

Klinik für Innere Medizin I
(Direktor: Prof. Dr. Stefan Schreiber)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**DIE BEDEUTUNG DER NLRC5 KNOCK-OUT-MAUS IN
UNTERSCHIEDLICHEN ENTZÜNDUNGSMODELLEN DES
ANGEBORENEN IMMUNSYSTEMS**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

NICOLINA LARA BÖTTCHER

aus **Kiel**

Kiel 2012

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Rosenstiel

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Grassl

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2013

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 13.11.2013

gez. Prof. Dr. Laudes

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation mit dem Thema

„Die Bedeutung der Nlrc5 Knock-out-Maus in unterschiedlichen Entzündungsmodellen des angeborenen Immunsystems“

abgesehen von Ratschlägen meines Doktorvaters und meiner sonstigen akademischen Lehrer nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist und dass ich außer den in der Arbeit aufgeführten keine weiteren Hilfsmittel benutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Ort, Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis und Termini technici	iii
Abbildungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	v
1 Einleitung	1
1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	1
1.2 Genetische Assoziationsstudien im Bereich der chronisch entzündlichen Erkrankungen	3
1.3 Autoinflammatorische Erkrankungen	4
1.4 Das angeborene Immunsystem und die <i>pattern recognition receptor</i>	5
1.4.1 Genassoziationen der <i>Nod-like receptor</i> Familie mit chronischen Entzündungskrankheiten	7
1.4.2 Die <i>Nod-like receptor</i> Familie.....	8
1.5 Fragestellung	11
2 Material und Methoden	13
2.1 Material	13
2.2 Mäuse	13
2.3 Mausexperimente	14
2.3.1 Mäusepräparation	14
2.3.2 Endotoxinschock	14
2.3.3 DSS-induzierte Kolitis	15
2.4 Isolierung von Mausgewebe/-zellen.....	17
2.4.1 DNA-Isolierung aus Mäuseschwänzen	17
2.4.2 <i>Bone marrow derived macrophages</i> (BMDMs).....	17
2.4.3 Lunge.....	19
2.4.4 Stimulation	19
2.5 Molekularbiologische Methoden.....	20
2.5.1 RNA-Isolation aus Gewebe.....	20
2.5.2 cDNA-Synthese.....	21
2.5.3 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	21
2.5.4 Agarose-Gelelektrophorese	22
2.5.5 Real-Time PCR	23
2.5.6 ELISA.....	23
2.6 Histologische Methoden.....	24
2.6.1 Vorbereitung.....	24
2.6.2 HE-Färbung	24
2.7 Statistik.....	25
3 Ergebnisse	26

3.1	Nlrc5.....	26
3.1.1	Genomische Organisation von murinem <i>Nlrc5</i>	26
3.1.2	Expressionsprofil von <i>Nlrc5</i>	27
3.1.3	Regulation von Nlrc5 durch Interferon- γ	27
3.2	Bestätigung des Knock-outs.....	28
3.3	Basale Phänotypisierung der Nlrc5-deletierten Maus.....	29
3.3.1	Basale Histologie der intestinalen Organe.....	29
3.3.2	Basale Laborwerte.....	32
3.4	Provokationsmodelle.....	33
3.4.1	Endotoxinschock.....	33
3.4.2	Stimulationen durch LPS in vitro.....	35
3.4.3	Natrium-Dextransulfat (DSS) -induzierte Kolitis.....	36
4	Diskussion.....	42
4.1	Die Nlrc5-deletierte Maus.....	42
4.2	Expression und Induktion von murinem Nlrc5.....	43
4.3	Die Deletion von Nlrc5 schützt im akuten Entzündungsmodell.....	44
4.4	Aggravierte Entzündung der Nlrc5-deletierten Maus bei der DSS-induzierten Kolitis.....	47
4.5	Dichotomer Effekt von Nlrc5 in verschiedenen Entzündungsmodellen.....	49
4.6	Ausblick.....	53
5	Zusammenfassung.....	55
	Literaturverzeichnis.....	56
	Anhang – Verwendete Materialien.....	61
	Danksagung.....	63
	Lebenslauf.....	64

Abkürzungsverzeichnis und Termini technici

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BIR	<i>Baculoviral inhibitory repeat</i> Domäne
BMDMs	<i>Bone marrow-derived macrophages</i>
BP	Basenpaare
CARD	<i>Caspase activation and recruitment domain</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CIITA	<i>Class II, major histocompatibility complex, transactivator</i>
CINCA	<i>Chronic infantile neurological and articular syndrome</i>
DAI	<i>Disease activity index</i>
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
DEPC	<i>Diethylpyrocarbonat</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSS	Natrium-Dextransulfat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
et al.	Und andere
FCAS	<i>Familial cold autoinflammatory syndrome</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> , Zellkulturmedium
G	Gauche
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
GWAS	Genome-wide association studies
HE	Hämatoxylin-Eosin
IFN- γ	Interferon- γ
IKK	<i>Inhibitor of nuclear factor-kappa B Kinase</i>
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
KC	<i>Keratinocyte-derived Cytokine</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>Leucine-rich repeat</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MAVS	<i>Mitochondrial antiviral signaling protein</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MMLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
NACHT	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NLR	<i>Nod-like receptor</i> , nach der neuen Nomenklatur als <i>Nucleotide-binding domain and leucine rich repeat containing family</i> bezeichnet
Nlrc5	<i>NLR family,, CARD domain containing 5 protein</i>
Nlrc5 ^{-/-} -Maus	Nlrc5 Knock-out-Maus
NLRP	<i>NLR-family, pyrin domain containing</i> , früher als NALP bezeichnet
NOD	<i>Nucleotide-binding and oligomerization domain</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>

RIG	<i>Retinoic acid inducible gene</i>
RLR	<i>Retinoic acid inducible gene (RIG) like receptor</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
Rpm	<i>Rounds per minute</i>
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute, bestimmtes Zellkulturmedium</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>
siRNA	<i>Small interfering ribonucleic acid</i>
SD	Standardabweichung
SEM	<i>Standard error of mean</i>
Tab.	Tabelle
TAE	<i>Tris-Acetat-EDTA</i>
Tag	<i>Termophilus aquaticus</i>
TH	T-Helferzelle
TLR	<i>Toll-like-receptor</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tube	Plastikreaktionsgefäß
Well	Vertiefung in einer Reaktionsplatte
WT	Wildtyp-Maus bzw. -Mäuse

Wie allgemein üblich sind in dieser Arbeit englische Begriffe kursiv gesetzt. Zur genaueren Differenzierung werden außerdem Gene im Gegensatz zu Proteinen kursiv geschrieben, sowie für murine Bestandteile Kleinschrift und für humane Großschrift verwendet.

In dieser Arbeit wird größtenteils die aktuelle Nomenklatur des *Human genome organization gene nomenclature committee* aus dem Jahre 2008 verwendet. Die Ausnahme besteht im Begriff *Nod-like receptor*, welcher aufgrund seines Bekanntheitsgrades für die *nucleotide-binding domain and leucine rich repeat containing family* verwendet wird.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aufbau und Funktion des NLRP3-Inflammasoms	9
Abb. 2: Struktur der <i>Nod-like</i> Rezeptor Familie	10
Abb. 3: Verwandte genomische Organisation von murinem und humanem <i>Nlrc5</i>	26
Abb. 4: Vermehrte Expression von <i>Nlrc5</i> in der Lunge	27
Abb. 5: <i>Nlrc5</i> Induktion durch Interferon- γ in vitro	28
Abb. 6: Bestätigung des Knock-outs	29
Abb. 7: Basale Histologie der <i>Nlrc5</i> -deletierten Maus und der Wildtyp-Maus	31
Abb. 8: Verbesserte Überlebensrate der <i>Nlrc5</i> -deletierten Mäuse im Endotoxinschockversuch	34
Abb. 9: Verminderte Interleukin-1 β und TNF- α Werte bei den <i>Nlrc5</i> -deletierten Mäusen im Endotoxinschockversuch	35
Abb. 10: Verminderte Interleukin-1 β und TNF- α Werte bei den <i>Nlrc5</i> -deletierten Mäusen nach LPS Stimulation in vitro	36
Abb. 11: Die <i>Nlrc5</i> -deletierten Mäuse zeigten im chronischen DSS Versuch ein niedrigeres Gewicht und einen höheren <i>Disease Activity Index</i> als der Wildtyp	37
Abb. 12: Die <i>Nlrc5</i> -deletierten Mäuse zeigten im chronischen DSS Versuch eine vergrößerte und schwerere Milz	38
Abb. 13: Die <i>Nlrc5</i> -deletierten Mäuse zeigten im chronischen DSS Versuch einen signifikanten erhöhten endoskopischen Score	39
Abb. 14: Vermehrte Entzündung im Darm der <i>Nlrc5</i> -deletierten Mäuse nach 30 Tagen chronischer DSS-Kolitis	39
Abb. 15: Erhöhte Zytokinexpression im Kolon nach 30-tägiger DSS-Gabe bei den <i>Nlrc5</i> -deletierten Mäusen für Interleukin-1 β , Interferon- γ , KC und erniedrigte Zytokinexpression für TNF- α	41
Abb. 16: Hypothetisches Modell zur Funktion von <i>Nlrc5</i>	53

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: NLR-assoziierte Erkrankungen	8
Tab. 2: Aktuelle Nomenklatur der <i>Nod-like</i> Rezeptor Familie	11
Tab. 3: Disease Activity Index	16
Tab. 4: Endoskopischer Score	17
Tab. 5: Verwendete Zellkulturformate	19
Tab. 6: Verwendete Chemikalien und Konzentrationen	19
Tab. 7: Reaktionsansatz für eine cDNA-Synthese	21
Tab. 8: Reaktionsansatz und PCR-Programm einer RT-PCR	22
Tab. 9: Vergleich von murinen und humanen <i>Nlrc5</i> auf Gen- und Proteinebene	26
Tab. 10: Basale Blutanalyse	32
Tab. 11: Verwendete Medien	61
Tab. 12: Verwendete Chemikalien und Zusätze	61
Tab. 13: Verwendete Kits	61
Tab. 14: Oligonukleotide	62
Tab. 15: Geräte	62

1 Einleitung

Die Medizin ist einem ständigen Wandel unterworfen. Während in den letzten Jahrzehnten Infektionskrankheiten in den westlichen Industrienationen stark zurückgedrängt werden konnten, sind chronische Entzündungskrankheiten in den Fokus der Aufmerksamkeit gerückt (Rook 2010). Chronisch entzündliche Erkrankungen gehören zusammen mit den bösartigen Neubildungen und den kardiovaskulären Erkrankungen zu den bis heute nicht bewältigten medizinischen Problemen in der westlichen Welt. Die Gruppe der chronisch entzündlichen Erkrankungen umfasst Autoimmunkrankheiten, chronische Entzündungen und die eher seltenen Erkrankungen aus dem Formenkreis der Autoinflammation. Krankheiten wie Morbus Crohn, die Anfang des 20. Jahrhunderts praktisch unbekannt waren, haben in den letzten Jahrzehnten so zugenommen, dass die Deutsche Forschungsgemeinschaft von den „Epidemien der Moderne“ spricht (Deutsche Forschungsgemeinschaft 2011). Es existieren nur wenige europäische Zahlen zur ökonomischen Belastung durch chronische Entzündungskrankheiten, die einen Schaden in Milliardenhöhe vermuten lassen (Hoffmann, Preiss et al. 2008; Lundkvist, Kastang et al. 2008; Rychlik 2008).

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Zu den chronisch entzündlichen Erkrankungen, die in den letzten Jahren viel beforscht worden sind, gehören die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Hier liegt nach den heutigen Kenntnissen eine Schädigung der Barriere vor, die zur anhaltenden Stimulation des intestinalen Immunsystems durch luminale Antigene aus Darmbakterien und Nahrungsbestandteilen führt. Morbus Crohn und Kolitis ulzerosa sind die häufigsten immunologisch vermittelten gastroenterologischen Erkrankungen. Klinisch sind beide Erkrankungen durch eine chronische Darmentzündung unbekannter Ursache charakterisiert. Im Gegensatz zu infektiösen Darmerkrankungen werden Remissionsphasen von akuten entzündlichen Schüben unterbrochen, bei einigen Patienten findet sich ein chronisch aktiver Verlauf. Verlauf, Ausdehnung und Schweregrad der Erkrankungen sind variabel und nicht vorhersehbar (Cho 2008). Chronisch entzündliche Darmerkrankungen betreffen meist junge Patienten (20. - 40. Lebensjahr), die durch die in Schüben verlaufende unvorhersehbare chronische Erkrankung meist erheblich in ihrer Lebensqualität beeinträchtigt sind (Renz-Polster and Aries 2006; Hoffmann, Preiss et al. 2008). Hochrechnungen der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten zufolge belaufen sich die jährlichen Kosten in Deutschland, die allein durch Morbus Crohn entstehen, auf bis zu drei Milliarden Euro (Hoffmann, Preiss et al. 2008).

Morbus Crohn und Kolitis ulcerosa zeigen zahlreiche Gemeinsamkeiten, lassen sich aufgrund charakteristischer Unterschiede in Klinik, Pathologie und immunologischen Veränderungen jedoch meist gut voneinander differenzieren.

Bei Morbus Crohn sind alle Schichten der Darmwand granulomatös entzündet, was zu Stenosierungen, Fistelbildungen und Abszessen führen kann. Die Entzündung kann in allen Darmanteilen mit einem diskontinuierlichen Befall der Segmente auftreten, bevorzugt aber im terminalen Ileum und im Kolon. Das Krankheitsbild ist sehr variabel. Die meisten Patienten klagen über Abdominalschmerzen und Durchfälle, die jedoch im Gegensatz zur Kolitis ulcerosa nur selten blutig sind. Patienten mit Morbus Crohn haben häufig extraintestinale Manifestationen an der Haut (Aphten, Erythema nodosum), den Gelenken (Arthritis) und an den Augen (Iritis).

Im Gegensatz dazu ist die Kolitis ulcerosa durch eine kontinuierliche, im Rektum beginnende und auf die Kolonmukosa beschränkte Entzündung charakterisiert. In etwa 10 % der Erkrankungen ist hierbei das gesamte Kolon betroffen.

Die Inzidenz beider Erkrankungen beträgt 3/100.000/Jahr und war im letzten Jahrhundert vor allem in den westlichen Industrienationen stark steigend. Seit 1960 hat sie sich versechsfacht (Renz-Polster and Aries 2006), die Häufigkeit scheint jetzt aber ein Plateau zu erreichen (Engel and Neurath 2010).

In der Pathogenese werden eine gestörte mukosale Toleranz und eine pathologische Immunreaktion auf luminale Antigene als bedeutende Mechanismen von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen angenommen. Aufgrund der unklaren Ätiologie sind für die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen bisher keine kausalen Therapieansätze etabliert. Beide Erkrankungen sprechen jedoch wegen ihrer immunologischen Genese auf eine antiinflammatorische bzw. immunsuppressive Therapie an. Nach den aktuellen Leitlinien der DGVS (Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselstörung) erfolgt die Behandlung von Morbus Crohn (Hoffmann, Preiss et al. 2008) und Kolitis ulcerosa (Dignass, Preiss et al. 2011) nach einem Stufenschema. Prinzipiell werden entzündungshemmende Medikamente eingesetzt, wobei Schubschwere und Ausdehnung der Entzündung maßgeblich für die Auswahl der Therapie sind. Bei leichtem Entzündungsgrad wird bei Morbus Crohn Budesonid als lokal wirksames Glukokorticoide eingesetzt. Bei Kolitis ulcerosa ist der Goldstandard die Behandlung mit Mesalazinpräparaten, welche die Prostaglandinsynthese und die chemotaktische Rekrutierung von Entzündungszellen hemmen. Bei einem mittelschweren und schweren Morbus Crohn werden systemische Kortikosteroide und

Azathioprin oder 6-Mercaptopurin zum Remissionserhalt verwendet. Bei Versagen oder Kontraindikation können die neuen Biologika, die sich als Antikörper gegen TNF- α richten, eingesetzt werden (Engel and Neurath 2010).

Die Einführung der Immunsuppressiva und Biologika hat zwar einen deutlichen Fortschritt in Remissionsinduktion und -erhalt gebracht, dennoch erreichen nach wie vor gut die Hälfte der Patienten mit Morbus Crohn und Kolitis ulzerosa nicht das Therapieziel und sind nicht ausreichend und anhaltend frei von Entzündung (Eicher and Hoffman 2008).

Die Ätiologie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist bisher nicht endgültig geklärt. Es existieren zahlreiche Hinweise darauf, dass sowohl eine genetische als auch eine Umweltkomponente existieren. Es sind inzwischen mehr als 30 Genloci entdeckt worden, die mit einem erhöhten Risiko für deren Entwicklung einhergehen (Rosenstiel, Sina et al. 2009). Bei Morbus Crohn ist die familiäre Vorbelastung der wichtigste Risikofaktor (Tysk, Lindberg et al. 1988; Torok, Glas et al. 2006). Die genetische Komponente macht ungefähr die Hälfte des Risikos, an Morbus Crohn zu erkranken, aus (Simmons 2010).

1.2 Genetische Assoziationsstudien im Bereich der chronisch entzündlichen Erkrankungen

Die Genomforschung konzentriert sich seit Jahren darauf, den Krankheitsursachen näher zu kommen. In diesem Zusammenhang werden seit 2005 sogenannte *genome-wide association studies* (GWAS) durchgeführt. Hierbei wird menschliche DNA von Kranken und Gesunden miteinander verglichen. Untersucht werden bestimmte Veränderungen einzelner Nukleotide, meist *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), die eine genetische Variation darstellen und mit den entsprechenden Krankheiten in Verbindung stehen. Die Kenntnis dieser „krankmachenden Gene“ könnte die Behandlung der Patienten spezifischer machen und unter anderem die Stratifizierung von Patientengruppen mit besonders gutem Ansprechen ermöglichen. Patienten werden hierbei je nach individuellem Risikoprofil in verschiedene Behandlungsgruppen eingeteilt. Ein klinisch wichtiges und etabliertes Beispiel ist der Brustkrebs mit der HER2/neu Mutation. Brustkrebspatienten werden heutzutage routinemäßig auf eine Mutation des HER2 Gens, das für den epithelialen Wachstumsfaktor codiert, getestet. Patienten mit dieser Mutation können mit einem monoklonalen Antikörper gegen diesen Wachstumsfaktor (Trastuzumab) spezifisch behandelt werden. Das krankheitsfreie Überleben der Frauen wurde dadurch signifikant gebessert (Untch 2006).

Auch bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sind durch *genome-wide association studies* zahlreiche assoziierte Gene entdeckt worden. Hierdurch wurde das

Verständnis der Pathogenese dieser Krankheiten stark erweitert (Schreiber, Rosenstiel et al. 2005; Duerr, Taylor et al. 2006; Yen, Cheung et al. 2006; Budarf, Labbe et al. 2009; Rosenstiel, Sina et al. 2009).

Die Untersuchung der neu entdeckten Genassoziationen zeigte eine erstaunliche Ähnlichkeit zwischen klinisch auf den ersten Blick sehr unterschiedlichen Krankheitsbildern. Als Beispiel seien hier Morbus Crohn und Psoriasis genannt, welche mit der Mutation des Interleukin-23-Rezeptors den gleichen Risikofaktor aufweisen (Duerr, Taylor et al. 2006; Nair, Ruether et al. 2008). Diese Beobachtung wird klinisch dadurch gestützt, dass Patienten mit Morbus Crohn eine fünffach erhöhte Wahrscheinlichkeit besitzen an Psoriasis zu erkranken (Zell, Hu et al. 2008).

Ein anderes Beispiel für die Verknüpfung unterschiedlicher Krankheitsbilder über die Genetik ist die Gruppe der *Nod-like* Rezeptoren (NLRs). Polymorphismen in den Genen der *Nod-like* Rezeptoren weisen eine bemerkenswerte Assoziation zu entzündlichen Erkrankungen auf. Beispielfhaft seien hier der Morbus Crohn und das Muckle-Wells-Syndrom, eine autoinflammatorische Erkrankung, genannt. (Rosenstiel, Till et al. 2007).

1.3 Autoinflammatorische Erkrankungen

Der Begriff „autoinflammatorisch“ entstand Ende der 1990er Jahre zur Beschreibung von entzündlichen Erkrankungen mit nicht erkennbarem Auslöser und ohne Nachweis von Autoantikörpern bzw. autoreaktiven T-Lymphozyten.

Die ersten besser charakterisierten autoinflammatorischen Erkrankungen waren das TRAPS (*TNF Receptor-Associated Periodic Syndrome*) und das familiäre Mittelmeerfieber.

Autoinflammatorische Erkrankungen zeichnen sich durch eine übersteigerte Aktivierung des angeborenen Immunsystems ohne eine physiologische Provokation, z. B. durch einen Infekt, aus. Eine wichtige Rolle in diesem Prozess spielen dabei Makrophagen und Interleukin-1 β , welches vermehrt sezerniert wird (Dinarello 2011). Die Krankheiten äußern sich durch rezidivierende Fieberepisoden und Entzündungen an Grenzflächen wie Urtikaria, Pleuritis oder Synovitis (Lamprecht and Gross 2009). Bei Autoimmunerkrankungen kommt es hingegen zu einer Störung der Immuntoleranz, sodass körpereigene Strukturen bekämpft werden. Dabei ist vor allem das adaptive System mit den T-Helfer Zellen eingespannt.

Zu den autoinflammatorischen Syndromen gehört unter anderem das Muckle-Wells-Syndrom. Es wird meist autosomal-dominant vererbt und die Patienten erkranken schon im frühen Kindesalter. Symptome sind unter anderem Fieber, Urtikaria, Gelenkschmerzen und Taubheit.

Die Überlebenserwartung hängt im Wesentlichen davon ab, ob die Patienten eine Amyloidose entwickeln (10-50 % der Fälle) (Lamprecht and Gross 2009).

Außerdem gehören zu den autoinflammatorischen Syndromen das familiäre kälteinduzierte autoinflammatorische Syndrom (FCAS) und das *Chronic Infantile neurological and articular* Syndrom (CINCA), auch bekannt als *Neonatal-onset multisystem inflammatory disease (NOMID)*. Patienten mit FCAS leiden unter Kälte assoziierter schmerzhafter Urtikaria, Konjunktivitis und Gelenkschmerzen. CINCA stellt die schwerste Form der autoinflammatorischen Syndrome dar, die zusätzlich eine neurologische Komponente enthält (Meningitis, Hirnatrophie) (Lamprecht and Gross 2009).

Neben den oben erwähnten Erkrankungen gehören noch zahlreiche weitere Erkrankungen in den autoinflammatorischen Formenkreis. Bei Diabetes mellitus Typ 2 gibt es Hinweise auf eine ähnliche Pathogenese, so dass auch diese Krankheit zu den autoinflammatorischen Erkrankungen gezählt werden kann (Dinarello 2009). Klinisch interessant wurden diese an sich seltenen Erkrankungen vor allem durch die Möglichkeit der Therapie mit Anakinra, einem Interleukin-1-Rezeptorantagonisten, welcher bei vielen Patienten die Symptome durch spezifisches Eingreifen in die Entzündungskaskade deutlich lindert (Kuemmerle-Deschner, Tyrrell et al. 2011).

1.4 Das angeborene Immunsystem und die *pattern recognition* Rezeptoren

Das Immunsystem gliedert sich in einen angeborenen und einen erworbenen Teil. Das angeborene Immunsystem liegt bereits in frühen Entwicklungsstufen vor und kann nur auf eine beschränkte Anzahl von Pathogenen reagieren, dafür aber schnell und meist schon beim ersten Kontakt. Wichtige Komponenten sind unter anderem mechanische und physiologische Barrieren (Epithelien), spezialisierte Zellen (Phagozyten) und das Komplementsystem.

Das erworbene Immunsystem braucht einige Zeit um sich auf Erreger einzustellen, bekämpft diese dann aber höchstspezifisch und besitzt ein Gedächtnis für eine erneute Infektion. Wichtige Bestandteile sind hier die T- und B-Lymphozyten. Es ist phylogenetisch jünger und nur bei den Vertebraten nachweisbar.

Das angeborene Immunsystem ist die erste Linie der Verteidigung gegen Krankheitserreger. Dabei ist es entgegen früherer Behauptungen keinesfalls völlig unspezifisch. Wichtig für die Erkennung von Krankheitserregern sind die keimbahncodierten *pattern recognition* Rezeptoren (PRR) (Akira, Uematsu et al. 2006).

Die *pattern recognition* Rezeptoren sind zuständig für die Erkennung von zellulären Gefahrensignalen (*danger-associated molecular patterns* = DAMPs) und konservierten Strukturen von Pathogenen (*pathogen-associated molecular patterns* = PAMPs). *Danger-associated molecular patterns* sind intrazellulär vorkommende Moleküle, die extrazellulär einen Hinweis für eine Zellschädigung darstellen wie z.B. ATP. *Pathogen-associated molecular patterns* bestehen aus Strukturen, die nur in Pathogenen und nicht im Wirt vorkommen, wobei sie allerdings nicht spezifisch für einen bestimmten Organismus sind. Beispiele hierfür sind die Lipopolysaccharide, die in der Membran von gramnegativen Bakterien enthalten sind. Weitere *Pathogen-associated molecular patterns* sind Peptidoglykane aus der Membran von Bakterien oder doppelsträngige RNA, die in bestimmten Virentypen vorkommt. Gemeinsam ist diesen Strukturen, dass sie essentiell für den angreifenden Organismus (z.B. Bakterien oder Viren) und deshalb schwierig zu modifizieren sind (Akira, Uematsu et al. 2006).

