

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Rolle von NOD2 in der
Campylobacter jejuni-induzierten Kolitis
im gnotobiotischen Mausmodell

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ursula Catharina Grundmann

aus Aachen

Datum der Promotion: 27.02.2015

Meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis..... 1

Abstract..... 3

1 Einleitung..... 6

1.1 Das angeborene Immunsystem..... 6

1.2 Die NOD-like Rezeptoren 7

 1.2.1 Rezeptorfunktionen von NOD2 im angeborenen Immunsystem 8

 1.2.2 Folgen der NOD2-Aktivierung 9

 1.2.3 Bedeutung von NOD2-Genmutationen für den Menschen 11

1.3 *Campylobacter jejuni* 12

 1.3.1 Die akute *Campylobacter*-Gastroenteritis 14

1.4 Das gnotobiotische Mausmodell der *Campylobacter*infektion 15

1.5 Ziel der Arbeit 17

2 Material und Methoden 19

2.1 Material 19

 2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Puffer..... 19

 2.1.2 Kommerzielle „Kits“ 20

 2.1.3 Oligonukleotidprimer und -sonden 20

 2.1.4 DNA-Längenmarker und Enzyme 21

 2.1.5 Antikörper 22

 2.1.6 Nährmedien und Seren 22

 2.1.7 Geräte und Plastikwaren..... 22

 2.1.8 Sonstiges..... 23

2.2 Tierversuche 24

 2.2.1 Versuchstiere 24

2.2.2 Behördliche Genehmigungen der Tierversuche	24
2.2.3 Haltung der Mäuse unter SPF-Bedingungen.....	24
2.2.4 Haltung, Generierung und Infektion gnotobiotischer Mäuse.....	25
2.2.5 Infektion mit <i>Escherichia coli</i>	25
2.2.6 Infektion mit <i>Campylobacter jejuni</i>	26
2.2.7 Klinisches Bild der Mäuse	27
2.2.8 Probenentnahme	28
2.3 Kulturelle Analysen der Bakterien.....	29
2.3.1 Gewichtsbestimmung des luminalen Inhaltes des Gastrointestinaltraktes bzw. der Organe	29
2.3.2 Quantifizierung der koloniebildenden Einheiten	29
2.3.3 Kultureller Nachweis von <i>Escherichia coli</i>	30
2.3.4 Kultureller Nachweis von <i>Campylobacter jejuni</i>	30
2.4 Histopathologische Beurteilung des Gastrointestinaltraktes.....	30
2.4.1 Herstellung der histologischen Präparate.....	30
2.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	31
2.4.3 Auswertung der histologischen Präparate	31
2.4.4 Herstellung und Beurteilung der immunhistochemischen Präparate	32
2.5 Zytokin- und Proteinmessungen.....	32
2.5.1 Zytokinbestimmung aus Organkulturüberständen	32
2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	33
2.5.3 Bestimmung der Stickstoffmonoxidkonzentration.....	33
2.5.4 Cytometric Bead Array (CBA)	33
2.5.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	34
2.6 Molekularbiologische Methoden.....	34
2.6.1 RNA-Extraktion aus dem Kolongewebe.....	34
2.6.2 Quantitative Real-Time PCR (RT-PCR) zur mRNA-Bestimmung	34

2.7 Genotypisierung der verwendeten Mäuse	36
2.7.1 DNA-Extraktion aus Mausgewebe.....	36
2.7.2 PCR zur DNA-Bestimmung.....	36
2.7.3 Abschließende Auswertung.....	37
2.8 Statistische Analysen und Software	37
3 Ergebnisse	38
3.1 Geringer Einfluss von NOD2 bei gnotobiotischen, infizierten WT- und NOD2 ^{-/-} -Tieren.....	38
3.1.1 Infektion mit <i>C. jejuni</i> führte zu verringerter NOD2-Expression im Kolongewebe... 38	
3.1.2 Stabile Kolonisation von <i>C. jejuni</i> im Darm von WT- und NOD2 ^{-/-} -Tieren	39
3.1.3 NOD2 beeinflusste nicht den klinischen Zustand der Tiere nach der Infektion	40
3.1.4 Leichte entzündliche Veränderungen des Kolongewebes der infizierten Tiere.....	41
3.1.4.1 Verschlechterung der Histopathologie des Kolons durch die Infektion	41
3.1.4.2 Erhöhter Zellumsatz bei NOD2-Defizienz im Kolongewebe infizierter Tiere	42
3.1.5 NOD2 regulierte die proinflammatorische Antwort gegen <i>C. jejuni</i>	43
3.1.5.1 NOD2-Defizienz führte zu erhöhter Makrophagenzahl im Kolon infizierter Tiere	43
3.1.5.2 NOD2-Defizienz führte zu verringerter Muc-2-, IL-23- und IL-18-Expression	44
3.1.5.3 NOD2-Defizienz mit erhöhter Zytokinproduktion verbunden.....	46
3.1.6 Geringer Einfluss von NOD2 auf das erworbene Immunsystem nach Infektion.....	50
3.1.6.1 NOD2 beeinflusste die Rekrutierung von T-Zellen bei infizierten Tieren	50
3.1.6.2 Tendenzieller Einfluss von NOD2 auf Th1-Zytokin IFN-g.....	51
3.1.6.3 Kein Einfluss von NOD2 auf Th17-Zytokine	53
3.2 Gnotobiotische, IL-10-defiziente Tiere zeigen schwächere Kolitis bei NOD2-Defizienz	55
3.2.1 Reduktion der NOD2-Transkription im Kolon nach Infektion mit <i>C. jejuni</i>	55
3.2.2 Kein Einfluss von NOD2 auf die Kolonisierung mit <i>C. jejuni</i>	56
3.2.3 NOD2-Defizienz verbesserte den klinischen Zustand der infizierten Tiere	56
3.2.4 Schwere Entzündung des Kolonepithels durch die Infektion mit <i>C. jejuni</i>	58

3.2.4.1 NOD2-Defizienz führte zu einer weniger ausgeprägten Entzündung des Kolons...	58
3.2.4.2 NOD2 führte zu größerem Schaden im Epithel bei Infektion mit <i>C. jejuni</i>	58
3.2.5 NOD2 beeinflusste das angeborene Immunsystem im Rahmen der Kolitis	59
3.2.5.1 Kein Einfluss von NOD2 auf die Granulozyten- und Makrophagenzahl	60
3.2.5.2 Divergender Einfluss von NOD2 auf die Expression von Zytokinen.....	60
3.2.5.3 NOD2-Defizienz führte zu verstärkter proinflammatorischen Zytokinsekretion	62
3.2.6 NOD2 beeinflusste die Th1- und Th17-Immunantwort.....	65
3.2.6.1 NOD2 begrenzte die Akquirierung von Lymphozyten im Kolon.....	65
3.2.6.2 Negative Regulation von IFN-g durch NOD2	67
3.2.6.3 Negativer Einfluss von NOD2 auf die IL-22 Expression infolge der Infektion	69
4 Diskussion	70
4.1 Einführung.....	70
4.2 Hemmung der NOD2-Expression als eine Immun-Evasionsstrategie?	70
4.3 NOD2-Defizienz führte nicht zu erhöhter Bakterienkonzentration im Kolon.....	73
4.4 Die beiden murinen Infektionsmodelle von <i>C. jejuni</i> : Kolonisation und Entzündung	73
4.5 NOD2 verstärkte die Symptomatik der <i>C. jejuni</i> -Kolitis bei verminderter Immunsystemakti- vierung.....	75
4.5.1 NOD2 verstärkte den klinischen Zustand und die Histopathologie nach <i>C. jejuni</i> -In- fektion.....	75
4.5.2 Wirkungen von NOD2 in der Architektur des Kolonepithels.....	76
4.5.3 NOD2 begrenzte die Aktivierung des angeborenen Immunsystems	76
4.5.4 NOD2 begrenzte auch die Aktivierung des erworbenen Immunsystems	78
4.5.5 Die Rolle von NOD2 in den beiden murinen <i>C. jejuni</i> -Infektionsmodell	78
4.6 Regulation der Zytokinproduktion durch NOD2 vom Kontext abhängig.....	79
4.7 Mögliche Mechanismen der Regulation der Zytokinproduktion durch NOD2	80

Inhaltsverzeichnis

Literaturverzeichnis.....	83
Eidesstattliche Versicherung.....	89
Lebenslauf.....	90
Publikationen.....	91
Danksagung.....	92

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent	<i>engl</i>	Englisch
°C	Grad Celsius	<i>et al.</i>	<i>lat: et alii</i> (= und andere)
µl	Mikroliter	FACS	Engl: Fluorescent activated cell sorting
µm	Mikrometer		
Abb.	Abbildung	FEM	Forschungszentrum für Experimentelle Medizin (Charité)
Aqua dest.	destilliertes Wasser		
ATF	<i>engl: activating transcription factor</i>	FKS	Fetales Kälber Serum
ATG16L1	<i>engl: Autophagy-related 16-like 1</i>	FoxP3	Forckhead Box P3
ATP	Adenosintriphosphat	g	Gramm
BAP	<i>engl: Blood agar plate</i>	GalNAc	N-Acetylgalactosamin
bidest.	doppelt destilliert	GALNT	<i>engl: UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:poly-peptide N-acetyl-galactosaminyltransferase</i>
bp	Basenpaare		
BSA	Bovines Serumalbumin		
bzw.	beziehungsweise	GlcNAc	N-Acetylglucosamin
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	h	Stunde
ca.	circa	hBD	humanes beta-Defensin
CARD	<i>engl: Caspase recruitment domain-containing protein</i>	HCl	Salzsäure
Casp	Caspase	HD	humanes alpha-Defensin
CBA	<i>engl: Cytometric Bead Assay</i>	HE	Hämatoxylin-Eosin
CBF	<i>engl: Cell-binding factor</i>	HIV	humanes Immundefizienz Virus
CCL	<i>engl: CC-Chemokine ligand</i>	hnRNP-A1	<i>engl: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1</i>
CD	<i>engl: Cluster of Differentiation</i>	HPF	<i>engl: High power field</i>
Cdt	<i>engl: Cytolethal distending toxine</i>	HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung	IFN-g	Interferon gamma
CFU	<i>engl: Colony-forming Unit</i>	IL	Interleukin
Cj	mit <i>C. jejuni</i> besiedelt	IRAK	<i>engl: Interleukin-1 receptor associated kinase</i>
cm	Zentimeter		
CNA	Colistidin/ Nalidixin Säure-Agar	IRF	<i>engl: Interferon-regulatory factor</i>
CO ₂	Kohlendioxid	KBE	Kolonie-bildende-Einheit
CXCL	<i>engl: CXC-Chemokine ligand</i>	l	Liter
d	Tag	<i>lat</i>	Lateinisch
DNA	Desoxyribonucleinsäure	LK	Lymphknoten
DSS	<i>engl: Dextrane sodium sulfate</i>	LOS	Lipooligosaccharid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	LPS	Lipopolysaccharid
EFSA	European Food Safety Authority	LRR	<i>engl: C-terminal leucine-rich repeat</i>
ELISA	<i>engl: Enzyme-linked immunosorbent Assay</i>	M	molar

Abkürzungsverzeichnis

MAPK	<i>engl:</i> Mitogen-activated protein kinase	RICK	<i>engl:</i> Rip-like interacting caspase-like apoptosis-regulatory protein kinase
MC	Morbus Crohn	RIP	<i>engl:</i> Receptor-interacting protein
MCP-1	<i>engl:</i> Monocyte chemo-tactic bzw. -attractant protein 1	RKI	Robert-Koch-Institut (Berlin)
MDP	Muramyldipeptid	RLR	<i>engl:</i> Retinoid-acid-inducible gene I-like receptor
mg	Milligramm	RNA	Ribonukleinsäure
MHC	<i>engl:</i> Major histocompatibility complex	RPMI	Roswell Park Memorial Institute Zellkulturmedium
min	Minute	sek	Sekunde
ml	Milliliter	SLE	Systemischer Lupus erythematosus
mLN	mesenteriale Lymphknoten	SPF	<i>engl:</i> Special pathogen free
MPO7	Myeloperoxidase 7	ssRNA	<i>engl:</i> single-stranded RNA
mRNA	<i>engl:</i> messenger RNA	Tab	Tabelle
Muc-2	Mucin 2	TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
MurNAc	N-acetylmuraminsäure	TCA	Trichloressigsäure
MyD88	<i>engl:</i> myloid differentiation primary response gene 88	TGF	<i>engl:</i> Transforming growth factor
n	naive	Th	T-Helfer-Zelle Typ
NaCl	Natrium-Chlorid-Lösung	TLE1	<i>engl:</i> Transducin-like enhancer of split 1
NFkB	<i>engl:</i> Nuclear Factor kappa B	TLR	<i>engl:</i> Toll-like-Rezeptor
NLR	NOD-like Rezeptor	TNBS	<i>engl:</i> 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid
NO	Stickstoffmonoxid	TNF-a	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
NOD	<i>engl:</i> Nucleotide-binding oligomerization domain	TRIF	<i>engl:</i> TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-beta
NOD1	<i>engl:</i> NOD-containing protein 1	TRAF	<i>engl:</i> Tumor necrosis factor receptor associated factor
NOD2	<i>engl:</i> NOD-containing protein 2	Treg	regulatorische T-Zelle
OVA	Ovalbumin	u.a.	unter anderem
p	P-Wert	v.a.	vor allem
<i>p.i.</i>	<i>post infectionem</i>	usw.	und so weiter
PAMP	<i>engl:</i> Pathogen associated molecular pattern	WT	Wildtyp
PBS	<i>engl:</i> Phosphat-Buffered-Saline	z.B.	zum Beispiel
PCR	<i>engl:</i> Polymerase-Chain-Reaction		
PGN	Peptidoglycan		
PPP2R5E	<i>engl:</i> protein phosphatase 2, regulatory subunit B', epsilon isoform		
PRR	<i>engl:</i> Pattern recognition receptor		

Abstract

Einleitung: Der zytosolische Rezeptor NOD2 moduliert die Funktionen des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Mutationen von NOD2 sind signifikant mit der chronisch entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn assoziiert. Das Gram-negative Bakterium *Campylobacter jejuni* ist die häufigste Ursache für bakterielle Durchfallerkrankungen in Europa. Trotz der großen sozi-ökonomischen Bedeutung dieses Krankheitserregers fehlten bisher adäquate Tiermodelle zur Untersuchung der Immunpathologie und der Wirtsinteraktionen. Die Pathogenese der Campylobacteriose ist bisher kaum verstanden. In der vorliegenden Arbeit wurden Funktionen von NOD2 im Rahmen der Infektion mit *C. jejuni* im Mausmodell untersucht.

Methodik: Gnotobiotische Mäuse wurden durch eine mehrwöchige orale Fünffach-Antibiose hergestellt. Diese Tiere sind mit *C. jejuni* kolonisierbar. Es wurden drei bis vier Monate alte, gnotobiotische WT- und, NOD2^{-/-}-Mäuse bzw. IL-10^{-/-}- und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Mäuse mit dem Stamm *C. jejuni* 81-176 peroral infiziert. Die Tiere wurden täglich untersucht. Am sechsten Tag nach der letzten Infektion wurden mikrobiologische, histologische und immunologische Analysen von Kolon, mesenterialen Lymphknoten und Milz durchgeführt und die Daten statistisch ausgewertet.

Ergebnisse: Die *C. jejuni*-Infektion führte in gnotobiotischen WT- und NOD2^{-/-}-Tieren zu keiner sichtbaren Symptomatik. Allerdings wurde die NOD2-Expression bei den WT-Tieren im Darm durch die Kolonisierung mit *C. jejuni* gehemmt. Auch verursachte die *C. jejuni*-Infektion einen Anstieg der Produktion der Zytokine TNF- α , MCP-1, IL-6, IL-10, IFN- γ , IL-17A und IL-22. Dabei zeigte sich eine NOD2-vermittelte Hemmung der Konzentration von NO, TNF- α , MCP-1, IL-6 und IL-10.

Anschließend wurden gnotobiotische IL-10^{-/-}- und NOD2^{-/-}-IL10^{-/-}-Tiere mit *C. jejuni* infiziert. In diesen Tieren entwickelte sich eine massive, ulzerierende Kolitis mit makroskopischer Beeinträchtigung der Tiere und Anstieg der Konzentration der Zytokine IL-1- β , NO, TNF- α , IL-6, MCP-1, IFN- γ , IL-17A und IL-22 im Kolon. Auch hier reduzierte die *C. jejuni*-Infektion die NOD2-Expression bei den IL-10^{-/-}-Tieren. NOD2 verschlechterte die Symptomatik dieser Tiere und deren Histopathologie im Kolon. Allerdings wiesen die NOD2^{-/-}-IL10^{-/-}-Tiere trotz besserer Symptomatik höhere Konzentrationen an MCP-1, IL-6, IFN- γ und IL-22 im Darm im Vergleich zu den IL-10^{-/-}-Kontrolltieren auf.

Schlussfolgerung: In beiden Modellen regulierte und begrenzte NOD2 die Aktivierung des angeborenen und erworbenen Immunsystems durch Hemmung der Produktion sowohl pro- als auch antiinflammatorischer Zytokine. Diese hemmende Wirkung von NOD2 auf die Zytokinproduktion wurde durch Hemmung der NOD2-Expression im Rahmen der *C. jejuni*-Infektion bereits

vermindert. In beiden Modellen könnte eine NOD2-vermittelte Hemmung des Toll-like-Rezeptor Signalwegs für die vermehrte Zytokinproduktion in NOD2-defizienten Tieren verantwortlich sein. Eine NOD2-vermittelte Hemmung der Immunantwort via Hemmung der TLR2-Immunantwort wurde bereits im Rahmen anderer Forschungsarbeiten nachgewiesen. Auch sind TLR2- und TLR4-vermittelte Signalwege für die durch *C. jejuni* vermittelte Entzündung im Kolon essentiell.

Abstract

Introduction: The cytosolic pattern recognition receptor NOD2 modulates responses of the innate and the adaptive immune systems. Mutations of NOD2 are significantly associated with Crohn's disease, an inflammatory bowel disease. The Gram-negative bacteria *Campylobacter jejuni* causes the most frequent cause of bacterial diarrhea in Europe. Despite its socio-economic impact adequate models for the investigation of *C. jejuni* infection and inflammation are still lacking. The pathogenesis of Campylobacteriosis is poorly understood. Therefore, functions of NOD2 were investigated in the novel gnotobiotic murine *C. jejuni* infection models.

Methods: Gnotobiotic mice generated by an oral, quintuple antibiotic regime are susceptible to *C. jejuni* infection. Three to four months old WT- and NOD2^{-/-}-mice, and IL-10^{-/-}- and NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-mice respectively, were infected with the *C. jejuni* strain 81-176 perorally. The animals were controlled each day and sacrificed on day six. Microbiological, histological and immunological analyses were performed and statistically evaluated.

Results: Gnotobiotic WT- and NOD2^{-/-}-mice were infected with *C. jejuni*. The infection caused no symptomatic outcome but it decreased the expression of NOD2 in the WT-mice. The infection increased concentrations of pro- as well as anti-inflammatory cytokines of the innate and adaptive immune systems (namely TNF- α , MCP-1, IL-6, IL-10, IFN- γ , IL-17A and IL-22). NOD2 inhibited the production of NO, TNF- α , MCP-1, IL-6 and IL-10 in the intestines.

Secondly gnotobiotic IL-10^{-/-}- and NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-mice, infected with *C. jejuni*, showed a massive ulcerative colitis accompanied by clinical symptoms and an increase of IL-1-b, NO, TNF- α , IL-6, MCP-1, IFN- γ , IL-17A and IL-22 in the colon. Here too the infection by *C. jejuni* caused a decreased expression of NOD2 in IL-10^{-/-}-mice. NOD2 aggravated the clinical outcome of the animals and the histopathology in the colon. Anyway mice deficient in NOD2 showed significantly higher levels of MCP-1, IL-6, IFN- γ and IL-22 as compared to IL-10^{-/-}-control mice.

Conclusion: In both murine models NOD2 regulates and limits the activation of the immune system by inhibiting the production of pro- as well as anti-inflammatory cytokines. This inhibitory function of NOD2 was already diminished by decrease of the expression of NOD2 following *C. jejuni* infection. It can be assumed that in both models a NOD2 mediated inhibition of Toll-like-receptor signaling was responsible for the augmented cytokine production in NOD2-deficient animals. Inhibition of TLR2-responses by NOD2 has been already described in earlier studies. It is already known that TLR2- and TLR4-signaling is essential for *C. jejuni*-mediated inflammation in the colon.

1 Einleitung

1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem gehört neben den physikalischen Barrieremechanismen und dem erworbenen Immunsystem zur körpereigenen Abwehr des Menschen gegen potenziell krankmachende Organismen. Das angeborene Immunsystem ist im Gegensatz zum erworbenen Immunsystem bereits ab dem Zeitpunkt der Geburt voll funktionsfähig. Es besteht aus im Blut gelösten und zellulären Anteilen. Zu den zellulären Anteilen gehören neben den myeloepoetischen Zellen wie Makrophagen, natürliche Killerzellen und Granulozyten die Epithelzellen der Haut und Schleimhäute. Zu den löslichen Bestandteilen gehören unter anderem (u.a.) das Komplementsystem und Defensine [Abb. 1].

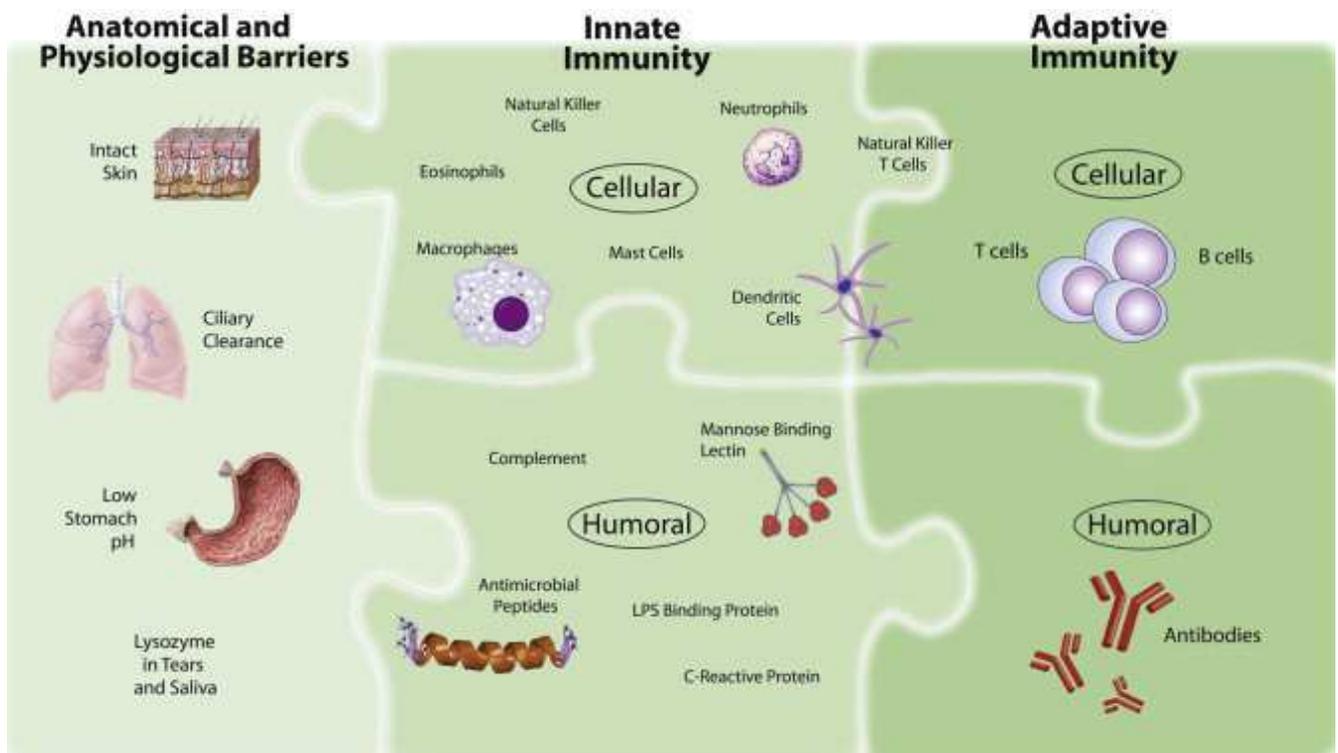


Abb. 1.1: Aufbau des Immunsystems. Das Abwehrsystem gegen pathogene Mikroorganismen kann in drei Ebenen aufgeteilt werden: (I) anatomische und physiologische Barrieren, (II) das angeborene Immunsystem und (III) das adaptive oder erworbene Immunsystem [aus Turvey *et al.* 2010].

Das angeborene Immunsystem ist in den Epithelzellen durch verschiedene Rezeptorstrukturen vertreten, welche als im Blut gelöste, zellmembranständige oder im Zytosol befindliche, sogenannte „Pattern recognition receptors“ (PRRs) vorkommen können. PRRs selbst haben sich im Verlauf der Evolution zu hochkonservierten Strukturen entwickelt. So sind PRRs bereits in Pflanzen und Insekten zu finden. Dort werden sie R-Proteine genannt und erfüllen Abwehrfunktio-

tionen gegen Viren [Kanneganti *et al.* 2005]. Die PRRs sind in der Lage, ebenfalls im Verlauf der Evolution konservierte und für das Überleben der Pathogene (hauptsächlich Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten) notwendige Strukturmerkmale zu erkennen, welche „Pathogen associated molecular patterns (PAMPs)“ genannt werden. Bekannte Beispiele für PAMPs sind Lipopolysaccharid (LPS), ein Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien, und Flagellin, ein Protein, welches für die Beweglichkeit motiler Bakterien essentiell ist.

Zu den membranständigen PRRs gehören die Toll-like-Rezeptoren (TLR), eine Familie von mindestens 12 Rezeptoren. Bekannte Beispiele aus dieser Familie sind TLR4, Rezeptor für LPS und TLR5, Rezeptor für Flagellin. Zu den im Zytosol gelegenen PRRs gehören die „Retinoid-acid-inducible gene I-like receptors“ (RLRs), die virale RNA im Zytosol erkennen und die „Nucleotide-Oligomerization-Domain (NOD)-like Rezeptoren“ (NLRs) [Murphy 2011, Akira *et al.* 2006, Turvey *et al.* 2010, Aderem *et al.* 1999].

1.2 Die NOD-like Rezeptoren

Die Familie der NOD-like-Rezeptoren (NLRs) besteht beim Menschen aus mindestens 22 NLR-Proteinen. Bei der Maus sind sogar 33 NLR-Gene bekannt. NLRs werden in Immun- (u.a. Lymphozyten und Makrophagen) und in Nichtimmunzellen (vor allem (v.a.) Epithelzellen) exprimiert. Der Aufbau der NLRs richtet sich stets nach dem gleichen Grundprinzip. Sie bestehen aus (1) einer „C-terminal leucine-rich repeat“ (LRR), welche die PAMPs-Strukturen erkennt, (2) einer zentralen „nucleotide-binding oligomerization (NOD) domain“, welche für die Selbstoligomerisation nach erfolgreicher Bindung am LRR-Bereich verantwortlich ist und (3) einer variablen „N-terminal protein-protein interaction domain“, welche durch die Selbstoligomerisation ausgelöst das „Downstream signaling“ initiiert. Anhand des unterschiedlichen Aufbaus lassen sich die NLRs je nach Einteilung in 3 - 5 Unterfamilien einteilen [Kanneganti *et al.* 2007, Chen *et al.* 2009].

Die meisten NLRs sind am Aufbau und an der Funktion von Inflammasomen beteiligt. Dabei handelt es sich um im Zytosol gelegene Proteinstrukturen, die durch stress- oder entzündungsinduzierte Reize zu einer Aktivierung von Caspase-1 führen. Dort zeichnet sie für die Reifung von Interleukin (IL) -1-beta und IL-18 in die aktive Form verantwortlich [Siegmond 2010, Chen *et al.* 2009]. Die Rezeptoren NOD1 (NOD-containing protein 1) und NOD2 bilden hier eine Ausnahme. So gehört zu ihren Hauptaufgaben u.a. die Auslösung inflammatorischer Genexpression via „Nuclear Factor kappa B (NFkB)“ -Aktivierung.

Die molekularen Liganden wurden bisher nur für wenige der NLRs ermittelt. Beim Ligand für NOD1 handelt es sich um das Peptidoglycan (PGN) der Bakterien.

PGN, das auch als Murein bezeichnet wird, ist Bestandteil fast aller bakteriellen Zellwände. Allerdings variieren Größe, molekulare Zusammensetzung und Lokalisation bei verschiedenen Bakterienarten [Abb. 2, Turvey *et al.* 2010, Chen *et al.* 2009].

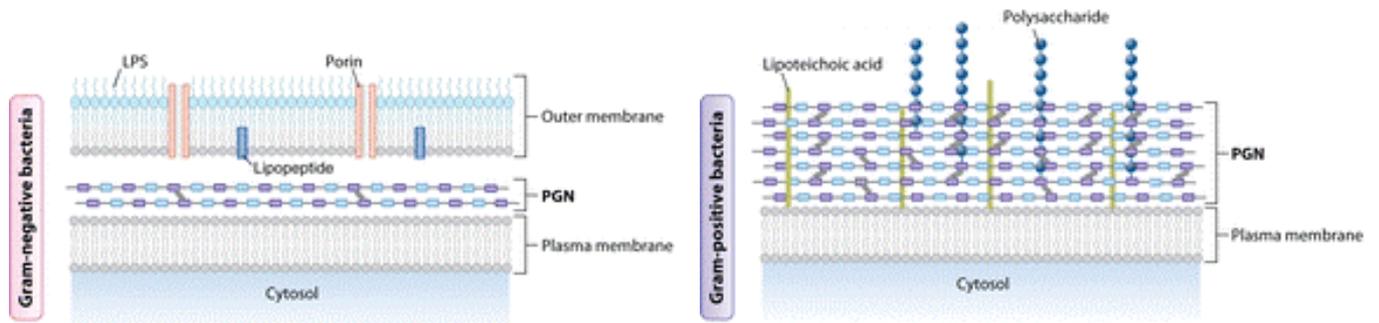


Abb. 1.2: Peptidoglycan (PGN) in bakteriellen Zellwänden. PGN bzw. Murein besteht aus sich abwechselnden Zuckerketten von N-acetylglucosaminen (GlcNAc) und N-acetylmuraminsäure (MurNAc), die durch kurze Peptidketten miteinander verbunden sind. Die molekulare Zusammensetzung variiert stark zwischen Gram-negativen und -positiven Bakterien [aus Chen *et al.* 2009].

1.2.1 Rezeptorfunktionen von NOD2 im angeborenen Immunsystem

NOD2 ist auch unter dem Namen „caspase recruitment domain-containing protein 15“ (CARD15) bekannt. Beim Menschen liegt der für CARD15 kodierende Genabschnitt auf dem Chromosom 16 [Strober *et al.* 2011].

In Darmepithelzellen wird die Expression von NOD2 durch Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) via NF κ B induziert. Dies kann noch durch Interferon-gamma (IFN- γ) verstärkt werden [Rosenstiel *et al.* 2003]. Ein wichtiger negativer Regulator der Funktion von NOD2 ist Erbin, das ebenfalls eine LLR beinhaltet. CARD9 ist ein Beispiel für positive Regulation der Funktion.

NOD2 kann im Zytosol gelegen oder membranständig in der Zelle vorkommen, wobei aus der Lokalisation unterschiedliche Effektorfunktionen resultieren können [Strober *et al.* 2011].

Muramyl-Dipeptid (MDP) ist ein Baustein des PGNs und wird als Ligand für NOD2 beschrieben. Ob MDP direkt an NOD2 bindet, ist bei Säugetieren noch nicht völlig geklärt [Strober *et al.* 2006]. Bei Insekten und *in vitro* konnte eine direkte Bindung von MDP an NOD2 gezeigt werden [Grimes *et al.* 2012, Mo *et al.* 2012]. Es entsteht beim intrazellulären Abbau des PGNs. Es setzt sich aus dem Zucker N-acetylmuraminsäure und den Aminosäuren D-Alanin und D-isoGlutamin (oder auch D-Glutamin) zusammen. In *Mycobacterien* und *Actinomyceten* kann die N-Acetylgruppe in eine N-Glycolylgruppe umgewandelt werden. Das könnte zu einer erhöhten Immunogenität führen [Ogawa *et al.* 2011, Coulombe *et al.* 2009].

Neben MDP soll NOD2 auch virale ssRNA binden [Strober *et al.* 2011].

Weiterhin hat NOD2 eine Interaktionsstelle für Adenosintriophosphat (ATP) und weist Eigenschaften einer ATPase auf [Mo *et al.* 2012].

1.2.2 Folgen der NOD2-Aktivierung

Wenn MDP an die LRR-Domäne von NOD2 bindet, geht man von einer darauf folgenden Selbstoligomerization aus. Anschließend lagert sich an die CARD-CARD-Domäne die Serin-/Threonin Kinase RICK (auch RIP-2 genannt) an und wird dadurch aktiviert. In der Folge wird NFκB aktiviert. Alternativ kann NOD2 auch den „Mitogen-activated protein kinase“ (MAPK) - Signalweg aktivieren. Beide Signalwege führen zur vermehrten Expression bestimmter proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, TNFα, IL-8, IL-12, CXCL1, CXCL2 und CCL5 [Borzutzky *et al.* 2010, Strober *et al.* 2006, Strober *et al.* 2011].

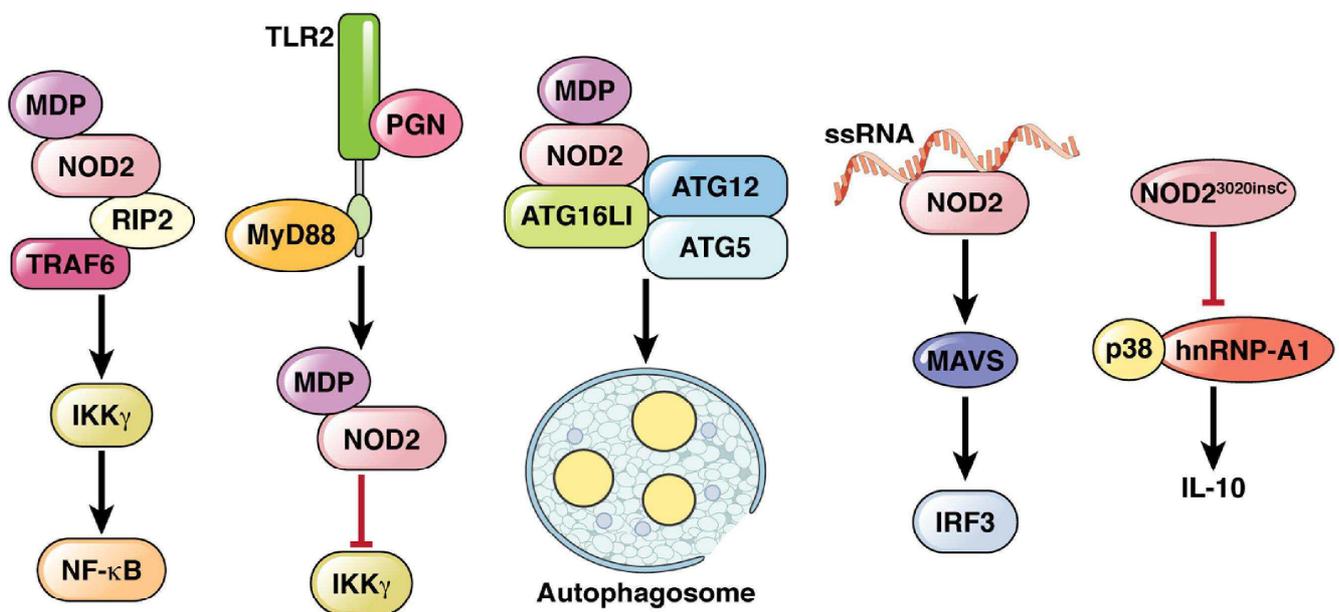


Abb. 1.3: Durch NOD2-Aktivierung induzierte Signalwege. NOD2 wird durch bakterielles PGN, MDP oder virale ssRNA aktiviert und führt zu verschiedenem „Downstream-signaling“. Die Mutation NOD2^{3020insC} hemmt die IL-10-Sekretion via p38 und hnRNP-A1 [aus Kaser *et al.* 2011].

Weiterhin ist die Beteiligung von NOD2 an der Autophagie beschrieben. Dabei handelt es sich um einen Abbaumechanismus eukaryoter Zellen, der bei der Beseitigung von fehlgefalteten Zellproteinen, beschädigten Zellorganellen und intrazellulären Pathogenen zum Erhalt der zellulären Homöostase und bei der Antigenpräsentation durch den Major Histocompatibility Complex (MHC) Class II eine wichtige Rolle spielt. Bei der durch die MDP-Bindung an NOD2 induzierten Autophagie formt NOD2 zusammen mit dem Protein „autophagy-related 16-like 1“ (ATG16L1) Autophagosomen. Dieser Vorgang scheint RICK-, aber nicht NFκB-abhängig zu

sein. Eine durch Mutation von ATG16L1 oder NOD2 bedingte Dysfunktion der Autophagie führt wohl zu einer überschießenden proinflammatorischen Immunantwort, welche durch eine erhöhte Produktion von IL-1-beta, IL-6 und TNF- α charakterisiert ist. Dies bedeutet eine negativ regulatorische Funktion der Autophagie auf Entzündungsantworten [Abb. 3, Travassos *et al.* 2010, Shaw *et al.* 2011, Plantinga *et al.* 2011].

Auch bei der lokalen antimikrobiellen Abwehr im Darm durch Defensine spielt NOD2 eine wichtige Rolle. Defensine sind kationische Proteine, die durch Porenbildung in der Zellwand Bakterienzellen schädigen und damit die epitheliale Barriere verteidigen [Murphy 2011, Sorbara *et al.* 2011]. In Epithel- und *Lamina propria*-Zellen des Kolon scheint NOD2 an der Induktion von β -Defensinen im Rahmen von Infektionen mitbeteiligt zu sein, wobei dem Defensin hBD2 eine besondere Aufgabe zukommt [Sorbara *et al.* 2011].

Weiterhin ist NOD2 in den Panethzellen des Ileums an der Ausschüttung von α -Defensinen (v.a. HD5 und HD6) beteiligt. So zeigten NOD2^{-/-}-Tiere nach peroraler Infektion mit *Helicobacter hepaticus* im Ileum eine Entzündung mit der Bildung granulomatöser Herde in der Darmwand, welche durch die transgene Expression von humanen α -Defensinen HD5 kuriert werden konnte [Biswas *et al.* 2010].

In NOD2^{-/-}-Tieren wurde auch eine Veränderung in der Zusammensetzung der Darmflora beschrieben. So sind Bakterien aus der Gruppe der *Bacteroidetes* häufiger vertreten und die Diversität der Darmflora ist geringer als in Wildtyp-Tieren [Rehman *et al.* 2011, Mondot *et al.* 2011].

