

---

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinikum der Universität

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Die Rolle des NLRP3-Inflammasoms in der  
T-Zell-Differenzierung in einem  
T-Zell-basierten Transferkolitismodell**



Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an

der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Cornelia Reichl  
aus Wien  
2023

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Universität zu München

Berichterstatter: Prof. Dr. Max Schnurr

Mitberichterstatter: PD Dr. Fabian Schnitzler  
Prof. Dr. Ludger Klein

Mitbetreuung durch die  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Peter Düwell

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 09.03.2023

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>5</b>
1.1. Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen .....	5
1.2. Das NLRP3-Inflammasom als Regulator entzündlicher Prozesse im Darm...	8
1.3. Die Bedeutung des NLRP3-Inflammasoms für die lokale Immunhomöostase im Darm .....	12
1.4. Die Rolle von T-Zellen in der Pathogenese von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen .....	14
1.5. Die Rolle des NLRP3-Inflammasoms in der T-Zell-Differenzierung .....	17
1.6. Tiermodelle für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen .....	18
1.7. Zielsetzung der Arbeit.....	20
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>21</b>
2.1. Material.....	21
2.1.1. Technisches Equipment .....	21
2.1.2. Verbrauchsmaterialien.....	21
2.1.3. Chemikalien und Reagenzien.....	22
2.1.4. Pufferlösungen .....	22
2.1.4.1. Pufferlösungen für Arbeiten mit Einzelzellsuspensionen.....	22
2.1.4.2. Pufferlösungen für <i>in vivo</i> Experimente .....	23
2.1.5. Zellkulturreagenzien und Zellkulturmedien .....	23
2.1.5.1. Zellkulturreagenzien .....	23
2.1.5.2. Zellkulturmedien .....	23
2.1.6. Kommerzielle Kits .....	24
2.1.7. Antikörper .....	24
2.1.7.1. Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	24
2.1.7.2. Antikörper für <i>in vitro</i> Experimente .....	25
2.1.8. Rekombinante Zytokine und Proteine .....	25
2.1.9. Primer Sequenzen für qRT-PCR .....	26
2.1.10. Software .....	26

---

2.2. Methoden.....	27
2.2.1. Molekularbiologische Methoden .....	27
2.2.1.1. RNA-Isolation aus Gewebe und Einzelzellsuspensionen.....	27
2.2.1.2. cDNA Synthese .....	27
2.2.1.3. Quantitative <i>real-time</i> Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR).....	28
2.2.2. Immunologische Methoden .....	29
2.2.2.1. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA) .....	29
2.2.2.2. Durchflusszytometrie .....	29
2.3. Tierexperimente.....	30
2.3.1. Versuchstiere und Haltung .....	30
2.3.2. T-Zell-Transferkolitismodell .....	31
2.3.3. Klinisches und histologisches <i>Scoring</i> der Versuchstiere .....	32
2.3.4. Organpräparation und Herstellung von Einzelzellsuspensionen .....	32
2.3.4.1. Gewinnung von Plasma und Isolation von peripheren mononukleären Zellen aus peripherem Blut zur FACS-Analyse .....	32
2.3.4.2. Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Milzen und mesenterialen Lymphknoten .....	33
2.3.4.3. Aufbereitung von Kolongewebe für weitere Analysen .....	33
2.3.5. <i>In vitro</i> T-Zell-Polarisierungsversuche .....	34
2.4. Statistik .....	35
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
3.1. Das NLRP3-Inflammasom beeinflusst die Produktion von IL-17A in murinen T-Zellen .....	36
3.2. <i>Nlrp3</i> <sup>-/-</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RB <sup>high</sup> T-Zellen produzieren <i>in vitro</i> weniger IL-17 als WT T-Zellen .....	38
3.3. NLRP3-Defizienz in den transferierten CD4 <sup>+</sup> CD45RB <sup>high</sup> T-Zellen beeinflusst nicht den Verlauf der T-Zell-Transferkolitis im vierwöchigen Modell .....	40
3.4. <i>Nlrp3</i> <sup>-/-</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RB <sup>high</sup> T-Zellen haben keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf der Transferkolitis im sechswöchigen Modell .....	41

---

3.5. Bestimmung der Anzahl von <i>Nlrp3</i> <sup>-/-</sup> und WT CD4 <sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut im Verlauf der T-Zell-Transferkolitis .....	43
3.6. Zytokinprofil im Kolongewebe nach sechs Wochen Transferkolitis .....	45
3.7. <i>Nlrp3</i> <sup>-/-</sup> T-Zellen in der Lamina propria produzieren mehr IL-17 <i>in vivo</i> .....	47
3.8. <i>Nlrp3</i> <sup>-/-</sup> T-Zellen in mesenterialen Lymphknoten favorisieren einen Th <sub>17</sub> -Phänotyp.....	48
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>51</b>
4.1. Die Rolle des NLRP3-Inflammasoms in der T-Zell-Polarisierung im Kontext chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen.....	51
4.2. Diskrepanz in der Th <sub>1</sub> /Th <sub>17</sub> -Polarisierung von NLRP3 <sup>-/-</sup> T-Zellen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....	54
4.3. <i>Nlrp3</i> <sup>-/-</sup> T-Zellen favorisieren einen Th <sub>17</sub> -Phänotyp im T-Zell-Transferkolitismodell trotz ausbleibender klinischer Relevanz .....	58
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>63</b>
<b>6. Anhang .....</b>	<b>65</b>
6.1. Abkürzungsverzeichnis.....	65
6.2. Tabellenverzeichnis .....	69
6.3. Abbildungsverzeichnis .....	70
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>71</b>
<b>8. Lebenslauf.....</b>	<b>84</b>
<b>9. Danksagung .....</b>	<b>85</b>
<b>10. Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>86</b>

---

## 1. Einleitung

### 1.1. Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) sind eine Gruppe von rezidivierenden oder kontinuierlich auftretenden entzündlichen Erkrankungen des Dün- und Dickdarms, die als Folge einer Dysregulation des mukosalen Immunsystems auftreten (Podolsky 2002, Baumgart and Sandborn 2007). Als Erklärungsversuch für den Ursprung von CED ist man mittlerweile von einem definitiven Auslöser abgekommen und sieht das komplexe Zusammenspiel aus genetischer Prädisposition, Umweltfaktoren und dysreguliertem Mikrobiom in den Fokus der Wissenschaft gerückt, wobei der exakte Ablauf in der Pathophysiologie weiterhin ungeklärt bleibt (Khor, Gardet et al. 2011, Khan, Ullah et al. 2019, Schirmer, Garner et al. 2019).

Die beiden häufigsten Vertreter der CED sind Morbus Crohn und Colitis ulcerosa (Strober, Fuss et al. 2007). Obwohl beide Erkrankungen viele Gemeinsamkeiten aufweisen, gibt es auch Unterschiede (Sands 2004, Zhang and Li 2014). Gerade die Gemeinsamkeiten erschweren zu Beginn der Erkrankungen oft die Diagnosestellung.

Der Morbus Crohn ist durch einen schubförmigen, diskontinuierlichen und transmuralen, also alle Wandschichten betreffenden, Befall des Gastrointestinaltrakts charakterisiert. Das Kolon und das terminale Ileum stellen die Hauptmanifestationsorte der Erkrankung dar, prinzipiell ist jedoch ein Befall des gesamten Gastrointestinaltrakts möglich (Cummings, Cooney et al. 2010, Van Assche, Dignass et al. 2010).

Die Colitis ulcerosa beginnt meist im Rektum und breitet sich dann kontinuierlich nach oral im Dickdarm aus und bleibt auf diesen begrenzt (Dignass, Eliakim et al. 2012). Als Sonderform ist eine sogenannte *Backwash-Ileitis* möglich, bei der das terminale Ileum von der Entzündung mitbetroffen sein kann. Die Entzündungsreaktion der Colitis ulcerosa ist auf histologischer Ebene auf die Mukosa und Submukosa beschränkt; es handelt sich also hier um einen nicht-transmuralen Befall des Gastrointestinaltrakts (Baumgart and Sandborn 2007).

Morbus Crohn und Colitis ulcerosa können mit extraintestinalen Symptomen einhergehen, wobei häufig Gelenk-, Augen- oder Hautbeteiligungen vorkommen (Rothfuss 2006, Cheifetz 2013). Die häufigsten klinischen Symptome beider Erkrankungen hängen vom Befallsmuster der jeweiligen Erkrankung und der aktuellen

Krankheitsaktivität ab. Sowohl bei Morbus Crohn als auch bei Colitis ulcerosa sind die Betroffenen oft geplagt von Durchfall, rektalem Blutabgang, abdominellen Beschwerden und Gewichtsverlust (Yeshi, Ruscher et al. 2020).

Im Fokus der Frage nach der genauen Pathophysiologie von CED stehen genetische sowie umweltbedingte Prozesse, die zur Veränderung der Darmschleimhaut bis hin zum kompletten Verlust der Barrierefunktion des Darmepithels führen (Podolsky 2002, Abraham and Cho 2009, Bianco, Girardelli et al. 2015, Martens, Neumann et al. 2018). Mittlerweile konnten mehr als 200 Gene identifiziert werden, die mit einer erhöhten Anfälligkeit für CED einhergehen (Bianco, Girardelli et al. 2015, Liu, van Sommeren et al. 2015, Loddo and Romano 2015, Ye and McGovern 2016). Um sich hier einen besseren Überblick über die beteiligten Gene zu verschaffen, kann man diese in drei Kategorien einteilen: 1. Pathogenerkennung, 2. gestörte Immunantwort und 3. Aufrechterhaltung der Barrierefunktion der Darmschleimhaut (Younis, Zarif et al. 2020).

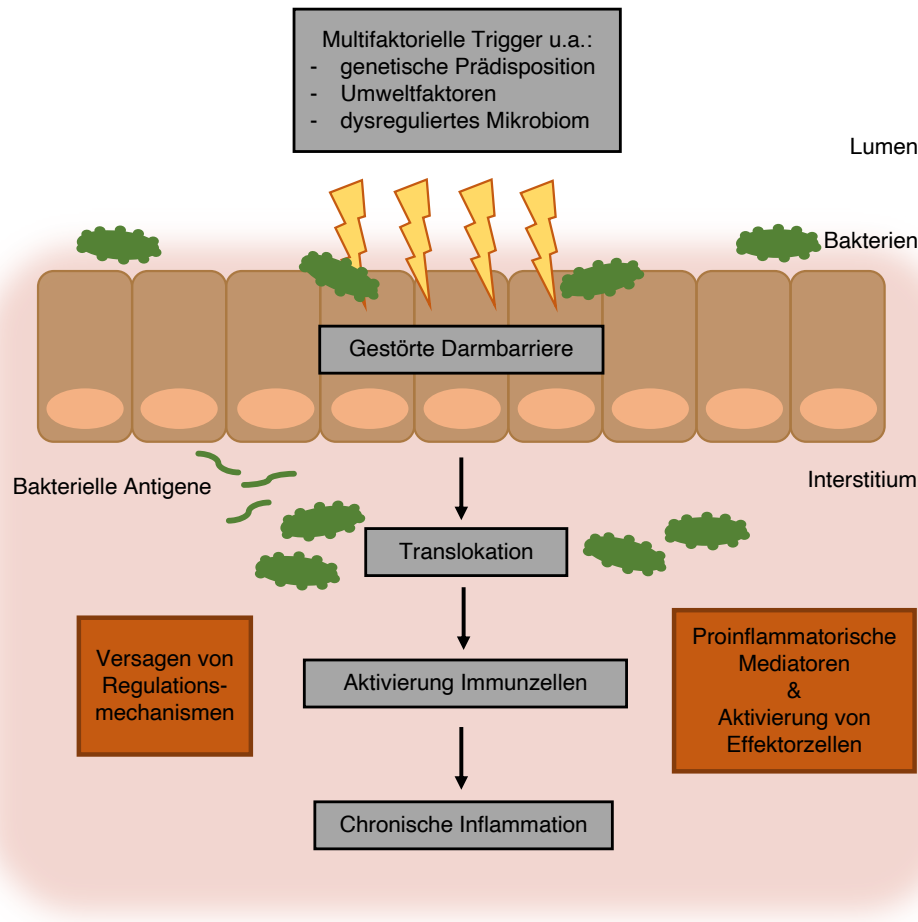
Zu einer gestörten Pathogenerkennung führen Mutationen des Gens ATG16L1, ein Autophagogen, welches für die intrazelluläre Degradierung von eingedrungenen Pathogenen wichtig ist. Mutationen im NOD2-Gen, verantwortlich für die Erkennung pathogener Bakterien im Darm und Aktivierung des Immunsystems, sind ebenfalls zentraler Gegenstand der CED-Forschung (Naser, Arce et al. 2012, Caruso, Warner et al. 2014, Salem, Ammitzboell et al. 2015). Die physiologische Rolle von NOD2 besteht in der Aktivierung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (Ogura, Inohara et al. 2001). Der NF- $\kappa$ B-Signalweg aktiviert die Transkription verschiedenster proinflammatorischer Zytokine, wie TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 und IL-12 (Ben-Neriah and Karin 2011). Mutationen im NOD2-Gen stören so die frühe Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs und sind für eine dysregulierte Zytokinantwort verantwortlich. Eine gestörte NF- $\kappa$ B-Aktivierung in Darmepithelzellen führt u.a. zu deren Apoptose und zur Translokation von Bakterien in die Darmschleimhaut (Nenci, Becker et al. 2007).

Mutationen in HLA-Genen, *gain-of-function* Mutationen des IL-23-Rezeptors (Liu, Yadav et al. 2011, Xu, Xie et al. 2015, Ling-Long Peng 2016) und *loss-of-function* Mutationen des IL-10-Rezeptors (Glocker, Kotlarz et al. 2009, Kotlarz, Beier et al. 2012) führen zu einer gestörten Immunantwort und tragen so zur Pathogenese bei CED-Patienten bei.



Die Epithelbarriere des Darms wird durch Mutationen im CDH1-Gen und HNF4-a-Gen, beide wichtig für die Aufrechterhaltung der Integrität des Darmepithels und damit seiner Barrierefunktion, gestört (Consortium, Barrett et al. 2009, Muise, Walters et al. 2009).

Im Entstehungsprozess der akuten, wie auch chronischen Erkrankung steht somit ein komplexes Zusammenspiel aus Umweltfaktoren und den eben exemplarisch erwähnten genetischen Faktoren. Daneben scheint insbesondere auch die Translokation bakterieller Antigene nach Zusammenbruch der mukosalen Darmbarriere eine Schlüsselrolle in der Pathogenese einzunehmen (Abraham and Cho 2009). Das Immunsystem des Darms ist der ständigen Herausforderung ausgesetzt, zwischen potenziell pathogenen Keimen und Bakterien der Normalflora zu unterscheiden. Sowohl im gesunden *steady state* als auch in der akuten Entzündungsreaktion muss die Balance zwischen proinflammatorischen und tolerogenen Prozessen gewahrt bleiben. Eine Dysregulation dieser homöostatischen Prozesse lokaler Immunzellen führt zum Krankheitsbild der CED (Antoni, Nuding et al. 2014). Zellpopulationen des angeborenen (dendritische Zellen, Makrophagen) und des adaptiven Immunsystems (T-Zellen) in Lamina propria (LP) und mesenterialen Lymphknoten (MLK) spielen hier eine wichtige Rolle in der Steuerung und Balancierung der Immunantwort (Geremia, Biancheri et al. 2014, Wallace, Zheng et al. 2014, Moreira Lopes, Mosser et al. 2020). Versagt diese natürliche Regulationsbalance und kommt es zu einem Überwiegen an proinflammatorischen Mediatoren, entsteht eine akute bzw. chronische Entzündungsreaktion. Eine stark vereinfachte schematische Darstellung der Pathogenese von CED findet sich in **Abbildung 1-1**.



**Abbildung 1-1: Pathogenese chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen.**

Das Zusammenspiel multifaktorieller Trigger (z.B. genetische Prädisposition, Umweltfaktoren, dysreguliertes Mikrobiom) führt zu einem Verlust der Barrierefunktion des Darmepithels, wodurch Mikrobiombestandteile und bakterielle Antigene ins Interstitium eindringen können. Diese Translokation pathogener Keime führt zur Aktivierung von Immunzellen (Makrophagen, dendritischen Zellen, T-Zellen u.a.), wodurch proinflammatorische Mediatoren ausgeschüttet werden. Versagen die körpereigenen physiologischen Regulationsmechanismen, kommt es zu einer chronischen Entzündungsreaktion (Adaptiert nach Neurath 2014).

## 1.2. Das NLRP3-Inflammasom als Regulator entzündlicher Prozesse im Darm

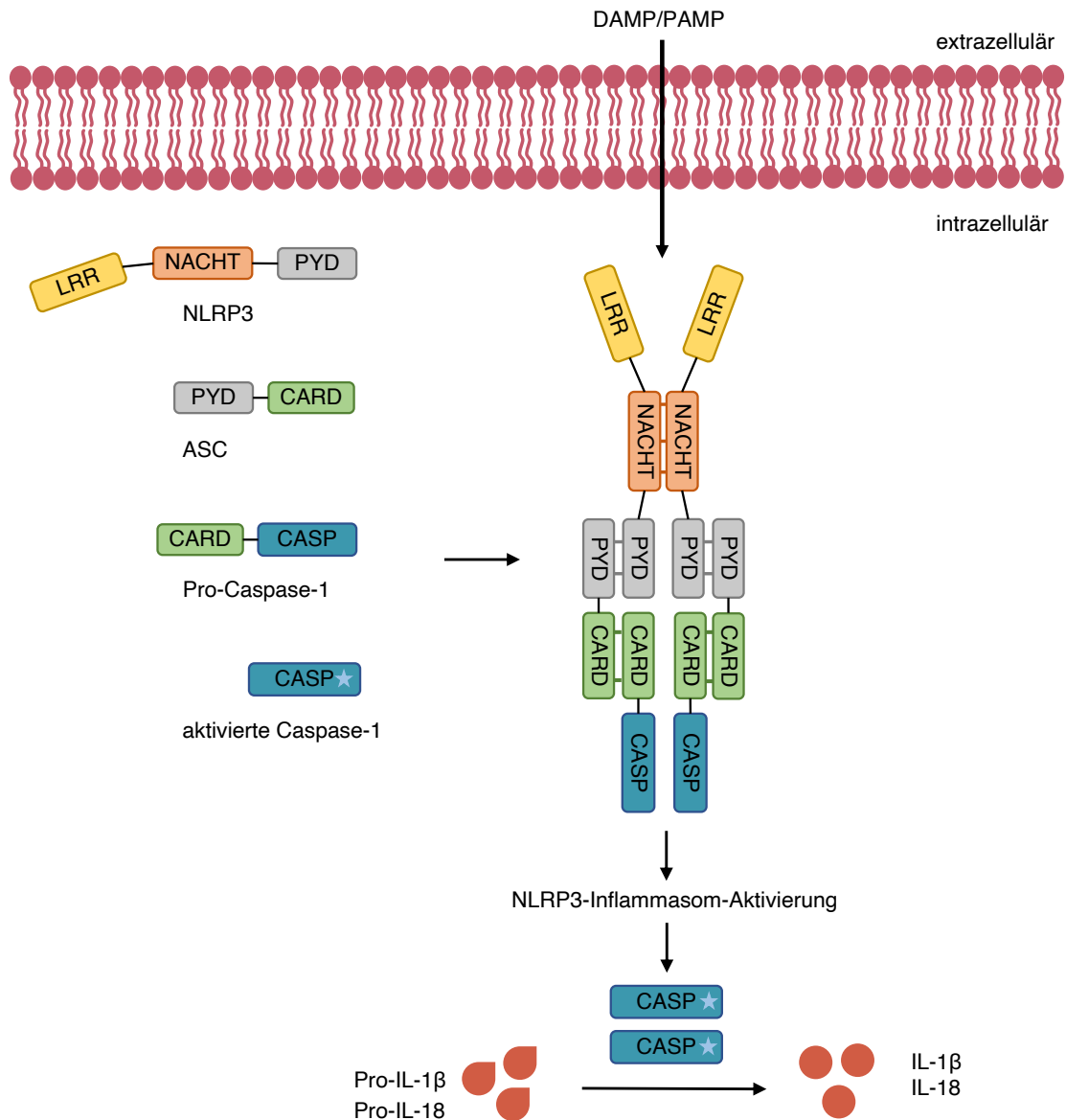
Inflammasome sind intrazelluläre Multiproteinkomplexe des angeborenen Immunsystems, die über die Aktivierung von Caspasen die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen induzieren und zur Pyroptose, einer Art lytischem Zelltod, führen (Broz and Dixit 2016). Die Ausrichtung der Inflammasomkomponenten wird durch einen einzigartigen Mustererkennungsrezeptor (*pattern-recognition receptor*, PRR) als Antwort auf Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated*

*molecular patterns*, PAMPs) oder endogene intrazelluläre Gefahrensignale (*damage-associated molecular patterns*, DAMPs) initiiert.

Zu den Mustererkennungsrezeptoren, die Inflammasomkomplexe bilden, gehören: die NLRs (*nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD) and *leucine-rich repeat* (LRR)-*containing protein*) NLRP1, NLRP3 und NLRC4, sowie *Absent in melanoma 2* (AIM2 oder auch *interferon-inducible protein* genannt) und Pypin (Winsor, Krustev et al. 2019). Neben diesen Mustererkennungsrezeptoren bestehen Inflammasome noch aus dem Adaptorprotein *Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD* (ASC) und pro-Caspase-1, selbst ein Pro-Protein, welches Vorstufen von proinflammatorischen Zytokinen prozessiert (Broz and Dixit 2016, Winsor, Krustev et al. 2019).

Das NLRP3-Inflammasom besteht aus dem *NOD-like* Rezeptor NLRP3, dem Adaptorprotein ASC und Caspase-1 (Agostini 2004). Der *NOD-like* Rezeptor NLRP3 besteht aus einer Pyrimidomäne (PYD), einer Nukleotidbindungs- und Oligomerisierungsdomäne (NOD oder NACHT-Domäne) und einer Leucin-reichen Wiederholungsdomäne (LRR). Bei Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms interagiert die PYD-Domäne des NLRP3 mit der PYD-Domäne des ASC (Kelley, Jeltema et al. 2019). Die CARD-Domäne des ASC vernetzt sich anschließend mit der CARD-Domäne von pro-Caspase-1, wodurch aktive Caspase-1 gebildet wird. Die aktivierte Caspase-1 ist nun in der Lage pro-IL-1 $\beta$  und pro-IL-18 in deren aktive Form zu überführen (Schroder and Tschopp 2010). Eine vereinfachte schematische Übersicht der NLRP3-Inflammasom-Komponenten und deren Aktivierung ist in **Abbildung 1-2** dargestellt (Rathinam, Vanaja et al. 2012, Broz and Dixit 2016, de Vasconcelos, Van Opendenbosch et al. 2016).

Aktiviert wird das NLRP3-Inflammasom durch endogene Stimuli (z.B. ATP, Harnsäurekristalle, Amyloidablagerungen, lysosomaler Membranstress) und exogene Stimuli (z.B. Bakterientoxine, Nigericin, Asbest, extrazelluläres ATP, PAMP) sowie durch ROS (*reactive oxygen species*) (Mariathasan, Weiss et al. 2006, Martinon, Petrilli et al. 2006, Halle, Hornung et al. 2008, Duewell, Kono et al. 2010, Schroder and Tschopp 2010, Latz, Xiao et al. 2013, Kelley, Jeltema et al. 2019). Allen Stimuli ist gemeinsam, dass sie am Ende zu einem Kaliumausstrom aus der Zelle führen (Munoz-Planillo, Kuffa et al. 2013).