Die Aktivierung der verschiedenen *pattern recognition* Rezeptoren führt über unterschiedliche Signalwege zu proinflammatorischen Reaktionen. Häufig wird über eine Kaskade der Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert, welches dann zu einer erhöhten Produktion von Zytokinen, im Wesentlichen TNF, Interleukin-1 und Interleukin-6 führt.

Proinflammatorische Zytokine führen unter anderem zur Aktivierung von Phagozyten und Lymphozyten und zur Hochregulierung von Rezeptoren für Pathogene. Interleukin-1 β ist dabei ein zentrales und initial aktiviertes Zytokin, welches vor allem von Monozyten und Makrophagen ausgeschüttet wird. Es induziert unter anderem die Genexpression der Cyclooxygenase-2, welches zu den typischen Infektsymptomen (Fieber, erniedrigte Schmerzschwelle, Vasodilatation, Hypotension) führt (Dinarello 2011). Zusätzlich kommt es zu einer Verstärkung durch die Synthese von Akut-Phase-Proteinen in der Leber und weiteren Zytokinen wie Interleukin-6. Interleukin-1 β fördert die Wanderung der Immunzellen zum Ort der Infektion durch die Induktion der Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen. Außerdem zeigen Studien eine Bedeutung in der Angiogenese (Ben-Av, Crofford et al. 1995; Voronov, Shouval et al. 2003; Dinarello 2009). Die Induktion zur Bildung von Interleukin-1 β erfolgt unter anderem durch Liganden der sogenannten *toll-like* Rezeptoren (TLRs).

In Säugetieren wurden drei Untergruppen der *pattern recognition* Rezeptoren identifiziert. Am bekanntesten sind die *toll-like* Rezeptoren (TLRs), von denen bisher 13 identifiziert worden sind. Ihre Lokalisation ist die Plasma- oder endosomale Membran, wo sie hochkonservierte bakterielle Strukturen erkennen, bevor die Erreger pathogen in die Zelle

eindringen können. Ihre Aktivierung führt meist über NF- κ B zu einer proinflammatorischen Reaktion.

Die zweite Gruppe, die *retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) like receptors* (RLRs), sind zytoplasmatisch lokalisiert und können doppelsträngige RNA detektieren. Diese kommt bei bestimmten Virentypen vor. Die Aktivierung von *retinoic acid-inducible gene I like* Rezeptoren führt zu einer Interferon Ausschüttung. Die dritte Gruppe ist die *Nod-like* Rezeptor Familie (NLRs), um die es in dieser Arbeit geht.

1.4.1 Genassoziationen der *Nod-like* receptor Familie mit chronischen Entzündungskrankheiten

Polymorphismen in den Genen der *Nod-like* Rezeptoren (NLRs) weisen eine bemerkenswerte Assoziation zu entzündlichen Erkrankungen auf. Die Wahrscheinlichkeit an Morbus Crohn zu erkranken, entsteht in etwa zur Hälfte durch eine genetische Komponente (Simmons 2010). Eine besondere Bedeutung hat dabei das Gen *NOD2* auf Chromosom 16. Eine homozygote Mutation auf dem *NOD2* Gen führt bis zu einem hundertfach erhöhten Risiko an Morbus Crohn zu erkranken (Hampe, Cuthbert et al. 2001; Hugot, Chamaillard et al. 2001; Ogura, Bonen et al. 2001; Schreiber, Hampe et al. 2002; Torok, Glas et al. 2006). Es gibt verschiedene Theorien wie die Mutation in *NOD2* zu der Erkrankung Morbus Crohn führt (Strober, Murray et al. 2006).

Auch bei der Pathogenese der oben beschriebenen autoinflammatorischen Erkrankungen spielt ein Vertreter der NLR Familie eine entscheidende Rolle. Durch eine *gain of function* Mutation im *NLRP3* Gen (*nucleotide-binding oligomerization-domain protein (NOD)-like receptor family, pyrin domain containing 3*) wird *NLRP3* aktiviert und es kommt über das *NLRP3*-Inflammasom zur vermehrten Interleukin-1 β Sekretion mit dauerhafter Entzündungsreaktion (Lamprecht and Gross 2009).

Weitere Assoziationen zwischen Mutationen in den Genen der *Nod-like* Rezeptoren und der Pathogenese von Asthma, Atopischer Dermatitis und autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen sind beschrieben (Rosenstiel, Till et al. 2007). Außerdem wurden Assoziationen zu bestimmten Krebsarten beobachtet werden, wie dem besonders früh auftretenden Brustkrebs (Huzarski, Lener et al. 2005; Geddes, Magalhaes et al. 2009). Tabelle 1 gibt eine Übersicht der bekannten, mit *Nod-like* Rezeptoren assoziierten Erkrankungen.

Tab. 1: NLR-assozierte Erkrankungen

Modifiziert nach (Rosenstiel, Till et al. 2007; Fukata, Vamadevan et al. 2009; Lamprecht and Gross 2009).

Dargestellt ist eine Auswahl an Erkrankungen, die mit Mutationen in Genen für *Nod-like* Rezeptoren (NLR) assoziiert sind.

NLR	Krankheit
<i>NOD1</i>	Atopisches Ekzem Asthma M. Crohn
<i>NOD2</i>	M. Crohn <i>Early-onset</i> Sarkoidose Blau-Syndrom
<i>NLRP1</i>	Vitiligo Autoimmune Schilddrüsenerkrankungen
<i>NLRP3</i>	Autoinflammatorische Syndrome <ul style="list-style-type: none"> – Muckle-Wells-Syndrom – <i>Familial Cold Autoinflammatory Syndrome (FCAS)</i> – <i>Chronic Infantile Neurological and Articular Syndrome (CINCA)</i> – Familiäres Mittelmeerfieber
<i>CIITA</i>	<i>Bare lymphocyte syndrome Type 2 (BLSII)</i> Multiple Sklerose Systemischer Lupus erythematoses

1.4.2 Die *Nod-like receptor* Familie

Die Gruppe der *Nod-like* Rezeptoren (NLRs), nach der neuen Nomenklatur auch als *Nucleotide-binding domain and leucine rich repeat containing family* bezeichnet, gehört zu den *pattern recognition* Rezeptoren, die pathogene Strukturen intrazellulär erkennen und so zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems führen. Eine grobe Unterteilung der NLRs nach ihrer Funktion führt nach Magalhaes und Sorbara et al. zu drei Gruppen (Magalhaes, Sorbara et al. 2010).

1) *Class II, major histocompatibility complex, transactivator* (CIITA) nimmt eine Sonderposition in der *Nod-like* Rezeptor Familie ein, da es bisher als einziges Gen dieser Familie eine gesicherte Rolle in der transkriptionellen Regulation einnimmt. CIITA hat eine Schlüsselrolle in der Regulation von MHC II Genen inne.

2) Die zweite Gruppe besteht aus den Inflammasom aktivierenden *Nod-like* Rezeptoren. Sie bilden nach ihrer Aktivierung einen zytoplasmatischen Multiproteinkomplex, das sogenannte

Inflammasom. Es existieren drei Inflammasomtypen: NLRP3 (= NALP3), NLRC4 und NLRP1 (= NALP1). Alle führen über eine Caspase-1 Aktivierung zu Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, insbesondere von Interleukin-1 β und Interleukin-18 (Kumar, Kawai et al. 2009).

Das NLRP3-Inflammasom kann durch zahlreiche Stimuli wie *pathogen-associated molecular patterns*, Bakterien, Pilze und Viren aktiviert werden. Nach der Aktivierung oligomerisiert NLRP3, was die Anlagerung des ASC (*Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) Adapters möglich macht. Nach der Rekrutierung der Procaspase-1 wird diese autokatalytisch aktiviert und die Caspase-1 wandelt Prointerleukin-1 β in seine aktive Form um (Schroder and Tschopp 2010). Die Sekretion von Interleukin-1 β ist zusätzlich von der Aktivierung des Interleukin-1 β Promoters abhängig, da pro-Interleukin-1 β nicht konstitutiv hergestellt wird. Dieses geschieht durch proinflammatorische Signale wie LPS oder TNF- α . Die Inflammasom Aktivierung wird außerdem durch antivirale Signalwege wie z.B. RIG-1 beeinflusst (Poeck, Bscheider et al. 2010).

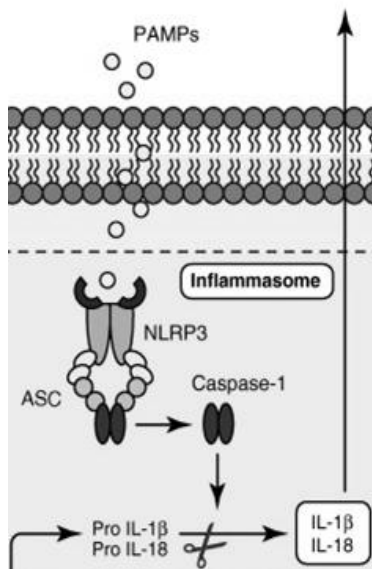


Abb. 1: Aufbau und Funktion des NLRP3-Inflammasoms

Modifiziert nach (Zaki, Lamkanfi et al. 2011).

Das NLRP3-Inflammasom wird durch *pathogen-associated molecular patterns*, also Strukturen, die nur in Pathogenen und nicht im Wirt vorkommen, aktiviert. Anschließend oligomerisiert NLRP3 (=NALP3), was die Anlagerung des ASC (*Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) Adapters möglich macht. Nach der Rekrutierung der Procaspase-1 wird diese autokatalytisch aktiviert und die Caspase-1 wandelt Prointerleukin-1 β in seine aktive Form um. Die Sekretion von Interleukin-1 β führt zu einer proinflammatorischen Systemreaktion.

Die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms konnte mit zahlreichen Krankheiten in Verbindung gebracht werden, unter anderem mit autoinflammatorischen Syndromen, Gicht und Typ 2 Diabetes (So, De Smedt et al. 2007; Shinkai, McCalmont et al. 2008; Zhou, Tardivel et al. 2010; Shaw, McDermott et al. 2011).

3) Die dritte NLR Gruppe funktioniert ohne die Aktivierung eines Inflammasoms. Ihre Wirkung entfalten Proteine wie NOD1 (*Nucleotide-binding and oligomerization domain 1*) oder NOD2 (*Nucleotide-binding and oligomerization domain 2*) über die Aktivierung von NF- κ B.

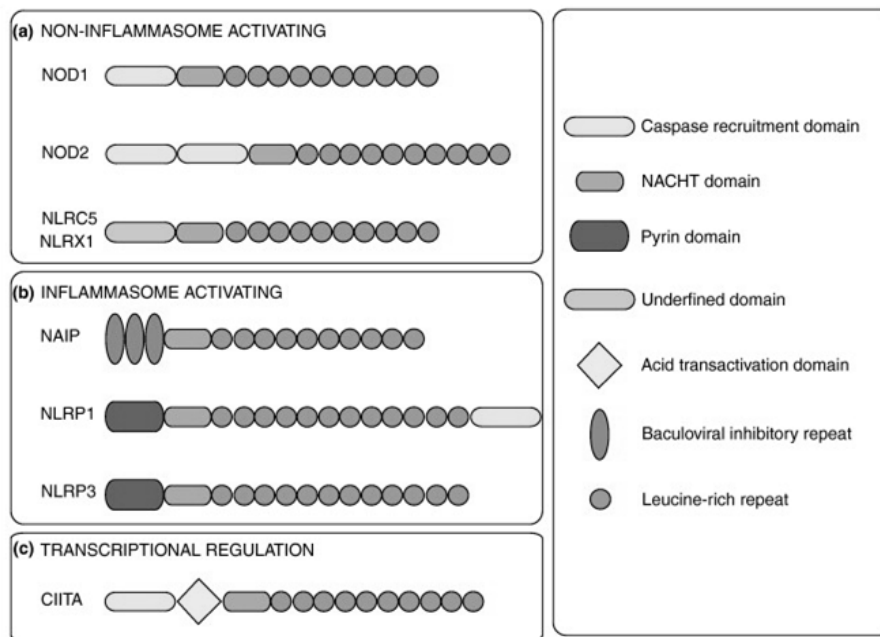


Abb. 2: Struktur der *Nod-like* Rezeptor Familie

Modifiziert nach (Magalhaes, Sorbara et al. 2010).

Die *Nod-like* Rezeptor (NLR) Familie kann in drei funktionelle Gruppen eingeteilt werden: Nicht Inflammasom aktivierend, Inflammasom aktivierend und Transkriptioneller Regulator.

Die Struktur aller NLRs ist dreigeteilt:

C-terminal liegt eine *leucine-rich repeat* (LRR) Domäne, zentral die *nucleotide-binding and oligomerization domain* (NOD), auch NACHT genannte Domäne, und N-terminal je nach Gruppe eine *caspase-recruitment* Domäne (CARD), eine Pyrin Domäne, eine *acid transactivation* Domäne oder eine *baculoviral inhibitory repeat* (BIR) Domäne.

Strukturell zeichnen sich alle *Nod-like* Rezeptoren durch einen ähnlichen dreigeteilten Aufbau aus. C-terminal befindet sich eine *leucine-rich repeat* (LRR) Domäne, die die Bindung an Liganden vermittelt. Im Anschluss folgt die *nucleotide-binding and oligomerization domain* (NOD), auch NACHT-Domäne genannt, die für die Selbst-Oligomerisierung sorgt und eine ATPase Aktivität hat (Strober, Murray et al. 2006). N-terminal befindet sich eine Domäne, die für Protein-Protein Interaktionen wichtig ist und nach der sich die Untergruppen einteilen (Ting, Lovering et al. 2008).

Bei den *Nod-like* Rezeptoren gab es lange eine große Namensvielfalt, die zu vielen Synonymen der einzelnen Proteine geführt hat. Im Jahre 2008 hat sich das *Human genome organization gene nomenclature committee* darauf geeinigt, den Namen des jeweiligen Gens

als NLR für *nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing* plus den Endbuchstaben als Abkürzung für die jeweilige N-terminale Domäne zusammengesetzten (Ting, Lovering et al. 2008). Insgesamt existieren fünf Unterfamilien:

Unterfamilie	N-terminale Domäne	Zentrale Domäne	C-terminale Domäne
NLRA (= CIITA)	<i>acidic domain</i>	-NOD-	LRR
NLRB (= NAIP)	BIR	-NOD-	LRR
NLRC (= NOD)	CARD	-NOD-	LRR
NLRP (= NALP)	PYRIN	-NOD-	LRR
NLRX	X	-NOD-	LRR

Tab. 2: Aktuelle Nomenklatur der *Nod-like* Rezeptor Familie

Modifiziert nach (Magalhaes, Sorbara et al. 2010).

Die Einteilung der *Nod-like* Rezeptor Familie nach ihrer Struktur, wie in der aktuellen Nomenklatur vorgenommen, führt zu fünf Unterfamilien. Die Struktur aller NLRs ist dreigeteilt. N-terminal liegt die Domäne, die zur jeweiligen Gruppe führt. Dieses ist entweder eine *acid transactivation* Domäne, eine *baculoviral inhibitory repeat* (BIR) Domäne, eine *caspase-recruitment* Domäne (CARD), eine Pyrin Domäne oder eine bisher nur als X bezeichnete Domäne. Die einheitliche Struktur zentral und c-terminal entscheidet über die Zugehörigkeit zur Gruppe der NLR-Familie.

1.5 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des murinen *Nlrc5* (*Nucleotide-binding domain and leucine rich repeat containing family, CARD domain containing 5 protein*), welches bis 2008 als *Nod27* bezeichnet wurde (Ting, Lovering et al. 2008).

Phylogenetische Analysen zeigten, dass humanes *NLRC5* eng verwandt mit *NOD1*, *NOD2* und *CIITA* ist, bei denen Mutationen zu einer erhöhten Suszeptibilität für entzündliche Erkrankungen wie z.B. Morbus Crohn führen (Magalhaes, Sorbara et al. 2010). Zu Beginn dieser Arbeit lagen in vitro Untersuchungen zu humanen *NLRC5* vor, aus denen hervor ging, dass *NLRC5* bei Menschen ein protektiver Faktor sowohl bei bakteriellen als auch viralen Infektionen sein könnte (Kuenzel, Till et al. 2010). Die abschließende Hypothese beschrieb eine Aktivierung von *NLRC5* durch Interferon- γ , welches STAT1 phosphoryliert und über den ISRE-GAS Signalweg antivirale Zielgene (Interferon- α , OAS-1 und PRKRIR) aktiviert (Kuenzel, Till et al. 2010).

Nun sollte durch die Untersuchung der *Nlrc5*-deletierten Maus in vivo die funktionelle Rolle von *Nlrc5* im Immunsystem weiter charakterisiert werden. Wie oben dargestellt, ist die strukturelle Ähnlichkeit mit anderen Molekülen der *Nod-like* Rezeptor Familie beschrieben, unklar ist jedoch welche Rolle *Nlrc5* in der Entzündungskaskade spielt. Daher sollte die Regulation von *Nlrc5* und die Bedeutung seiner Stimulation auf proinflammatorische Zytokine in vitro und in vivo in zwei verschiedenen Modellen untersucht werden. Zum einen

wurde ein Endotoxinschockversuch durchgeführt in dem Interleukin-1 vordergründig eine Rolle spielt. Zum anderen wurde das komplexe Modell der experimentellen Kolitis verwendet, welches sowohl eine akute Phase mit Wundheilungsmechanismen als auch eine chronische Phase mit Stimulation der adaptiven Immunantwort beinhaltet. Folgende Fragestellungen wurden in dieser Arbeit untersucht:

- Kann durch die genetische Defizienz für *Nlrc5* eine akute bzw. chronische Entzündungsreaktion in vivo modifiziert werden?
- Inwiefern beeinflusst die Deletion von *Nlrc5* die Zytokinantwort in der akuten und chronischen Entzündungsreaktion?
- Wie wirkt sich die strukturelle Ähnlichkeit von *Nlrc5*, mit den für ihre Assoziation zu bestimmten Krankheiten bekannten anderen *Nod-like* Rezeptoren, auf seine Bedeutung im angeborenen Immunsystem aus?

2 Material und Methoden

2.1 Material

Eine tabellarische Übersicht der verwendeten Medien, Chemikalien, Zusätze, Kits, Primer und Geräte findet sich im Anhang.

2.2 Mäuse

Alle verwendeten Mäuse wurden im Kleintierstall der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel untergebracht. Sie lebten in einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus und erhielten Standard-Trockenfutter sowie Wasser ad libitum. Für die Versuche wurde ein ausgewogenes Geschlechterverhältnis genommen.

Die Vergleichsgruppe der Wildtyp-Mäuse bestand aus C57BL/6J Mäusen.

Die Knock-out-Mäuse (B6.129Sv/Pas-Nlrc5^{tm1}) wurden von der Firma *Genoway* gezüchtet. Bei der Herstellung wurden 129SvPas embryonale Stammzellen ohne das Gen für *Nlrc5* in eine C57BL/6J Maus eingesetzt. Ein Genkonstrukt ohne *Nlrc5* wurde dabei mittels Elektroporation in eine embryonale Stammzelle einer 129SvPas Maus eingesetzt und der Klon dann in eine Blastozyste einer C57BL/6J Maus injiziert. Diese wurde dann einer scheinchwangeren Maus implantiert, welche ein chimäres Tier ausgetragen hat. Den Erfolg der Injektion konnte man an der Fellfarbe erkennen. Die Maus zeigte aufgrund des unterschiedlichen genetischen Hintergrundes ihrer Zellen ein geflecktes Muster. Dieses chimäre Tier wurde nun mit einer C57BL/6J Maus verpaart. Da das Braun der 129SvPas Linie dominant über das Schwarz der C57BL/6J ist, zeigte eine braune Fellfarbe der Nachkommen eine erfolgreiche Keimblatttransmission der embryonalen Stammzellen an. Der Knock-out wurde zusätzlich zwischendurch regelmäßig durch PCR und Southern Blot Analyse überprüft. Diese Tiere waren heterozygot für den Knock-out und wurden nun untereinander gekreuzt, so dass statistisch 25 % homozygote Tieren geboren wurden.

Nach zehn Inzucht Kreuzungen waren die *Nlrc5*-deletierten Mäuse fast komplett auf den C57BL/6J Stamm zurückgekreuzt und wurden in den Versuchen eingesetzt.

Um die Gendefizienz der Tiere zu überprüfen, wurde vor Beginn der Versuche genomische DNA isoliert und damit eine PCR durchgeführt.

2.3 Mausexperimente

Die Tierversuche wurden beim Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt u. ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein von Dr. med. vet. Olga Gavrilova eingereicht und genehmigt (gemäß § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes) Alle Experimente wurden gemäß den Tierschutzbestimmungen der CAU Kiel ausgeführt.

2.3.1 Mäusepräparation

Am Ende des jeweiligen Versuches wurden die Mäuse jeweils für Organentnahmen per Genickbruch getötet. Anschließend wurden die Mäuse desinfiziert und das Fell durch einen Mediansagittalschnitt eröffnet. Der Thorax wurde parasternal eröffnet und Blut mittels einer 22 Gauche Braunüle und einer 5 ml Spritze aus dem Herzen genommen und in ein Tube überführt. Das Blut wurde anschließend im Labor der Universitätsklinik Kiel analysiert. Vor der Blutentnahme erhielten die Mäuse wie gewohnt Standard-Trockenfutter ad libitum.

Für die Entnahme von Darmproben wurde das Abdomen eröffnet und der jeweilige Darmanteil entnommen. Stuhlreste wurden durch eine Spülung mit PBS entfernt und der Darm anschließend längsseits aufgeschnitten. Die Darmanteile wurden einzeln in Tubes überführt, wobei das Kolon in proximales, mediales und distales Kolon unterteilt worden ist. Dann wurden die Organe sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Die Milz wurde gleich nach der Entnahme weiterverarbeitet. Für die Knochenmarkzellisolation wurden die Beine eröffnet und der Femur aus der Hüfte disloziert. So konnten Femur, Tibia und Fibula zusammenhängend entnommen werden.

Es folgte die weitere Verarbeitung je nach speziellem Protokoll um eine Lagerung zu ermöglichen.

2.3.2 Endotoxinschock

Das Endotoxinschock-Modell ist ein einfaches Modell um eine Sepsis mit gram-negativen bakteriellen Wandbestandteilen nachzustellen. Durch die LPS Gabe intraperitoneal wurde bei den Mäusen ein Schockzustand verursacht, der schließlich zum Tod führte.

Für den Versuch wurde den Mäusen einmalig jeweils eine Mischung aus LPS (0,05 mg/Maus), D-Galaktosamin (20 mg) und PBS (90 µl) intraperitoneal verabreicht. D-Galaktosamin sensitiviert die Leber für die Wirkung des LPS (Freudenberg, Keppler et al. 1986).

Die Tiere standen anschließend unter ständiger Beobachtung. Wenn der Belastungsgrad für die Tiere zu groß wurde („raues Fell“, apathisches Verhalten, Nahrungsverweigerung,

Gewichtsverlust $> 20\%$), wurden die Tiere euthanasiert. Die Todeszeitpunkte wurden notiert um hier etwaige Unterschiede festhalten zu können.

In zeitlich festgelegtem Abstand (vor der intraperitonealen Injektion, nach drei, vier und fünf Stunden) wurden einzelne Tiere durch zervikale Dislokation getötet und verschiedene Organe und Blut für ELISAs und RNA-Isolierung entnommen. Hierbei wurde besonderer Wert auf die Zytokinspiegel gelegt um Unterschiede in der Reaktion der Mausorganismen zwischen der Nlrc5-deletierten Maus und der Wildtyp-Maus festzustellen.

Für den Versuch wurden jeweils zwölf Wildtyp- und Nlrc5-deletierte Mäuse genommen und ein ausgewogenes Geschlechterverhältnis eingehalten. Jeweils vier dieser Mäuse wurden für die Untersuchung der Zytokinspiegel verwendet, acht zur Beobachtung der Überlebensrate und des klinischen Verlaufs.

2.3.3 DSS-induzierte Kolitis

Um festzustellen ob die Deletion von Nlrc5 zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Angriffen auf die epitheliale Barriere im Darmlumen führt, wurde eine Kolitis durch die Gabe von Natrium-Dextransulfat (DSS) induziert. In dieser Arbeit wurde eine niedrige Dosierung von DSS über einen längeren Zeitraum gewählt, um die chronische Entzündung des Menschen nachzubilden.

Dafür wurde den Mäusen zyklisch eine zweiprozentige DSS-Lösung über das Trinkwasser verabreicht (modifiziert nach Siegmund et al. (Siegmund, Lehr et al. 2002)). In insgesamt drei Zyklen wurde den Mäusen jeweils fünf Tage eine DSS-Lösung gegeben, gefolgt von fünf Tagen reinem Trinkwasser ad libitum. Die Kontrollgruppe erhielt zu jeglicher Zeit normales Trinkwasser. Während des Versuches wurden die Tiere alle zwei Tage gewogen, die Stuhlkonsistenz überprüft und ein Hämoccult-Test durchgeführt.

