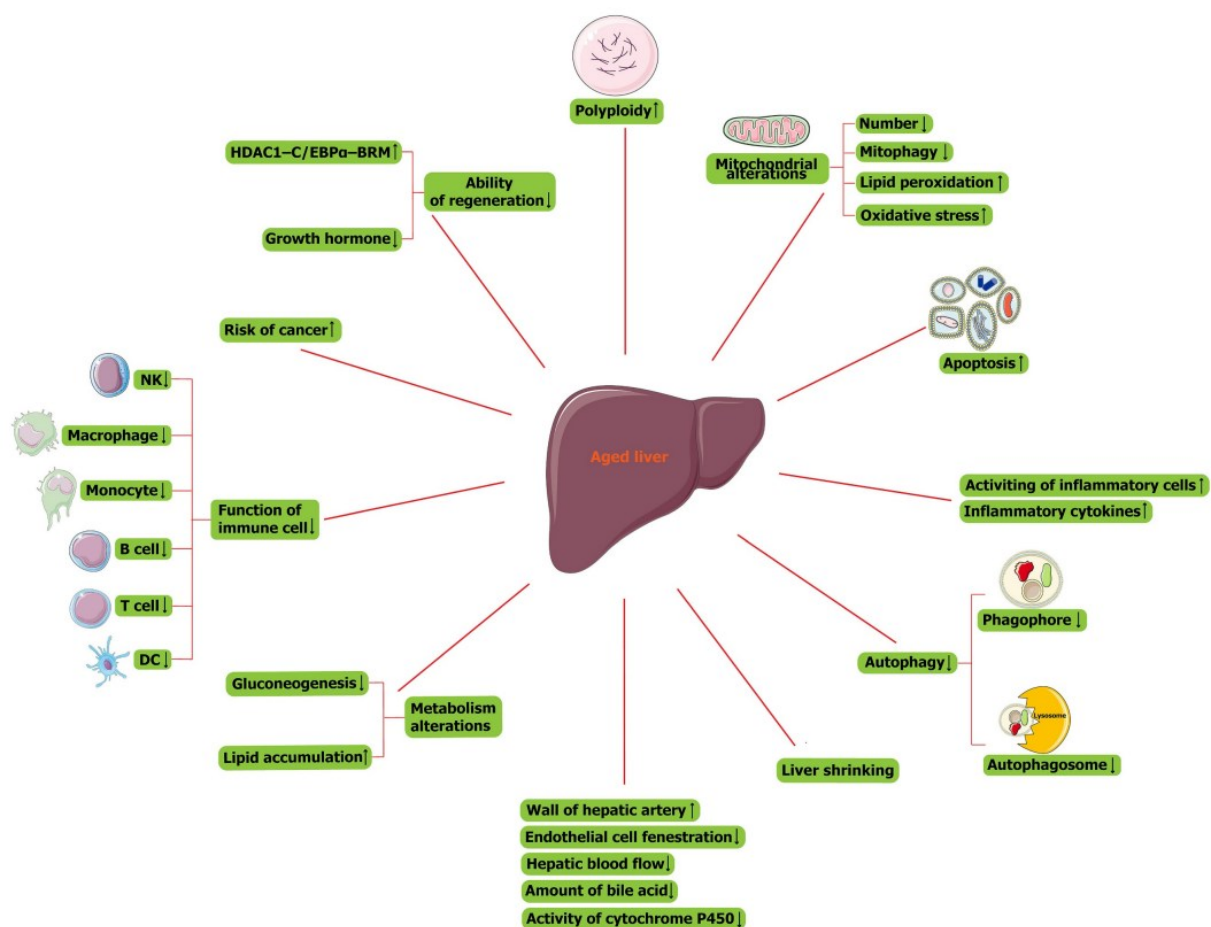


Abbildung 1: Folgen des Alterns auf die Leber.

Natürliche Killerzelle (NK-Zelle); dendritische Zelle (DC-Zelle); Histon-Deacetylase 1 (HDAC1); CCAAT/Enhancer-bindendes Protein (C/EBP) α (C/EBPα); SWI/SNF-verwandter, matrixassoziiertes, aktinabhängiger Regulator des Chromatins, Unterfamilie a, Mitglied 2 (BRM) (Wang et al., 2023).

1.2 Der Toll like Rezeptor 9 (Tlr9) Signalweg: Charakterisierung, Expression und Funktion von TLR9

Das Immunsystem hat eine Reihe von Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptors, PRRs) entwickelt, um zwischen körpereigenen und körperfremden Antigenen zu unterscheiden, Krankheitserreger zu erkennen und die Immunantwort des Wirts einzuleiten (Janeway & Medzhitov, 2002). Toll-like-Rezeptoren (Tlrs) übernehmen dabei genau diese Aufgabe und gelten als zentrale Rezeptoren sowohl der angeborenen als auch der adaptiven Immunität (Janeway & Medzhitov, 2002). Ursprünglich wurde der Rezeptor Toll in *Drosophila* (Fruchtfliege) entdeckt, wo er eine Rolle bei der Ausbildung der dorso-ventralen Polarität spielt (Hashimoto et al., 1998). Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass er wesentlich an der Immunabwehr beteiligt ist, denn Fliegen, denen dieses Protein fehlte, waren besonders anfällig für Infektionen mit dem Pilz *Aspergillus fumigatus* (Lemaitre et al., 1996). Beim Menschen wurden bisher zehn Mitglieder (Tlr1–Tlr10) und bei Mäusen 13 Mitglieder (Tlr1–Tlr13) der Tlr-Familie beschrieben (Eaton-Bassiri et al., 2004; Fitzgerald & Kagan, 2020).

Bei Säugetieren werden Tlrs im endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und anschließend zu ihren Zielorten innerhalb der Zelle transportiert. Diese Zielorte sind entweder die Plasmamembran (extrazelluläre Tlrs) oder die endosomale Membran (intrazelluläre Tlrs) (Randow & Seed, 2001; Tabeta et al., 2006; Takahashi et al., 2007). Plasmamembranständige Tlrs (Tlr1, 2, 4 und 5) benötigen keine speziellen Transportfaktoren, sondern gelangen über den klassischen sekretorischen Weg an ihren Zielort (Fitzgerald & Kagan, 2020).

Im Gegensatz dazu müssen endosomale Tlrs einen komplexeren Transportweg durchlaufen. Sie benötigen den speziellen Chaperon-Transporter Unc93B1, der im ER an die Tlrs bindet und deren Faltung unterstützt. Nach der Faltung bleibt Unc93B1 gebunden und stabilisiert die Tlrs (Kim et al., 2008; Pelka et al., 2018). Unc93B1 vermittelt zudem die Aufnahme der Tlrs in COPII-umhüllte Vesikel, die sich vom Übergangs-ER abschnüren (Lee et al., 2013). Anschließend durchlaufen Unc93B1 und die gebundenen Tlrs den Golgi-Apparat. Je nach Tlr unterscheidet sich der weitere Transport: Tlr9 wird zunächst zur Plasmamembran transportiert, wo eine AP-2-Bindungsstelle in Unc93B1 die Endozytose fördert und damit Tlr9 zusammen mit Unc93B1 in das endosomale Netzwerk einschleust (Lee et al., 2013). Dort muss Tlr9 schließlich von Unc93B1 freigesetzt werden, um CpG-DNA binden und die nachgeschaltete Signalweiterleitung auslösen zu können (Majer et al., 2019).

Die Expression von Tlr9-messenger Ribonukleinsäure (mRNA) und -Protein ist zelltypspezifisch und beschränkt sich nach derzeitigem Stand auf bestimmte Immunzellen. Dazu gehören B-Zellen, plasmacytoide dendritische Zellen (pDCs) sowie Zellen der Monozyten-/Makrophagen-

Linie, die alle eine wichtige Rolle bei der Erkennung von Pathogenen spielen (Bauer et al., 2001; Hemmi et al., 2000; Kadowaki et al., 2001; Krieg et al., 1995; Krug et al., 2001). Tlr9 erkennt unmethylierte CpG-Motive in bakterieller, viraler und parasitärer DNA (McKelvey et al., 2011; Marongiu et al., 2019) (siehe Abbildung 2) sowie mitochondriale DNA (mtDNA), die bei Schädigung der Mitochondrien freigesetzt wird (Tan, 2024).

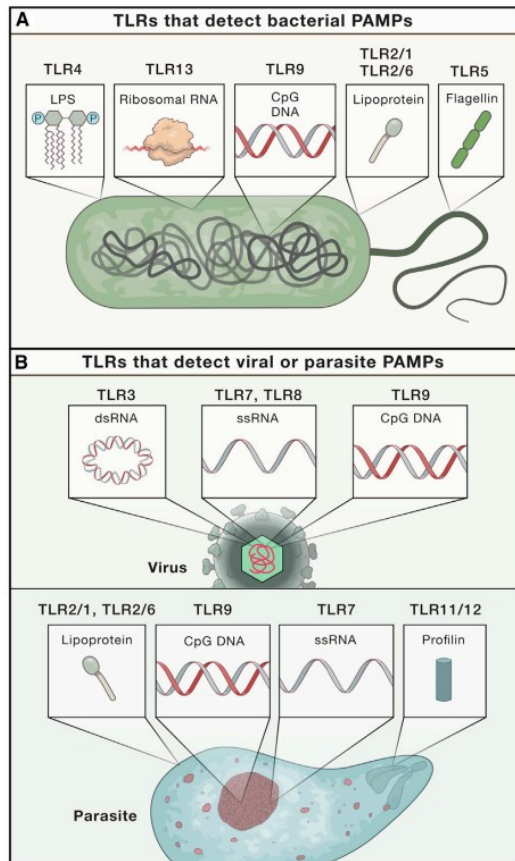


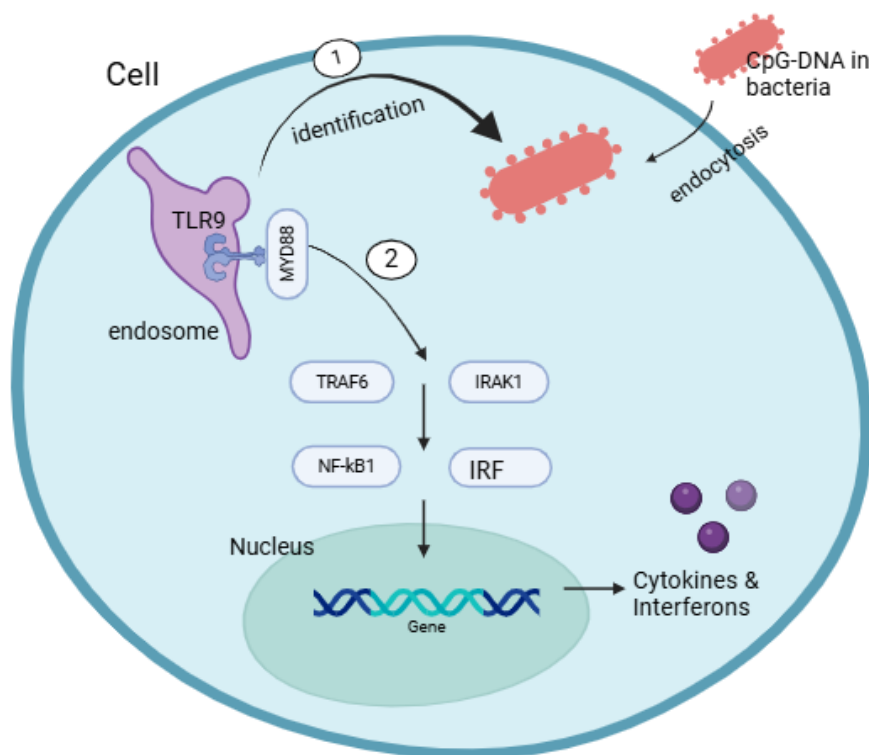
Abbildung 2: Mitglieder der Toll like Rezeptoren (Tlr) -Familie erkennen unterschiedliche pathogenassoziierte molekulare Muster (PAMPs) auf einzelnen Mikroorganismen.

(A) Tlrs, die bakterielle PAMPs erkennen: Tlr4 erkennt Lipopolysaccharide (LPS). Tlr13 erkennt ribosomale RNA. Tlr9 erkennt Cytosin-Phosphat-Guanin-DNA (CpG-DNA). Tlr2/1 und Tlr2/6 erkennen Lipoproteine. Tlr5 erkennt Flagellin. (B) Tlrs, die virale oder parasitäre PAMPs erkennen. Viren: Tlr3 erkennt doppelsträngige RNA (dsRNA). Tlr7 und Tlr8 erkennen einzelsträngige RNA (ssRNA). Tlr9 erkennt CpG-DNA. Parasiten: Tlr2/1 und Tlr2/6 erkennen Lipoproteine. Tlr9 erkennt CpG-DNA. Tlr7 erkennt ssRNA und Tlr11/12 erkennen Profilin. Die angegebenen TLR-Bezeichnungen stammen aus Mausmodellen, da es für jede dieser TLR-PAMP-Interaktionen genetische Nachweise ihrer Bedeutung gibt (Fitzgerald & Kagan, 2020).

Tlr9 gehört zu den intrazellulären Tlrs und befindet sich vor allem in den Endosomen. Die intrazelluläre Lokalisierung von Tlr9 in den Endosomen ist wichtig, da körpereigene DNA dort normalerweise nicht vorkommt und so Autoimmunreaktionen sowie unangemessene Immunantworten vermieden werden. Nach derzeitigem Stand gelangt CpG, der Ligand von Tlr9,

durch clathrinvermittelte Endozytose in die Zelle (Barton et al., 2005; Latz et al., 2004). Nach der Erkennung seines Liganden in den Endosomen wird Tlr9 proteolytisch gespalten und aktiviert dadurch zwei mögliche Signalwege. In beiden Fällen wird zunächst der myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) -abhängige Signalweg genutzt. Anschließend wird entweder:

- 1) Der Interferon Regulatory Factor (IRF) aktiviert, was zur Produktion von Typ-I-Interferonen (IFN- α , IFN- β) führt, oder
- 2) Der Nukleärer Faktor kappa B (NF- κ B) aktiviert, was die Produktion proinflammatorischer Zytokine (z. B. Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)) induziert (siehe Abbildung 3) (Marongiu et al., 2019).



Created in BioRender.com 

Abbildung 3: Schematische Darstellung des Tlr9 Signalwegs.

Bakterielle CpG-DNA gelangt durch endozytose in die Zelle. Der im Endosomen sitzende Toll like Rezeptor 9 (Tlr9) erkennt die CpG-DNA und bindet daran. Dadurch wird das Adapterprotein Myeloid differentiation primary response 88 (Myd88) rekrutiert. Myd88 aktiviert eine Signalkaskade mit TNF Receptor-Associated Factor 6 (TRAF6) und Interleukin 1 Receptor-Associated Kinase 1 (IRAK1). Dies führt zur Aktivierung von Nuclear Factor kappa B (NF- κ B) und Interferon-Regulationsfaktoren (IRF). NF- κ B und IRFs wandern in den Zellkern und aktivieren dort bestimmte Gene, was wiederum zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und Interferonen führt. Durch die Freisetzung wird das Immunsystem aktiviert, um Infektionen zu bekämpfen. Die Abbildung wurde basierend auf (Marongiu et al., 2019) mit BioRender.com erstellt.

In Studien mit Zellen von Tlr9-defizienten Mäusen zeigten diese weder Proliferation noch Zytokinsekretion als Reaktion auf die Stimulation mit CpG. *In vivo*-Studien bestätigten zudem, dass diese Mäuse resistent gegenüber einem CpG-induziertem Schock waren (Hemmi et al., 2000). Diese Daten stärken erneut die zentrale Rolle von Tlr9 bei der Immunantwort auf bakterielle Infektionen (Eaton-Bassiri et al., 2004).

MtDNA wirkt proinflammatorisch und wird unter Stressbedingungen wie oxidativem Stress oder Nährstoffmangel von den Mitochondrien freigesetzt (Dudek, 2017; Khwaja et al., 2021; Newman & Shadel, 2023). Da sie ursprünglich aus Bakterien stammt, besitzt mtDNA noch immer Eigenschaften bakterieller DNA, darunter eine zirkuläre Struktur und weniger methylierten CpG-Stellen. Dass mtDNA ein Ziel der Immunität der Wirtszelle ist, zeigt sich daran, dass sie nach ihrem Austritt aus den Mitochondrien ins Zytosol von DNA-Erkennungsrezeptoren wie Tlr9 als PAMPs oder Schadens-assoziierte molekulare Muster (DAMPs) erkannt wird und dadurch Immunreaktionen oder Entzündungsprozesse auslöst (Zanini et al., 2023). Somit spielt Tlr9 ebenfalls eine zentrale Rolle bei der starken Schädigung von Mitochondrien.

1.3 Altern und der TLR9

In den letzten Jahren haben sich zahlreiche Daten angesammelt, die darauf hindeuten, dass Veränderungen des intestinalen Mikrobioms und der Barrierefunktion an der Entwicklung metabolischer Lebererkrankungen wie der alkoholischen und nichtalkoholischen Lebererkrankung beteiligt sind (Henao-Mejia et al., 2013; Kirpich et al., 2015). Zudem legen diese Befunde nahe, dass diese Veränderungen auch einen Einfluss auf die geringgradige Entzündung haben könnten, die typischerweise im Kontext des Alterns auftritt (Cevenini et al., 2012; Franceschi et al., 2006). Die intestinale Schleimschicht bildet zusammen mit einer stabilen Mikrobiota die erste Verteidigungslinie gegen äußere Schädigungen (Turner, 2009; Vancamelbeke & Vermeire, 2017). Sie reguliert die Aufnahme und Verdauung von Nahrungsnährstoffen und spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung des Immunsystems (Kamada et al., 2013; Takiishi et al., 2017).

