

**Rolle des Nod-like Rezeptors Nod2
in der
Salmonellen-induzierten Colitis**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Anne-Kathrin Claes
aus Gießen

Sülfeld, 2013

Erster Gutachter: Prof. Dr. Thomas Roeder

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Guntram A. Grassl

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2013

Zum Druck genehmigt: 08.07.2013

gez. Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl, Dekan

Diese Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe Entzündungsmodelle am Institut für Experimentelle Medizin, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und am Forschungszentrum Borstel, Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften angefertigt. Gefördert wurde das Projekt aus Mitteln des Exzellenzcluster „Entzündung an Grenzflächen“.

„In uns selbst liegen die Sterne unseres Glücks“

Heinrich Heine

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Einleitung.....	1
1.1. <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	1
1.1.1. Wirt-Pathogen Interaktion	1
1.1.2. Colitismodell	4
1.2. Morbus Crohn.....	8
1.3. Nod-like Rezeptoren.....	10
1.3.1. Nod1.....	10
1.3.2. Nod2.....	11
1.3.2.1. Signalweg von Nod2.....	11
1.3.2.2. Rolle von Nod2 in der Immunantwort.....	13
1.3.2.3. Rolle von Nod2 in verschiedenen Krankheiten.....	15
1.4. Zielsetzung	16
2. Material und Methoden	18
2.1. Chemikalien.....	18
2.2. Reagenzien, Medien und Nährlösungen	19
2.3. Kits	20
2.4. Antikörper	21
2.5. Bakterien- und Phagenstämme	21
2.6. Mausstämme.....	22
2.7. Geräte	22
2.8. Software	23
2.9. Bakterien	23
2.9.1. Kultivierung und Aufbewahrung	23
2.9.2. Herstellung von <i>S. Tm</i> Δ <i>msbB</i> Mutanten durch P22-Transduktion.....	23
2.10. Maushaltung.....	26

2.11.	Salmonellen-induziertes Colitis-Modell	26
2.11.1.	Infektion.....	26
2.11.2.	Organentnahme.....	27
2.11.3.	Bestimmung der Keimlast.....	27
2.12.	Histologie.....	27
2.12.1.	Gewebefixierung und Paraffinschnitte	27
2.12.2.	Hämatoxylin und Eosin (H&E)-Färbung	28
2.12.3.	Pathologische Bewertung der Colitis	28
2.12.4.	Azan-Färbung.....	29
2.12.4.1.	Software-basierte Bestimmung des Kollagen-Gehalts	30
2.12.5.	Immunfluoreszenz Färbung	30
2.13.	Molekularbiologische Techniken.....	30
2.13.1.	Isolierung von bakterieller DNA	30
2.13.2.	Isolierung von muriner DNA.....	31
2.13.3.	RNA-Isolierung	31
2.13.4.	PCR zur Genotypisierung.....	31
2.13.5.	Agarose Gel Elektrophorese.....	32
2.13.6.	Reverse Transkription.....	32
2.13.7.	Quantitative <i>Real-time</i> PCR.....	32
2.14.	<i>In vitro</i> Methoden.....	34
2.14.1.	Kultivierung.....	34
2.14.2.	Transiente Transfektion	34
2.14.3.	Stimulierung von transfizierten HEK293 Zellen	35
2.15.	Proteinbestimmung.....	35
2.15.1.	IL-8 ELISA.....	35
2.15.2.	MCP-1 ELISA	35
2.15.3.	IL-1 β ELISA.....	36
2.16.	Statistische Analysen.....	36

3. Ergebnisse	37
3.1. Einfluss von Nod2 auf die Salmonellen-induzierte Colitis.....	37
3.1.1. <i>S. Tm</i> Δ <i>aroA</i> induziert eine vergleichbare intestinale Entzündung in..... C57BL/6J und <i>Nod2</i> ^{-/-} Mäusen	37
3.1.2. <i>S. Tm</i> Wildtyp induziert eine vergleichbare intestinale Entzündung in..... C57BL/6J und <i>Nod2</i> ^{-/-} Mäusen.....	42
3.1.3. <i>S. Tm</i> Δ <i>msbB</i> induziert eine verstärkte intestinale Entzündung in..... <i>Nod2</i> ^{-/-} Mäusen	44
3.1.3.1. Veränderter zeitlicher Verlauf der Keimlast in <i>Nod2</i> ^{-/-} Mäusen	44
3.1.3.2. <i>S. Tm</i> Δ <i>msbB</i> induziert eine verstärkte Immunpathologie im Caecum	46
3.1.3.3. Neutrophile sind an der verstärkten <i>S. Tm</i> Δ <i>msbB</i> -induzierten	49
3.1.3.4. Makrophagen infiltrieren das entzündete Caecum von <i>S. Tm</i> Δ <i>msbB</i> -..... infizierten Mäusen	51
3.1.3.5. Einfluss von Nod2 auf die Genexpression von PRRs in der <i>S. Tm</i> Δ <i>msbB</i> -..... induzierten Colitis	52
3.1.3.6. Einfluss von Nod2 auf die Synthese von Chemo- und Zytokinen in der	54
3.1.3.7. Die Redox-Homöostase wird in der <i>S. Tm</i> Δ <i>msbB</i> -induzierten Colitis von	58
3.1.3.8. Nod2 nimmt keinen Einfluss auf die <i>S. Tm</i> Δ <i>msbB</i> -induzierte Fibrogenese ...	59
3.2. Einfluss von Nod1 auf die akute <i>S. Tm</i> Δ <i>msbB</i> -induzierte Colitis.....	61
3.2.1. <i>S. Tm</i> Δ <i>msbB</i> induziert eine verstärkte Pathologie in <i>Nod1</i> ^{-/-} und DKO..... Mäusen.....	61
3.3. Unterschiedliche Aktivierung von PRRs durch <i>S. Tm</i> Δ <i>msbB</i>	64
3.3.1. LPS von <i>S. Tm</i> Δ <i>msbB</i> weist eine reduzierte Aktivierung von TLR4 auf	64
3.3.2. Gegenseitige Inhibition von Nod2 und TLR4.....	65
3.3.3. Verstärkte TLR2-Reaktivität von <i>S. Tm</i> Δ <i>msbB</i>	67

4. Diskussion	70
4.1. Nod2 nimmt keinen Einfluss auf die <i>S. Tm</i> Δ <i>aroA</i> - oder <i>S. Tm</i> Wildtyp-induzierte Colitis	70
4.2. <i>S. Tm</i> Δ <i>msbB</i> induziert eine verstärkte Colitis in <i>Nod2</i> ^{-/-} Mäusen.....	72
4.2.1. Verzögerte Eliminierung von <i>S. Tm</i> Δ <i>msbB</i>	72
4.2.2. Verstärkte Immunpathologie in <i>Nod2</i> ^{-/-} Mäusen	74
4.2.3. Einfluss von <i>Nod1</i> auf die <i>S. Tm</i> Δ <i>msbB</i> -induzierte Colitis	80
4.3. Unterschiedliche PRRs-Aktivierung durch <i>S. Tm</i> Δ <i>msbB</i>	82
4.4. Fazit: <i>Nod2</i> spielt eine protektive Rolle	86
4.5. Ausblick	89
5. Zusammenfassung	90
6. Summary	91
7. Literaturverzeichnis	92
8. Abbildungsverzeichnis	103
9. Tabellenverzeichnis	104
10. Lebenslauf	105
11. Publikationsliste	107
12. Danksagung	108
13. Eidesstattliche Erklärung	110

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. dest</i>	<i>Aqua destillata</i>
Al ₂ (SO ₄) ₃	Aluminiumsulfat
AMP	Antimikrobielle Peptide
ATG16L1	<i>Autophagy-related protein 16-like 1</i>
BSA	Albumin Fraktion A
<i>C. rodentium</i>	<i>Citrobacter rodentium</i>
CARD	<i>Caspase activating and recruiting domains</i>
CED	Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen
CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i>
DAMP	<i>Danger-associated molecular patterns</i>
DC	Dendritische Zelle
DKO	<i>Nod1^{-/-}/Nod2^{-/-}</i>
DSS	Dextran Natrium Sulfat (<i>Dextran sodium sulphate</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix (<i>Extracellular matrix</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycolbistetraessigsäure
EMR1	<i>EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FCS	Fötale Kälberserum (<i>Fetal calf serum</i>)
<i>H. hepaticus</i>	<i>Helicobacter hepaticus</i>
H5	Phage H5
hBD	Humanes β-Defensin
HD	Humanes α-Defensin
IFN	Interferon
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IKK	IκBα-Kinase
IL	Interleukin
IRAK	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase</i>
iT _H 17	<i>Innate T_H17-Zellen</i>
IVC	Einzelbelüftete Käfige (<i>Individual ventilated cages</i>)
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
KC	<i>Keratinocyte chemoattractant</i>
Kdo	2-Keto-3-Deoxyoctanat

KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
L	Lumen
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
LA	Lymphaggregat
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>Leucine-rich repeat</i>
M	Mukosa
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
M-CSF	<i>Macrophage-stimulating factor</i>
MDP	Muramyl-dipeptid
MEKK4	<i>MAP kinase kinase kinase 4</i>
meso-DAP	Meso-Diaminopimelinsäure
MHC	<i>Histocompatibility complex</i>
MLK	Mesenteriale Lymphknoten
MP	<i>Muscularis propria</i>
MPO	Myeloperoxidase
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaIO ₃	Natriumjodat
NaOH	Natriumhydroxid
NEC	Nekrotisierende Enterocolitis
NEMO	<i>NF-κB essential modulator</i>
NLR	Nod-like Rezeptor
NOD	<i>Nucleotide binding and oligomerization domain</i>
<i>Nod2^{-/-}</i>	B6.129S1-Nod2 ^{tm1Flv/J}
Nos2	Stickoxid Synthase 2
Nramp1	<i>Natural resistance-associated macrophage protein 1</i>
ns	Nicht signifikant
P22	Phage 22
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PepT1	<i>Peptide transporter 1</i>
PMN	Polymorphnukleäre Leukozyten
PRDX4	Peroxiredoxin 4
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>

RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
S. Typhi	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi
S. Tm	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium
SCV	<i>Salmonella-containing vacuole</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat
Slc11a1	<i>Solute Carrier Family 11 (Proton-Coupled Divalent Metal Ion Transporters), Member 1</i>
SM	Submukosa
SPF	Spezifisch-Pathogen-frei
SPI	<i>Salmonella pathogenicity island</i>
T3SS	Typ III Sekretionssystem
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
T _H -Zellen	T-Helfer-Zellen
TLR	Toll-like Rezeptor
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
TNF- α	Tumornekrosefaktor
TRX1	Thioredoxin
ÜN	Über Nacht

1. Einleitung

1.1. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

Jedes Jahr erkranken weltweit bis zu 93,8 Millionen Menschen an einer nicht-typhoiden Salmonellose [1]. Da diese schwere Magen-Darm-Entzündung bis zu 155.000 Todesfälle pro Jahr verursacht, steht die Salmonellose seit vielen Jahren im Fokus der Forschung [1]. Ausgelöst wird sie hauptsächlich von *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (S. Tm), das in Geflügel, Menschen und Rindern eine Gastroenteritis (vorwiegend im Ileum lokalisiert) und in Mäusen eine Colitis (vorwiegend in Caecum und Colon lokalisiert) induziert [2]. Beim Menschen führt die Infektion zu Diarrhö, Erbrechen, intestinaler Entzündung und abdominalen Schmerzen [3]. Die Infektion ist normalerweise selbst-limitierend und dauert meist vier bis sieben Tage an [3].

S. Tm ist ein gramnegatives, begeißeltes Bakterium, das sich fakultativ intrazellulär in Wirtszellen vermehrt. Das Pathogen gelangt oral über verunreinigte Lebensmittel oder Trinkwasser in den Magen-Darm-Trakt und dringt dort über verschiedene Mechanismen in die Epithelschicht des Darms ein [2, 4]. Dabei wird das Bakterium entweder vom Wirt durch M-Zellen oder Dendritischen Zellen (DC) aufgenommen oder das Bakterium kann selbst aktiv in die Zelle invadieren. M-Zellen sind spezialisierte Epithelzellen, die vor allem in den Peyerschen Plaques des Dünndarms vorkommen und können mittels Endozytose Antigene oder Bakterien aus dem Darmlumen aufnehmen [2]. Mit den Peyerschen Plaques sind außerdem verschiedene DC-Unterklassen assoziiert, die entweder über Zellfortsätze Bakterien aus dem Darmlumen oder bereits in das Gewebe eingedrungene Bakterien phagozytieren [2]. *Salmonella* kann aber auch selbst durch aktive Invasion in Enterozyten eindringen oder durch die Zerstörung von Tight Junctions, welche Epithelzellen miteinander verbinden, parazellulär tiefer in das Gewebe infiltrieren.

1.1.1. Wirt-Pathogen Interaktion

Gelangt S. Tm in den Darmtrakt, wird die Synthese unterschiedlicher Virulenzfaktoren induziert, die unter anderem in Genclustern organisiert sind, die als *Salmonella pathogenicity islands* (SPI) bezeichnet werden [2]. Die beiden Gencluster SPI-1 und SPI-2 kodieren für zwei Typ III Sekretionssysteme (T3SS), die an der Injektion von bakteriellen Proteinen in die Wirtszelle beteiligt sind. Während der frühen Infektionsphase sind vor allem SPI-1-kodierte Effektorproteine wie SipA, SopB, SopE und SopE2 an der Invasion der Enterozyten durch die Umstrukturierung des Zytoskeletts sowie der Spaltung von Tight Junctions beteiligt [2, 5]. Die Injektion SPI-kodierter Proteine löst außerdem verschiedene Abwehrmechanismen der

Wirtszelle aus. Dazu gehört die Aktivierung von Interleukin (IL)-1 β und IL-18, was zur Induktion der Pyroptose [4] sowie zur Rekrutierung von Neutrophilen führt [6, 7, 8]. In Mäusen ist die Induktion der Colitis in der frühen Infektionsphase abhängig von der Expression von SPI-1 [2, 9].

Nachdem *Salmonella* in die Wirtszelle eingedrungen ist, werden die intrazellulären Überlebensprozesse vor allem durch SPI-2-kodierte Proteine gesteuert [10]. Dabei wird die Expression von SPI-2-kodierten Genen durch die Ansäuerung des Phagosoms ausgelöst und das Phagosom wird zu einer *Salmonella-containing vacuole* (SCV) umgebaut [11]. In dieser SCV kann sich *Salmonella* dann der Endosomen-Lysosomen-Fusion entziehen und sich replizieren.

Ein weiterer wichtiger Virulenzfaktor von *S. Tm* ist das Lipopolysaccharid (LPS), das aus Lipid A, dem Kern-Oligosaccharid und dem Polysaccharid O-Antigen gebildet wird, welche kovalent miteinander verbunden sind [12]. In gramnegativen Bakterien ist das Endotoxin Lipid A an der Verankerung von LPS in der äußeren Membran beteiligt. Das Grundgerüst von Lipid A besteht aus zwei Glucosaminen, an das sechs bis sieben Acylgruppen gebunden sind. Während der Lipid A-Biosynthese werden an den Vorläufer Lipid IV_A, der bereits vier Acylgruppen besitzt, zwei 2-Keto-3-Deoxyoctanat (Kdo) gebunden (Abb. 1) [13]. Schließlich addieren Acyltransferasen zwei weitere Acylgruppen an den Lipid A-Vorläufer. Eine Laurylgruppe wird mittels LpxL gebunden und MsbB (auch LpxM oder WaaN) fügt schließlich die sechste Acylgruppe, eine Myristinsäure, an das Lipid A an [13]. *Salmonella* Stämme, bei denen aufgrund einer Deletion MsbB fehlt, können die Myristinsäure nicht an Lipid A binden. In einer *S. Tm* Δ *msbB* Mutante, ist das Lipid A daher pentaacyliert und weist eine reduzierte Toll-like Rezeptor (TLR) 4-Reaktivität auf [14, 15].

Die Struktur von Lipid A ist eng mit seiner Aktivität verbunden und kann durch Acylierungen entscheidend moduliert werden [16]. So wurde bereits gezeigt, dass die Anzahl der Acylgruppen wichtig für die molekulare Konformation von Lipid A ist [17]. Hexaacyliertes Lipid A, welches TLR4 optimal aktivieren kann, weist eine konische Konformation auf, während pentaacyliertes Lipid A zylindrisch ist. Die molekulare Struktur kann auch durch eine unterschiedliche Verteilung der Acylgruppen am Glucosamin-Rückgrat beeinflusst werden, wodurch die Konformation des Rückgrats und die Orientierung der Acylgruppen verändert wird und es dadurch die Bindung an den MD2-TLR4-Rezeptorkomplex beeinflusst [17]. Die Kristallstruktur des MD2-TLR4-Rezeptorkomplex zeigt, dass Lipid A vor allem mit MD2 interagiert [18]. Dabei bilden zwei β -Faltblätter von MD2 eine hydrophobische Bindungstasche mit der die Acylgruppen des Lipid A interagieren können. Fünf Acylgruppen werden in dieser Bindungstasche gebunden, während die sechste Acylgruppe teilweise daraus hervorragt und mit TLR4 interagiert [18]. Daher ist Lipid A an der Dimerisierung von MD2 und TLR4 involviert. Ist Lipid A allerdings pentaacyliert, könnten die fünf Acylgruppen

tiefer in der Bindungstasche liegen und aufgrund der fehlenden sechsten Acylgruppe könnte die Dimerisierung von MD2 und TLR4 beeinträchtigt sein [18]. Jedoch fehlen noch Kristallstruktur-Analysen des MD2-TLR4-Rezeptorkomplexes an den pentaacyliertes Lipid A gebunden ist, um diese Hypothese zu bestätigen.

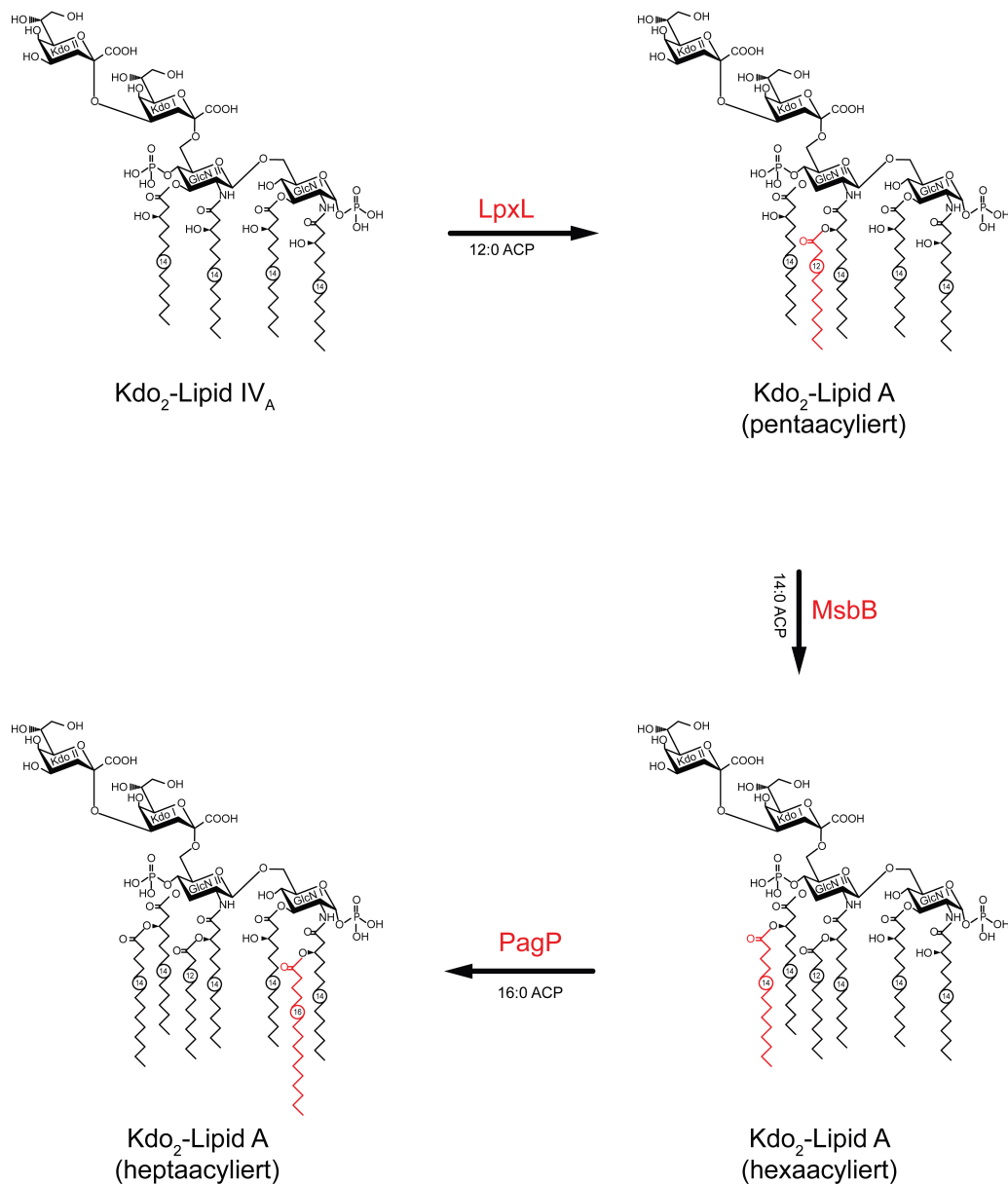


Abb. 1: Sekundäre Acylierungen in der Lipid A-Biosynthese

An den Vorläufer 2-2-Keto-3-Deoxyoctanat (Kdo)-Lipid IV_A wird durch die Acyltransferasen LpxL die fünfte Acylgruppe gebunden. MsbB bindet eine weitere Acylgruppe an das pentaacylierte Lipid A, sodass hexaacyliertes Lipid A gebildet wird. Schließlich kann Lipid A mittels PagP durch die Addition einer siebten Acylgruppe noch weiter modifiziert werden. Modifiziert nach einer Vorlage, die freundlicherweise von Prof. Dr. Ulrich Zähringer zur Verfügung gestellt wurde.

Mittels verschiedener Enzyme kann *Salmonella* die Anzahl der Acylgruppen von Lipid A beeinflussen und dadurch die TLR4-Aktivität und die Immunantwort des Wirts modulieren [12]. So modifiziert beispielsweise die Acyltransferase PagP das Lipid A von *S. Tm* durch die Addition einer Palmitinsäure, was in einem heptaacylierten Lipid A resultiert [19]. Dadurch vermittelt PagP beispielsweise eine erhöhte Resistenz gegen antimikrobielle Peptide (AMPs) und eine reduzierte TLR4-Reaktivität [11].

Als Abwehrmechanismus reagiert der Wirt auf die *S. Tm*-Infektion mit einer massiven Entzündungsreaktion, die durch verschiedene Effektorproteine und *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) induziert wird [20]. Über das T3SS injiziert das Bakterium die SPI-1-kodierten Effektorproteine in die Wirtszelle und induziert die Expression von Chemo- und Zytokinen sowie die Rekrutierung von Immunzellen wie Neutrophilen. Außerdem induzieren PAMPs die Entzündungsreaktion, welche von den *pattern recognition receptors* (PRRs) erkannt werden und darüber das angeborene Immunsystem aktivieren [20].

Die PAMPs von *S. Tm* können durch eine Vielzahl an PRRs erkannt werden. Hieran sind vor allem die Toll-like Rezeptoren (TLR) beteiligt, die zum Beispiel essentiell für eine schnelle Ansäuerung der SCV sind [11]. An der extrazellulären Erkennung von *S. Tm* sind besonders TLR2 (erkennt Lipopeptide), TLR4 (erkennt LPS) und TLR5 (erkennt Flagellin) beteiligt [3, 11, 21]. Intrazellulär können PAMPs neben weiteren endosomalen TLRs auch durch Nod-like Rezeptoren (NLR), wie Nod1 und Nod2 (erkennen Peptidoglykan), NLRC4 (erkennt Flagellin) und NLRP3 (Ligand ist noch unbekannt) erkannt werden [22].

1.1.2. Colitismodell

Im Gegensatz zum Menschen entwickeln Mäuse in Folge einer *S. Tm*-Infektion nur eine leichte Colitis und es manifestiert sich stattdessen eine systemische Infektion, die dem Krankheitsbild des Typhus ähnelt [2]. Typhus wird durch *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*) induziert, welches strikt an den Menschen adaptiert ist [1]. Deshalb kann in der Maus die Infektion mit *S. Tm* als Modell des Typhus verwendet werden [1]. Die *S. Tm*-induzierte Enterocolitis dagegen wurde lange Zeit in anderen Tiermodellen wie der Kuh untersucht [2]. Im Jahr 2003 wurde dann ein Mausmodell für die Untersuchung der *S. Tm*-induzierten Colitis entwickelt [6]. *Salmonella* kolonisiert den Darm von Mäusen nur mit einer niedrigen Keimlast und induziert deshalb nur eine leichte Colitis. Die Mikrobiota spielt hierbei eine wichtige protektive Rolle, indem sie den Wirt vor der Kolonisierung des Pathogens schützt und mit ihm beispielsweise um Nährstoffe konkurriert [7]. Diese protektive Rolle der Mikrobiota wird auch als Kolonisierungs-Resistenz bezeichnet und in der *S. Tm*-induzierten

Colitis ausgenutzt [6]. Dazu werden C57BL/6J Mäuse 24 h vor der *S. Tm*-Infektion mit Streptomycin behandelt, wodurch die Darm-Mikrobiota reduziert wird und *S. Tm* den Darm mit einer höheren Keimlast besiedeln kann [6]. Innerhalb eines Tages entwickeln diese Tiere im Caecum und im proximalen Colon Symptome einer Colitis, die durch eine Ödem-Bildung, Neutrophilen-Infiltration, Becherzell-Entleerung und der Zerstörung des Darmepithels gekennzeichnet ist [6]. Dieses Colitis-Modell ähnelt daher der *S. Tm*-induzierten Enterocolitis beim Menschen und wird seither in der Forschung eingesetzt.

C57BL/6J Mäuse sind aufgrund einer Punktmutation des *natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1)*-Gens (auch bekannt als *solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1 (Slc11a1)*) besonders empfänglich für *S. Tm* Wildtyp-Infektionen und versterben innerhalb von sechs bis neun Tagen [23]. Aus diesem Grund eignen sich diese Tiere nur für Untersuchungen der akuten *S. Tm*-induzierten Colitis. Im Gegensatz dazu tragen beispielsweise 129Sv/Ev Mäuse das Wildtyp-Allel von *Nramp1* und zeigen infolgedessen einen mildereren Krankheitsverlauf [23]. Diese resistenten Mäuse entwickeln ebenfalls eine Colitis, die systemische Infektion ist jedoch milder und verläuft im Gegensatz zu C57BL/6J Mäusen nicht letal und erlaubt daher auch die Untersuchung des chronischen Verlaufs der *S. Tm*-induzierten Colitis [23]. Allerdings stehen die meisten gentechnisch veränderten Mäuse nur auf dem genetischen Hintergrund von C57BL/6J Mäusen zur Verfügung [24], weshalb mit diesem Modell der Einfluss bestimmter Gene nur in der akuten Phase der *S. Tm*-induzierten Colitis untersucht werden kann.

Dieses Problem wurde durch eine Weiterentwicklung des *S. Tm*-induzierten Colitis-Modells von Grassl *et al.* gelöst, indem attenuierte *S. Tm* Stämme eingesetzt wurden [25]. Zudem ermöglicht dieses modifizierte Colitis-Modell nicht nur den Einsatz von gentechnisch veränderten Mäusen, sondern stellt auch ein stabiles und reproduzierbares Mausmodell für die intestinale Fibrose dar [5, 25]. Die intestinale Fibrose ist eine schwerwiegende Komplikation, die bei einigen Morbus Crohn Patienten vorkommt und oft die chirurgische Entfernung des betroffenen Darmabschnitts zur Folge hat. Die Mechanismen die zu dieser Fibrogenese führen sind jedoch größtenteils unklar [26]. Das *S. Tm*-induzierte Colitis & Fibrose-Modell von Grassl *et al.* (Abb. 2) bietet daher die Möglichkeit die Entstehung der intestinalen Fibrose genauer zu untersuchen.

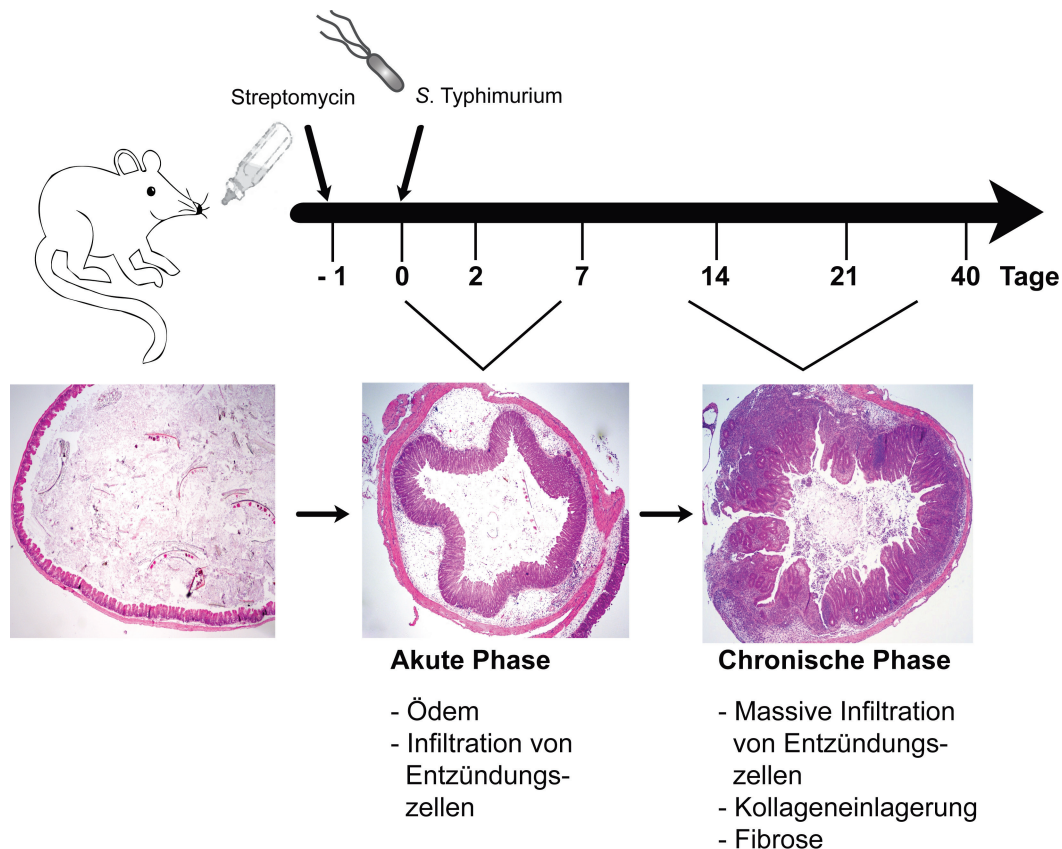


Abb. 2: S. Tm-induziertes Colitis & Fibrose Modell

Dargestellt ist das Infektionsschema des S. Tm-induzierten Colitis & Fibrose Modells. Mäuse werden mittels einer Schlundsonde mit Streptomycin behandelt und nach 24 h mit S. Tm infiziert. In der akuten Infektionsphase entwickeln die Tiere eine Entzündung des Caecums, die durch Ödem-Bildung und Infiltration von Entzündungszellen gekennzeichnet ist. Die Entzündung verstärkt sich im zeitlichen Verlauf weiter und führt zur exzessiven Kollagen-Produktion. Modifiziert nach Grassl *et al.* und McCormick *et al.* [5, 25]

In Streptomycin-behandelten und S. Tm Wildtyp-infizierten 129Sv/Ev Mäusen wird neben einer schweren transmuralen Entzündung auch eine Anreicherung von Extrazellulärer Matrix (ECM) im Caecum beobachtet, die bereits nach sieben Tagen stark ausgebildet [25]. Die ECM, insbesondere Kollagen, ist zu diesem frühen Zeitpunkt vor allem in der Submukosa und Mukosa lokalisiert, die auch stark von Immunzellen infiltriert werden [25]. Der Höhepunkt der Kollagen-Einlagerung wird nach 14 Tagen erreicht, wo das Kollagen massiv in der gesamten Darmwand eingelagert ist [25]. Nach 21 und 40 Tagen nach der Infektion ist das Caecum noch stark mit Kollagen angereichert, jedoch ist die Kollagen-Einlagerung verlagert. Während es an früheren Zeitpunkten der Infektion noch auf die gesamte Darmwand verteilt ist, ist das Kollagen nun vor allem in der Submukosa und der Muskelschicht eingelagert und ähnelt dem fibrotischen Morbus Crohn-Phänotypen im Menschen [25]. Die Kollagen-Anreicherung in diesem Mausmodell ist außerdem mit einer massiven Infiltration der Kollagen-produzierenden Fibroblasten sowie einiger Myofibroblasten assoziiert [25].

Neben der ähnlichen Morphologie der Fibrose wurden noch weitere Zusammenhänge zwischen Morbus Crohn im Menschen und der *S. Tm*-induzierten Fibrose in der Maus festgestellt. So kommt es im Verlauf der *S. Tm*-induzierten Colitis und Fibrose zu einer verstärkten Expression der Fibrose-assoziierten Gene *transforming growth factor (Tgf)- β 1*, *connective tissue growth factor (Ctgf)* und *insulin-like growth factor (Igf)-1* [25]. In dem fibrotischen Gewebe der Mäuse ist außerdem die Genexpression von *procollagen-1* verstärkt, was auch in den fibrotischen Geweben von Morbus Crohn Patienten der Fall ist. Desweiteren induziert die *S. Tm*-Infektion eine verstärkte Expression von *monocyte chemoattractant protein (Mcp)-1*, Tumornekrosefaktor (*Tnf*)- α und *Il-17* [25].

Die Morbus Crohn-ähnliche Pathologie des *S. Tm*-induzierte Colitis & Fibrose-Modells kann auch in C57BL/6J Mäusen nachgestellt werden, allerdings wird für die Infektion der attenuierte Stamm *S. Tm* Δ *aroA* benötigt [25]. Dieser Stamm ist aufgrund seiner geringeren Virulenz im Gegensatz zu *S. Tm* Wildtyp in C57BL/6J Mäusen nicht letal, induziert aber eine intestinale Entzündung und Fibrose, die vergleichbar mit der Fibrose in resistenten 129Sv/Ev Mäusen ist [25]. Das *S. Tm*-induzierte Colitis & Fibrose-Modell von Grassl *et al.* (Abb. 2) stellt daher ein ideales Modell dar, um genetische Risikofaktoren zu untersuchen, die mit Morbus Crohn assoziiert sind.

1.2. Morbus Crohn

Morbus Crohn ist eine transmurale Entzündung des Magen-Darm-Trakts und wird zu den Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen (CED) gezählt. Diese Krankheit ist seit den 1920er Jahren bekannt und mit dem westlichen, industrialisierten Lebensstil assoziiert, weshalb sie als Zivilisationskrankheit bezeichnet wird [27].

Charakteristisch für Morbus Crohn sind der rezidivierende Verlauf und die diskontinuierlich, segmental auftretende intestinale Entzündung [28]. Diese Entzündung kann im gesamten Magen-Darm-Trakt auftreten, bei den meisten Patienten ist allerdings vor allem das terminale Ileum betroffen. Aufgrund der unterschiedlichen Lokalisierung können die Symptome mannigfaltig sein, sodass sich Patienten erstmalig mit Diarrhö, abdominalen Schmerzen, Erbrechen, Blut im Stuhl oder Fieber beim Arzt vorstellen [28].

Der therapeutische Ansatz bei Morbus Crohn setzt seit Jahren an der Unterdrückung der Entzündung und damit der Aufrechterhaltung der Remission an, weshalb insbesondere TNF α -Inhibitoren wie Infliximab eingesetzt werden [28]. Bei mehr als einem Drittel der Patienten entwickelt sich im chronischen Krankheitsverlauf ein fibrostenotischer Phänotyp (Abb. 3) [26], der nicht auf diese Therapie anspricht. Hierbei kommt es aufgrund eines übermäßigen Wundheilungsprozesses zu einer massiven Ablagerung von Kollagen im entzündeten Darmsegment, welche schließlich zu einer Stenose (Verengung) des Darmsegments bis hin zu einem vollständigen Darmverschluss führen [29].

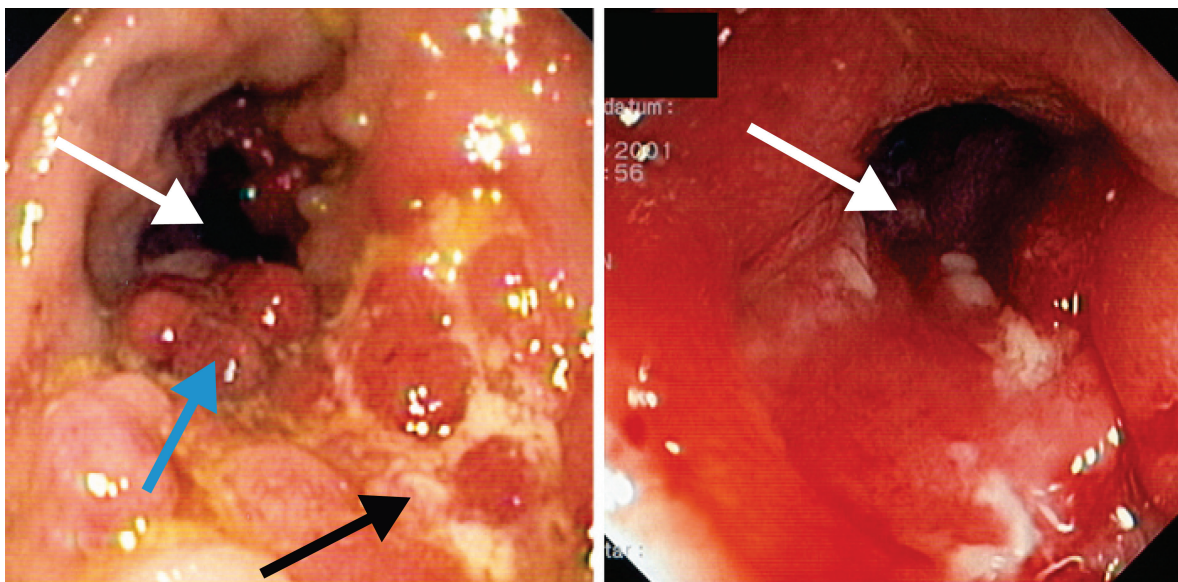


Abb. 3: Fibrose im Colon von Morbus Crohn Patienten

Endoskopische Aufnahmen eines fibrotischen Colons eines Morbus Crohn Patienten. Dargestellt sind Gewebeerstörung (schwarzer Pfeil), Pseudopolypen (blauer Pfeil) und die Verengung des Darmlumens (weiße Pfeile). Modifiziert nach Rieder *et al.* [29]

Welche Mechanismen hinter dieser Morbus Crohn-assoziierten Fibrose stehen sind noch weitgehend ungeklärt, weshalb auch keine kausalen Therapiemöglichkeiten zur Verfügung stehen [29]. Alleine chirurgische Maßnahmen, wie die Strikturoplastik, bei der das fibrotische Darmsegment erhalten werden kann oder die vollständige Entfernung des Darmabschnitts, bieten eine kurzfristige Verbesserung. Allerdings kommt es bei diesem fibrostenotischen Phänotypen in der Regel zur Bildung weiterer Stenosen, sodass diese Patienten erneut chirurgisch behandelt werden müssen [29]. Obwohl der Auslöser des fibrostenotischen noch nicht bekannt ist, wurden bisher eine Reihe unterschiedlicher Zelltypen, wie Fibroblasten, Myofibroblasten und glatte Muskelzellen als Kollagen-Produzenten identifiziert [30]. Insbesondere den Fibroblasten wird eine bedeutende Rolle zugesprochen, so wurde bereits 2001 gezeigt, dass isolierte Fibroblasten von Morbus Crohn Patienten schneller proliferieren und mehr Kollagen sekretieren als Fibroblasten gesunder Probanden [31].

Als Ursache für Morbus Crohn werden neben solchen zellulären Faktoren auch genetische Faktoren, die Ernährung, Rauchen, intestinale Infektionen und die Dysregulation der Wirts-Mikrobiota- sowie der Darm-Homöostase diskutiert [32, 33]. So wurden adhären-invasive *Escherichia coli* (AIEC) Stämme und *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* vermehrt in Morbus Crohn Patienten nachgewiesen [32, 35]. Für Patienten mit einer überstandenen *Salmonella*- oder *Campylobacter*-induzierten Gastroenteritis ist außerdem ein erhöhtes Risiko für CED beschrieben [34]. Da Morbus Crohn besonders gehäuft in Familien auftritt, wurde bereits früh eine genetische Prädisposition diskutiert [35]. Zahlreiche Gene wie das Autophagie-Gen *autophagy-related protein 16-like 1* (ATG16L1) und der PRR Nod2, sind mit der Krankheit Morbus Crohn assoziiert, wobei Nod2 die stärkste Assoziation zu Morbus Crohn aufweist [27, 35].

1.3. Nod-like Rezeptoren

Zu den Nod-like Rezeptoren (NLR) zählen eine Vielzahl an zytosolischen PRRs, die an der Erkennung von *danger-associated molecular patterns* (DAMPs) oder PAMPs beteiligt sind [33]. Sie besitzen eine gemeinsame Grundstruktur mit einer zentralen *nucleotide binding and oligomerization domain* (NOD) und einem *leucine-rich repeat* (LRR) am C-Terminus (Abb. 4) [33].

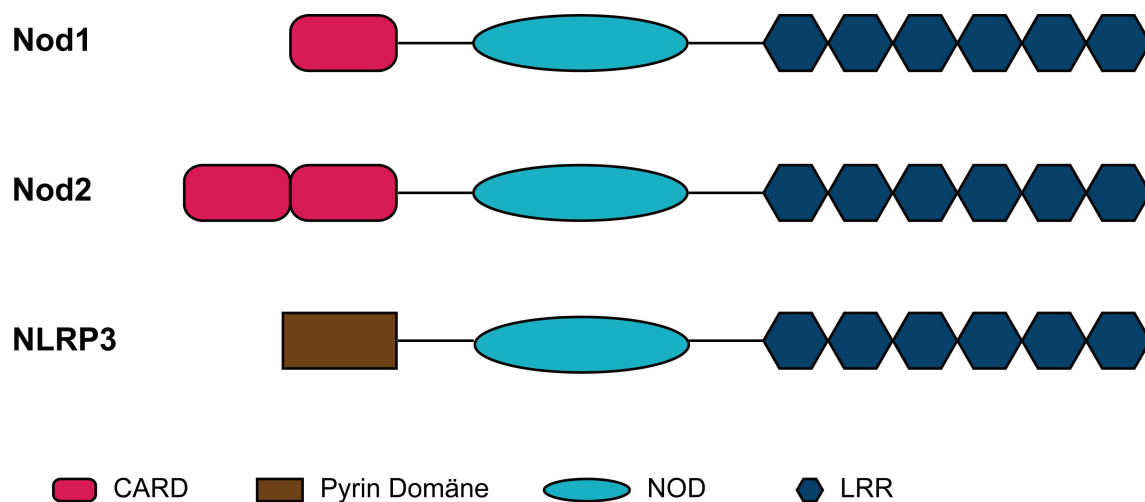


Abb. 4: Schematischer Aufbau der NLR

Exemplarisch sind die NLRs Nod1, Nod2 und NLRP3 dargestellt. Sie besitzen eine gemeinsame Struktur mit der zentralen *nucleotide binding and oligomerization domain* (NOD) und dem *leucine-rich repeat* (LRR) am C-Terminus. Am N-Terminus können entweder *caspase activating and recruiting domains* (CARD) oder eine Pyrin-Domäne sitzen.