Nach 30 Tagen wurden beide Gruppen koloskopiert und anschließend per zervikaler Dislokation getötet und Organe für eine Zytokinbestimmung per ELISA und Real-Time-PCR entnommen. Als Abbruchkriterien für den Tierversuch wurden ein relativer Gewichtsverlust von $> 25\%$ und/oder ein stark verändertes Allgemeinverhalten festgelegt.

Die Kontrollgruppe bestand aus jeweils acht Wildtyp- und Nlrc5-deletierten Mäusen, die Versuchsgruppe aus neun Wildtyp- und siebzehn Nlrc5-deletierten Mäusen.

2.3.3.1 Disease Activity Index

In der Humanmedizin gibt es zahlreiche Indizes, die dazu dienen die Schwere einer intestinalen mukosalen Entzündung semiquantitativ zu erfassen. Daraus wurde ein adaptierter

Mäusescore entwickelt. Hierbei wurde die Gewichtsabnahme, die Stuhlkonsistenz und der rektale Blutverlust zwischen 0 und 4 Punkten bewertet und addiert. Es konnten also Werte zwischen 0 (gesund) und 12 (schwerster Krankheitsverlauf) erreicht werden. In unserem Versuch wurde der Index darüber hinaus dabei eingesetzt, die Mäuse bezüglich der Schwere ihrer Erkrankung besser vergleichen zu können.

Tab. 3: Disease Activity Index (DAI)
(Modifiziert nach Siegmund, Rieder et al. 2001)

Punkte	Gewichtabnahme (%)	Stuhlkonsistenz	Rektale Blutung
4	> 20	Klebt am Anus	Positiv
3	11-20		
2	6-10	Schmierig	Hämoccult positiv
1	1-6		
0	0	Normal geformte Pellets	Negativ

2.3.3.2 Endoskopie

Zur genauen Beschreibung des Phänotyps wurden die Mäuse am Ende des Versuches koloskopiert, um die makroskopischen Veränderungen beurteilen zu können.

Zur Vorbereitung wurde eine intraperitoneale Narkose mit Sedierung und Analgesie (100 mg/kg Maus Ketamin plus 16 mg/kg Maus Xylazin) vorgenommen. Der Anus wurde befeuchtet und anschließend das Koloskop (SCB Xenon 175, Karl Storz, Tuttlingen) eingeführt. Der Darm wurde durch Kohlenstoffdioxid Insufflation dilatiert, um die Sichtbarkeit zu verbessern. Unter Zurückziehen der Optik wurde ein Video gedreht und anschließend ausgewertet und exemplarische Einzelbilder zur Dokumentation ausgewählt. Zur Objektivierung wurde ein für Mäuse modifizierter endoskopischer Score verwendet. Der MEICS-Score (*murine endoscopic score of colitis severity*) beinhaltet folgende Parameter: das Gefäßmuster, die Stuhlkonsistenz, die Dicke der Kolonmukosa, Vorhandensein von Fibrinbelägen und die Oberflächengranularität. Die Mäuse erhalten einen Punktwert zwischen 0 und 15, wobei 0 für gesunde Mäuse steht und 15 für eine schwerwiegende Kolitis (Becker, Fantini et al. 2005).

Tab. 4: Endoskopischer Score
(Becker, Fantini et al. 2005)

Punkte	Gefäß-muster	Stuhl-konsistenz	Verdickung der Kolonmukosa	Fibrin-beläge	Oberflächen-granularität
3	Blutungen	Flüssig	Intransparent	Extrem	Extrem
2	Nicht sichtbar	Ungeformt	Stark	Stark	Stark
1	Verstrichen	Leicht geformt	Moderat	Moderat	Moderat
0	Normal	Fest	Transparent	Keine	Keine

2.4 Isolierung von Mausgewebe/-zellen

2.4.1 DNA-Isolierung aus Mäuseschwänzen

Um vor Beginn der Versuche den Knock-out von *Nlrc5* in den Mäusen zu überprüfen, wurde eine DNA-Isolierung aus den Schwänzen der Mäuse durchgeführt. Der Nachweis an sich wurde mit einer Reverse Transkriptase-PCR durchgeführt.

Die DNA-Isolierung wurde mit leichten Modifikationen nach Herstellerangaben mit dem *DNeasy Blood and Tissue-Kit* von Qiagen durchgeführt.

Dafür wurde 180 µl ATL-Puffer in jedes Tube gegeben und mit 20 µl Proteinase K in einem Vortexer vermischt. Anschließend wurde das Gewebe für ein bis drei Stunden bei 56 °C inkubiert, bis sich das Gewebe gelöst hatte. Pro Tube wurde dann ein Gemisch aus 200 µl AL Puffer plus 200 µl Ethanol (100 %) hineingegeben und das Ganze gründlich gemischt. Der Mix wurde auf die Säule des Kits pipettiert und die Mischung eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule auf ein neues Tube gesetzt. Nach Zugabe von 500 µl AW1 Puffer wurde der Mix eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dieser Schritt wurde mit AW2 Puffer und verstärkter Zentrifugation (drei Minuten bei 13200 rpm) noch einmal durchgeführt. Durch Zugabe von 100 µl AE-Puffer pro Tube wurde die DNA von der Säule gelöst und nach fünfminütiger Inkubation und fünfminütiger Zentrifugation bei 8000 rpm konnte die Konzentration der DNA gemessen werden.

2.4.2 Bone marrow derived macrophages (BMDMs)

Makrophagen sind ein essentieller Bestandteil der Immunantwort. Um die Makrophagen der *Nlrc5*-deletierten Mäuse spezifisch mit denen der Wildtyp-Mäuse vergleichen zu können, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit die Methode zur Isolierung der Makrophagen aus dem Knochenmark der Mäuse mehrfach modifiziert und verbessert.

Um die Anzahl der gewonnenen Makrophagen zu erhöhen, wurden die Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in reife Makrophagen differenziert. Dargestellt ist hier das endgültige Protokoll für die Gewinnung von *Bone marrow derived macrophages* (BMDMs).

Femur und Tibia der Maus wurden in toto entfernt und anschließend weitgehend von Gewebe befreit. Die Knochen wurden danach sofort in eiskaltes RPMI-1640 Medium auf Eis gegeben. Unter der Sterilbank sind die Knochen unmittelbar an den Gelenken abgeschnitten worden und anschließend das Knochenmark mit einer 30 Gauche Kanüle mit kaltem Makrophagenmedium, welches Penicillin, Streptomycin und Amphotericin beinhaltet, aus dem Knochen gespült worden. Der Durchfluss wurde in einem sterilen 50 ml Tube aufgefangen. Jedes Tube wurde auf 50 ml mit Makrophagenmedium aufgefüllt und 20 ng/ml M-CSF hinzugegeben. Jeweils 10 ml wurden durch ein Zellsieb (Cell Strainer 70 μm , BD Falcon) auf einer Petrischale ausgesät. Hierbei ist zu beachten unbeschichtete Schalen zu nehmen, da Makrophagen besonders adhärent sind und ansonsten nicht mehr abgelöst werden können.

Dann wurden die Zellen im Brutschrank gelagert. Der Zustand der Zellen wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und nach vier bis fünf Tagen wurde das Medium gewechselt. Da zu diesem Zeitpunkt noch nicht alle Zellen adhärent waren, wurde das Medium abgenommen und die Zellen bei 300 g zehn Minuten runter zentrifugiert. Die zentrifugierten Zellen wurden in jeweils 5 ml Makrophagenmedium plus 20 ng/ μl M-CSF resuspendiert und auf die jeweiligen Schalen gegeben.

Nach sieben bis zehn Tagen wurden die Zellen für die Stimulation umgesetzt. Dafür wurden die Zellen einmal mit warmem PBS gewaschen und dann für 20 Minuten mit eiskaltem PBS beschichtet. Anschließend wurden die Zellen mit dem Zellschaber zusammengekratzt, in einem Falcon gesammelt und die Schalen sicherheitshalber noch einmal mit kaltem PBS ausgespült, damit keine Zellen verloren gehen. Der Falcon wurde bei 300 g für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgegeben und die Zellen in ca. 10 ml Makrophagenmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt und im entsprechenden Format ausgesät (800.000 Zellen/well bei 2 ml Medienvolumen). Nach zwei Tagen Erholungszeit folgte die Stimulation.

Darauf folgend wurde der Überstand zur Zytokinbestimmung abgenommen und weggefroren. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, abgeschabt und das Pellet bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

2.4.3 Lunge

Um einen Überblick über die Reaktion der Lunge zu bekommen wurde die Lunge der Maus entnommen und anschließend als Ganzes in ein Medium aus RPMI-1640 + 10 % FBS + 1 % Penicillin/Streptomycin auf Eis gegeben. Für eine Organkultur wurde die Lunge dann in gleichmäßige Stücke geschnitten und auf einer 12 Well Platte verteilt. Dann folgte die Stimulation.

2.4.4 Stimulation

Vor den Stimulationen mussten die *Bone marrow derived macrophages* erst gezählt werden, um eine für die Zellen gute Konzentration pro well herstellen zu können.

Die Vitalität der Zellen wurde durch die Zugabe von 2 µl Trypanblau in 10 µl Zellsuspension bestimmt. Da Trypanblau nur von toten Zellen aufgrund der veränderten Zellmembranpermeabilität aufgenommen wird, färben sich nur diese blau an.

Zum Messen der Zelldichte wurden die Zellen dann in eine Neubauerzählkammer pipettiert. Die Auszählung erfolgt unter einem Mikroskop, wobei die Gesamtzahl der Zellen und die Anzahl vitaler Zellen im Besonderen bestimmt wurde. Die Berechnung der Zelldichte erfolgte unter Berücksichtigung der Anzahl der ausgezählten Quadrate und der Verdünnungsfaktoren. Für die Bestimmung der Zelldichte der BMDMs wurde außerdem das Cellometer TM Auto T4 von Nexcelom Bioscience benutzt, um durch die automatisierte Zellzählung eine schnellere Verarbeitung der Zellen garantieren zu können.

Die Stimulationen wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Reinraum-Werkbank durchgeführt. Dafür wurden die Zellen bzw. das Gewebe zuerst in passenden Well-Platten ausgesät.

Tab. 5: Verwendete Zellkulturformate

Experiment	Zellkulturformat	Zellzahl/well	Medienvolumen
BMDMs	6 well Platte	800.000	2 ml/well
Organkultur Lunge	12 well Platte		2 ml/well

Anschließend wurde mit den folgenden Chemikalien und Konzentrationen stimuliert.

Tab. 6: Verwendete Chemikalien und Konzentrationen

Stimulans	IFN- γ	LPS
Konzentration	10 ng/ml	250 ng/ml

Es folgte die weitere Verarbeitung nach speziellem Protokoll um eine Lagerung zu ermöglichen.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 RNA-Isolation aus Gewebe

Die RNA-Isolierung wurde mit dem *RNeasy Mini Kit* von Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die entnommen Organe wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bis zur Verarbeitung bei -80 °C gelagert. Vor der RNA-Isolierung wurden alle Arbeitsmaterialien durch *RNAzip* von RNasen befreit.

Zur Isolierung wurden die Organe als Erstes mit einem Mörser im gefrorenen Zustand zerkleinert und die Bruchstücke anschließend in 600 μl RLT mit β -Mercaptoethanol (10 μl β -ME/ml RLT) lysiert. Zur weiteren Aufspaltung wurde eine Homogenisierung im *QIAShredder* angeschlossen (Zentrifugation 2 Minuten bei 13000 rpm).

Damit die RNA an die *RNeasy spin column* (Säule) binden konnte, mussten 600 μl Ethanol zugegeben werden. Nach 30 Sekunden Zentrifugation bei 10000 rpm wurde der Durchfluss verworfen. Die gebundene RNA wurde nun mit 350 μl RW1 Puffer gewaschen (30 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugieren) und das Eluat wieder verworfen. Es folgte eine zweifache Inkubation mit DNaseI (30 Minuten, 10 μl DNaseI mit 70 μl RDD-Puffer) um jegliche DNA zu entfernen. Die Säule wurde nun einmal mit 350 μl RW1-Puffer und zweimal mit 500 μl RPE gewaschen (jeweils 30 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugieren). Um Kontamination zu vermeiden wurde ein neues Tube für die Säule benutzt und durch eine einminütige Zentrifugation mit 12000 rpm wurden auch Restbestände von Ethanol entfernt.

Zum Schluss wurde die RNA durch RNase freies Wasser (50 μl) in einem neuen sterilen Tube von der Säule gelöst (5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren, 1 Minute bei 12000 rpm zentrifugieren).

Im UV-Photometer (NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer, PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) wurde dann bei 260 nm gemessen, wie viel RNA gewonnen werden konnte. Durch eine PCR mit GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) als Primer wurde überprüft, dass die Proben nicht mit DNA kontaminiert waren. Anschließend wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

2.5.2 cDNA-Synthese

Mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase kann aus einem RNA Template komplementäre DNA (cDNA) hergestellt werden. Da die *messenger* RNA in eukaryotischen Zellen polyadenyliert ist, kann ein Oligo-Desoxy-Thymidin Primer hybridisieren. Die Reverse Transkriptase kann dann eine doppelsträngige DNA synthetisieren.

Für die cDNA-Synthese wurde das *Advantage® RT-for-PCR Kit* (Clontech, Heidelberg) verwendet, welches neben einer retroviralen MMLV (*moloney-murine leukemia virus*) Transkriptase alle weiteren benötigten Komponenten enthält.

Zuerst wurde genau berechnet, wie viel Volumen an RNA-Template benötigt wird, um die gewünschte Konzentration (durchschnittlich 1 µg) zu erreichen. Das Pipettieren erfolgte auf Eis. Die RNA wurde mit dem Primer und Wasser zwei Minuten bei 70 °C inkubiert und anschließend langsam abgekühlt, damit sich der Primer anlagern kann. Die übrigen Komponenten wurden als Master Mix zusammengegeben und gut gemischt. Dann wurden je Template 3,25 µl Master Mix zugegeben und anschließend inkubiert.

Tab. 7: Reaktionsansatz für eine cDNA-Synthese

Komponente	Menge (µl)	Inkubation	
RNA	1 µg	2 min	70 °C
Oligo (dT) Primer	1 µl		
DEPC-Aqua	ad 12,5		

5-fach Reaktionspuffer	2	60 min	42 °C
dNTPs	0,5	5 min	95 °C
RNase Inhibitor	0,25	Pause	10 °C
MMLV (Reverse Transkriptase)	0,5		
Gesamtvolumen	15,75		

Anschließend wurde die cDNA durch Zugabe von 90 µl mit DEPC behandeltem Wasser verdünnt und bis zur weiteren Nutzung bei -20 °C gelagert.

2.5.3 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Amplifizierung der DNA-Fragmente erfolgte durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung der DNA-Polymerase von Qiagen und der mitgelieferten Komponenten im Gradienten *Thermocycler* (Biometra, Göttingen).

Die benötigten Komponenten wurden als Master Mix zusammengemischt, um bei allen Proben die gleichen Bedingungen zu schaffen.

Das PCR-Programm begann mit einem Denaturierungsschritt, in dem bei 96 °C die beiden Stränge der Template-DNA getrennt wurden. Anschließend wurde im Annealingschritt die Temperatur auf die für den jeweiligen Primer beste Hybridisierungstemperatur gesenkt. Danach wurde die Temperatur auf 72 °C, dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase erhöht. Im sogenannten Elongationsschritt wurde so der Primerstrang verlängert bis wieder eine doppelsträngige DNA vorlag. Für die semiquantitative Analyse wurde darauf geachtet, dass die Anzahl der Zyklen so niedrig gewählt wurde, dass sie im ungesättigten Bereich lag. Die verwendeten Oligonukleotide und Hybridisierungstemperaturen finden sich im Anhang.

Tab. 8: Reaktionsansatz und PCR-Programm einer RT-PCR

Komponente	Menge (µl)	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Zyklusanzahl
DNA	0,2	96	4	1
RNase freies Aqua	10,3	96	0:30	34 – 35
10x QIAGEN Buffer	2	Siehe Primer-Tab.	0:30	
Q-Solution	4	72	0:30 - 1	
dNTP Mix	0,5	72	4	1
Primer verdünnt 1:10	1	10	Pause	1
Qiagen Taq (Reverse Transkriptase)	0,2			

2.5.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wurden einprozentige Agarose-Gele in TAE-Puffer verwendet, die aufgekocht und anschließend mit 1,5 µl des Fluoreszenzfarbstoffes *SYBR® Safe* versetzt wurden. Nach dem Aushärten wurde das Gel mit TAE-Puffer überschichtet und 15 µl (bei GAPDH als Primer) bzw. 20 µl (bei *Nlrc5* als Primer) des Gemisches in die Geltasche gegeben. Als Standard wurden 5 µl *SmartLadder* verwendet. Zur Auftrennung wurde eine elektrische Spannung von 100 Volt für 30-45 Minuten angelegt. Abschließend wurden die angefärbten DNA-Fragmente unter einem UV-Spektrophotometer sichtbar gemacht und fotografiert.

Eine semiquantitative densitometrische Auswertung erfolgte mittels der Software *ImageJ* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>, National Institutes of Health, USA) und Microsoft Excel.

2.5.5 Real-Time PCR

Um die gewonnene DNA bei der PCR genau zu quantifizieren wurde das Prinzip des *TaqMan*® *PCR Assay* genutzt.

Es basiert auf der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq Polymerase. Dabei wird eine spezielle Sonde eingesetzt, deren Oligonukleotid am 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff und am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff markiert ist.

Normalerweise würde die Fluoreszenz Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge von 488 nm zur Fluoreszenz angeregt werden. Durch die räumliche Nähe zum Quencher wird die Fluoreszenz jedoch durch einen Fluoreszenz-Energietransfer unterdrückt.

Die Sonde hybridisiert zwischen den beiden Primern für die PCR. Durch die 5'-3'-Exonuklease Aktivität der Taq Polymerase wird die Sonde vom 5'-Ende von der sich aufbauenden Zielsequenz verdrängt und dadurch der Reporter vom Quencher getrennt. Ab jetzt kann die Fluoreszenz des Reporter-Moleküls detektiert werden. Die Zunahme der Intensität der Fluoreszenz ist proportional zur Entstehung von PCR-Produkten, wodurch eine quantitative Bestimmung erfolgen kann.

2.5.6 ELISA

Der *enzyme linked immunosorbent assay* wurde zum Nachweis von sezernierten Zytokinen verwendet. Für diese Arbeit wurde der Sandwich ELISA eingesetzt, das heißt das zu messende Protein wird durch zwei Antikörper eingeschlossen. Danach folgt die Detektion durch einen Peroxidase-gekoppelten Antikörper, die die Umsetzung einer Farbvorstufe in einen Farbstoff katalysiert. Da der Farbumschlag proportional zur Konzentration der Peroxidase ist, welche wiederum die Menge des Antigens widerspiegelt, kann anschließend mittels einer Eichkurve die Konzentration des Antigens berechnet werden.

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Als Erstes wurde die 96 well Platte mit einem Antikörper gegen das gesuchte Antigen, hier also einem Zytokin, beschichtet (auf Englisch: *coating*) und anschließend über Nacht inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS-Tween wurden die freien unspezifischen Protein-Bindungsstellen auf der Platte durch Zugabe von 200 µl Assay Puffer geblockt. Nach der dafür notwendigen einstündigen Inkubation wurden 100 µl der Überstände bzw. Serumproben aufgetragen. Um später die Konzentrationen berechnen zu können wurde zusätzlich ein definierter Standard benutzt. Dann wurden 50 µl des Detektionsantikörpers aufgetragen und die Platte zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurde die *Streptavidin-*

Horseradish-Peroxidase zugegeben, die anschließend mit dem 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) Substrat eine Farbreaktion bewirkte.

Die Reaktion erfolgte für ca. 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur. Die Absorption des Farbstoffs wurde bei 490 nm im GeniosPro-Plattenreader (Tecan Trading AG, Schweiz) bestimmt. Mit Hilfe einer Eichkurve wurde anschließend die Konzentration des Zytokins berechnet. Die untersuchten Zytokine sind im Anhang zu finden.

2.6 Histologische Methoden

2.6.1 Vorbereitung

Zur Organentnahme wurde die Maus per zervikaler Dislokation getötet und nach Desinfektion mit Ethanol eröffnet. Die Organe wurden entnommen und in Paraformaldehyd in PBS 4 % fixiert. Formalaldehyd führt zur Ausbildung von Methylengruppen zwischen den freien Aminogruppen der Proteine. Durch diese Vernetzung wird die Gewebestruktur besser erhalten.

Anschließend folgte die Einbettung in Paraffin. Dafür wurden die Organe in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Xylol gelagert, um den Alkohol zu entfernen. Danach wurden die Präparate in speziellen Formen mit Paraffin übergossen und konnten nach dem Erkalten mit dem Mikrotom in 4,5 µm dicke Scheiben geschnitten werden.

Vor dem Färben mussten die Proben wieder vom Paraffin befreit werden. Dieses erfolgte durch ein Bad in Xylol (3 x 10 Minuten). Durch die anschließende absteigende Alkoholreihe (5 Minuten jeweils 98 %, 96 %, 90 %, 80 % und 70 % Isopropanol) wurden die Schnitte dann wieder ins wässrige Milieu überführt, um gefärbt werden zu können.

2.6.2 HE-Färbung

Um einen Überblick über die Gewebestruktur zu bekommen und entzündliche Veränderungen zu erkennen, wurde die HE-Färbung für die Gewebeschnitte genutzt. Hierbei werden die Zellkerne durch einen basischen Farbstoff (Hämatoxylin) blau und das Zytoplasma durch einen sauren Farbstoff (Eosin) rot gefärbt.

Die Objektträger mit den Schnitten wurden dafür 5 Minuten in Hämalaun nach Mayer (1 g Hämatoxylin + 0,2 g Natriumjodat + 59 g Kalialaun in 1 l Aqua dest. lösen, dazu noch 50 g Chloralhydrat + 1 g Zitronensäure, filtrieren) gebadet und dann 15 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Dann folgte die Färbung in 0,5 % Eosin für 4,5 Minuten. Nach Spülung mit Aqua dest. wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils 5

Sekunden 70 %, 80 % und 90 % Isopropanol, dann 2 x 5 Minuten 100 % Isopropanol) entwässert. Es folgten 3 Minuten Hylol als organisches Lösungsmittel und das Eindecken in Eukitt mit einem Deckglas.

2.7 Statistik

Die Daten wurden mit dem Programm GraphPad Prism, GraphPas Software, La Jolla, USA ausgewertet. Anschließend wurde auch dieses Programm zur Erstellung der Graphen verwendet.

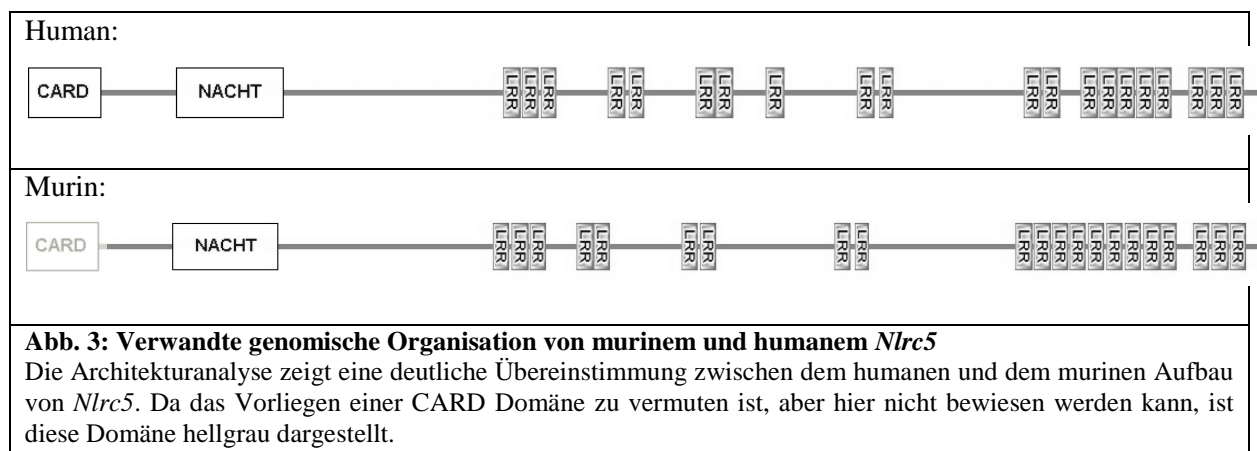
3 Ergebnisse

3.1 Nlrc5

3.1.1 Genomische Organisation von murinem *Nlrc5*

Für die Untersuchung der genomischen Organisation von *Nlrc5* bei der Maus wurde das frei zugängliche Programm Smart verwendet (<http://smart.embl-heidelberg.de/>).