**Abbildung 1-2: Aufbau des NLRP3-Inflammasoms.**

Gezeigt ist eine schematische Darstellung des NLRP3-Inflammasoms. Auf der linken Grafikhälfte sind die Bestandteile des NLRP3-Inflammasoms zu erkennen: NLRP3, ASC und Pro-Caspase-1 bzw. aktivierte Caspase-1. Durch Zellstress-Stimuli, hier beispielhaft gezeigt an der Erkennung von DAMP bzw. PAMP, oligomerisieren die Bestandteile des NLRP3-Inflammasoms. Pro-Caspase-1 wird so zur aktivierten Caspase-1, die zur Maturierung von pro-IL-1β und pro-IL-18 in ihre aktive Form führt (Adaptiert nach Schroder, Tschopp et al. 2014)

Das NLRP3-Inflammasom wird überwiegend in Immunzellen exprimiert und ist ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität. IL-1β und IL-18 bilden zentrale Faktoren der Immunregulation im Darm, was durch die Expression von Inflammasom-Komponenten im Darmgewebe weiter untermauert wird (Winsor, Krustev et al. 2019). Im Kolon von Patienten mit aktiven Schüben von Morbus Crohn und Colitis

Ulcerosa ist die mRNA-Expression von NLRP3 und IL-1 $\beta$  deutlich erhöht, was eine Rolle des NLRP3-Inflammasoms als proinflammatorischer Akteur in der Pathogenese der CED nahelegt (Ranson, Veldhuis et al. 2018). Neben IL-1 $\beta$  findet sich in der Darmschleimhaut von IBD Patienten jedoch auch vermehrt TNF- $\alpha$  und IL-6. Beide Zytokine korrelieren mit der Intensität und Aktivität der Entzündung (Reinecker, Steffen et al. 2008) und stehen neben anderen Zytokinen am Ende des NF- $\kappa$ B-Signalweges.

Der proinflammatorische Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B ist also zentraler Teil in der Immunhomöostase von Entzündungsreaktionen (Neurath and Pettersson 1997, Barnabei, Laplantine et al. 2021, Zhang, Ma et al. 2021). NF- $\kappa$ B kommt in fast allen Zellen vor, auch in T- und B-Zellen, sowie antigenpräsentierenden Zellen (APC), wie Makrophagen und dendritischen Zellen, und wird auch in Darmepithelzellen in der Entzündungsreaktion hochreguliert (Rogler, Brand et al. 1998). Nach dessen Aktivierung kommt es in APC zur Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6, IL-12, INF- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  (Rogler, Brand et al. 1998, Ben-Neriah and Karin 2011, Thaïss, Levy et al. 2016). Diese Zytokine nehmen in der Pathogenese von CED neben NLRP3-abhängig produziertem IL-1 $\beta$  eine zentrale Rolle ein (Baumann and Gaudie 1994, Sanchez-Munoz, Dominguez-Lopez et al. 2008, Zigmond, Varol et al. 2012, Neurath 2014). Die enge Verknüpfung von NLRP3 und NF- $\kappa$ B zeigt sich auch in der Tatsache, dass die Aktivierung von NF- $\kappa$ B als *Priming*-Signal für die NLRP3-Aktivierung dienen kann (Bauernfeind, Horvath et al. 2009, Harder, Franchi et al. 2009).

Das NLRP3-Inflammasom hat nicht nur als Treiber der Inflammation bei CED eine Vorreiterrolle, sondern ist zudem entscheidend für die Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase (Zhen and Zhang 2019). *Single nucleotide polymorphisms* (SNPs), die zu einer erniedrigten NLRP3-Expression und IL-1 $\beta$ -Produktion führen, stehen in Zusammenhang mit einer erhöhten Anfälligkeit für die Entwicklung von Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa (Villani, Lemire et al. 2009, Zhang, Wang et al. 2014). Dem gegenüber stehen Daten unserer Arbeitsgruppe, die für *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen konnten, dass diese im DSS-Kolitismodell geschützt sind und so dem NLRP3-Inflammasom eine proinflammatorische Komponente eingestehen (Bauer, Duewell et al. 2010).

### **1.3. Die Bedeutung des NLRP3-Inflammasoms für die lokale Immunhomöostase im Darm**

Die Integrität des menschlichen Darmepithels ist eine wichtige Voraussetzung für die Barrierefunktion, damit die im Darm befindliche Mikroflora nicht unkontrolliert mit dem mukosalen Immunsystem in Kontakt tritt und zu einer Inflammation führt. Bei CED ist die lokale Immunregulation gestört und es entsteht eine sich selbst unterhaltende Entzündungsreaktion mit weiterer Schädigung der Integrität der Darmmukosa. Dabei gelangen Bakterien und deren Bestandteile in Kontakt mit lokalen Immunzellen (Sanchez de Medina, Romero-Calvo et al. 2014). Unter Beteiligung des adaptiven Immunsystems nimmt die Entzündungsreaktion so ihren Lauf. Eine wichtige Rolle nehmen hier die durch das NLRP3-Inflammasom prozessierten Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 ein (Lopetuso, Chowdhry et al. 2013, Neurath 2014). Studien einiger Arbeitsgruppen messen Veränderungen am NLRP3-Inflammasom bei Patienten mit Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn einen krankheitsfördernden Effekt bei (Yang, Kim et al. 2011, Hanaei, Sadr et al. 2018).

Das bereits früh im Entzündungsgeschehen produzierte Zytokin IL-1 $\beta$  ist zentral an der Regulation der Entzündungsreaktion im Darm beteiligt (Cummings, Cooney et al. 2010). In Kolitis-Tiermodellen ist schon lange bekannt, dass erhöhte Level von IL-1 $\beta$  im Gewebe und Blut nachweisbar sind (Cominelli, Nast et al. 1990, Okayasu, Hatakeyama et al. 1990). Auch beim Menschen wird vermehrt IL-1 $\beta$  im Kolon von CED Patienten exprimiert (Mahida, Wu et al. 1989, Ligumsky, Simon et al. 1990) und dessen Level korrelieren mit der Krankheitsaktivität. Therapeutisch führt die Blockade von IL-1 $\beta$  im Tiermodell zur Abschwächung der Entzündungsreaktion im Darm (Cominelli, Nast et al. 1992, Siegmund, Lehr et al. 2001). In klinischen Studien hat sich diese Strategie jedoch bislang nicht durchsetzen können.

Die Auswirkungen von IL-18 auf die Immunhomöostase des Darms ist komplex. Die Arbeitsgruppe von Nowarski et al. konnte zeigen, dass von Epithelzellen produziertes IL-18 für die Schädigung der protektiven Muzinschicht des Darms verantwortlich ist, indem es die Heranreifung der Muzin-produzierenden Becherzellen hemmt (Nowarski, Jackson et al. 2015). Diese proinflammatorische Rolle von IL-18 deckt sich damit, dass durch die Blockade von IL-18 in den murinen DSS- und TNBS-Kolitismodellen die Krankheitsaktivität verringert wird (Kanai, Watanabe et al. 2001, Siegmund, Fantuzzi et al. 2001, Sivakumar, Westrich et al. 2002). Andere Arbeiten hingegen zeigten, dass IL-18

an der Reparatur der Epithelbarriere im Darm beteiligt ist und exogen zugeführtes IL-18 bei *Casp1*<sup>-/-</sup> Mäusen (die weder IL-1 $\beta$  noch IL-18 produzieren) die Ausprägung der DSS-Kolitis verringert (Dupaul-Chicoine, Yeretssian et al. 2010). Somit kann IL-18 nach heutigem Wissenstand sowohl anti- als auch proinflammatorische Wirkungen entfalten, abhängig vom lokalen Zytokinmilieu, dem zellulären Ursprung und vom Ort der Aktivierung (Siegmund 2010).

Vom NLRP3-Inflammasom produziertes IL-1 $\beta$  und IL-18 und deren Auswirkungen auf das lokale Immunsystem im Darm sowie die Entzündung wurde in zahlreichen experimentellen Studien untersucht. Im DSS-Kolitismodell konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass das Fehlen des NLRP3-Inflammasoms einen protektiven Effekt auf die Entstehung der lokalen Entzündungsreaktion hat (Bauer, Duewell et al. 2010). Der protektive Effekt durch das Fehlen des NLRP3-Inflammasoms auf die lokale Entzündungsreaktion konnte von unserer Arbeitsgruppe ebenfalls in einem T-Zell-Transferkolitismodell demonstriert werden (Mak'Anyengo, Duewell et al. 2018). Andere Arbeitsgruppen hingegen fanden, dass durch die Abwesenheit des NLRP3-Inflammasoms die Mortalität im DSS-Kolitismodell steigt (Zaki, Boyd et al. 2010). Als Erklärungsversuch für die teils widersprüchlichen Forschungsergebnisse wird die unterschiedliche Zusammensetzung des Mikrobioms im Darm, abhängig von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen, herangezogen (Bauer, Duewell et al. 2012). So konnte im DSS-Kolitismodell durch eine Antibiotikatherapie der Versuchstiere der protektive Effekt in den *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Mäusen aufgehoben werden. Dies belegt die Notwendigkeit, dass bei der Interpretation der Daten Faktoren, die das Mikrobiom beeinflussen können, berücksichtigt werden müssen.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass eine aus dem Fehlen von Inflammasom-Komponenten resultierende Dysbiose sowohl die lokale Entzündungsreaktion im Darm als auch die Kanzerogenese beeinflussen kann.

*Casp1*<sup>-/-</sup>, *Nlrp3*<sup>-/-</sup> und *Nlrp6*<sup>-/-</sup> Mäuse haben ein höheres Risiko, ein kolorektales Karzinom zu entwickeln. Dies wurde auf die fehlende protektive Wirkung von IL-18 zurückgeführt (Zaki, Vogel et al. 2010, Chen, Liu et al. 2011, Elinav, Strowig et al. 2011). Ursächlich hierfür waren Veränderungen des Mikrobioms in Inflammasom-defizienten Tieren, die einer proinflammatorische Dysbiose entsprechen (Elinav, Strowig et al. 2011, Henaoui-Mejia, Elinav et al. 2012). Levy et al. konnten zeigen, dass gewisse Bakterien NLRP6 aktivieren. Das NLRP6-abhängig von Epithelzellen produzierte IL-18 ist anschließend

mitverantwortlich für die Prävention einer Dysbiose im Darmepithel (Levy, Thaiss et al. 2015, Levy, Shapiro et al. 2017). Eine Inflammasom-abhängige Veränderung des Mikrobioms könnte somit über eine Dysbiose und damit verbundenen chronischen Entzündungsreaktion an der Entstehung des kolorektalen Karzinoms mitbeteiligt sein (Elinav, Nowarski et al. 2013). Eine Dysbiose findet sich typischerweise auch bei Patienten mit CED. Sowohl genetische Faktoren als auch Umwelteinflüsse spielen hier wichtige Rollen (Lee and Chang 2021).

Inflammasome können also wie oben ausgeführt als Regulatoren des Mikrobioms im Darm fungieren und so als Erklärungsansatz für die erwähnten teils widersprüchlichen Forschungsergebnisse dienen (Elinav, Strowig et al. 2011, Hu, Friedman et al. 2019). Interessanterweise konnte unsere Arbeitsgruppe durch *cohousing*-Experimente zeigen, dass das Mikrobiom im T-Zell-Transferkolitismodell keinen Einfluss auf den protektiven Effekt in *Nlrp3*-defizienten Tieren zu haben scheint. Vielmehr fungiert es als molekularer Schalter der intestinalen Homöostase, indem lokale Immunzellen durch die Produktion von IL-1 $\beta$  in Richtung eines proinflammatorischen Phänotyps verschoben werden (Mak'Anyengo, Duewell et al. 2018). Ein gewisses Level an NLRP3-Inflammasom-Aktivität scheint wichtig für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase im Darm zu sein (Zaki, Boyd et al. 2010, Hirota, Ng et al. 2011).

Eine Limitierung der hier genannten Studien ist, dass in *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Mäusen das NLRP3-Inflammasom in allen Zellen des Organismus fehlt. Insofern können die Konsequenzen des Gendefekts nicht detailliert in den einzelnen Zellpopulationen, wie dendritischen Zellen, Makrophagen, T-Zellen oder Darmepithelzellen, betrachtet werden. Eine detaillierte Kenntnis ist jedoch, insbesondere bei den teils widersprüchlichen Daten zu den pathophysiologischen Konsequenzen der NLRP3-Inflammasom-Aktivierung, erforderlich, um NLRP3 als Zielstruktur für neue Therapien der CED zu evaluieren.

### **1.4. Die Rolle von T-Zellen in der Pathogenese von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen**

Das Immunsystem des Darms steht in einem andauernden Balanceakt. Potenziell pathogene Keime müssen von der bakteriellen Normalflora unterschieden werden. Kommt es hier zu einem Ungleichgewicht, erfolgt die Aktivierung des angeborenen und



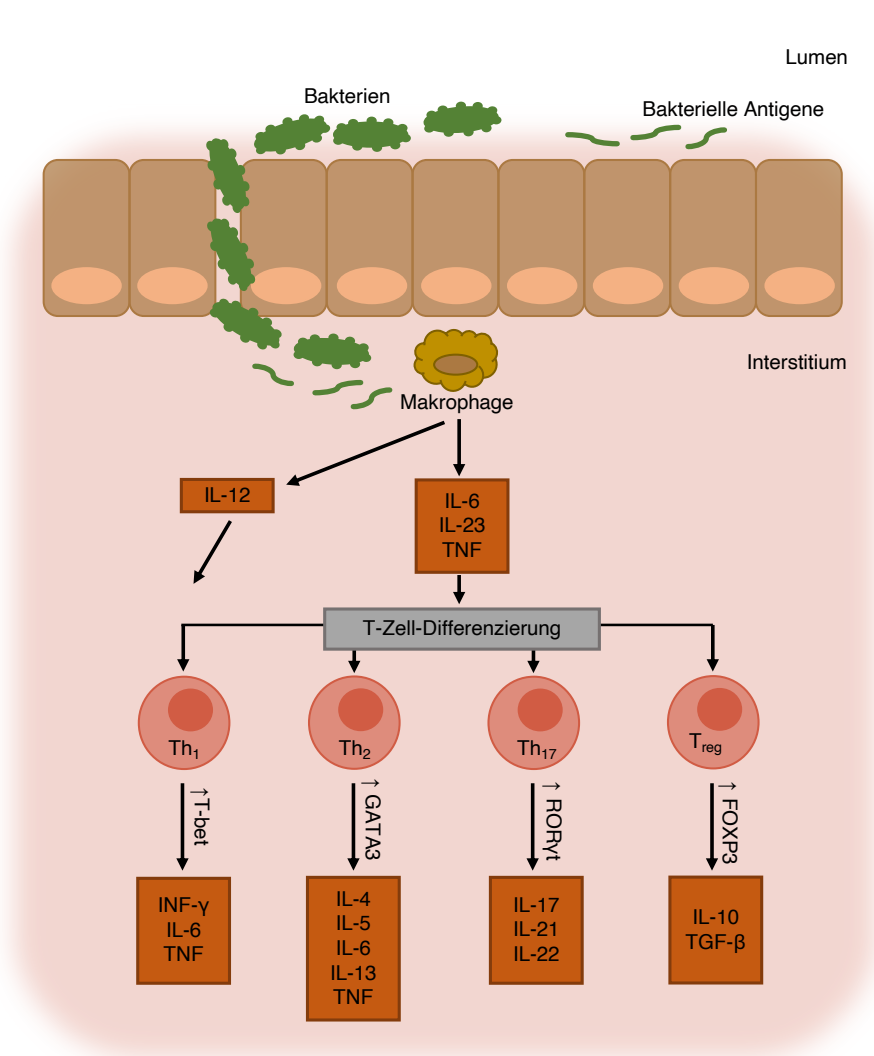
konsekutiv des erworbenen Immunsystems. Die Modulation der Immunantwort auf pathogene Reize wird maßgeblich mitbestimmt durch T-Zellen in Lamina propria, mesenterialen Lymphknoten (MLK) und Payer-Plaques (Abraham and Cho 2009, Marsal and Agace 2012).

Um die Rolle der T-Zellen im Darm genauer zu untersuchen, sind grundlegende Kenntnisse über deren Polarisierung unabdingbar. Nach Abschluss der T-Zell-Entwicklung im Thymus, gelangen die naïven CD4<sup>+</sup> T-Zellen über das Blut u.a. in die sekundären lymphatischen Organe (z.B. die MLK, Milz und Peyer-Plaques) Im Intestinaltrakt erfolgt die lokale Aktivierung der naïven CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch Antigen-präsentierende Zellen (Makrophagen und dendritische Zellen). Bestimmt durch das Signalmuster der Antigenaktivierung startet der Differenzierungsprozess in die T-Helfer-Zelllinien: Th<sub>1</sub>, Th<sub>2</sub>, Th<sub>17</sub> und T<sub>reg</sub> Zellen (Zhu and Paul 2008). Durch ein komplexes Zusammenspiel aus der Hochregulation von Transkriptionsfaktoren und der Aktivierung von STAT-Proteinen exprimieren die hervorgehenden T-Helfer-Zellpopulationen schlussendlich ein einzigartiges Repertoire an Zytokinen, das für sie charakteristisch ist (Zhu, Yamane et al. 2010). Eine Zusammenfassung einer vereinfachten Übersicht zur Polarisierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Kontext der CED findet sich nachfolgend in **Abbildung 1-3**.

Diverse Polymorphismen, die die T-Zell-Differenzierung beeinflussen, konnten mit einer erhöhten Prädisposition für CED in Verbindung gebracht werden (Khor, Gardet et al. 2011). Untersuchungen zeigten, dass CED-Patienten eine erhöhte Anzahl an CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Darmmukosa haben und bringen diese Zellpopulation in den Fokus der Suche nach einem besseren Verständnis für die Entstehung von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa (Sturm, de Souza et al. 2008). Die Inhibition der verstärkten Migration von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den Darm während der akuten und chronischen Entzündung wird als Ansatzpunkt für neuere Therapiemöglichkeiten der CED genutzt (Marsal and Agace 2012).

Das Mikrobiom von Patienten mit Colitis ulcerosa und Morbus Crohn unterscheidet sich signifikant von der Zusammensetzung gesunder Kontrollen und deutet auf einen Zusammenhang zwischen Mikrobiom und lokalem Immunzellmilieu im Darm hin (Sturm, de Souza et al. 2008, Mishima and Sartor 2020). In Anbetracht dieser Tatsache ist auch erwähnenswert, dass die bakterielle Zusammensetzung der Darmflora an der Differenzierung der T-Zell-Subpopulationen im Darm beteiligt ist. Behandelt man Mäuse mit Antibiotika, stört dies die Differenzierung von Th<sub>17</sub> Zellen im Darm. Die Balance von

Th<sub>17</sub> Zellen und damit verbunden auch die Balance von regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>) in der Lamina propria ist somit nachweislich von der Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms bestimmt (Ivanov, Frutos Rde et al. 2008).



**Abbildung 1-3: T-Zell Polarisierung im Darm bei CED.**

Gezeigt ist eine schematisierte und stark vereinfachte Darstellung der T-Zell-Polarisierung im Darm im Rahmen einer chronischen Entzündungsreaktion, wie sie bei CED stattfindet. Durch das Eindringen von Pathogenen von luminal ins Darmepithel (gezeigt anhand von Bakterien und bakteriellen Antigenen) werden u.a. Makrophagen aktiviert. Über die Produktion proinflammatorischer Zytokine (IL-12, IL-6, IL-23 und TNF) findet die Differenzierung naiver T-Zellen zu Th<sub>1</sub>, Th<sub>2</sub>, Th<sub>17</sub> und T<sub>reg</sub> Zellen statt. Gezeigt sind außerdem die Schlüsseltranskriptionsfaktoren der einzelnen T-Zell-Subpopulationen und deren vorrangig produzierten Effektorzytokine (Adaptiert nach Neurath 2014)

Bevor die Existenz und damit auch die Rolle von Th<sub>17</sub> Zellen in CED bekannt war, wurden CED in Th<sub>1</sub> und Th<sub>2</sub> dominierte Erkrankungen eingeteilt (I J Fuss 1996, Zenewicz, Antov et al. 2009). Schon vor Jahren hatte man erkannt, dass Patienten mit Colitis ulcerosa

erhöhte IL-4-Level haben und hatte Colitis ulcerosa damit als Th<sub>2</sub>-dominierte Erkrankung klassifiziert (S. Inoue 1999, Heller, Florian et al. 2005). Für Morbus Crohn, dachte man, dass Th<sub>1</sub> Zellen die initiale entzündungsauslösende Rolle mit der Produktion von INF- $\gamma$  einnehmen (P Parronchi 1997). Als man in Darmbiopsien von Patienten, die an Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn leiden, erhöhte IL-17-Level nachgewiesen hatte, wurde die Rolle der einzelnen T-Zell-Subpopulationen für die Entstehung von CED komplexer und Th<sub>17</sub> Zellen rückten an die Frontlinie der CED-Forschung (Nielsen, Kirman et al. 2003, S Fujino 2003, Hundorfean, Neurath et al. 2012).

Die genaue Rolle der einzelnen T-Zell-Subpopulationen, insbesondere auch der Th<sub>17</sub> Zellen, für die Balance der Immunhomöostase des Darms bleibt, gemeinsam mit der Immunzellendifferenzierung durch das lokale Mikrobiom, Gegenstand der aktuellen Forschung.

### **1.5. Die Rolle des NLRP3-Inflammasoms in der T-Zell-Differenzierung**

Das NLRP3-Inflammasom wird vor allem in myeloiden Immunzellen, wie Makrophagen und dendritischen Zellen, exprimiert und steht mit der Sekretion von IL-1 $\beta$  und IL-18 als Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität. Dass IL-1 $\beta$  wichtig für die Differenzierung von T-Zell-Subpopulationen ist, konnte bereits vielfach nachgewiesen werden. So ist beispielsweise bekannt, dass IL-1 $\beta$  die Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu Th<sub>17</sub> Zellen und die Expansion von IL-17A-sezernierenden CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen fördert (Acosta-Rodriguez, Napolitani et al. 2007, Rao, Tracey et al. 2007).

Neuere Daten konnten zeigen, dass die NLRP3/IL-1 $\beta$  Achse zudem eine Rolle in der T-Zell-Differenzierung spielt. Interessanterweise werden NLRP3-Inflammasom-Komponenten auch von CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert, was eine T-Zell-intrinsische Rolle nahelegt. Hier sorgt das NLRP3-Inflammasom komplementabhängig über eine Caspase-1-abhängige autokrine IL-1 $\beta$ -Sekretion für die INF- $\gamma$ -Produktion und die Differenzierung von Th<sub>1</sub> Zellen (Arbore, West et al. 2016). Dieselbe Arbeitsgruppe konnte in einem T-Zell-Transferkolitismodell zeigen, dass Tiere mit NLRP3-defizienten CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine signifikant stärker ausgeprägte intestinale Entzündung zeigten. Es ließ sich auch eine verstärkte Th<sub>17</sub>-Polarisierung nachweisen.