Anhand der N-terminalen Domäne können die NLRs klassifiziert werden, sodass Rezeptoren mit einer oder mehreren *caspase activating and recruiting domains* (CARD) zu den NLRCs zählen, während NLRPs eine Pyrin-Domäne besitzen [33]. Nachdem in den letzten Jahren verschiedene Genvarianten der NLRs mit Morbus Crohn assoziiert wurden [27, 35], wird den NLRs eine wichtige Rolle an der Regulation der Wirts-Mikrobiota-Interaktion und der Darm-Homöostase zugesprochen [33].

1.3.1. Nod1

Nod1 zählt gemeinsam mit Nod2 zu den NLRCs und besitzt eine CARD-Domäne (Abb. 4) [36]. Nod1 wird ubiquitär in sämtlichen Zelltypen und Geweben exprimiert [37]. Die Rezeptoren Nod1 und Nod2 besitzen nicht nur strukturelle Ähnlichkeiten, sondern sind auch

beide maßgeblich an der Erkennung von Peptidoglykan beteiligt. Im Gegensatz zu Nod2 bindet Nod1 das Peptidoglykan-Fragment meso-Diaminopimelinsäure (meso-DAP), welches von gramnegativen [38] und wenigen grampositiven Bakterien [39] produziert wird. Nod1 aktiviert RIP2-abhängig NF- κ B und die *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Kaskade, darüberhinaus ist Nod1 auch an der Aktivierung des Typ I-Interferon (IFN)-Signalwegs beteiligt [37, 40, 41]. Desweiteren interagiert Nod1 mit dem Autophagie-Protein ATG16L1 und ist im Zytosol mit der Zellmembran assoziiert [42]. Wie Nod2 wird auch Nod1 im Zusammenhang mit CED diskutiert, allerdings bestätigte sich die genetische Prädisposition in späteren Studien nicht [33, 43, 44].

1.3.2. Nod2

Der Rezeptor Nod2 besitzt im Gegensatz zu Nod1 zwei N-terminale CARD-Domänen und wird ebenfalls zu den NLRs gezählt (Abb. 4) [45]. Entgegen ersten Untersuchungen, die Nod2 hauptsächlich in Monozyten nachwiesen, wurde eine Expression von Nod2 später in allen Geweben belegt [45, 46]. Die Expression in Epithelzellen ist dabei abhängig von der Stimulation mit TNF α oder IFN γ [47].

1.3.2.1. Signalweg von Nod2

Nod2 erkennt Peptidoglykan-Bruchstücke von gramnegativen und grampositiven Bakterien. Muramyldipeptid (MDP) ist die Minimalstruktur von Peptidoglykan, die Nod2 noch aktivieren [48]. Es gibt drei Hauptwege über die MDP in das Zytosol der Wirtszelle gelangt [49]: (1) Mittels Makropinozytose können intrazelluläre Pathogene in nicht-phagozytierende Zellen invadieren und gelangen nach der Formation einer Vakuole schließlich in das Zytosol, wo sich die Bakterien replizieren [50]. Bei der Replikation wird die bakterielle Zellwand umgebaut und bei diesem Prozess gelangen Peptidoglykan-Bruchstücke in das Zytosol. (2) Alternativ kann MDP nach der Phagozytose und Degradation innerhalb des Phagosoms in das Zytosol von Makrophagen oder DCs gelangen [49]. (3) MDP, das extrazellulär degradiert wurde, wird außerdem durch Endozytose aufgenommen [51]. Neben diesen drei Mechanismen wird in der Literatur auch der Plasmamembran-Transporter *peptide transporter* (PepT) 1 diskutiert, der MDP direkt in das Zytosol transportieren kann [52, 53]. Allerdings wurde in PepT1-defizienten Makrophagen keine veränderte Aufnahme von extrazellulären MDP festgestellt, weshalb die Rolle von PepT1 weiter charakterisiert werden muss [51, 52, 53].

Im Zytosol wird MDP an Nod2 gebunden und aktiviert so dessen Signalweg [54]. Die Bindung von MDP führt zu einer Konformationsänderung des LRRs, woraufhin Nod2 homodimerisiert und das Adaptorprotein RIP2 über dessen CARD-Domäne rekrutiert wird [45, 55, 56]. RIP2 wird dann poly-ubiquitiniert und rekrutiert zum einen den Tak1/Tab 1, 2, 3 Komplex und poly-ubiquitiniert zum anderen NF- κ B *essential modulator* (NEMO), was in der Phosphorylierung und Aktivierung des I κ B α -Kinase (IKK)-Komplex resultiert [53, 57]. Dies führt schließlich zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und zur Expression von NF- κ B-regulierten Genen wie IL-1 β [55].

Neben dem NF- κ B-abhängigen Signalweg kann Nod2 auch MAPKs aktivieren, allerdings ist die Interaktion von Nod2 mit diesem Signalweg noch wenig untersucht [53]. So führt die Stimulation von Nod2 mit MDP zur Phosphorylierung von *extracellular signal-regulated kinase* (ERK)1/2, *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) und p38, welche zu den MAPK zählen [58, 59]. Diese Nod2-abhängige Aktivierung von JNK und p38 ist außerdem abhängig von dem Adaptorprotein CARD9, das vor allem in lymphatischen Geweben exprimiert wird [60].

Nod2 ist ein zytosolisches Protein, das aber in das Zytoskelett eingebunden ist. So zeigten Analysen des Zytoskeletts, dass Nod2 mit dem Membran-assoziierten F-Aktin interagiert und über aktiviertes Rac1 auch an den Membranausstülpungen gebunden ist, welche bei der Aktin-vermittelten Phagozytose ausgebildet werden [61]. Da das Zytoskelett bei der Invasion von Pathogenen umstrukturiert wird, stellt diese zelluläre Lokalisierung von Nod2 auch eine positive Rückkopplung des Signalwegs dar, denn dessen Zerstörung induziert ebenfalls eine verstärkte Nod2-abhängige NF- κ B-Aktivierung [61].

Zwischen dem Immunsystem des Darms und der angesiedelten Mikrobiota herrscht eine Symbiose. Dabei muss das Immunsystem zwischen der Mikrobiota und Pathogenen unterscheiden können, um die intestinale Homöostase aufrechtzuerhalten [62, 63]. NLR sind an dieser Regulation beteiligt und müssen deshalb selbst stringent reguliert werden. In den vergangenen Jahren wurden bereits mehrere Negativ-Regulatoren beschrieben, die den Nod2-Signalweg beeinflussen. Dazu gehört eine Splice-Variante von Nod2, Nod2-S, welche eine verkürzte CARD2-Domäne besitzt [64]. Mittels der intakten NOD-Domäne kann Nod2-S mit Nod2 oligomerisieren und konkurriert deshalb mit anderen Nod2-Proteinen um die Homodimerisierungsdomäne. Der Nod2/Nod2-S Komplex kann RIP2 rekrutieren, aber die weitere Aktivierung der IKK-Kaskade und die Aktivierung von NF- κ B sind inhibiert [64]. Das Protein Erbin wurde auch als Regulator von Nod2 identifiziert. Es ist zusammen mit Nod2 an der Plasmamembran lokalisiert und inhibiert die Nod2-abhängige Aktivierung von NF- κ B [65, 66]. Obwohl es keine direkte Interaktion zwischen Nod2 und dem Caspase/IL-1 β -Signalweg gibt, wurde Caspase-12 als Negativ-Regulator von Nod2 identifiziert [67]. Dieser

Regulationsmechanismus adressiert ebenfalls die Nod2-vermittelte Aktivierung von NF- κ B, indem Caspase-12 RIP2 bindet und dadurch dessen Ubiquitinierung verhindert.

Die spontane Oligomerisierung und damit die unkontrollierte Aktivierung von Nod2 wird über zwei verschiedene Mechanismen verhindert. Im inaktiven Zustand ist die NOD-Domäne von Nod2 von der LRR-Domäne verdeckt [55]. Erst durch die Bindung von MDP kommt es zu einer Konformationsänderung, sodass die LRR-Domäne die NOD-Domäne für die Oligomerisierung freigibt. Der zweite Mechanismus wird über das Adaptorprotein RIP2 reguliert. In der nicht-stimulierten Zelle ist die MAP *kinase kinase kinase* (MEKK) 4 mit RIP2 assoziiert und verhindert die spontane Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs [68]. Erst durch die Bindung von MDP an Nod2 gibt MEKK4 RIP2 frei und die Inhibition des Signalwegs wird aufgehoben.

1.3.2.2. Rolle von Nod2 in der Immunantwort

Die Autophagie ist ein Prozess, der dem Abbau von zytosolischem Material, wie Zellorganellen aber auch Bakterien dient [69]. Nach der Formierung der Autophagosomen fusionieren sie mit Endo- und Lysosomen, sodass das zytosolische Material lysosomal abgebaut werden kann. Da auch Bakterien von Autophagosomen aufgenommen werden können, ist die Autophagie ebenfalls an der Immunabwehr von Pathogenen beteiligt. Sie wird von dem bakteriellen Nod2-Liganden MDP induziert, was sowohl von Nod2 als auch von ATG16L1 abhängig ist [70]. Desweiteren wurde gezeigt, dass Nod2 mit ATG16L1 interagieren kann und diese Proteine beide an der Plasmamembran lokalisiert sind [42]. Da die MDP-abhängige Induktion der Autophagie unabhängig von dem Nod2-Adaptorprotein RIP2 ist, stellt dieser Weg einen alternativen, NF- κ B-unabhängigen Nod2-Signalweg dar. So wurde auch gezeigt, dass Nod2-Mutationen, die mit Morbus Crohn assoziiert sind, zu einer weniger effektiven Formation von Autophagosomen führen, da ATG16L1 nicht mehr an die Plasmamembran rekrutiert wird [42]. Die Stimulation mit MDP führt außerdem zu einer erhöhten Expression von *major histocompatibility complex* (MHC)-Klasse II auf der Zelloberfläche [69]. Daher führt Nod2 zu einer verstärkten Antigenpräsentation und beeinflusst indirekt auch die Antigen-spezifische adaptive Immunabwehr [71].

Durch die Interaktion mit anderen Komponenten des Immunsystems, wie den TLRs, kann Nod2 Einfluss auf die proinflammatorische Immunantwort nehmen. Dieser regulatorische Einfluss ist vor allem für die Interaktion mit TLR2 und TLR4 beschrieben [63, 72]. Werden Darmzellen zuerst mit MDP stimuliert und dann TLR2 oder TLR4 aktiviert, wird die Barrierefunktion der Zellen gestärkt und die Zytokinproduktion gesteigert [63, 72]. Auch in humanen Fibroblasten wird eine verstärkte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen

detektiert, wenn Nod2 und TLR2 oder Nod2 und TLR4 gleichzeitig stimuliert werden [73]. Dies wurde ebenfalls für Makrophagen bestätigt, bei denen eine MDP-Stimulation die LPS-induzierte Expression von *Tnf α* und anderen proinflammatorischen Zytokinen verstärkt [74]. Gleichzeitig führt die Aktivierung von TLR4 zu einer verstärkten Expression von *Nod2*. Bei der Blockierung des Nod2-Signalwegs hingegen führt die Aktivierung von TLR4 zu einer überschießenden proinflammatorischen Immunantwort [74]. Nod2 ist deshalb ein Negativ-Regulator von TLR4. Dieser Effekt auf TLR4 konnte auch *in vivo* bestätigt werden [75]. In isolierten Enterozyten von neugeborenen Mäusen wird hierbei die *Tlr4*-Expression sowie die Produktion von TLR4-induzierten Zytokinen durch die Stimulation mit MDP inhibiert. In Mäusen wurde außerdem die Rolle von Nod2 als protektiver Regulator an der nekrotisierenden Enterocolitis (NEC) nachgewiesen [75]. NEC ist eine plötzlich auftretende, nekrotisierende Entzündung des Dickdarms und betrifft beim Menschen häufig Frühgeborene. In neugeborenen Mäusen kann NEC durch die Stimulation mit LPS nachgestellt werden. Die vorherige Stimulation mit MDP schwächt NEC allerdings deutlich ab [75]. Bei NEC ist Nod2 daher protektiv und wirkt einer überschießenden TLR4-Immunantwort entgegen. Dieser Mechanismus wurde bisher allerdings nur in neugeborenen Mäusen beschrieben [75]. Diese Daten weisen Nod2 eine duale Funktion an der Regulation der TLR-Immunantwort zu, da zum einen die Ko-Stimulation zu einer Verstärkung der Immunantwort führt [72, 73, 74], zum anderen Nod2 Liganden-unabhängig auch negativ regulatorisch in den TLR4-Signalweg eingreift [74].

Hedl *et al.* verifizierte diese Nod2-induzierte Toleranz gegen bakterielle Produkte [76]. In dieser Studie wurde durch wiederholte MDP-Stimulationen *in vitro* eine Toleranz gegen Lipid A erzeugt. Während an den frühen Zeitpunkten ein synergistischer Effekt zwischen Nod2 und TLR4 beobachtet wurde, trat im späteren Versuchsverlauf eine MDP-abhängige Toleranz von LPS auf [76]. Dies ging mit einer Inhibition der *interleukin-1 receptor-associated kinase* (IRAK)1-Aktivität und der Induktion des IRAK1-Inhibitors IRAK-M einher. Da IRAK1 über die Bindung an MyD88 am TLR-Signalweg beteiligt ist, stellt dieser Mechanismus eine negative Rückkopplung zwischen Nod2 und TLR4 dar [76].

Für die Interaktion von Nod2 mit TLR2 gibt es widersprüchliche Angaben in der Literatur. Zuerst zeigte Watanabe *et al.* anhand eines Colitis-Modells, dass Nod2 negativ regulatorisch auf TLR2 einwirkt und so vor einer übermäßigen TLR2-induzierten proinflammatorischen Immunantwort schützt [77]. Im Gegensatz dazu wurde jedoch später gezeigt, dass Nod2 synergistisch auf TLR2 wirkt, da die Stimulation mit beiden Liganden die Barrierefunktion und die Produktion von Chemokinen und Zytokinen erhöht [72, 78]. Dieser Synergismus ist ein Dosis-abhängiger Effekt, der nur durch die Stimulation mit niedrigen MDP-Konzentrationen erzielt wird [78].

Eine klinische Fallstudie deutet außerdem daraufhin, dass Nod2 mit dem TLR5-Signalweg assoziiert ist [79]. In dieser Studie wurde ein Patient beschrieben, der an einer chronischen Yersinien-Infektion erkrankt war und neben einer Mutation des *TLR5*-Gens auch eine mit Morbus Crohn-assoziierte Nod2-Mutation aufwies. Trotz des erhöhten Morbus Crohn-Risikos und der manifestierten Yersinien-induzierten Colitis, zeigte der Patient keine Morbus Crohn-assoziierten Symptome. Da TLR5-Mutationen nur schwach mit Morbus Crohn assoziiert sind, schlussfolgerten die Autoren, dass die TLR5-Mutation einen protektiven Effekt auf die Morbus Crohn-assoziierte *Nod2*-Mutation hatte [79].

1.3.2.3. Rolle von Nod2 in verschiedenen Krankheiten

Nachdem Nod2 von Ogura *et al.* als NLR identifiziert wurde, wurden verschiedene Nod2-Mutationen in einer genetischen Studie als Risikofaktor für Morbus Crohn identifiziert [35, 45]. Eine *frameshift*-Variante von Nod2 durch die Insertion von Cytosin, führt zu der Substitution von Leucin an der Position 1007 (Leu1007fsinsC) und hat den Einbau eines vorzeitigen Stopp-Codons zur Folge, was in einem verkürzten Protein resultiert [54]. Außerdem wurden zwei *missense*-Varianten Gly908Arg und Arg702Trp mit Morbus Crohn assoziiert [54]. Alle drei Mutationen liegen auf oder in der Nähe des Genabschnitts, der die LRR-Domäne kodiert und führen zu einer *loss-of-function* des NF- κ B-abhängigen Nod2-Signalwegs [72, 80]. Diese Nod2-Mutationen sind in Europa und Nordamerika mit Morbus Crohn assoziiert, wurden jedoch bisher nicht in indischen oder chinesischen Morbus Crohn Patienten detektiert [81, 82, 83].

Neben Morbus Crohn ist Nod2 auch mit dem Blau-Syndrom assoziiert [84]. Blau-Syndrom ist eine autosomal-dominante Erkrankung, die sowohl granulomatöse Arthritis, Uveitis als auch knötchenförmige Hautausschläge auslöst. Im Gegensatz zu den Morbus Crohn-assoziierten Nod2-Mutationen ist beim Blau-Syndrom die NOD-Domäne des Rezeptors betroffen und es kommt zu einer verstärkten Aktivierung von NF- κ B und damit zu einer erhöhten proinflammatorischen Immunantwort [54, 85].

Nod2 spielt auch bei Infektionskrankheiten eine wichtige Rolle. So wurden in verschiedenen Maus-Modellen gezeigt, dass Nod2 an der Eliminierung von *Citrobacter rodentium* (*C. rodentium*), *Helicobacter hepaticus* (*H. hepaticus*) oder *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) beteiligt ist [58, 86, 87].

1.4. Zielsetzung

In dieser Arbeit sollte die Rolle von Nod2 in der nicht-typhoidalen Salmonellose und einem Salmonellen-induzierten Modell für intestinale Fibrose untersucht werden.

Nod2 ist ein zytosolischer Mustererkennungsrezeptor des angeborenen Immunsystems und detektiert die bakterielle Zellwandstruktur Peptidoglykan. Wird Nod2 von dem Peptidoglykan-Spaltprodukt MDP aktiviert, wird eine proinflammatorische Immunantwort induziert, die beispielsweise in der Produktion von TNF- α oder IL-1 β resultiert. Mutationen von Nod2 die in einem funktionslosen Rezeptor resultieren, sind Suszeptibilitätsgene für Morbus Crohn. Obwohl die genetische Prädisposition bereits umfassend untersucht wurde, ist die Rolle des Suszeptibilitätsgens Nod2 bei der Entstehung der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung noch unzureichend bekannt. Eine schwerwiegende Komplikation bei Morbus Crohn ist die Entwicklung des fibrostenotischen Phänotyps, der im chronischen Krankheitsverlauf zu einer Stenose des betroffenen Darmsegments führt und oft chirurgische Maßnahmen erfordert. Die Ursachen, die zu dem fibrostenotischen Phänotyps bei Morbus Crohn führen, sind unzureichend untersucht. Darüberhinaus ist nicht bekannt, ob Nod2 in diesen Prozess eingebunden ist. Auch Nod1 ist an der Detektion von Peptidoglykan involviert und es wird diskutiert, ob Nod1 und Nod2 sich gegenseitig kompensieren können. Aus diesem Grund sollte die Rolle von Nod1 analog zu Nod2 in der Salmonella-induzierten Colitis untersucht werden.

In dieser Arbeit sollte das *Salmonella*-induzierte Colitis und Fibrose Modell eingesetzt werden, um in der Maus Morbus Crohn-ähnliche Symptome nachzustellen und so den Einfluss von Nod1 und Nod2 zu untersuchen. Darüberhinaus sollte dieses Modell Einblicke in die nicht-typhoidale Salmonellose bieten.

Diese Analysen sollten an folgenden Mauslinien erfolgen: C57BL/6J Mäuse, die als Wildtyp Kontrollen dienen, sowie *Nod1*^{-/-}, *Nod2*^{-/-} und *Nod1*^{-/-}/*Nod2*^{-/-} Mäuse, die den jeweiligen Rezeptor nicht exprimieren.

Für das Infektionsmodell sollten außerdem verschiedene *S. Tm* Stämme eingesetzt werden, um die Folgen einer akuten Infektion, ausgelöst durch *S. Tm* Wildtyp und den Verlauf der akuten sowie chronischen Phase durch die Infektion mit den attenuierten Stämmen *S. Tm* Δ *aroA* und *S. Tm* Δ *msbB* genauer zu charakterisieren.

Folgende Fragestellungen sollten in dieser Arbeit untersucht werden:

1. Ist Nod2 an der *Salmonella*-induzierten Colitis beteiligt?
 - a. Nimmt Nod2 Einfluss auf die Keimlast?
 - b. Wird die intestinale Entzündung durch Nod2 moduliert?
 - c. Welchen Einfluss hat Nod2 auf die intestinale Fibrose?

2. Welche Rolle spielt Nod1 in der Initiierung der *Salmonella*-induzierten Colitis?
 - a. Nimmt Nod1 Einfluss auf die Keimlast?
 - b. Wird die intestinale Entzündung durch Nod1 moduliert?

3. Welche Faktoren der Mutante *S. Tm ΔmsbB* führen zu einer verstärkten Colitis in *Nod1^{-/-}*, *Nod2^{-/-}* und *Nod1^{-/-}/Nod2^{-/-}* Mäusen?

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

- 2-Propanol (Merck, Darmstadt)
- 37 % Formalin (Merck)
- 6x DNA Ladepuffer (Fermentas, Burlington, Kanada)
- Albumin Fraktion A (BSA) (AppliChem, Darmstadt)
- Alfazym (PAA, Cölbe)
- Aluminiumsulfat ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) (Sigma-Aldrich, München)
- Anillin (Sigma-Aldrich)
- Anillinblau (Sigma-Aldrich)
- *Aqua B. Braun* (B. Braun, Melsungen)
- *Aqua destillata (A. dest)* (Deionisierungsanlage, Forschungszentrum Borstel (FZB))
- Azokarmin G (Sigma-Aldrich)
- Chloroform (Merck)
- DAPI (Life Technologies, Carlsbad, USA)
- DEPC-behandeltes Wasser (Life Technologies, Carlsbad, USA)
- Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2PO_4) (Sigma-Aldrich)
- DMEM (mit L-Glutamin und Natriumpyruvat) (PAN, Aidenbach)
- EGTA (AppliChem)
- Eisessig (Merck)
- Entellan (Merck)
- Eosin Y (Sigma-Aldrich)
- Ethanol (Merck)
- Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich)
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (ICN Biomedicals, Eschwege)
- Ethylenglycolbistetraessigsäure (EGTA) (AppliChem)
- Ethylenglykol (Sigma-Aldrich)
- Fötale Kälberserum (FCS) (Biochrom, Berlin)
- Gentamycin (Sigma-Aldrich)
- Glycerol (Merck)
- Hämatoxylin (Sigma-Aldrich)
- HEPES *Buffer Solution* (PAA)
- Kaliumchlorid (KCl) (Sigma-Aldrich)
- Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) (Sigma-Aldrich)
- Kanamycin (Roth, Karlsruhe)

- LB-Agar (Roth)
- LB-Medium (Roth)
- Lipofectamin (LifeTechnologies)
- *Macrophage-stimulating factor* (M-CSF) (R&D, Minneapolis, USA)
- Natriumchlorid (NaCl) (Sigma-Aldrich)
- Natriumcitrat (Sigma-Aldrich)
- Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃) (Sigma-Aldrich)
- Natriumhydroxid (NaOH) (Sigma-Aldrich)
- Natriumjodat (NaIO₃) (Sigma-Aldrich)
- Natriumlaurylsulfat (SDS) (Merck)
- Orange G (Sigma-Aldrich)
- Paraffin (Sherwood Medical, St. Louis, USA)
- Penicillin/Streptomycin (P/S) (Sigma-Aldrich)
- peqGOLD Universal-Agarose (PeqLab, Erlangen)
- Phosphorwolframsäure (Sigma-Aldrich)
- ProLongGold[®] mit DAPI (Life Technologies)
- Proteinase K (Roche, Basel)
- RNALater[®] (Life Technologies)
- Streptomycin (Sigma-Aldrich)
- Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan (Serva, Heidelberg)
- Tris/HCl (Sigma-Aldrich)
- Triton-x100 (Sigma-Aldrich)
- Trypsin/EDTA (Biochrom)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich)
- Wasserstoffperoxid (Merck)
- Xylol (Merck)
- Ziegen-Serum (PAA)

2.2. Reagenzien, Medien und Nährlösungen

- 4 % Formalin in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS); pH 7,4
- 5 % Phosphorwolframsäure in *A. dest*
- Anillinalkohol: 0,1 % Anillin in 90 % Ethanol
- Anillinblau-Goldorange (3x): 0,5 % Anillinblau, 2 % Orange G, 8 % Eisessig in *A. dest*; aufgeköcht, filtriert und vor Gebrauch 1:3 in *A. dest* verdünnt

- Azokarminlösung: 0,1 % Azokarmin G in *A. dest.*; aufgekocht und filtriert; anschließend Zugabe von 1 % Eisessig
- Blockierungspuffer: 2 % Ziegenserum, 0,1 % Triton-x100, 0,05 % Tween 20 in PBS
- Citrat-Puffer: 10 mM Natriumcitrat, 0,05 % Tween 20 in *A. dest.*, pH 6,0
- EGTA-Lösung (10x): 100 mM EGTA in *A. dest.*; pH 8; steril filtriert
- Eosinlösung: 1 % Eosin in *A. dest.*; filtriert und mit 2-3 Tropfen Eisessig angesäuert
- Essigsäurealkohol: 1 % Eisessig in 96 % Ethanol
- Färbepuffer: 0,1 % TritonX100, 0,05 % Tween 20 in PBS
- Glycerinlösung: 40 % Glycerin in *A. dest.*
- Hämatoxylinlösung nach Gill: 6 g Hämatoxylin, 0,6 g NaIO₃, 52,8 Al₂(SO₄)₃, 150 ml Ethylenglykol, 60 ml Eisessig und 690 ml Leitungswasser
- HEPES Puffer: 100 mmol/l in *A. dest.*, steril filtriert
- Lyse-Puffer (Maus-Genotypisierung): 100 mM Tris/HCl (pH 8), 5mM EDTA (pH 8), 0,2 % SDS, 200 mM NaCl in *A. dest.*
- PBS: 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 9 mM Na₂HPO₄ in *A. dest.*; pH 7,4
- PBST: 0,05 % Tween 20 in PBS
- Proteinase K-Lösung (Maus-Genotypisierung): 10 mg/ml Proteinase K in *Aqua B. Braun*
- Selektive LB-Agarplatten (P22 Transduktion): 10 mM EGTA, 40 µg/ml Kanamycin in LB-Agar
- Zellkulturmedium (HEK283 Zellen): 10 % FCS, 1 % P/S in DMEM

2.3. Kits

- *BD OptEIA Mouse MCP-1 ELISA Set* (BD, Heidelberg)
- *DuoSet Mouse IL-1beta/IL-1F2* (R&D)
- *High Pure RNA Tissue Kit* (Roche Diagnostics, Mannheim)
- *HotStar HiFidelity Polymerase Kit* (Qiagen, Hilden)
- *Human IL-8 CytoSet ELISA* (Life Technologies)
- *LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master* (Roche)
- *Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit* (Roche)

2.4. Antikörper

Tab. 1: Antikörper für immunhistologische Färbungen

Antigen	Spezies	Markierung	Verdünnung	Hersteller
Myeloperoxidase (MPO)	Kaninchen	-	1:100	Thermo Fisher Scientific
E-Cadherin	Maus	-	1:200	Abcam, Cambridge, UK
CD-3	Kaninchen	-	1:100	Abcam
CD-68	Maus	-	1:100	Abcam
IL-17	Kaninchen	-	1:100	Santa Cruz
CD45r	Ratte	-	1:100	Abcam
Kaninchen IgG	Ziege	Alexa Fluor® 488	1:500	Life Technologies
Maus IgG	Ziege	Alexa Fluor® 546	1:500	Life Technologies
Maus IgG	Ziege	Alexa Fluor® 633	1:500	Life Technologies
Ratte IgG	Ziege	Alexa Fluor® 633	1:500	Life Technologies

2.5. Bakterien- und Phagenstämme

Tab. 2: Bakterien- und Phagenstämme

Spezies + Serovar	Stamm	Genotyp	Antibiotika-Resistenz	Herkunft
Phage P22	-	-	-	Prof. Dr. Hensel [14]
Phage H5	-	-	-	Prof. Dr. Hensel [14]
S. Typhimurium	SL1344	Wildtyp	Streptomycin	Prof. Dr. Finlay [88]
S. Typhimurium	SL1344	$\Delta fljB/fliC$	Streptomycin	Prof. Dr. Finlay [89]
S. Typhimurium	SL1344	$\Delta aroA$	Streptomycin	Prof. Dr. Finlay [88]
S. Typhimurium	C5	Wildtyp	-	Dr. Mamat [14]
S. Typhimurium	C5	$\Delta msbB$	Kanamycin	Prof. Dr. Zähringer [14]

S. Typhimurium	SL1344	$\Delta msbB$	Streptomycin/ Kanamycin	Diese Arbeit
S. Typhimurium	SL1344	$\Delta fljB/fliC/msbB$	Streptomycin/ Kanamycin	Diese Arbeit
S. Typhimurium	SL1344	$\Delta aroA/msbB$	Streptomycin/ Kanamycin	Diese Arbeit

2.6. Mausstämme

Tab. 3: In der Arbeit eingesetzte Mausstämme

Stamm	Genetischer Hintergrund	Quelle
C57BL/6J		Prof. Dr. Rosenstiel [90]
<i>Nod2</i> ^{-/-}	C57BL/6J	Prof. Dr. Rosenstiel [90]
<i>Nod1</i> ^{-/-}	C57BL/6J	Prof. Dr. Philpott [9]
<i>Nod1</i> ^{-/-} / <i>Nod2</i> ^{-/-} (DKO)	C57BL/6J	Prof. Dr. Philpott [9]

2.7. Geräte

- Autotechnikon STP120 (Thermo Fisher Scientifics, Waltham, USA)
- AxioCam MR (Zeiss, Wetzlar)
- C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad)
- Dampfgarer (Bomann, Kempen)
- Fluoreszenzmikroskop Axio Observer.Z1 (Zeiss)
- Geldokumentation ChemiDoc2000 (Bio-Rad, München)
- Gelkammer (Bio-Rad)
- Infinite 200 Pro (Tecan, Männedorf, Schweiz)
- Kühlzentrifuge 5415 R (Eppendorf, Hamburg)
- Lichtmikroskop Olympus BX41 (Olympus, Hamburg)
- LightCycler® 480 II (Roche)
- Mehrkanalpipette 10 µl Research® Plus (Eppendorf)
- Mehrkanalpipetten (10 µl und 200 µl) Transferpette® S -8 (Brand, Wertheim)
- Mikrotom RM215RT (LEICA, Nussloch)
- NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific)
- Paraffingießstation LEICA EG1140c (LEICA)
- Paraffin-Streckbad 1052 (GFL, Burgwedel)

- Pipetten-Satz (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl) Research® Plus (Eppendorf)
- PowerPac™ Basic Power Supply (Bio-Rad)
- Rostfreie Stahlperlen 5mm (Qiagen)
- Shandonkammer (Thermo Fisher Scientific)
- Sterilwerkbank (Thermo Fisher Scientific)
- Sunrise™ Reader (Tecan)
- SuperFrost® Plus Objektträger (Thermo Fisher Scientific)
- Thermomixer Comfort (Eppendorf)
- TissueLyser II (Qiagen)
- Vortexer MS 3 Basic (IKA, Staufen)
- Wasserbad JB Aqua 18 (Grant Instruments, Cambridge, UK)

2.8. Software

- Magellan™ – Data Analysis Software (Tecan)
- Microsoft Office Excel 2007
- NIS Elements (Nikon Instruments Inc.)
- GraphPad Prism 5 (GraphPad, La Jolla, USA)

2.9. Bakterien

2.9.1. Kultivierung und Aufbewahrung

S. Tm wurde in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 37°C über Nacht (ÜN) bis zur stationären Phase angezogen. Zur Bestimmung der Keimlast oder zur Selektion spezifischer *S. Tm* Linien, wurden sie auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und bei 37°C ÜN angezogen.

Für die Langzeitlagerung wurden ÜN-Kulturen 1:1 mit einer 40 % Glycerin-Lösung gemischt und bei -80°C eingefroren.

2.9.2. Herstellung von *S. Tm* $\Delta msbB$ Mutanten durch P22-Transduktion

Phage 22 (P22) ist ein Bakteriophage, der *S. Tm* infiziert. Während des lytischen Zyklus schneidet die Nuklease P22 die DNA an der Sequenz *pac*, sodass 48 kb große DNA-Fragmente in neue Phagenköpfe verpackt werden können. Da das Chromosom von *S. Tm*

homologe Sequenzen zu *pac* enthält, wird es ebenfalls durch P22 geschnitten und in Phagenköpfe verpackt. Dieser Mechanismus wird bei der P22-Transduktion ausgenutzt, um gezielt DNA-Sequenzen von einem *S. Tm* Stamm auf weitere Stämme zu transferieren.

Um neue *S. Tm* Mutanten zu generieren, die eine mutierte Genvariante von *msbB* (inkl. Kanamycin Resistenz Genkassette) tragen [14], wurde als Donor *S. Tm* $\Delta msbB$ (Stamm C5) bei 37°C ÜN mit P22 infiziert. Am nächsten Tag wurde die ÜN-Kultur bei 37°C für 20 min mit $CHCl_3$ schüttelnd inkubiert, um die Bakterien zu lysieren und die Phagen freizulassen. Diese Kultur wurde bei 3.500 x g für 2 min zentrifugiert, 30 μ l $CHCl_3$ zu dem Überstand gegeben und das P22-Lysat bei 37°C für 3 h schüttelnd inkubiert.

Von den Empfänger-Linien (*S. Tm* SL1344, *S. Tm* $\Delta aroA$ oder *S. Tm* $\Delta fljB/fliC$) wurden Kulturen bis zur frühen Log-Phase angezogen. Dann wurde eine serielle Verdünnungsreihe (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} und 10^{-4}) des frischen P22-Lysats vorbereitet. Jede Verdünnung wurde dann 1:1 mit der Empfänger-Kultur gemischt, sodass jeder Ansatz ein unterschiedliches P22:*S. Tm* Verhältnis aufwies. Nach 30 minütiger Inkubation auf dem Schüttler bei 37°C zur Adsorption der Phagen wurden 10 nM EGTA zugegeben und erneut schüttelnd bei 37°C für 1 h inkubiert. Um die Bakterien selektieren zu können, die die mutierte *msbB*-Variante aufgenommen hatten, wurden 100 μ l der Kultur auf eine selektive Agarplatte (LB mit 10 mM EGTA und Kanamycin) ausgestrichen und bei 37°C kultiviert. Nach ein bis zwei Tagen wuchsen nur Kolonien, die das mutierte Gen aufgenommen hatten, sie wurden gepickt und auf frischen selektive Platten angereichert.

Obwohl EGTA während der Transduktion zugegeben wurde, um die Formation von Lysogenen zu verhindern, wurden die selektierten *S. Tm* Klone anschließend auf Lysogene hin überprüft. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass Bakterien nur durch einen Bakteriophagen infiziert werden können. Wenn sich der Phage als Lysogen in das bakterielle Chromosom integriert hatte, war das Bakterium resistent gegenüber weiteren Bakteriophagen-Infektionen.

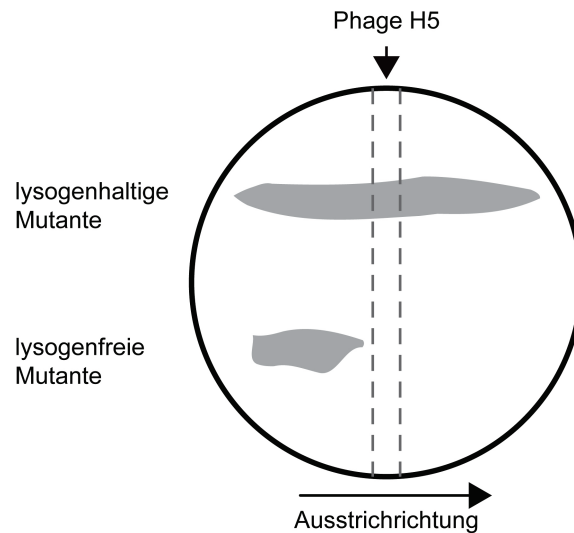


Abb. 5: Lysogen-Test

Nach der P22-Transduktion wurden *S. Tm* Mutanten mittels H5-Infektion auf P22-Lysogene überprüft. Lysogenhaltige Mutanten waren resistent gegen eine H5-Infektion, während lysogenfreie Mutanten von H5 infiziert und lysiert wurden. Diese Klone wuchsen nur vor der mit H5 behandelten Zone.

P22-Lysogene wurden daher mittels einer Infektion mit dem Phagen H5 (H5) identifiziert (). Dazu wurde von einer H5-Lösung eine dünne Linie vertikal auf eine LB-Platte (ohne EGTA) aufgetragen. Nun wurden die *S. Tm* Klone gepickt und senkrecht von links nach rechts durch die H5-Linie verstrichen. Lysogenfreie *S. Tm* Klone konnten nur in dem Bereich links von der H5-Linie wachsen, das Durchstreichen durch die H5-Linie würde zu einer H5-Infektion führen, sodass die Klone rechts von der H5-Linie nicht wachsen könnten. Im Gegensatz dazu waren einige *S. Tm* Klone H5-resistent, sodass sie als lysogenhaltige *S. Tm* Klone identifiziert wurden. Solche *S. Tm* Klone wurden erneut auf selektive Platten ausgestrichen und solange selektiert, bis der gewünschte *S. Tm* Klon lysogenfrei war.

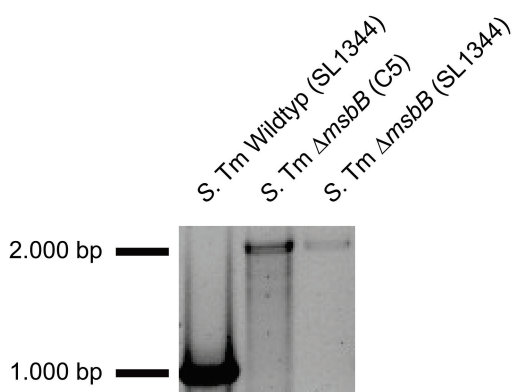


Abb. 6: Genotypisierung von *S. Tm* Mutanten

DNA wurde aus *S. Tm* Mutanten isoliert und der Transfer der *msbB*-Genvariante mittels PCR überprüft. 10 μ l des PCR-Produkts wurde in einem 1% Agarosegel aufgetrennt und die DNA mit Ethidiumbromid angefärbt. Dargestellt ist ein exemplarisches Ergebnis der Empfänger-Linie *S. Tm* Wildtyp (SL1344), des Donors *S. Tm* Δ *msbB* und der neu generierten Mutante *S. Tm* Δ *msbB* (SL1344).

Der erfolgreiche Transfer der *msbB*-Genvariante wurde anschließend mittels PCR (siehe 2.13.4) überprüft. Das PCR-Produkt der *msbB*-Mutante war durch die Kanamycin Resistenz Genkassette 2,3 kb groß, während der *msbB*-Wildtyp in einem 1 kb PCR-Produkt resultierte. Ein exemplarisches Ergebnis der Genotypisierungs-PCR ist in Abb. 6 dargestellt. In dieser Arbeit wurden erfolgreich *S. Tm* $\Delta msbB$ (SL1344), *S. Tm* $\Delta aroA/msbB$ und *S. Tm* $\Delta fljB/fliC/msbB$ mittels P22-Transduktion generiert.

2.10. Maushaltung

C57BL/6J und B6.129S1-Nod2^{tm1Flv}/J (*Nod2*^{-/-}) Mäuse wurden von Prof. Dr. Philip Rosenstiel, Universität zu Kiel, zur Verfügung gestellt. Beide Mauslinien wurden ursprünglich von *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, USA) erworben und *Nod2*^{-/-} Mäuse mit C57BL/6J Mäuse mindestens sieben Generationen zurückgekreuzt [90]. Die Mäuse wurden unter spezifischen-pathogen-freien (SPF) Bedingungen in einzelbelüfteten Käfigen (IVCs) gehalten, die mit Luftfiltern versehen waren. Versuche wurden in der Tierhaltung des FZBs unter S2-Sicherheitsbedingungen durchgeführt. Dieses Tierversuchsvorhaben wurde vom Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein unter der Nummer V312-72241.123-3(65-5/09) genehmigt.

In Abschnitt 3.2 werden Versuche gezeigt, die im Labor von Prof. Dr. Dana J. Philpott an der Universität von Toronto, Kanada, durchgeführt wurden. Die zur Verfügung gestellten C57BL/6, *Nod1*^{-/-}, *Nod2*^{-/-} und *Nod1*^{-/-}/*Nod2*^{-/-} (DKO) Mäuse wurden ebenfalls unter SPF-Bedingungen in IVCs gehalten. Die *Nod2*^{-/-} und DKO Mäuse stammten ursprünglich vom *Pasteur Institute* (Paris, Frankreich) und *Nod1*^{-/-} Mäuse von Millenium Pharmaceuticals (Cambridge, USA). Alle Mauslinien wurden zuvor mit C57BL/6J Mäusen zurückgekreuzt [9, 91]. Dieses Tierversuchsvorhaben wurde zuvor von dem *Animal Ethics Committee of the University of Toronto* genehmigt.

2.11. Salmonellen-induziertes Colitis-Modell

2.11.1. Infektion

Für die Induktion der Colitis wurde den Mäusen 20 mg Streptomycin in 100 ml H₂O mit einer Schlundsonde appliziert. Nach 24 h wurde eine ÜN-Kultur von *S. Tm* mit HEPES Puffer (100 mmol/l) auf eine Keimlast von 3 – 5 x 10⁷/ml (*S. Tm* Wildtyp und *S. Tm* $\Delta aroA$) bzw. 3 – 5 x 10⁸/ml (*S. Tm* $\Delta msbB$) verdünnt und den Mäusen 100 µl mittels Schlundsonde appliziert. Die

Infektionsdosis wurde anschließend anhand einer 1:10-Verdünnungsgreihe des Inokulums (siehe 2.11.3) überprüft.

2.11.2. Organentnahme

Zur Analyse der Salmonellen-induzierten Colitis wurden infizierte Mäuse mittels zervikaler Dislokation nach 2, 7, 14 oder 21 Tagen getötet. Dabei wurde die Bauchdecke geöffnet und das Caecum, Colon und Ileum sowie die mesenterialen Lymphknoten (MLK), Leber und Milz präpariert und die Gesamtgewichte der Darmabschnitte notiert. Für histologische Untersuchungen wurden je 1 cm der Caecumspitze, des Colons und des Ileums, sowie die halbe Milz, ein Teilstück der Leber und ein MLK in 4 % Formalin für 24 h fixiert. Weitere Proben von Caecum, Colon, Ileum und Milz wurden für molekularbiologische Analysen in RNALater® (Ambion) bei -20°C gelagert. Nach diesen Präparationen wurden die Teilgewichte der Darmabschnitte notiert.

2.11.3. Bestimmung der Keimlast

Caecum, Colon und MLK sowie die Hälfte von Ileum, Leber und Milz wurden in 1 ml PBS mittels einer Metallkugel und dem TissueLyser II (Qiagen) 2-4 min bei 30 Hz homogenisiert. Von dem Homogenisat wurden mit PBS 1:10-Verdünnungsreihen angefertigt und 10 µl auf einer LB-Agarplatte in Triplikaten ausgestrichen. Aufgrund der niedrigeren Keimlast der systemischen Organe und des Ileums wurde von diesen Homogenisaten zusätzlich 100 µl unverdünnt auf eine separate LB-Platte ausplattiert. Nach 24 h bei 37°C wurden die Kolonien zur Bestimmung der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) ausgezählt und mittels der Organgewichte für das gesamte Organ berechnet. Das übrige Homogenisat wurde 2 min bei 7.800 g zentrifugiert und die Überstände für spätere Analysen bei -80°C gelagert.