Es wurde gezeigt, dass NOD2 die Proliferation von *Salmonellen* in intestinalen Epithelzellen hemmt und die zur IL-12-Produktion führende CCL2 Antwort nach einer *Citrobacter rodentium* Infektion initiiert. Weiterhin kontrolliert NOD2 die intragastrische Infektion mit *Listeria monocytogenes* [Chen *et al.* 2009, Sorbara *et al.* 2011]. Auch bei der Entzündungsantwort gegen eine Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* ist NOD2 beteiligt [Strober *et al.* 2011]. Allerdings scheint eine verlängerte Präsenz des Liganden MDP (nicht des gesamten Bakteriums) zu einer Toleranz, vermittelt durch NOD2, gegenüber dem Mikroorganismus zu führen [Hedl *et al.* 2007]. Dies spricht für eine induzierte Toleranz gegenüber Bakterien, von denen nur bereits abgebaute Bruchstücke zum intrazellulär gelegenen NOD2 gelangen. Das heißt, dass das Bakterium bereits von Abwehrmechanismen des Wirtes angegriffen und durch Zerlegung in „Einzelteile“ unschädlich gemacht wurde. Dadurch ist die erste Gefahr gebannt, das zerstörte Bakterium stellt eine viel geringere Bedrohung für den Wirt dar. Damit wäre die Aufrechterhaltung einer Immunantwort obsolet.

Eine chronische Stimulation von NOD2 durch MDP führt zu einer negativen Regulation des durch PGN initiierten TLR2-Signalweges, da eine chronische Stimulation durch MDP bei

NOD2-Defizienz zu einer überschießenden T-Helfer-Zelle Typ (Th) 1-Immunantwort führt. Mäuse sind durch die Gabe von MDP im Vorfeld vor einer experimentellen Kolitis geschützt. Der Schutz vor der chemischen Entzündungsinduktion ist von IRF-4 abhängig [Watanabe *et al.* 2006, 2008, 2014].

Auch in der erworbenen Immunität spielt NOD2 eine wichtige Rolle. So ist es in die Entwicklung, Funktion und das Überleben von u.a. regulatorischen T-Zellen (Treg), Th1-, Th17-Zellen und B-Zellen involviert [Shaw *et al.* 2011, Rahman *et al.* 2010, Kobayashi *et al.* 2005].

1.2.3 Bedeutung von NOD2-Genmutationen für den Menschen

Beim Menschen sind Mutationen von NOD2 mit dem Blau-Syndrom und mit der Early-Onset-Sarkoidose (ähnelt dem Blau-Syndrom, weist aber keinerlei Lungenbeteiligung auf) assoziiert. Dabei führen die Mutationen zu einer verstärkten NFκB-Stimulation und -Expression. Ebenfalls führen Genmutationen bei Spender oder Empfänger im Rahmen der Graft-versus-Host-Disease zu einer verstärkten Abstoßungsreaktion bei allogenen Knochenmarktransplantationen [Borzutzky *et al.* 2009, Chen *et al.* 2009, Henckaerts *et al.* 2007].

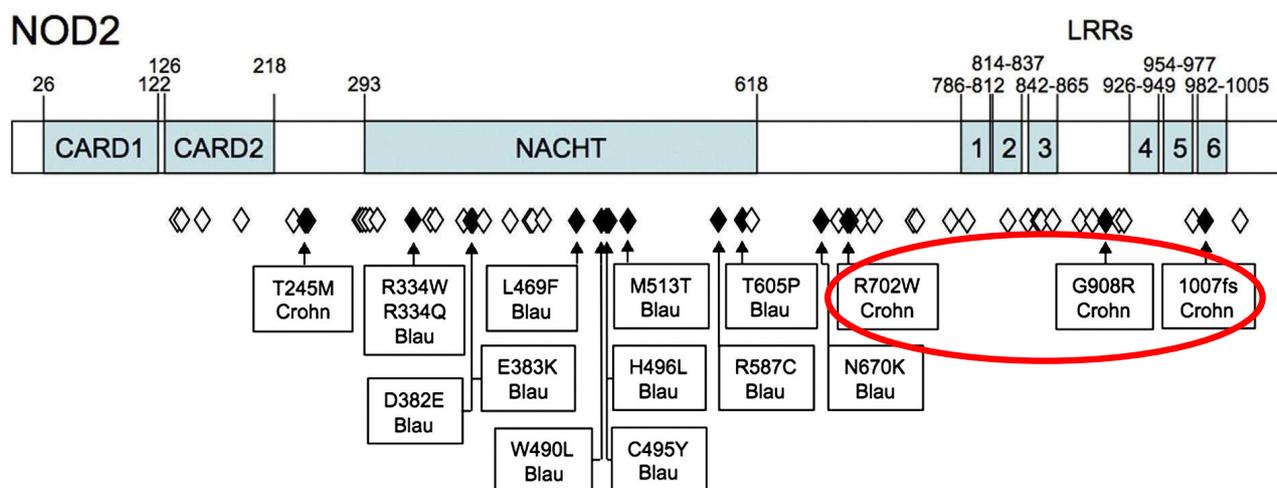


Abb. 1.4: Aufbau von NOD2; zusätzlich Darstellung von krankheits-assoziierten Mutationen. Detaillierte Darstellung der Struktur von NOD2 einschließlich der Lokalisation der mit Morbus Crohn (MC) und Blau-Syndrom/ Early-onset-Sarkoidose assoziierten Mutationen. Weiße Rauten stehen für mit MC assoziierte Mutationen, deren Krankheitsrelevanz bisher jedoch noch unklar ist [aus Borzutzky *et al.* 2009].

Im Jahr 2001 wurden NOD2-Mutationen als die ersten genetischen Veränderungen beschrieben, die mit Morbus Crohn (MC), einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung (CED) assoziiert sind [Hugot *et al.* 2001, Ogura *et al.* 2001, Hampe *et al.* 2001]. Die Krankheit kann den gesamten Gastrointestinaltrakt betreffen, jedoch tritt eine Affektion des terminalen Ileums am häufigs-

ten auf. Die Entzündung ist histologisch durch eine transmurale Entzündung und durch Makrophagen-Granulome in der Darmwand charakterisiert [Xavier *et al.* 2007].

Die Mutationen G908R, R702Q und L1007fsinsC (auch als NOD2^{3020insC} bekannt) sind mit einem vielfach erhöhten Risiko an MC zu erkranken assoziiert. Die momentane Hypothese besagt, dass eine verminderte Bindungsfähigkeit des Liganden MDP zu einer verringerten NFkB-Aktivierung führt. Daneben ist für die Mutation L1007fsinsC eine reduzierte IL-10 Sekretion via Inhibition des Proteins hnRNP-A1 beschrieben worden [Abb. 3, Chen *et al.* 2008, Noguchi *et al.* 2009].

Allerdings zeigen diese Mutationen keine vollständige Penetranz, da nicht alle Menschen mit den genannten NOD2-Mutationen an MC erkranken [Hugot *et al.* 2007].

Das Paradoxon, dass Mutationen von NOD2, welche zu verringerten Entzündungsantworten führen, mit dem erhöhten Risiko an einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung zu leiden, einhergehen, lässt sich möglicherweise durch die regulatorischen und lokalen antimikrobiellen Eigenschaften von NOD2 erklären [Strober *et al.* 2011].

1.3 *Campylobacter jejuni*

Campylobacter jejuni (*C. jejuni*) gehört zur Klasse der Epsilonprotobakterien, die einzig aus der Ordnung der *Campylobacterales* besteht. Ihr werden u.a. die Familien der *Campylobacteraceae* und *Helicobacteraceae* zugeordnet. Die *Campylobacteraceae* setzen sich aus den Gattungen *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Dehalospirillum* und *Sulfurospirillum* zusammen. Die Gattung *Campylobacter* (zu welcher *C. jejuni* gehört) besteht aus 17 Spezies und 6 Subspezies [Garrity *et al.* 2004].

Für den Menschen pathogen sind v.a. *C. coli* und *C. jejuni* sowie seltener *C. lari*, *C. upsaliensi* und *C. fetus* neben weiteren Spezies [Butzler 2004].

C. jejuni macht etwa 90% aller klinischen Isolate aus [Janssen *et al.* 2008]. Es ist ein gram-negatives, spiralförmiges Stäbchenbakterium (Breite: 0,2 - 0,8µm; Länge: 0,5 - 5,0µm), das eine mikroaerobe Umgebung zum Wachstum benötigt (3 - 6 % Sauerstoffgehalt, 2 - 10 % Kohlendioxid). Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 42 °C. Der bevorzugte Wirt sind alle Geflügelarten. Därme von Hühnern werden favorisiert kolonisiert [Snelling *et al.* 2005]. Damit gehört *C. jejuni* zur Gruppe der Zoonoseerreger. Dabei handelt es sich um Pathogene, die ihr natürliches Reservoir in Nutz- oder Haustieren haben und bei einer Transmission durch direkten Kontakt oder Verzehr der kontaminierten Produkte auf den Menschen übertragen werden und Infektionen auslösen. Neben Geflügel kontaminiert *C. jejuni* häufig Gewässer und unpasteurisierte Milch [Young *et al.* 2007].

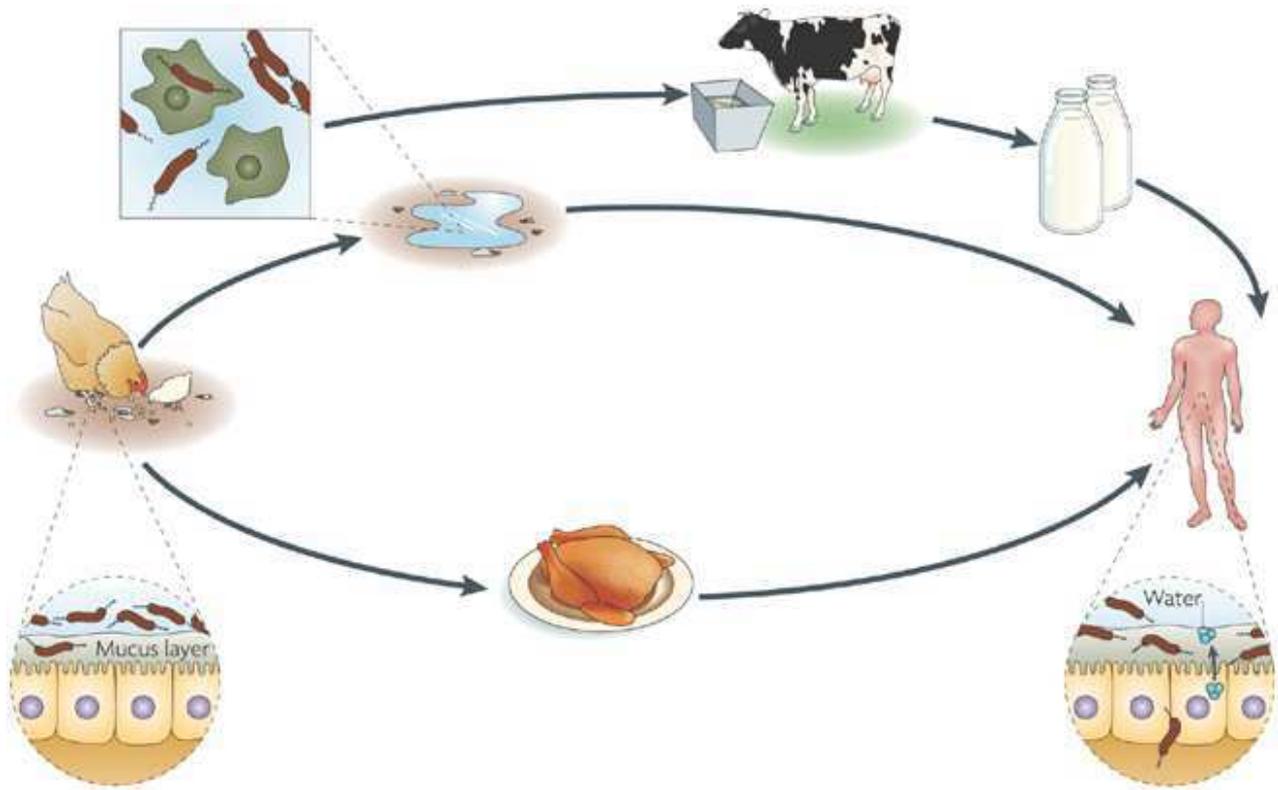


Abb. 1.5: Vorkommen und Übertragungswege von *C. jejuni*. Die Infektion erfolgt durch Tierkontakt oder die Aufnahme kontaminierter Nahrungsmittel. Säugetiere und Vögel stellen natürliche Wirte da [aus Young *et al.* 2007].

Die Gründe für die Pathogenität gegenüber dem Menschen sind bis heute nicht hinreichend geklärt. Allerdings sind verschiedene Eigenschaften von *C. jejuni* bekannt, welche als Virulenzfaktoren fungieren können.

Die Kapsel von *C. jejuni* besteht u.a. aus Lipooligosacchariden (LOS), welche immunogene Eigenschaften aufweisen, das Bakterium aber auch gegen Phagozytose schützen [Snelling *et al.* 2005, Young *et al.* 2007]. Daneben besitzt das Bakterium zwei polare Flagellen, die für die Motilität verantwortlich sind. Die Motilität ist für die Pathogenität essentiell. Das Bakterium benötigt die Flagellen um im Darm durch die Mukusschicht zu den Epithelzellen zu gelangen. Das Flagellum ist durch die Aktivierung von TLR5 auch an sich immunogen [Snelling *et al.* 2005, Wassenaar *et al.* 1999]. Für die anschließende Adhäsion an die Epithelzelle ist wohl das Adhäsin „cell binding factor (CBF) 1“ verantwortlich. Das „Cytolethal Distending Toxines“ (Cdt) ist ein hitze-labiles Protein, welches den Zellzyklus blockiert und so zytotoxisch wirkt [Young *et al.* 2007]. In Gesellschaft mit dem invasiven Potential des Bakteriums sind diese Eigenschaften da-

für verantwortlich, dass eine Infektion abläuft, in deren Rahmen das Epithel v.a. IL-8 sezerniert [Snelling *et al.* 2005].

Allerdings ist eine erhebliche genetische Vielfalt vorhanden, so dass Forschungsergebnisse nicht ohne weiteres auf die ganze Bakterienpopulation übertragbar sind. Selbst innerhalb eines *C. jejuni* - Stammes kommt es durch Passagieren des Bakteriums im Wirtsorganismus zu einer erheblichen genetischen Diversität, die auch funktionelle Konsequenzen hat [Wassenaar *et al.* 1999, Kim *et al.* 2012].

1.3.1 Die akute *Campylobacter*-Gastroenteritis

Das Robert Koch-Institut (RKI) gibt für Deutschland ca. 65.800 gemeldete Fälle von *Campylobacter*-Enteritis im Jahr 2011 an. Damit ist *Campylobacter* hierzulande der häufigste bakterielle Durchfallerreger - vor den Salmonellen [RKI 2012]. Europaweit liegt die Inzidenz der *Campylobacteriosen* bei 48,6 / 100.000 Einwohner im Jahr 2010. Allerdings geht die European Food Safety Authority (EFSA) von einer Dunkelziffer von ca. 9 Millionen Fällen aus. Durch den selbstlimitierenden Verlauf werden viele Erkrankungsfälle nicht durch Laboratorien erfasst. Die höchste Inzidenzrate ist in Europa bei Kindern unter 5 Jahren mit 126,8 Erkrankungen / 100.000 Einwohnern im Jahr 2010 zu verzeichnen [EFSA 2012].

In den USA ist *Campylobacter* die zweithäufigste Ursache bakterieller Durchfallerkrankungen - nach den *Salmonellen* mit 13 Fällen / 100.000 Einwohnern / Jahr [CDC 2010]. Mittlerweile ist *C. jejuni* auch bei einer bedeutenden Anzahl von Reise-Durchfallerkrankungen zu finden. Bei Reisenden aus dem asiatischen Raum war *C. jejuni* in bis zu 64 % der Fälle nachweisbar [De Saussure 2009].

Die Inkubationszeit der *Campylobacter*-Enterocolitis beträgt im Durchschnitt 2 - 5 Tage. Eine Dosis von 500 - 800 Bakterien ist für die Etablierung einer Infektion ausreichend. In 30 % der Fälle kann eine Prodromalphase der Gastroenteritis voranschreiten. Dabei klagen die Patienten über Grippe-ähnliche Symptome wie Fieber, Kopfschmerzen und Myalgien. Die symptomatische *Campylobacteriosis* zeichnet sich durch entweder wässrige oder blutige Diarrhöen, Fieber und schwere Bauchschmerzen aus. Der Darm zeigt histologische Zeichen einer akuten Entzündung wie Infiltration des Epithels und der *Lamina propria* durch Neutrophile und mononukleäre Zellen. Es lassen sich häufig Erythrozyten und Leukozyten dem Stuhl aufgelagert finden, selbst wenn sich der Durchfall als nicht blutig präsentiert [Janssen *et al.* 2008, Wassenaar *et al.* 1999].

Therapeutisch beschränkt man sich in den meisten Fällen auf Flüssigkeitssubstitution sowie Schmerz- und Fieberlinderung. Bei Risikopatienten oder bei schweren Krankheitsverläufen wird auch auf eine antibiotische Therapie zurückgegriffen. Dazu eignen sich, neben Fluorchinolonen,

gegen die *C. jejuni* aber eine Resistenz entwickeln kann, hauptsächlich Makrolide (hier v.a. Erythromycin) [Snelling *et al.* 2005].

Es besteht ein gewisses Risiko nach der akuten Enteritis an Spät komplikationen der Campylobacteriose zu erkranken. Bei ungefähr einem von 1000 Betroffenen manifestiert sich als neurologische Folgeerkrankung das Guillain-Barré-Syndrom, oder seine seltenere Unterform, das Miller-Fisher-Syndrom. Auch können das Reiter-Syndrom oder eine reaktive Arthritis als Spät komplikation auftreten [Janssen *et al.* 2008, Snelling *et al.* 2005].

Eine auslösende Rolle von Campylobacteriosen bei der Pathogenese der CEDs wird seit einigen Jahren kontrovers diskutiert. So zeigte eine Forschungsgruppe aus Dänemark im Jahr 2009, dass zwischen Infektionen mit *Salmonellen* oder *Campylobacter* und dem Auftreten einer CED signifikante Zusammenhänge bestehen. Daraus resultieren auch Überlegungen zu einer möglichen Kausalität [Gradel *et al.* 2009, Kalischuck *et al.* 2010]. Bereits 2011 wurden diese Erkenntnisse allerdings relativiert und man nimmt an, dass dieser Zusammenhang durch eine Bias bei der Detektion der Bakterien verursacht war [Jess *et al.* 2011]. *Salmonellen*- oder *Campylobacter*-Infektionen werden auch in Zusammenhang mit der postinfektiösen Entwicklung eines Reizdarms-Syndroms gebracht [De Saussure 2009, Schwille-Kiuntke *et al.* 2011].

Einige der oben aufgeführten möglichen Virulenzfaktoren der Bakterien spielen wohl eine Rolle bei der Immunpathogenese von *C. jejuni* im Menschen. Allerdings nehmen auch Faktoren auf Seiten des Patienten Einfluss auf die Folgen der Infektion. So variiert die Klinik nach Kontakt mit *C. jejuni* extrem. Von asymptomatischen transienten Trägern bis hin zu schwersten Verläufen mit Sepsis ist eine Ausprägung möglich. Störungen des Immunsystems scheinen den Verlauf negativ zu beeinflussen. So zeigen beispielsweise Menschen mit einer HIV-Infektion häufiger Symptome und schwerere Verläufe als Menschen ohne ein kompromittiertes Immunsystem [Janssen *et al.* 2008].

Von Seiten des angeborenen Immunsystems sind TLR2, TLR4, NOD1 und NOD2 an der Immunantwort gegen *C. jejuni* beteiligt. Jedoch scheinen diese nicht essentiell zu sein [Al-Sayeqh *et al.* 2010]. Unsere Arbeitsgruppe konnte in der Maus zeigen, dass TLR2, TLR4 und TLR9 an der Immunpathogenese der Campylobacteriose beteiligt sind [Bereswill *et al.* 2011, Haag *et al.* 2012].

1.4 Das gnotobiotische Mausmodell der Campylobacterinfektion

Bisher waren keine adäquaten und standardisierbaren Tiermodelle für die akute Campylobacteriosis beim Menschen verfügbar. In Hühnern kolonisiert das Bakterium zwar, die Tiere zeigen aber keine typischen Symptome einer Erkrankung. In der Maus mit normaler Darmflora steht die

Kolonisationsresistenz gegen die *Campylobacter*-Infektion der Verwendung als Modellsystem entgegen [Bereswill *et al.* 2011].

Die Kolonisationsresistenz beschreibt die Fähigkeit der ortsständigen Darmmikrobiota, die Besiedlung des Magen-Darmtraktes mit pathogenen Mikroorganismen effektiv zu verhindern. Als Ursachen werden die Produktion antimikrobieller Substanzen, die Nährstoff-Konkurrenz mit der Darmflora sowie Eigenschaften des Epithels angenommen. So kommt es im Rahmen der Infektion zur Konkurrenz um Adhensionsrezeptoren, zur Stimulation der Mucinsekretion, zur Verstärkung der Darmmotilität sowie zur Produktion antimikrobieller Peptide [Stecher *et al.* 2008]. Es wurde im Mausmodell einer durch *Salmonellen* hervorgerufenen Durchfallerkrankung die „pathogen clearance“ der Darmflora beschrieben. Wenn ein Pathogen den Darm besiedelt, zerstört es die mikrobielle Homöostase im Lumen. Während der Rekonstitution der Darmflora schafft es diese, die Pathogene aus dem Darmlumen zu entfernen. Das Immunsystem hat auf diesen Bereich keinen Zugriff [Endt *et al.* 2010].

In den letzten Jahren wurden Modifikationen entwickelt, durch die die Kolonisationsresistenz gegen *C. jejuni* im Mausmodell neutralisiert wurde.

So hat die Forschungsgruppe von Linda S. Mansfield ein Mausmodell entwickelt, bei dem IL-10^{-/-}-Mäuse mit einer limitierten Darmflora erfolgreich mit *C. jejuni* besiedelt werden. Die Tiere zeigen nach circa (ca.) 30 Tagen typische Zeichen einer Enteritis [Mansfield *et al.* 2007].

Die Gruppe um Christian Jobin infizierte in Isolatoren aufgezogene, keimfreie IL-10^{-/-}-Mäuse peroral mit *C. jejuni*. Diese Tiere entwickeln innerhalb von 14 Tagen eine schwere ulzerative Kolitis. Sie konnten zeigen, dass NFκB-Aktivierung eine bedeutende Rolle in der Immunpathogenese spielt [Lippert *et al.* 2009]. Eingeschränkt ist dieses Modell aber durch die Tatsache, dass in Isolatoren aufgezogene Tiere kein normales Immunsystem im Darm entwickeln [Shroff *et al.* 1995, Wagner 2008].

Auch die Arbeitsgruppe, in der die vorliegende Arbeit durchgeführt wurde, hat in den letzten Jahren Mausmodelle für die *C. jejuni*-Infektion entwickelt [Bereswill *et al.* 2011, Haag *et al.* 2012].

In dieser Arbeit wurden IL-10^{-/-}-Mäusen im Alter von 3 Wochen von der Mutter getrennt und mit einem Cocktail aus fünf verschiedenen Antibiotika im Trinkwasser über einen Zeitraum von mehreren Wochen keimfrei gemacht. Bis zum Zeitpunkt der Antibiose waren die Jungtiere einer normalen mikrobiellen Umgebung ausgesetzt. Auch wiesen die Muttertiere eine konventionelle Darmflora auf. Nach 4 - 6 Wochen Behandlung mit Antibiotika waren keine Bakterien mehr in den Faeces nachweisbar und die Tiere wurden - zur Unterscheidung von keimfreien Tieren aus der Isolatorenhaltung - als gnotobiotisch bezeichnet. Diese Tiere wurden an zwei konsekutiven

Tagen mit ca. 10^9 KBE *C. jejuni* / ml oral (per Gavage) infiziert. Innerhalb einer Woche entwickelten die gnotobiotischen IL-10^{-/-}-Tiere typische Symptome einer *Campylobacter*-Enterocolitis. Mittels *E. coli* - Kolonisation konnte gezeigt werden, dass die Induktion der Entzündung spezifisch für *C. jejuni* war. Die mit *E. coli* kolonisierten Kontrolltiere zeigten keinerlei Zeichen einer akuten Entzündung [Haag *et al.* 2012].

Dieses Mausmodell lässt sich verwenden um die Grundlagen der Virulenz und Pathogenität von *C. jejuni* beim Bakterium und im Wirt näher zu untersuchen.

1.5 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von Funktionen des Rezeptors NOD2 bei der Infektion mit *C. jejuni* in murinen Kolonisations- und Entzündungsmodellen. Wie bereits dargestellt, wird NOD2 in der Literatur als proinflammatorisch beschrieben. So führt die Bindung von MDP an NOD2 zu einer Aktivierung von NF κ B, einem proinflammatorischen Transkriptionsfaktor. Dadurch werden Expression und Sekretion proinflammatorischer Zytokine verstärkt. Einige Publikationen zeigten aber auch eine inhibitorische Rolle von NOD2. Hier hemmte NOD2 vor allem den TLR2-Signalweg.

Daraus folgte die Frage, welche Rolle NOD2 in der Infektion mit *C. jejuni* spielt. Diese Fragestellung wurde im oben beschriebenen, gnotobiotischen Mausmodell, in dem *C. jejuni* ansiedeln kann, untersucht.

Es wurde der Referenz-Stamm *C. jejuni* 81-176 benutzt. Dabei handelt es sich um ein Isolat von einem Patienten mit schwerer Enteritis [Korlath *et al.* 1985]. Dieser Stamm ist ausführlich erforscht, er ist *in vitro* hoch invasiv in Zellkulturmethoden und besitzt ein Virulenz-Plasmid [Poly *et al.* 2005, Bacon *et al.* 2000].

Hier sollte untersucht werden, in wie weit NOD2 einen Einfluss auf den klinischen Zustand der Tiere hatte. Des Weiteren wurden Immunzellen, Zytokinexpression und Zytokinsekretion im Magen-Darm-Trakt analysiert.

Im ersten Experiment wurden gnotobiotische WT- und NOD2^{-/-}-Tiere peroral mit *C. jejuni* 81-176 infiziert und analysiert. Es stellten sich folgende Fragen:

- Welchen Einfluss hat NOD2 auf die Kolonisation von *C. jejuni* im Kolon der Mäuse?
- Kann sich in den NOD2^{-/-}-Tieren eine sichtbare Entzündung des Epithels etablieren?
- Zeigen die NOD2^{-/-}-Tiere einen blanderen klinischen Zustand als die WT-Tiere, weil *C. jejuni* über NOD2 zu einer Aktivierung proinflammatorischer Immunantworten führt?

- Spiegelt sich das auch in den Immunzellen und den Zytokinen wider?

Im zweiten Experiment wurden gnotobiotische IL-10^{-/-}- und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}- Tiere mit *C. jejuni* 81-176 peroral infiziert. Von den gnotobiotischen IL-10^{-/-}- Tieren ist bereits bekannt, dass eine Infektion mit *C. jejuni* eine schwere ulzerierende Kolitis auslöst. Hier stellten sich nun die folgenden Fragen:

- Zeigen die NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tiere einen ähnlich schweren Verlauf der Kolitis wie die IL-10^{-/-}-Tiere oder schützt die NOD2-Defizienz die Tiere?
- Welchen Einfluss hat NOD2 in diesem Modell auf die Produktion von Zytokinen und Entzündungsmediatoren im Kolon, mesenterialen Lymphknoten und Milz?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Puffer

Tabelle 2.1: Chemikalien, Reagenzien und Puffer

Substanz	Hersteller/ Zusammensetzung
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Aqua dest.	Institut für Mikrobiologie
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Ciprofloxacin	Bayer Vital, Leverkusen
Chininalkohol	Charité, Institut für Mikrobiologie
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Entellan	Merck, Darmstadt
Eosin	Merck, Darmstadt
Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg
Gram's crystal violet Solution	Charité, Institut für Mikrobiologie
Gram's safranin Solution	Charité, Institut für Mikrobiologie
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Imipenem	MSD, Haar
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lugol's Lösung	Charité, Institut für Mikrobiologie
Magnesiumchlorid	Roche, Mannheim
Metronidazol	Fresenius, Bad Homburg
N-(1-naphthyl)ethylendiamine	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumnitrit	Sigma-Aldrich, Steinheim
Paraffin	Charité, Institut für Pathologie
Formaldehyd (4%)	Herbeta Arzneimittel, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA; Pasching
Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
Sulfanilamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
TBE (Tris-Bor-EDTA)-Puffer (10x) pH 8	108g Tris-Base, 55g Borsäure, 6,42g EDTA, Aqua dest. auf 1000ml
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Biochrom AG, Berlin
Vancomycin	Cell Pharm, Bad Vilbel
Wasserstoffperoxid	Biochrom AG, Berlin
Xylol	J.T.Baker, Phillipsburg

2.1.2 Kommerzielle „Kits“

Tabelle 2.2: Kommerzielle „Kits“

Kitbezeichnung	Hersteller
BD Cytometric Bead Array Mouse Inflammation Kit	BD Biosciences, Heidelberg
Envision Peroxidase Kit	DAKO, Hamburg
peqGOLD Total RNA Kit	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
QIAmp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
Quantikine Mouse / Rat IL-22 Immunoassay	R&D Systems, Wiesbaden
StreptavidinAP Kit	DAKO, Hamburg
SuperScript™ III Platinum ^R One-Step Quantitative-PCR System	Invitrogen, Karlsruhe
TGF-β-Elisa	R&D Systems, Wiesbaden

2.1.3 Oligonukleotidprimer und -sonden

Tabelle 2.3: Oligonukleotidprimer

Primer-Bezeichnung	Sequenz 5' – 3'	Orientierung
HPRT ex7,8 F	gTTggATACAggCCAgACTTTgT	sense
HPRT as	CACAggACTAgAACACCTgC	antisense
mu IFN γ se	CATCAgCAACAACATAAgCgTCA	sense
mu IFN γ 04	CTCTTCCCCACCCCgAATCA	antisense
IL-01b ex5 S	gTgCTgTCggACCCATATgAg	sense
IL-01b ex7 R	TggggAACTCTgCAgACTCAA	antisense
IL-06ex3 F	TgATggATgCTACCAAAGTggAT	sense
mu IL-06 A	ggTCTTggTCCTTAgCCACT	antisense
IL-10 L	TAggCgAATgTTCTTCC	sense
IL-10 R	CAgCTCTAggAgCATgTggC	antisense
IL-10 neo R	CCTgCGTgCAATCCATCTTg	antisense
IL-17a S	gCTTCATCTgTgTCTCTgATgC	sense
IL-17a A	gAgTTAAAgACTTTgAggTTgACC	antisense
mIL-18bpx4,5 S	ACCCCAgACCAgACTgATAATATAC	sense
mIL-18bpx5,7R	gAAgATTCAAAGTCCATCTTgTTg	antisense
IL-22 S	gCTgAAggAgACAgTgAAAAAg	sense
IL-22 R	AggAAggAgCAGTTCTTCg	antisense
IL-23 F'	CCAgCgggACATATgAATCTAC	sense
IL-23 R''	TgCAAgCAGAACTggCTgTT	antisense
Muc2 F	CTggATTgTAACAACACATgTACTTg	sense
Muc2 A	CTCTTCCAAGTgAACAgCC	antisense
NOD2 F	GCAACAGGGAGGAGCTTCCA	sense
NOD2 R	ACATCAGGCCAGCAGCAGTG	antisense
TNF α ex 3,4 F	CTgTAgCCCACgTCgTAgCA	sense
TNF α R	CggCAGAgAggAggTTgACT	antisense

Tabelle 2.4: Oligonukleotidsonden

Sonde	Sequenz 5' – 3'
HPRT FL-Sonde	AAAgCCTAAgATgAgCgCAAgTTgA
HPRT LC-Sonde	TCTgCAAATACgAggAgTCCTgTTg
IFN γ FL-Sonde	CATCAgCAACAACATAAgCgTCA
IFN γ LC-Sonde	CATCAgCAACAACATAAgCgTCA
IL-1 β FL-Sonde	TAATgAAAgACggCACACCCACCC
IL-1 β LC-Sonde	CAgCTggAgAgTgTggATCCCAAgC
IL-6 FL-Sonde	CATAAAATAgTCCTTCCTACCCCAATTTCC
IL-6 LC-Sonde	TgCTCTCCTAACAgATAAgCTggAgTCAC
IL-17A FL-Sonde	AgCTCAgCgTgTCCAAACACTgA
IL-17A LC-Sonde	gCCAaggACTTCCTCCAgAATgTgA
IL-18 FL-Sonde	AggATgCTgAAgTAggggAAgC
IL-18 LC-Sonde	CTgCAggCAgTACAggACAaggTC
IL-22 FL-Sonde	CTCAgAgACATAAACAgCaggTCCAgT
IL-22 LC-Sonde	CCCCAATCgCCTTgATCTCTCCA
IL-23 FL-Sonde	CCCgTATCCAgTgTgAAgATggTT
IL-23 LC-Sonde	TgACCCACAaggACTCAaggACAA
Muc2 FL-Sonde	AgCACCTgCTCTATCTACgggAgTg
Muc2 LC-Sonde	CCACTACATCACCTTCgACgggAA
NOD2 Taqman-Sonde	TGCGTGGCCAAACCG CTGTC
TNF α FL-Sonde	CCCgACTACgTgCTCCTCACCCA
TNF α LC-Sonde	CCgTCAgCCgATTTgCTATCTCATACC

Alle Primer und Sonden werden von der Firma TIB Molbiol Berlin hergestellt.

2.1.4 DNA-Längenmarker und Enzyme

Tabelle 2.5: DNA-Längenmarker und Enzyme

Produktbezeichnung	Hersteller
Ampli Taq DNA Polymerase	Applied Biosystems, Foster City
DNase I	Roche, Mannheim
Envision Peroxidase anti-Kaninchen	DAKO, Hamburg
Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus	Fermentas, St Leon-Rot
Liberase	Roche, Mannheim
Proteinase K	Qiagen, Hilden
Streptavidin Alkalische Phosphatase	DAKO, Hamburg

2.1.5 Antikörper

Tabelle 2.6: Antikörper

Produktbezeichnung	Hersteller
Biotin. Esel-anti-Kaninchen	Dianova, Hamburg
Biotin. Kaninchen-anti-Ratte	DAKO, Hamburg
B220/CD45R	ebioscience, San Diego
Caspase3	CellSignaling, Danvers
CD3	DAKO, Hamburg
F4/80	Invitrogen, Carlsbad
Foxp3	ebioscience, San Diego
MPO7	DAKO, Hamburg
TEC3	DAKO, Hamburg

2.1.6 Nährmedien und Seren

Tabelle 2.7: Nährmedien und Seren

Nährmedium / Serum	Hersteller
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Columbia Schafblut Agar	Oxoid, Wesel
Columbia Schafblut Agar + CAN	BD Biosciences, Heidelberg
Columbia Schafblut Agar + BAP	Heipha Dr. Müller
Columbia Schafblut Agar + Kanamycin / Vancomycin	Oxoid, Wesel
Fetales Kälber Serum (FKS)	Biochrom AG, Berlin
Karmali Selektivagar	Oxoid, Wesel
MacConkey Selektivagar	Oxoid, Wesel
De Man, Rogosa, Sharpe (MRS) Selektivagar	Oxoid, Wesel
RPMI 1640 + Glutamax	GIBCO/ Invitrogen, Karlsruhe
Thioglycolat-Bouillon	Oxoid, Wesel

2.1.7 Geräte und Plastikwaren

Tabelle 2.8: Geräte und Plastikwaren

Gerät / Plastikware	Hersteller
Anaerobier-Töpfe	Oxoid, Wesel
Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau
Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Capillary Gap Microscope Slides	DAKO, Hamburg
Deckgläser	Mezel-Gläser, Braunschweig
FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg
FastPrep FP12	Bio 101, La Jolla

FastPrep FP120	Bio 101, La Jolla
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Fotodokumentation	VWR GenoSmart
Horizontale Gelelektrophorese	PeqLab, Erlangen
Kühlplatte	MIRCOM GmbH, Walldorf
LightCycler	Roche, Mannheim
Mircom HM 355	MIRCOM GmbH, Walldorf
Mikotiterplatte, unbeschichtet	Nunc, Wiesbaden
Multikanalpipette	Eppendorf, Hamburg
Multistep pipette	Eppendorf, Hamburg
Petrischalen	Nunc, Wiesbaden
pH Meter	Knick, Berlin
Plattenzentrifuge	Heraeus, Hanau
Präparierbesteck	Aesculap/Braun, Melsungen
Reaktionsgefäße 0,5/ 1,5/ 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen 15/ 50 ml	Sarstedt, Sarstedt/Falcon, BD Biosciences, Heidelberg
Rotor Stator, ART Micra D-1	Roth, Karlsruhe
Schüttler	Braun, Melsungen
Shandon EXCELSIOR ES	Thermo Electro Corporation, Waltham
SpectraFluor Plus	Teca, Crailsheim
Spritzen 1/ 5/ 10 ml	Braun, Melsungen
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
TEC5 EME-2 5230 TecTM Tissue Tek®	Sakura, Staufen
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank	Memmert, Heilbronn
Uni Link Enbettkassetten	R. Langenbrinck, Emmendingen
Zeiss Standard 25	Zeiss, Göttingen
Cryobank	MastDiagnostics, Reinfeld
Zellsieb 70/ 100 µm	BD Biosciences, Heidelberg

2.1.8 Sonstiges

Tabelle 2.9: Sonstiges

Material	Hersteller
AnaeroGen®	Oxoid, Wesel
AnaeroTest®	Merck, Darmstadt
CampyGen®	Oxoid, Wesel
Flüssigstickstoff	Fa. Messer, Griessheim
Glaswaren	Schott Duran, Wertheim/ Simax, Selb
Haemocult®	Beckmann Coulter, Krefeld
Knopfkanülen	Roth, Karlsruhe
LightCycler Glaskapillaren	Roche, Mannheim
Microbiologica Bactident® Oxidase	Merck, Darmstadt
Pehanon pH-Streifen	Macherey-Nagel, Düren

2.2 Tierversuche

2.2.1 Versuchstiere

Die C57BL/6 (C6) -Wildtyp- und NOD2^{-/-}-Mäuse wurden bei The Jackson Laboratories (Bar Harbor, USA) kommerziell erworben.

IL-10^{-/-}-Mäuse im 129/SvJ-Hintergrund wurden freundlicherweise von Professor R. Balfour Sartor (University of Carolina, USA), zur Verfügung gestellt. Um IL-10^{-/-}-Mäuse im C56BL/C-Hintergrund zu erhalten, wurden IL-10^{-/-}-Mäuse des 129/SvJ-Hintergrunds mit den bereits vorhandenen C6-Wildtyp-Mäusen gekreuzt. Die Versuchstiere wurden ab der 7. Generation in die Experimente aufgenommen.

Zum Erhalt von NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Mäuse wurden die selbst gekreuzten C6/IL-10^{-/-}-Mäuse mit den NOD2^{-/-}-Mäusen verpaart und ab der 7. Generation als Versuchstiere in die Experimente aufgenommen.

