

Aus dem Institut für klinische Molekularbiologie
(Direktoren: Prof. Dr. Schreiber, Prof. Dr. Rosenstiel, Prof. Dr. Franke)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel an der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

FUNKTION VON NALP6 IM
ENTZÜNDUNGSPROZESS IM RAHMEN
DER EXPERIMENTELLEN CHRONISCHEN
KOLITIS UND SEPSIS AM MAUSMODELL

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

vorgelegt von
Miriam Isabel Emons (geb. Stratenschulte)
aus **Berlin**

Kiel 2015

1. Berichterstatter: Frau Professor Dr. Almut Nebel

2. Berichterstatter: Frau Dr. Annegret Fischer

Tag der mündlichen Prüfung: 9.11.2015

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

gez.: (Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	6
1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	7
1.2 Entzündung	8
1.3 Das angeborene Immunsystem	10
1.4 Toll-like-Rezeptoren	12
1.5 Die <i>retinoic acid inducible gene-1 (RIG-I)-like RNA</i> -Helikasen (RLH) .	13
1.6 Nod-like Rezeptoren	13
1.7 Nalp3	14
1.8 Interleukine	15
1.9 Das Inflammasom	15
1.10 Das NALP3 Inflammasom und die chronische Kolitis	17
1.11 NALP6 /PYPAF5	18
1.12 Fragestellung	18
2 Material und Methoden	20
2.1 Das Mausmodell	20
2.2 Tierversuche	21
2.2.1 Phase 1: Murines Colitis Modell	21
2.2.2 Phase 2: Sepsis-Modelle	23
2.2.3 Klinischer Score (<i>Disease Activity Index, DAI</i>)	24
2.2.4 Mauspräparation	24

2.2.5	Histologie	25
2.3	Zellbiologische Methoden	26
2.3.1	Zelllinien	26
2.3.2	Isolierung primärer muriner Kolonepithelzellen	28
2.3.3	Isolierung primärer muriner Knochenmarkszellen (Bone Mar- row Derived Macrophages (<i>BMDM's</i>))	28
2.3.4	Isolierung gemischter muriner Milzzellen (<i>mixed Splenocytes</i>)	30
2.3.5	Bestimmung der Zellzahl	30
2.3.6	Aussaat und Ernte der Zellen	31
2.3.7	Transfektion von eukaryotischen Zellen	32
2.4	Molekularbiologische Methoden	33
2.4.1	Agarose-Gelelektrophorese	33
2.4.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	34
2.4.3	Isolierung von Gesamt-RNA	34
2.4.4	Qualitätskontrolle der RNA	35
2.4.5	cDNA-Synthese	36
2.4.6	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	37
2.5	Proteinbiochemische Methoden	39
2.5.1	Herstellung von Gesamtproteinlysaten	39
2.5.2	Quantitative Proteinbestimmung	39
2.5.3	Western Blot	40
2.5.4	Koimmunopräzipitation	44
2.5.5	ELISA	45
2.6	Statistische Auswertung	46
2.6.1	Varianzanalyse (Anova) eines multiplen linearen Modells .	46
2.6.2	Kaplan-Meier-Plot und Überlebenszeitanalyse mittels Cox Proportional-Hazard Methode	47
2.6.3	Lineares <i>Mixed-Effects</i> Modell	47
2.6.4	<i>Student-t-Test</i>	48

3	Ergebnisse	49
3.1	In Vivo-Versuche	49
3.1.1	Basale Phänotypisierung der <i>Nalp6</i> ^{-/-} -Maus	49
3.1.2	Chronische Kolitis	52
3.1.3	Endotoxin-Schock	56
3.1.4	CLP-Sepsis	57
3.2	In vitro-Versuche	60
3.2.1	Expressionsanalyse von <i>NALP6</i>	60
3.2.2	Bestimmung der Zytokinausprägung mittels RT-PCR	64
3.2.3	Bestimmung der Zytokine mittels ELISA in verschiedenen Geweben	65
3.2.4	Die Bedeutung von <i>Nalp3</i> und <i>Nalp6</i> im Inflammasom	70
4	Diskussion	73
4.1	Wahl der Methoden und Evaluation der Entzündungsmodelle	74
4.2	Verhalten der <i>Nalp6</i> ^{-/-} -Tiere im Entzündungsmodell	75
4.2.1	Die Regulation der proinflammatorischen Zytokine in der <i>Nalp6</i> ^{-/-} -Maus	77
4.3	Funktion von <i>Nalp6</i> im Entzündungsprozess	81
4.4	Ausblick	83
5	Zusammenfassung	85
	Abbildungsverzeichnis	87
	Tabellenverzeichnis	93
	Literatur	94

1 Einleitung

Entzündungen sind die physiologische Reaktion des Immunsystems auf Moleküle, Bakterien und Viren, die dem Körper schaden. Die hohe Zahl von Patienten, die allein in Deutschland an einer chronischen Entzündungskrankheit wie Asthma bronchiale, Multiple Sklerose oder Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis leiden, zeigt, dass Fehler in diesem komplexen System aus Homöostase der körpereigenen Zellen und Bekämpfung schädlicher Einflüsse verheerende Folgen haben können. Besonders die Organe, die eine Grenzfläche zwischen dem Körperinneren und der Außenwelt darstellen, wie die Haut, die Lunge und der Darm, sind von diesen Entzündungen betroffen. Die damit einhergehenden Krankheitsbilder sind unter anderem die Sarkoidose an der Lunge, die Psoriasis an der Haut und die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. Die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) stellen eine ernstzunehmende Krankheitsentität dar, da viele Menschen betroffen sind und die Krankheit, neben einem hohen Leidensdruck bei den Patienten, erhebliche sozio-ökonomische Folgeschäden mit sich bringt. Charakteristisch tritt CED im jungen Erwachsenenalter auf und begleitet daher die Patienten während ihres gesamten Berufslebens. Ein Fragebogen-Survey von 2010 erfasste 1083 CED-Patienten aus Deutschland, deren Durchschnittsalter bei 42 Jahren und deren mittlere Erkrankungsdauer bei 13 Jahren lagen. 52% fühlten sich von Stress stark beeinträchtigt, ein Drittel litt unter starker Erschöpfung und jeweils 25% gaben schwere Einschränkungen in verschiedenen Bereichen sozialer Teilhabe an, sowie stark oder sehr stark unter

der Erkrankung zu leiden (Hardt u. a., 2010).

Die Kosten für die Behandlung wurden in der Bundesrepublik Deutschland für das Jahr bei M. Crohn-Patienten auf 3.767 Euro und bei Colitis ulcerosa-Patienten auf 2.478 Euro im Jahr geschätzt (Prenzler u. a., 2011). Damit liegen die jährlichen Behandlungskosten bei knapp einer Milliarde Euro. Die volkswirtschaftlichen Kosten in Europa werden auf 2,1 bis 16 Milliarden Euro geschätzt (Yu u. a., 2008).

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Etwa 320.000 Menschen in Deutschland leiden an einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa (Bokemeyer, 2007). Menschen, die von dieser Erkrankung betroffen sind, leiden an schubweise auftretenden Darmentzündungen, die sich durch zum Teil blutige Durchfälle, Bauchschmerzen, Fieber und Gewichtsverlust äußern (Crohn, Ginzburg und Oppenheimer, 1984). Histologisch manifestieren sich beide Erkrankungen in Form einer mononukleär geprägten, chronisch-destruierenden Entzündung. Die Lebenszeitprävalenz in Nordamerika und Nordwesteuropa liegt konstant bei 0,2% (Binder, 2004). Während die Inzidenz der Infektionskrankheiten im letzten Jahrhundert deutlich gesunken ist, ist sie bei den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen weiter angestiegen (Bach, 2002). Sie liegt in Nordamerika und Europa deutlich höher als in anderen Teilen der Erde. Außerdem steigt die Inzidenz in den Ländern signifikant an, die sich zu einem westlichen Lebensstil hin entwickeln (Loftus, 2004), sodass man davon ausgeht, dass unter anderem die gestiegenen hygienischen Bedingungen in der Kindheit eine Rolle spielen (Hampe u. a., 2003; Gent u. a., 1994).

Als Grenzfläche spielt der Darm bei der Immunabwehr eine besondere Rolle. Die Darmschleimhaut wird von einer vielfältigen Mikroflora besiedelt, die noch

nicht vollständig charakterisiert ist (Bäckhed u. a., 2005). Hier muss der Körper zwischen nützlichen Bakterien und pathogenen Keimen unterscheiden. Daher bildet die Darmschleimhaut nicht nur eine physikalische, sondern auch eine immunologische Barriere, wobei die intestinalen Epithelzellen eine große Bedeutung haben (Rosenstiel u. a., 2009). Experimentelle Daten zeigen, dass die Durchlässigkeit der epithelialen Barriere bei Betroffenen, aber auch bei deren gesunden Verwandten erhöht ist (Katz u. a., 1989; Irvine und Marshall, 2000). So beobachtet man bei Patienten mit CED eine erhöhte intramukosale Bakteriendichte, die eine mögliche Folge dieser gestörten Barrierefunktion sein könnte (Xavier und Podolsky, 2007).

Sowohl für M. Crohn als auch für Colitis ulcerosa ist eine genetische Disposition gesichert (Schreiber u. a., 2005; Henckaerts u. a., 2008). Trotz dieser klaren genetischen Assoziation ist aber auch erwiesen, dass durch die genetische Prädisposition höchstens 20% des individuellen Erkrankungsrisikos erklärt werden können (Kaser, Zeissig und Blumberg, 2010). So belegen Zwillingsstudien eine multifaktorielle Genese, bei der auch Umweltfaktoren und immunologische Faktoren eine Rolle spielen (Thompson u. a., 1996; Tysk u. a., 1988). Da die genaue Ursache bis heute nicht bekannt ist, kann die Krankheit auch nicht kausal behandelt werden (Rosenstiel u. a., 2009).

1.2 Entzündung

Entzündung ist eine Reaktion auf einen, zunächst lokalen Gewebeschaden. Die Ursache können mikrobielle Erreger wie Viren und Bakterien sein, aber auch chemische Substanzen, physikalische Faktoren und Immunreaktionen. Der verursachte Gewebeschaden führt zur Freisetzung von Immunmediatoren, die eine Reihe vaskulärer und zellulärer Reaktionen in Gang setzen: den Entzündungsprozess. Die Entzündungsreaktion wird durch verschiedene Mechanismen ver-

mittelt. Die zellulären Mediatoren verursachen eine Vasodilatation, fördern die endotheliale Leukozytenadhäsion, hemmen die Plättchenaggregation und haben zum Teil einen zytotoxischen Effekt sowohl auf Bakterien als auch auf körpereigene Zellen. Die zellulären Effektoren des Immunsystems sind unter anderem Lymphozyten. So spielen beispielsweise die CD8⁺-Lymphozyten in der Lunge eine entscheidende Rolle in der Abwehr von viralen Erkrankungen der Atemwege (de Bree u. a., 2005).

Eine lebensbedrohliche Form einer Entzündung ist die Sepsis. Sie ist eine komplexe systemische inflammatorische Reaktion auf eine Infektion und wird durch pathogene Mikroorganismen und deren Produkte (z. B. Endo- und Exotoxine) ausgelöst. Dies führt zu einer endogenen Bildung und Ausschüttung von humoralen und zellulären Mediatoren. In Abgrenzung zu einer Infektion ist sie dadurch gekennzeichnet, dass es dem Wirt nicht gelingt, die inflammatorische Reaktion lokal zu begrenzen (Moerer und Quintel, 2009). Ausgangspunkt einer Sepsis ist bei bakteriellen Erkrankungen ein lokaler Entzündungsherd, wie der Urogenitaltrakt oder auch der Magen-Darm-Trakt, der als Sepsisherde oder Eintrittspforte bezeichnet wird. Die Bakterientoxine verursachen direkt oder über Mediatoren Störungen der Durchblutung (Mikrozirkulationsstörungen bis hin zum generalisierten septischen Kreislaufschock) und Fieber.

Die Inzidenz der schweren Sepsis in Deutschland liegt bei 110/100.000 Einwohner, das entspricht 79.000 erkrankten Patienten pro Jahr. Weitere 75.000 Patienten erleiden einen septischen Schock. Beide Erkrankungen gehen mit einer hohen Letalität von 40-56% einher (Engel u. a., 2007). Etwa 60.000 Menschen sterben pro Jahr an einer Sepsis oder einem septischen Schock. Damit sind diese Erkrankungen die dritthäufigste Todesursache hinter der koronaren Herzkrankheit und dem Myokardinfarkt (Moerer und Burchardi, 2006). Die Kosten der Sepsis für die Gesellschaft betragen zwischen 3,6 und 7,8 Milliarden Euro pro Jahr (Moerer und Quintel, 2009; Angus u. a., 2001).

1.3 Das angeborene Immunsystem

Die Aufgabe des Immunsystems ist es, den Körper vor Infektionen zu schützen. Säugetiere verfügen dazu über zwei ineinander greifende Systeme: das angeborene und das erworbene Immunsystem. Während das erworbene Immunsystem, das phylogenetisch jünger ist, eine immunologische Prägung voraussetzt, ist das angeborene Immunsystem in der Lage, ohne vorherigen Kontakt mit dem jeweiligen Krankheitserreger zu reagieren und so Bakterien und Viren schnell abzuwehren. Eine der wesentlichen Aufgaben des Immunsystems ist es also, körpereigene und harmlose Substanzen von körperfremden und potenziell gefährlichen Substanzen zu unterscheiden, um auf letztere entsprechend reagieren zu können. Die Zellen des erworbenen Immunsystems durchlaufen deshalb einen langen Reifungs- und Lernprozess, in dem autoaggressive Immunzellen ausgesondert werden. Die Immunzellen erlernen dadurch eine Toleranz gegenüber körpereigenen Zellen. Es stellt sich deshalb die Frage, wie es dem angeborenen Immunsystem, das keinerlei Prägung erfährt, gelingt, diese Unterscheidung vorzunehmen.

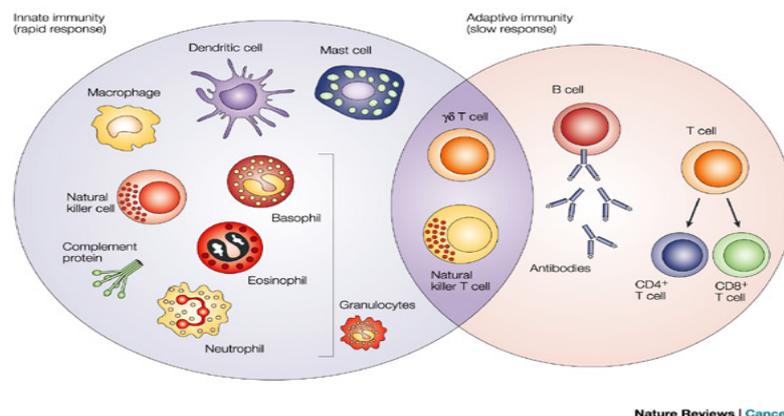


Abbildung 1.1 – Schematische Darstellung des angeborenen und des erworbenen Immunsystems (Dranoff, 2004)

Das angeborene Immunsystem verfügt über vier Kategorien der Abwehr. Anatomische und physiologische Barrieren (wie zum Beispiel Epithelien), spezialisierte Zellen (beispielsweise Monozyten und Phagozyten), das Komplementsystem

tem und als letztes allgemeine entzündliche Reaktionen. Die Akteure der unspezifischen Abwehr verfügen über Rezeptoren, die unter anderem Bestandteile von Bakterien und Viren wahrnehmen können. Diese werden als *pathogen associated molecular patterns* (sogenannte *PAMPs*) bezeichnet und die entsprechenden, keimbahn-kodierten Rezeptoren als *PRRs* (*Pathogen Recognition Receptors*) (Medzhitov, 2001). Sie gliedern sich in drei Familien: die Toll-like Rezeptoren (*TLRs*), die *Nod-like-Rezeptoren* (*NLRs*) und die *RIG-I-like-Rezeptoren* (*RLRs*). Da das angeborene Immunsystem aber auch in der Lage ist, zwischen harmlosen und schädlichen Bakterien zu unterscheiden, muss es noch weitergehende Erkennungsmechanismen geben. Es wird davon ausgegangen, dass dies unter anderem durch Gefahrensignale geschieht, die von den Zellen bei Infektionen, Gewebeschäden oder Gewebeverlust durch Zelltod oder Zellschäden abgesondert werden, wie zum Beispiel ATP oder ein erhöhter Kaliumspiegel. Diese Moleküle werden als *DAMPs* (*Danger Associated Molecular Pattern*) bezeichnet (Martinon, 2008). Die Erkennung von *PAMPs* oder *DAMPs* führt zu einer Sekretion von proinflammatorischen Proteinen (Ghosh und Karin, 2002).

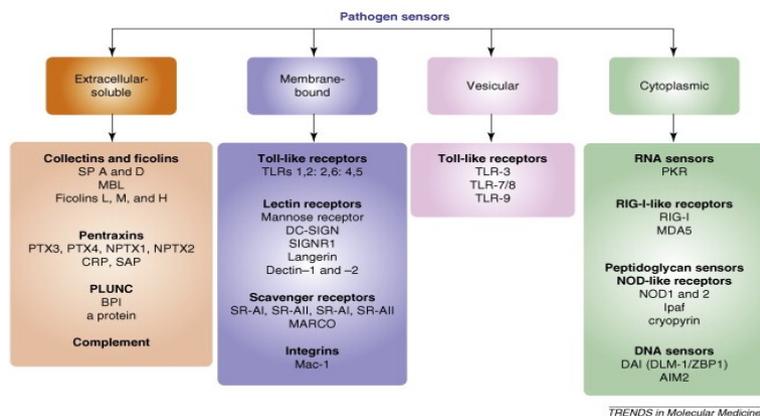


Abbildung 1.2 – Schematische Darstellung der verschiedenen Pathogensensoren (Ranjan u. a., 2009)

1.4 Toll-like-Rezeptoren

Die Toll-like Rezeptoren sind membrangebundene Proteine, die an der Zelloberfläche oder an endosomalen Komponenten exprimiert werden. Sie erkennen Bakterien, Viren, Fungi, Protozoen und einige der sogenannten Gefahrensignale. Zurzeit sind neun humane *TLRs* beschrieben (Takeda und Akira, 2005; Takeda, Kaisho und Akira, 2003). Davon sind fünf in der Zellmembran verankert und vier endosomal lokalisiert. *TLRs* weisen alle eine charakteristische Domänenstruktur auf. Auf der dem Lumen zugewandten Seite besitzen sie eine *Leucine-Rich-Repeats*-Domäne (*LRR*-Domäne), welche als Sensor für extrazelluläre *PAMPs* dient. Im Zytosol befindet sich eine Toll/IL-1R (*TIR*) Domäne, die bei Kontakt der *LRRs* mit einem entsprechenden Liganden zytosolische Signale über homologe Interaktionen weiterleitet. Diese Domäne aktiviert verschiedene Signalwege, wie zum Beispiel den NF- κ B (nuclear factor kappaB)-Signalweg (Moynagh, 2005; Takeda und Akira, 2005). Sie sind in der Lage, trotz begrenzter Anzahl von Rezeptoren und Signalwegen, eine differenzierte und vielfältige Immunreaktion einzuleiten.

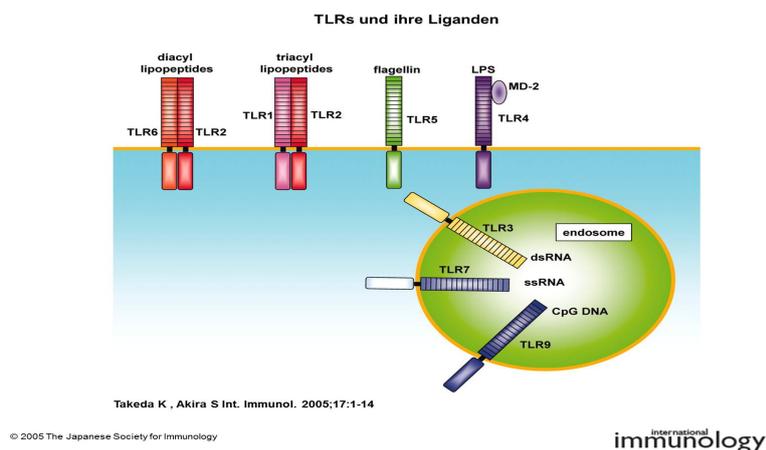


Abbildung 1.3 – Darstellung der Toll-like Rezeptoren und ihrer Liganden (Takeda und Akira, 2005)

1.5 Die *retinoic acid inducible gene-1 (RIG-I)-like RNA-Helikasen (RLH)*

Eine weitere Gruppe von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems sind die *RLHs*. Sie bilden sogenannte intrazelluläre Sensoren für doppelsträngige RNA (dsRNA) (Yoneyama u. a., 2004; Kang u. a., 2002) und können dadurch Viren erkennen. Dabei zeigt die *RLH*-Familie bei der viralen Antwort Ähnlichkeiten zu den antiviralen Signalaktivierungen von *TLRs* (Meylan und Tschopp, 2006).

1.6 Nod-like Rezeptoren

Eine weitere Gruppe der *Pathogen Recognition Receptors (PRRs)* bilden die *Nod-like Rezeptoren (NLRs)*. Sie liegen im Zytosol und erkennen sowohl mikrobielle Bestandteile, wie intrazelluläres Flagellin, als auch Moleküle, die bei Zellstress freigesetzt werden, unter anderem ATP und Kalium. Sie bilden damit einen nachgeschalteten Mechanismus im Rahmen der Immunabwehr, indem sie auf fremde und potenziell schädliche Moleküle reagieren, die die Zellwand durchdrungen haben. Die von den *NLRs* hervorgerufenen Reaktionen überschneiden sich mit denen der *TLRs*. Beide Rezeptoren induzieren proinflammatorische Reaktionen und können auch zu inflammatorischer Apoptose, entzündungsbedingtem programmiertem Zelltod, führen (Rosenstiel, Till und Schreiber, 2007). Allein im menschlichen Genom sind zurzeit 22 Mitglieder der *NLR*-Familie beschrieben, wobei nur ein kleiner Teil bisher charakterisiert wurde. Die Abbildung 1.4 zeigt eine Auswahl der verschiedenen humanen und murinen *NLRs*.

Im Allgemeinen zeichnet sich die Proteinfamilie durch eine konservierte dreiteilige Domänenstruktur aus: eine aminoterminal liegende *effector-binding domain (EBD)*, eine zentral lokalisierte NACHT-Domäne und carboxyterminal eine *ligand recognition domain (LRD)*.

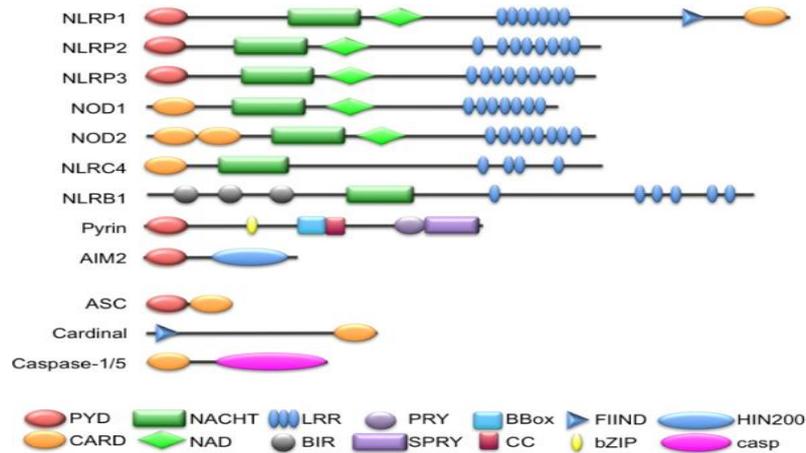


Abbildung 1.4 – Domänenstruktur verschiedener *NLR*-Proteine (Khare u. a., 2010)

Die *NLRs* werden anhand ihrer N-terminalen Bindungsdomäne in mehrere Untergruppen eingeteilt: die NODs, die eine CARD-Domäne tragen, die NAIPs, die eine BIR-Domäne tragen, und die NALPs, mit einer N-terminalen PYD-Domäne. Den verschiedenen Bindungsdomänen werden unterschiedliche Funktionen zugeschrieben. Sowohl die BIR- als auch die CARD- und die PYD-Domäne sollen Protein-Protein-Bindungen vermitteln.

Zu den bisher am besten untersuchten *NLRs* zählen NOD2 und NALP3. Der Rezeptor NOD2 wird überwiegend in Monozyten ausgebildet und erkennt den Bakterienwandbestandteil Muramyldipeptid (MDP) mittels der c-terminalen LRR-Domäne. Mutationen im NOD2-Gen, die zu einer Veränderung der LRR-Domäne des Rezeptors führen, gehen mit einer erhöhten Anfälligkeit für M. Crohn einher, wie bereits vor einigen Jahren gezeigt werden konnte (Hampe u. a., 2001; Hugot u. a., 2001). In den intestinalen Epithelzellen wird NOD2 durch TNF- α und IFN- γ hochreguliert (Rosenstiel u. a., 2003).

1.7 Nalp3

Nalp3 trägt eine N-terminale Pyrindomäne und wird überwiegend in Leukozyten ausgebildet. Es spielt eine Rolle bei der Bildung von IL-1 β aus der Vorstu-

fe pro-IL-1 β (Agostini u. a., 2004) Es interagiert mit dem Protein ASC (*apoptosis-associated speck-like protein*) und bildet einen Multiproteinkomplex, der zur Aktivierung von Caspase-1 führt: das Inflammasom (siehe 1.9).

1.8 Interleukine

Zytokine sind Glykoproteine, die Wachstum und Differenzierung anderer Zellen regulieren. Einige von ihnen sind ebenfalls Mediatoren der Entzündungsreaktion und vermitteln lokal zwischen den Immun- und den Zielzellen. Sie haben aber auch systemische Wirkung: Sie üben Kontrollfunktionen über biologische Aktivitäten der Immunzellen aus. Zu ihnen gehören unter anderem Zytokine (Interferone, Interleukine, Tumornekrosefaktoren, Chemokine und koloniestimulierende Faktoren) (Bonizzi und Karin, 2004) und antimikrobielle Peptide (Defensine, Cathelicidine) (Kaiser und Diamond, 2000). Die Interleukin (IL)-1 Familie spielt bei der Vermittlung von Entzündung und vor allem von autoentzündlichen Geschehen eine wesentliche Rolle. Aufgrund der Vermittlungsrolle von IL-1 β bei autoinflammatorischen Erkrankungen ist es das am besten untersuchte Mitglied der Interleukin-1 Familie.

1.9 Das Inflammasom

Der Begriff „Inflammasom“ wurde 2002 geprägt, um einen Multiproteinkomplex zu beschreiben, der sich im Zytosol befindet (Martinon, Burns und Tschopp, 2002). Er besteht aus einem NLR-Protein, dem Adaptorprotein ASC („apoptosis-associated speck-like protein“) und aus aktivierter Caspase-1. Da das Inflammasom zwischen schädlichen und unschädlichen Bakterien unterscheiden kann, wird vermutet, dass es auf PAMPs in Verbindung mit Gefahrensignalen reagiert, die von Zellen bei ihrem Tod freigesetzt werden, wie zum Beispiel ATP und Ka-

lium. Durch die proteolytische Aktivität der Caspase-1 spaltet diese molekulare Plattform eine Reihe von Proteinen, ohne dafür klassische Signalpeptide zu benötigen. Inzwischen sind eine Reihe verschiedener Inflammasome beschrieben, wie beispielsweise das Nalp1-Inflammasom (Martinon, Burns und Tschopp, 2002) und das *NLRC4*-Inflammasom (Miao u. a., 2010). Das am besten untersuchte Inflammasom ist NALP3. Es setzt sich aus einem *NALP3*-Protein, ASC und aktiver Caspase-1 zusammen. Die Aktivierung der Caspase-1 bewirkt die Reifung von Zytokinvorstufen zu den aktiven Zytokinen IL-1 β und IL-18 (Martinon und Tschopp, 2007). IL-1 β ist als endogenes Pyrogen bekannt und spielt eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung von Entzündungen und Fieber (Martinon, 2008).