2.12. Histologie

2.12.1. Gewebefixierung und Paraffinschnitte

Gewebeproben wurden für 24 h in 4 % Formalin fixiert und anschließend in einem Autotechnikon (Thermo Fisher Scientific) dehydriert und in Paraffin übertragen (1 h 4 % Formalin, 1 h 70 % EtOH, 1 h 80 % EtOH, 1 h 95 % EtOH, 2x 1 h 100 % EtOH, 2x 1 h Xylol, 1 h Xylol/Paraffin-Intermediat, >1 h Paraffin (65°C)). Die vorbereiteten Proben wurden dann mit Hilfe einer Paraffingießstation (LEICA) in Paraffin eingebettet. Von den in Paraffin-

eingebetteten Darmproben wurden mittels Mikrotom (LEICA) 5 µm dicke Schnitte angefertigt und in *A. dest* mit Raumtemperatur gegeben, um Falten vorsichtig herauszustreichen. Anschließend wurden die Schnitte in 39°C warmem *A. dest* gestreckt, auf SuperFrost®Plus Objektträger (Thermo Fisher Scientific) übertragen und bei 37°C für mindestens 4 h getrocknet. Unmittelbar vor histologischen Analysen wurden die Schnitte mit Xylol (3 x 5 min Xylol) und in einer absteigenden Alkoholreihe (1 min 1:2-Xylol/EtOH-Gemisch, 5 min 100 % EtOH, 5 min 100 % EtOH, dann nacheinander in 100 % EtOH, 96 % EtOH, 80 % EtOH und 40 % EtOH kurz dippen) rehydriert. Nach dem Wässern in *A. dest* waren die Schnitte für anschließende histologische Färbungen vorbereitet.

Die an der Universität Toronto gesammelten Gewebeproben wurden in 10 % Formalin fixiert, an das FZB verschickt und dort wie oben beschrieben dehydriert und in Paraffin eingebettet.

2.12.2. Hämatoxylin und Eosin (H&E)-Färbung

Die H&E-Färbung wurde für die pathologische Bewertung der Colitis verwendet. Deparaffinierte und rehydrierte Schnitte (siehe 2.12.1) wurden 20 min mit Hämatoxylin nach Gill angefärbt und 10 min in Leitungswasser differenziert, um die Zellkerne blau anzufärben. Die Schnitte wurden 2 min in 1 % Eosin gegengefärbt, sodass das Zellplasma rot dargestellt wurde. Anschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (in 96 % EtOH dippen, 1 min 100 % EtOH, 2 min 100 % EtOH) und Xylol (2 x 5 min Xylol) dehydriert und mit Entellan eingedeckt.

2.12.3. Pathologische Bewertung der Colitis

Die Pathologische Bewertung von mit H&E angefärbten Caecum-Schnitten wurde an dem Lichtmikroskop Olympus BX41 (Olympus) durchgeführt. Von jedem Caecum wurde die Entzündung anhand eines detaillierten Bewertungssystems (Tab. 4) beurteilt und nach einem Zahlensystem (in Klammern angegeben) bewertet. Dabei stand der Wert 0 für keine pathologische Veränderung und der Wert 23 für die schwerste pathologische Veränderung. Das Bewertungssystem ist nachfolgend dargestellt:

Tab. 4: Pathologische Bewertungssystem der S. Tm-induzierten Colitis

	Untersuchtes Merkmal	Wert
Lumen	Apoptotische Epithelzellen	Keine (0); ab 10 Zellen (1); moderat (2); Lumen ist dicht gefüllt (3)
	Neutrophile	Keine (0); ab einer Zelle (1); moderat (2); Lumen ist dicht gefüllt (3)
Oberflächenepithel	Desquamation	Keine (0); Vereinzelt unter 30 % (1); großflächig über 30 % (2)
	Ulzeration	Keine (0); Vorhanden (1)
Mukosa	Kryptenabzesse	Keine (0); Vereinzelt (1); mehr als 5 (2); mehr als 20 (3)
	Inflammatorisches Infiltrat	Keine (0); Vereinzelt unter 15 % (1); moderat (2); großflächig über 50 % (3)
	Lymphaggregate (LA)	1 kleines LA (0); 2-4 kleine LA (1); mehr als 5 kleine oder 1 großes LA (2)
Submukosa	Lymphaggregate (LA)	1 kleines LA (0); 2-4 kleine LA (1); mehr als 5 kleine oder 1 großes LA (2)
	Polymorphnukleäre Leukozyten (PMN)	Keine (0); wenige PMNs(1); viele PMNs (2)
	Ödem	Mild unter 10 % (0); moderat (1); großflächig über 80 % (2)

2.12.4. Azan-Färbung

Die Azan-Färbung ist eine Färbung, um extrazelluläre Matrixproteine und Kollagen darzustellen. Deparaffinierte und rehydrierte Schnitte (siehe 2.12.1) wurden in Azokarmin bei 60°C für 1 h angefärbt. Danach wurden die Zellkerne in Anilinalkohol differenziert und die Reaktion mit Essigsäurealkohol abgestoppt. Die Schnitte wurden für 3 h mit 5 % Phosphorwolframsäure gebeizt und 5 min mit Anilinblau-Goldorange gegengefärbt. Anschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (in 96 % EtOH dippen, 1 min 100 % EtOH, 2 min 100 % EtOH) und Xylol (2 x 5 min Xylol) dehydriert und mit Entellan eingedeckt.

2.12.4.1. Software-basierte Bestimmung des Kollagen-Gehalts

Um die Fibrose des Caecums quantifizieren zu können, wurden mit Azan angefärbte Schnitte (siehe 2.12.4) an dem Lichtmikroskop Olympus BX41 (Olympus) analysiert. Mit der Software NIS Elements (Nikon Instruments Inc., Melville, USA) wurde die Fläche der blau angefärbten kollagen-haltigen Strukturen ermittelt. Dazu wurden von jedem Schnitt drei Bereiche unabhängig ausgewählt und fotografiert (400x Vergrößerung). Von jedem Bereich wurde die kollagen-haltige Fläche vermessen und schließlich der Mittelwert von allen drei Bereichen in Microsoft Office Excel 2007 ermittelt.

2.12.5. Immunfluoreszenz Färbung

Mittels Immunfluoreszenz können antigenspezifisch Strukturen oder Zellen angefärbt werden. Durch die Wahl verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe konnten in einem Schnitt außerdem mehrere Antigene gleichzeitig angefärbt werden.

Für das Antigen-Retrieval wurden deparaffinierte und rehydrierte Schnitte (siehe 2.12.1) in einem Dampfgerät (Bomann) 30 min in vorgewärmten Citrat-Puffer inkubiert. Nachdem Abkühlen wurden die Schnitte in PBS gewaschen und in eine Shandonkammer (Thermo Scientific) eingespannt. Die Schnitte wurden 20 min mit Blockierungspuffer (2 % Ziegen Serum, 0,1 % Triton-x100, 0,05 % Tween 20 in PBS) inkubiert und der entsprechende primäre Antikörper in Blockierungspuffer verdünnt (Tab. 1). 100 µl des Antikörpers wurden auf die Schnitte aufgetragen und bei 4°C ÜN inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal mit PBST gewaschen und die entsprechenden fluoreszierenden sekundären Antikörper in Färbepuffer aufgetragen (Tab. 1). Nach 1 h wurden die Schnitte erneut dreimal mit PBST gewaschen und mit ProlongGold[®] (Life Technologies) eingedeckelt. Die spätere Auswertung und Dokumentation wurde am Fluoreszenzmikroskop Axio Observer.Z1 (Zeiss) durchgeführt.

2.13. Molekularbiologische Techniken

2.13.1. Isolierung von bakterieller DNA

Zur Genotypisierung der oben hergestellten S. Tm Mutanten wurde eine Kolonie des entsprechenden S. Tm Klons für die DNA-Isolierung gepickt, in 100 µl H₂O resuspendiert und 2 min bei 100°C lysiert. Anschließend wurde das Lysat bei 16.200 x g für 2 min zentrifugiert und der Überstand für die weitere DNA-Analyse verwendet.

2.13.2. Isolierung von muriner DNA

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde ein Gewebestück der Haut oder des Schwanzes (*post mortem*) entnommen und in 0,1 mg/ml Proteinase K in Lysis Puffer bei 56°C ÜN lysiert. Am nächsten Tag wurde das Lysat bei 3.500 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in 500 µl Isopropanol dekantiert und durch Invertieren die DNA gefällt. Der ausgefallenen DNA-Faden wurde dann mit einer Pasteurpipette herausgefischt und an der Luft getrocknet. Die DNA wurde in 50 bis 200 µl H₂O aufgenommen, bei 56°C für 30 min gelöst und wurden anschließend für weitere DNA-Analysen verwendet.

2.13.3. RNA-Isolierung

Aus den verschiedenen Gewebeproben wurde RNA mittels dem *High Pure RNA Tissue Kit* (Roche) isoliert. Die in RNALater[®] aufbewahrten Gewebestücke (siehe 2.11.2) wurden aufgetaut und in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit *Lysis/Binding Buffer* und einer Metallkugel überführt. Nach dem zweiminütigen Homogenisieren mittels dem TissueLyser II (Qiagen) bei 30 Hz wurden die Proben nach Herstellerangaben weiterbehandelt. Abschließend wurde die RNA mit 30 µl *Elution Buffer* eluiert, die Konzentration mit Hilfe des NanoDrop1000 (Thermo Fisher Scientific) bei 260 nm und Verunreinigungen bei 280 nm gemessen. Bis zur Weiterverwendung wurden isolierte RNA-Proben bei -80°C gelagert.

2.13.4. PCR zur Genotypisierung

Zur Genotypisierung der Mäuse bzw. der S. Tm Klone wurde DNA isoliert (siehe 2.13.1 und 2.13.2) und mit dem *HotStar HiFidelity Polymerase Kit* (Qiagen) amplifiziert. Dazu wurden entweder 5 µl bakterielle DNA oder 1 µl murine DNA eingesetzt und nach den Angaben des Herstellers gearbeitet. Die eingesetzten *forward* und *reverse* Primer sowie die verwendeten PCR-Bedingungen sind in Tab. 5 aufgeführt.

Tab. 5: Primersequenzen für die Genotypisierung und Bedingungen der PCR

Genotyp	Primersequenz	Produkt [bp]	PCR-Bedingungen		
			Annealing	Elongation	Zyklen
S. Tm	<i>forward</i> : CTTTCGCTATCCACAGTATTGGGG <i>reverse</i> : TACGCTTATACGGCTGAATCTCGCC	1.000 (Wildtyp) 2.300 ($\Delta msbB$)	55°C 1 min	68°C 1 min	40
Nod2 Wildtyp	<i>forward</i> : ACAGAGATGCCGACACCATACTG <i>reverse</i> : TGGAGAAGGTTGAAGAGCAGAGTC	370	61°C 1 min	72°C 1 min	40
<i>Nod2</i> ^{-/-}	<i>forward</i> : TGA CTGTGGCTAATGTCCTTTGTG <i>reverse</i> : TTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTC	1.000	61°C 1 min	72°C 1 min	40

2.13.5. Agarose Gel Elektrophorese

10 µl PCR-Produkt (siehe 2.13.4) wurden mit 2 µl 6x *DNA Loading Dye* (Fermentas) gemischt und in einem 1 % (bakterielle DNA) oder 1,5 % (murine DNA) Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA mit Ethidiumbromid angefärbt und mittels der ChemiDoc2000 (BioRad) dokumentiert.

2.13.6. Reverse Transkription

Um die in Abschnitt 2.13.3 isolierte RNA in cDNA umzuschreiben wurde das *Transcriptor HighFidelity cDNA Synthesis Kit* (Roche) verwendet. Dazu wurden 1 µg RNA eingesetzt und nach Herstellerangaben gearbeitet, wobei die Elongation bei 45°C für 30 min erfolgte. Anschließend wurde die cDNA 1:10 in DEPC-H₂O verdünnt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

2.13.7. Quantitative *Real-time* PCR

Die Genexpression wurde mittels quantitativer *Real-Time* PCR am LightCycler[®]480 II (Roche) untersucht. Mit dieser sensitiven Methode kann die Amplifikation der cDNA durch *SYBR Green I*, einem Farbstoff der in die doppelsträngige DNA interkaliert, in Echtzeit verfolgt werden.

Für das jeweilige Gen (Tab. 6) wurden Primer-Mixe mit 10 µM *forward* und 10 µM *reverse* Primer vorbereitet und bei -20°C gelagert. Die quantitative *Real-Time* PCR wurde mit dem *LightCycler[®]480 SYBR Green I Master Kit* von Roche nach Herstellerangaben vorbereitet. Dabei wurden 0,2 µM Primer-Mix und 1 µl cDNA eingesetzt.

Es wurde nach dem folgenden Temperatur-Protokoll gearbeitet:

- (1) 95°C für 10 sek
 - (2) 94°C für 15 sek
 - (3) 60°C für 30 sek
- 39 Zyklen

Die Spezifität der *Real-Time* PCR wurde mittels Schmelzkurven-Analyse überprüft.

Tab. 6: Primersequenzen für die quantitative *Real-Time* PCR

Gen	Primersequenz	
	<i>forward</i>	<i>reverse</i>
<i>Mcp-1</i>	ATTGGGATCATCTTGCTGGT	CCTGCTGTTACAGTTGCC
<i>Kc</i>	TCTCCGTTACTTGGGGACAC	ACCCAAACCGAAGTCATAGC
<i>Tnfα</i>	AGGGTCTGGGCCATAGAACT	CCACCACGCTCTTCTGTCTAC
<i>Il-17f</i>	CAAAACCAGGGCATTCTGT	TTGATGCAGCCTGAGTGTCT
<i>Il-17a</i>	CTCTCCACCGCAATGAAGAC	AGCTTTCCCTCCGCATTGA
<i>Il-22</i>	GCAATCAGCTCAGCTCCTGT	CGCCTTGATCTCTCCACTCT
<i>Nos2</i>	CAGATCGAGCCCTGGAAGAC	CAACCTTGGTGTTGAAGGCG
<i>Prdx</i>	GTTTTAGCTGGCTGCCTGGCGG	ATGCAGGGAGTGATCCGCGACT
<i>Trx1</i>	CTCTGCTACGTGGTGTGGAC	CCTTGTTAGCACCGGAGAACT
<i>Nod1</i>	TCCCTTGCCTGTGAGCAGAAAGTA	GTGGGTATGTGCCATGCTTTGCTT
<i>Tlr2</i>	TGTCTCCACAAGCGGGACTT	TTCGATGGAATCGATGATGTTG
<i>Emr1</i>	GGATGTACAGATGGGGGATG	CATAAGCTGGGCAAGTGGTA

Die weitere Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode mit Microsoft Office Excel 2007. Dazu wurden folgende Formeln eingesetzt:

Formel 1: $\Delta C_t = C_t (\text{Gen}) - C_t (\text{house-keeping Gen})$

Formel 2: $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t - \text{Kalibrator}$

Formel 3: $x\text{-fache Genexpression} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$

Die jeweilige Genexpression wurde auf die Expression des *housekeeping* Gens *Gapdh* normalisiert, dabei wurde jeweils von einer Effizienz von 2 ausgegangen (Formel 1). Anschließend wurden die Daten auf die Genexpression von nicht-infizierten Mäusen (Tag 0) normalisiert. Dazu wurde zuerst der Kalibrator bestimmt indem der ΔC_t -Mittelwert von allen

nicht-infizierten Mäusen ermittelt wurde. Anschließend wurde $\Delta\Delta Ct$ und daraus die x-fache Genexpression nach der Formel 2 und Formel 3 berechnet.

2.14. *In vitro* Methoden

Die Experimente mit HEK293 Zellen wurden in dem Labor von Prof. Dr. Holger Heine am FZB durchgeführt.

2.14.1. Kultivierung

Die HEK293 Zellen wurden von Frau Ina Goroncy in DMEM-Medium (10 % FCS, 1 % P/S) bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. 24 h vor der Transfektion wurden 96-Well Zellkulturplatte mit einer Zelldichte von 2,5 x 10⁴ Zellen vorbereitet.

2.14.2. Transiente Transfektion

Um zu untersuchen ob TLR2, TLR4 oder Nod2 unterschiedlich stark durch *S. Tm* Wildtyp bzw. *S. Tm* $\Delta msbB$ stimuliert werden, wurden HEK293 Zellen mit dem jeweiligen Plasmid (Tab. 7) und Lipofectamin2000 (Life Technologies) nach Herstellerangaben für 24 h transient transfiziert. Um auszuschließen, dass bei Ko-Transfektion nicht die höhere Plasmid-Konzentration zu einer veränderten Aktivierung der Zellen führt, wurden die entsprechenden Einzeltransfektionen mit einem nichtkodierenden Kontroll-Plasmid ko-transfiziert.

Tab. 7: Plasmide für die Transfektion von HEK293 Zellen

	Plasmid (interner Nummerierung)	Eingesetzte Menge
Kontroll-Plasmid	pCDNA3 (#67)	100 ng
Nod2 (Human)	hNod2 (#130)	100 ng
TLR2 (Human)	hTLR2 (#45)	100 ng
TLR4 (Human)	hTLR4 (#68)	80 ng
	hMD2 (#66)	10 ng
	hCD14 (#8)	10 ng
TLR4 (Murin)	mTLR4 (#372)	90 ng
	mMD2 (#371)	10 ng

2.14.3. Stimulierung von transfizierten HEK293 Zellen

Zwei Tage vor der Stimulierung wurden ÜN-Kulturen der entsprechenden *S. Tm* Stämme angesetzt. Am nächsten Tag wurde eine 1:10-Verdünnungsreihe angesetzt, um die Keimlast der Kultur zu überprüfen. Die übrige ÜN Kultur wurde 5 h bei 65°C auf dem Schüttler hitzeinaktiviert und anschließend eine Sterilkontrolle durchgeführt.

24 h nach der transienten Transfektion der HEK293 Zellen (siehe 2.14.2) wurde das Transfektionsmedium abgenommen und durch den entsprechenden Stimulus ersetzt. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit DMEM-Medium als Negativ-Kontrolle oder TNF α als Positiv-Kontrolle stimuliert. Außerdem wurde entweder MDP als Nod2-Ligand, P3CSK4 als TLR2-Ligand oder LPS als TLR4-Ligand der jeweiligen Plasmid-Transfektion entsprechend als spezifische Positiv-Kontrolle mitgeführt. Um die PRR-Aktivität von *S. Tm* $\Delta msbB$ und *S. Tm* Wildtyp zu untersuchen, wurden die transfizierten Zellen mit hitzeinaktivierten *S. Tm* oder mit aufgereinigtem LPS von *S. Tm* $\Delta msbB$ und *S. Tm* Wildtyp stimuliert. Die eingesetzten Konzentrationen wurden in den jeweiligen Ergebnissen aufgeführt. Die Zellen wurden für 24 h stimuliert, danach wurden die Zellkulturüberstände zur Bestimmung der IL-8-Produktion abgenommen.

Um zu untersuchen, ob ein inhibitorischer oder synergistischer Effekt der untersuchten PRRs vorlag, wurde für jeden Stimulus die IL-8-Produktion der Einzel-Transfektionen addiert und mittels 2-Wege ANOVA Test mit der IL-8-Produktion der Ko-Transfektion verglichen.

2.15. Proteinbestimmung

2.15.1. IL-8 ELISA

Um die Stimulation der transfizierten HEK293 Zellen (siehe 2.14.2) zu analysieren, wurde die IL-8-Produktion im Zellkulturüberstand mit Hilfe des *Human IL-8 CytoSet* ELISAs (Life Technologies) bestimmt. Der ELISA wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei die Zellkulturüberstände in einer 1:5-Verdünnung gemessen wurden. Die TMB-Farbreaktion wurde anschließend bei 450 nm und 630 nm am *SunriseTM Reader* (Tecan) gemessen. Die Protein-Konzentration wurde mit Hilfe der Software *MagellanTM* (Tecan) bestimmt.

2.15.2. MCP-1 ELISA

Die Proteinmenge von MCP-1 im Caecum von *S. Tm* $\Delta msbB$ -infizierten Mäusen wurde mittels *BD OptEIA Mouse MCP-1 ELISA Set* (BD Pharmingen) gemessen. Dazu wurden die Caeca isoliert, homogenisiert und die Überstände (siehe 2.11.2) unverdünnt bzw. 1:5 in dem

ELISA eingesetzt. Der ELISA wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und die TMB-Farbreaktion anschließend bei 450 nm und 630 nm am *Infinite 200 Pro Reader* (Tecan) gemessen. Die Protein-Konzentration wurde mit Hilfe der Software Magellan™ (Tecan) bestimmt.

2.15.3. IL-1 β ELISA

IL-1 β wurde mittels *DuoSet Mouse IL-1beta/IL-1F2* (R&D) im Caecum-Homogenisat von S. Tm Δ msbB-infizierten Mäusen (siehe 2.11.2) gemessen. Der ELISA wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und die TMB-Farbreaktion anschließend bei 450 nm und 630 nm am *Infinite 200 Pro Reader* (Tecan) gemessen. Die Protein-Konzentration wurde mit Hilfe der Software Magellan™ (Tecan) bestimmt.

2.16. Statistische Analysen

Die statistische Analyse wurde mit der Software GraphPad Prism 5 (GraphPad) durchgeführt. Die einzelnen Datengruppen wurden zuerst mit dem Kolmogorov-Smirnov Test auf Normalverteilung getestet. Anschließend wurde die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen untersucht. Normalverteilte Datensätze wurden mit dem Student's *t* Test (zweiseitig, Konfidenzintervall 95 %) oder mit dem ANOVA Test mit Bonferroni Mehrfach-Vergleichstest (Konfidenzintervall 95 %) analysiert. Nicht normalverteilte Datensätze wurden mit dem Mann-Whitney Test (zweiseitig, Konfidenzintervall 95 %) oder mit dem Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Mehrfach-Vergleichstest (Konfidenzintervall 95 %) analysiert.

Soweit nicht anders angeführt, wurden *p*-Werte größer als 0,05 ermittelt und die Unterschiede als nicht signifikant (ns) beurteilt. Signifikante Unterschiede wurden mit Sternen gekennzeichnet, die wie folgt definiert waren: *: *p* < 0,05; **: *p* < 0,01; *** *p* < 0,001.

3. Ergebnisse

3.1. Einfluss von Nod2 auf die Salmonellen-induzierte Colitis

3.1.1. *S. Tm* Δ *aroA* induziert eine vergleichbare intestinale Entzündung in C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäusen

Die Erkrankung Morbus Crohn ist eine schwere Entzündung des Magen-Darm-Trakts. Im chronischen Verlauf der Krankheit entwickeln mehr als ein Drittel der Patienten eine intestinale Fibrose, welche für schwerwiegende Komplikationen verantwortlich ist [26]. Die Fibrose führt zu einer fortschreitenden Verengung des entzündeten Darmabschnitts, sodass das betroffene Darmsegment schließlich chirurgisch entfernt werden muss. Bisher ist allerdings noch unklar, wodurch diese Fibrogenese induziert wird und warum nur ein Teil der Patienten davon betroffen ist. In dieser Arbeit wurde diese Fragestellung unter dem Aspekt der genetischen Suszeptibilität mit Hilfe des *S. Tm*-induzierten Fibrose-Modells untersucht. Da C57BL/6J Mäuse besonders suszeptibel gegenüber *S. Tm* sind und sechs bis neun Tage nach der Infektion versterben, wurde zur Untersuchung der chronischen Zeitpunkte die attenuierte Mutante *S. Tm* Δ *aroA* eingesetzt.

C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäuse wurden mit Streptomycin behandelt und nach 24 h mit 3×10^6 KBE *S. Tm* Δ *aroA* infiziert. Zur Bestimmung der Keimlast und für histologische Untersuchungen wurden an unterschiedlichen Zeitpunkten verschiedene Darmabschnitte, Leber, Milz und MLK zur Bestimmung der Keimlast entnommen.

14 Tage nach der Infektion wurde *S. Tm* Δ *aroA* im Darm und den systemischen Organen nachgewiesen (Abb. 7 A+B). Das Ileum von C57BL/6J Mäusen war zu diesem Zeitpunkt im Mittel mit $3,6 \times 10^4$ KBE *S. Tm* Δ *aroA* besiedelt und 8×10^2 KBE *S. Tm* Δ *aroA* wurden in *Nod2*^{-/-} Mäusen detektiert, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (Abb. 7 A). Das Caecum und Colon von C57BL/6J Mäusen war etwas stärker besiedelt als *Nod2*^{-/-} Mäuse, allerdings war dieser Unterschied ebenfalls nicht signifikant. Im Gegensatz dazu war die Keimlast in den systemischen Organen niedriger verglichen mit den verschiedenen Darmabschnitten (Abb. 7 B). In den MLK und der Leber von C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäusen kam es jeweils zu einem vergleichbaren Keimwachstum. Die Milz von *Nod2*^{-/-} Mäusen hingegen war signifikant stärker besiedelt als die Milz der C57BL/6J Mäuse.

Nach 21 Tagen waren der Darm und die systemischen Organe noch mit *S. Tm* Δ *aroA* besiedelt (Abb. 7 C+D), im Vergleich zu Tag 14 war die Keimlast jedoch etwas reduziert. Sowohl in den verschiedenen Darmabschnitten als auch den systemischen Organen wurde kein Unterschied in der Keimlast zwischen C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäusen festgestellt.

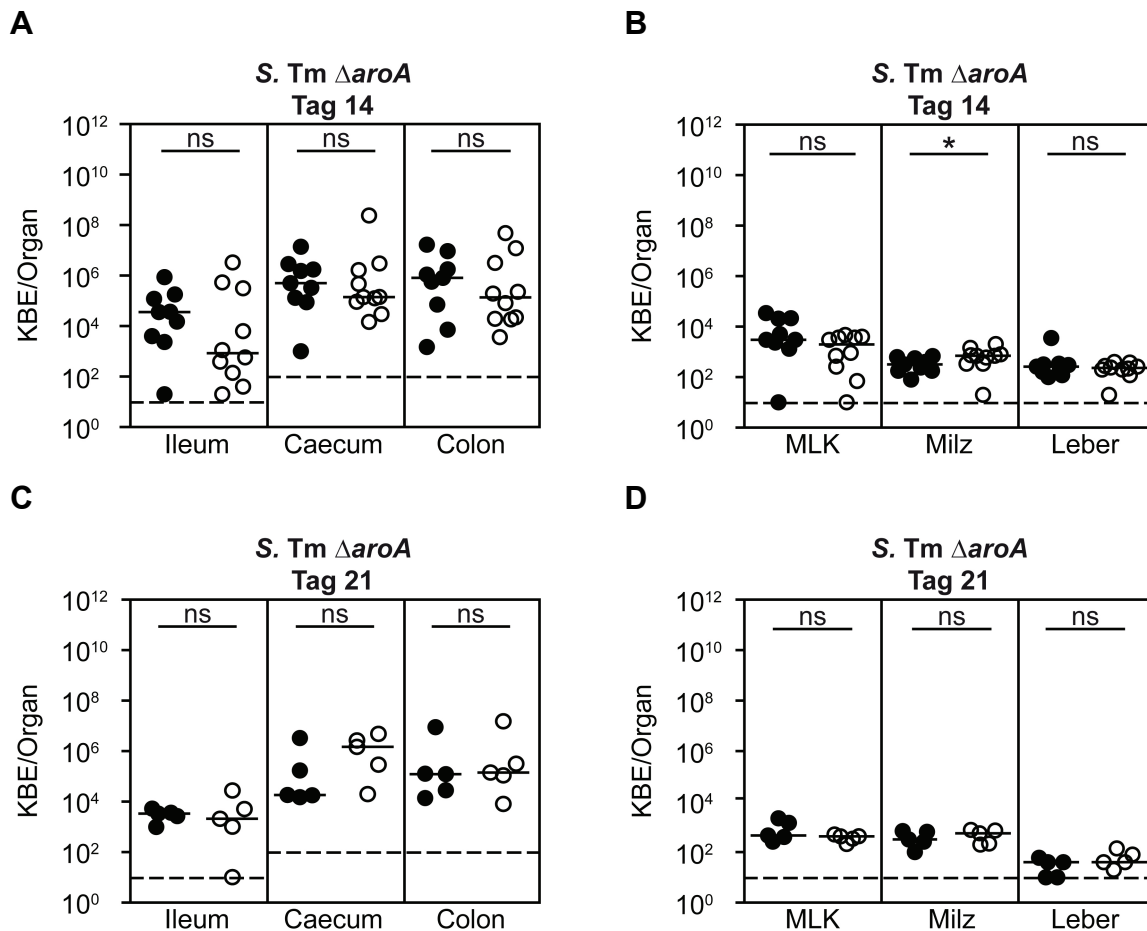


Abb. 7: Vergleichbare Keimlast in *S. Tm* Δ *aroA*-infizierten Mäusen

C57BL/6J (schwarze Symbole) und *Nod2*^{-/-} (weiße Symbole) Mäuse wurden mit Streptomycin behandelt und nach 24 h oral mit 3×10^6 KBE *S. Tm* Δ *aroA* infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Keimlast in verschiedenen Darmabschnitten (A+C) und systemischen Organen (B+D) bestimmt. Dargestellt ist der Median von vier bis zehn Tieren je Genotyp. Gestrichelte Linie: Detektionslimit. *: $p < 0,05$; Mann-Whitney Test

In vorangegangenen Studien wurde bereits gezeigt, dass *S. Tm* Δ *aroA* eine transmurale Entzündung des Caecums induziert, wenn die Mäuse 24 h zuvor mit Streptomycin behandelt wurden [25]. Diese Entzündung wies zahlreiche Parallelen zur Entzündung bei Morbus Crohn-Patienten auf, wie zum Beispiel eine starke T-Helfer-Zellen (T_H)1-vermittelte Immunantwort und intestinale Fibrose [92]. Aus diesem Grund wurde dieses Modell zur Untersuchung des Einflusses von *Nod2* auf die chronische Entzündung und Fibrose benutzt. Um die Rolle von *Nod2* in der intestinalen Entzündung zu untersuchen, wurden Caeca von *S. Tm* Δ *aroA*-infizierten C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäusen isoliert, in Formalin fixiert und 5 μ m dicke Paraffinschnitte mit H&E angefärbt.

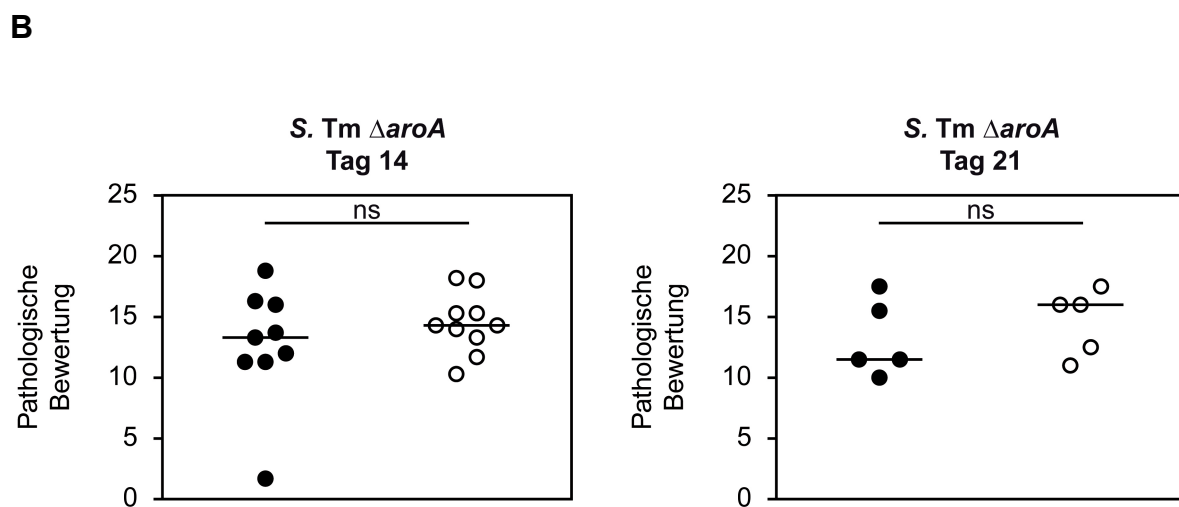
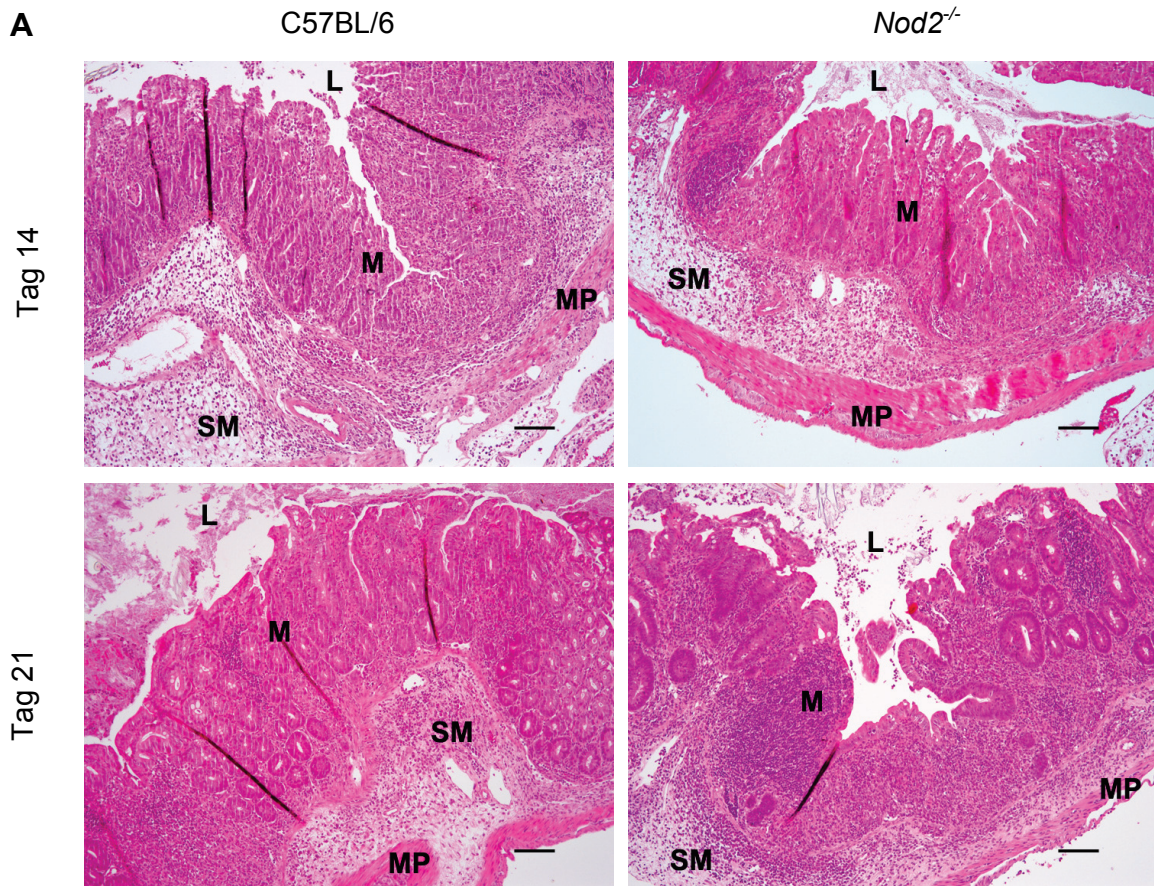


Abb. 8: Vergleichbare Colitis in *S. Tm ΔaroA*-infizierten Mäusen

C57BL/6J und *Nod2^{-/-}* Mäuse wurden mit Streptomycin behandelt und nach 24 h oral mit 3×10^6 KBE *S. Tm ΔaroA* infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde das Caecum isoliert und in 4 % Formalin fixiert. (A) 5 μ m dicke Paraffinschnitte wurden mit H&E angefärbt und histologisch untersucht. Dargestellt ist eine repräsentative Aufnahme von vier bis zehn Tieren je Genotyp. Größenbalken: 100 μ m; Original-Vergrößerung: 100x; L: Lumen; M: Mukosa; MP: *muscularis propria*; SM: Submukosa (B) Die Entzündung des Caecums wurde pathologisch bewertet. Dargestellt ist der Median von vier bis zehn Tieren je Genotyp. schwarze Symbole: C57BL/6J Mäuse; weiße Symbole: *Nod2^{-/-}* Mäuse; ns: $p > 0,05$; Mann-Whitney Test

14 und 21 Tage nach der Infektion wurde im Caecum eine starke Veränderung der Krypten-Struktur festgestellt (Abb. 8 A). Die Mukosa und die Submukosa waren durch eine massive Infiltration von Zellen stark verdickt. Die ursprüngliche Krypten-Struktur des Caecums war dadurch fast vollständig zerstört. Außerdem wurde an beiden Zeitpunkten die Formation von Lymphaggregaten in der Mukosa beobachtet. Im Lumen befanden sich apoptotische Zellen und die Desquamation der Epithelschicht war stark ausgeprägt, sodass die Epithelschicht an einigen Stellen bereits zerstört war. Im Gegensatz dazu wurden keine Entzündungsmerkmale im Ileum und nur eine milde Entzündung des Colons von C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäusen detektiert (Daten nicht gezeigt).

Um den Schweregrad der Entzündung quantitativ bewerten zu können, wurden die H&E gefärbten Schnitte nach einem pathologischen Bewertungssystem untersucht (siehe 2.12.3). Diese Bewertung reichte von 0 bis 23, wobei 23 den höchsten Schweregrad der Entzündung beschreibt. Die pathologische Bewertung der *S. Tm ΔaroA*-induzierten Entzündung zeigte sowohl nach 14 als auch nach 21 Tagen eine massive Entzündung des Caecums im Bereich von 13 – 16 (Abb. 8 B). In den *Nod2*^{-/-} Mäusen wurde eine ähnliche Pathologie wie in den C57BL/6J Mäusen festgestellt.

Um den Einfluss von *Nod2* auf die Fibrose und der damit verbundenen Ablagerungen von extrazellulären Matrixproteinen, insbesondere Kollagen, zu untersuchen wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte von Caeca von *S. Tm ΔaroA*-infizierten Mäusen mit Azan angefärbt.

Nach 14 Tagen wurde eine verstärkte Kollagen-Anreicherung im entzündeten Caecum gegenüber nicht-infizierten Caeca festgestellt (Abb. 9 A). Das Kollagen war hauptsächlich in der Submukosa und dem Muskelgewebe eingelagert und wies den für Kollagen typischen faserartigen Charakter auf. Neben der Submukosa waren aber auch die Mukosa und die Muskelschicht von einem Kollagennetz durchzogen.

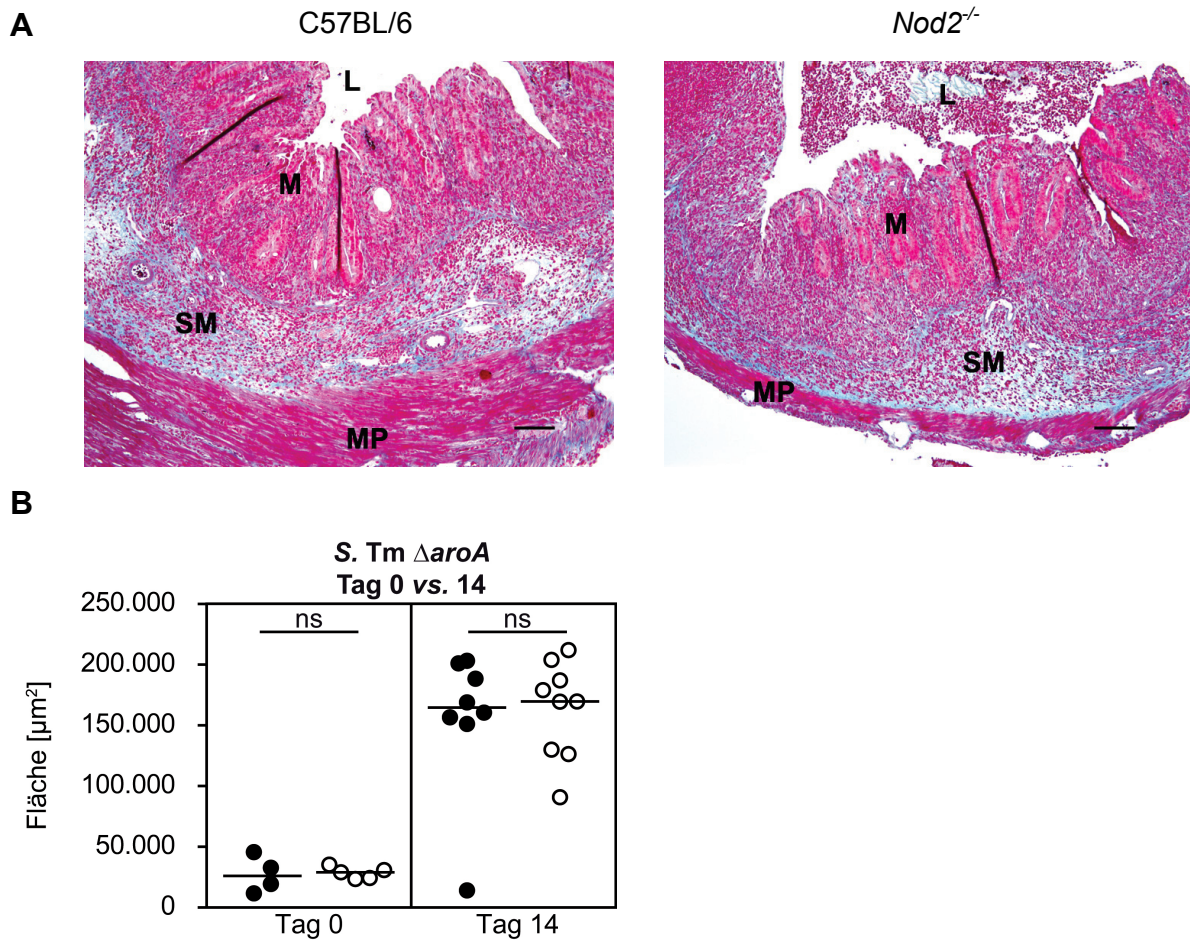


Abb. 9: Vergleichbare Kollagen-Produktion in *S. Tm* Δ aroA-infizierten Mäusen

C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäuse wurden mit Streptomycin behandelt und nach 24 h oral mit 3×10^6 KBE *S. Tm* Δ aroA infiziert. Nach 14 Tagen wurde das Caecum isoliert und in 4 % Formalin fixiert. (A) 5 μm dicke Paraffinschnitte wurden mit Azan anfärbt, um Kollagen (blau) histologisch nachzuweisen. Dargestellt ist eine repräsentative Aufnahme von neun bis zehn Tieren je Genotyp. Größenbalken: 100 μm ; Original-Vergrößerung: 100x; L: Lumen; M: Mukosa; MP: *muscularis propria*; SM: Submukosa (B) Mittels der Software NIS Elements (Nikon Instruments Inc.) wurde die Fläche der kollagen-haltigen (blau-angefärbt) Bereiche berechnet. Für jede Maus wurde der Kollagen-Gehalt in 3 repräsentativen Abschnitten der Azan-Färbung ermittelt und der Mittelwert bestimmt. Dargestellt ist der Median von vier bis zehn Tieren je Genotyp. Schwarze Symbole: C57BL/6J Mäuse; weiße Symbole: *Nod2*^{-/-} Mäuse; ns: $p > 0,05$; Student's *t* Test

Mittels der Software-basierten Quantifizierung des Kollagen-Gehalts wurde nachgewiesen, dass im Verlauf der Infektion vermehrt Kollagen in das entzündete Gewebe eingelagert wurde, allerdings wurde kein Unterschied zwischen C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäusen festgestellt (Abb. 9 B).

3.1.2. S. Tm Wildtyp induziert eine vergleichbare intestinale Entzündung in C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäusen

Wie oben beschrieben spielt *Nod2* vermutlich keine Rolle während der chronischen Phase der *S. Tm* Δ *aroA*-induzierten Colitis und Fibrose. Da *Nod2* aber auch eine wichtige Rolle in der Immunantwort gegen Pathogene wichtig ist [58, 86, 87], wurde untersucht, ob *Nod2* die akute Phase der *Salmonella*-induzierten Colitis beeinflusst.

Streptomycin-behandelte C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäuse wurden nach 24 h mit 3×10^6 KBE *S. Tm* Wildtyp C5 (falls nicht genauer spezifiziert, im Folgenden als *S. Tm* Wildtyp bezeichnet) infiziert. An Tag 2 nach der Infektion wurden die Organe zur Untersuchung der Keimlast und der Pathologie entnommen.