Die genomische Organisation zeigte deutliche Übereinstimmungen zwischen dem humanen und dem murinen Aufbau von *Nlrc5* (Abbildung 3). Das Vorliegen einer CARD Domäne an der gleichen Stelle ist stark zu vermuten, konnte aber nicht bewiesen werden. Tabelle 9 stellt einen Vergleich auf Gen- und Proteinebene dar und beschreibt die leichten Unterschiede.



Tab. 9: Vergleich von murinen und humanen *Nlrc5* auf Gen- und Proteinebene

	Maus	Mensch
Lage	8qC5	16q12.3
Größe	54kbp	96kbp
Exons	49	39
Translationsstart	1. Exon	3. Exon
Stoppcodon	49. Exon	39. Exon
Anzahl Aminosäuren	1915	1866
Masse	212 kDa	205 kDa
CARD	?	1-91
NACHT	AS 223-386	220-383
LRR	Ab Aminosäure 716	Ab Aminosäure 713
Anzahl LRRs	21, 6 Blöcke mit 2-9 LRRs	20, 5 Blöcke mit 2-5 LRRs

3.1.2 Expressionsprofil von *Nlrc5*

Vor Beginn der oben beschriebenen Versuche wurde eine Expressionsanalyse von murinem *Nlrc5* durchgeführt, um über das Vorkommen dieses Gens Hinweise auf dessen Bedeutung zu gewinnen.

Für die Expressionsanalyse wurde ein kommerzielles Kit verwendet. Die Expression von *Nlrc5* wurde mit der Reverse Transkriptase-PCR im Verhältnis zur GAPDH bestimmt.

Es zeigte sich eine relativ verstärkte Expression von *Nlrc5* in der Lunge (Abbildung 4).

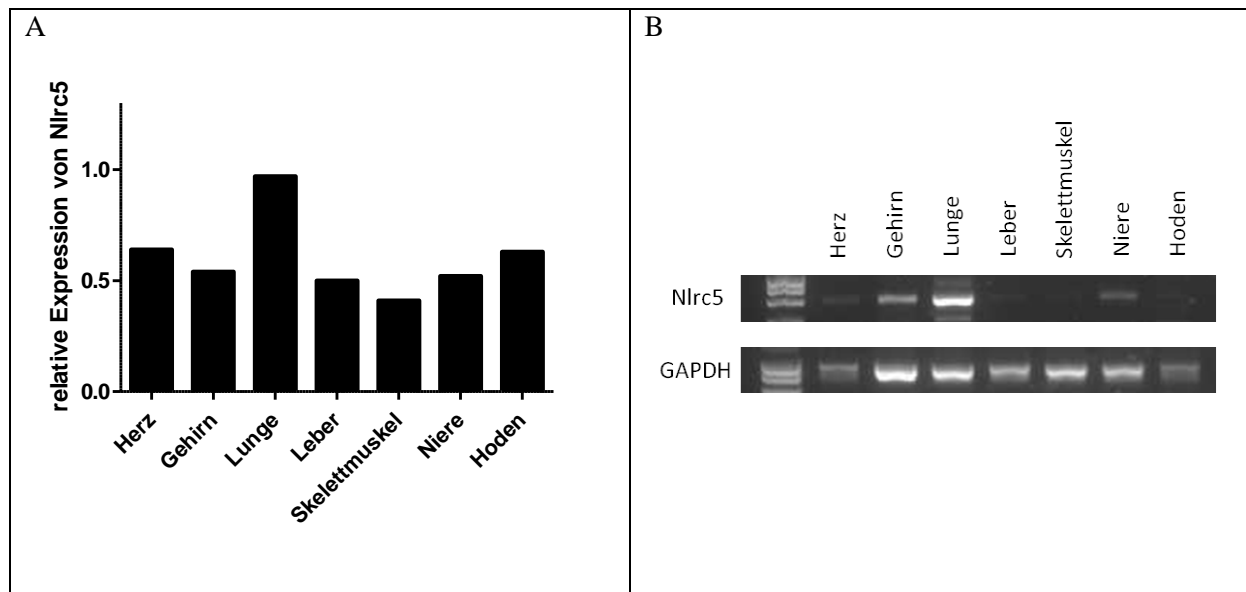


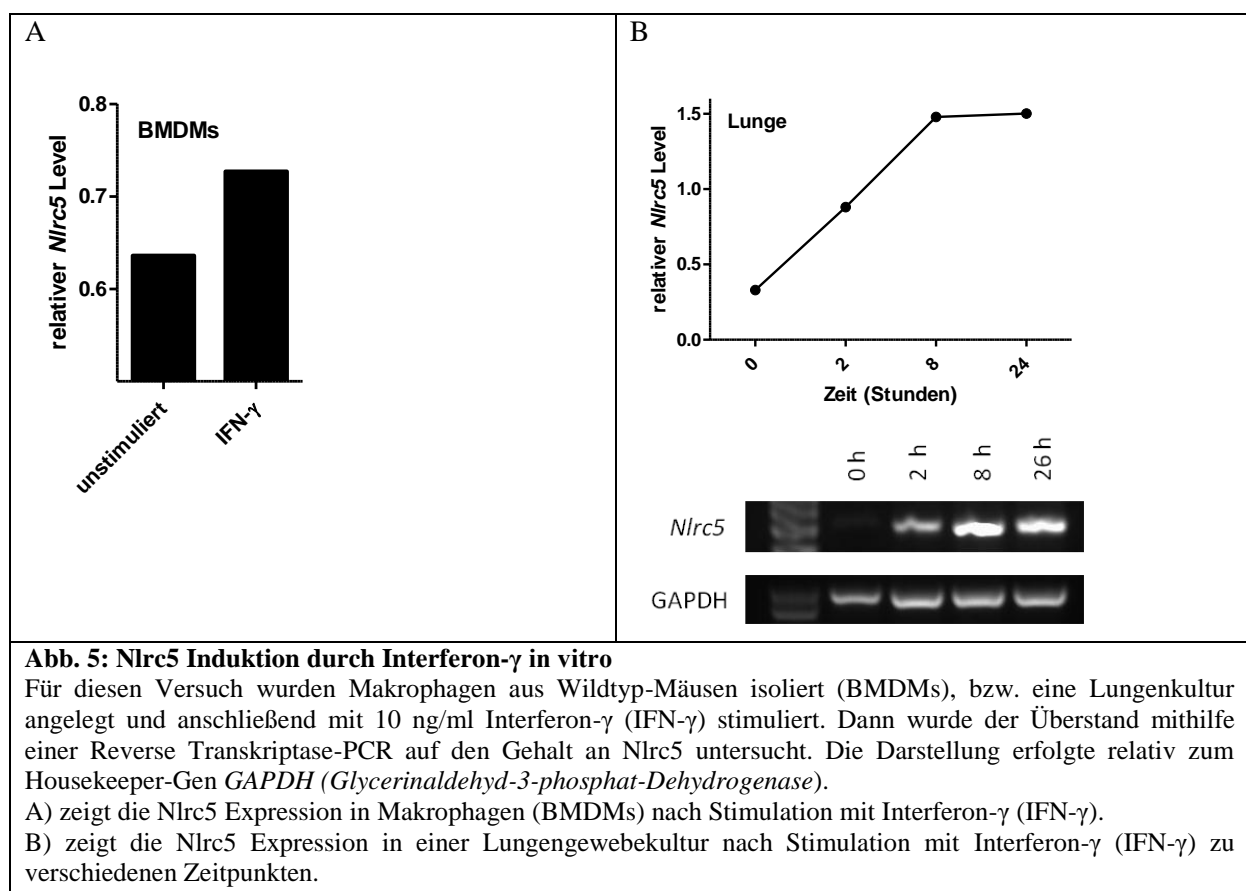
Abb. 4: Vermehrte Expression von *Nlrc5* in der Lunge

A: zeigt die relative Expression von *Nlrc5* in Wildtyp-Tieren mittels Reverse Transkriptase-PCR. Für die Expressionsanalyse wurde ein kommerzielles Kit verwendet. Dargestellt sind verschiedene Gewebe in Relation zur *GAPDH* (*Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase*). Die Expression ist in der Lunge erhöht.

B: zeigt das Agarose Gel zu A.

3.1.3 Regulation von *Nlrc5* durch Interferon- γ

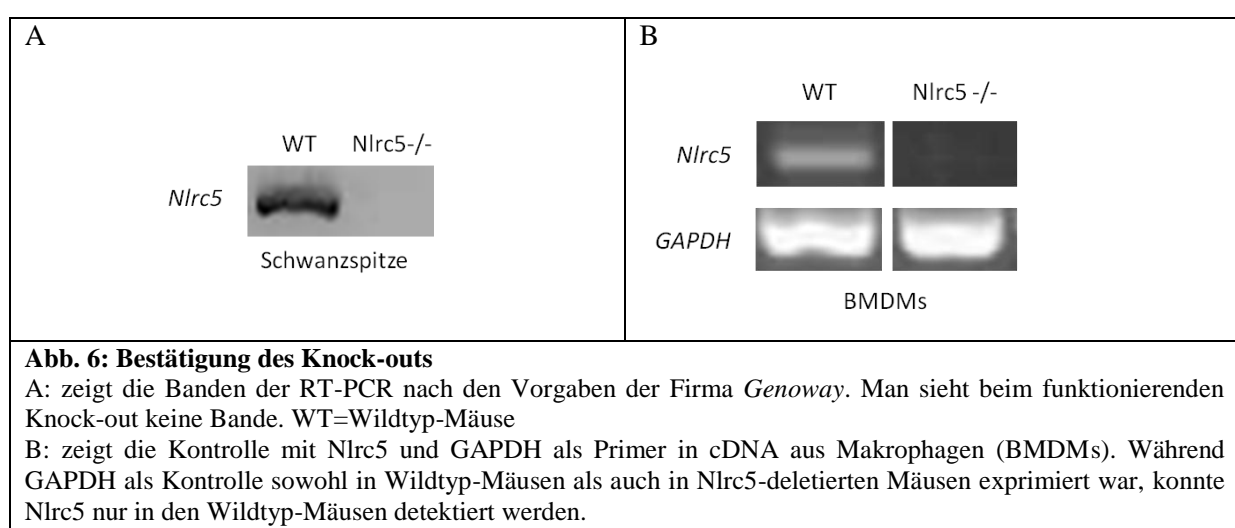
Interferon- γ ist ein wesentliches Zytokin bei der Stimulation der adaptiven Immunantwort nach Makrophagenaktivierung. Für humanes NLRC5 wurden im Rahmen der Charakterisierung dieses Gens in vitro Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation durchgeführt. Hier konnte ein selektiver Effekt von Interferon- γ auf die Promoter-Transaktivierung gezeigt werden (Kuenzel, Till et al. 2010). Diese Untersuchungsergebnisse konnten hier ex vivo bestätigt werden. Hierfür wurden Makrophagen (BMDMs) und Lungengewebe von Wildtyp-Mäusen entnommen und anschließend mit Interferon- γ stimuliert. Es zeigte sich ein Anstieg von *Nlrc5* mittels Reverse Transkriptase-PCR (Abbildung 5).



3.2 Bestätigung des Knock-outs

Zur Kontrolle des Knock-outs wurde vor Beginn der Versuche eine Reverse Transkriptase-PCR aus genomischer DNA nach den Vorgaben der Firma *Genoway* durchgeführt. Abbildung 6 zeigt, dass in den Mäusen kein *Nlrc5* mehr zu amplifizieren war.

Zusätzlich wurde der Knock-out in Makrophagen mithilfe komplementärer DNA kontrolliert. Als Kontrolle diente der Primer für die konstant exprimierte *GAPDH* (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase). Abbildung 6 zeigt, dass die *GAPDH* sowohl in Wildtyp-Mäusen als auch in *Nlrc5*-deletierten Mäusen exprimiert war. *Nlrc5* war nur in den Makrophagen der Wildtyp-Mäuse zu detektieren.



3.3 Basale Phänotypisierung der *Nlrc5*-deletierten Maus

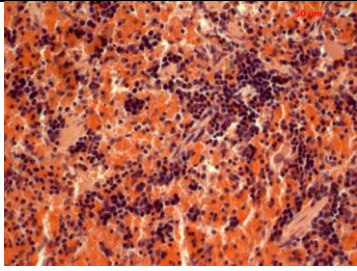
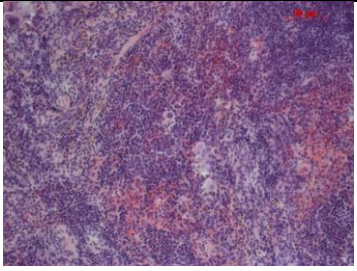
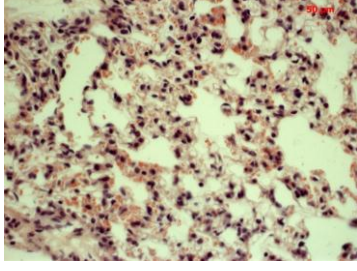
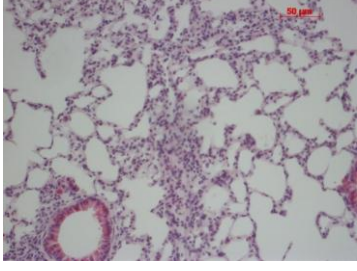
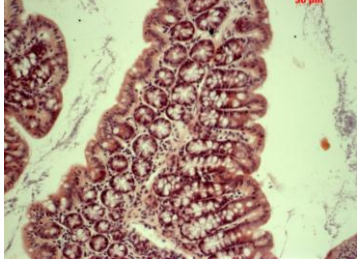
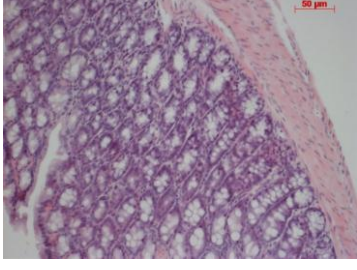
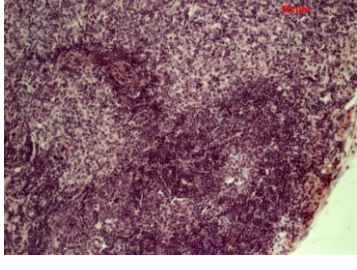
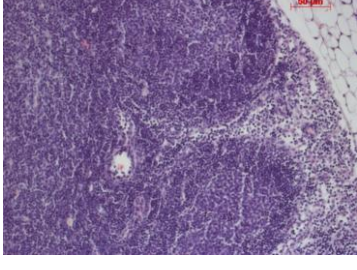
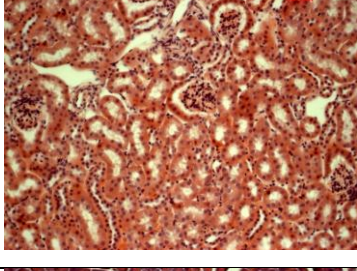
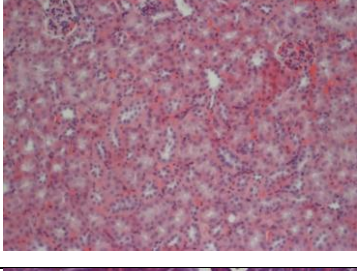
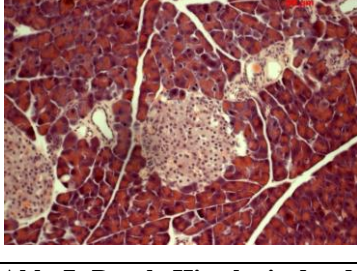
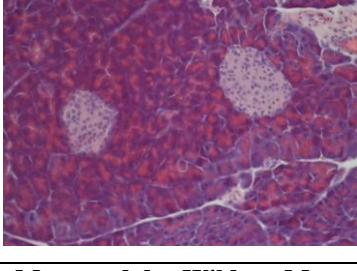
Die Tiere zeigten spontan phänotypisch keinerlei pathologische Veränderungen und vertrugen sowohl das Trinkwasser als auch die Nahrung problemlos. Die Fortpflanzung war ungestört. Ihre Wachstums- und Gewichtsentwicklung verlief vergleichbar zu der Kontrollgruppe der Wildtyp-Mäuse. Spontan zeigten die Tiere keine Zeichen einer Entzündung. Insgesamt gesehen konnten ohne Provokation keine relevanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe der Wildtyp-Mäuse und den *Nlrc5*-deletierten Mäusen gesehen werden.

3.3.1 Basale Histologie der intestinalen Organe

Um etwaige Unterschiede in der Histologie bei den *Nlrc5*-deletierten Tieren zu erkennen, wurden den Mäusen 20 verschiedene Organe entnommen und eine HE-Färbung durchgeführt. Bei der Betrachtung der Bilder wurde besonders auf Hinweise für eine chronische Entzündung der makroskopisch gesunden Mäuse geachtet. Hierbei wurden die Bilder im Hinblick auf Infiltrate im Allgemeinen und im Besonderen mit mononukleären Zellen untersucht. Abbildung 7 zeigt histologische Bilder speziell ausgewählter Organe. Als Auswahl der lymphatischen Organe sind die Milz und Lymphknoten zu sehen. Beide zeigten eine unauffällige Histologie, die keine Unterschiede zwischen den beiden Maustypen erkennen ließ. Um entzündliche Veränderungen an Grenzflächen zu untersuchen, wurden Kolon und Lunge untersucht. Auch hier zeigte sich kein relevanter Unterschied. Insbesondere eine Wandverdickung, wie sie bei chronisch entzündlichen Erkrankungen typisch ist, konnte nicht gezeigt werden. Bei der Blutuntersuchung der *Nlrc5*-deletierten Mäuse zeigten sich wie später genauer beschrieben einige Laborveränderungen (Tabelle 10). Aufgrund deutlich erhöhter Glukosewerte der *Nlrc5*-deletierten Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen wurde das Pankreas der Tiere histologisch nach morphologisch dazu passenden

Veränderungen untersucht. Die Langerhansschen Inseln stellten sich jedoch unverändert dar. Bei erniedrigten Kreatininwerten der Nlrc5-deletierten Mäuse wurde außerdem die Niere genauer untersucht, wobei Glomeruli und Tubuli sich unverändert zeigten.

Insgesamt gesehen zeigten sich die Nlrc5-deletierten Mäuse histologisch ohne relevante Veränderungen in Bezug auf die Vergleichsgruppe der Wildtyp-Mäuse.

	Nlrc5 ^{-/-} -Maus	Wildtyp-Maus (C57BL/6)
Milz		
Lunge		
Kolon		
Lymphknoten		
Niere		
Pankreas		
<p>Abb. 7: Basale Histologie der Nlrc5-deletierten Maus und der Wildtyp-Maus Die Nlrc5-deletierten und die Wildtyp-Mäuse zeigten histologisch in der HE-Färbung keine relevanten Unterschiede.</p>		

3.3.2 Basale Laborwerte

Bei der Untersuchung der Laborparameter wurde ein kleines Blutbild und typische Parameter der Klinischen Chemie wie z.B. Elektrolyte, Leber- und Nierenwerte und der Glukosewert analysiert. Dafür wurden fünf bis acht Wildtyp-Mäuse mit drei bis fünf Nlrc5-deletierten Mäusen verglichen. Dann wurde untersucht ob der Median für den jeweiligen Laborparameter der Knock-out-Mäuse aus der Spannweite der Wildtyp-Mäuse fällt, um so relevante Unterschiede zu detektieren (Tabelle 10)

Auffällig zeigten sich vor allem die Glukosewerte. Der Median war bei den Nlrc5-deletierten Mäusen mit 328 mg/dl stark erhöht. Die Wildtyp-Mäuse schwankten zwischen 67 mg/dl und 171 mg/dl. Beide Maustypen hatten vor Entnahme der Blutes Standard-Trockenfutter ad libitum zur Verfügung.

Die Triglyzeride zeigten sich dagegen mit 46 mg/dl vermindert. Hier hatte die Vergleichsgruppe Werte zwischen 66 und 246 mg/dl. Auch Kreatinin als Parameter für die Nierenfunktion zeigte sich mit 0,1 mg/dl im Median im Vergleich zu der Spannweite der Wildtyp-Mäuse mit 0,27-0,35 mg/dl erniedrigt. Gleiches gilt für die Harnsäure mit einem Median von 0,7 mg/dl bei den Knock-out-Mäusen und einer Spannweite von 1,1-3,2 mg/dl in der Kontrollgruppe. Bei den Elektrolyten lag das Calcium bei den deletierten Mäusen mit 2,3 mmol/l (Spannweite Wildtyp-Mäuse 8,5-9,6 mmol/l) unter dem Grenzbereich.

Die Untersuchung des Blutbildes ergab eine relative Thrombozytopenie der Nlrc5-deletierten Mäuse. Diese hatten mit 534.500 Thrombozyten/ μ l niedrigere Werte als die Vergleichsgruppe der Wildtyp-Mäuse, die eine Spannweite zwischen 549.000 und 1.316.000 Thrombozyten/ μ l aufwies. Ansonsten ergab das Blutbild keine Auffälligkeiten. Insbesondere die Leukozyten als Entzündungsmarker unterschieden sich nicht.

Insgesamt konnte durch die Blutuntersuchung kein Hinweis auf eine ablaufende Entzündung bzw. Erkrankung gefunden werden.

Tab. 10: Basale Blutanalyse

Für die Blutanalyse wurde drei bis fünf Nlrc5-deletierten Mäusen und fünf bis acht Wildtyp-Mäusen direkt aus dem Herzen Blut abgenommen und die entsprechenden Röhrchen im Labor der Universitätsklinik Kiel untersucht. Danach wurde bei den Nlrc5-deletierten Mäusen der jeweilige Median ermittelt und dieser mit der Spannweite der Wildtyp-Mäuse als Kontrollgruppe verglichen. Das Blutbild ergab eine relative Thrombozytopenie und ansonsten unauffällige Laborwerte. Bei den Laborparametern der Klinischen Chemie zeigten sich eine Erniedrigung der Triglyzeride, des Kreatinins, der Harnsäure und des Calciums. Auffällig waren vor allem die stark erhöhten Glukosewerte.

	Nlrc5 ^{-/-} -Mäuse, Median	Wildtyp-Mäuse, Minimum	Wildtyp-Mäuse, Maximum
Leukozyten (*10 ³ / μ l)	7,5	3,2	11,8
Hämoglobin (g/dl)	14,2	12,1	16,2
Erythrozyten (*10 ⁶ / μ l)	9,2	7,79	10,6
Hämatokrit (%)	43,6	36,9	50,2

MCV (fl)	45,5	40,2	50,8
MCH (pg/Zelle)	15,6	13,6	17,6
MCHC (g/dl)	33,1	32	34,2
Thrombozyten (*10 ³ /µl)	534,5	549	1316
Natrium (mmol/l)	146,0	146	155
Kalium (mmol/l)	4,3	4,25	8,62
Chlorid (mmol/l)	114,0	109	115
Calcium (mg/dl)	2,3	2,12	2,39
Harnstoff (mg/dl)	46,0	36,8	88,1
Kreatinin (mg/dl)	0,1	0,266	0,348
Harnsäure (mg/dl)	0,7	1,14	3,2
AST (U/l)	114,0	71,7	236
ALT (U/l)	31,0	26,4	89
LDH (U/l)	317,0	259	873
CK (U/l)	494,0	249	1119
Glucose (mg/dl)	328,0	67,4	171
Triglyzeride (mg/dl)	46,0	66,1	246
Gesamteiweiß (g/dl)	4,6	4,51	5,53
Albumin (g/dl)	3,3	2,27	3,59
Cholesterin (mg/dl)	97,0	36,7	126

3.4 Provokationsmodelle

3.4.1 Endotoxinschock

Der Einfluss von Nlrc5 auf die systemische Entzündung wurde mit dem Endotoxinschock-Modell, einem Mausmodell einer bakteriellen Sepsis, untersucht. Hierfür wurde den Mäusen einmalig 0,05 mg/Maus LPS in einer Mischung mit 20 mg Galaktosamin intraperitoneal verabreicht.

Abbildung 8 stellt die Überlebensrate der Versuchstiere während des Endotoxinschocks dar.

Der Effekt der intraperitonealen LPS Injektion, eine fulminante Sepsis mit Todesfolge, setzte bei den Nlrc5-deletierten Mäusen später ein als bei den Wildtyp-Mäusen. Während die ersten Nlrc5-deletierten Mäuse erst zwischen Stunde sechs und sieben verstarben, waren zu Beginn der Stunde sechs nur noch fünf der acht Wildtyp-Mäuse am Leben (62,5 %). Auch im weiteren Verlauf zeigten die Knock-out-Mäuse eine bessere Überlebensrate als der Wildtyp. Während nach neun Stunden alle Wildtyp-Mäuse verstorben waren, lebten noch 32 % der Nlrc5-deletierten Mäuse. Die letzten Knock-out-Mäuse starben erst 13 bis 24 Stunden nach Versuchsbeginn. Insgesamt zeigte sich bei den Nlrc5-deletierten Mäusen ein verzögerter Effekt der LPS-Injektion.