Alle Mäuse wurden im Forschungszentrum für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité-Universitätsmedizin Berlin gezüchtet und gehalten. Die Gendefekte jeder Maus wurden mittels Genotypisierung überprüft, siehe unter 2.7.

2.2.2 Behördliche Genehmigungen der Tierversuche

Die Tierversuche der vorliegenden Arbeit wurden gemäß den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt (Tierversuchsvorhaben G0173/07 vom 15.11.2007, G0135/10 vom 30.08.2010, Tötungsantrag T0114/05 vom 27.04.2005).

2.2.3 Haltung der Mäuse unter SPF-Bedingungen

Die Haltung aller in dieser Arbeit verwendeten Tiere fand im Forschungszentrum für Experimentelle Medizin der Charité-Universitätsmedizin Berlin statt. Es herrschten folgende Bedingungen in den Tierräumen: Spezifisch-pathogenfrei (SPF), 21°C Raumtemperatur, 50% relative Luftfeuchte und ein 12/12 Stunden Hell- und Dunkelrhythmus.

Ein freier Zugang der Tiere zu Leitungswasser und Futter war während des gesamten Versuchablaufes gewährleistet. Alle sieben Tage wurden die Tiere in neue Käfige mit frischen Einstreu, frischem Leitungswasser und autoklaviertem Futter umgesetzt.

Der Gesundheitszustand der Mäuse wurde durch tägliche Kontrollen überprüft.

2.2.4 Haltung, Generierung und Infektion gnotobiotischer Mäuse

Um die sterilen Bedingungen aufzubauen und zu gewährleisten, wurden die Mäuse in einem separaten Tierlabor gehalten. Dort saßen die Tiere in autoklavierten Käfigen mit Hauben. Jegliches Handling der Tiere geschah unter sterilen Bedingungen mit Einmal-Kittel, sterilen Handschuhen, Mundschutz und Kopfhaube. Alle mit den Mäusen in Kontakt kommenden Materialien waren autoklaviert.

Zur Eradizierung der kommensalen Darmflora wurden die Mäuse entsprechenden Alters in autoklavierte Käfige mit Haube überführt und unter den oben genannten sterilen Bedingungen gehalten. Die Tiere erhielten über mehrere Wochen eine steril filtrierte Antibiotikallösung ad libitum zu trinken. Für diese Lösung waren folgende Antibiotika in Leitungswasser gelöst: Ciprofloxacin (200mg/ l, Bayer Vital), Metronidazol (1g/ l, Fresenius), Ampicillin (1g/ l, Ratiopharm), Imipenem (250mg/ l, MSD) und Vancomycin (500mg/ l, Cell Pharm). Zur Kontrolle der erfolgreichen Keimeliminierung wurden einmal wöchentlich Faecesproben von den Mäusen gewonnen, in eine Thioglykolat-Bouillon überführt und bei 37°C bebrütet. Die Tiere wurden als keimfrei angesehen, wenn in der Folge von drei Wochen in den Faeces der Tiere keine kultivierbaren Spezies mehr nachweisbar waren.

Zu einem gegebenen Zeitpunkt nach der erfolgreichen Eradiktion der kommensalen Darmflora wurde die Antibiotika-Therapie beendet und es erfolgte die Gabe von autoklaviertem Leitungswasser. Zwei Tage später wurden die Mäuse mit dem jeweiligen *Escherichia coli* (*E. coli*)- bzw. *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*)-Stamm, wie unter 2.2.4 und 2.2.5 erläutert, infiziert.

2.2.5 Infektion mit *Escherichia coli*

Es wurde aus dem Darminhalt einer naiven Wildtypmaus ein *E. coli* -Stamm isoliert, biochemisch und durch Sequenzierung identifiziert. Die Anzucht des *E. coli* erfolgte in einer Thioglykolat-Bouillon durch Übernacht-Bebrütung bei 37°C mit dem Ziel einer Bakterienkonzentration von ca. 10^9 – 10^{10} KBE/ml. Im weiteren Verlauf wurden je 100µl aus der bebrüteten Thioglykolat-Bouillon auf MacConkey-Agar gegeben und ausplattiert. Nach 24 Stunden Bebrütung bei Raumtemperatur wurden die Kolonien der konfluent bewachsenen Platten mit einem sterilen Tupfer in eine der Anzahl der zu infizierenden Tiere entsprechende Menge steriles PBS überführt. Unmittelbar anschließend wurde jedes Tier mit 0,3ml *E. coli* -Suspension mittels Gavagesonde per oral infiziert. Die Infektion erfolgte an zwei aufeinanderfolgenden Tagen.

Die verabreichte *E. coli*-Konzentration jeder Infektionssuspension wurde anhand einer seriellen Verdünnungsreihe erhoben und in koloniebildenden Einheiten (KBE)/ ml angegeben.

Zum Erhalt einer 1:100 Verdünnung wurden 100µl der Infektionssuspension in ein mit 9,9ml sterilem NaCl 0,9% gefüllten Falcon Gefäß gemischt. Die Überführung von 100µl aus der ersten Verdünnung in einen neuen Falcon Tube, wiederum mit 9,9ml sterilem NaCl 0,9% gefüllt, ergab die zweite Verdünnungsstufe (1:10.000). Die dritte Verdünnungsstufe (1:1.000.000) wurde durch die Vermischung von 100µl aus der zweiten Verdünnung mit 9,9ml sterilen NaCl 0,9%, befindlich in einem weiteren Falcon Tube, hergestellt.

Anschließend wurden 100µl der jeweiligen Verdünnungsstufe auf Columbia- und MacConkey-Agar ausplattiert und unter normaler Atmosphäre bei 37°C für 24 h bebrütet. Die Konzentration an *E. coli* der verwendeten Infektionssuspensionen ergab ca. 10^{10} – 11^{11} KBE *E. coli*/ ml.

Zum Ausschluss einer möglichen sekundären Kontamination wurden zudem 100µl der *E. coli*-Infektionssuspension unverdünnt auf Colistin/ Nalidixin Säure (CNA) -Agar ausplattiert. Die Bebrütung erfolgte 48h bei 37°C und normaler Atmosphäre. Die Quantifizierung der KBE wurde wie unter 2.3.2 beschrieben vorgenommen.

2.2.6 Infektion mit *Campylobacter jejuni*

Der Stamm *C. jejuni* 81-176 ist ein Patientenisolat, welcher freundlicherweise von Prof. Dr. Steffen Backert (University College of Dublin, vormals Universität Magdeburg) zur Verfügung gestellt wurden.

Die Lagerung jedes Stammes erfolgte in einer Cryobank bei -80°C. Zur Herstellung einer *C. jejuni*-Suspension wurden 100µl und einige Keramikkügelchen aus der entsprechenden Cryobank entnommen und auf Karmali-Agar ausplattiert. Diese Agarplatten wurden unter mikroaerophilen Bedingungen bei 37°C bebrütet. Dies wurden durch Zugabe eines CampyGen[®] zu den Platten innerhalb eines luftdichten Topfes erzielt. Nach 48h Bebrütung wurden Bakterienkolonien von je zwei konfluent bewachsenen Karmali-Platten mit einem sterilen Tupfer abgenommen und in 1,5ml steriles PBS eingerührt. Anschließend wurden jeweils 100µl der Suspension auf einer der Zahl der zu infizierenden Tiere gemäßen Stückzahl an Karmali-Agares ausplattiert und 48 h unter den oben genannten Bedingungen bebrütet. Darauf wurden diese konfluent gewachsenen *C. jejuni*-Kolonien mit einem sterilen Tupfer in eine der Tiermenge angepassten Menge steriles PBS eingerührt. Unmittelbar darauffolgend wurde jedes Tier mit 0,3ml *C. jejuni* -Suspension per oral unter Nutzung einer Gavagesonde infiziert. Je nach Experimentalansatz erfolgte die Infektion der Tiere mit *C. jejuni* an zwei oder an drei konsekutiven Tagen.

Zur Bestimmung der *C. jejuni*-Konzentration in der Infektionssuspensionen wurden je 100µl von der Infektionssuspension in einer 1:100-, 1:10.000- und 1:1.000.000-Verdünnung auf Columbia-

und Karmali-Agar ausplattiert und unter den oben genannten Bedingungen für 48h bebrütet. Die Herstellung der seriellen Verdünnung ist unter 2.2.4 beschrieben.

Zum Ausschluss einer möglichen sekundären Kontamination wurden zudem 100µl der *C. jejuni* - Infektionssuspension unverdünnt auf CNA-Agar ausplattiert. Die Bebrütung erfolgte für 48 Stunden bei 37°C unter normaler Atmosphäre. Die Quantifizierung der KBE wurde wie unter 2.3.2 beschrieben vorgenommen.

2.2.7 Klinisches Bild der Mäuse

Zur Erhebung des klinischen Scores wurden die Tiere im naiven, nicht infizierten Zustand und zu bestimmten Zeitpunkten nach der Infektion bis zum Sektionszeitpunkt beurteilt. Diese Bewertung erfolgte auf Grundlage eines standardisierten, modifizierten Scores der akuten DSS-Colitis [Siegmond *et al.* 2001]. Als Bewertungskriterien wurden der klinische Aspekt, die Stuhlkonsistenz und der makroskopische bzw. mikroskopische Blutnachweis im Stuhl erfasst. Der Nachweis von verborgenem Blut im Stuhl der Tiere erfolgte mit dem nach Greeger modifizierten Guajak-Test (später als Haemocult bezeichnet). Hierfür wurde ein ca. 0,5cm langes Stück Faeces auf das Haemocult-Testfeld gegeben und ausgestrichen. Die Rückseite wurde mit Entwicklerflüssigkeit beträufelt und nach einer Minute erfolgte die Beurteilung eines möglichen Farbumschlages.

Jedes dieser Kriterien umfasste eine Einteilung von null bis vier Punkten. In Tabelle 2.10 ist die Zuordnung des Punktwertes zu der Kriteriumsausprägung dargestellt. Durch Addition der jeweiligen erhobenen Punktwerte der drei genannten Kriterien wurde so ein maximaler klinischer Score von 12 Punkten errechnet.

Tabelle 2.10: Zuordnung von Punktwert zur Kriteriumsausprägung des klinischen Scores

Kriterium	Punktwert
Klinischer Aspekt	
Unbeeinträchtigt Erscheinungsbild	0
Struppiges Fell	1
Struppiges Fell und gekrümmte Haltung	2
Struppiges Fell, gekrümmte Haltung und Isolationsverhalten	3
Präfinales Erscheinungsbild bzw. Tod	4

Stuhlkonsistenz

Harter, geformter Faeces	0
Weicher, breiiger Faeces	2
Flüssiger, am Anus klebender Faeces	4

Haemocult

Kein Farbumschlag	0
Farbumschlag	2
Makroskopisch sichtbares Blut bzw. Rektumprolaps	4

2.2.8 Probenentnahme

Zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der *E. coli*- und *C. jejuni* -Lasten im Verlauf der Infektion wurden zu definierten Zeitpunkten Faeces gewonnen und in 1,5ml sterilem PBS aufbewahrt. Aus diesen Faecesproben wurden 100µl entnommen und auf entsprechenden Kulturmedien seriell verdünnt ausplattiert. Für eine Analyse der murinen Gastrointestinalflora wurden ebenso zu den entsprechenden Zeitpunkten Faecesproben der Mäuse asserviert.

Zum Sektionszeitpunkt erfolgte die Tötung der Mäuse durch CO₂-Inhalation. Kontrolltiere befanden sich zum Sektionszeitpunkt in einem zu den infizierten Tieren korrelierenden Alter und Geschlecht.

Um eine signifikante Keimreduktion des Fells zu erzielen, wurden die Tiere nach Tötung in 70% Isopropylalkohol getaucht. Daraufhin wurden Brust- und Bauchfell steril eröffnet und das Vollblut wurde durch eine Herzpunktion gewonnen. Darauf folgten die Eröffnung des Situs mittels eines Y-Schnittes des Peritoneums und eine anschließende makroskopische Beurteilung der Organe. Es wurde vornehmlich auf die Größe der mesenterialen Lymphknoten und der Milz geachtet. Eine Beurteilung des Gastrointestinaltraktes erfolgte besonders bezüglich Anzahl der Peyer-Plaques, Einblutungen, Stenosen, Wandverdickungen und Stuhlkonsistenz und -farbe. Anschließend wurde der Darm vom Mesenterium gelöst und die Länge des Dünndarms und Kolons gemessen. Auch wurden je nach Experimentalansatz Milz, Leber, Nieren und mesenteriale Lymphknoten steril entnommen um die bakterielle Translokation zu bestimmen oder in PBS auf Eis gelagert für spätere Weiterverarbeitung.

Mehrere ca. 0,5cm lange Darmstücke von Ileum und Kolon wurden aufgeschnitten, in PBS gespült und in PBS auf Eis gelagert beziehungsweise (bzw.) in flüssigem Stickstoff gefroren um für weitere Analysen zur Verfügung zu stehen. Für den Nachweis von *E. coli*- und *C. jejuni*-Lasten wurde aus den einzelnen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes (Magen, Duodenum,

Ileum und Kolon) luminaler Inhalt in ein mit 1,5ml sterilem PBS gefüllten Eppendorfgesäß gefüllt und auf Eis gelagert. Des Weiteren wurde dieser so genutzte Darmabschnitt eröffnet und mittels eines Streifentests der pH-Wert bestimmt.

Von jedem der genannten Bereiche des Gastrointestinaltraktes wurde ein Abschnitt in eine Einbettkassette für Histologien gelegt und in einer 4% Formaldehyd-Lösung fixiert.

2.3 Kulturelle Analysen der Bakterien

2.3.1 Gewichtsbestimmung des luminalen Inhaltes des Gastrointestinaltraktes bzw. der Organe

Die in der kulturellen Analyse bestimmten Bakterienlasten wurden auf das Gewicht des gewonnenen luminalen Inhaltes des Gastrointestinaltraktes bzw. das Organgewicht bezogen. Dafür erfolgte ein Wiegen der mit 0,75ml bzw. 1,5ml sterilem PBS gefüllten Eppendorfgesäße vor und nach Zugabe der Faecesproben/ Organstücke und die Differenz ergab das jeweilige Eigengewicht.

2.3.2 Quantifizierung der koloniebildenden Einheiten

Um eine gute kulturelle Differenzierung und Quantifizierung der jeweiligen untersuchten Bakterienspezies zu gewährleisten, durften weder ein zu geringes Wachstum noch ein überwucherndes Wachstum der Bakterien auf der Platte die visuelle Auswertung behindern. Dafür wurden die in 1,5 ml sterilen PBS befindlichen Faecesproben mit einem sterilen Tupfer homogenisiert und anschließend je 100µl unverdünnt, in einer 1:100- und in einer 1:10.000-Verdünnung auf die jeweiligen Platten ausgebracht und mit einem Glasspatel ausplattiert. Die Herstellung dieser Verdünnungsreihe ist unter 2.2.5 beschrieben.

Tabelle 2.11: Quantifizierung der KBE

Gezählte KBE	Notierte KBE
1	10^1
10	10^2
100	10^3
1000	10^4
Beginnend konfluierend	10^5
Konfluierend	10^6
Überwuchernd	$>10^6$

Die Quantifizierung der koloniebildenden Einheiten (KBE) der unterschiedlichen Morphotypen erfolgte anhand der in Tabelle 2.11 genannten Methode. Es wurden zur Präzisierung der quantitativen Auswertung 0,25-fachen logarithmische Abstufungen vorgenommen.

Die Beurteilung erfolgte abschließend nach 48 Stunden. Die verschiedenen Koloniemorphologien wurden dokumentiert und quantifiziert. Unklare Koloniemorphologien wurden mit standardisierten mikrobiologischen Verfahren weiter differenziert und bestimmt.

2.3.3 Kultureller Nachweis von *Escherichia coli*

Für den kulturellen Nachweis von *E. coli* wurden die im Versuchsverlauf gewonnenen Faecesproben wie unter 2.3.1 und 2.3.2 gewogen, homogenisiert und verdünnt. Je 100µl der Probe und der jeweiligen Verdünnungsstufe wurden auf einen Columbia- und MacConkey-Agar ausgebracht und unter Ausnutzung des gesamten Agars ausplattiert. Die Mitführung des Columbia-Universalagars erfolgte zwecks Ausschluss einer möglichen endogenen Hemmung des Wachstums auf dem Selektivagar. Die Bebrütung erfolgte für 24h bei 37°C und normaler Atmosphäre. Die anschließende Quantifizierung erfolgte wie unter 2.3.2 erläutert.

E. coli konnte anhand seiner Koloniemorphologie, seines Geruches und des Farbindikators im MacConkey-Agar identifiziert werden. Da es sich bei *E. coli* um ein Laktose-positives Enterobacterium handelt, fand bei entsprechendem bakteriellem Wachstum auf dem MacConkey-Agar ein Farbumschlag zu Pink statt, welcher bei Laktose-negativen Isolaten vollständig fehlte.

2.3.4 Kultureller Nachweis von *Campylobacter jejuni*

Der kulturelle Nachweis von *C. jejuni* erfolgte entsprechend dem Vorgehen wie unter 2.3.3 beschrieben. Abweichungen gab es bei den Platten und den Bebrütungsbedingungen. So wurden alle Proben auf Karmali-Selektivnährboden ausplattiert. Die Bebrütung erfolgte wie unter 2.2.6 erläutert. Daran schloss sich die Quantifizierung des Bakterienwachstums, wie unter 2.3.2 beschrieben, an.

2.4 Histopathologische Beurteilung des Gastrointestinaltraktes

2.4.1 Herstellung der histologischen Präparate

Nachdem die Gastrointestinalabschnitte wie unter 2.2.8 beschreiben fixiert waren, folgte im Institut für Pathologie der Charité-Universitätsmedizin, Campus Benjamin Franklin, die Einbettung in Paraffin. Eine gründliche Spülung der Fixative erfolgte mit Aqua dest.. Daran

schloss sich die Entwässerung mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe an und die Entfettung und Entalkoholisierung durch Xylol und Methylbenzoat. Abschließend wurden die so bearbeiteten Fixative in Paraffin eingebettet. Es wurden von den Paraffinblöcken 4-5µm dicke Schnitte mit einem Mikrotom hergestellt und auf einen Objektträger transferiert. Diese wurden über Nacht bei 60 °C getrocknet und fixiert.

2.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Um eine histopathologische Beurteilung vornehmen zu können, wurden die Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Hierfür fanden eine zweimal fünfminütige Entparaffinisierung mittels Xylol und eine folgende Rehydrierung durch eine absteigenden Alkoholreihe (100% Isopropanol, 96%, 80% und 70% Ethanol) statt. Dem Waschen in Aqua dest. folgte die drei Minuten dauernde Hämatoxylin-Färbung. Nach einem erneuten Waschen wurde das Präparat in einprozentige Salzsäure (HCl) getaucht, nochmals gewaschen und während fünf Minuten mit Leitungswasser gespült. Nach einem weiteren Waschgang in Aqua dest. erfolgte die 30-60 Sekunden dauernde Eosin-Färbung. Darauf wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und wieder in Xylol getaucht. Endlich wurden die Schnitte mit Entellan und Deckgläschen eingedeckt, wodurch die Haltbarkeit gewährleistet war.

2.4.3 Auswertung der histologischen Präparate

Die Auswertung der HE-Schnitte erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskops. Die Schnitte wurden unter 100- bis 400-facher Vergrößerung betrachtet und mit Hilfe des in der Tabelle 2.12 genannten OVA-Colitis-Scores bewertet.

Tabelle 2.12: OVA-Colitis-Score

Morphologisches Merkmal	Punktwert
Keine Veränderungen	0
Einzelne, isolierte Zellinfiltrate in der Mukosa, keine Epithelhyperplasie	1
Wenige verstreute bis diffuse Zellinfiltrate in Mukosa und Submukosa, schwache Epithelhyperplasie, beginnender Verlust von Becherzellen	2
Zellinfiltrate in Mukosa, Submukosa und häufig transmural, Epithelhyperplasie, Verlust von Becherzellen	3
Zellinfiltrate in Mukosa, Submukosa und häufig transmural, schwere Entzündung, Verlust von Becherzellen und Krypten, schwere Epithelhyperplasie	4

Für eine genauere Beurteilung wurde der Score in 0,5er Schritte gegliedert. Es wurde immer die stärkste Läsion des Gewebeschnittes zur Beurteilung herangezogen. Die Bewertung erfolgte von zwei unabhängigen Gutachtern. Die Auswertung erfolgte auf Grund des Mittelwertes dieser beiden Bewertungen.

2.4.4 Herstellung und Beurteilung der immunhistochemischen Präparate

Nach Anfertigung von Paraffinschnitten wie unter 2.4.1. erfolgte die Entparaffinisierung und Rehydrierung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe. Daran schloss sich die Epitop-Demaskierung in Citratpuffer (pH 6) im Schnellkochtopf an. Anschließend wurden die Präparate 30 Minuten lang mit dem Primärantikörper gegen Caspase3, Ki67 bzw. TEC3, CD3, MPO7, B220 oder F4/80 inkubiert. Die Schnitte, welche für die Foxp3-Färbung bestimmt waren, wurden vor der Färbung mit dreiprozentigem Wasserstoffperoxid behandelt um die endogene Peroxidase zu blockieren. Die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper folgte.

Als sekundärer Antikörper fungierte ein biotinylierter Anti-Kaninchen-Antikörper aus dem Esel, ein Anti-Ziege-Antikörper aus dem Esel bzw. ein Anti-Ratte-Antikörper aus dem Kaninchen. Für den tertiären, Enzym-tragenden Komplex wurde mit Streptavidin gekoppelte alkalische Phosphate genutzt. Im Falle von Foxp3 wurde die Envision Peroxidase Anti-Kaninchen und im Falle von IL-18 wurde Peroxidase Anti-Ziege aus dem Esel verwendet. Die Detektion und Visualisierung der Peroxidase geschah mittels Diaminobenzidin bzw. Fast Red als Chromogen.

Die durchschnittliche Anzahl der Immunzellen pro Gesichtsfeld wurde durch Auszählen positiv gefärbter Zellen in sechs repräsentativen Kolonabschnitten in einer 40x10-Vergrößerung am Mikroskop und anschließender Mittelwertbildung bestimmt.

Die immunhistochemischen Färbungen entstanden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin und der Arbeitsgruppe von Dr. Anja A. Kühl an der Charité, Campus Benjamin Franklin.

2.5 Zytokin- und Proteinmessungen

2.5.1 Zytokinbestimmung aus Organkulturüberständen

Die Probennahme erfolgte wie unter 2.2.8 beschrieben. Es wurden die jeweiligen Organstücke (Leber, mesenteriale Lymphknoten, Niere oder Milz) bzw. ein 1cm langes Kolonstück für die Zytokinmessungen aufgeschnitten und sorgfältig in PBS gespült um den vorhandenen Inhalt zu entfernen. Bis zur weiteren Bearbeitung wurde das Darmstück in PBS auf Eis gelagert. Daraufhin folgte die Inkubation des Organstückes für 18 Stunden in RPMI/ 0,01% Penicillin/

Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und bis zu weiteren Verarbeitungen bei -80°C aufbewahrt. Das Organstück wurde gewogen. Die Organkulturüberstände des Kolons wurden mit den unter 2.5.2 - 2.5.5 beschriebenen Methoden analysiert. Zur Normalisierung der untersuchten Parameter wurden die Messwerte auf Proteingehalt oder Organgewicht bezogen.

2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der Trichloressigsäure (TCA)-Präzipitation bestimmt. Dafür wurden zu 35µl aus den Organ- bzw. Kolon-Kulturüberstand 100µl HCl (0,1M) und 25µl 20% TCA hinzugefügt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte die Messung der Absorption der entstandenen Trübung bei 405nm. Die Proteinkonzentration errechnete sich anhand einer auf Bovines Serum Albumin (BSA) bezogenen Standardkurve.

2.5.3 Bestimmung der Stickstoffmonooxidkonzentration

Die Stickstoffmonooxid (NO)-Konzentration der Kolon-Organkulturüberstände erfolgte mittels der Griess-Reaktion. Da NO eine zu geringe Halbwertszeit besitzt, wurde der Nachweis anhand des Stoffwechselproduktes Nitrit erbracht. Dafür wurden 3g Sulfonamid in 18ml Phosphorsäure gelöst und ad 300ml mit Aqua dest. vermischt. Anschließend wurden 300mg N-(1-naphtyl)-ethylendiamin in 300ml Aqua dest. gelöst. Von beiden Lösungen wurden im Verhältnis 1 + 1 eine Reagenzlösung hergestellt. Von diesem Griess-Reagenz wurden 50µl mit 50µl Probe in einer Mikrotiterplatte vermischt. Es bildete sich ein Azofarbstoff aus der Reaktion von N-(1-naphtyl)-ethylendiamin mit dem aus der Probe stammenden Nitrit. Die Extinktion des Farbstoffes wurde bei 550nm gemessen. Die NO-Konzentration wurde anhand einer auf Natriumnitrit bezogenen Standardkurve berechnet. Trat eine zu starke Trübung in den Kulturüberständen auf, wurde von einer NO-Messung abgesehen (meist bei den Milzkulturen).

2.5.4 Cytometric Bead Array (CBA)

Es wurden mit dem CBA Mouse Inflammation Kit die Konzentrationen von IL-6, IL-10, IL-12p70, IFN-g, TNF-a und MCP-1 untersucht. In dem Kit waren sechs unterschiedliche Gruppen von mikroskopischen Kügelchen enthalten, welche mit gegen das jeweilige Zytokin gerichteten Antikörpern gecoatet waren. Zur Formung von Sandwich-Komplexen wurden diese Kügelchen, die Proben und die detektierenden Antikörper, welche an Phycoerythrin gekoppelt waren, gemeinsam inkubiert. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte mit dem Gerät FACS-

Canto II. Die Kügelchen unterschieden sich in einer für die jeweilige Gruppe spezifischen Fluoreszenz-Intensität.

2.5.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Um die Konzentration von IL-17A, IL-1-beta und IL-22 zu bestimmen wurden die jeweiligen ELISA-Kits von R&D Systems laut Protokoll verwendet. Bei diesen Kits handelt es sich um ELISAs, welche nach dem Prinzip des Sandwich-ELISA arbeiten.

Zu Beginn wurden der Standard, die Kontrolle und die Proben in eine bereits mit dem jeweiligen Antikörper gecoatete Mikrotiterplatte in die jeweiligen Vertiefungen pipettiert und über einen definierten Zeitraum inkubiert. Anwesende Zytokine konnten so vom jeweiligen Antikörper gebunden werden. Der enzymgekoppelte Antikörper wurde anschließend hinzu geben. Darauf wurde das Enzymsubstrat beigegeben und konnte so vom Enzym umgesetzt werden. Die Konzentration des gemessenen Zytokins wurde mit Hilfe einer Standardkurve, welche sich auf die optische Dichte des verstoffwechselten Substrates bezog, ausgerechnet. Eine Normalisierung der gemessenen Werte erfolgte auf die Proteinkonzentration oder das Organgewicht bezogen.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 RNA-Extraktion aus dem Kolongewebe

Zur RNA-Extraktion aus Kolongewebe wurde mit dem peqGold Total RNA Kit laut Protokoll gearbeitet. Dazu wurden die während der Probenentnahme im flüssigen Stickstoff gefrorenen Kolonstücke benutzt. Zusätzlich zur RNA-Isolierung erfolgte die Zerkleinerung und Homogenisierung der Kolonstücke durch Bashing Beads (Zymo Research). Anschließend wurden RNasen inaktiviert und das Lysat wurde über eine DNA-Säule geschickt um genomische DNA aus der Probe abzuscheiden. Darauf folgte eine weitere Säule, bei der die RNA aus der Probe getrennt wurde, in dem sie an die Säulen-Membran band. Es schlossen sich mehrere Waschschrte an um Kontaminationen zu entfernen. Die Lagerung der RNA bis zur weiteren Verwendung erfolgte als Eluat in 40µl RNase-freiem Aqua bidest. bei -80°C.

2.6.2 Quantitative Real-Time PCR (RT-PCR) zur mRNA-Bestimmung

Nachdem die RNA wie unter 2.6.1 beschrieben aus dem Kolongewebe isoliert wurde, schloss sich das Umschreiben in cDNA laut Protokoll des SuperScript™ III Platinum^R One-Step Quantitative-PCR System an.

Tabelle 2.13: Reaktionsbedingungen der RT-PCR

	HPRT	IFNγ	IL1β	IL6	IL17A	IL18	IL22	IL23p19	Muc2	TNFα	NOD2
Reverse Transkription	30min 60°C	30min 60°C	30min 60°C	30min 55°C	30min 60°C	30min 60°C	30min 55°C	30min 60°C	30min 60°C	30min 60°C	30min 60°C
Initiale Denaturierung	2min 95°C	2min 95°C	2min 95°C	2min 95°C	2min 95°C	2min 95°C	2min 95°C	2min 95°C	2min 95°C	2min 95°C	2min 95°C
Denaturierung	5sek 95°C	5sek 95°C	5sek 95°C	5sek 95°C	5sek 95°C	5sek 95°C	5sek 95°C	5sek 95°C	5sek 95°C	5sek 95°C	5sek 95°C
Bindung der Oligonukleotide	7sek 58°C	10sek 60°C	10sek 60°C	7sek 59°C	10sek 57°C	10sek 57°C	8sek 58°C	7sek 58°C	10sek 55°C	10sek 59°C	45sek 60°C
Strangverlängerung	10sek 72°C	7sek 72°C	12sek 72°C	10sek 72°C	6sek 72°C	9sek 72°C	5sek 72°C	5sek 72°C	7sek 72°C	9sek 72°C	-

Es wurde 1 μ l RNA-Template mit folgenden Substanzen in einer Glaskapillare vermischt: 5 μ l zweifacher Puffer, je 0,5 μ l BSA, Primermix, Sonde FL, Sonde LC und 0,25 μ l MgCl₂, 0,4 μ l Enzymmix und 1,35 μ l Aqua dest. Die Analyse, bei der destilliertes Wasser als Negativkontrolle diente, erfolgte im LightCycler. Die Konditionen des RT-PCR-Ablaufes sind in Tabelle 2.13 dargestellt.

Es fanden 45 Zyklen der Denaturierung, Annealing und Elongation statt und zu jedem Zyklusende wurde eine Fluoreszenzdetektion durchgeführt. Kalibriert wurde das System mit Hilfe eines Darmstückes, welches von einer mit 100 *Toxoplasma gondii*-Zysten per oral infizierten und präfinal seziierten Maus stammte. Um Mengenunterschiede zwischen den verschiedenen verwendeten Darmstücken auszugleichen, wurde die relative Menge der spezifischen RNA auf die Expression des Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT)-„Housekeeping“-Gens normiert. Der Crossing Point wurde mittels der Software RelQuant ermittelt. Die Werte wurden dann auf den kleinsten Wert gleich eins normiert.

2.7 Genotypisierung der verwendeten Mäuse

2.7.1 DNA-Extraktion aus Mausgewebe

Das QIAmp DNA Mini Kit von Qiagen wurde für die DNA-Extraktion aus der Schwanzspitze laut Protokoll verwendet. Dafür wurden die Schwanzspitzen durch Proteinase K zersetzt und das Lysat über eine Säule mit einer QIAmp Membran geschickt, wobei die freigesetzte DNA an die Membran gebunden wurde. Dann wurde die DNA zweimal gewaschen und in 400µl Aqua dest gelöst.

2.7.2 PCR zur DNA-Bestimmung

Die aus den Schwanzspitzen gewonnene DNA (siehe 2.7.1) wurde mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Um Heterozygotien auszuschließen wurde nicht nur die Mutation sondern auch die Wildtypvariante überprüft inklusive Positiv- und Negativkontrollen.

Um bei der IL-10-Mutation einen 1000 Basenpaare (bp) messenden Genabschnitt zu amplifizieren wurden folgende Primer benutzt: IL-10 L (forward), IL-10 R (reverse) und IL-10 neo r (reverse). Bei den NOD2-Mutationen wurden für die Wildtypvariante die Primer wt1NOD2-f (forward) und wt2NOD2-r (reverse) verwendet um einen 370 pb umfassenden Genabschnitt zu vervielfältigen, bei den NOD2-Knockouts wurden die Primer mut-f NOD2 (forward) und mut-r NOD2 (reverse) genutzt um einen 1000 bp langen Genabschnitt zu amplifizieren. Anschließend wurde jeweils ein Mix aus 1µl Proben-DNA, 25µl jeden Primers, 2,5µl MgCl₂, 0,25µl BSA, 0,5µl Nukleotide, 0,25µl Taq-Polymerase, 2,5µl zehnfacher Puffer und 17,5µl Aqua dest. hergestellt.

In Tabelle 2.14 werden die PCR-Bedingungen für den Nachweis der IL-10- bzw. NOD2-Mutation beschrieben.

Tabelle 2.14: Reaktionsbedingungen der Genotypisierungs-PCR

	IL10	NOD2
Initiale Denaturierung	5 min; 95 °C	3 min; 94 °C
Denaturierung	45 sek; 95 °C	30 sek; 94 °C
Annealing	45 sek; 63 °C	1 min; 66 °C
Elongation	1 min; 72 °C	1 min; 72 °C
Finale Strangverlängerung	5 min; 72 °C	2 min; 72 °C
Zyklenanzahl	40 x	35 x

2.7.3 Abschließende Auswertung

Um die PCR-Produkte durch eine Gelelektrophorese aufzutrennen, wurde ein 2%-iges Agarose-Gel hergestellt. Zum Nachweise der DNA 1µl (1%) Ethidiumbromidlösung dem Gel zugesetzt. Zur Vergleichbarkeit der Größe der Reaktionsprodukte wurde 100-bp-Ladder benutzt. Zur Auftrennung wurde eine Spannung von 120 Volt für 45 Minuten angelegt. Da sich das verwendete Ethidiumbromid in die DNA einlagert, wurden die PCR-Produkte als Banden im UV-Licht sichtbar und fotografisch dokumentiert.

2.8 Statistische Analysen und Software

Graphische Darstellungen erfolgten mit dem Programm GraphPad Prism 5.0a (GraphPad Software, LaJolla, USA). Für die Auswertung der ELISAs wurde das Programm Magellan 3.3 (Tecan Austria Gesellschaft, Grödig, Österreich) verwendet. Die Analyse der LightCycler-Ergebnisse wurde mit Hilfe des Programms Relquant 1.0 (Roche Molecular Biochemicals, Basel, Schweiz) durchgeführt.

Dargestellt ist immer der Median. Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Signifikanzniveaus wurden in drei Stufen eingetragen ($p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,005$).

3 Ergebnisse

3.1 Geringer Einfluss von NOD2 bei gnotobiotischen, infizierten WT- und NOD2^{-/-}-Tieren

Gnotobiotische Mäuse, bei denen durch eine mehrwöchige Antibiose im Trinkwasser die kommensale Darmflora entfernt wurde, wiesen im Gegensatz zu normal besiedelten Tieren keine Kolonisationsresistenz gegen *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) mehr auf. Wie bereits erwähnt, aktiviert NOD2 durch die Bindung von MDP den Transkriptionsfaktor NFκB, der wiederum die Expression proinflammatorischer Zytokine initiiert und verstärkt.

Um die mögliche Funktion von NOD2 bei der Immunpathologie der *Campylobacter*-Kolitis zu untersuchen, wurden gnotobiotische WT- und NOD2^{-/-}-Tiere mit dem Stamm *C. jejuni* 81-176 infiziert. Dafür wurden die beiden Tiergruppen an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit jeweils 0,3 ml der Infektionssuspension per Gavage infiziert. Die Konzentration der Infektionssuspension betrug 10⁹ KBE *C. jejuni* 81-176/ ml steriles PBS im Median.

3.1.1 Infektion mit *C. jejuni* führte zu verringerter NOD2-Expression im Kolongewebe

NOD2 ist ein intrazellulärer Rezeptor für Muramyl-dipeptid (MDP). Die Expression des NOD2-Gens betrug bei naiven WT-Tieren das 3,22 - fache des kleinsten Wertes im Median. Durch die Infektion mit *C. jejuni* verringerte sich dieser Wert sechs Tage nach der letzten Infektion signifikant auf das 1,51 - fache des kleinsten Wertes im Median. Das entsprach einem Rückgang der Transkriptionsrate auf 46,9 % des Ausgangswertes ($p < 0,005$) [Abb. 3.1].

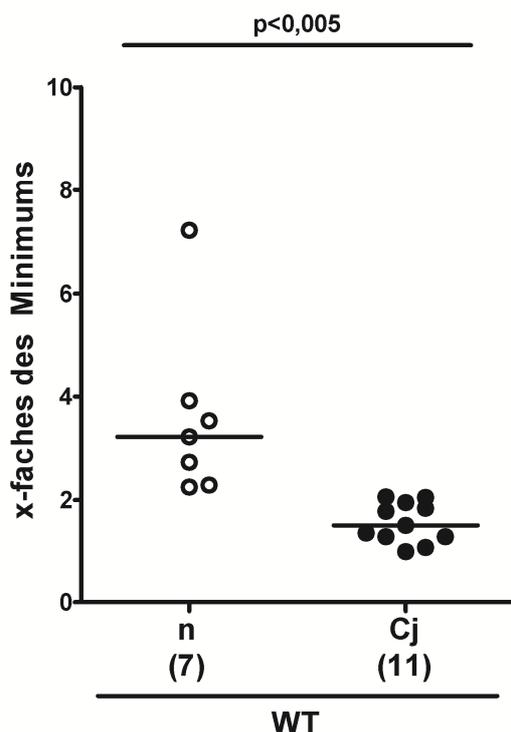


Abb. 3.1: NOD2-Expression im Kolon von gnotobiotischer WT-Tiere. Dargestellt ist die Expression des NOD2-Gens bei gnotobiotischen WT-Tieren als ein Vielfaches des kleinsten Wertes im Kolon am sechsten Tag nach der letzten Infektion mit *C. jejuni* 81-176. Offene Symbole stehen für naive (n), geschlossene Symbole für infizierte (Cj) Tiere. Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern unterhalb der Tiergruppen angegeben. Balken symbolisieren den Median.

Damit führte die Infektion mit *C. jejuni* 81-176 zu einer Hemmung der Transkription des NOD2-Gens im Kolongewebe. Das weist darauf hin, dass eine Funktion des NOD2-Signalweges bei der *Campylobacter*-Kolitis schon durch die Infektion selber vermindert wird.

3.1.2 Stabile Kolonisation von *C. jejuni* im Darm von WT- und NOD2^{-/-}-Tieren

Da NOD2 als intrazellulärer Rezeptor auch die Antwort des angeborenen Immunsystems gegen Bakterien beeinflusst, wurde das Kolonisationsverhalten von *C. jejuni* 81-176 untersucht. Dafür wurde an definierten Zeitpunkten nach der Infektion die *C. jejuni*-Konzentration in den Faeces der infizierten WT- und NOD2^{-/-}-Tiere erfasst.

Im gesamten Experimentverlauf konnte eine Besiedelung mit *C. jejuni* 81-176 bei allen untersuchten Tieren nachgewiesen werden. Das entsprach einer Kolonisationskapazität von 100 %.