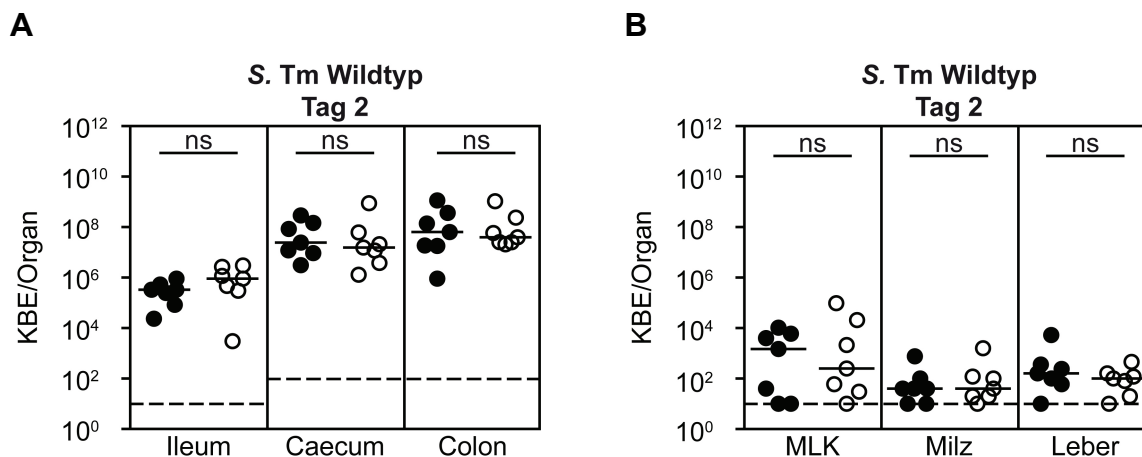


Abb. 10: Vergleichbare Keimlast in *S. Tm* Wildtyp-infizierten Mäusen

C57BL/6J (schwarze Symbole) und *Nod2*^{-/-} (weiße Symbole) Mäuse wurden mit Streptomycin behandelt und nach 24 h oral mit 3×10^6 KBE *S. Tm* Wildtyp infiziert. Nach zwei Tagen wurde die Keimlast in den angegebenen Darmabschnitten (A) und systemischen Organen (B) bestimmt. Dargestellt ist der Median von sieben Tieren je Genotyp. Gestrichelte Linie: Detektionslimit. ns: $p > 0,05$; Mann-Whitney Test

S. Tm Wildtyp besiedelte nach zwei Tagen alle untersuchten Darmabschnitte, zwischen C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäusen wurde aber kein Unterschied in der Keimlast festgestellt (Abb. 10 A). Nach zwei Tagen wurde *S. Tm* Wildtyp außerdem in den systemischen Organen wie der Leber, der Milz und den MLK detektiert (Abb. 10 B). In den systemischen Organen wurde ebenfalls eine vergleichbare Keimlast zwischen C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäusen festgestellt.

Um den Einfluss von *Nod2* auf die intestinale Entzündung zu bewerten, wurden Caeca von infizierten C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäusen isoliert, in Formalin fixiert und 5 μ m dicke Paraffinschnitte mit H&E angefärbt und der Entzündungsgrad bewertet.

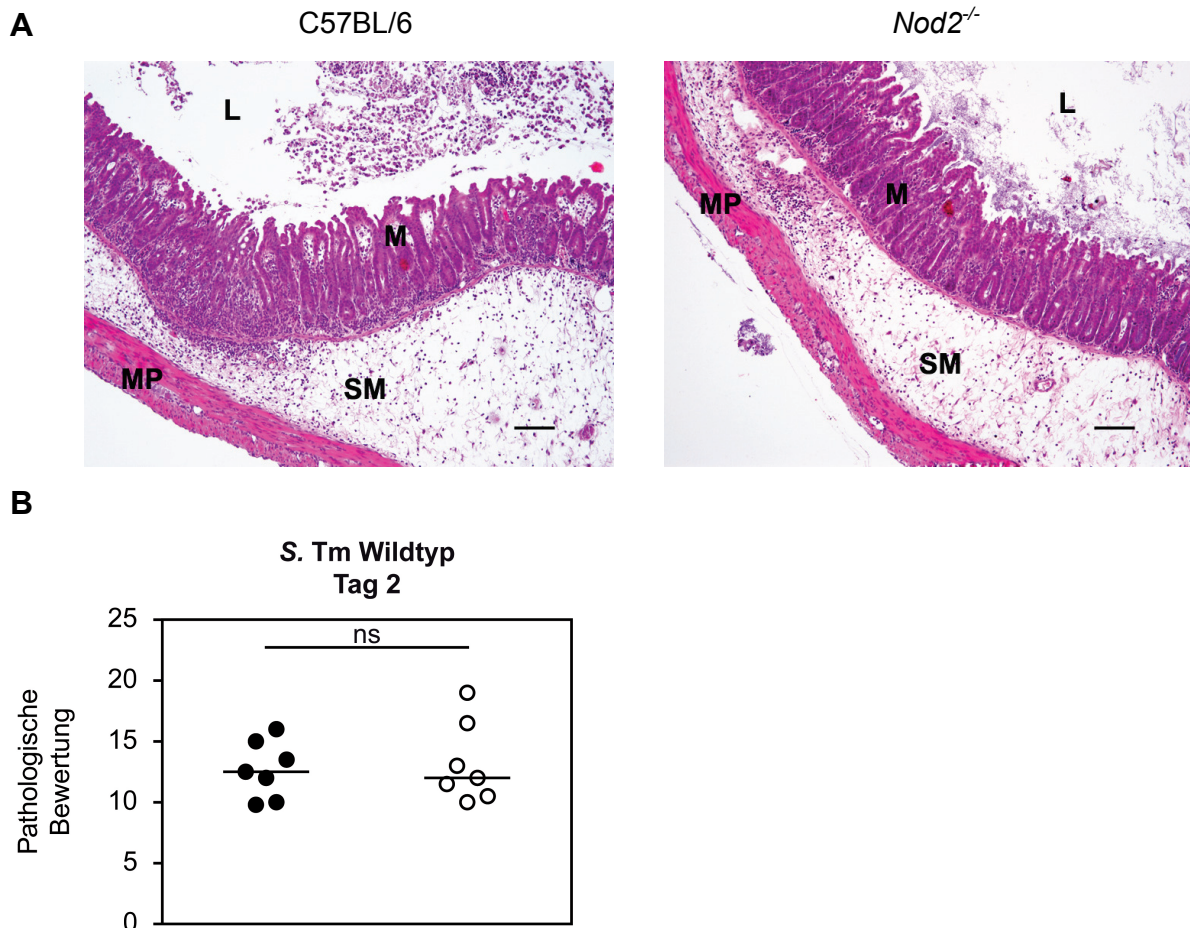


Abb. 11: S. Tm Wildtyp induzierte eine vergleichbare Colitis

C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäuse wurden mit Streptomycin behandelt und nach 24 h oral mit 3×10^6 KBE *S. Tm* Wildtyp infiziert. Nach zwei Tagen wurde das Caecum isoliert und in 4 % Formalin fixiert. (A) 5 μ m dicke Paraffinschnitte wurden mit H&E angefärbt und histologisch untersucht. Dargestellt ist eine repräsentative Aufnahme von sieben Tieren je Genotyp. Größenbalken: 100 μ m; Original-Vergrößerung: 100x; L: Lumen; M: Mukosa; MP: *muscularis propria*; SM: Submukosa (B) Die Entzündung des Caecums wurde pathologisch bewertet. Dargestellt ist der Median von sieben Tieren je Genotyp. Schwarze Symbole: C57BL/6J Mäuse; weiße Symbole: *Nod2*^{-/-} Mäuse; ns: $p > 0,05$; Mann-Whitney Test

In der histologischen Auswertung der *S. Tm* Wildtyp-induzierten Colitis wurde nach zwei Tagen eine starke Ödem-Bildung in der Submukosa sowie eine beginnende Infiltration von Immunzellen beobachtet (Abb. 11 A). Vor allem die Desquamation der Epithelzellen war besonders ausgeprägt und resultierte in einer Ansammlung von apoptotischen Zellen im Darmlumen, außerdem wurden dort zahlreiche Neutrophile detektiert. Im Gegensatz zu der chronischen Entzündung durch *S. Tm* Δ *aroA* (Abb. 8 A) war die Krypten-Struktur noch weitgehend intakt. Die Pathologische Bewertung des Caecums ergab, dass *S. Tm* Wildtyp eine vergleichbare Entzündung in C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäusen induzierte (Abb. 11 B).

Die Infektionen mit *S. Tm* Δ *aroA* und *S. Tm* Wildtyp resultierten weder in der Keimlast, der Entzündung des Caecums noch in der Kollagen-Produktion in Unterschieden zwischen C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäusen, sodass *Nod2* vermutlich keine entscheidende Rolle in der *S. Tm* Δ *aroA* bzw. Wildtyp-induzierten Colitis spielt.

3.1.3. *S. Tm* Δ *msbB* induziert eine verstärkte intestinale Entzündung in *Nod2*^{-/-} Mäusen

An der Immunabwehr von *S. Tm* ist ein breites Spektrum an PRRs des angeborenen Immunsystems beteiligt, neben den NLRs werden vor allem TLR2, -4, -5 und -9 durch PAMPs von *S. Tm* aktiviert [3, 11, 21]. Dies führte zu der Hypothese, dass die starke Stimulation der TLRs die Wirkung von *S. Tm* auf *Nod2* überdecken könnte. Aus diesem Grund wurde mit einem *S. Tm* Stamm weitergearbeitet, der durch eine veränderte LPS-Struktur eine reduzierte TLR4-Reaktivität auswies [14], um so die Rolle von *Nod2* genauer charakterisieren zu können.

3.1.3.1. Veränderter zeitlicher Verlauf der Keimlast in *Nod2*^{-/-} Mäusen

C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäuse wurden mit Streptomycin behandelt und nach 24 h mit 3×10^7 KBE *S. Tm* Δ *msbB* infiziert. Um die Keimlast zu bestimmen, wurden die Organe zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen und die akute und die chronische Phase der Infektion untersucht.

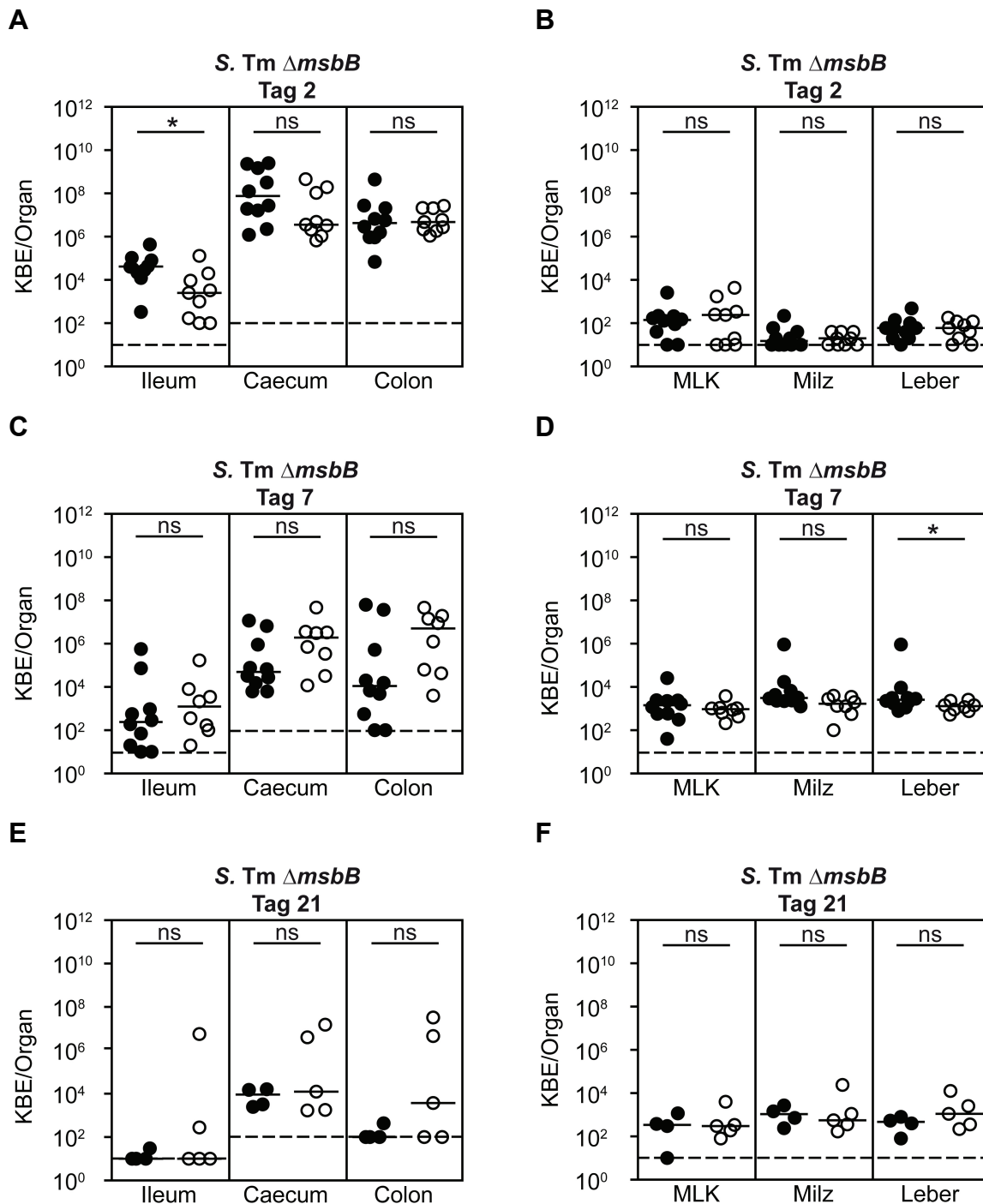


Abb. 12: Geringere Keimlast im Ileum von *S. Tm* $\Delta msbB$ -infizierten *Nod2*^{-/-} Mäusen

C57BL/6J (schwarze Symbole) und *Nod2*^{-/-} (weiße Symbole) Mäuse wurden mit Streptomycin behandelt und nach 24 h oral mit 3×10^7 KBE *S. Tm* $\Delta msbB$ infiziert. Die Keimlast wurde in den verschiedenen Darmabschnitten (A, C, E) und systemischen Organen (B, D, F) zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt. Dargestellt ist der Median von vier bis zehn Tieren je Genotyp. Gestrichelte Linie: Detektionslimit. *: $p < 0,05$; Mann-Whitney Test

Zwei Tage nach der Infektion waren alle Darmabschnitte mit *S. Tm* $\Delta msbB$ besiedelt (Abb. 12 A). Im Ileum wurde eine signifikant niedrigere Keimlast in den *Nod2*^{-/-} Mäusen als in den C57BL/6J Mäusen nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurde kein Unterschied in der

Keimlast des Caecums, Colons oder den systemischen Organen in den untersuchten Mäusen detektiert (Abb. 12 A+B). Im späteren Verlauf der Infektion war die Keimlast in den verschiedenen Darmabschnitten rückläufig und es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Mäusen beobachtet (Abb. 12 C+E). In den C57BL/6J Mäusen wurde von Tag 2 zu Tag 7 die Keimlast im Mittel von $7,6 \times 10^7$ KBE signifikant auf 5×10^4 KBE verringert (Abb. 12 A+C). Im Gegensatz dazu blieb die Keimlast in den *Nod2*^{-/-} Mäusen in etwa konstant bei $3,6 \times 10^6$ und $1,6 \times 10^6$ KBE. Die Unterschiede zwischen C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäuse waren im zeitlichen Verlauf der Keimlast nicht signifikant, deuteten aber daraufhin, dass in den C57BL/6J Mäusen im Gegensatz zu den *Nod2*^{-/-} Mäusen bereits die Eliminierung von *S. Tm* Δ *msbB* eingesetzt haben könnte.

Ergänzend zu der akuten *S. Tm* Δ *msbB*-Infektion wurde auch die chronische Phase der Infektion untersucht (Abb. 12 E+F). Obwohl die Keimlast in den *Nod2*^{-/-} Mäusen von Tag 2 zu Tag 7 nicht verringert wurde, war die Keimlast nach 21 Tagen in C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäusen so stark reduziert, dass teilweise das Detektionslimit erreicht wurde. Im Gegensatz zu den untersuchten Darmabschnitten wurde in den systemischen Organen zu keinem der untersuchten Zeitpunkte ein Unterschied zwischen C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäusen festgestellt (Abb. 12 B, D+F).

3.1.3.2. *S. Tm* Δ *msbB* induziert eine verstärkte Immunpathologie im Caecum von *Nod2*^{-/-} Mäusen

Mit einem systemischen Salmonellen-Infektions-Modell zeigte St John *et al.*, dass *S. Tm* Δ *msbB* verglichen mit *S. Tm* Wildtyp eine verringerte Virulenz aufweist [15]. Um zu untersuchen, ob *S. Tm* Δ *msbB* trotz der verminderten Virulenz eine Colitis im Caecum induzieren kann, wurden Caeca von C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäusen an unterschiedlichen Zeitpunkten isoliert, in Formalin fixiert und 5 μ m dicke Paraffinschnitte mit H&E angefärbt.

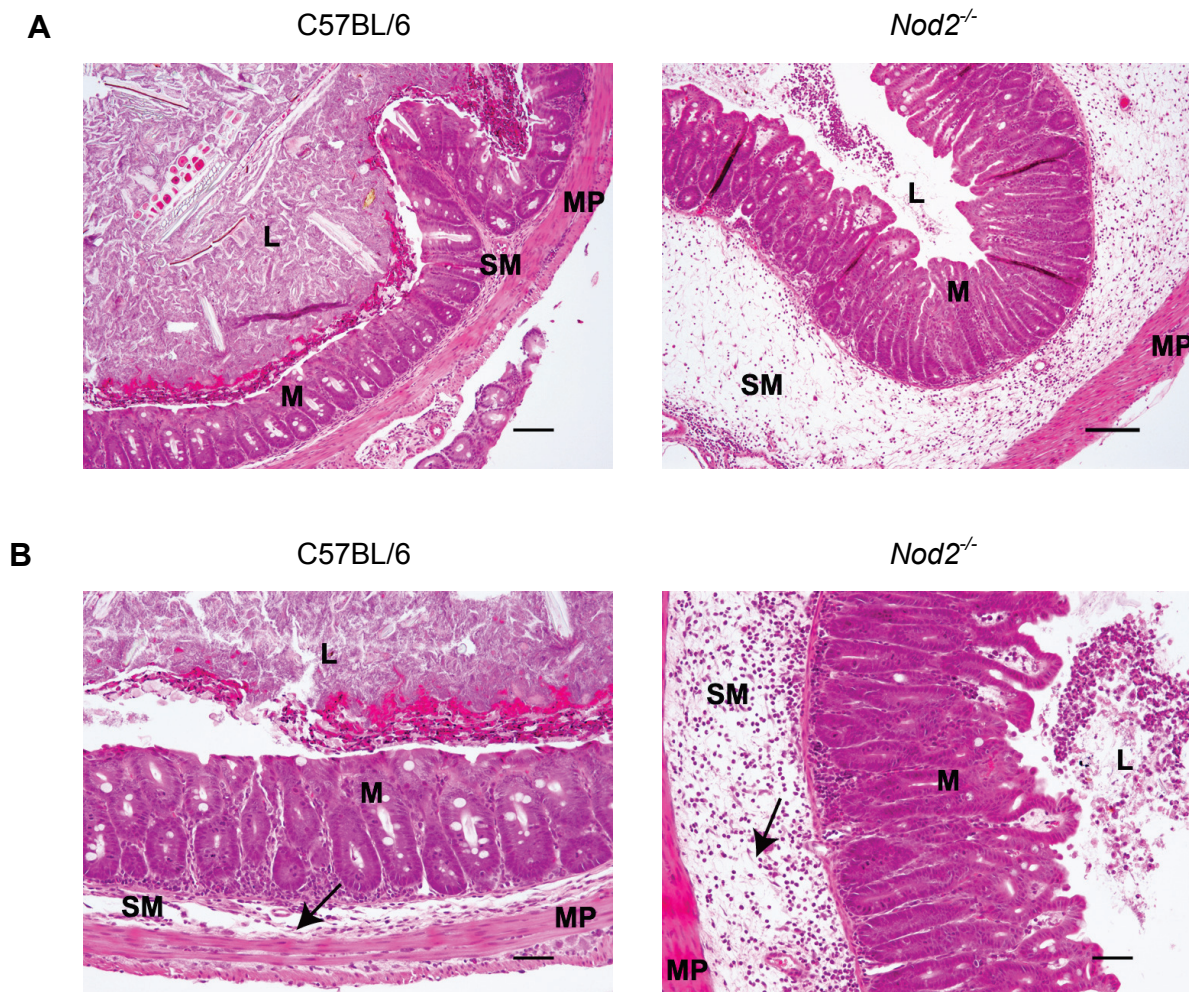


Abb. 13: Verstärkte Entzündung des Caecums von *S. Tm* $\Delta msbB$ -infizierten *Nod2*^{-/-} Mäusen

C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäuse wurden mit Streptomycin behandelt und nach 24 h oral mit 3×10^7 KBE *S. Tm* $\Delta msbB$ infiziert. Nach zwei Tagen wurde das Caecum isoliert, in 4 % Formalin fixiert und 5 μ m dicke Paraffinschnitte mit H&E angefärbt und histologisch untersucht. Dargestellt ist eine repräsentative Aufnahme von neun bis zehn Tieren je Genotyp. (A) 100x Original-Vergrößerung, Größenbalken: 100 μ m; (B) 200x Original-Vergrößerung, Größenbalken: 50 μ m; L: Lumen; M: Mukosa; MP: *muscularis propria*; SM: Submukosa; Pfeile: Ödem

Nach zwei Tagen wurde im Caecum von *S. Tm* $\Delta msbB$ -infizierten Mäusen eine Entzündung festgestellt (Abb. 13), die verglichen mit der *S. Tm* Wildtyp-Infektion (Abb. 11) milder verlief. Darüberhinaus zeichnete sich in den mikroskopischen Aufnahmen eine verstärkte Pathologie in den *Nod2*^{-/-} Mäusen ab. Während die Submukosa der C57BL/6J Mäuse nur wenig verändert war, wurde in den *Nod2*^{-/-} Mäusen die Formation großer Ödeme (Abb. 13; Pfeile) festgestellt. Zudem wiesen die Submukosa und die Mukosa erste Anzeichen einer Hyperplasie auf und es wurden vermehrt Kryptenabzesse in den *Nod2*^{-/-} Mäusen detektiert. Im Lumen der *Nod2*^{-/-} Mäuse befanden sich zahlreiche Neutrophile sowie apoptotische Zellen, was mit einer verstärkten Desquamation der Epithelschicht einher ging. Diese Entzündungsmerkmale waren in den Caeca von C57BL/6J Mäusen schwächer ausgeprägt.

3.1.3.3. Neutrophile sind an der verstärkten *S. Tm ΔmsbB*-induzierten Immunpathologie im Caecum von *Nod2*^{-/-} Mäusen beteiligt

Nachdem gezeigt wurde, dass *S. Tm ΔmsbB* nach zwei Tagen eine verstärkte Colitis in *Nod2*^{-/-} Mäusen induziert, wurde im Folgenden genauer analysiert, welche Zellen daran beteiligt waren. Hierzu wurden Paraffinschnitte der an Infektionstag 2 isolierten und fixierten Caeca immunhistologisch angefärbt.

Da Neutrophile an der frühen Abwehr von Salmonellen beteiligt sind [93] und die in Abb. 13 dargestellte H&E Färbung auf eine Beteiligung von Neutrophilen hinwies, wurden Paraffinschnitte spezifisch mit anti-MPO und einem grün-fluoreszierenden sekundären Antikörper gefärbt. Zur Orientierung wurden außerdem Zellkerne (DAPI, blau) und Epithelzellen (E-Cadherin, rot) angefärbt. Bei allen untersuchten Mäusen wurde eine unspezifische Färbung des grün-fluoreszierenden sekundären Antikörpers im Faeces-gefüllten Darmlumen festgestellt (Abb. 15).

In den Streptomycin-behandelten, nicht-infizierten Mäusen wurden keine Neutrophile in der Mukosa oder Submukosa nachgewiesen (Abb. 15 A). Im Gegensatz dazu wurde das Gewebe zwei Tage nach der Infektion mit *S. Tm ΔmsbB* von Neutrophilen infiltriert (Abb. 15 B+C). Dabei wurde in den *Nod2*^{-/-} Mäusen eine massive Infiltration von Neutrophilen in das entzündete Gewebe und in das Darmlumen festgestellt. In C57BL/6J Mäusen war das Gewebe der C57BL/6J Mäuse im Vergleich zu den *Nod2*^{-/-} Mäusen deutlich weniger von Neutrophilen infiltriert worden.

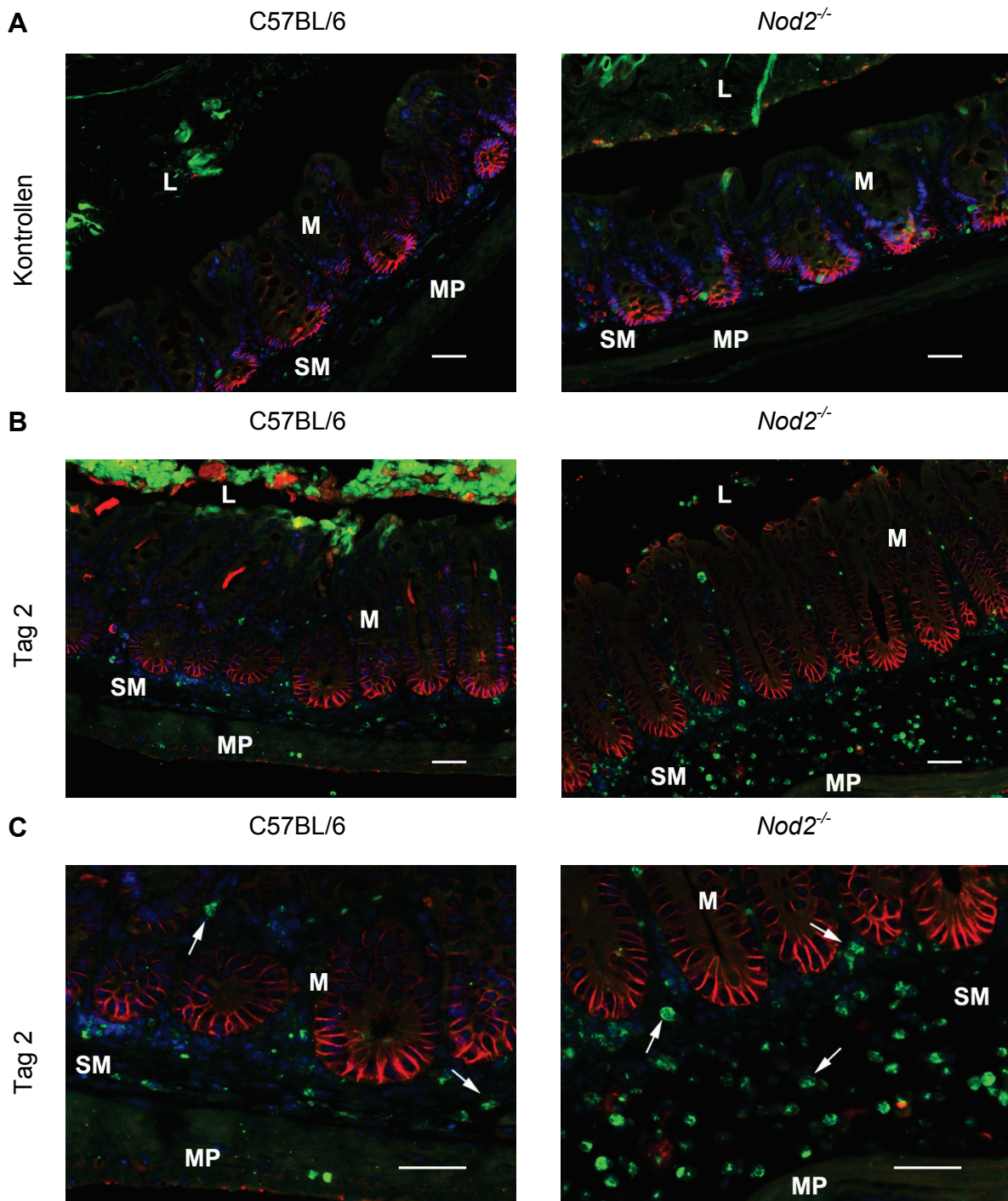


Abb. 15: Frühe Neutrophilen-Infiltration in den *S. Tm* $\Delta msbB$ -infizierten *Nod2*^{-/-} Mäusen

C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäuse wurden mit Streptomycin behandelt und nach 24 h oral mit 3×10^7 KBE *S. Tm* $\Delta msbB$ infiziert. Nach 2 Tagen wurde das Caecum isoliert und in 4 % Formalin fixiert. 5 μ m dicke Paraffinschnitte wurden mit anti-MPO (grün) und anti-E-Cadherin (rot) sowie einem entsprechenden fluoreszierenden sekundären Antikörper behandelt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Dargestellt ist eine repräsentative Aufnahme von neun bis zehn Tieren je Genotyp. L: Lumen; M: Mukosa; MP: *muscularis propria*; SM: Submukosa; Pfeile: MPO-positive Zellen (A) Streptomycin-behandelte nicht-infizierte Tiere ; Größenbalken: 200x Original-Vergrößerung: 50 μ m (B) Tag 2; 200x Original-Vergrößerung, Größenbalken: 50 μ m (C) Tag 2; 400x Original-Vergrößerung, Größenbalken: 50 μ m

3.1.3.4. Makrophagen infiltrieren das entzündete Caecum von *S. Tm* Δ *msbB*-infizierten Mäusen

Desweiteren wurde die Beteiligung von Makrophagen und T-Zellen an der *S. Tm* Δ *msbB*-induzierten Entzündung untersucht. Dazu wurden Makrophagen mit einem anti-CD68 Antikörper (rot), T-Zellen mit einem anti-CD3 Antikörper (grün) und die Zellkerne mit DAPI angefärbt.

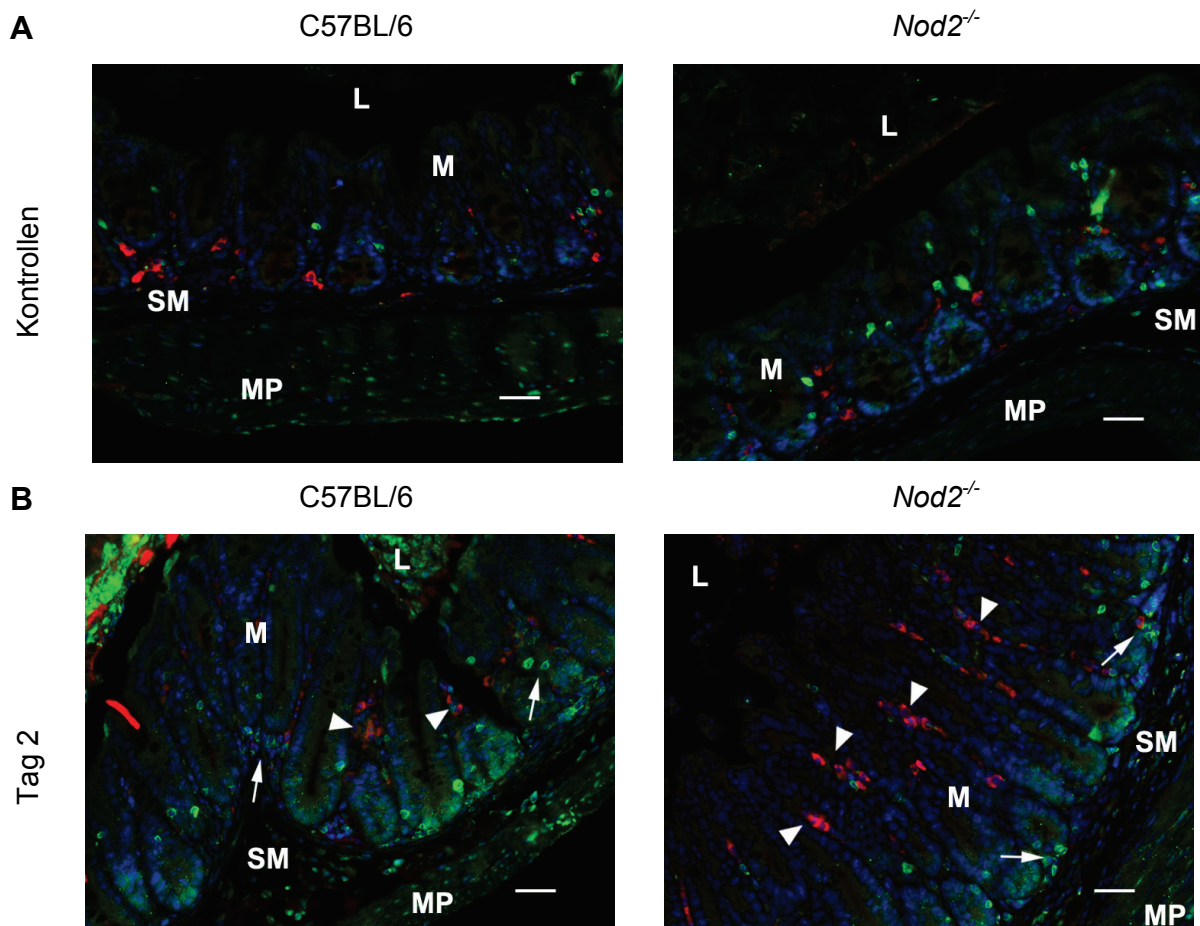


Abb. 16: Infiltration von Makrophagen und T-Zellen

C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäuse wurden mit Streptomycin behandelt und nach 24 h oral mit 3×10^7 KBE *S. Tm* Δ *msbB* infiziert. Nach zwei Tagen wurde das Caecum isoliert und in 4 % Formalin fixiert. 5 μ m dicke Paraffinschnitte wurden mit anti-CD3 (grün) und anti-CD68 (rot) sowie einem entsprechenden fluoreszierenden sekundären Antikörper behandelt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Dargestellt ist eine repräsentative Aufnahme von neun bis zehn Tieren je Genotyp. L: Lumen; M: Mukosa; MP: *muscularis propria*; SM: Submucosa; Pfeile: T-Zellen; Pfeilspitzen: Makrophagen; (A) Streptomycin-behandelte nicht-infizierte Tiere ; 200x Original-Vergrößerung, Größenbalken: 50 μ m (B) Tag 2; 200x Original-Vergrößerung, Größenbalken: 50 μ m

Bereits im nicht-entzündeten Darm sind in der Mukosa residente Makrophagen und T-Zellen angesiedelt (Abb. 16 A) [94, 95]. Zwei Tage nach der *S. Tm* $\Delta msbB$ -Infektion wurden weitere Makrophagen in das entzündete Gewebe rekrutiert, wobei in den *Nod2*^{-/-} Mäusen mehr Makrophagen im Vergleich zu den C57BL/6J Mäusen nachgewiesen wurden (Abb. 16 B). Im Gegensatz dazu war kein Unterschied in der Infiltration durch T-Zellen zwischen den C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäusen festzustellen.

Da die immunhistologische Untersuchung auf eine verstärkte Rekrutierung von Makrophagen in das Caecum von *S. Tm* $\Delta msbB$ -infizierten *Nod2*^{-/-} Mäusen hindeuteten, wurde dies anhand von Genexpressions-Analysen genauer verifiziert.

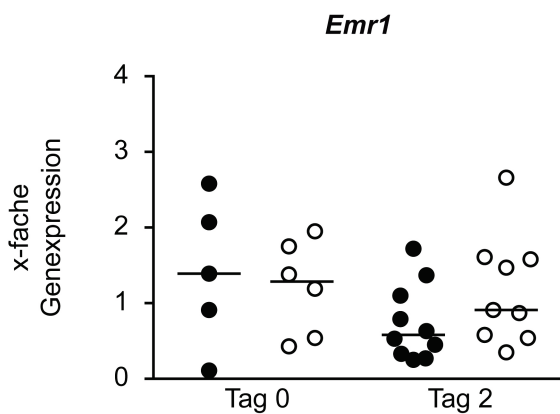


Abb. 17: Unveränderte Genexpression von *Emr1* in *S. Tm* $\Delta msbB$ -infizierten Mäusen

C57BL/6J (schwarze Symbole) und *Nod2*^{-/-} (weiße Symbole) Mäuse wurden mit Streptomycin behandelt und nach 24 h oral mit 3×10^7 KBE *S. Tm* $\Delta msbB$ infiziert. Das Caecum wurde an den angegebenen Zeitpunkten isoliert und die relative Genexpression von *Emr1* im Verhältnis zu *Gapdh* mittels quantitativer *Real-Time* PCR bestimmt. Die Daten wurden auf die relative Genexpression von Tag 0 normalisiert. Dargestellt ist der Median von fünf bis zehn Tieren je Genotyp. ns: $p > 0,05$; 1-Weg ANOVA Test mit Bonferroni Test

Um die Makrophagen-Rekrutierung genauer zu betrachten, wurde die Genexpression von *EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1* (*Emr1*), einem Makrophagen-spezifischen Oberflächenmarker, mittels quantitativer *Real-Time* PCR untersucht (Abb. 17). Die immunhistologischen Untersuchungen wurden jedoch nicht bestätigt, da weder im zeitlichen Verlauf noch zwischen den Mäusen ein signifikanter Unterschied in der *Emr1*-Genexpression detektiert wurde.

3.1.3.5. Einfluss von *Nod2* auf die Genexpression von PRRs in der *S. Tm* $\Delta msbB$ -induzierten Colitis

Im Verlauf dieser Arbeit stellte sich die Frage, ob die *Nod2*-Mutation in den *Nod2*^{-/-} Mäusen einen Einfluss auf die Genexpression der PRRs *Nod1* und *Tlr2* nimmt. Dazu wurde RNA aus

Caeca von *S. Tm* $\Delta msbB$ -infizierten Mäusen isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Genexpression mittels quantitativer *Real-Time* PCR ermittelt.

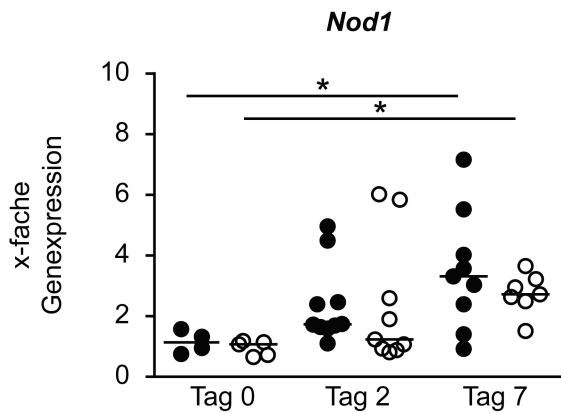


Abb. 18: Induktion der *Nod1*-Genexpression in *S. Tm* $\Delta msbB$ -infizierten Mäusen

C57BL/6J (schwarze Symbole) und *Nod2*^{-/-} (weiße Symbole) Mäuse wurden mit Streptomycin behandelt und nach 24 h oral mit 3×10^7 KBE *S. Tm* $\Delta msbB$ infiziert. Das Caecum wurde an den angegebenen Zeitpunkten isoliert und die relative Genexpression von *Nod1* im Verhältnis zu *Gapdh* mittels quantitativer *Real-Time* PCR bestimmt. Die Daten wurden auf die relative Genexpression von Tag 0 normalisiert. Dargestellt ist der Median von vier bis zehn Tieren je Genotyp. *: $p < 0,05$; 1-Weg ANOVA Test mit Bonferroni Test

Während die Genexpression von *Nod1* in den Streptomycin-behandelten, nicht-infizierten C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäusen vergleichbar war, wurde an Tag 2 und Tag 7 eine etwas geringere *Nod1*-Expression in den *Nod2*^{-/-} Mäusen detektiert (Abb. 18). Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Zwei Tage nach der Infektion wurde in den C57BL/6J Mäusen ein leichter, aber nicht signifikanter Anstieg der Genexpression im Vergleich zu Tag 0 gezeigt. Im Gegensatz dazu war die Genexpression von *Nod1* von Tag 0 zu Tag 7 sowohl in C57BL/6J als auch in *Nod2*^{-/-} Mäusen signifikant hochreguliert.

Darüberhinaus wurde mittels quantitativer *Real-Time* PCR untersucht, ob die Genexpression von *Tlr2* an Tag 2 der Infektion unterschiedlich in C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäusen ist.

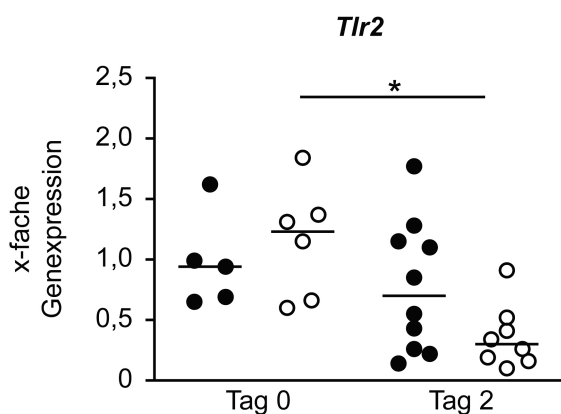


Abb. 19: Veränderte Genexpression von *Tlr2* in *S. Tm* $\Delta msbB$ -infizierten Mäusen

C57BL/6J (schwarze Symbole) und *Nod2*^{-/-} (weiße Symbole) Mäuse wurden mit Streptomycin behandelt und nach 24 h oral mit 3×10^7 KBE *S. Tm* $\Delta msbB$ infiziert. Das Caecum wurde an den angegebenen Zeitpunkten isoliert und die relative Genexpression von *Tlr2* im Verhältnis zu *Gapdh* mittels quantitativer *Real-Time* PCR bestimmt. Die Daten wurden auf die relative Genexpression von Tag 0 normalisiert. Dargestellt ist der Median von fünf bis zehn Tieren je Genotyp. *: $p < 0,05$; Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Mehrfach-Vergleichstest

In nicht-infizierten *Nod2*^{-/-} Mäusen wurde im Vergleich zu C57BL/6J Mäusen keine signifikant veränderte Genexpression von *Tlr2* festgestellt (Abb. 19), dies war auch zwei Tage nach der Infektion mit *S. Tm ΔmsbB* der Fall. Im Verlauf der Infektion von Tag 0 zu Tag 2 wurde die *Tlr2*-Genexpression jedoch in *Nod2*^{-/-} Mäusen signifikant herunter reguliert, während die Genexpression in C57BL/6J Mäusen unverändert blieb.

3.1.3.6. Einfluss von Nod2 auf die Synthese von Chemo- und Zytokinen in der *S. Tm ΔmsbB*-induzierten Colitis

Um die Faktoren, die zu der verstärkten *S. Tm ΔmsbB*-induzierten Colitis der *Nod2*^{-/-} Mäuse führten, zu charakterisieren, wurde die Expression anti- bzw. proinflammatorischer Gene untersucht. Dazu wurde RNA aus Caeca von *S. Tm ΔmsbB*-infizierten Mäusen, in cDNA umgeschrieben und die Genexpression mittels quantitativer *Real-Time* PCR ermittelt.

Zwei Tage nach der *S. Tm ΔmsbB*-Infektion stieg die Genexpression des Chemokins *Mcp-1* sowohl in C57BL/6J als auch in *Nod2*^{-/-} Mäusen signifikant an (Abb. 20 A). Auch von Tag 0 zu Tag 7 war eine Hochregulation der Genexpression zu beobachten, allerdings war die erhöhte *Mcp-1*-Expression von Tag 0 zu Tag 7 nur in C57BL/6J Mäusen signifikant. Im Gegensatz dazu war in *Nod2*^{-/-} Mäusen die Genexpression von *Mcp-1* an Tag 7 etwas niedriger im Vergleich zu Tag 2, sodass die Hochregulation der *Mcp-1*-Expression von Tag 0 zu Tag 7 in *Nod2*^{-/-} Mäusen nicht signifikant war. Wie bereits für *C. rodentium*-Infektionen beschrieben [86], wurde in der *S. Tm ΔmsbB*-Infektion der Trend beobachtet, dass *Nod2*^{-/-} Mäuse an Tag 2 und Tag 7 weniger *Mcp-1* exprimieren als C57BL/6J Mäuse, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Das Chemokin *keratinocyte chemoattractant* (KC) ist an der Neutrophilen-Rekrutierung beteiligt und im Verlauf der Infektion wurde ein schrittweiser Anstieg der *Kc*-Expression in C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäusen beobachtet (Abb. 20 B). Nach zwei Tagen war die Genexpression in den Mäusen bereits erhöht und sie war nach sieben Tagen noch weiter erhöht, sodass der Anstieg von Tag 0 zu Tag 7 signifikant war. Zwischen den C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäusen wurde jedoch zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied detektiert.