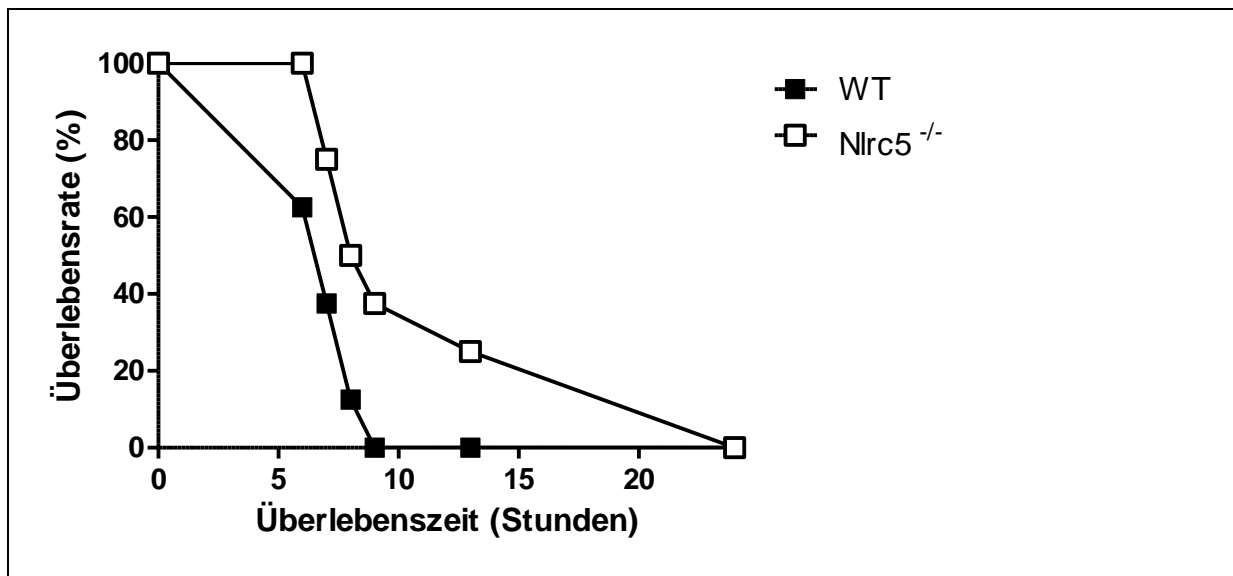


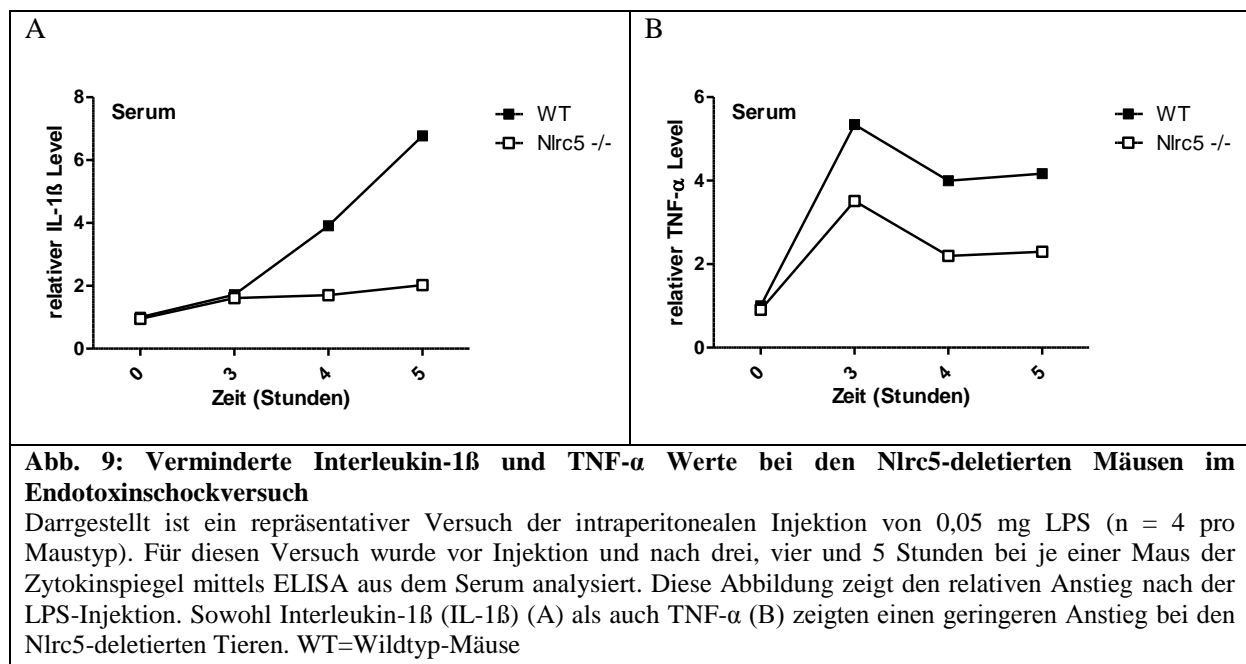
Abb. 8: Verbesserte Überlebensrate der Nlrc5-deletierten Mäuse im Endotoxinschockversuch

Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch der prozentualen Überlebensrate der Mäuse ($n = 8$ pro Maustyp) nach intraperitonealer Gabe von 0,05 mg LPS. Die Nlrc5-deletierten Mäuse zeigten in diesem Versuch die bessere Überlebensrate. Während nach sechs Stunden nur noch 62 % der Wildtyp-Mäuse (WT) lebten, waren es bei den Nlrc5-deletierten Mäusen noch 100 %. Nach neun Stunden waren alle Wildtyp-Mäuse gestorben, aber noch 32 % der Nlrc5-deletierten Mäuse am Leben.

Um der Ursache der besseren Überlebensrate der Knock-out-Mäuse auf den Grund zu gehen, wurde nach drei, vier und fünf Stunden Blut zur Analyse der Zytokine abgenommen.

Die Untersuchung des Interleukin-1 β Spiegels im Blut ergab deutliche Unterschiede (Abbildung 9). Bei den Wildtyp-Mäusen erhöhte sich dieser passend zum klinischen Bild einer Sepsis über sechsfach zur Stunde fünf im Vergleich zum Ausgangswert vor der intraperitonealen LPS-Injektion. Die Nlrc5-deletierten Mäuse zeigten mit einer zweifachen Erhöhung des Interleukin-1 β Levels nur einen leichten Anstieg zu diesem Zeitpunkt. Beide Maustypen zeigten einen progredienten Anstieg dieses Zytokins.

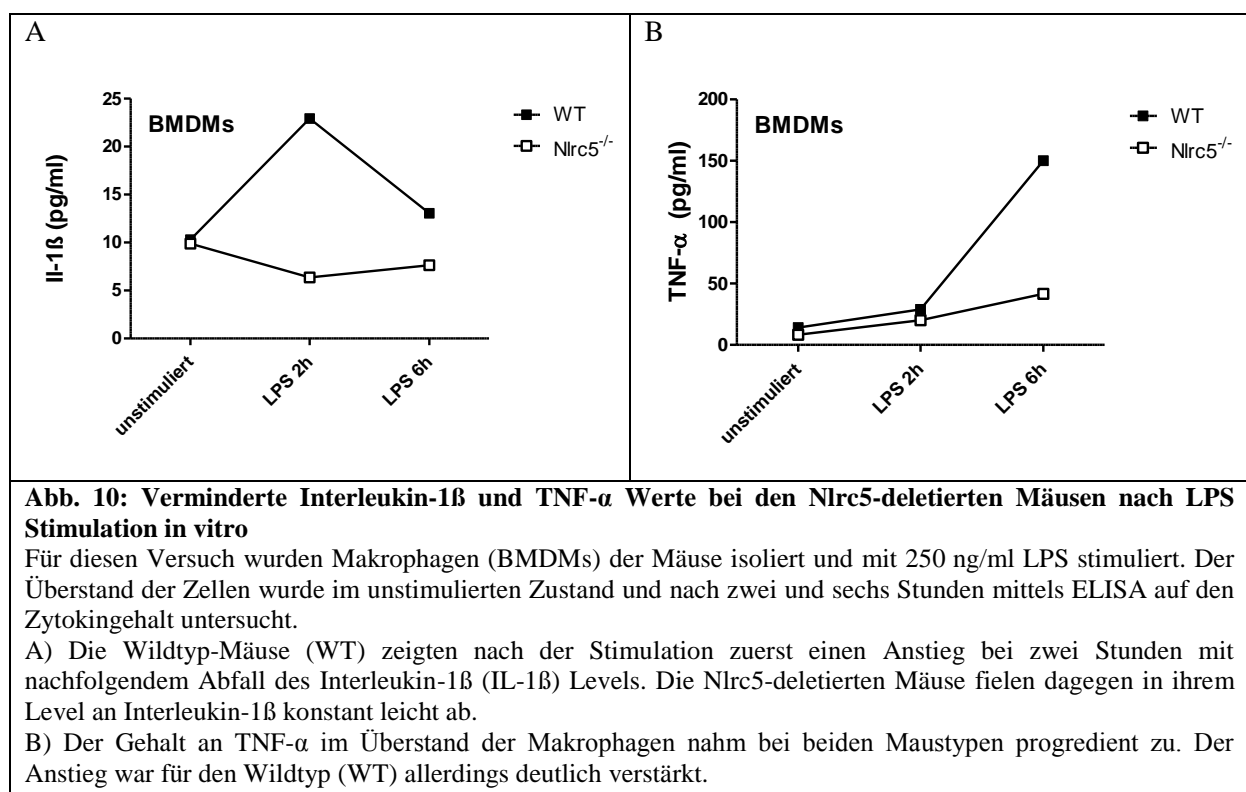
Auch bei der Analyse von TNF- α aus dem Blut der Mäuse ergab sich eine Differenz. Beide Maustypen zeigten einen frühen Anstieg dieses Zytokins mit einem Peak nach drei Stunden und anschließendem Abfall. Allerdings fiel der Anstieg bei den Wildtyp-Mäusen deutlich stärker aus. Nach drei Stunden hatte sich hier der Wert über fünffach erhöht, wohingegen die Nlrc5-deletierten Mäuse nur eine Erhöhung um das dreieinhalbfache zeigten (Abbildung 9).



3.4.2 Stimulationen durch LPS in vitro

Da im Endotoxinschock Versuch die Nlrc5-deletierten Mäuse ein längeres Überleben zeigten, wurde die Stimulation durch LPS (Lipopolysaccharid) auf Ebene der Makrophagen wiederholt und die Zytokine bestimmt (Abbildung 10). Hierfür wurden Makrophagen aus dem Knochenmark der Mäuse isoliert (BMDMs) und die Zellen anschließend mit 250 ng/ml LPS stimuliert. Der Überstand der Zellen wurde anschließend mittels ELISA untersucht. Wie bei der in vivo Stimulation ergaben sich für Interleukin-1 β und TNF- α auffällige Parameter. Interleukin-1 β zeigte bei den Wildtyp-Makrophagen zweifach erhöhte Werte nach zweistündiger Stimulation mit LPS im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. Anschließend kam es nach sechs Stunden zu einem Abfall bis auf das 1,2-fache des Ausgangswertes. Die Nlrc5-deletierten Makrophagen hatten dagegen ein konstantes bzw. leicht sinkendes Niveau an Interleukin-1 β nach der Stimulation mit LPS.

TNF- α stieg sowohl bei den Nlrc5-deletierten Makrophagen als auch bei den Wildtyp-Makrophagen progredient an. Der Anstieg war mit Werten, die nach sechs Stunden das Zehnfache der unstimulierten Makrophagen erreichten (2 Stunden: zweifach), bei den Wildtyp-Makrophagen um ein Vielfaches stärker als bei den Nlrc5-deletierten Makrophagen (2 Stunden: 2-fach; 6 Stunden: 5-fach im Vergleich zum Ausgangswert vor Stimulation). Abbildung 10 zeigt den geringeren Anstieg des Interleukin-1 β und TNF- α Levels.



3.4.3 Natrium-Dextransulfat (DSS) -induzierte Kolitis

Die Unterbrechung der Barriere ist bei dem Mausmodell der induzierten experimentellen Kolitis der wesentliche pathogenetische Mechanismus. Normale Bakterien und intraluminale Antigene führen so zur pathologischen Stimulierung des mukosalen Immunsystems mit Gewebeschädigung durch chronische Entzündung. Um herauszufinden, ob Nlrc5 einen Einfluss auf die Resistenz der epithelialen Barriere im Darmlumen hat, wurde eine Natrium-Dextransulfat (DSS) -induzierte Kolitis durchgeführt. Hierfür wurde den Mäusen zyklisch eine zweiprozentige DSS-Lösung über das Trinkwasser verabreicht.

Es überlebten alle Tiere den 30-tägigen Versuch. Abbildung 11A zeigt die Gewichtsveränderung bei den mit DSS-behandelten Mäusen. Es zeigte sich eine leichte Gewichtsabnahme bei den Nlrc5-deletierten Mäusen bis auf das 0,97-fache des Ausgangsgewichtes (Tag 8). Die Wildtyp-Mäuse verzeichneten dagegen eine leichte Gewichtszunahme (Tag 20: 1,06-fach im Vergleich zum Ausgangsgewicht). Das Gewicht der Nlrc5-deletierten Mäuse war dauerhaft niedriger. Zum Ende des Versuches am Tag 30 verzeichneten die Wildtyp-Mäuse eine Gewichtszunahme von 4 % und die Nlrc5-deletierten Mäuse eine Gewichtsabnahme von 0,4 %.

Um den Schweregrad der Erkrankung durch die DSS-Gabe genauer beurteilen zu können, wurde der Disease Activity Index eingesetzt. Hierbei wurden die Gewichtsabnahme, die Stuhlkonsistenz und der rektale Blutverlust berücksichtigt und den Mäusen ein Wert zwischen

0 (gesund) und 12 (maximal erkrankt) zugeteilt. Die *Nlrc5*-deletierten Mäuse erreichten mit durchschnittlich 4,2 Punkten über den gesamten Krankheitsverlauf gesehen höhere Punktwerte als der Wildtyp mit 3,0. Für Tag 10, 16, 24 und 30 wurde eine statistische Auswertung mit dem Wilcoxon-Rangsummentest vorgenommen. Hier zeigten sich für Tag 16 (5,3, SD 1,3 vs. 3,9, SD 0,8, p-Wert: 0,0077) und Tag 24 (4,4, SD 1,2 vs. 3,1, SD 0,9, p-Wert: 0,0048) signifikant erhöhte Werte bei den *Nlrc5*-deletierten Mäusen. Dem Disease Activity Index zufolge hatten die *Nlrc5*-deletierten Mäuse nach DSS Gabe einen schwereren Krankheitsverlauf (Abbildung 11B).

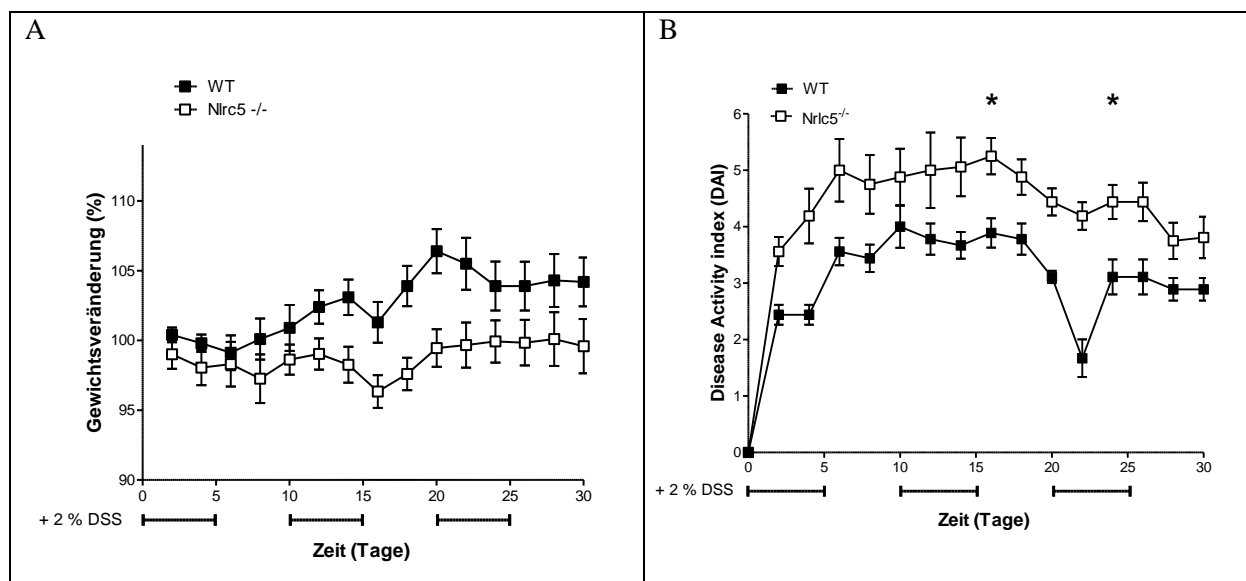


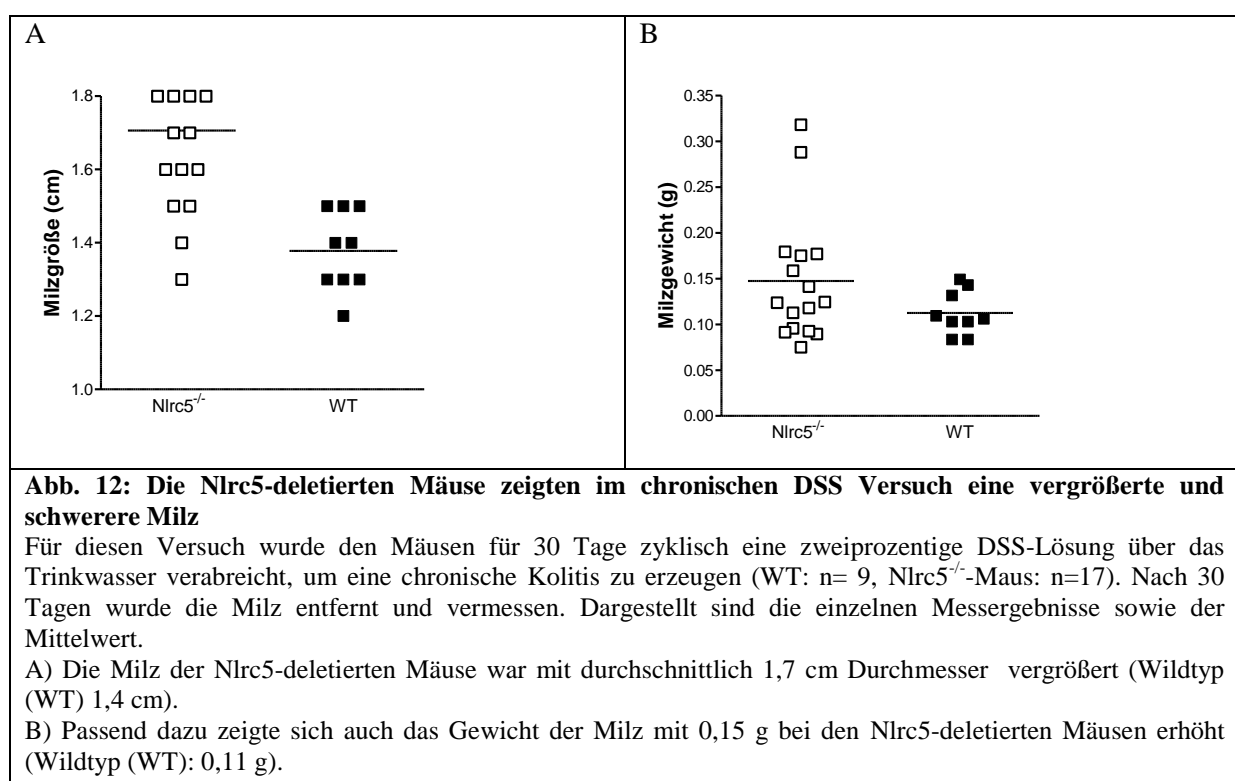
Abb. 11: Die *Nlrc5*-deletierten Mäuse zeigten im chronischen DSS Versuch ein niedrigeres Gewicht und einen höheren Disease Activity Index als der Wildtyp

Für diesen Versuch wurde den Mäusen für 30 Tage zyklisch eine 2-prozentige DSS-Lösung über das Trinkwasser verabreicht, um eine chronische Kolitis zu erzeugen (WT: n= 9, *Nlrc5*^{-/-}-Maus: n=17).

A: Dargestellt ist das prozentuale Gewicht der Mäuse in Bezug auf ein Ausgangsgewicht von 100 % und der jeweilige Standardfehler (SEM). Die *Nlrc5*-deletierten Mäuse zeigten dauerhaft ein niedrigeres Gewicht als die Wildtyp-Mäuse (WT). Zum Ende des Versuches am Tag 30 verzeichneten die Wildtyp-Mäuse eine Gewichtszunahme von 4 % und die *Nlrc5*-deletierten Mäuse eine Gewichtsabnahme von 0,4 %.

B: Gezeigt ist der Disease Activity Index (zusammengesetzt aus Gewichtsabnahme, Stuhlkonsistenz und rektalem Blutverlust) im zeitlichen Verlauf der DSS-induzierten Kolitis mit dem jeweiligen Mittelwert sowie dem Standardfehler (SEM). Der Disease Activity Index war bei den *Nlrc5*-deletierten Mäusen über den gesamten Versuchszeitraum gegenüber den Wildtyp-Mäusen (WT) erhöht. Für Tag 10, 16, 24 und 30 wurde eine statistische Auswertung mit dem Wilcoxon-Rangsummentest vorgenommen. Hier zeigten sich für Tag 16 (5,3, SD 1,3 vs. 3,9, SD 0,8, p-Wert: 0,0077) und Tag 24 (4,4, SD 1,2 vs. 3,1, SD 0,9, p-Wert: 0,0048) signifikant erhöhte Werte bei den *Nlrc5*-deletierten Mäusen.

Einen weiteren Hinweis auf eine verstärkte Immunantwort bei den *Nlrc5*-deletierten Mäusen ergab die Untersuchung der Milz. Diese war mit durchschnittlich 1,7 cm Durchmesser bei den *Nlrc5*-deletierten Tieren vergrößert (Wildtyp 1,4 cm). Zusätzlich zeigte sich auch das Gewicht der Milz mit 0,15 g bei den *Nlrc5*-deletierten Mäusen im Gegensatz zu 0,11 g bei den Wildtyp-Tieren erhöht. Abbildung 12 stellt die Milzveränderungen dar.



Verstärkt wird die Vermutung einer stärker ablaufenden Entzündung bei den Nlrc5-deletierten Mäusen durch den endoskopischen Score, der nach Ablauf der 30 Tage erhoben wurde. Hierbei wurden die Parameter Gefäßmuster, Stuhlkonsistenz, Dicke der Kolonmukosa, Vorhandensein von Fibrinbelägen und die Oberflächengranularität berücksichtigt.

Es zeigten sich signifikante Unterschiede. Die Nlrc5-deletierten Mäuse erhielten mit einem mittleren Wert von 3,7 einen höheren Wert als die Wildtyp-Mäuse mit 2,6 (3,7, SD 0,2 vs. 2,6, SD 0,2; p-Wert: 0,0084, Wilcoxon-Rangsummentest) (Abbildung 13). Dieser Unterschied konnte auch mittels Bildern aus der Koloskopie dokumentiert werden (Abbildung 14), in welchen die verstärkte Gefäßzeichnung zu sehen ist. Die Kolonlänge war in unseren Händen nicht verändert.

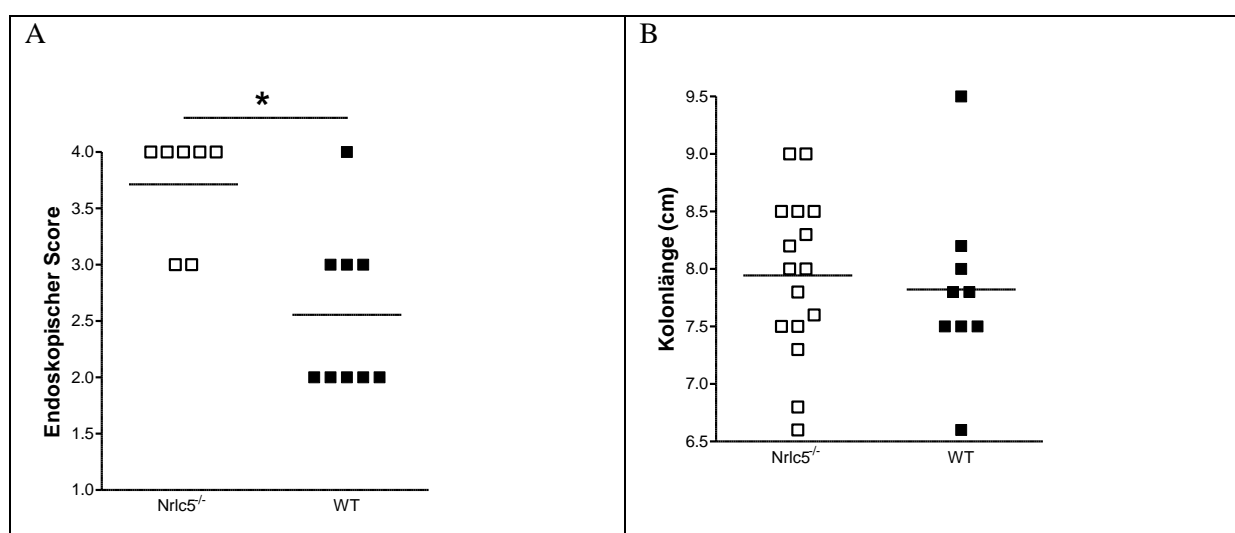


Abb. 13: Die Nlr5-deletierten Mäuse zeigten im chronischen DSS Versuch einen signifikanten erhöhten endoskopischen Score

Nach 30 Tagen zyklischer Gabe einer zwei-prozentigen DSS-Lösung über das Trinkwasser (Wildtyp (WT): n= 9, Nlr5^{-/-}-Maus: n=17) wurde bei den Mäusen eine Endoskopie durchgeführt und ein endoskopischer Score (Gefäßmuster, Stuhlkonsistenz, Dicke der Kolonmukosa, Vorhandensein von Fibrinbelägen, Oberflächengranularität) ermittelt. Außerdem wurde das Kolon entnommen und vermessen. Dargestellt sind die einzelnen Messergebnisse und der Mittelwert.