Der Einfluss von Veränderungen des intestinalen Mikrobioms auf die im Alter auftretende geringgradige Entzündung lässt sich exemplarisch anhand der bereits vorhandenen Literatur zu Tlr4 verdeutlichen. Durch eine erhöhte intestinale Permeabilität gelangen vermehrt bakterielle Toxine, wie beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS; Tlr4-Ligand) aus der Zellwand gramnegativer Bakterien, in den Blutkreislauf. Der Körper reagiert darauf mit einer verstärkten Expression von Lipopolysaccharid-bindendem Protein (LBP) (Baumann et al., 2021). Studien weisen darauf hin, dass dieses Protein LPS bindet und die Immunantwort einleitet. Infolge des erhöhten Vorkommens des Tlr4-Liganden, kommt es zur einer Hochregulation von Tlr4 selbst und dadurch

zu einer verstärkten Aktivierung von Immun- und Entzündungsprozessen (Brandt et al., 2022; Jin et al., 2020), darunter die Synthese verschiedener inflammatorischer Zytokine (Khan et al., 2010). Jin et al. (2020) konnten zudem zeigen, dass die Deletion von LBP mit einer Abnahme von Seneszenz- und Entzündungsmarkern in der Leber einhergeht. Dies stützt die Hypothese, dass bakterielle Endotoxine maßgeblich zur altersbedingten Verschlechterung der Leberfunktion beitragen könnten.

Über Tlr4 hinaus weisen jedoch weitere Arbeiten darauf hin, dass im Alter mehrere Tlrs verstärkt exprimiert werden. Baumann et al. (2021) konnten im Zusammenhang mit Veränderungen in der Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms sowie einer Beeinträchtigung der intestinalen Barrierefunktion und der daraus resultierenden verstärkten Translokation bakterieller Toxine bereits eine Hochregulation der Expression verschiedener Tlrs im Alter nachweisen. Zu den Tlrs, die im Alter signifikant vermehrt exprimiert werden, gehören Tlr1, Tlr2, Tlr4, Tlr6 und Tlr9 (Baumann et al., 2021). Zudem wurde eine altersassoziierte Erhöhung des Tlr-abhängigen Signalproteins Myd88 im Lebergewebe festgestellt (Baumann et al., 2021; Jin et al., 2020).

Für Tlr9 konnte ebenfalls eine signifikante altersassoziierte Zunahme seines Liganden, der CpG-DNA bei gesund gealterten Menschen und Mäusen, nachgewiesen werden (unpublizierte Daten, Arbeitsgruppe Bergheim).

Die Bindung von Tlr9 an mtDNA könnte ebenfalls zur mitochondrialen Dysfunktion und letztlich zur Alterung beitragen. Es gibt Hinweise darauf, dass Tlr9 in die Mitochondrien transloziert werden kann, wo es die mtDNA als PAMP oder DAMP erkennt und dadurch Immun- bzw. Entzündungsreaktionen auslöst. Dabei greift Tlr9 die exponierte Sekundärstruktur der mtDNA während ihres Replikationsprozesses an und bindet spezifisch an diese Strukturen, um sie zu stabilisieren (Tan, 2024). Dadurch wird die Polymerase- γ -Aktivität unterbrochen, was zur mtDNA-Deletion und mitochondrialer Dysfunktion führt. Nach dieser Theorie würde eine Reduzierung der intramitochondrialen Pathogen-DNA-Erkennungsrezeptoren wie Tlr9 die mtDNA-Deletion begrenzen und somit die mitochondriale Dysfunktion, die zu den bekannten „Hallmarks of Aging“ zählt, verzögern (Tan, 2024). Ob der im Alter möglicherweise erhöhte Gehalt an CpG- und mtDNA sowie die dadurch gesteigerte Aktivität von Tlr9 mitverantwortlich für die altersbedingte Verschlechterung der Leberfunktion ist, ist bisher weitgehend ungeklärt.

1.4 Fragestellung

Die Lebenserwartung der Menschen steigt weltweit kontinuierlich an (Dattani et al., 2023). Allerdings wächst die Zeitspanne, die in guter Gesundheit verbracht wird (HALE), nicht im gleichen Maße, sodass die Dauer der krankheitsbelasteten Lebensjahre zunimmt (Global Burden of Disease Study, 2020). Auch ohne das Vorliegen offensichtlicher Infektionen gilt Altern als ein Zustand geringgradiger Entzündung (Franceschi & Campisi, 2014), wobei die damit verbundenen Prozesse als „Hallmarks of Aging“ bezeichnet werden (López-Otín et al., 2023).

Selbst das sogenannte „gesunde“ Altern ist mit einem fortschreitenden Funktionsverlust der Organe, einschließlich der Leber, verbunden (López-Otín et al., 2013; Jin et al., 2020). Tierexperimentelle Studien haben gezeigt, dass die genetische Deletion des LBP mit einer Abnahme von Seneszenz- und Entzündungsmarkern in der Leber einhergeht (Jin et al., 2020). Darüber hinaus wird Tlr9 als möglicher Schlüsselfaktor bei der Entstehung mitochondrialer Dysfunktionen diskutiert (Tan, 2024).

Ob eine genetische Deletion von Tlr9 zu einer reduzierten Immunantwort in der Leber führt und damit den durch ein verändertes intestinales Mikrobiom und eine gestörte Barrierefunktion (Cevenini et al., 2012; Franceschi et al., 2006) erhöhten Gehalt an CpG-DNA und der damit assoziierten Immunantwort, sowie die vermehrte Produktion proinflammatorischer Zytokine und Interferone entgegenwirkt, ist bisher ungeklärt (Jin et al., 2020).

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Masterarbeit folgende Hypothese und zentrale Frage bearbeitet.

Hypothese

Die genetische Deletion von Tlr9 schützt Mäuse vor der altersassoziierten Leberdegeneration.

Zentrale Fragestellung:

Ist TLR9 ein kritischer Faktor in der Altersdegeneration der Leber?

Folgende Unterfragen werden adressiert:

- 1) Wie unterscheidet oder verändert sich die Expression von Tlr9 und dessen Liganden im natürlichen Verlauf des Alterns?
- 2) Wie unterscheiden sich Tlr9-Knockout Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen histologisch im Alter? Zeigen Tlr9-Knockout Mäuse dabei einen protektiven Effekt gegenüber altersassoziierten Gewebeveränderungen, besonders in der Leber?

2 Materialien

2.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Geräte

96-Well Platten	BRANDplates, BRAND GmbH & Co. KG., Wertheim, Deutschland
Aluminiumblock	Laborbestand
Aluminiumfolie	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
ddH ₂ O	Laborbestand
Falcon-Tubes (15 mL, 50 mL)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Feinwaage	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Flockeneisbereiter EF 103	Scotsman Industries Inc., Vernon Hills, USA
Flüssigstickstoff	Air Liquide Austria GmbH, Schwechat, Österreich
Flüssigstickstoffbehälter	KGW-Isotherm Karlsruher Glastechnisches Werk Schieder GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Laborhandschuhe – Semperguard®	Sempermed USA, Inc. Clearwater, USA
Laborstift	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Labortücher – Kimtech	Kimberly-Clark GmbH, Koblenz, Deutschland
Magnetrührer – PCE-MSR 100	PCE Deutschland GmbH, Meschede, Deutschland
Magnetstäbchen ROTILABO®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mehrkanalpipette Research Plus® (100 µL, 300 µL)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Messzylinder (1L)	Laborbestand
Microplate Reader SpectraMax M3	Molecular Devices GmbH, San Jose, USA
Mikroreaktionsgefäße (0,5 mL; 1,5 mL; 2 mL)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland

Mixing Block MB – 102	Hangzhou Bioer Technology Co., Hangzhou, China
pH-Meter 420 A	Orion Research Inc., Jacksonville, USA
Pinzetten	Laborbestand
Pipettenspitzen (10 µL, 200 µL, 1000 µL)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pufferwanne Kunststoff	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Reaktionsgefäßständer - ROTILABO®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Research Plus® Pipetten (2µL, 10µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Schere	Laborbestand
Serologische Pipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Stoppuhr	Laborbestand
Styroporboxen	Laborbestand
TipOne Filterspitzen	STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland
Ultraschallhomogenisator	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Vortex REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Wasserbad	Köttermann GmbH, Uetze, Deutschland
Wiegeschalen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge Z216 MK	HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland

2.2 Histologische und Immunhistochemische Färbungen

Chemikalien/Lösungen

Albumin Fraktion V (BSA) ≥98%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
-------------------------------	---

Dako Anti Rabbit HRP Polymer	DAKO AG, Wiesentheid, Deutschland
Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System	DAKO AG, Wiesentheid, Deutschland
Dako REAL Peroxidase Blocking Solution	DAKO AG, Wiesentheid, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) $\geq 95\%$, wasserfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Entellan®	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (100%, 95%, 70%, 30%)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Hämatoxylin Lösung, Gill No.2	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl) $\geq 99,5\%$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4) $\geq 99\%$, wasserfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl) $\geq 99,9\%$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti Histol ($\text{C}_{10}\text{H}_{18}$)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween® 20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Verbrauchsmaterialien und Geräte

Deckgläschen	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Digital Orbital Shaker	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Färbeetrog Kunststoff weiß	Sanova Pharma GmbH, Wien, Österreich
Färbegestell Glas	Sanova Pharma GmbH, Wien, Österreich
Färbeschale - Staintray™	Simport Scientific Inc. Quebec, Kanada
Färbetrog Glas	Sanova Pharma GmbH, Wien, Österreich

Fettstift – Super HAT PAP Pen	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glasstab	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikrowelle	
Objektträgerhalter Kunststoff blau	Sanova Pharma GmbH, Wien, Österreich

2.3 Sirius Red Färbung

Chemikalien/Lösungen

Direct Red 80	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Fast Green FCF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Pikrinsäure-Lösung (gesättigt, 1,3% in H ₂ O)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

2.4 Ly6G Färbung

Chemikalien/Lösungen

Anti-Ly6G Antikörper	Abcam Limited, Cambridge, United Kingdom
Tris-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Laborbestand

2.5 Cleaved Caspase 3 Färbung

Chemikalien/Lösungen

10mM Mono-Natriumcitrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1E) #9664	Cell Signaling Technology Europe B.V., Leiden, Niederlande

2.6 Triglycerid-Extraktion + Proteinbestimmung nach Bradford

Chemikalien/Lösungen

Albumin Fraktion V (BSA) $\geq 98\%$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) $\geq 95\%$, wasserfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl) $\geq 99,5\%$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4) $\geq 99\%$, wasserfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Methanol (CH_4O) $\geq 99,9\%$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl) $\geq 99,9\%$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trichlormethan/Chloroform (CHCl_3) $\geq 99,5\%$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TRIGS – Triglycerid Kit (TR210)	Randox Laboratories limited, Crumlin, United Kingdom
Bradford	
Albumin Fraktion V (BSA) $\geq 98\%$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Protein Assay Dye (Reagent Concentration)	BIO-RAD Laboratories Inc., Hercules, USA

Verbrauchsmaterialien und Geräte

Concentrator plus (Vakuumzentrifuge)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Ultraschallbad Sonorex Digitec	Bandelin electronic GmbH, Berlin, Deutschland

2.7 cDNA-Synthese

Chemikalien/Lösungen

Reverse Transcription System	Promega Corporation, Madison, USA
RQ1 DNase Stop Solution	Promega Corporation, Madison, USA
RQ1 RNase-Free DNase	Promega Corporation, Madison, USA
RQ1 RNase-free DNase 10x Reaction Buffer	Promega Corporation, Madison, USA
Wasser – BioScience Grade, DEPC-behandelt, steril, Nuklease-frei, autoklaviert	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Verbrauchsmaterialien und Geräte

DLAB D1008 Palm Micro Centrifuge	DLAB Scientific Co., Ltd., Beijing, China
Multiply®-µStrip Pro 8er Kette	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Thermocycler LifeECO	Bioer Technology Co., Ltd., Zhejiang, China
UV-STAR® Microplatten	Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich

2.8 Real-time qPCR

Chemikalien/Lösungen

iTaq™ Universal SYBR® Green	BIO-RAD Laboratories Inc., Hercules, USA
Nuklease-freies Wasser	Promega Cooperation, Madison, USA
Primer forward (18S, TGFβ1, BAD, α-SMA, col1a1)	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland
Primer reverse (18S, TGFβ1, BAD, α-SMA, col1a1)	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland

Verbrauchsmaterialien und Geräte

CFX Connect™ Real-time system	BIO-RAD Laboratories Inc., Hercules, USA
Microseal B PCR Plate Sealing Film	BIO-RAD Laboratories Inc., Hercules, USA
PCR Platte 96 well	BIO-RAD Laboratories Inc., Hercules, USA
Zentrifuge Z 446 K	HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland

2.9 ELISA (IL1 β und PAI1)

Chemikalien/Lösungen

Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat Na ₂ HPO ₄	R&D Systems, Inc., Minneapolis, Kanada
DuoSet Mouse IL-1 β / IL-1F2	R&D Systems, Inc., Minneapolis, Kanada
DuoSet Mouse Serpin E1/PAI-1	R&D Systems, Inc., Minneapolis, Kanada
IL-1 β Standard	R&D Systems, Inc., Minneapolis, Kanada
Kaliumchlorid KCl	R&D Systems, Inc., Minneapolis, Kanada
Kaliumdihydrogenphosphat KH ₂ PO ₄	R&D Systems, Inc., Minneapolis, Kanada
Natriumchlorid NaCl	R&D Systems, Inc., Minneapolis, Kanada
PAI-1 Standard	R&D Systems, Inc., Minneapolis, Kanada
Protease- und Phosphatase Inhibitoren	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Schwefelsäure 2N H ₂ SO ₄	Laborbestand
Substrate Reagent Pack	R&D Systems, Inc., Minneapolis, Kanada
Tween® 20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Verbrauchsmaterialien und Geräte

Eisblock	Laborbestand
ELISA Clear Microplate	R&D Systems, Inc., Minneapolis, Kanada
Heratherm Incubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Mikro-Schraubröhre 2 mL	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Precellys 24 Touch Homogenizer	Bertin Technologies SAS, Montigny le Bretonneux, Frankreich
Sealplate	Excel Scientific, Victorville, USA
Zirkonoxidperlen	BioCat GmbH, Heidelberg Deutschland

2.10 Software zur Ergebnisauswertung

BioRender.com	BioRender, Toronto, Kanada
CFX Manager™ Software Version 3.1	BIO-RAD Laboratories Inc., Hercules , USA
Graphpad Prism 10	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
LAS V4.5	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
LAS X	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Microsoft Office 365 Excel	Microsoft Corporation, Redmond, USA

3 Methodik

3.1 Versuchsdesign

Die für diese Arbeit verwendeten Gewebeproben stammen aus einem Tierexperiment, das bereits vor Beginn der Masterarbeit durchgeführt wurde. Der Versuch wurde vom österreichischen Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft und Forschung (BMBWF) genehmigt (2021-0.464.120). Nachfolgend ist das Versuchsdurchführungskonzept kurz zusammengefasst:

Insgesamt wurden 35 Mäuse unter standardisierten Bedingungen (12-Stunden Hell-Dunkel-Zyklus, Raumtemperatur 23–24 °C, relative Luftfeuchtigkeit ~55 %) in einer spezifisch pathogenfreien (SPF) Tierhaltung der Universität Wien gezüchtet und gehalten. Dabei handelte es sich um 18 männliche C57BL/6J-Wildtypmäuse (BL6) und 17 männliche Tlr9-defiziente Mäuse (C57BL/6J-Tlr9M7Btlr/Mmjax). Die Tiere wurden vor und während des Versuchszeitraums mit Standard-Pelletfutter und Wasser ad libitum versorgt und sind ohne weitere Intervention gesund gealtert (siehe Abbildung 4).

Jeweils acht Mäuse beider Gruppen wurden im Alter von 4 Monaten und jeweils neun bis zehn Mäuse beider Gruppen im Alter von 20 Monaten mit einer terminalen Narkose aus 100 Milligramm/Kilogramm (mg/kg) Körpergewicht Ketamin und 16 mg/kg Körpergewicht Xylazin tief anästhesiert und mittels zervikaler Dislokation getötet. Im Anschluss wurde Blut aus der Pfortader und Gewebe entnommen. Das entnommene Lebergewebe wurde entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert oder in 4 % formaldehydhaltiger, phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) fixiert.

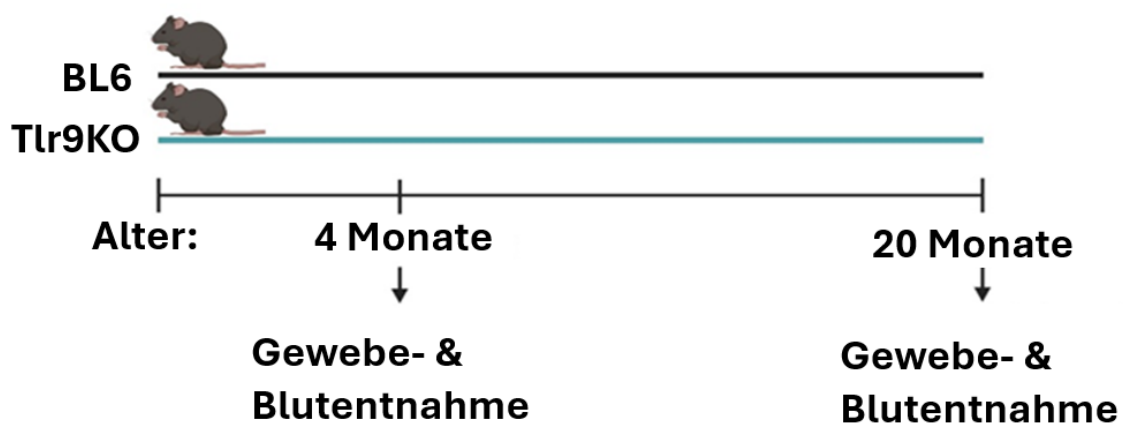


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Studiendesigns.

Dargestellt sind die Zeitpunkte der Gewebe- und Blutentnahme der C57BL/6J-Wildtypmäuse und der Mäuse mit einer genetischen Deletion von Tlr9.