Am ersten Tag nach der letzten Infektion wiesen die WT-Tiere eine *C. jejuni* 81-176-Konzentration von 10⁷ KBE/g Faeces im Median auf. Die NOD2^{-/-}-Tiere waren dagegen mit 10⁸ KBE/g Faeces im Median besiedelt. So führte das Fehlen des NOD2-Gens zu einer höheren Konzentration von *C. jejuni* im Faeces am ersten Tag nach der letzten Infektion ($p < 0,05$).

Allerdings war die Bakterienkonzentration sechs Tage nach der letzten Infektion bei beiden Tiergruppen auf 10⁹ KBE/g Faeces im Median gestiegen und damit signifikant höher als am ersten Tag nach der letzten Infektion ($p < 0,05 - 0,005$). Zwischen den WT- und NOD2^{-/-}-Tieren bestand am sechsten Tage nach der letzten Infektion kein messbarer Unterschied mehr [Abb. 3.2].

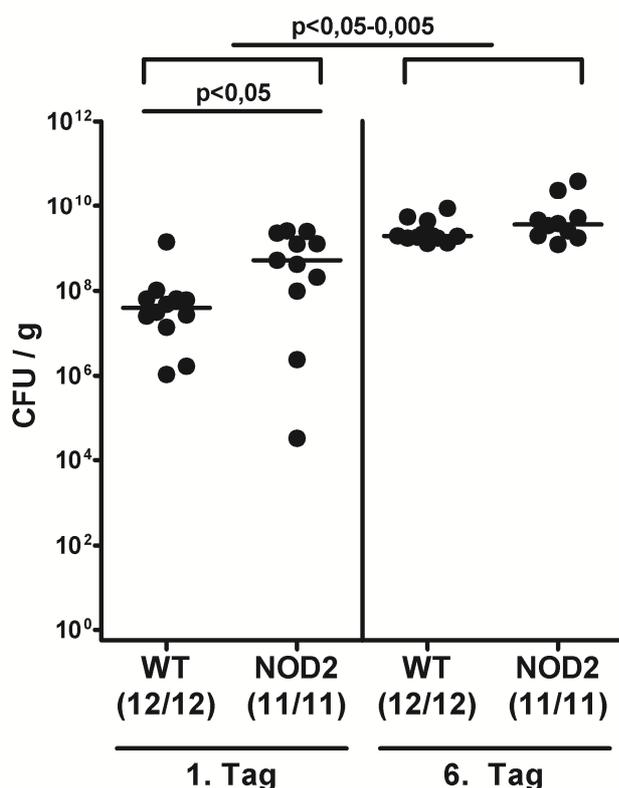


Abb. 3.2: Kolonisationsverhalten von *C. jejuni* 81-176 bei gnotobiotischen WT- und NOD2^{-/-}-Tieren im Verlauf. Dargestellt ist die Kinetik der *C. jejuni* 81-176-Konzentration im Faeces am ersten und sechsten Tag nach der letzten Infektion mit *C. jejuni* 81-176 bezogen auf 1 Gramm Faeces von gnotobiotischen WT und NOD2^{-/-}-Tieren. Die Anzahl der jeweils besiedelten und insgesamt untersuchten Tiere ist in Klammern unterhalb der Tiergruppen angegeben. Balken symbolisieren den Median.

Diese Daten zeigen, dass die Konzentration von *C. jejuni* in den Faeces im Verlauf des Experiments signifikant bei beiden Tiergruppen angestiegen war. Die biologische Relevanz dieses Unterschiedes ist jedoch fraglich, da aus anderen Experimenten dieser Art bereits bekannt ist, dass Schwankungen von 1-2 log KBE/g Faeces von Experiment zu Experiment möglich sind.

3.1.3 NOD2 beeinflusste nicht den klinischen Zustand der Tiere nach der Infektion

Um die Auswirkungen der Infektion mit *C. jejuni* 81-176 auf den Krankheitszustand der Mäuse zu erkennen wurden beide Tiergruppen täglich beobachtet und die Ergebnisse mit einem „Klinischen Score“ standardisiert. Naive WT- und NOD2^{-/-}-Tiere wiesen mit einem Score von 0 im Median keinerlei Krankheitszeichen auf. Durch die Infektion mit *C. jejuni* stiegen die Werte im „Klinischen Score“ bei beiden Tiergruppen sechs Tage nach der letzten Infektion auf einen Score von 1 im Median an ($p < 0,05 - 0,01$) [Abb. 3.3].

Ein sicheres Zeichen für eine Entzündung des Kolons ist der Nachweis von okkultem Blut in den Faeces der Tiere mittels Guajak-Test. Mäuse aus beiden Tiergruppen wiesen sehr vereinzelt (max. ein Tier pro Untersuchungszeitpunkt) einen positiven Nachweis auf okkultes Blut in den Faeces auf. Diese Befunde hatten jedoch keinerlei statistische Relevanz [Daten nicht dargestellt]. Eine Verkürzung der Darmlänge ist ein Zeichen für eine Entzündung des betroffenen Darmabschnittes. Die WT-Tiere wiesen durch die Infektion mit *C. jejuni* keine Verkürzung der Dünndarmlänge mit 44,35 (vor der Infektion) und 44,65 cm im Median (nach der Infektion) auf. Allerdings führte die Infektion bei den NOD2^{-/-}-Tieren zu einer signifikanten Verkürzung des Dünndarms von 43,30 auf 40,60 cm im Median ($p < 0,05 - 0,005$) [Abb. 3.3].

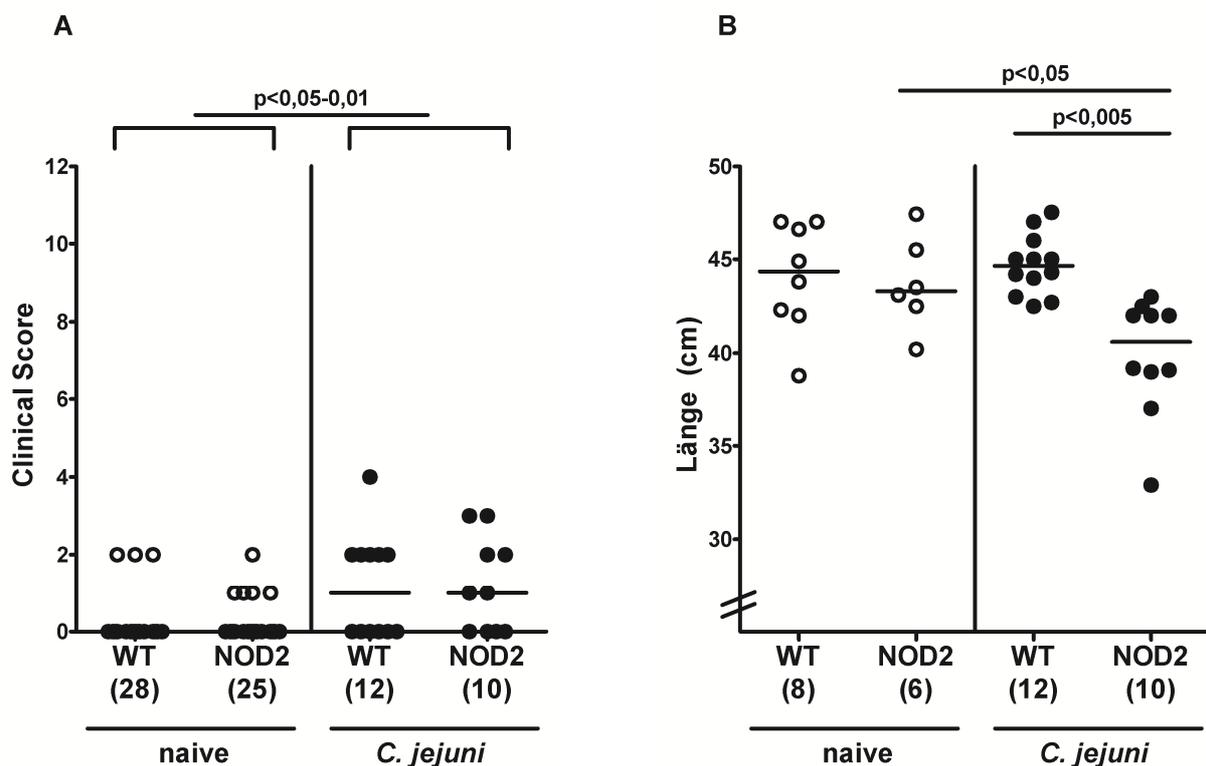


Abb. 3.3: „Klinischer Score“ (A) sowie Dünndarmlängen (B) von gnotobiotischen WT- und NOD2^{-/-}-Tieren. Dargestellt ist in (A) der „Klinische Score“ der gnotobiotischen WT- und NOD2^{-/-}-Tiere vor der ersten und am sechsten Tag nach der letzten Infektion mit *C. jejuni* 81-176. Die Dünndarmlängen in Zentimetern derselben Genotypen sind am sechsten Tag nach der letzten Infektion in (B) abgebildet. Offene Symbole stehen für naive, geschlossene Symbole für infizierte Tiere. Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern unterhalb der Tiergruppen angegeben. Balken symbolisieren den Median.

Auf die Länge des Dickdarms hatte die Infektion bei keiner der beiden Tiergruppen einen Einfluss [Daten nicht dargestellt].

Die erhobenen Daten zeigen eine geringe Verschlechterung des klinischen Zustandes der WT- und NOD2^{-/-}-Tiere durch die Infektion mit *C. jejuni*. Die Tiere wiesen aber keine Zeichen einer ernstesten Entzündung, wie verstärktes Auftreten von okkultem Blut im Faeces oder eine Verkürzung des Kolons auf. NOD2 hatte keinen Einfluss auf den klinischen Zustand.

3.1.4 Leichte entzündliche Veränderungen des Kolongewebes der infizierten Tiere

3.1.4.1 Verschlechterung der Histopathologie des Kolons durch die Infektion

Die Infektion mit *C. jejuni* führte zu einer geringfügigen Verschlechterung des klinischen Zustandes der Tiere. Dabei konnte kein Einfluss durch den Genotyp der Tiere festgestellt werden. Um eine mögliche Korrelation zu diesen makroskopischen Veränderungen auf mikroskopischer Ebene festzustellen, wurde das Kolon nach der Infektion mit *C. jejuni* 81-176 mikroskopisch beurteilt. Dazu wurden HE-gefärbte Schnittpräparate des Kolons von naiven und infizierten WT- und NOD2^{-/-}-Tieren mit dem „OVA-Colitis-Score“ bewertet.

Das Kolon der naiven gnotobiotischen WT- und NOD2^{-/-}-Tiere wies einen Score von 0, beziehungsweise 0,25, im Median auf. Bei den mit *C. jejuni* infizierten Tieren war eine verstärkte Immunezellinfiltration und beginnender Verlust an Becherzellen zu finden. So führte die Infektion zu einer Verschlechterung des histopathologischen Scores auf einen Wert von 1,13 im Median bei beiden Tiergruppen (WT und NOD2^{-/-}). Allerdings war diese geringfügige Verstärkung der Histopathologie durch *C. jejuni* nur bei den WT-Tieren signifikant ($p < 0,005$) [Abb. 3.4].

Die Ergebnisse zeigen, dass die Infektion mit *C. jejuni* zu einer Histopathologie des Kolons führte, eine NOD2-Abhängigkeit konnte dabei aber nicht festgestellt werden.

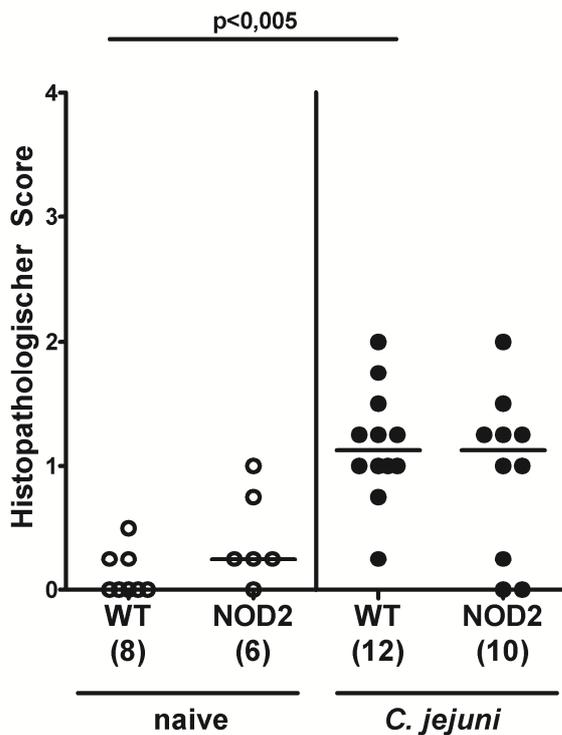


Abb. 3.4: Histopathologie des Kolons von gnotobiotischen WT- und NOD2^{-/-}-Tieren. Dargestellt ist der „OVA-Colitis-Score“ des Kolons der gnotobiotischen WT- und NOD2^{-/-}-Tiere am sechsten Tag nach der letzten Infektion mit *C. jejuni* 81-176. Offene Symbole stehen für naive, geschlossene Symbole für infizierte Tiere. Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern unterhalb der Tiergruppen angegeben. Balken symbolisieren den Median.

3.1.4.2 Erhöhter Zellumsatz bei NOD2-Defizienz im Kolongewebe infizierter Tiere

Da die Infektion mit *C. jejuni* 81-176 nur eine geringe Verschlechterung des histologischen Zustandes des Kolons hervorrief, wurde anschließend das Kolongewebe mittels Immunhistochemie auf infektionsbedingte Veränderungen hin untersucht. Dafür wurden Schnittpräparate des Kolons der infizierten Tiere mit Antikörpern gegen Marker für Proliferation (TEC3) und Apoptose (Caspase 3) gefärbt und quantitativ ausgewertet.

Die NOD2-Defizienz führte zu einer leicht erhöhten Zahl proliferativer Zellen im Kolongewebe mit 202,29 TEC3 - positiven (pos.) Zelle n/ High - Power - Field (HPF = Gesichtsfeld) im Vergleich zu 186,88 TEC3 - pos. Zellen / HFP im Median bei Tieren mit intaktem NOD2-Gen ($p < 0,05$).

Post infectionem wiesen die WT-Tiere mit 7,12 Caspase 3 - pos. Zellen / HPF weniger apoptotische Zellen als die NOD2^{-/-}-Tiere mit 9,54 Caspase 3 - pos. Zellen / HPF im Median auf ($p < 0,05$) [Abb. 3.5].

Die Daten zeigen, dass NOD2 *post infectionem* Apoptose steuernde Signalwege, aber auch proliferative Vorgänge beeinflusste.

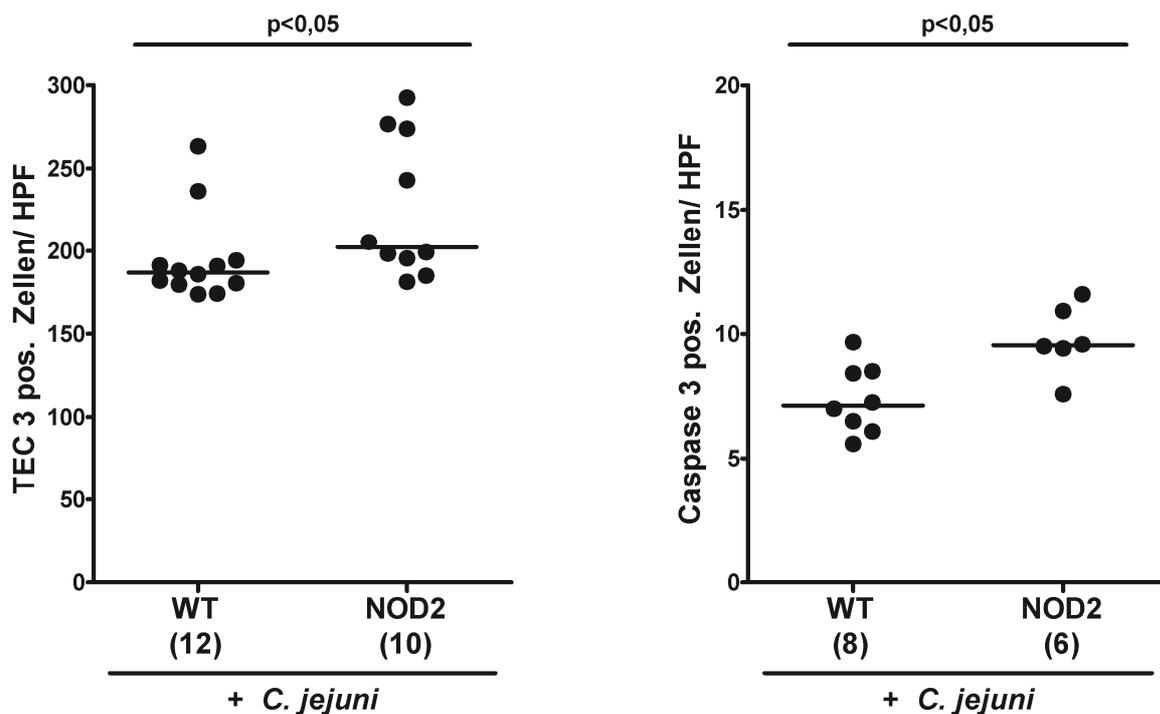


Abb. 3.5: TEC3-positive, proliferative und Caspase 3-positive, apoptotische Zellen im Kolon von gnotobiotischen WT- und NOD2^{-/-}-Tieren. Dargestellt ist die Anzahl TEC3-positiver, proliferativer und Caspase 3-positiver, apoptotischer Zellen je Gesichtsfeld im Kolon der gnotobiotischen WT- und NOD2^{-/-}-Tiere am sechsten Tag nach der letzten Infektion mit *C. jejuni* 81-176. Geschlossene Symbole stehen für infizierte Tiere. Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern unterhalb der Tiergruppen angegeben. Balken symbolisieren den Median.

3.1.5 NOD2 regulierte die proinflammatorische Antwort gegen *C. jejuni*

Um einen Einfluss von NOD2 auf das angeborene Immunsystems bei der Antwort gegen *C. jejuni* zu analysieren, wurden Zellen des angeborenen Immunsystems im Kolon mittels Immunhistochemie *in situ* dargestellt. Außerdem wurde die Expression und Sekretion von Zytokinen des angeborenen Immunsystems im Kolon, in den mesenterialen Lymphknoten (mLN) als regionales Immunorgan und in der Milz als systemisches Immunorgan gemessen.

3.1.5.1 NOD2-Defizienz führte zu erhöhter Makrophagenzahl im Kolon infizierter Tiere

Schnittpräparate des Kolons von mit *C. jejuni* 81-176 infizierten WT- und NOD2^{-/-}-Tieren wurden mit Antikörpern gegen MPO7 für Granulozyten und F4/80 für Monozyten und Makrophagen gefärbt und via Mikroskop ausgewertet.

Mit *C. jejuni* infizierte WT-Tiere wiesen mit 20,58 F4/80 - pos. Zellen / HPF signifikant weniger Makrophagen und Monozyten *in situ* im Kolon auf als NOD2^{-/-}-Tiere mit 26,50 F4/80 - pos. Zellen / HPF im Median ($p < 0,01$) [Abb. 3.6].

Mit *C. jejuni* 81-176 infizierte WT- und NOD2^{-/-}-Tiere wiesen keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Anzahl an neutrophilen Granulozyten (MPO7-pos. Zellen) mit 3,58 (respektive 4,5) MPO7 - pos. Zellen / HPF im Median im Kolon auf [Daten nicht dargestellt].

NOD2 hemmte also die Infiltration des Kolongewebes mit Makrophagen und Monozyten nach der Infektion mit *C. jejuni*. Auf die Infiltration neutrophiler Granulozyten ins Kolon infizierter Tiere hatte NOD2 dagegen keinen Einfluss.

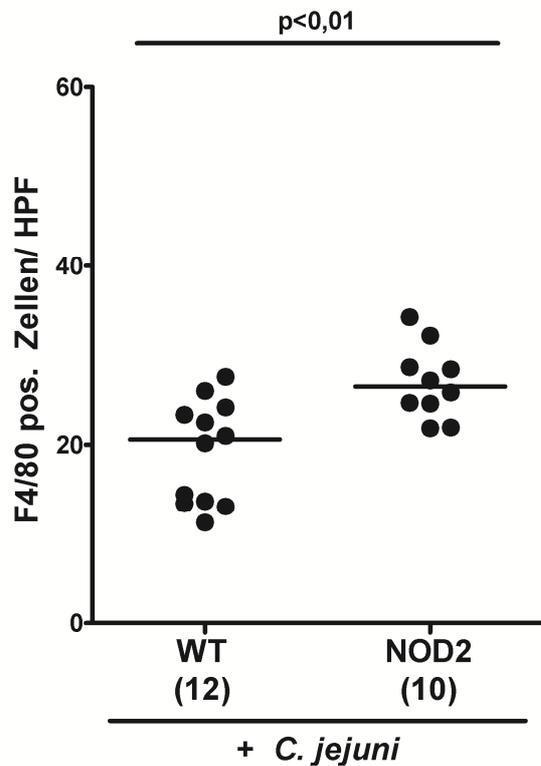


Abb. 3.6: F4/80-positive Makrophagen und Monozyten im Kolon von gnotobiotischen WT- und NOD2^{-/-}-Tieren. Dargestellt ist die Anzahl F4/80-positiver Makrophagen und Monozyten je Gesichtsfeld im Kolon der gnotobiotischen WT- und NOD2^{-/-}-Tiere am sechsten Tag nach der letzten Infektion mit *C. jejuni* 81-176. Geschlossene Symbole stehen für infizierte Tiere. Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern unterhalb der Tiergruppen angegeben. Balken symbolisieren den Median.

3.1.5.2 NOD2-Defizienz führte zu verringerter Muc-2-, IL-23- und IL-18-Expression

Es wurde nun untersucht, ob NOD2 die Transkription bestimmter Zytokine des angeborenen Immunsystems beeinflusste.

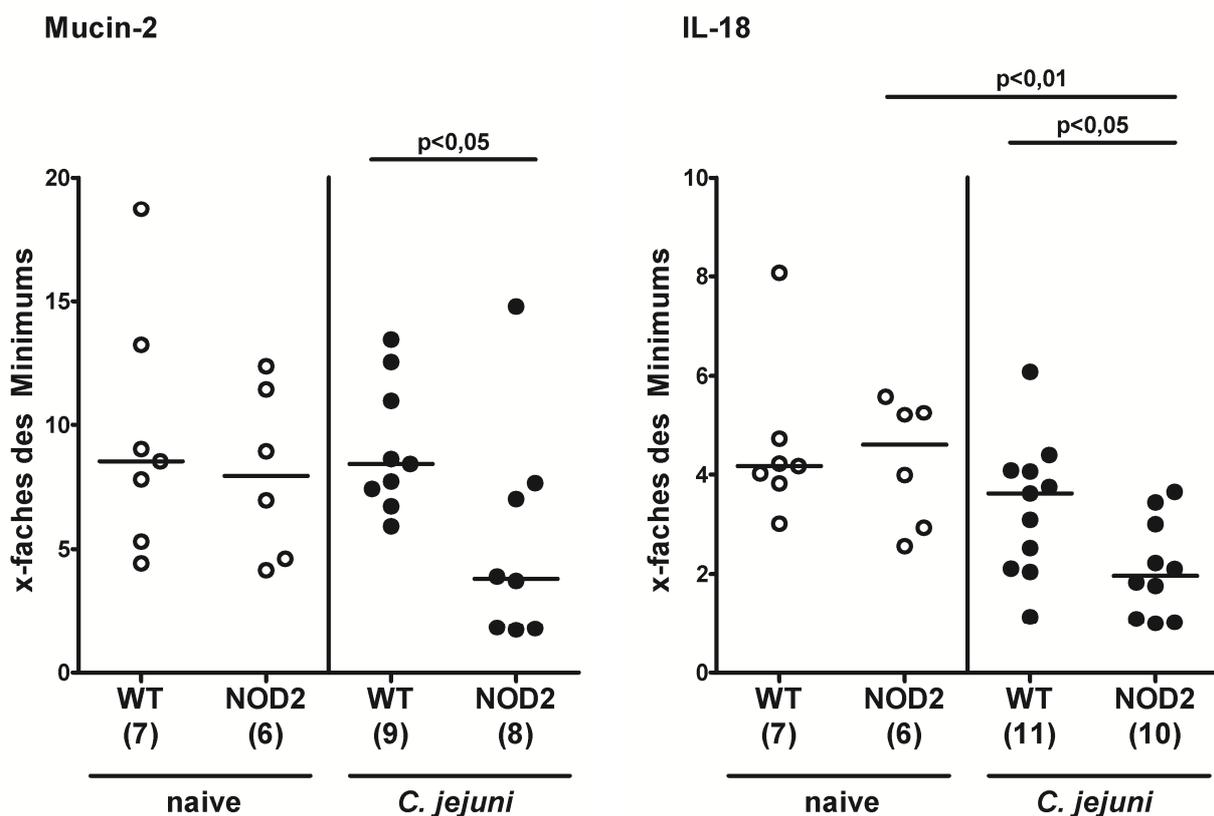
Die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , welches Proliferation und Apoptose beeinflusst, und IL-1- β , welches durch das Inflammasom in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten produziert wird, werden unter anderem von Makrophagen sezerniert. Die Infektion mit *C. jejuni* führte bei beiden Tiergruppen (WT und NOD2^{-/-}) im Kolongewebe zu einem Anstieg der Genexpression sowohl von TNF- α als auch von IL-1- β ($p < 0,005$). Zwischen den Genotypen waren allerdings keine Unterschiede vorhanden [Daten nicht dargestellt].

Mucin-2 ist ein Vertreter der Mucine. Diese schützen das Epithel vor den mikrobiellen Pathogenen im Darmlumen und werden von Becherzellen sezerniert. NOD2-Defizienz führte bei mit *C. jejuni* infizierten Tieren zu einer signifikanten Senkung der Genexpression von Mucin-2 im Kolon im Vergleich zu Tieren mit intaktem NOD2-Gen ($p < 0,05$).

IL-18 gehört zur IL-1-Superfamilie und wird ebenfalls vom Inflammasom reguliert. Die Infektion mit *C. jejuni* führte zu einer Senkung der Transkription von IL-18 im Kolon von infizierten NOD2^{-/-}-Tieren – im Vergleich sowohl zu naiven NOD2^{-/-}-Tieren als auch zu infizierten WT-Tieren ($p < 0,05 - 0,01$).

IL-23p19 soll die Bildung von IL-22 in Th17-Zellen induzieren. Durch die Infektion mit *C. jejuni* erfolgte bei beiden Tiergruppen eine signifikante Verminderung der Transkription von IL-23p19 im Kolon ($p < 0,05 - 0,005$). Diese Verminderung war bei einer NOD2-Defizienz der infizierten Tiere stärker ausgeprägt ($p < 0,05$) [Abb. 3.7].

Die Daten zeigen, dass die Infektion mit *C. jejuni* zu einer Steigerung der Transkription der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1- β führte. Darauf hatte NOD2 keinen Einfluss. Die NOD2-Defizienz führte infolge der Infektion zu einer Hemmung der Transkription des schützenden Muc-2 sowie der Interleukine IL-23p19 und IL-18 im Kolongewebe.



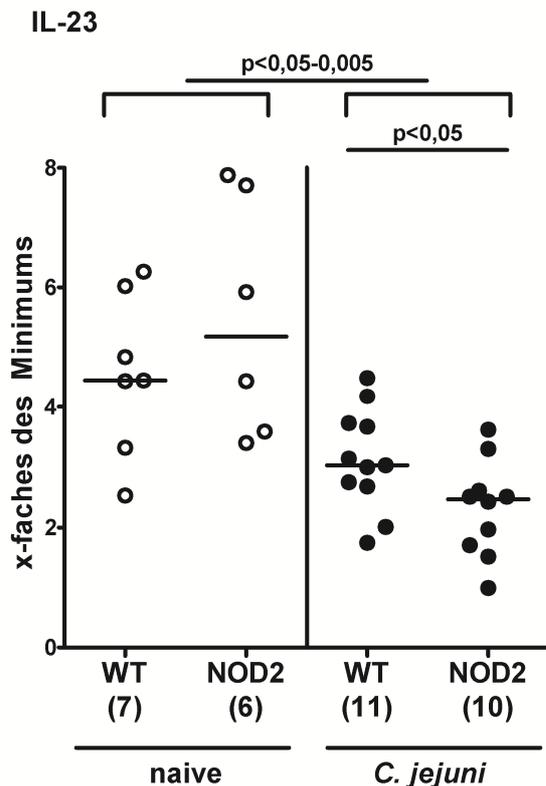


Abb. 3.7: Mucin-2-, IL-18- und IL-23p19-Expression im Kolon von gnotobiotischen WT- und NOD2^{-/-}-Tieren. Dargestellt ist die Expression des Mucin-2-, IL-18- und IL-23-Gens im Kolon der gnotobiotischen WT- und NOD2^{-/-}-Tiere als ein Vielfaches des kleinsten Wertes am sechsten Tag nach der letzten Infektion mit *C. jejuni* 81-176. Offene Symbole stehen für naive, geschlossene Symbole für infizierte Tiere. Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern unterhalb der Tiergruppe angegeben. Balken symbolisieren den Median.

3.1.5.3 NOD2-Defizienz mit erhöhter Zytokinproduktion verbunden

Nachdem ein Einfluss von NOD2 auf die Transkription von Zytokinen des angeborenen Immunsystems gezeigt wurde, stellte sich nun die Frage, ob sich dieser Befund auch in der Sekretion widerspiegelte. Es wurden Proteinkonzentrationen in Organkultur-Überständen von Kolon, mesenterialen Lymphknoten und Milz von naiven sowie von mit *C. jejuni* 81-176 infizierten gnotobiotischen WT- und NOD2^{-/-}-Tieren gemessen.

MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1) und IL-6 wirken beide proinflammatorisch. Die Infektion mit *C. jejuni* führte zu einer deutlichen Steigerung der Proteinkonzentration von MCP-1 bei den WT-Tieren von 3,79 auf 12,65 pg / mg Organgewicht und bei den NOD2^{-/-}-Tieren von 5,00 auf 25,99 pg / mg Organgewicht im Median im Kolon ($p < 0,05$).

Durch die Infektion mit *C. jejuni* stieg die Konzentration von IL-6 von 9,53 auf 18,33 pg / mg Organgewicht bei den WT-Tieren und von 3,88 auf 22,22 pg / mg Organgewicht im Median bei den NOD2^{-/-}-Tieren im Kolonüberstand ($p < 0,05$).

Die Infektion mit *C. jejuni* rief auch einen Anstieg des proinflammatorischen Zytokins TNF- α von 0,16 auf 1,30 pg / mg Organgewicht bei WT-Tieren und von 0,14 auf 1,37 pg / mg Organgewicht im Median bei den NOD2^{-/-}-Tieren im Kolon hervor ($p < 0,005$). Der Unterschied zwischen den Tieren mit oder ohne intaktes NOD2-Gen war nicht signifikant [Daten nicht dargestellt].

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein Marker für zellulären Stress. Die Messung der NO-Konzentration im Organkulturüberstand des Kolons sechs Tage nach der letzten Infektion mit *C. jejuni* zeigte eine signifikante Steigerung der NO-Konzentration von 7,11 auf 13,22 pg / mg Organgewicht im Median im Kolon der WT-Tiere ($p < 0,005$). Bei den NOD2^{-/-}-Tieren verursachte die Infektion einen Anstieg der NO-Konzentration von 8,20 auf 18,01 pg / mg Organgewicht im Median ($p < 0,005$). Der Unterschied zwischen den infizierten WT- und NOD2^{-/-}-Tieren war signifikant ($p < 0,005$).

Das antiinflammatorische Zytokin IL-10 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Homöostase zwischen Darmflora und dem Immunsystem des Darms. Mit *C. jejuni* infizierte WT-Tiere wiesen eine Induktion der IL-10-Sekretion von 0,00 auf 0,52 pg / mg Organgewicht und bei den NOD2^{-/-}-Tieren von 0,00 auf 1,26 pg / mg Organgewicht im Median im Kolon auf ($p < 0,005$). Die Zunahme von IL-10 war bei den NOD2^{-/-}-Tieren signifikant größer als bei den WT-Tieren ($p < 0,01$) [Abb. 3.8].

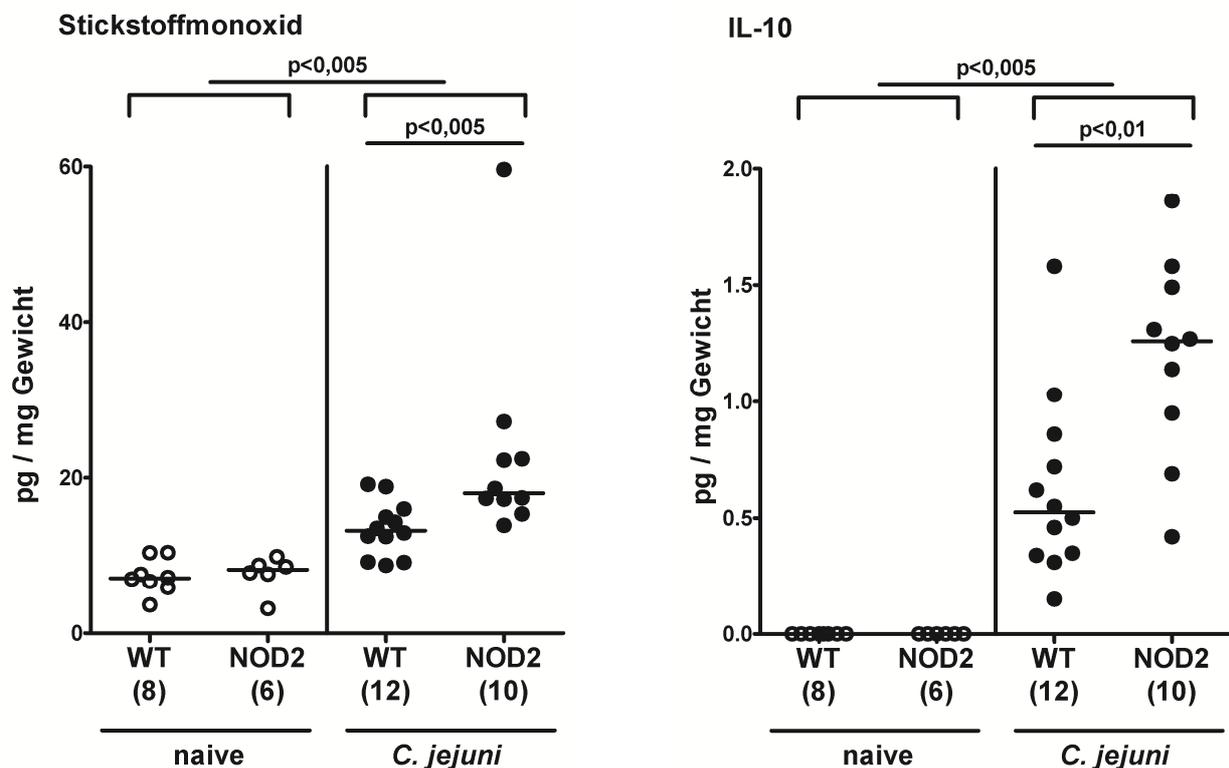


Abb. 3.8: Stickstoffmonoxid- und IL-10-Proteinkonzentrationen im Kolon von gnotobiotischen WT- und NOD2^{-/-}-Tieren. Dargestellt ist die Stickstoffmonoxid- und die IL-10-Proteinkonzentration im Kolon von gnotobiotischen WT- und NOD2^{-/-}-Tieren bezogen auf das Organgewicht am sechsten Tag nach der letzten Infektion mit *C. jejuni* 81-176. Offene Symbole stehen für naive, geschlossene Symbole für infizierte Tiere. Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern unterhalb der Tiergruppen angegeben. Balken symbolisieren den Median.

In den mLN konnten ebenfalls Folgen durch die Infektion mit *C. jejuni* 81-176 gemessen werden. Dabei führte die Infektion nur bei den NOD2^{-/-}-Tiere zu einem Anstieg der TNF-a-

Konzentration von 0,00 auf 13,70 pg / mg Gesamtprotein im Median ($p < 0,05$). Bei den WT-Tieren verblieb die TNF-a-Konzentration mit 1,20 (naiver Zustand) bzw. 0,00 (infizierter Zustand) pg / mg Gesamtprotein gleichbleibend auf einem niedrigen Niveau in den mLN. Damit war der TNF-a-Konzentrationsanstieg der infizierten NOD2^{-/-}-Tiere auch im Verhältnis zu den infizierten WT-Tieren signifikant höher ($p < 0,05$).

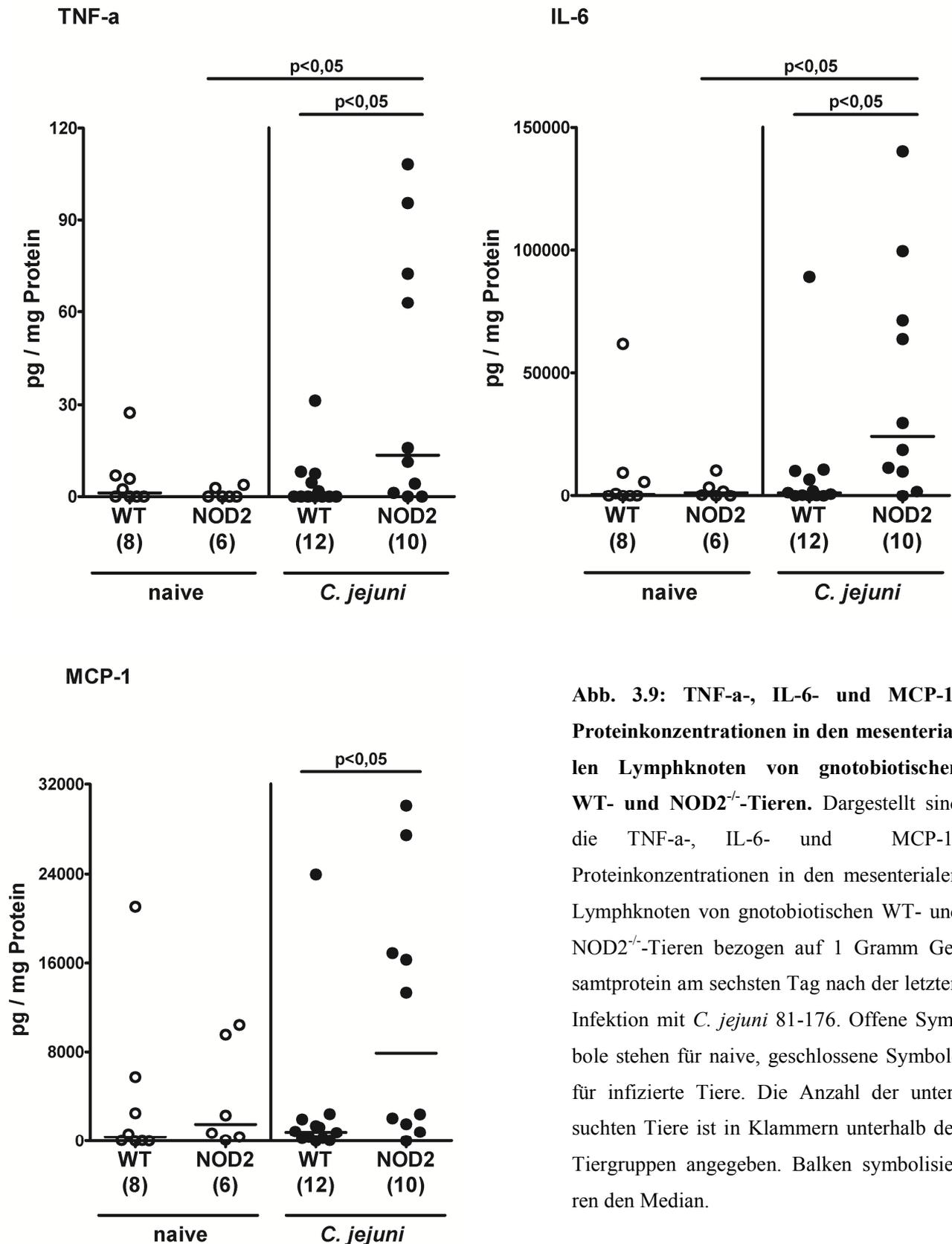


Abb. 3.9: TNF-a-, IL-6- und MCP-1-Proteinkonzentrationen in den mesenterialen Lymphknoten von gnotobiotischen WT- und NOD2^{-/-}-Tieren. Dargestellt sind die TNF-a-, IL-6- und MCP-1-Proteinkonzentrationen in den mesenterialen Lymphknoten von gnotobiotischen WT- und NOD2^{-/-}-Tieren bezogen auf 1 Gramm Gesamtprotein am sechsten Tag nach der letzten Infektion mit *C. jejuni* 81-176. Offene Symbole stehen für naive, geschlossene Symbole für infizierte Tiere. Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern unterhalb der Tiergruppen angegeben. Balken symbolisieren den Median.