Zu Beginn der Entzündung wurde nur ein geringer Anstieg der Genexpression des proinflammatorische Zytokins *Tnfα* festgestellt (Abb. 20 C). Nach sieben Tagen war die Genexpression in C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu Tag 0 signifikant hochreguliert. Zu diesem Zeitpunkt wurde außerdem eine signifikant stärkere *Tnfα*-Expression in *Nod2*^{-/-} Mäusen detektiert.

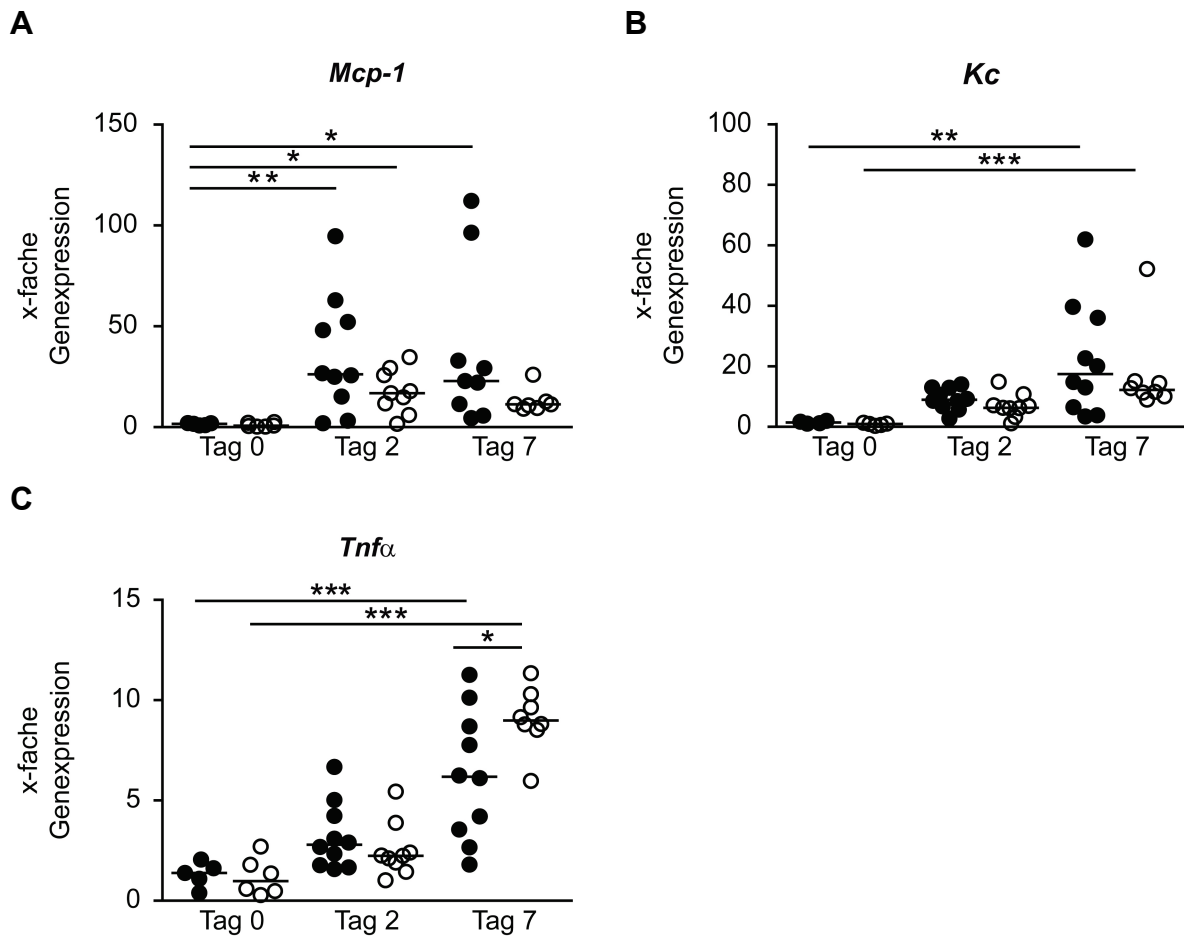


Abb. 20: Veränderte Genexpression von Chemo- und Zytokinen in *S. Tm* $\Delta msbB$ -infizierten Mäusen

C57BL/6J (schwarze Symbole) und *Nod2*^{-/-} (weiße Symbole) Mäuse wurden mit Streptomycin behandelt und nach 24 h oral mit 3×10^7 KBE *S. Tm* $\Delta msbB$ infiziert. Das Caecum wurde an den angegebenen Zeitpunkten isoliert und die relative Genexpression von *Mcp-1* (A), *Kc* (B) und *Tnfα* (C) im Verhältnis zu *Gapdh* mittels quantitativer *Real-Time* PCR bestimmt. Die Daten wurden auf die relative Genexpression von Tag 0 normalisiert. Dargestellt ist der Median von fünf bis zehn Tieren je Genotyp. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Mehrfach-Vergleichstest (A+B); 1-Weg ANOVA Test mit Bonferroni Test (C)

Da der Trend beobachtet wurde, dass *Nod2*^{-/-} Mäuse weniger *Mcp-1* exprimieren (Abb. 20 A), wurde die Proteinmenge im Zellhomogenisat des Caecums an Tag 2 der nach Infektion mittels ELISA bestimmt.

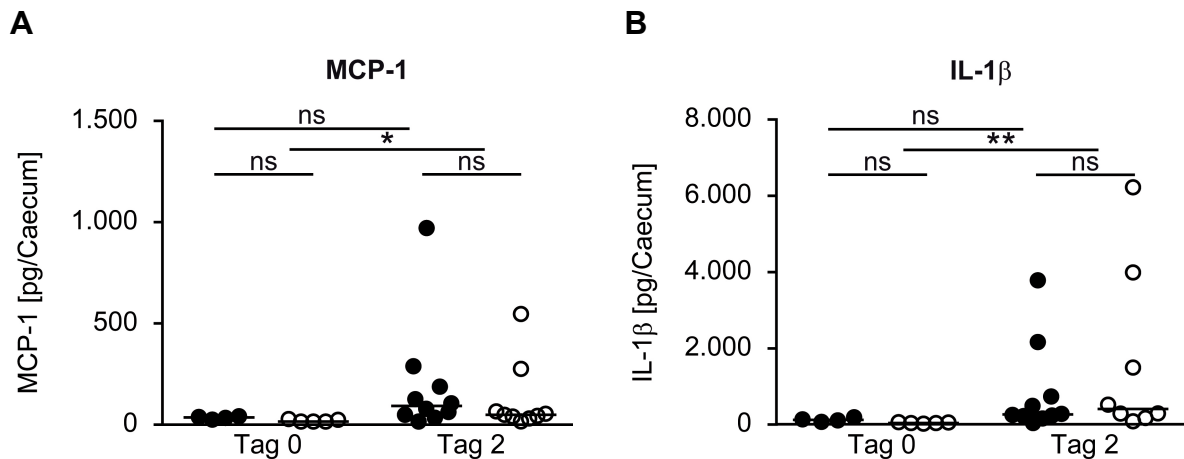


Abb. 21: Veränderte Chemo- und Zytokinmenge in *S. Tm* $\Delta msbB$ -infizierten Mäusen

C57BL/6J (schwarze Symbole) und *Nod2*^{-/-} (weiße Symbole) Mäuse wurden mit Streptomycin behandelt und nach 24 h oral mit 3×10^7 KBE *S. Tm* $\Delta msbB$ infiziert. Das Caecum wurde an den angegebenen Zeitpunkten isoliert, in 1 ml PBS homogenisiert und in dem Überstand die Protein-Konzentration von MCP-1 (A) und IL-1 β (B) mittels ELISA detektiert. Die Proteinmenge wurde für das Caecumgewicht berechnet. Dargestellt ist der Median von vier bis zehn Tieren je Genotyp. ns: $p > 0,05$; *: $p < 0,05$; Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Mehrfach-Vergleichstest

Entsprechend der Genexpression induzierte die *S. Tm* $\Delta msbB$ -Infektion einen signifikanten Anstieg der MCP-1 Protein-Konzentration im Caecum von *Nod2*^{-/-} Mäusen (Abb. 21 A). Auch in C57BL/6J Mäusen wurde zwei Tage nach der Infektion ein Anstieg der MCP-1-Produktion im Vergleich zu Tag 0 beobachtet. Zwar deutet der ermittelte Median an, dass C57BL/6J Mäuse etwas mehr MCP-1 produzierten als *Nod2*^{-/-} Mäuse, dies wurde jedoch nicht von statistischen Analysen bestätigt.

IL-1 β wurde ebenfalls verstärkt in den infizierten Mäusen produziert, dieses Ergebnis war nur in den *Nod2*^{-/-} Mäusen signifikant. Zwischen C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäusen wurde dagegen kein Unterschied in der IL-1 β -Produktion festgestellt.

Auch die IL-17- und IL-22-Signalwege sind an der Immunabwehr während einer Salmonellen-Infektionen beteiligt [91, 96, 97]. Um den Einfluss der verstärkten *S. Tm* $\Delta msbB$ -induzierten Colitis in *Nod2*^{-/-} Mäusen auf diese Interleukine zu untersuchen, wurde die Genexpression mittels quantitativer *Real-Time* PCR untersucht.

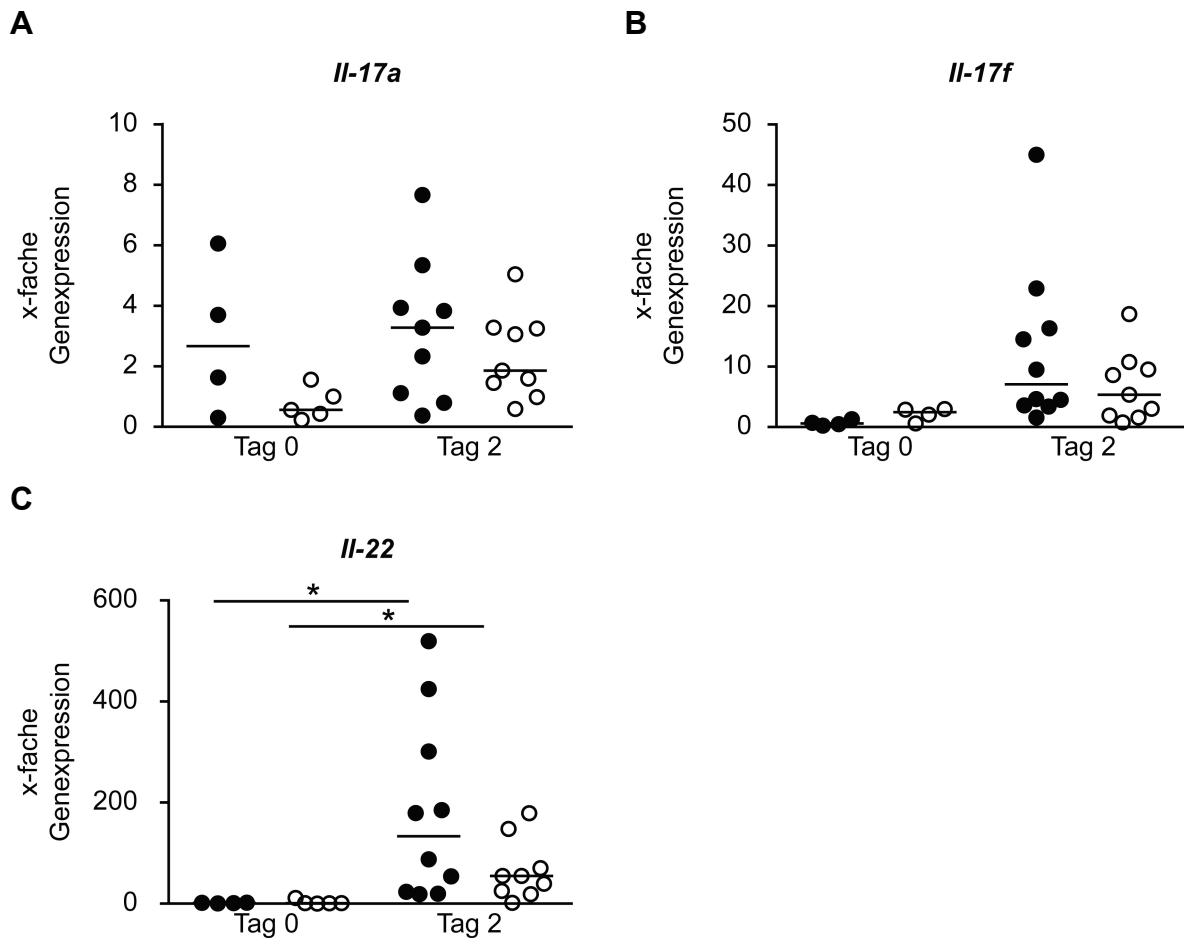


Abb. 22: Veränderte Genexpression von Interleukinen in *S. Tm* $\Delta msbB$ -infizierten Mäusen

C57BL/6J (schwarze Symbole) und *Nod2*^{-/-} (weiße Symbole) Mäuse wurden mit Streptomycin behandelt und nach 24 h oral mit 3×10^7 KBE *S. Tm* $\Delta msbB$ infiziert. Das Caecum wurde an den angegebenen Zeitpunkten isoliert und die relative Genexpression von *II-17a* (A), *II-17f* (B) und *II-22* (C) im Verhältnis zu *Gapdh* mittels quantitativer *Real-Time* PCR bestimmt. Die Daten wurden auf die relative Genexpression von Tag 0 normalisiert. Dargestellt ist der Median von vier bis zehn Tieren je Genotyp. *: $p < 0,05$; 1-Weg ANOVA Test mit Bonferroni Test (A+B); Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Mehrfach-Vergleichstest (C)

Zwei Tage nach der Infektion mit *S. Tm* $\Delta msbB$ war weder die Genexpression von *II-17a* noch von *II-17f* in den untersuchten Mäusen hochreguliert (Abb. 22 A+B). Im Gegensatz dazu wurde eine starke Hochregulation der Genexpression von *II-22* festgestellt (Abb. 22 C). *Nod2*^{-/-} Mäuse wiesen dabei tendenziell eine geringere Genexpression von *II-22* im Vergleich zu C57BL/6J Mäusen auf, dieser Unterschied war aber nicht signifikant.

3.1.3.7. Die Redox-Homöostase wird in der *S. Tm* $\Delta msbB$ -induzierten Colitis von Nod2 beeinflusst

Da Nod2 Einfluss auf die Redox-Homöostase nimmt, könnte eine Dysregulation derselben die Entzündungsreaktion im Darm beeinflussen [98]. Aus diesem Grund wurde die Expression von Genen, die an der Synthese von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und reaktiven Stickstoffspezies (RNS) beteiligt sind, während der *S. Tm* $\Delta msbB$ -Infektion untersucht.

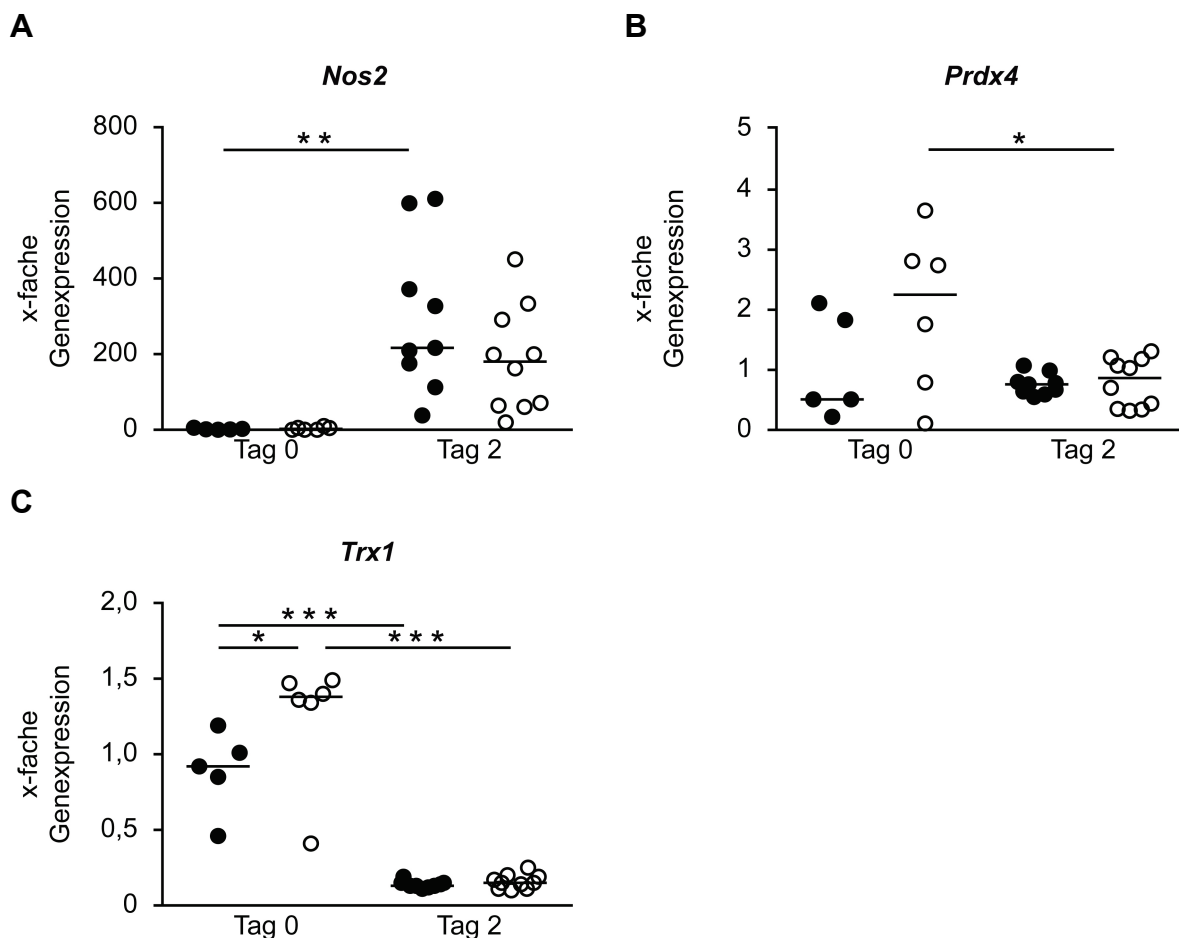


Abb. 23: Veränderte Expression der Redox-Homöostase-Gene in *S. Tm* $\Delta msbB$ -infizierten Mäusen

C57BL/6J (schwarze Symbole) und *Nod2*^{-/-} (weiße Symbole) Mäuse wurden mit Streptomycin behandelt und nach 24 h oral mit 3×10^7 KBE *S. Tm* $\Delta msbB$ infiziert und das Caecum an den angegebenen Zeitpunkten isoliert. Von den Kooperationspartnern Dr. Simone Lipinski und Prof. Dr. Philip Rosenstiel wurde die relative Genexpression von *Nos2* (A), *Prdx4* (B) und *Trx1* (C) im Verhältnis zu *Gapdh* mittels quantitativer *Real-Time* PCR bestimmt. Die Daten wurden auf die relative Genexpression von Tag 0 normalisiert. Dargestellt ist der Median von fünf bis zehn Tieren je Genotyp. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; 1-Weg ANOVA Test mit Bonferroni Test

Die Genexpression der induzierbaren Stickoxid Synthase 2 (*Nos2*), die direkt an der Umwandlung von L-Arginin zu Stickstoffmonoxid beteiligt ist, war durch die Infektion verstärkt (Abb. 23 A). Obwohl zu keinem der untersuchten Zeitpunkte Unterschiede in der *Nos2*-Expression zwischen C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäusen detektiert wurden, war der Anstieg der Genexpression von Tag 0 zu Tag 2 nur in C57BL/6J Mäusen signifikant.

Die Antioxidantien Peroxiredoxin 4 (PRDX4) und Thioredoxin (TRX1) sind an der Reduktion von ROS beteiligt [99]. In nicht-infizierten *Nod2*^{-/-} Mäusen wurde eine verstärkte Expression von *Prdx4* im Vergleich zu C57BL/6J Mäusen detektiert, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (Abb. 23 B). Im Verlauf der Infektion fiel die *Prdx4*-Expression in den *Nod2*^{-/-} Mäusen signifikant auf ein vergleichbares Level mit den C57BL/6J Mäusen ab. Auch für *Trx1* wurde an Tag 0 eine signifikant stärkere Genexpression in *Nod2*^{-/-} Mäusen detektiert (Abb. 23 C). Während der *S. Tm* Δ *msbB*-Infektion wurde für dieses Antioxidans eine signifikante Reduktion der Genexpression in C57BL/6J als auch in *Nod2*^{-/-} Mäusen beobachtet.

3.1.3.8. Nod2 nimmt keinen Einfluss auf die *S. Tm* Δ *msbB*-induzierte Fibrogenese

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *Nod2* keinen Einfluss auf die *S. Tm* Δ *aroA*-induzierte Colitis und Fibrose nimmt. Im Gegensatz dazu wurde in *Nod2*^{-/-} Mäusen mit *S. Tm* Δ *msbB* eine verstärkte Colitis induziert. Aus diesem Grund wurde der Kollagen-Gehalt des Caecums auch in den *S. Tm* Δ *msbB*-infizierten Mäusen untersucht. Dazu wurden 21 Tage nach der Infektion Caeca isoliert, in Formalin fixiert und Paraffinschnitte mit Azan gefärbt (Abb. 24).

21 Tage nach der *S. Tm* Δ *msbB*-Infektion war die Kollagen-Anreicherung weit vorangeschritten, wobei das Kollagen hauptsächlich in der Submukosa eingelagert wurde und die Mukosa von Kollagenfasern durchzogen wurde (Abb. 24 A). Zwischen den C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäusen wurde jedoch eine vergleichbar große kollagen-haltige Fläche ermittelt (Abb. 24 B).

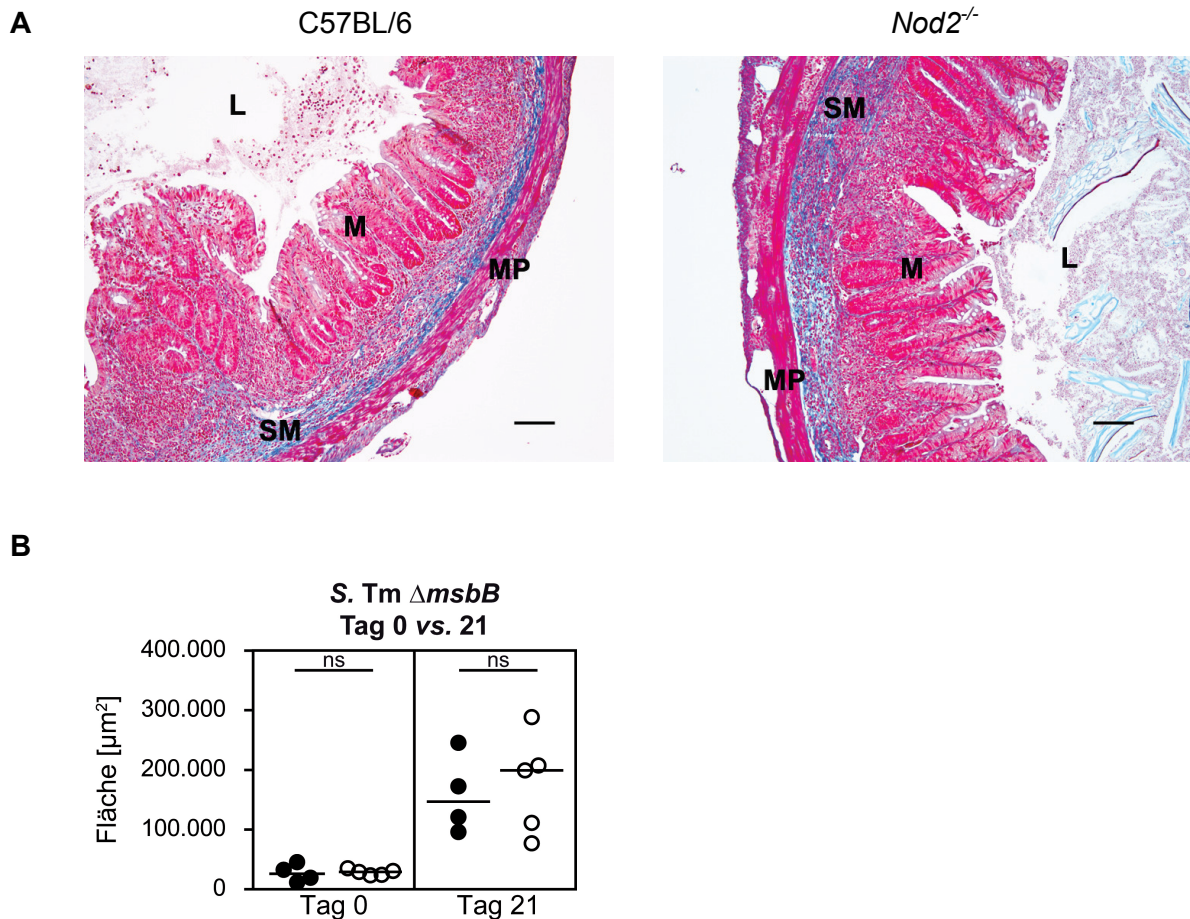


Abb. 24: Vergleichbare Kollagen-Produktion in *S. Tm* $\Delta msbB$ -infizierten Mäusen

C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäuse wurden mit Streptomycin behandelt und nach 24 h oral mit 3×10^7 KBE *S. Tm* $\Delta msbB$ infiziert. Nach 21 Tagen wurde das Caecum isoliert und in 4 % Formalin fixiert. (A) 5 μm dicke Paraffinschnitte wurden mit Azan angefärbt, um Kollagen (blau) histologisch nachzuweisen. Dargestellt ist eine repräsentative Aufnahme von neun bis zehn Tieren je Genotyp. Größenbalken bei 100x Original-Vergrößerung: 100 μm ; (B) Mittels der Software NIS Elements (Nikon Instruments Inc.) wurde die Fläche der kollagen-haltigen (blau-angefärbt) Bereiche berechnet. Für jede Maus wurde der Kollagen-Gehalt in 3 repräsentativen Abschnitten der Azan-Färbung ermittelt und der Mittelwert bestimmt. Dargestellt ist der Median von vier bis fünf Tieren je Genotyp. Schwarze Symbole: C57BL/6J Mäuse; weiße Symbole: *Nod2*^{-/-} Mäuse; ns: $p > 0,05$; Student's *t* Test

Zusammenfassend wurden zwei Tage nach der *S. Tm* $\Delta msbB$ -Infektion signifikante Unterschiede zwischen den C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäusen beobachtet. Dazu zählte eine verstärkte intestinale Entzündung der *Nod2*^{-/-} Mäuse, die mit einer massiven Infiltration von Neutrophilen einherging. Desweiteren wurde eine zeitlich verzögerte Reduzierung der Keimlast in *Nod2*^{-/-} Mäusen beobachtet. Im Gegensatz dazu wurden zu späteren Zeitpunkten der Infektion keine Unterschiede zwischen den C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäusen beobachtet.

3.2. Einfluss von Nod1 auf die akute *S. Tm* $\Delta msbB$ -induzierte Colitis

3.2.1. *S. Tm* $\Delta msbB$ induziert eine verstärkte Pathologie in *Nod1*^{-/-} und DKO Mäusen

Nod1^{-/-}/*Nod2*^{-/-} (DKO) Mäuse entwickeln nach der Infektion mit *S. Tm* Wildtyp (SL1344) eine mildere Colitis im Vergleich zu C57BL/6J, *Nod1*^{-/-} und *Nod2*^{-/-} Mäusen, die eine vergleichbare Colitis aufweisen [9]. Diese Ergebnisse lieferten Hinweise, dass Nod1 und Nod2 die *S. Tm*-induzierte Entzündungsreaktion gemeinsam modulieren. Da *S. Tm* $\Delta msbB$ eine verstärkte Colitis in *Nod2*^{-/-} Mäusen induzierte (siehe 3.1), wurde in dieser Arbeit untersucht, ob Nod1 ebenfalls in die *S. Tm* $\Delta msbB$ -induzierte Colitis involviert ist. Deshalb wurden C57BL/6J, *Nod1*^{-/-}, *Nod2*^{-/-} und DKO Mäuse mit Streptomycin behandelt und nach 24 h mit *S. Tm* $\Delta msbB$ infiziert. Nach zwei Tagen wurden das Caecum, der Colon und das Ileum zur Bestimmung der Keimlast und für histologische Untersuchungen isoliert. Diese Versuche wurden in dem Labor von Prof. Dr. Dana J. Philpott an der Universität von Toronto, Kanada, durchgeführt.

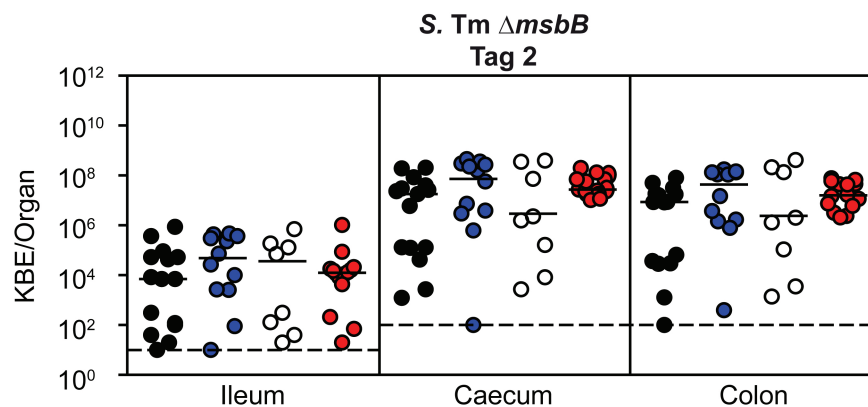


Abb. 25: Vergleichbare Keimlast in C57BL/6J, *Nod1*^{-/-}, *Nod2*^{-/-} und DKO Mäuse

C57BL/6J (schwarze Symbole), *Nod1*^{-/-} (blaue Symbole), *Nod2*^{-/-} (weiße Symbole) und DKO (rote Symbole) Mäuse wurden mit Streptomycin behandelt und nach 24 h oral mit 3×10^7 KBE *S. Tm* $\Delta msbB$ infiziert. Nach zwei Tagen wurde die Keimlast in den angegebenen Darmabschnitten bestimmt. Dargestellt ist der Median von zwölf bis fünfzehn Tieren je Genotyp. Gestrichelte Linie: Detektionslimit. ns: $p > 0,05$; Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Mehrfach-Vergleichstest

Zwei Tage nach der Infektion wurde im Caecum und Colon der *Nod2*^{-/-} Mäuse (weiße Symbole) im Vergleich zu C57BL/6J Mäusen (schwarze Symbole) eine etwas reduzierte, aber nicht signifikant unterschiedliche Keimlast detektiert (Abb. 25). Die Keimlast der *Nod1*^{-/-} Mäuse (blaue Symbole) wies keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu C57BL/6J Mäusen auf, allerdings wurde eine etwas höhere Keimlast beobachtet. In den DKO Mäuse (rote Symbole) wurde in allen Organen eine vergleichbare Keimlast beobachtet.

Um die Schwere der induzierten Colitis zu bewerten, wurden isolierte Caeca in Formalin fixiert, Paraffinschnitte mit H&E angefärbt und nach einem Bewertungssystem (siehe 2.12.3) pathologisch begutachtet.

Im Gegensatz zu vorangegangenen Versuchen, die am FZ Borstel durchgeführt wurden (siehe 3.1.3), induzierte *S. Tm ΔmsbB* im Labor der Universität Toronto, Kanada, eine deutlich milder Colitis (Abb. 26). In *Nod2^{-/-}* Mäusen (weiße Symbole) wurde tendenziell eine etwas stärkere Entzündung als in den C57BL/6J Mäusen (schwarze Symbole) beobachtet, jedoch war dieser Unterschied aufgrund der Streuung nicht signifikant. Im Gegensatz dazu induzierte *S. Tm ΔmsbB* in den *Nod1^{-/-}* Mäusen (blaue Symbole) eine signifikant stärkere Entzündung im Vergleich zu C57BL/6J Mäusen (Abb. 26). Auch in den DKO Mäusen (rote Symbole) wurde eine signifikant stärkere Entzündung zu den C57BL/6J Mäusen detektiert. Diese war vergleichbar mit der Entzündung in den *Nod1^{-/-}* Mäusen.

Die stärkere Entzündung zeichnete sich in den *Nod1^{-/-}* und DKO Mäusen durch eine beginnende Ödem-Bildung in der Submukosa aus (Abb. 26 A). Die Mukosa war in den *Nod1^{-/-}* Mäusen durch infiltrierende Zellen etwas verdickt. Auch die Desquamation der Epithelschicht war vorangeschritten und es befanden sich apoptotische Zellen und Neutrophile im Darmlumen.

Diese Untersuchungen zeigten, dass neben *Nod2* auch *Nod1* eine Rolle in der *S. Tm ΔmsbB*-induzierten Colitis spielt.

3.3. Unterschiedliche Aktivierung von PRRs durch *S. Tm* $\Delta msbB$

Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass *S. Tm* $\Delta msbB$ im Gegensatz zu anderen *S. Tm* Stämmen in *Nod2*^{-/-} Mäusen eine stärkere Immunpathologie auslöst, wurde analysiert welche Faktoren dafür verantwortlich sind. Deshalb wurde *in vitro* untersucht, ob *S. Tm* $\Delta msbB$ im Vergleich zu *S. Tm* Wildtyp PRRs unterschiedlich stimuliert. Für die oben gezeigten *in vivo*-Versuche wurden die Stämme *S. Tm* Wildtyp und *S. Tm* $\Delta msbB$ auf dem genetischen Hintergrund von Stamm C5 und der Stamm *S. Tm* $\Delta aroA$ auf dem genetischen Hintergrund von SL1344 eingesetzt. *S. Tm* SL1344 ist besser charakterisiert als *S. Tm* C5 (falls nicht genauer spezifiziert auch als *S. Tm* Wildtyp bezeichnet). Um zu zeigen, dass die Unterschiede durch den *MsbB*-Defekt und nicht aufgrund von Unterschieden zwischen den *Salmonella* Wildtyp Stämmen vermittelt wurden, wurde in dieser Arbeit eine weitere *S. Tm* $\Delta msbB$ Mutante auf dem genetischen Hintergrund von *S. Tm* SL1344 generiert (siehe 2.9.2) und mit der *S. Tm* $\Delta msbB$ Mutante auf dem genetischen Hintergrund von *S. Tm* C5 verglichen.

3.3.1. LPS von *S. Tm* $\Delta msbB$ weist eine reduzierte Aktivierung von TLR4 auf

S. Tm $\Delta msbB$ fehlt aufgrund einer Deletion das Enzym *MsbB*, welches an der Acylierung von Lipid A in der Synthese von LPS beteiligt ist. Aus diesem Grund hat das Lipid A eine Acylgruppe weniger [14] und es wird angenommen, dass es nicht mehr als TLR4 Agonist wirken kann [100]. In diesem Zusammenhang wurde bereits gezeigt, dass diese Lipid A-Veränderung zu einer verminderten Virulenz von *S. Tm* $\Delta msbB$ führt, da C57BL/6J Mäuse im Gegensatz zu *S. Tm* Wildtyp-Infektionen nicht an der *S. Tm* $\Delta msbB$ -Infektion sterben [15]. Darüberhinaus wurde vermutet, dass dies ein TLR4-abhängiger Prozess ist, da *TLR4*^{-/-} Mäuse sowohl die Infektion mit *S. Tm* Wildtyp als auch mit *S. Tm* $\Delta msbB$ überleben [15].

Da bisher ein direkter Nachweis fehlt, dass das LPS von *S. Tm* $\Delta msbB$ TLR4 nicht oder nur reduziert aktiviert, sollte diese Frage in dieser Arbeit analysiert werden. Dazu wurden HEK293 Zellen transient mit TLR4 (inklusive CD14 und MD2) transfiziert und mit LPS von *S. Tm* Wildtyp oder *S. Tm* $\Delta msbB$ stimuliert und nach 24 h wurde im Zellkulturüberstand die IL-8-Produktion mittels ELISA gemessen.

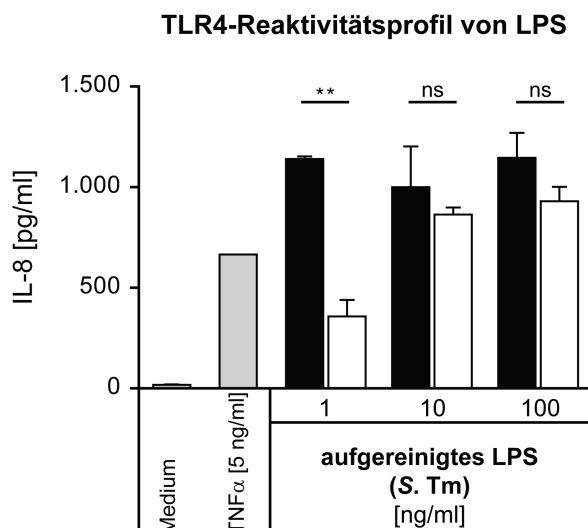


Abb. 27: Reduzierte TLR4-Reaktivität des LPS von *S. Tm* $\Delta msbB$

HEK293 Zellen wurden transient mit hTLR4 transfiziert und 24 h mit LPS von *S. Tm* Wildtyp (schwarze Balken) oder *S. Tm* $\Delta msbB$ (weiße Balken) stimuliert. Als Kontrolle wurden Zellen mit Medium und 5 ng/ml TNF α (graue Balken) stimuliert. Mittels ELISA wurde IL-8 im Zellkulturüberstand nachgewiesen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis einer Doppelbestimmung mit Mittelwert und Standardabweichung. Die Standardabweichung ist nicht eingezeichnet, wenn sie zu gering war. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt. ns: $p > 0,05$; **: $p < 0,01$; 2-Wege ANOVA Test mit Bonferroni Test)

Die Stimulation der TLR4-transfizierten Zellen mit TNF α resultierte in einer IL-8-Produktion, während nach der Kontrollstimulation mit Medium kein IL-8 nachgewiesen wurde (Abb. 27). Ein ng/ml LPS von *S. Tm* Wildtyp induzierte eine starke IL-8-Produktion, die durch höhere LPS-Konzentrationen nicht weiter gesteigert werden konnte. Auch das aus *S. Tm* $\Delta msbB$ aufgereinigte LPS induzierte die Produktion von IL-8, wobei eine Dosis-Abhängigkeit beobachtet wurde. Stimulation mit einer niedrigen Konzentration (1 ng/ml) LPS von *S. Tm* $\Delta msbB$ induzierte signifikant weniger IL-8 im Vergleich zu LPS von *S. Tm* Wildtyp. Bei höheren LPS-Konzentrationen wurde hingegen kein Unterschied zwischen *S. Tm* $\Delta msbB$ und *S. Tm* Wildtyp festgestellt.

3.3.2. Gegenseitige Inhibition von Nod2 und TLR4

In neugeborenen Mäusen wurde gezeigt, dass Nod2 inhibitorisch auf TLR4 wirkt und dadurch einen protektiven Einfluss auf die LPS-induzierte nekrotisierende Enterocolitis hat [75]. Um die Wechselwirkung zwischen Nod2 und TLR4 zu untersuchen wurden HEK293 Zellen mit Nod2 und TLR4 ko-transfiziert und mit Nod2 oder TLR4 einzel-transfizierten HEK293 Zellen verglichen. Um den Unterschied zwischen *S. Tm* Wildtyp und *S. Tm* $\Delta msbB$ zu charakterisieren, wurden die Zellen mit hitzeinaktivierten Salmonellen stimuliert und nach 24 h IL-8 mittels ELISA im Zellkulturüberstand nachgewiesen.

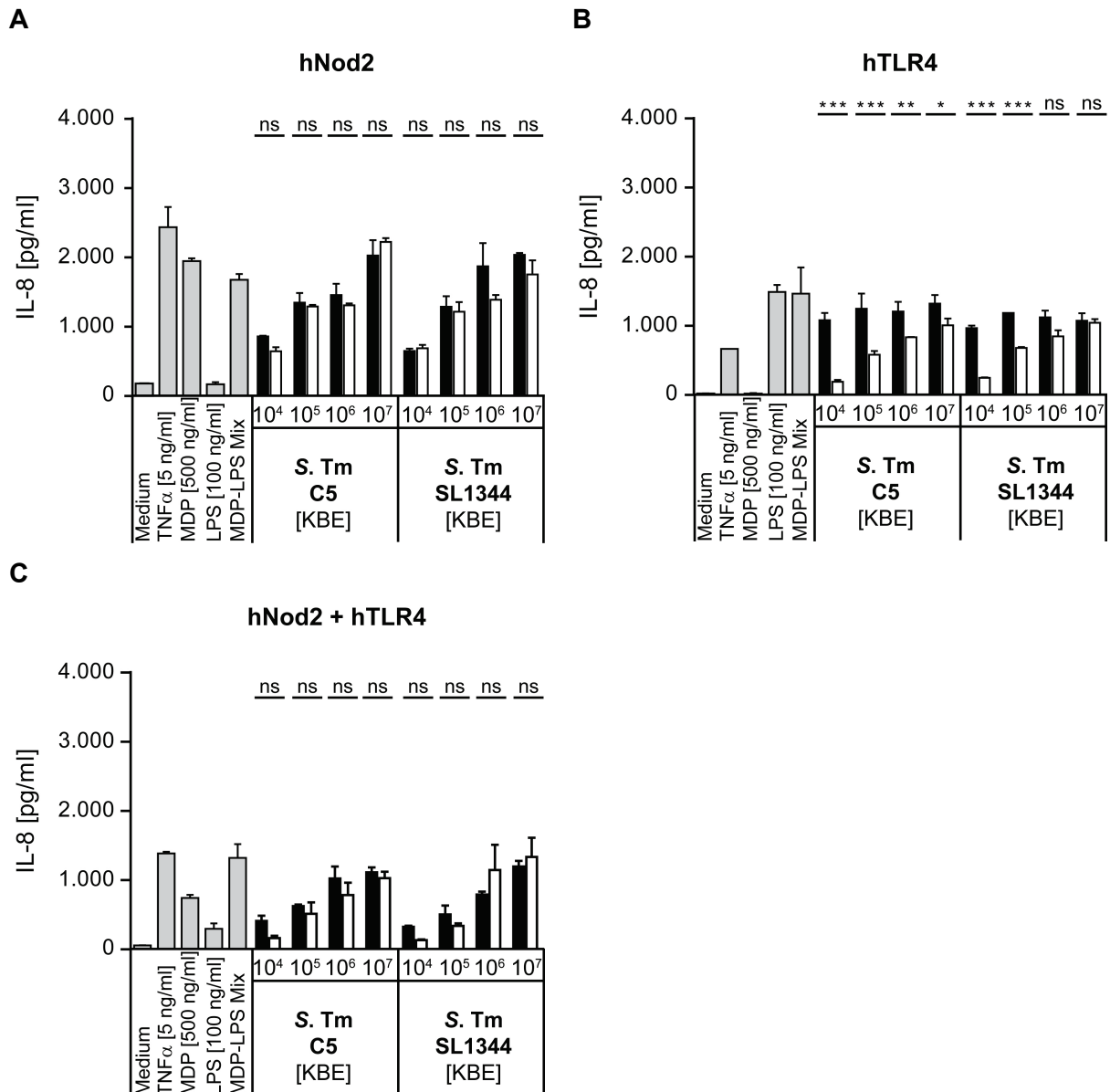


Abb. 28: Reduzierte TLR4-Reaktivität von *S. Tm* Δ *msbB*

HEK293 Zellen wurden transient mit hNOD2 (A), hTLR4 (B) bzw. mit hNOD2 und hTLR4 (C) transfiziert und 24 h mit hitzeinaktiviertem *S. Tm* Wildtyp (C5- oder SL1344-Stamm, schwarze Balken) bzw. mit *S. Tm* Δ *msbB* (Mutterstamm C5- oder SL1344-Stamm, weiße Balken) stimuliert. Als Kontrolle wurden Zellen mit Medium, 5 ng/ml TNF α , 500 ng/ml MDP, 100 ng/ml LPS (*S. Friedenau*) oder einem Gemisch aus 500 ng/ml MDP und 100 ng/ml LPS (*S. Friedenau*) (graue Balken) stimuliert. Mittels ELISA wurde IL-8 im Zellkulturüberstand nachgewiesen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis einer Doppelbestimmung mit Mittelwert und Standardabweichung. Die Standardabweichung ist nicht eingezeichnet, wenn sie zu gering war. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt. ns: $p > 0,05$; *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$; 2-Wege ANOVA Test mit Bonferroni Test)

Nod2-transfizierte HEK293 Zellen produzierten IL-8 nach der Stimulation mit den Kontrollen TNF α , MDP oder MDP und LPS, während die Kontrollstimulationen mit Medium und LPS zu keiner IL-8-Produktion führten (Abb. 28 A). Die Stimulation mit *S. Tm* Wildtyp (C5-Stamm) und *S. Tm* Δ *msbB* (C5-Stamm) resultierte in einer vergleichbaren IL-8-Produktion. Dies

wurde auch für *S. Tm* Wildtyp (SL1344-Stamm) und *S. Tm* $\Delta msbB$ (SL1344-Stamm) festgestellt.