3.2 Histologische Gewebepräparation und Paraffineinbettung

Die entnommenen Lebergewebeproben wurden von einer Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe Bergheim in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden 4 Mikrometer (μm) dünne Gewebeschnitte mithilfe eines Mikrotoms angefertigt, auf Objektträger aufgezogen und nachfolgend für 3 Tage bei 37°C an der Luft getrocknet. Nachfolgend fand eine Hämatoxylin- und Eosin-Färbung der Leberschnitte statt, um die Gewebemorphologie sowie die zellulären Strukturen der verschiedenen Versuchsgruppen histologisch darzustellen.

3.3 Histologische Sirius Red Färbung der Leber

Zur histologischen Darstellung fibrotischer Veränderungen der Leber wurde die Sirius-Red-Färbung angewandt. Sirius Red bindet dabei über ionische und hydrophobe Wechselwirkungen spezifisch an Kollagenfasern. Fast Green diente als Kontrastfarbstoff, um nicht-kollagenes Gewebe sichtbar zu machen (Segnani et al., 2015). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Färbung am Lebergewebe der Mäuse durchgeführt.

Die 4 μm dicken Leberschnitte der Mäuse wurden in mehreren Durchgängen gefärbt, wobei stets Schnitte aus allen vier Versuchsgruppen gemeinsam gefärbt wurden. Zu Beginn erfolgte die Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte durch schrittweises Eintauchen in unterschiedlichen Lösungen bei 90 Umdrehungen pro Minute (rpm) auf einem Orbitalschüttler (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Entparaffinierung und Rehydrierung bei der Sirius Red Färbung

Inkubationszeit	Lösung
20 min	Roti-Histol
2 min	100% Ethanol
2 min	96% Ethanol
2 min	70% Ethanol
2 min	30% Ethanol

Anschließend wurden jeweils 200 Mikroliter (μL) Sirius-Red-Lösung auf die Gewebeschnitte pipettiert und diese für 30 Minuten (min) in einer mit etwas destilliertem Wasser befüllten Färbekassette inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die überschüssige Farbe abgeklopft und die Schnitte unter leicht fließendem Leitungswasser für 4 min gespült.

Zur Gegenfärbung wurde 200 µL Fast Green aufgetragen und die Schnitte für 15 Sekunden (sec) inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion gestoppt und die Schnitte wurden schrittweise durch kurzes Eintauchen in verschiedene Lösungen dehydriert (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Dehydrierung bei der Sirius Red Färbung

Inkubationszeit	Lösung
2-3 s	Leitungswasser 1
2-3 s	Leitungswasser 2
2-3 s	30% Ethanol
2-3 s	70% Ethanol
2-3 s	96% Ethanol
2-3 s	100% Ethanol
10 min	Roti-Histol

Die gefärbten Schnitte wurden anschließend mit Entellan eingedeckt, mit einem Deckgläschen versehen und über Nacht an der Luft trocknen gelassen.

Die Auswertung der Sirius-Red-Färbung erfolgte bei einer 200-fachen Vergrößerung unter einem Lichtmikroskop. Pro Schnitt wurden acht repräsentative Aufnahmen angefertigt, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Bereiche doppelt erfasst wurden und keine größeren Gefäße im Bildausschnitt enthalten waren, da in deren Umgebung physiologischerweise Fibrose vorkommt. Die aufgenommenen Bilder wurden anschließend mittels der Software LAS V4.5 analysiert, wobei die rot gefärbten Areale densitometrisch bestimmt wurden.

3.4 Immunhistochemische Ly6G- und Cleaved Caspase 3 Färbung der Leber

Zur Detektion neutrophiler Granulozyten, als Hinweis auf Entzündungs- und Abwehrreaktionen, wurde eine Ly6G-Färbung am Lebergewebe der Mäuse durchgeführt (Wang et al., 2012). Der hierfür eingesetzte Primärantikörper bindet spezifisch an das Oberflächenprotein Ly6G, das charakteristisch für neutrophile Granulozyten ist, und macht diese somit histologisch sichtbar.

Die Leberschnitte wurden in mehreren Durchgängen gefärbt, wobei in jedem Durchgang jeweils Schnitte aus allen vier Versuchsgruppen enthalten waren. Zu Beginn erfolgte die Entparaffinierung und Rehydrierung der 4 µm dicken Schnitte durch schrittweises Eintauchen in verschiedenen Lösungen (90 rpm) auf einem Orbitalschüttler (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Entparaffinierung und Rehydrierung bei der Ly6G- und Cleaved Caspase 3 Färbung

Inkubationszeit	Lösung
20 min	Roti-Histol
5 min	100% Ethanol
5 min	96% Ethanol
5 min	70% Ethanol
2 x 5 min	Destilliertes Wasser (d H ₂ O)

Die Schnitte wurden zunächst in Tris(hydroxymethyl)aminomethan Ethylendiamintetraessigsäure (Tris-EDTA) -Puffer überführt und in der Mikrowelle bis zum Aufkochen der Lösung (ca. 2 min) erhitzt, um Protein-Quervernetzungen aufzubrechen und Antigen-Bindestellen freizulegen. Nach 20 min Abkühlung folgte ein 10-minütiges Spülen in destilliertem Wasser (90 rpm). Um den Verbrauch der Lösungen zu minimieren, wurden die Schnitte mit einem Fettstift umrandet und anschließend 10 min in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBST) gewaschen (90 rpm).

Zur Blockierung wurden 150 µL Peroxidase Block (DAKO) für 15 min aufgetragen, danach erneut 10 min in PBST gewaschen und für 1 h mit 150 µL PBA (PBS mit 1 % Bovines Serumalbumin (BSA)) blockiert. Der Primärantikörper Ly6G (1:2000 in PBA) wurde für 1,5 Stunden (h) bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBST (10 min) erfolgte eine 20-minütige Inkubation mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (anti-rabbit, DAKO), gefolgt von einem weiteren 10-minütigen PBST-Waschgang.

Zur Visualisierung der Ly6G-positiven Zellen wurde 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) -Substratlösung (1 Tropfen Chromogen/1 mL Substrat) aufgetragen und je nach Färbeintensität bis zur sichtbaren Braunfärbung inkubiert; die Reaktion wurde durch Spülen in destilliertem Wasser gestoppt. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Gegenfärbung mit Hämatoxylin bei der Ly6G- und Cleaved Caspase 3 Färbung

Inkubationszeit	Lösung
20 sec	Hämatoxylin Lösung
20 sec	Leitungswasser I
20 sec	Leitungswasser II
10 sec	d H ₂ O

Zur Dehydrierung wurden die Schnitte schrittweise in verschiedenen Alkohollösungen und abschließend in Roti-Histol eingetaucht (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Dehydrierung bei der Ly6G- und Cleaved Caspase 3 Färbung

Inkubationszeit	Lösung
10 sec	70% Ethanol
10 sec	96% Ethanol
10 sec	100% Ethanol
10 min	Roti-Histol

Die dehydrierten Schnitte wurden mit Entellan eingedeckt, mit Deckgläschen versehen und über Nacht getrocknet. Die Auswertung der Ly6G-Färbung erfolgte bei 200-facher Vergrößerung unter einem Lichtmikroskop. Pro Schnitt wurden acht repräsentative Aufnahmen angefertigt, ohne Überlappungen zu erfassen. Die Analyse erfolgte manuell durch Auszählen der Ly6G-positiven Zellen (braune Kernfärbung). Für die Statistik wurde der Mittelwert der pro Maus ermittelten Zellzahlen berechnet.

Die Cleaved Caspase-3-Färbung diente dem Nachweis apoptotischer Zellen im Lebergewebe. Der eingesetzte Primärantikörper erkennt selektiv die aktive, gespaltene Form der Caspase-3 (Kobayashi et al., 2007). Die Durchführung entsprach weitgehend der Ly6G-Färbung, mit folgenden Abweichungen:

1. Antigenretrieval: Statt Tris-EDTA wurden die Schnitte in Mono-Natriumcitrat-Puffer überführt und in der Mikrowelle erhitzt (2:20 min bei P80/800 W, 3 min Abkühlung; insgesamt dreimal, die letzten beiden Zyklen bei P50).
2. Primärantikörper: Cleaved Caspase-3 (Cell Signaling), 1:100 in PBA verdünnt, Inkubation über Nacht bei 4 °C in feuchter Färbekassette.
3. Sekundärantikörper: Anti-rabbit (DAKO), 30 min Inkubation.
4. Mikroskopische Auswertung: 200-fache Vergrößerung, acht repräsentative Aufnahmen ohne Überlappungen pro Schnitt, Analyse mit LAS V4.5, braun gefärbte apoptotische Areale wurden densitometrisch bestimmt.

Alle weiteren Schritte, einschließlich DAB-Entwicklung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Dehydrierung und Eindeckung, erfolgten analog zur Ly6G-Färbung.

3.5 Triglycerid Extraktion + Proteinbestimmung nach Bradford der Leber

Die Bestimmung der Triglyceridkonzentration im Lebergewebe erfolgte nach Folch et al. (1956). Dazu wurden 500 µL 2×PBS in 2 mL Eppendorfgefäße vorgelegt und auf Eis gestellt. Das auf Eis präparierte Lebergewebe wurde überführt und 30 sec homogenisiert. Anschließend wurden weitere 500 µL 2×PBS zugegeben und die Proben 10 sec vortexiert, um die Zellstrukturen aufzubrechen. Danach erfolgten zweimal 20 sec Ultraschallhomogenisierung und erneutes 10 sec vortexen. Aus dem Homogenisat wurden 500 µL für die Triglyceridextraktion abgenommen, der Rest 5 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand zur Proteinbestimmung nach Bradford et al. verwendet (siehe Proteinbestimmung nach Bradford).

Die Proben zur Triglyceridbestimmung wurden in einem Heizblock auf 80 °C erhitzt. Nach Erreichen der Temperatur wurden die Proben für 5 min bei 80 °C inkubiert und anschließend für 10 min bei RT abgekühlt.

‘Folch’-Extraktion nach Folch et al.

Die Lipidextraktion erfolgte durch die Zugabe von 250 µL Methanol zu den abgekühlten Proben. Nach zweimaligem Vortexen (10 sec) wurden die Proben 5 min bei RT im Ultraschallbad inkubiert, erneut vortexiert und anschließend mit 500 µL Chloroform versetzt. Nach zweimaligem Vortexen (10 sec) folgte eine 10-minütige Ultraschallinkubation bei RT. Vor der 2 h-Inkubation bei RT wurden die Proben nochmals zweimal vortexiert.

Nach der Zentrifugation (5 min, max. Geschwindigkeit) wurden 200 µL der chloroformhaltigen Phase entnommen und 10 min im Vakuumkonzentrator eingedampft. Der Rückstand wurde in 200 µL 5 %iger BSA-Lösung gelöst, 10 min bei 55 °C inkubiert, vortexiert und zweimal für 20 sec ultraschallhomogenisiert. Danach folgte eine 1 h-Inkubation bei 55 °C und das Einfrieren über Nacht bei –80 °C.

Am Folgetag wurden die Proben 10 min bei 55 °C aufgetaut, vortexiert, ultraschallhomogenisiert und erneut 1 h bei 55 °C inkubiert, während das Photometer auf 37 °C vorgeheizt wurde. Nach erneutem Vortexen wurde das Enzymreagenz (TRIGS-Kit) gemäß Herstellerangaben durch Zugabe von 15 Milliliter (mL) Puffer angesetzt.

Für die Messung wurden Standard, Blank und Proben (je 2 µL, in Dreifachbestimmung) in eine 96-Well-Platte pipettiert und mit 200 µL Enzymreagenz versetzt. Nach 10 min Inkubation bei 37 °C erfolgte die photometrische Messung der Absorption bei 500 Nanometer (nm). Die Triglyceridkonzentration wurde anhand des Standards berechnet und auf die Proteinmenge bezogen.

3.5.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford dient der quantitativen Erfassung der Gesamtproteinmenge einer Probe (Bradford, 1976). Dies ist wichtig im Zusammenhang mit Methoden wie ELISA oder Triglyzeridextraktion, da die Ergebnisse auf die Proteinmenge bezogen und Unterschiede durch variierende Probenmengen ausgeschlossen werden können. So lassen sich die Werte zuverlässig physiologischen Veränderungen zuordnen.

Das Farbreagenz wurde durch Mischen von BioRad Dye mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:5 hergestellt und bis zur Verwendung lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahrt. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Die Proben wurden im Verhältnis 1:40 mit destilliertem Wasser in 0,5-mL-Eppendorfgefäßen verdünnt (4 µL Probe + 156 µL dH₂O).

Zur Herstellung des Standards wurde der Probenpuffer ebenfalls im Verhältnis 1:40 mit destilliertem Wasser verdünnt (40 µL Puffer + 1560 µL dH₂O) und anschließend nach folgendem Schema in 0,5-mL-Eppendorfgefäße aliquotiert:

Tabelle 6: Herstellung der Standardverdünnungsreihe

	Protein	1:40 verdünnter Probenpuffer	Konzentration [mg BSA/mL]
A	2 µL Stock Solution (BSA)	189 µL	1,0
B	100 µL A	100 µL	0,5
C	100 µL B	100 µL	0,25
D	100 µL C	100 µL	0,125
E	100 µL D	100 µL	0,0625
F		100 µL	0

Zu Ansatz A wurden 2 µL der BSA-Stocklösung gegeben, gemischt und 100 µL der Lösung in Ansatz B überführt. Dieser Verdünnungsschritt wurde analog bis E durchgeführt; F diente als Blank ohne BSA.

Jeweils 5 µL der Proben und Standards wurden in Dreifachbestimmung in eine 96-Well-Platte pipettiert. Danach wurden mit einer Mehrkanalpipette 200 µL des verdünnten Farbreagenzes zugegeben. Die Platte wurde unmittelbar im Plattenreader 5 min geschüttelt und anschließend bei 590 nm photometrisch gemessen. Die Auswertung erfolgte mittels Standardgerade.

3.6 cDNA-Synthese

Für die Analyse der Genexpression ist die Herstellung von komplementärer DNA (cDNA) unverzichtbar, da viele molekularbiologische Verfahren, wie etwa die quantitative PCR (qPCR), eine DNA-Vorlage benötigen (Resuehr & Spiess, 2003). Da mRNA, die bereits extrahiert vorlag, sehr instabil ist und sich für diese Anwendungen nicht direkt eignet, wird sie mittels reverser Transkription in cDNA umgewandelt. Die Qualität und Konzentration der dabei gewonnenen cDNA bestimmen maßgeblich die Verlässlichkeit und Aussagekraft der folgenden Expressionsanalysen.

Zu Beginn der Synthese wurde die aus Leberproben isolierte RNA im Verhältnis 1:50 (2 µL RNA + 98 µL RNase- und DNase-freies Wasser) verdünnt und in eine UV-Platte überführt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit 100 µL RNase- und DNase-freiem Wasser. Um eine Kontamination der Proben zu vermeiden, erfolgten alle Arbeitsschritte ausschließlich mit Filterspitzen. Anschließend wurde die RNA-Konzentration spektrophotometrisch bei den Wellenlängen 230 nm, 260 nm und 280 nm gemessen. Im nächsten Schritt wurde die RNA so eingestellt, dass 1,11 µg in 8 µL RNase- und DNase-freiem Wasser enthalten waren.

Zur Entfernung verbliebener DNA-Verunreinigungen wurden 1 µL eines 10× DNase-Puffers und 1 µL RNase-freie DNase zugesetzt und die Ansätze für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die DNase wurde im Anschluss durch Zugabe von 1 µL Stopplösung deaktiviert und für 10 min bei 65 °C erhitzt.

Währenddessen wurde auf Eis ein Mastermix aus MgCl₂, Reverse Transcriptase-Puffer, einem Desoxyribonukleosid-Triphosphat (dNTP) -Mix, RNasin, Random Primern und Avian Myeloblastosis Virus (AMV) Reverse Transcriptase angesetzt. Nach der Inaktivierung der DNase wurde dieser Mastermix zu den Proben gegeben und die reverse Transkription im Thermocycler durchgeführt. Der Reaktionsablauf bestand aus drei Temperaturphasen: zunächst 10 min bei 25 °C zur Anlagerung der Primer, gefolgt von 15 min bei 42 °C für die eigentliche cDNA-Synthese und abschließend 5 min bei 95 °C zur Inaktivierung der Enzyme. Die Reaktion wurde anschließend bei 4 °C beendet.

Zum Abschluss wurden 80 µL RNase-freies Wasser zu den Proben gegeben, um die cDNA zu verdünnen. Die fertige cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.7 Real-time qPCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) diente der Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte (Arya et al., 2014). Alle Schritte erfolgten auf Eis. Pro Ansatz enthielt der Mastermix 10 µL iTaq, 1 µL Forward- und 1 µL Reverse-Primer sowie 3 µL Nuklease freies Wasser. Die Gesamtmenge wurde

anhand der Probenzahl, einer Non-Template-Control (NTC, Wasser statt Probe) und zusätzlicher Ansätze berechnet.

Je 15 µL Mastermix wurden in eine 96-Well-Platte pipettiert. Die Proben wurden vortexiert, kurz zentrifugiert und je 5 µL in Duplikaten zugegeben. Die Platte wurde mit einer Folie versiegelt, bei 2000 rpm zentrifugiert und im CFX Real-Time PCR-Gerät (Bio-Rad) mit dem entsprechenden Temperaturprogramm (siehe Tabelle 7) gemessen.

Die Auswertung der relativen Genexpression erfolgte mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode unter Verwendung von 18S als Referenzgen. Alle Pipettierschritte wurden mit Filterspitzen durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden.

Tabelle 7: Temperaturprofil der real-time qPCR

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Polymerase Aktivierung	95	30	
Denaturierung	95	5	
Annealing/Elongation			
18S	55	30	40
α-SMA, BAD, TGFβ1, P16	64	30	49
	95	10	
Schmelzkurvenanalyse	65-95	5	

3.8 ELISA

Mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) können spezifische Proteinkonzentrationen in biologischen Proben bestimmt werden. Grundlage ist die Bindung zwischen Antigen und Antikörper (Reen, 1994). Analysiert wurden Maus Plasminogen-Activator-Inhibitor-1 (PAI-1) und Maus Interleukin-1 β (IL-1 β) mit dem DuoSet von R&D Systems aus Lebergewebeproben.