Andere Arbeitsgruppen fanden heraus, dass NLRP3 als Transkriptionsfaktor in der Differenzierung von Th<sub>2</sub> Zellen eine Rolle spielt (Bruchard, Rebe et al. 2015). In diesen Untersuchungen der Gruppe um Bruchard et al. zeigte sich, dass die Expression von NLRP3 über den T-Zell-Antigenrezeptor (TCR) via STAT5 und IL-2 vermittelt ist. Die Differenzierung von naïven CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu Th<sub>2</sub> Zellen war von der NLRP3-Expression in den T-Zellen abhängig, da NLRP3 hier selbst durch direkte Bindung an DNA die Bindung des Transkriptionsfaktor IRF4 an die DNA ermöglichte und so das Differenzierungsprogramm der Th<sub>2</sub> Zellen reguliert. *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Th<sub>2</sub> Zellen produzierten außerdem weniger IL-4 und IL-5 als WT T-Zellen.

Das NLRP3-Inflammasom ist außerdem in CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Patienten mit rheumatoider Arthritis hochreguliert. Hier reguliert das von CD4<sup>+</sup> T-Zellen produzierte IL-1β die Differenzierung von Th<sub>17</sub> Zellen (Zhao, Gu et al. 2018).

### **1.6. Tiermodelle für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen**

Tiermodelle für CED sind in unterschiedliche Kategorien je nach Induktion der Entzündungsreaktion eingeteilt (Elson, Cong et al. 2005). Als wichtigste Kategorien zählen: chemisch-induzierte Kolitismodelle, genetische Tiermodelle und T-Zell-Transferkolitismodelle.

Trotz zahlreicher mittlerweile verfügbarer Tiermodelle, insbesondere im Bereich genetisch veränderter Tiermodelle, gibt es kein perfektes Kolitismodell, welches die humane Pathogenese der CED exakt abbilden kann. Das genaue Zusammenspiel immunologischer und genetischer Faktoren gemeinsam mit Umweltbedingungen und dem Darmmikrobiom bleibt zu facettenreich, um alle beteiligten Faktoren in einem Modell zu vereinigen. So erlauben insbesondere die genetischen Tiermodelle, auf spezielle Fragestellungen angepasst, einen unverzichtbaren Einblick, um mechanistische Details in Hinblick auf die Pathogenese von CED zu beleuchten (Mizoguchi, Low et al. 2020). *IL-2*<sup>-/-</sup> Mäuse entwickeln spontan nach einigen Wochen Lebensdauer eine ausgeprägte autoimmunähnliche Erkrankung mit erhöhter Frequenz an aktivierten T- und B-Zellen. Es kommt zur Destruktion diverser Organsysteme und die Tiere entwickeln u.a. eine Hepatitis, Pneumonie und hämolytische Anämie mit hoher Sterblichkeit. Die überlebenden Tiere entwickeln zusätzlich eine schwere Kolitis, die der Colitis ulcerosa ähnelt. Werden die *IL-2*<sup>-/-</sup> Mäuse in einer speziell pathogenfreien Umgebung gehalten,

kommt es dagegen nicht zur Kolitisentwicklung, sodass ursächlich von einer Antigenstimulation über das adaptive Immunsystem ausgegangen wird (Sadlack B. 1993). Auch im *IL-10*<sup>-/-</sup> Mausmodell kommt es zur spontanen Kolitisentwicklung, welche ebenfalls nicht unter pathogenfreien Bedingungen ausbricht (Kühn, Löhler et al. 1993). Untersuchungen an *Muc2*<sup>-/-</sup> Mäusen konnten zeigen, dass MUC2 eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der intestinalen Epithelbarriere hat. MUC2 ist als sekretorisches Muzin essenziell für die Integrität der schützenden Muzinschicht im Darm (Bankole, Read et al. 2021). *Muc2*<sup>-/-</sup> Tiere entwickeln nicht nur spontan eine Kolitis, auch im DSS-Kolitismodell kommt es bei *Muc2*<sup>-/-</sup> Tieren zu einer verstärkten Krankheitsausprägung (Van der Sluis, De Koning et al. 2006).

Chemisch-induzierte Kolitismodelle gehören nach wie vor zu den am häufigsten verwendeten Tiermodellen in der CED-Forschung. Bei diesen Kolitismodellen appliziert man rektal 2,4,6-Trinitrobenolsulfonsäure (TNBS) oder oral Dextransulfat-Natrium (DSS), um so eine chemische Schädigung der Epithelbarriere im Darm zu erzeugen. Die TNBS-induzierte Kolitis wird häufig als Modell für Morbus Crohn und die DSS-induzierte Kolitis als Modell der Colitis ulcerosa angesehen (Alex, Zachos et al. 2009). Eine Limitierung ist jedoch, dass diese Modelle als induzierenden Faktor eine nahezu vollständige Zerstörung der Epithelbarriere haben und so die subtileren Mechanismen der Aktivierung des adaptiven Immunsystems in der Entstehung von CED vernachlässigen.

Die Benutzung des T-Zell-Transferkolitismodell für die Induktion einer experimentellen Kolitis ist weitverbreitet, da es ein realitätsnäheres Abbild der CED im Menschen darstellt als rein chemisch-induzierte Kolitismodelle. In diesem Kolitismodell bildet sich das äußert fein abgestimmte Zusammenspiel aus Effektorzellen und regulatorischen Zellen im Darmmilieu ab und zeigt, was passiert, wenn die Immunzellhomöostase lokal zusammenbricht. Die Entzündungsreaktion wird durch eine gestörte Balance der pro- und antiinflammatorischen Gegenspieler eingeleitet.

Bei der T-Zell-Transferkolitis werden T-Zellen von gesunden Tieren adoptiv in immuninkompetente Mäuse, wie *recombinant activating gene (Rag-1)*-defiziente oder *severe combined immunodeficiency (SCID)* Mäuse transferiert. Dies führt zu einer Störung der T-Zell-Immunhomöostase und konsekutiv zur Entstehung einer Kolitis. Im klassischen Modell der T-Zell-Transferkolitis werden CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T-Zellen (naïve T-Zellen), ohne die Fraktion der CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> T-Zellen, von gesunden

Spendermäusen genommen und dann in die oben genannten immuninkompetenten Mäuse (ohne funktionsfähige T- oder B-Zellen) transferiert (Powrie and Uhlir 2004). Werden zusätzlich CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> T-Zellen transferiert, wird die Ausprägung der Kolitis abgeschwächt, da diese Population auch regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>) enthält, die antiinflammatorisch wirken.

SCID und *Rag-1*<sup>-/-</sup> Mäuse tragen Mutationen im Erbgut, welche zu einer fehlerhaften V(D)J-Rekombination führen (Bosma G.C. 1983, Mombaerts, Iacomini et al. 1992), einem genetischen Umlagerungsprozess der DNA, der für die Ausreifung von B- und T-Zell-Rezeptoren und für die Variabilität der von B-Zellen gebildeter Antikörper sorgt. Bei SCID Mäusen findet sich eine Mutation des Enzyms *DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit*, auch PRKDC-Gen genannt, bei *Rag-1*<sup>-/-</sup> Mäusen besteht eine Mutation im RAG-1-Gen. Die B- und T-Zell-Entwicklung in diesen KO-Mäusen ist schon in einem frühen Stadium blockiert.

### 1.7. Zielsetzung der Arbeit

Das NLRP3-Inflammasom, welches die Sekretion der Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 reguliert, nimmt in der Pathogenese von CED eine zentrale Rolle ein. Einige Publikationen deuten auf eine T-Zell-intrinsische Funktion von NLRP3 in der Polarisation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen hin, wodurch auf transkriptioneller Ebene die Differenzierung sowohl in Th<sub>1</sub> als auch in Th<sub>2</sub> Zellen reguliert wird (Bruchard, Rebe et al. 2015, Arbore, West et al. 2016). Mit diesen teils widersprüchlichen Daten zur Rolle des NLRP3-Inflammasoms in der T-Zell-Differenzierung soll mit der vorliegenden Arbeit die Auswirkung von NLRP3 auf die T-Zell-Polarisierung und der daraus resultierenden Entzündungsreaktion im T-Zell-Transferkolitismodell untersucht werden. Es ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. Welche Rolle spielt T-Zell-intrinsisches NLRP3 in der Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen *in vitro* bzw. *in vivo*?
2. Welche Auswirkung hat ein T-Zell-spezifischer Defekt der NLRP3-Expression auf die Krankheitsausprägung im CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T-Zell-Transferkolitismodell?

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Technisches Equipment

FACSCanto II	BD Biosciences, USA
gentleMACS <i>Dissociator</i>	Miltenyi Biotech, Deutschland
Inkubator (BD6220)	Heraeus, Deutschland
Innova44 <i>Thermoshaker</i>	New Brunswick Scientific, Deutschland
Lichtmikroskop Axiovert 40C	Zeiss, USA
LSRFortessa™	BD Biosciences, USA
Magnetzellseparator MiniMACS™	Milteny, Deutschland
NanoDrop® 2000c	ThermoFischerScientific, Deutschland
PCR Maschine LightCycler480 System	Roche, Deutschland
Pipetus	Hirschmann Eberstadt, Deutschland
Research plus Pipetten	Eppendorf, Deutschland
Sprout Minizentrifuge	Biozym, Deutschland
Tischvortexer RS VA 10	Phoenix, Deutschland
T3 <i>Thermocycler</i>	Biometra, Deutschland
Ultra Turrax	IKA, USA
Zellkultur HeraSAFE KS	Heraeus, Deutschland
Zentrifuge 5418r	Eppendorf, Deutschland

#### 2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Kunststoffgut (steril und unsteril) für Einwegzwecke wurde von folgenden Herstellern bezogen: BD Biosciences (Deutschland), Corning (USA), Eppendorf (Deutschland), Greiner bio-one (Deutschland), Sarstedt (Deutschland) und Falcon (Deutschland)

### 2.1.3. Chemikalien und Reagenzien

1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Biozym Probe qPCR Kit Separate ROX	Biozym, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Deutschland
BD Pharm Lyse Lysepuffer (10 x)	BD Biosciences, USA
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, Deutschland
Count Bright, <i>counting beads</i>	LifeTechnologies, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Deutschland
FACSFlow Lösung	BD Biosciences, USA
Heparin-sodium 2.500 IE /5 ml	Braun AG, Deutschland
Inomycin	Peptotech, USA
Isofluoran	CP PHARMA, Deutschland
Isopropanol	Applichem, Deutschland
KAPA PROBE FAST Universal qPCR	PEQ LABS, Deutschland
Master Mix	
LightCycler ® Probes Master	Roche Diagnostics, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Deutschland
Phorbol-12-myristate 13-acetat (PMA)	Peptotech, USA
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Apotheke Innenstadt LMU, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Deutschland
Tween 20	Carl Roth GmbH, Deutschland
ultraComp eBeads	eBioscience, US

### 2.1.4. Pufferlösungen

#### 2.1.4.1. Pufferlösungen für Arbeiten mit Einzelzellsuspensionen

**Tabelle 1:** Pufferlösung für FACS-Analysen und Zellseparationen

<b>Pufferlösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>FACS Azid-Puffer</b>	PBS, 2 % FBS, 2 mM EDTA, 10 % NaN <sub>3</sub>
<b>FACS Fixationspuffer</b>	4 % PFA
<b>FACS Sort-Puffer</b>	PBS, 2 % FBS, 2 mM EDTA
<b>MACS Puffer</b>	PBS, 0.2 % FBS, 2 mM EDTA
<b>STEMCELL Puffer</b>	PBS, 2 % FBS, 1 mM EDTA



### 2.1.4.2. Pufferlösungen für *in vivo* Experimente

Tabelle 2: Pufferlösungen für die Lamina propria-Isolation

Pufferlösung	Zusammensetzung
<b>Digestionslösung</b>	HBSS w/, 5 % FBS
<b>HBSS w/ (<i>with</i>, dt.: mit)</b>	HBSS mit Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> , 10mM HEPES
<b>HBSS w/o (<i>without</i>, dt.: ohne)</b>	HBSS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> , 10 mM HEPES
<b>PB Puffer</b>	PBS, 0.5 % FBS
<b>Predigestionslösung</b>	HBSS w/o, 5mM EDTA, 5 % FBS, 1 mM DTT

### 2.1.5. Zellkulturreagenzien und Zellkulturmedien

#### 2.1.5.1. Zellkulturreagenzien

Dulbeccos Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	PAA Pasching, Österreich
HEPES-Puffer 1 M	Sigma-Aldrich, Deutschland
Fetales bovines Serum (FBS)	Gibco Products, USA
L-Glutamin 200 mM (100 x)	PAA Pasching, Österreich
MEM <i>Non-essential amino acids</i> (NEAA, 100 x)	Gibco Products, USA
Natriumpyruvat	PAA Pasching, Österreich
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> , 10 %)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Penicillin/ Streptomycin (100 x)	PAA Pasching, Österreich
Roswell Park Memory Institute (RPMI)	PAA Pasching, Österreich
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deutschland
Trypsin (10 x)	PAA Pasching, Österreich

#### 2.1.5.2. Zellkulturmedien

Tabelle 3: Individuell hergestellte Zellkulturmedien

Zellkulturmedium	Zusammensetzung
<b>T-Zell-Medium</b>	RPMI, 10 % FBS, 1 % 200mM L-Glutamin, 1 % 100x Penicillin, 1 % Natriumpyruvat, 1 %

100x NEAA, 1 % 1mM HEPES, 0,005 %  
β-Mercaptoethanol

### 2.1.6. Kommerzielle Kits

EasySep™ Maus CD4 <sup>+</sup> <i>T cell Isolation Kit</i>	STEMCELL™ Technologies, Deutschland
CD4 <sup>+</sup> <i>T cell Isolation Kit</i> , Maus	Miltenyi Biotech, Deutschland
Cytofix/Cytoperm <i>Fixation and Permeabilization Kit</i>	BD Biosciences, USA
Lamina Propria <i>Dissociation Kit</i> , Maus	Miltenyi Biotech, Deutschland
Maus IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA	R&D Systems, USA
Maus IL-5 DuoSet ELISA	R&D Systems, USA
Maus IL-6 ELISA Set	BD Biosciences, USA
Maus IL-17 <i>Quantikine</i> ELISA Kit	R&D Systems, USA
Maus TNF-alpha <i>Quantikine</i> ELISA Kit	R&D Systems, USA
Maus IFN-gamma <i>Quantikine</i> ELISA Kit	R&D Systems, USA
peqGOLD TriFast™	VWR Peqlab, Deutschland
peqGOLD <i>Total RNA Isolation Kit</i>	VWR Peqlab, Deutschland
RevertAid <i>First Strand cDNA Synthesis Kit</i>	ThermoFischerScientific, USA

### 2.1.7. Antikörper

#### 2.1.7.1. Antikörper für die Durchflusszytometrie

Tabelle 4: Primär konjugierte Antikörper für die Durchflusszytometrie

Spezifität	Fluorochrom	Spezies/ Isotyp	Klone	Konzentration	Firma
CD3ε	APC	Rattete/IgG <sub>2b</sub> , κ	17A2	1:200	BioLegend
CD3ε	APC/Cy7	Rattete/IgG <sub>2b</sub> , κ	17A2	1:200	BioLegend
CD3ε	PE	Armenischer Hamster/IgG	145-2C11	1:200	BioLegend
CD3ε	PE/Cy7	Armenischer Hamster/IgG	145-2C11	1:200	BioLegend
CD4	PE	Ratte/IgG <sub>2b</sub> , κ	GK1.5	1:133	BD Biosciences
CD4	PE/Cy7	Ratte/IgG <sub>2a</sub> , κ	RM4-5	1:200	BioLegend
CD4	PerCP	Ratte/IgG <sub>2a</sub> , κ	RM4-5	1:200	BioLegend

<b>CD45</b>	PE/Cy7	Ratte/IgG <sub>2b</sub> , κ	30-F11	1:200	BioLegend
<b>CD45</b>	PB	Ratte/IgG <sub>2b</sub> , κ	30-F11	1:200	BioLegend
<b>CD45</b>	AF700	Ratte/IgG <sub>2b</sub> , κ	30-F11	1:200	BioLegend
<b>CD45RB</b>	FITC	Ratte/IgG <sub>2a</sub> , κ	16A	1:67	BD Biosciences
<b>FVD</b>	eFluor® 780			1:1000	eBioscience
<b>IFN-γ</b>	APC	Ratte/IgG1, κ	XMG1.2	1:200	BioLegend
<b>IL-17</b>	FITC	Ratte/IgG1, κ	TC11- 18H10.1	1:200	BioLegend
<b>RORγt</b>	BV786	Maus/IgG2a, κ	Q31-378	1:200	BD Biosciences
<b>T-bet</b>	BV-421™	Ratte/IgG1, κ	4B10	1:200	BioLegend

### 2.1.7.2. Antikörper für *in vitro* Experimente

Tabelle 5: Antikörper für *in vitro* Experimente

Spezifität		Spezies/ Isotyp	Klone	Konzentration	Firma
<b>α-CD3</b>	<i>Functional grade purified</i>	Armenischer Hamster/IgG	145-2C11	2 µg/ml	eBioscience
<b>α-CD28</b>	<i>Functional grade purified</i>	Goldhamster/IgG	37.51	5 µg/ml	eBioscience

### 2.1.8. Rekombinante Zytokine und Proteine

Tabelle 6: Zytokine und Proteine

Zytokin/Protein	Spezifität	Firma
<b>Interleukin-1β</b>	Maus	Peprtech, USA
<b>Interleukin-2</b>	Maus	Peprtech, USA
<b>Interleukin-4</b>	Maus	Peprtech, USA
<b>Interleukin-6</b>	Maus	Peprtech, USA
<b>Interleukin-12</b>	Maus	Peprtech, USA
<b>Interleukin-23</b>	Maus	Peprtech, USA
<b>TGF-β</b>	Human/Maus	R&D Systems, Deutschland

### 2.1.9. Primer Sequenzen für qRT-PCR

Tabelle 7: qRT-PCR Primer

<b>Gen</b>	<b>left/right</b>	<b>5'→3'</b>
<b>GATA-3</b>	<i>left</i>	TTATCAAAGCCCAAGCGAAG
	<i>right</i>	TGGTGGTGGTCTGACAGTTC
<b>IFN-γ</b>	<i>left</i>	ATCTGGAGGAACTGGCAAAA
	<i>right</i>	TTCAAGACTTCAAAGAGTCTGAGGTA
<b>IL-5</b>	<i>left</i>	ACATTGACCGCCAAAAAG
	<i>right</i>	ATCCAGGAACTGCCTCGT
<b>IL-6</b>	<i>left</i>	GCTACCAAAGTGGATATAATCAGGA
	<i>right</i>	CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA
<b>IL-17</b>	<i>left</i>	CATGAGTCCAGGGAGAGCTT
	<i>right</i>	GCTGAGCTTTGAGGGATGAT
<b>IL-18</b>	<i>left</i>	CAAACCTTCCAAATCACTTCCT
	<i>right</i>	TCCTTGAAGTTGACGCAAGA
<b>IL-1β</b>	<i>left</i>	AGTTGACGGACCCCAAAAG
	<i>right</i>	AGCTGGATGCTCTCATCAGG
<b>T-bet</b>	<i>left</i>	CAACCAGCACCCAGACAGAGA
	<i>right</i>	ACAAACATCCTGTAATGGCTTG
<b>TNF-α</b>	<i>left</i>	CTGTAGCCCACGTCGTAGC
	<i>right</i>	TTGAGATCCATGCCGTTG
<b>RORγt</b>	<i>left</i>	AGAGACACCACCGGACATCT
	<i>right</i>	CAAGGGATCACTTCAATTTGTG
<b>β-Aktin</b>	<i>left</i>	CTAAGGCCAACCGGGAAAAG
	<i>right</i>	ACCAGAGGCATACAGGGACA

### 2.1.10. Software

EndNote X9	Thomson Reuters, USA
FACSDiva 7.0	BD Biosciences, Deutschland
FlowJo 10.2	Tree Star, USA
Graphpad Prism 8.0	Graphpad Software, USA
Lightcycler 480 SW 1.5	Roche, Deutschland
Microsoft Powerpoint	Microsoft Corporation, USA
Microsoft Word	Microsoft Corporation, USA

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1. RNA-Isolation aus Gewebe und Einzelzellsuspensionen

Zur RNA-Isolation aus murinem Kolongewebe oder MLK wurde das peqGOLD *Total RNA isolation kit* von peqlab benutzt. Circa ein Zentimeter Kolongewebe oder je ein MLK pro Maus wurden direkt nach Isolation bei - 20 °C in sterilen *Eppendorf Tubes*<sup>®</sup> eingefroren. Zur RNA-Isolation wurden die Gewebeprobe in 800 µl *RNA Lysis Buffer T* resuspendiert, zum Auftauen für fünf Minuten auf Eis gelagert und danach mit einem Ultra Turrax homogenisiert. Anschließend wurde das Herstellerprotokoll verfolgt. Für den letzten Elutionsschritt des Herstellerprotokolls wurde die RNA mit 50 µl RNase freiem Wasser eluiert und für zehn Minuten bei 55 °C inkubiert. Die totale RNA-Konzentration wurde sofort photometrisch bestimmt und die isolierte RNA bis zur Weiterverwendung bei - 80 °C gelagert. Die RNA-Isolation aus Einzelzellsuspensionen erfolgte mit dem peqGOLD *TriFast™ RNA Extraction Kit*. Hierzu wurden zuvor in Zellkulturexperimenten kultivierte T-Zellen mit PBS gewaschen und je 5 x 10<sup>6</sup> Zellen in 250 µl PBS gelöst. Anschließend wurde das Herstellerprotokoll befolgt. Die totale RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt und die isolierte RNA bis zur Weiterverarbeitung bei - 80 °C gelagert.

#### 2.2.1.2. cDNA Synthese

Für die Herstellung von cDNA wurde das *RevertAID™ First Strand Synthesis Kit* von ThermoScientific benutzt. Oligo(dT)<sub>18</sub> Primer wurden benutzt, um cDNA ausschließlich vom poly(A) Ende der mRNA zu synthetisieren. Die isolierte RNA wurde mit RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 2.000 ng/11 µl gebracht. Anschließend wurde die RNA bei 42 °C mit den folgenden Reagenzien für die Amplifikation inkubiert: 4 µl *Reaction Buffer* (5 x), 2 µl *dNTP Mix* (10 mM), 1 µl *Oligo(dT)<sub>18</sub> Primer*, 1 µl *RiboLock™ RNase Inhibitor* (20 U/µl) and 1 µl *RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase* (200 U/µl). Nach 60 Minuten Inkubationszeit zum cDNA-Umschrieb wurden die Proben für zehn Minuten auf 70 °C gebracht, um die reverse Transkriptase zu inaktivieren. Jede Probe wurde mit 20 µl RNase-freiem Wasser verdünnt, um eine Konzentration von 50 ng/ml zu erreichen und bei - 20 °C gelagert.