A: Die Nlr5-deletierten Mäuse zeigten nach Ablauf der chronischen Kolitis signifikant höhere Werte im endoskopischen Score (3,7, SD 0,2 vs. 2,6, SD 0,2; p-Wert: 0,0084, Wilcoxon-Rangsummentest).

B: Die Kolonlänge zeigte nach Ablauf des Versuches keine wesentlichen Unterschiede.

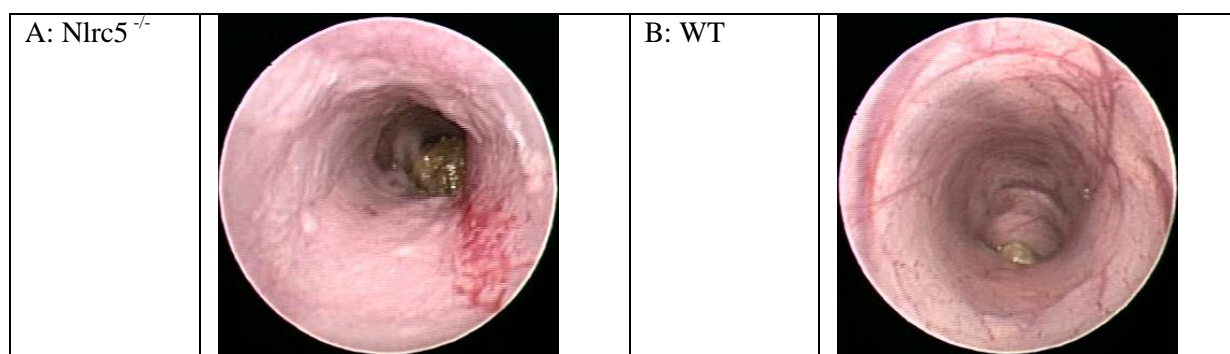


Abb. 14: Vermehrte Entzündung im Darm der Nlr5-deletierten Mäuse nach 30 Tagen chronischer DSS-Kolitis

Nach 30 Tagen zyklischer Gabe einer 2-prozentigen DSS-Lösung über das Trinkwasser (Wildtyp (WT): n= 9, Nlr5^{-/-}-Maus: n=17) wurde bei den Mäusen eine Endoskopie durchgeführt. Die Nlr5-deletierten Mäuse zeigten eine vermehrte Vulnerabilität der Darmwand sowie Ansätze eines Pflastersteinreliefs mit entzündlich verdickten Schleimhautarealen.

Bei den durchgeführten Koloskopien konnte der Eindruck einer verstärkten Entzündung auch bildlich festgehalten werden. Abbildung 14 zeigt eine vermehrte Vulnerabilität der Darmwand sowie Ansätze eines Pflastersteinreliefs mit entzündlich verdickten Schleimhautarealen bei der Nlr5-deletierten Maus, welche bei den Wildtyp-Tieren nicht in dem Ausmaß vorhanden war.

Das entnommene Kolon wurde nach Vermessung in drei Anteile unterteilt. Dann wurde das mittlere Drittel des Kolons selektiert, welches bei der chronischen Kolitis eine besondere

Rolle spielt. Nach Aufarbeitung der cDNA wurde mittels Real-Time PCR die Expression ausgewählter Zytokine gemessen. Es zeigte sich mit 0,0024 relativer Einheit eine um das 1,7-fach erhöhte Expression von Interleukin-1 β in den Nlrc5-deletierten Mäusen (Wildtyp-Mäuse: 0,0014). Auch die Expression von Interleukin-18 (1,8-fach), KC (1,4-fach) und Interferon- γ (1,7-fach) zeigte sich im Kolon der Nlrc5-deletierten Mäuse im Vergleich zum Kolon der Wildtyp-Mäuse nach 30-tägiger DSS-Kolitis erhöht. TNF- α war dagegen herabreguliert. Hier zeigte sich mit 0,0006 bei den Nlrc5-deletierten Mäusen ein um 0,6-fach niedrigerer cDNA-Gehalt als bei den Wildtyp-Mäusen (0,0011) (Abbildung 15). Interleukin-12 zeigte eine stabile Expression.

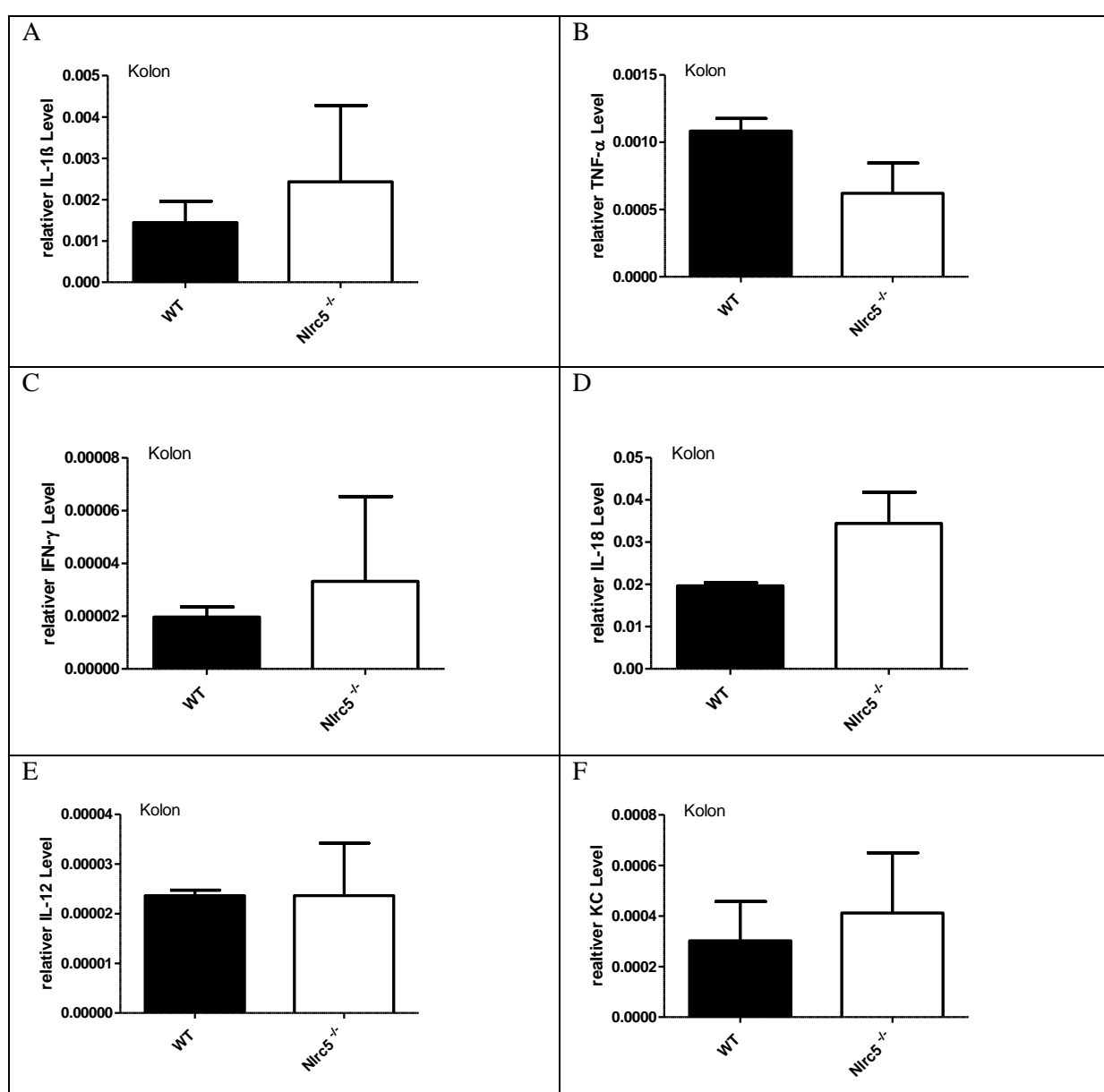


Abb. 15: Erhöhte Zytokinexpression im Kolon nach 30-tägiger DSS-Gabe bei den Nlrc5-deletierten Mäusen für Interleukin-1 β , Interferon- γ , KC und erniedrigte Zytokinexpression für TNF- α

Nach 30 Tagen zyklischer Gabe einer zweiprozentigen DSS-Lösung zur Auslösung einer chronischen Kolitis wurde den Mäusen das mittlere Drittel des Kolons entnommen und die cDNA isoliert (Wildtyp (WT): n=2, Nlrc5^{-/-}-Maus: n=3). Anschließend erfolgte eine Messung von ausgewählten Zytokinen per Real-Time PCR. Die Darstellung erfolgte in relativen Werten in Bezug zum Housekeeper-Gen β -Actin. Gezeigt sind der jeweilige Mittelwert sowie der Standardfehler (SEM).

A-F: Es zeigte sich in den Nlrc5-deletierten Mäusen eine um das 1,7-fach erhöhte Expression von Interleukin-1 β (0,0024 vs. 0,0014). Auch die Expression von Interleukin-18 (IL-18) (1,8-fach), *Keratinocyte-derived Cytokine* (KC) (1,4-fach) und Interferon- γ (IFN- γ) (1,7-fach) zeigte sich im Kolon der Nlrc5-deletierten Mäuse im Vergleich zum Kolon der Wildtyp-Mäuse nach 30-tägiger DSS-Kolitis erhöht. TNF- α war dagegen herunter reguliert. Hier zeigte sich mit 0,0006 bei den Nlrc5-deletierten Mäusen ein um das 0,6-fache niedrigerer cDNA-Gehalt als bei den Wildtyp-Mäusen (0,0011). Interleukin-12 (IL-12) zeigte eine stabile Expression.

4 Diskussion

Elie Metchnikoff erkannte bereits vor über 100 Jahren, dass spezialisierte Zellen des Körpers, die er Phagozyten nannte, Fremdkörper aufnehmen und benannte somit erstmals das Prinzip der angeborenen Immunität. Demgegenüber stand die Schule von Paul Ehrlich, der zeitgleich die Grundlagen des adaptiven Immunsystems beschrieb. Beide erhielten 1908 den Nobelpreis, auch wenn bezüglich der molekularen Verbindung und Regulation beider Abwehrmechanismen auch heute noch viele Fragen offen sind (Kaufmann 2008). In den letzten Jahren wurden mittels *genome-wide association studies* zahlreiche Gene, die für das angeborene Immunsystem von Bedeutung sind, identifiziert. Somit wurden genetische Verknüpfungen zwischen auf den ersten Blick klinisch recht unterschiedlichen Krankheiten wie z.B. Morbus Crohn und Psoriasis gefunden (Duerr, Taylor et al. 2006; Nair, Ruether et al. 2008), was zu einem neuen interdisziplinären Denkansatz geführt hat.

Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen liegt eine Barrierschädigung vor, die zur anhaltenden Stimulation des intestinalen Immunsystems durch luminale Antigene aus Darmbakterien und Nahrungsbestandteilen führt. Die Ätiologie ist nach wie vor unklar, es konnten aber einige Zytokine der adaptiven Immunantwort als bedeutend in der Pathogenese identifiziert werden. Anti-TNF- α -Antikörper wie z.B. Infliximab werden erfolgreich in der Therapie des schwergradigen, unzureichend auf andere Therapiemöglichkeiten ansprechenden Morbus Crohn eingesetzt (Hoffmann, Preiss et al. 2008). Die Nebenwirkungen sind jedoch beträchtlich, was gehäuft zu Therapieabbrüchen führt (Riis, Martinsen et al. 2012). Die Genom-Forschung der letzten Jahre konzentriert sich nun darauf, der Pathogenese der chronischen Entzündungskrankheiten näher zu kommen, um spezifischer eingreifen zu können. In diesem Rahmen wurde auch dem angeborenen Immunsystem eine neue Bedeutung zugemessen. Für die bis dahin unbekannte Familie der *Nod-like*-Rezeptoren (NLR) wurde eine Beeinflussung der NF- κ B Aktivierung, der Interleukin-1 β Produktion und der Apoptose entdeckt (Chen, Shaw et al. 2009). Außerdem wurden vorwiegend entzündliche Erkrankungen wie Morbus Crohn (Hampe, Cuthbert et al. 2001) oder das Muckle-Wells-Syndrom (Hoffman, Mueller et al. 2001) mit *Nod-like* Rezeptoren in Zusammenhang gebracht.

4.1 Die *Nlrc5*-deletierte Maus

Gegen Ende 80er Jahre war es erstmals möglich die Auswirkung eines bestimmten Gens in vivo zu untersuchen. Durch die gezielte Ausschaltung bestimmter Gene mittels genetischer Deletion in Mäusen wurde der Forschungszweig der Genforschung ermöglicht. Die Knock-out-Maus ist inzwischen zu einem der bedeutendsten Modelle in der Grundlagenforschung

geworden und brachte ihren Erfindern Mario R. Capecchi, Martin Evans und Oliver Smithies 2007 den Nobelpreis ein. Durch die schnelle Reproduzierbarkeit von genetisch identischen Mäusen lässt sich die Bedeutung von genetischen Veränderungen *in vivo* beobachten. Der übereinstimmende genetische Hintergrund der Mäuse lässt außerdem die Bedeutung von Umwelteinflüssen leichter erkennen. Dass das Genom der Maus zu 99 % mit dem humanen identisch ist, unterstreicht die Bedeutung von murinen Tiermodellen (O'Brien and Woychik 2003). Besonders die Aufklärung von genetischen Krankheiten, die aufgrund ihrer Seltenheit bisher schwer zu erforschen waren, profitiert vom Einsatz dieses Modells. Ein Beispiel hierfür sind Patienten mit dem Muckle-Wells-Syndrom. Diese Krankheit gehört zur Gruppe der autoinflammatorischen Erkrankungen, welche sich durch eine übersteigerte Aktivierung des angeborenen Immunsystems ohne eine physiologische Provokation auszeichnen (Lamprecht and Gross 2009). Gestützt durch die Erkenntnis der zentralen Bedeutung von Interleukin-1 β im Mausmodell, wurde der Interleukin-1 Rezeptor Antagonist Anakinra entworfen, der direkt in die Signalkaskade eingreift und so die Erkrankung spezifisch therapiert (Chen, Shaw et al. 2009; Kuemmerle-Deschner, Tyrrell et al. 2011). Neben der Identifikation neuer Therapieziele kann im Mausmodell vor allem die funktionelle Bedeutung von Proteinen untersucht werden. Für Nlrc5 gab es Hinweise auf eine Assoziation zu entzündlichen Erkrankungen und eine Bedeutung bei der Immunabwehr an Grenzflächen. In dieser Arbeit wurden jetzt mittels der Nlrc5 Knock-out-Maus weitere Hinweise auf die physiologische und pathologische Rolle von Nlrc5 im Immunsystem gesammelt. Die Nlrc5-deletierten Mäuse zeigten spontan keinerlei phänotypische Auffälligkeiten oder Entzündungszeichen. Die Fortpflanzung und die Wachstums- und Gewichtsentwicklung verlief vergleichbar zu der Kontrollgruppe der Wildtyp-Mäuse und auch laborchemisch oder histologisch kam es zu keinen signifikanten Differenzen. Auffällig waren die erhöhten Glukose Werte der Nlrc5-deletierten Mäuse, welche zum Zeitpunkt der Versuche allerdings im Labor gehäuft auftraten und deshalb auf einen systemischen Fehler zurückzuführen sein könnten. Da ohne Provokation keine relevanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe der Wildtyp-Mäuse und den Nlrc5-deletierten Mäusen gesehen werden konnte, wurden sowohl eine akute als auch eine chronische Entzündungsreaktion ausgelöst.

4.2 Expression und Induktion von murinem Nlrc5

Vor Beginn der Provokationsmodelle wurde ein Expressionsprofil von Nlrc5 erstellt, um einen Eindruck zu bekommen, in welchen Geweben bzw. Zellen Nlrc5 eine Bedeutung haben könnte. Das verstärkte Vorkommen von Nlrc5 in der Lunge bestätigt humane

Voruntersuchungen (Kuenzel, Till et al. 2010). Die Lunge als Grenzorgan der Körperoberfläche zur Außenwelt könnte für eine Bedeutung im Bereich des mukosalen Immunsystems sprechen. Als Organ für die Provokation einer mukosalen Immunantwort wurden daher in dieser Arbeit Darmmodelle eingesetzt, für die im Institut ein großer Erfahrungsschatz vorlag. Ein weiterer Hinweis auf eine entzündungsfördernde Rolle von Nlrc5 im Immunsystem ist die Induktion von Nlrc5 durch Interferon- γ , welches ein Schlüsselzytokin in der adaptiven Immunantwort unter anderem nach bakterieller Stimulation von Makrophagen ist (Buchmeier and Schreiber 1985; Schroder, Hertzog et al. 2004). Tatsächlich konnte die Induktion von Nlrc5 in dieser Arbeit in murinen Makrophagen aus dem Knochenmark und in der Lunge gezeigt werden. Künzel et al. untersuchten 2010 in den humanen HeLaS3-Zellen eine Vielzahl an Stimuli einschließlich LPS, TNF- α , EGF und *Listeria monocytogenes*. Einzig Interferon- γ führte zu einer Induktion von NLRC5.

4.3 Die Deletion von Nlrc5 schützt im akuten Entzündungsmodell

Um die Auswirkungen von Nlrc5 auf die akute Entzündungsreaktion beobachten zu können, wurde im Modell des Endotoxinschocks durch intraperitoneale Injektion von Lipopolysacchariden eine Sepsis durch gram-negative Bakterien nachempfunden. Lipopolysaccharide führen zu einer Aktivierung der *pattern recognition* Rezeptoren und hier insbesondere zu einer durch TLR4 ausgelösten Signalkaskade (Beutler and Poltorak 2000). Hierdurch kommt es zu einer breitgefächerten proinflammatorischen Immunantwort mit besonderer Bedeutung der Makrophagen (Michalek, Moore et al. 1980; Freudenberg, Keppler et al. 1986; Freudenberg, Ness et al. 1993). Der Endotoxinschock führt zu einem gesteigerten Herzminutenvolumen und einem erniedrigten peripheren Widerstand, also hämodynamischen Veränderungen, die der menschlichen Sepsis ähneln (Fink, Fiallo et al. 1987).

Das Endotoxinschockmodell ist ein dramatisches Entzündungsmodell, doch zeigt es deshalb eine besonders deutliche Darstellung etwaiger Unterschiede. Mit seiner guten Reproduzierbarkeit und der leichten Durchführung ist es heutzutage das bevorzugte Modell für eine akute systemische Entzündungsreaktion.

In diesem Versuch zeigte sich eine eindeutige Protektion der Nlrc5-deletierten Mäuse. Der Effekt der intraperitonealen LPS Injektion, eine fulminante Sepsis mit Todesfolge, setzte bei den Nlrc5-deletierten Mäusen verzögert ein. Sechs Stunden nach Versuchsbeginn lebten noch alle Knock-out-Mäuse, aber nur noch 62,5 % der Wildtyp-Mäuse und neun Stunden nach Versuchsbeginn waren alle Wildtyp-Mäuse verstorben, aber noch 32 % der Nlrc5-deletierten Mäuse am Leben. Passend zum verzögerten klinischen Bild zeigten die Nlrc5-deletierten

Mäuse einen deutlich schwächeren Anstieg von Interleukin-1 β (zweifach statt sechsfach). Interleukin-1 β ist ein zentrales proinflammatorisches Zytokin, welches vor allem von Monozyten ausgeschüttet wird und dann zu den typischen Infektsymptomen wie Fieber, erniedrigter Schmerzschwelle und Vasodilatation führt. Bei dem nachgewiesenen schwachen Anstieg von Interleukin-1 β könnte es sich allerdings auch um eine zeitliche Verzögerung handeln. Die niedrigeren Interleukin-1 β Werte im Endotoxinschockversuch sind im Zeitraum bis zu 5 Stunden erhoben worden. Zu diesem Zeitraum waren die Wildtyp-Mäuse im Gegensatz zu den Nlrc5-deletierten Mäusen schon schwer erkrankt. Zu den Zeitpunkten 8 bis 24 Stunden nach Versuchsbeginn wurden keine Zytokinwerte erhoben. Auch die Analyse von TNF- α aus dem Blut der Mäuse ergab einen geringeren Anstieg (3,5-fach statt fünffach). Leider konnten während dieses Versuches nur eine begrenzte Anzahl an Zytokinen bestimmt werden, da aufgrund der erhöhten Vasopermeabilität im septischen Zustand nur geringe Mengen Blut aus dem Herzen entnommen werden konnten und so die Probenmenge für eine größere Anzahl an Zytokinen zu gering war.

Da im Endotoxinschock Versuch die Nlrc5-deletierten Mäuse ein längeres Überleben zeigten, wurde die Stimulation durch LPS *in vitro* auf Ebene der Makrophagen wiederholt und anschließend die Zytokine im Überstand bestimmt. Diese Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse des Endotoxinschocks. Sowohl der niedrigere Interleukin-1 β als auch der niedrigere TNF- α Wert bei den Nlrc5-deletierten Mäusen nach LPS Stimulation konnte in den Makrophagen bestätigt werden. Interleukin-1 β stieg nach der Stimulation mit LPS, wie zu erwarten war, um das Zweifache an. Nach sechs Stunden kam es dann zu einem Abfall, welcher klassischerweise zu einer Anergie der Makrophagen nach starker Stimulation mit Erschöpfung der Ressourcen passen würde. Die Nlrc5-deletierten Mäuse hatten dagegen erst ein leicht sinkendes und dann minimal ansteigendes Niveau an Interleukin-1 β nach der Stimulation mit LPS. Dies bestätigt die Vermutung einer zeitlichen Verzögerung der Interleukin-1 β Antwort. TNF- α als Zytokin der Makrophagenaktivierung (Driscoll, Carter et al. 1997) stieg sowohl bei den Makrophagen der Nlrc5-deletierten Mäuse als auch bei den Wildtyp-Mäusen progressiv an, wobei der Anstieg bei den Wildtyp-Tieren entsprechend der Entzündungsreaktion um ein Vielfaches stärker war.

Kritiker sehen eine eingeschränkte Übertragbarkeit des Endotoxinschockmodells auf die gram-negative Sepsis beim Menschen (Waisbren 1964), da die Toxizität von Bakterien nicht ausschließlich auf LPS zurückzuführen ist. Außerdem führt die Applikation meist bei allen

Versuchstieren zum Tod, sodass die Unterschiede in den Gruppen nur zeitlich und nicht absolut zu sehen sind.

Wie bereits erwähnt, zeigte sich eine besondere Rolle von Interferon- γ für die Expression von *Nlrc5*. Interessanterweise führt Interferon- γ über die Aktivierung von Makrophagen zu einer verbesserten bakteriellen Immunabwehr (Buchmeier and Schreiber 1985; Williams, Jurkovich et al. 1992) und verstärkt die Immunantwort im Endotoxinschockversuch (Jurkovich, Mileski et al. 1991). Zusätzlich weisen Interferon- γ -Rezeptor negative Mäuse verbesserte Überlebensraten im Endotoxinschockversuch mit LPS auf (Car, Eng et al. 1994). Hier könnte *Nlrc5* ein Bindeglied sein, welches nach seiner Induktion durch Interferon- γ zu einer vermehrten Interleukin-1 β Sekretion führt und so die Makrophagenaktivierung fördert.

Auch andere Forschergruppen konnten eine proinflammatorische Wirkung von NLRC5 im angeborenen Immunsystem zeigen. Der siRNA Knock-down von NLRC5, also die temporäre Verhinderung der Proteintranslation, führte zu einem verminderten bzw. fehlenden Anstieg von Interleukin-1 β nach Stimulation mit LPS (Davis, Roberts et al. 2011). Weitergehende Untersuchungen ergaben deutliche Hinweise auf eine Rolle von NLRC5 im NLRP3-Inflammasom. In Zellen ohne funktionierendes NLRC5 konnte eine verminderte Caspase-1 und Interleukin-18 Aktivierung gefunden werden. Außerdem wurde eine selektive Interaktion zwischen NLRP3, ASC und NLRC5 detektiert und es konnte gezeigt werden, dass nach einer Transfektion von NLRC5 mit Komponenten des NLRP3-Inflammasoms mehr Interleukin-1 β gebildet wird (Davis, Roberts et al. 2011). All dies sind deutliche Hinweise auf eine wichtige Funktion von NLRC5 im NLRP3-Inflammasom.