Die IL-6-Konzentration der mLN stieg bei den NOD2^{-/-}-Tieren durch die Infektion mit *C. jejuni* von 1.089,59 auf 36.914,18 pg / mg Gesamtprotein im Median an ($p < 0,05$). Auch war die IL-6-Konzentration bei den WT-Tieren auf konstant geringem Niveau mit 168,06 (naiver Zustand) und 1.026,75 (infizierter Zustand) pg / mg Gesamtprotein im Median und signifikant niedriger im Vergleich zu den infizierten NOD2^{-/-}-Tieren ($p < 0,05$).

MCP-1 wurde *post infectionem* bei den NOD2^{-/-}-Tieren mit 7.881,49 pg / mg Gesamtprotein im Median signifikant stärker sezerniert als von den WT-Tieren mit 786,04 pg / mg Gesamtprotein im Median in den mLN ($p < 0,05$) [Abb. 3.9].

In der Milz zeigte sich ein Einfluss von NOD2 auf die IL-6-Sekretion unabhängig vom Infektionszustand. Die NOD2-Defizienz führte zu einer erhöhten Proteinkonzentration mit 540,75 (naiv) respektive 378,68 (infiziert) pg / mg Organgewicht im Median bei den NOD2^{-/-}-Tieren im Vergleich zu WT-Tieren mit 123,10 (naiv) respektive 89,83 (infiziert) pg / mg Organgewicht im Median. Dieser Unterschied war nur bei den naiven Tieren signifikant ($p < 0,05$), nicht bei den infizierten Tieren ($p = 0,05$) [Abb. 3.10].

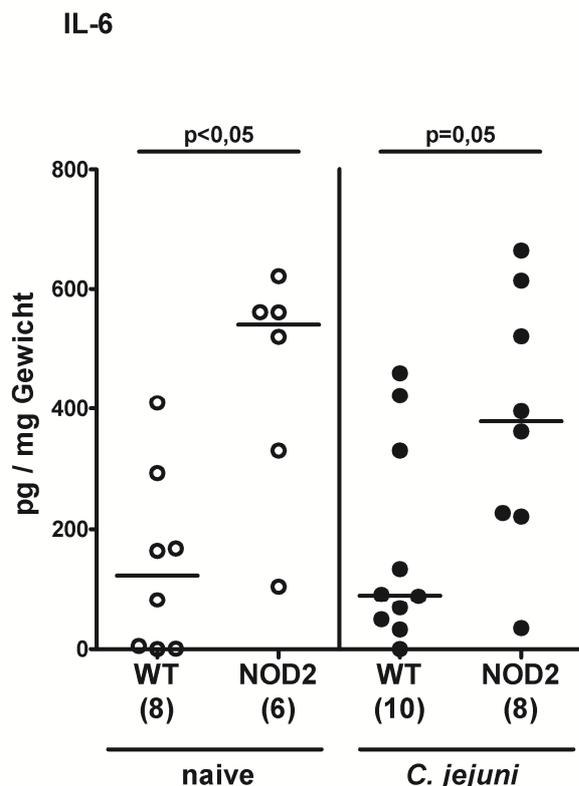


Abb. 3.10: IL-6-Proteinkonzentrationen in der Milz von gnotobiotischen WT- und NOD2^{-/-}-Tieren. Dargestellt ist IL-6-Proteinkonzentration in der Milz von gnotobiotischen WT- und NOD2^{-/-}-Tieren bezogen auf das Organgewicht am sechsten Tag nach der letzten Infektion mit *C. jejuni* 81-176. Offene Symbole stehen für naive, geschlossene Symbole für infizierte Tiere. Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern unterhalb der Tiergruppen angegeben. Balken symbolisieren den Median.

Die erhobenen Ergebnisse zeigen, dass die Infektion mit *C. jejuni* im Kolongewebe zu einem Anstieg der proinflammatorischen Zytokine MCP-1, IL-6 und TNF- α führte. NOD2 beeinflusste dies nicht. Dagegen hemmte NOD2 die Bildung des Entzündungsmarker NO und des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 im Kolongewebe.

In den mLN führte die Infektion nur bei NOD2-Defizienz zu einem Konzentrationsanstieg der Zytokine MCP-1, IL-6 und TNF- α . In der Milz führte die NOD2-Defizienz zu einer verstärkten Sekretion von IL-6, unabhängig vom Infektionszustand.

3.1.6 Geringer Einfluss von NOD2 auf das erworbene Immunsystem nach Infektion

Infektionen mit *C. jejuni* rufen im Organismus auch eine Antwort des erworbenen Immunsystems hervor, dabei sind die T-Helferzellen-Typ 1 (Th1) dominant. Da NOD2 die Th1-Antwort beeinflussen kann, wurde der Einfluss von NOD2 auf die Immunantwort gegen *C. jejuni* ebenfalls analysiert. Neben der immunhistochemischen Darstellung von T-Zellen sowie der Subpopulation der regulatorischen T-Zellen erfolgte die Messung von Transkription und Proteinsekretion der wichtigsten Effektorzytokine der T-Helferzellen im Kolon, in den mLN und in der Milz.

3.1.6.1 NOD2 beeinflusste die Rekrutierung von T-Zellen bei infizierten Tieren

T-Zellen und regulatorische T-Zellen sind anhand ihrer Oberflächenstrukturen (CD3 bei T-Zellen) bzw. Transkriptionsfaktoren (FoxP3 bei regulatorischen T-Zellen) darstellbar. Um einen ersten Überblick von der Antwort des erworbenen Immunsystems auf die Infektion mit *C. jejuni* 81-176 zu erhalten, wurden Schnittpräparate des Kolons immunhistochemisch gefärbt und quantitativ ausgewertet.

Es waren im Kolongewebe von WT-Tieren signifikant weniger T-Zellen mit 57,21 CD3 - pos. Zellen /HPF vorhanden als im Vergleich zu NOD2^{-/-}-Tieren mit 65,96 CD3 - pos. Zellen / HPF im Median ($p < 0,05$).

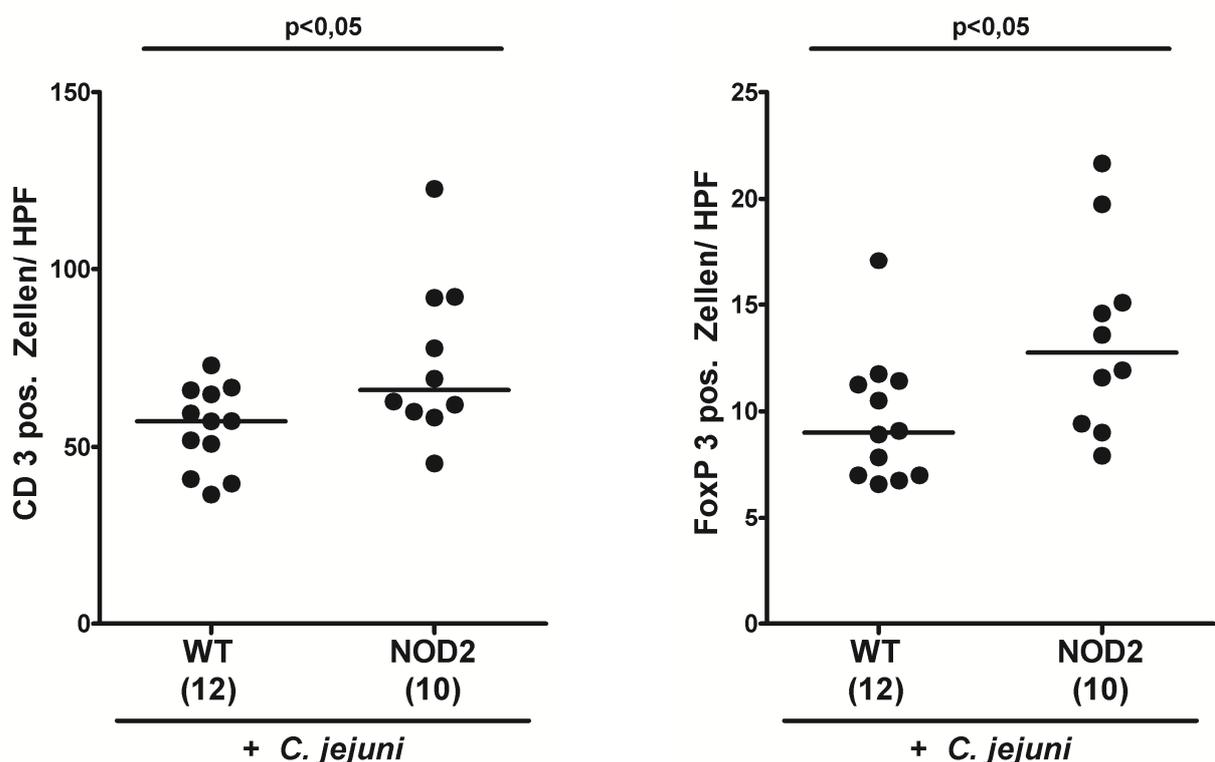


Abb. 3.11: CD3-positive T-Zellen und FoxP3-positive regulatorische T-Zellen im Kolon von gnotobiotischen WT- und NOD2^{-/-}-Tieren. Dargestellt ist die Anzahl CD3-positiver T-Zellen und FoxP3-positiver regulatorischer T-Zellen je Gesichtsfeld im Kolon der gnotobiotischen WT- und NOD2^{-/-}-Tiere am sechsten Tag nach der letzten Infektion mit *C. jejuni* 81-176. Geschlossene Symbole stehen für infizierte Tiere. Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern unterhalb der Tiergruppen angegeben. Balken symbolisieren den Median.

Genauso wiesen WT-Tiere mit 9,00 FoxP3 - pos. Zellen / HPF eine niedrigere Anzahl an regulatorischen T-Zellen im Kolongewebe auf als NOD2^{-/-}-Tieren mit 12,75 FoxP3 - pos. Zellen / HPF im Median ($p < 0,05$) [Abb. 3.11].

Die Daten zeigen, dass NOD2 die Gewebeeinfiltration durch T-Zellen negativ beeinflusste. Dabei beeinflusste NOD2 nicht nur die Gesamtheit der T-Zellen, sondern es konnte auch ein Einfluss auf die Subpopulation der regulatorischen T-Zellen gezeigt werden.

3.1.6.2 Tendenzieller Einfluss von NOD2 auf Th1-Zytokin IFN-g

Das wichtigste Th1-Effektorzytokin ist IFN-g. Die Transkription wurde im Kolon und die Proteinsekretion in Kolon, mLN und Milz gemessen.

Die Infektion mit *C. jejuni* 81-176 führte zu einer signifikanten Steigerung der Transkription des IFN-g-Gens im Kolon der infizierten Tiere ($p < 0,05 - 0,005$). Die NOD2^{-/-}-Tiere zeigten tendenziell eine stärkere Expression des IFN-g-Gens im Kolon im Vergleich zu den WT-Tieren, der Unterschied war aber nicht signifikant [Abb. 3.12].

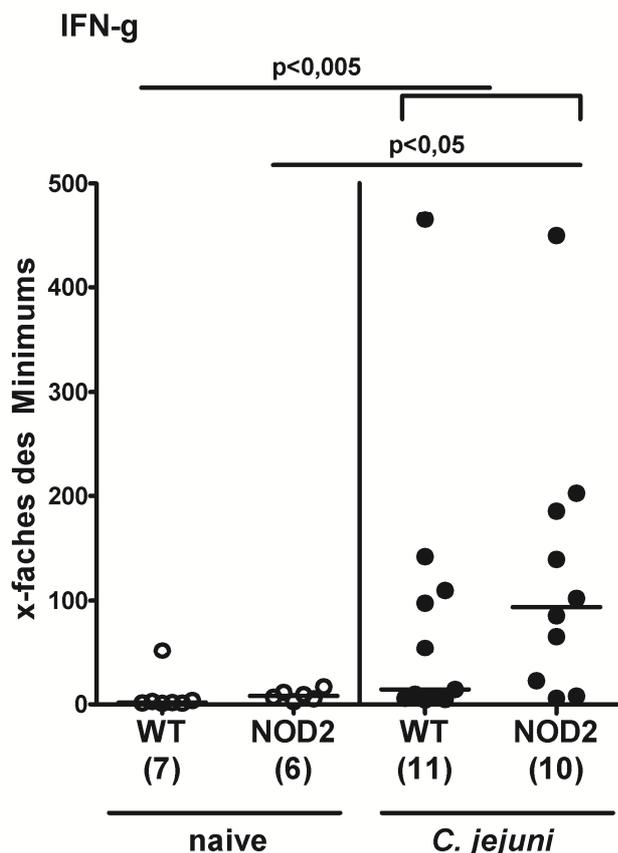


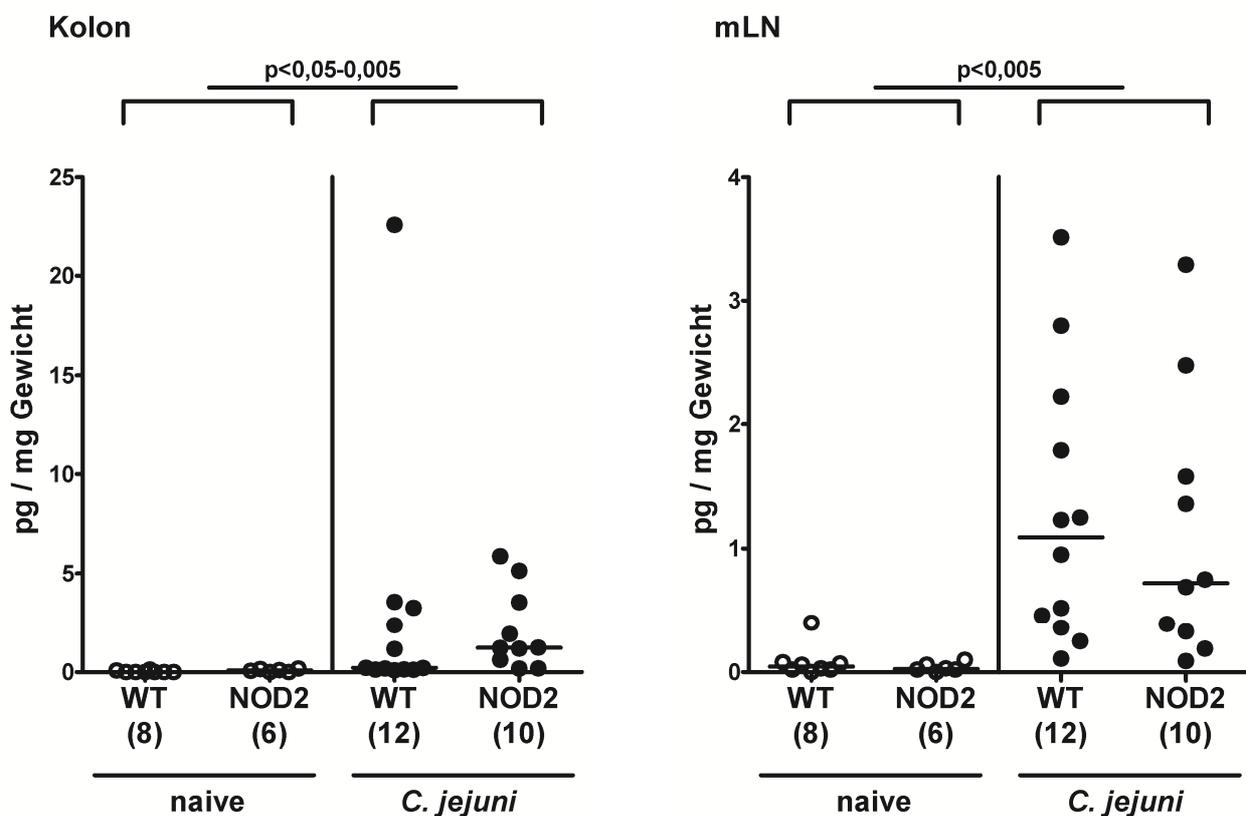
Abb. 3.12: IFN-g-Expression im Kolon von gnotobiotischen WT- und NOD2^{-/-}-Tieren. Dargestellt ist die Expression des IFN-g-Gens im Kolon der gnotobiotischen WT- und NOD2^{-/-}-Tiere als ein Vielfaches des kleinsten Wertes am sechsten Tag nach der letzten Infektion mit *C. jejuni* 81-176. Offene Symbole stehen für naive, geschlossene Symbole für infizierte Tiere. Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern unterhalb der Tiergruppe angegeben. Balken symbolisieren den Median.

Durch die Infektion mit *C. jejuni* stieg die Proteinkonzentration von IFN-g im Kolon bei den WT-Tieren von 0,00 auf 0,22 und bei den NOD2^{-/-}-Tieren von 0,08 auf 1,23 pg/ mg Organgewicht im Median signifikant an ($p < 0,05 - 0,005$). Zwischen den beiden Gruppen war der Unterschied nicht signifikant, auch wenn die NOD2^{-/-}-Tiere eine tendenziell höhere Proteinkonzentration von IFN-g zeigten.

In den mLNs bewirkte die Infektion mit *C. jejuni* ebenfalls einen signifikanten Anstieg der Proteinkonzentration von IFN-g bei den WT-Tieren von 0,04 auf 1,09 und bei den NOD2^{-/-}-Tieren von 0,02 auf 0,72 pg / mg Organgewicht im Median ($p < 0,005$). Auch hier war der Unterschied zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant.

In der Milz hatte die Infektion mit *C. jejuni* keine Auswirkungen auf die Proteinkonzentration von IFN-g, sie verharrte bei den WT-Tieren bei 0,77 (von 0,80) und bei den NOD2^{-/-}-Tieren bei 0,83 (von 0,53) pg / mg Organgewicht im Median [Abb. 3.13].

Die Daten zeigen, dass die Infektion mit *C. jejuni* einen Anstieg des IFN-g im Kolon als auch in den mLNs auslöste. Im Kolon zeigte sich eine Tendenz zu einer höheren Konzentration an IFN-g bei den NOD2^{-/-}-Tieren. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Infektion keine systemische Aktivierung des IFN-g auslöste, da in der Milz keine Veränderungen der IFN-g-Proteinkonzentration messbar waren.



Milz

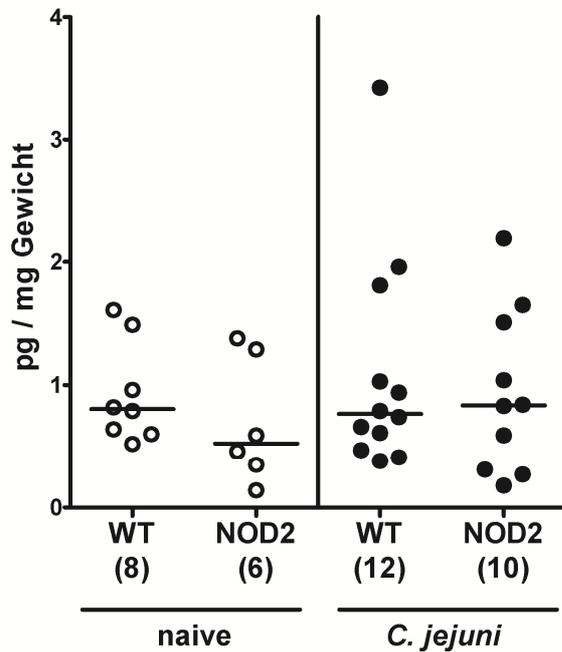


Abb. 3.13: IFN-g-Proteinkonzentrationen in Kolon, mLN und Milz von gnotobiotischen WT- und NOD2^{-/-}-Tieren. Dargestellt ist IFN-g-Proteinkonzentration in Kolon, mLN und Milz von gnotobiotischen WT- und NOD2^{-/-}-Tieren bezogen auf das Organgewicht am sechsten Tag nach der letzten Infektion mit *C. jejuni* 81-176. Offene Symbole stehen für naive, geschlossene Symbole für infizierte Tiere. Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern unterhalb der Tiergruppen angegeben. Balken symbolisieren den Median.

3.1.6.3 Kein Einfluss von NOD2 auf Th17-Zytokine

Da neben der Th1-Immunantwort auch die Th17-Immunantwort besonders im Darm eine wichtige Rolle bei der Immunantwort gegen Pathogene spielt, wurde die Expression der Th17-Zytokine IL-17A und IL-22 mittels RT-PCR gemessen.

Die Infektion mit *C. jejuni* führte bei den WT- und den NOD2^{-/-}-Tieren zu einem signifikanten Anstieg der Transkription des IL-17A- und des IL-22-Gens im Kolon ($p < 0,005$). Die infizierten NOD2^{-/-}-Tiere zeigten eine geringe Tendenz hin zu einer stärkeren Transkription des IL-22-Gens im Vergleich zu den infizierten WT-Tieren, der Unterschied war aber nicht signifikant [Abb. 3.14].

Die Daten zeigen, dass die Infektion mit *C. jejuni* einen deutlichen Anstieg der Expression des proinflammatorischen IL-17A sowie des regulatorischen IL-22 im Kolon auslöste. NOD2 hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Expression dieser Zytokine.

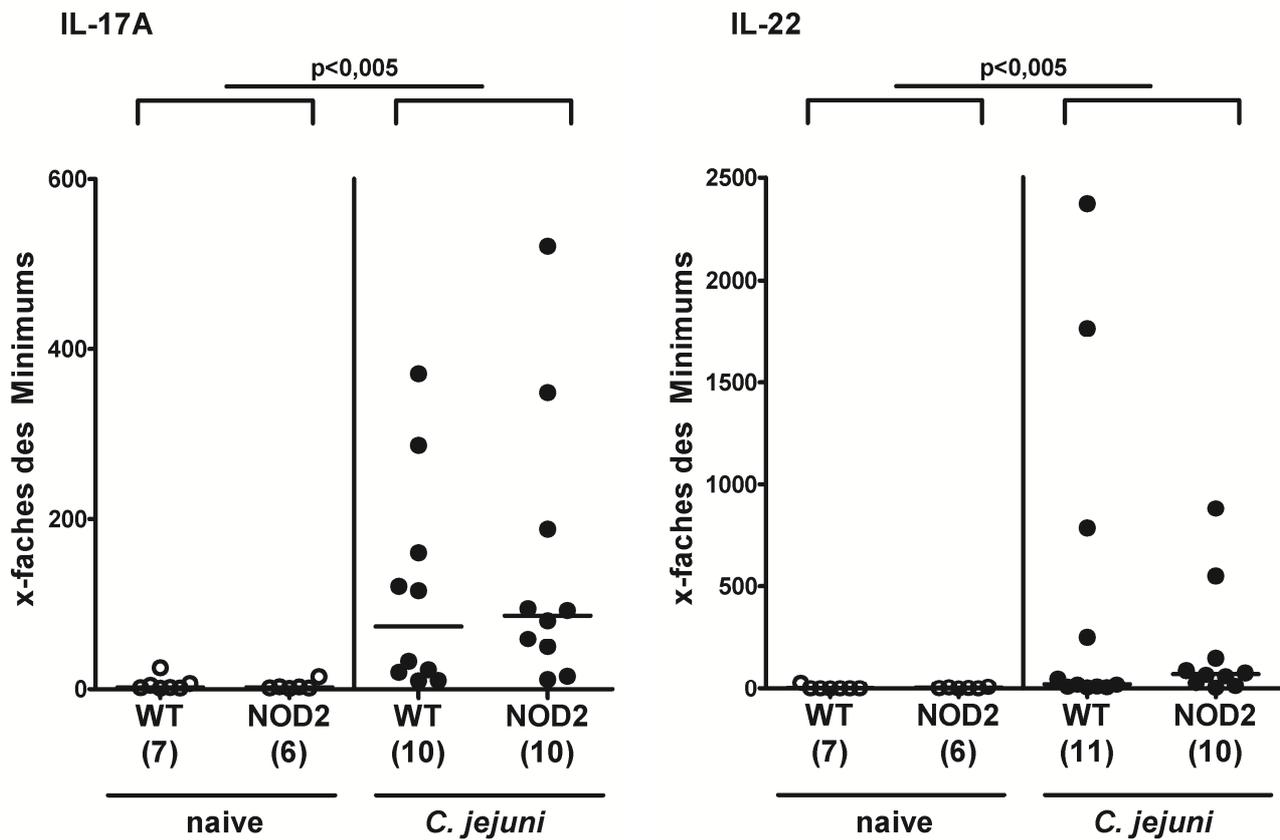


Abb. 3.14: IL-17A- und IL-22-Expression im Kolon von gnotobiotischen WT- und NOD2^{-/-}-Tieren. Dargestellt ist die Expression des IL-17A- und des IL-22-Gens im Kolon der gnotobiotischen WT- und NOD2^{-/-}-Tiere als ein Vielfaches des kleinsten Wertes am sechsten Tag nach der letzten Infektion mit *C. jejuni* 81-176. Offene Symbole stehen für naive, geschlossene Symbole für infizierte Tiere. Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern unterhalb der Tiergruppe angegeben. Balken symbolisieren den Median.

3.2 Gnotobiotische, IL-10-defiziente Tiere zeigten schwächere Kolitis bei NOD2-Defizienz

Da die *Campylobacter*-Kolitis in gnotobiotischen WT-Mäusen symptomatisch und immunhistologisch nicht ausgeprägt war, wurde die mögliche Rolle von NOD2 bei der *C. jejuni* - Infektion in einem weiteren Tiermodell untersucht. Wenn gnotobiotische Tiere, denen das Gen für das antiinflammatorische IL-10 fehlt, mit *C. jejuni* peroral infiziert werden, entwickeln sie innerhalb weniger Tage eine nicht-selbst limitierende, ulzerierende Kolitis mit ausgeprägter Verschlechterung des Allgemeinzustandes. IL-10^{-/-}- und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tiere wurden durch eine mehrwöchige orale Antibiose und sterile Haltung gnotobiotisch gemacht und im Alter von etwa zwei bis drei Monaten an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit 0,3 ml einer Infektionssuspension peroral infiziert. Die Konzentration der Suspension betrug 10⁹ KBE *C. jejuni* 81-176/ ml PBS im Median.

3.2.1 Reduktion der NOD2-Transkription im Kolon nach Infektion mit *C. jejuni*

Auch in dem Modell der ulzerierenden Kolitis bei gnotobiotischen IL-10^{-/-}-Tieren wurde die Expression des NOD2-Gens durch die *C. jejuni*-Infektion gehemmt. Naive Tiere wiesen im Kolon eine Transkriptionsrate des NOD2-Gens vom 5,82 - fachen des kleinsten Wertes auf, die Infektion mit *C. jejuni* reduzierte diesen Wert auf das 1,97 - fache des kleinsten Wertes im Median. Dies entsprach einem Rückgang der Transkriptionsrate auf 33 % des Ausgangswertes ($p < 0,005$) [Abb. 3.12].

Damit führte die Infektion mit *C. jejuni* auch in diesem Infektionsmodell zu einer deutlichen Reduktion der Transkriptionsrate von NOD2 im Kolon.

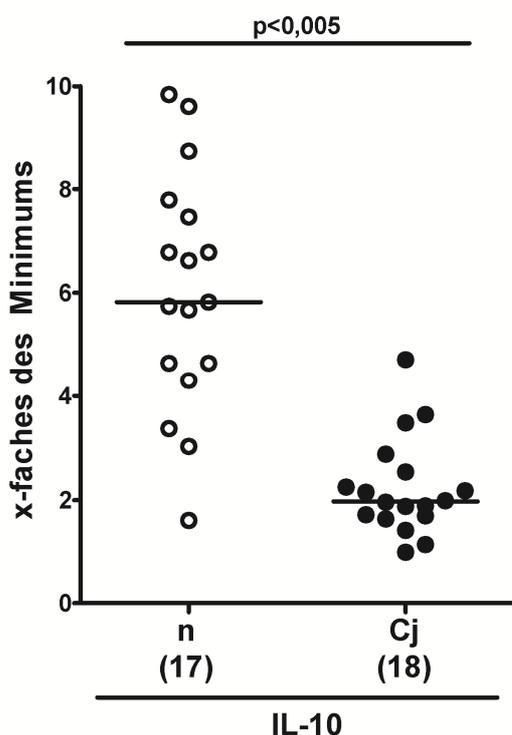


Abb. 3.15: NOD2-Expression im Kolon gnotobiotischer IL-10^{-/-}-Tiere. Dargestellt ist die Expression des NOD2-Gens bei gnotobiotischen IL-10^{-/-}- Tieren als ein Vielfaches des kleinsten Wertes im Kolon am sechsten Tag nach der letzten Infektion mit *C. jejuni* 81-176. Offene Symbole stehen für naive (n), geschlossene Symbole für infizierte (Cj) Tiere. Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern unterhalb der Tiergruppen angegeben. Balken symbolisieren den Median.

3.2.2 Kein Einfluss von NOD2 auf die Kolonisierung mit *C. jejuni*

Um den Einfluss von NOD2 auf die Kolonisationsfähigkeit von *C. jejuni* im Kolon der IL-10^{-/-}- und der NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tiere zu analysieren, wurde die Bakterienkonzentration in den Faeces am ersten und sechsten Tag nach der letzten Infektion untersucht.

Beide Tiergruppen zeigten einen Tag nach der letzten Infektion bereits eine Kolonisation mit *C. jejuni*. Die Konzentration an *C. jejuni* betrug bei den IL-10^{-/-}-Tieren $2,24 \times 10^9$ KBE / g Faeces und bei den NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren $2,02 \times 10^9$ KBE / g Faeces im Median. Auch sechs Tage nach der letzten Infektion waren keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Tiergruppen zu finden bei Bakterienkonzentrationen von $7,24 \times 10^8$ (IL-10^{-/-}) bzw. $7,51 \times 10^8$ (NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}) KBE / g Faeces im Median. Auch bestand kein wesentlicher Unterschied zwischen den Analysetagen [Abb. 3.13].

Die Daten zeigen, dass NOD2 in diesem Entzündungsmodell die Kolonisationsfähigkeit von *C. jejuni* 81-176 im Kolon nicht beeinflusste.

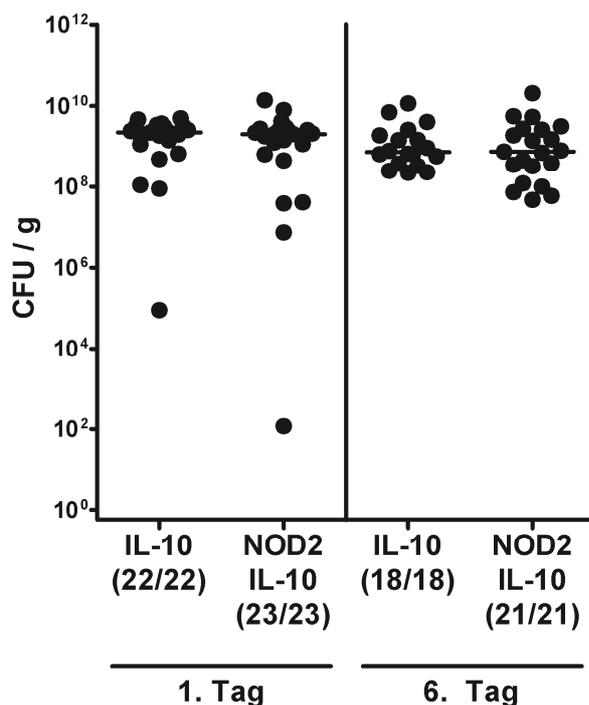


Abb. 3.16: Kolonisationsverhalten von *C. jejuni* 81-176 bei gnotobiotischen IL-10^{-/-}- und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren im Verlauf. Dargestellt ist die Kinetik der *C. jejuni* 81-176-Konzentration im Faeces am ersten und sechsten Tag nach der letzten Infektion bezogen auf 1 Gramm Faeces von gnotobiotischen IL-10^{-/-}- und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren. Die Anzahl der besiedelten und insgesamt untersuchten Tiere ist in Klammern unterhalb der Tiergruppen angegeben. Balken symbolisieren den Median.

3.2.3 NOD2-Defizienz verbesserte den klinischen Zustand der infizierten Tiere

Um die Schwere der Erkrankung bei den mit *C. jejuni* 81-176 infizierten Tiere zu untersuchen, wurde der klinische Zustand der IL-10^{-/-}- und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Mäuse täglich mit dem „Klinischen Score“ evaluiert. Ab dem dritten Tag nach der letzten Infektion konnte eine Verschlechterung des klinischen Zustandes der Tiere beobachtet werden. Dabei wiesen die IL-10^{-/-}-Tiere im naiven Zustand einen Score von 0 im Median auf, der sich sechs Tage nach der letzten Infektion mit *C. jejuni* auf einen Score von 8 im Median verschlechtert hatte. Die NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tiere

wiesen dagegen nur eine Verschlechterung des Scores von 0 im naiven Zustand auf 4 sechs Tage nach der letzten Infektion im Median auf und zeigten im Vergleich zu den IL-10^{-/-}-Tieren eine geringere Infektionssymptomatik ($p < 0,005$).

Das Auftreten von okkultem Blut in den Faeces als Hinweis auf das Ausmaß der Entzündung des Darms wurde mit dem Hämocult-Score erfasst. Die IL-10^{-/-}-Tiere wiesen sechs Tage nach der letzten Infektion einen Hämocult-Score von 4 im Median auf, im Vergleich dazu zeigten die NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tiere nur einen Hämocult-Score von 2 im Median ($p < 0,05$) [Abb. 3.14].

Diese Ergebnisse zeigen, dass NOD2 die Symptomatik der Campylobacteriose im Mausmodell verstärkt. Die NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tiere wiesen einen deutlich besseren Allgemeinzustand und weniger okkultes Blut in den Faeces auf als die IL-10^{-/-}-Tiere sechs Tage nach der letzten Infektion.

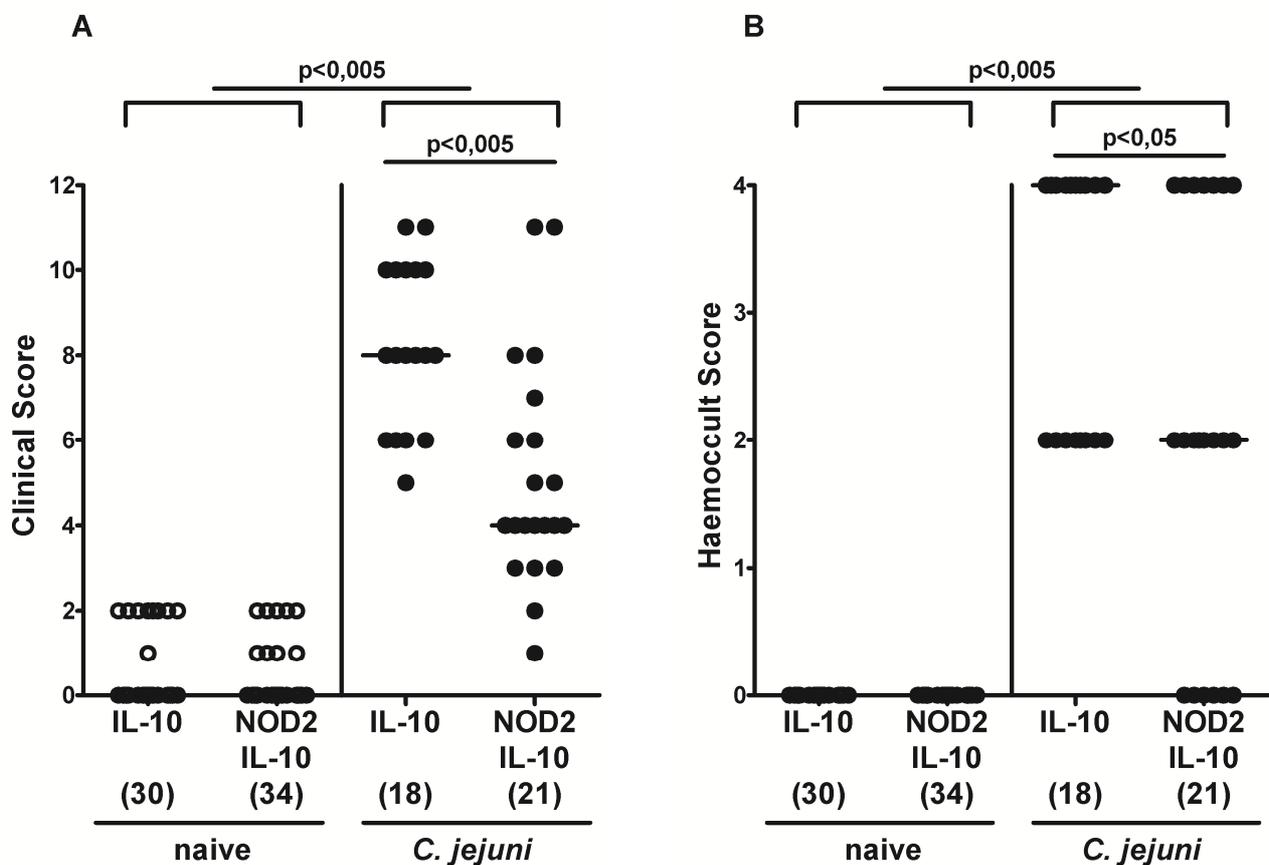


Abb. 3.17: „Klinischer Score“ (A) sowie der Hämocult-Score (B) von gnotobiotischen IL-10^{-/-}- und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren. Dargestellt ist der „Klinische Score“ (A) und der Hämocult-Score (B) der gnotobiotischen IL-10^{-/-}- und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tiere vor der ersten und am sechsten Tag nach der letzten Infektion mit *C. jejuni* 81-176. Offene Symbole stehen für naive, geschlossene Symbole für infizierte Tiere. Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern unterhalb des jeweiligen Genotyps angegeben. Balken symbolisieren den Median.