### 2.2.1.3. Quantitative *real-time* Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

mRNA-Expressionslevel wurden mittels qRT-PCR gemessen. Die Anzahl der gemessenen Kopien pro Probe wurde anhand des Referenzgens  $\beta$ -Aktin normiert. Für die Proben aus *in vivo* Experimenten wurde *KAPA PROBE FAST qPCR Kit* von VWR peqlab und für Proben aus *in vitro* Experimenten wurde *Biozym Probe qPCR Kit Separate ROX* von Biozym verwendet. Die Herstellerangaben wurden befolgt, jedoch wurde das totale Volumen auf 10  $\mu$ l pro Probe halbiert.

Für diese Arbeit wurden sequenzspezifische DNA-Sonden des *Universal ProbeLibrary Set* von Roche benutzt. Primer wurden mithilfe des *Universal ProbeLibrary Assay Design Center* von Roche hergestellt. Für alle qRT-PCR Experimente wurde ein Master Mix (Zusammensetzung siehe Tabelle 8) verwendet.

**Tabelle 8:** qRT-PCR Master-Mix pro Zielgen und Probe

Reagenz	Volumen/Well [ $\mu$ l]
cDNA	2
<i>KAPA PROBE</i> bzw. <i>Biozym Probe</i>	5
Primer vorwärts (100 $\mu$ M)	0.2
Primer rückwärts (100 $\mu$ M)	0.2
Probe mix (10 x)	0.1
RNAs-freies Wasser	2.5

Zur Detektion der Reaktion wurde das Programm *Mono Color Hydrolysis Probes* des LightCycler480 ausgewählt, welches aus den in Tabelle 9 genannten Teilschritten besteht. Zur Analyse der Daten wurde die LightCycler 480 Softwareversion 1.5 benutzt.

**Tabelle 9:** Ablauf des Syntheseprogrammes im LightCycler

Teilschritt	Temperatur	Zeit	Quantifikation	Zyklen
Vorinkubation	95 °C	10 Minuten	nein	1
Denaturierung	95 °C	15 Sekunden	nein	40
DNA-Synthese	60 °C	60 Sekunden	ja	
Kühlung	40 °C	30 Sekunden	nein	1

## 2.2.2. Immunologische Methoden

### 2.2.2.1. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

Unter 2.1.6. sind alle ELISA aufgeführt, die für diese Arbeit benutzt wurden. Für alle ELISA wurden die Herstellerprotokolle exakt befolgt mit folgender, einziger Ausnahme: Alle angegebenen Volumina wurden bei der Durchführung um 50 % reduziert.

### 2.2.2.2. Durchflusszytometrie

Für alle durchflusszytometrischen Analysen wurde ein FACSCanto II oder ein LRSFortessa genutzt. Das FACSCanto II hat drei Laser: einen blauen Laser (488nm), einen roten Laser (633nm) und einen violetten Laser (405nm). Das LRSFortessa besitzt vier Laser: einen blauen Laser (488nm), einen violetten Laser (405nm), einen gelb-grünen Laser (561nm) und einen roten Laser (640nm).

*Single stained compensation controls* wurden benutzt, um spektrale Überlappungen zu detektieren. Um eine optimale Analyse zu garantieren, wurden spektrale Überlappungen < 25 % gehalten. Zur Kompensation wurden *UltraComp eBeads* von eBioscience benutzt. Ungefärbte Kontrollproben, sowohl aus Einzelzellsuspensionen als auch aus *UltraComp eBeads* und Isotyp-Kontrollen, wurden in jede durchflusszytometrische Analyse eingeschlossen. Die Isotyp-Kontrollen wurden mit den gleichen Konzentrationen wie die entsprechenden Proben gefärbt. Für die Kompensationsberechnungen wurden je 50  $\mu$ l *UltraComp eBeads* mit 1  $\mu$ l Fluorochromgekoppeltem Antikörper gefärbt. *BD FACSDiva* Software wurde zur Berechnung der optimalen Kompensation benutzt.

#### 2.2.2.2.1. Färbung von Oberflächenmolekülen zur FACS-Analyse

Proben aus Einzelzellsuspensionen wurden mit 50  $\mu$ l eines Antikörper-Master-Mix vermischt und lichtgeschützt für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Waschritt wurden die Proben für die durchflusszytometrischen Analyse in 100  $\mu$ l FACS Azid Puffer resuspendiert. Proben, die nicht sofort mittels FACS-Analyse ausgewertet wurden, wurden mit 1 ml 4 % PFA für 20 Minuten lichtgeschützt bei 4 °C inkubiert, so

fixiert und dann nach einem Waschschrift mit PBS anschließend in 100  $\mu$ l PBS maximal eine Woche bis zur FACS-Analyse lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

### 2.2.2.2.2. Färbung von intrazellulären Proteinen zur FACS-Analyse

Vor der Färbung von intrazellulären Proteinen zur FACS-Analyse wurden die Proben unspezifisch mit PMA, Inomycin und Brefeldin A stimuliert. Brefeldin A, ein Proteintransportinhibitor, hemmt im rauhen endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat den weiteren intrazellulären Proteintransport und ermöglicht so den intrazellulären Nachweis des sekretierten Proteins durch Immunfluoreszenzfärbung.

Die Stimulation der Proben wurde in den folgenden Volumina und Konzentrationen je FACS-*Tube* durchgeführt:

T-Zell Medium	PMA	Inomycin	Brefeldin A
500 $\mu$ l	1:20.000	1:1.000	1:1.000

Anschließend wurden die Proben für 4 Stunden bei 37 °C in einem Inkubator inkubiert, einmalig mit PBS gewaschen, bei 400 x g für fünf Minuten zentrifugiert und die Überstände verworfen. Für die Färbung wurde das *BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit* benutzt und das Herstellerprotokoll befolgt.

## 2.3. Tierexperimente

### 2.3.1. Versuchstiere und Haltung

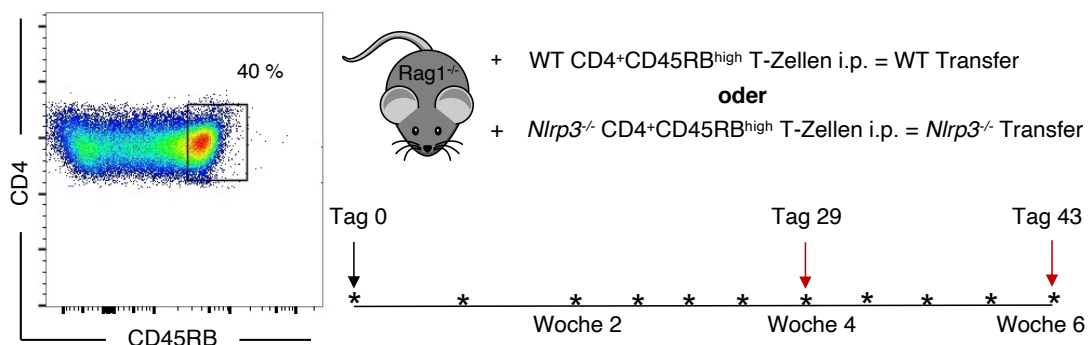
C57BL/6 Mäuse wurden von Janvier (St. Berthevin Cedex, Frankreich) bezogen. *Nlrp3<sup>-/-</sup>* und *Rag1<sup>-/-</sup>* Mäuse auf einem C57/BL6 Hintergrund wurden in der Zentralen Tierversuchsanstalt der Universität München gezüchtet. Die Mäuse wurden entsprechend der gesetzlichen Hygiene- und Haltevorschriften gehalten. Alle Mausexperimente erfolgten im Rahmen des von der Regierung von Oberbayern genehmigten Tierversuchsantrags Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-48-12. Die Mäuse waren zu Beginn der Experimente zwischen neun und zwölf Wochen alt.



### 2.3.2. T-Zell-Transferkolitismodell

Für diese Arbeit wurde ein adaptives T-Zell-Transferkolitismodell genutzt. Ursprüngliche Protokolle zur Induktion einer Kolitis in immuninkompetenten Mäusen (in unserem Fall *Rag1*<sup>-/-</sup>) mittels naiver T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T-Zellen) aus gesunden Spendertieren von Fiona Powrie und Kollegen (Powrie and Uhlir 2004) wurden über die Jahre von anderen Arbeitsgruppen modifiziert. Für die vorliegende Arbeit wurde das Protokoll von Dmitry V. Ostanin und Kollegen (Ostanin, Bao et al. 2009) benutzt. Übersichtshalber zusammengefasst wurden folgende Arbeitsschritte befolgt:

Milzen gesunder Spendermäuse wurden entnommen. Zur Isolation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Splenozyten wurde entweder das *CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit* von MiltenyiBiotec oder das *EasySep™ Maus CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit* von STEMCELL benutzt und die Herstellerangaben genau befolgt. Die isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden zu 5 x 10<sup>7</sup> Zellen in 1 ml FACS Puffer ohne Natriumazid mit 1:67 CD45RB FITC und 1:133 CD4 PE Antikörpermix resuspendiert und lichtgeschützt auf einem Rollenmischer für 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden im Anschluss gewaschen und zu einem unabhängigen FACS-Zellsorter (Dr. med. habil. Michael Hristov am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten der Ludwig-Maximilians-Universität München) gebracht, wo der FACS-Sort mit einem BD FACSAria™ III durchgeführt wurde.



**Abbildung 2-1: CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> Transferkolitis - Induktion und Versuchsablauf.**

Dargestellt ist das verwendete Transferkolitismodell. Die Induktion der Transferkolitis wird am Tag 0 mit der intraperitonealen (i.p.) Injektion von 100.000 WT oder *Nlrp3*<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T-Zellen pro Versuchstier gestartet. Als Empfängertiere dienen *Rag1*<sup>-/-</sup> Mäuse. Der Versuchsabbruch fand entweder am Tag 29 (nach vier Wochen) oder am Tag 43 (nach sechs Wochen) statt. Die mit Stern (Tag null, Woche eins, Woche zwei, anschließend zweimal pro Woche) markierten Stellen zeigen die Zeitpunkte der Gewichtskontrollen und der Überprüfungen des klinischen Scores an. Bei der links in der Abbildung dargestellten *Dot blot*-Analyse ist die *Gating*-Strategie der FACS-basierten Aufreinigung von WT CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> Zellen exemplarisch gezeigt.

Bezogen auf die CD4<sup>+</sup> Population ist die CD45RB<sup>high</sup> Population definiert als die 40 % der Zellen mit der stärksten CD45RB-Expression. Eine Reinheit von > 95 % der CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> Population wurde routinemäßig erzielt. Die Zellen wurden nach dem FAC-*Sort* in reinem FBS aufgefangen, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in PBS resuspendiert. 100  $\mu$ l PBS mit  $0.4 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T-Zellen wurde langsam in jede *Rag1*<sup>-/-</sup> Empfängermaus intraperitoneal (i.p.) injiziert. Der Versuchsaufbau ist schematisch in **Abbildung 2-1** gezeigt.

### 2.3.3. Klinisches und histologisches *Scoring* der Versuchstiere

Versuchstiere wurden während der T-Zell-Transferkolitis bis zur Woche 2 je einmal pro Woche *scored*, anschließend bis zum Versuchsabbruch in Woche 4 beziehungsweise 6 zweimal pro Woche. Das klinische *Scoring* bestand aus der Gewichtsbestimmung der Tiere kombiniert mit Stuhlanalysen. Es wurde sowohl die Konsistenz des Stuhls als auch Hämatochezie (Blut im Stuhl) bestimmt. Die Stuhlkonsistenz wurde eingeteilt in 0: normale Pellets, 2: weiche, deformierte Pellets, 4: flüssiger Stuhl. Hämatochezie wurde mittels Hämocult<sup>®</sup> Test bestimmt und eingeteilt in 0: negativ, 2: positiv, 4: sichtbarer rektaler Blutabgang. Die Summe aus Stuhlkonsistenz und Hämocult<sup>®</sup> Testergebnis wurde addiert und anschließend durch zwei geteilt, sodass als Maximalwert 4 für die Schwere der klinischen Symptomatik als klinischer *Score* erreicht werden konnte.

### 2.3.4. Organpräparation und Herstellung von Einzelzellsuspensionen

#### 2.3.4.1. Gewinnung von Plasma und Isolation von peripheren mononukleären Zellen aus peripherem Blut zur FACS-Analyse

Zur Gewinnung von Vollblut für weitere Untersuchungen wurden die Tiere mit Isofluran narkotisiert. Es wurde retroorbital mithilfe einer heparinisierten Mikrokapillare pro Maus 200  $\mu$ l Vollblut entnommen, 1:4 mit Heparin vermischt und anschließend bei 400 x g für fünf Minuten zentrifugiert, um das Blutplasma von den zellulären Bestandteilen des Blutes zu trennen. Das Blutplasma wurde anschließend in ein neues *Eppendorf Tube*<sup>®</sup> überführt und bei - 20 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Vor der FACS-Analyse wurde das restliche Vollblut mit PharmLyse® Ammoniumchlorid-Puffer versehen, um die enthaltenen Erythrozyten zu lysieren. Es wurde das Herstellerprotokoll verwendet. Nach dem letzten Waschschrift des Protokolls wurden die Proben mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gefärbt und sofort durchflusszytometrisch analysiert.

### **2.3.4.2. Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Milzen und mesenterialen Lymphknoten**

Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Milzgewebe wurden die Milzen in einer auf Eis gelagerten Petrischale mit T-Zell-Medium mittels einer 26-G Nadel durchgespült. Im Anschluss wurde das Medium mit den isolierten Zellen sowie die Milzen selbst auf einen 30  $\mu\text{m}$  *Nylon Mesh Strainer* platziert und vorsichtig durchgedrückt bzw. durchgespült. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 4 °C mit 400 x g für zehn Minuten wurde der Überstand abgeschüttet und das Pellet vorsichtig resuspendiert. Die Proben wurden bis zur weiteren Analyse auf Eis gelagert.

Entnommene MLK wurden unter kontinuierlicher Spülung mit PBS + 10 % FBS durch einen 30  $\mu\text{m}$  *Nylon Mesh Strainer* gegeben. Im Anschluss wurden die Proben bei 400 x g für fünf Minuten bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Bis zur weiteren Analyse der Proben mittels FACS-Analyse wurden diese auf Eis gelagert.

### **2.3.4.3. Aufbereitung von Kolongewebe für weitere Analysen**

Entnommene Dickdärme der Versuchstiere wurden von überschüssigem mesenterialen Bindegewebe und Blutgefäßen befreit, sowie verbliebene Kotpellets vorsichtig nach distal ausgestrichen. Restliche Kotrückstände wurden mit HBSS *w/o* ausgespült. Anschließend wurden die Kolons vermessen und gewogen, um das Verhältnis von Kolongewicht zu Kolonlänge zu ermitteln. Ein höherer Wert steht hier typischerweise für eine vermehrte Entzündungsreaktion und korreliert ebenfalls mit höheren klinischen *Scores* (Ostanin, Bao et al. 2009).

Zur pathologischen Beurteilung wurden fünf Millimeter lange Kolonstücke vom distalen Ende des Kolons abgetrennt und sofort in PBS mit 10 % Formalin transferiert. Die

Kolonstücke wurden so mindestens 24 h fixiert bevor sie in Paraffin eingebettet wurden. Das histologische *Scoring* wurde verblindet von einem Pathologen (PD Dr. med. Steffen Ormanns, Institut für Pathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München) vollzogen.

Zur Proteinanalyse mittels ELISA wurden fünf Millimeter lange Kolonstücke am distalen Ende abgeschnitten, mit einer Feinwaage gewogen und in eine 24-*well*-Platte mit 1 ml T-Zell-Medium gegeben. Um keine verfälschten Ergebnisse durch Darmmikrobiota zu erhalten, wurde dem Medium 100 µg/ml Gentamycin hinzugesetzt. Die Kolonstücke wurden für 24 h bei 37 °C im Inkubator belassen. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt bei 15.000 x g für fünf Minuten bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml *Eppendorf Tube*<sup>®</sup> überführt und bis zur weiteren Analyse bei - 20 °C eingefroren.

Zur RNA-Isolation wurden 10 mm lange Kolonstücke vom distalen Ende des Kolons abgetrennt, in ein *Eppendorf Tube*<sup>®</sup> überführt und bei - 20 °C bis zur weiteren RNA-Isolation aufbewahrt.

Zur Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus Kolongewebe wurde das *Lamina Propria Dissociation Kit* von Miltenyi Biotec verwendet. Das Herstellerprotokoll wurde befolgt. Alle angegebenen Volumina wurden um 50 % reduziert. Nach Schritt 23 des Protokolls wurden die generierte Einzelzellsuspension in 1 ml PBS mit 10 % FBS resuspendiert. Anschließend wurden die Proben zur FACS-Analyse angefärbt.

### 2.3.5. *In vitro* T-Zell-Polarisierungsversuche

Für die durchgeführten *in vitro* T-Zell-Polarisierungen wurden pro WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Gruppe je fünf bis sieben Milzen entnommen. Die in Kapitel 2.3.2. beschriebenen Arbeitsschritte wurden exakt befolgt. Anschließend wurden je 100.000 CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T-Zellen pro *well* in einer 96-*well-round bottom*-Platte in T-Zell-Medium für fünf Tage kultiviert. Plattengebundener anti-CD3 Antikörper (5 µg/ml) sowie löslicher anti-CD28 Antikörper (5 µg/ml) wurde in jedes *well* beigemischt. Die spezifischen Zytokinkonzentrationen zur Polarisierung in die einzelnen T-Zelllinien sind **Tabelle 10** zu entnehmen. Obwohl die CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> Fraktion keine T<sub>reg</sub> Zellen enthält, wurde diese Kondition als Negativkontrolle in jeden Versuch mitaufgenommen. Nach fünf Tagen Kultivierung

wurden die Platten bei 400 x g zentrifugiert und die Überstände für Zytokinbestimmungen mittels ELISA abgenommen.

**Tabelle 10:** Zytokinkonzentrationen der *in vitro* T-Zell-Polarisierung

	<b>Th<sub>0</sub></b>	<b>Th<sub>1</sub></b>	<b>Th<sub>2</sub></b>	<b>Th<sub>17</sub></b>	<b>T<sub>reg</sub></b>
<b>IL-2</b>		5 ng/ml	5 ng/ml		
<b>IL-12</b>		50 ng/ml			
<b>IL-4</b>			50 ng/ml		
<b>TGF-β</b>				1 ng/ml	5 ng/ml
<b>IL-6</b>				30 ng/ml	
<b>IL-23</b>				30 ng/ml	
<b>IL-1β</b>				20 ng/ml	

## 2.4. Statistik

Die dargestellten Daten sind Mittelwerte ± SEM. Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde mittels Welch's t-Test ermittelt. Unterschiede wurden ab einem p-Wert von < 0.05 als signifikant [\*] gewertet. Für die Erstellung der statistischen Angaben wurde GraphPad Prism (Version 8.1.0) verwendet.

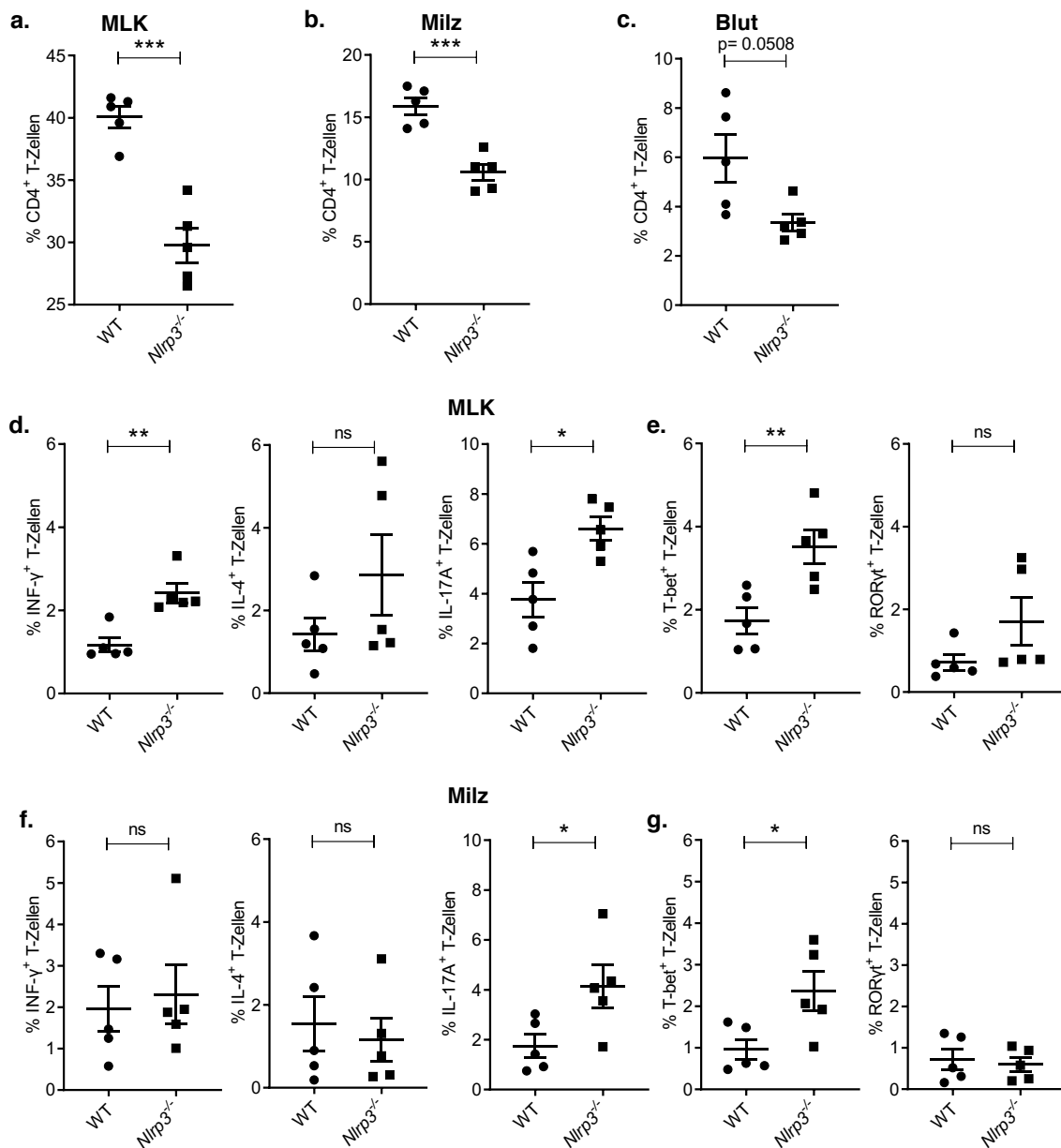
### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Das NLRP3-Inflammasom beeinflusst die Produktion von IL-17A in murinen T-Zellen

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe beschäftigten sich mit der Auswirkung des NLRP3-Inflammasoms auf Entstehung und Verlauf der CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> Transferkolitis. Es zeigte sich, dass *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Tiere signifikant geringere Entzündungszeichen im Kolon aufwiesen, was sich sowohl in klinischen und histologischen Untersuchungen, als auch in den exprimierten Zytokinen im Kolongewebe widerspiegelte (Mak'Anyengo, Duwell et al. 2018). Ein Augenmerk lag auf der Th<sub>1</sub>/Th<sub>17</sub>-Polarisierung, da diese T-Helfer-Zellpopulationen als dominante Vertreter entzündlicher Prozesse bei Kolitis beschrieben sind und deren Balance die entzündliche Immunreaktion beeinflusst (Kobayashi, Okamoto et al. 2008). Interessanterweise wiesen NLRP3-defiziente Empfängertiere, die mit WT CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T-Zellen transferiert wurden, nach vier Wochen weniger IL-17A<sup>+</sup> T-Zellen in der Lamina propria auf und die IL-17 mRNA-Level im Kolon waren signifikant niedriger als in WT Empfängertieren (Mak'Anyengo, Duwell et al. 2018). Unbeantwortet blieb die Frage, ob dies ein T-Zell-intrinsischer Effekt von NLRP3 oder ein indirekter Effekt war.