Auch Kumar et al. (Kumar, Pandey et al. 2011) konnten eine proinflammatorische Wirkung von NLRC5 zeigen. Die Überexprimierung zusammen mit pro-Interleukin-1 β und Caspase-1 führte zu einem Anstieg der Interleukin-1 β Produktion. Ein direkter Zusammenhang mit dem NLRP3-Inflammasom konnte hier allerdings nicht hergestellt werden. Bemerkenswert ist auch, dass Kumar et al. das erste Paper über die *Nlrc5*-deletierte Maus veröffentlicht hat. Die Zytokinspiegel in seinen Experimenten unterschieden sich nicht zwischen der *Nlrc5*-deletierten Maus und der Kontrollgruppe. Allerdings wurden die Stimulationen nicht in vivo vorgenommen, sondern in vitro in selektierten Zellen der deletierten Maus.

4.4 Aggravierte Entzündung der *Nlrc5*-deletierten Maus bei der DSS-induzierten Kolitis

Für die Familie der *Nod-like* Rezeptoren bestehen mehrere genetische Assoziationen zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Für NOD1 und NOD2 wurde eine Bedeutung der Mutation im Zusammenhang mit Morbus Crohn gefunden (Hampe, Cuthbert et al. 2001; Hugot, Chamaillard et al. 2001; Schreiber, Hampe et al. 2002). Im Tiermodell wurde für das NLRP6 Inflammasom bei Defizienz für das Adapterprotein ASC ein aggravierter Verlauf bei der durch DSS-induzierten Kolitis festgestellt (Elinav, Strowig et al. 2011). Des Weiteren besteht ein Zusammenhang zwischen der experimentell hervorgerufenen Kolitis und Interferon- γ , welches bemerkenswerter Weise bis jetzt als alleiniger Stimulator für NLRC5 identifiziert werden konnte (Kuenzel, Till et al. 2010). Interferon- γ -defiziente Mäuse scheinen vor der durch Natrium-Dextransulfat (DSS)-ausgelösten Kolitis geschützt zu sein (Ito, Shin-Ya et al. 2006).

Daraus folgend wurde das Modell der chronischen durch DSS-induzierten Kolitis eingesetzt. Hierfür wurde den Mäusen für insgesamt 30 Tage zyklisch eine zweiprozentige DSS-Lösung über das Trinkwasser gegeben. Der Wirkmechanismus ist nicht endgültig geklärt, vermutet wird, dass DSS direkt toxisch auf die epithelialen Zellen wirkt und so artifiziell eine Unterbrechung der Darmbarriere ausgelöst wird (Dieleman, Palmen et al. 1998). Dadurch führen normale Bakterien und intraluminal Antigenen zu einer pathologischen Stimulierung des mukosalen Immunsystems. Der langsame chronische Verlauf in diesem Modell mit fokalen Entzündungszeichen und fissuralen Defekten in der Epithelschicht und Submukosa ähnelt pathologisch den Befunden bei Morbus Crohn (Okayasu, Hatakeyama et al. 1990). Aufgrund der einfachen Handhabung und der guten Reproduzierbarkeit ist die DSS-induzierte Kolitis das bevorzugte Modell für chronisch entzündliche Darmerkrankungen.

In unserem Tierstall überlebten alle Tiere den 30-tägigen Versuch, zeigten jedoch unterschiedliche Krankheitsverläufe. Der Gewichtsverlauf zeigte eine leichte Gewichtsabnahme der *Nlrc5*-deletierten Mäuse und eine leichte Gewichtszunahme bei den Wildtyp-Mäusen. Letzteres ist durch das Wachstum der noch relativ jungen Tiere zu erklären. Anders stellt sich das Ganze beim Disease Activity Index, welcher sich aus Gewichtsabnahme, Stuhlkonsistenz und rektalem Blutverlust zusammensetzt, dar. Hier erreichten die *Nlrc5*-deletierten Mäuse mit durchschnittlich 4,2 Punkten über den gesamten Krankheitsverlauf gesehen deutlich höhere Punktwerte als der Wildtyp mit 3,0 Punkten. Auch die nach Ablauf des 30-tägigen Versuches durchgeführte Koloskopie zeigte das Bild einer

verstärkten Entzündung bei den *Nlrc5*-deletierten Mäusen, objektivierbar durch den endoskopischen Score. Hierbei wurden die Parameter Gefäßmuster, Stuhlkonsistenz, Dicke der Kolonmukosa, Vorhandensein von Fibrinbelägen und die Oberflächengranularität berücksichtigt, wobei sich signifikant höhere Punktwerte bei den *Nlrc5*-deletierten Mäusen ergaben. Die vermehrte Entzündung im Darm wurde von einer systemischen Immunantwort begleitet, die sich durch eine Splenomegalie zeigte. Um die verstärkte Entzündungsreaktion auf Molekülebene nachverfolgen zu können, wurde das Kolon nach 30 Tagen auf ausgewählte Zytokine untersucht. Es zeigte sich eine um das 1,7-fach erhöhte Expression von Interleukin-1 β in den Knock-out-Mäusen. Auch die Expression von Interleukin-18 zeigte sich um das 1,8-fache erhöht. Interleukin-18 und Interleukin-1 β sind die wesentlichen Zytokine, die nach der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms vermehrt sezerniert werden (van de Veerdonk, Netea et al. 2011). Außerdem ist Interleukin-18, wie der frühere Name „Interferon- γ induzierender Faktor“ schon andeutet, an der Produktion von Interferon- γ beteiligt (Dinarello 2009). Letztgenanntes Zytokin war im Kolon der *Nlrc5*-deletierten Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen nach 30-tägiger DSS-Kolitis um das 1,7-fache erhöht. Die verstärkte Interferon- γ Sekretion ist eine Erklärung für die verstärkte Entzündungsreaktion der *Nlrc5*-deletierten Mäuse in der DSS-induzierten Kolitis. Interferon- γ defiziente Mäuse sind vor der DSS-induzierten Kolitis geschützt (Ito, Shin-Ya et al. 2006). Schon Anfang der 90er Jahre konnte gezeigt werden, dass CD4-positive T-Zellen der Lamina propria vermehrt Interferon- γ sezernieren, wenn sie von Morbus Crohn Patienten stammen (Fuss, Neurath et al. 1996). Interferon- γ ist das zentrale Effektorzytokin in der durch T-Helfer (TH) -Zellen der Klasse 1 induzierten Immunantwort. Eine anerkannte Hypothese zur Pathogenese von Morbus Crohn ist eine initial vermittelte TH-1 Immunantwort mit einer vermehrten Interferon- γ Sekretion und einer späteren zusätzlichen Aktivierung der TH-17 vermittelten Immunantwort mit Interleukin-17 und Interleukin-23 als Effektorzytokine (Strober and Fuss 2011). In dieser Phase wird Interferon- γ inhibiert. Die Blockade von Interferon- γ (Fontolizumab) in klinischen Studien bei Morbus Crohn Patienten, zeigte keine ausreichende Effektivität (Reinisch, de Villiers et al. 2010). Die Expression von *Nlrc5* in der Wildtyp-Maus führte im Versuch der DSS-induzierten Kolitis zu einer niedrigen Interferon- γ Sekretion, was Parallelen zur späten Phase des Morbus Crohn mit der TH-17 vermittelten Immunantwort aufweist.

Auch das Modell der DSS-Kolitis beinhaltet mit der akuten und chronischen Entzündungsreaktion zwei Phasen (Heilmann, Hoffmann et al. 2009). In der akuten Phase spielen Makrophagen und Granulozyten eine besondere Rolle, welche nach Aktivierung unter

anderem TNF- α sezernieren. In der Phase der Regeneration kommt es zusätzlich zu einer T- und B-Zell-vermittelten Reaktion mit großen Lymphozytenaggregaten und es wird vermehrt Interferon- γ gebildet (Dieleman, Palmes et al. 1998).

4.5 Dichotomer Effekt von Nlrc5 in verschiedenen Entzündungsmodellen

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Modelle zur immunologischen Konfrontation der Nlrc5-deletierten Maus gewählt. Auffällig ist der unterschiedliche Effekt des Knock-outs von Nlrc5 auf das Modell der akuten und das der chronischen Entzündung. Im akuten Modell des Endotoxinschocks zeigte sich eine proinflammatorische Rolle von Nlrc5. Die Deletion des Gens für Nlrc5 führte zu einer eindeutigen Protektion der Mäuse mit verbesserter Überlebensrate und niedrigeren proinflammatorischen Zytokinspiegeln. Im chronischen Entzündungsmodell der DSS-induzierten Kolitis zeigte Nlrc5 allerdings eine leichte antiinflammatorische Wirkung.

Interessant sind in diesem Zusammenhang die in der Literatur zu findenden widersprüchlichen Ergebnisse, die bis jetzt in Zusammenhang mit NLRC5 erhoben worden sind und zum Teil direkt konträr erscheinen (Benko, Magalhaes et al. 2010; Cui, Zhu et al. 2010; Kuenzel, Till et al. 2010; Meissner, Li et al. 2010; Neerinx, Lautz et al. 2010; Davis, Roberts et al. 2011; Kumar, Pandey et al. 2011). Erklären ließe sich dies über eine unterschiedliche Funktion von NLRC5 in verschiedenen Zelltypen. Benko et al. konnten eine eindrücklich unterschiedliche Induzierbarkeit der Expression von NLRC5 in verschiedenen Zelltypen zeigen (Benko, Magalhaes et al. 2010). Einzig Interferon- γ konnte als genereller Stimulator getestet werden, dessen Wirkungsausmaß jedoch in den verschiedenen Zelltypen schwankte. Die Varianz in den Zelllinien wird ausführlich in der Arbeit von Davis et al. diskutiert (Davis, Roberts et al. 2011). Die starke Abhängigkeit von NLRC5 vom Zelltyp könnte auch auf eine besondere Anfälligkeit gegenüber dem jeweiligen Mausstamm hindeuten, was zur besonderen Aufmerksamkeit bei den Tierversuchen führen muss. Dies könnte auch eine Erklärung für die Differenz zwischen unseren Ergebnissen und denen der Arbeitsgruppe um Kumar (Kumar, Pandey et al. 2011) sein, da hier unterschiedliche genetische Hintergründe vorlagen. Die Bedeutung des Anteils der 129/SvPas Maus ergibt sich aus Forschungen, die deutliche Unterschiede zwischen den Mausstämmen in metabolischen, hämatologischen und biochemischen Untersuchungen zeigen (Champy, Selloum et al. 2008). Die 129/SvPas Maus zeigt eine gewisse Resistenz gegenüber der durch DSS-induzierten Kolitis (Mahler, Bristol et al. 1998). Bei der Herstellung der Nlrc5-deletierten Maus wurde aus technischen Gründen das hergestellte Genkonstrukt in eine embryonale Stammzelle einer

129/SvPas Maus eingesetzt und der Klon dann in eine Blastozyste einer C57BL/6J Maus injiziert. Je nach Anzahl der Rückkreuzungen variiert der Anteil der 129/SvPas Maus welcher kontinuierlich heraus gekreuzt wird. Ein reiner C57BL/6J Stamm besteht erst nach mindestens 20 Kreuzungen, welche aus Zeitgründen jedoch in den wenigsten Laboren durchgeführt werden. Praktisch gesehen, besteht auch nach zehn Rückkreuzungen, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurden, eine reine Knock-out-Maus. Unter dem Gesichtspunkt der besonderen Anfälligkeit von Nlrc5 für verschiedene Zelllinien und Mausstämme muss jedoch erwähnt werden, dass die Versuche zu unterschiedlichen Rückkreuzungsstadien durchgeführt wurden, was die Empfindlichkeit im DSS-Versuch modifiziert haben könnte.

Bezüglich des Endotoxinschocks existieren keine Hinweise zur Abhängigkeit der Empfindlichkeit vom Mausstamm, was diesen Versuch bei Nlrc5 geeigneter erscheinen lässt. Methodenkritisch muss unter diesem Gesichtspunkt außerdem ein fehlendes Altersmatching mit einem jüngeren Alter der Nlrc5-deletierten Mäuse angemerkt werden.

Eine andere Erklärung für die auf den ersten Blick konträr erscheinenden Ergebnisse, ist die unterschiedliche Pathophysiologie der beiden gewählten Modelle zur immunologischen Konfrontation der Nlrc5-deletierten Maus. Nlrc5 zeigte im Modell der akuten Entzündung eine proinflammatorische Wirkung und wirkte bei der chronischen Entzündung protektiv.

Auch für das Modell der Osteopontin-deletierten Maus konnten entgegengesetzte Befunde für die akute und die chronische Entzündung erhoben werden. Osteopontin ist ein Protein, welches vor allem in mineralisiertem Gewebe vorkommt und unter anderem durch aktivierte Makrophagen sezerniert wird (Gravallese 2003). Es beeinflusst die T-Zell vermittelte Immunantwort, indem eine TH-1 gerichtete Differenzierung gefördert wird (Ashkar, Weber et al. 2000; Jansson, Panoutsakopoulou et al. 2002). Osteopontin kann die intestinale Entzündungsreaktion auf zwei verschiedene Arten beeinflussen. Osteopontin-deletierte Mäuse sind während der akuten Kolitis schwerer erkrankt, zeigen eine fehlende Makrophagenaktivierung und erniedrigte Interleukin-1 β Spiegel. In der chronischen Kolitis zeigen sich die Osteopontin-deletierten Mäuse jedoch protektiert mit erniedrigten Interferon- γ und Interleukin-12 Spiegeln. Die Expression von Osteopontin hat also im akuten Modell eine protektive und im chronischen Modell eine aggravierende Wirkung (Heilmann, Hoffmann et al. 2009). Entgegengesetzt zu Osteopontin wurde bei Expression von Nlrc5 im akuten Modell des Endotoxinschocks ein fataler Verlauf und im chronischen Entzündungsmodell der DSS-Kolitis eine protektive Wirkung der Expression von Nlrc5 verzeichnet.

Unklar ist, wie diese differenzierte Immunantwort sowohl bei der *Nlrc5*-deletierten Maus als auch bei der Osteopontin-deletierten Maus ermöglicht wird. Eine Erklärung wäre eine differenzierte Antwort zwischen der durch DAMPs (*danger-associated molecular patterns*) und der durch PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) ausgelösten Immunantwort. *Danger-associated molecular patterns* sind Substanzen wie ATP, die normalerweise intrazellulär vorkommen und durch ihr extrazelluläres Vorkommen ein Hinweis auf eine Gewebeschädigung darstellen. Ihr Vorkommen führt über *Toll-like* und *Nod-like* Rezeptoren zu einer schwachen Entzündungsreaktion, welche zur Wundheilung führt. *Pathogen-associated molecular patterns* wie z.B. LPS kommen dagegen nur in Pathogenen vor und führen über die *Toll-like* und *Nod-like* Rezeptoren zu einer verstärkten Entzündungsreaktion, welche die Eliminierung der Pathogene bezwecken soll. Liu und Chen et al. konnten Sialdasen als einen möglichen diskriminierenden Faktor zwischen diesen beiden Reaktionen identifizieren. Sie postulieren einen trimolekularen Komplex aus CD24, SiglecG und einem *danger-associated molecular pattern*, welcher eine Inhibierung von *Toll-like* und *Nod-like* Rezeptoren bewirkt. Typische *pathogen-associated molecular patterns* wie LPS werden durch diese Interaktion nicht beeinflusst, was eine spezifisch verminderte Immunantwort nach der *danger-associated molecular pattern* vermittelten Aktivierung der *Nod-like* Rezeptoren und so die Diskriminierung zwischen der *danger-associated molecular pattern* (DAMP) und der *pathogen-associated molecular pattern* (PAMP) vermittelten Immunantwort ermöglicht (Liu, Chen et al. 2011).

Während der DSS-induzierten Kolitis kommt es zu einer toxischen Zellschädigung, welche zum Austritt normalerweise intrazellulär vorkommender Substanzen führt. Es kommt zu einer hauptsächlich *danger-associated molecular pattern* vermittelten Immunantwort, welche die Gewebereparatur im Rahmen der Wundheilung bezwecken soll. Durch die Zerstörung der Barriere kommt es zusätzlich zu einer Pathogenität normalerweise intraluminal vorkommender Bakterien, also einer *pathogen-associated molecular pattern* vermittelten Immunantwort (Dieleman, Palmen et al. 1998). Die *Nlrc5*-deletierten Mäuse hatten in diesem Modell der kombinierten DAMP und PAMP vermittelten Immunreaktion eine leicht aggravierte Entzündung, die Expression von *Nlrc5* schützte die Mäuse vor einer überschießenden Entzündungsreaktion.

Der Endotoxinschock mit LPS, welches normalerweise in der Membran von gramnegativen Bakterien enthalten ist, ist dagegen ein klassischerweise *pathogen-associated molecular pattern* vermitteltes Modell, also durch Strukturen vermittelt, die nur in Pathogenen und nicht im Wirt vorkommen und deshalb zu einer *pattern recognition receptor* vermittelten

Immunreaktion führen. Hier zeigte sich eine deutliche Protektion der Nlrc5-deletierten Mäuse, also eine proinflammatorische Wirkung von Nlrc5. Aufgrund der multifaktoriellen Geschehnisse bei einer Entzündungsreaktion ist allerdings kein absoluter Schutz der Nlrc5-deletierten Maus gegeben.

Folgend aus den Ergebnissen dieser Arbeit ist eine differenzierende Rolle von Nlrc5 im angeborenen Immunsystem zu vermuten. Nach einer *pathogen-associated molecular pattern* vermittelten Immunantwort kommt es zur vermehrten Aktivierung von Nlrc5 und daraufhin zu einer proinflammatorischen Reaktion. Möglich wäre eine Inhibierung von Nlrc5 nach einer *danger-associated molecular pattern* vermittelten Immunantwort z.B. durch Sialdasen. Durch diese Inaktivierung wird die proinflammatorische Funktion von Nlrc5 blockiert und es kommt zu einer weniger ausgeprägten Entzündungsreaktion. Wenn man von einer gewissen Grundaktivität von Nlrc5 ausgeht, wäre hier sogar ein antiinflammatorischer Effekt möglich.

Die gegensätzliche Reaktion der Nlrc5-deletierten Mäuse ist also durch die gegensätzliche Pathogenese der beiden Modelle zu erklären. Beide Modelle beinhalten eine bakterielle und immunologische Konfrontation mit Beteiligung der NLR Proteine. Doch ist die Aktivierung von Nlrc5 durch unterschiedliche Faktoren bedingt.

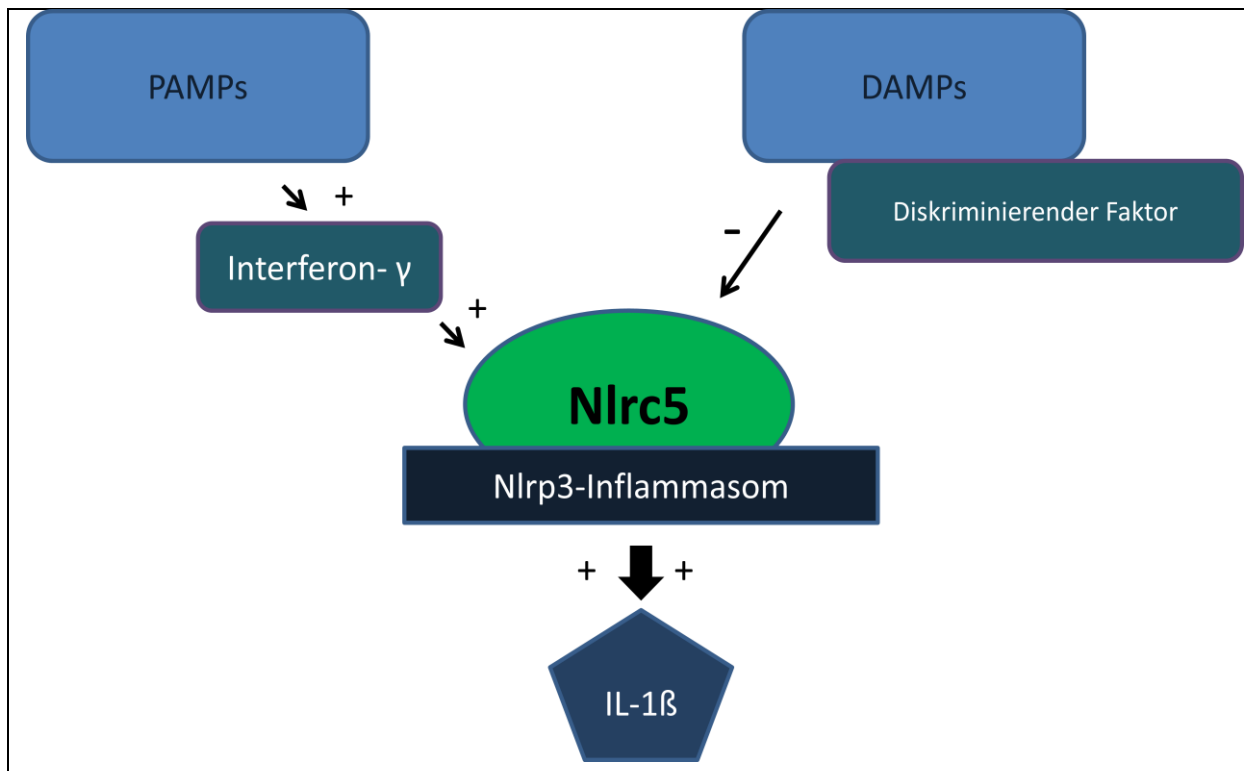


Abb. 16: Hypothetisches Modell zur Funktion von Nlr5

Dargestellt ist ein hypothetisches Modell zur Funktion von Nlr5 im angeborenen Immunsystem. Nach einer PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*) vermittelten Aktivierung z.B. via LPS (Lipopolysaccharid) kommt es zur vermehrten Interferon- γ Bildung. Dies führt zur Induktion von Nlr5, welches sich nach Davis und Roberts et al. an das Nlrp3-Inflammasom anlagert (Davis, Roberts et al. 2011). Durch diese Anlagerung an das Nlrp3-Inflammasom wird dessen Aktivität gefördert. Dies führt über die Caspase-1 zur verstärkten Interleukin (IL)-1 β Sekretion. Nach einer DAMP (*damage-associated molecular pattern*) vermittelten Immunantwort kommt es dagegen zur Inhibition von Nlr5. Hier wird ein diskriminierender Faktor vermutet wie ihn z.B. Liu und Chen in Sialdasen postulieren (Liu, Chen et al. 2011).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Deletion von Nlr5 einen deutlichen Schutz vor Interleukin-1 β vermittelten Erkrankungen und Entzündungen bietet. Der Schutz ist jedoch nicht absolut und versagt im Modell der Wundheilung.

4.6 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen auf eine wichtige proinflammatorische Rolle von Nlr5 im Immunsystem schließen. Nlr5 beeinflusst die Sekretion von Interleukin-1 β und modifiziert daher vor allem systemische Entzündungsreaktionen, die in Abhängigkeit von Interleukin-1 β entstehen. Ein anderer Aktivator von Interleukin-1 β ist das NLRP3-Inflammasom, welches mutiert zur Auslösung von autoinflammatorischen Erkrankungen führt. Weitergehende Forschungen *in vitro* zeigten deutliche Hinweise auf eine Interaktion von NLRC5 mit dem NLRP3-Inflammasom und hierzu passend eine verminderte Caspase-1 Aktivierung nach dem siRNA Knock-out von NLRC5 (Davis, Roberts et al. 2011). Hier sollten weitere Untersuchungen *in vivo* folgen, um diese Interaktion und ihre

Auswirkung besser zu verstehen. Momentan ist eine Therapiemöglichkeit der chronisch entzündlichen Erkrankungen das Eingreifen auf Höhe des Interleukin-1-Rezeptors mithilfe eines neutralisierenden Antikörpers. Anakinra wird bei rheumatischen Erkrankungen wie Morbus Still und autoinflammatorischen Erkrankungen wie dem Muckle-Wells-Syndrom vor allem bei therapierefraktären Verläufen erfolgreich eingesetzt (Fitzgerald, Leclercq et al. 2005; Kuemmerle-Deschner, Tyrrell et al. 2011).