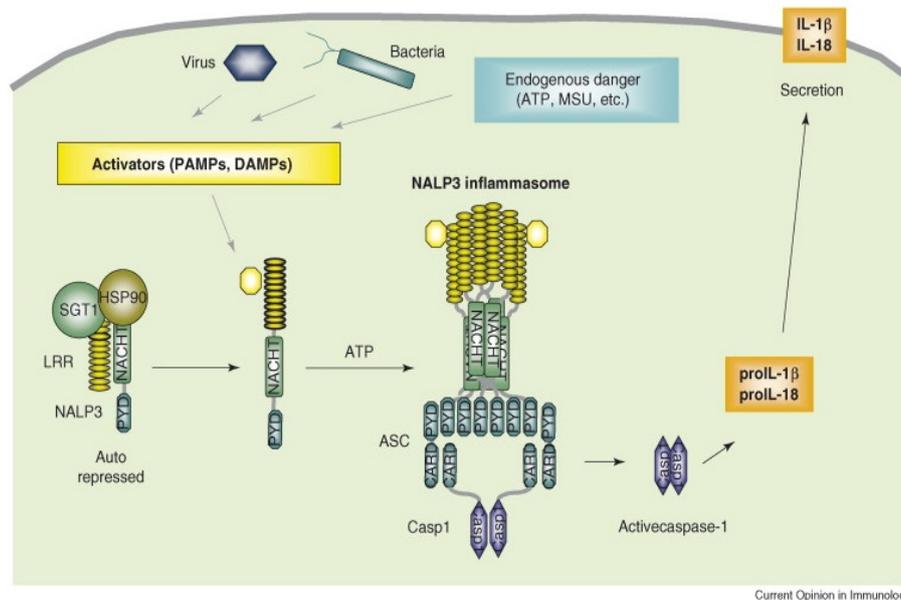


Abbildung 1.5 – Aktivierung des NALP3-Inflammasoms (Martinon und Tschopp, 2007)

Um die Funktionsweise des Inflammasoms zu verstehen, ist es von besonderer Bedeutung, die Moleküle zu identifizieren, die es aktivieren. Zu den bekannten Aktivatoren für das NALP3-Inflammasom zählen unter anderem Kalium, ATP, Harnsäure, Asbest, Silikon und Aluminium, wie es auch in Adjuvantien für Impfstoffe vorkommt, sowie Hemozoin, das Toxin der Malaria sowie der Bakterienbestandteil MDP (Eisenbarth u. a., 2008; Gasse u. a., 2009; Martinon u. a., 2004;

Dostert u. a., 2008). Diese Stoffe werden in der Kategorie der *PAMPs* zusammengefasst. Mutationen, die zu einer Funktionssteigerung oder Deregulierung von NALP3 führen, verursachen bei Menschen periodische Fiebersyndrome wie zum Beispiel das Muckle-Wells-Syndrom, das *familial cold autoinflammatory syndrome* (FCAS) und das *chronic infantile neurological cutaneous and articular* (CINCA) syndrome, das auch als *neonatal-onset multisystem inflammatory disease* (NOMID) bezeichnet wird (Hoffman u. a., 2001). Die Symptome dieser erblichen Syndrome sind auf eine erhöhte Produktion von IL-1 β und IL-18 zurückzuführen, welche die Episoden systemischer Entzündung bei den Patienten verursachen (Martinson, 2008).

1.10 Das NALP3 Inflammasom und die chronische Kolitis

Jüngste Studien (Zaki u. a., 2010; Bauer u. a., 2010) haben gezeigt, dass das Nalp3 (*NLRp3*)-Inflammasom nicht nur bei den bereits beschriebenen autoaggressiven Fiebersyndromen wie dem *Muckle-Wells-Syndrom*, sondern auch bei der Pathogenese der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen eine entscheidende Rolle spielt. Die genaue Rolle ist jedoch weiter umstritten. Bei den vorliegenden Studien wurden *Nalp3*^{-/-}-Mäuse mit Dextran-Natriumsulfat (DSS) behandelt, das bei oraler Aufnahme toxisch auf die Darmschleimhaut wirkt und so eine Entzündungsreaktion hervorruft. Bauer und Kollegen beschreiben, dass die *NLRp3*^{-/-}-Mäuse eine schwächere Entzündungsreaktion ausbilden sowie niedrigere Spiegel an proinflammatorischen Zytokinen und eine geringere Sterblichkeit aufweisen als die Wt-Kontrolltiere (Bauer u. a., 2010). Gleichzeitig wurde von Zaki et al. in einer vergleichbaren Studie gezeigt, dass *NLRp3*^{-/-}-Mäuse bei DSS-Gabe eine stärkere Entzündungsreaktion ausbilden und eine höhere Sterblichkeit aufweisen (Zaki u. a., 2010).

1.11 NALP6 /PYPAF5

NALP6, auch bekannt als PYPAF5, gehört ebenfalls zur NALP-Familie der NOD-like Rezeptoren. Es setzt sich aus folgenden Domänen zusammen: PYD-NACHT-NAD-LRR. NALP6 wird in Granulozyten und T-Zellen exprimiert. Es liegt auf dem gleichen Genlocus wie der *Angiotensin Vasopressin V2*-Rezeptor (AVR). Entgegen früherer Untersuchungen (Albrecht u. a., 2003), scheint es sich jedoch um zwei unterschiedliche Proteine zu handeln, die lediglich eine Sequenzüberschneidung aufweisen (Herrera u. a., 2008). Die genaue Rolle von NALP6 im Entzündungsprozess ist bisher nicht vollständig entschlüsselt worden. Da es in Verbindung mit ASC NF- κ B aktivieren kann (Grenier u. a., 2002), liegt die Überlegung nahe, dass es ebenfalls ein Inflammasom bilden oder mit anderen Inflammasomen interagieren könnte. Seit Beginn der Experimente für diese Arbeit 2009 konnten einige neue Erkenntnisse über die Rolle von NALP6 gewonnen werden. So scheint Nalp6 im Kolon stärker exprimiert zu sein als in anderen Geweben und einen protektiven Effekt gegenüber der DSS-induzierten Kolitis zu haben (Chen u. a., 2011; Elinav u. a., 2011). Diese Arbeiten beschreiben einen entzündungshemmenden Effekt von Nalp6 im Rahmen der DSS-induzierten Kolitis und zeigen, dass die Nalp6^{-/-}-Mäuse stärkere Entzündungsreaktionen ausbilden. Weiterhin wird in den vorliegenden Arbeiten von einem NALP6-Inflammasom gesprochen, die genaue Struktur dieses Inflammasoms bleibt aber unklar (Elinav u. a., 2011).

1.12 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit soll die Rolle von Nalp6 im Entzündungsprozess untersucht werden. Anhand eines Nalp6^{-/-}-Mausmodells werden die Unterschiede zwischen dem Entzündungsverhalten der *Knockout*-Tiere und der Vergleichstiere dargestellt und die Ergebnisse durch *in-vitro* Untersuchungen an humanen Zelllinien ergänzt. Aufgrund der entscheidenden Rolle, die NOD2 bei der

Entwicklung von M. Crohn spielt, und der erwiesenen Aktivierung von IL-1 β durch Nalp3 werden zwei Entzündungsformen beispielhaft ausgewählt und untersucht: die chronische Colitis als lokalisierte Entzündung, als Modell für die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen beim Menschen, und die Sepsis als generalisierte Entzündung, der im klinischen Alltag auf Grund ihrer Häufigkeit, der hohen Letalität für die Patienten und auch den damit verbundenen hohen volkswirtschaftlichen Kosten eine besondere Bedeutung zukommt. Die vorliegende Arbeit wird versuchen, folgende Punkte weiter zu entschlüsseln:

1. Sind Nalp6-defiziente Tiere vor Entzündungen geschützt oder gar stärker betroffen als Wildtyp-Tiere?
2. Welchen Einfluss hat NALP6 auf die Zytokinausschüttung im Rahmen der Entzündungsreaktion?
3. Lassen sich Stimuli identifizieren, welche die Regulation von Nalp6 beeinflussen?
4. Bildet Nalp6 ein eigenes Inflammasom?
5. Eine funktionelle Bedeutung von NALP3 bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen ist bereits bewiesen. Lässt sich auch eine funktionelle Interaktion zwischen NALP6 und NALP3 nachweisen?

2 Material und Methoden

Eine tabellarische Übersicht der verwendeten Antikörper, Chemikalien, Enzyme, Kits und Primer sowie die Puffer- und Medienzusammensetzungen findet sich im Anhang.

2.1 Das Mausmodell

Um die aufgestellte Hypothese zu untersuchen, wurde auf ein Tiermodell zurückgegriffen. *In vitro*-Untersuchungen stellen eine starke Reduktion der Komplexität des Organismus dar und die Wirkungsweise von Substanzen lässt sich nur in einzelnen Zellpopulationen erfassen. Deshalb ist eine Darstellung komplexer Signalwege und Interaktionen innerhalb verschiedener Zellpopulationen, wie sie im Verlauf der immunologischen Prägung stattfinden, nicht möglich. Erst in einem *in vivo*-Modell zeigt sich, ob sich die Hypothese auf einen komplexen Organismus übertragen lässt. Eine umfassende Literaturrecherche vor Stellung des Tierversuchsantrags ergab, dass keine Ergebnisse zu der dargestellten Fragestellung vorlagen. Die Versuche wurden an C75BL6- Sv129 Hybridmäusen durchgeführt. Diese Tierspezies ist hinsichtlich ihrer Anatomie, Biochemie und Neurophysiologie bestens charakterisiert und daher für die durchgeführten Versuche geeignet.

Alle verwendeten Tiere wurden gemäß den Tierhaltungsvorschriften im Kleintierstall der Christian-Albrechts-Universität Kiel untergebracht, lebten in einem

12-Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus und erhielten eine Standarddiät sowie H₂O ad libitum. Die *Nalp6*^{-/-}-Mäuse wurden im Rahmen eines NGFN-Projektes in Zusammenarbeit mit der Firma Genoway (Frankreich) generiert und eigens für Tierversuche gezüchtet. Die Gendefizienz wurde mittels PCR überprüft. Knockout- und Wildtypmäuse wurden in einem ausgewogenen Geschlechterverhältnis in den Experimenten verwendet. Die Tötung wurde per Genickbruch durchgeführt. Dieser Tod tritt innerhalb von Sekunden ein und steht in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz. Alle Experimente wurden gemäß den Tierschutzbestimmungen der CAU Kiel durch Fr. Dr. med. vet. Olga Gavrilova beziehungsweise unter ihrer Aufsicht ausgeführt (Vote No. V 362-72241.121-33 (63-7/05)).

2.2 Tierversuche

2.2.1 Phase 1: Murines Colitis Modell

Die Zerstörung der epithelialen Barriere im Darmlumen von Mäusen kann durch das Polymer Dextransodiumsulfat (DSS) erreicht werden. Es wirkt direkt toxisch auf die Basalzellen in den Krypten der Kolonmukosa und wird von Makrophagen aufgenommen. Dies führt zu einer Zerstörung der intestinalen Barrierefunktion. Durch die Einwanderung von Bakterien und anderen Noxen in die Submukosa kommt es zu einem dauerhaften entzündlichen Geschehen im Darm (Fukata u. a., 2005). Es induziert in hoher Konzentration reproduzierbar Kolitiden mit schweren Diarrhöen, Ulzerationen und Granulozyteninfiltration, die hauptsächlich in den transversalen und distalen Bereichen des Kolons auftreten. In niedriger, zyklisch verabreichter Konzentration, entsteht eine der chronischen Entzündung ähnelnde Immunreaktion.

Chronische DSS-Kolitis

Die Induktion der chronischen DSS-Kolitis erfolgt durch zyklische Verabreichung von 2%-DSS-Lösung über das Trinkwasser. Den 8x2 (16) *Nalp6^{-/-}*-Tieren der Versuchsgruppe und den entsprechenden 8x2 (16) Wildtyp-Kontrollen (C57BL6/ sog. „Littermates“) wird die DSS-Lösung (2%) in 3 Zyklen nach folgendem Schema verabreicht:

1. Zyklus: 5 Tage DSS (2%) in Wasser gefolgt von 5 Tagen Wasser
2. und 3. Zyklus: wie 1. Zyklus

Damit ist nach 30 Tagen der Versuch abgeschlossen. Alle Kohorten erhalten die Standard-Trockenfutter-Diät des Tierstalls. Am Ende des Versuchs werden die Tiere getötet und das Gewebe aufgearbeitet. Pro Kohorte wird ein gemischtes Geschlechterverhältnis angestrebt (n=5 pro Geschlecht). Zwei Stunden vor Versuchsende wird den Tieren Bromdesoxyuridin (BrdU) in einer Dosierung von 10 µl/g Körpergewicht (Verdünnung 0,1 g/10 ml) intraperitoneal appliziert. Hierbei handelt es sich um ein Thymidinanalogon, welches während der Synthesephase des Zellzyklus kompetitiv in die DNA inkorporiert wird. Spezifische Antikörper gegen BrdU werden eingesetzt und der gebundene Antikörper kann dann am histologischen Schnitt mittels immunhistochemischer Methoden nachgewiesen werden. Die Kontrollgruppe wird zur gleichen Zeit mit normalem Trinkwasser versorgt und am Ende des Versuches gemeinsam mit den DSS-Tieren getötet.

2.2.2 Phase 2: Sepsis-Modelle

Injektionsmodell-Endotoxinschock

Es wird eine einmalige Gabe von LPS i.p. durchgeführt. Kontrolle: i.p. Applikation von 200 µl PBS. Dosierung: 0,5 µg/1 LPS (055:B5 Escherichia coli; 3.000.000 EU/mg)

Cecal Ligation and Puncture

Bei der CLP wird das Zäkum unterhalb der Mündung des terminalen Ileums in das Colon ascendens abgebunden und anschließend mit einem Venenverweilkatheter der Größe 18G punktiert. Dadurch soll eine kontinuierliche Freisetzung von Bakterien aus dem Darm in das Peritoneum sichergestellt werden. Diese setzt eine Entzündungsreaktion in Gang und erhält sie aufrecht. Die Eingriffe wurden unter Betäubung durchgeführt. Für die Narkose wurden Ketamin und Xylazin als intraperitoneale Injektion eingesetzt. Die OP am Tier wurde an beheizbaren Kleintier-OP-Tischen (37°C) durchgeführt, um Hypothermie zu vermeiden. Nach dem Eintreten der Narkose (Toleranz-Stadium) wurde bei den Tieren eine Laparotomie durchgeführt. Mit zwei Wattestäbchen wurde nun der Zäkalpol aufgesucht und das Zäkum vorsichtig herausluxiert. Anschließend wurde das Zäkum unterhalb der Mündung des Ileums mit Ethicon 5/0 ligiert, ohne den Faden dabei zu fest zu ziehen, so dass das Zäkum vom distalen Ende aus betrachtet auf einer Länge von ca. 1,5 cm abgebunden wurde. Mit der 20G -Kanüle wurde jetzt die antimesenteriale Seite des ligierten Zäkums einmal punktiert, so dass Faeces austreten konnte. Nach diesem Vorgehen wurde das Peritoneum mit den Muskelschichten vernäht und anschließend die Haut verschlossen. Die Operationszeit betrug ca. 20 Minuten pro Tier. Nach der Laparotomie wurden die Tiere auf Wärmekissen gebracht, um einer Unterkühlung vorzubeugen.

2.2.3 Klinischer Score (*Disease Activity Index, DAI*)

In der humanmedizinischen Forschung gibt es eine Vielzahl valider Indizes, um die Aktivität von Krankheiten zu objektivieren. Für den adaptierten Mäuse-Score wurden unterschiedlich viele Punkte für die vorher definierten Parameter „Gewichtsabnahme in Prozent“, „Stuhlkonsistenz“ und „rektale Blutung“ verteilt, anschließend pro Tag und Maus addiert und der Mittelwert gebildet (siehe Tabelle 1.1).

Tabelle 2.1 – Disease Activity Index (DAI)

Punkte	Gewichtsabnahme (%)	Stuhlkonsistenz	Rektale Blutung
4	>20	klebt am Anus	positiv
3	11-20		
2	6-10	schmierig	Hämocult positiv
1	1-6		
0	0	normal geformte Pellets	negativ

2.2.4 Mauspräparation

Am Ende des Versuches wurden die Mäuse aller Kohorten per Genickbruch getötet, um Organe zur Untersuchung zu entnehmen. Die Mäuse wurden desinfiziert bevor das Fell und die Körperfaszie durch einen Mediansagittalschnitt eröffnet und die Bauchmuskulatur durchtrennt wurden. Die Proben für histologische und molekularbiologische Untersuchungen wurden wie folgt entnommen:

- zentrale Blutentnahme: Der Thorax wurde parasternal eröffnet. Mit einer 22G-Kanüle auf einer 5ml-Spritze wurde Blut aus dem Herzen entnommen, in ein Reaktionsgefäß mit Serumkügelchen überführt und gut gemischt. Anschließend wurde das *Tube* für 10 Minuten bei 3800 rpm zentrifugiert. Das Serum wurde in ein neues *Tube* überführt und bei -20°C für weitere Versuche eingefroren.

- Aus Leber und Milz wurden ca. 30 mg schwere Stücke entfernt, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Für andere Experimente wurden aus den Milzen gemischte Splenozyten isoliert.
- Kolon und Ileum: Das Intestinum wurde ab dem Magen mobilisiert und *in toto* entnommen. Stuhlreste wurden entfernt und der Darm mit PBS und darin gelöstem Penicillin und Streptomycin gespült. Nach der Längenbestimmung des Kolons wurden kleine Stücke aus dem Ileum, dem proximalen, medialen und distalen Kolon entnommen und in *Tubes* überführt. Die ilealen, proximalen und distalen Kolonfragmente wurden zur RNA- und Proteinisolation in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Das mediale Stück wurde für die Kolonkultur verwendet oder in 4%igem PFA fixiert und später für die Immunhistochemie in Paraffin eingebettet.

2.2.5 Histologie

Vorbereitung

Die Organe wurden wie beschrieben entnommen und in 4%- bzw. 1%-Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert, um die ursprüngliche Architektur des Gewebes zu erhalten. Die Organstücke wurden in Paraffin eingebettet und mit einem Mikrotom in 4,5 µm dicke Scheiben geschnitten, auf einen Objektträger transferiert, danach luftgetrocknet und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (Xylolersatz 2x10 Minuten; 100% Ethanol 2x5 Minuten; 90% Ethanol 5 Minuten; 80% Ethanol 3 Minuten; 70% Ethanol 3 Minuten; 50% Ethanol 3 Minuten; Aqua dest. 5 Minuten) entparaffiniert.

Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung

Die Objektträger mit den Schnitten wurden 5 Minuten in Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Anschließend wurden sie mit fließendem Leitungswasser für 10-15 Minuten gespült, um das überflüssige Farbsubstrat zu entfernen. Nach erfolgreicher Färbung erscheint das Zytoplasma rosa, während Zellkerne blau-lila erscheinen. Es folgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% Ethanol 5 Sekunden; 80% Ethanol 5 Sekunden; 90% Ethanol 5 Sekunden; 100% Ethanol 2x5 Minuten; Xylolersatz 3 Minuten) und das Eindeckeln mit einem Deckglas.

2.3 Zellbiologische Methoden

Als Zellkultur bezeichnet man tierische oder humane Zellen, die in einem Nährmedium außerhalb des Organismus kultiviert werden. Unter *in-vitro*-Bedingungen muss für die isolierten Zellen eine Umgebung geschaffen werden, in der Proliferation, Wachstum, Differenzierung und Ausübung von typischen Zellfunktionen möglich sind. Dies erfordert die Zufuhr essentieller Nährsubstanzen, die Neutralisierung von Abfallprodukten und den Schutz vor mikrobieller Kontamination. Deshalb wurde bei der Arbeit mit Zellkulturen stets auf sterile Bedingungen geachtet und es wurden ausschließlich sterile Materialien, Puffer und Medien verwendet. Die Arbeitsschritte wurden an einer Sicherheitswerkbank (HeraSafe, Heraeus Instruments GmbH, Hanau) durchgeführt.

2.3.1 Zelllinien

Zelllinien sind Zellen einer Gewebeart, die sich innerhalb der Zellkultur unbegrenzt vermehren können. Es werden sowohl immortalisierte Zelllinien als auch primäre Zellen kultiviert (Primärkultur). Als Primärkultur bezeichnet man eine nicht immortalisierte Zellkultur, die direkt aus einem Gewebe gewonnen wurde. Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Krebszelllinien wurden von der

Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) bezogen und in Nährmedium bei 37°C und 5 % (v/v) Kohlendioxid (CO₂) kultiviert.

Tabelle 2.2 – Verwendete Zelllinien und Kulturmedien

Zelllinie (DMSZ Nr.)	Zelltyp	Eigenschaften	Kulturmedium
Caco-2 (ACC 169)	human colon adenocarcinoma	adhärent, epithelial	MEM + 20 % FCS
HEK-293 (ACC 305)	human embryonal kidney	adhärent, epithelial	DMEM +
HT-29 (ACC299)	human colon adenocarcinoma	adhärent, epithelial	DMEM + 10 % FCS

Zur visuellen Überprüfung der Konfluenz und Morphologie der Zellkultur wurde ein Inversmikroskop (h500, Hund, Wetzlar) verwendet. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80 % überführt. Dazu wurden die anheftenden Zellen mit warmem PBS (Gibco, Eggenstein) gewaschen und 5 min bei 37°C mit Trypsin/EDTA-Lösung (Invitrogen, Karlsruhe) belassen. Durch Zugabe von FCS-haltigem Medium (PAA, Linz, Österreich) wurde die Ablösung der Zellen angehalten. Anschließend wurde die Zellsuspension in 50-ml Röhren (Falcon, Heidelberg) überführt und bei 1.700 U/min zentrifugiert. Hierfür wurde auf die Varifuge 3.0R, Heraeus (Kendro Laboratory Products Sorvall® und Heraeus® Laborgeräte, Langenselbold) zurückgegriffen. Das dadurch entstandene Zellpellet wurde in 5 ml Medium resuspendiert und entweder direkt in definierter Zelldichte für die entsprechenden Experimente ausgesät oder bei einer Verdünnung von 1:4-1:6, in 25 ml-Kulturflaschen (Falcon, Heidelberg) überführt. Die Zellen wurden maximal bis zur 25. Passage verwendet und einmal pro Monat auf Kontamination mit Mykoplasmen untersucht.

2.3.2 Isolierung primärer muriner Kolonepithelzellen

Für die Messung von Zytokinen wurden murine intestinale Epithelzellen aus dem Kolon von Wildtyp und *Nalp6*^{-/-}-Mäusen isoliert. Hierzu wurde das Gewebe nach Entnahme des Darms zweimal mit PBS gespült und in 10 ml HBSS + 1,5 mM EDTA (ohne Ca²⁺, Mg²⁺) für 10 min bei 37°C leicht geschüttelt. Der Überstand wurde in ein 15 ml Röhrchen überführt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt. Das übrige Gewebe wurde in 3 ml PBS aufgenommen, kurz gevortext, der Überstand mit dem vorherigen Überstand vereinigt und 1 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen und zur anschließenden Kultivierung in Medium überführt.

2.3.3 Isolierung primärer muriner Knochenmarkszellen (Bone Marrow Derived Macrophages (BMDM's))

Da *Nalp6* vorwiegend in Immunzellen ausgebildet wird, wurde eine Methode gewählt, mit der Makrophagen in Kultur gebracht werden können. Hierfür eignen sich *bone marrow derived macrophages* (BMDM's). Dies sind primäre Makrophagen, die in Anwesenheit von M-CSF in Kultur gebracht werden. M-CSF ist ein Zelllinien-spezifischer Wachstumsfaktor, der für die Proliferation und die Differenzierung von myeloischen Vorläuferzellen zu Makrophagenkulturen sorgt. Mäuse mit einem funktionellen M-CSF-Verlust haben einen Mangel an Makrophagen und Osteoklasten und leiden unter Osteoporose. M-CSF wird von L929-Zellen freigesetzt. Deshalb kann Überstand von L929-Zellen als Medium für die Kultivierung von BMDMs genutzt werden

Ausgangsprotokoll

Zu Beginn der Versuche wurde auf das in der Arbeitsgruppe etablierte Protokoll zurückgegriffen. Hierbei wurden die Femorae und Tibiae der Mäuse, nach

Tötung durch zervikale Dislokation, abgetrennt und mit einer Feinpunktionsnadel mit L-929 Medium ausgespült. Die Zellen einer Extremität wurden jeweils in einer 10 ml Petrischale aufgefangen. Diese wurde mit L-929 Medium aufgefüllt und bei 37°C in den Brutschrank gestellt. An Tag 3 und Tag 7 wurde das Medium gewechselt, anschließend wurden die Zellen gezählt und ausgesät.

Neues Protokoll, verändert nach A. Rittger

Da die Ergebnisse nicht immer konstant und gut vergleichbar waren, wurde auf ein anderes Protokoll umgestellt. Dieses hatte Andrea Rittger freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Es wurde angepasst und für einen Teil der Versuche übernommen: Hierzu wurde ein spezielles Makrophagenmedium angesetzt, das zur Hälfte aus PAA Makrophagenmedium und zur anderen Hälfte aus DMEM-/- besteht. Dieses wurde mit 50µg/ml Penicillin/Streptomycin und 25 µg/ml Amphotericin versetzt. Nachdem Femorae und Tibiae weitgehend von Gewebe befreit worden waren, wurden mit diesem Medium die Hinterläufe der Mäuse mit Hilfe einer 30G Nadel ausgespült. Die Zellen wurden in einem 50 ml Röhrchen aufgefangen. Es wurden die Zellen von jeweils 2-3 Mäusen desselben Stammes in einem Röhrchen gesammelt. Anschliessend wurde jedes *Tube* auf 50 ml aufgefüllt und mit 20 ng/ml M-CSF (PreproTech) versetzt. Mit dem Pipettor wurden jeweils 12,5 ml durch ein Zellsieb auf eine P100 Platte gegeben. Anschließend wurden die Zellen bei 37° und 5% CO₂ 7-10 Tage kultiviert. Ein Mediumwechsel war nicht notwendig.

Erweitertes Protokoll

Nach einigen Durchgängen wurde das Protokoll weiter entwickelt, so dass am Ende der Versuche mit folgendem Protokoll gearbeitet wurde: Das Makrophagenmedium wurde zusätzlich mit 10% FCS versetzt, um den Zellen mehr Nährstoffe zu liefern. Nach Tötung der Tiere wurden die Extremitäten in 10 ml kaltem

RPMI-Medium mit Penicillin/Streptomycin 1:100 in einer 5 cm Petrischale aufbewahrt. Nach Abtrennung und Säuberung der hinteren Extremitäten wurden die Zellen von einem Tier in einem sterilen 50 ml-*Tube* aufgefangen und gut resuspendiert. Die Suspension wurde anschließend auf zwei 50 ml-*Tubes* verteilt und jeweils auf 40 ml aufgefüllt. Es wurden pro *Tube* 20 ng/ml (1:1000) rmM-CSF (Immunotools) hinzugegeben. Jeweils 40 ml wurden mit einem Pipettor durch ein Zellsieb auf eine unbeschichtete 50 ml Petrischale gegeben. Das entspricht 2 großen Petrischalen pro Maus. Da durch das vorangegangene Protokoll bereits gute Ergebnisse erzielt wurden und die Zellen sehr dicht gewachsen waren, wurde es notwendig, im Verlauf der 10-tägigen Kultivierungszeit einen Mediumwechsel einzufügen. In den meisten Fällen war es ausreichend, weitere 10 ml des Makrophagenmediums inklusive Penicillin, Streptomycin und Amphotericin hinzuzugeben. Wenn sich allerdings noch viele Zellen in Suspension befanden, wurde das Medium komplett gewechselt. Hierfür wurde das Medium aus 2 Petrischalen abgenommen, in einem 50 ml Falcon-*Tube* gesammelt und die Zellen bei 300g 10 Minuten zentrifugiert. Währenddessen wurden die Schalen mit je 30 ml MMM inkl. P/S/Ampho + 20 ng M-CSF/ μ l beschichtet, damit die bereits adhärennten Zellen nicht austrockneten. Die zentrifugierten Zellen wurden, nach Verwerfen des Überstandes, in 20 ml MMM incl. P/S/Ampho + 20 ng M-CSF/ μ l resuspendiert und jeweils 10 ml auf jede Schale aufgetragen.