Um zu untersuchen, ob das NLRP3-Inflammasom in T-Zellen im *steady state* bei gesunden Tieren einen Effekt auf die T-Zell-Polarisierung hat, isolierten wir CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus gesunden WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Mäusen. Es zeigte sich, dass *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Tiere weniger CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den mesenterialen Lymphknoten (MLK) und in der Milz aufwiesen. Im peripheren Blut war der Unterschied mit einem p-Wert von 0.058 nicht signifikant (**Abbildung 3-1, a-c**).

CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus den MLK von *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Tieren wurden durchflusszytometrisch auf klassische Effektorzytokine der Th<sub>1</sub>- (INF- $\gamma$ ), Th<sub>2</sub>- (IL-4) und Th<sub>17</sub>- (IL-17A) Differenzierung untersucht (Raphael, Nalawade et al. 2015). CD4<sup>+</sup> T-Zellen produzierten signifikant mehr INF- $\gamma$  und IL-17A, für IL-4 fanden sich keine signifikanten Unterschiede (**Abbildung 3-1, d**).



**Abbildung 3-1: Ex vivo-Analyse der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen gesunder WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Mäuse.** Die Frequenz von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (% von CD45<sup>+</sup> Zellen) in mesenterialen Lymphknoten (MLK) (a), der Milz (b) und im Blut (c) von WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Tieren wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Die intrazelluläre Expression von INF- $\gamma$ , IL-4 und IL-17A wurde in MLK (d) und der Milz (f), die Transkriptionsfaktoren T-bet und ROR $\gamma$ t in MLK (e) und der Milz (g) bestimmt. Die intrazellulären Färbungen wurden vier Stunden nach Stimulation der Zellen mit PMA und Ionomycin durchgeführt. Daten sind gezeigt als Mittelwerte  $\pm$  SEM aus einem Experiment mit jeweils fünf Tieren. \* p < 0.050, \*\* p < 0.010, \*\*\* p < 0.001 und ns (nicht signifikant) wurden mittels Welch's t-Test ermittelt.

Zudem wurde die Expression klassischer Transkriptionsfaktoren der T-Zell-Differenzierung untersucht, um mögliche Hinweise auf eine dominierende T-Helfer-Zellsubpopulation zu bekommen. Die intrazelluläre Expression von T-bet, einem Transkriptionsfaktor für Th<sub>1</sub>-Polarisierung (Szabo SJ 2000), war in den MLK der *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Tiere, passend zu der höheren INF- $\gamma$ -Expression, signifikant höher als in WT

Tieren. In der Expression von ROR $\gamma$ t, einem zentralen Transkriptionsfaktor in der Differenzierung von Th<sub>17</sub> Zellen (Ivanov, McKenzie et al. 2006, Chung, Chang et al. 2009), fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Tieren (**Abbildung 3-1, e**). Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz von *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Tieren produzierten wie die der MLK signifikant mehr IL-17A, allerdings fand sich kein Unterschied in der Expression von INF- $\gamma$  oder IL-4 (**Abbildung 3-1, f**). Auch in der Milz fand sich in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen von *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Tieren eine signifikant höhere Expression von T-bet, während die Expression von ROR $\gamma$ t vergleichbar war (**Abbildung 3-1, g**).

Die Daten weisen darauf hin, dass die T-Helfer-Zellpopulation in gesunden *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Mäusen zugunsten einer Th<sub>1</sub>/Th<sub>17</sub>-Polarisierung verschoben ist.

### **3.2. *Nlrp3*<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T-Zellen produzieren *in vitro* weniger IL-17 als WT T-Zellen**

Als nächstes wurde untersucht, ob das NLRP3-Inflammasom in der Polarisierung naiver T-Zellen *in vitro* eine Rolle spielt. Da bei der T-Zell-Transferkolitis mit CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T-Zellen gearbeitet wird, verwendeten wir diese Population für die folgenden Versuche. Die Population von CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> ist zu über 90 % CD25<sup>-</sup>, zu 80 % CD62L<sup>+</sup> und kann somit als naive T-Zell-Population und gleichwertig zur CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Population angesehen werden (Ostanin, Bao et al. 2009).

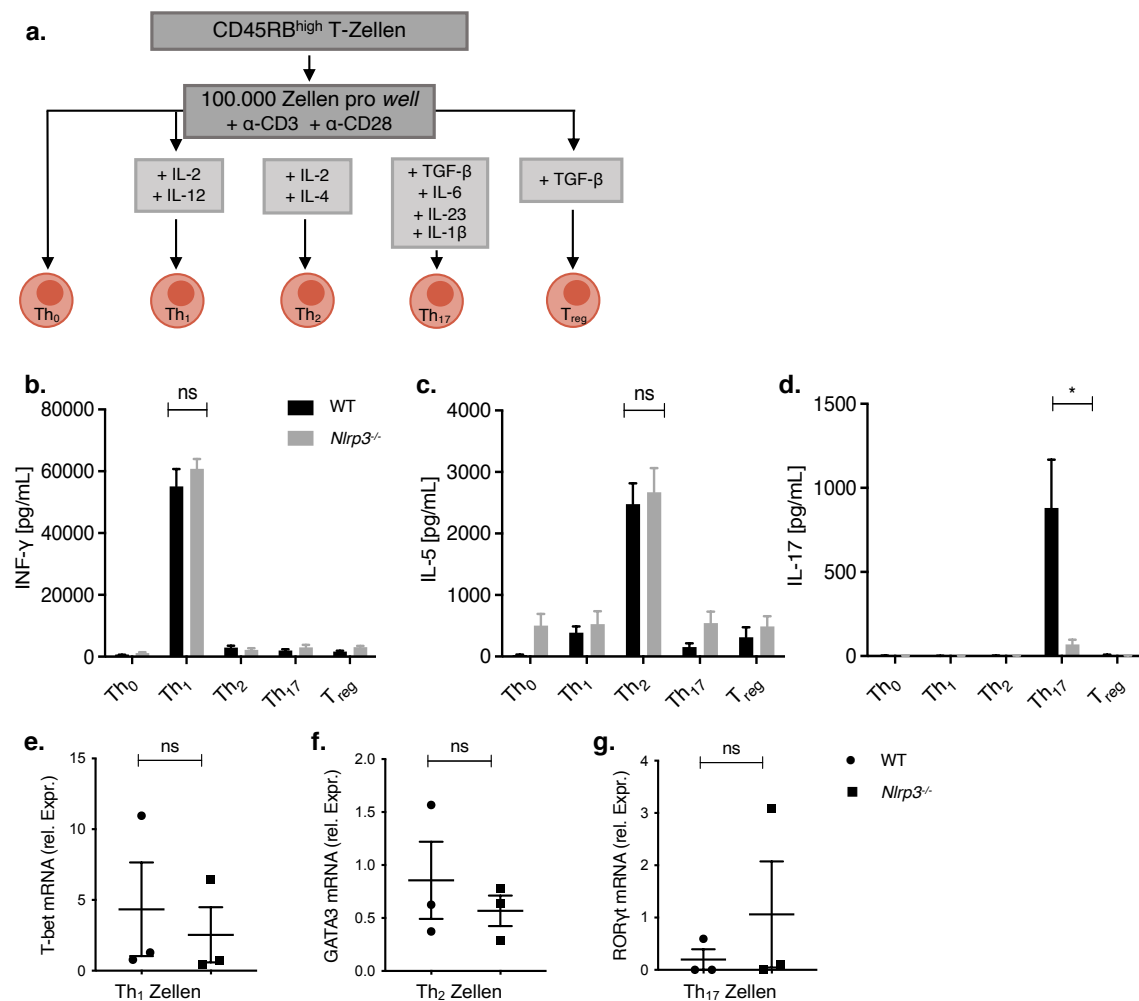
Auf die Th<sub>1</sub>-, Th<sub>2</sub>- und Th<sub>17</sub>-Polarisierung wurde ein besonderes Augenmerk gelegt, da sich diese Subtypen aus CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> Zellen im Rahmen der T-Zell-Transferkolitis *in vivo* differenzieren können. Die Konditionen für Th<sub>0</sub> und T<sub>reg</sub> Zellen wurden jedoch zur Vollständigkeit als Kontrollen in jedes Experiment miteinbezogen. Eine Übersicht des *in vitro* Versuchsaufbaus ist in **Abbildung 3-2, a** gezeigt.

Nach Polarisierung in Th<sub>1</sub>, Th<sub>2</sub> und Th<sub>17</sub> Zellen wurden die Zytokine INF- $\gamma$  (Th<sub>1</sub>), IL-5 (Th<sub>2</sub>) und IL-17 (Th<sub>17</sub>) im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Die Versuche zeigten, dass WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T-Zellen unter den Kulturbedingungen *in vitro* vergleichbare Mengen an INF- $\gamma$  und IL-5 sezernierten. Interessanterweise sezernierten *Nlrp3*<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T-Zellen, konträr zu den oben beschriebenen *ex vivo* Untersuchungen, deutlich weniger IL-17 als WT T-Zellen (**Abbildung 3-2, b-d**).



Auf mRNA-Ebene zeigte sich am Ende der Kultur kein signifikanter Unterschied in der Expression charakteristischer T-Zell-Transkriptionsfaktoren, wie T-bet für Th<sub>1</sub>, GATA3 für Th<sub>2</sub> (Zhang, Cohn et al. 1997) und RORγt für Th<sub>17</sub> Zellen (**Abbildung 3-2, e-g**).

Insgesamt zeigte sich *in vitro*, dass das NLRP3-Inflammasom T-Zell-intrinsisch keine Rolle in der Polarisierung von Th<sub>1</sub> und Th<sub>2</sub> Zellen spielt, gemessen an der Produktion von charakteristischen Zytokinen der entsprechenden Zellpopulationen. Für die Th<sub>17</sub>-Population zeigte sich eine deutliche Reduktion der IL-17A-Sekretion, als Hinweis auf eine gestörte Polarisierung aufgrund der NLRP3-Defizienz.



**Abbildung 3-2: *In vitro* T-Zell-Differenzierungs-Kulturbedingungen zeigen eine reduzierte IL-17A Sekretion bei *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Th<sub>17</sub> Zellen.**

CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T-Zellen wurden aus Milzen von gesunden WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Tieren mittels FAC-*Sort* isoliert und unter Konditionen für Th<sub>0</sub>, Th<sub>1</sub>, Th<sub>2</sub>, Th<sub>17</sub> und T<sub>reg</sub> Zellen kultiviert (a). Nach fünf Tagen wurden die Zellüberstände abgenommen und IFN-γ (b), IL-5 (c) und IL-17 (d) mittels ELISA bestimmt (jeweils n = 10). Mittels qRT-PCR wurde nach fünf Tagen Kultivierung die mRNA-Expression charakteristischer Transkriptionsfaktoren der Th<sub>1</sub>-, Th<sub>2</sub>- und Th<sub>17</sub>-Differenzierung bestimmt. Die relative Expression (rel. Expr.) von T-bet für Th<sub>1</sub> (e), GATA3 für Th<sub>2</sub> (f) und RORγt für Th<sub>17</sub> Zellen (g) ist normalisiert auf β-Aktin (jeweils n = 3).

Daten von b.-d. sind gezeigt als Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten. \*  $p < 0.050$  und ns (nicht signifikant) wurden mittels Welch's t-Test ermittelt.

### **3.3. NLRP3-Defizienz in den transferierten CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T-Zellen beeinflusst nicht den Verlauf der T-Zell-Transferkolitis im vierwöchigen Modell**

Die Versuche aus Kapitel 3.1 und Kapitel 3.2. zeigten einen konträren Phänotyp bezüglich der Th<sub>17</sub>-Differenzierung in den NLRP3-defizienten T-Zellen *in vivo* und *in vitro* auf. Die beiden Versuche weisen darauf hin, dass NLRP3 womöglich kontextabhängig die T-Zell-Polarisierung beeinflusst. Daher interessierte uns die Rolle von NLRP3 auf die Polarisation der transferierten CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T-Zellen im Transferkolitismodell und den daraus entstehenden Einfluss auf die Schwere der Kolitis.

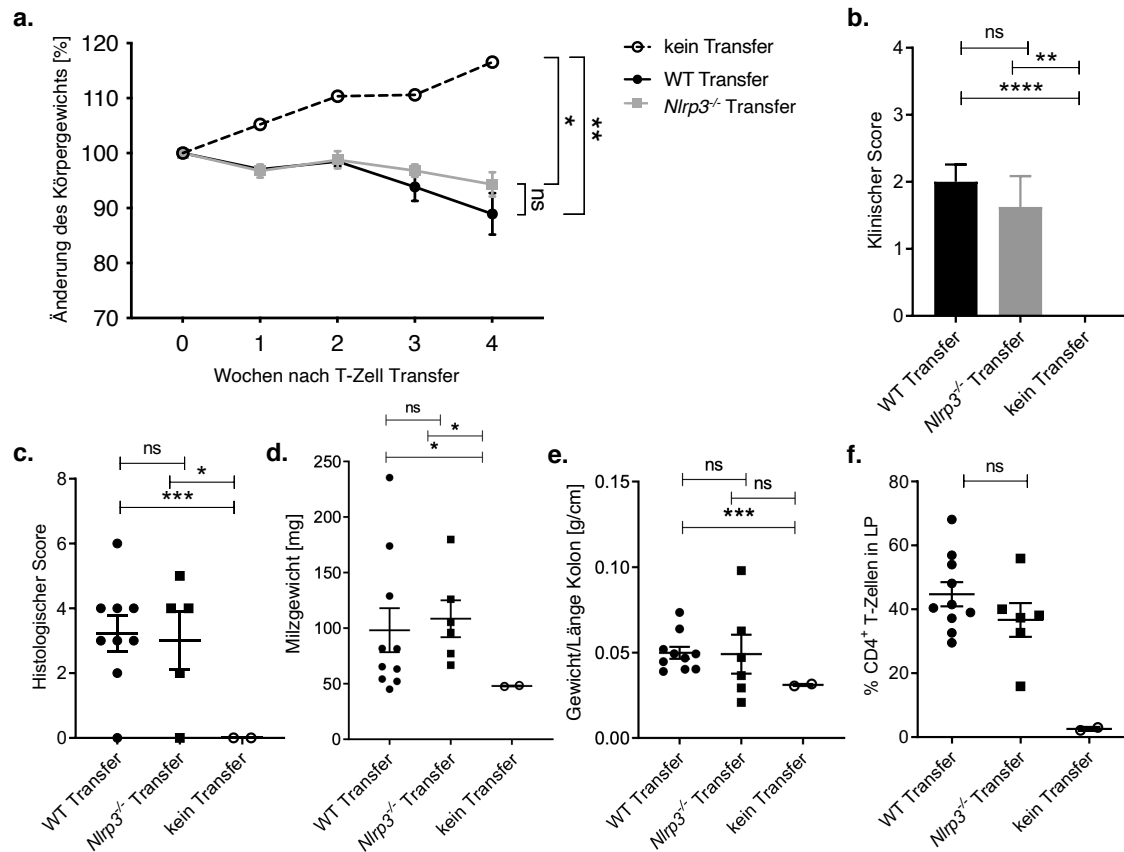
Vier Wochen nach Induktion der Transferkolitis zeigte sich sowohl in der WT als auch *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Transfergruppe ein signifikanter Gewichtsverlust im Vergleich zu unbehandelten Tieren (Kontrollgruppe, in den folgenden Abbildungen „kein Transfer“ genannt), zwischen den Genotypen fand sich diesbezüglich kein signifikanter Unterschied (**Abbildung 3-3, a**). Auch anhand des klinischen *Scores* (**Abbildung 3-3, b**) und der histologischen Veränderungen im Kolongewebe (**Abbildung 3-3, c**) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der WT und der *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Transfergruppe.

Die Milzen erkrankter Tiere weisen typischerweise im Rahmen der Entzündungsreaktion eine Gewichtszunahme nach vier Wochen Transferkolitis auf (Ostanin, Bao et al. 2009). Die Milzen beider Transfergruppen waren im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant schwerer, zwischen den Transfergruppen zeigte sich aber kein Unterschied (**Abbildung 3-3, d**).

Das Verhältnis von Kolongewicht zu Kolonlänge (**Abbildung 3-3, e**) zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen der WT und der *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Transfergruppe. Dieses Verhältnis kann additiv zur Bestimmung des Schweregrades der Kolitis genutzt werden. Ein hoher Wert korreliert hier mit einer höheren klinischen Krankheitsausprägung der Tiere (Ostanin, Bao et al. 2009).

Das Ausmaß der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Infiltration in die Lamina propria war nach vier Wochen Kolitisdauer in beiden Transfergruppen ebenfalls vergleichbar (**Abbildung 3-3, f**).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine NLRP3-Defizienz in den transferierten T-Helfer-Zellen keinen Einfluss auf den Schweregrad einer vierwöchigen Transferkolitis ausübt.



**Abbildung 3-3: Klinische Ausprägung der CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> Transferkolitis unter Verwendung von *Nlrp3*<sup>-/-</sup> bzw. WT T-Zellen nach vier Wochen Kolitisdauer.**

Vier Wochen nach Induktion der T-Zell-Transferkolitis mit WT oder *Nlrp3*<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T-Zellen wurde das Körpergewicht (a), normalisiert auf die gesunde Kontrollgruppe (kein Transfer), gemessen. Bei Versuchsabbruch wurde ein klinischer Score (b), bestehend aus Körpergewicht und Stuhlanalyse, sowie ein histologischer Score der entzündeten Darmmukosa (c), das Verhältnis von Kolongewicht und Stuhlanalyse (d) und das Gewicht der Milzen (e) bestimmt. Die Anzahl von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (% von CD45<sup>+</sup> Zellen) (f) in der Lamina propria des Kolons wurde durchflusszytometrisch untersucht (a-f: n = 6-10; kein Transfer: n = 2). Alle Daten sind gezeigt als Mittelwerte ± SEM von zwei unabhängigen Experimenten. \* p < 0.050, \*\* p < 0.010, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001 und ns (nicht signifikant) wurde mittels Welch's t-Test ermittelt.

### 3.4. *Nlrp3*<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T-Zellen haben keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf der Transferkolitis im sechswöchigen Modell

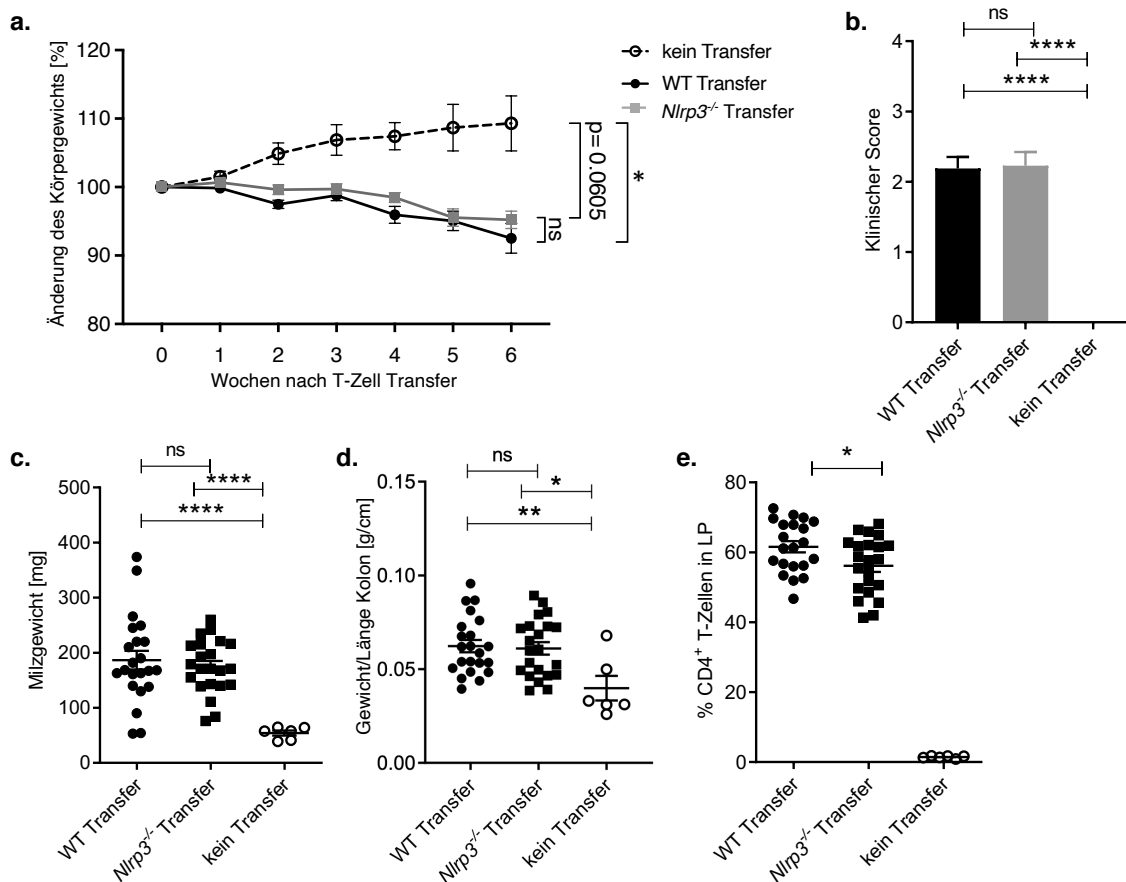
Viele publizierte Daten zur CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> Transferkolitis (und anderen adaptiven Transferkolitismodellen) stammen aus Versuchen, die sechs Wochen oder länger andauern. Mit unserem initialen Versuchsabbruch in Woche vier wollten wir einen

## Ergebnisse

potenziellen Einfluss von NLRP3 auf die frühe Entwicklung der Transferkolitis untersuchen. Die Verlängerung der Versuchsdauer auf sechs Wochen ermöglicht es, zudem eine spätere Phase der Entzündungsreaktion zu untersuchen.

Auch im Verlauf der sechs Wochen fand sich kein signifikanter Unterschied in der Änderung des Körpergewichts zwischen der WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Transfergruppe (**Abbildung 3-4, a**). Analog hierzu wies der klinische *Score* in Woche 6 keinen signifikanten Unterschied auf (**Abbildung 3-4, b**). Das Milzgewicht beider Transfergruppen hatte vergleichbar zugenommen (**Abbildung 3-4, c**) und auch das Verhältnis von Kolongewicht zu Kolonlänge (**Abbildung 3-4, d**) unterschied sich nicht signifikant. Die Anzahl der durchflusszytometrisch bestimmten CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Lamina propria war in der WT Transfergruppe nur gering erhöht (**Abbildung 3-4, e**).

Somit konnte auch die Verlängerung der Kolitisdauer keinen Einfluss auf die klinische Ausprägung der Transferkolitis zwischen den WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Transfergruppen aufdecken.