Am ersten Tag wurde die ELISA-Platte vorbereitet, indem die jeweils benötigte Anzahl an Wells mit 100 µL des Capture-Antikörpers, verdünnt in ELISA-PBS (Verdünnungen siehe Tabelle 8), befüllt wurde. Anschließend erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 25 °C im Heratherm-Inkubator.

Am Folgetag wurde zunächst der erste Waschschrift durchgeführt. Dazu wurde der Inhalt der Wells ausgeschüttet, die Wells dreimal mit je 300 µL Waschpuffer gespült und nach jeder Runde gründlich ausgeklopft. Im letzten Waschgang wurden die Platten zusätzlich auf einem Papiertuch

trockengeklopft. Anschließend erfolgte die Blockierung der Platte für 1 Stunde bei 25 °C mit 300 µL Reagent Diluent pro Well.

In der Zwischenzeit wurden für die Probenhomogenisierung in 2-mL-Schraubröhrchen jeweils zwei Zirkonoxidperlen und 300 µL Puffer vorgelegt (ELISA-PBS ergänzt mit je 1 µL Protease- und Phosphatase-Inhibitoren pro mL) und auf Eis gestellt. Die Lebergewebeproben wurden auf Eis auf ein Gewicht von 40–60 mg zugeschnitten und den jeweiligen Röhrchen zugegeben. Anschließend erfolgte die Homogenisierung für 30 sec im Homogenisator unter dem Leberprogramm. Die homogenisierten Proben wurden für 10 min bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand (200 µL) wurde für die weitere Analyse abgenommen.

Der Standard wurde seriell verdünnt, dafür wurde 300 µL Reagent Diluent + Standard in Röhrchen A gegeben und anschließend 150 µL sukzessive in B–G überführt und Röhrchen H diente als Blank (nur Reagent Diluent).

Nach Ablauf der Blockierungszeit wurde erneut ein Waschschrift durchgeführt. Anschließend wurden je 100 µL Standard oder verdünnte Probe in Reagent Diluent in die entsprechenden Wells pipettiert und für 2 h bei 25 °C inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift.

Daraufhin wurden je 100 µL Detection-Antikörper, verdünnt in Reagent Diluent, zugegeben und die Platte erneut für 2 h bei 25 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde je 100 µL Streptavidin, ebenfalls in Reagent Diluent verdünnt, in jedes Well pipettiert und für 20 min bei 25 °C inkubiert.

Im Anschluss wurde ein weiterer Waschschrift durchgeführt. Dann wurde das Substrat, bestehend aus den Komponenten A und B, je 100 µL pro Well zugegeben und für 20 min bei 25 °C inkubiert. Dabei wurde darauf geachtet, das Substrat vorsichtig und blasenfrei zu pipettieren, da Blasen die Messung verfälschen können und das Substrat nicht mehr entfernt wird.

Die Reaktion wurde mit 50 µL Schwefelsäure pro Well gestoppt und unmittelbar photometrisch gemessen. Die Auswertung erfolgte in Microsoft Excel.

Tabelle 8: Verwendete Verdünnungen für die ELISA

Verdünnungen/Mengen	PAI-1	IL1β
Capture Antibody	1:120	1:120
Standard	1,9 μ L	2,73 μ L
Proben	1:1	1:1
Detection Antibody	1:60	1:60
Streptavidin	1:40	1:40
Substrat	1:1	1:1

3.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung sowie die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgten mithilfe der Software GraphPad Prism (Version 7). Zur Überprüfung von potenziellen Ausreißern wurde der Grubb's-Test eingesetzt; identifizierte Ausreißer wurden anschließend von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Die Gruppenvergleiche wurden abhängig von der Verteilung der Daten durchgeführt. Bei vorliegender Normalverteilung kam ein ungepaarter t-Test zur Anwendung, während bei fehlender Normalverteilung der Mann-Whitney-U-Test verwendet wurde, um statistische Unterschiede innerhalb der Altersgruppen zu untersuchen.

Die Ergebnisse werden als Mittelwert (MW) $\pm$ Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant definiert.

4 Ergebnisse

Die in der vorliegenden Arbeit analysierten Gewebeproben stammen aus einem tierexperimentellen Versuch, welcher von Mitgliedern der Arbeitsgruppe durchgeführt wurde. Um die in der Arbeit erhobenen Ergebnisse besser zu verstehen, wurden weitere Daten, wie das Körpergewicht und das Leber-/Körpergewichts Ratio der Mäuse, in die Auswertung miteinbezogen.

4.1 Der Einfluss eines TLR9^{-/-} auf das Körpergewicht und das Leber-/Körpergewichts Ratio

Bei der Probenentnahme wurden das Körpergewicht sowie das Lebergewicht der Tiere gemessen, um anschließend das Leber-/Körpergewichts-Ratio zu berechnen (siehe Tabelle 9). Sowohl das Körpergewicht als auch das Leber-/Körpergewichts-Ratio unterschieden sich zu Beginn sowie am Ende des Versuchs nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen.

Tabelle 9: Daten zum Körpergewicht und Leber-/Körpergewichts-Ratio der 4 und 20 Monate alten BL6 und Tlr9^{-/-} Mäusen. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert $\pm$ SEM, Anzahl (n) = 8 in der 4 Monate alten Gruppe, n = 10 in der 20 Monate alten Gruppe.

	4 Monate BL6	4 Monate Tlr9 KO	20 Monate BL6	20 Monate Tlr9 KO
Körpergewicht Ende (g)	31,8 $\pm$ 0,5	31,6 $\pm$ 0,6	35,7 $\pm$ 1,2	36,8 $\pm$ 0,4
Leber/Körpergewichts Ratio (%)	5,5 $\pm$ 0,1	5,1 $\pm$ 0,1	4,9 $\pm$ 0,1	5,0 $\pm$ 0,1

4.2 TLR9 mRNA Expression in der Leber im Verlauf des Alterns

Um zu untersuchen, ob sich die Tlr9 Expression im Alter in der Leber verändert, wurde die Tlr9 mRNA Expression bei 4, 16 und 20 Monate alten BL6 Mäusen gemessen (siehe Abbildung 5). Dabei zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Tlr9 mRNA Expression in der Leber der 16 und 24 Monate alten Mäusen im Vergleich zu der Kontrolle ($p \leq 0,5$).

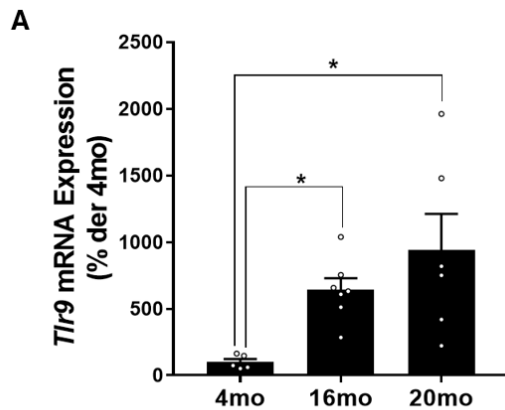


Abbildung 5: Tlr9 mRNA Expression im Lebergewebe verschiedenen Alters der C57BL/6 Mäuse.

(A) Tlr9 mRNA Expression im Lebergewebe. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert $\pm$ SEM, * $p < 0,05$.

4.3 Der Einfluss der genetischen Deletion von TLR9 auf die altersbedingte histologische Veränderung in der Leber: allgemeine Histologie, Fetteinlagerung, Entzündungsmarker und Marker für Fibrose

Zur Beurteilung des Einflusses der genetischen Deletion von Tlr9 auf die Alterung der Leber, wurde ein Leberentzündungs-Score erhoben. Das Ergebnis zeigt sowohl in der BL6- als auch in der Tlr9^{-/-}-Gruppe einen alters assoziierten Anstieg. Einen signifikanten Unterschied konnte nur zwischen jungen und alten Mäusen der BL6-Gruppe ($p \leq 0,5$) festgestellt werden, während in der Tlr9^{-/-}-Gruppe kein signifikanter Unterschied zwischen den jungen und alten Mäusen zu sehen ist. In der alten BL6-Gruppe zeigte sich ein relativer Unterschied von +136,3 %, in der alten Tlr9-defizienten Gruppe von +90 % im Vergleich zu den jungen Tieren (siehe Abbildung 6).

Zusätzlich wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung der histologischen Schnitte des Lebergewebes durchgeführt (siehe Abbildung 6). Dabei zeigte sich, dass die 20 Monate alte BL6 Gruppe deutlich mehr inflammatorische Foci aufwies als die 20 Monate alten Tlr9^{-/-} Mäuse.

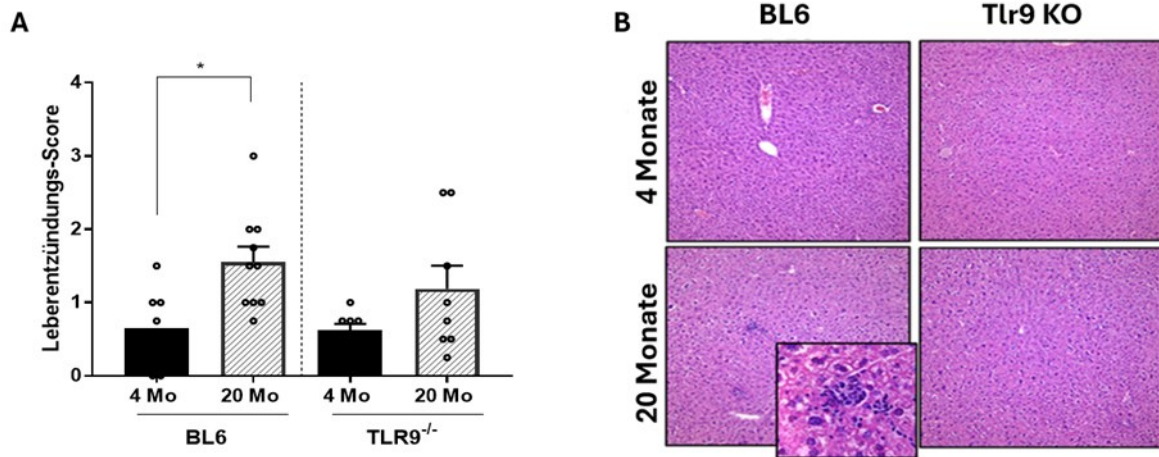


Abbildung 6: Leberentzündungs-Score und Histologische Bilder des Lebergewebes in 4 und 20 Monate alten BL6 und Tlr9^{-/-} Mäusen.

(A) Leberentzündungs-Score und (B) Repräsentative Bilder (Vergrößerung 100x und 400x) der Hämatoxylin und Eosin Färbung (H&E). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert $\pm$ SEM, $n = 8$ in der 4 Monate alten Gruppe, $n = 10$ in der 20 monate alten Gruppe, * $p < 0,05$.

Um zu untersuchen, ob der Verlust von Tlr9 einen Einfluss auf die hepatische Fetteinlagerung hatte, wurde eine Triglyceridextraktion mit anschließender quantitativer Bestimmung durchgeführt. Dabei fand sich unabhängig vom genetischen Hintergrund beim Vergleich junger und alter Mäuse eine ähnlich erhöhte Triglyzerid Konzentration in der Leber bei den alten Mäusen. In beiden Gruppen war ein signifikanter altersassoziierte Anstieg ($p \leq 0,5$) zu beobachten. Ein signifikanter Unterschied in der hepatischen Fetteinlagerung zwischen den alten BL6- und Tlr9^{-/-}-Mäusen war jedoch nicht nachweisbar (siehe Abbildung 7).

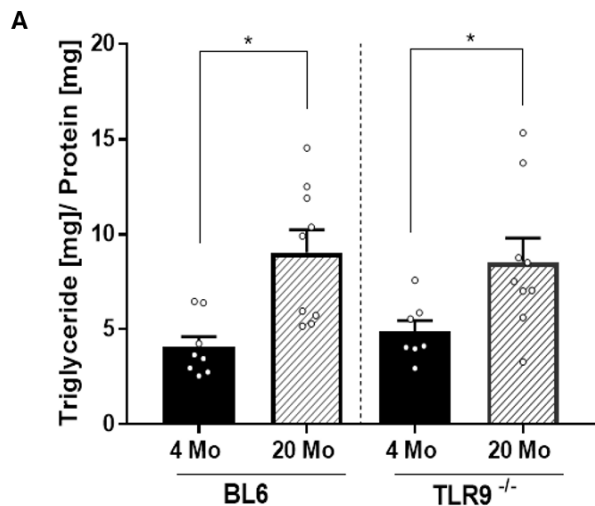


Abbildung 7: Triglyceridkonzentration im Lebergewebe in 4 und 20 Monate alten BL6 und Tlr9^{-/-} Mäusen.

(A) Analyse der Triglyceridextraktion des Lebergewebes. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SEM, n = 8 in der 4 Monate alten Gruppe, n = 10 in der 20 monate alten Gruppe, * p < 0,05.

Um zu untersuchen, ob der Verlust von Tlr9 einen Einfluss auf die Entzündungsmarker in der Leber hatte, wurde eine Ly6G-Färbung der histologischen Schnitte des Lebergewebes durchgeführt. Diese zeigte keinen altersassoziierten Effekt in beiden Gruppen. Die verringerte Anzahl neutrophiler Granulozyten scheint mit dem Phänotyp des Tlr9^{-/-} zusammen zu hängen, da bereits in der 4 Monate alten Tlr9^{-/-}-Gruppe eine niedrigere neutrophilen Zellzahl im Vergleich zur 4 Monate alten BL6-Gruppe zu beobachten war (siehe Abbildung 8).

Als weiterer Parameter für die hepatische Entzündung wurde die Konzentration des Gesamt IL-1β im Lebergewebe quantifiziert. Auch hierbei zeigte sich weder in der BL6- noch in der Tlr9^{-/-}-Gruppe ein alters assoziierter Effekt (siehe Abbildung 8).

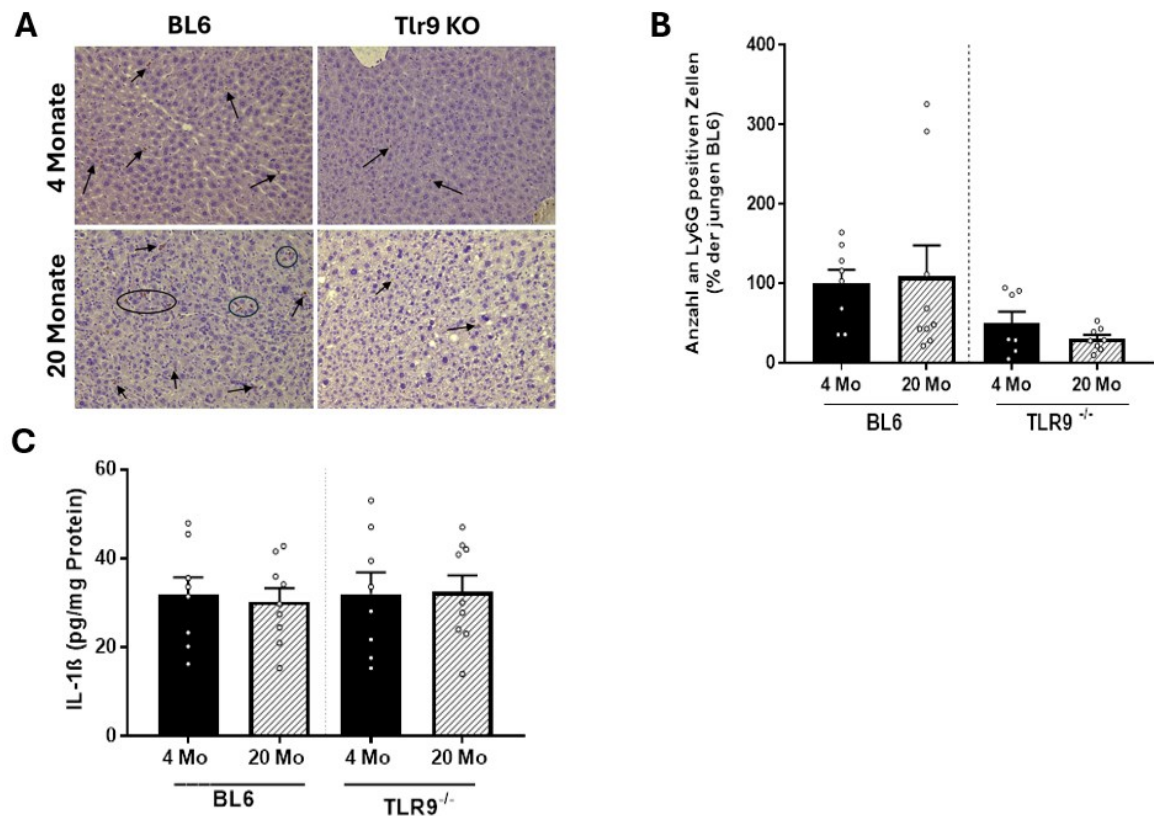


Abbildung 8: Marker der Leberinflammation in 4 und 20 Monate alten BL6 und Tlr9^{-/-} Mäusen.

(A) Repräsentative Bilder (Vergrößerung 200x) der Ly6G-Färbung im Lebergewebe, (B) densitometrische Analyse der LY6G Färbung in Leberschnitten und (C) Konzentration von IL-1β im Lebergewebe. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SEM, n = 8 in der 4 Monate alten Gruppe, n = 10 in der 20 monate alten Gruppe, * p < 0,05.

Zur Untersuchung der Auswirkung der genetischen Deletion von Tlr9 auf die Einsetzung der altersassoziierten Leberfibrose, wurde unter anderem eine Sirius Red Färbung der histologischen Schnitte des Lebergewebes durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen einen signifikanten altersassoziierten Anstieg fibrotischer Veränderungen in der BL6 Gruppe (+~ 79 %, p ≤ 0,5). In der Tlr9^{-/-} Gruppe hingegen war der Unterschied zwischen jungen und alten Mäusen nicht signifikant (siehe Abbildung 9).