2.3.4 Isolierung gemischter muriner Milzzellen (*mixed Splenocytes*)

2.3.5 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden Trypan-Blau (Sigma, München) und eine Neubauer-Zählkammer (VWR International, Darmstadt) verwendet. Trypan-Blau ist ein Azofarbstoff, der selektiv tote Zellen anfärbt. Sein Einsatz dient der

Vitalitätsbestimmung einer Zellpopulation.

Ein Aliquot von 10 μ l der Zellsuspension wurde mit 90 μ l Trypan-Blau-Lösung (0,4%), versetzt und 10 μ l dieser Verdünnung in die Zählkammer eingebracht. Anschließend wurden die Zellen unter einem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Zellzahl pro Milliliter wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl} = \frac{\text{Anzahl der ausgezählten Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Quadranten}} \times 1.000 \quad (2.1)$$

Zur Bestimmung der Zellzahl bei murinen intestinalen Epithelzellen und Knochenmarkszellen wurde auf Trypan-Blau und das zeitsparende, computergesteuerte Zellzählprogramm XY zurückgegriffen, da die Zellen schnellstmöglich wieder ausgesät werden müssen, um die Qualität zu erhalten.

2.3.6 Aussaat und Ernte der Zellen

Die verwendeten Zellkulturformate mit entsprechender Zellzahl und Medienvolumen sind in Tabelle (2.3) zusammengefasst.

Tabelle 2.3 – Verwendete Zellkulturformate

Experiment	Zellkulturformat	Zellzahl/well	Medienvolumen
Proteinisolierung	10cm Schale	5×10^6	10 ml
BMDMs	10cm Schale	5×10^6	12,5 ml
RNA-Isolierung	6-well-Platte	4×10^5	2 ml
ELISA	96 well-Platte	2×10^4	0,1 ml

Die Zellen wurden, wie in der Tabelle (2.3) beschrieben, ausgesät. Zur Ernte wurde die Zellkulturplatte auf Eis überführt, mit eiskaltem PBS gewaschen und die Zellen mit einem Gummischaber abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 1.200-1.800 U/min (Varifuge 3.0R von Heraeus, Hanau) sedimentiert. Danach wurden die Zellpellets entweder in den entsprechenden Puffern aufgenommen oder bei -80 °C eingefroren.

2.3.7 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Um eine erfolgreiche Transfektion zu gewährleisten, wurden die Zellen bei einer Konfluenz zwischen 50 bis 80% transfiziert.

Transfektion von Plasmid-DNA

Bei der Transfektion wird Fremd-DNA in eukaryotische Zellen eingebracht. Die Fremd-DNA, die eingeschleust werden soll, liegt in einem ringförmigen Plasmid, das als Vektor dient und so in die Wirtszelle gebracht wird. Dort wird diese DNA mithilfe der zelleigenen Enzyme vervielfältigt oder in ein Protein umgeschrieben. Durch diese Methode kann die Wirkung eines einzelnen Gens auf die Zellen relativ einfach untersucht werden. Bei den beschriebenen Experimenten wurde die Transfektion als transiente Transfektion mittels Lipofektion durchgeführt. Hierbei wird die negativ geladene DNA an der Oberfläche kationischer Lipidvesikel komplexiert und durch Fusion der Vesikel mit der Zellmembran in die Wirtszelle transferiert. Für die transiente Transfektion von Plasmid-DNA wurde Lipofectamine™ LTX (Invitrogen, Karlsruhe) für Caco2-Zellen und für alle anderen Zelllinien FuGENE® 6 (Roche, Mannheim) verwendet. Zunächst wurde die Plasmid-DNA in FCS-freiem Medium verdünnt, das Transfektions-Reagenz zugefügt und für 15-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Transfektionsgemisch wurde anschließend zu dem Zellkulturmedium in den jeweiligen Kulturschalen hinzugegeben und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Tabelle 2.4 – Verwendete Formate und Volumina für DNA Transfektionsansätze

Plattenformat	Medium (µl)	DNA (µg)	Lipofectamine™ LTX (µl/well)	FuGENE (µl/well)
10-cm-Schale	500	4	8	12
6-well-Platte	100	1	4	3

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode, bei der DNA- oder RNA-Stränge ihrer Größe nach aufgetrennt werden, um anschließend mit einem Molekül bekannter Größe verglichen zu werden. Hierzu werden die langen Fäden der Agarose durch aufkochen mit zehnfachem Auftragspuffer und anschließendem Abkühlen zu einem Gel vernetzt. Hierbei entstehen Poren in dem Agarosegel, die mit zunehmender Agarosekonzentration kleiner werden. Bei den folgenden Experimenten lag die Agarosekonzentration im Gel bei 0,5 - 2,0 (w/v), was das Auftrennen von DNA-Fragmenten zwischen 200 und 50.00 Basenpaaren (bp) ermöglicht hat. Das Gel wird auf einem Gelträger in eine mit Puffer gefüllte Kammer gelegt und, nachdem die Proben aufgetragen wurden, an Strom angeschlossen. Die DNA-Fragmente wandern nun entlang der elektrischen Strömung von x nach y. Durch die in dem Gel entstandenen Poren bleiben die DNA-Fragmente, abhängig von ihrer Größe, innerhalb des Gels hängen. Dies bezeichnet man als Gelsiebeffekt. In den beschriebenen Experimenten wurde das Gel mit Ethidiumbromid versetzt, um die Proben für eine spätere Auswertung und Dokumentation sichtbar zu machen. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und fluoresziert im UV-Licht bei 312 nm. Die DNA-Proben wurden mit zehnfachem Auftragspuffer versetzt und zusammen mit einem Marker auf die Gele aufgetragen. Die Spannung betrug konstant 90 Volt, je nach Größe der Fragmente liefen die Gele für 20 bis 60 Minuten. Zur quantitativen und qualitativen Auswertung und zur Dokumentation wurde eine UV-Geldokumentationsanlage (BioDoc Analyze, Biometra, Göttingen) verwendet.

2.4.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Um zu bestimmen, wie hoch die Konzentration an Nukleinsäuren in dem Zellysate war, wurde die Konzentration mit einem UVPhotometer (Nano Drop[®] ND 1000 Spektrophotometer, ©PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) bei 260 nm bestimmt. Zum Ausschluss von Proteinverunreinigungen, die bei 280 nm Absorption gemessen werden können, wurde der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt und es wurden nur Proben verwendet, bei denen das Verhältnis der beiden Messungen zwischen 1,6 und 2,0 lag.

2.4.3 Isolierung von Gesamt-RNA

Die RNA-Isolierung diente der Analyse der momentanen Zelltätigkeit, da nur die Gene, die gerade transkribiert wurden, als RNA vorlagen. Für die Isolierung der RNA mussten die Zellen lysiert und die ubiquitär vorkommenden Ribonukleasen (RNasen), die dem Abbau von RNA dienen, inaktiviert werden. Anschließend wurde die RNA aus dem Zellysate isoliert, sodass man ein Gemisch aus ribosomaler RNA (rRNA), Transfer-RNA (tRNA), messenger RNA (mRNA) und anderen erhielt. Dadurch konnte man anschließend mittels verschiedener Methoden die Genexpression bestimmen. Da RNasen auch auf der Haut vorkommen, musste besonders auf saubere Arbeitsbedingungen geachtet werden. Vor der Isolierung wurden der Arbeitsbereich und alle Hilfsmittel mit RNase-inaktivierenden Tüchern gesäubert. Es wurden stets saubere Handschuhe getragen, die regelmäßig gewechselt wurden.

Zur RNA-Isolierung wurde das RNeasy-Kit von Qiagen (Hilden) verwendet. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und in 350 µl RLT Puffer (supplementiert mit 10 µl/ml 2-Mercaptoethanol) lysiert. Dann wurden sie über der QiaShredder[®]-Säule (13.000 x g, 2 min, RT) zentrifugiert. Anschließend wurde das Lysat mit dem gleichen Volumen 70% Ethanol verdünnt und in die RNeasy-Säule über-

führt. Durch Zentrifugation (15 s; 8000 U/min) wurde die RNA an die Membran gebunden und danach das Eluat verworfen. Darauf folgt ein Waschschrift mit 350 µl RLT Puffer unter Zentrifugation (15 s; 8000 U/min). Anschließend wurde das Eluat durch zwei 30-minütige Inkubationen mit DNase-Lösung (10 µl DNase I in 70 µl RDD Puffer) von verbliebener genomischer DNA gereinigt. Danach wird das Lysat dreimal mit 700 µl RW1 Puffer und danach zweimal mit 500 µl RPE Puffer gewaschen und im Anschluss in ein sauberes Röhrchen überführt. Danach wurde es zum Trocknen für 2 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Die Säulenmatrix wurde nun mit 30-50 µl RNase-freiem Wasser (Qiagen) für 5 Minuten bei RT inkubiert. Die Elution der Gesamt-RNA erfolgte durch einen letzten Zentrifugationsschritt (2 min, 13.000x g) in ein frisches RNA-Röhrchen. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt.

2.4.4 Qualitätskontrolle der RNA

Um sicherzustellen, dass die RNA weder durch genomische DNA oder andere Substanzen verunreinigt noch degradiert war, musste die RNA-Qualität überprüft werden, da ansonsten die Ergebnisse der nachfolgenden Experimente verfälscht worden wären. Dazu wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Während bei intakten RNA-Proben lediglich die 18S- und 28S-rRNA-Banden zu erkennen sind, deuten zusätzliche Banden oder ein Verschmieren der rRNA-Banden auf Kontamination oder Degradation der RNA hin. Um Kontaminationen der RNA-Proben mit genomischer DNA auszuschließen, wurde eine Test-PCR mit isolierter RNA als Matrize durchgeführt. Nur RNA-Proben, bei denen keine GAPDH-Bande amplifiziert wurde, wurden für die reverse Transkription verwendet.

Tabelle 2.5 – GAPDH-Kontroll-PCR

PCR-Komponente	Volumen (µl)	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Zyklen
RNA	2,0	95	4:00	1
GoTaq TM Reaktionspuffer	5,0	95	0:30	30
GAPDH-Primer-Mix (10µM)	1,0	52	0:45	30
dNTP-Mix (jeweils 10 mM)	1,0	72	1:00	30
GoTaq TM DNA-Polymerase	0,4	72	5:00	1
Aqua bidest. ad 20 µl	10,6	4	Pause	1

2.4.5 cDNA-Synthese

Bei der Synthese von cDNA wird ein RNA-Strang, der als Matrize dient, durch das Enzym „Reverse Transkriptase“ in cDNA umgeschrieben. Für die Synthese wurde das Advantage[®] RT-for-PCR Kit (Clontech, Heidelberg) benutzt, das alle Reagenzien einschließlich der „Reversen Transkriptase“ aus dem retroviralen MMLV (*moloney-murine leukemia virus*) enthielt. Primer, die an RNA binden, starten die Reaktion. Hierzu können Oligo-dT-Abschnitte verwendet werden, die komplementär zum Poly-A-Schwanz der eukaryotischen mRNA sind oder random Hexamer Primer, die aus sechs zufällig zusammengesetzten Nukleinbasen bestehen.

Die RT-PCR dient dem Nachweis der Expression eines bestimmten Gens in dem zu untersuchenden Gewebe. Nachdem aus der RNA eine cDNA erstellt wurde, wurde diese mittels Polymerase-Kettenreaktion, wie sie 1987 von Mullis und Faloona beschrieben wurde, vervielfältigt. Hierzu ist ein genspezifischer Primer nötig, der für die beschriebenen Versuche von der Firma Eurogentec (Köln) hergestellt und so gewählt wurde, dass das entstehende Amplikon eine Länge zwischen 200 und 1000 bp aufwies. Bei der Polymerase-Kettenreaktion wird die zu vervielfältigende DNA auf 95°C erhitzt, sodass die Wasserstoffbrückenbin-

Tabelle 2.6 – Reaktionsansatz für cDNA Synthese

Komponente	Volumen [μl]	Inkubation
Gesamt-RNA	500 ng	2 min bei 70 °C
Oligo(dT)18-Primer	1,0 μ l	
Aqua bidest. (RNase-frei)	Ad 13,5 μ l	
5-fach Reaktionspuffer	4,0 μ l	1 h bei 42 °C
dNTP-Mix (jeweils 10 mM)	1,0 μ l	+
Rekombinanter RNase-Inhibitor (40 U/ μ l)	0,5 μ l	5 min bei 95 °C
MMLV-Reverse-Transkriptase (200 U/ μ l)	1,0 μ l	
Gesamtvolumen	20,0 μ l	

dungen aufgehoben und die zelleigenen Enzyme inaktiviert werden. Eine auf ihre Hitzebeständigkeit hin ausgewählte DNA-Polymerase erstellt dann mit Hilfe der Primer und der zugegeben Nukleinbasen in mehreren Zyklen Kopien der vorliegenden DNA. Als Enzym wurde die DNA-Polymerase GoTaq™ (Promega, Madison, USA) verwendet. Die Reaktion wurde in dem Gradienten Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide und Hybridisierungstemperaturen finden sich im Anhang. Um eine semiquantitative Analyse zu ermöglichen, wurde darauf geachtet, dass die Zyklenzahl so niedrig gewählt wurde, dass sie im ungesättigten Bereich lag.

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarosegel-Elektrophorese und wurde mit dem Programm ImageJ densitometrisch quantifiziert. Die Expression entsprechender Zielgene wurde als Mittelwert von mindestens zwei unabhängigen Experimenten relativ zur GAPDH-Expression berechnet.

2.4.6 Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR dient dem Nachweis der Expression eines bestimmten Gens in dem zu untersuchenden Gewebe. Nachdem wie oben dargestellt, aus der RNA eine cDNA erstellt wurde, wird diese mittels Polymerase-Kettenreaktion, wie 1987 von Mullis und Faloona beschrieben, vervielfältigt. Hierzu ist ein genspezifischer

Tabelle 2.7 – RT-PCR

PCR-Komponente	Volumen (μ l)	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [min]	Zyklen
cDNA	2	95	05:00	1
5x GoTaq TM Reaktionspuffer	5	95	00:30	33-36
Primer-Mix (jeweils 10 μ M)	1	Tanneal	00:30	
dNTP-Mix (jeweils 10 mM)	1	72	01:20	
GoTaq TM DNA-Polymerase	0,4	72	05:00	1
Aqua bidest. ad. 20 μ l	10,6	4	Pause	1

scher Primer nötig, der für die beschriebenen Versuche von der Firma Eurogentec (Köln) hergestellt und so gewählt wurde, dass das entstehende Amplikon eine Länge zwischen 200 und 1000 bp aufwies. Bei der Polymerase-Kettenreaktion wird die zu vervielfältigende DNA auf 95 $^{\circ}$ C erhitzt, sodass die Wasserstoffbrückenbindungen aufgehoben und die zelleigenen Enzyme inaktiviert werden. Eine auf ihre Hitzebeständigkeit hin ausgewählte DNA-Polymerase erstellt dann mit Hilfe der Primer und der zugegebenen Nukleinbasen in mehreren Zyklen Kopien der vorliegenden DNA. Als Enzym wurde die DNA-Polymerase GoTaqTM (Promega, Madison, USA) verwendet. Die Reaktion wurde in dem „Gradienten Thermocycler“ (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide und Hybridisierungstemperaturen finden sich im Anhang. Um eine semiquantitative Analyse zu ermöglichen, wurde darauf geachtet, dass die Zyklenzahl so niedrig gewählt wurde, dass sie im ungesättigten Bereich lag.

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarosegel-Elektrophorese und wurde mit dem kostenlosen Programm ImageJ densitometrisch bestimmt.

Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die identifizierten DNA-Banden wurden aus dem Agarosegel mit dem „Qiaquick[®] Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) eluiert. Dazu wurden die gewünschten Fragmente mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, in ein tariertes Reaktionsröhrchen überführt und gewogen. Die DNA wurde nach Herstellerangaben aus dem Gel isoliert und mit 20 bis 50 μ l Nuklease-freiem Wasser in ein sauberes

Röhrchen eluiert (1 min; 12.000 U/min).

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Herstellung von Gesamtproteinlysaten

Um die Proteine mit verschiedenen Methoden quantitativ und qualitativ analysieren zu können, wurde aus den Zellen Gesamtproteinlysate gewonnen. Hierzu wurden die am Boden haftenden Zellen, nach Abnahme des Überstandes, in 100 µl kaltem 1x DLB- Lysepuffer mit 1 % Phosphatase-Inhibitor Cocktail II (Sigma, München) und 2 % 50X Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma, München) resuspendiert. Die Lysate wurden für 5 Minuten bei 99°C aufgeköcht und anschließend mit einer Ultraschallsonde 2x5s behandelt, um die Zellen weiter zu lysieren. Danach wurden die Lysate zentrifugiert (16.000x g; 15 min; 4 °C) und der Überstand, der die Proteine enthält, in eine neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Alle weiteren Versuche wurden auf Eis durchgeführt. Die Proben wurden bei -20°C gelagert

2.5.2 Quantitative Proteinbestimmung

Für die Aussagekraft der nachfolgenden Analysen ist es wichtig, dass jede Probe den gleichen Proteingehalt aufweist. Dafür muss der Proteingehalt der erstellten Gesamtproteinlysate gemessen und anschließend die entsprechende Menge der Lysate entnommen werden. Diese Messung erfolgte nach der Methode von Bradford mit Hilfe des „DC (Detergent Compatible) Protein Assays“ (Biorad, München). Bei dieser Methode wird der Farbstoff „Coomassie brilliant blue G-250“ verwendet, der an die hydrophoben Strukturen des Proteins bindet. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm auf 595 nm. Für die Messung wurden 2µl Proteinprobe 1:5 in H₂O verdünnt und die weite-

ren Assay-Reagenzien hinzugefügt. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Die Berechnung des Proteingehalts erfolgte anhand einer BSA-Verdünnungsreihe, die mitgemessen wurde und als Eichgerade diente.

2.5.3 Western Blot

Der „Western Blot“ ist eine Methode, bei der Proteine auf eine Membran übertragen werden und dann durch Immundetektion oder andere Methoden nachgewiesen oder weiter analysiert werden können. Für die vorliegende Arbeit wurden drei aufeinander folgende Methoden verwendet, um jeweils ein bestimmtes Zielprotein nachzuweisen:

- die Auftrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese
- das eigentliche „Blotting“
- der immunologische Nachweis des Proteins durch Chemiluminiszenz

Der Name „Western Blot“ ist eine Anlehnung an den von Edwin Southern (1975) entwickelten Blot zur DNA-Detektion und wurde für den Nachweis von Proteinen erstmals durch Towbin beschrieben.

Denaturierende Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Zum Auftrennen der Proteine wurde die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli verwendet. Bei diesem Verfahren werden negativ geladene SDS-Protein-Komplexe durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Das SDS (Natriumdecylsulfat) ist ein anionisches Detergenz, das Proteine oder Proteinkomplexe bis zur Primärstruktur entfaltet und deren Eigenladung überdeckt. Weiterhin werden die inter- und intramolekularen Proteinbindungen durch 2-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT; Sigma, München) aufgehoben. Die denaturierten Proteine werden durch ihr konstantes Ladung/Masse-Verhältnis in dem Polyacrylamidnetz des Gels nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Im ersten Schritt, wurde

Tabelle 2.8 – Zusammensetzung eines Trenngels

Komponente	Größe des Zielproteins [kDa]			
	10-60	20-100	30-120	50-200
Acrylamid	15%	12%	10%	7,50%
N,N'-Methylenbisacrylamid	5 ml	4,15 ml	3,5 ml	2,5 ml
4x Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Aqua bidest.	2,5 ml	3,5 ml	4,15 ml	5 ml
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
10 % (v/w) APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

das Gel für die Elektrophorese aus den unten (Tabelle 1.12 und Tabelle 1.13) aufgelisteten Komponenten erstellt, wobei das Gel aus zwei Anteilen, einem dichteren Trenngel und einem darüber gelegenen Sammelgel besteht. Die Polymerisierungsreaktion von Acrylamid und N,N' Methylenbisacrylamid wurde durch den Radikalstarter Ammoniumpersulfat (APS) und den Polymerisierungskatalysator Tetramethylethyldiamin (TEMED) verursacht. Der Anteil an Acrylamid bestimmt die Porengröße und wurde je nach Größe des Zielproteins verändert. Die äquilibrierten Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 5xSDS-Puffer versetzt und für 5 Minuten bei 99°C eingekocht und anschließend kurz zentrifugiert. Anschließend wurden die Geltaschen mit jeweils 15 µg Protein beladen und zusammen mit einem Molekulargewichtstandard (Precision Plus Protein TM) in einer Gelkammer (Multigel G44; Biometra, München) aufgetrennt. Zunächst wurde das Gel bei 15 mA/Gel (PP 3000 High Voltage Power Pack; Biometra, München) für 30 Minuten fokussiert, damit alle Proteinladungen sich in dem Sammelgel setzen können und anschließend gleichmäßig laufen. Danach wurde das Gel für 45 bis 90 Minuten, je nach Größe des zu bestimmenden Proteins, im Trenngel bei 30 mA/Gel aufgetrennt.

Immobilisierung von Proteinen durch Elektrotransfer (Western Blot)

Die aufgetrennten Proteine wurden nun für die Immundetektion aus dem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran (Millipore, Schwalbach) gebracht. Da-

Tabelle 2.9 – Zusammensetzung eines Sammelgels

Komponente	Sammelgel (3 % Acrylamid)
N,N'-Methylenbisacrylamid	0,3 ml
4x Sammelgelpuffer	0,75 ml
Aqua bidest.	1,95 ml
TEMED	3 µgl
10 % (v/w) APS	30 µgl

zu wurden zunächst pro Gel eine PVDF-Membran und drei Whatmann-Paper in der exakten Größe des Trenngels zurechtgeschnitten. Anschließend wurden die Whatmann-Paper vor Ende der Gelelektrophorese 15 Minuten in Anoden- und Kathodenpuffer inkubiert. Die PVDF-Membran wurde durch kurzes Einlegen in Methanol aktiviert und danach für 5 Minuten in Aqua bidest äquibriert. Nach Ende der Elektrophorese wurde der Blotsandwich, bestehend aus Whatmann-Paper, Gel und PVDF-Membran zügig und luftblasenfrei zusammengesetzt und zwischen die Granitplatten der Blottingapparatur (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad, München) gelegt. Anschließend wurde, je nach Anzahl und Größe der Gele, ein Strom von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ für 55 Minuten angelegt.

Immundetektion von Proteinen durch Chemilumineszenz

Zur Detektion der Zielproteine wurden gegen das jeweilige Protein gerichtete Antikörper (Primärantikörper) auf die Membran gegeben. Anschließend wurden Sekundärantikörper, die gegen die Ursprungspezies des Primärantikörpers gerichtet waren, aufgetragen. Diese waren mit einem Enzym, der Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*), konjugiert, das nach Zugabe von Luminol und Wasserstoffperoxid die Oxidation zu 3' Aminophtalt katalysiert. 3' Aminophtalat liegt im angeregten Zustand vor und gibt bei dem Übergang in den stabilen Grundzustand Energie in Form von Licht ab. Durch geeignete Röntgenfilme ist es möglich, diese chemilumineszente Reaktion sichtbar zu machen und zu dokumentieren. Nach dem Elektrotransfer der aufgetrennten Proteine auf die PVDF-

Tabelle 2.10 – Verwendete Antikörper und Verdünnungen zur Immundetektion

Antikörper	Spezies, Typ	Verdünnung	Hersteller
α -caspase 1	Kaninchen, monoklonal	1:500	Sigma
α -flag	Maus, monoklonal	1:500	Stratagene
α -Nalp3	Maus, monoklonal	1:500	Abcam
α -Nalp6	Ziege, polyklonal	1:75	Abcam
Anti-b-Actin	Maus, monoklonal	1:5000	Sigma
Anti-goat	Kaninchen, polyklonal	1:2000	Sigma
Anti-mouse- HRP	Ziege, polyklonal	1:2000	Amersham Biosciences
Anti-rabbit- HRP	Ziege, polyklonal	1:2000	Amersham Biosciences

Membran wird diese für 1h in Magermilchpulver 5% in TTBS gelöst (MMP 5%) und bei Raumtemperatur rollend inkubiert, um unspezifische Reaktionen abzusättigen. Anschließend wird der Primärantikörper in entsprechender Verdünnung, in 5% MMP gelöst, hinzugefügt und über Nacht bei 4°C rollend inkubiert. Anschließend wird die Antikörperlösung abgegossen und die Membran wird drei Mal für 10 Minuten in TTBS gewaschen. Danach wird der Sekundärantikörper hinzugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran erneut drei Mal für jeweils 30 Minuten gewaschen. Dann wird die Membran mit ECL-Reagenz (ECL PLUS, Amersham Biosciences, Freiburg) überschichtet und drei Minuten bei RT inkubiert. Der Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences) wurde je nach Reaktionsintensität zwischen einer Sekunde und 30 Minuten exponiert und anschließend in einer Tischentwicklungsmaschine entwickelt (Curix 60, AGFA, Leverkusen). Auf der Membran gebundene Antikörper wurden durch sogenanntes „strippen“ entfernt. Dabei wurden die Antikörper durch alkalische Denaturierung für 40 Minuten bei 55°C in Stripping-Puffer entfernt und neue Zielproteine oder Haushaltsproteine (β -Aktin, GAPDH) durch eine wiederholte immunologische Behandlung nachgewiesen.

2.5.4 Koimmunopräzipitation

Die Koimmunpräzipitation (Co-IP) ist eine Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen und wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt, um die mögliche Interaktion von Nalp3 mit Nalp6 aufzuklären. Zum Präzipitieren wurden Agarose-Beads mit immobilisiertem Protein A/G (Santa Cruz, Heidelberg) sowie die in der Tabelle 1.10 dargestellten Konstrukte und Antikörper verwendet. Die Proteine, deren Interaktion nachgewiesen werden sollte, wurden zunächst in BMDM-Zellen von Wildtypmäusen überexprimiert. Die Zellen wurden in 500 μ l RIPA Lysepuffer + Phosphatase- und Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma, München) resuspendiert und durch Vortexen für 45 Sekunden weiter aufgeschlossen. Ein Preclearing-Schritt, bei dem 10 μ l Protein A/G-Agarosekügelchen zum Lysat hinzugegeben wurden, entfernte unspezifisch bindende Proteine aus dem Proteinlysat. Nach Zentrifugation (16.000x g, 15 min, 4 °C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 μ g eines monoklonalen Antikörpers versetzt, der spezifisch an GFP (Green Fluorescent Protein) bindet. Nach einer einstündigen Inkubation bei 4 °C auf einem Schüttler (Multi-Axle Rotator A257, Denley-Tech, England) wurden 25 μ l Protein A/G-Agarosekügelchen hinzugegeben und die Proben bei 4 °C über Nacht weiterinkubiert. Am folgenden Tag wurden die Agarosekügelchen abzentrifugiert (5 min, 12.000 U/min) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde dreimal mit kaltem RIPA-Puffer gewaschen und durch Zugabe von 40 μ l 2x SDS-Ladepuffer sowie fünfminütigem Aufkochen und anschließendem Zentrifugieren eluiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und mittels SDS-PAGE und Immunblot auf die Anwesenheit von präzipitierten NOD2-GFP und kopräzipitiertem DUOX2-HA überprüft.