**Abbildung 3-4: Klinische Ausprägung der CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> Transferkolitis unter Verwendung von *Nlrp3*<sup>-/-</sup> bzw. WT T-Zellen nach sechs Wochen Kolitisdauer.**

Sechs Wochen lang nach Induktion der T-Zell-Transferkolitis mit WT oder *Nlrp3*<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T-Zellen wurde das Körpergewicht (a), normalisiert auf die gesunde Kontrollgruppe (kein Transfer), gemessen. Bei

Versuchsabbruch wurde ein klinischer *Score* (b), bestehend aus Körpergewicht und Stuhlanalyse, erhoben. Zudem wurden das Verhältnis von Kolongewicht zu Kolonlänge (c) und das Milzgewicht (d) erfasst. Die Anzahl von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (% von CD45<sup>+</sup>) (e) wurde in der Lamina propria (LP) des Kolons durchflusszytometrisch ermittelt (a-e: n= 22; kein Transfer: n= 6).

Alle Daten sind gezeigt als Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten.

\* p < 0.050, \*\* p < 0.010, \*\*\*\* p < 0.0001 und ns (nicht signifikant) wurde mittels Welch's t-Test ermittelt.

### 3.5. Bestimmung der Anzahl von *Nlrp3*<sup>-/-</sup> und WT CD4<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut im Verlauf der T-Zell-Transferkolitis

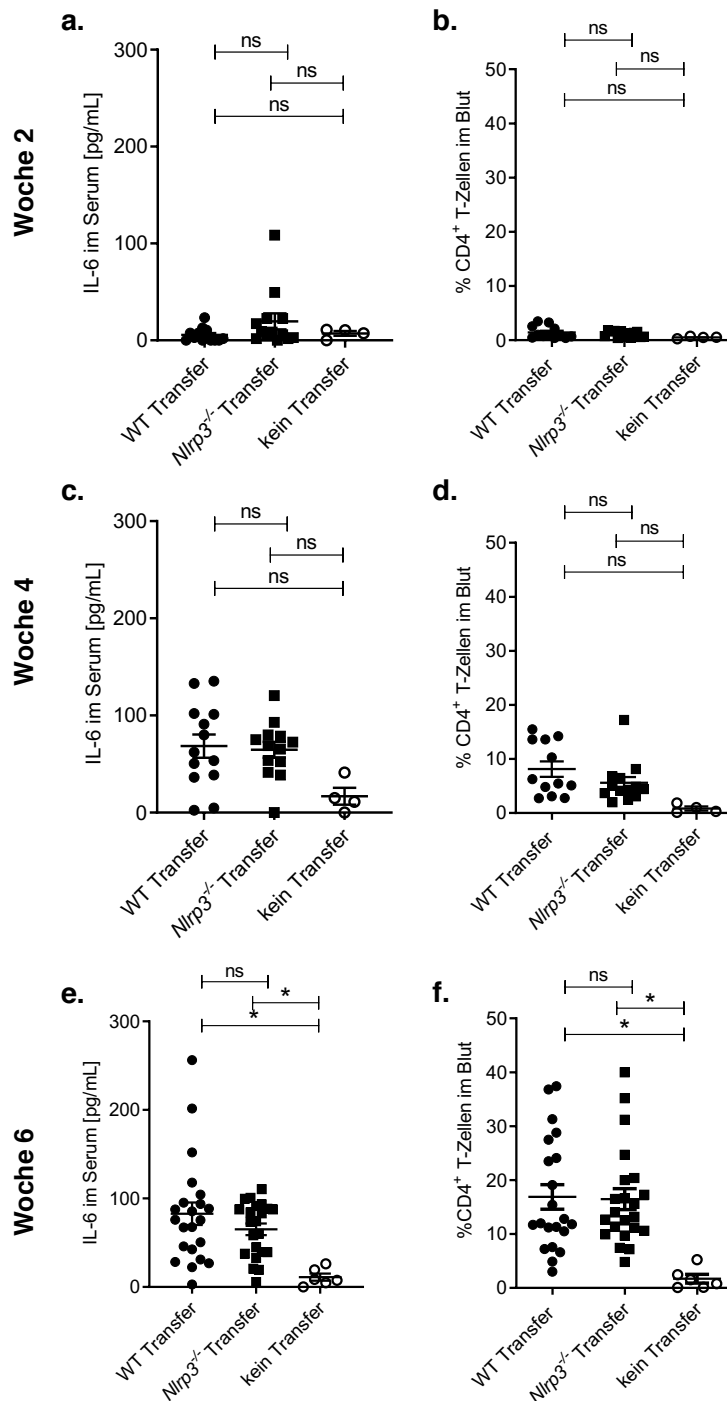
In den FACS-Untersuchungen der T-Zellen im *steady state* sahen wir in Milz, MLK und im Blut insgesamt eine geringere Frequenz von *Nlrp3*<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu WT CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Um auszuschließen, dass die transferierten *Nlrp3*<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T-Zellen nach Transfer nicht genauso expandieren, wie WT CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T-Zellen wurde die Anzahl der transferierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut in Woche zwei, vier und sechs nach Induktion der Transferkolitis mittels FACS-Analyse untersucht.

Wie zu erwarten, nahm die Anzahl der peripheren T-Zellen mit Dauer der Transferkolitis in beiden Transfergruppen stetig zu. Es konnte weder nach zwei, vier bzw. sechs Wochen ein signifikanter Unterschied im Anteil der CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Blut zwischen den WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Transfergruppen festgestellt werden (**Abbildung 3-5**), was darauf hindeutet, dass die *Nlrp3*<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T-Zellen keinen Expansionsnachteil aufweisen.

Ergänzend untersuchten wir die IL-6-Serumspiegel in den Versuchstieren. IL-6 spielt neben dem C-reaktiven Protein und Procalcitonin in der laborchemischen Beurteilung diverser Entzündungsreaktionen, wie der Sepsis, deren Früherkennung und Prognose eine entscheidende Rolle (Schulte, Bernhagen et al. 2013, Ma, Zhang et al. 2016, Iwase, Nakada et al. 2019, Song, Park et al. 2019). Es ist nachgewiesen, dass T-Zellen der Lamina propria von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa signifikant mehr IL-6 als T-Zellen gesunder Probanden produzieren (Atreya R 2000). Erhöhte IL-6-Serumspiegel finden sich auch im Blut von CED Patienten mit aktiver Entzündung und korrelieren in Untersuchungen mit der Schwere der Entzündungsaktivität (Mitsuyama 1991, Kusugami K. 1995, Reinisch W. 1999).

Zwischen der WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Transfergruppe fand sich weder nach zwei, vier bzw. sechs Wochen signifikante Unterschiede (**Abbildung 3-5, a,c,e**) in den IL-6-Serumleveln. Somit fand sich auch anhand der gemessenen IL-6-Werte im Serum kein Unterschied in

der klinischen Krankheitsausprägung zwischen den Transfergruppen, was sich auch mit dem vergleichbaren klinischen Krankheitsscore in Woche 6 (**Abbildung 3-4, b**) deckt.



**Abbildung 3-5: IL-6-Serumspiegel und Anzahl von CD4<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut im Verlauf der Transferkolitis.**

Die Konzentration von IL-6 im Serum (ELISA) und die Anzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen (durchflusszytometrische Analyse), angegeben als Prozent (%) von CD45<sup>+</sup> Zellen im peripheren Blut, wurde nach zwei (a-b), vier (c-d) und sechs Wochen (e-f) nach Start der Transferkolitis mit WT oder *Nlrp3*<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T-Zellen bestimmt (a-f: n= 13-22; kein Transfer: n= 4-6).

Alle Daten sind gezeigt als Mittelwerte ± SEM von zwei (a-d) bzw. drei (e-f) unabhängigen Experimenten.

\* p < 0.050 und ns (nicht signifikant, p > 0.050) wurde mittels Welch's t-Test ermittelt.

### 3.6. Zytokinprofil im Kolongewebe nach sechs Wochen Transferkolitis

In publizierten Arbeiten anderer Arbeitsgruppen wurde sowohl eine vermehrte Polarisation von *Nlrp3*<sup>-/-</sup> T-Zellen zu Th<sub>1</sub> Zellen (Arbore, West et al. 2016) beschrieben, als auch eine zentrale Rolle von NLRP3 für die Th<sub>2</sub>-Polarisierung (Bruchard, Rebe et al. 2015). In der Lamina propria von CED Patienten finden sich nachweislich hohe Level von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  und IL-17 (Korzenik and Podolsky 2006, Abraham and Cho 2009, Choy, Visvanathan et al. 2017, Guan 2019). Es stellte sich nun die Frage, ob im Rahmen der Transferkolitis Unterschiede im Zytokinprofil des Kolongewebes zwischen der WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Transfergruppe auftreten und ob sich ein dominanter T-Helfer-Zelltyp herauskristallisieren würde.

Der Zellkulturüberstand aus kultivierten Kolonproben wurde auf proinflammatorische Zytokine untersucht sowie die mRNA-Expression diverser Gene und T-Zell-Transkriptionsfaktoren im Kolongewebe bestimmt.

Es zeigte sich kein Unterschied der WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Transfergruppe in der gemessenen Konzentration von IL-1 $\beta$  (**Abbildung 3-6, a**) und TNF- $\alpha$  (**Abbildung 3-6, b**) im Zellkulturüberstand von Kolonstücken mittels ELISA. Auch die mRNA-Expression von IL-18 war in der *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Transfergruppe gering, jedoch signifikant höher als in der WT Transfergruppe (**Abbildung 3-6, c**). Die produzierte Proteinmenge von IL-18 wurde nicht bestimmt. Die im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe reduzierte mRNA-Expression von IL-18 im entzündlich veränderten Darmgewebe konnten wir bereits in unseren vorherigen Arbeiten beobachten (Mak'Anyengo, Duewell et al. 2018). Die mRNA-Expression von IL-6 (**Abbildung 3-6, d**) im Kolongewebe zeigte mittels qRT-PCR keinen Unterschied zwischen den Transfergruppen.

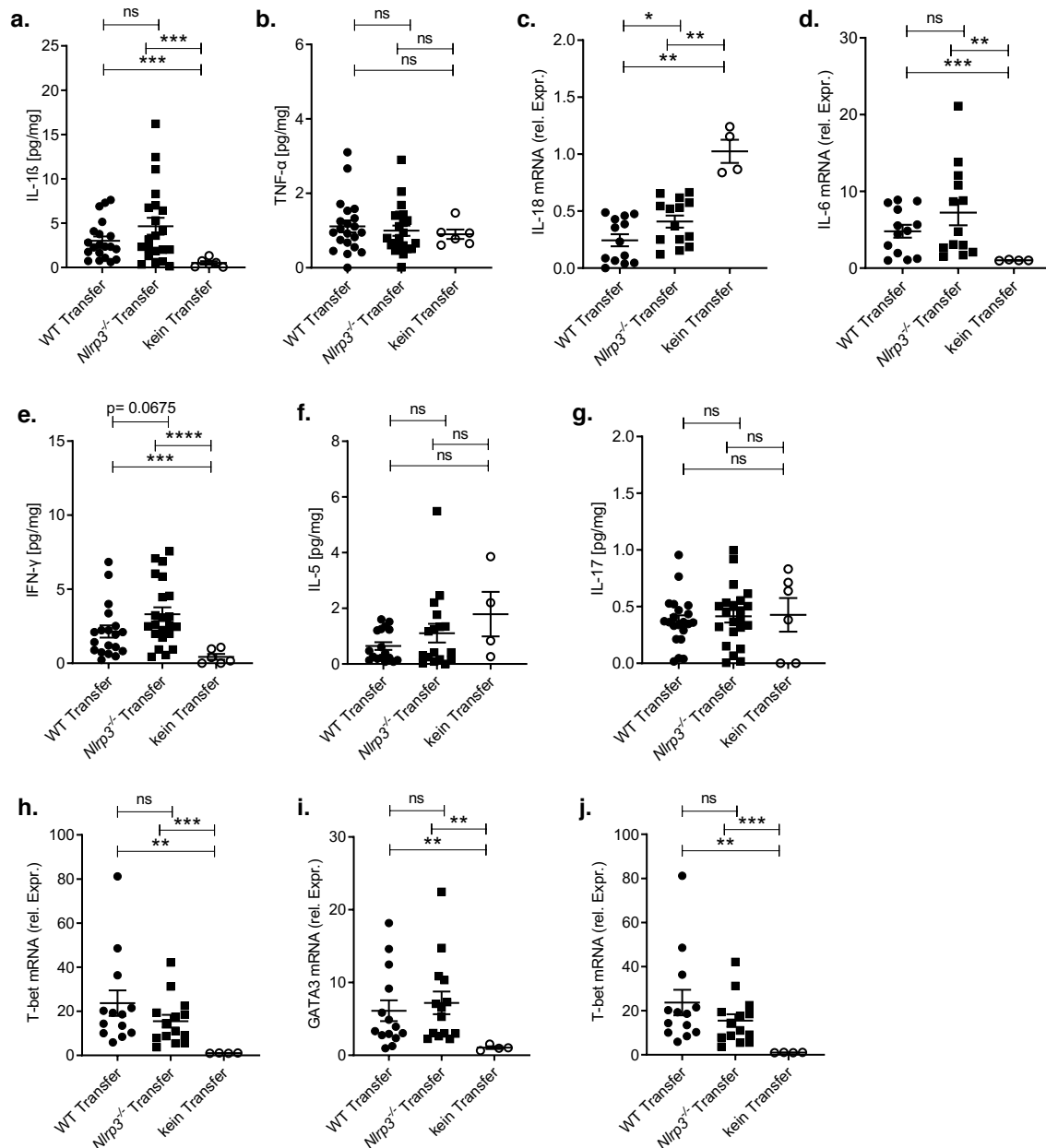
Für die Th<sub>1</sub>, Th<sub>2</sub> und Th<sub>17</sub> T-Zell-Populationen wurde je ein Effektorzytokin mittels ELISA im Kolonüberstand und ein zugehöriger Transkriptionsfaktor auf mRNA-Ebene untersucht. T-bet und INF- $\gamma$  für Th<sub>1</sub>, IL-5 und GATA3 für Th<sub>2</sub> sowie IL-17 und ROR $\gamma$ t für Th<sub>17</sub>. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Transfergruppe, weder in der gemessenen Zytokinmenge von INF- $\gamma$ , IL-5 und IL-17 im Kolonüberstand (**Abbildung 3-6, e-g**) noch in der mRNA-Expression von T-bet, GATA3 und ROR $\gamma$ t im Kolongewebe (**Abbildung 3-6, h-j**).

Ergänzend wurde auch in den MLK ein qRT-PCR Profil für die Th<sub>1</sub>- (INF- $\gamma$  und T-bet), Th<sub>2</sub>- (IL-5 und GATA3) und Th<sub>17</sub>- (IL-17 und ROR $\gamma$ t) Populationen durchgeführt (Daten

## Ergebnisse

nicht gezeigt). Hier fand sich ebenfalls kein Hinweis für eine differente T-Helfer-Zelldifferenzierung zwischen den beiden Transfergruppen.

Auf Protein- und mRNA-Ebene ließ sich somit nach sechswöchiger Kolitisdauer kein Unterschied in der Expression proinflammatorischer Zytokine bzw. der T-Helfer-Zelldifferenzierung zwischen WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Transfergruppe feststellen.



**Abbildung 3-6: Zytokinprofil im Kolongewebe nach sechs Wochen Transferkolitis**

Sechs Wochen nach Induktion der T-Zell-Transferkolitis mit WT oder *Nlrp3*<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T-Zellen wurde Kolongewebe der Versuchstiere entnommen, entweder 24 Stunden in Kulturmedium kultiviert und die sezernierten Zytokine IL-1 $\beta$  (a), TNF- $\alpha$  (b), INF- $\gamma$  (e), IL-5 (f) und IL-17 (g) im Überstand mittels ELISA bestimmt (n= 17-22; kein Transfer: n= 6) oder die mRNA-Expression von IL-18 (c), IL-6 (d) sowie T-bet (h), GATA3 (i) und ROR $\gamma$ t (j) mittels qRT-PCR untersucht. Die Proteindaten sind normalisiert auf das



Kolongewebe in Milligramm. Die Expression der untersuchten Gene wurde jeweils auf  $\beta$ -Aktin normalisiert und als relative Expression (rel. Expr.) dargestellt (n= 13-14; kein Transfer: n= 4). Alle Daten sind gezeigt als Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei (Proteindaten) oder von zwei aus drei unabhängigen Experimenten (mRNA-Daten). \* p < 0.050, \*\* p < 0.010, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001 und ns (nicht signifikant) wurde mittels Welch's t-Test ermittelt.

### 3.7. *Nlrp3*<sup>-/-</sup> T-Zellen in der Lamina propria produzieren mehr IL-17 *in vivo*

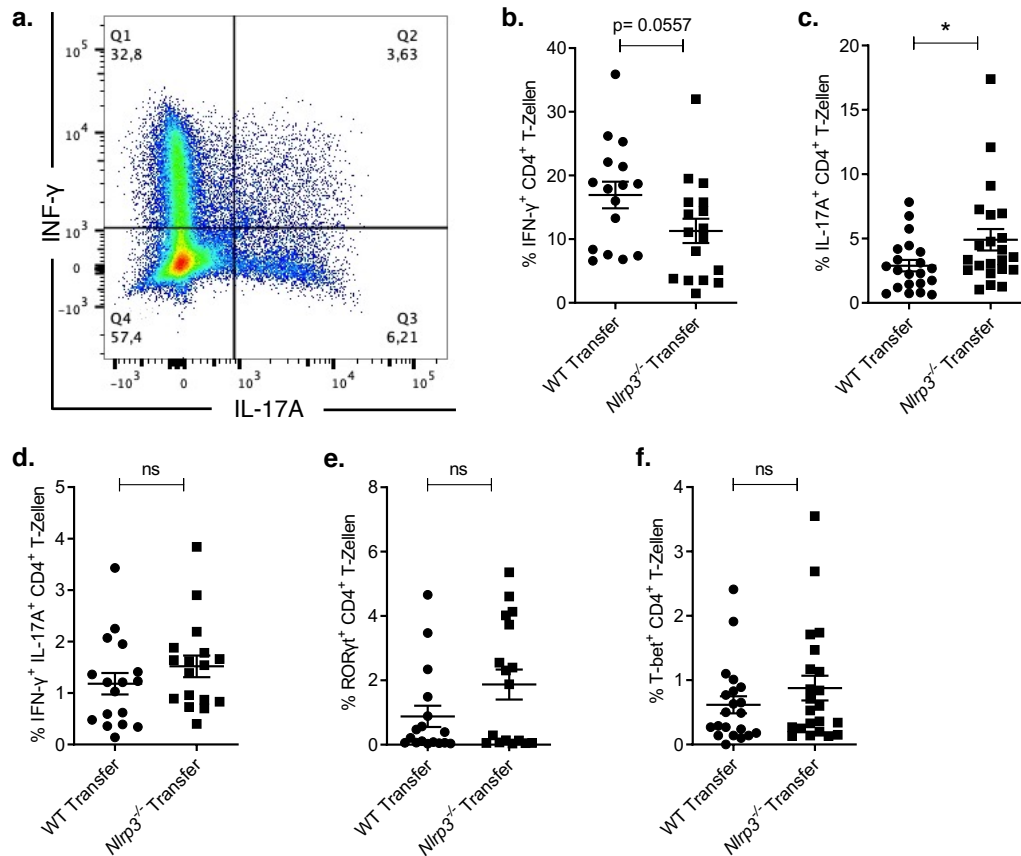
Die mukosalen Barriere des Intestinaltrakts teilt sich immunologisch in zwei wichtige Kompartimente mit unterschiedlichen Lymphozytenpopulationen. Zum einen in die Lymphozyten der Epithelschicht (intraepitheliale Lymphozyten – IEL) und die Lymphozyten in der Lamina propria (LPL) (Steege, Buurman et al. 1997), welche sich größtenteils aus aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen zusammensetzen (MacDonald and Pender 1998), die zuvor ihre Polarisierung nach Kontakt mit den APC in unter anderem den MLK durchlaufen haben (Abraham and Cho 2009). Die Zellen der Lamina propria wurden isoliert und durchflusszytometrisch analysiert, um Hinweise auf die vorherrschenden T-Zell-Subpopulationen im Transferkolitismodell zu gewinnen.

Wie in **Abbildung 3-3, f** bereits gezeigt fanden sich nach vier Wochen keine Unterschiede in der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Infiltration in die Lamina propria zwischen WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Transfergruppe. Nach sechs Wochen Kolitisdauer war in der WT Transfergruppe jedoch eine signifikant stärkere CD4<sup>+</sup> T-Zell-Infiltration in die Lamina propria nachzuweisen (**Abbildung 3-4, e**). Die T-Zell-Charakterisierung in der Lamina propria bezieht sich im Folgenden auf Transferkolitisversuche mit sechswöchiger Krankheitsdauer.

Von Interesse war insbesondere die Th<sub>1</sub>/Th<sub>17</sub>-Balance im entzündlich veränderten Kolongewebe. Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der Lamina propria wurden daher durchflusszytometrisch auf die Expression von INF- $\gamma$  und T-bet (Th<sub>1</sub>) sowie IL-17A und ROR $\gamma$ t (Th<sub>17</sub>) untersucht.

Die Expression von INF- $\gamma$  in CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Lamina propria war in der WT Transfergruppe höher als in der *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Transfergruppe, wobei dies mit einem p-Wert von 0.0557 statistisch nicht signifikant war (**Abbildung 3-7, b**). Die Expression von IL-17A in CD4<sup>+</sup> T-Zellen (**Abbildung 3-7, c**) war in der *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Transfergruppe zwar signifikant erhöht, die Co-Expression von INF- $\gamma$  und IL-17A (**Abbildung 3-7, d**) sowie die Expression der Transkriptionsfaktoren ROR $\gamma$ t und T-bet (**Abbildung 3-7, e-f**) zeigte hingegen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Transfergruppen.

Die höhere Frequenz von CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> T-Zellen in der *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Transfergruppe deutet auf eine verstärkte Th<sub>17</sub>-Polarisierung in dieser Transfergruppe hin.



**Abbildung 3-7: Protein-Expressionsprofil von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren in CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der Lamina propria nach sechs Wochen Transferkolitis.**

Sechs Wochen nach Induktion einer T-Zell-Transferkolitis mit WT oder *Nlrp3*<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T-Zellen wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen (% von CD45<sup>+</sup> Zellen) in der Lamina propria des Kolons durchflusszytometrisch untersucht. Abbildung (a) zeigt exemplarisch die *Gating*-Strategie der intrazellulären Färbung von IFN- $\gamma$  und IL-17A in der *Dotplot*-Analyse. Die Expression von IFN- $\gamma$  (b) und IL-17A (c), sowie die Co-Expression beider Zytokine (d) wurde durchflusszytometrisch bestimmt (n= 20-22), ebenso wie die Expression der Transkriptionsfaktoren ROR $\gamma$ t (e) und T-bet (f) (n= 17-22). Vor der FACS-Analyse wurden die Proben vier Stunden lang mit PMA und Ionomycin *in vitro* stimuliert.

Daten sind gezeigt als Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten. \* p < 0.050 und ns (nicht signifikant) wurde mittels Welch's t-Test ermittelt.