Als weiterer Marker der Leberfibrose wurde mittels PCR die mRNA Expression von alpha-Smooth Muscle Actin (alpha-sma) und Transforming Growth Factor beta 1 (TGFβ1) im Lebergewebe gemessen. Die Ergebnisse zeigen beide einen unterschiedlichen alters assoziierten Anstieg in der BL6- und der Tlr9^{-/-}-Gruppe. Sowohl bei alpha-sma als auch bei TGFβ1 fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen jungen und alten Mäusen der BL6-Gruppe (TGFβ1: +~ 109 %, alpha sma: +~ 343 %, p ≤ 0,5), während in der Tlr9^{-/-}-Gruppe kein signifikanter Unterschied zwischen den jungen und alten Mäusen festgestellt wurde (siehe Abbildung 9).

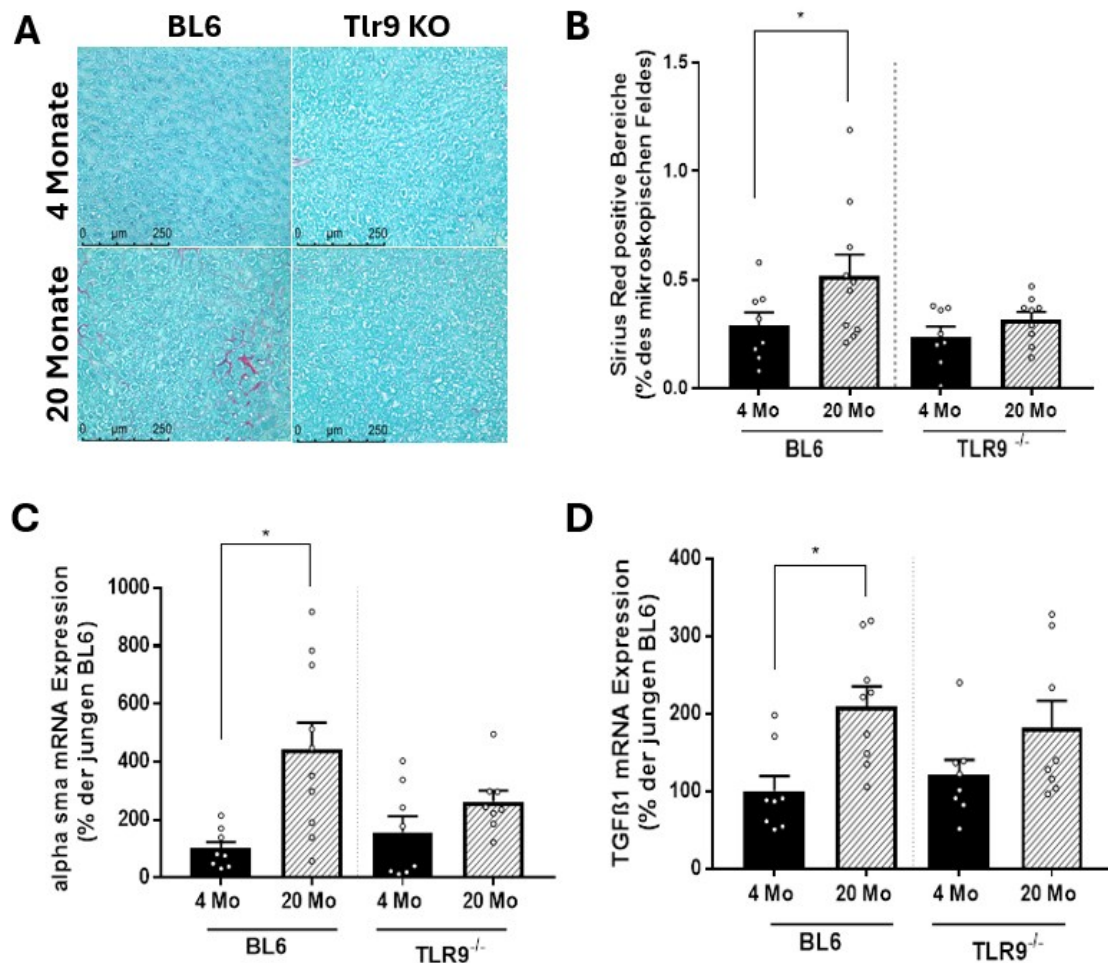


Abbildung 9: Marker der Leberfibrose in 4 und 20 Monate alten BL6 und Tlr9^{-/-} Mäusen.

(A) Repräsentative Bilder (Vergrößerung 200x) der Sirius Red Färbung im Lebergewebe, (B) densitometrische Analyse der Sirius Red Färbung in Leberschnitten, (C) alpha sma mRNA-Expression im Lebergewebe, (D) TGFβ1 mRNA Expression im Lebergewebe. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SEM, n = 8 in der 4 Monate alten Gruppe, n = 10 in der 20 Monate alten Gruppe, * p < 0,05.

4.4 Der Einfluss der genetischen Deletion von Tlr9 auf Marker der Apoptose und der Seneszenz im Lebergewebe von jungen und alten Mäusen

Um zu untersuchen, ob der Verlust von Tlr9 einen Einfluss auf die Apoptose der hepatischen Zellen hatte, wurde eine Cleaved Caspase 3 Färbung der histologischen Schnitte des Lebergewebes durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen weder in der BL6- noch in der Tlr9^{-/-}-Gruppe einen alters assoziierten Unterschied (siehe Abbildung 10).

Als weiterer Marker für die Apoptose hepatischer Zellen wurde mittels PCR die Bcl-2-associated agonist of cell death (BAD) mRNA-Expression in der Leber gemessen. Die mRNA-Expression von BAD im Lebergewebe war sowohl in der Leber der alten BL6 Mäuse und der alten Tlr9^{-/-} Mäuse

signifikant höher als in der jungen Kontrolle (WT j vs. a: +~ 516%, TLR9^{-/-} j vs. a: +~ 240 %, $p \leq 0,5$) (siehe Abbildung 10).

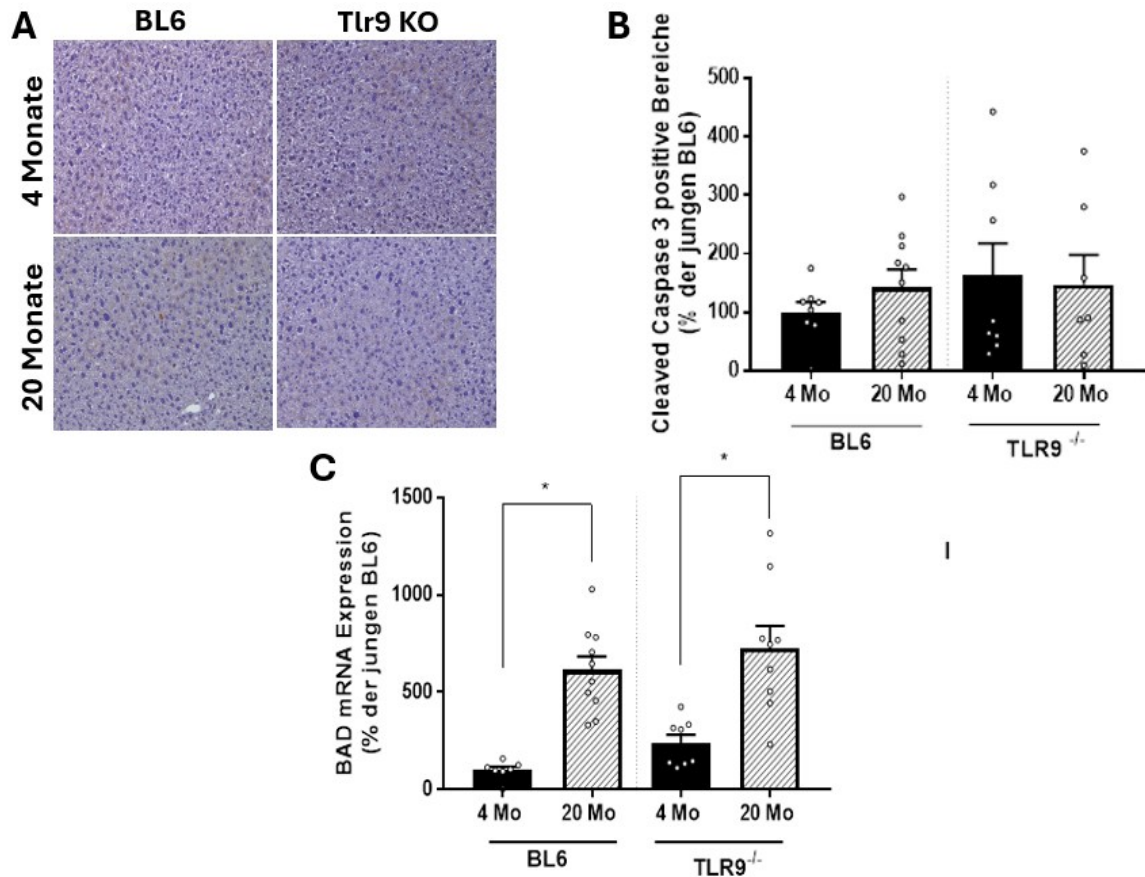


Abbildung 10: Marker der Apoptose im Lebergewebe von 4 und 20 Monate alten BL6 und Tlr9^{-/-} Mäusen.

(A) Repräsentative Bilder (Vergrößerung 200x) der Cleaved Caspase 3 Färbung im Lebergewebe, (B) densitometrische Analyse der Cleaved Caspase 3 Färbung in Leberschnitten und (C) BAD mRNA Expression im Lebergewebe. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert $\pm$ SEM, $n = 8$ in der 4 Monate alten Gruppe, $n = 10$ in der 20 monate alten Gruppe, * $p < 0,05$.

Um zu untersuchen, ob der Verlust von Tlr9 einen Einfluss auf Marker der Seneszenz im Lebergewebe hatte, wurde mittels PCR die P16 mRNA Expression in der Leber gemessen. Die Ergebnisse zeigen sowohl in der Leber der BL6- als auch in der Tlr9^{-/-}-Gruppe einen vergleichbaren, signifikanten altersassoziierten Anstieg der P16 mRNA Expression (WT j vs. a: +~ 1238 %, TLR9^{-/-} j vs. a: +~ 1195 %, $p \leq 0,5$) (siehe Abbildung 11).

Zusätzlich wurde die Konzentration des Gesamt PAI-1 im Lebergewebe als weiterer Marker der Seneszenz quantifiziert. Hier zeigte sich ein signifikanter altersassoziiertes Anstieg in der BL6

Gruppe, denn zwischen den jungen und alten BL6 Mäusen liegt ein signifikanter Unterschied in der PAI-1 Konzentration vor ($\sim 35\%$, $p \leq 0,05$). Im Gegensatz dazu war zwischen den jungen und alten $Tlr9^{-/-}$ Mäusen kein signifikanter Unterschied der PAI-1 Konzentration im Lebergewebe nachweisbar (siehe Abbildung 11).

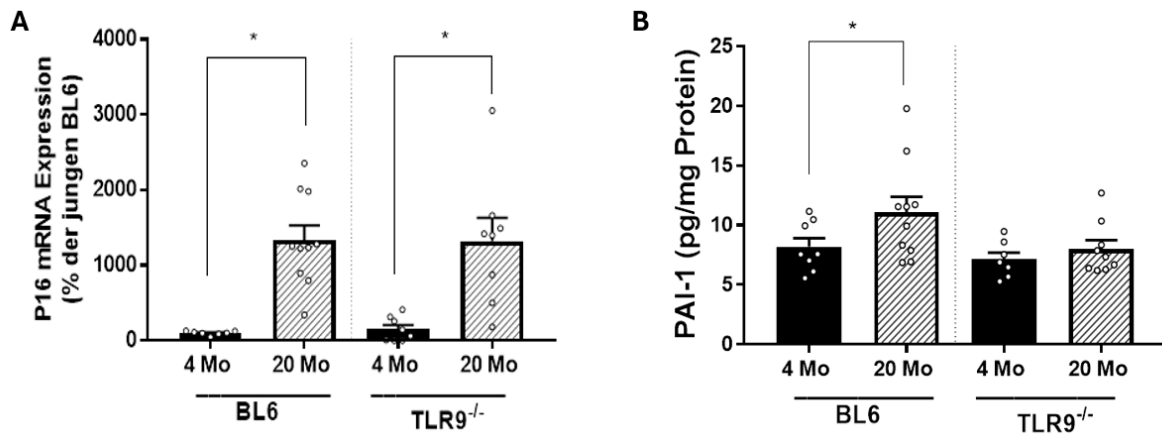


Abbildung 11: Marker der Seneszenz im Lebergewebe von 4 und 20 Monate alten BL6 und $Tlr9^{-/-}$ Mäusen.

(A) P16 mRNA Expression im Lebergewebe und (B) Konzentration von Gesamt PAI-1 im Lebergewebe. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert $\pm$ SEM, $n = 8$ in der 4 Monate alten Gruppe, $n = 10$ in der 20 Monate alten Gruppe, $* p < 0,05$.

5 Diskussion

Die Zahl hochbetagter Menschen steigt weltweit stetig an (Dattani et al., 2023). Die Zeit, die in guter Gesundheit verbracht wird (Healthy Life Expectancy), nimmt jedoch in vielen Ländern nicht im gleichen Maße zu (Global Burden of Disease Study, 2021). Altern ist ein multifaktorieller Prozess (López-Otín et al., 2013) und wird als ein Zustand geringgradiger, chronischer Entzündung betrachtet, der auch ohne das Vorliegen einer offensichtlichen Infektion auftritt (Franceschi & Campisi, 2014). Mit dem „gesunden“ Altern geht, wie in tierexperimentellen Studien gezeigt werden konnte, ein fortschreitender Funktionsverlust der Organe (López-Otín et al., 2013), einschließlich der Leber, einher (Jin et al., 2020). Daten aus den letzten Jahren legen nahe, dass Veränderungen des intestinalen Mikrobioms und der Barrierefunktion Einfluss auf die geringgradige Entzündung haben könnten, die typischerweise im Kontext des Alterns auftritt (Cevenini et al., 2012; Franceschi et al., 2006). Studien bei Mäusen haben gezeigt, dass Veränderungen in der Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms sowie eine Beeinträchtigung der intestinalen Barrierefunktion im Alter zu einer verstärkten Translokation bakterieller Toxine führen. Infolgedessen kommt es zu einer Hochregulation der Expression verschiedener Tlrs, darunter auch Tlr9 (Baumann et al., 2021). Ungeklärt ist jedoch, ob eine Unterbrechung der Tlr9-abhängigen Signalkaskade durch die genetische Deletion von Tlr9 die altersbedingte Leberdegeneration bei Mäusen beeinflusst.

5.1 Das Mausmodell zur Untersuchung der altersassoziierten Leberschädigung

In der Altersforschung ist der Einsatz von Menschen als Versuchspersonen aufgrund zahlreicher ethischer Fragen, der langen Lebensspanne, vielfältiger Umwelteinflüsse und individueller Unterschiede stark eingeschränkt. Daher werden Tiermodelle verwendet, um die genetischen und physiologischen Grundlagen des Alterns sowie altersbedingter Krankheiten zu erforschen. Solche Modelle sollten die biologischen Veränderungen, die mit dem Altern einhergehen, möglichst genau nachbilden und dabei sowohl intrinsische als auch extrinsische Einflüsse kontrollieren (Vanhooren & Libert, 2012).

In-vitro-Modelle sind für die Altersforschung ungeeignet, da nicht das gesamte Organ als Teil eines lebenden Organismus abgebildet werden kann, inklusive dessen Wechselwirkungen zwischen Zelltypen und Matrik (Starkel & Leclercq, 2011). Niedere Organismen wie der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* und die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* bieten dabei Vorteile wie eine einfache Handhabung, kurze Generationszeiten, standardisierte Haltungsbedingungen, die Verfügbarkeit genormter Stämme und umfangreich vorhandene Informationen (Conn, 2008; Holtze et al., 2021). Sie haben wesentlich zur Identifizierung

bestimmter alterungsrelevanter Gene beigetragen. Dennoch sind viele Forscher überzeugt, dass Säugetiermodelle unverzichtbar sind, um das menschliche Altern in seiner Komplexität zu verstehen.

Primaten wären in dieser Hinsicht ideal, da sie dem Menschen physiologisch am nächsten stehen, jedoch bestehen erhebliche ethische Bedenken, und ihre lange Lebensspanne erschwert experimentelle Untersuchungen. Nager hingegen, insbesondere Mäuse, stellen eine praktikable Alternative dar. Sie sind Säugetiere mit einer deutlich kürzeren Lebensdauer, lassen sich kostengünstig halten und genetisch leicht verändern. Obwohl Mäuse sich in einigen Aspekten vom Menschen unterscheiden, zeigen sie in vielen physiologischen und zellulären Funktionen, insbesondere im muskuloskelettalen, immunologischen, endokrinen und gastrointestinalen System, große Ähnlichkeiten. Altersbedingte Veränderungen der Leber konnten im Mausmodell erfolgreich nachgebildet werden. Damit vereinen Mäuse die Vorteile eines Säugetiersystems mit einer kurzen Lebensdauer, niedrigen Kosten und der Möglichkeit gezielter genetischer Manipulation (Hasty & Vijg, 2004; Vanhooren & Libert, 2012).