2.5.5 ELISA

ELISA steht für Enzyme-Linked Immunosorbent Assay und ist eine Methode zum immunologischen Nachweis von Proteinen und niedermolekularen Strukturen mittels einer enzymatischen Farbreaktion. Bei den folgenden Experimenten wurde die sogenannte „Double Antibody“ oder auch „Sandwich“-Methode verwendet, bei der zwei Antikörper, die beide spezifisch an ein in der Probe vorhandenes Antigen binden, verwendet werden. Damit die beiden Antikörper sich nicht gegenseitig behindern, müssen sie an unterschiedlichen Stellen des Antigens binden. Hierfür wird der erste Antikörper auf die Platte mit den Proben aufgetragen und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wird die Probe hinzugegeben und inkubiert dann für eine Weile mit dem ersten (Coating-)Antikörper. Anschließend wird die Platte gewaschen, um die ungebundenen Teile der Probe zu entfernen. Dann wird der zweite Antikörper (Detection Antibody) hinzugegeben, der an ein anderes Epitop des Antigens bindet. Dadurch befindet sich das Antigen quasi in der Mitte der beiden Antikörper (Sandwich). Der zweite Antikörper trägt außerdem ein Enzym, meistens eine *Horseradish*-Peroxidase, dass in Verbindung mit einem geeigneten Substrat umgesetzt wird und so eine messbare farbliche, fluoreszierende oder chemilumineszente Reaktion erzeugt. Da die Absorptionsintensität proportional zur Konzentration an Peroxidase ist und diese wiederum die Menge an immobilisiertem Antigen widerspiegelt, kann über eine Standardkurve die Konzentration des jeweiligen Zytokins bestimmt werden. Für diese Arbeit wurde ELISA eingesetzt, um eine Reihe von Interleukinen in verschiedenen murinen und humanen Geweben nachzuweisen. Es wurden die Cyto Sets von Biosource (Solingen) verwendet, eine genaue Auflistung der untersuchten Interleukine und Gewebe findet sich in der unten stehenden Tabelle. Für die Bestimmung der Zytokinsekretion wurden die Überstände der entsprechend kultivierten und vorbehandelten Zellen auf eine mit Capture-Antikörper behandelte 96-well-Platte übertragen. Nach einstündiger Inkubation wurde die Platte

mit PBS-Tween gewaschen und wiederum für eine Stunde mit dem Detection-Antikörper inkubiert. Anschließend wurde nach wiederholtem Waschen das Peroxidase-Substrat hinzugegeben und die Absorption des Farbstoffs bei 450 nm mit Hilfe des GeniosPro-Plattenreaders (Tecan Trading AG, Schweiz) bestimmt.

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Beratung erfolgte durch Dr. rer. nat. Frank Kramer, Institut für medizinische Statistik, Universität Göttingen. Für die verschiedenen statistischen Tests wurde jeweils P-Werte < 0.05 als signifikant angesehen.

2.6.1 Varianzanalyse (Anova) eines multiplen linearen Modells

Mit der Varianzanalyse (Anova) lässt sich der statistische Einfluss einer oder mehrerer Einflussvariablen (unabhängige Variable) auf eine Zielvariable (abhängige Variable) überprüfen. Bei einem multiplen linearen Modell wird der Einfluss mehrerer unabhängiger Variablen auf die abhängige Variable überprüft. Um die Gewichtsverläufe während der DSS-induzierten Kolitis (s. **Abbildung 3.3a**) statistisch auszuwerten wurde deshalb auf eine solche Varianzanalyse eines multiplen linearen Modells zurückgegriffen. Hierbei stellte das Gewicht die abhängige Variable dar, der Genotyp, der Versuchstag und das jeweilige Tier stellten unabhängige Variablen dar. Bei der Auswertung der Zytokinspiegel im Blut nach LPS-Endotoxinschock (s. **Abbildung 3.19**) wurde ebenfalls eine Varianzanalyse (Anova) eines multiplen linearen Modells durchgeführt. Hierbei war die optische Dichte die abhängige und der Genotyp, die Zeit und das jeweilige Tier die unabhängigen Variablen.

2.6.2 Kaplan-Meier-Plot und Überlebenszeitanalyse mittels

Cox Proportional-Hazard Methode

Bei der Kaplan-Meier-Schätzung handelt es sich um eine nichtparametrische Schätzung des Überlebens. Es werden auch aus dem Versuch ausgeschiedene Tiere (z.B. durch Unterschreiten des Mindestgewichts) mit einbezogen und die Anzahl an Tieren, die den Endpunkt des Versuchs erlebt haben berücksichtigt. Das Regressionsmodell nach Cox untersucht das Verhalten der Ausfallraten in Abhängigkeit von unterschiedlichen Faktoren. Die Überlebenskurven der Tiere im CLP-Sepsis-Modell (s. **Abbildung 3.8a**) und beim LPS-Endotoxinschock (s. **Abbildung 3.7**) wurden nach diesem Verfahren ausgewertet wobei durch das Regressionsmodell nach Cox die beiden Gruppen *Nalp6*^{-/-} und *Wildtyp* miteinander verglichen werden konnten.

2.6.3 Lineares *Mixed-Effects* Modell

Das lineare *Mixed-Effects* Modell stellt ein gemischtes Modell dar, in dem sowohl *Fixed Effects* als auch *Random Effects* berücksichtigt sind. Bei beiden handelt es sich um lineare Paneldatenmodelle, wobei die Random Effects Analysen auf der Annahme beruhen, dass die unbeobachtete Heterogenität nicht mit den erklärenden Variablen korreliert während die Fixed Effects Analysen davon ausgehen, dass eine Korrelation zwischen der individuellen Heterogenität und der erklärenden Variablen besteht. Für die statistische Auswertung des *Disease Activity Index* (s. **Abbildung 3.3b**) wurde auf ein solches gemischtes Modell zurückgegriffen wobei der Rang des *DAI-Scores* als abhängige Variable, die Gruppe und der Zeitpunkt als unabhängige Variable sowie das Tier als *Random-Effects-Variable* betrachtet wurden.

2.6.4 Student-t-Test

Für die statistische Auswertung der übrigen Ergebnisse wurde der Zweistichprobent-Test durchgeführt. Dieser prüft an Hand der Mittelwerte zweier Stichproben ob die beiden Gruppen sich voneinander unterscheiden. Die Berechnung des *Students-t-Test* wurde mit dem kostenlosen Programm *studentsttest.com* durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 In Vivo-Versuche

3.1.1 Basale Phänotypisierung der *Nalp6*^{-/-}-Maus

Die *Nalp6*-knockout-Tiere aus dem Stamm 126-J wurden im Tierhaus der CAU Kiel über mindestens drei Generationen mit Tieren des Stammes „Black6“ gekreuzt. Die Wildtyp Kontrolltiere stammen lediglich aus dem Stamm BL6. die Transgenität wurde mittels RT-PCR bestätigt (s. **Abbildung 3.1**).

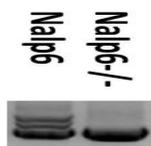


Abbildung 3.1 – RT-PCR von *Nalp6*- und *Nalp6*^{-/-}-Mäusen. Die DNA wurde aus den Schwanzspitzen isoliert. Bei den *Nalp6*-Tieren zeigen sich Banden nach den Vorgaben der Firma Genoway, bei dem funktionierenden Knockout zeigen sich keine Banden. Exemplarische Darstellung von n=1. Jedes in die Versuche eingeschlossene Tier wurde vorher einzeln auf den vorhandenen Knockout getestet.

Die Tiere lebten in einem normalen 12-stündigen Hell- und Dunkelzyklus und vertrugen sowohl Nahrung als auch das Trinkwasser. Beide Mausstämme zeigten weder spontane Kolitiden oder spontan auftretende Tumoren noch andere pathologische Zeichen. Das Wachstum und die Gewichtsentwicklung sowie die Fortpflanzung der *Nalp6*^{-/-}-Tiere waren mit den Wildtypmäusen (*Nalp6*-littermate Kontrolltieren) vergleichbar. Der Stuhl war von fester Konsistenz und pelletartig

geformt.

Das im Routinelabor des UKSH bestimmte Blutbild wies keine Unterschiede zwischen den Wildtyp- und den *Nalp6*^{-/-}-Tieren auf (s. **Tabelle 3.1 und 3.2**). Die in **Abbildung 3.2** dargestellten Schnitte verschiedener Darmabschnitte und der Leber zeigten keine Unterschiede zwischen den *Nalp6*^{-/-}-Tieren und den Wildtyp-Kontrollen.

Tabelle 3.1 – Blutbild *Nalp6*^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den Normwerten (Ewringmann, 2008)

Laborwerte	Normwerte	<i>Nalp6</i> ^{-/-}
Hämoglobin (g/dl)	10-16	12,84
Hämatokrit (%)	36-49	42,06
Erythrozyten (10 ⁶ /μl)	7-11,5	7,97
Leukozyten (10 ³ /μl)	4-12,5	4,81
Thrombozyten (10 ³ /μl)	400-980	397,11

Tabelle 3.2 – Klinische Chemie *Nalp6*^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu C57BL6-Mäusen (Mittelwert, angepasst nach (Zur, 2005))

Laborwerte	Normwerte	<i>Nalp6</i> ^{-/-}
Natrium (mmol/l)	156,5	146,14
Kalium (mmol/l)	4,49	5,23
Kalzium (mmol/l)	2,07	2,25
Harnstoff (mg/dl)	49,9	51,63
Kreatinin (mg/dl)	0,20	0,13
Harnsäure (mg/dl)	1,56	1,33
Gesamtbilirubin	0,29	<10
AST (U/l)	51	128,17
ALT (U/l)	24,5	34,94
LDH (U/l)	307	462,80
CK (U/l)	162,5	887,83
Glucose (mg/dl)	146,5	419,33
Triglyzeride (mg/dl)	102	82,83
Eiweiß (g/dl)	4,0	4,17
Cholesterin (mg/dl)	82	77,40

Die histologische Untersuchung zeigte in HE-gefärbten Präparaten keine Un-

terschiede zwischen den *Nalp6*^{-/-}-Tieren und den Wildtyp-Kontrollen.

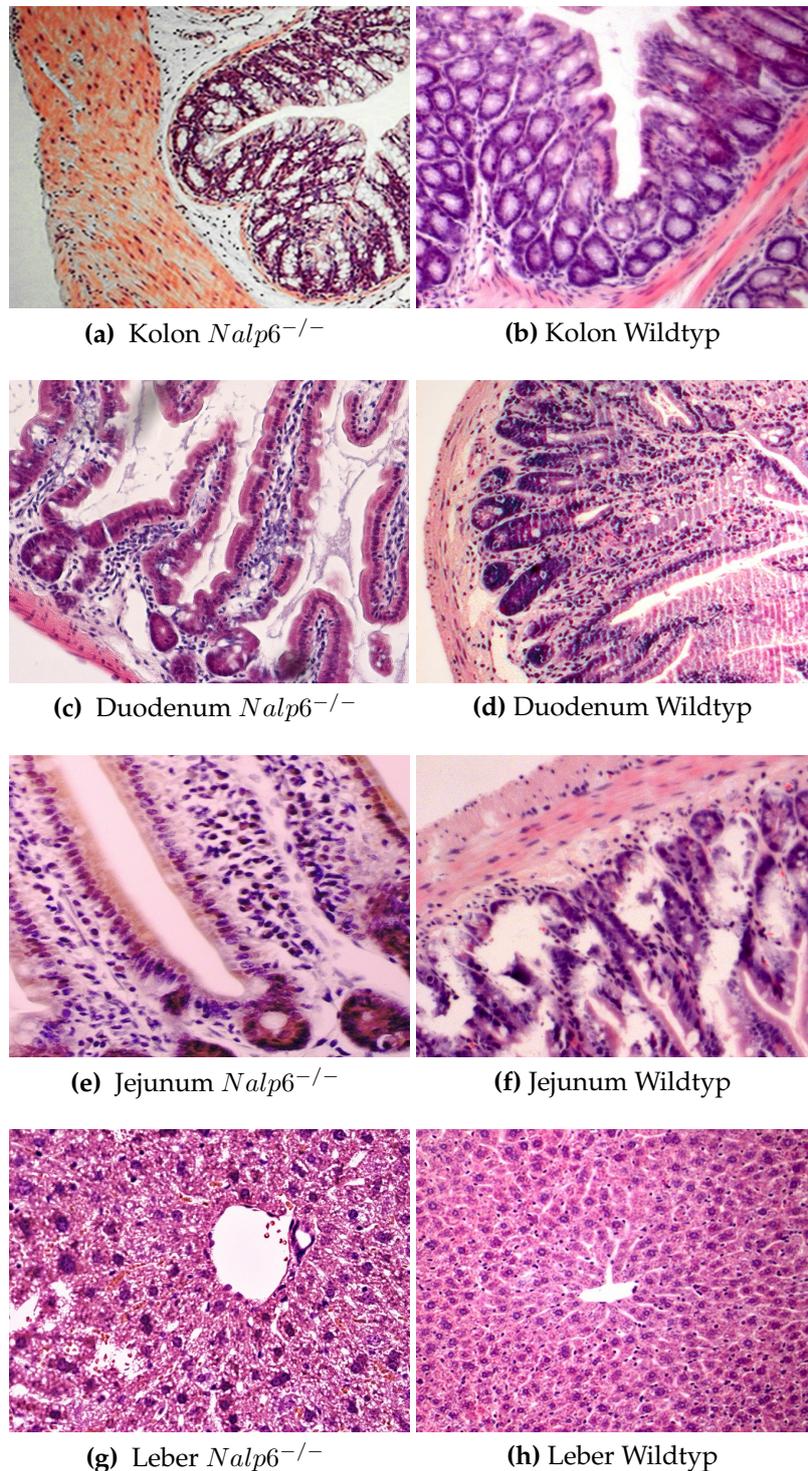


Abbildung 3.2 – Basale Phänotypisierung. Gezeigt werden jeweils ein unbehandeltes *Nalp6*^{-/-}-Tier und ein unbehandeltes Wildtyp-Tier. Es fanden sich keine Unterschiede zwischen den Wildtyp und den *Nalp6*^{-/-}-Tieren.

3.1.2 Chronische Kolitis

Versuchsaufbau: Durch DSS wird bei den Mäusen eine Darmentzündung generiert, die histologisch und zellulär mit menschlichen Darmentzündungen, wie sie auch bei M.Crohn und Colitis ulcerosa vorkommen, vergleichbar ist. Für diese Arbeit wurde sowohl bei Wildtyp- als auch bei *Nalp6^{-/-}*-Tieren mit 2%-DSS-Lösung eine chronische Kolitis induziert (siehe Material und Methoden) und das Ansprechen der beiden Gruppen anschließend miteinander verglichen.

Während der 35-tägigen Versuchsdauer wurde die Gewichtsveränderung der Tiere erfasst (**Abbildung 3.3a**). Die *Nalp6^{-/-}*-Tiere wiesen bei gleichem Ausgangsgewicht während der Zyklen mit DSS-Gabe ein höheres Körpergewicht auf als die Kontrolltiere. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer Varianzanalyse (Anova) eines multiplen linearen Modells (s. Material u. Methoden). Dadurch konnte gezeigt werden, dass die beiden Gruppen sich über die Zeit signifikant unterschiedlich entwickelten ($p=0,0001$). Während des Versuchs wurden täglich das Gewicht, die Blutungsstärke und die Stuhlkonsistenz erhoben und daraus der DAI, Disease Activity Index, berechnet (dargestellt in **Abbildung 3.3b**). Diese Darstellung des Krankheitsverlaufs zeigt, dass sowohl die *Nalp6^{-/-}*-Tiere als auch die Kontrolltiere in den Phasen der DSS-Gabe Darmentzündungen entwickelt haben und sich in den Tagen, an denen kein DSS gegeben wurde, erholt haben. Es zeigten sich allerdings keine Unterschiede im Krankheitsverlauf zwischen den beiden untersuchten Genotypen. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe eines linearen *Mixed-Effects Modells*. Diese Auswertung zeigte, dass keine signifikante Veränderung des DAI zwischen den beiden Gruppen in Abhängigkeit von der Zeit festgestellt werden konnte ($p=0,64$). Weiterhin können keine signifikanten Änderungen des DAI zwischen den Gruppen ($p=0,13$) bzw. über die Zeit ($p=0,46$) alleine festgestellt werden. Am Ende der 35-tägigen Versuchszeit waren beide Gruppen nur unwesentlich betroffen. Die *Nalp6^{-/-}*-Tiere wiesen über den Verlauf des Experiments ein signifikant höheres Gewicht auf als

die Wildtypiere. Der Verlauf der induzierten Kolitis entspricht eher dem einer rezidivierenden akuten Kolitis als dem einer persistierenden chronischen Kolitis.

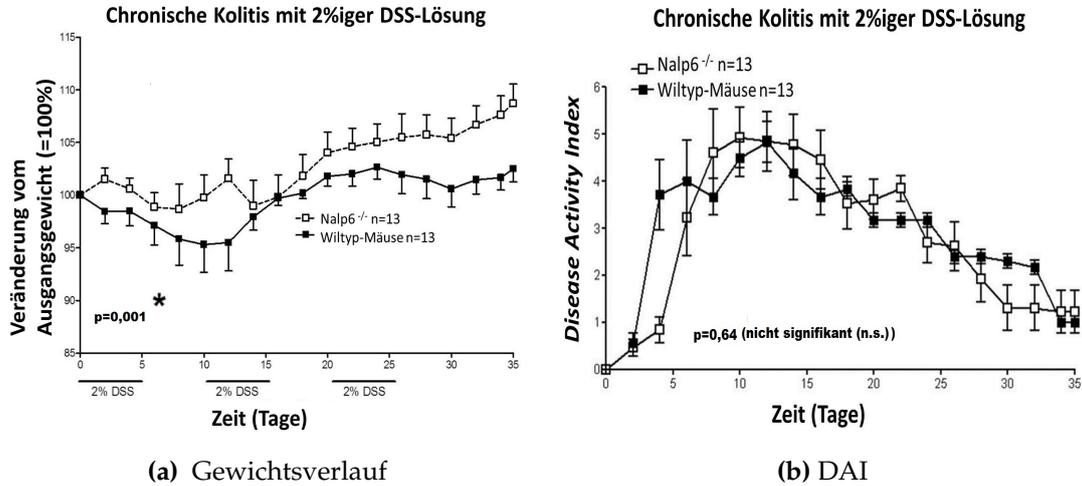


Abbildung 3.3 – Gewichtsverlauf und *Disease Activity Index* (DAI) unter DSS-induzierter Kolitis bei *Nalp6*^{-/-}- und Wildtyp-Tieren. Gezeigt wird der Median von jeweils n=13 Tieren. Die Kurven, die die Gewichtsveränderung anzeigen verlaufen signifikant unterschiedlich (p=0,001) während sich im DAI kein signifikanter Unterschied feststellen ließ (p= 0.64).

Nach der Tötung der Tiere wurde die Länge der Därme gemessen und zwischen den *Nalp6*^{-/-}-Tieren und den Wildtyp-Tieren verglichen (**Abbildung 3.4**). Es wurden die Darmlängen aller 13 überlebenden *Nalp6*^{-/-}-Tiere sowie von fünf der sieben überlebenden Wildtyp-Tiere bestimmt. Bei den fehlenden zwei Tieren war die Darmlänge auf Grund von technischen Problemen bei der Organentnahme nicht sicher zu verwerten. Sie wurden deshalb in dieser Messung ausgeschlossen. Die Darmlänge ist in diesem Modell ein Parameter dafür, wie stark der Darm von Entzündungen betroffen ist, da chronische intestinale Entzündungen und die damit verbundenen Reperaturmechanismen zu Verkürzungen des Darms führen. Am Ende des Versuchs war die mittlere Darmlänge der *Nalp6*^{-/-}-Tiere signifikant höher (p=0,02) als bei den Wildtyp-Tieren. Die Auswertung erfolgte mit dem *Student-t-Test*.

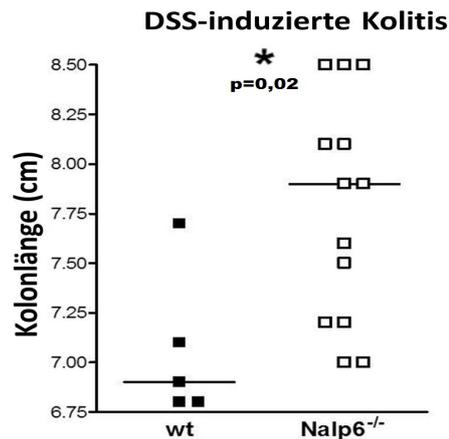


Abbildung 3.4 – Kolonlänge am Tag 35 nach DSS-induzierter chronischer Kolitis. Gezeigt werden die Ergebnisse von den 5 aus 7 Wildtyp-Tieren, die den Endpunkt nach 35 Tagen erreicht hatten, sowie 13 aus 13 *Nalp6*^{-/-}-Tieren. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den *Nalp6*^{-/-}- und den Wildtyp-Tieren ($p=0,02$).

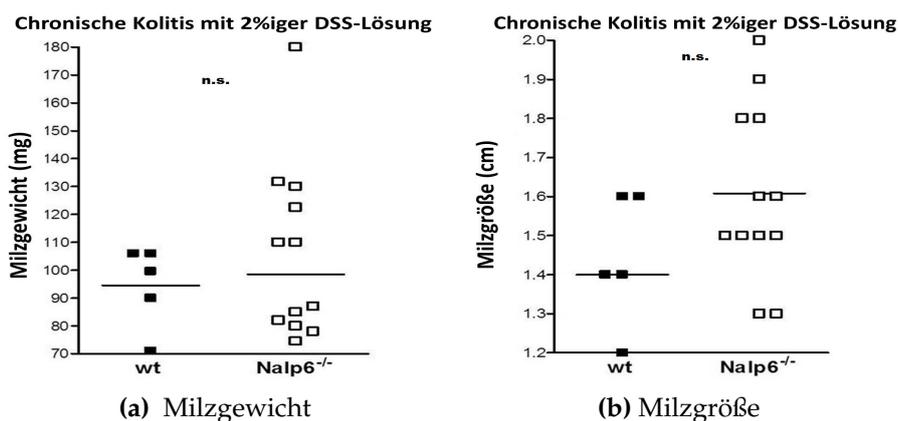


Abbildung 3.5 – Größe und Gewicht der Milzen von *Nalp6*^{-/-}- und Wildtyp-Tieren am Tag 35 nach DSS-induzierter chronischer Kolitis. Gezeigt werden die Ergebnisse von den 5 aus 7 Wildtyp -Tieren, die den Endpunkt erreicht haben, sowie von 12 aus 13 *Nalp6*^{-/-}-Tieren. Die Unterschiede zwischen den Wildtyp- und den *Nalp6*^{-/-}-Tieren waren nicht signifikant (Milzgewicht $p=0,39$; Milzlänge $p=0,11$).

Die Messung der Milzgröße und des Milzgewichts (**Abbildung 3.5**) zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Wildtyp-Tieren und den *Nalp6*^{-/-}-Tieren (Milzgewicht $p=0,39$; Milzlänge $p=0,11$). Es wurden fünf von sieben Wildtyp-Tiere (s. **Abbildung 3.5a**) sowie zwölf von 13 *Nalp6*^{-/-}-Tiere (s. **Abbildung 3.5b**) untersucht, bei den fehlenden drei Tieren konnten auf Grund technischer

Probleme bei der Organentnahme die Milzgröße und das Milzgewicht nicht eindeutig bestimmt werden. Sie wurden aus der Messung ausgeschlossen. Die Auswertung erfolgte mit dem *Student-t-Test*.

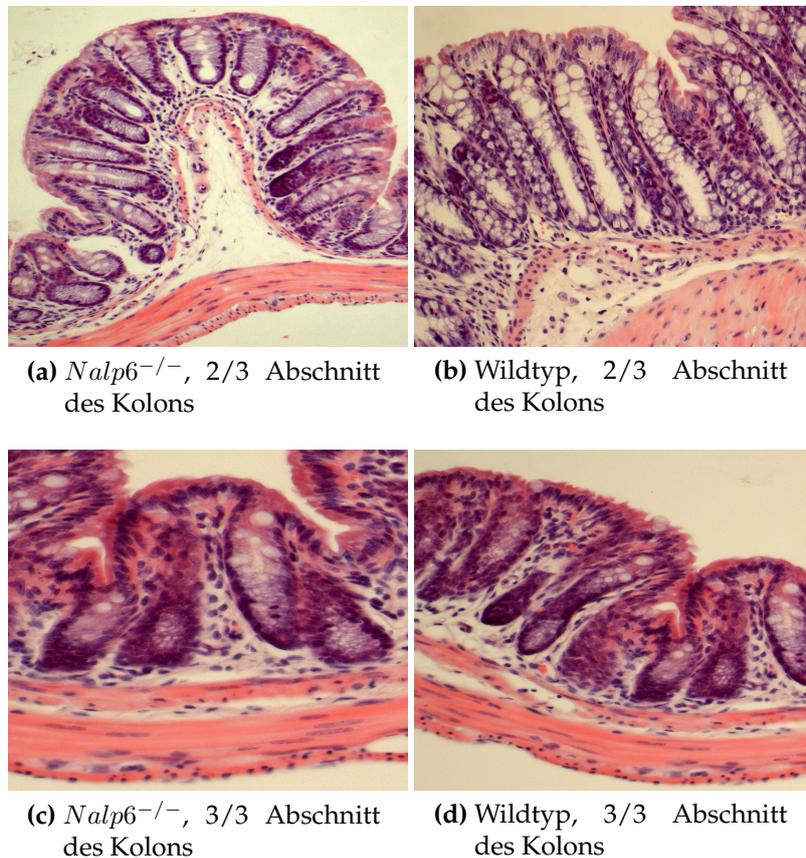


Abbildung 3.6 – verschiedene Kolonabschnitte von 1 (proximal) bis 3 (distal) nach DSS-induzierter chronischer Kolitis, gezeigt werden jeweils ein repräsentatives Beispiel von jeweils 13 *Nalp6*^{-/-}-Tieren bzw. 7 Wildtyp-Tieren.

Die in **Abbildung 3.6** dargestellte histologische Untersuchung von jeweils einem medialen Kolonabschnitt (2/3, s. **Abbildungen 3.6a und 3.6b**) sowie je eines distalen Kolonabschnittes (3/3, s. **Abbildungen 3.6c und 3.6d**). Es zeigten sich keine histologischen Unterschiede zwischen den *Nalp6*^{-/-}-Tieren und den Wildtyp-Tieren.

3.1.3 Endotoxin-Schock

Um die Reaktion der Tiere auf einen Endotoxinschock zu untersuchen, haben die Mäuse im Rahmen einer Versuchsreihe LPS intraperitoneal (i.p.) gespritzt bekommen. Die Ausgangszahl lag bei jeweils $n=8$ Tieren. Hier zeigte sich, dass von den Wildtyp-Tieren bereits nach 9h alle Tiere verstorben waren, von den $Nalp6^{-/-}$ -Tieren war zu diesem Zeitpunkt noch ein Tier am Leben, das den Endpunkt des Experiments nach 24h erreichte (s. **Abbildung 3.7**). In der statistischen Auswertung als Überlebenszeitanalyse mittels Cox Proportional-Hazard Methode konnte keine signifikante Korrelation der Überlebenszeit mit der Gruppenzugehörigkeit festgestellt werden ($p=0,11$).

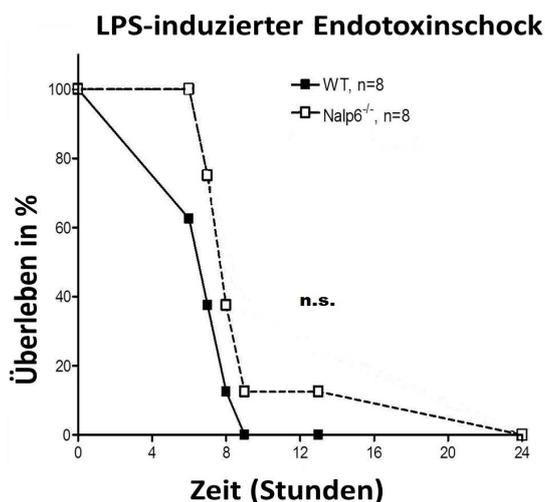


Abbildung 3.7 – Überleben nach Injektion von LPS in Stunden, jeweils $n=8$ Tiere. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Überlebenszeit festgestellt werden ($p=0,11$).