3.2.4 Schwere Entzündung des Kolonepithels durch die Infektion mit *C. jejuni*

3.2.4.1 NOD2-Defizienz führte zu einer weniger ausgeprägten Entzündung des Kolons

Um die Rolle von NOD2 bei der Ausprägung des histopathologischen Zustandes im Kolon zu untersuchen, wurden Schnittpräparate des Kolons mit dem „OVA-Colitis-Score“ mikroskopisch bewertet. Beide Tiergruppen zeigten nach Infektion eine ausgeprägte Entzündung des Dickdarms mit fokaler Zerstörung der Kryptenarchitektur, massiver Infiltration durch Immunzellen und ausgeprägtem Verlust an Becherzellen im Vergleich zu den naiven Tieren ($p < 0,005$). Dabei wiesen die IL-10^{-/-}-Tiere mit einem histopathologischen Score von 4,00 eine leichtgradig stärkere Entzündung des Kolons auf als die NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tiere, die einen histopathologischen Score von 3,75 im Median zeigten ($p < 0,05$) [Abb. 3.15]

Damit führte NOD2 zu einer Verstärkung der Gewebsschädigung in IL-10-defizienten Tieren nach der Infektion mit *C. jejuni*. Dieses Ergebnis deckt sich mit den symptomatischen Befunden und zeigt, dass NOD2 die ulzerierende Gewebserstörung im Kolon verstärkt.

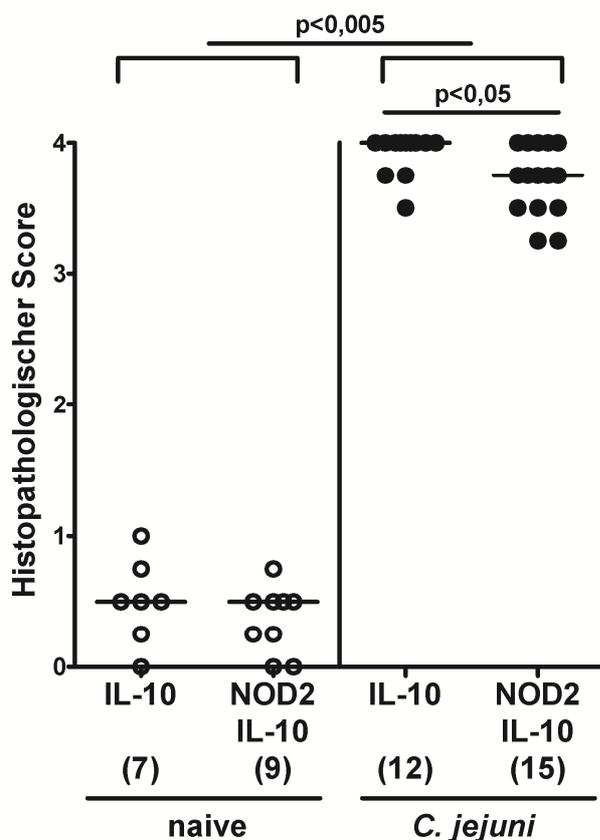


Abb. 3.18: Histopathologie des Kolons von gnotobiotischen IL-10^{-/-}- und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren. Dargestellt ist der histopathologische Score des Kolons der gnotobiotischen IL-10^{-/-}- und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tiere am sechsten Tag nach der Infektion mit *C. jejuni* 81-176. Offene Symbole stehen für naive, geschlossene Symbole für infizierte Tiere. Die Anzahl der untersuchten Tiere in Klammern unterhalb der Tiergruppen angegeben. Balken symbolisieren den Median.

3.2.4.2 NOD2 führte zu größerem Schaden im Epithel bei Infektion mit *C. jejuni*

Für die Differenzierung der histopathologischen Schädigung des Kolons wurde das Kolonepithel auf zelluläre Veränderungen *in situ* hin untersucht. Dafür wurden Schnittpräparate des Kolons

mit immunhistochemischen Antikörpern für Proliferation (TEC3) und Apoptose (Caspase 3) gefärbt und quantitativ ausgewertet. Die IL-10^{-/-}-Tiere zeigten *post infectionem* mit 311,87 TEC3 - pos. Zellen / HPF eine signifikant geringere Proliferationsrate des Kolonepithels im Vergleich zu den NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren, welche 378,75 TEC3 - pos. Zellen / HPF im Median aufwiesen ($p < 0,005$).

Dafür war mit 29,58 Caspase 3 - pos. Zellen / HPF die Apoptoserate bei IL-10^{-/-}-Tieren signifikant höher im Vergleich zu NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren, welche eine Apoptoserate von 17,08 Caspase 3 - pos. Zellen / HPF im Median im Kolon aufwiesen ($p < 0,005$) [Abb. 3.16].

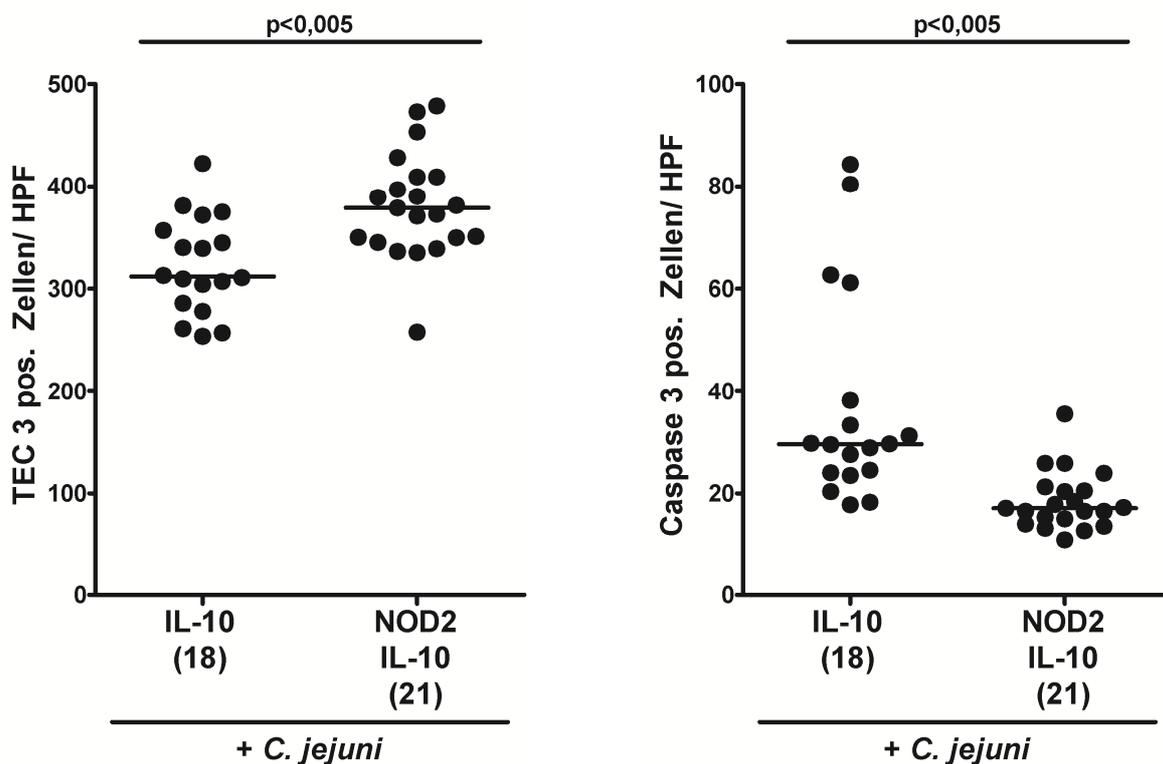


Abb. 3.19: TEC3-positive, proliferative und Caspase 3-positive, apoptotische Zellen im Kolon von gnotobiotischen IL-10^{-/-}- und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren. Dargestellt ist die Anzahl TEC3-positiver, proliferativer und Caspase 3-positiver, apoptotischer Zellen je Gesichtsfeld im Kolon der gnotobiotischen IL-10^{-/-}- und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tiere am sechsten Tag nach der letzten Infektion mit *C. jejuni* 81-176. Geschlossene Symbole stehen für infizierte Tiere. Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern unterhalb der Tiergruppen angegeben. Balken symbolisieren den Median.

Die verringerte Zellproliferation und erhöhte Apoptoserate von IL-10^{-/-}-Tieren bestätigt, dass NOD2 die intestinale Gewebszerstörung bei der murinen Campylobacteriose verstärkt.

3.2.5 NOD2 beeinflusste das angeborenen Immunsystem im Rahmen der Kolitis

Die dramatische Verschlechterung des klinischen Zustandes der Tiere sowie die massive Entzündung des Kolons wiesen auf eine ausgeprägte Immunreaktion hin. Daher wurde die Rolle des

angeborenen Immunsystems bei der durch *C. jejuni* ausgelösten Entzündung im Kolon untersucht und dabei der Einfluss von NOD2 genauer analysiert. Zuerst wurden Immunzellen immunhistochemisch im Kolonepithel *in situ* gefärbt sowie die Konzentration von Entzündungsstoffen und Zytokinen gemessen.

3.2.5.1 Kein Einfluss von NOD2 auf die Granulozyten- und Makrophagenzahl

Es wurden Schnittpräparate des Kolons hinsichtlich Veränderungen der Immunzellzahl durch die Infektion mit *C. jejuni* analysiert. *In situ* wurden mit immunhistochemischen Markern neutrophile Granulozyten (MPO7) und Makrophagen bzw. Monozyten (F4/80) dargestellt und quantitativ ausgewertet. Es konnte kein Einfluss von NOD2 auf die Zellzahl von Granulozyten oder Makrophagen im entzündeten Kolongewebe festgestellt werden [Daten nicht dargestellt].

3.2.5.2 Divergender Einfluss von NOD2 auf die Expression von Zytokinen

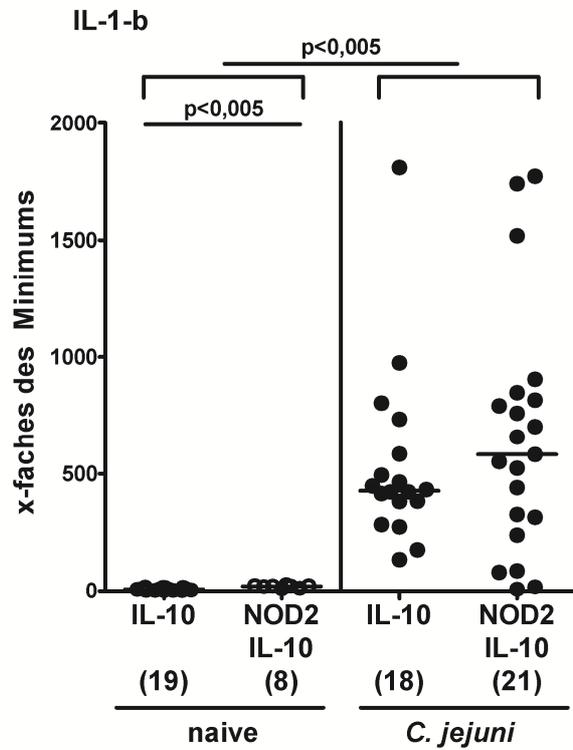
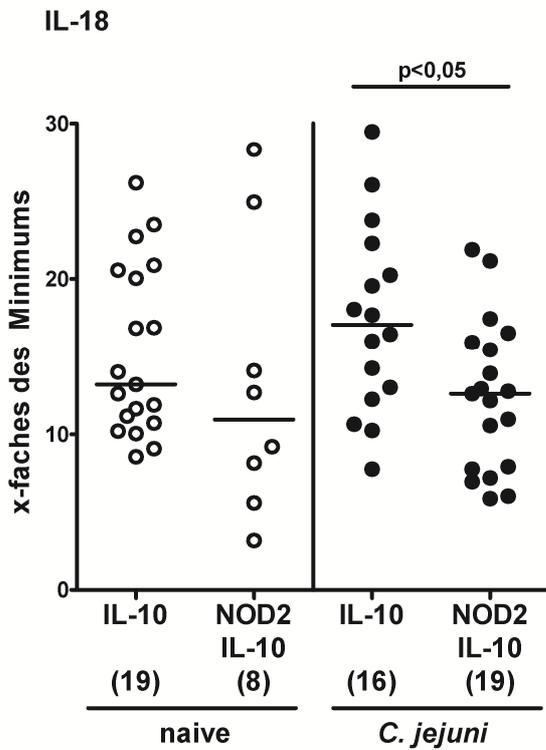
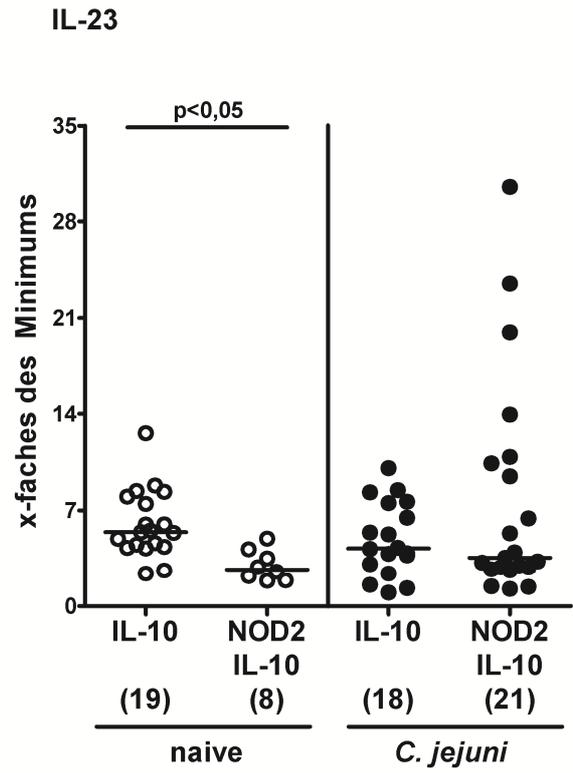
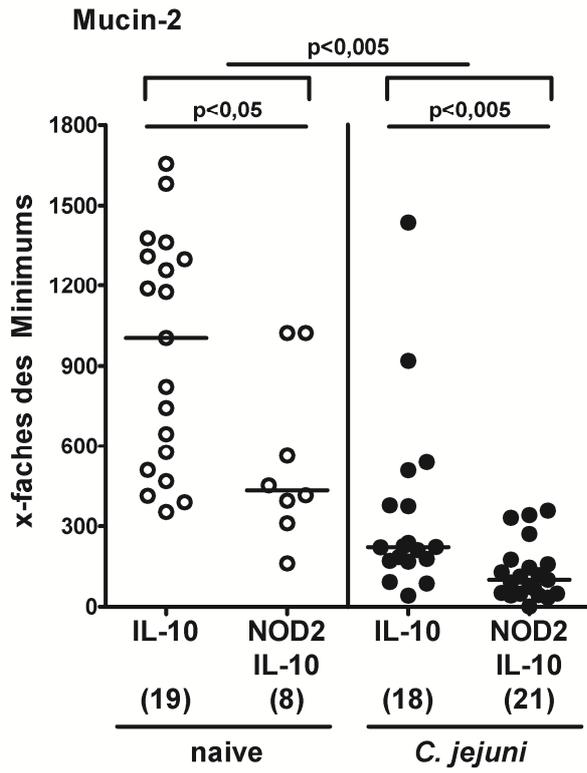
Da im unter 3.1 beschriebenen Modell ein Fehlen des NOD2-Gens die Antwort des angeborenen Immunsystems gegen *C. jejuni* beeinflusste, wurde nun ebenfalls die Transkription von Zytokinen des angeborenen Immunsystems in diesem Modell gemessen. Es wurden die Expressionsraten von Mucin-2, TNF- α , IL-1- β , IL-18 und IL-23p19 untersucht [Abb. 3.20].

Dabei zeigte sich, dass das Mucin-2-Gen bei den naiven IL-10^{-/-}-Tieren signifikant stärker exprimiert wurde als bei den naiven NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren ($p < 0,05$). Durch die Infektion mit *C. jejuni* war die Transkriptionsrate von Mucin-2 sechs Tage nach der letzten Infektion signifikant bei beiden Gruppen verringert ($p < 0,005$). Allerdings zeigten die NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tiere *post infectionem* eine stärkere Reduktion der Transkriptionsrate von Mucin-2 als die IL-10^{-/-}-Tiere ($p < 0,005$).

Die Genexpression des IL-23p19-Gens war bei einem Fehlen des NOD2-Gens im naiven Zustand reduziert, so wiesen die IL-10^{-/-}-Tiere eine höhere Transkriptionsrate im Vergleich zu den NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren auf ($p < 0,05$). Die Infektion mit *C. jejuni* hatte keinen Einfluss auf die IL-23p19-Transkription.

Das IL-18-Gen wies bei den mit *C. jejuni* infizierten IL-10^{-/-}-Tieren eine signifikant erhöhte Transkriptionsrate im Vergleich zu den infizierten NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren auf ($p < 0,05$).

Die Genexpression von IL-1- β und TNF- α war bei NOD2-Defizienz im naiven Zustand erhöht, so wiesen die IL-10^{-/-}-Tiere eine signifikant verringerte Transkriptionsrate dieser beiden Gene im Vergleich zu den NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren auf ($p < 0,005$). Infolge der Infektion mit *C. jejuni* zeigten die IL-10^{-/-}- und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren einen signifikanten Anstieg der Transkriptionsrate für beide Gene ($p < 0,005$), zwischen den Gruppen bestand kein Unterschied [Abb. 3.20].



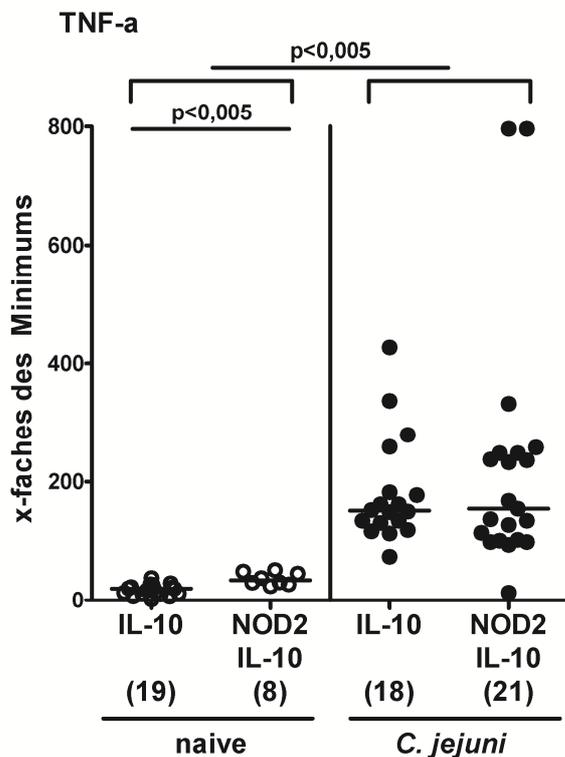


Abb. 3.20: Mucin-2-, IL-23-, IL-18-, IL-1-b- und TNF-a-Expression im Kolon von gnotobiotischen IL-10^{-/-}- und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren. Dargestellt ist die Expression von Mucin-2, IL-23, -18, -1-b und TNF-a als ein Vielfaches des kleinsten Wertes im Kolon von gnotobiotischen IL-10^{-/-}- und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren am sechsten Tag nach der letzten Infektion mit *C. jejuni* 81-176. Offene Symbole stehen für naive Tiere, geschlossene Symbole für infizierte Tiere am 6. Tag nach der letzten Infektion. Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern unterhalb der Tiergruppen angegeben. Balken symbolisieren den Median.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Infektion mit *C. jejuni* zu einem Anstieg der Transkription der proinflammatorischen Gene für TNF-a und IL-1b führte, aber zu einem Abfall der Transkription von Mucin-2. Im naiven Zustand beeinflusste NOD2 die Expression von Mucin-2 (hier auch im infizierten Zustand) und IL-23 positiv, die von TNF-a und IL-1b aber negativ.

3.2.5.3 NOD2-Defizienz führte zu verstärkter proinflammatorischer Zytokinsekretion

Nachdem sich kein deutlicher Einfluss von NOD2 auf die Transkription proinflammatorischer Zytokine des angeborenen Immunsystems *post infectionem* zeigte, wurde nun die Sekretion von Zytokinen des angeborenen Immunsystems zuerst im Organkultur-Überstand vom Kolon sechs Tage nach der letzten Infektion mit *C. jejuni* gemessen [Abb. 3.21].

Es wurde die Konzentration von NO als Maß für den epithelialen Stress gemessen. Naive IL-10^{-/-}-Tiere wiesen mit 5,30 pg / mg Organgewicht einer signifikant niedrigeren NO-Konzentration im Vergleich zu den naiven NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren mit 8,57 pg / mg Organgewicht im Median auf ($p < 0,005$). Nach der Infektion mit *C. jejuni* zeigten beide Gruppen einen deutlichen Anstieg der NO-Konzentration auf 27,22 bei den IL-10^{-/-}-Tieren und auf 27,00 pg / mg Organgewicht im Median bei den NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren ($p < 0,005$). Es war kein Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen mehr vorhanden.

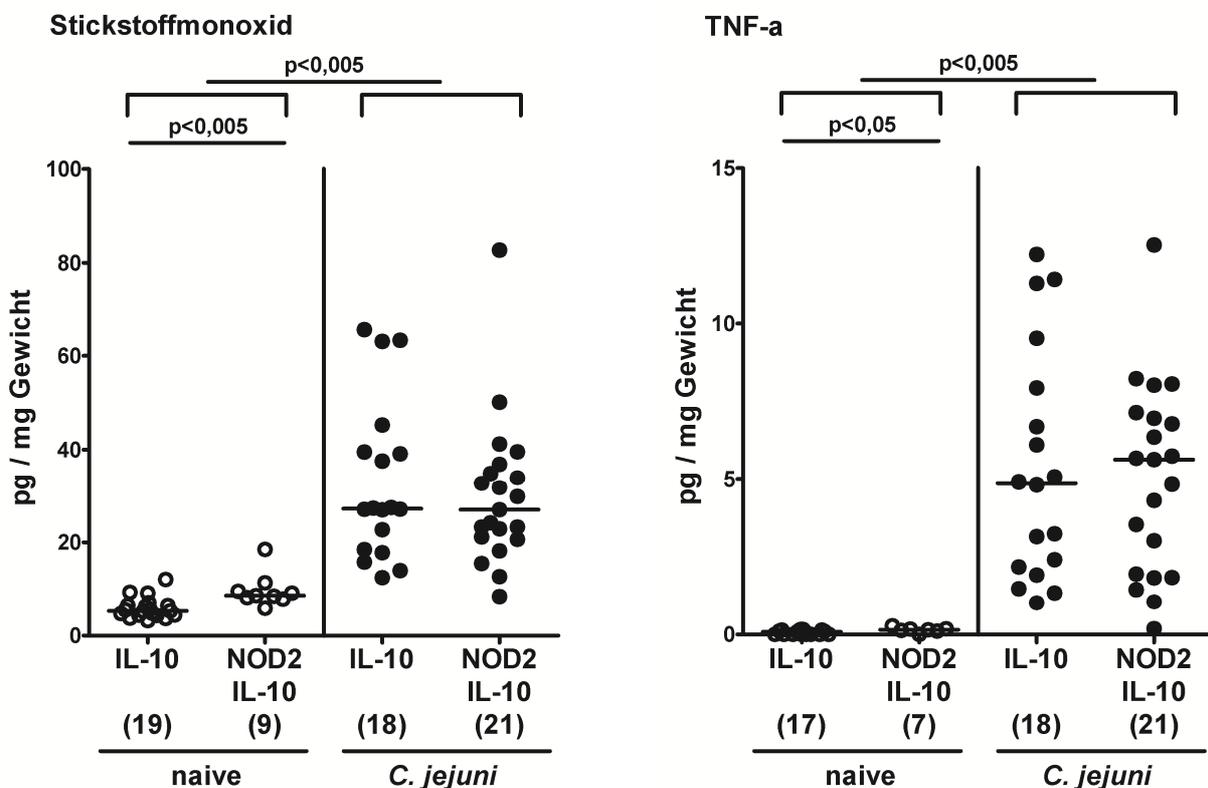
Bei der Messung des proinflammatorischen TNF-a zeigten die IL-10^{-/-}-Tiere im naiven Zustand ebenfalls eine niedrigere Proteinkonzentration mit 0,08 pg / mg Organgewicht im Vergleich zu den naiven NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren mit 0,15 pg / mg Organgewicht im Median ($p < 0,05$). Auch

hier führte die Infektion mit *C. jejuni* zu einem deutlichen Anstieg der TNF-a-Konzentration auf 4,86 bei den IL-10^{-/-}-Tieren und auf 5,62 pg / mg Organgewicht im Median bei den NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren ($p < 0,005$), der Unterschied zwischen den Genotypen ging *post infectionem* allerdings verloren.

Die IL-10^{-/-}-Tiere zeigten im naiven Zustand mit 0,00 pg / mg Organgewicht einer signifikant niedrigere Konzentration des proinflammatorischen IL-12p70 als die NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tiere mit 0,08 pg / mg Organgewicht im Median ($p < 0,05$). Die Infektion führte aber nur bei den IL-10^{-/-}-Tieren zu einem signifikant messbaren Anstieg der Konzentration, mit 0,02 pg / mg Organgewicht IL-12p70 ($p < 0,05$). Die NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tiere verharrten mit 0,05 pg / mg Organgewicht auf etwa dem gleichen Niveau wie vor der Infektion [Abb. 3.21].

Die Infektion mit *C. jejuni* führte bei den IL-10^{-/-}- und den NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren zu einem signifikanten Anstieg der Proteinkonzentration von IL-6 und MCP-1 ($p < 0,05 - 0,005$). NOD2 hatte keinen Einfluss auf die Sekretion dieser proinflammatorischen Zytokine, weder im naiven noch im infizierten Zustand [Daten nicht dargestellt].

Die Ergebnisse zeigen, dass NOD2 die Sekretion von Stickstoffmonoxid, TNF-a und IL-12p70 im naiven Zustand hemmte. Im infizierten Zustand ging dieser Unterschied verloren.



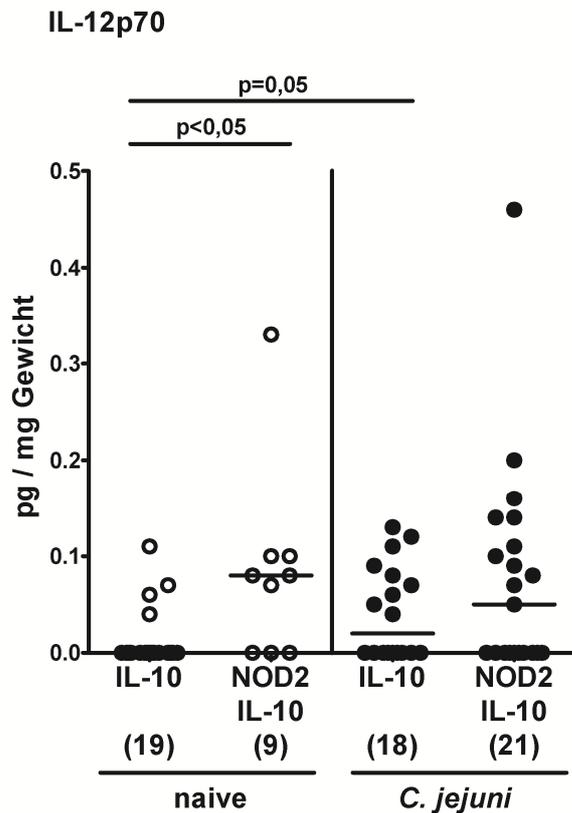


Abb. 3.21: Stickstoffmonoxid-, TNF-a- und IL-12p70-Proteinkonzentrationen im Kolon von gnotobiotischen IL-10^{-/-}- und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren. Dargestellt sind die Stickstoffmonoxid-, TNF-a- und IL-12p70-Proteinkonzentrationen im Kolon von gnotobiotischen IL-10^{-/-}- und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren bezogen auf das Organgewicht am sechsten Tag nach der letzten Infektion mit *C. jejuni* 81-176. Offene Symbole stehen für naive, geschlossene Symbole für infizierte Tiere. Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern unterhalb der Tiergruppen angegeben. Balken symbolisieren den Median.

In den mesenterialen Lymphknoten als erste Station der Immunabwehr außerhalb des Kolons bewirkte die Infektion mit *C. jejuni* einen signifikanten Anstieg der Proteinkonzentration von TNF-a und IL-6 ($p < 0,01 - 0,005$). Zwischen den Genotypen bestand kein Unterschied [Daten nicht dargestellt].

Die Infektion mit *C. jejuni* führte zu einem signifikanten Anstieg der MCP-1-Konzentration von 0,00 auf 3.812,33 pg / mg Gesamtprotein bei den IL-10^{-/-}-Tieren und von 548,79 auf 11.312,25 pg / mg Gesamtprotein im Median bei den NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren ($p < 0,05 - 0,005$). Der Konzentrationsunterschied zwischen den IL-10^{-/-}- und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren war *post infectionem* signifikant ($p < 0,05$) [Abb. 3.22].

Bei der Messung der Zytokine in der Milz als systemisches Immunorgan fiel auf, dass die Infektion mit *C. jejuni* bei den IL-10^{-/-}-Tieren zu einer signifikanten Verringerung der IL-6-Proteinkonzentration von 312,11 auf 57,85 pg / mg Organgewicht führte, ebenso bei den NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren mit 520,77 auf 125,70 pg / mg Organgewicht im Median ($p < 0,05 - 0,01$). Die Tiere ohne intaktes NOD2-Gen zeigten sowohl im naiven als auch im infizierten Zustand signifikant höhere Proteinkonzentrationen im Vergleich zu den Tieren mit intaktem NOD2-Gen ($p < 0,05$) [Abb. 3.22].

Die Infektion mit *C. jejuni* führte im systemischen Immunorgan Milz zu einem Abfall der Konzentration des proinflammatorischen Zytokins IL-6. Dieser Befund steht im Widerspruch zum Krankheitszustand der Mäuse im Rahmen der Campylobacteriose.

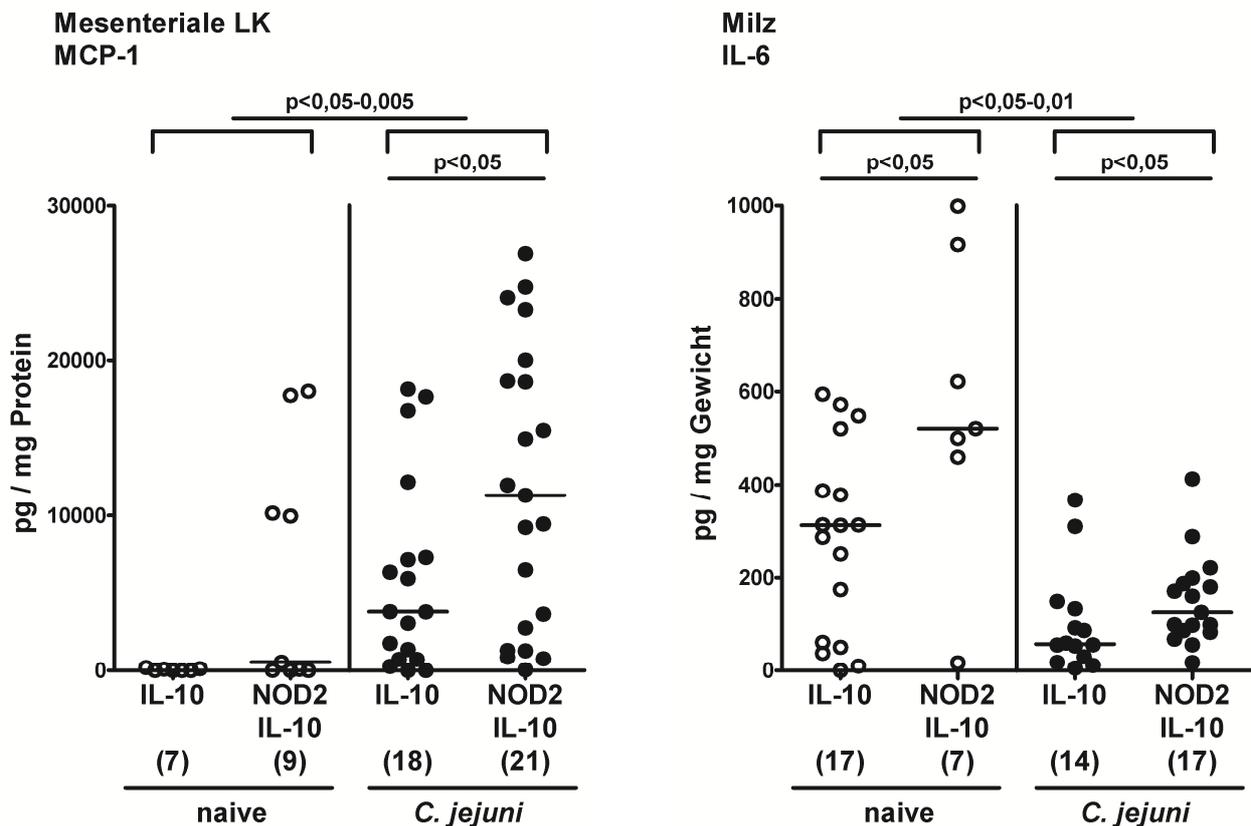


Abb. 3.22: MCP-1-Proteinkonzentration in den mesenterialen LK und IL-6-Proteinkonzentration in der Milz von gnotobiotischen IL-10^{-/-} und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren. Dargestellt ist die MCP-1-Proteinkonzentration in den mesenterialen LK auf 1 Gramm Gesamtprotein und die IL-6-Proteinkonzentration in der Milz auf das Organgewicht bezogen von gnotobiotischen IL-10^{-/-} und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren am sechsten Tag nach der letzten Infektion mit *C. jejuni* 81-176. Offene Symbole stehen für naive, geschlossene Symbole für infizierte Tiere. Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern unterhalb der Tiergruppen angegeben. Balken symbolisieren den Median.

3.2.6 NOD2 beeinflusste die Th1- und Th17-Immunantwort

Nachdem die bisherigen Untersuchungen eine relevante Rolle von NOD2 bei der Antwort des angeborenen Immunsystems gegen *C. jejuni* gezeigt hatten, wurde nun die Rolle von NOD2 bei der Antwort des erworbenen Immunsystems analysiert. Für einen Überblick wurden zuerst die B-, T- und regulatorischen T-Zellen anhand der spezifischen Antikörperfärbungen untersucht. Anschließend wurde die Genexpression und Protein-Sekretion von T-Helferzell-Zytokinen gemessen.

3.2.6.1 NOD2 begrenzte die Akquirierung von Lymphozyten im Kolon

Die Schnittpräparate vom Kolon der Tiere wurden immunhistochemisch auf die Anwesenheit von T-Zellen (CD3) sowie regulatorischen T-Zellen (FoxP3) und B-Zellen (B220) hin untersucht. Die IL-10-Tiere wiesen mit 24,67 im Vergleich zu 42,92 B220 - pos. Zellen / HPF im Median bei den NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren signifikant weniger B-Zellen auf ($p < 0,005$). Die Population der

T-Zellen war bei den IL-10-Tieren signifikant seltener vertreten mit 189,29 im Vergleich zu 231,25 CD3 - pos. Zellen / HPF im Median bei den NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren ($p < 0,05$).

Auch die Subpopulation der regulatorischen T-Zellen war bei den IL-10-Tieren mit 25,13 im Vergleich zu 33,83 FoxP3 - pos. Zellen / HPF im Median bei den NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren deutlich seltener vertreten [Abb. 3.23].

Damit zeigte sich, dass NOD2 die Akquirierung von B- und T-Zellen hemmte.

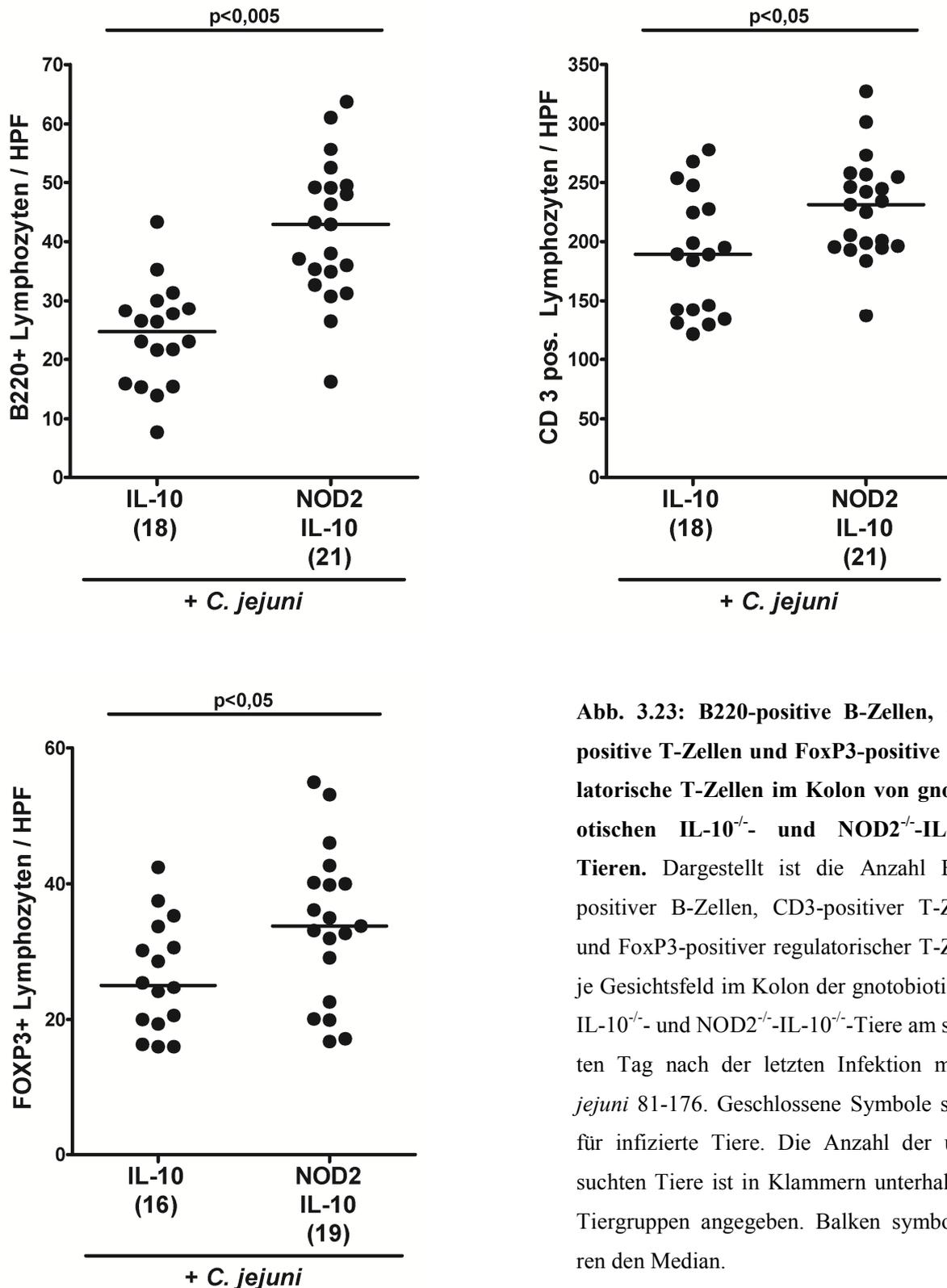


Abb. 3.23: B220-positive B-Zellen, CD3-positive T-Zellen und FoxP3-positive regulatorische T-Zellen im Kolon von gnotobiotischen IL-10^{-/-} und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren. Dargestellt ist die Anzahl B220-positiver B-Zellen, CD3-positiver T-Zellen und FoxP3-positiver regulatorischer T-Zellen je Gesichtsfeld im Kolon der gnotobiotischen IL-10^{-/-} und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tiere am sechsten Tag nach der letzten Infektion mit *C. jejuni* 81-176. Geschlossene Symbole stehen für infizierte Tiere. Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern unterhalb der Tiergruppen angegeben. Balken symbolisieren den Median.