Zur Untersuchung der Leber werden Mausmodelle häufig eingesetzt, da sie ein intaktes Organsystem mit funktioneller Kommunikation zum gesamten Körper bieten, einschließlich immunologischer, vaskulärer, metabolischer und endokriner Interaktionen. Zudem verkürzt die kürzere Lebensdauer der Tiere die Zeit bis zur Entwicklung altersassoziierter Leberschäden. Tiermodelle ermöglichen darüber hinaus die Kontrolle und Reduktion von Variablen, die beim Menschen schwer kontrollierbar sind, sowie die gezielte Untersuchung spezifischer Gene und Signalwege durch den Einsatz genetisch veränderter Tiere (Delire et al., 2015).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das Modell der männlichen C57BL/6J-Mäuse gut für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen geeignet ist. Es ermöglicht unter kontrollierten Bedingungen, altersbedingte Veränderungen der Leber aufgrund der kurzen Lebensdauer und der vergleichsweise geringen Haltungskosten zu beobachten (Delire et al., 2015). Darüber hinaus erlaubt dieses Modell den direkten Vergleich mit genetisch veränderten Tieren (Hasty & Vijg, 2004). Auch für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte genetische Deletion von Tlr9 stellt das Mausmodell eine geeignete und bewährte Grundlage dar.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein signifikanter altersassoziierter Anstieg der Tlr9-mRNA-Expression in der Leber von C57BL/6J Mäusen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis reiht sich in die bereits vorliegenden Befunde der Arbeitsgruppe ein. Baumann et al. (2021) konnten ebenfalls einen Anstieg der Tlr9-Expression im Alter feststellen. Neben Tlr9 zeigten sich in den Untersuchungen von Baumann et al. auch Erhöhungen anderer Tlrs, darunter Tlr1, Tlr2, Tlr4 und

Tlr6. Baumann et al. (2021) setzten diese Ergebnisse in Zusammenhang, mit dem im Alter erhöhten Endotoxinspiegel, was insgesamt auf eine Veränderung der Darmbarrierefunktion hinweisen könnte.

Die Ergebnisse werden auch durch die von Jin et al. (2020) und Brandt et al. (2022) gestützt. Wenngleich Jin et al. und Brandt et al. ihre Untersuchungen auf Tlr4 fokussierten, konnten jedoch beide ebenfalls einen erhöhten Endotoxinspiegel nachweisen und schlussfolgerten, dass Altern bei Mäusen mit einer Beeinträchtigung der Darmbarrierefunktion im Dünndarm und einer veränderten Darmhomöostase einhergeht (Tran et al., 2013). Brandt et al. (2023) berichteten zudem von einer erhöhten Tlr2- und Tlr4-Liganden-Konzentration im Portal- und peripheren Blut alter Mäuse, was auf eine unzureichende Clearance bakterieller Toxine in der Leber zurückzuführen sein könnte. Auch wenn einige dieser Studien nicht konkret Tlr9 untersucht haben, lassen sich durch die altersbedingten Erhöhungen von Tlr1, Tlr2, Tlr4, Tlr6 und Tlr9, wie von Baumann et al. gezeigt, Parallelen ziehen. Daraus lässt sich ableiten, dass wenn eine im Alter beeinträchtigte Darmbarrierefunktion zu einem erhöhten Endotoxinspiegel führt, damit möglicherweise auch mehr CpG-DNA in den Blutkreislauf gelangt, was die erhöhte Tlr9-mRNA-Expression erklären könnte.

Darüber hinaus konnten Jin et al. (2020) eine erhöhte Myd88-mRNA-Expression in der Leber alter Mäuse nachweisen. Myd88 gilt als zentrales Signalmolekül im Tlr9-Signalweg (Marongiu et al., 2019). Unterstützend dazu konnten Brandt et al. (2023) ebenfalls eine erhöhte Konzentration von Myd88 im Hippocampus und präfrontalen Kortex alter Mäuse beobachten. Die erhöhte Myd88-Expression weist somit auf eine altersabhängige Aktivierung des Tlr9-Signalwegs hin. Ergänzend dazu deuten die in der Studie von Jin et al. (2020) gemessenen mitochondrialen Marker auf eine Abnahme der mitochondrialen Funktion bei Wildtyp-Mäusen im Alter. Die Abnahme der mitochondrialen Funktion führt zur Freisetzung von mtDNA (Dudek, 2017; Khwaja et al., 2021; Newman & Shadel, 2023), was ebenfalls eine Erklärung für die erhöhte Tlr9-mRNA-Expression im Alter liefern könnte. Insgesamt stützen die Ergebnisse der vorliegenden Masterarbeit zusammen mit denen anderer, dass die Tlr9 Expression in der Leber im Alter ansteigt.

5.2 Der Einfluss einer genetischen Deletion von Tlr9 auf die altersbedingten histologischen Veränderungen der Leber im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen

In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikante altersassoziierte Erhöhung des Leberentzündungsscores bei den BL6-Mäusen beobachtet werden, der sich im Gegensatz dazu bei den Tlr9-defizienten Mäusen zwar ebenfalls erhöhte, jedoch blieb ein signifikanter Unterschied aus. Zusätzlich konnte bei der Hämatoxylin- und Eosin-Färbung in der alten BL6-

Gruppe im Vergleich zur alten Tlr9-defizienten Gruppe eine vermehrte Anzahl inflammatorischer Foci festgestellt werden. Die Ergebnisse zum Leberentzündungsscore reihen sich in die Befunde vorheriger Studien ein, in denen ebenfalls beobachtet werden konnte, dass alte männliche C57BL/6J-Mäuse, die mit Standardfutter gefüttert wurden, mit einer signifikanten altersassoziierten Erhöhung des Leberentzündungsscores einhergehen (Baumann et al., 2021; Jin et al., 2020). In der Studie von Jin et al. (2020) konnte auch ein ähnlicher Effekt in Bezug auf den Leberentzündungsscore bei einer LBP-Defizienz beobachtet werden. Es konnte sowohl bei den alten Wildtyp-Mäusen als auch bei den LBP-defizienten Mäusen ein signifikanter altersassoziiertes Anstieg des Leberentzündungsscores im Vergleich zu den jungen Mäusen festgestellt werden. Allerdings war der Anstieg bei den alten LBP-defizienten Mäusen geringer als bei den alten Wildtyp-Mäusen. Diese Daten legen nahe, dass wie bereits bei anderen Organen festgestellt (Saffrey, 2013), auch die entzündlichen Veränderungen der Leber, die über eine Aktivierung von Tlr abhängigen Signal Kaskaden vermittelt werden, eine wichtige Rolle in altersassoziierten degenerativen Veränderungen von Organen spielen könnten (Jin et al., 2020) und dass die genetische Deletion von Tlr9 oder LBP einen protektiven Effekt auf diese entzündlichen Veränderungen der Leber haben kann. Den Anstieg inflammatorischer Foci in der Leber von Mäusen im Verlauf des Alterns konnten ebenfalls Baumann et al. (2021) und Jin et al. (2020) bei der Hämatoxylin- und Eosin-Färbung feststellen. In dieser Studie wurde kein Vergleich mit Tlr9-defizienten Mäusen durchgeführt, dennoch scheint die Tlr9-Defizienz in der vorliegenden Studie den Beginn entzündlicher Veränderungen in der Leber abzumildern.

In Bezug auf die hepatische Fetteinlagerung konnte in der vorliegenden Arbeit mittels Triglyzeridextraktion kein Unterschied zwischen den Tlr9-defizienten Mäusen und den Wildtyp-Mäusen festgestellt werden, da die hepatische Fetteinlagerung in beiden Gruppen altersbedingt signifikant angestiegen ist und sich nicht unterschied. Obwohl die hepatische Fetteinlagerung eine bekannte altersassoziierte Entwicklung ist (Wang et al., 2023), konnten Jin et al. (2020) bei der Untersuchung von jungen und alten Wildtyp-Mäusen, die gesund gealtert waren, keinen altersassoziierten Unterschied feststellen. Auch im zweiten Teil ihrer Studie konnte kein signifikanter altersassoziiertes Anstieg beobachtet werden, als die hepatische Fetteinlagerung zusätzlich bei jungen und alten Mäusen mit einer genetischen LBP-Deletion, einem wichtigen Faktor im Tlr4-Signalweg, untersucht wurde. Dabei zeigte sich nur ein marginaler Effekt der LBP-Deletion auf die hepatische Fetteinlagerung (Jin et al., 2020). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass, obwohl die Expression von Tlr9 und Tlr4 im Alter ansteigt (Baumann et al., 2021), eine genetische Deletion von Tlr9 oder LBP jedoch keinen protektiven Effekt auf die hepatische Fetteinlagerung im Alter hat, sondern hier andere Mechanismen von Bedeutung sein könnten, wie die Futterzusammensetzung (Kromm et al., 2025). Es konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme

einer sogenannten „purified“ Diät bei alternden Mäusen zu einer Ansammlung von Leberfett führt, während gleichaltrige Mäuse, die mit „Standardfutter“ aus natürlichen Ressourcen gefüttert wurden, wie in der vorliegenden Arbeit, keine hepatische Fetteinlagerung zeigten (Kromm et al., 2025).

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen der Entzündungsmarker in der Leber konnte kein protektiver Effekt einer Tlr9-Deletion festgestellt werden. Bei der Ly6G-Färbung zeigte sich in beiden Gruppen kein signifikanter altersassoziierter Effekt. Bei der Quantifizierung von Gesamt-IL-1 β , zeigten weder die Tlr9-defizienten- noch die Wildtyp-Mäuse einen altersassozierten Effekt. Im Falle der Ly6G-Färbung scheint es sich jedoch um einen Phänotyp der Tlr9-Deletion zu handeln, da bereits in der 4 Monate alten Tlr9-defizienten Gruppe eine niedrigere Neutrophilenzahl im Vergleich zur gleichaltrigen Wildtyp-Gruppe zu beobachten war. In den Studien von Baumann et al. (2021) und Jin et al. (2020) ist hingegen ein signifikanter altersassoziierter Anstieg der Neutrophilenzahl bei Wildtyp-Mäusen erkennbar. Diese Ergebnisse stimmen teilweise mit den Befunden dieser Arbeit überein, da bei den Wildtyp-Mäusen ein geringer altersassoziierter Anstieg der Neutrophilenzahl festgestellt wurde. Bei den Tlr9-defizienten Mäusen hingegen war im Alter sogar eine Abnahme der Neutrophilenzahl zu beobachten, was erneut den spezifischen Phänotyp der Tlr9-Deletion unterstreicht. Jin et al. (2020) verwendete zur Sichtbarmachung der Neutrophilen eine andere Färbung (Chloroacetat-Esterase-Färbung), allerdings konnte in ihrer Arbeit eine höhere Neutrophilenzahl in der Leber alter Wildtyp-Mäuse festgestellt werden, während Mäuse mit einer LBP-Deletion weniger Neutrophile aufwiesen. Auch wenn kein direkter Vergleich möglich ist, da LBP im Signalweg von Tlr9 keine Rolle spielt, lässt sich daraus schließen, dass die genetische Deletion von LBP einen protektiven Effekt auf die Neutrophilenzahl in der Leber hat, nicht jedoch die Deletion von Tlr9.

Da im Tlr9-aktivierten Signalweg proinflammatorische Zytokine freigesetzt werden (Marongiu et al., 2019), wurde zusätzlich die Konzentration von Gesamt-IL-1 β im Lebergewebe quantifiziert. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, beobachteten Jin et al. (2020) eine signifikant höhere IL-1 β mRNA-Expression, mittels PCR bei alten Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu jungen Tieren. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass die alten Mäuse bei Jin et al. (2020) 4 Monate älter waren als die der vorliegenden Arbeit, was potenziell die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich IL-1 β erklärt. Ergänzend konnte in einer Zellkulturstudie von De Dios et al. (2020) eine durch CpG-Oligodeoxynukleotide (CpG-ODN) induzierte Erhöhung der IL-1 β -Expression festgestellt werden. Ein direkter Vergleich ist jedoch eingeschränkt, da es sich um ein in-vitro-Modell handelt und nicht, wie in der vorliegenden Arbeit, die Gesamtleber von Mäusen untersucht

wurde. Insgesamt deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass IL-1 β kein direktes Target der Tlr9 Defizienz ist.

5.2.1 Fibrose

Bei allen drei in dieser Arbeit angewandten Methoden zur Bestimmung der Leberfibrose konnte bei den Wildtyp-Mäusen ein signifikanter altersassoziierter Anstieg der Leberfibrose beobachtet werden, während dieser bei den Mäusen mit einer genetischen Deletion von Tlr9 ausblieb. Die Tlr9-Deletion konnte bei der Sirius-Red-Färbung, der Expression von α sma und der Expression von TGF β 1 einen protektiven Effekt gegenüber der altersassozierten Leberfibrose aufweisen. Einen protektiven Effekt der Tlr9-Deletion auf die Leberfibrose konnten bereits Gäbele et al. (2008) beobachten. In deren Studie wurden die Mäuse nicht gesund altern gelassen, sondern einer Gallengangsunterbindung unterzogen. Bei der anschließenden Sirius-Red-Färbung zeigte sich eine deutlich schwächere Fibrose in den Lebern der Tlr9-defizienten Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (Gäbele et al., 2008).

Auch in den Studien von Jin et al. (2020), Baumann et al. (2021) und Abdelmegeeda et al. (2015) konnte bei der Sirius-Red-Färbung ein signifikanter altersassoziierter Anstieg der Fibrose zwischen jungen und alten Wildtyp-Mäusen festgestellt werden. Diese Ergebnisse unterstreichen die Relevanz der Beobachtung, dass bei einer Tlr9-Deletion in dieser Arbeit kein signifikanter altersassoziierter Anstieg der Leberfibrose zu erkennen war.

Gäbele et al. (2008) konnten bei Tlr9-defizienten Mäusen nach der Intervention ebenfalls eine geringere α sma-Expression im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen feststellen. Auch Abu-Tair et al. (2013) berichteten von einem protektiven Effekt einer Tlr9-Deletion auf fibrotische Veränderungen in der Leber von Mäusen, nachdem diese über vier Wochen mit einem Tetrachlormethan-Fibrosemodell behandelt wurden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass CpG-DNA (und mtDNA) die Aktivierung von hepatischen Sternzellen (HSCs) induziert und somit die Leberfibrose fördert (Gäbele et al., 2008; Abu-Tair et al., 2013). Bei einer genetischen Deletion von Tlr9 bleibt diese Aktivierung aus, was vor Fibrose schützt.

Im Gegensatz dazu konnte Jin et al. (2020) zwar eine signifikante Erhöhung der fibrotischen Marker in alten Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu jungen Mäusen feststellen, jedoch zeigte der zweite Teil ihrer Studie, bei dem die Leberfibrose von Mäusen mit LBP-Deletion untersucht wurde, keinen protektiven Effekt dieser Deletion. Dies deutet darauf hin, dass Tlr9 einen stärkeren Einfluss auf fibrotische Veränderungen in der Leber hat als Tlr4.

Insgesamt weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf einen protektiven Effekt der genetischen Deletion von Tlr9 auf die altersassoziierten fibrotischen Veränderungen in der Leber hin.

5.3 Der Einfluss einer genetischen Deletion von Tlr9 auf die altersbedingte Apoptose und Seneszenz in der Leber im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen

Bei den in dieser Arbeit gemessenen Markern der Apoptose konnte kein protektiver Effekt einer genetischen Deletion von Tlr9 auf die altersassoziierte Leberapoptose beobachtet werden. Die BAD-mRNA-Expression in der Leber stieg sowohl in der Wildtyp-Gruppe als auch in der Tlr9-defizienten Gruppe im Alter signifikant an. Die Cleaved-Caspase-3-positiven Bereiche stiegen nur bei den Wildtyp-Mäusen im Alter an, bei den Tlr9-defizienten Mäusen konnte sogar eine Abnahme dieser Bereiche beobachtet werden. Dass die BAD-mRNA-Expression im Alter bei Wildtyp-Mäusen ansteigt, stimmt mit den Ergebnissen von Jin et al. (2020) überein.

Dies spricht dafür, dass das Ergebnis auf den Phänotyp der Tlr9-Defizienz zurückzuführen ist, da sowohl bei der BAD-mRNA-Expression als auch bei den Cleaved-Caspase-3-positiven Bereichen die Werte bei den jungen Tlr9-defizienten Mäusen bereits höher lagen als bei den jungen Wildtyp-Mäusen. Damit scheint die Apoptose kein Altersphänomen zu sein, das von Tlr9 beeinflusst wird.

Apoptose ist jedoch nicht per se negativ, es kann vorteilhaft sein, wenn seneszente Zellen durch Apoptose abgebaut werden, um die weitere Freisetzung entzündungsfördernder Botenstoffe zu verhindern (Salminen et al., 2010; Sikora et al., 2010). Die Tlr9-defizienten Mäuse scheinen, selbst wenn die Apoptose unverändert ist, dennoch einen protektiven Effekt auf die im Alter auftretende Fibrose zu haben. Dies könnte darauf hinweisen, dass die durch Apoptose von hepatischen Zellen freigesetzte mtDNA nicht an Tlr9 binden kann. Dies würde bedeuten, dass es sogar vorteilhaft wäre, wenn die Apoptose seneszenten Zellen zunimmt, da diese dann keine proinflammatorischen Botenstoffe freisetzen könnten und die durch die Bindung von mtDNA an Tlr9 vermittelte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine sowie Typ-I-Interferone ausbleibt.