Nach der Tötung des überlebenden Tiers wurde die *Dry/Wet-Ratio* der Därme der Tiere bestimmt (s. **Abbildung 3.8**). Diese Messung gibt Hinweise auf die Ödembildung während der Entzündungsreaktion. Die Ergebnisse der $Nalp6^{-/-}$ -Tiere wurden mit den *littermate*-Kontrolltieren, unbehandelten Tieren aus dem gleichen Wurf verglichen. Die Auswertung erfolgte mit dem *Student-t-Test*. Während im Kolon keine Unterschiede im Wassergehalt offensichtlich wurden ($p=$

0,85), zeigten die *Nalp6*^{-/-}-Tiere im Jejunum eine signifikant höhere *Dry-Wet-Ratio* (p=0,003).

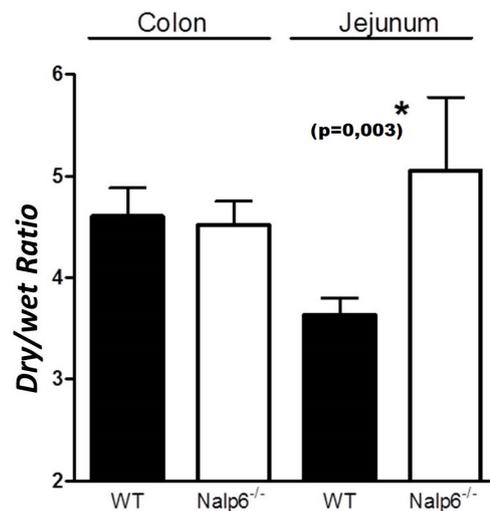


Abbildung 3.8 – Dry/Wet-Ratio von Kolon und Jejunum nach LPS-Endotoxin-Schock bei *Nalp6*^{-/-}- und Wildtyp-tieren.

Nach der Tötung der verbliebenen Tiere wurden die Zytokinspiegel im Serum mittels ELISA analysiert. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 3.19** im Abschnitt *Bestimmung der Zytokine mittels ELISA in verschiedenen Geweben* dargestellt.

3.1.4 CLP-Sepsis

Um eine bakterielle Sepsis zu induzieren, wurde das Zökum der Mäuse punktiert, sodass Darminhalt in die Bauchhöhle austreten konnte. Dies führte zu einer zunächst lokalen Entzündung, die sich dann über das Peritoneum systemisch ausbreitete. Nach der OP wurden die Tiere drei Tage lang beobachtet, Gewichtsveränderungen und Überleben erfasst und die verbleibenden Tiere anschließend getötet.

Für den Versuch lag die Zahl der *Nalp6*^{-/-}- und der Wildtyp-tiere bei jeweils n=13. Die Experimente wurden in zwei unabhängigen Versuchsreihen durchgeführt. Das Überleben und der Gewichtsverlauf während des Versuchs sind in **Abbildung 3.9** dargestellt. Während dieser Beobachtungszeit konnte festgestellt

werden, dass die *Nalp6*^{-/-}-Tiere zu über 60% (n=8) die folgenden drei Tage überlebt haben. Von den Wildtyp-Tieren haben lediglich 15% (n=2) den Beobachtungszeitraum überlebt. In der statistischen Auswertung mittels Cox Proportional-Hazard Methode zeigte sich eine signifikant längere Überlebenszeit bei *Nalp6*^{-/-}-Tieren als bei den Wildtyp-Tieren (p=0,03) (siehe **Abbildung 3.9a**). Weiterhin haben die Messungen der Gewichtsveränderungen gezeigt, dass die *Nalp6*^{-/-}-Tiere 13% ihres Ausgangskörpergewichts verloren haben, wohingegen die *littermate*-Kontrolltiere im Schnitt 18% ihres Körpergewichts verloren haben (siehe **Abbildung 3.9b**). Die Auswertung erfolgte mit dem *Student-t-Test*. An Tag 3 ließ sich ein signifikanter Gewichtsunterschied zwischen den *Nalp6*^{-/-}-Tieren und den Wildtyp-Tieren zeigen (p= 0,02).

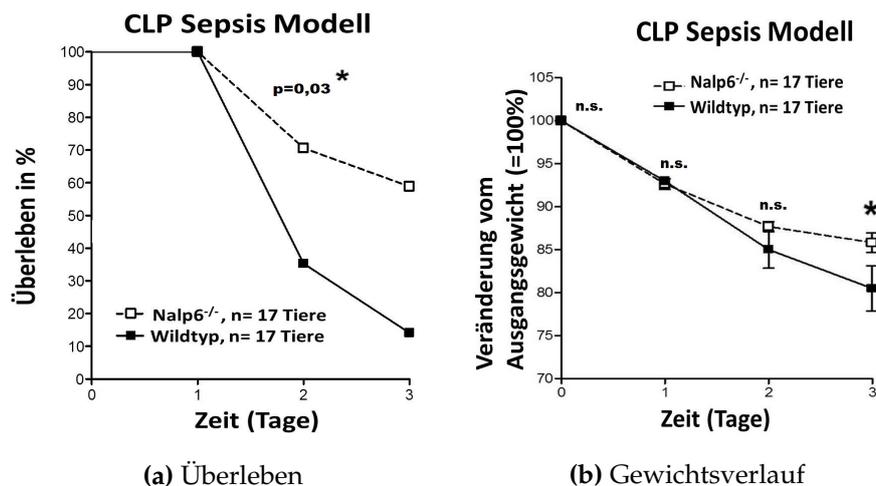


Abbildung 3.9 – Überleben und Gewichtsverlauf unter CLP-Sepsis bei jeweils n= 17 *Nalp6*^{-/-}- und Wildtyp-Tieren. Die *Nalp6*^{-/-}-Tiere zeigten ein signifikant höheres Überleben als die Wildtyp-Tiere (p=0,03) sowie an Tag 3 ein signifikant höheres Gewicht (p=0,02).

Am Ende des Versuchs wurden die Organe entnommen und histologische aufgearbeitet (s. **Abbildung 3.10**). Die folgenden Abbildungen zeigen beispielhaft einige Organe. Es lassen sich keine morphologischen Unterschiede auf Organebene zwischen den *Nalp6*^{-/-}- und Wildtyp-Tieren erkennen.

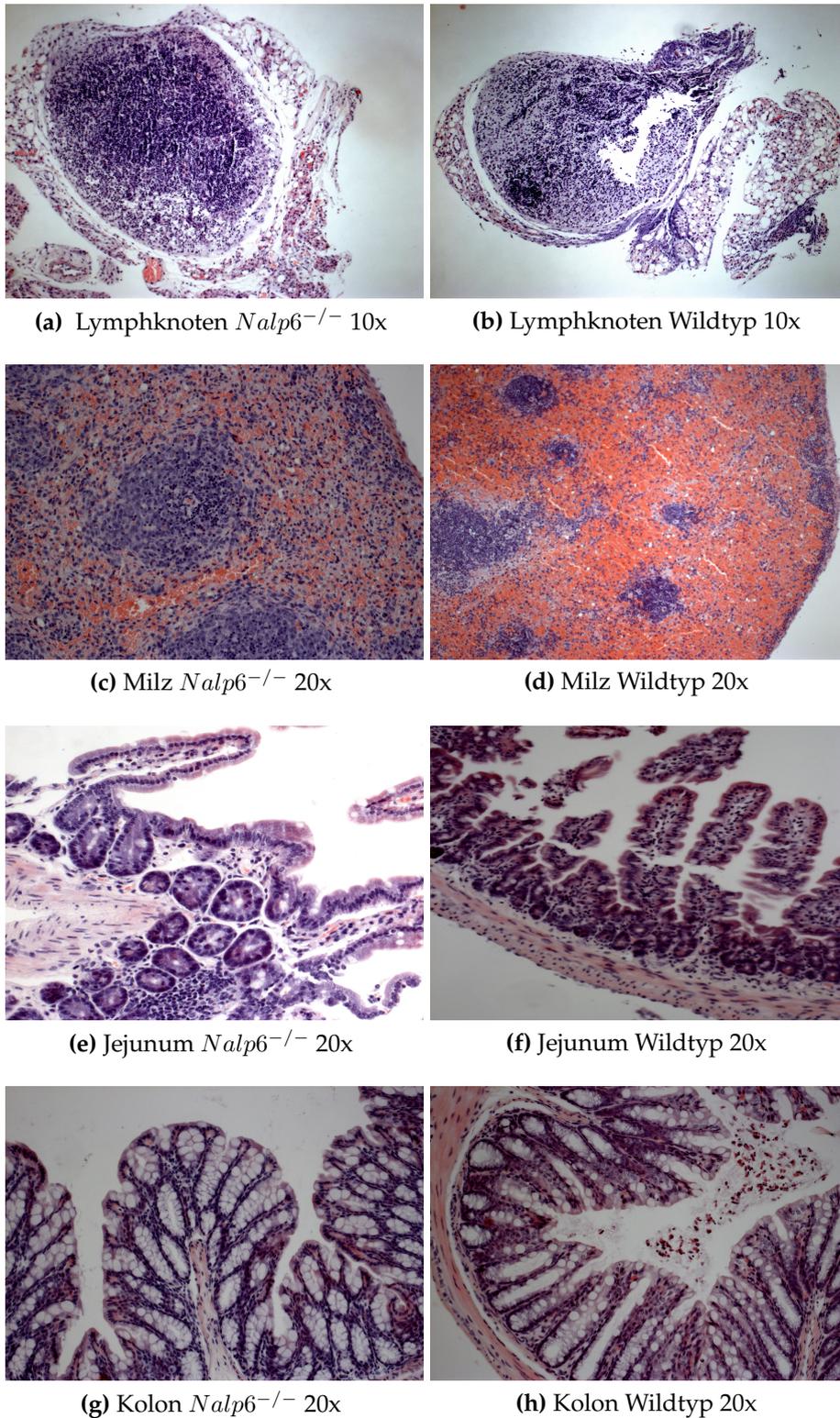


Abbildung 3.10 – Beispielhafte Darstellung verschiedener Organe nach CLP-Sepsis. Gezeigt wird das eine überlebende Wildtyp-Tier sowie ein *Nalp6*^{-/-}-Tier im Vergleich. Es zeigten sich keine histomorphologischen Unterschiede.

3.2 In vitro-Versuche

3.2.1 Expressionsanalyse von *NALP6*

Mithilfe von semiquantitativer RT-PCR und quantitativer Realtime-PCR sollte untersucht werden, in welchen menschlichen Geweben und welchen Zelllinien *NALP6* exprimiert wird. Es wurden Gewebeproben aus Skelettmuskeln, Herzmuskeln, Lunge, Milz, Niere, Leber, Dünndarm, Dickdarm und Leukozyten hinsichtlich der Expression von *NALP6* untersucht. *NALP3* konnte in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden und *NALP1* zeigte lediglich im Skelettmuskel und in der Leber keine Expression. *NALP6* war in Niere, Milz und Leukozyten stark exprimiert zu, in der Leber und im Dünndarm nur schwach. Im Dickdarm und den anderen untersuchten Geweben konnte kein *NALP6* nachgewiesen werden (s. **Abbildung 3.11**).

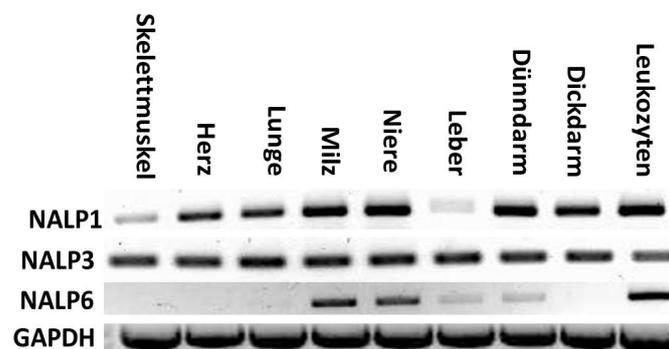


Abbildung 3.11 – Expression von *NALP6* in humanen Geweben. Die Expression von *NALP1*, *NALP3* und *NALP6* wurde mittels RT-PCR in einem kommerziell erworbenen Human Tissue Kit analysiert und Hinweise auf die Expression in verschiedenen humanen Geweben zu erhalten.

Weiterhin wurden die menschlichen Zelllinien Jurkat, ThP1, Caco-2, SW480, HEK, Hela und HT29 untersucht, mit dem Ziel diese als Modellzelllinien für bestimmte Organe zu nutzen. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 3.12** dargestellt. Die Jurkat-Zellen sind aus immortalisierten T-Zellen hervorgegangen, ThP1 aus akuten monozytären Leukämie-Zellen. Caco-2, SW-480 und HT29 sind Kolonkarzinom-

Zelllinien, Hela ist eine Ovar-Zelllinie und HEK eine humane embryonale Nieren-Zelllinie. Wie auch bei den entsprechenden humanen Geweben (s. **Abbildung 3.11**) zeigte *NALP1* eine starke Expression in allen hier untersuchten Zelllinien. Die stärkste Expression für *NALP6* wurde bei Jurkat- und ThP 1-Zellen nachgewiesen. Des Weiteren zeigt sich eine schwache Expression von *NALP6* in der SW480- und der HT29-Zelllinie. Hierbei handelt es sich um Kolonzelllinien, im humanen Gewebe ließ sich keine Expression von *NALP6* im Dickdarm nachweisen (s. **Abbildung 3.11**). *NALP3* zeigte eine starke Expression in ThP1-Zellen und eine schwache in HT29-Zellen. In den übrigen Zelllinien ließ sich *NALP3* nicht nachweisen obwohl *NALP3* sich in den humanen Zellen sowohl im Dick- und Dünndarm als auch in der Niere nachweisen ließ. In der ThP1- und der HT29-Zelllinie zeigte sich eine Koexpression von *NALP3* und *NALP6*. Das hier gezeigte Expressionsmuster von *NALP6* stimmt mit der Literatur überein, da beschrieben wurde, dass *NALP6* in T-Zellen und Granulozyten exprimiert wird. Die Expression von *NALP6* in der monozytären ThP1-Zelllinie war die Grundlage für die weitergehenden Untersuchungen an murinen Knochenmarkszellen (*bone marrow derived macrophages*, s. **Abb. 3.17**).

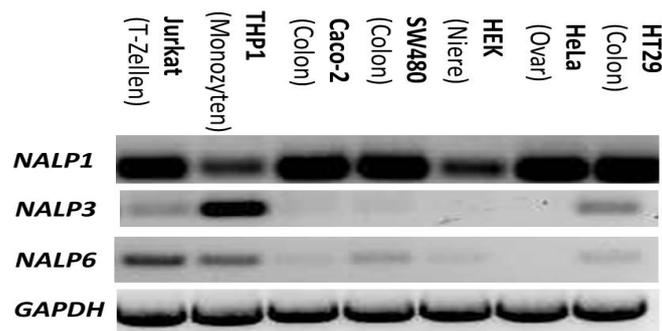


Abbildung 3.12 – Expression von *NALP6* in verschiedenen Zelllinien. Als entfernte Modelle vom Organismus wurden Zelllinien aus unterschiedlichen Geweben mittels RT-PCR auf die Expression von *NALP6* untersucht. Es zeigte sich für *NALP1* eine starke Expression in allen Zelllinien, für *NALP6* eine Expression in Jurkat und ThP1-Zellen sowie eine schwache Expression in der SW480- und der HT29-Zelllinie. *NALP3* zeigte eine starke Expression in ThP1-Zellen und eine schwache Expression in HT29-Zellen. In diesen beiden Zelllinien sind *NALP3* und *NALP6* koexprimiert.

Durch eine semiquantitative Real-time PCR (qRT-PCR) wurde die Expression von *NALP6* in ThP1-Zellen nach Stimulation durch verschiedene Reagenzien relativ zu unstimulierten Zellen gemessen (s. **Abbildung 3.13-3.15**). Für die Stimulation wurden verschiedene entzündungskorrelierte Reagenzien beispielhaft gewählt. Listerien sprechen alle *pathogen recognition patterns* im Sinne einer allgemeinen Entzündungsreaktion an. LPS und Flagellin wurden als TLR-Liganden gewählt, die als erste Kontaktstelle vor der Entzündung in Aktion treten. TNF- α und IFN- γ wurden als Zytokine gewählt, die bei einer bereits laufenden Entzündung freigesetzt werden.

Es zeigt sich, dass die Expression von *NALP6* in ThP1-Zellen nach Stimulation mit Listerien abnimmt (s. **Abbildung 3.13**). In der statistischen Auswertung mit dem *Student-t-Test* zeigt sich, dass *NALP6* nach 2h und 8h signifikant schwächer exprimiert war als nach 0h und 1h (nach 1h Stimulation vs. 0h $p= 0,01$, nach 2h vs. 0h $p= 0,0006$, nach 8h Stimulation vs. 0h $p= 0,001$).

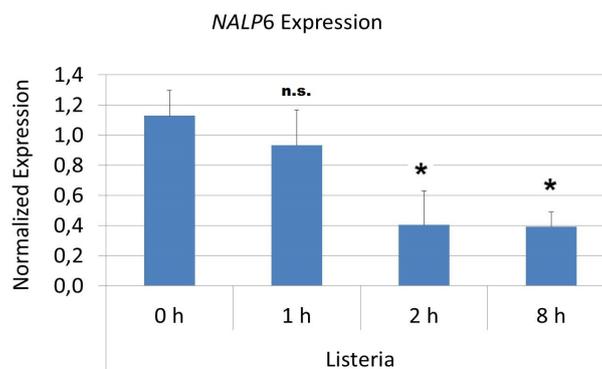


Abbildung 3.13 – Normalisierte semiquantitative Expression von *NALP6* in ThP1-Zellen nach Stimulation mit Listerien sowie, relativ zu unstimulierten Zellen. Gezeigt ist der Mittelwert aus zwei technischen Replikaten. Im Zeitverlauf nimmt die Expression von *NALP6* unter Listerienstimulation ab.(nach 1h Stimulation mit Listerien vs. 0h $p= 0,01$, nach 2h Stimulation mit Listerien vs. 0h $p= 0,0006$, nach 8h Stimulation mit Listerien vs. 0h $p= 0,001$).

Die Stimulation mit LPS und Flagellin hat keinen signifikanten Effekt auf die Expression von *NALP6* (s. **Abbildung 3.14**). Nach Stimulation mit Flagellin lässt sich nach 1h ein Abfall der *NALP6*-Expression erkennen, der Effekt ist aber in der

Auswertung mit dem *Student-t-Test* auf Grund der hohen Standardabweichung nicht signifikant (nach 1h Stimulation mit Flagellin vs. 0h $p=0,06$, nach 2h Stimulation mit Flagellin vs. 0h $p=0,27$, nach 8h Stimulation mit Flagellin vs. 0h $p=0,69$, nach 1h Stimulation mit LPS vs. 0h $p=0,68$, nach 2h Stimulation mit LPS vs. 0h $p=0,10$, nach 8h Stimulation mit LPS vs. 0h $p=0,78$).

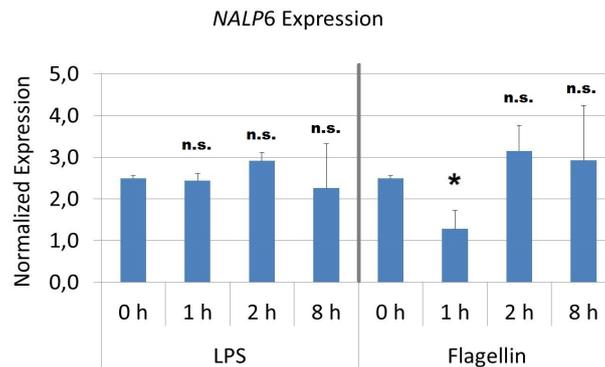


Abbildung 3.14 – Normalisierte semiquantitative Expression von *NALP6* in ThP1-Zellen nach Stimulation mit LPS sowie, relativ zu unstimulierten Zellen. Gezeigt ist der Mittelwert aus zwei technischen Replikaten. Die Stimulation mit LPS hat keine Auswirkung auf die Expression von *NALP6*. Nach Stimulation mit Flagellin zeigt sich ein Abfall der Expression von *NALP6* nach 1h, der Unterschied ist aber nicht signifikant. Die Stimulation mit Flagellin hat damit ebenfalls keinen Einfluss auf die Expression von *NALP6*.

Die Stimulation mit $\text{TNF-}\alpha$ (s. **Abbildung 3.15**) hat keinen Einfluss auf die Expression von *NALP6* über die beobachtete Zeit. Die Auswertung erfolgte mit dem *Student-t-Test*. (Nach 1h Stimulation mit $\text{TNF-}\alpha$ vs. 0h $p=0,59$, nach 2h Stimulation mit $\text{TNF-}\alpha$ vs. 0h $p=0,44$, nach 8h Stimulation mit $\text{TNF-}\alpha$ $p=0,01$). Nach Stimulation mit $\text{IFN-}\gamma$ zeigte sich nach 1h und nach 2h eine signifikante Zunahme der Expression von *NALP6* im Vergleich zu 0h (siehe **Abbildung 3.15**, nach 1h Stimulation mit $\text{IFN-}\gamma$ vs. 0h $p=0,005$, nach 2h Stimulation mit $\text{IFN-}\gamma$ vs. 0h $p=0,002$, nach 8h Stimulation mit $\text{IFN-}\gamma$ vs. 0h $p=0,057$).

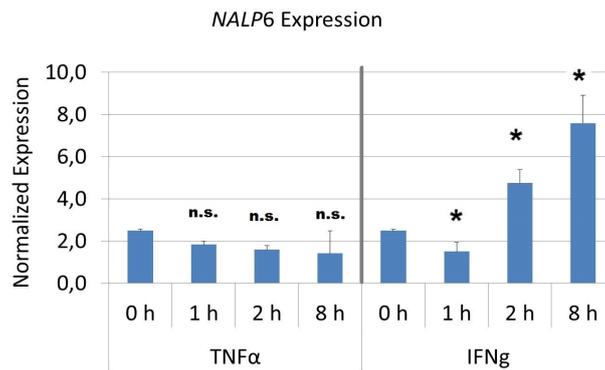


Abbildung 3.15 – Normalisierte semiquantitative Expression von *NALP6* in ThP1-Zellen nach Stimulation mit TNF- α sowie IFN- γ , relativ zu unstimulierten Zellen. Gezeigt ist der Mittelwert aus zwei technischen Replikaten. Die Stimulation mit TNF- α zeigt keine Veränderung in der Expression von *NALP6*. Nach Stimulation mit *NALP6* zeigt sich eine vermehrte Expression von *NALP6* nach 1h und 2h (nach 1h Stimulation mit IFN- γ vs. 0h p= 0,005, nach 2h Stimulation mit IFN- γ vs. 0h p=0,002, nach 8h Stimulation mit IFN- γ vs.0h p= 0,057).

3.2.2 Bestimmung der Zytokinausprägung mittels RT-PCR

Um zu untersuchen, ob die Zytokine IL-6 und KC (murines IL-8) einen Einfluss auf die Genexpression bei *Nalp6*^{-/-}- und Wildtyptieren haben, wurde der relative Gehalt der beiden Zytokine an Hand einer vergleichenden PCR mit GAPDH bestimmt und die Ergebnisse für die *Nalp6*^{-/-}- und die Wildtyptiere gegenüber gestellt (s. **Abbildung 3.16**). Die Experimente wurden in zwei unabhängigen Versuchen durchgeführt. KC (murines IL-8) und IL-6 wurden als Beispiele für Zytokine mit unterschiedlichen Produktions- und Zielzellen gewählt.

In der RT-PCR mit *gapdh*, das als *Housekeeping*-Gen benutzt wurde, fallen keine Unterschiede zwischen *Nalp6*^{-/-}-Tieren und den *littermate*-Kontrollen auf. Die Banden liegen im nicht-gesättigten Bereich und sind gleichmäßig. Die Reihenfolge der aufgetragenen Proben war stets die gleiche. Die Negativ-Kontrollen enthielten keine cDNA sondern nur den Puffer und zeigten keine Amplifikationen.

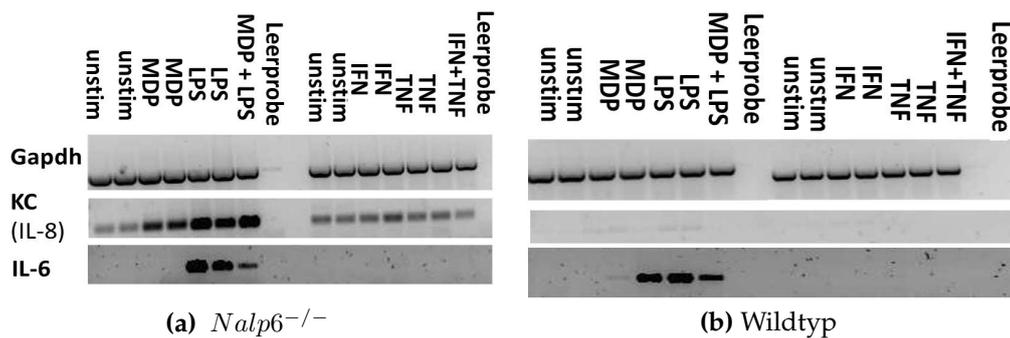


Abbildung 3.16 – Nachweis von IL 6 und KC (murinem IL-8) mittels RT-PCR in stimulierten BMDM-Zellen. Stimulation mit LPS und MDP, RT-PCR mit einer *annealing* Temperatur von 54°, 34 Zyklen. Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis aus zwei Experimenten. Es zeigt sich bei dem Experiment mit KC eine Expression in den *Nalp6*^{-/-}-Tieren, jedoch nicht in den Wildtyp-Tieren. Für IL-6 zeigt sich lediglich eine Expression bei den Proben, die mit LPS bzw. LPS+MDP stimuliert worden sind, dieses Expressionsmuster ist in beiden Genotypen gleich.

Die RT-PCR mit dem IL-6 Primer zeigt sowohl bei den *Nalp6*^{-/-}-Tieren als auch bei den Wildtyp-Tieren Banden. Es kann somit eine Expression von IL-6 nach Stimulation mit LPS bzw. LPS+MDP gezeigt werden, nicht jedoch ein Unterschied zwischen den verschiedenen Genotypen (s. **Abbildung 3.16**). Die RT-PCR von KC zeigt einen Unterschied zwischen den Genotypen. Die *Nalp6*^{-/-}-Tiere weisen eine Expression in allen Proben auf. Es zeigt sich eine stärkere Bandenausprägung bei den Proben die mit LPS bzw. LPS+MDP stimuliert worden sind. Im Vergleich dazu zeigen die Untersuchungen von den Wildtyp-Tieren keine Expression des murinen IL-8 (KC) in einer der Proben (s. **Abbildung 3.16**).

3.2.3 Bestimmung der Zytokine mittels ELISA in verschiedenen Geweben

ELISA aus stimulierten BMDMs

Die folgenden Versuche wurden an kultivierten Makrophagen vorgenommen, die jeweils aus mehreren *Nalp6*^{-/-}- und WT-Tiere gepoolt wurden (siehe Ma-

terial und Methoden).