Wie erwartet wurden TLR4-transfizierte Zellen durch die Kontrollstimulation mit $TNF\alpha$, LPS oder MDP und LPS aktiviert, aber nicht durch die Stimulation mit Medium oder MDP allein. Mit den *S. Tm* Wildtyp Stämmen C5 und SL1344 wurde im Vergleich zu der entsprechenden *S. Tm* $\Delta msbB$ Mutante eine signifikant stärkere TLR4-Aktivierung beobachtet (Abb. 28 B).

Die Stimulation der Nod2 und TLR4 ko-transfizierten Zellen mit $TNF\alpha$, MDP, LPS oder MDP und LPS resultierte in einer IL-8-Produktion. Außerdem wies die Ko-Transfektion eine vergleichbare IL-8-Produktion zwischen den *S. Tm* Wildtyp Stämmen (C5 oder SL1344) und den entsprechenden *S. Tm* $\Delta msbB$ Mutanten auf (Abb. 28 C). Die IL-8-Produktion war bei der Ko-Transfektion mit Nod2 und TLR4 im Vergleich zu den Einzel-Transfektionen nicht verstärkt, sondern verringert. Die Ko-Stimulation resultierte also in einer Inhibition zwischen Nod2 und TLR4.

3.3.3. Verstärkte TLR2-Reaktivität von *S. Tm* $\Delta msbB$

Um die Wechselwirkung zwischen Nod2 und TLR2 genauer zu charakterisieren, wurden HEK293 Zellen mit Nod2 und TLR2 einzeln-transfiziert oder mit Nod2 und TLR2 ko-transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden für 24 h mit hitzeinaktivierten Salmonellen stimuliert und die IL-8-Konzentration mittels ELISA im Zellkulturüberstand untersucht.

In Nod2-transfizierte HEK293 Zellen wurde IL-8 nach der Stimulation mit $TNF\alpha$, MDP oder MDP und P3CSK4, jedoch nicht nach der Stimulation mit Medium und P3CSK4, detektiert (Abb. 29 A). Desweiteren wurde in den Zellen eine vergleichbare IL-8-Produktion nach der Stimulation mit den verschiedenen *S. Tm* Wildtyp- oder *S. Tm* $\Delta msbB$ -Stämmen beobachtet.

Bei TLR2 wurde eine IL-8-Produktion nach der Stimulation mit $TNF\alpha$, P3CSK4 oder MDP und P3CSK4 nachgewiesen (Abb. 29 B). Die Stimulation mit Medium oder MDP resultierte dagegen in keiner Produktion von IL-8. *S. Tm* Wildtyp C5 und SL1344 führten zu einer schwachen Aktivierung von TLR2 mit der höchsten eingesetzten Bakterien-Konzentration. Im Gegensatz dazu wurde für *S. Tm* $\Delta msbB$ eine signifikant höhere IL-8-Produktion detektiert. Dieser Unterschied zu *S. Tm* Wildtyp wurde für alle untersuchten *S. Tm* $\Delta msbB$ Mutanten gezeigt.

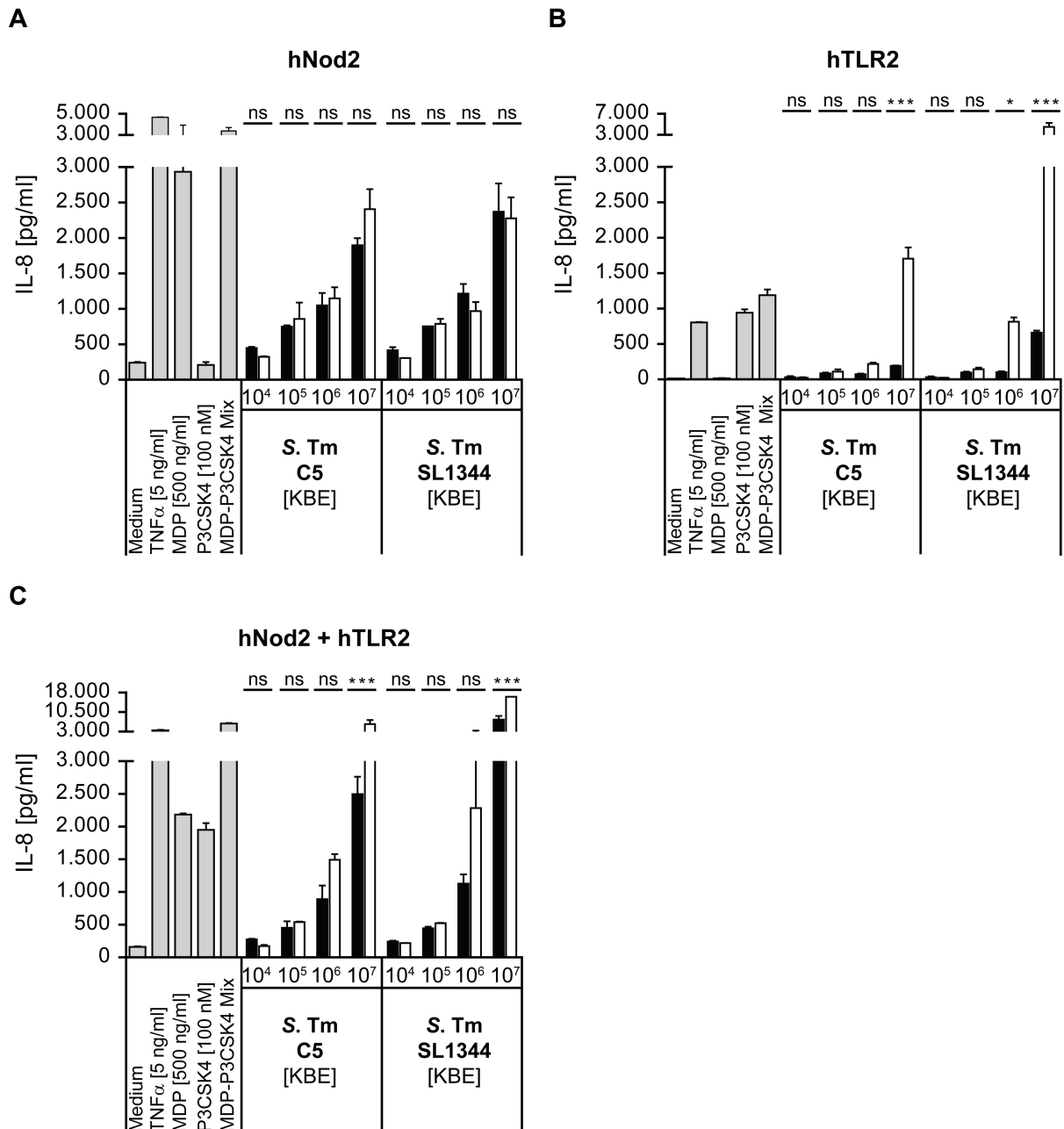


Abb. 29: Verstärkt TLR2-Reaktivität von *S. Tm* Δ *msbB*

HEK293 Zellen wurden transient mit hNOD2 (A), hTLR2 (B) bzw. mit hNOD2 und hTLR2 (C) transfiziert und 24 h mit hitzeinaktiviertem *S. Tm* Wildtyp (C5- oder SL1344-Stamm, schwarze Balken) bzw. mit *S. Tm* Δ *msbB* (Mutterstamm C5- oder SL1344-Stamm, weiße Balken) stimuliert. Als Kontrolle wurden Zellen mit Medium, 5 ng/ml TNF α , 500 ng/ml MDP, 100 nM P3CSK4 oder einem Gemisch aus 500 ng/ml MDP und 100 nM P3 (graue Balken) stimuliert. Mittels ELISA wurde IL-8 im Zellkulturüberstand nachgewiesen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis der Doppelbestimmung mit Mittelwert und Standardabweichung. Die Standardabweichung ist nicht eingezeichnet, wenn sie zu gering war. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt. ns: $p > 0,05$; *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$; 2-Wege ANOVA Test mit Bonferroni Test

Die Nod2/TLR2-ko-transfizierten Zellen produzierten nach der Stimulation mit den Kontrollen TNF α , MDP, P3CSK4 oder MDP und P3CSK4 IL-8 (Abb. 29 C). Es wurde beobachtet, dass

S. Tm $\Delta msbB$ im Vergleich zu *S. Tm* Wildtyp eine höhere IL-8-Produktion induziert. Dieser Unterschied war bei 10^7 KBE signifikant und wurde sowohl mit den C5- als auch den SL1344-Stämmen beobachtet. Darüberhinaus war die IL-8-Produktion nach der Stimulation mit der höchsten Bakterien-Konzentration an *S. Tm* in den Nod2/TLR2-ko-transfizierten Zellen signifikant höher als bei den Einzel-Transfektionen. Das weist auf einen Synergismus zwischen Nod2 und TLR2 hin, der mittels mathematischer Analysen (siehe 2.16) nachgewiesen wurde.

Mittels der *in vitro* Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass LPS von *S. Tm* $\Delta msbB$ sowie hitzeinaktivierte *S. Tm* $\Delta msbB$ eine reduzierte TLR4-Reaktivität im Vergleich zu *S. Tm* Wildtyp aufweisen. Diese reduzierte TLR4-Reaktivität war Dosis-abhängig. Darüberhinaus wurde eine Inhibition zwischen Nod2 und TLR4 durch Stimulation mit *S. Tm* Wildtyp oder *S. Tm* $\Delta msbB$ belegt. Außerdem wurde gezeigt, dass *S. Tm* $\Delta msbB$ im Vergleich zu *S. Tm* Wildtyp eine verstärkte TLR2-Reaktivität aufweist und ein synergistischer Einfluss zwischen Nod2 und TLR2 in Folge der Stimulation mit *S. Tm* besteht.

4. Diskussion

Nod2 ist ein Suszeptibilitätsgen der Darmerkrankung Morbus Crohn und es wurden bereits mehrere Mutationen identifiziert, die mit der Krankheit assoziiert sind [35]. Darüberhinaus spielt Nod2 bei Infektionen mit verschiedenen Pathogenen wie *Citrobacter rodentium* (*C. rodentium*), *Helicobacter hepaticus* (*H. hepaticus*) oder *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) eine wichtige Rolle [58, 86, 87]. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit untersucht, welchen Einfluss der Nod-like Rezeptor Nod2 auf die Salmonellen-induzierte Colitis und Fibrose in der Maus nimmt. Dazu wurde ein Mausmodell [2] eingesetzt, dass mittels einer *S. Tm*-Infektion eine Colitis im Caecum induziert, die mit der Ausbildung einer intestinalen Fibrose einhergeht und in vielen Aspekten den Charakteristika von Morbus Crohn ähnelt.

4.1. Nod2 nimmt keinen Einfluss auf die *S. Tm* Δ *aroA*- oder *S. Tm* Wildtyp-induzierte Colitis

Aufgrund einer Punktmutation in dem Gen *Nramp1* sind C57BL/6J Mäuse suszeptibel für *S. Tm* und die Infektion verläuft letal [101]. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit *S. Tm* Wildtyp ausschließlich für zweitägige Infektionsversuche verwendet, anhand welcher der akute Verlauf, nicht aber die intestinale Fibrose untersucht werden konnte. Um den Einfluss von Nod2 auf die Fibrose während des späteren Infektionsverlaufs zu untersuchen, wurde daher die attenuierte Mutante *S. Tm* Δ *aroA* eingesetzt. Es ist bereits bekannt, dass *Nod2*^{-/-} Mäuse suszeptibel gegenüber einer chemisch-induzierte Colitis sind und sowohl bei der Behandlung mit Dextran Natrium Sulfat (DSS) als auch mit 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) eine verstärkte Entzündung im Colon entwickeln [102, 103].

Die Infektion mit *S. Tm* Δ *aroA* resultierte an Tag 14 in einer geringeren Keimlast im Darm der *Nod2*^{-/-} Mäuse und deutete darauf hin, dass *Salmonella* den Darm schlechter besiedelte (Abb. 7 A). Diese Mausdaten streuten jedoch sehr stark, sodass keine Signifikanz nachgewiesen wurde. Nach 21 Tagen war die Keimlast in den C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäusen vergleichbar (Abb. 7 C+D). Auch während der akuten *S. Tm* Wildtyp-induzierten Colitis wurde kein Unterschied in der Salmonellen-Besiedelung festgestellt. Diese Ergebnisse widersprachen allerdings Untersuchungen von Kobayashi *et al.*, die Nod2 eine wichtige Rolle in der Eliminierung von Pathogenen im Darm zusprachen [58]. Die Infektion mit *L. monocytogenes* resultierte, wenn sie über den gastrointestinalen Weg infiziert wurden, in einer höheren Keimlast der *Nod2*^{-/-} Mäuse. Wurden die Mäuse jedoch intravenös infiziert, war dieser Unterschied nicht feststellbar [58]. Gemeinsam mit den hier gezeigten Daten

deutet es darauf hin, dass Nod2 eine selektive Rolle bei der Eliminierung von Pathogenen spielt, die nicht nur Organ-spezifisch, sondern auch von dem jeweiligen Pathogen abhängt. Von Geddes *et al.* wurde die vergleichbare Keimlast von *S. Tm* Wildtyp (Abb. 10) später bestätigt, der zeigen konnte, dass Nod1 und Nod2 alleine keinen Einfluss auf die Keimlast von *S. Tm* Wildtyp hatten [9]. Fehlten jedoch beide Rezeptoren in den DKO Mäusen, war die Keimlast nach 24 h niedriger im Vergleich zu Wildtyp Mäusen. Gleichzeitig wurde aber eine zeitverzögerte Eliminierung von *S. Tm* Wildtyp beobachtet, weshalb die DKO Mäuse an späteren Zeitpunkten stärker besiedelt waren als Wildtyp Mäuse [9]. Fehlt daher nur Nod1 oder Nod2 kann bei einer *S. Tm* Wildtyp-Infektion vermutlich der andere Rezeptor den Defekt des anderen kompensieren [9]. Da in dieser Arbeit keine Unterschiede in der Keimlast von *S. Tm* Δ *aroA* oder *S. Tm* Wildtyp festgestellt wurden, konnte die fehlende Nod2-Funktion durch die Peptidoglykan-Erkennung von Nod1 hinreichend kompensiert werden, um eine adäquate Immunantwort zu induzieren.

Neben der vergleichbaren Keimlast zwischen C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäusen, induzierten *S. Tm* Δ *aroA* und *S. Tm* Wildtyp auch eine vergleichbare Entzündung des Caecums (Abb. 8 und Abb. 10). Im weiteren Infektionsverlaufs mit *S. Tm* Δ *aroA* wurde eine Verschlimmerung der intestinalen Entzündung beobachtet, die mit einer Fibrose einherging. Allerdings wurde kein Unterschied in der Kollagen-Anreicherung zwischen C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäusen detektiert (Abb. 9). Auch in der *S. Tm* Δ *msbB*-Infektion wurde an Tag 21 kein Unterschied in der Kollagen-Anreicherung detektiert (Abb. 24). Dieses Ergebnis widerspricht der zu Beginn der Arbeit aufgestellten Hypothese (siehe 1.4), dass das Morbus Crohn-Suszeptibilitätsgen Nod2 eine entscheidende Rolle in der chronischen Salmonellen-induzierten Colitis und Fibrose einnimmt. Zu diesem Zeitpunkt waren die Ergebnisse über einen kompensatorischen Effekt zwischen Nod1 und Nod2 aber noch nicht publiziert [9]. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass die Wirkung von *S. Tm* auf Nod2 in beiden Infektionsmodellen durch die starke Stimulierung der TLR-Antwort überlagert wurden.

4.2. S. Tm $\Delta msbB$ induziert eine verstärkte Colitis in $Nod2^{-/-}$ Mäusen

Um trotz der TLR-Antwort den Effekt von Nod2 auf die S. Tm-induzierte Colitis untersuchen zu können, sollte der LPS-induzierte TLR4-Effekt in dem Modellsystem vermindert werden. Dazu wurde in dem Colitismodell eine S. Tm Mutante eingesetzt, die aufgrund einer unzureichenden Lipid A-Modifizierung eine reduzierte TLR4-Reaktivität aufwies [14]. Diese Mutante sollte aufgrund der reduzierten Virulenz [15] im Vergleich zu S. Tm Wildtyp eine mildere Colitis induzieren, sodass der Effekt von Nod2 auf die Entzündung stärker ins Gewicht fällt.

4.2.1. Verzögerte Eliminierung von S. Tm $\Delta msbB$

Die orale Infektion der C57BL/6J und $Nod2^{-/-}$ Mäuse mit S. Tm $\Delta msbB$ führte zu einer Kolonisierung des Darms und den systemischen Organen (Abb. 12). Im Ileum wurde nach zwei Tagen in den $Nod2^{-/-}$ Mäusen im Vergleich zu den C57BL/6J Mäusen eine reduzierte Keimlast beobachtet. Das widersprach zunächst der Hypothese, dass Nod2 eine entscheidende Rolle an der Eliminierung von intestinalen Pathogenen spielt, sodass aufgrund einer schlechteren Limitierung der Infektion eine höhere Keimlast in den $Nod2^{-/-}$ Mäusen gemessen wurde. Außerdem stand dieses Ergebnis im Kontrast zu Untersuchungen mit *C. rodentium*, welche in einer erhöhten Keimlast der $Nod2^{-/-}$ Mäuse resultierten [86]. Im Gegensatz dazu wurde ein Tag nach der Infektion in Mäusen, die weder Nod1 noch Nod2 exprimierten, eine reduzierte Kolonisierung von S. Tm Wildtyp beobachtet [9]. Die Autoren diskutierten dieses kontroverse Ergebnis damit, dass die Nod1/Nod2-vermittelte Entzündung für die Kolonisierung von Salmonella wichtig sein könnte [9, 104]. Tatsächlich induziert *Salmonella* im Darm nach der Infektion sehr schnell eine Entzündungsreaktion des Wirts. Für den Wirt spielt die Entzündung dabei eine wichtige Rolle, um das Pathogen zu eliminieren oder soweit zu kontrollieren bis das adaptive Immunsystem eingreifen kann [104]. Die verstärkte Colitis der $Nod2^{-/-}$ Mäuse an Tag 2 der Infektion ging beispielsweise mit der Becherzell-Entleerung einher. Mit Hilfe des Mukuses, der dabei in das Darmlumen sekretiert wird, könnten Pathogene auch mechanisch aus dem Darm entfernt werden [9] und für die reduzierte Keimlast verantwortlich sein.

Salmonella profitiert aber auch selbst von der Entzündung [105, 106]. So werden während der akuten Entzündung beispielsweise massiv antimikrobielle Peptide (AMP) in das Darmlumen freigelassen [104]. Diese sind jedoch unspezifisch und wirken daher nicht nur gegen Pathogene, sondern auch gegen die kommensalen Bakterien der Mikrobiota. Durch den Angriff auf die Mikrobiota entstehen daher neue Nischen in denen *Salmonella* sich dann einnisten kann [104]. Darüberhinaus wurde bereits gezeigt, dass manche Cryptdin-Gene

(Maus-Orthologe der humanen α -Defensine (HD)) wie *Cryptdin 4* und *Cryptdin 10* in *Nod2*^{-/-} Mäusen schwächer exprimiert waren und im Verlauf einer *L. monocytogenes*-Infektion noch weiter reduziert wurden [58]. Dies steht in Einklang mit Morbus Crohn Patienten, die *Nod2*-Mutationen aufwiesen, die weniger *HD-5* und *HD-6* exprimierten und im Verlauf der Entzündung die Genexpression ebenfalls nicht hochreguliert wurde [107]. Obwohl diese Daten darauf hindeuten dass *Nod2*^{-/-} Mäuse einen schwächeren Schutz gegenüber intestinalen Pathogenen besitzen, konnte sich *S. Tm* Δ *msbB* im Ileum der *Nod2*^{-/-} Mäusen zwei Tage nach der Infektion im Vergleich zu den C57BL/6J Mäusen schlechter manifestieren, was sich in der reduzierten Keimlast zeigte (Abb. 12). Aufgrund der schwächeren AMP-Ausschüttung im Ileum im Verlauf der Infektion könnte die Mikrobiota nicht zu Gunsten von *Salmonella* moduliert worden sein und die Kolonisierungs-Resistenz verstärkt sein, weshalb *S. Tm* Δ *msbB* den Darm von *Nod2*^{-/-} Mäusen weniger stark besiedelte. In diesem Zusammenhang wurde in *Nod2*-überexprimierenden HEK293-Zellen gezeigt, dass das humane β -Defensin (hBD)-2 durch MDP induziert wird [108], sodass auch β -Defensine in die Kolonisierung involviert sein könnten. In *Nod2*^{-/-} Mäusen wurde jedoch keine grundsätzlich veränderte Genexpression des hBD-2-Orthologs murines β -Defensin (mBD)-3 sowie mBD-14 (Ortholog zu hBD-3) detektiert [109].

Im Verlauf der *S. Tm* Δ *msbB*-Infektion blieb die Keimlast der *Nod2*^{-/-} Mäuse von Tag 2 zu Tag 7 ungefähr konstant bei $3,6 \times 10^6$ und $1,6 \times 10^6$ KBE, während C57BL/6J Mäuse die Keimlast von $7,6 \times 10^7$ auf 5×10^4 KBE reduzieren konnten. Allerdings lag bei den *Nod2*^{-/-} Mäusen kein genereller Defekt in der Eliminierung von *Salmonella* vor, da nach 21 Tagen die Infektion sowohl in C57BL/6J als auch den *Nod2*^{-/-} Mäusen stark eingedämmt wurde (Abb. 12 E-F). Die Eliminierung der *S. Tm* Δ *msbB*-Infektion verlief daher in den *Nod2*^{-/-} Mäusen zeitlich verzögert ab. Eine zeitlich verzögerte Pathogen-Eliminierung wurde auch in anderen Arbeiten beobachtet. So setzte die Eliminierung des Pathogens bei einer *C. rodentium*-Infektion von *Nod2*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen erst 14 Tage verzögert ein [86]. Auch in der bereits erwähnten *S. Tm* Wildtyp-Infektion von DKO Mäusen, stagnierte die Keimlast und blieb über mehrere Tage unverändert [9]. Aufgrund dieser verzögerten Eliminierung beobachtete Geddes *et al.* zuerst eine niedrigere Keimlast in den DKO Mäusen. An den späteren Zeitpunkten war die Keimlast der DKO Mäuse jedoch aufgrund der effektiveren Pathogen-Eliminierung geringer als in den Wildtyp Mäusen [9]. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit der in dieser Arbeit gezeigten zeitverzögerten Eliminierung von *S. Tm* Δ *msbB* in den *Nod2*^{-/-} Mäusen.

4.2.2. Verstärkte Immunpathologie in *Nod2*^{-/-} Mäusen

Aufgrund der unzureichenden Modifizierung von Lipid A durch Acylgruppen sollte die *S. Tm* $\Delta msbB$ Mutante TLR4 nicht optimal aktivieren können. Aus diesem Grund wurde die Hypothese aufgestellt, dass *S. Tm* $\Delta msbB$ *in vivo* eine mildere Colitis induziert und der Effekt von *Nod2* auf die Entzündung stärker ins Gewicht fällt. Tatsächlich induzierte *S. Tm* $\Delta msbB$ zwei Tage nach der Infektion eine mildere Entzündung im Caecum im Vergleich zur *S. Tm* Wildtyp-induzierten Colitis (Abb. 11, Abb. 13). Das machte sich beispielsweise in der Ödem-Bildung der Submukosa bemerkbar, die ein charakteristisches Merkmal der akuten Colitis ist und an Tag 2 in den *S. Tm* $\Delta msbB$ -infizierten C57BL/6J Mäusen noch nicht stark ausgeprägt war. Im Gegensatz dazu induzierte die *S. Tm* $\Delta msbB$ -Infektion in den *Nod2*^{-/-} Mäusen eine verstärkte Colitis im Vergleich zu den C57BL/6J Mäusen und bestätigte damit die Hypothese, dass *Nod2* wichtig in der intestinalen Entzündung ist. Im späteren Infektionsverlauf an Tag 7 und Tag 21 wurde eine allgemeine Verschlechterung der Colitis beobachtet, es traten jedoch keine Unterschiede zwischen C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäusen auf. Dies deutet darauf hin, dass *Nod2* maßgeblich entzündungsmildernd an der frühen Phase der intestinalen Entzündung, nicht aber an dessen Aufrechterhaltung beteiligt ist. Im Gegensatz dazu wurde in dem *C. rodentium*-induzierten Colitismodell gezeigt, dass *Nod2*^{-/-} Mäuse zuerst eine mildere Colitis entwickeln, die dann im Infektionsverlauf schwerer verlief als bei Wildtyp Mäusen [86]. Die Autoren argumentierten, dass die zeitverzögerte Eliminierung der Bakterien in einer verstärkten Aktivierung von *Nod2*-unabhängigen Mechanismen resultieren könnte, welche schließlich den *Nod2*-Defekt kompensierten und später zu der verstärkten Entzündung führten. Durch die Induktion dieser *Nod2*-unabhängigen Mechanismen wurde jedoch der unmittelbare Effekt von *Nod2* auf die chronische Entzündungsphase maskiert. In dem hier gezeigten Modell wird der TLR4-Effekt hingegen abgeschwächt, sodass die TLR4-vermittelte Kompensation des *Nod2*-Defekts reduziert wurde. Aus diesem Grund konnte hier gezeigt werden, dass *Nod2* eine protektive Wirkung auf die frühe Phase der Entzündungsentstehung hat, die jedoch im späteren Verlauf der Infektion durch andere Mechanismen kompensiert wird. Dies steht im Einklang mit Beobachtungen, die zeigten, dass die frühe Stimulation von *Nod2* einen protektiven Einfluss auf die übermäßige Induktion des TLR4-Signalwegs und dadurch die Ausbildung der LPS-induzierten NEC hatte [75].

Da nur an Tag 2 eine verstärkte Entzündung in den *Nod2*^{-/-} Mäusen detektiert wurde, während spätere Zeitpunkte sowohl in einer vergleichbaren Keimlast als auch vergleichbaren Entzündung resultierten, konzentrierten sich die nachfolgenden Untersuchungen auf den zweiten Infektionstag. Um zu verstehen, welche Mechanismen an der verstärkten *Nod2*-abhängigen Colitis beteiligt sind, wurden zunächst verschiedene Immunzellen mittels IHC analysiert.

Die Färbung von Makrophagen (Abb. 16) lies zuerst eine vermehrte Einwanderung von Makrophagen in das entzündete Caecumgewebe von *Nod2*^{-/-} Mäusen vermuten. Genexpressionsanalysen des Makrophagen-Markers *Emr1* (Abb. 17) bestätigten dieses Ergebnis jedoch nicht und C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäuse wiesen eine vergleichbare Genexpression. Diese zunächst widersprüchlichen Ergebnisse könnten aber auch darauf hindeuten, dass Makrophagen rekrutiert wurden, die den Makrophagen-Marker CD68 aber nicht *Emr1* exprimierten. Mittels der Durchflusszytometrie könnte daher die Rolle von Makrophagen in der verstärkten Entzündung der *Nod2*^{-/-} Mäuse näher analysiert und quantifiziert werden.

Bei der Analyse von B-Zellen (Daten nicht gezeigt) und CD3-positiven T-Zellen (Abb. 16) wurden ebenfalls keine Unterschiede zwischen C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäusen festgestellt. In der *S. Tm* Wildtyp-induzierten Colitis wurden von Geddes und Rubino *et al.* CD4-positiven *innate* T-Helfer (T_H) 17 (iT_H17)-Zellen identifiziert, die bereits einen Tag nach der Infektion in das Gewebe infiltrierten und IL-17 produzierten [91]. In der vorliegenden Arbeit gab es während der akuten *S. Tm* Δ *msbB*-induzierten Colitis keine Hinweise auf eine Beteiligung von IL-17-produzierenden Zellen, da zu diesem Zeitpunkt keine Regulation der *Il-17a*- oder *Il-17f*-Genexpression detektiert wurde (Abb. 22). Das steht zwar im Widerspruch zu Geddes und Rubino *et al.* und Keestra *et al.* , die 24 h nach der Infektion mit *S. Tm* Wildtyp eine starke Induktion der *Il-17a*- und *Il-17f*-Genexpression in C57BL/6J Mäusen detektierten [91, 96], allerdings induzierte *S. Tm* Wildtyp (Abb. 11) auch eine viel stärkere Entzündungsreaktion im Vergleich zu *S. Tm* Δ *msbB* (Abb. 14). Deshalb könnte die reduzierte Virulenz von *S. Tm* Δ *msbB* für die ausbleibende Induktion von iT_H17-Zellen verantwortlich sein.

IL-22 ist neben IL-17 beispielsweise durch die Induktion von AMPs und Chemokinen an der Rekrutierung von Neutrophilen und am Schutz der intestinalen Barrierefunktion beteiligt [110, 111]. Nach zwei Tagen induzierte *S. Tm* Δ *msbB* sowohl in C57BL/6J als auch in *Nod2*^{-/-} Mäusen eine signifikante Hochregulation der Genexpression von *Il-22* (Abb. 22). Das wurde auch für *S. Tm* Wildtyp im Rhesusaffen (induzierte hier eine Gastroenteritis, die dem Menschen ähnelt) und in C57BL/6J Mäusen beschrieben [91, 97]. In den *Nod2*^{-/-} Mäusen wurde jedoch tendenziell eine geringere Hochregulation der *Il-22*-Expression beobachtet. Dies könnte darauf hindeuten, dass die *Nod2*^{-/-} Mäuse im Vergleich zu C57BL/6J Mäusen im Verlauf der Salmonellen-Infektion eine beeinträchtigte intestinale Barrierefunktion besaßen. Tatsächlich wurde *Nod2* bereits als Modulator der Barrierefunktion beschrieben, da gezeigt wurde, dass die Barrierefunktion durch die Vorstimulation mit MDP und die anschließende Stimulation mit einem TLR2- oder TLR4-Agonisten gestärkt wird [63, 72]. Außerdem ist die Permeabilität der intestinalen Barriere in *Nod2*^{-/-} Mäusen erhöht und erleichtert es

Pathogenen die Barriere zu durchbrechen [63, 102]. Diese beeinträchtigte Barrierefunktion könnte von *S. Tm* $\Delta msbB$ ausgenutzt werden und indirekt ein Grund für die zeitverzögerte Eliminierung des Pathogens in *Nod2*^{-/-} Mäusen sein. Ein weiteres Indiz dafür ist, dass die *Ii-22*-Expression auch in *S. Tm* Wildtyp-infizierten DKO Mäusen reduziert war, die ebenfalls eine zeitverzögerte Eliminierung aufweisen [91].

Die H&E-Färbung wies bereits auf eine starke Beteiligung von Neutrophilen an der verstärkten Colitis in den *Nod2*^{-/-} Mäuse hin (Abb. 13). Es ist bekannt, dass an der frühen Phase der Salmonellen-induzierten Colitis Neutrophile beteiligt sind und dass bei gesunden *Nod2*^{-/-} Mäusen wie auch bei C57BL/6J Mäusen keine Neutrophilen-Infiltration in das Gewebe auftritt [6, 7, 102]. Mittels IHC-Färbung von MPO wurden auch in dem entzündeten Caecumgewebe von *S. Tm* $\Delta msbB$ -infizierten Mäusen infiltrierende Neutrophile nachgewiesen (Abb. 15). Dabei wurde in den *Nod2*^{-/-} Mäuse eine massive Infiltration von Neutrophilen in das Gewebe und das Darmlumen beobachtet, während das Gewebe von C57BL/6J Mäuse von deutlich weniger Neutrophilen infiltriert wurde. MPO wird zwar auch in geringen Mengen von Makrophagen produziert [112], diese können aber aufgrund der Zellgröße gut von den Neutrophilen unterschieden werden. Neutrophile spielen in der frühen Phase der Salmonellen-induzierten Colitis eine wichtige Rolle. Mittels Degranulierung und Ausschüttung von proinflammatorischen Proteinen, wie MPO und Matrix-Metalloproteinasen, sowie der Phagozytose sind Neutrophile direkt an der Abtötung von Pathogenen beteiligt [113]. Da in dem hier gezeigten Colitismodell die Entzündung der *Nod2*^{-/-} Mäuse mit einer niedrigeren Keimlast einherging (Abb. 12), könnte die massive Neutrophilen-Infiltration dafür verantwortlich sein, dass *S. Tm* $\Delta msbB$ den Darm weniger stark besiedelte. Kürzlich wurde gezeigt, dass *S. Tm* während der Salmonellen-induzierten Colitis von luminalen Neutrophilen aufgenommen wurde, jedoch nicht getötet wurde, sondern in den luminalen Neutrophilen überlebte [93]. Neutrophile könnten daher von *S. Tm* $\Delta msbB$ als geschützte Nische ausgenutzt werden, in der sie während der frühen Infektionsphase dem Immunsystem aus dem Weg gehen könnten. Da in den *Nod2*^{-/-} Mäusen eine verstärkte Neutrophilen-Rekrutierung beobachtet wurde, könnte diese Nische hier besonders effektiv genutzt werden und maßgeblich an der zeitverzögerten Eliminierung von *S. Tm* $\Delta msbB$ beteiligt sein. Neutrophile haben eine kurze Lebensdauer von wenigen Tagen und sterben durch Apoptose ab. Wenn im weiteren Verlauf der Entzündung dann keine weiteren Neutrophile rekrutiert werden, könnte *S. Tm* $\Delta msbB$ dem Immunsystem über diese „Neutrophilen-Nische“ nicht weiter aus dem Weg gehen. Tatsächlich wurden an Tag 7 der Infektion zwar noch Neutrophile in dem entzündeten Gewebe detektiert, *Nod2*^{-/-} Mäuse wiesen aber keine massive Neutrophilen-Infiltration mehr auf.

Aufgrund der massiven Neutrophilen-Infiltration bei *Nod2*^{-/-} Mäusen wurde überprüft, ob Veränderungen der Chemokin-Genexpression oder -Produktion dafür verantwortlich waren. Zuvor wurde bereits beschrieben, dass *Nod2*^{-/-} Mäuse in Folge einer *C. rodentium*-Infektion sowohl im Serum als auch im intestinalen Gewebe weniger stark MCP-1 produzierten als Wildtyp Mäuse [86]. In der *S. Tm* Δ *msbB*-induzierten Colitis wurde ebenfalls ein Anstieg der Genexpression und der Proteinmenge von MCP-1 im Caecum beobachtet (Abb. 20 + Abb. 21). Dabei war die Genexpression von *Mcp-1* in den *Nod2*^{-/-} Mäusen sowohl an Tag 2 als auch an Tag 7 im Vergleich zu C57BL/6J Mäusen etwas geringer, jedoch waren die Ergebnisse nicht signifikant.

Auch das Gen *Kc* wurde im Verlauf der Infektion vermehrt exprimiert, doch auch für dieses Chemokin, das an der Neutrophilen-Rekrutierung beteiligt ist, wurden keine Unterschiede zwischen C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäusen festgestellt (Abb. 20). Auch Geddes *et al.* detektierte keine Unterschiede in der KC-Proteinmenge des entzündeten Caecums von *S. Tm* Wildtyp-infizierten *Nod2*^{-/-} Mäusen [9]. Im Gegensatz dazu produzierten *S. Tm* Wildtyp-infizierten DKO Mäusen signifikant weniger KC im Caecum [9]. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch nur Tag 2 und Tag 7 der frühen Infektionsphase untersucht, weshalb es möglich ist, dass die relevanten Zeitpunkte der Chemokin-Regulation, die zur vermehrten Neutrophilen-Rekrutierung in den *Nod2*^{-/-} Mäusen führten, hier nicht untersucht wurden. Vielmehr ist davon auszugehen, dass der Neutrophilen-Rekrutierung eine veränderte Chemokin-Expression und -Produktion vorausgegangen ist, die bereits an Tag 2 wieder ausgeglichen war. Aus diesem Grund wäre es sinnvoll weitere Analysen an Tag 1 der Infektion durchzuführen.

Im Verlauf der *S. Tm* Wildtyp-Infektion war die Produktion von IL-1 β in *Nod2*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu C57BL/6J Mäusen signifikant reduziert, resultierte jedoch in einer vergleichbaren Pathologie [9]. In der *S. Tm* Δ *msbB*-Infektion hingegen wurde eine stärkere Colitis in den *Nod2*^{-/-} Mäuse detektiert (Abb. 13), die jedoch nicht mit einer veränderten IL-1 β -Produktion einherging (Abb. 21). An Tag 2 war die IL-1 β -Produktion allerdings geringer als bei Geddes *et. al* [9], sodass auch dieses Ergebnis auf die reduzierte Virulenz von *S. Tm* Δ *msbB* zurückgeführt werden kann.

Neben Immunzellen, AMPs oder Enzymen wie Lysozym sind auch ROS und RNS an der Pathogen-Abwehr beteiligt [98]. Da die reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies starke Oxidantien sind, die unspezifisch wirken, können sie nicht nur das Pathogen, sondern auch den Wirt schwerwiegend schädigen. Aus diesem Grund ist die Produktion von ROS und RNS streng reguliert und neutralisierende Antioxidantien wirken ihnen entgegen, sodass normalerweise eine Redox-Homöostase besteht [114]. *Nod2* ist durch die Interaktion mit der dualen Oxidase 2 (DUOX2) an der Produktion von ROS beteiligt [98]. Deshalb stellte sich in

dieser Arbeit die Frage, ob die verstärkte Entzündung der *Nod2*^{-/-} Mäuse mit einer Dysregulation der Redox-Homöostase einherging. Die Infektion mit *S. Tm ΔmsbB* induzierte eine starke Hochregulation der Genexpression von *Nos2*, einem Enzym, das an der Synthese von Stickstoffmonoxid beteiligt ist (Abb. 23). Gleichzeitig wurden die Antioxidantien *Prdx4* und *Trx1* herunterreguliert. Dadurch war das Redox-Gleichgewicht zu Gunsten der ROS und RNS verschoben und könnte an der Gewebeerstörung und der Pathogen-Eliminierung beteiligt sein. Allerdings stand die Inhibition der *Prdx4*-Expression im Widerspruch zu Weichart *et al.*, der zuvor zeigte, dass die Überexprimierung von *Nod2* in HEK293 Zellen in einer verstärkten *Prdx4*-Expression resultierte [115]. Die Autoren schlussfolgerten, dass diese *Nod2*-abhängige Induktion von *Prdx4* eine negative Rückkopplung sein könnte, um den *Nod2*-induzierten NF-κB-Signalweg abzuschwächen. Die oben gezeigten Daten (Abb. 23) widersprechen dieser Schlussfolgerung jedoch aus zwei Gründen: (1) In Abwesenheit von *Nod2* wurden im Vergleich zu C57BL/6J Mäusen an Tag 0 sowohl *Prdx4* als auch *Trx1* stärker exprimiert. (2) In den C57BL/6J Mäusen führte die Infektion und damit die Stimulation des intakten *Nod2*-Rezeptors nicht zu einer Induktion von *Prdx4*, sondern zu einer Inhibition der Genexpression, sodass die von Weichart *et al.* postulierte negative Rückkopplung nicht induziert wurde.

Im Verlauf der *S. Tm ΔmsbB*-Infektion wurde zwischen C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäusen keine unterschiedliche Genexpression für die Antioxidantien detektiert, jedoch wurde in den nicht-infizierten, gesunden *Nod2*^{-/-} Mäusen eine verstärkte Genexpression beobachtet (Abb. 23). Dadurch ist die Redox-Homöostase der *Nod2*^{-/-} Mäuse bereits in nicht-behandelten, gesunden Tieren dysreguliert und könnte sich beispielsweise auf die Zusammensetzung der Mikrobiota auswirken. Tatsächlich wiesen *Nod2*^{-/-} Mäuse im Ileum eine veränderte Mikrobiota auf, die im Vergleich zu Wildtyp Mäusen von *Bacteroides*, *Firmicutes* und *Bacillus* dominiert wurde [87, 90, 116]. Darüberhinaus war die Keimlast im Faeces von *Nod2*^{-/-} Mäusen generell erhöht. Ähnliche Veränderungen der Mikrobiota wurden auch in Morbus Crohn Patienten detektiert, welche die *frameshift*-Variante *Leu1007fsinsC* von *Nod2* aufwiesen [90]. Kürzlich wurde außerdem gezeigt, dass *Nod2*^{-/-} Mäuse in einem Azoxymethan (AOM)/DSS-Modell suszeptibler gegenüber der Bildung von kolorektalen Karzinomen waren [103]. Hierfür soll die veränderte Mikrobiota der *Nod2*^{-/-} Mäuse ursächlich gewesen sein, da die Suszeptibilität zum einen durch die Gabe von Breitband-Antibiotika gemindert werden konnte und zum anderen die Suszeptibilität durch die Transplantation des Faeces auf Wildtyp Mäuse übertragen werden konnte. Allerdings stellen Untersuchungen von Robertson *et al.* diese Mikrobiota-Ergebnisse in Frage, die zum ersten Mal den Zusammenhang zwischen der Mikrobiota und den Haltungsbedingungen systematisch untersucht hatte [109]. Die oben genannten Publikationen basieren jeweils auf unterschiedlichen Versuchsaufbauten. Rehman *et al.* untersuchte beispielsweise *Nod2*^{-/-} und Wildtyp Mäuse, die aus derselben

Heterozygoten-Kreuzung stammten, aber nach dem Absetzen von der Mutter in separaten Käfigen gehalten wurden [90]. Petnicki-Ocwietja *et al.* hingegen verglich *Nod2*^{-/-}, heterozygote *Nod2*^{+/-} und Wildtyp Mäuse, die zusammen in demselben Käfig gehalten wurden [87]. Im Gegensatz dazu untersuchte Couturier-Maillard *et al.* *Nod2*^{-/-} und Wildtyp Mäuse, die entweder in demselben Käfig gehalten wurden oder in separaten Käfigen gehalten wurden [103]. Um den Einfluss der Haltungsbedingungen und des Genotyps auf die Mikrobiota zu untersuchen, verglich Robertson *et al.* *Nod2*^{-/-} Mäuse mit heterozygoten *Nod2*^{+/-} Mäusen eines Geschwisterwurfs (*littermates*) der Generation F2 [109]. In diesem Fall wurden keine Unterschiede in der Mikrobiota detektiert. Dagegen wiesen Mäuse, die nicht aus demselben Geschwisterwurf stammten, eine veränderte Mikrobiota im Vergleich zu den Mäusen eines Geschwisterwurfs auf und es war dabei unbedeutend, ob die Mäuse separat oder in einem gemeinsamen Käfig gehalten wurden [109]. Die Autoren empfehlen daher für weitere Untersuchungen der Mikrobiota Geschwisterpaare der F2-Generation zu verwenden, die in demselben Käfig gehalten werden. Aufgrund dieser neuen Erkenntnisse ist es fraglich, ob die veränderte Genexpression der Antioxidantien die Mikrobiota der *Nod2*^{-/-} Mäuse beeinflussen könnte. Vielmehr könnte die dysregulierte Redox-Homöostase die Eliminierung von Pathogenen in der frühen Phase der Infektion stören.