5.3.1 Seneszenz Marker

Dass Marker der Seneszenz, wie P16 und PAI-1, in der Leber von Mäusen im Alter ansteigen, konnte bereits in vorherigen Studien der Arbeitsgruppe beobachtet werden (Baumann et al., 2021; Jin et al., 2020). *Auch in dieser Arbeit konnte ein altersassoziiertes Anstieg der Seneszenz in der Leber nachgewiesen werden. Hinsichtlich des Einflusses einer genetischen Deletion von Tlr9 auf die altersassoziierte Seneszenz in der Leber ergaben sich jedoch keine eindeutigen Ergebnisse.* Die P16-mRNA-Expression zeigte sowohl bei den Wildtyp-Mäusen als auch bei den Tlr9-defizienten Mäusen einen signifikanten altersassoziierten Anstieg, was darauf hindeutet, dass

eine Tlr9-Deletion keinen protektiven Effekt auf die P16-mRNA-Expression hat. Bei der PAI-1-Konzentration konnte ein signifikanter altersassoziierter Anstieg bei den Wildtyp-Mäusen festgestellt werden, der bei den Tlr9-defizienten Mäusen ausblieb. Auch wenn der Unterschied zwischen den beiden Gruppen im Alter relativ gering ist, kann dieses Ergebnis ebenfalls ein Indiz auf den protektiven Effekt einer Tlr9 Deletion auf die Leberfibrose sein, da die Expression von PAI-1 die Fibrose fördert (Matsuo et al., 2005; Eitzman et al., 1996; Wang et al., 2005)

Ein möglicher Grund für das nicht eindeutige Ergebnis hinsichtlich des protektiven Effekts der Tlr9-Defizienz auf die Leber-Seneszenz könnte darin liegen, dass die Mäuse mit einem Alter von 20 Monaten noch nicht ausreichend alt waren, um einen deutlichen Unterschied in der Seneszenz feststellen zu können. Möglicherweise hätten sich im weiteren Verlauf des Alterns stärkere Unterschiede herausgebildet, oder Tlr9 spielt in diesem Zusammenhang insgesamt nur eine untergeordnete Rolle. Dafür bräuchte es in Zukunft die Messungen von weiteren Markern der Seneszenz. Allerdings konnte in der Studie von Abu-Tair et al. (2013) ebenfalls trotz eines protektiven Effekts der Tlr9-Defizienz auf die Leberfibrose nach vierwöchiger Behandlung mit einem Tetrachlormethan-Fibrosemodell ein Anstieg von Seneszenzmarkern wie p15^{INK4B} und SA- β -Gal-positiven Zellen beobachtet werden.

Jin et al. (2020) konnten hingegen bei Mäusen mit einer genetischen LBP-Deletion einen signifikant protektiven Effekt auf die altersassozierte Leberseneszenz nachweisen. Die gegensätzlichen Effekte von Tlr9- und Tlr4-Signalen auf die Leber lassen sich möglicherweise dadurch erklären, dass beide Rezeptoren unterschiedliche Signalwege nutzen. Eine Aktivierung von Tlr4 über den MyD88-abhängigen Signalweg führt zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (Müller, 2008), die stärker mit der Induktion von Leberseneszenz in Verbindung stehen. Über den TIR-Domänen-haltigen Adapter, der Interferon- β induziert (TRIF) -abhängigen Signalweg werden hingegen Typ-I-Interferone ausgeschüttet (Müller, 2008). Bei einer Aktivierung von Tlr9 über den MyD88-abhängigen Signalweg werden sowohl proinflammatorische Zytokine als auch Typ-I-Interferone freigesetzt (Marongiu et al., 2019). Letztere sind insbesondere dafür bekannt, die Aktivierung hepatischer Sternzellen zu fördern und somit zur Entstehung von Leberfibrose beizutragen (Gäbele et al., 2008; Abu-Tair et al., 2013). Möglicherweise gibt es in Abhängigkeit vom Adapterprotein eine „präferierte“ Wirkung, was bedeuten würde, dass die dominantere Immunantwort von Tlr4 in proinflammatorischen Zytokinen besteht, während die kombinierten MyD88-abhängigen Signale von Tlr9 stärker mit Fibrose assoziiert sein könnten.

Es ist jedoch zu beachten, dass sich die Signalwege von Tlr4 und Tlr9 nicht strikt voneinander abgrenzen lassen, da viele Prozesse parallel oder überlappend ablaufen. Zudem kann sich die Expression beider Rezeptoren im Alter zwar erhöhen, jedoch zu unterschiedlichen Zeitpunkten,

wodurch auch die nachgeschalteten Effekte zeitlich versetzt auftreten können. Dennoch könnte dieser Mechanismus erklären, warum eine Tlr9-Defizienz keinen ausgeprägten protektiven Effekt auf die altersbedingte Leberseneszenz zeigt.

6 Fazit und Ausblick

Zusammengefasst weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass eine genetische Deletion von Tlr9 bei Mäusen einen protektiven Effekt auf den Leberentzündungsscore und die Entstehung von Leberfibrose hat. Dieses Ergebnis lässt sich vermutlich einerseits auf die im Alter zunehmende intestinale Translokation des Tlr9 Liganden CpG-DNA zurückführen, der in Abwesenheit des Rezeptors nicht gebunden werden kann, wodurch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Typ-I-Interferone vermindert bleibt. Andererseits, wie die unveränderten Ergebnisse der Apoptose in dieser Arbeit nahelegen, gelangt die durch Apoptose hepatischer Zellen freigesetzte mitochondriale DNA ebenfalls nicht mehr an ihren Erkennungsrezeptor Tlr9, was eine nachfolgende Entzündungsreaktion und die daraus resultierende Fibrose verhindern kann. Obwohl die in dieser Arbeit erhobenen Marker der Seneszenz kein eindeutiges Ergebnis lieferten, möglicherweise weil die untersuchten Mäuse mit einem Alter von 20 Monaten noch nicht ausreichend alt waren, deutet das Ergebnis der Quantifizierung von Gesamt PAI-1 in der Leber auf einen weiteren protektiven Effekt der Tlr9 Deletion auf die Leberfibrose. Für eine eindeutige Beurteilung des protektiven Einflusses einer Tlr9 Defizienz auf die Leberseneszenz sind zukünftige Studien erforderlich, in denen ältere Tiere untersucht und zusätzliche Seneszenzmarker analysiert werden. Zusätzlich wäre es von besonderem Interesse die mitochondriale Funktion in diesem Zusammenhang zu messen und die Untersuchung, ob eine Tlr9 Defizienz mit einer geringeren altersbedingten Abnahme der mitochondrialen Leistungsfähigkeit einhergeht. Ein solcher Befund könnte die Hypothese stützen, dass eine Tlr9 Defizienz die mitochondriale Dysfunktion als schwächstes Glied des Alterungsnetzwerks verzögern kann.

7 Zusammenfassung

Die durchschnittliche Lebenserwartung ist in den letzten Jahrzehnten stetig gestiegen und hat sich in den vergangenen 120 Jahren in den Industrieländern bei Männern wie auch bei Frauen nahezu verdoppelt. Die Lebenszeit, die in guter Gesundheit verbracht wird (Healthy Life Expectancy, HALE), nimmt jedoch nicht im gleichen Maße zu. Das Altern gilt als multifaktorieller Prozess und ist durch einen Zustand geringgradiger, chronischer Entzündung gekennzeichnet, der auch ohne das Vorliegen einer offensichtlichen Infektion besteht. Dieser Zustand wird als „inflammaging“ bezeichnet. Trotz zahlreicher Studien ist bislang nicht eindeutig geklärt, wie, wann und auf welche Weise das Altern die Gewebe- und Zellfunktionen beeinträchtigt und dadurch zu inflammaging führt. Aktuelle Daten deuten darauf hin, dass Veränderungen des intestinalen Mikrobioms und der Barrierefunktion sowohl zur Entstehung metabolischer Lebererkrankungen beitragen als auch die altersbedingte geringgradige Entzündung beeinflussen können. Eine erhöhte intestinale Permeabilität ermöglicht das Eindringen bakterieller Bestandteile, darunter verschiedener Toll like Rezeptoren (Tlr) -Liganden, in den Blutkreislauf, was zur Hochregulation von Toll-like-Rezeptoren und zur Aktivierung immunologischer Prozesse führt. Für Tlr9 wurde zudem eine signifikante altersassoziierte Zunahme seines Liganden, der CpG-DNA, bei gesund gealterten Menschen und Mäusen nachgewiesen. Zudem könnte die Bindung von Tlr9 an seinen weiteren Liganden, die mitochondriale DNA, zu einer mitochondrialen Dysfunktion und damit zur Alterung beitragen. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss einer genetischen Deletion von Tlr9 auf die altersbedingte Verschlechterung der Leberfunktion zu untersuchen. Hierzu wurden männliche Tlr9-defiziente Mäuse für 20 Monate gesund altern gelassen und anschließend mit gleichaltrigen männlichen C57BL/6J Wildtypmäusen verglichen. Analysiert wurden Parameter der allgemeinen Histologie, der hepatischen Verfettung und Entzündung sowie Marker der Fibrose, Apoptose und Seneszenz. Es zeigte sich ein protektiver Effekt der genetischen Deletion von Tlr9 auf den Leberentzündungsscore und die Entstehung von Leberfibrose. Bei allen drei untersuchten Fibrosemarkern wurde in den Wildtypmäusen ein signifikanter altersassoziiertes Anstieg beobachtet, während dieser Effekt bei den Tlr9-defizienten Mäusen ausblieb. Die Tlr9-Defizienz zeigte hingegen keinen schützenden Einfluss auf die hepatische Fetteinlagerung, die Entzündungsmarker oder die Marker der Apoptose. Bei den beiden untersuchten Seneszenzmarkern, Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1) und p16, zeigte sich ein protektiver Effekt der Tlr9-Defizienz in der Quantifizierung des Gesamt-PAI-1 im Lebergewebe. Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass eine genetische Deletion von Tlr9 protektiv auf die altersassoziierte Entstehung der Leberfibrose wirkt.

8 Summary

Life expectancy has steadily increased over the past decades and has nearly doubled for both men and women in industrialized countries over the last 120 years. However, the period of life spent in good health (Healthy Life Expectancy, HALE) has not increased to the same extent. Aging is considered a multifactorial process and is characterized by a state of low-grade, chronic inflammation that occurs even in the absence of an apparent infection. This condition is commonly referred to as “inflammaging.”. Despite numerous studies, it remains unclear how, when, and by which mechanisms aging impairs tissue and cellular function, thereby contributing to inflammaging. Recent data suggest that alterations in the intestinal microbiome and barrier function may contribute to the development of metabolic liver diseases on the one hand, and influence the low-grade inflammation typically observed during aging on the other. Increased intestinal permeability allows bacterial components, including various Tlr ligands, to enter the bloodstream. This, in turn, leads to the upregulation of different Toll-like receptors (Tlrs), which activate immune and inflammatory processes. For Tlr9, a significant age-associated increase in its ligand, CpG DNA, has already been demonstrated in healthy aged humans and mice. Furthermore, binding of Tlr9 to its other ligand, mitochondrial DNA, may contribute to mitochondrial dysfunction and, consequently, to aging. The aim of this study was to investigate the effect of a genetic deletion of Tlr9 on age-related decline of liver function. To this end, male Tlr9-deficient mice were allowed to age naturally for 20 months and were subsequently compared with age-matched male C57BL/6J wild-type mice. Parameters of general histology, hepatic steatosis and inflammation, as well as markers of fibrosis, apoptosis, and senescence were analyzed. A protective effect of the genetic deletion of Tlr9 was observed with respect to the hepatic inflammation score and the development of liver fibrosis. For all three fibrosis markers examined, a significant age-associated increase was detected in wild-type mice, whereas this effect was absent in Tlr9-deficient animals. In contrast, Tlr9 deficiency showed no protective effect on hepatic fat accumulation, inflammatory markers, or markers of apoptosis. For the two senescence markers analyzed, Plasminogen Activator Inhibitor 1 (PAI-1) and p16, Tlr9 deficiency demonstrated a protective effect in the quantification of total PAI-1 in liver tissue. In summary, the results indicate that genetic deletion of Tlr9 exerts a protective effect on the age-associated development of liver fibrosis.

9 Literaturverzeichnis

- Abdelmegeed, M. A., Choi, Y., Ha, S. & Song, B. (2015). Cytochrome P450-2E1 promotes aging-related hepatic steatosis, apoptosis and fibrosis through increased nitroxidative stress. *Free Radical Biology And Medicine*, 91, 188–202. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.12.016>
- Abu-Tair, L., Axelrod, J. H., Doron, S., Ovadya, Y., Krizhanovsky, V., Galun, E., Amer, J. & Safadi, R. (2013). Natural Killer Cell-Dependent Anti-Fibrotic Pathway in Liver Injury via Toll-Like Receptor-9. *PLoS ONE*, 8(12), e82571. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082571>
- Allen, S. E. (2002). *The liver: Anatomy, physiology, disease and treatment*. North Eastern University Press. Available from: <http://ebookbrowse.com/the-liver-pdf-d18204398>.
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N. & Patel, H. R. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review Of Molecular Diagnostics*, 5(2), 209–219. <https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.209>
- Barton, G. M., Kagan, J. C. & Medzhitov, R. (2005). Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nature Immunology*, 7(1), 49–56. <https://doi.org/10.1038/ni1280>
- Bauer, S., Kirschning, C. J., Häcker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H. & Lipford, G. B. (2001). Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 98(16), 9237–9242. <https://doi.org/10.1073/pnas.161293498>
- Baumann, A., Hernández-Arriaga, A., Brandt, A., Sánchez, V., Nier, A., Jung, F., Kehm, R., Höhn, A., Grune, T., Frahm, C., Witte, O. W., Camarinha-Silva, A. & Bergheim, I. (2021). Microbiota profiling in aging-associated inflammation and liver degeneration. *International Journal Of Medical Microbiology*, 311(4), 151500. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2021.151500>
- Brandt, A., Baumann, A., Hernández-Arriaga, A., Jung, F., Nier, A., Staltner, R., Rajcic, D., Schmeer, C., Witte, O. W., Wessner, B., Franzke, B., Wagner, K., Camarinha-Silva, A. & Bergheim, I. (2022). Impairments of intestinal arginine and NO metabolisms trigger aging-associated intestinal barrier dysfunction and ‘inflammaging’. *Redox Biology*, 58, 102528. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102528>
- Brandt, A., Kromm, F., Hernández-Arriaga, A., Sánchez, I. M., Bozkir, H. Ö., Staltner, R., Baumann, A., Camarinha-Silva, A., Heijtz, R. D. & Bergheim, I. (2023). Cognitive Alterations in Old Mice Are Associated with Intestinal Barrier Dysfunction and Induced Toll-like Receptor 2 and 4 Signaling in Different Brain Regions. *Cells*, 12(17), 2153. <https://doi.org/10.3390/cells12172153>
- Cevenini, E., Monti, D. & Franceschi, C. (2012). Inflamm-ageing. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 16(1), 14–20. <https://doi.org/10.1097/mco.0b013e32835ada13>
- Collaborators, G. D. (2020). Global age-sex-specific fertility, mortality, healthy life expectancy (HALE), and population estimates in 204 countries and territories, 1950–2019: A comprehensive demographic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*, 396(10258), 1160–1203. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30977-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30977-6)
- Conn, P. M. (2008). Sourcebook of Models for Biomedical Research. In *Humana Press eBooks*. <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-285-4>

Cook, S., Weitzman, M., Auinger, P., Nguyen, M. & Dietz, W. H. (2003). Prevalence of a Metabolic Syndrome Phenotype in Adolescents. *Archives Of Pediatrics And Adolescent Medicine*, 157(8), 821. <https://doi.org/10.1001/archpedi.157.8.821>

Dattani, S., Rodés-Guirao, L., Ritchie, H., Ortiz-Ospina, E., & Roser, M. (2023). “Life Expectancy” veröffentlicht auf OurWorldinData.org. Abgerufen am 07.11.2025 von: 'https://ourworldindata.org/life-expectancy' [Online Resource]

De Dios, R., Nguyen, L., Ghosh, S., McKenna, S. & Wright, C. J. (2020). CpG-ODN-mediated TLR9 innate immune signalling and calcium dyshomeostasis converge on the NFκB inhibitory protein IκBβ to drive IL1α and IL1β expression. *Immunology*, 160(1), 64–77. <https://doi.org/10.1111/imm.13182>

Delire, B., Stärkel, P. & Leclercq, I. (2015). Animal Models for Fibrotic Liver Diseases: What We Have, What We Need, and What Is under Development. *Journal Of Clinical And Translational Hepatology*, 3(1), 53–66. <https://doi.org/10.14218/jcth.2014.00035>

Dudek, J. (2017). Role of Cardiolipin in Mitochondrial Signaling Pathways. *Frontiers in Cell And Developmental Biology*, 5, 90. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00090>

Durand, F., Levitsky, J., Cauchy, F., Gilgenkrantz, H., Soubrane, O. & Francoz, C. (2018). Age and liver transplantation. *Journal Of Hepatology*, 70(4), 745–758. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.12.009>

Eaton-Bassiri, A., Dillon, S. B., Cunningham, M., Ryczyn, M. A., Mills, J., Sarisky, R. T. & Mbow, M. L. (2004). Toll-Like Receptor 9 Can Be Expressed at the Cell Surface of Distinct Populations of Tonsils and Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Infection And Immunity*, 72(12), 7202–7211. <https://doi.org/10.1128/iai.72.12.7202-7211.2004>

Eitzman, D. T., McCoy, R. D., Zheng, X., Fay, W. P., Shen, T., Ginsburg, D. & Simon, R. H. (1996). Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in transgenic mice that either lack or overexpress the murine plasminogen activator inhibitor-1 gene. *Journal Of Clinical Investigation*, 97(1), 232–237. <https://doi.org/10.1172/jci118396>

Ferrucci, L. & Fabbri, E. (2018). Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nature Reviews Cardiology*, 15(9), 505–522. <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0064-2>

Fitzgerald, K. A. & Kagan, J. C. (2020). Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell*, 180(6), 1044–1066. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.041>

Franceschi, C. & Campisi, J. (2014). Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases. *The Journals Of Gerontology Series A*, 69(Suppl 1), S4–S9. <https://doi.org/10.1093/gerona/glu057>

Franceschi, C., Capri, M., Monti, D., Giunta, S., Olivieri, F., Sevini, F., Panourgia, M. P., Invidia, L., Celani, L., Scurti, M., Cevenini, E., Castellani, G. C. & Salvioli, S. (2006). Inflammaging and anti-inflammaging: A systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mechanisms Of Ageing And Development*, 128(1), 92–105. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2006.11.016>

Gäbele, E., Mühlbauer, M., Dorn, C., Weiss, T. S., Froh, M., Schnabl, B., Wiest, R., Schölmerich, J., Obermeier, F. & Hellerbrand, C. (2008). Role of TLR9 in hepatic stellate cells and experimental liver

fibrosis. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 376(2), 271–276. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.08.096>

GBD 2019 Demographics Collaborators. (2020). Global age-sex-specific fertility, mortality, healthy life expectancy (HALE), and population estimates in 204 countries and territories, 1950–2019: A comprehensive demographic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, 396(10258), 1160–1203. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30977-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30977-6)