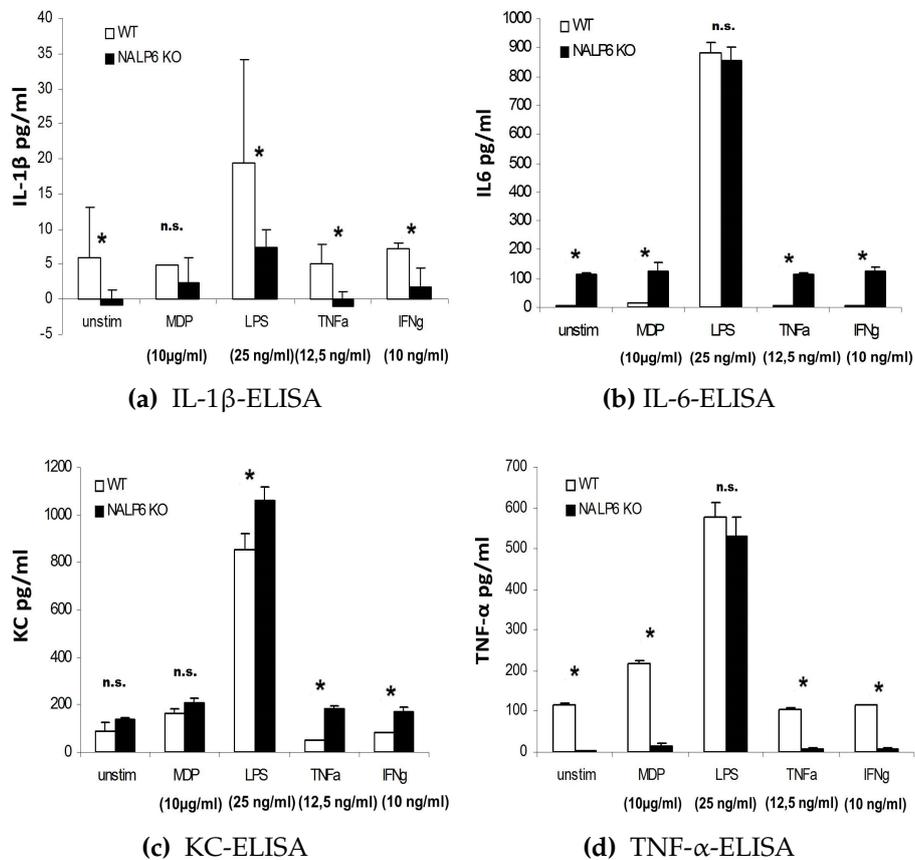


Abbildung 3.17 – ELISA-Nachweis aus BMDM-Kulturen von jeweils n=3 Mäusen. Zellen von *Nalp6*^{-/-}- und Wildtyp-Tieren wurden wie im Material und Methoden-Teil beschrieben, kultiviert und am 10. Tag stimuliert. Gezeigt wird der Median von jeweils drei technischen Replikaten.

Um den Effekt verschiedener entzündungsassoziierter Moleküle zu untersuchen, wurden die Kulturen mit MDP, LPS, TNF α und IFN γ stimuliert. Anschließend wurde der Zytokingehalt mittels ELISA bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit dem *Student-t-Test*.

Der Gehalt an IL-1 β (siehe **Abbildung 3.17a**) lag bereits ohne Stimulation bei den Zellen der Wildtyp-Tiere signifikant höher als bei den *Nalp6*^{-/-}-Tieren (p=0,02). Durch die Stimulation mit MDP stieg der IL-1 β -Gehalt bei den *Nalp6*^{-/-}-Tieren in den Zellen beider Genotypen an, der Unterschied war jedoch nicht signifikant (p=0,59). Die Analyse der LPS-stimulierten Zellen zeigte einen deutlichen An-

stieg von IL- β in beiden Genotypen, der Gehalt in den Wildtypzellen war signifikant höher als bei den Zellen der *Nalp6*^{-/-}-Tiere (p=0,02). Auch nach Stimulation mit TNF α (p=0,003) und IFN γ (p=0,007) lag der IL-1 β -Spiegel bei den Zellen der Wildtyptiere signifikant über dem der *Nalp6*^{-/-}-Tiere.

Der Gehalt an IL-6 (siehe **Abbildung 3.17b**) war bei den unstimulierten BMDMs der *Nalp6*^{-/-}-Tieren signifikant höher als bei den Wildtyp-Tieren (p=0,000). Die Stimulation mit MDP, TNF α , und IFN γ zeigte keinen Anstieg oder Abfall der IL-6-Spiegel, sie waren bei den *Nalp6*^{-/-}-Tieren weiter signifikant höher als bei den Wildtyptieren (MDP: p=0,000; TNF α p=0,000; IFN γ p= 0,000). Lediglich die Stimulation mit LPS führte bei beiden Genotypen gleichermaßen zu einem massiven Anstieg des IL-6-Levels um das etwa Achtfache. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Genotypen ließ sich mittels *Student-t-Test* nicht nachweisen (p=0,57).

Der Gehalt an KC (murinem IL-8) (siehe **Abbildung 3.17c**) war bei den unstimulierten Zellen der Wildtyp- und *Nalp6*^{-/-}-Tiere nicht signifikant unterschiedlich (p=0,20). Die Stimulation mit MDP führte bei bei den Zellen beider Genotypen zu einem leichten Anstieg ohne, dass der Unterschied signifikant war (p=0,08). Der deutlichste Anstieg des KC-Gehalts zeigte sich nach Stimulation mit LPS. Hier kam es zudem zu einem höheren Anstieg bei den Zellen der *Nalp6*^{-/-}-Tiere, so dass diese nach Stimulation mit LPS einen signifikant höheren KC-Spiegel aufwiesen als die Zellen der Wildtypiere (p=0,000). Nach Stimulation mit TNF α (p=0,000) und IFN γ (p=0,000) lag der KC-Spiegel der *Nalp6*^{-/-}-Tiere ebenfalls signifikant über dem der Wildtypiere.

Bei der Bestimmung des Levels von TNF α (siehe **Abbildung 3.17d**) zeigte sich, dass TNF α bei unstimulierten BMDM-Zellen von Wildtypieren signifikant stärker ausgeprägt war als bei *Nalp6*^{-/-}-Tieren (p= 0,000). Durch Stimulation mit MDP stieg der TNF α -Gehalt in beiden Populationen etwa gleichmäßig an, der Unterschied blieb signifikant (p= 0,000). Bei Stimulation mit LPS war in beiden

Populationen ein deutlicher Anstieg um das circa Sechsfache zu verzeichnen, allerdings ließ sich kein signifikanter Unterschied mehr feststellen ($p=0,24$). Die Stimulation mit $TNF-\alpha$ und $IFN\gamma$ zeigte keinen deutlichen Effekt, der Unterschied zwischen den Genotypen blieb signifikant ($p=0,005$).

ELISA aus stimulierten gemischten Milzzellen (mixed spleenocytes)

Weiterhin wurden gemischte Milzzellen (*mixed spleenocytes*) als periphere mononukleäre Zellen kultiviert und deren Zytokinsekretion nach LPS-Reaktion ebenfalls mit ELISA untersucht (s. **Abbildung 3.18**). In der statistischen Auswertung mittels *Student-t-Test* konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten nachgewiesen werden. Die Sekretion von $TNF\alpha$ war ebenfalls nicht signifikant, allerdings zeigte sich ein Trend: Bei den unstimulierten Zellen war der p-Wert 0,88, nach 2h Stimulation lag er bei 0,48 und nach 6-stündiger LPS-Stimulation lag der p-Wert bei 0,09.

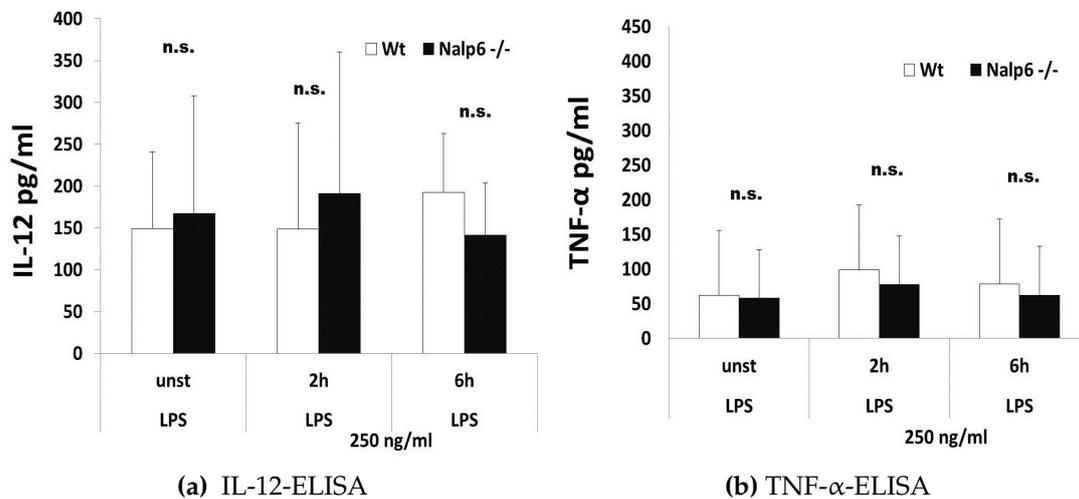


Abbildung 3.18 – ELISA-Nachweis aus *mixed Spleenocytes*-Kulturen von jeweils $n=3$ Mäusen. Zellen von *Nalp6*^{-/-}- und Wildtyp-Tieren wurden wie im Material- und Methodenteil beschrieben, kultiviert und am 10. Tag stimuliert. Gezeigt wird der Median von jeweils drei technischen Replikaten. Es konnte für die verschiedenen Zeitpunkte kein signifikanter Unterschied zwischen *Nalp6*^{-/-}- und Wildtyp-Tieren nachgewiesen werden.

ELISA aus Serum nach LPS-Endotoxinschock

Nach dem LPS-Endotoxin-Schock wurde mit ELISA der relative Zytokingehalt im Serum der Mäuse untersucht (**Abbildung 3.19**). In der statistischen Auswertung mittels einer *Analysis of Variance (Anova)* konnte für keines der Experimente eine signifikante Korrelation von optischer Dichte mit der Gruppe über die Zeit festgestellt werden (KC: $p=0,24$, IL-1 β : $p=0,07$, IL-6: $p=0,23$, TNF- α : $p=0,70$). Allein für IL-1 β mit $p=0,07$ kann ein Trend bezüglich einer höheren OD über die Zeit bei der Gruppe WT angenommen werden. Deshalb wurde die relative optische Dichte zu den verschiedenen Zeitpunkten nochmal mittels *Student-t-Test* verglichen. Hier zeigte sich, dass die optische Dichte von IL-1 β nach vier Stunden ($p=0,005$) sowie von TNF- α nach drei Stunden ($p=0,02$) und nach vier Stunden ($p=0,05$) bei den Wildtyptieren signifikant höher lagen.

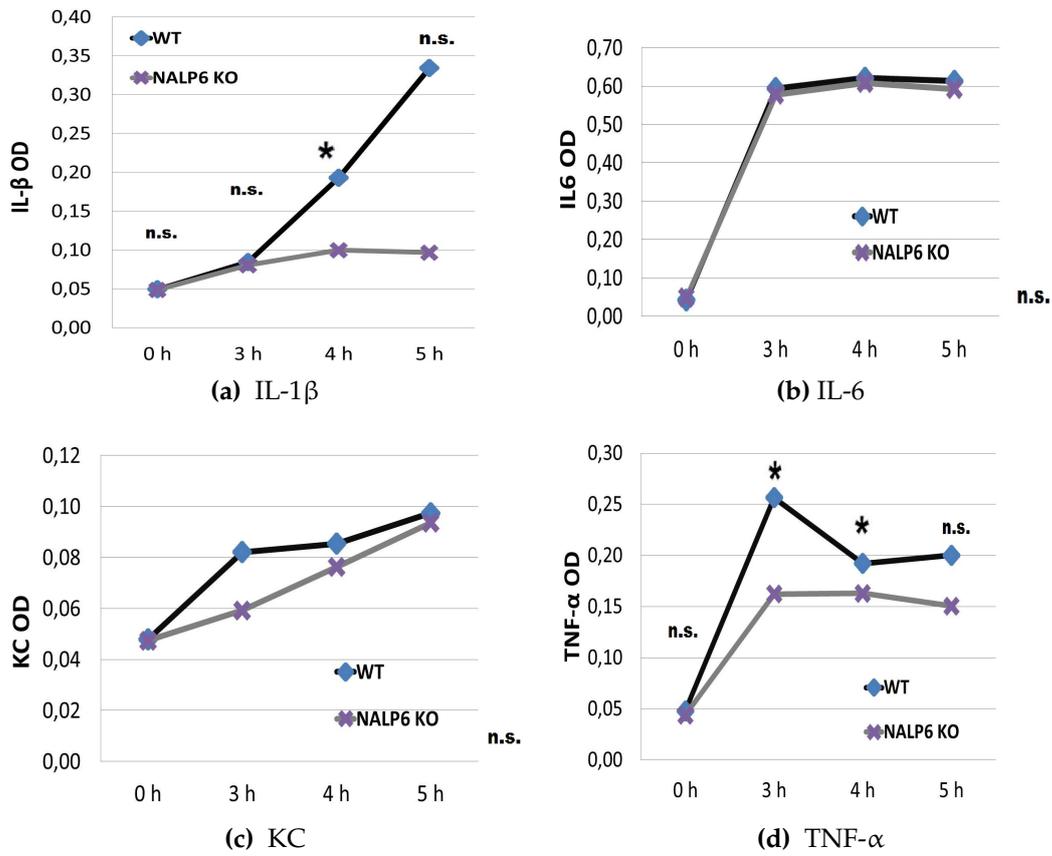


Abbildung 3.19 – ELISA aus Serum von *Nalp6*^{-/-}- und Wildtyp-Tieren nach LPS-Injektion, jeweils n=3 Tiere. Injektion von 10 μ l LPS in 90 μ l PBS i.p. Messung nach drei Stunden, vier Stunden, und fünf Stunden. Versuchsabbruch nach fünfeinhalb Stunden, da alle Tiere verstorben waren. In der Kurvenanalyse mittels Anova konnte keine signifikante Korrelation festgestellt werden (KC: p=0,24, IL-1 β : p=0,07, IL-6: p=0,23, TNF- α : p=0,70). Im Vergleich der einzelnen Stundenwerte mit dem Student-t-Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied für TNF- α nach 3h und 4h, für IL-1 β zeigte sich ein signifikanter Unterschied nach 4h.

3.2.4 Die Bedeutung von Nalp3 und Nalp6 im Inflammasom

Um die klinische Bedeutung von NALP3 und NALP6 zu untersuchen, wurden während eines aktiven Schubs, Darmbiopsien von Patienten, die an einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung litten, analysiert. Es wurden Proben aus akut entzündeten Stellen des Darms von erkrankten Patienten mit Proben aus nicht entzündlich veränderten Darmabschnitten gesunder Patienten verglichen

(siehe **Abbildung 3.20**). Während sich in einem Western Blot gegen β -Actin gleichmäßige Banden zeigten, ließen sich NALP3 und NALP6, am ehesten aus technischen Gründen, nicht darstellen.

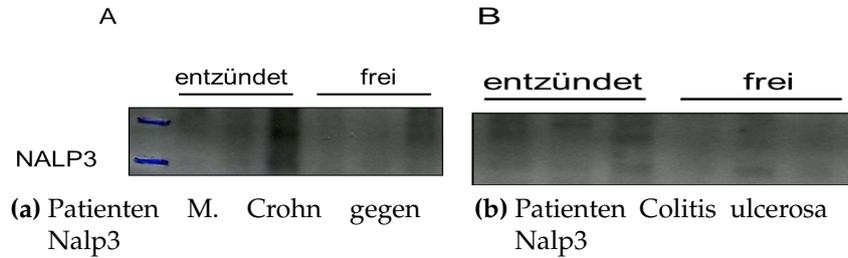


Abbildung 3.20 – Darmbiopsien von Patienten mit M. Crohn, Colitis ulcerosa und gesunden Patienten, jeweils n=6. Western Blot mit Nalp3-Antikörper (1:500) und Maus-Antikörper (1:1500). Repräsentative Darstellung von zwei unabhängigen Experimenten. Nalp3 hat eine Größe von 118 kDa.

Daher wurden die Versuche erneut *in vitro* durchgeführt (**Abbildung 3.21**). Die Zellen wurden mit ASC, NALP3 und NALP6 in unterschiedlichen Kombinationen transfiziert und mit INF- γ stimuliert. Auch hier ließen sich NALP3 und NALP6 nicht eindeutig darstellen.

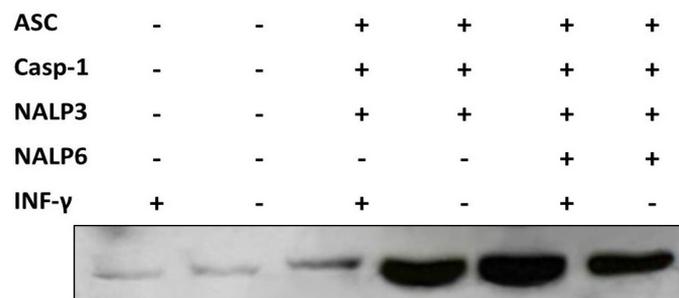


Abbildung 3.21 – Western Blot von transfizierten HEK-Zellen (Transfection mit ASC und caspase-1, s. Material und Methoden), stimuliert mit INF- γ (1:10.000 im Nährmedium). Western Blot mit Caspase-1-Antikörper (1:500) und Maus-Antikörper (1:1500). Repräsentative Darstellung von drei unabhängigen Experimenten.

Nach diesen Ergebnissen wurde versucht, mittels Koimmunopräzipitation eine Koexpression zwischen Nalp6 und Nalp3 nachzuweisen (**Abbildung 3.22**). Hierfür wurde auf die murinen BMDM-Zellen zurückgegriffen, da die Ergebnis-

se gezeigt hatten, dass die Expression von NALP6 in diesen Zellen stärker ist als in anderen Geweben. Bei den abgebildeten Ergebnissen scheint sich ein Zusammenhang zu zeigen, dies konnte in Wiederholungen allerdings nicht bestätigt werden.

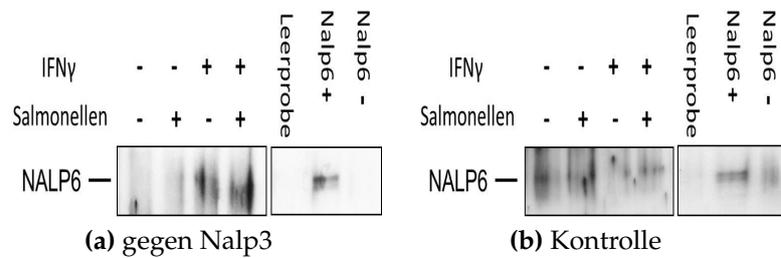


Abbildung 3.22 – Co-Immunopräzipitation mit Nalp3-Antikörpern von kultivierten BMDM-Zellen von WT-Tieren. Stimulation der kultivierten BMDM-Zellen mit Salmonellen (75 Stück/ Zelle) für zwei beziehungsweise zehn Stunden. Nach Ende des Stimulationszeit Abnahme des Mediums und Zugabe von Antibiotika-haltigem Medium (s. Material und Methoden). Anschließend Western Blot mit Nalp6-Antikörper (1:500) und *rabbit*-Antikörper (1:1500). Repräsentative Darstellung von zwei unabhängigen Western Blots aus Zellysaten von einer Ko-Immunopräzipitation.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des Proteins NALP6 im Entzündungsprozess zu untersuchen. NALP6 gehört zu der Familie der zytosolischen NOD-like Rezeptoren, die auf bestimmte Stimuli mit dem Auslösen einer Entzündungsreaktion reagieren. Diese rezeptorvermittelte Immunabwehr spielt besonders an Grenzflächen, wo die Körperoberfläche und äußere Einflüsse aufeinander treffen, eine entscheidende Rolle. Fehlfunktionen der NOD-like Rezeptoren können zu einer mangelhaften oder unkontrollierten, überschießenden Entzündungsreaktion führen. Für mehrere NLR-Rezeptoren sind allelische Varianten der kodierenden Gene bekannt, die mit entzündlichen Erkrankungen assoziiert sind (Chen u. a., 2009; Rosenstiel u. a., 2008). So sind genetische Varianten von *NOD2* mit M. Crohn assoziiert (Hampe u. a., 2001; Hugot u. a., 2001) während *NALP3* unter anderem mit bestimmten Formen von Muskeldystrophien (Rawat u. a., 2010), dem Muckle-wells-Syndrom, familiärem Mittelmeerfieber und Morbus Crohn in Verbindung gebracht wird (Hoffman u. a., 2001; Villani u. a., 2009). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Nod-like Rezeptoren eine wesentliche Rolle in der Immunreaktion spielen. Das genaue Verständnis ihrer Funktionsweise und ein Eingriff in die Regulation könnten die Grundlage neuer therapeutischer Ansätze bilden (Mathews, Sprakes und McDermott, 2008).

4.1 Wahl der Methoden und Evaluation der Entzündungsmodelle

Die im Säugetier und damit auch im Menschen ablaufenden Entzündungsreaktionen benutzen komplexe Signalwege des angeborenen und erworbenen Immunsystems und setzen daher eine abgelaufene immunologische Prägung voraus. Daher lassen sich diese Reaktionen nicht allein durch Untersuchungen an isolierten Zellpopulationen darstellen. Säugetiere sind damit als Tiermodelle unverzichtbare Instrumente der Entzündungsforschung, auch wenn sie nicht die ganze Komplexität der Erkrankung darstellen und Untersuchungen an Patienten nicht ersetzen können. Die Maus ist ein gut etablierter Modellorganismus auch für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (Wirtz und Neurath, 2007). In der basalen Phänotypisierung der *Nalp6*^{-/-}-Maus fielen keine Unterschiede zu den Wildtyptieren auf. Sie lebten unter den gleichen Bedingungen wie diese und zeigten im täglichen Verhalten sowie in der Fortpflanzung keine Auffälligkeiten oder pathologische Zeichen. Alle Blutwerte lagen im Normbereich oder nur knapp außerhalb, sodass dies nicht für grundlegende Unterschiede zwischen den verschiedenen Mausstämmen spricht. Serologisch zeigte sich lediglich eine auffällige Hyperglykämie, die am ehesten auf prämortalen Stress und darauf, dass die Tiere nicht nüchtern waren, zurück zu führen ist. Auch die Histologie zeigte bei der basalen Phänotypisierung keine Unterschiede. Es ist davon auszugehen, dass der Verlust von *Nalp6* keinen Einfluss auf das normale Leben der Tiere hatte.

Um die Rolle von *Nalp6* bei lokalen und generalisierten Entzündungsgeschehen zu beurteilen und dadurch Rückschlüsse auf die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie M. Crohn und Colitis ulcerosa zu ziehen, wurden die chronische DSS-Colitis sowie zwei verschiedene Sepsis-Modelle gewählt: die *Cecal ligation and puncture* und der Endotoxinschock mittels LPS.

4.2 Verhalten der *Nalp6*^{-/-}-Tiere im Entzündungsmodell

In der DSS-induzierten Kolitis zeigt sich ein Schutz der *Nalp6*^{-/-}-Tiere gegenüber den Wildtyp-Tieren

Die DSS-Colitis ist ein gut etabliertes Modell, mit dem sich intestinale Entzündungen induzieren lassen. Hierbei geht man von einem direkten toxischen Effekt von DSS auf die intestinale Epithelschicht aus. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten mit *Nalp6*^{-/-}-Tieren zeigten sich bei der DSS-induzierten Kolitis, dass der Gewichtsverlauf zwischen den beiden Gruppen sich signifikant unterschied. Am Ende des Versuchs lag das Körpergewicht der *Nalp6*^{-/-}-Mäuse signifikant höher als das der Wildtyp-Tiere. Im *Disease Activity Index* zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Er lag zum Zeitpunkt der stärksten Entzündung bei beiden Gruppen bei etwa 5, nach Ende des Versuchs lag er sowohl bei den *Nalp6*^{-/-}-Tieren, als auch den Wildtyp-Tieren um 1, im Sinne einer leichten Kolitis. Am Ende des Versuchs, 5 Tage nach der letzten Gabe von 2%iger DSS-Lösung, waren beide Gruppen klinisch so gut wie gar nicht mehr von der Krankheit betroffen. Unterschiede zeigten sich allerdings in der Kolonlänge. Diese war bei den *Nalp6*^{-/-}-Tieren signifikant länger ($p=0,02$). Es ist zu vermuten, dass die *Nalp6*^{-/-}-Mäuse vor der Entzündung im Darm geschützt sind und daher weniger Strikturen und Fibrose erleiden. Histologisch zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Es wurde insbesondere nach Anzeichen für Entzündungen, wie Granulozyteninfiltration geschaut. Die nicht sehr starke Ausprägung der Kolitis in beiden Gruppen sowie die gute Regeneration sprechen dafür, dass eventuell eine höhere Dosis DSS erforderlich gewesen wäre. Die Bestimmung des Milzgewichts und der Milzgröße, die ebenfalls Aufschluss über abgelaufene Entzündungen geben können, wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Für das mit *Nalp6* ver-

wandte Rezeptorprotein Nalp3 sind ähnliche Versuche mit DSS bereits durchgeführt worden (Bauer u. a., 2010; Zaki u. a., 2010), allerdings mit widersprüchlichen Ergebnissen. Bei Zaki et al. wiesen die *Nalp3*^{-/-}-Tiere unter 4%-DSS-Lösung eine deutlich erhöhte Sterblichkeit gegenüber den Wildtyp-Tieren auf. Bei Zufuhr von 3%-DSS-Lösung wiesen die *Nalp3*^{-/-}-Tiere einen höheren *Disease activity index* auf als die Vergleichsgruppe und es ließen sich ein höherer Gewichtsverlust sowie verstärkte rektale Blutungen verzeichnen. Im Gegensatz dazu beschreiben Bauer et al., dass die *Nalp3*^{-/-}-Tiere im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren vor intestinaler Entzündung geschützt sind. Bei Zufuhr von 2%-DSS-Lösung wiesen die *Nalp3*^{-/-}-Tiere eine geringere Sterblichkeit sowie weniger Gewichtsverlust auf als die Wildtyp-Tiere. Die Ergebnisse dieser Arbeit schließen sich daher eher Bauer et al. an, da ein leichter protektiver Effekt zu erkennen war, sich aber keine Hinweise fanden, dass die *Nalp6*^{-/-}-Tiere stärker von den Entzündungen betroffen waren. Diese Übereinstimmung könnte auch darauf zurück zu führen sein, dass sowohl bei den vorliegenden Versuchen, als auch bei den Versuchen von Bauer et al. mit 2% DSS gearbeitet wurde. Die Konzentration des DSS scheint eine wesentliche Rolle bei der Ausprägung der Kolitis zu spielen und eine höhere Dosis zu einer systemischen Entzündung zu führen.

***Nalp6*^{-/-}-Mäuse zeigen ein höheres Überleben und eine geringere Krankheitsaktivität bei der CLP- induzierten und der LPS-induzierten Sepsis**

Da die verhältnismäßig leichten lokalen Entzündungsreaktionen im Darm keine Unterschiede aufwiesen und *Nalp6*, wie die Voruntersuchungen zeigen, in Immunzellen stärker ausgeprägt ist als im Darmepithel, wurde die Reaktion der *Nalp6*^{-/-}-Tiere bei einer schweren, generalisierten Entzündung untersucht. Hierzu wurde zunächst eine Sepsis durch die *Cecal ligation and puncture* induziert. Die daraufhin einsetzende Verminderung des Allgemeinzustandes der Tiere, gemes-

sen am Körpergewicht und letztendlich am Überleben, zeigten, dass es tatsächlich zu einer systemischen Entzündung gekommen war. Bei der CLP-induzierten Sepsis zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Überleben zwischen den Wildtyp- und den *Nalp6*^{-/-}-Tieren. Von jeweils 13 Tieren erreichten nur zwei der Wildtyp-Tiere aber acht der *Nalp6*^{-/-}-Tiere den vorgesehenen Endpunkt des Experiments nach drei Tagen. Auch das Körpergewicht der überlebenden *Nalp6*^{-/-}-Tiere lag an Tag 3 signifikant über dem der Wildtyp-Tiere. In der Histologie zeigten sie sich keine Unterschiede. Der signifikante Überlebensvorteil der *Nalp6*^{-/-}-Tiere und das höhere Endgewicht bei Versuchsende lassen darauf schließen, dass die *Nalp6*^{-/-}-Tiere vor Sepsis geschützt sind. Dies unterstützt ebenfalls die Ergebnisse von Bauer et al, dass die Defizienz eines Nalp-Proteins übermäßige Entzündungsreaktion bremst (Bauer u. a., 2010).