3.2.6.2 Negative Regulation von IFN-g durch NOD2

Da die T-Zell-Immunantwort eine wichtige Rolle bei der Infektion mit *C. jejuni* spielt und die immunhistochemische Analyse der T-Zellen einen Einfluss von NOD2 zeigte, wurde nun die Expression und die Proteinsekretion des Th-1-Effektorzytokins IFN-g gemessen. Durch die Infektion mit *C. jejuni* erfolgte im Kolon eine signifikante Steigerung der Expression von IFN-g bei den IL-10^{-/-}-Tieren und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren ($p < 0,005$). Die IL-10^{-/-}-Tiere zeigten sowohl im naiven als auch im infizierten Zustand aber eine geringere Expression von IFN-g im Vergleich zu den NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren ($p < 0,01 - 0,005$) [Abb. 3.24].

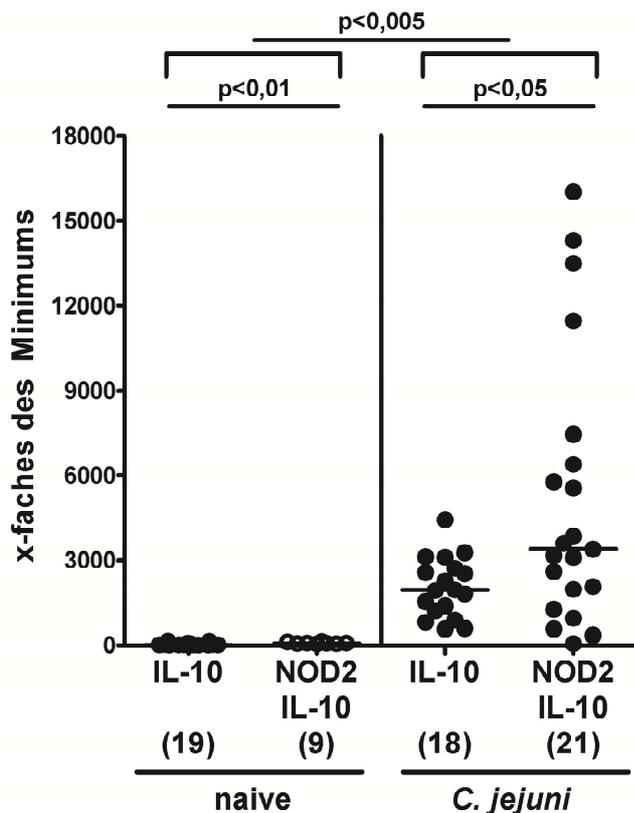


Abb. 3.24: IFN-g-Expression im Kolon von gnotobiotischen IL-10^{-/-}- und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren. Dargestellt ist die Expression des IFN-g-Gens als ein Vielfaches des kleinsten Wertes im Kolon von gnotobiotischen IL-10^{-/-}- und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren am sechsten Tag nach der letzten Infektion mit *C. jejuni* 81-176. Offene Symbole stehen für naive, geschlossene Symbole für infizierte Tiere. Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern unterhalb der Tiergruppen angegeben. Balken symbolisieren den Median.

Im Kolon wiesen die IL-10^{-/-}-Tiere eine IFN-g-Konzentration von 0,04, die NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tiere von 0,08 pg / mg Organgewicht im Median im naiven Zustand auf. Durch die Infektion mit *C. jejuni* stieg die Konzentration bei den IL-10^{-/-}-Tieren auf 4,00, bei den NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren auf 10,43 pg / mg Organgewicht im Median an ($p < 0,005$). Der Unterschied *post infectionem* war zwischen beiden Tiergruppen signifikant ($p < 0,005$).

Im naiven Zustand betrug die IFN-g-Konzentration in den mesenterialen Lymphknoten bei den IL-10^{-/-}-Tieren 0,15, bei den NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren 0,05 pg / mg Organgewicht im Median. Die Infektion bewirkte eine Erhöhung auf 5,42 bei den IL-10^{-/-}-Tieren und auf 10,46 pg / mg Organgewicht im Median bei den NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren ($p < 0,005$). Auch hier war der Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen signifikant ($p < 0,005$).

In der Milz war die IFN-g-Konzentration im naiven Zustand bei den IL-10^{-/-}-Tieren 1,68 und bei den NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren 0,98 pg / mg Organgewicht im Median. Die Infektion mit *C. jejuni* führte nur bei den NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren zu einem signifikanten Anstieg der Konzentration auf 5,00, während die IL-10^{-/-}-Tiere mit 1,68 pg / mg Organgewicht im Median auf gleich niedrigem Niveau verharrten ($p < 0,01 - 0,005$) [Abb. 3.25].

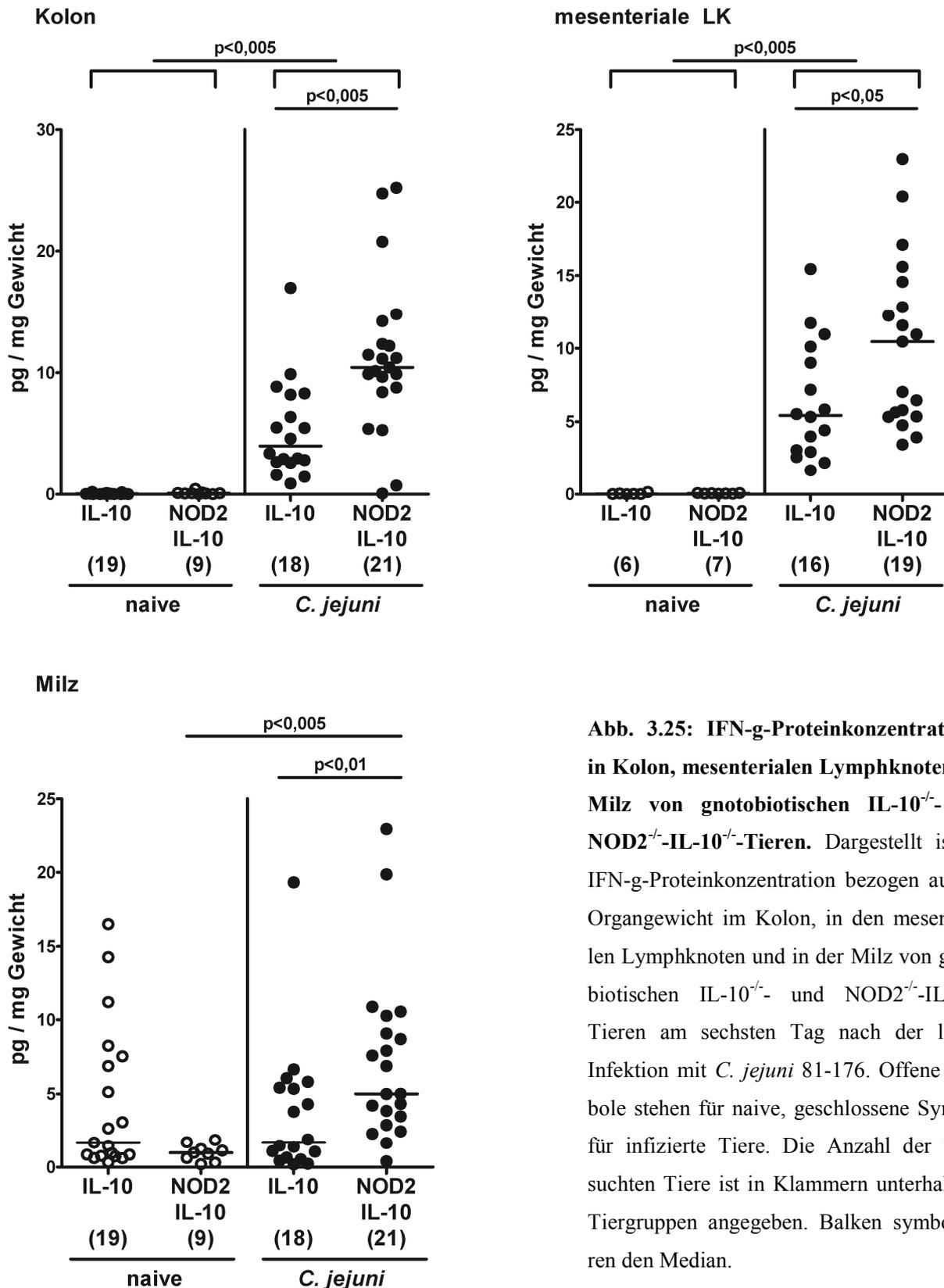


Abb. 3.25: IFN-g-Proteinkonzentrationen in Kolon, mesenterialen Lymphknoten und Milz von gnotobiotischen IL-10^{-/-}- und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren. Dargestellt ist die IFN-g-Proteinkonzentration bezogen auf das Organgewicht im Kolon, in den mesenterialen Lymphknoten und in der Milz von gnotobiotischen IL-10^{-/-}- und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren am sechsten Tag nach der letzten Infektion mit *C. jejuni* 81-176. Offene Symbole stehen für naive, geschlossene Symbole für infizierte Tiere. Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern unterhalb der Tiergruppen angegeben. Balken symbolisieren den Median.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die Steigerung der IFN-g-Produktion durch die Infektion mit *C. jejuni* bei den NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren deutlich verstärkt im Vergleich zu den IL-10^{-/-}-Tieren. In der Milz löste die Infektion sogar nur einen Anstieg des IFN-g bei NOD2-Defizienz aus.

3.2.6.3 Negativer Einfluss von NOD2 auf die IL-22 Expression infolge der Infektion

Nach dem gezeigt werden konnte, dass NOD2 eine Rolle bei der IFN-g-Immunantwort spielte, wurde nun der Einfluss von NOD2 auf die Th-17-Immunantwort gegen *C. jejuni* anhand der Expressionen von IL-17A und IL-22 untersucht.

Die Infektion mit *C. jejuni* führte bei den IL-10^{-/-}- und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren zu einem signifikanten Anstieg der Transkription von IL-17A im Kolon ($p < 0,005$). Zwischen den Tiergruppen bestand kein Unterschied. Bei den IL-10^{-/-}- und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren führte die Infektion mit *C. jejuni* ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der Expression von IL-22 ($p < 0,005$). Bei NOD2-Defizienz war dieser Anstieg aber signifikant verstärkt im Vergleich zu den Tieren mit intaktem NOD2-Gen ($p < 0,01$) [Abb. 3.26].

Diese Ergebnisse zeigen, dass NOD2 auch die Transkription des Th-17-Zytokins IL-22 hemmt.

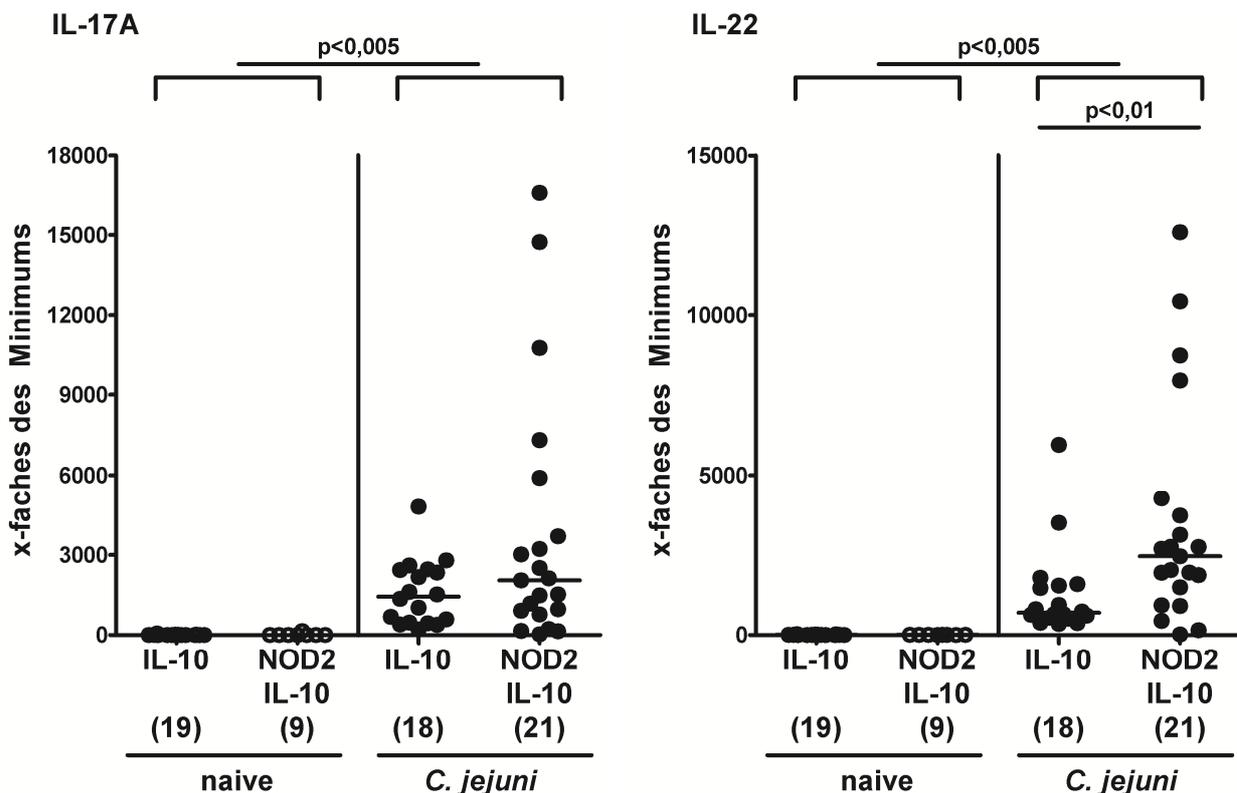


Abb. 3.26: IL-17A- und IL-22-Expression im Kolon von gnotobiotischen IL-10^{-/-}- und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren. Dargestellt ist die Expression des IL-17A- und IL-22-Gens als ein Vielfaches des kleinsten Wertes im Kolon von gnotobiotischen IL-10^{-/-}- und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren am sechsten Tag nach der letzten Infektion mit *C. jejuni* 81-176. Offene Symbole stehen für naive, geschlossene Symbole für infizierte Tiere. Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern unterhalb der Tiergruppen angegeben. Balken symbolisieren den Median.

4 Diskussion

4.1 Einführung

Mutationen im NOD2-Gen sind signifikant mit der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn assoziiert [Rivas *et al.* 2011]. Die Funktionen des intakten NOD2 beim Menschen sind bis heute nicht eindeutig geklärt. Es werden bisher sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften beschrieben [Strober *et al.* 2011]. In letzter Zeit wird NOD2 als Regulator sowohl des angeborenen als auch erworbenen Immunsystems gesehen [Amendola *et al.* 2014, Philpott *et al.* 2014].

Campylobacter jejuni ist in Europa der häufigste bakterielle Erreger von akuter Diarrhoe beim Menschen. Seit längerem wird ein Einfluss der Proteobakterien, zu denen auch *C. jejuni* gehört, bei Entstehung bzw. Aufrechterhaltung des Entzündungsprozesses der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen diskutiert [Mukhopadhyaya *et al.* 2012]. Bereits seit den 1980er Jahren wurden Infektionen mit *C. jejuni* bei Patienten für eine Verschlechterung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen verantwortlich gemacht [Newman *et al.* 1980, Goodman *et al.* 1980, Stallmach *et al.* 2002].

IL-10^{-/-}-defiziente Mäuse sind ein geeignetes Modell für die Untersuchung der *C. jejuni*-Infektion [Mansfield *et al.* 2007, Lippert *et al.* 2009, Bereswill *et al.* 2011, Haag *et al.* 2012, Sun *et al.* 2014]. In den hier vorgestellten experimentellen Arbeiten wurde daher die Bedeutung von NOD2 bei der *C. jejuni*-Infektion in gnotobiotischen WT- und IL-10^{-/-}-Mäusen mit *C. jejuni* untersucht. Dabei wurden sowohl klinische Parameter wie Zustand der Tiere und Histopathologie des Kolons als auch immunologische Parameter wie pro- und antiinflammatorische Zytokine im Darm der Tiere ermittelt.

4.2 Hemmung der NOD2-Expression als eine Immun-Evasionsstrategie?

In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass die Genexpression von NOD2 nach der Infektion mit *C. jejuni* sowohl bei gnotobiotischen WT- als auch IL-10^{-/-}-Tieren signifikant reduziert war [Abb. 3.1; 3.15]. Dieser Befund war spezifisch für *C. jejuni*, da bei einer Infektion mit einem apathogenen *E.coli* die Expression von NOD2 auf dem Niveau naiver WT- und IL-10^{-/-}-Tiere verblieb [Daten nicht gezeigt]. Die Reduktion der Expression des NOD2-Gens war nicht mit einem Schaden des Darmepithels assoziiert, da histologisch bei den *C. jejuni*-infizierten WT-Tieren keine Schädigung des Epithels nachweisbar war [Abb. 3.4].

Interessanterweise wird die Expression des NOD2-Gens nach großflächigen Verbrennungen ebenfalls reduziert [Moore *et al.* 2007].

Von Petnicki-Ocwieja *et al.* wurde 2009 gezeigt, dass die Expression von NOD2 im terminalen Ileum von „germ-free“ WT-Tieren deutlich geringer war als in mit *Lactobacillus plantarum* und *E. coli* Nissle 1917 rekolonisierten WT-Mäusen. Der genetische Hintergrund der Tiere in dieser Studie war vergleichbar, da ebenfalls Mäuse des Stamms C57BL/6 verwendet wurden. Es wurde die Vermutung aufgestellt, dass die kommensale Darmflora als Stimulus für eine ausreichende NOD2-Expression benötigt wird [Petnicki-Ocwieja *et al.* 2009]. Dies steht jedoch nicht im Widerspruch zu der reduzierten NOD2-Expression bei Infektion mit *C. jejuni*. Bei *C. jejuni* handelt es sich um ein pathogenes Bakterium mit entsprechenden Virulenzfaktoren und es hat dadurch grundlegend andere Eigenschaften und verursacht aktiv Schäden im Wirt – anders als die von Petnicki-Ocwieja *et al.* zur Rekolonisation verwendeten Bakterien [Young *et al.* 2007, O Cróinín *et al.* 2012]. Im Gegensatz zur kommensalen Darmflora, welche toleriert wird, verursacht das Immunsystem bei Infektionen mit Pathogenen wie *C. jejuni* die Abwehr und schlussendlich die Eradikation der Krankheitserreger.

Beim akutem Dextran-Sodium-Sulfate (DSS) -Kolitismodell in C57BL/6-Mäusen mit konventioneller Darmflora war die Expression des NOD2-Gens im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren ebenfalls erhöht [Zheng *et al.* 2013]. Es muss aber bedacht werden, dass in diesem Modell das erworbene Immunsystem für die Entzündung nicht essentiell ist und es sich hier primär um eine chemische Schädigung des Darmepithels durch das DSS handelt, die auch in keimfreien Tieren und in Tieren ohne erworbenes Immunsystem stattfindet [Dieleman *et al.* 1994, Pils *et al.* 2011]. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass diese Tiere mit DSS-Kolitis im Besitz einer kommensalen Darmflora waren, welche eine erhöhte Translokationsneigung zeigt [Smith *et al.* 2012]. Abzugrenzen davon sind die gnotobiotischen Mäuse, welche nur mit dem Pathogen *C. jejuni* rekolonisiert wurden. Somit ist die Pathogenese der DSS-Kolitis klar zu unterscheiden von der durch *C. jejuni* ausgelösten Immunantwort und Kolitis im Darm der Mäuse.

Untersuchungen zur Expression von NOD2 oder anderen PRRs in Gewebe von Mäusen, welche mit *C. jejuni* infiziert wurden und darauf mit einer Immunantwort oder sogar einer Entzündung reagierten (wie hier in der Arbeit vorgestellt) sind zum jetzigen Kenntnisstand bisher nicht durchgeführt worden. Allerdings konnte Lippert *et al.* zeigen, dass nach Infektion der murinen Rectum-Karzinom-Zelllinie CMT93 mit *C. jejuni* 81-176 mRNA von NOD2 akkumulierte [Lippert *et al.* 2009].

Ein möglicher Erklärungsansatz für die reduzierte NOD2-Expression im Darm von gnotobiotischen WT- und IL-10^{-/-}-Tiere nach Infektion mit *C. jejuni* wäre eine aktive Strategie mit der das Pathogen durch Reduktion der NOD2-Expression in Darmzellen und Immunzellen der Erkennung durch das angeborene Immunsystem entgeht. In der Literatur wird beschrieben, dass es *C.*

jejuni möglich ist, Einfluss auf die Immunantwort seines Wirtes zu nehmen. So führte eine Mutation im Cytolethal distending Toxin (Cdt) B von *C. jejuni* 81-176 zu einer verringerten Fähigkeit, C57BL/129-WT-Mäuse langfristig zu besiedeln im Vergleich zum *C. jejuni*-Wildtypstamm mit intaktem CDT [Fox *et al.* 2004]. Jones *et al.* konnten jedoch zeigen, dass das Cdt-B von *C. jejuni* NCTC11168 keinen Einfluss auf die Stimulation von proinflammatorischen Zytokinen *in vitro* hatte [Jones *et al.* 2003]. Rose *et al.* beschrieben, dass das *C. jejuni*-Kapselbestandteil Lipooligosaccharid (LOS) vor exzessiver Zytokinproduktion *ex vivo* schützt [Rose *et al.* 2012]. Choi *et al.* konnten zeigen, dass nach Infektion von THP-1-Monozyten mit LOS von *Haemophilus influenza* eine Steigerung der NOD2-Expression stattfand [Choi *et al.* 2014]. Und Burrough *et al.* zeigte, dass nach Infektion von schwangeren Meerschweinchen mit *C. jejuni* die Expression eines anderen PRRs, von TLR-2, in subplazentären Syncytiotrophoblasten nach Fehlgeburt gesteigert war [Burrough *et al.* 2011].

Aufgrund des aktuellen Standes der Erkenntnisse ist nicht abschließend zu klären, ob die reduzierte NOD2-Expression, die hier beobachtet wurde, Teil einer Immun-Evasionsstrategie von *C. jejuni* ist. Dagegen spricht die Tatsache, dass NOD2-defiziente Mäuse nach *C. jejuni*-Infektion erhöhte Konzentrationen an proinflammatorischen Zytokinen aufwiesen wie WT-Kontrolltiere [Abb. 3.7-10, 3.20-22, 3.24/25].

Ebenfalls unklar ist die Frage, ob die Reduktion der NOD2-Expression ubiquitär in allen Zelltypen gleich ausgeprägt ist oder ob sie in den einzelnen Zell-Subsets wie Epithelzellen oder Zellen hämatopoetischen Ursprungs wie Granulozyten und Lymphozyten mit ihren einzelnen Untergruppen verschieden stark ausgebildet ist. Dazu sind weiterführende Untersuchungen zur NOD2-Expression in den jeweiligen Zellsubtypen nötig.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Expression von NOD2 nur anhand der Messung der mRNA-Werte untersucht. Natürlich kann auch keine Aussage darüber gemacht werden, ob es weitere quantitative Veränderungen des NOD2-Proteins nach der Translation gibt. In anderen Arbeiten wurde *in vitro* gezeigt, dass die proteosomale Degradation des NOD2-Proteins zu Toleranz gegenüber bakteriellen Zellwandbestandteilen führte [Lee *et al.* 2012]. Auch wurde bisher nicht untersucht, ob sich die Veränderungen der NOD2-Expression durch die Infektion mit *C. jejuni* ebenfalls in der Expression und Aktivität der Kinase RIP-2 widerspiegeln. Via RIP-2 findet hauptsächlich die NF- κ B-Aktivierung durch NOD2 statt [Strober *et al.* 2006].

Auf eine mögliche Bedeutung der bei *C. jejuni*-Infektion reduzierten NOD2-Expression im Zusammenhang mit den klinischen und histopathologischen Befunden soll später nochmals eingegangen werden.

4.3 NOD2-Defizienz führte nicht zu erhöhter Bakterienkonzentration im Kolon

Trotz der im Darmepithel für NOD2 beschriebenen essentiellen Rolle in der Produktion von antibakteriellen Substanzen wie z.B. Defensinen [Wehkamp *et al.* 2004, Kobayashi *et al.* 2005, Sorbara *et al.* 2011], haben die hier gezeigten Experimente keinen funktionellen Einfluss der NOD2-Defizienz auf die Konzentrationen lebender Bakterien der kommensalen Flora gezeigt. Auch hatte das Fehlen des NOD2-Gens keinen Einfluss auf das Kolonisationsverhalten von *C. jejuni* im Darm infizierter Tiere. Am sechsten Tag nach der letzten Infektion war die Konzentration an lebenden *C. jejuni* im Kolon jeweils zwischen den WT- bzw. IL-10^{-/-}-Tieren und den NOD2^{-/-}- bzw. NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren identisch. Auch in den als Kontrollexperimenten durchgeführten peroralen Infektionen mit einem apathogenem *E. coli* betrug der Unterschied der Konzentrationen an lebenden Bakterien im Median weniger als eine logarithmische Stufe und war damit biologisch nicht relevant [Daten nicht gezeigt].

Damit wird auch die Frage von Shaw *et al.* beantwortet, ob NOD2-Defizienz einen Einfluss auf die Bakterienlast von mono-rekolonisierten, gnotobiotischen Tieren hat – NOD2-Defizienz hat keinen relevanten Einfluss [Shaw *et al.* 2011].

Es lässt sich festhalten, dass der in der Literatur beschriebene Einfluss von NOD2 auf die Produktion von Defensinen in dem hier beschriebenen Mausmodellen keinen relevanten funktionellen Einfluss auf die Bakterienkonzentration nach peroraler Infektion hatte. Dieser Befund wird unterstützt durch neuere Studien, die zeigen, dass kein funktioneller Unterschied an antimikrobiellen Substanzen bei WT- und NOD2^{-/-}-Tieren zu messen war. Auch wurden früher beschriebene Unterschiede in der Zusammensetzung der kommensalen Darmflora auf Einflüsse durch die Tierhaltung zurückgeführt [Robertson *et al.* 2013, Shanahan *et al.* 2014]. In der hier vorgestellten Arbeit wurden allerdings weiterführende Untersuchungen zu Anzahl und Funktion der Paneth-Zellen in den Tiergruppen nicht durchgeführt.

4.4 Die beiden murinen Infektionsmodelle von *C. jejuni*: Kolonisation und Entzündung

Tiere, denen die membranständigen PRRs TLR4 oder TLR9 oder deren wichtigste „downstream“-Adaptermoleküle TRIF oder MyD88 fehlten [Abreu 2010], wiesen nach peroraler Infektion im Vergleich zu den WT-Kontrollen einen signifikant schwächeren Einstrom an Immunzellen wie neutrophile Granulozyten, T- und B-Zellen in das Kolonepithel auf [Bereswill *et al.* 2011]. Auch hatten Vorarbeiten in gnotobiotischen TLR2^{-/-}-IL-10^{-/-}- und TLR4^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren gezeigt, dass die TLR2 und TLR4-Defizienz vor der *C. jejuni*-induzierten Kolitis in diesen Tieren schützte. Dies ging mit reduzierter Konzentration der Zytokine in den TLR2^{-/-}-IL-10^{-/-}- und

TLR4^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren einher [Haag *et al.* 2012]. Darauf aufbauend wurde hier geprüft, ob NOD2 am Krankheitsbild der *C. jejuni*-Kolitis beteiligt ist.

Im ersten Experimentalansatz wurden gnotobiotische WT- und NOD2^{-/-}-Tiere peroral mit *C. jejuni* 81-176 infiziert. Diese Tiere zeigten hinsichtlich klinischen Zustands und Histopathologie des Kolons nur eine geringe makroskopische Symptomatik [Abb. 3.3 & 3.4]. Auf Zytokinebene des angeborenen Immunsystems führte *C. jejuni* hauptsächlich im Kolon sowohl auf Expressionsebene als auch auf Proteinebene zu einer deutlichen Steigerung der Produktion von mehreren proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , MCP-1, IL-6 und IL-1- β und dem antiinflammatorischen Zytokin IL-10. Nur bei IL-23p19 wurde die Genexpression durch die Entzündung vermindert [Abb. 3.7-10]. Auch die Zytokine des erworbenen Immunsystems wie IFN- γ , IL-17A und IL-22 wurden in Folge der Infektion mit *C. jejuni* vornehmlich im Kolon verstärkt exprimiert [Abb. 3.12-14]. Die *C. jejuni*-Infektion führte zu keiner makro- oder mikroskopisch sichtbaren Symptomatik, aber zu einer Immunsystemaktivierung mit Zunahme der Zytokinkonzentrationen im Kolon. Deshalb wurde dieses Modell als Kolonisationsmodell von *C. jejuni* in gnotobiotischen WT- und NOD2^{-/-}-Tieren bezeichnet.

Im zweiten Experimentalansatz wurden gnotobiotische IL-10^{-/-}- und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tiere ebenfalls peroral mit *C. jejuni* 81-176 infiziert. Bei beiden Tiergruppen verschlechterte sich der klinische Zustand der Tiere deutlich und in der Histopathologie zeigte sich eine ulzerierende Kolitis [Abb. 3.17-18]. Auf Zytokinebene des angeborenen Immunsystems führte die Infektion mit *C. jejuni* insgesamt zu einer deutlichen Steigerung der Genexpression und Proteinproduktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1- β , NO, TNF- α , IL-6 und MCP-1 nicht nur im Kolon, sondern auch teilweise in den mesenterialen Lymphknoten (mLN).

Bei den IL-10^{-/-}- und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren führte die Infektion mit *C. jejuni* zu einer deutlichen Abnahme der IL-6-Konzentration in der Milz [Abb. 3.20/22]. Möglicherweise reduziert sich die Zahl der IL-6-produzierenden Zellen in der Milz *post infectionem*, verursacht durch eine Wanderung dieser Zellen in das Kolon, ausgelöst durch den inflammatorischen Reiz der Kolitis dort. Eine Färbung der IL-6 produzierenden Zellen in der Milz bei naiven und infizierten IL-10^{-/-}- und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren könnte diese Frage klären.

Die Expression des Mucin-2, das die Mucosa schützt, war in Folge der Infektion mit *C. jejuni* stark reduziert. Die Zytokine des erworbenen Immunsystems (IFN- γ , IL-17A, IL-22) wurden ebenfalls in Folge der Infektion mit *C. jejuni* vor allem im Kolon verstärkt exprimiert [Abb. 3.24-26]. Aus der verschlechterten Klinik und Histopathologie der Tiere und der parallel dazu ansteigenden Zytokinproduktion wurde dieses Modell als Entzündungsmodell von *C. jejuni* in gnotobiotischen IL-10^{-/-}- und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren charakterisiert.

Damit führte die NOD2-Defizienz in beiden Infektionsmodellen nicht zu einer schwächeren Immunantwort auf Zytokinebene gegenüber *C. jejuni*, sondern im Gegenteil zu einer verstärkten Immunantwort.

4.5 NOD2 verstärkte die Symptomatik der *C. jejuni*-Kolitis bei verminderter Immunsystemaktivierung

4.5.1 NOD2 verstärkte den klinischen Zustand und die Histopathologie nach *C. jejuni*-Infektion

In gnotobiotischen Mäusen im Kolonisationsmodell hatte NOD2 nach Infektion mit *C. jejuni* keinen Einfluss auf den klinischen Zustand der Tiere und die Histopathologie im Kolon [Abb. 3.3]. Bemerkenswert ist, dass die Infektion nur bei den NOD2^{-/-}-Tieren zu einer signifikanten Verkürzung des Dünndarms führte. Dies wird normalerweise als Zeichen einer Entzündung des betreffenden Darmabschnitts gewertet [Okayasu *et al.* 1990]. Für *Helicobacter hepaticus*, ebenfalls ein Proteobakterium wie *C. jejuni*, wurde gezeigt, dass es eine Entzündung im Dünndarm von NOD2^{-/-}-Tieren auslösen konnte [Biswas *et al.* 2010]. Da der Schwerpunkt der *C. jejuni*-Infektion und -Kolitis in dieser Arbeit auf dem Kolon lag, wurde der Dünndarm allerdings nicht weiter untersucht.

Im Gegensatz dazu zeigte sich im IL-10^{-/-}-Entzündungsmodell, dass die NOD2-Defizienz die Tiere klinisch vor einem schwereren Verlauf der durch *C. jejuni* ausgelösten Kolitis schützte. Dies spiegelte sich auch im geringeren Auftreten von okkultem Blut in den Faeces sowie in der schwächeren Histopathologie im Kolon der NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tiere wider [Abb. 3.17/18].

In IL-10^{-/-}- und NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren mit SPF-Flora wurde gezeigt, dass NOD2 im Alter von 18 Wochen die chronische Kolitis verstärkt, was im Gegensatz zu den hier vorgestellten Daten steht. Die bessere Klinik der NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tiere war begleitet von verringerten proinflammatorischen Zytokinlevels, welche wiederum mit den hier vorgestellten Werten korreliert [Jamontt *et al.* 2013]. Allerdings muss bedacht werden, dass in diesen Tieren mit SPF-Flora kein pathogener Reiz wie z.B. *C. jejuni* vorhanden war und dass es sich um eine chronische Entwicklung der Kolitis handelte.

Sun *et al.* infizierten NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tiere, welche ursprünglich mit SPF-Flora kolonisiert waren, nach einer siebentägigen Antibiose mit *C. jejuni* 81-176. Dabei verschlechterten sich NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tiere histopathologisch nach 21 Tage im Vergleich zu den IL-10^{-/-}-Tieren. Allerdings wiesen die Tiere im Median eine Score von 2,51 bei einem möglichen Maximum von 4 auf und damit ist die Kolitis nur mittelgradig ausgeprägt. Jedoch korrelierten die gemessenen Zytokin-

mengen (mehr proinflammatorische Zytokine bei den NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren) mit den in der hier vorgelegten Arbeit [Sun *et al.* 2014]. Auch muss bedacht werden, dass die Tiere noch Residuen der SPF-Flora aufwiesen und die durch *C. jejuni* ausgelöste Kolitis relativ spät auftrat und auch nicht maximal ausgeprägt war.

4.5.2 Wirkungen von NOD2 in der Architektur des Kolonepithels

Die Untersuchungen des Kolonepithels zeigten, dass die NOD2-Defizienz eine Zunahme sowohl proliferativer als auch apoptotischer Vorgänge *post infectionem* im Kolonisationsmodell zu Folge hatte [Abb. 3.5]. Es wurde bereits beschrieben, dass NOD2-Defizienz zu einer verstärkten Apoptose führt [Cruikshank *et al.* 2008], möglicherweise via PPP2R5E, einer Variante der Protein-Phosphatase 2A, mit der NOD2 interagiert [Nimmo *et al.* 2011].

Im Entzündungsmodell nach Infektion mit *C. jejuni* zeigte sich ein verändertes Bild. So führte die NOD2-Defizienz zu einer verstärkten Proliferation und zu einer geringeren Apoptose [Abb. 3.19]. Die verringerte Apoptose trotz vorhandener NOD2-Defizienz ist hier als Zeichen einer geringeren Zellschädigung bei den NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren zu werten. Dies ist konsistent mit deren besserem Erscheinungsbild im klinischen Zustand und in der Histopathologie.

4.5.3 NOD2 begrenzte die Aktivierung des angeborenen Immunsystems

Bei gnotobiotischen WT-Mäusen im Kolonisationsmodell kam es nach *C. jejuni*-Infektion nur bei NOD2-Defizienz zu einer Verminderung der Expression von Mucin-2. In gnotobiotischen IL-10-defizienten Tieren im Entzündungsmodell führte die Infektion mit *C. jejuni* – wahrscheinlich über die Zerstörung der Becherzellen, welche Mucin-2 produzieren, zu einer Reduktion der Mucin-2-Expression bei allen Tieren. Hier war sowohl bei den naiven als auch infizierten Tieren der positive Einfluss von NOD2 auf die Mucin-2-Expression ersichtlich [Abb. 3.7 & 20]. NOD2 interagiert mit GALNT2, einem GalNAc-Familienmitglied, welches wichtig für Mucin-2-Produktion ist [Nimmo *et al.* 2011, Bennett *et al.* 2012]. Der Einfluss von NOD2 auf die Mucin-2-Expression in den vorgestellten Arbeiten kann möglicherweise durch GALNT2 vermittelt sein. Auch war die Expression von IL-18 nach Infektion mit *C. jejuni* sowohl im Kolonisationsmodell bei den WT-Tieren als auch im Entzündungsmodell bei den IL-10^{-/-}-Tieren nur bei den Tieren mit einer NOD2-Defizienz reduziert [Abb. 3.7 & 20]. IL-18 ist wichtig für die Wiederherstellung der Gewebeintegrität nach bakteriellen Infektionen und wird u.a. durch NOD2 induziert [Arend *et al.* 2008, Hedl *et al.* 2014].

Desgleichen hatte NOD2 einen positiven Einfluss auf die Expression von IL-23 im Kolonisations- und Entzündungsmodell [Abb. 3.7 & 20]. Unterstützt wird dies dadurch, dass NOD2 die IL-

23-Expression in dendritischen Zellen verstärken kann. Eine Kostimulation dieser Zellen mit einem TLR2- bzw. NOD1-Ligand neben der Stimulation mit dem NOD2-Liganden MDP führte zu einer Steigerung der IL-23-Expression [van Beelen *et al.* 2007, Schwarz *et al.* 2013]. Die klinische Relevanz dieser Befunde zeigt sich darin, dass Defekte im IL-23-Signalweg selbst mit einem erhöhten Risiko für chronisch entzündliche Darmerkrankungen einher gehen [Abraham *et al.* 2009].

Im Kolonisationsmodell bei den WT-Tieren führte die NOD2-Defizienz zu einer gesteigerten Anzahl an Markophagen im Kolon und erhöhten Werten des Entzündungsmarkers Stickstoffmonoxid und des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 im Kolon sowie der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-6 und MCP-1 in den mLN *post infectionem* [Abb. 3.8/9]. Die verstärkte Sekretion von IL-10 im Kolon der NOD2^{-/-}-Tiere war dagegen unerwartet. Bisher wurde in der Literatur für NOD2-Mutationen nur ein hemmender Einfluss auf die IL-10-Produktion beschrieben [Chen *et al.* 2008, Ngouchi *et al.* 2009].