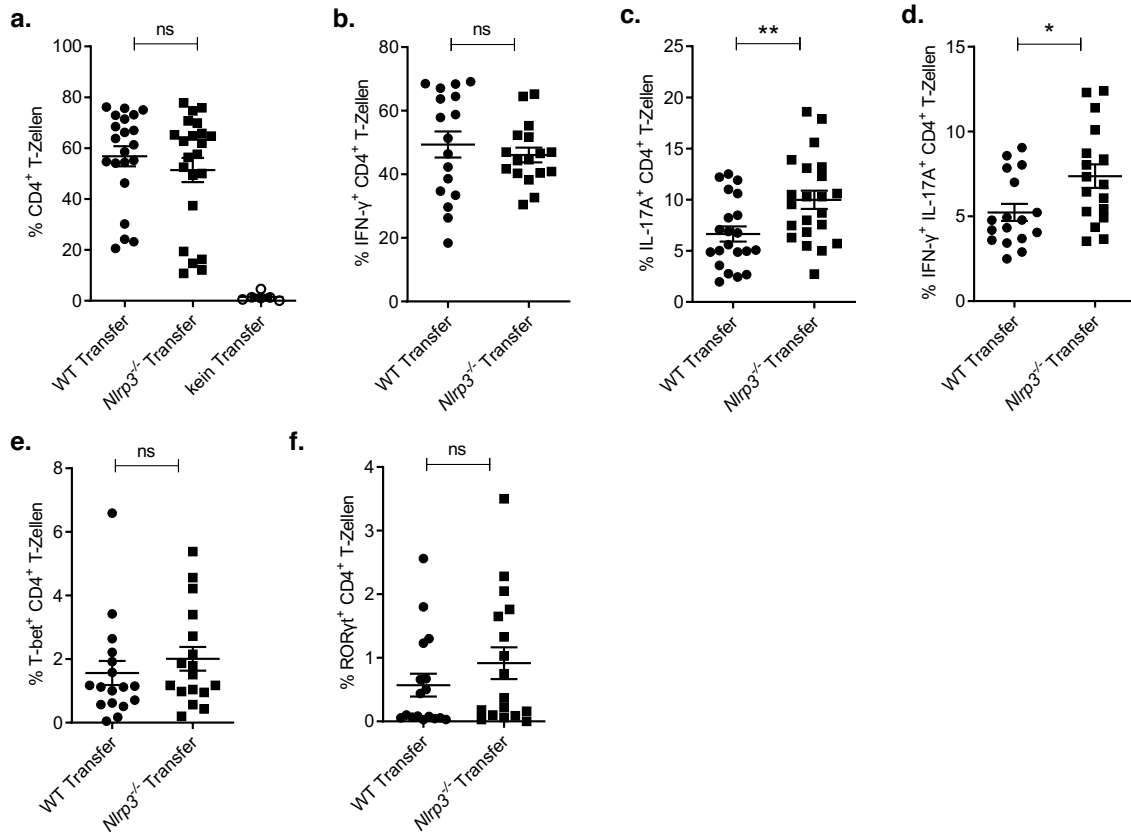
### 3.8. *Nlrp3*<sup>-/-</sup> T-Zellen in mesenterialen Lymphknoten favorisieren einen Th<sub>17</sub>-Phänotyp

Durch die ständige Exposition mit potenziellen Antigenen aus dem Darmlumen bildet das mukosale Immunsystem (MALT – *mucosa-associated lymphoid tissue*) ein spezielles Kompartiment. Im Darm wird es auch als GALT (*gut-associated lymphoid*

*tissue*) bezeichnet, zu welchem die Peyers-Patches, einzelne mukosale Lymphfollikel und die MLK zählen. Luminale Antigene werden in den MLK durch antigenpräsentierende Zellen den T-Zellen präsentiert. Hier geschieht die Differenzierung der einzelnen T-Zell-Populationen in ihre Subpopulationen Th<sub>1</sub>, Th<sub>2</sub>, Th<sub>17</sub> und T<sub>reg</sub> (Luckheeram, Zhou et al. 2012), bevor sie zur Lamina propria zurückwandern, um ihre Effektorfunktionen auszuüben (Abraham and Cho 2009). Die MLK bieten sich somit als idealen Ort an, um einen NLRP3-abhängigen Effekt auf die T-Zell-Polarisierung zu untersuchen. Die folgenden Daten zeigen die durchflusszytometrische Analyse der MLK nach sechs Wochen Transferkolitis.

In den MLK der *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Transfergruppe fand sich kein Unterschied in der Infiltration der gesamten CD4<sup>+</sup> T-Zell-Population im Vergleich zur WT Transfergruppe (**Abbildung 3-8, a**). Die genauere Betrachtung der Th<sub>1</sub>- und Th<sub>17</sub>-Populationen zeigte ein ähnliches Bild wie in der Lamina propria. Es fand sich eine vergleichbare INF-γ-Expression der CD4<sup>+</sup> T-Zellen von WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Transfergruppe (**Abbildung 3-8, b**). Allerdings war die Expression von IL-17A sowie die Co-Expression von INF-γ und IL-17A in der *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Transfergruppe erhöht (**Abbildung 3-8, c-d**). Für die Expression der Th<sub>1</sub>- bzw. Th<sub>17</sub>-Transkriptionsfaktoren T-bet bzw. RORγt wurde zwischen den Transfergruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt (**Abbildung 3-8, e-f**).

Somit zeigte sich nach sechs Wochen Transferkolitis eine favorisierte Polarisierung der *Nlrp3*<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen in einen Th<sub>17</sub>-Phänotyp in den MLK, die sich sowohl in der Expression von IL-17A allein als auch in der Co-Expression von INF-γ und IL-17A widerspiegelt. Diese Daten decken sich mit den Ergebnissen aus **Kapitel 3-7**, wo wir in der Lamina propria ebenfalls einen verstärkten Th<sub>17</sub>-Phänotyp nachweisen konnten.



**Abbildung 3-8: Charakterisierung der transferierten WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen in mesenterialen Lymphknoten nach sechs Wochen Kolitisdauer.**

Sechs Wochen nach Induktion einer T-Zell-Transferkolitis mit WT oder *Nlrp3*<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T-Zellen wurde die Frequenz von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (% von CD45<sup>+</sup> Zellen) in den MLK (a) und in der Milz (b) durchflusszytometrisch untersucht (n= 21-22; kein Transfer: n= 6). Die Expression von INF-γ (c) und IL-17A (d) sowie die Co-Expression beider Zytokine (e) wurde in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt (n= 20-22), ebenso wie die Expression der Transkriptionsfaktoren T-bet und RORγt (n= 17). Vor der Analyse wurden die Proben vier Stunden lang mit PMA und Ionomycin *in vitro* stimuliert.

Alle Daten sind gezeigt als Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten. \* p < 0.050, \* p < 0.010 und ns (nicht signifikant) wurde mittels Welch's t-Test ermittelt.

## 4. Diskussion

### 4.1. Die Rolle des NLRP3-Inflammasoms in der T-Zell-Polarisierung im Kontext chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen

Das NLRP3-Inflammasom mit seinen Effektormolekülen IL-1 $\beta$  und IL-18 ist ein essenzieller Bestandteil des angeborenen Immunsystems und steht als solcher bei Forschungsarbeiten zu CED im Fokus (Mao, Kitani et al. 2018). Die teils widersprüchliche Rolle des NLRP3-Inflammasoms in der Pathophysiologie der CED wurde in diversen Tiermodellen versucht zu entwirren. Sowohl proinflammatorische als auch protektive Einflüsse des NLRP3-Inflammasoms wurden beschrieben (Allen, TeKippe et al. 2010, Zaki, Boyd et al. 2010). Unterschiede in den verwendeten Tiermodellen (chemisch-induzierte Kolitismodelle *versus* T-Zell-Transferkolitismodelle), Haltungsbedingungen der Mäuse, sowie Speziesunterschiede (humanes *versus* murines System) tragen möglicherweise durch eine Heterogenität der experimentellen Bedingungen zu den widersprüchlichen Ergebnissen bei. Es sei an dieser Stelle auf einige Übersichtsarbeiten hingewiesen, die diese Problematik beleuchten (Mizoguchi 2012, Tourkochristou, Aggeletopoulou et al. 2019).

Arbeiten im DSS-Kolitismodell und im T-Zell-Transferkolitismodell unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Tiere vor der Entwicklung einer experimentellen Kolitis geschützt sind (Bauer, Duewell et al. 2010, Mak'Anyengo, Duewell et al. 2018). Eine reduzierte IL-1 $\beta$ -Produktion in den NLRP3-defizienten Mäusen korrelierte u.a. mit einer erhöhten FLT3-Produktion und Zunahme von tolerogenen CD103<sup>+</sup> dendritischen Zellen im Kolon (Mak'Anyengo, Duewell et al. 2018). Auch *Asc*<sup>-/-</sup> und *Casp1*<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen durch konsekutiv verminderte IL-18-Level im Darmepithel eine höhere Mortalität im DSS-Kolitismodell (Zaki, Boyd et al. 2010). In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine generelle Überexpression des NLRP3-Inflammasoms in Mäusen mit einer vermehrten IL-1 $\beta$ -Produktion einhergeht, die IL-18-Produktion jedoch nicht beeinflusst wird (Yao, Zhang et al. 2017). Nach Transfer von *Asc*<sup>-/-</sup> T-Zellen konnte im chronischen Setting der Transferkolitis eine verstärkte lokale Entzündungsreaktion nachgewiesen werden und so die protektive Funktion von ASC in T-Zellen darlegen, die Inflammasom-unabhängig war (Javanmard Khameneh, Leong et al. 2019).

In den letzten Jahren wurde auch die Rolle des NLRP3-Inflammasoms in T-Zellen untersucht. Durch die bislang nicht beachtete T-Zell-intrinsische Aktivität des

NLRP3-Inflammasoms öffnet sich eine neue Ebene der Komplexität. In Th<sub>2</sub> Zellen ermöglicht NLRP3 via direkter Bindung an die DNA und dem Transkriptionsfaktor IRF4 das Differenzierungsprogramm dieser T-Helfer-Zelllinie und fungiert so als Co-Transkriptionsfaktor (Bruchard, Rebe et al. 2015). Auch für Th<sub>1</sub> Zellen ist eine Rolle des NLRP3-Inflammasoms beschrieben: Hier wird durch die komplementabhängige autokrine IL-1 $\beta$ -Sekretion, welche Caspase-1-abhängig ist, die INF- $\gamma$ -Produktion und somit die Th<sub>1</sub>-Polarisierung aufrecht erhalten (Arbore, West et al. 2016).

Die erwähnten Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe im T-Zell-Transferkolitismodell zeigten, dass ein globales Fehlen des NLRP3-Inflammasoms protektiv auf die Krankheitsentwicklung ist. Dies ging mit weniger IL-17A<sup>+</sup> T-Zellen in der Lamina propria und geringerer IL-17-mRNA-Level im Kolon der *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Empfängertiere einher (Mak'Anyengo, Duewell et al. 2018). Unbeantwortet blieb in diesen Versuchen, wie sich ein NLRP3 *knock-out* in transferierten T-Zellen auf deren Polarisierung *in vivo* auswirkt und die Th<sub>1</sub>/Th<sub>17</sub>-Balance beeinflussen würde.

Um diese Auswirkung aufzudecken, wurden initial die T-Zell-Populationen im Kolon, den MLK und der Milz von gesunder *Nlrp3*<sup>-/-</sup> und WT Tieren *ex vivo* analysiert. Es zeigte sich, dass *Nlrp3*<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Kolon und den MLK signifikant mehr IL-17A und INF- $\gamma$  produzieren. Diese Daten deuten darauf hin, dass ein globaler NLRP3 *knock-out* mit einer verstärkten Th<sub>1</sub>- und Th<sub>17</sub>-Polarisierung vergesellschaftet ist.

Auf den ersten Blick wirkt das im *steady state* der *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Maus verwunderlich. Schließlich wird durch Bindung von IL-1 $\beta$  am IL-1-Rezeptor (IL-1R) dessen Signalübertragung aktiviert, was wiederum für die Ausbildung reifer Th<sub>17</sub> Zellen in der frühen Phase deren Differenzierung unerlässlich ist (Chung, Chang et al. 2009). Eine dysregulierte IL-1 $\beta$ -Überproduktion aufgrund einer *gain-of-function* Mutation im NLRP3-Gen bei CAPS-Patienten (*Cryopyrin-associated periodic syndrome*) (Hoffman, Mueller et al. 2001) führt dort zu einer verstärkten Th<sub>17</sub>-Antwort (Lasiglie, Traggiai et al. 2011). Nach Therapie mit einem IL-1R-Antagonisten konnte bei diesen Patienten eine Reduktion der IL-17-Serumspiegel sowie der absoluten Th<sub>17</sub> Zellzahl im Blut nachgewiesen werden (Lasiglie, Traggiai et al. 2011). Das bekräftigt die IL-1 $\beta$ -abhängige Th<sub>17</sub>-Differenzierung. Weitere Studien im humanen und murinen System konnten die Rolle von IL-1 $\beta$  in der Th<sub>17</sub>-Differenzierung *in vivo* ebenfalls bestätigen (Meng, Zhang et al. 2009, Lamacchia, Palmer et al. 2010, Lasiglie, Traggiai et al. 2011, Coccia, Harrison et al. 2012).

In der *Nlrp3*<sup>-/-</sup>-Maus würde man nun davon ausgehen, dass auch weniger IL-1 $\beta$  durch die globale NLRP3-Defizienz produziert wird. Dadurch würden weniger naive T-Zellen zu Th<sub>17</sub> Zellen differenzieren, die man in MLK und der Lamina propria nachweisen kann. Hier sahen wir in unserer Untersuchung jedoch sogar eine verstärkte Th<sub>17</sub>-Antwort.

Ob diese IL-1 $\beta$ -Produktionslücke von anderen Inflammasomen (NLRP6, AIM2, etc.) kompensiert bzw. sogar überschießend übernommen wird, kann anhand der durchgeführten Experimente leider nicht abschließend geklärt werden, da keine Charakterisierung der IL-1-Produktion von antigenpräsentierenden Zellen mit den *ex vivo* Daten erstellt wurde. In der Literatur gibt es aber zumindest Hinweise, dass IL-1 $\beta$  auch unabhängig von Caspase-1 prozessiert werden kann (Schönbeck 1998, Maelfait, Vercammen et al. 2008). Unter anderem können bakterielle Enzyme oder Proteasen von neutrophilen Granulozyten pro-IL-1 $\beta$  zu biologisch aktivem IL-1 $\beta$  überführen (Black, Kronheim et al. 1988, Pyrillou, Burzynski et al. 2020). Das würde wiederum für eine NLRP3-unabhängige IL-1 $\beta$ -Produktion in der *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Maus sprechen, die zum vorliegenden Th<sub>17</sub>-Phänotyp führt.

Die *ex vivo* untersuchten CD4<sup>+</sup> T-Zellen der *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Tiere exprimierten auch höhere Level an intrazellulär gemessenem INF- $\gamma$ . Dies steht in Widerspruch zu Daten anderer Arbeiten, die postulieren, dass das NLRP3-Inflammasom in CD4<sup>+</sup> T-Zellen für die regelhafte Produktion von INF- $\gamma$  verantwortlich ist (Gris, Ye et al. 2010, Arbore, West et al. 2016). Hier handelt es sich jedoch zum Teil um Untersuchungen im humanen System (Arbore, West et al. 2016), die nicht ohne weiteres auf die vorliegende Arbeit übertragbar sind, die sich ausschließlich im murinen System bewegt. Im *steady state* der *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Maus zeigte sich eine NLRP3-unabhängige INF- $\gamma$ -Produktion der Th<sub>1</sub> Zellen.

Die Polarisierung der Th<sub>1</sub>- und Th<sub>17</sub>-Population ist zum größten Teil nach NLRP3-Inflammasomaktivierung in dendritischen Zellen gesteuert (Su, Zhang et al. 2018, Hatscher, Lehmann et al. 2021). Diese extrinsische NLRP3-Abhängigkeit der Th<sub>1</sub>- und Th<sub>17</sub>-Polarisierung kann in der globalen *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Maus anhand der *ex vivo* Daten nicht nachvollzogen werden, da beide Populationen in diversen Kompartimenten (Lamina propria, MLK und Milz) unbeeinträchtigt vom Fehlen von NLRP3 *ex vivo* nachweisbar waren. Das Proliferationsmilieu ist in der globalen *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Maus durch die veränderte NLRP3/IL-1/IL-18-Achse anscheinend zu einem Th<sub>1</sub>/Th<sub>17</sub>-Phänotyp verlagert.

Einschränkend muss jedoch festgehalten werden, dass die genotypischen Unterschiede zwar signifikant, jedoch eher gering ausgeprägt waren.

#### **4.2. Diskrepanz in der Th<sub>1</sub>/Th<sub>17</sub>-Polarisierung von NLRP3<sup>-/-</sup> T-Zellen *in vitro* und *in vivo***

Nachdem sich eine vermehrte Expression von IFN- $\gamma$  und IL-17 in T-Zellen gesunder *Nlrp3<sup>-/-</sup>* Tiere *in vivo* nachweisen ließ, stellte sich die Frage, ob dies ein primärer, T-Zell-intrinsischer Effekt der NLRP3-Defizienz war, oder ob vielmehr sekundäre Effekte der fehlenden Inflammasom-Aktivierung im Organismus die beobachteten Unterschiede in der T-Zell-Polarisation bedingen.

Um dies zu adressieren, wurden die T-Zellen aus Milzen gesunder *Nlrp3<sup>-/-</sup>* und WT Tiere isoliert und *in vitro* unter Bedingungen für die Th<sub>1</sub>-, Th<sub>2</sub>- und Th<sub>17</sub>-Differenzierung kultiviert. Interessanterweise zeigte sich bei der *in vitro* Differenzierung ein abweichendes Bild zu den *ex vivo* Versuchen. Für WT und *Nlrp3<sup>-/-</sup>* T-Zellen, welche *in vitro* zu Th<sub>1</sub> und Th<sub>2</sub> Zellen polarisiert wurden, zeigten sich keine Unterschiede in deren Phänotyp. WT und *Nlrp3<sup>-/-</sup>* Th<sub>1</sub> Zellen produzierten vergleichbare Level an INF- $\gamma$  im Zellkulturüberstand und auch die mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors T-bet, einem zentralen Regulator der Th<sub>1</sub>-Differenzierung, unterschied sich nicht. Für die *in vitro* polarisierten Th<sub>2</sub> Zellen zeigte sich ebenfalls zwischen WT und *Nlrp3<sup>-/-</sup>* Th<sub>2</sub> Zellen kein wesentlicher Unterschied der produzierten IL-5-Menge im Zellkulturüberstand oder der mRNA-Expression von GATA3. Die beschriebene Funktion des NLRP3-Inflammasoms als Transkriptionsfaktor für die Th<sub>2</sub>-Polarisierung ließ sich in unseren Experimenten somit nicht nachvollziehen (Bruchard, Rebe et al. 2015). Die *in vivo* beobachtete vermehrte INF- $\gamma$ -Produktion war somit eher ein indirekter Effekt auf die T-Zell-Aktivierung in den globalen NLRP3-defizienten Tieren. Unterschiede des Mikrobioms könnten hier eine wichtige Rolle spielen (Donovan, Liu et al. 2020, Wagatsuma and Nakase 2020), wie sie auch Thema diverser Publikationen sind.

Entgegen unserer Erwartung zeigten die zu Th<sub>17</sub> polarisierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus *Nlrp3<sup>-/-</sup>* Mäusen *in vitro* einen signifikanten Verlust der IL-17-Sekretion im Zellkulturüberstand. Ein solcher Defekt steht im Widerspruch zu den Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe, bei der sich durchflusszytometrisch (intrazellulär) bestimmte IL-17-Level von *in vitro* polarisierten Th<sub>17</sub> Zellen zwischen WT und *Nlrp3<sup>-/-</sup>* Mäusen nicht



unterschieden (Javanmard Khameneh, Leong et al. 2019). Eine andere Arbeitsgruppe zeigte hingegen, dass ein *knock-down* von NLRP3 mittels siRNA (*small interfering RNA*) in naïven T-Zellen *in vitro* die Th<sub>17</sub>-Differenzierung und die IL-17A-Produktion hemmt (Zhao, Gu et al. 2018). Einschränkend muss hier betont werden, dass theoretisch eine Diskrepanz zwischen intrazellulär gemessenen (Durchflusszytometrie-Daten) und sezernierten Zytokinen (ELISA-Daten) bestehen kann. Dies wäre erklärbar, wenn das NLRP3-Inflammasom eine Rolle bei der Sekretion von IL-17 spielen würde, wie es z.B. für IL-1 $\beta$  und IL-18 beschrieben wurde. Dies könnte ein interessanter Ansatz für weiterführende Experimente sein. Tatsächlich findet man im Zusammenhang der NLRP3-Inflammasom-abhängigen IL-17-Produktion von T-Zellen einige Ansatzpunkte.

Studien zu Untersuchungen von Wundinfektionen mit *Staphylococcus aureus* haben gezeigt, dass die IL-17-Produktion von  $\gamma\delta$  T-Zellen *in vivo* vom NLRP3-Inflammasom abhängig zu sein scheint. Nach einer Infektion mit zwei verschiedenen *Staphylococcus aureus* Stämmen fanden sich in den Hautwunden von *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Mäusen weniger IL-17<sup>+</sup> T-Zellen als in den WT Tieren (Maher, Mulcahy et al. 2013). Nach der Inhalation des von *Staphylococcus aureus* produziertem Enterotoxin A in die Lunge wird durch die Sekretion von IL-2 und IL-1 $\beta$  (welche Caspase-1-abhängig ist) die konsekutive Produktion von IL-17 durch  $\gamma\delta$  T-Zellen gesteuert (Menoret, Buturla et al. 2018). Die letztere erwähnte Studie stellt zwar keine direkte Verbindung im Sinne einer Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und daraufhin ablaufenden IL-17-Produktion dar, verbindet jedoch IL-1 $\beta$  als Effektorzytokin des NLRP3-Inflammasoms mit der davon abhängigen IL-17-Produktion im Kontext einer bakteriellen Infektion.

In Pigmentepithelzellen der Retina konnte gezeigt werden, dass IL-17A die Expression des NLRP3-Inflammasoms auf mRNA-Ebene hochreguliert, sowie Caspase-1-abhängig die IL-1 $\beta$ -Produktion dieser Zellen stimuliert (Zhang, Yu et al. 2016). Dies stärkt weiter die enge Verknüpfung von IL-17 und NLRP3-Inflammasom im Rahmen inflammatorischer Prozesse und könnte ebenfalls Hinweise auf eine noch nicht beschriebene Rückkopplungsschleife liefern.

Für gewisse Chemotherapeutika wurde gezeigt, dass sie *in vivo* das NLRP3-Inflammasom in myeloiden Suppressorzellen (MDSC) aktivieren können, was wiederum zur Produktion von IL-1 $\beta$  durch diese Zellpopulation führt. Das von den MDSC produzierte IL-1 $\beta$  führte auch *in vitro* zur Produktion von IL-17 durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Diese IL-1 $\beta$ -Produktion der MDSC war wiederum in *Casp1*<sup>-/-</sup> und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Mäusen gestört,

wodurch wiederum die Caspase-1-abhängige IL-17-Produktion unterstrichen wird. Die Co-Kultur von *Casp1*<sup>-/-</sup> MDSC mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen hatte keine Auswirkungen auf deren IL-4- oder IFN- $\gamma$ -Produktion (Bruchard, Mignot et al. 2013). Diese Daten sind konkordant zu unseren *in vitro* Ergebnissen, wo wir ebenfalls für die polarisierten WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Th<sub>1</sub> und Th<sub>2</sub> Zellen keine Unterschiede in den produzierten IFN- $\gamma$ - und IL-5-Leveln im Zellkulturüberstand gesehen haben und nur die *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Th<sub>17</sub> Zellen eine stark verminderte IL-17-Sekretion aufwiesen.