4.2.1 Die Regulation der proinflammatorischen Zytokine in der *Nalp6*^{-/-}-Maus

Um Unterschiede in der Zytokinausschüttung zwischen *Nalp6*^{-/-}-Mäusen und den Wildtypmäusen in einer Primärkultur nachzuweisen, ist die Isolierung und Kultivierung von Knochenmark-Makrophagen (*BMDMs*) eine geeignete Methode. Nicht nur die Vielzahl an Funktionen, die Makrophagen in der Immunabwehr erfüllen, sondern auch ihr Wachstumsverhalten sind ideal, um die bestehende Fragestellung zu untersuchen. Im Vergleich zu anderen primären Zellkulturen sind sie homogen, haben eine hohe proliferative Kapazität und können in Kultur bis zu drei Wochen leben, ohne morphologische und funktionelle Veränderungen aufzuweisen (Cunnick u. a., 2006; Weischenfeldt und Porse, 2008). Im Verlauf der experimentellen Arbeit wurde das Protokoll für die Isolierung der *BMDMs* grundlegend verändert (siehe Material- und Methodenteil). Durch das neue Protokoll wurden ein deutlich verbessertes *in-vitro* Wachstum und eine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Experimenten erreicht. Durch die Nutzung des

L929-Mediums im Anfangsprotokoll war die Gefahr für Kontaminationen deutlich erhöht, da es sich hierbei um den Überstand aus einer anderen Zelllinie handelt. Dadurch war die Kultivierungszeit länger und es gab mehr Verarbeitungsschritte, was die Kontaminationsgefahr weiter erhöht hat. Weiterhin war die dort enthaltene Menge des benötigten Wachstumsfaktors M-CSF sowie anderer Nährstoffe nicht genau dosierbar. Im Verlauf wurden durch das spezielle Makrophagenmedium sowie extra hinzugefügtes, und damit genau dosiertes M-CSF, nicht nur ein besseres Wachstum, sondern vor allem vergleichbare Ergebnisse zwischen verschiedenen Experimenten erreicht. Die verbesserte Reproduzierbarkeit und die höhere Ausbeute haben es ermöglicht, wissenschaftlich verwertbare Ergebnisse zu erzielen und die Anzahl der benötigten Mäuse zu reduzieren.

Die *Nalp6*^{-/-}-Tiere zeigen geringere Spiegel von IL-1 β und TNF α als die Wildtyp-Tiere

Die kultivierten Makrophagen und das Serum der Mäuse wurden untersucht, um Erkenntnisse über den Zytokingehalt zu gewinnen. Zunächst wurden die *BMDMs* mit unterschiedlichen Reagenzien stimuliert und anschließend die mRNA mittels RT-PCR auf IL-6, KC und mip-2 untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl bei den Wildtyp-Tieren als auch bei den *Nalp6*^{-/-}-Tieren die mRNA der untersuchten Zytokine vorhanden war. Bei IL-6 zeigte sich nur eine Amplifikation der Proben, die vorher mit LPS stimuliert waren, bei KC und mip-2 zeigten sich in allen Proben Banden. Auch wenn die Auswertung der RT-PCR auf eine stärkere Ausprägung von IL-6 und KC bei *Nalp6*^{-/-}-Tieren hinzuweisen scheinen, kann darüber keine genaue Aussage getroffen werden, da die RT-PCR keine genaue Quantifizierung erlaubt. Deshalb wurde eine quantitative Analyse mittels ELISA durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass in den *BMDMs* der absolute Gehalt von TNF- α und IL-1 β signifikant unter dem der Wildtyp-Tiere lag. Die größte Zunahme der jeweiligen Zytokinspiegel zeigte sich nach Stimulation mit LPS. Der

Unterschied zwischen den Zellen der beiden Genotypen war allerdings nur bei dem IL-1 β -Spiegel und dem Gehalt an KC (murinem IL-8) signifikant. Der in den Experimenten erkennbare Trend deckt sich mit den Ergebnissen von Bauer et al., die in Makrophagen ebenfalls erniedrigte IL-1 β -Spiegel bei den *Nalp3*^{-/-}-Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren gemessen hatten. Der Unterschied ließe sich für *Nalp6* eventuell statistisch noch besser nachweisen, wenn die Experimente mit mehr technischen und biologischen Repikaten wiederholt würden und es gelänge, die Standardabweichungen zu minimieren. Weiterhin hatten Bauer et al. in Kolonzellen ein ähnliches Verhalten der Zytokinspiegel gezeigt.

Bei der Analyse von IL-6 zeigte sich ein deutlicher Anstieg nach LPS-Stimulation, was die Ergebnisse der PCR bestätigt. Weiterhin zeigt sich bei KC ein signifikant höheres Level bei den *Nalp6*^{-/-}-Tieren, als bei den Wildtyp-Tieren, was sich ebenfalls mit der RT-PCR deckt und im Einklang mit den Ergebnissen von Zaki et al. steht.

In Ergänzung zu den *BMDMs* wurden die Zytokinlevel auch im Serum bestimmt, allerdings nur die optische Dichte und nicht der absolute Zytokingehalt. Trotzdem bestätigen sich hier die Ergebnisse der *BMDM*-Untersuchungen, was darauf schließen lässt, dass die Zytokinspiegel sich *in vivo* etwa so verhalten, wie in den *BMDM*-Zellen. Auch hier ließ sich der Unterschied statistisch nicht nachweisen, für den Versuch mit IL-1 β ließ sich allerdings ein Trend erkennen ($p=0,07$), der der Spiegel bei den Wildtyp-Tieren höher lag als bei den *Nalp6*^{-/-}-Tieren.

Die Bestimmung der Zytokinspiegel in den Milzzellen, zeigte keine eindeutigen Ergebnisse, da hier die interindividuellen Unterschiede zwischen den beiden verschiedenen Wildtyp-Tieren höher war, als die Unterschiede zwischen den Wildtyp- und den *Nalp6*^{-/-}-Tieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Kultivierung und Stimulation der *mixed spleenocytes* noch nicht die gleiche Qualität erreicht hatte, wie die der *BMDMs*, deren Protokoll im Laufe der vorliegenden Ar-

beit verbessert wurde. Weiterhin zeigen diese Unterschiede auf, dass eine Bestimmung von einzelnen Tieren an Stelle des „Poolens“ Aufschlüsse über die interindividuellen Unterschiede geben kann. Dies wurde bei den *BMDM*-Zellen nicht gemacht, da es einen deutlich größeren logistischen Aufwand erfordert. Durch die individuelle Kultivierung der *BMDMs* nimmt die Qualität ab, da die Zellen nicht schnell genug und vor allem nur mit deutlichen zeitlichen Unterschieden verarbeitet werden können.

Auch Bauer et al. und Zaki et al. haben die Spiegel mehrerer Zytokine in verschiedenen Geweben bestimmt, um zu untersuchen, welche Reaktionen durch *Nalp3* hervorgerufen werden. Bereits Kwon et al. hatten gezeigt, dass $IL-1\beta$ eine Rolle in der DSS-induzierten Kolitis spielt (Kwon, Ohigashi und Murakami, 2007). Deshalb wurde $IL-1\beta$ von Zaki et al. auch im intestinalen Gewebe und im Serum bestimmt. Bauer et al. haben zusätzlich auch Makrophagen untersucht. Zaki et al. konnten zeigen, dass die Ausschüttung von $IL-18$ bei Wildtyp-Tieren sowohl im Serum als auch in Darmepithel nach DSS-Stimulation bei den Wildtyp-Tieren höher war als bei den *Nalp3*^{-/-}-Tieren. Weiterhin wurden bei den *Nalp3*^{-/-}-Tieren erhöhte Spiegel von KC (murines $IL-8$), $TNF-\alpha$, $IL-6$ und MCP-1 gezeigt. Bauer et al. hingegen zeigten in Makrophagen von *Nalp3*^{-/-}-Tieren erniedrigte $IL-\beta$ -Spiegel. Beide Autoren berufen sie sich auf Montelone et al. und Maeda et al., die zeigen, dass die Ausschüttung $IL-18$ und $IL-\beta$ mit der Entwicklung von Kolitis einhergeht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf eine Relevanz von *Nalp6* bei der Entzündungsreaktion hin

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *Nalp6* eine entscheidende Rolle in der Entzündungsreaktion zu spielen scheint. Im Vergleich zu der Diskussion zwischen Zaki et al. und Bauer et al. um den Einfluss von *NALP3* auf chronische Darmentzündungen (Bauer u. a., 2010; Zaki u. a., 2010) legen die Ergebnisse die-

ser Arbeit eine Wirkungsweise von NALP6 in der Entzündungsreaktion nahe, die dem Einfluss von NALP3 in den Arbeiten von Bauer et al. entsprechen: die Tiere sind vor Entzündungen geschützt, weisen niedrigere Spiegel proinflammatorischer Zytokine auf und haben ein besseres Überleben in Entzündungssituationen.

4.3 Funktion von Nalp6 im Entzündungsprozess

In Ergänzung zu den Entzündungsversuchen an Mäusen war es auch Ziel dieser Arbeit, mehr über die die genaue Wirkungsweise von NALP6 im Entzündungsprozess zu erfahren.

LPS, MDP, TNF- α , INF- γ und Flagellin scheinen Nalp6 zu aktivieren

Die Expressionsanalysen an humanen THP-Zellen mittels qRT-PCR zeigte eine verstärkte Expression von Nalp6 nach Stimulation mit Flagellin, LPS und INF- γ . Die *in vivo*-Versuche stützen diese Ergebnisse für LPS und INF- γ und deuten auf MDP und TNF- α als weitere Aktivatoren hin, da die Stimulation mit LPS, MDP, TNF- α und INF- γ bei den Wildtyp-Tieren zu einem Anstieg der Zytokine führte. Um dies zu verifizieren und weitere Aktivatoren von Nalp6 zu identifizieren, wurden weitere Versuche durchgeführt. Hierfür wurden *in vitro* humane Zelllinien mit *NALP6* transfiziert und anschließend mit verschiedenen Stoffen stimuliert. Allerdings gelang der Nachweis von NALP6 mittels Western Blot nicht, da kein funktionierender Antikörper gegen Nalp6 erhältlich war. Wie bei Martinon et al. gezeigt, hätte in einem zweiten Schritt versucht werden können, gezielt Spaltprodukte einer aktivierten Kaspase-1 nachzuweisen (Martinon u. a., 2004).

Nalp6 verhält sich im Entzündungsprozess wie ein Inflammasom

In den 2011 veröffentlichten Artikeln über Nalp6 wird stets von einem Nalp6-Inflammasom gesprochen (Chen u. a., 2011; Elinav u. a., 2011). Die wesentliche Eigenschaft eines Inflammasoms, wie es 2002 von Martinon et al. definiert wurde, ist die Bildung eines Multiproteinkomplexes, bestehend aus einem NLR-Protein, ASC und Kaspase-1 (Martinon, Burns und Tschopp, 2002). Wie von Grenier et al. bereits 2002 gezeigt, kann Nalp6 in Verbindung mit ASC NF- κ B aktivieren (Grenier u. a., 2002). Zur Bildung eines Inflammasoms müsste Nalp6 auch mit aktivierter Kaspase einen Komplex eingehen (Agostini u. a., 2004). Dieses Enzym, auch bekannt als *Interleukin-1 β -Converting Enzyme (ICE)*, führt zur Spaltung und damit Aktivierung von IL-1 β (Black u. a., 1988). Da in den vorliegenden Tierversuchen gezeigt werden konnte, dass die Produktion von IL-1 β bei den Wildttypetieren höher war als bei den Nalp6-defizienten Tieren, ist davon auszugehen, dass Nalp6 Einfluss auf die Freisetzung der genannten Interleukine und damit auch auf die Aktivierung der Kaspase-1 hat (Conforti-Andreoni, Ricciardi-Castagnoli und Mortellaro, 2011).

Durch diesen Schluss scheint Nalp6 bereits zwei der Kriterien eines Inflammasoms zu besitzen: die Bildung eines Multiproteinkomplexes mit ASC und aktivierter Kaspase-1 sowie die Kaspase-1-gesteuerte Freisetzung von IL-1 β . Eine weitere Charakteristik der Inflammasome ist die Aktivierung durch verschiedene Bakterienbestandteile und Gefahrensignale (Martinon u. a., 2004; Martinon, 2008). Da, wie oben gezeigt, davon ausgegangen werden kann, dass LPS und MDP Nalp6 aktivieren können, scheint Nalp6 auch in diesem Punkt Eigenschaften eines Inflammasoms zu besitzen. Die Experimente der vorliegenden Arbeit legen zusammen mit den bereits bekannten Ergebnissen aus der Literatur nahe, dass Nalp6 an der Bildung eines Inflammasoms beteiligt ist.

Es ergeben sich Hinweise auf eine funktionelle Koexpression von Nalp3 und Nalp6

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Koimmunopräzipitation gibt Hinweise auf eine mögliche Koexpression von Nalp3 und Nalp6, kann diese jedoch nicht abschließend bestätigen. In dem Artikel von Chen et al. wird hingegen von einer funktionellen Gegenregulation von Nalp3 und Nalp6 ausgegangen (Chen u. a., 2011).

Die Frage nach der genauen Struktur eines eventuellen Nalp6-Inflammasoms bleibt weiterhin offen

Der Hinweis auf eine Koexpression von Nalp3 und Nalp6 lässt weitere Vermutungen über die Existenz und Struktur eines Nalp6-Inflammasoms zu. Es könnte sich sowohl um ein eigenständiges Inflammasom ähnlich wie das NLRC4-Inflammasom als auch um ein Nalp3-assoziiertes Inflammasom, wie das Nalp1-Nalp3-Inflammasom handeln.

4.4 Ausblick

Nalp6 scheint sowohl lokale als auch generalisierte Entzündungsreaktionen zu beeinflussen. Da die bisher gewonnenen Ergebnisse sich zum Teil widersprechen, sollte versucht werden, die Rolle von Nalp6 besser zu verstehen und die beteiligten Prozesse zu entschlüsseln. Da es sich hierbei um ein komplexes System handelt, müssen sowohl die Faktoren, die Nalp6 aktivieren können als auch die genaue Wirkungsweise von Nalp6 und die dadurch in Gang gesetzten Reaktionen genauer aufgeklärt werden. Hierfür müssen weitere Stoffe identifiziert werden, die zu einer Aktivierung der NALP6-vermittelten Entzündungsreaktion beitragen. Erste Erkenntnisse hierüber ließen sich durch *in vitro*-Versuche an humanen Zelllinien gewinnen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten bereits einige Stoffe

mittels qRT-PCR identifiziert werden. Diese Versuche könnten für eine größere Auswahl potenzieller Aktivatoren wiederholt werden.

Um mehr über die genaue Struktur des NALP6-Inflammasoms heraus zu finden, sollte zunächst versucht werden, die Reaktionen von NALP3 und NALP6 sowie von NALP6 und anderen bekannten Inflammasombuildnern zu differenzieren. Dies könnte sowohl Aufschluss über mögliche Koexpressionen geben als auch die Eigenständigkeit eines NALP6-Inflammasoms nachweisen. Bevor dies in einem größer angelegten Tierversuch, in dem *Nalp3*^{-/-}- und *Nalp6*^{-/-}- Tiere sowie Wildtyp- und eventuell noch weitere transgene Tiere miteinander verglichen werden, untersucht wird, könnte allerdings versucht werden, dies an humanen Zelllinien *in vitro* nachzuweisen. Hierfür könnte versucht werden, die NALP3- bzw. NALP6-Funktion gezielt mittels siRNA auszuschalten und anschließend die Spiegel verschiedener entzündungskorrelierter Proteine im Zelllysat nachzuweisen.

Um die klinische Relevanz von *Nalp6* sowohl im Rahmen chronischer Darmentzündungen als auch von Sepsis zu untersuchen, könnte versucht werden, eine erhöhte *Nalp6*-Aktivität in Darmbiopsien bzw. Serumproben erkrankter Patienten nachzuweisen.

Letztendlich ist davon auszugehen, dass detaillierte Kenntnisse über NALP6 und die beteiligten Faktoren dazu beitragen können, therapeutisch in Entzündungsgeschehen einzugreifen. Dies könnte eines Tages zu einer gezielten Therapie überschießender Entzündungsreaktionen, wie sie im Rahmen der Sepsis und chronischer Entzündungskrankheiten auftreten, einzudämmen.

5 Zusammenfassung

Die Reaktion des Körpers auf Bakterien, Viren und andere Stoffe, die dem Körper Schaden zufügen können, ist eine wesentliche Herausforderung des Immunsystems. Die Unterscheidung zwischen tatsächlich schädlichen Stoffen und körpereigenen Zellen hat dabei eine besondere Bedeutung. Fehler in diesem System können einerseits zu einer abgeschwächten Immunabwehr, andererseits zu überschießenden Reaktionen wie bei den autoimmun-vermittelten Erkrankungen führen. Eine besondere Rolle bei der Reaktion auf potenzielle Gefahrenstoffe haben die *Nod-like* Rezeptoren, die Teil des angeborenen Immunsystems sind. Sie sind im Zytosol lokalisiert und erkennen pathogen-assoziierte Moleküle (*PAMPs*) oder andere zytosolische Gefahrensignale (*DAMPs*). Ihr Einfluss auf die Immunabwehr wird durch die weitreichenden Folgen deutlich, die Mutationen in einzelnen *Nod-like* Rezeptoren haben können. Fehlregulationen von NALP3, das zu einer Untergruppe der NLRs gehört, können verschiedene autoimmune Entzündungs- und Fieberkrankheiten wie das Muckle-Wells-Syndrom und das *familial coldauto-inflammatory syndrome* auslösen. Weiterhin spielt der Rezeptor NOD2 eine Rolle bei der Entstehung von M. Crohn.

In dieser Arbeit wurde die Funktion von *NALP6*, einem Protein, das eng mit NALP3 verwandt ist, sowohl an verschiedenen Entzündungsmodellen im Tierversuch als auch *in vitro* näher untersucht. Ziel der Arbeit war es, die Rolle von NALP6 im Entzündungsprozess zu untersuchen sowie Erkenntnisse über seine genaue Funktionsweise zu gewinnen. Um genauere Erkenntnisse über NALP6 zu

gewinnen, wurden zunächst Expressionsanalysen durchgeführt. Diese zeigten, dass NALP6 in menschlichen Geweben in Milz, Niere und Leukozyten ausgebildet wird. Bei der Untersuchung verschiedener humaner Zelllinien zeigte sich die stärkste Expression in Zelllinien aus immortalisierten Immunzellen. Die Expression von NALP6 wurde durch Stimulation mit IFN γ , LPS und Flagellin induziert. Anschließend wurde in einem homozygoten murinen *Nalp6* knockout Modell (*Nalp6*^{-/-}) die Reaktion von *Nalp6*-defizienten Tiere mit der von Wildtyptieren verglichen. Bei einer künstlich mittels Dextran-Natriumsulfat (DSS) induzierten chronischen Darmentzündung waren die *Nalp6*^{-/-}-Tiere leicht vor Entzündung geschützt. Als weitere exemplarische Entzündungsform wurde für diese Arbeit die Sepsis ausgewählt. Es wurden zwei Sepsis-Modelle untersucht: die *cecal ligation and puncture* (CLP), wobei der Darm punktiert und so eine Bauchfellentzündung herbeigeführt wurde, und der LPS-Endotoxinschock, bei dem die Injektion von LPS eine Sepsis induzierte. In diesen Versuchen zeigte sich ein signifikanter Überlebensvorteil der *Nalp6*^{-/-}-Tiere. Da die Expressionsanalysen eine stärkere Ausprägung in Immunzellen gezeigt hatten, wurden im Anschluss in isolierten Knochenmakrophagen (*bone marrow derived macrophages* (BMDMs) und im Serum die Spiegel entzündungskorrelierte Zytokine mittels RT-PCR und ELISA bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass die *Nalp6*^{-/-}-Tiere weniger IL-1 β und TNF α aufwiesen als die Wildtyptiere. Auch die Analyse von isolierten Milzzellen nach einem LPS-Endotoxinschock zeigte einen höheren Anstieg von IL-1 β bei den Wildtyptieren als bei den *Nalp6*^{-/-}-Tieren. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass *Nalp6* eine IL-1 β - und TNF α - vermittelte Entzündungsreaktion auslöst. Sowohl die Erkenntnisse dieser Arbeit als auch die Literatur deuten darauf hin, dass NALP6 in Form eines Inflammasoms agiert. Es zeigten sich auch Hinweise darauf, dass *Nalp6* mit *Nalp3* koexprimiert wird. Die Frage, ob *Nalp6* mit *Nalp3* ein gemeinsames Inflammasoms bildet oder eigenständig ist, bleibt weiterhin offen.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung des angeborenen und des erworbenen Immunsystems (Dranoff, 2004)	10
1.2	Schematische Darstellung der verschiedenen Pathogensensoren (Ranjan u. a., 2009)	11
1.3	Darstellung der Toll-like Rezeptoren und ihrer Liganden (Takeda und Akira, 2005)	12
1.4	Domänenstruktur verschiedener <i>NLR</i> -Proteine (Khare u. a., 2010) .	14
1.5	Aktivierung des NALP3-Inflammasoms (Martinon und Tschopp, 2007)	16
3.1	RT-PCR von <i>Nalp6</i> - und <i>Nalp6</i> ^{-/-} -Mäusen. Die DNA wurde aus den Schwanzspitzen isoliert. Bei den <i>Nalp6</i> -Tieren zeigen sich Banden nach den Vorgaben der Firma Genoway, bei dem funktionierenden Knockout zeigen sich keine Banden. Exemplarische Darstellung von n=1. Jedes in die Versuche eingeschlossene Tier wurde vorher einzeln auf den vorhandenen Knockout getestet.	49
3.2	Basale Phänotypisierung. Gezeigt werden jeweils ein unbehandeltes <i>Nalp6</i> ^{-/-} -Tier und ein unbehandeltes Wildtyp-Tier. Es fanden sich keine Unterschiede zwischen den Wildtyp und den <i>Nalp6</i> ^{-/-} -Tieren.	51

3.3	Gewichtsverlauf und <i>Disease Activity Index (DAI)</i> unter DSS-induzierter Kolitis bei <i>Nalp6^{-/-}</i> - und Wildtyp-Tieren. Gezeigt wird der Median von jeweils n=13 Tieren. Die Kurven, die die Gewichtsveränderung anzeigen verlaufen signifikant unterschiedlich (p=0,001) während sich im DAI kein signifikanter Unterschied feststellen ließ (p= 0.64).	53
3.4	Kolonlänge am Tag 35 nach DSS-induzierter chronischer Kolitis. Gezeigt werden die Ergebnisse von den 5 aus 7 Wildtyp-Tieren, die den Endpunkt nach 35 Tagen erreicht hatten, sowie 13 aus 13 <i>Nalp6^{-/-}</i> -Tieren. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den <i>Nalp6^{-/-}</i> - und den Wildtyp-Tieren (p=0,02).	54
3.5	Größe und Gewicht der Milzen von <i>Nalp6^{-/-}</i> - und Wildtyp-Tieren am Tag 35 nach DSS-induzierter chronischer Kolitis. Gezeigt werden die Ergebnisse von den 5 aus 7 Wildtyp -Tieren, die den Endpunkt erreicht haben, sowie von 12 aus 13 <i>Nalp6^{-/-}</i> -Tieren. Die Unterschiede zwischen den Wildtyp- und den <i>Nalp6^{-/-}</i> -Tieren waren nicht signifikant (Milzgewicht p=0,39; Milzlänge p= 0,11). . . .	54
3.6	verschiedene Kolonabschnitte von 1 (proximal) bis 3 (distal) nach DSS-induzierter chronischer Kolitis, gezeigt werden jeweils ein repräsentatives Beispiel von jeweils 13 <i>Nalp6^{-/-}</i> -Tieren bzw. 7 Wildtyp-Tieren.	55
3.7	Überleben nach Injektion von LPS in Stunden, jeweils n= 8 Tiere. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Überlebenszeit festgestellt werden (p= 0,11).	56
3.8	Dry/Wet-Ratio von Kolon und Jejunum nach LPS-Endotoxin-Schock bei <i>Nalp6^{-/-}</i> - und Wildtyp-Tieren.	57

3.9	Überleben und Gewichtsverlauf unter CLP-Sepsis bei jeweils n=17 <i>Nalp6</i> ^{-/-} - und Wildtyp-Tieren. Die <i>Nalp6</i> ^{-/-} -Tiere zeigten ein signifikant höheres Überleben als die Wildtyp-Tiere (p=0,03) sowie an Tag 3 ein signifikant höheres Gewicht (p=0,02).	58
3.10	Beispielhafte Darstellung verschiedener Organe nach CLP-Sepsis. Gezeigt wird das eine überlebende Wildtyp-Tier sowie ein <i>Nalp6</i> ^{-/-} -Tier im Vergleich. Es zeigten sich keine histomorphologischen Unterschiede.	59
3.11	Expression von <i>NALP6</i> in humanen Geweben. Die Expression von <i>NALP1</i> , <i>NALP3</i> und <i>NALP6</i> wurde mittels RT-PCR in einem kommerziell erworbenen Human Tissue Kit analysiert und Hinweise auf die Expression in verschiedenen humanen Geweben zu erhalten.	60
3.12	Expression von <i>NALP6</i> in verschiedenen Zelllinien. Als entfernte Modelle vom Organismus wurden Zelllinien aus unterschiedlichen Geweben mittels RT-PCR auf die Expression von <i>NALP6</i> untersucht. Es zeigte sich für <i>NALP1</i> eine starke Expression in allen Zelllinien, für <i>NALP6</i> eine Expression in Jurkat und ThP1-Zellen sowie eine schwache Expression in der SW480- und der HT29-Zelllinie. <i>NALP3</i> zeigte eine starke Expression in ThP1-Zellen und eine schwache Expression in HT29-Zellen. In diesen beiden Zelllinien sind <i>NALP3</i> und <i>NALP6</i> koexprimiert.	61
3.13	Normalisierte semiquantitative Expression von <i>NALP6</i> in ThP1-Zellen nach Stimulation mit Listerien sowie, relativ zu unstimulierten Zellen. Gezeigt ist der Mittelwert aus zwei technischen Replikaten. Im Zeitverlauf nimmt die Expression von <i>NALP6</i> unter Listerienstimulation ab.(nach 1h Stimulation mit Listerien vs. 0h p= 0,01, nach 2h Stimulation mit Listerien vs. 0h p= 0,0006, nach 8h Stimulation mit Listerien vs. 0h p= 0,001).	62

- 3.14 Normalisierte semiquantitative Expression von *NALP6* in ThP1-Zellen nach Stimulation mit LPS sowie, relativ zu unstimulierten Zellen. Gezeigt ist der Mittelwert aus zwei technischen Replikaten. Die Stimulation mit LPS hat keine Auswirkung auf die Expression von *NALP6*. Nach Stimulation mit Flagellin zeigt sich ein Abfall der Expression von *NALP6* nach 1h, der Unterschied ist aber nicht signifikant. Die Stimulation mit Flagellin hat damit ebenfalls keinen Einfluss auf die Expression von *NALP6*. 63
- 3.15 Normalisierte semiquantitative Expression von *NALP6* in ThP1-Zellen nach Stimulation mit TNF- α sowie IFN- γ , relativ zu unstimulierten Zellen. Gezeigt ist der Mittelwert aus zwei technischen Replikaten. Die Stimulation mit TNF- α zeigt keine Veränderung in der Expression von *NALP6*. Nach Stimulation mit *NALP6* zeigt sich eine vermehrte Expression von *NALP6* nach 1h und 2h (nach 1h Stimulation mit IFN- γ vs. 0h p= 0,005, nach 2h Stimulation mit IFN- γ vs. 0h p=0,002, nach 8h Stimulation mit IFN- γ vs.0h p= 0,057). 64
- 3.16 Nachweis von IL 6 und KC (murinem IL-8) mittels RT-PCR in stimulierten BMDM-Zellen. Stimulation mit LPS und MDP, RT-PCR mit einer *annealing* Temperatur von 54°, 34 Zyklen. Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis aus zwei Experimenten. Es zeigt sich bei dem Experiment mit KC eine Expression in den *Nalp6*^{-/-}-Tieren, jedoch nicht in den Wildtyp-Tieren. Für IL-6 zeigt sich lediglich eine Expression bei den Proben, die mit LPS bzw. LPS+MDP stimuliert worden sind, dieses Expressionsmuster ist in beiden Genotypen gleich. 65