Interleukin-1 β ist nicht nur bei bakteriellen Infektionen, sondern auch bei Virusinfektionen von Bedeutung. Diesbezüglich konnte eine Verbindung über RIG-I (*Retinoic acid inducible gene 1*), einem intrazellulären Rezeptor zur Erkennung viraler Strukturen hergestellt werden. Nach der Aktivierung von RIG-1 kommt es zum einen zu einer NF- κ B Aktivierung. Zum anderen assoziiert RIG-1 mit ASC, dem Adapterprotein beim Inflammasom, wodurch es zu einer Caspase-1 Aktivierung kommt (Poeck, Bscheider et al. 2010). Eine Verbindung zum NLRP-3 Inflammasom konnte über die *Nlrp3*-deletierte Maus hergestellt werden, die nach einer Influenza Infektion eine verminderte Immunantwort mit erhöhter Mortalität aufweist (Allen, Scull et al. 2009). In vitro konnte außerdem gezeigt werden, dass ds und ss RNA eine NLRP3 vermittelte Immunantwort auslösen. Auch für NLRC5 gibt es Hinweise auf eine Modifizierung der Immunantwort nach viraler Stimulation. Cui et al. konnten eine Inhibierung der *RIG-I like receptor* abhängigen Typ I Interferon Antwort durch NLRC5 zeigen. Außerdem führte der Knock-down von NLRC5 zu einer geringeren Anfälligkeit gegenüber dem *Vesicular stomatitis virus* (Cui, Zhu et al. 2010). Auch Benko et al. zeigten eine Hemmung der Typ I Interferon abhängigen Signalwege durch NLRC, welche von dieser Arbeitsgruppe allerdings durch eine direkte transkriptionell hemmende Wirkung auf NF- κ B und Typ I Interferon abhängige Signalwege erklärt wurde (Benko, Magalhaes et al. 2010). Widersprüchlich zu Cui et al. zeigten Neerincx et al. eine fördernde Rolle von NLRC5 im Typ I Interferon Signalweg (Neerincx, Lautz et al. 2010) und Künzel et al. auf antivirale Signalmediatoren wie ISRE und GAS und Interferon- α (Kuenzel, Till et al. 2010). Auch hier wäre wie bei den bakteriellen Stimulationen eine differenzierende Rolle von *Nlrc5* möglich. Ein besseres Verständnis der Signalkaskade könnte durch ein früheres Eingreifen die Spezifität der Therapie erhöhen und so das Nebenwirkungsprofil verringern. Da der Knock-out von *Nlrc5* vor allem im Endotoxinschock eine Relevanz zeigte, ist die Rolle von *Nlrc5* im Rahmen der Sepsis und aus den oben genannten Gründen auch bei autoinflammatorischen Erkrankungen interessant.

5 Zusammenfassung

Die Familie der *NOD-like* Rezeptoren (NLR) erkennt als Vertreter der *pattern recognition* Rezeptoren intrazellulär pathogene Strukturen. Bemerkenswert sind die zahlreichen Assoziationen zwischen entzündlichen Erkrankungen und Polymorphismen in den Genen dieser Gruppe. Der in dieser Arbeit untersuchte Vertreter dieser Familie – *Nlrc5* – ist strukturell mit Genen wie *NOD2* verwandt, die durch ihre enge Korrelation mit entzündlichen Erkrankungen klinische Relevanz erlangten. Zur Untersuchung von *Nlrc5* wurde für diese Arbeit eine transgene Maus generiert, um die Rolle dieses Gens für systemische und epitheliale Entzündungen genauer zu klären. Die Untersuchung von *Nlrc5* in Wildtyp-Mäusen zeigte eine vermehrte Expression in der Lunge und eine Regulation durch Interferon- γ . Die Charakterisierung der *Nlrc5*-deletierten Maus ergab sowohl serologisch als auch histologisch ohne Provokation keine relevanten Unterschiede zur Vergleichsgruppe der C57BL/6 Wildtyp-Mäuse, weshalb unterschiedliche Entzündungsmodelle angewandt wurden. Im Endotoxinschock, der durch eine intraperitoneale Injektion von LPS ausgelöst wurde, zeigten die *Nlrc5*-deletierten Mäuse eine bessere Überlebensrate und niedrigere Interleukin-1 β und TNF- α Werte im Blut als die Vergleichsgruppe der C57BL/6 Wildtyp-Mäuse. Die Zytokinwerte konnten auch bei der Stimulation von Makrophagen *in vitro* mit LPS bestätigt werden. Bei der DSS-induzierten Kolitis, einem Modell für Morbus Crohn, war der Krankheitsverlauf der *Nlrc5*-deletierten Mäuse dagegen aggraviert. Die Krankheitsaktivität wurde dabei durch die Parameter Gewichtsverlauf, Disease Activity Index (Gewicht, Stuhlkonsistenz, rektale Blutung), Milzgröße und einem endoskopischen Score nach Koloskopie ermittelt. Es zeigten sich bei der Untersuchung des Kolons erhöhte Interleukin-1 β - und Interleukin-18-Spiegel.

Diese Arbeit stellt einen Zusammenhang zwischen *Nlrc5* und Interleukin-1 β her und deutet auf eine proinflammatorische Rolle des untersuchten Gens im akuten Entzündungsmodell hin. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen von Davis et al., der eine Interaktion zwischen NLRC5 und dem NLRP3-Inflammasoms zeigen konnte. Desweiteren ergaben sich Hinweise auf eine differenzierende Rolle von *Nlrc5* im angeborenen Immunsystem. Möglich wäre eine verstärkte Aktivierung von *Nlrc5* nach einer durch *pathogen-associated molecular patterns* vermittelten Immunantwort und eine Inhibierung nach einer *damage-associated molecular patterns* vermittelten Immunantwort. Die Regulation von *Nlrc5* sollte zukünftig genauer untersucht werden, um dessen pathogenetische Bedeutung für eine Vielzahl an Erkrankungen wie zum Beispiel autoinflammatorischen Syndrome zu identifizieren und therapeutisch beeinflussen zu können.

Literaturverzeichnis

- Akira, S., S. Uematsu, et al. (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.
- Allen, I. C., M. A. Scull, et al. (2009). "The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA." Immunity **30**(4): 556-565.
- Ashkar, S., G. F. Weber, et al. (2000). "Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity." Science **287**(5454): 860-864.
- Becker, C., M. C. Fantini, et al. (2005). "In vivo imaging of colitis and colon cancer development in mice using high resolution chromoendoscopy." Gut **54**(7): 950-954.
- Ben-Av, P., L. J. Crofford, et al. (1995). "Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis." FEBS Lett **372**(1): 83-87.
- Benko, S., J. G. Magalhaes, et al. (2010). "NLRC5 limits the activation of inflammatory pathways." J Immunol **185**(3): 1681-1691.
- Beutler, B. and A. Poltorak (2000). "Positional cloning of Lps, and the general role of toll-like receptors in the innate immune response." Eur Cytokine Netw **11**(2): 143-152.
- Buchmeier, N. A. and R. D. Schreiber (1985). "Requirement of endogenous interferon-gamma production for resolution of *Listeria monocytogenes* infection." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(21): 7404-7408.
- Budarf, M. L., C. Labbe, et al. (2009). "GWA studies: rewriting the story of IBD." Trends Genet **25**(3): 137-146.
- Car, B. D., V. M. Eng, et al. (1994). "Interferon gamma receptor deficient mice are resistant to endotoxic shock." J Exp Med **179**(5): 1437-1444.
- Champy, M. F., M. Selloum, et al. (2008). "Genetic background determines metabolic phenotypes in the mouse." Mamm Genome **19**(5): 318-331.
- Chen, G., M. H. Shaw, et al. (2009). "NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease." Annu Rev Pathol **4**: 365-398.
- Cho, J. H. (2008). "The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease." Nat Rev Immunol **8**(6): 458-466.
- Cui, J., L. Zhu, et al. (2010). "NLRC5 negatively regulates the NF-kappaB and type I interferon signaling pathways." Cell **141**(3): 483-496.
- Davis, B. K., R. A. Roberts, et al. (2011). "Cutting edge: NLRC5-dependent activation of the inflammasome." J Immunol **186**(3): 1333-1337.
- Deutsche Forschungsgemeinschaft. (2011). "Epidemien der Moderne." Dossier Gesundheitsforschung, from http://www.dfg.de/dfg_magazin/aus_der_wissenschaft/gesundheitsforschung/epidemie_n_der_moderne/index.html.
- Dieleman, L. A., M. J. Palmen, et al. (1998). "Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines." Clin Exp Immunol **114**(3): 385-391.
- Dignass, A., J. C. Preiss, et al. (2011). "[Updated German guideline on diagnosis and treatment of ulcerative colitis, 2011]." Z Gastroenterol **49**(9): 1276-1341.
- Dinarello, C. A. (2009). "Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family." Annu Rev Immunol **27**: 519-550.
- Dinarello, C. A. (2011). "Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases." Blood **117**(14): 3720-3732.
- Driscoll, K. E., J. M. Carter, et al. (1997). "Cytokines and particle-induced inflammatory cell recruitment." Environ Health Perspect **105 Suppl 5**: 1159-1164.

- Duerr, R. H., K. D. Taylor, et al. (2006). "A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene." *Science* **314**(5804): 1461-1463.
- Eicher, U. and J. C. Hoffman, Priv.-Doz. Dr. (2008). "Was können Medikamente erreichen: Remissionsinduktion/Remissionserhalt, Langzeittherapie." *Bauchredner* **2008**(04).
- Elinav, E., T. Strowig, et al. (2011). "NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis." *Cell* **145**(5): 745-757.
- Engel, M. A. and M. F. Neurath (2010). "New pathophysiological insights and modern treatment of IBD." *J Gastroenterol* **45**(6): 571-583.
- Fink, M. P., V. Fiallo, et al. (1987). "Systemic and regional hemodynamic changes after intraperitoneal endotoxin in rabbits: development of a new model of the clinical syndrome of hyperdynamic sepsis." *Circ Shock* **22**(1): 73-81.
- Fitzgerald, A. A., S. A. Leclercq, et al. (2005). "Rapid responses to anakinra in patients with refractory adult-onset Still's disease." *Arthritis Rheum* **52**(6): 1794-1803.
- Freudenberg, M. A., D. Keppler, et al. (1986). "Requirement for lipopolysaccharide-responsive macrophages in galactosamine-induced sensitization to endotoxin." *Infect Immun* **51**(3): 891-895.
- Freudenberg, M. A., T. Ness, et al. (1993). "[The role of cytokines in endotoxic shock and in endotoxin hypersensitivity]." *Immun Infekt* **21**(2): 40-44.
- Fukata, M., A. S. Vamadevan, et al. (2009). "Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders." *Semin Immunol* **21**(4): 242-253.
- Fuss, I. J., M. Neurath, et al. (1996). "Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5." *J Immunol* **157**(3): 1261-1270.
- Geddes, K., J. G. Magalhaes, et al. (2009). "Unleashing the therapeutic potential of NOD-like receptors." *Nat Rev Drug Discov* **8**(6): 465-479.
- Gravallese, E. M. (2003). "Osteopontin: a bridge between bone and the immune system." *J Clin Invest* **112**(2): 147-149.
- Hampe, J., A. Cuthbert, et al. (2001). "Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations." *Lancet* **357**(9272): 1925-1928.
- Heilmann, K., U. Hoffmann, et al. (2009). "Osteopontin as two-sided mediator of intestinal inflammation." *J Cell Mol Med* **13**(6): 1162-1174.
- Hoffman, H. M., J. L. Mueller, et al. (2001). "Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome." *Nat Genet* **29**(3): 301-305.
- Hoffmann, J. C., J. C. Preiss, et al. (2008). "[Clinical practice guideline on diagnosis and treatment of Crohn's disease]." *Z Gastroenterol* **46**(9): 1094-1146.
- Hugot, J. P., M. Chamaillard, et al. (2001). "Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease." *Nature* **411**(6837): 599-603.
- Huzarski, T., M. Lener, et al. (2005). "The 3020insC allele of NOD2 predisposes to early-onset breast cancer." *Breast Cancer Res Treat* **89**(1): 91-93.
- Ito, R., M. Shin-Ya, et al. (2006). "Interferon-gamma is causatively involved in experimental inflammatory bowel disease in mice." *Clin Exp Immunol* **146**(2): 330-338.
- Jansson, M., V. Panoutsakopoulou, et al. (2002). "Cutting edge: Attenuated experimental autoimmune encephalomyelitis in eta-1/osteopontin-deficient mice." *J Immunol* **168**(5): 2096-2099.
- Jurkovich, G. J., W. J. Mileski, et al. (1991). "Interferon gamma increases sensitivity to endotoxin." *J Surg Res* **51**(3): 197-203.
- Kaufmann, S. H. (2008). "Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff." *Nat Immunol* **9**(7): 705-712.

- Kuemmerle-Deschner, J. B., P. N. Tyrrell, et al. (2011). "Efficacy and safety of anakinra therapy in pediatric and adult patients with the autoinflammatory Muckle-Wells syndrome." Arthritis Rheum **63**(3): 840-849.
- Kuenzel, S., A. Till, et al. (2010). "The nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor NLRC5 is involved in IFN-dependent antiviral immune responses." J Immunol **184**(4): 1990-2000.
- Kumar, H., T. Kawai, et al. (2009). "Pathogen recognition in the innate immune response." Biochem J **420**(1): 1-16.
- Kumar, H., S. Pandey, et al. (2011). "NLRC5 deficiency does not influence cytokine induction by virus and bacteria infections." J Immunol **186**(2): 994-1000.
- Lamprecht, P. and W. L. Gross (2009). "Autoinflammatorische Syndrome." Der Internist **50**(6): 676-684.
- Liu, Y., G. Y. Chen, et al. (2011). "Sialoside-based pattern recognitions discriminating infections from tissue injuries." Curr Opin Immunol **23**(1): 41-45.
- Lundkvist, J., F. Kastang, et al. (2008). "The burden of rheumatoid arthritis and access to treatment: health burden and costs." Eur J Health Econ **8 Suppl 2**: S49-60.
- Magalhaes, J. G., M. T. Sorbara, et al. (2010). "What is new with Nods?" Curr Opin Immunol.
- Mahler, M., I. J. Bristol, et al. (1998). "Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis." Am J Physiol **274**(3 Pt 1): G544-551.
- Meissner, T. B., A. Li, et al. (2010). "NLR family member NLRC5 is a transcriptional regulator of MHC class I genes." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(31): 13794-13799.
- Michalek, S. M., R. N. Moore, et al. (1980). "The primary role of lymphoreticular cells in the mediation of host responses to bacterial endotoxin." J Infect Dis **141**(1): 55-63.
- Nair, R. P., A. Ruether, et al. (2008). "Polymorphisms of the IL12B and IL23R genes are associated with psoriasis." J Invest Dermatol **128**(7): 1653-1661.
- Neerincx, A., K. Lautz, et al. (2010). "A role for the human nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat-containing family member NLRC5 in antiviral responses." J Biol Chem **285**(34): 26223-26232.
- O'Brien, T. and R. Woychik (2003). "Our small relative." Nat Genet **33**(1): 3-4.
- Ogura, Y., D. K. Bonen, et al. (2001). "A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease." Nature **411**(6837): 603-606.
- Okayasu, I., S. Hatakeyama, et al. (1990). "A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice." Gastroenterology **98**(3): 694-702.
- Poock, H., M. Bscheider, et al. (2010). "Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 beta production." Nat Immunol **11**(1): 63-69.
- Reinisch, W., W. de Villiers, et al. (2010). "Fontolizumab in moderate to severe Crohn's disease: a phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled, multiple-dose study." Inflamm Bowel Dis **16**(2): 233-242.
- Renz-Polster, H. and S.-P. Aries (2006). Basislehrbuch Innere Medizin. Kompakt - greifbar - verständlich : [Online-Zugang + interaktive Extras www.studentconsult.de]. München [u.a.], Elsevier, Urban & Fischer.
- Riis, A., T. C. Martinsen, et al. (2012). "Clinical experience with infliximab and adalimumab in a single-center cohort of patients with Crohn's disease." Scand J Gastroenterol **47**(6): 649-657.
- Rook, G. A. (2010). "99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: darwinian medicine and the 'hygiene' or 'old friends' hypothesis." Clin Exp Immunol **160**(1): 70-79.

- Rosenstiel, P., C. Sina, et al. (2009). "Towards a molecular risk map--recent advances on the etiology of inflammatory bowel disease." Semin Immunol **21**(6): 334-345.
- Rosenstiel, P., A. Till, et al. (2007). "NOD-like receptors and human diseases." Microbes Infect **9**(5): 648-657.
- Rychlik, R. (2008). Kosten der Unterversorgung mit Arzneimitteln in Deutschland. Institut für Empirische Gesundheitsökonomie. G. f. d. V. f. A. e.V.
- Schreiber, S., J. Hampe, et al. (2002). "[Genetics and the environment. Has the picture become clearer?]." Internist (Berl) **43**(11): 1335-1341.
- Schreiber, S., P. Rosenstiel, et al. (2005). "Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease." Nat Rev Genet **6**(5): 376-388.
- Schroder, K., P. J. Hertzog, et al. (2004). "Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions." J Leukoc Biol **75**(2): 163-189.
- Schroder, K. and J. Tschopp (2010). "The inflammasomes." Cell **140**(6): 821-832.
- Shaw, P. J., M. F. McDermott, et al. (2011). "Inflammasomes and autoimmunity." Trends Mol Med **17**(2): 57-64.
- Shinkai, K., T. H. McCalmont, et al. (2008). "Cryopyrin-associated periodic syndromes and autoinflammation." Clin Exp Dermatol **33**(1): 1-9.
- Siegmund, B., H. A. Lehr, et al. (2002). "Leptin: a pivotal mediator of intestinal inflammation in mice." Gastroenterology **122**(7): 2011-2025.
- Simmons, A. (2010). "Crohn's disease: Genes, viruses and microbes." Nature **466**(7307): 699-700.
- So, A., T. De Smedt, et al. (2007). "A pilot study of IL-1 inhibition by anakinra in acute gout." Arthritis Res Ther **9**(2): R28.
- Strober, W. and I. J. Fuss (2011). "Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases." Gastroenterology **140**(6): 1756-1767.
- Strober, W., P. J. Murray, et al. (2006). "Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2." Nat Rev Immunol **6**(1): 9-20.
- Ting, J. P., R. C. Lovering, et al. (2008). "The NLR gene family: a standard nomenclature." Immunity **28**(3): 285-287.
- Torok, H. P., J. Glas, et al. (2006). "Genetic variants and the risk of Crohn's disease: what does it mean for future disease management?" Expert Opin Pharmacother **7**(12): 1591-1602.
- Tysk, C., E. Lindberg, et al. (1988). "Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking." Gut **29**(7): 990-996.
- Untch, M., , et al (2006). "Adjuvante Therapie mit Trastuzumab bei Mammakarzinompatientinnen." Deutsches Ärzteblatt **103**(50).
- van de Veerdonk, F. L., M. G. Netea, et al. (2011). "Inflammasome activation and IL-1beta and IL-18 processing during infection." Trends Immunol **32**(3): 110-116.
- Voronov, E., D. S. Shouval, et al. (2003). "IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2645-2650.
- Waisbren, B. A. (1964). "GRAM-NEGATIVE SHOCK AND ENDOTOXIN SHOCK." Am J Med **36**: 819-824.
- Williams, J. G., G. J. Jurkovich, et al. (1992). "Macrophage priming by interferon gamma: a selective process with potentially harmful effects." J Leukoc Biol **52**(6): 579-584.
- Yen, D., J. Cheung, et al. (2006). "IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6." J Clin Invest **116**(5): 1310-1316.
- Zaki, M. H., M. Lamkanfi, et al. (2011). "The Nlrp3 inflammasome: contributions to intestinal homeostasis." Trends Immunol **32**(4): 171-179.
- Zell, D., S. Hu, et al. (2008). "Genetic alterations in psoriasis." J Invest Dermatol **128**(7): 1614.

Zhou, R., A. Tardivel, et al. (2010). "Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation." Nat Immunol **11**(2): 136-140.

Anhang – Verwendete Materialien**Tab. 11: Verwendete Medien**

Makrophagenmedium	
Murines Makrophagen Medium	250 ml
DMEM	250 ml
Amphotericin	5 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml

Tab. 12: Verwendete Chemikalien und Zusätze

Bezeichnung	Hersteller
Amphotericin	Invitrogen, Karlsruhe
Antibiotic /antimycotic (Penicillin, Streptomycin, Amphotericin)	Invitrogen, Karlsruhe
DEPC	Sigma-Aldrich, München
Natrium-Dextransulfat (DSS)	TdB consultancy, Schweden
D-Galaktosamin	Sigma-Aldrich, München
DMEM	PAA Laboratories, Linz
Eosin	Sigma-Aldrich, München
Ethanol	Merck, Darmstadt
FBS	Sigma-Aldrich, München
Hämalaun	Sigma-Aldrich, München
Interferon- γ	Invitrogen, Karlsruhe
LPS	InvivoGen, Toulouse
LPS für i.p Injektion	Sigma-Aldrich, München
M-CSF	Immunotools, Friesoythe
Murines Makrophagen Medium	PAA Laboratories, Linz
NaCl	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS	PAA Laboratories, Linz
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Linz
RPMI-1640 Medium	PAA Laboratories, Linz
Sea Kem LE Agarose	Lonza, Köln
Smart Ladder TM Auto T4	Eurogentec, Köln
SYBR® Safe	Invitrogen, Karlsruhe
TAE	Invitrogen, Karlsruhe

Tab. 13: Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller
DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen, Hilden
Hämocult Test	Beckmann Coulter, Krefeld
Murines IL-1 β ELISA Kit	Biosource/Invitrogen, Karlsruhe
Murines IL-6 ELISA Kit	Biosource/Invitrogen, Karlsruhe
Murines IL-12 ELISA Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Murines IL-18 ELISA Kit	MBL International, Woburn
Murines KC ELISA Kit	Biosource/Invitrogen, Karlsruhe
Murines TNF- α ELISA Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Invitrogen, Karlsruhe

Tab. 14: Oligonukleotide

Primer	Sequenz	Größe	Temp. Ann.	Zyklen
GAPDH 1	For: CCAGCCGAGCCACATCGC Rev: TGAGCCCCAGCCTTCTCCAT	983bp	54°C	32
GAPDH 2	For: TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTGGC Rev: CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC	983bp	58°C	34
Nlrc5	For: CTCCAACCCTGAGGTCATCC Rev: CACTCTGGCATATCGGCTCCG	589bp	56°C	35

Tab. 15: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Nano Drop ND-1000	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Cellometer TM Auto T4	Nexcelom Bioscience, Lawrence
Endoskope SCB Xenon 175	Karl Storz, Tuttlingen
Tricam SLH	Karl Storz, Tuttlingen
Axiocam HrC	Zeiss, Jena
Axiomager 21 Mikroskop	Zeiss, Jena
GeniosPro-Plattenreader	Tecan Deutschland, Weilsheim

Danksagung

Mein Dank gilt zuallererst Frau Prof. Dr. Bianca Wittig, die mich im Rahmen dieser Doktorarbeit betreut hat und deren konstruktive Kritik immer eine große Hilfe war.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Simone Lipinski bedanken, die vor allem beim experimentellen Teil dieser Arbeit eine hervorragende Betreuung geleistet hat und mich aus vielen schwierigen Situationen retten konnte.

In diesem Rahmen bedanke ich mich auch bei Frau Dr. Olga Gavrilova und bei Dr. Christian Sina für deren Hilfe bei den Mausexperimenten.

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Philip Rosenstiel für die hervorragenden Bedingungen, die ich im Labor vorgefunden habe.

Danke sage ich außerdem den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Zellbiologie im Institut für klinische Molekularbiologie und hier insbesondere Alina Graeff, Tanja Kaacksteen, Melanie Schlapkohl und Maren Reffermann.

Außerdem bedanke ich mich bei Miriam Stratenschulte, Sven Künzel, Nils Grabe, Janne Böck und Julia Saphörster für den Austausch, die viele Hilfe und die schöne Zeit im Labor der Zellbiologie.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei Sebastian Goldschagg für die Geduld bei planmäßig aber auch häufig unplanmäßig ausfallenden gemütlichen Abenden und die liebe Unterstützung revanchieren.

Lebenslauf**NICOLINA LARA BÖTTCHER**

Alte Lübecker Chaussee 35
24113 Kiel

PERSÖNLICHE ANGABEN

Geburtsdatum	14.10.1986
Geburtsort	Kiel
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

AUSBILDUNG

1993 – 1997	Brüder-Grimm-Grundschule, Kronshagen
1997 – 2006	Gymnasium Kronshagen
2006-2012	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
2008	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note 1.5

PROMOTION

2009-2012	Doktorarbeit in der Klinik für Innere Medizin I, Kiel „Die Bedeutung der Nlrc5 Knock-out-Maus in unterschiedlichen Entzündungsmodellen des angeborenen Immunsystems“
-----------	--

PUBLIKATIONEN

06/2012	Vortrag „Funktionelle Bedeutung von Nlrc5 in Entzündungsmodellen des angeborenen Immunsystems“ auf der 25. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
---------	--

FAMULATUREN

03/2007	Innere Medizin, Krankenhaus Buchholz i.d. Nordheide
08/2009	Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Kiel
03/2010	Kardiovaskuläres Praktikum, Rhön Klinikum, Bad Neustadt a. d. Saale
08/2010	Innere Medizin, Whangarei Hospital, Neuseeland
10/2010	Orthopädie, Orthopaedicum in Kiel
03/2011	Gynäkologie, Frauenärzte Prüner Gang

PRAKTISCHES JAHR

08/2012 – 12/2011	Chirurgie, FEK Neumünster
12/2011 – 02/2012	Neurologie, Paraplegikerzentrum Balgrist, Schweiz
02/2012 – 04/2012	Neurologie, Segeberger Kliniken
04/2011 – 07/2012	Innere Medizin, Universitätsklinikum Kiel