Da nicht nur *Nod2* an der Erkennung von Peptidoglykan beteiligt ist, sondern auch *Nod1*, stellte sich die Frage, ob in den *Nod2*^{-/-} Mäusen die fehlende Funktion von *Nod2* durch *Nod1* kompensiert werden konnte. In nicht-infizierten *Nod2*^{-/-} Mäusen kam es bei der Genexpression zu keiner Kompensation von *Nod2* durch eine erhöhte *Nod1*-Expression, da C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäuse eine vergleichbare *Nod1*-Expression aufwiesen (Abb. 18). Diese vergleichbare *Nod1*-Genexpression wurde auch durch Robertson *et al.* bestätigt [109]. Im Infektionsverlauf von Tag 2 zu Tag 7 war die *Nod1*-Expression erst an Tag 7 signifikant hochreguliert. Hierbei wurde eine etwas niedrigere Expression in den *Nod2*^{-/-} Mäusen detektiert, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant, außerdem war der Anstieg der Genexpression insgesamt gering, sodass diesem kleinen Unterschied keine biologische Relevanz zugesprochen werden kann. Da die verstärkte Entzündung der *Nod2*^{-/-} Mäusen nur an Tag 2 festgestellt wurde und die Entzündung an Tag 7 vergleichbar mit der Pathologie der C57BL/6J Mäuse war, könnte die erst nach Tag 2 einsetzende Hochregulation der *Nod1*-Expression den *Nod2*-Defekt im späteren Entzündungsverlauf kompensieren.

4.2.3. Einfluss von Nod1 auf die *S. Tm* $\Delta msbB$ -induzierte Colitis

Nachdem gezeigt wurde, dass Nod2 in die Initiierung der intestinalen Entzündung und die frühe Eliminierung von *S. Tm* $\Delta msbB$ involviert ist, sollte untersucht werden, ob auch Nod1 eine Rolle spielt. Dies wurde im Rahmen eines Forschungsaufenthalts bei Prof. Dr. Dana J. Philpott an der Universität von Toronto, Kanada, untersucht. Sie konnte zuvor zeigen, dass sich Nod1 und Nod2 in der *S. Tm* Wildtyp-induzierten Colitis gegenseitig kompensierten [9]. Zwei Tage nach der Infektion wurden zwischen C57BL/6J, *Nod1*^{-/-}, *Nod2*^{-/-} und DKO Mäusen keine signifikanten Unterschiede in der Keimlast beobachtet (Abb. 25). Bei den *Nod2*^{-/-} Mäusen wurde jedoch wie bereits bei den Versuchen am FZB eine tendenziell geringere Keimlast im Vergleich zu C57BL/6J Mäusen detektiert (Abb. 12). Außerdem war die Keimlast der C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäuse sowohl in Toronto als auch am FZB vergleichbar und deutete darauf hin, dass die frühe Phase der Salmonellen-induzierten Colitis nicht durch unterschiedliche Versuchsbedingungen beeinflusst wurde. Auch in den *Nod1*^{-/-} und DKO Mäusen wurde eine vergleichbare Keimlast detektiert. Dieses Ergebnis stand zunächst im Widerspruch zu der *S. Tm* Wildtyp-Infektion, bei der DKO Mäuse zwei Tage nach der Infektion signifikant stärker besiedelt waren [9]. Die Mutante *S. Tm* $\Delta msbB$ ist jedoch weniger virulent als der Wildtyp, weshalb die Kolonisierung des Darms bei der Mutante verzögert statt finden könnte. Da hier nur Tag 2 der Infektion und nicht Tag 7 nach der Infektion analysiert wurde, wurde nicht untersucht, ob in den *Nod1*^{-/-}, *Nod2*^{-/-} und DKO Mäusen eine zeitlich verzögerte Eliminierung von *S. Tm* $\Delta msbB$ stattfindet.

Die geringere Virulenz von *S. Tm* $\Delta msbB$ in Toronto machte sich auch in der pathologischen Bewertung der caecalen Entzündung bemerkbar (Abb. 26). Während die C57BL/6J Mäuse am FZB nach zwei Tagen schon deutliche Merkmale der Colitis entwickelt hatten (Abb. 13), wurden in Toronto nur in wenigen Mäusen Entzündungsmerkmale beobachtet. Die C57BL/6J Mäuse wiesen keine Entzündung auf und auch die *Nod2*^{-/-} Mäuse entwickelten in Toronto im Vergleich zu den Versuchen am FZB eine deutlich mildere Colitis. Es gibt zwar widersprüchliche Ansichten, ob der Genotyp die Mikrobiota in nicht-behandelten Mäusen beeinflussen kann, dennoch kann die Mikrobiota der Tiere durch die Ernährung moduliert werden [90, 109, 117]. Da die SPF-Maushaltung der Universität von Toronto sowohl das Futter als auch das Wasser autoklaviert, könnte dies Einfluss auf die Diversität der Mikrobiota haben. Dagegen wird in der SPF-Maushaltung am FZB nicht-autoklaviertes Futter verwendet und das Wasser ist mit Ozon behandelt. Die unterschiedlich behandelten Nahrungsmittel könnten daher die Mikrobiota in der jeweiligen Maushaltung entscheidend beeinflussen und sich auf die *S. Tm* $\Delta msbB$ -Infektion auswirken.

Neben der milderen Colitis im Vergleich zu den Versuchen am FZB wurde außerdem keine signifikant stärkere Entzündung der *Nod2*^{-/-} Mäuse im Vergleich zu C57BL/6J Mäusen

detektiert, wie es am FZB beobachtet wurde. In Toronto wurde aber eine tendenziell stärkere Colitis beobachtet, deshalb könnte aufgrund der allgemein milderen Colitis der Colitisverlauf zeitverzögert sein und der Unterschiede zwischen den beiden Genotypen an Tag 2 der Infektion noch nicht vollständig ausgebildet sein. Im Gegensatz dazu wiesen *Nod1*^{-/-} Mäuse eine signifikant stärkere Entzündung auf. Nod1 spielt daher ebenfalls eine wichtige Rolle an der Initiierung der *S. Tm* Δ *msbB*-induzierten Colitis und könnte auch an der Pathogenese von Morbus Crohn beteiligt sein. Aufgrund von widersprüchlichen genetischen Studien von CED Patienten ist jedoch immer noch unklar, ob Nod1 auch mit Morbus Crohn assoziiert ist [33, 43, 44]. Tatsächlich finden sich in der Literatur einige Hinweise, dass Nod1 nicht nur an der Pathogen-Erkennung, sondern auch an der Entstehung der intestinalen Entzündung beteiligt ist. *Nod1*^{-/-} Mäuse waren beispielsweise susceptibler für Infektionen mit *Clostridium difficile* [118]. Außerdem induzierte die Behandlung mit DSS eine verstärkte Colitis in den *Nod1*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen und auch die Tumorgenese war in dem AOM-DSS-Modell verstärkt ausgeprägt [119]. In der vorliegenden Arbeit wurde kein Einfluss auf die *S. Tm* Wildtyp-induzierte Colitis nachgewiesen. In der systemischen Salmonellose, die ohne Streptomycin-Behandlung induziert wurde, spielte Nod1 jedoch eine wichtige Rolle in der DC-vermittelten Überwindung des Darmepithels [120].

Für die *S. Tm* Wildtyp-induzierte Colitis zeigte Geddes *et al.* bereits, dass Nod1 beziehungsweise Nod2 den Defekt des jeweils Anderen kompensieren kann, weshalb *Nod1*^{-/-} und *Nod2*^{-/-} Mäuse keine veränderte Colitis entwickeln [9]. In DKO Mäusen wurde hingegen eine mildere Colitis induziert, die mit einer reduzierten Mukus-Sekretion einherging. *S. Tm* Δ *msbB* induzierte eine verstärkte Colitis in den DKO Mäusen (Abb. 26). Jedoch wiesen Infektionen mit *C. rodentium* bereits darauf hin, dass Nod1 zum einen eine Pathogen-spezifische Rolle besitzt und zum anderen eine duale Rolle im zeitlichen Verlauf der Entzündung einnimmt [91]. So induzierte *C. rodentium* wie *S. Tm* Wildtyp nach sieben Tagen in DKO Mäusen eine mildere Entzündung im Colon, die sich nach 14 Tagen verstärkte und sich im Gegensatz zu Wildtyp Mäusen auch auf das proximale Colon ausdehnte. Die reduzierte TLR4-Reaktivität und die gleichzeitig verstärkte TLR2-Reaktivität von *S. Tm* Δ *msbB* könnte der entscheidende Mechanismus sein, warum die Mutante im Vergleich zu dem Wildtyp eine andere Pathogen-spezifische Immunantwort in den DKO Mäusen auslöst. Außerdem wurden neben Nod2 auch für Nod1 eine Synergie mit dem TLR2 und TLR4-Signalweg beschrieben [73, 121, 122], sodass durch den Defekt von Nod1 oder Nod2 beziehungsweise beider Rezeptoren dieser verstärkende Mechanismus nicht greifen könnte und die Infektion schlechter bekämpft würde. Gleichzeitig wirkten die MDP-induzierten Toleranzmechanismen in den *Nod1*^{-/-}, *Nod2*^{-/-} und DKO Mäusen nicht, die den Wirt vor übermäßiger Gewebeerstörung schützen sollten, weshalb sie an Tag 2 eine verstärkte Entzündung im Caecum entwickelten.

4.3. Unterschiedliche PRRs-Aktivierung durch *S. Tm* $\Delta msbB$

Bei den Enterobakterien *Escherichia coli* (*E. coli*) und *S. Tm* ist die Acyltransferase MsbB an der Acylierung von Lipid A beteiligt. Da die Acylierung Einfluss auf die Lipid A-Toxizität nimmt, wird *MsbB* oft bei der Verbesserung von Lebend-Vakzinen genetisch verändert [12, 123, 124, 125]. Seit einigen Jahren werden Bakterien auch in der Krebstherapie eingesetzt, dabei kolonisieren die Bakterien den Tumor und inhibieren dessen Wachstum. Damit die eingesetzten Stämme sicher sind und keinen septischen Schock induzieren, wird auch hier die Acylierung von Lipid A durch MsbB moduliert [126, 127, 128]. In dieser Arbeit wurde die *S. Tm* $\Delta msbB$ Mutante eingesetzt, weil vorherige Arbeiten darauf hindeuteten, dass die veränderte Acylierung zu einer verminderten TLR4-Reaktivität führt [14], sodass der Effekt von *Salmonella* auf Nod2 besser untersucht werden konnte.

In der Literatur wurden Experimente mit *S. Tm* $\Delta msbB$ beschrieben, die in unterschiedlichen *S. Tm* Wildtyp Stämmen generiert wurden und jeweils eine verringerte Virulenz aufwiesen [15, 127, 129]. So induzierte *S. Tm* $\Delta msbB$ im Vergleich zu *S. Tm* Wildtyp beispielsweise weniger TNF α und in einem Mausmodell für Typhus wies *S. Tm* $\Delta msbB$ eine reduzierte Virulenz auf [127, 129]. Außerdem induzierte *S. Tm* $\Delta msbB$ im Gegensatz zu *S. Tm* Wildtyp keine Umstrukturierung der Lymphknoten, die mit *S. Tm* Wildtyp zur Zerstörung der B- und T-Zell-Zonen führte [15]. Einige Arbeiten zeigten jedoch, dass die *S. Tm* $\Delta msbB$ Mutante im Wachstum beeinträchtigt war. Murray *et al.* beschrieb, dass die Mutante sensitiv für 6 mM EGTA war und schlechter auf MacConkey- und LB-Medium wuchs [130]. Darüberhinaus zeigte Karsten *et al.*, dass die Mutante sensitiv gegenüber 5% CO $_2$ war und somit in Zellkulturexperimenten beeinträchtigt war [131]. Aufgrund dieser Daten, wurden die in dieser Arbeit eingesetzten *S. Tm* $\Delta msbB$ Mutanten auf Wachstumsdefekte hin überprüft (Daten nicht gezeigt). Jedoch ist das Wachstum von *S. Tm* $\Delta msbB$ weder auf MacConkey- noch auf LB-Medium beeinträchtigt. Auch EGTA wirkte sich nicht negativ auf das Wachstum aus, denn bei der Herstellung der *S. Tm* $\Delta msbB$ Mutanten auf dem genetischen Hintergrund von *S. Tm* SL1344, wurde unter anderem EGTA als Selektionsmittel eingesetzt und es wurde kein verändertes Wachstum im Vergleich zu *S. Tm* Wildtyp beobachtet. Selbst die Kultivierung bei 10% CO $_2$ zeigte keine Beeinträchtigung. Auch Kong *et al.* beschrieb, dass es Diskrepanzen in der Literatur bezüglich des Wachstums gab, deshalb wurde die eingesetzte *S. Tm* $\Delta msbB$ Mutante entsprechend überprüft und es wurde keine Beeinträchtigung festgestellt [12].

In der Literatur wurde die Hypothese aufgestellt, dass das pentaacylierte Lipid A von *S. Tm* $\Delta msbB$ aufgrund der fehlenden MsbB-vermittelten Acylierung, nicht mehr als TLR4-Agonist wirken könnte [100]. Jedoch wurde diese Theorie bisher nur durch indirekte Nachweise unterstützt, beispielsweise weil *S. Tm* Wildtyp in *TLR4*^{-/-} Mäusen eine vergleichbar reduzierte

Virulenz wie *S. Tm* Δ *msbB* aufwies [15]. Die Autoren schlussfolgerten daher, dass die verminderte *S. Tm* Δ *msbB*-Virulenz durch TLR4 vermittelt war und daher das veränderte LPS ursächlich sei.

In dieser Arbeit wurde deshalb untersucht, inwieweit aufgereinigtes LPS von *S. Tm* Δ *msbB* noch als TLR4-Agonist wirken kann. Entgegen der Literatur wurde mittels TLR4-transfizierten Zellen jedoch gezeigt, dass aufgereinigtes LPS von *S. Tm* Δ *msbB* über den humanen CD14-MD2-TLR4-Rezeptorkomplex noch erkannt wurde und die Produktion von IL-8 induzierte (Abb. 27). Darüberhinaus wurde eine reduzierte TLR4-Aktivierung im Vergleich zu Wildtyp-LPS beobachtet, jedoch war dieser Effekt Dosis-abhängig und wurde nur bei niedrigen LPS-Konzentrationen beobachtet. Neben LPS wies auch die hitzeinaktivierte *Salmonella*-Mutante selbst eine schwächere TLR4-Reaktivität auf (Abb. 28). Da bekannt ist, dass TLR4 von Mäusen und Menschen verschiedene LPS-Motive unterschiedlich effektiv binden und die Rezeptoraktivität entsprechend beeinflusst wird [132], wurden die Versuche mit dem murinen MD2-TLR4-Rezeptorkomplex wiederholt (Daten nicht gezeigt). Die reduzierte TLR4-Reaktivität von *S. Tm* Δ *msbB* wurde sowohl für den humanen als auch den murinen Rezeptor nachgewiesen.

Durch sekundäre Modifizierungen des Lipid A, kann zum Beispiel die TLR4-Reaktivität beeinflusst werden und so das Immunsystem aufgrund der verminderten Erkennung umgangen werden [12]. Neben *MsbB* sind noch weitere Enzyme an der sekundären Modifizierung von Lipid A beteiligt. Zu diesen Enzymen zählt die Acyltransferase *PagP*, die die Addition einer weiteren Acylgruppe, die Palmitinsäure, vermittelt und zu heptaacylierten Lipid A führt, das nicht optimal von TLR4 erkannt wird [16, 19]. Die *PagP*-vermittelte Lipid A-Modifikation ist beispielsweise an der erhöhten Resistenz gegen AMPs beteiligt [11]. Die Genexpression von *PagP* war in *S. Tm* Δ *msbB* hochreguliert, weshalb das LPS der Mutante neben pentaacyliertem Lipid A auch hexacylierte Formen aufwies [12]. Dies könnte ein Schutzmechanismus sein, der die Stabilität der Zellwand sichert. *PagP* könnte daher den Defekt von *MsbB* teilweise kompensieren und für die TLR4-Reaktivität von *S. Tm* Δ *msbB* verantwortlich sein.

Durch die Interaktion von Nod2 mit verschiedenen PRRs kann die Immunantwort moduliert werden. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die Ko-Stimulierung von Nod2 und TLR4 synergistisch auf die Produktion von *Tnf α* -Genexpression wirkte [74]. Um zu untersuchen, ob *S. Tm* Δ *msbB* die Wechselwirkung zwischen Nod2 und TLR4 im Vergleich zu *S. Tm* Wildtyp beeinflusst, wurden HEK293 mit Nod2 und TLR4 ko-transfiziert. Entgegen Berichten, dass Nod2 und TLR4 synergistisch wirkten, wurde hier ein inhibitorischer Effekt detektiert (Abb. 28). Nod2 wird jedoch eine duale Rolle bei der Interaktion mit TLR4 zugeschrieben, die diese widersprüchlichen Ergebnisse erklären könnten. So wurde der

synergistisch Effekt nur nach kurzer Stimulation mit MDP beobachtet, während Stimulationen für 24 h oder länger in einer Toleranz von LPS resultierten [74, 76]. Darüberhinaus milderte die Stimulation von Nod2 die Entwicklung der TLR4-vermittelten LPS-induzierten NEC in neugeborenen Mäusen ab [75]. Die duale Rolle von Nod2 auf TLR4 könnte aufgrund der zeitabhängigen Regulierung zum einen für eine effektive Aktivierung des Immunsystems in der initialen Phase der Infektion sorgen, zum anderen einen Schutzmechanismus darstellen, indem Nod2 später einer übermäßigen TLR4-induzierten Entzündung vorbeugt. Dieser inhibitorische Mechanismus zwischen Nod2 und TLR4 wurde jedoch nicht durch den *MsbB*-Defekt beeinflusst, da er sowohl bei der Stimulation mit *S. Tm* Wildtyp als auch mit *S. Tm* $\Delta msbB$ beobachtet wurde.

Neben TLR4 besteht auch eine Wechselbeziehung zwischen Nod2 und TLR2, für die ebenfalls sowohl inhibitorische als auch synergistische Effekte beschrieben wurden [77, 133]. Hier gab es jedoch zu Beginn Hinweise, dass die Wechselwirkung im Mensch und der Maus gegensätzlich reguliert ist, sodass Nod2 in Mäusen inhibitorisch auf den TLR2-Signalweg einwirkt, während in humanen Zellen ein Synergismus beobachtet wird. Borm *et al.* zeigte in humanen Monozyten, dass sowohl ein inhibitorischer als auch synergistischer Effekt induziert werden konnte und abhängig von der MDP-Dosis war [78]. Dabei induzierten niedrige MDP-Dosen (0,1 - 25 $\mu\text{g/ml}$) den Synergismus und 100 $\mu\text{g/ml}$ MDP inhibierte den TLR2-Signalweg. Auch in murinen Epithelzellen wurde ein synergistischer Effekt zwischen Nod2 und TLR2 nachgewiesen, der mit 10 $\mu\text{g/ml}$ MDP induziert wurde, was Borm *et al.* zuvor als niedrige Dosis definiert hatte [72]. In den beschriebenen Arbeiten wurden die Zellen 24 h mit MDP stimuliert, weshalb noch ungeklärt ist, ob die Wechselwirkung zwischen Nod2 und TLR2 analog zu TLR4 auch durch die Dauer der MDP-Stimulation beeinflusst werden kann. In dieser Arbeit wurden nach der Definition von Born *et al.* niedrige MDP-Dosis von 500 ng/ml MDP eingesetzt. Die Ko-Stimulation mit 100 ng/ml P3CSK4 resultierte ebenfalls in einem Synergismus zwischen Nod2 und TLR2 (Abb. 29). Dieser Synergismus zwischen Nod2 und TLR2 wurde auch durch die Stimulation mit *S. Tm* $\Delta msbB$, *S. Tm* Wildtyp (SL1344) und *S. Tm* $\Delta msbB$ (SL1344) induziert, jedoch nicht mit *S. Tm* Wildtyp (C5). Dies stand zuerst mit der verstärkten Entzündung in den *S. Tm* $\Delta msbB$ -infizierten *Nod2*^{-/-} Mäusen im Widerspruch. Der Synergismus konnte jedoch aufgrund des Nod2-Defekts nicht in den *Nod2*^{-/-} Mäusen, sondern nur den C57BL/6J Mäusen auftreten. Wäre daher der Nod2-TLR2-Synergismus entscheidend für die *S. Tm* $\Delta msbB$ -induzierte Colitis, müsste die Immunantwort in den C57BL/6J Mäusen verstärkt sein.

Im Gegensatz dazu könnte TLR2 selbst eine wichtige Rolle in der verstärkten Entzündung bei den *Nod2*^{-/-} Mäusen spielen. In gesunden *Nod2*^{-/-} Mäusen wurde von Barreau *et al.* eine höhere *Tlr2*-Expression nachgewiesen [63]. In dieser Arbeit war die Genexpression aber in

den nicht-infizierte Tieren unverändert (Abb. 19). Während der Infektion wurde jedoch eine signifikante Herunterregulierung der *Tlr2*-Expression in *Nod2*^{-/-} Mäusen nachgewiesen, während die Genexpression der C57BL/6J Mäuse unverändert blieb. Darüberhinaus wiesen die beiden untersuchten *S. Tm* Δ *msbB* Mutanten eine deutlich verstärkte TLR2-Reaktivität im Vergleich zu *S. Tm* Wildtyp (C5 bzw. SL1344) auf, die selbst bei der höchsten eingesetzten Keimlast nur eine schwache IL-8-Produktion induzierten (Abb. 29). Diese verstärkte TLR2-Reaktivität könnte indirekt auch durch die veränderte LPS-Struktur der Mutante verursacht sein. Die unterschiedliche Anzahl sowie die veränderte Verteilung der Acylgruppen könnte die Konformation des Glucosamin-Rückgrats beeinflussen, sodass die Acylgruppen anders orientiert sind und mehr oder weniger Platz einnehmen [17]. So könnten Lipoproteine auf der Zelloberfläche von *S. Tm* Δ *msbB* zugänglich sein, die eigentlich in der Salmonellen-Zellwand verdeckt sind und nicht durch TLR2 erkannt werden können. *S. Tm* Δ *msbB* könnte auch mehr oder andere Lipopeptide synthetisieren und so die Stabilität der Zellwand stärken. Oder die Zellwand ist aufgrund der veränderten LPS-Struktur weniger stabil, weshalb mehr Degradationsprodukte der Zellwand frei werden und TLR2 aktivieren könnten. Jedoch würde sich eine instabile Zellwand entscheidend auf das Wachstum der Mutante auswirken, hier wurde jedoch gezeigt, dass *S. Tm* Δ *msbB* im Wachstum nicht beeinträchtigt war.

Die Bedeutung der verstärkten TLR2-Aktivierung wurde in nachfolgenden Experimenten weiter analysiert, indem in murinen Darmepithelzellen entweder *Nod2*, TLR2 oder *Nod2* und TLR2 zusammen mittels siRNA inhibiert werden. Diese Versuche wurden im Rahmen dieser Arbeit etabliert und werden zurzeit von Frau Dr. Natalie Steck fortgeführt. Vorläufige Ergebnisse von Frau Dr. Natalie Steck zeigen, dass *S. Tm* Δ *msbB* in den *Nod2*-defizienten Zellen eine verstärkte Zytokin-Produktion gegenüber *S. Tm* Wildtyp induziert. Diese verstärkte Aktivierung ist TLR2-abhängig, denn in Zellen die *Nod2*- und TLR2-defizient sind, ist die verstärkte Aktivierung von *S. Tm* Δ *msbB* inhibiert.

Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass TLR2 der entscheidende Faktor sein könnte, weshalb *S. Tm* Δ *msbB* in *Nod2*^{-/-} Mäusen die verstärkte Pathologie induziert.

4.4. Fazit: Nod2 spielt eine protektive Rolle

Die *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen mit *S. Tm ΔmsbB* deuten darauf hin, dass die Interaktion von Nod2 und TLR2 entscheidend für die Initiierung der intestinalen Entzündung sowie die Eliminierung von *Salmonella* ist.

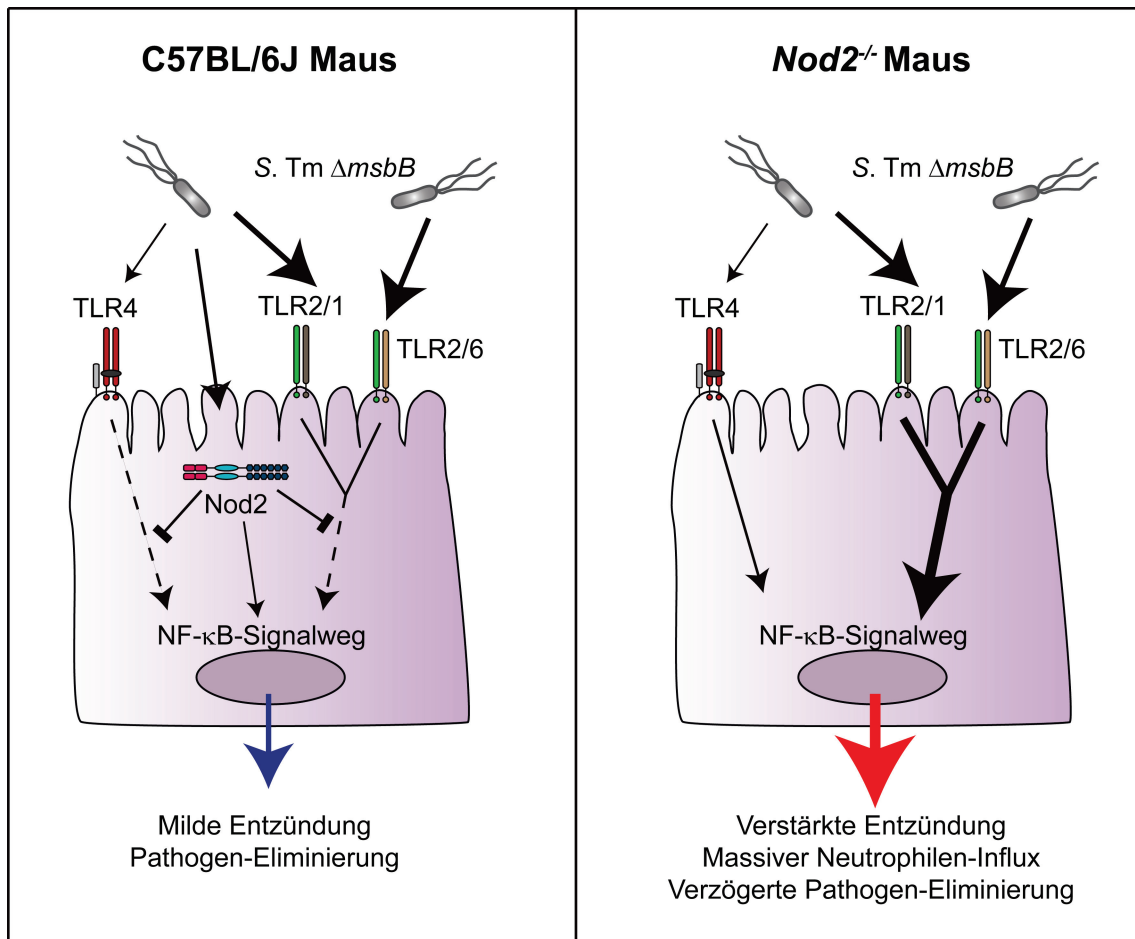


Abb. 30: Immunantwort auf *S. Tm ΔmsbB*

Die Immunantwort in C57BL/6J Mäusen im Vergleich zu *Nod2*^{-/-} Mäusen auf *S. Tm ΔmsbB* ist schematisch dargestellt. *S. Tm ΔmsbB* aktiviert im Vergleich zu *S. Tm* Wildtyp TLR2 stärker. In den C57BL/6J Mäusen führt dies nicht zu einer stärkeren Entzündung, da Nod2 inhibitorisch auf den TLR2- und TLR4-Signalweg wirkt. In den *Nod2*^{-/-} Mäusen fehlt die Nod2-vermittelte Inhibition, weshalb die verstärkte TLR2-Induktion in einer stärkeren Entzündung resultiert. Zusätzlich wird auch der TLR4-Signalweg nicht mehr inhibiert und führt zu einer übermäßigen LPS-induzierten Entzündung.

In den C57BL/6J Mäusen induziert das LPS von *S. Tm ΔmsbB* die Aktivierung von TLR4, jedoch wird parallel dazu Nod2 durch Peptidoglykan aktiviert und führt zu einer Inhibition des TLR4-Signalwegs (Abb. 30). Hier übernimmt Nod2 eine protektive Rolle, die vor einer übermäßigen TLR4-induzierten Entzündung schützt [75]. TLR2 wird im Gegensatz zu TLR4

von *S. Tm* $\Delta msbB$ stärker stimuliert, allerdings kann dieser Signalweg von Nod2 ebenfalls inhibiert werden. Aufgrund dieser Nod2-vermittelten Inhibition des TLR2-Signalwegs wirkt sich die verstärkte TLR2-Reaktivität von *S. Tm* $\Delta msbB$ nicht in einer verstärkten Entzündung aus, sondern führt zu einer mildereren intestinalen Entzündung in den C57BL/6J Mäusen.

Fehlt jedoch Nod2 kann der Nod2-vermittelte protektive Mechanismus nicht greifen. In der *S. Tm* $\Delta msbB$ -induzierten Colitis wirkt sich dieser Defekt auf zwei Ebenen auf die Pathologie der *Nod2*^{-/-} Mäuse aus. Obwohl TLR4 durch LPS von *S. Tm* $\Delta msbB$ etwas schwächer stimuliert wird, fehlt der negativ-regulatorisch Einfluss von Nod2 auf TLR4 (Abb. 30). Daher wirkt der Aktivierung von TLR4 nichts entgegen und resultiert in einer starken Induktion der Entzündungsantwort. Darüberhinaus ist der TLR2-Signalweg durch die fehlende Interaktion mit Nod2 dysreguliert. Dies steht im Einklang mit dem Modell der Antigen-spezifischen Colitis, die eine verstärkte Colitis in *Nod2*^{-/-} Mäusen induziert [77]. Der verstärkte Phänotyp wurde in diesem Modell ebenfalls durch eine verstärkte TLR2-Antwort induziert und in *Nod2*^{-/-} /*TLR2*^{-/-} Mäusen inhibiert. Bei den *Nod2*^{-/-} Mäusen fehlte in dieser Arbeit daher nicht nur die Nod2-vermittelte Inhibition der TLR2-Antwort, der TLR2-Signalweg wurde noch dazu exzessiv von *S. Tm* $\Delta msbB$ induziert und potenzierte die TLR2-vermittelte Induktion der Entzündung gegenüber den C57BL/6J Mäusen. Die fehlende Nod2-abhängige Inhibition der TLR2- und TLR4-Antwort und die übermäßige TLR2-Aktivierung führten daher zwei Tage nach der Infektion zu der verstärkten Entzündung in *Nod2*^{-/-} Mäusen.

Die Ergebnisse deuten außerdem daraufhin, dass Nod2 in intestinalen Infektionen für eine Balance zwischen der Eliminierung des Pathogenes und der dadurch induzierten Entzündung entscheidend ist. Diese Balance wird unter anderem durch die bakterielle Liganden-induzierte Toleranz gestärkt, welche den Wirt vor einer unverhältnismäßig verlaufenden Gewebeerstörung während der Entzündungsreaktion schützt und damit auch das Überleben während der Infektion sichert [59]. So induzierte beispielsweise die Kostimulation von Makrophagen mit LPS und MDP die nachfolgende Pathogen-Toleranz. In Makrophagen von *Nod2*^{-/-} Mäusen war diese Toleranz jedoch reduziert und wurde durch die spezifische Stimulation von Nod1 vermittelt [59]. Auf die oben gezeigten Ergebnisse übertragen bedeutet das, dass der Nod2-Defekt in der akuten Infektionsphase in einer verminderten MDP-induzierten Toleranz der *Nod2*^{-/-} Mäuse resultierte und zu einer verstärkten Entzündung des Caecums führte. Gleichzeitig wirkte sich der Defekt auf die Pathogen-Eliminierung aus, die in den *Nod2*^{-/-} Mäusen zeitlich verzögert einsetzte. Im späteren Infektionsverlauf konnten dann aber andere Mechanismen eingreifen, die den Defekt von Nod2 und damit die fehlende MDP-induzierte Toleranz kompensierten.

Bisher ist der Auslöser von Morbus Crohn noch nicht identifiziert worden, jedoch werden intestinale Pathogene und auch die Mikrobiota als Ursache diskutiert [134]. Vor allem

mikrobielle Antigene der Mikrobiota, die vom Immunsystem eigentlich toleriert werden, sollen hier die Entzündungsreaktion induzieren, was unter anderem damit begründet wird, dass Antibiotika die Remission bei Patienten verlängern können [135]. Die hier gezeigten Daten deuten daher darauf hin, dass Nod2 eine protektive Rolle in der Entstehung von Morbus Crohn einnimmt. Vor allem die Nod2-Mutation Leu1007fsinsC wird mit Morbus Crohn assoziiert, welche nach dem aktuellen Forschungsstand funktionell einer Nod2-Defizienz entspricht [136]. Daher könnte die fehlende Nod2-vermittelte Inhibition von TLRs dazu führen, dass die intestinale Entzündung bei Patienten unkontrolliert induziert wird. Dafür spricht auch der rezidivierende Verlauf der Krankheit, da Nod2 hauptsächlich an der Initiierung der Entzündung beteiligt ist und im späteren Verlauf andere Mechanismen greifen. Die Modifikation von Lipid A ist ein wichtiger Mechanismus für Bakterien, um das Immunsystem zu umgehen [137]. Resultiert diese Modifikation in einer verstärkten TLR2-Reaktivität ist dies normalerweise kein Nachteil für das Bakterium, da sie aufgrund des Nod2-Schutzmechanismus nicht in einer verstärkten Immunantwort resultiert. Wenn der Nod2-induzierte Mechanismus jedoch aufgrund einer Nod2-Mutation nicht inhibierend eingreift, könnte die verstärkte TLR2-Aktivierung bei Morbus Crohn Patienten in der Initiierung der Entzündungsreaktion resultieren.

Darüberhinaus stellen die hier gezeigten Ergebnisse auch den Einsatz der *msbB*-Mutation in Salmonellen-Impfstämmen in Frage. Diese Mutation wurde bereits in verschiedene Impfstämme eingebracht, damit sie aufgrund einer verminderten Lipid A-Toxizität sicher sind und keinen septischen Schock induzieren können [12, 124]. Vor dem Einsatz im Patienten sollte jedoch dringend abgeklärt werden, ob die entsprechenden Stämme analog zu *S. Tm ΔmsbB* eine verstärkte TLR2-Reaktivität aufweisen. Wäre dies der Fall könnte es vor allem für Patienten mit einer Nod2-Mutation fatale Folge haben, da der Impfstamm aufgrund der fehlenden Nod2-vermittelten Inhibition von TLR2 unbeabsichtigt schwere Entzündungen des Darms auslösen könnte.

4.5. Ausblick

In der *S. Tm* $\Delta msbB$ -induzierten Colitis spielt Nod2 eine wichtige Rolle bei der Initiierung der Entzündung. Mittels IHC wurde eine Beteiligung von Neutrophilen in der Entzündungsreaktion nachgewiesen, jedoch ist noch unklar ob weitere Immunzellen an der verstärkten Entzündung der *Nod2*^{-/-} Mäuse beteiligt sind. Aufgrund von Problemen in der Zucht der *Nod2*^{-/-} Mäuse war es nicht mehr möglich diese Zellen mittels Durchflusszytometrie näher zu charakterisieren. Diese Versuche wurden in während dieser Arbeit bereits etabliert und werden daher nachgeholt, sobald wieder genügend Tiere für diese Versuche zur Verfügung stehen.

Darüberhinaus könnte der zeitliche Verlauf der *S. Tm* $\Delta msbB$ -induzierten Colitis in der frühen Infektionsphase näher untersucht werden. So könnte beispielsweise die Untersuchung von Tag 3 oder 4 der *S. Tm* $\Delta msbB$ -Infektion klären, welche Faktoren dazu führen, dass trotz der anfänglich verstärkten Colitis der *Nod2*^{-/-} Mäuse die Colitis an Tag 7 vergleichbar war.

Desweiteren soll die Rolle von TLR2 in der *S. Tm* $\Delta msbB$ -induzierten Colitis näher untersucht werden. Dazu wurden bereits Versuche etabliert, mit welchen in einer murinen Epithelzelllinie die Produktion von Nod2, TLR2 oder Nod2 und TLR2 mittels siRNA blockiert und die Immunantwort auf *S. Tm* $\Delta msbB$ im Vergleich zu *S. Tm* Wildtyp untersucht werden kann. Diese Versuche werden zurzeit von Frau Dr. Natalie Steck fortgeführt und vorläufige Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass die verstärkte Entzündung der *Nod2*^{-/-} Mäuse TLR2-abhängig induziert wird.

Dies könnte auch in einer Krypten-Organoid-Zellkultur aus primären murinen Epithelzellen weiter analysiert werden, die kürzlich in der Arbeitsgruppe Entzündungsmodelle etabliert wurde. Mit diesem Modell ist es möglich, Krypten-Organoiden von *Nod2*^{-/-} Mäusen zu kultivieren, mit *S. Tm* zu infizieren und den TLR2-Signalweg mittels eines TLR2-Antikörpers zu blockieren.

In dieser Arbeit wurden auch Faeces-Proben der C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäuse vor Versuchsbeginn, ein Tag nach der Streptomycin-Behandlung sowie an verschiedenen Tagen der *S. Tm* $\Delta msbB$ -Infektion gesammelt. Obwohl es bereits einige Berichte über die Mikrobiota in *Nod2*^{-/-} Mäuse gibt [87, 90, 109, 116], wurde bislang nicht untersucht, inwieweit die Mikrobiota von der *S. Tm*-induzierten Colitis beeinflusst werden. Daher wäre es sinnvoll die Mikrobiota im Verlauf der *S. Tm*-induzierten Colitis anhand der zur Verfügung stehenden Faeces-Proben zu untersuchen.

5. Zusammenfassung

Die nicht-typhoidale Salmonellose ist eine schwere Magen-Darm-Erkrankung an der jährlich bis zu 93,8 Millionen Menschen erkranken. Hierbei induziert der Erreger *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (S. Tm) Diarrhö, Erbrechen, intestinale Entzündung und abdominalen Schmerzen. Diese selbst-limitierende Gastroenteritis dauert in der Regel vier bis sieben Tage an, die Krankheit kann jedoch auch tödlich verlaufen und fordert jährlich bis zu 15.500 Todesfälle. Morbus Crohn ist eine diskontinuierliche, segmental auftretende chronische Darmentzündung mit einem rezidivierenden Verlauf. Die Therapie zur Unterdrückung der chronischen Entzündung, beispielsweise mit TNF α -Inhibitoren, ist zwar vielversprechend und hilft bei der Aufrechterhaltung der Remission, jedoch tritt bei mehr als einem Drittel der Patienten eine Fibrose mit Stenosen auf, die auf diese Therapie nicht ansprechen. Es ist zwar eine genetische Prädisposition für Morbus Crohn bekannt, die Pathogenese von Morbus Crohn ist allerdings nicht vollständig verstanden. Das am häufigsten auftretende Suszeptibilitätsgens von Morbus Crohn ist der Nod-like Rezeptor Nod2. Dieser Rezeptor ist an der Erkennung von bakteriellem Peptidoglykan beteiligt und spielt auch bei intestinalen Infektionskrankheiten wie *C. rodentium* oder *H. hepaticus* eine Rolle.

Mittels C57BL/6J und *Nod2*^{-/-} Mäusen wurde in dieser Arbeit untersucht, welche Rolle Nod2 in der Pathogenese der Salmonellen-induzierten Colitis und Fibrose einnimmt. Darüberhinaus wurde *in vitro* analysiert, ob der attenuierte *Salmonella* Stamm S. Tm Δ *msbB* PRRs unterschiedlich aktiviert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Nod2 eine wichtige Rolle in der Initiierung der intestinalen Entzündung spielt und die Eliminierung von *Salmonella* in der akuten Phase reguliert. *Nod2*^{-/-} Mäuse entwickelten in der akuten Infektionsphase eine verstärkte Entzündung, die beispielsweise mit einer verstärkten Neutrophilen-Infiltration einherging. Außerdem setzte die Eliminierung von *Salmonella* in *Nod2*^{-/-} Mäusen zeitverzögert ein. Auch Nod1 spielt eine vergleichbare Rolle in der Initiierung der Entzündung, da auch *Nod1*^{-/-} und *Nod1*^{-/-}/*Nod2*^{-/-} Mäuse eine verstärkte Entzündung entwickelten. Auf die chronische Phase der Entzündung und der intestinalen Fibrose in der Salmonellen-induzierten Colitis wurde jedoch kein Einfluss von Nod2 festgestellt. Die Rolle von Nod2 bei der Initiierung der Entzündung und der frühen Eliminierung von *Salmonella* ist darüberhinaus abhängig von TLR2. Die verstärkte Entzündung der *Nod2*^{-/-} Mäuse wurde nur mit dem attenuierten Stamm S. Tm Δ *msbB* induziert, der im Vergleich zu S. Tm Wildtyp verstärkt den TLR2-Signalweg aktiviert.

Nod2 wurde in dieser Arbeit als Regulator der angeborenen Immunantwort identifiziert, der in der Initiierung der Entzündung inhibitorisch auf die TLR2- und TLR4-Signalwege einwirkt und protektiv einer übermäßigen TLR2- und TLR4-induzierten Entzündung entgegen wirkt.

6. Summary

Non-typhoidal salmonellosis is a serious gastrointestinal-disease and causes 93.8 million cases per year. The pathogen *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (S. Tm) induces diarrhea, vomiting, abdominal pain and intestinal inflammation. This self-limiting gastroenteritis usually lasts four to seven days, but the disease can also lead to death and causes 15,500 deaths annually.

Crohn's disease is a discontinuous, segmental occurring chronic intestinal inflammation with a relapsing course of disease. Therapy for suppression of chronic inflammation, such as TNF α -inhibitors is indeed promising, but more than one third of the patients develop fibrosis with strictures, which do not respond to this anti-inflammatory therapy. Although genetic predisposition to Crohn's disease is well-known, pathogenesis of the disease is not fully understood. The most common susceptibility gen for Crohn's disease is the Nod-like receptor Nod2. This receptor is involved in the recognition of bacterial peptidoglycan and plays a role in intestinal infectious diseases such as *C. rodentium* or *H. hepaticus*.

Using C57BL/6J and *Nod2*^{-/-} mice the role of Nod2 in the pathogenesis of *Salmonella*-induced colitis and fibrosis was investigated. Moreover, it was analyzed in vitro whether the attenuated *Salmonella* strain S. Tm Δ *msbB* activates PRRs differently.

The results show that Nod2 plays an important role in the initiation of intestinal inflammation and regulates the elimination of *Salmonella* in the acute phase. *Nod2*^{-/-} mice developed exacerbated inflammation in the acute phase of infection, which was associated with increased neutrophils infiltration. In addition, the elimination of *Salmonella* was delayed in *Nod2*^{-/-} mice compared to C57BL/6J mice. Also Nod1 plays a similar role in the initiation of inflammation, as *Nod1*^{-/-} and *Nod1*^{-/-}/*Nod2*^{-/-} mice developed exacerbated inflammation as well. However, no influence of Nod2 was found in the chronic phase of inflammation and fibrosis in *Salmonella*-induced colitis. The role of Nod2 in the initiation of inflammation and the early elimination of *Salmonella* were also dependent on TLR2. Exacerbated inflammation of *Nod2*^{-/-} mice was just induced by the attenuated strain S. Tm Δ *msbB*, which activates the TLR2-signaling more strongly compared to S. Tm wild type.