In der Milz führte die NOD2-Defizienz im Kolonisationsmodell unabhängig von der Infektion und im Entzündungsmodell *post infectionem* zu erhöhten Werten an IL-6 [Abb. 3.10 & 22].

Außerdem zeigten im naiven Zustand die NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tiere eine verstärkte Sekretion an NO, TNF- α und IL-12p70 im Kolon im Vergleich [Abb. 3.21]. Diese Unterschiede gingen im Rahmen der Infektion mit *C. jejuni* im Entzündungsmodell verloren. Möglicherweise wurde durch die starke Kolitis bei den IL-10^{-/-}-Tieren auch eine NOD2-unabhängige Aktivierung dieser proinflammatorischen Zytokine ausgelöst. Ebenfalls muss bedacht werden, dass bei diesen Tieren die NOD2-Expression nach Infektion mit *C. jejuni* reduziert war und dadurch ein Einfluss von NOD2 geringer war als bei den naiven Tieren.

Im Entzündungsmodell waren bei NOD2-Defizienz gesteigerte Werte an MCP-1 in den mLN *post infectionem* zu beobachten [Abb. 3.22].

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass NOD2 sowohl in WT-Tieren als auch in IL-10^{-/-}-Tieren nach *C. jejuni*-Infektion einen hemmenden und regulierenden Einfluss auf die Sekretion sowohl pro- als auch antiinflammatorischer Zytokine des angeborenen Immunsystems hat.

4.5.4 NOD2 begrenzte auch die Aktivierung des erworbenen Immunsystems

Im Kolonisationsmodell in gnotobiotischen WT-Tieren mit NOD2-Defizienz zeigte sich eine erhöhte Zellzahl an T-Zellen insgesamt und deren Subpopulation der regulatorischen T-Zellen nach Infektion mit *C. jejuni* [Abb. 3.11]. In diesem Modell hatte NOD2 keinen Einfluss auf die Sekretion der gemessenen Zytokine dieser Zellen.

Im Entzündungsmodell in IL-10^{-/-}-Tieren hatte NOD2 einen reduzierenden Einfluss auf die Akquirierung von B-Zellen, T-Zellen insgesamt und deren Subpopulation der regulatorischen T-Zellen nach Infektion [Abb. 3.23]. Es ist beschrieben, dass NOD2 relevant ist für das Überleben von FoxP3-positiven T-Zellen [Rahman *et al.* 2010].

Nach Infektion mit *C. jejuni* zeigte sich bei NOD2-Defizienz in allen beurteilten Kompartimenten eine deutlich erhöhte Produktion des Th1-Zytokins IFN-g. Es konnte gezeigt werden, dass NOD2 die Produktion von IFN-g in Peyerschen Plaques im Kolon von Tieren mit kommensaler Darmflora hemmt [Barreau *et al.* 2010]. Auch die Expression von IL-22 war im Kolon bei NOD2-Defizienz deutlich erhöht nach Infektion mit *C. jejuni* [Abb. 3.26]. IL-22 ist in diesem Modell als antiinflammatorisch zu werten, da diesem Zytokin im Rahmen einer Kolitis protektive Eigenschaften zu geschrieben werden [Rutz *et al.* 2013]. Die erhöhte Konzentration an IL-22 bei den infizierten NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren ist auch konsistent mit deren besserem Befund im klinischen und histopathologischen Zustand.

Das im angeborenen Immunsystem aufgetretene Phänomen, dass NOD2 die Induktion sowohl pro- als auch antiinflammatorischer Zytokine begrenzt, setzt sich im erworbenen Immunsystem fort.

4.5.5 Die Rolle von NOD2 in den beiden murinen *C. jejuni*-Infektionsmodellen

Zusammenfassend war im Kolonisationsmodell klinisch und histopathologisch kein Einfluss von NOD2 feststellbar. Allerdings zeigte sich auf Zytokinebene des angeborenen Immunsystems, dass NOD2 in den WT-Tieren die Produktion sowohl pro- als auch antiinflammatorischer Zytokine begrenzte. Da nicht nur die proinflammatorischen Zytokine im Exzess vorhanden waren, sondern auch die antiinflammatorischen Zytokine, neutralisierten sich die Wirkungen und die Tiere zeigten eine gesunde klinische Erscheinung. Diese Befunde werden durch Untersuchungen an NOD2^{-/-}-Tieren nach intrarektaler Ethanol-Gabe bestätigt. Im Kolongewebe wurden signifikant mehr IL-12p70 und Transforming growth factor (TGF)-beta produziert. Nach Stimulation von *Lamina propria*-Zellen mit anti-CD3 und -CD28 war auch eine Steigerung der IFN-g-Produktion messbar [Amendola *et al.* 2014].

Dagegen war im Entzündungsmodell in IL-10-defizienten Tieren eine Verstärkung der makroskopischen Symptomatik und Histopathologie der IL-10^{-/-}-Tiere ersichtlich. Im Gegensatz dazu war aber die Produktion der pro- und antiinflammatorischen Zytokine sowohl des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems bei den IL-10^{-/-}-Tieren geringer als bei den NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren. Dies korreliert mit den Daten aus dem Kolonisationsmodell in gnotobiotischen WT- und NOD2^{-/-}-Tieren, die mit *C. jejuni* infiziert worden waren. Die vermehrte Zahl an regulatori-

schen FoxP3-positiven T-Zellen kann für die bessere klinische Erscheinung der Tiere nicht verantwortlich sein. Diese Zellen sind in IL-10^{-/-}-Tieren nicht funktionsfähig und deren inhibitorischen Zytokine, IL-10 und TGF- β , werden **hier** nicht produziert [Vignali *et al.* 2008]. IL-10 fehlt *per se* und TGF- β konnte in diesem *C. jejuni*-Entzündungsmodell mittels ELISA nicht detektiert werden – lag also unter der Nachweisgrenze [Daten nicht gezeigt]. Ob allein die vermehrte Produktion von IL-22 die Waage gegenüber der gesteigerten Produktion der proinflammatorischen Zytokine in den NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren hielt, wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Sollte eine Blockade der IL-22-Wirkung durch Gabe von IL-22-Antikörpern zu der den IL-10^{-/-}-Tieren entsprechenden Klinik in den NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren führen, läge der schützende Effekt der NOD2-Defizienz in diesem Modell alleine an der vermehrten IL-22-Produktion. Bei Nicht-eintreten dieses Effekts rückten ein Überschuss an anderen antiinflammatorischen Zytokinen, vermehrtes Auftreten weiterer Suppressorzellen oder auch das wichtigste immunsuppressive Molekül im Körper, Kortisol, in den Fokus der weiteren Untersuchungen.

Zusammenfassend betrachtet lässt sich feststellen, dass NOD2 in den beiden Modellen der akuten *C. jejuni*-Infektion in gnotobiotischen Mäusen die Produktion sowohl pro- als auch antiinflammatorischer Zytokine reguliert und begrenzt.

4.6 Regulation der Zytokinproduktion durch NOD2 vom Kontext abhängig

Die hier beschriebenen Modelle sind beide akute Infektionsmodelle in gnotobiotischen Tieren. In beiden Modellen war feststellbar, dass das NOD2-Signaling die Produktion sowohl pro- als auch antiinflammatorischer Zytokine hemmte. Eine Überexpression von NOD2 könnte also insbesondere in den IL-10-defizienten Tieren sogar zu einer weiteren Verschlechterung der Klinik führen. Allerdings ist die Einschränkung dieser Begrenzung der Zytokinproduktion durch NOD2 in den gnotobiotischen Tieren durch Senkung der Produktion von NOD2 sinnvoll, da *C. jejuni* sich hier fest ansiedeln kann und als potenzielle akute Bedrohung schnellstmöglich eliminiert werden muss um weiteren möglichen Schaden vom Wirt abzuwenden.

Doch wie sieht es bei Tieren mit kommensaler Darmflora aus, welche mit *C. jejuni* infiziert werden? WT-Tiere mit SPF-Darmflora besitzen eine natürliche Kolonisationsresistenz gegen *C. jejuni* und scheiden diesen innerhalb von 48h komplett aus [Bereswill *et al.* 2011]. Dabei wird die Expression von NOD2 signifikant erhöht, was noch 12 Tage nach der letzten Infektion nachweisbar ist [Daten nicht gezeigt]. Eine Erklärung dafür kann sein, dass für diese Tiere *C. jejuni* keine weiterführende Bedrohung darstellt, da die Kolonisationsresistenz ausreichend zur Abwehr dieses Pathogens ist. Eine Immunantwort darauf, die auch zu weiteren Entzündungsvorgängen führen würde, wäre für den Wirt sogar schädlich. Daher ist hier die Regulation der Zytokinpro-

duktion durch NOD2 und ihre Verstärkung durch Erhöhung der Expression ein sinnvoller Mechanismus um Schaden vom Wirt abzuwenden.

Ein Hinweis für die Regulation der Zytokinproduktion durch NOD2 findet sich auch bei Untersuchungen von Patienten mit systemischem Lupus erythematosus (SLE). Patienten, welche seit min. 10 Jahren krankheitsfrei waren und entweder nie oder seit ebenfalls min. 10 Jahren keine Immunsuppressiva erhalten hatten, zeigten in plasmazytoiden dendritischen Zellen eine Steigerung der NOD2-Produktion im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Plasmazytoide dendritische Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese des SLE [Yu *et al.* 2011; Dema *et al.* 2014].

Einen weiteren Hinweis bieten Makrophagen, welche einem „organischen Staub-Extrakt“ aus Schweineställen ausgesetzt waren. Diese zeigten eine vermehrte Produktion von NOD2. Makrophagen mit NOD2^{-/-}-Defizienz zeigten nach der Kontakt mit diesem Staub-Extrakt erhöhte Werte an proinflammatorischen Zytokinen. Dies spricht ebenfalls dafür, dass NOD2 in diesem Modell die Zytokinproduktion ebenfalls reguliert. Da der Staub-Extrakt aus den Ställen prinzipiell keine infektiöse Bedrohung darstellt, wird die Regulation der Zytokinproduktion durch NOD2 verstärkt durch Steigerung der NOD2-Expression und -Translation um die Immunantwort gegen den Reiz, ausgelöst durch den Staub, einzuschränken [Poole *et al.* 2011].

4.7 Mögliche Mechanismen der Regulation der Zytokinproduktion durch NOD2

Im Folgenden werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert, wie die Regulation der Zytokinproduktion durch NOD2 ablaufen könnte. NOD2 hemmt die TLR2-Immunantwort in Folge einer längeren Stimulation mit dem NOD2-Liganden MDP. Für die TLR2-Immunantwort wurde nicht nur die Induktion von pro-, sondern auch von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-10 und IL-22 *ex vivo* beschrieben [Rojas-Bernabé *et al.* 2014]. Damit ist die in der vorliegenden Arbeit beschriebene überschießende Zytokinproduktion bei den Tieren mit NOD2-Defizienz möglicherweise die Folge einer unkontrollierten TLR2-Immunantwort der Tiere als Folge auf die Infektion mit *C. jejuni*. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Detektion der Bakterien über TLR2 und TLR4 die Symptomatik der *C. jejuni*-Infektion in gnotobiotischen Mäusen mit und ohne gleichzeitiger IL-10-Defizienz verstärkt. So war in jeweiliger Abwesenheit dieser beiden TLRs die Immunantwort gegen *C. jejuni* vermindert [Haag *et al.* 2012].

Das Phänomen der TLR2-Regulation durch NOD2 wurde *ex vivo* sowohl in dendritischen Zellen als auch in Makrophagen beschrieben. In dendritischen Zellen hemmte NOD2 in Folge der Stimulation mit MDP die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB, insbesondere von dessen Untereinheit c-Rel [Watanabe *et al.* 2004]. Diese Hemmung verlief via Steigerung der Aktivität

von „Interferon Regulatory Factor“ (IRF) 4 [Strober *et al.* 2008]. In Makrophagen führte die NOD2-Stimulation mit MDP durch eine Reduktion von „Interleukin-1 receptor associated kinase“ (IRAK) -1 oder eine Aktivitätssteigerung von IRAK-M zur beobachteten Hemmung des TLR4-Signalweges [Hedl *et al.* 2007].

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von NOD2 Mäuse vor einer Kolitis schützte, ausgelöst durch die intrarektale Gabe vom TLR2-Liganden Peptidoglycan oder von TNBS [Yang *et al.* 2007]. Auch eine Vorbehandlung der Tiere mit MDP schützte vor der Kolitisinduktion, wiederum via IRF4. Hier wurde nicht nur die TLR2-, sondern auch die TLR3-, TLR4-, TLR5- und TLR9-Immunantwort durch NOD2 gehemmt [Watanabe *et al.* 2008]. Borm *et al.* zeigten, dass diese MDP-vermittelte Toleranz durch NOD2 von der MDP-Dosis abhängig war [Borm *et al.* 2008].

Vor kurzem wurden weitere Mediatoren dieser Toleranz durch NOD2 beschrieben. In Makrophagen führte die chronische Stimulation mit MDP zu einer Steigerung der NFkB1-Expression. NFkB1 band an „Activating transcription factor“ (ATF) 3 und führte darüber zu einer Reduktion der Zytokinproduktion [Zheng *et al.* 2013]. Auch führte in Mäusen mit TNBS-Kolitis die MDP-Vorbehandlung nicht nur zu einer Steigerung der IRF4-Expression, sondern auch zu einer vermehrten Bindung von IRF4 an „Tumor necrosis factor receptor associated factor“ (TRAF) 6 und RICK. IRF4 hemmte dadurch die Lys63-vermittelte Polyubiquitinierung dieser beiden Enzyme [Watanabe *et al.* 2014]. Dagegen sieht die Situation lokal in Dünn- und Dickdarmepithelzellen ganz anders aus. In den jeweiligen Zelllinien arbeiten NOD2 und TLRs synergistisch proinflammatorisch und stabilisieren die epitheliale Barriere [Hiemstra *et al.* 2012]. Die in der vorliegende Arbeit beschriebene „Zytokinexzesshemmung“ bei den WT- und IL-10^{-/-}-Tieren nach Infektion mit *C. jejuni* durch NOD2 fügt sich in diesen Zusammenhang ein.

Um herauszufinden, welcher der genannten Signalwege in der hier beschriebenen *C. jejuni*-Infektion die NOD2-vermittelte Reduktion der Zytokinproduktion zu verantworten hat, werden die Expression und Aktivität von IRF4, IRAK-1 und IRAK-M, ATF3, TRAF6 und RICK zu untersuchen sein. Eine Verschlimmerung der Immunantwort (auf das Niveau der IL-10^{-/-}-Tiere) bei den NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tieren durch eine Blockade von TLR2 mittels Antikörper würde die These unterstützen, dass der Vorteil der NOD2^{-/-}-IL-10^{-/-}-Tiere durch eine fehlende Hemmung der TLR2-Immunantwort verursacht wird.

Allerdings ist die Hemmung der TLR2-Immunantwort durch NOD2 gegen *C. jejuni* zum Nachteil der Tiere, da diese einen schlechteren klinischen Zustand und eine stärkere Kolitis zeigten. Tiere mit zusätzlicher NOD2-Defizienz, bei denen keine TLR2-Hemmung möglich ist, wiesen in

der akuten Kolitis einen Vorteil hinsichtlich Klinik und Histopathologie auf, ausgelöst durch die ungehemmte TLR2-Immunantwort.

Im Transfer zu den WT-Tieren mit SPF-Darmflora, infiziert mit *C. jejuni*, bedeutet es, dass durch Verstärken der Expression von NOD2 eine stärkere Hemmung der TLR2-Immunantwort erfolgt und dadurch eine inflammatorische Reaktion des Wirts auf das potenzielle Pathogen *C. jejuni* verhindert wird.

Neben der NOD2-vermittelten Reduktion der TLR2-Immunantwort ist eine Verminderung der NFkB-Aktivierung durch NOD2 über den Ko-Transkriptionsfaktor TLE1 beschrieben [Nimmo *et al.* 2011]. Die Regulation der Zytokinproduktion durch NOD2 wäre bei den gnotobiotischen IL-10^{-/-}-Tieren nach Infektion mit *C. jejuni* via TLE1 auch möglich und sollte weiter untersucht werden.

Es sollte weiterhin beachtet werden, dass NOD2 auch im Rahmen der Autophagie eine wichtige Rolle spielt. Unter Autophagie ist nicht nur die Beseitigung intrazellulärer Pathogene zu verstehen. Auch Abbau von zelleigenen Proteinen kann über die Autophagie geschehen. NOD2 bindet nicht nur an ATG16L1 um dann das Autophagosom an die Plasmamembran zu translozieren [Strober *et al.* 2011]. Es interagiert auch mit Vimentin, welches für die Autophagosombildung wichtig ist [Nimmo *et al.* 2011]. So kann NOD2 auch ein Ziel an proinflammatorischen Zytokinen via Autophagie reduzieren. Bei NOD2-Defizienz ist diese Reduktion gestört.

Zusammenfassend betrachtet ist der Mechanismus der Hemmung v.a. des TLR2- und möglicherweise auch des TLR4-Signalwegs durch NOD2 aber die wahrscheinlichste Erklärung für die Regulation der Produktion sowohl pro- als auch antiinflammatorischer Zytokine, die im Rahmen der *C. jejuni*-Infektion in den gnotobiotischen Tiere beobachtet wurde.

Literaturverzeichnis

- Abraham C, Cho J. Interleukin-23/Th17 pathways and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:1090-1100
- Abreu MT. Toll-like receptor signaling in the intestinal epithelium: how bacteria recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol* 2010;10:131-144
- Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 1999;17:593-623
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124:783-801
- Al-Sayeqh AF, Loughlin MF, Dillon, Mellits KH, Connerton IF. *Campylobacter jejuni* activates NF-kappaB independently of TLR2, TLR4, Nod1 and Nod2 receptors. *Microb Pathog* 2010;49:294-304
- Amendola A, Butera A, Sanchez M, Strober W, Boirivant M. Nod2 deficiency is associated with an increased mucosal immunoregulatory response to commensal microorganisms. *Mucosal Immunol* 2014;7:391-404
- Arend WP, Palmer G, Gabay C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immuol Rev* 2008;223:20-38
- Bacon DJ, Alm RA, Burr DH et al. Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infect Immun* 2000;68:4384-4390
- Barreau F, Madre C, Meinzer U et al. Nod2 regulates the host response towards microflora by modulating T cell function and epithelial permeability in mouse Peyer's patches. *Gut* 2010;59:207-217
- Bennett EP, Mandel U, Clausen H, Gerken TA, Fritz TA, Tabak LA. Control of mucin-type O-glycosylation: a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Glycobiology* 2012;22:736-756
- Bereswill S, Fischer A, Plickert R et al. Novel murine infection models provide deep insights into the "ménage à trois" of *Campylobacter jejuni*, microbiota and host innate immunity. *PLoS One* 2011;6:e20953
- Biswas A, Liu YJ, Hao L et al. Induction and rescue of Nod2-dependent Th1-driven granulomatous inflammation of the ileum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:12739-12744
- Borm ME, van Bodegraven AA, Mulder CJ, Kraal G, Bouma G. The effect of NOD2 activation on TLR2-mediated cytokine responses is dependent on activation dose and NOD2 genotype. *Genes Immun* 2008;9:274-278
- Borzutzky A, Fried A, Chou J, Bonilla FA, Kim S, Dedeoglu F. NOD2-associated diseases: Bridging innate immunity and autoinflammation. *Clin Immunol* 2010;134:251-261
- Burrough ER, DiVerde KD, Sahin O, Plummer PJ, Zhang Q, Yaeger MJ. Expression of toll-like receptors 2 and 4 in subplacental trophoblasts from guinea pigs (*Cavia porcellus*) following infection with *Campylobacter jejuni*. *Vet Pathol* 2011;48:381-388
- Butzler JP. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:868-876
- Centers for disease control and prevention (CDC). Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food-10 States 2009. *MMWR* 2010;59:418-422
- Chen G, Shaw MH, Kim Y, Núñez G. NOD-Like Receptors: Role in Innate Immunity and Inflammatory Disease. *Annu Rev Pathol* 2009; 4:365-98
- Choi J, Cox AD, Li J, McCready W, Ulanova M. Activation of Innate Immune Responses by Haemophilus influenzae Lipooligosaccharide. *Clin Vaccine Immunol* 2014;21:769-776
- Coulombe F, Divangahi M, Veyrier F et al. Increased NOD2-mediated recognition of N-glycolyl muramyl dipeptide. *J Exp Med* 2009;206:1709-1716

- Cruickshank SM, Wakenshaw L, Cardone J, Howdle PD, Murray PJ, Carding SR. Evidence for the involvement of NOD2 in regulating colonic epithelial cell growth and survival. *World J Gastroenterol* 2008;14:5834-5841
- De Saussure PP. Management of the returning traveler with diarrhea. *Therap Adv Gastroenterol* 2009;2:367-375
- Dema B, Charles N. Advances in mechanisms of systemic lupus erythematosus. *Discov Med* 2014;17:247-255
- Dieleman LA, Ridwan BU, Tennysan GS, Beagley KW, Bucy RP, Elson CO. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology* 1994;107:1643-1652
- Endt K, Stecher B, Chaffron S et al. The microbiota mediates pathogen clearance from the gut lumen after non-typhoidal *Salmonella* diarrhea. *PLoS Pathog* 2010;6:e1001097
- Fox JG; Rogers AB, Whary MT et al. Gastroenteritis in NF-kappaB-deficient mice is produced with wild-type *Campylobacter jejuni* but not with *C. jejuni* lacking cytolethal distending toxin despite persistent colonization with both strains. *Infect Immun* 2004;72:1116-1125
- Garrity, GM, Bell JA, Lilburn TG. Taxonomic Outline of the Prokaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition, Release 5.0., New York, USA: Springer-Verlag, 2004:137-139
- Goodman MJ, Pearson KW, McGhie D, Dutt S, Deodhar SG. *Campylobacter* and *Gardia lamblia* causing exacerbation of inflammatory bowel disease. *Lancet* 1980;2:1247
- Gradel KO, Nielsen HL, Schønheyder HC, Ejlersen T, Kristensen B, Nielsen H. Increased short- and long-term risk of inflammatory bowel disease after salmonella or campylobacter gastroenteritis. *Gastroenterology* 2009;137:495-501
- Grimes CL, Ariyananda LD, Melnyk J, O'Shea EK. The innate immune protein Nod2 binds directly to MDP, a bacterial cell wall fragment. *J Am Chem Soc* 2012;134:13535-13537
- Haag LM, Fischer A, Otto B et al. *Campylobacter jejuni* induces acute enterocolitis in gnotobiotic IL-10^{-/-} mice via Toll-like-receptor-2 and -4 signaling. *PLoS One* 2012;7:e40761
- Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ et al. Association between insertion mutation in DNO2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 2001;357:1925-1928
- Hedl M, Li J, Cho JH, Abraham C. Chronic stimulation of Nod2 mediates tolerance to bacterial products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:19440-19445
- Hedl M, Zheng S, Abraham C. The IL18RAP Region Disease Polymorphism Decreases IL-18RAP/IL-18R1/IL-1R1 Expression and Signaling through Innate Receptor-Initiated Pathways. *J Immunol* 2014;192:5924-5932
- Henckaerts L, Vermeire S. NOD2/CARD15 disease associations other than Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:235-241
- Hiemstra IH, Bouma G, Geerts D, Kraal G, den Haan JM. Nod2 improves barrier function of intestinal epithelial cells via enhancement of TLR responses. *Mol Immunol* 2012;52:264-272
- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603
- Hugot JP, Zaccaria I, Cavanaugh J et al. Prevalence of CARD15/NOD2 mutations in Caucasian healthy people. *Am J Gastroenterol* 2007;102:1259-1267
- Jamontt J, Petit S, Clark N, Parkinson SJ, Smith P. Nucleotide-binding oligomerization domain 2 signaling promotes hyperresponsive macrophages and colitis in IL-10-deficient mice. *J Immunol* 2013;190:2948-2958

- Janssen R, Krogfelt KA, Cawthraw SA, van Pelt W, Wagenaar JA, Owen RJ. Host-Pathogen Interactions in *Campylobacter* Infections: the Host Perspective. *Clin Microbiol Rev* 2008;21:505-518
- Jess T, Simonsen J, Nielsen NM et al. Enteric Salmonella or Campylobacter infections and the risk of inflammatory bowel disease. *Gut* 2011;60:318-324
- Jones MA, Töttemeyer S, Maskell DJ, Bryant CE, Barrow PA. Induction of proinflammatory responses in the human monocytic cell line THP-1 by Campylobacter jejuni. *Infect Immun* 2003;71:2626-2633
- Kalischuk LD, Buret AG. A role for Campylobacter jejuni-induced enteritis in inflammatory bowel disease? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;298:G1-9
- Kanneganti TD, Lamkanfi M, Núñez G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity* 2007;27:549-559
- Kaser A, Blumberg RS. Autophagy, microbial sensing, endoplasmic reticulum stress, and epithelial function in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2011;140:1738-1747
- Kim JS, Artymovich KA, Hall DF et al. Passage of Campylobacter jejuni through the chicken reservoir or mice promotes phase variation in contingency genes Cj0045 and Cj0170 that strongly associates with colonization and disease in a mouse model. *Microbiology* 2012;158:1304-1316
- Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005;307:731-734
- Korlath JA, Osterholm MT, Judy LA, Forfang JC, Robinson RA. A point-source outbreak of Campylobacteriosis associated with consumption of raw milk. *J Infect Dis* 1985;152:592-596
- Lee KH, Biswas A, Liu YJ, Kobayashi KS. Proteasomal degradation of Nod2 protein mediates tolerance to bacterial cell wall components. *J Biol Chem* 2012;287:39800-39811
- Lippert E, Karrasch T, Sun X et al. Gnotobiotic IL-10; NF-kappaB mice develop rapid and severe colitis following Campylobacter jejuni infection. *PLoS One* 2009;4:e7413
- Mansfield LS, Bell JA, Wilson DL et al. C57BL/6 and congenic interleukin-10-deficient mice can serve as models of *Campylobacter jejuni* colonization and enteritis. *Infect Immun* 2007;75:1099-1115
- Mo J, Boyle JP, Howard CB, Monie TP, Davis BK, Duncan JA. Pathogen Sensing by Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing Protein 2 (NOD2) Is Mediated by Direct Binding to Muramyl Dipeptide and ATP. *J Biol Chem* 2012;287:23057-23067
- Mondot S, Barreau F, Al Nabhani Z et al. Altered gut microbiota composition in immune-impaired Nod2(-/-) mice. *Gut* 2011;61:634-635
- Moore CB, Medina MA, van Deventer HW et al. Downregulation of immune signaling genes in patients with large surface burn injury. *J Burn Care Res* 2007;28:879-887
- Mukhopadhyay I, Hansen R, El-Omar EM, Hold GL. IBD-what role do Proteobacteria play? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012;9:219-230
- Murphy K. *Janeway's Immunobiology*. 8th ed. New York, USA: Garland Science, 2011:37-73
- Newman A, Lambert JR. Campylobacter jejuni causing flare-up in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1980;2:919
- Nimmo ER, Stevens C, Phillips AM et al. TLE1 modifies the effects of NOD2 in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2011;141:972-981

- Noguchi E, Homma Y, Kang X, Netea MG, Ma X. A Crohn's disease-associated NOD2 mutation suppresses transcription of human IL10 by inhibiting activity of nuclear ribonucleoprotein hnRNP-A1. *Nat Immunol* 2009;10:471-479
- O Cróinín T, Backert S. Host epithelial cell invasion by *Campylobacter jejuni*: trigger or zipper mechanism? *Front Cell Infect Microbiol* 2012;2:25
- Ogawa C, Liu YJ, Kobayashi KS. Muramyl dipeptide and its derivatives: peptide adjuvant in immunological disorders and cancer therapy. *Curr Bioact Compd* 2011;7:180-197
- Ogura Y, Bonen DK, Inohara N et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-606
- Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990;98:694-702
- Petnicki-Ocwieja T, Hrcir T, Liu YJ et al. Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:15813-15818
- Philpott DJ, Sorbara MT, Robertson SJ, Croitoru K, Girardin SE. NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2014;14:9-23
- Pils MC, Bleich A, Prinz I et al. Commensal gut flora reduces susceptibility to experimentally induced colitis via T-cell-derived interleukin-10. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17:2038-2046
- Plantinga TS, Crisan TO, Oosting M et al. Crohn's disease-associated ATG16L1 polymorphism modulates pro-inflammatory cytokine responses selectively upon activation of NOD2. *Gut* 2011;60:1229-1235
- Poly F, Threadgill D, Stintzi A. Genomic diversity in *Campylobacter jejuni*: identification of *C. jejuni* 81-176-specific genes. *J Clin Microbiol* 2005;43:2330-2338
- Poole JA, Kielian T, Wyatt TA et al. Organic dust augments nucleotide-binding oligomerization domain expression via an NF- κ B pathway to negatively regulate inflammatory responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011;301:L296-306
- Rahman MK, Midtling EH, Svingen PA et al. The pathogen recognition receptor NOD2 regulates human FOXP3+ T cell survival. *J Immunol* 2010;184:7247-7256
- Rehman A, Sina C, Gavrilova O et al. Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities. *Gut* 2011;60:1354-1362
- Rivas MA, Beaudoin M, Gardet A et al. Deep resequencing of GWAS loci identifies independent rare variants associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 2011;43:1066-1073
- Robert Koch-Institut. *Epidemiologisches Bulletin* Nr. 3 2012;24
- Robertson SJ, Zhou JY, Geddes K et al. Nod1 and Nod2 signaling does not alter the composition of intestinal bacterial communities at homeostasis. *Gut Microbes* 2013;4:222-231
- Rojas-Bernabé A, Garcia-Hernández O, Maldonado-Bernal C et al. *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan activates ERK and p38 MAP kinase and induces production of proinflammatory cytokines in human macrophages through TLR2 and TLR4. *Parasitology* 2014;141:788-800
- Rose A, Kay E, Wren BW, Dallman MJ. The *Campylobacter jejuni* NCTC11168 capsule prevents excessive cytokine production by dendritic cells. *Med Microbiol Immunol* 2012;201:137-144
- Rosenstiel P, Fantini M, Bräutigam K. et al. TNF- α and IFN- γ regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2003;124:1001-1009

- Rutz S, Eidenschenk C, Ouyang W. IL-22, not simply a Th17 cytokine. *Immunol Rev* 2013;252:116-132
- Schwarz H, Posselt G, Wurm P, Ulbing M, Duschl A, Horejs-Hoeck J. TLR(and NOD signaling synergistically induce the production of IL-1 β and IL-23 in monocyte-derived DCs and enhance the expression of the feedback inhibitor SOCS2. *Immunobiology* 2013;218:533-542
- Schwille-Kiuntke J, Enck P, Zendler C et al. Postinfectious irritable bowel syndrome: follow-up of a patient cohort of confirmed cases of bacterial infection with Salmonella or Campylobacter. *Neurogastroenterol Motil* 2011;23:e479-488
- Shanahan MT, Carroll IM, Grossniklaus E et al. Mouse Paneth cell antimicrobial function is independent of Nod2. *Gut* 2014;63:903-910
- Shaw MH, Kamada N, Warner N et al. The ever-expanding function of NOD2: autophagy, viral recognition, and T cell activation. *Trends Immunol* 2011; 32:73-79
- Shroff KE, Cebra JJ. Development of mucosal humoral immune responses in germ-free (GF) mice. *Adv Exp Med Biol* 1995;371A:441-446
- Siegmund B, Fantuzzi G, Rieder F et al. Neutralization of interleukin-18 reduces severity in murine colitis and intestinal IFN-gamma and TNF-alpha production. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;281:R1264-1273
- Siegmund B. Interlukin-18 in intestinal inflammation: friend and foe? *Immunity* 2010;32:300-302
- Smith P, Siddharth J, Pearson R et al. Host genetics and environmental factors regulate ecological succession of the mouse colon tissue-associated microbiota. *PLoS One* 2012;7:e30273
- Snelling WJ, Matsuda M, Moore J, Dooley JS. *Campylobacter jejuni*. *Lett Appl Microbiol* 2005;41:297-302
- Sorbara MT, Philpott DJ. Peptidoglycan: a critical activator of the mammalian immune system during infection and homeostasis. *Immunol Rev* 2011;243:40-60
- Stallmach A, Carstens O. Role of infections in the manifestation or reactivation of inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2002;8:213-218
- Stecher B, Hardt WD. The role of microbiota in infectious disease. *Trends Microbiol* 2008;16:107-114
- Strober W, Kitani A, Fuss I, Asano N, Watanabe T. The molecular basis of NOD2 susceptibility mutations in Crohn's disease. *Mucosal Immunol* 2008;Suppl 1:S5-9
- Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol* 2006;6:9-20
- Strober W, Watanabe T. NOD2, an intracellular innate immune sensor involved in host defense and Crohn's disease. *Mucosal Immunol* 2011;4:484-495
- Sun X, Jobin C. Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Containing Protein 2 Controls Host Response to *Campylobacter jejuni* in Il10^{-/-} Mice. *J Infect Dis* 2014 [Epub ahead of print]
- The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010, *EFSA Journal* 2012;112-116
- Travassos LH, Carneiro LA, Girardin S, Philpott DJ. Nod proteins link bacterial sensing and autophagy. *Autophagy* 2010;6:409-411
- Turvey SE, Broide DH. Innate Immunity. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:24-32

- van Beelen AJ, Zelinkova Z, Taanman-Kueter EW et al. Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity* 2007;27:660-669
- Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008;8:523-532
- Wagner RD. Effects of microbiota on GI health: gnotobiotic research. *Adv Exp Med Biol* 2008;635:41-56
- Wassenaar TM, Blaser MJ. Pathophysiology of *Campylobacter jejuni* infections of humans. *Microbes Infect* 1999;1:1023-1033
- Watanabe T, Asano N, Murray PJ et al. Muramyl dipeptide activation of nucleotide-binding oligomerization domain 2 protects mice from experimental colitis. *J Clin Invest* 2008;118:545- 559
- Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol* 2004;5:800-808
- Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Wakatsuki Y, Uss IJ, Strober W. Nucleotide binding oligomerization domain 2 deficiency leads to dysregulated TLR2 signaling and induction of antigen-specific colitis. *Immunity* 2006;25:473-485
- Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M et al. NOD2 (CARD 15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 2004;53:1658-1664
- Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007;448:427-434
- Yang Z, Fuss IJ, Watanabe T et al. NOD2 transgenic mice exhibit enhanced MDP-mediated down-regulation of TLR2 responses and resistance to colitis induction. *Gastroenterology* 2007;133:1510-1521
- Young KT, Davis LM, Dirita VJ. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:665-679
- Yu SL, Wong CK, Wong PT et al. Down-regulated NOD2 by immunosuppressants in peripheral blood cells in patients with SLE reduces the muramyl dipeptide-induced IL-10 production. *PLoS One* 2011;6:e23855
- Zheng B, Morgan ME, van de Kant HJ, Garssen J, Folkerts G, Kraneveld AD. Transcriptional modulation of pattern recognition receptors in acute colitis in mice. *Biochim Biophys Acta* 2013;1832:2162-2172

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Ursula Catharina Grundmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Die Rolle von NOD2 in der *Campylobacter jejuni*-induzierten Kolitis im gnotobiotischen Mausmodell selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen

Heimesaat MM, Alutis A, Grundmann U, Fischer A, Tegtmeyer N, Böhm M, Kühl AA, Göbel UB, Backert S & Bereswill S. The role of serine protease HtrA in acute ulcerative enterocolitis and extra-intestinal immune responses during *Campylobacter jejuni* infection of gnotobiotic IL-10 deficient mice". *Front Cell Infect Microbiol* 2014;4:77

Heimesaat MM, Fischer A, Alutis M, Grundmann U, Boehm M, Tegtmeyer N, Göbel UB, Kühl AA, Bereswill S & Backert S. The impact of serine protease HtrA in apoptosis, intestinal immune responses and extra-intestinal histopathology during *Campylobacter jejuni* infection of infant mice. *Gut Pathogens* 2014;6:16

Haag LM, Fischer A, Otto B, Grundmann U, Kühl AA, Gübel UB, Bereswill S, Heimesaat MM. *Campylobacter jejuni* infection of infant mice: acute enterocolitis is followed by asymptomatic intestinal and extra-intestinal immune responses. *Eur J Microbiol Immunol* 2012; 2,2-11

Heimesaat MM, Dunay I, Schulze S, Fischer A, Grundmann U, Alutis M, Kühl AA, Tamas A, Toth G, Dunay M, Göbel UB, Reglodi D, Bereswill S. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide ameliorates experimental acute ileitis and extra-intestinal sequelae. *PLOS ONE*, *Manuskript eingereicht*

Danksagung

Zuerst möchte ich Prof. Dr. Dr. Ulf Göbel für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seinem Institut durchführen zu können, danken.

Großer Dank gebührt Prof. Dr. Stefan Bereswill für die Unterstützung bei der Entwicklung der Experimente und dem Verfassen der Arbeit.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich Dr. Markus M. Heimesaat für seine geduldige und engagierte Ausbildung, seine Unterstützung und Hilfe bei der praktischen Durchführung und Auswertung der Experimente aussprechen.

Bei Dr. André Fischer möchte ich mich für die Unterstützung und Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der Experimente bedanken. Dr. Lea-Maxie Haag danke ich für die geduldige und intensive Einarbeitung in die mikrobiologischen Methoden, Dr. Melba Muñoz und Dr. Rita Plickert danke ich für die freundliche Unterstützung. Bei Marie Alutis und Johanna Meier möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und gegenseitige Hilfe bedanken.

Alexandra Bittroff-Leben, Gernot Reifenberger, Ines Puschendorf, Michaela Wattrodt, Silvia Schulze, Ursula Rüschenndorf und Uwe Lohmann gilt großer Dank von meiner Seite für die Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und die sehr freundliche Zusammenarbeit. Den Tierpflegern aus dem FEM, besonders Thomas Strandt, Elfi Decker, und Dominique Heine, danke ich für die praktische Anleitung und gute Zusammenarbeit.

Für die praktische Arbeit bei der Herstellung der histologischen Schnitte bedanke ich mich bei Dr. Anja A. Kühl und Simone Spiekermann. Prof. Britta Siegmund und Dr. Thorsten Strohdanke ich für die freundliche Überlassung der Materialien zur NOD2-Expressionsmessung.

Stellvertretend für das Graduiertenkolleg „IMMUCO“ des Sonderforschungsbereiches 633 der „Deutschen Forschungsgemeinschaft e.V.“ danke ich Dr. Verena Moos und Dr. Tina Kornprobst für das umfangreiche Lehrangebot und die finanzielle Unterstützung sowohl für das Forschungsjahr als auch für die Reisekostenfinanzierung.

Mein Dank geht vor allem auch an meine Familie sowie an Anne Sedlag, Dr. Michael Luecken, Alena Beder und Katharina Völker für die fortwährende Unterstützung und für das immer offene Ohr!