3.17	ELISA-Nachweis aus BMDM-Kulturen von jeweils n=3 Mäusen. Zellen von <i>Nalp6</i> ^{-/-} - und Wildtyp-Tieren wurden wie im Material und Methoden-Teil beschrieben, kultiviert und am 10. Tag stimuliert. Gezeigt wird der Median von jeweils drei technischen Replikaten.	66
3.18	ELISA-Nachweis aus <i>mixed Spleenocytes</i> -Kulturen von jeweils n=3 Mäusen. Zellen von <i>Nalp6</i> ^{-/-} - und Wildtyp-Tieren wurden wie im Material- und Methodenteil beschrieben, kultiviert und am 10. Tag stimuliert. Gezeigt wird der Median von jeweils drei technischen Replikaten. Es konnte für die verschiedenen Zeitpunkte kein signifikanter Unterschied zwischen <i>Nalp6</i> ^{-/-} - und Wildtyp-Tieren nachgewiesen werden.	68
3.19	ELISA aus Serum von <i>Nalp6</i> ^{-/-} - und Wildtyp-Tieren nach LPS-Injektion, jeweils n=3 Tiere. Injektion von 10 µl LPS in 90 µl PBS i.p. Messung nach drei Stunden, vier Stunden, und fünf Stunden. Versuchsabbruch nach fünfeinhalb Stunden, da alle Tiere verstorben waren. In der Kurvenanalyse mittels Anova konnte keine signifikante Korrelation festgestellt werden (KC: p=0,24, IL-1β: p=0,07, IL-6: p=0,23, TNF-α: p=0,70). Im Vergleich der einzelnen Stundenwerte mit dem Student-t-Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied für TNF-α nach 3h und 4h, für IL-1β zeigte sich ein signifikanter Unterschied nach 4h.	70
3.20	Darmbiopsien von Patienten mit M. Crohn, Colitis ulcerosa und gesunden Patienten, jeweils n=6. Western Blot mit Nalp3-Antikörper (1:500) und Maus-Antikörper (1:1500). Repräsentative Darstellung von zwei unabhängigen Experimenten. Nalp3 hat eine Größe von 118 kDa.	71

3.21	Western Blot von transfizierten HEK-Zellen (Transfection mit ASC und caspase-1, s. Material und Methoden), stimuliert mit INF- γ (1:10.000 im Nährmedium). Western Blot mit Caspase-1-Antikörper (1:500) und Maus-Antikörper (1:1500). Repräsentative Darstellung von drei unabhängigen Experimenten.	71
3.22	Co-Immunopräzipitation mit Nalp3-Antikörpern von kultivierten BMDM-Zellen von WT-Tieren. Stimulation der kultivierten BMDM-Zellen mit Salmonellen (75 Stück/ Zelle) für zwei beziehungsweise zehn Stunden. Nach Ende des Stimulationszeit Abnahme des Mediums und Zugabe von Antibiotika-haltigem Medium (s. Material und Methoden). Anschließend Western Blot mit Nalp6-Antikörper (1:500) und <i>rabbit</i> -Antikörper (1:1500). Repräsentative Darstellung von zwei unabhängigen Western Blots aus Zelllysaten von einer Ko-Immunopräzipitation.	72

Tabellenverzeichnis

2.1	<i>Disease Activity Index (DAI)</i>	24
2.2	Verwendete Zelllinien und Kulturmedien	27
2.3	Verwendete Zellkulturformate	31
2.4	Verwendete Formate und Volumina für DNA Transfektionsansätze	32
2.5	GAPDH-Kontroll-PCR	36
2.6	Reaktionsansatz für cDNA Synthese	37
2.7	RT-PCR	38
2.8	Zusammensetzung eines Trenngels	41
2.9	Zusammensetzung eines Sammelgels	42
2.10	Verwendete Antikörper und Verdünnungen zur Immundetektion .	43
3.1	Blutbild <i>Nalp6</i> ^{-/-} -Mäuse im Vergleich zu den Normwerten (Ewring- mann, 2008)	50
3.2	Klinische Chemie <i>Nalp6</i> ^{-/-} -Mäuse im Vergleich zu C57BL6-Mäusen (Mittelwert, angepasst nach (Zur, 2005))	50
5.1	Verwendete Chemikalien und Zusätze	105
5.2	Oligonukleotide	106
5.3	Verwendete Zellkulturmedien	107
5.4	Verwendete Kits	107
5.5	Verwendete Geräte	107

Literatur

Agostini, Laetitia u. a. (2004). "NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder." eng. In: *Immunity* 20.3, S. 319–325.

Albrecht, Mario u. a. (2003). "Identification of mammalian orthologs associates PYPAF5 with distinct functional roles." eng. In: *FEBS Lett* 538.1-3, S. 173–177.

Angus, D. C. u. a. (2001). "Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care." eng. In: *Crit Care Med* 29.7, S. 1303–1310.

Bach, Jean-Francois (2002). "The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases." eng. In: *N Engl J Med* 347.12, S. 911–920. DOI: 10.1056/NEJMra020100. URL: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra020100>.

Bauer, Christian u. a. (2010). "Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome." eng. In: *Gut* 59.9, S. 1192–1199. DOI: 10.1136/gut.2009.197822. URL: <http://dx.doi.org/10.1136/gut.2009.197822>.

Bäckhed, Fredrik u. a. (2005). "Host-bacterial mutualism in the human intestine." eng. In: *Science* 307.5717, S. 1915–1920. DOI: 10.1126/science.1104816. URL: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1104816>.

Binder, Vibeke (2004). "Epidemiology of IBD during the twentieth century: an integrated view." eng. In: *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18.3, S. 463–479. DOI:

10.1016/j.bpg.2003.12.002. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpg.2003.12.002>.

Black, R. A. u. a. (1988). "Generation of biologically active interleukin-1 beta by proteolytic cleavage of the inactive precursor." eng. In: *J Biol Chem* 263.19, S. 9437–9442.

Bokemeyer, B. (2007). "CED-Behandlung in Deutschland". In: *Der Gastroenterologe* 2.6, S. 447–455.

Bonizzi, Giuseppina und Michael Karin (2004). "The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity." eng. In: *Trends Immunol* 25.6, S. 280–288. DOI: 10.1016/j.it.2004.03.008. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2004.03.008>.

Chen, Grace u. a. (2009). "NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease." eng. In: *Annu Rev Pathol* 4, S. 365–398. DOI: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092239. URL: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092239>.

Chen, Grace Y. u. a. (2011). "A functional role for Nlrp6 in intestinal inflammation and tumorigenesis." eng. In: *J Immunol* 186.12, S. 7187–7194. DOI: 10.4049/jimmunol.1100412. URL: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1100412>.

Conforti-Andreoni, Cristina, Paola Ricciardi-Castagnoli und Alessandra Mortelaro (2011). "The inflammasomes in health and disease: from genetics to molecular mechanisms of autoinflammation and beyond." eng. In: *Cell Mol Immunol* 8.2, S. 135–145. DOI: 10.1038/cmi.2010.81. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/cmi.2010.81>.

Crohn, B. B., L. Ginzburg und G. D. Oppenheimer (1984). "Landmark article Oct 15, 1932. Regional ileitis. A pathological and clinical entity. By Burril B. Crohn, Leon Ginzburg, and Gordon D. Oppenheimer". In: *JAMA* 251.1. Crohn, B B Ginzburg, L Oppenheimer, G D Biography Historical Article United states JAMA : the

journal of the American Medical Association JAMA. 1984 Jan 6;251(1):73-9., S. 73–9.

Cunnick, Jess u. a. (2006). “Use of bone marrow-derived macrophages to model murine innate immune responses.” eng. In: *J Immunol Methods* 311.1-2, S. 96–105. DOI: 10.1016/j.jim.2006.01.017. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2006.01.017>.

de Bree, Godelieve J. u. a. (2005). “Selective accumulation of differentiated CD8+ T cells specific for respiratory viruses in the human lung.” eng. In: *J Exp Med* 202.10, S. 1433–1442. DOI: 10.1084/jem.20051365. URL: <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20051365>.

Dostert, Catherine u. a. (2008). “Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica.” eng. In: *Science* 320.5876, S. 674–677. DOI: 10.1126/science.1156995. URL: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1156995>.

Dranoff, Glenn (2004). “Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy.” eng. In: *Nat Rev Cancer* 4.1, S. 11–22. DOI: 10.1038/nrc1252. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1252>.

Eisenbarth, Stephanie C. u. a. (2008). “Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants.” eng. In: *Nature* 453.7198, S. 1122–1126. DOI: 10.1038/nature06939. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nature06939>.

Elinav, Eran u. a. (2011). “NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis.” eng. In: *Cell* 145.5, S. 745–757. DOI: 10.1016/j.cell.2011.04.022. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.04.022>.

Engel, Christoph u. a. (2007). “Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study.” eng. In: *Intensive Care Med* 33.4, S. 606–

618. DOI: 10.1007/s00134-006-0517-7. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s00134-006-0517-7>.

Ewringmann Anja Glöckner, Barbara (2008). *Leitsymptome bei Ratte, Hamster, Maus und Rennmaus*. Enke Verlag.

Fukata, Masayuki u. a. (2005). "Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis." eng. In: *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288.5, G1055–G1065. DOI: 10.1152/ajpgi.00328.2004. URL: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00328.2004>.

Gasse, Pamela u. a. (2009). "Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis." eng. In: *Am J Respir Crit Care Med* 179.10, S. 903–913. DOI: 10.1164/rccm.200808-1274OC. URL: <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200808-1274OC>.

Gent, A. E. u. a. (1994). "Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy". In: *Lancet* 343.8900. Gent, A E Hellier, M D Grace, R H Swarbrick, E T Coggon, D Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't England *Lancet Lancet*. 1994 Mar 26;343(8900):766-7., S. 766–7.

Ghosh, Sankar und Michael Karin (2002). "Missing pieces in the NF-kappaB puzzle." eng. In: *Cell* 109 Suppl, S81–S96.

Grenier, Jill M. u. a. (2002). "Functional screening of five PYPAF family members identifies PYPAF5 as a novel regulator of NF-kappaB and caspase-1." eng. In: *FEBS Lett* 530.1-3, S. 73–78.

Hampe, J. u. a. (2001). "Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations." eng. In: *Lancet* 357.9272, S. 1925–1928. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)05063-7. URL: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)05063-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(00)05063-7).

Hampe, J. u. a. (2003). "Association of inflammatory bowel disease with indicators for childhood antigen and infection exposure". In: *Int J Colorectal Dis* 18.5.

Hampe, Jochen Heymann, Kerstin Krawczak, Michael Schreiber, Stefan Research Support, Non-U.S. Gov't Germany International journal of colorectal disease Int J Colorectal Dis. 2003 Sep;18(5):413-7. Epub 2003 Apr 10., S. 413–7.

Hardt, J. u. a. (2010). “[Inflammatory bowel diseases as multi-focal disorders: results from a multi-regional survey on bodily and psychosocial problems in IBD patients].” ger. In: *Z Gastroenterol* 48.3, S. 381–391. DOI: 10.1055/s-0028-1109524. URL: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0028-1109524>.

Henckaerts, L. u. a. (2008). “The role of genetics in inflammatory bowel disease”. In: *Curr Drug Targets* 9.5. Henckaerts, Liesbet Figueroa, Carolina Vermeire, Severine Sans, Miquel Research Support, Non-U.S. Gov't Review Netherlands Current drug targets *Curr Drug Targets*. 2008 May;9(5):361-8., S. 361–8.

Herrera, Victoria L M. u. a. (2008). “Overlapping genes in Nalp6/PYPAF5 locus encode two V2-type vasopressin isoreceptors: angiotensin-vasopressin receptor (AVR) and non-AVR.” eng. In: *Physiol Genomics* 34.1, S. 65–77. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00199.2007. URL: <http://dx.doi.org/10.1152/physiolgenomics.00199.2007>.

Hoffman, H. M. u. a. (2001). “Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome.” eng. In: *Nat Genet* 29.3, S. 301–305. DOI: 10.1038/ng756. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/ng756>.

Hugot, J. P. u. a. (2001). “Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease.” eng. In: *Nature* 411.6837, S. 599–603. DOI: 10.1038/35079107. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/35079107>.

Irvine, E. J. und J. K. Marshall (2000). “Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk”. In: *Gastroenterology* 119.6. Irvine, E J Marshall, J K Case Reports United states *Gastroenterology Gastroenterology*. 2000 Dec;119(6):1740-4., S. 1740–4.

Kaiser, V. und G. Diamond (2000). "Expression of mammalian defensin genes." eng. In: *J Leukoc Biol* 68.6, S. 779–784.

Kang, Dong-chul u. a. (2002). "mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties." eng. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99.2, S. 637–642. DOI: 10.1073/pnas.022637199. URL: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.022637199>.

Kaser, Arthur, Sebastian Zeissig und Richard S. Blumberg (2010). "Genes and environment: how will our concepts on the pathophysiology of IBD develop in the future?" eng. In: *Dig Dis* 28.3, S. 395–405. DOI: 10.1159/000320393. URL: <http://dx.doi.org/10.1159/000320393>.

Katz, K. D. u. a. (1989). "Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their healthy relatives". In: *Gastroenterology* 97.4. Katz, K D Hollander, D Vadheim, C M McElree, C Delahunty, T Dadufalza, V D Krugliak, P Rotter, J I DK35200/DK/NIDDK NIH HHS/United States Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. United states Gastroenterology Gastroenterology. 1989 Oct;97(4):927-31., S. 927–31.

Khare, Sonal u. a. (2010). "Inflammasomes and their activation." eng. In: *Crit Rev Immunol* 30.5, S. 463–487.

Kwon, Ki Han, Hajime Ohigashi und Akira Murakami (2007). "Dextran sulfate sodium enhances interleukin-1 beta release via activation of p38 MAPK and ERK1/2 pathways in murine peritoneal macrophages." eng. In: *Life Sci* 81.5, S. 362–371. DOI: 10.1016/j.lfs.2007.05.022. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2007.05.022>.

Loftus E. V., Jr. (2004). "Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences". In: *Gastroenterology* 126.6. Loftus, Edward V Jr Research Support, Non-U.S. Gov't United States Gastroenterology Gastroenterology. 2004 May;126(6):1504-17., S. 1504–17.

Martinon, F. und J. Tschopp (2007). "Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation." eng. In: *Cell Death Differ* 14.1, S. 10–22. DOI: 10.1038/sj.cdd.4402038. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4402038>.

Martinon, Fabio (2008). "Detection of immune danger signals by NALP3." eng. In: *J Leukoc Biol* 83.3, S. 507–511. DOI: 10.1189/jlb.0607362. URL: <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0607362>.

Martinon, Fabio, Kimberly Burns und Jürg Tschopp (2002). "The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta." eng. In: *Mol Cell* 10.2, S. 417–426.

Martinon, Fabio u. a. (2004). "Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome." eng. In: *Curr Biol* 14.21, S. 1929–1934. DOI: 10.1016/j.cub.2004.10.027. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2004.10.027>.

Mathews, Rebecca J., Michael B. Sprakes und Michael F. McDermott (2008). "NOD-like receptors and inflammation." eng. In: *Arthritis Res Ther* 10.6, S. 228. DOI: 10.1186/ar2525. URL: <http://dx.doi.org/10.1186/ar2525>.

Medzhitov, R. (2001). "Toll-like receptors and innate immunity." eng. In: *Nat Rev Immunol* 1.2, S. 135–145. DOI: 10.1038/35100529. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/35100529>.

Meylan, Etienne und Jürg Tschopp (2006). "Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses." eng. In: *Mol Cell* 22.5, S. 561–569. DOI: 10.1016/j.molcel.2006.05.012. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2006.05.012>.

Miao, Edward A. u. a. (2010). "Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome." eng. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 107.7, S. 3076–3080. DOI: 10.1073/pnas.0913087107. URL: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0913087107>.

Moerer, O. und H. Burchardi (2006). "[The cost of sepsis]." ger. In: *Anaesthesist* 55 Suppl 1, S. 36–42. DOI: 10.1007/s00101-006-1039-y. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s00101-006-1039-y>.

Moerer, O. und M. Quintel (2009). "[Sepsis in adult patients - definitions, epidemiology and economic aspects]." ger. In: *Internist (Berl)* 50.7, S. 788, 790–4, 796–8. DOI: 10.1007/s00108-008-2285-7. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s00108-008-2285-7>.

Moynagh, Paul N. (2005). "The NF-kappaB pathway." eng. In: *J Cell Sci* 118.Pt 20, S. 4589–4592. DOI: 10.1242/jcs.02579. URL: <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.02579>.

Prenzler, Anne u. a. (2011). "Health care costs and their predictors of inflammatory bowel diseases in Germany." eng. In: *Eur J Health Econ* 12.3, S. 273–283. DOI: 10.1007/s10198-010-0281-z. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s10198-010-0281-z>.

Ranjan, Priya u. a. (2009). "Cytoplasmic nucleic acid sensors in antiviral immunity." eng. In: *Trends Mol Med* 15.8, S. 359–368. DOI: 10.1016/j.molmed.2009.06.003. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2009.06.003>.

Rawat, Rashmi u. a. (2010). "Inflammasome up-regulation and activation in dysferlin-deficient skeletal muscle." eng. In: *Am J Pathol* 176.6, S. 2891–2900. DOI: 10.2353/ajpath.2010.090058. URL: <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2010.090058>.

Rosenstiel, P. u. a. (2008). "NOD-like receptors: ancient sentinels of the innate immune system." eng. In: *Cell Mol Life Sci* 65.9, S. 1361–1377. DOI: 10.1007/s00018-008-7502-y. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-008-7502-y>.

Rosenstiel, P. u. a. (2009). "Towards a molecular risk map—recent advances on the etiology of inflammatory bowel disease". In: *Semin Immunol* 21.6. Rosenstiel, Philip Sina, Christian Franke, Andre Schreiber, Stefan Research Support, Non-

U.S. Gov't Review England Seminars in immunology Semin Immunol. 2009 Dec;21(6):334-45. Epub 2009 Nov 17., S. 334–45.

Rosenstiel, Philip, Andreas Till und Stefan Schreiber (2007). "NOD-like receptors and human diseases." eng. In: *Microbes Infect* 9.5, S. 648–657. DOI: 10.1016/j.micinf.2007.01.015. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2007.01.015>.

Rosenstiel, Philip u. a. (2003). "TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells." eng. In: *Gastroenterology* 124.4, S. 1001–1009. DOI: 10.1053/gast.2003.50157. URL: <http://dx.doi.org/10.1053/gast.2003.50157>.

Schreiber, S. u. a. (2005). "Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease". In: *Nat Rev Genet* 6.5. Schreiber, Stefan Rosenstiel, Philip Albrecht, Mario Hampe, Jochen Krawczak, Michael Research Support, Non-U.S. Gov't Review England Nature reviews. Genetics Nat Rev Genet. 2005 May;6(5):376-88., S. 376–88.

Takeda, Kiyoshi und Shizuo Akira (2005). "Toll-like receptors in innate immunity." eng. In: *Int Immunol* 17.1, S. 1–14. DOI: 10.1093/intimm/dxh186. URL: <http://dx.doi.org/10.1093/intimm/dxh186>.

Takeda, Kiyoshi, Tsuneyasu Kaisho und Shizuo Akira (2003). "Toll-like receptors." eng. In: *Annu Rev Immunol* 21, S. 335–376. DOI: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126. URL: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126>.

Thompson, N. P. u. a. (1996). "Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study". In: *BMJ* 312.7023. Thompson, N P Driscoll, R Pounder, R E Wakefield, A J Research Support, Non-U.S. Gov't Twin Study England BMJ (Clinical research ed.) BMJ. 1996 Jan 13;312(7023):95-6., S. 95–6.

- Tysk, C. u.a. (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". In: *Gut* 29.7. Tysk, C Lindberg, E Jarnerot, G Floderus-Myrhed, B Research Support, Non-U.S. Gov't England Gut Gut. 1988 Jul;29(7):990-6., S. 990–6.
- Villani, Alexandra-Chloé u.a. (2009). "Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility." eng. In: *Nat Genet* 41.1, S. 71–76. DOI: 10.1038/ng.285. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/ng.285>.
- Weischenfeldt, Joachim und Bo Porse (2008). "Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications." eng. In: *CSH Protoc* 2008, pdb.prot5080.
- Wirtz, Stefan und Markus F. Neurath (2007). "Mouse models of inflammatory bowel disease." eng. In: *Adv Drug Deliv Rev* 59.11, S. 1073–1083. DOI: 10.1016/j.addr.2007.07.003. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2007.07.003>.
- Xavier, R. J. und D. K. Podolsky (2007). "Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease." eng. In: *Nature* 448.7152, S. 427–434. DOI: 10.1038/nature06005. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nature06005>.
- Yoneyama, Mitsutoshi u.a. (2004). "The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses." eng. In: *Nat Immunol* 5.7, S. 730–737. DOI: 10.1038/ni1087. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/ni1087>.
- Yu, Andrew Peng u.a. (2008). "The costs of Crohn's disease in the United States and other Western countries: a systematic review." eng. In: *Curr Med Res Opin* 24.2, S. 319–328. DOI: 10.1185/030079908X260790. URL: <http://dx.doi.org/10.1185/030079908X260790>.
- Zaki, Md Hasan u.a. (2010). "The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis." eng. In: *Immunity*

32.3, S. 379–391. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.03.003. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2010.03.003>.

Zur, Berndt (2005). "Laborchemische Referenzbereiche für Wistarratten und C57BL/6-Mäuse". Diss. Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.

Literaturverzeichnis Literaturverzeichnis.bib

Anhang

Tabelle 5.1 – Verwendete Chemikalien und Zusätze

Bezeichnung	Hersteller
Amphotericin	
Antibiotic /antimycotic	Invitrogen, Karlsruhe
Antibiotic/Antimycotic 100x	GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe
ATP	Sigma-Aldrich, München
DEPC	Sigma-Aldrich, München
Natrium-Dextransulfat	TdB consultancy, Schweden
D-GAL	Sigma-Aldrich, München
DMEM	PAA Laboratories, Linz
Eosin	Sigma-Aldrich, München
Ethanol (p.a.)	Merck, Darmstadt
Hämalaun	Sigma-Aldrich, München
Hepes	PAA Laboratories, Linz
IFN- γ	Invitrogen, Karlsruhe
LPS	InvivoGen, Toulouse
LPS für i.p Injektion	Sigma-Aldrich, München
M-CSF	Immunotools, Friesoythe
MDP	Bachem, Bubendorf
Murines Makrophagen Medium = MMM	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 (Agarose-Gele)	
TNF- α	Biosource/Invitrogen, Karlsruhe
Tween20	Merck, Darmstadt
b-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München

Tabelle 5.2 – Oligonukleotide

Primer	Sequenz	Größe	Temp	Zyklen
			Ann.	
GAPDH 1	For: CCAGCCGAGCCACATCGC	983bp	54°C	32
	Rev: TGAGCCCCAGCCTTCTCCAT			
GAPDH 2	For: TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTGGC	983bp	58°C	34
	Rev: CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC			
m-PRKRIR	For: TCTGCCGTATGAAGCTGATG	230bp	55°C	35
	Rev: GGACAGACTTTGCCAACCAT			
m-KC	For: GCTGGGATTCACCTCAAGAA	169bp	55°C	35
	Rev: TGGGGACACCTTTTAGCATC			
m-STAT1	For: CCTCTTCCAGCAGCTCATTC	241bp	55°C	35
	Rev: TGTGTGCGTACCCAAGATGT			
m-OAS1	For: TGGACCCCGCTGACCCAACA	159bp	57°C	35
	Rev: GCACTCCAACCTCCGTCGGC			
m-TNF	For: GACTCTTCCCTGAGGTGCAA		53-58°	
	Rev: CAGCCTGGTCACCAAATCA			

Tabelle 5.3 – Verwendete Zellkulturmedien

Makrophagenmedium	
Murines Makrophagen Medium = MMM (PAA)	250 ml
DMEM (PAA)	250 ml
Amphotericin	5 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml
Milzmedium	
RPMI 1640	500 ml
FCS	10%
Penicillin/Streptomycin	1%
Hepes	1%
β-Mercaptoethanol	0,01%
Erythrozytenlysepuffer	
KHCO ₃	0,01 M
NH ₄ Cl	0,155 M
EDTA	0,1 nM
pH 7,5, steril filtrieren	

Tabelle 5.4 – Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller
DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen, Hilden
Hämocult Test	Beckmann Coulter, Krefeld
Murines IL-1? 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

Tabelle 5.5 – Verwendete 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-Plattenreaders	Tecan Deutschland, Weilsheim

Danksagung

Für die Unterstützung bei meiner Doktorarbeit gilt mein Dank Frau Prof. Dr. med. Bianca Wittig für die Betreuung dieser Arbeit. Bei Herrn Prof. Dr. med. Stefan Schreiber sowie Herrn Prof. Dr. med. Philip Rosenstiel bedanke ich mich für die Überlassung der Arbeit und die Möglichkeit am Institut für Klinische Molekularbiologie arbeiten zu können. Mein besonderer Dank gilt Dr. Simone Lipinski für die gute fachliche Anleitung und stetige Unterstützung während der gesamten Zeit der Arbeit. Ohne ihre Ehrfahrungen, Korrekturen, Ermutigungen und Diskussionen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Außerdem bedanke ich mich bei Dr.med. vet. Olga Gavrilova für die Zucht der Mäuse und die Unterstützung den Tierversuchen und Nicolina Böttcher für die Diskussionen und den Erfahrungsaustausch während der gemeinsamen Doktorandenzeit. Des weiteren gilt mein Dank Dr. Frank Kramer vom Institut für Biostatistik der Universität Göttingen für die statistische Beratung zur Auswertung der Ergebnisse.

Ein großes Dankeschön geht an alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für klinische Molekularbiologie, insbesondere an die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Zellbiologie, für die freundschaftliche und ungezwungene Arbeitsatmosphäre sowie für die mir jederzeit entgegengebrachte Hilfsbereitschaft. Bei Melanie Schlapkohl, Tanja Kaacksteen, Maren Reffelman, Alina Gräff, Dina Quitzau und Katharina Schwarzer bedanke ich mich für die experimentelle Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

Lebenslauf

Persönliche Informationen

- Geboren 1985 in Berlin

Ausbildung

- **2005: Erlangen des Abiturs (1,6) und des französischen Baccalauréat (Mention très bien)**
- **2005-2012: Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**
- **WS 2009-2010: Forschungsfreisemester für die Promotion am Institut für Klinische Molekularbiologie Kiel**
- **2012: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Approbation**

Berufstätigkeit

- **Seit September 2012: Assistenzärztin am Zentrum für Anästhesiologie, Rettungs- und Intensivmedizin, Universitätsmedizin Göttingen**

Kongressbeiträge

- **„Schmerzstandards“-Prozesssteuerung in der postoperativen Akutschmerztherapie durch standardisierte Therapiekonzepte (J. Erlenwein, M. Stratenschulte, A. Hecke, M. Bauer, W. Meißner, F. Petzke), Poster, Deutscher Schmerzkongress 2013**

- **Strukturen und Prozesse der Akutschmerztherapie bei Kindern in Deutschland- Ergebnisse des Akutschmerzzensus 2012** (J. Erlenwein, M.Stratenschulte, M. Quintel, W. Meißner, U. Stamer, F. Petzke), Poster, Deutscher Schmerzkongress 2013

Publikationen

- **Prozesssteuerung in der Akutschmerztherapie** (J. Erlenwein, M. I. Emons, A. Hecke, N. Nestler, M. Przemek, M. Bauer, W. Meißner, F. Petzke) *Der Schmerz*, Okt. 2014
- **Behandlungsstandards in der postoperativen Akutschmerztherapie** (J. Erlenwein, M. Emons, A. Hecke, N.Nestler, S. Wirz, M.Bauer, W. Meißner, F. Petzke), *Der Anästhesist*, Jan. 2015