Here, Nod2 was identified as a regulator of innate immunity that modulates inflammation by inhibition of TLR2- and TLR4-signaling pathways and acts protective against excessive TLR2- and TLR4-induced inflammation.

7. Literaturverzeichnis

1. Tsohis RM, Xavier MN, Santos RL, Baumler AJ. How to become a top model: impact of animal experimentation on human Salmonella disease research. *Infect Immun* 2011, **79**(5): 1806-1814.
2. Grassl GA, Finlay BB. Pathogenesis of enteric Salmonella infections. *Curr Opin Gastroenterol* 2008, **24**(1): 22-26.
3. Broz P, Ohlson MB, Monack DM. Innate immune response to Salmonella typhimurium, a model enteric pathogen. *Gut Microbes* 2012, **3**(2): 62-70.
4. Coburn B, Grassl GA, Finlay BB. Salmonella, the host and disease: a brief review. *Immunol Cell Biol* 2007, **85**(2): 112-118.
5. McCormick BA. Using Salmonella enterica serotype typhimurium to model intestinal fibrosis. *Gastroenterology* 2008, **134**(3): 872-875.
6. Barthel M, Hapfelmeier S, Quintanilla-Martinez L, Kremer M, Rohde M, Hogardt M, Pfeffer K, Russmann H, Hardt WD. Pretreatment of mice with streptomycin provides a Salmonella enterica serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infect Immun* 2003, **71**(5): 2839-2858.
7. Stecher B, Macpherson AJ, Hapfelmeier S, Kremer M, Stallmach T, Hardt WD. Comparison of Salmonella enterica serovar Typhimurium colitis in germfree mice and mice pretreated with streptomycin. *Infect Immun* 2005, **73**(6): 3228-3241.
8. McCormick BA, Colgan SP, Delp-Archer C, Miller SI, Madara JL. Salmonella typhimurium attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signalling to subepithelial neutrophils. *J Cell Biol* 1993, **123**(4): 895-907.
9. Geddes K, Rubino S, Streutker C, Cho JH, Magalhaes JG, Le Bourhis L, Selvanantham T, Girardin SE, Philpott DJ. Nod1 and Nod2 regulation of inflammation in the Salmonella colitis model. *Infect Immun* 2010, **78**(12): 5107-5115.
10. Srikanth CV, Mercado-Lubo R, Hallstrom K, McCormick BA. Salmonella effector proteins and host-cell responses. *Cell Mol Life Sci* 2011, **68**(22): 3687-3697.
11. Arpaia N, Godec J, Lau L, Sivick KE, McLaughlin LM, Jones MB, Dracheva T, Peterson SN, Monack DM, Barton GM. TLR Signaling Is Required for Salmonella typhimurium Virulence. *Cell* 2011, **144**(5): 675-688.
12. Kong Q, Six DA, Liu Q, Gu L, Roland KL, Raetz CR, Curtiss R, 3rd. Palmitoylation state impacts induction of innate and acquired immunity by the Salmonella enterica serovar typhimurium msbB mutant. *Infect Immun* 2011, **79**(12): 5027-5038.
13. Raetz CR, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 2002, **71**: 635-700.
14. Khan SA, Everest P, Servos S, Foxwell N, Zahringer U, Brade H, Rietschel ET, Dougan G, Charles IG, Maskell DJ. A lethal role for lipid A in Salmonella infections. *Mol Microbiol* 1998, **29**(2): 571-579.

15. St John AL, Abraham SN. Salmonella disrupts lymph node architecture by TLR4-mediated suppression of homeostatic chemokines. *Nat Med* 2009, **15**(11): 1259-1265.
16. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zahringer U, Seydel U, Di Padova F, Schreier M, Brade H. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J* 1994, **8**(2): 217-225.
17. Schromm AB, Brandenburg K, Loppnow H, Moran AP, Koch MH, Rietschel ET, Seydel U. Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion. *Eur J Biochem* 2000, **267**(7): 2008-2013.
18. Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 2009, **458**(7242): 1191-1195.
19. Kong Q, Six DA, Liu Q, Gu L, Wang S, Alamuri P, Raetz CR, Curtiss R, 3rd. Phosphate groups of lipid A are essential for Salmonella enterica serovar Typhimurium virulence and affect innate and adaptive immunity. *Infect Immun* 2012, **80**(9): 3215-3224.
20. Tukul C, Raffatellu M, Chessa D, Wilson RP, Akcelik M, Baumler AJ. Neutrophil influx during non-typhoidal salmonellosis: who is in the driver's seat? *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006, **46**(3): 320-329.
21. Hapfelmeier S, Stecher B, Barthel M, Kremer M, Muller AJ, Heikenwalder M, Stallmach T, Hensel M, Pfeffer K, Akira S, Hardt WD. The Salmonella pathogenicity island (SPI)-2 and SPI-1 type III secretion systems allow Salmonella serovar typhimurium to trigger colitis via MyD88-dependent and MyD88-independent mechanisms. *J Immunol* 2005, **174**(3): 1675-1685.
22. Broz P, Newton K, Lamkanfi M, Mariathasan S, Dixit VM, Monack DM. Redundant roles for inflammasome receptors NLRP3 and NLRC4 in host defense against Salmonella. *J Exp Med* 2010, **207**(8): 1745-1755.
23. Stecher B, Paesold G, Barthel M, Kremer M, Jantsch J, Stallmach T, Heikenwalder M, Hardt WD. Chronic Salmonella enterica serovar Typhimurium-induced colitis and cholangitis in streptomycin-pretreated Nramp1^{+/+} mice. *Infect Immun* 2006, **74**(9): 5047-5057.
24. Seong E, Saunders TL, Stewart CL, Burmeister M. To knockout in 129 or in C57BL/6: that is the question. *Trends Genet* 2004, **20**(2): 59-62.
25. Grassl GA, Valdez Y, Bergstrom KS, Vallance BA, Finlay BB. Chronic enteric salmonella infection in mice leads to severe and persistent intestinal fibrosis. *Gastroenterology* 2008, **134**(3): 768-780.
26. Burke JP, Mulsow JJ, O'Keane C, Docherty NG, Watson RW, O'Connell PR. Fibrogenesis in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2007, **102**(2): 439-448.
27. Rosenstiel P, Sina C, Franke A, Schreiber S. Towards a molecular risk map--recent advances on the etiology of inflammatory bowel disease. *Semin Immunol* 2009, **21**(6): 334-345.

-
28. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* 2007, **369**(9573): 1641-1657.
 29. Rieder F, Brenmoehl J, Leeb S, Scholmerich J, Rogler G. Wound healing and fibrosis in intestinal disease. *Gut* 2007, **56**(1): 130-139.
 30. Shelley-Fraser G, Borley NR, Warren BF, Shepherd NA. The connective tissue changes of Crohn's disease. *Histopathology* 2012, **60**(7): 1034-1044.
 31. Lawrance IC, Maxwell L, Doe W. Altered response of intestinal mucosal fibroblasts to profibrogenic cytokines in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2001, **7**(3): 226-236.
 32. Bernstein CN, Shanahan F. Disorders of a modern lifestyle: reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases. *Gut* 2008, **57**(9): 1185-1191.
 33. Rubino SJ, Selvanantham T, Girardin SE, Philpott DJ. Nod-like receptors in the control of intestinal inflammation. *Curr Opin Immunol* 2012, **24**(4): 398-404.
 34. Gradel KO, Nielsen HL, Schonheyder HC, Ejlersen T, Kristensen B, Nielsen H. Increased short- and long-term risk of inflammatory bowel disease after salmonella or campylobacter gastroenteritis. *Gastroenterology* 2009, **137**(2): 495-501.
 35. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001, **411**(6837): 599-603.
 36. Inohara N, Koseki T, del Peso L, Hu Y, Yee C, Chen S, Carrio R, Merino J, Liu D, Ni J, Nunez G. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* 1999, **274**(21): 14560-14567.
 37. Franchi L, Warner N, Viani K, Nunez G. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev* 2009, **227**(1): 106-128.
 38. Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac A, Jehanno M, Viala J, Tedin K, Taha MK, Labigne A, Zahringer U, Coyle AJ, DiStefano PS, Bertin J, Sansonetti PJ, Philpott DJ. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 2003, **300**(5625): 1584-1587.
 39. Kufer TA, Banks DJ, Philpott DJ. Innate immune sensing of microbes by Nod proteins. *Ann N Y Acad Sci* 2006, **1072**: 19-27.
 40. Magalhaes JG, Sorbara MT, Girardin SE, Philpott DJ. What is new with Nods? *Curr Opin Immunol* 2011, **23**(1): 29-34.
 41. Watanabe T, Asano N, Fichtner-Feigl S, Gorelick PL, Tsuji Y, Matsumoto Y, Chiba T, Fuss IJ, Kitani A, Strober W. NOD1 contributes to mouse host defense against *Helicobacter pylori* via induction of type I IFN and activation of the ISGF3 signaling pathway. *J Clin Invest* 2010, **120**(5): 1645-1662.
-

-
42. Travassos LH, Carneiro LA, Ramjeet M, Hussey S, Kim YG, Magalhaes JG, Yuan L, Soares F, Chea E, Le Bourhis L, Boneca IG, Allaoui A, Jones NL, Nunez G, Girardin SE, Philpott DJ. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol* 2010, **11**(1): 55-62.
 43. Franke A, Ruether A, Wedemeyer N, Karlsen TH, Nebel A, Schreiber S. No association between the functional CARD4 insertion/deletion polymorphism and inflammatory bowel diseases in the German population. *Gut* 2006, **55**(11): 1679-1680.
 44. McGovern DP, Hysi P, Ahmad T, van Heel DA, Moffatt MF, Carey A, Cookson WO, Jewell DP. Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease. *Hum Mol Genet* 2005, **14**(10): 1245-1250.
 45. Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 2001, **276**(7): 4812-4818.
 46. Iwanaga Y, Davey MP, Martin TM, Planck SR, DePriest ML, Baugh MM, Suing CM, Rosenbaum JT. Cloning, sequencing and expression analysis of the mouse NOD2/CARD15 gene. *Inflamm Res* 2003, **52**(6): 272-276.
 47. Rosenstiel P, Fantini M, Brautigam K, Kuhbacher T, Waetzig GH, Seegert D, Schreiber S. TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2003, **124**(4): 1001-1009.
 48. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, Sansonetti PJ. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 2003, **278**(11): 8869-8872.
 49. Lecat A, Piette J, Legrand-Poels S. The protein Nod2: an innate receptor more complex than previously assumed. *Biochem Pharmacol* 2010, **80**(12): 2021-2031.
 50. Cossart P, Sansonetti PJ. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* 2004, **304**(5668): 242-248.
 51. Marina-Garcia N, Franchi L, Kim YG, Hu Y, Smith DE, Boons GJ, Nunez G. Clathrin- and dynamin-dependent endocytic pathway regulates muramyl dipeptide internalization and NOD2 activation. *J Immunol* 2009, **182**(7): 4321-4327.
 52. Ismail MG, Vavricka SR, Kullak-Ublick GA, Fried M, Mengin-Lecreulx D, Girardin SE. hPepT1 selectively transports muramyl dipeptide but not Nod1-activating muramyl peptides. *Can J Physiol Pharmacol* 2006, **84**(12): 1313-1319.
 53. Sorbara MT, Philpott DJ. Peptidoglycan: a critical activator of the mammalian immune system during infection and homeostasis. *Immunol Rev* 2011, **243**(1): 40-60.
 54. Inohara N, Nunez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* 2003, **3**(5): 371-382.
 55. Kufer TA. Signal transduction pathways used by NLR-type innate immune receptors. *Mol Biosyst* 2008, **4**(5): 380-386.
-

56. Shaw MH, Reimer T, Kim YG, Nunez G. NOD-like receptors (NLRs): bona fide intracellular microbial sensors. *Curr Opin Immunol* 2008, **20**(4): 377-382.
57. Abbott DW, Wilkins A, Asara JM, Cantley LC. The Crohn's disease protein, NOD2, requires RIP2 in order to induce ubiquitinylation of a novel site on NEMO. *Curr Biol* 2004, **14**(24): 2217-2227.
58. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nunez G, Flavell RA. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005, **307**(5710): 731-734.
59. Kim YG, Park JH, Daignault S, Fukase K, Nunez G. Cross-tolerization between Nod1 and Nod2 signaling results in reduced refractoriness to bacterial infection in Nod2-deficient macrophages. *J Immunol* 2008, **181**(6): 4340-4346.
60. Hsu YM, Zhang Y, You Y, Wang D, Li H, Duramad O, Qin XF, Dong C, Lin X. The adaptor protein CARD9 is required for innate immune responses to intracellular pathogens. *Nat Immunol* 2007, **8**(2): 198-205.
61. Legrand-Poels S, Kustermans G, Bex F, Kremmer E, Kufer TA, Piette J. Modulation of Nod2-dependent NF-kappaB signaling by the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 2007, **120**(Pt 7): 1299-1310.
62. Robertson SJ, Girardin SE. Nod-like receptors in intestinal host defense: controlling pathogens, the microbiota, or both? *Curr Opin Gastroenterol* 2013, **29**(1): 15-22.
63. Barreau F, Madre C, Meinzer U, Berrebi D, Dussallant M, Merlin F, Eckmann L, Karin M, Sterkers G, Bonacorsi S, Lesuffleur T, Hugot JP. Nod2 regulates the host response towards microflora by modulating T cell function and epithelial permeability in mouse Peyer's patches. *Gut* 2010, **59**(2): 207-217.
64. Rosenstiel P, Huse K, Till A, Hampe J, Hellmig S, Sina C, Billmann S, von Kampen O, Waetzig GH, Platzer M, Seegert D, Schreiber S. A short isoform of NOD2/CARD15, NOD2-S, is an endogenous inhibitor of NOD2/receptor-interacting protein kinase 2-induced signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(9): 3280-3285.
65. Kufer TA, Kremmer E, Banks DJ, Philpott DJ. Role for erbin in bacterial activation of Nod2. *Infect Immun* 2006, **74**(6): 3115-3124.
66. McDonald C, Chen FF, Ollendorff V, Ogura Y, Marchetto S, Lecine P, Borg JP, Nunez G. A role for Erbin in the regulation of Nod2-dependent NF-kappaB signaling. *J Biol Chem* 2005, **280**(48): 40301-40309.
67. LeBlanc PM, Yeretssian G, Rutherford N, Doiron K, Nadiri A, Zhu L, Green DR, Gruenheid S, Saleh M. Caspase-12 modulates NOD signaling and regulates antimicrobial peptide production and mucosal immunity. *Cell Host Microbe* 2008, **3**(3): 146-157.
68. Clark NM, Marinis JM, Cobb BA, Abbott DW. MEKK4 sequesters RIP2 to dictate NOD2 signal specificity. *Curr Biol* 2008, **18**(18): 1402-1408.
69. Cooney R, Baker J, Brain O, Danis B, Pichulik T, Allan P, Ferguson DJ, Campbell BJ, Jewell D, Simmons A. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med* 2010, **16**(1): 90-97.

-
70. Homer CR, Richmond AL, Rebert NA, Achkar JP, McDonald C. ATG16L1 and NOD2 interact in an autophagy-dependent antibacterial pathway implicated in Crohn's disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2010, **139**(5): 1630-1641, 1641 e1631-1632.
 71. Ramjeet M, Hussey S, Philpott DJ, Travassos LH. 'Nodophagy': New crossroads in Crohn disease pathogenesis. *Gut Microbes* 2010, **1**(5): 307-315.
 72. Hiemstra IH, Bouma G, Geerts D, Kraal G, den Haan JM. Nod2 improves barrier function of intestinal epithelial cells via enhancement of TLR responses. *Mol Immunol* 2012, **52**(3-4): 264-272.
 73. Tang L, Zhou XD, Wang Q, Zhang L, Wang Y, Li XY, Huang DM. Expression of TRAF6 and pro-inflammatory cytokines through activation of TLR2, TLR4, NOD1, and NOD2 in human periodontal ligament fibroblasts. *Arch Oral Biol* 2011, **56**(10): 1064-1072.
 74. Tsai WH, Huang DY, Yu YH, Chen CY, Lin WW. Dual roles of NOD2 in TLR4-mediated signal transduction and -induced inflammatory gene expression in macrophages. *Cell Microbiol* 2011, **13**(5): 717-730.
 75. Richardson WM, Sodhi CP, Russo A, Siggers RH, Afrazi A, Gribar SC, Neal MD, Dai S, Prindle T, Jr., Branca M, Ma C, Ozolek J, Hackam DJ. Nucleotide-binding oligomerization domain-2 inhibits toll-like receptor-4 signaling in the intestinal epithelium. *Gastroenterology* 2010, **139**(3): 904-917, 917 e901-906.
 76. Hedl M, Li J, Cho JH, Abraham C. Chronic stimulation of Nod2 mediates tolerance to bacterial products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(49): 19440-19445.
 77. Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Wakatsuki Y, Fuss IJ, Strober W. Nucleotide binding oligomerization domain 2 deficiency leads to dysregulated TLR2 signaling and induction of antigen-specific colitis. *Immunity* 2006, **25**(3): 473-485.
 78. Borm ME, van Bodegraven AA, Mulder CJ, Kraal G, Bouma G. The effect of NOD2 activation on TLR2-mediated cytokine responses is dependent on activation dose and NOD2 genotype. *Genes Immun* 2008, **9**(3): 274-278.
 79. Netea MG, van der Leij F, Drenth JP, Joosten LA, te Morsche R, Verweij P, de Jong D, Kullberg BJ, van der Meer JW. Chronic yersiniosis due to defects in the TLR5 and NOD2 recognition pathways. *Neth J Med* 2010, **68**(10): 310-315.
 80. Netea MG, Ferwerda G, de Jong DJ, Girardin SE, Kullberg BJ, van der Meer JW. NOD2 3020insC mutation and the pathogenesis of Crohn's disease: impaired IL-1beta production points to a loss-of-function phenotype. *Neth J Med* 2005, **63**(8): 305-308.
 81. Guo QS, Xia B, Jiang Y, Qu Y, Li J. NOD2 3020insC frameshift mutation is not associated with inflammatory bowel disease in Chinese patients of Han nationality. *World J Gastroenterol* 2004, **10**(7): 1069-1071.
 82. Wang YF, Zhang H, Ouyang Q. Clinical manifestations of inflammatory bowel disease: East and West differences. *J Dig Dis* 2007, **8**(3): 121-127.
 83. Mahurkar S, Banerjee R, Rani VS, Thakur N, Rao GV, Reddy DN, Chandak GR. Common variants in NOD2 and IL23R are not associated with inflammatory bowel disease in Indians. *J Gastroenterol Hepatol* 2011, **26**(4): 694-699.
-

-
84. Miceli-Richard C, Lesage S, Rybojad M, Prieur AM, Manouvrier-Hanu S, Hafner R, Chamailard M, Zouali H, Thomas G, Hugot JP. CARD15 mutations in Blau syndrome. *Nat Genet* 2001, **29**(1): 19-20.
 85. Le Bourhis L, Benko S, Girardin SE. Nod1 and Nod2 in innate immunity and human inflammatory disorders. *Biochem Soc Trans* 2007, **35**(Pt 6): 1479-1484.
 86. Kim YG, Kamada N, Shaw MH, Warner N, Chen GY, Franchi L, Nunez G. The Nod2 sensor promotes intestinal pathogen eradication via the chemokine CCL2-dependent recruitment of inflammatory monocytes. *Immunity* 2011, **34**(5): 769-780.
 87. Petnicki-Ocwieja T, Hrnčir T, Liu YJ, Biswas A, Hudcovic T, Tlaskalova-Hogenova H, Kobayashi KS. Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(37): 15813-15818.
 88. Hoiseth SK, Stocker BA. Genes *aroA* and *serC* of *Salmonella typhimurium* constitute an operon. *J Bacteriol* 1985, **163**(1): 355-361.
 89. Bergman MA, Cummings LA, Alaniz RC, Mayeda L, Fellnerova I, Cookson BT. CD4⁺-T-cell responses generated during murine *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection are directed towards multiple epitopes within the natural antigen FliC. *Infect Immun* 2005, **73**(11): 7226-7235.
 90. Rehman A, Sina C, Gavrilova O, Hasler R, Ott S, Baines JF, Schreiber S, Rosenstiel P. Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities. *Gut* 2011, **60**(10): 1354-1362.
 91. Geddes K, Rubino SJ, Magalhaes JG, Streutker C, Le Bourhis L, Cho JH, Robertson SJ, Kim CJ, Kaul R, Philpott DJ, Girardin SE. Identification of an innate T helper type 17 response to intestinal bacterial pathogens. *Nat Med* 2011, **17**(7): 837-844.
 92. Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006, **3**(7): 390-407.
 93. Loetscher Y, Wieser A, Lengefeld J, Kaiser P, Schubert S, Heikenwalder M, Hardt WD, Stecher B. *Salmonella* transiently reside in luminal neutrophils in the inflamed gut. *PLoS One* 2012, **7**(4): e34812.
 94. Pabst O. Trafficking of regulatory T cells in the intestinal immune system. *Int Immunol* 2013, **25**(3): 139-143.
 95. Mowat AM, Bain CC. Mucosal macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *J Innate Immun* 2011, **3**(6): 550-564.
 96. Keestra AM, Godinez I, Xavier MN, Winter MG, Winter SE, Tsois RM, Baumler AJ. Early MyD88-dependent induction of interleukin-17A expression during *Salmonella* colitis. *Infect Immun* 2011, **79**(8): 3131-3140.
 97. Raffatellu M, Santos RL, Verhoeven DE, George MD, Wilson RP, Winter SE, Godinez I, Sankaran S, Paixao TA, Gordon MA, Kolls JK, Dandekar S, Baumler AJ. Simian immunodeficiency virus-induced mucosal interleukin-17 deficiency promotes *Salmonella* dissemination from the gut. *Nat Med* 2008, **14**(4): 421-428.
-

-
98. Lipinski S, Till A, Sina C, Arlt A, Grasberger H, Schreiber S, Rosenstiel P. DUOX2-derived reactive oxygen species are effectors of NOD2-mediated antibacterial responses. *J Cell Sci* 2009, **122**(Pt 19): 3522-3530.
 99. Netto LES, Chae HZ, Kang SW, Rhee SG, Stadtman ER. Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties. TSA possesses thiol peroxidase activity. *J Biol Chem* 1996, **271**(26): 15315-15321.
 100. Wilson RP, Raffatellu M, Chessa D, Winter SE, Tukel C, Baumler AJ. The Vi-capsule prevents Toll-like receptor 4 recognition of Salmonella. *Cell Microbiol* 2008, **10**(4): 876-890.
 101. Valdez Y, Grassl GA, Guttman JA, Coburn B, Gros P, Vallance BA, Finlay BB. Nramp1 drives an accelerated inflammatory response during Salmonella-induced colitis in mice. *Cell Microbiol* 2009, **11**(2): 351-362.
 102. Barreau F, Meinzer U, Chareyre F, Berrebi D, Niwa-Kawakita M, Dussaillant M, Foligne B, Ollendorff V, Heyman M, Bonacorsi S, Lesuffleur T, Sterkers G, Giovannini M, Hugot JP. CARD15/NOD2 is required for Peyer's patches homeostasis in mice. *PLoS One* 2007, **2**(6): e523.
 103. Couturier-Maillard A, Secher T, Rehman A, Normand S, De Arcangelis A, Haesler R, Huot L, Grandjean T, Bressenot A, Delanoye-Crespin A, Gaillot O, Schreiber S, Lemoine Y, Ryffel B, Hot D, Nunez G, Chen G, Rosenstiel P, Chamailard M. NOD2-mediated dysbiosis predisposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer. *J Clin Invest* 2013, **123**(2): 700-711.
 104. Winter SE, Keestra AM, Tsolis RM, Baumler AJ. The Blessings and Curses of Intestinal Inflammation. *Cell Host Microbe* 2010, **8**(1): 36-43.
 105. Stecher B, Barthel M, Schlumberger MC, Haberli L, Rabsch W, Kremer M, Hardt WD. Motility allows *S. Typhimurium* to benefit from the mucosal defence. *Cell Microbiol* 2008, **10**(5): 1166-1180.
 106. Raffatellu M, George MD, Akiyama Y, Hornsby MJ, Nuccio SP, Paixao TA, Butler BP, Chu H, Santos RL, Berger T, Mak TW, Tsolis RM, Bevins CL, Solnick JV, Dandekar S, Baumler AJ. Lipocalin-2 resistance confers an advantage to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium for growth and survival in the inflamed intestine. *Cell Host Microbe* 2009, **5**(5): 476-486.
 107. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schaffeler E, Schlee M, Herrlinger KR, Stallmach A, Noack F, Fritz P, Schroder JM, Bevins CL, Fellermann K, Stange EF. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 2004, **53**(11): 1658-1664.
 108. Voss E, Wehkamp J, Wehkamp K, Stange EF, Schroder JM, Harder J. NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2. *J Biol Chem* 2006, **281**(4): 2005-2011.
 109. Robertson SJ, Zhou JY, Geddes K, Rubino SJ, Cho JH, Girardin SE, Philpott DJ. Nod1 and Nod2 signaling does not alter the composition of intestinal bacterial communities at homeostasis. *Gut Microbes* 2013, **4**(3): 222-231.
-

-
110. Rubino SJ, Geddes K, Girardin SE. Innate IL-17 and IL-22 responses to enteric bacterial pathogens. *Trends Immunol* 2012, **33**(3): 112-118.
 111. Liu JZ, Pezeshki M, Raffatellu M. Th17 cytokines and host-pathogen interactions at the mucosa: dichotomies of help and harm. *Cytokine* 2009, **48**(1-2): 156-160.
 112. Henrique de Araujo T, Okada SS, Ghosn EE, Taniwaki NN, Rodrigues MR, Rogerio de Almeida S, Mortara RA, Russo M, Campa A, Albuquerque RC. Intracellular localization of myeloperoxidase in murine peritoneal B-lymphocytes and macrophages. *Cell Immunol* 2013, **281**(1): 27-30.
 113. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2013, **13**(3): 159-175.
 114. Circu ML, Aw TY. Redox biology of the intestine. *Free Radic Res* 2011, **45**(11-12): 1245-1266.
 115. Weichart D, Gobom J, Klopffleisch S, Hasler R, Gustavsson N, Billmann S, Lehrach H, Seeger D, Schreiber S, Rosenstiel P. Analysis of NOD2-mediated proteome response to muramyl dipeptide in HEK293 cells. *J Biol Chem* 2006, **281**(4): 2380-2389.
 116. Mondot S, Barreau F, Al Nabhani Z, Dussaillant M, Le Roux K, Dore J, Leclerc M, Hugot JP, Lepage P. Altered gut microbiota composition in immune-impaired Nod2(-/-) mice. *Gut* 2012, **61**(4): 634-635.
 117. Wang S, Zhu H, Lu C, Kang Z, Luo Y, Feng L, Lu X. Fermented milk supplemented with probiotics and prebiotics can effectively alter the intestinal microbiota and immunity of host animals. *J Dairy Sci* 2012, **95**(9): 4813-4822.
 118. Hasegawa M, Yamazaki T, Kamada N, Tawaratsumida K, Kim YG, Nunez G, Inohara N. Nucleotide-binding oligomerization domain 1 mediates recognition of *Clostridium difficile* and induces neutrophil recruitment and protection against the pathogen. *J Immunol* 2011, **186**(8): 4872-4880.
 119. Chen GY, Shaw MH, Redondo G, Nunez G. The innate immune receptor Nod1 protects the intestine from inflammation-induced tumorigenesis. *Cancer Res* 2008, **68**(24): 10060-10067.
 120. Le Bourhis L, Magalhaes JG, Selvanantham T, Travassos LH, Geddes K, Fritz JH, Viala J, Tedin K, Girardin SE, Philpott DJ. Role of Nod1 in mucosal dendritic cells during *Salmonella* pathogenicity island 1-independent *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun* 2009, **77**(10): 4480-4486.
 121. Tada H, Aiba S, Shibata K, Ohteki T, Takada H. Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. *Infect Immun* 2005, **73**(12): 7967-7976.
 122. Fritz JH, Girardin SE, Fitting C, Werts C, Mengin-Lecreulx D, Caroff M, Cavaillon JM, Philpott DJ, Adib-Conquy M. Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *Eur J Immunol* 2005, **35**(8): 2459-2470.
-

123. Vorachek-Warren MK, Ramirez S, Cotter RJ, Raetz CR. A triple mutant of *Escherichia coli* lacking secondary acyl chains on lipid A. *J Biol Chem* 2002, **277**(16): 14194-14205.
124. Liu T, Konig R, Sha J, Agar SL, Tseng CT, Klimpel GR, Chopra AK. Immunological responses against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Braun lipoprotein and lipid A mutant strains in Swiss-Webster mice: potential use as live-attenuated vaccines. *Microb Pathog* 2008, **44**(3): 224-237.
125. Gunn BM, Wanda SY, Burshell D, Wang C, Curtiss R, 3rd. Construction of recombinant attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium vaccine vector strains for safety in newborn and infant mice. *Clin Vaccine Immunol* 2010, **17**(3): 354-362.
126. Rosenberg SA, Spiess PJ, Kleiner DE. Antitumor effects in mice of the intravenous injection of attenuated *Salmonella typhimurium*. *J Immunother* 2002, **25**(3): 218-225.
127. Low KB, Ittensohn M, Le T, Platt J, Sodi S, Amoss M, Ash O, Carmichael E, Chakraborty A, Fischer J, Lin SL, Luo X, Miller SI, Zheng L, King I, Pawelek JM, Bermudes D. Lipid A mutant *Salmonella* with suppressed virulence and TNFalpha induction retain tumor-targeting in vivo. *Nat Biotechnol* 1999, **17**(1): 37-41.
128. Stritzker J, Hill PJ, Gentschev I, Szalay AA. Myristoylation negative msbB-mutants of probiotic *E. coli* Nissle 1917 retain tumor specific colonization properties but show less side effects in immunocompetent mice. *Bioeng Bugs* 2010, **1**(2): 139-145.
129. Everest P, Ketley J, Hardy S, Douce G, Khan S, Shea J, Holden D, Maskell D, Dougan G. Evaluation of *Salmonella typhimurium* mutants in a model of experimental gastroenteritis. *Infect Immun* 1999, **67**(6): 2815-2821.
130. Murray SR, Bermudes D, de Felipe KS, Low KB. Extragenic suppressors of growth defects in msbB *Salmonella*. *J Bacteriol* 2001, **183**(19): 5554-5561.
131. Karsten V, Murray SR, Pike J, Troy K, Ittensohn M, Kondradzhyan M, Low KB, Bermudes D. msbB deletion confers acute sensitivity to CO₂ in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium that can be suppressed by a loss-of-function mutation in zwf. *BMC Microbiol* 2009, **9**: 170.
132. Heine H, Ulmer AJ. Recognition of bacterial products by toll-like receptors. *Chem Immunol Allergy* 2005, **86**: 99-119.
133. Netea MG, Ferwerda G, de Jong DJ, Jansen T, Jacobs L, Kramer M, Naber TH, Drenth JP, Girardin SE, Kullberg BJ, Adema GJ, Van der Meer JW. Nucleotide-binding oligomerization domain-2 modulates specific TLR pathways for the induction of cytokine release. *J Immunol* 2005, **174**(10): 6518-6523.
134. Shanahan F, Bernstein CN. The evolving epidemiology of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2009, **25**(4): 301-305.
135. Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2008, **134**(2): 577-594.

136. Kim YG, Shaw MH, Warner N, Park JH, Chen F, Ogura Y, Nunez G. Cutting edge: Crohn's disease-associated Nod2 mutation limits production of proinflammatory cytokines to protect the host from *Enterococcus faecalis*-induced lethality. *J Immunol* 2011, **187**(6): 2849-2852.
137. Matsuura M, Kawasaki K, Kawahara K, Mitsuyama M. Evasion of human innate immunity without antagonizing TLR4 by mutant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium having penta-acylated lipid A. *Innate Immun* 2012, **18**(5): 764-773.

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Sekundäre Acylierungen in der Lipid A-Biosynthese	3
Abb. 2: S. Tm-induziertes Colitis & Fibrose Modell	6
Abb. 3: Fibrose im Colon von Morbus Crohn Patienten	8
Abb. 4: Schematischer Aufbau der NLR	10
Abb. 5: Lysogen-Test	25
Abb. 6: Genotypisierung von S. Tm Mutanten	25
Abb. 7: Vergleichbare Keimlast in S. Tm Δ aroA-infizierten Mäusen	38
Abb. 8: Vergleichbare Colitis in S. Tm Δ aroA-infizierten Mäusen	39
Abb. 9: Vergleichbare Kollagen-Produktion in S. Tm Δ aroA-infizierten Mäusen	41
Abb. 10: Vergleichbare Keimlast in S. Tm Wildtyp-infizierten Mäusen	42
Abb. 11: S. Tm Wildtyp induzierte eine vergleichbare Colitis	43
Abb. 12: Geringere Keimlast im Ileum von S. Tm Δ msbB-infizierten $Nod2^{-/-}$ Mäusen	45
Abb. 13: Verstärkte Entzündung des Caecums von S. Tm Δ msbB-infizierten $Nod2^{-/-}$ Mäusen	47
Abb. 14: Stärkere Pathologie in den $Nod2^{-/-}$ Mäusen an Tag 2 der S. Tm Δ msbB-Infektion ..	48
Abb. 15: Frühe Neutrophilen-Infiltration in den S. Tm Δ msbB-infizierten $Nod2^{-/-}$ Mäusen	50
Abb. 16: Infiltration von Makrophagen und T-Zellen	51
Abb. 17: Unveränderte Genexpression von <i>Emr1</i> in S. Tm Δ msbB-infizierten Mäusen	52
Abb. 18: Induktion der <i>Nod1</i> -Genexpression in S. Tm Δ msbB-infizierten Mäusen	53
Abb. 19: Veränderte Genexpression von <i>Tlr2</i> in S. Tm Δ msbB-infizierten Mäusen	53
Abb. 20: Veränderte Genexpression von Chemo- und Zytokinen in S. Tm Δ msbB-infizierten Mäusen	55
Abb. 21: Veränderte Chemo- und Zytokinmenge in S. Tm Δ msbB-infizierten Mäusen	56
Abb. 22: Veränderte Genexpression von Interleukinen in S. Tm Δ msbB-infizierten Mäusen	57
Abb. 23: Veränderte Expression der Redox-Homöostase-Gene in S. Tm Δ msbB-infizierten Mäusen	58
Abb. 24: Vergleichbare Kollagen-Produktion in S. Tm Δ msbB-infizierten Mäusen	60
Abb. 25: Vergleichbare Keimlast in C57BL/6J, $Nod1^{-/-}$, $Nod2^{-/-}$ und DKO Mäuse	61
Abb. 26: Verstärkte Colitis in S. Tm Δ msbB-infizierten $Nod1^{-/-}$ und DKO Mäusen	62
Abb. 27: Reduzierte TLR4-Reaktivität des LPS von S. Tm Δ msbB	65
Abb. 28: Reduzierte TLR4-Reaktivität von S. Tm Δ msbB	66
Abb. 29: Verstärkt TLR2-Reaktivität von S. Tm Δ msbB	68
Abb. 30: Immunantwort auf S. Tm Δ msbB	86

9. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Antikörper für immunhistologische Färbungen.....	21
Tab. 2: Bakterien- und Phagenstämme	21
Tab. 3: In der Arbeit eingesetzte Mausstämme	22
Tab. 4: Pathologische Bewertungssystem der <i>S. Tm</i> -induzierten Colitis	29
Tab. 5: Primersequenzen für die Genotypisierung und Bedingungen der PCR.....	32
Tab. 6: Primersequenzen für die quantitative <i>Real-Time</i> PCR.....	33
Tab. 7: Plasmide für die Transfektion von HEK293 Zellen.....	34

10. Lebenslauf

Name: **Anne-Kathrin Claes**

Geburtsdatum: 05. Januar 1984

Geburtsort: Gießen

Anschrift: 23867 Sülfeld
Wittenkamp 26

Wissenschaftlicher Werdegang:

- 10/2009 - heute Promotion am Institut für Experimentelle Medizin in der Arbeitsgruppe „Entzündungsmodelle“ (Universität Kiel und Forschungszentrum Borstel)
- 10/2009 Verleihung des akademischen Grad „Diplom-Biologin“ an der Justus-Liebig-Universität Gießen
- 01 - 09/2009 Abschluss: Diplom
Diplomarbeit am Paul-Ehrlich-Institut im Fachgebiet „Klinische Allergologie“ in Langen
Titel: „Etablierung eines Potency-Tests für chemisch modifizierte Allergenextrakte (Allergoide)“
- 2003 - 2009 Studium der Diplom-Biologie an der Justus-Liebig-Universität Gießen
- 1996 - 2003 Abschluss: Abitur
Landgraf-Ludwig-Gymnasium in Gießen;
- 1994 - 1996 Adolf-Reichwein-Schule in Pohlheim - Watzenborn-Steinberg
- 1990 - 1994 Limesschule in Pohlheim - Watzenborn-Steinberg

Ausgewählte Kongressbeiträge und Forschungsaufenthalte:

- 11/2012 Vortrag: „35rd Symposium of the North-German Immunologists“ am Forschungszentrum Borstel, Deutschland
- 10/2012 Poster: „64. Jahrestagung der DGHM“ in Hamburg, Deutschland
- 08 - 09/2012 Forschungsaufenthalt am „Department of Immunology“ in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dana J. Philpott, University of Toronto, Kanada.
Thema: „Analyse der Rolle von Nod1 in Salmonellen-induzierter Darmentzündung“
- 06/2012 Vortrag: „5th Seeon Conference Microbiota, Probiota and Host“ der DGHM in Seeon, Deutschland

- 03/2012 Poster: Keystone Symposium „Innate Immunity: Sensing the Microbes and Damage Signals” in Keystone, USA
- 11/2011 Vortrag: „34rd Symposium of the North-German Immunologists” am Forschungszentrum Borstel, Deutschland
- 09/2011 Poster: „2011 Joint Annual Meeting SIICA/DGfI” in Riccione, Italien
- 04/2011 Vortrag: „4th Seeon Conference Microbiota, Probiota and Host” der DGfM in Seeon, Deutschland

11. Publikationsliste

„Nod2 is involved in regulation of *S. Typhimurium* Δ *msbB*-induced colitis”

A.-K. Claes, N. Steck, D. Schultz, U. Zähringer, S. Lipinski, P. Rosenstiel, K. Geddes, D. J. Philpott, H. Heine, G. A. Grassl. (Manuscript in preparation)

12. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während meiner Promotion unterstützt haben.

Besonders herzlich möchte ich mich bei meinem Betreuer **Prof. Dr. Guntram Grassl** für die Bereitstellung dieses spannenden Themas und die großartige Betreuung danken. Danke für die Unterstützung meiner Ideen, deinen unerschütterlichen Optimismus durch den wir jede Krise sicher überstehen konnten und für die immer gut gelaunten Besprechungen. Auch für die Möglichkeit meine Arbeit auf nationalen und internationalen Kongressen vorzustellen möchte ich mich bedanken. Besonders der Forschungsaufenthalt in Kanada war für mich eine einmalige Erfahrung. Du hast mich in den letzten Jahren unglaublich unterstützt, mein Vertrauen in mich selbst bestärkt und mir geholfen selbst in den schwärzesten Stunden die Freude an der Forschung nicht zu verlieren. Danke!

Prof. Dr. Thomas Roeder möchte ich für die Betreuung dieses Promotionsvorhabens als Erstgutachter bedanken.

Prof. Dr. Holger Heine danke ich für die herausragende Betreuung der Zellkulturprojekte und die Möglichkeit die Versuche in seinem Labor durchzuführen. Vielen Dank für die wertvollen Tipps und auch für die Unterstützung bei Problemen außerhalb der Laborarbeit.

Prof. Dr. Ulrich Zähringer danke ich für die Bereitstellung des *Salmonella* Stamms S. Tm $\Delta msbB$ und der LPS-Proben. Vor allem möchte ich mich aber für die hilfreichen Gespräche bedanken, durch die mir die Welt der Lipopolysaccharide etwas näher gebracht wurde.

Prof. Dr. Philip Rosenstiel und **Dr. Simone Lipinski** möchte ich für die Bereitstellung der Mäuse bedanken und für die Durchführung der Real-Time PCR zur Bestimmung der Genexpression der Redox-Homöostase-beteiligten Gene.

Prof. Dr. Jürgen Harder und **Prof. Dr. Ehrhardt Proksch** möchte ich für die Unterstützung und Betreuung eines Haut-Infektionsprojekts bedanken.

Herzlich möchte ich mich auch bei **Prof. Dr. Dana J. Philpott** bedanken, die mir die Möglichkeit bot in ihrem Labor zu arbeiten, um die Rolle von Nod1 in der Salmonellen-induzierten Colitis zu untersuchen. Vielen Dank auch an **Dr. Susan Robertson**, **Dr. Kaoru**

Geddes und das gesamte Team, dass ich so herzlich aufgenommen wurde und für die wunderbaren wissenschaftlichen Diskussionen. Die Zeit in Toronto bleibt unvergessen!

Der gesamten **Arbeitsgruppe Entzündungsmodelle** - **Janin Braun, Sandra Hannemann, Dorothee Schultz, Dr. Natalie Steck, Christina Traband sowie den Azubis** - möchte ich für ihre Unterstützung im Labor, die hilfreichen Anregungen bei technischen Fragen und die wissenschaftliche Diskussion danken.

Darüberhinaus möchte ich der **Arbeitsgruppe Angeborene Immunität**, insbesondere **Ina Goroncy** danken, die mich für die Durchführung der Transfektionsversuche in ihrer Gruppe freundlich aufgenommen und tatkräftig unterstützt haben.

Bei den Kollegen aus dem „**3. Stock**“ möchte ich mich für die humorvollen Pausen und die gute Laune im Labor bedanken. Insbesondere möchte ich auch **Dr. Jochen Behrends** danken, der mich nicht nur bei der Etablierung der Durchflusszytometrie unterstützt hat, sondern auch bei sonstigen Fragen immer ein offenes Ohr für mich hatte.

In den letzten Jahren wurde ich von lieben Freunden begleitet. Drei davon sind mir ganz besonders ans Herz gewachsen, denen ich für ihre Freundschaft, ihre Unterstützung und den Spaß, den wir gemeinsam hatten, danken möchte:

Lisa, ohne unsere Dienstag-Koch&Strickabende kann ich mir die Welt nicht mehr vorstellen... Ohne große Worte: Deine Freundschaft ist das Wichtigste was ich von hier mitnehme! **Jule**, von dir habe ich soviel gelernt (Spontanität...kenn ich nicht ☺). Danke für die tollen Gespräche, unsere Ausflüge ans Meer, die witzigen Wochenendschichten in der 22 und unsere (fast) täglichen Spaziergänge! **Kim**, danke für eine tolle Zeit, ob bei der Meet&Greet-Organisation, am Schreibtisch oder bei spontanen Roadtrips und danke, dass du immer wusstest, wie du mich schnell aufmunterst. Ich werde unsere gemeinsame Bürozeit so sehr vermissen!

Schließlich danke ich meiner **Familie**, die mich auch in diesem Lebensabschnitt wieder bedingungslos unterstützt haben. Ohne meinen Eltern, die von klein auf an mich geglaubt und für mich gekämpft haben, wäre dieser Weg für mich verwehrt geblieben. **Sebastian**, danke, dass du immer genau weißt wie es mir geht, auch ohne Wort. Du bist einfach der Beste große Bruder, den man sich vorstellen kann. **Carolin** und **Sebastian**, euch möchte ich für eure Unterstützung und Liebe danken.

Ihr seid mein Anker, unabhängig davon wo ich in der Weltgeschichte herumreise!

13. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit, abgesehen von der Beratung durch die Betreuer, nach Inhalt und Form selbstständig von mir verfasst wurde und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet wurden. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut wurde als solches kenntlich gemacht.

Ferner erkläre ich, dass diese Arbeit weder vollständig noch in Teilen im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde.

Diese Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Ort, Datum

Unterschrift