Global Burden of Disease Study. (2021). *Global Burden of Disease Study 2021*. Institute for Health Metrics and Evaluation. <https://www.healthdata.org/gbd/2021>

Hashimoto, C., Hudson, K. L. & Anderson, K. V. (1988). The Toll gene of drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, 52(2), 269–279. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90516-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90516-8)

Hasty, P. & Vijg, J. (2004). Accelerating aging by mouse reverse genetics: a rational approach to understanding longevity. *Aging Cell*, 3(2), 55–65. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9728.2004.00082.x>

He, S. & Sharpless, N. E. (2017). Senescence in Health and Disease. *Cell*, 169(6), 1000–1011. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.015>

Henao-Mejia, J., Elinav, E., Thaiss, C. A., Licona-Limon, P. & Flavell, R. A. (2013). Role of the intestinal microbiome in liver disease. *Journal Of Autoimmunity*, 46, 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2013.07.001>

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. & Akira, S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408(6813), 740–745. <https://doi.org/10.1038/35047123>

Hoare, M., Das, T. & Alexander, G. (2010). Ageing, telomeres, senescence, and liver injury. *Journal Of Hepatology*, 53(5), 950–961. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.06.009>

Holtze, S., Gorshkova, E., Braude, S., Cellerino, A., Dammann, P., Hildebrandt, T. B., Hoeflich, A., Hoffmann, S., Koch, P., Skulachev, M., Skulachev, V. P., Terzibasi Tozzini, E., & Sahm, A. (2021). Alternative animal models of aging research. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, Article 673044. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.660959>

Ilyas, G., Zhao, E., Liu, K., Lin, Y., Tesfa, L., Tanaka, K. E. & Czaja, M. J. (2015). Macrophage autophagy limits acute toxic liver injury in mice through down regulation of interleukin-1 β . *Journal Of Hepatology*, 64(1), 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.08.019>

Janeway, C. A. & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual Review Of Immunology*, 20(1), 197–216. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>

Jin, C. J., Baumann, A., Brandt, A., Engstler, A. J., Nier, A., Hege, M., Schmeer, C., Kehm, R., Höhn, A., Grune, T., Witte, O. W. & Bergheim, I. (2020). Aging-related liver degeneration is associated with increased bacterial endotoxin and lipopolysaccharide binding protein levels. *American Journal Of Physiology-Gastrointestinal And Liver Physiology*, 318(4), G736–G747. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00345.2018>

Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., De Waal Malefyt, R., Kastelein, R. A., Bazan, F. & Liu, Y. (2001). Subsets of Human Dendritic Cell Precursors Express Different Toll-like Receptors and Respond to

- Different Microbial Antigens. *The Journal Of Experimental Medicine*, 194(6), 863–870. <https://doi.org/10.1084/jem.194.6.863>
- Kamada, N., Seo, S., Chen, G. Y. & Núñez, G. (2013). Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature Reviews. Immunology*, 13(5), 321–335. <https://doi.org/10.1038/nri3430>
- Khan, N., Summers, C. W., Helbert, M. R., & Arkwright, P. D. (2010). Effects of age, gender, and immunosuppressive agents on *in vivo* toll-like receptor pathway responses. *Human Immunology*, 71(4), 372–376. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2010.01.018>
- Khwaja, B., Thankam, F. G. & Agrawal, D. K. (2021). Mitochondrial DAMPs and altered mitochondrial dynamics in OxLDL burden in atherosclerosis. *Molecular And Cellular Biochemistry*, 476(4), 1915–1928. <https://doi.org/10.1007/s11010-021-04061-0>
- Kim, I. H., Kisseleva, T. & Brenner, D. A. (2015). Aging and liver disease. *Current Opinion in Gastroenterology*, 31(3), 184–191. <https://doi.org/10.1097/mog.0000000000000176>
- Kim, Y., Brinkmann, M. M., Paquet, M. & Ploegh, H. L. (2008). UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature*, 452(7184), 234–238. <https://doi.org/10.1038/nature06726>
- Kirpich, I. A., Parajuli, D. & McClain, C. J. (2015). The gut microbiome in NAFLD and ALD. *Clinical Liver Disease*, 6(3), 55–58. <https://doi.org/10.1002/cld.494>
- Kobayashi, T., Masumoto, J., Tada, T., Nomiyama, T., Hongo, K. & Nakayama, J. (2007). Prognostic Significance of the Immunohistochemical Staining of Cleaved Caspase-3, an Activated Form of Caspase-3, in Gliomas. *Clinical Cancer Research*, 13(13), 3868–3874. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-06-2730>
- Krieg, A. M., Yi, A., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky, G. A. & Klinman, D. M. (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, 374(6522), 546–549. <https://doi.org/10.1038/374546a0>
- Kromm, F., Bozkir, H. Ö., Brandt, A., Yergaliyev, T., Camarinha-Silva, A. & Bergheim, I. (2025). Aging-related decline in the liver and brain is accelerated by refined diet consumption. *GeroScience*. <https://doi.org/10.1007/s11357-025-01897-y>
- Krug, A., Towarowski, A., Britsch, S., Rothenfusser, S., Hornung, V., Bals, R., Giese, T., Engelmann, H., Endres, S., Krieg, A. M., & Hartmann, G. (2001). Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *European Journal of Immunology*, 31(10), 3026–3037. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(2001010\)31:10](https://doi.org/10.1002/1521-4141(2001010)31:10)
- Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K. A., Monks, B. G., Knetter, C. F., Lien, E., Nilsen, N. J., Espevik, T. & Golenbock, D. T. (2004). TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nature Immunology*, 5(2), 190–198. <https://doi.org/10.1038/ni1028>
- Lee, B. L., Moon, J. E., Shu, J. H., Yuan, L., Newman, Z. R., Schekman, R. & Barton, G. M. (2013). UNC93B1 mediates differential trafficking of endosomal TLRs. *eLife*, 2, e00291. <https://doi.org/10.7554/elife.00291>

- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., & Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86(6), 973–983. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80172-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80172-5)
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194–1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2023). Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*, 186(2), 243–278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.001>
- Mahrouf-Yorgov, M., De L'Hortet, A. C., Cosson, C., Slama, A., Abdoun, E., Guidotti, J., Fromenty, B., Mitchell, C. & Gilgenkrantz, H. (2011). Increased Susceptibility to Liver Fibrosis with Age Is Correlated with an Altered Inflammatory Response. *Rejuvenation Research*, 14(4), 353–363. <https://doi.org/10.1089/rej.2010.1146>
- Majer, O., Liu, B., Woo, B. J., Kreuk, L. S. M., Van Dis, E. & Barton, G. M. (2019). Release from UNC93B1 reinforces the compartmentalized activation of select TLRs. *Nature*, 575(7782), 371–374. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1611-7>
- Marongiu, L., Gornati, L., Artuso, I., Zanoni, I. & Granucci, F. (2019). Below the surface: The inner lives of TLR4 and TLR9. *Journal Of Leukocyte Biology*, 106(1), 147–160. <https://doi.org/10.1002/jlb.3mir1218-483rr>
- Matsuo, S., Lepez-Guisa, J. M., Cai, X., Okamura, D. M., Alpers, C. E., Bumgarner, R. E., Peters, M. A., Zhang, G. & Eddy, A. A. (2005). Multifunctionality of PAI-1 in fibrogenesis: Evidence from obstructive nephropathy in PAI-1-overexpressing mice. *Kidney International*, 67(6), 2221–2238. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00327.x>
- McKelvey, K. J., Highton, J. & Hessian, P. A. (2010). Cell-specific expression of TLR9 isoforms in inflammation. *Journal Of Autoimmunity*, 36(1), 76–86. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2010.11.001>
- Müller, T. C. (2008). Biochemische Analyse von Toll-like Rezeptor 9. Abgerufen am 07.11.2025, von <https://mediatum.ub.tum.de/doc/673662/673662.pdf>
- Newman, L. E. & Shadel, G. S. (2023). Mitochondrial DNA release in innate immune signaling. *Annual Review Of Biochemistry*, 92(1), 299–332. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-032620-104401>
- Ozougwu, J. C., & Eyo, J. E. (2014). Hepatoprotective effects of *Allium cepa* extracts on paracetamol-induced liver damage in rats. *African Journal of Biotechnology*, 13(26), 2679–2688. <https://doi.org/10.5897/AJB2014.13815>
- Pelka, K., Bertheloot, D., Reimer, E., Phulphagar, K., Schmidt, S. V., Christ, A., Stahl, R., Watson, N., Miyake, K., Hacohen, N., Haas, A., Brinkmann, M. M., Marshak-Rothstein, A., Meissner, F. & Latz, E. (2018). The Chaperone UNC93B1 Regulates Toll-like Receptor Stability Independently of Endosomal TLR Transport. *Immunity*, 48(5), 911–922.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.04.011>
- Petersen, K. F., Befroy, D., Dufour, S., Dziura, J., Ariyan, C., Rothman, D. L., DiPietro, L., Cline, G. W. & Shulman, G. I. (2003). Mitochondrial Dysfunction in the Elderly: Possible Role in Insulin Resistance. *Science*, 300(5622), 1140–1142. <https://doi.org/10.1126/science.1082889>

- Randow, F. & Seed, B. (2001). Endoplasmic reticulum chaperone gp96 is required for innate immunity but not cell viability. *Nature Cell Biology*, 3(10), 891–896. <https://doi.org/10.1038/ncb1001-891>
- Reen, D. J. (1994). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Methods in Molecular Biology*, 32, 461–466. <https://doi.org/10.1385/0-89603-268-X:461>
- Resuehr, D. & Spiess, A. (2003). A real-time polymerase chain reaction-based evaluation of cDNA synthesis priming methods. *Analytical Biochemistry*, 322(2), 287–291. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.07.017>
- Saffrey, M. J. (2013). Aging of the mammalian gastrointestinal tract: a complex organ system. *AGE*, 36(3), 9603. <https://doi.org/10.1007/s11357-013-9603-2>
- Salminen, A., Ojala, J. & Kaarniranta, K. (2010). Apoptosis and aging: increased resistance to apoptosis enhances the aging process. *Cellular And Molecular Life Sciences*, 68(6), 1021–1031. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0597-y>
- Schmucker, D. L. (2005). Age-related changes in liver structure and function: Implications for disease ? *Experimental Gerontology*, 40(8–9), 650–659. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.06.009>
- Segnani, C., Ippolito, C., Antonioli, L., Pellegrini, C., Blandizzi, C., Dolfi, A. & Bernardini, N. (2015). Histochemical Detection of Collagen Fibers by Sirius Red/Fast Green Is More Sensitive than van Gieson or Sirius Red Alone in Normal and Inflamed Rat Colon. *PLoS ONE*, 10(12), e0144630. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144630>
- Sikora, E., Arendt, T., Bennett, M. & Narita, M. (2010). Impact of cellular senescence signature on ageing research. *Ageing Research Reviews*, 10(1), 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2010.10.002>
- Slawik, M. & Vidal-Puig, A. J. (2006). Lipotoxicity, overnutrition and energy metabolism in aging. *Ageing Research Reviews*, 5(2), 144–164. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2006.03.004>
- Starkel, P. & Leclercq, I. (2011). Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 25(2), 319–333. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2011.02.004>
- Tabeta, K., Hoebe, K., Janssen, E. M., Du, X., Georgel, P., Crozat, K., Mudd, S., Mann, N., Sovath, S., Goode, J., Shamel, L., Herskovits, A. A., Portnoy, D. A., Cooke, M., Tarantino, L. M., Wiltshire, T., Steinberg, B. E., Grinstein, S. & Beutler, B. (2006). The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nature Immunology*, 7(2), 156–164. <https://doi.org/10.1038/ni1297>
- Takahashi, K., Shibata, T., Akashi-Takamura, S., Kiyokawa, T., Wakabayashi, Y., Tanimura, N., Kobayashi, T., Matsumoto, F., Fukui, R., Kouro, T., Nagai, Y., Takatsu, K., Saitoh, S. & Miyake, K. (2007). A protein associated with Toll-like receptor (TLR) 4 (PRAT4A) is required for TLR-dependent immune responses. *The Journal Of Experimental Medicine*, 204(12), 2963–2976. <https://doi.org/10.1084/jem.20071132>
- Takiishi, T., Fenero, C. I. M. & Câmara, N. O. S. (2017). Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. *Tissue Barriers*, 5(4), e1373208. <https://doi.org/10.1080/21688370.2017.1373208>

- Tan, D. (2024). Mitochondrial dysfunction, a weakest link of network of aging, relation to innate intramitochondrial immunity of DNA recognition receptors. *Mitochondrion*, 76, 101886. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2024.101886>
- Turner, J. R. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Reviews. Immunology*, 9(11), 799–809. <https://doi.org/10.1038/nri2653>
- Tran, L. & Meerveld, B. G. (2013). Age-Associated Remodeling of the Intestinal Epithelial Barrier. *The Journals Of Gerontology Series A*, 68(9), 1045–1056. <https://doi.org/10.1093/gerona/glt106>
- Vancamelbeke, M. & Vermeire, S. (2017). The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Review Of Gastroenterology & Hepatology*, 11(9), 821–834. <https://doi.org/10.1080/17474124.2017.1343143>
- Vanhooren, V. & Libert, C. (2012). The mouse as a model organism in aging research: Usefulness, pitfalls and possibilities. *Ageing Research Reviews*, 12(1), 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.03.010>
- Wang, H., Abbas, K. M., Abbasifard, M., Abbasi-Kangevari, M., Abbastabar, H., Abd-Allah, F., Abdelalim, A., Abolhassani, H., Abreu, L. G., Abrigo, M. R. M., Abushouk, A. I., Adabi, M., Adair, T., Adebayo, O. M., Adediji, I. A., Adekanmbi, V., Adeoye, A. M., Adetokunboh, O. O., Advani, S. M., . . . Bhageerathy, R. (2020). Global age-sex-specific fertility, mortality, healthy life expectancy (HALE), and population estimates in 204 countries and territories, 1950–2019: a comprehensive demographic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, 396(10258), 1160–1203. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30977-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30977-6)
- Wang, H., Vohra, B. P., Zhang, Y. & Heuckeroth, R. O. (2005). Transcriptional Profiling After Bile Duct Ligation Identifies PAI-1 as a Contributor to Cholestatic Injury in Mice *. *Hepatology*, 42(5), 1099–1108. <https://doi.org/10.1002/hep.20903>
- Wang, J., Bair, A. M., King, S. L., Shnayder, R., Huang, Y., Shieh, C., Soberman, R. J., Fuhlbrigge, R. C. & Nigrovic, P. A. (2012). Ly6G ligation blocks recruitment of neutrophils via a β 2-integrin-dependent mechanism. *Blood*, 120(7), 1489–1498. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-404046>
- Wang, M., Chen, F., Lau, J. T. Y. & Hu, Y. (2017). Hepatocyte polyploidization and its association with pathophysiological processes. *Cell Death And Disease*, 8(5), e2805. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.167>
- Wang, M., Chen, F., Li, J., Liu, C., Zhang, H., Xia, Y., Yu, B., You, P., Xiang, D., Lu, L., Yao, H., Borjigin, U., Yang, G., Wangenstein, K. J., He, Z., Wang, X. & Hu, Y. (2014). Reversal of Hepatocyte Senescence After Continuous In Vivo Cell Proliferation. *Hepatology*, 60(1), 349–361. <https://doi.org/10.1002/hep.27094>
- Wang, W., Xu, K., Shang, M., Li, X., Tong, X., Liu, Z., Zhou, L. & Zheng, S. (2023). The biological mechanism and emerging therapeutic interventions of liver aging. *International Journal Of Biological Sciences*, 20(1), 280–295. <https://doi.org/10.7150/ijbs.87679>
- Zanini, G., Selleri, V., Domenech, S. L., Malerba, M., Nasi, M., Mattioli, A. V. & Pinti, M. (2023). Mitochondrial DNA as inflammatory DAMP: a warning of an aging immune system? *Biochemical Society Transactions*, 51(2), 735–745. <https://doi.org/10.1042/bst20221010>

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber*innen der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

Beim Verfassen dieser Masterarbeit habe ich Grammarly verwendet, um grammatikalische und orthografische Fehler zu korrigieren. Mit ChatGPT habe ich die stilistischen Elemente einiger Formulierungen in meinem Text verbessert. Außerdem habe ich DeepL verwendet, um eine erste Version der englischen Zusammenfassung zu übersetzen, wobei ich die zuvor von mir verfasste deutsche Zusammenfassung als Vorlage verwendet habe.

10 Anhang

Tabelle 10: Zusammensetzung Tris-EDTA-Puffer

Substanz	Menge (pro Liter)
Tris Base	1,21 g
EDTA	0,37 g
dH ₂ O	1 L
Tween®20	500 µL

pH-Wert von 9 mit HCl oder NaOH eingestellt

Tabelle 11: Zusammensetzung Mono-Natriumcitrat

Substanz	Menge (pro Liter)
Na-Citrat	2,1411 g
dH ₂ O	1 L

pH-Wert von 6 mit HCl oder NaOH eingestellt

Tabelle 12: Zusammensetzung 10x PBS

Substanz	Menge (pro Liter)
NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	7,62 g
KH ₂ PO ₄	0,77 g

pH-Wert von 7,4 mit HCl oder NaOH eingestellt

1x PBS: 100 mL 10x PBS + 900 mL dH₂O

2x PBS: 200 mL 10x PBS + 800 mL dH₂O

Tabelle 13: Zusammensetzung PBST

Substanz	Menge (pro Liter)
10x PBS	100mL
dH ₂ O	900mL
Tween®20	500µL

Tabelle 14: Verwendete Verdünnungsfaktoren und Extraktionspuffer der Methoden

Methode	Verdünnungsfaktor	Extraktionspuffer
Triglycerid-Extraktion	1:30	2x PBS

Tabelle 15: Zusammensetzung der benötigten Lösungen für die ELISA

Lösung	Menge (pro Liter)
Waschpuffer	500 µL Tween®20 in 1 L ELISA PBS
Reagent Diluent	0,5 g BSA in 50 mL ELISA PBS