Sowohl die NLRP3-abhängige Produktion von IL-1 $\beta$  durch dendritische Zellen (Lalor, Dungan et al. 2011) als auch die autokrine Produktion von IL-1 $\beta$  durch Th<sub>17</sub> Zellen selbst scheinen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* essenziell für deren Überleben, Proliferation (Martin, Wang et al. 2016) und IL-17-Produktion zu sein (Dungan and Mills 2011, Mills, Dungan et al. 2013). Interessanterweise fanden wir jedoch, dass im *steady state* und in der Transferkolitis *Nlrp3*<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den MLK sogar mehr IL-17A und INF- $\gamma$  produzierten als in WT Mäusen. Die IL-17-Produktion durch Th<sub>17</sub> Zellen war *in vivo* unter homöostatischen Bedingungen im *steady state* nicht von T-Zell-intrinsischem NLRP3 abhängig.

Ein anderer Erklärungsansatz für die in unserer Arbeit beobachtete Diskrepanz der IL-17-Produktion *in vitro* und *in vivo* könnte ein Einfluss der verstärkten Th<sub>17</sub>-Polarisation *in vivo* auf eine konsekutive *in vitro* Stimulation im Sinne einer Desensitivierung z.B. von in der Th<sub>17</sub>-Polarisierung involvierten Zytokinrezeptoren sein. Nach Stimulation des IL-17-Rezeptors (IL-17R) führt dessen Aktivierung zur Rekrutierung des Adapterproteins Act1, wodurch im Verlauf der NF- $\kappa$ B-Signalweg aktiviert wird (Chang, Park et al. 2006, Gaffen 2009). Die anhaltende Stimulation von HeLa-Zellen mit IL-17 führt zum Verlust von Act1 im Sinne einer Desensitivierung (Peiqing Shi 2011).

Ob ein NLRP3 *knock-out* in T-Zellen eventuell mit einem IL-1-Rezeptordefekt verbunden ist, der wiederum für eine verminderte Th<sub>17</sub>-Polarisierung *in vitro* verantwortlich sein könnte, ließ sich trotz ausgiebiger Literaturrecherche nicht sicher klären. In einem Modell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis konnte gezeigt werden, dass *IL-1r1*<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu WT Mäusen geschützt waren, was mit einer fehlenden Induktion von Th<sub>17</sub> Zellen korrelierte. Für die Th<sub>1</sub>- und Th<sub>2</sub>-Population konnte kein Unterschied festgestellt werden (Sutton, Brereton et al. 2006). Diese Daten deuten darauf hin, dass die Th<sub>17</sub>-Regulierung in diesem Krankheitsmodell *in vivo* IL-1-Rezeptor-abhängig ist. Andere Arbeitsgruppen bestätigen diese *in vivo* Daten auch

*in vitro* und zeigen außerdem, dass Th<sub>17</sub> Zellen mehr IL-1R1-mRNA exprimieren (Chung, Chang et al. 2009).

Auf *in vitro* differenzierten Th<sub>1</sub> Zellen lässt sich kein IL-1R nachweisen, was auf eine IL-1β- und NLRP3-unabhängige Polarisierung hindeutet (Martin, Wang et al. 2016). Diese NLRP3-unabhängige Th<sub>1</sub>-Differenzierung konnten wir in den *ex vivo* Daten der *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Tiere ebenfalls sehen und in den *in vitro* Daten bestätigen (vergleichbare INF-γ-Produktion der differenzierten Th<sub>1</sub> Zellen von WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> T-Zellen).

Der völlig entgegengesetzte Th<sub>17</sub>-Phänotyp zwischen der *ex vivo* Analyse und den *in vitro* Versuchen ist schwerer zu entschlüsseln.

Studien deuten darauf hin, dass *in vitro* generierte Th<sub>17</sub> Zellen kein stabiles epigenetisches Muster haben (Mukasa, Balasubramani et al. 2010) und nach Stimulation mit IL-12 zu Th<sub>1</sub> (Lee, Turner et al. 2009) und nach Stimulation mit IL-4 zu Th<sub>2</sub> Zellen differenzieren können, also eine gewisse Plastizität aufweisen. Plastizität beschreibt die Eigenschaft von zuvor polarisierten T-Zellen, ihren Phänotyp zu ändern.

Bei Morbus Crohn Patienten fanden Annunziato et al. Th<sub>17</sub> Zellen, die sowohl IL-17 als auch INF-γ bilden und somit eine eigenständige Th<sub>1</sub>/Th<sub>17</sub>-Population darstellen (Annunziato, Cosmi et al. 2007). Auch andere Arbeitsgruppen konnten diese Plastizität von Th<sub>17</sub> Zellen im CED-Kontext nachweisen (Lee, Turner et al. 2009). Aus entzündlich verändertem Darmgewebe von Morbus Crohn-Patienten isolierte IL-17<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen, welche phänotypisch sowohl Eigenschaften von Th<sub>17</sub> als auch T<sub>reg</sub> Zellen aufwiesen, zeigten *in vitro* ausgeprägte antiinflammatorische Wirkung (Hovhannisyan, Treatman et al. 2011). Diese Plastizität von Th<sub>17</sub> Zellen bei CED wird durch das vorherrschende Zytokinmilieu, dem Mikrobiom und durch Stoffwechselprodukte gesteuert, welche wiederum Transkriptionsfaktoren der Repolarisierung regulieren (Ueno, Jeffery et al. 2018). Abhängig vom vorherrschenden Zytokinmilieu, in dem sich Th<sub>17</sub> Zellen befinden, kann sich ihr Effektorprogramm entsprechend anpassen. Diese Transdifferenzierung von Th<sub>17</sub> Zellen als Antwort auf veränderte Umweltbedingungen erlaubt eine physiologische Regulation der Immunantwort und stellt Th<sub>17</sub> Zellen in den Mittelpunkt der komplexen Immunhomöostase (Ueno, Jeffery et al. 2018). Diese Plastizität zeigt sich jedoch nicht für *in vitro* generierte Th<sub>1</sub> und Th<sub>2</sub> Zellen und scheint auch nicht für *ex vivo* gewonnene Th<sub>17</sub> Zellen zu gelten (Lexberg, Taubner et al. 2008).

Die erläuterte Plastizität könnte für einen kontextabhängigen (vom umgebenden Zytokinmilieu abhängigen) Th<sub>17</sub>-Phänotyp sprechen. Die Bedingungen der *in vitro* Versuche bilden den *steady state* der *in vivo* Bedingungen nicht ab und führen so möglicherweise zu dem IL-17-Defekt der *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Th<sub>17</sub> Zellen.

#### **4.3. *Nlrp3*<sup>-/-</sup> T-Zellen favorisieren einen Th<sub>17</sub>-Phänotyp im T-Zell-Transferkolitismodell trotz ausbleibender klinischer Relevanz**

Das NLRP3-Inflammasom ist ein zentraler Mediator für die Th<sub>1</sub>/Th<sub>17</sub>-Balance inflammatorischer Prozesse im Darm (Arbore, West et al. 2016). Im murinen und humanen System sind die entzündlichen Veränderungen bei CED durch die Th<sub>1</sub>/Th<sub>17</sub>-dominierte Zytokinantwort geprägt (Powrie, Leach et al. 1994, Pallone and Monteleone 1998, Strober, Fuss et al. 2002, Fujino, Andoh et al. 2003, Rovedatti, Kudo et al. 2009, Raza, Yousaf et al. 2012). Das von uns verwendete T-Zell-Transferkolitismodell stellt ein sogenanntes Th<sub>1</sub>/Th<sub>17</sub>-Kolitismodell dar (Ostanin, Bao et al. 2009) und bietet sich somit gut an, die Auswirkungen des NLRP3-Inflammasoms auf die Th<sub>1</sub>/Th<sub>17</sub>-Balance zu untersuchen.

Unsere Arbeitsgruppe hatte zuvor gezeigt, dass *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Empfängertiere im Transferkolitismodell einen weniger schweren Krankheitsverlauf als WT Tiere ausbilden. Dies korreliert mit geringeren Mengen an IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-17 in der Lamina propria. Ebenso fanden sich in der Lamina propria weniger Th<sub>17</sub> Zellen, was auf eine durch IL-1 $\beta$  induzierte Th<sub>17</sub>-Antwort durch den IL-1-Rezeptor auf Th<sub>17</sub> Zellen hindeutet (Mak'Anyengo, Duewell et al. 2018).

Die nachgewiesene Expression von NLRP3 in T- und B-Zellen (Heeger and Kemper 2012, Liszewski, Kolev et al. 2013) lenkte unsere Aufmerksamkeit auf die Auswirkungen einer fehlenden autokrinen, NLRP3-abhängigen IL-1 $\beta$ -Produktion durch T-Zellen auf die lokale Zytokinexpression im Darm und T-Zell-Differenzierung im Rahmen der Transferkolitis und der murinen Th<sub>1</sub>/Th<sub>17</sub>-Balance.

Neun bis zwölf Wochen alte *Rag1*<sup>-/-</sup> Tiere wurden nach der Injektion von WT bzw. *Nlrp3*<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T-Zellen für vier bis sechs Wochen beobachtet. Im Verlauf dieser Zeit konnte anhand der Parameter Gewichtsverlust, Stuhlbeschaffenheit und Blut im Stuhl kein Unterschied in der klinischen Krankheitsausprägung zwischen den beiden Transfergruppen festgestellt werden. Auch die mikroskopische Untersuchung des

Darmgewebes und die Zusammensetzung des proinflammatorischen Zytokinmilieus im Kolongewebe zeigten keinen signifikanten Unterschied. Dennoch fand sich eine verstärkte Th<sub>1</sub>/Th<sub>17</sub>-Polarisierung der transferierten *Nlrp3*<sup>-/-</sup> T-Zellen, die wir zuvor schon in unserer *ex vivo* Analyse nachweisen konnten.

Wir bestimmten die Frequenz der CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Blut im Laufe der Transferkolitis und konnten hier keine signifikanten Unterschiede in der T-Zell-Expansion feststellen. In der *ex vivo* FACS-Analyse der CD4<sup>+</sup> T-Zellen fanden sich ebenfalls keine Unterschiede zwischen WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Tieren. Es zeigten sich somit keine Anzeichen auf den in der Literatur beschriebenen *in vivo* und *in vitro* Proliferationsdefekt von *Nlrp3*<sup>-/-</sup> T-Zellen (Gris, Ye et al. 2010). In Zusammenschau unserer Daten mit publizierten Arbeiten, die die Signifikanz des NLRP3-Inflammasoms im Darm als Homöostaseregler auf Epithelzellebene hervorheben (Zaki, Boyd et al. 2010), ergibt sich das Bild, dass T-Zell-intrinsische Effekte von NLRP3 im Transferkolitismodell eine untergeordnete Rolle spielen.

Erwähnt werden muss jedoch, dass die hier erhobenen Daten im Widerspruch zu einer Untersuchung stehen, die während der Durchführung dieser Arbeit publiziert wurde und im Transferkolitismodell mit *Nlrp3*<sup>-/-</sup> T-Zellen eine stärkere Krankheitsaktivität beobachtete (Arbore, West et al. 2016). In einem T-Zell-Transferkolitismodell zeigten Arbore et al., dass das NLRP3-Inflammasom zumindest im Darm die Th<sub>1</sub>/Th<sub>17</sub>-Balance kontrolliert. Eine reduzierte IFN- $\gamma$ -Produktion von *Nlrp3*<sup>-/-</sup> T-Zellen führte neben einer vermehrten Th<sub>17</sub>-Polarisierung in der Lamina propria zu einer verstärkten Inflammation im Darm in der *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Transfergruppe.

Insgesamt muss man jedoch bei genauerer Betrachtung der vorliegenden Daten von Arbore et al. zur durchgeführten T-Zell-Transferkolitis folgende Observationen festhalten: Sechs Wochen nach Induktion der Kolitis zeigt die WT Transfergruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen Unterschied im Gewichtsverlauf, es zeigt sich kein Unterschied in den Kolonlängen zwischen WT und Kontrollgruppe und auch in der histologischen Begutachtung der explantierten Kolons zeigt sich bei einem Großteil der WT Transfergruppe keine Inflammation oder Immunzellinfiltration. Es ist zwar beschrieben, dass 10 – 20 % der Tiere im Transferkolitismodell keinen signifikanten Gewichtsverlust erleiden, jedoch ist auch bei diesen Tieren histologisch ein Entzündungsnachweis immer möglich, da es zu einer Pankolitis kommt (Ostanin, Bao et al. 2009). Im Dickdarm der Tiere kommt es zu einer deutlich nachweisbaren

Leukozyteninfiltration (Powrie 1993). Fehlt bei der Mehrheit der transferierten Tiere die klinische Krankheitsausprägung, welche typischerweise drei bis vier Wochen nach Induktion sichtbar sein sollte, kann dies auf methodische Probleme während der Induktion zurückzuführen sein. Darunter fallen eine schlechte Zellviabilität, eine suboptimale *Gating*-Strategie im FACS-*Sort* oder eine fehlerhafte i.p.-Injektion der T-Zellen (Ostanin, Bao et al. 2009).

Die langjährige Erfahrung unserer Arbeitsgruppe mit diesem Modell hat gezeigt, dass es selbst bei fehlendem Gewichtsverlust der Tiere trotzdem histologisch zu entzündlichen Veränderungen und immer zu einer T-Zell-Infiltration in die Lamina propria kommt. Bleibt diese aus, fehlt auch der T-Zell-Nachweis im Blut der Tiere und es liegt somit ein methodisch nicht korrekt durchgeführter T-Zell-Transfer zu Beginn der Experimente vor.

Nichtsdestotrotz konnte der beschriebene Th<sub>1</sub>/Th<sub>17</sub>-Phänotyp im T-Zell-Transferkolitismodell durch die Arbeitsgruppe um Arbore et al. auch in einem *graft-versus-host* Krankheitsmodell nachweisen: Hier zeigten Mäuse, die *Nlrp3*<sup>-/-</sup> T-Zellen erhielten, eine stärkere klinische Krankheitsausprägung, einhergehend mit einer verminderten Th<sub>1</sub>- und verstärkten Th<sub>17</sub>-Antwort (Arbore, West et al. 2016). Somit scheint ein NLRP3 *knock-out* sowohl auf T-Zell-Ebene, als auch global im Organismus die Th<sub>17</sub>-Differenzierung zu beeinflussen.

Die Beobachtung, dass sich die klinische Erkrankungsaktivität sowie diverse Immunparameter in der Lamina propria, wie Zytokinspiegel und T-Zell-Aktivierung, in den *Nlrp3*<sup>-/-</sup> und WT Transfergruppen nicht signifikant unterscheiden, lässt die Schlussfolgerung zu, dass die beschriebenen Unterschiede in der Th<sub>17</sub>-Polarisierung keine relevante Auswirkungen auf die Entzündungsausprägung im Transferkolitismodell haben. Mit den Endzeitpunkten in Woche vier und sechs konnten wir das für die frühe und späte Krankheitsphase untersuchen. Die T-Zell-intrinsische NLRP3-Funktion ist für die Pathogenese der Transferkolitis also von untergeordneter Bedeutung. In diesem Modell einer chronisch-entzündlichen Erkrankungen scheint die Funktion des NLRP3-Inflammasoms in anderen zellulären Kompartimenten, wie antigenpräsentierenden Zellen und Epithelzellen, ausschlaggebender für den Krankheitsverlauf zu sein.

Im Rahmen diverser anderer Erkrankungen ist die (NLRP3-abhängige) Th<sub>1</sub>/Th<sub>17</sub>-Immunantwort ebenfalls ausschlaggebend für den Krankheitsprogress, z.B. bei rheumatoider Arthritis oder der Multiplen Sklerose (MS) (Gris, Ye et al. 2010, Rostami

and Ciric 2013, Zhao, Gu et al. 2018). Versuche in anderen experimentellen Krankheitsmodellen, wie zum Beispiel der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (ein MS-Modell), könnten hilfreich sein, um abschließend zu klären, ob eine T-Zell-intrinsische NLRP3-Aktivität in Th<sub>1</sub>/Th<sub>17</sub> geprägten Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle spielt.

---



## 5. Zusammenfassung

Die exakte Pathogenese der CED ist nach wie vor nicht vollständig verstanden. Gesichert ist, dass es sich um ein komplexes Zusammenspiel aus genetischer Prädisposition, Umweltfaktoren und einem dysregulierten Mikrobiom handelt.

Dem NLRP3-Inflammasom kommt mit seinen Effektorzytokinen IL-1 $\beta$  und IL-18 in der Pathogenese der CED sowie der Regulation einer Th<sub>1</sub>/Th<sub>17</sub>-Immunantwort eine zentrale Rolle zu. In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass das NLRP3-Inflammasom nicht nur von antigenpräsentierenden Zellen und Epithelzellen, sondern auch von CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert wird. Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von NLRP3 in der T-Zell-Differenzierung und insbesondere in der intestinalen Entzündungsreaktion im CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup>-Transferkolitismodell zu untersuchen.

Die Analyse *ex vivo* entnommener CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus gesunden WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> Mäusen ergaben, dass *Nlrp3*<sup>-/-</sup> T-Zellen im *steady state* mehr INF- $\gamma$  und IL-17A produzieren. Die *in vitro* Th<sub>17</sub>-Differenzierung naïver *Nlrp3*<sup>-/-</sup> T-Zellen zeigte hingegen einen Defekt in der IL-17-Sekretion, während die INF- $\gamma$ -Sekretion unbeeinflusst blieb. Die Diskrepanz der IL-17-Produktion von *Nlrp3*<sup>-/-</sup> T-Zellen *in vivo* und *in vitro* bedarf zur Klärung des zugrundeliegenden Mechanismus weiterer Untersuchungen.

Als nächstes wurde der Einfluss der T-Zell-intrinsischen NLRP3-Defizienz im CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup>-Transferkolitismodell untersucht. Der adoptive Transfer von WT und *Nlrp3*<sup>-/-</sup> T-Zellen in *Rag1*<sup>-/-</sup> Mäusen führte zu einer intestinalen Entzündungsreaktion im vier- bis sechswöchigen Krankheitsverlauf. Es fand sich jedoch kein signifikanter Unterschied im Gewichtsverlust, im klinischen Score oder beim Zytokinprofil des Kolongewebes. Interessanterweise wiesen *Nlrp3*<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die aus der Lamina propria oder den mesenterialen Lymphknoten der Versuchstiere isoliert wurden, eine signifikant höhere Expression von IL-17A auf. Dies ist in Einklang mit den oben beschriebenen *in vivo* Versuchen im *steady state*. Allerdings hatte dieser Unterschied in der IL-17-Expression keinen Einfluss auf die Krankheitsaktivität der Versuchstiere.

Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die zum Teil widersprüchlichen Daten zur Rolle des NLRP3-Inflammasoms in der Pathogenese der CED besser zu verstehen und um neue Therapien für Patienten mit CED zur Verfügung stellen zu können.

---

## 6. Anhang

### 6.1. Abkürzungsverzeichnis

AIM2	engl.: <i>Absent in melanoma 2</i> , dt.: Interferon-induzierbares Protein AIM2
APC	Allophycocyanin
APC	engl.: <i>Antigen-presenting cells</i> , dt.: Antigenpräsentierende Zelle
APC/Cy7	Allophycocyanine-Cyanin 7
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
ATG16L1	engl.: <i>Autophagy related 16 like 1</i> , dt.: Autophagieverwandtes 16 <i>like 1</i> Protein
BSA	Bovines Serumalbumin
CAPS	engl.: <i>Cryopyrin-associated periodic syndrome</i> , dt.: Cryopyrin-assoziierte periodische Syndrome
CARD	engl.: <i>Caspase-recruitment domain</i> , dt.: Caspase-Rekrutierungsdomäne
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CD	engl.: <i>Cluster of differentiation</i> , dt.: Unterscheidungsgruppen
CDH1	Cadherin 1
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
C57BL/6	Inzuchtmausstamm
DAMP	engl.: <i>Damage-associated molecular pattern</i> , dt.: Schadensassoziierte molekulare Muster
DC	engl.: <i>Dendritic cell</i> / dt.: Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSS	Dextranes Natriumsulphat
dt.	Deutsch
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
engl.	Englisch
FACS	engl.: <i>Fluorescence-activated cell sorter</i> , dt.: Durchflusszytometrie
FBS	Fetales bovines Serum

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLT3	engl.: <i>FMS-like tyrosine kinase 3</i> , dt.: Tyrosin-Protein-Kinase FLT3
FoxP3	Forxhead box P3
GALT	engl.: <i>gut associated lymphoid tissue</i> , dt.: darmassoziiertes lymphatische Gewebe
GATA3	GATA3, Transkriptionsfaktor der Th <sub>2</sub> Zellen
HBSS	Hanks' Salzlösung
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HNF4a	engl.: <i>Hepatocyte nuclear factor 4 alpha</i> , dt.: Hepatozyten-Kernfaktor 4 alpha
IEL	intraepitheliale Lymphozyten
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IL-1R1	Interleukin-1-Rezeptor, Typ 1
IL-17R	IL-17-Rezeptor
i.p.	intraperitoneal
IRF4	engl.: <i>IFN regulatory factor 4</i> , dt.: Interferon-Regulations-Faktor 4
LP	Lamina propria
LPL	Lymphozyten der Lamina propria
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	engl.: <i>leucine-rich repeat</i> , dt.: Leucin-reiche Wiederholung
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
MALT	engl.: <i>mucosa associated lymphoid tissue</i> , dt.: Schleimhaut-assoziiertes lymphatisches Gewebe
MDSC	engl.: <i>Myeloid-derived suppressor cells</i> , dt.: Myeloide Suppressorzellen
MLK	Mesenterialer Lymphknoten
mRNA	engl.: <i>Messenger RNA</i> , dt.: Boten-RNA
MS	Multiple Sklerose
MUC2	Muzin 2
NACHT	engl.: <i>NAIP (neuronal apoptosis inhibitor protein), C2TA (class 2 transcription activator), of the MHC, HET-E (heterokaryon incompatibility) and TP1 (telomerase associated) Nod-like receptor</i>

NF-κB	engl.: <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NLR	engl.: <i>Nod-like receptor</i> , dt.: Nucleotid-bindender Oligomerisierungsdomänen-Rezeptor
NLRC4	engl.: <i>CARD domain-containing protein 4</i> , dt.: CARD-Domänen enthaltende Protein 4
NLRP	engl.: <i>NACHT, LRR and PYD domains-containing protein</i> , dt.: NACHT-, LRR-, FIIND-, CARD-Domänen- und PYD-Domänen enthaltendes Protein 1
NOD2	engl.: <i>Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2</i> , intrazellulärer Mustererkennungsrezeptor
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PB	<i>Pacific blue</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (dt.: Phosphatgepufferte Salzlösung)
PE	<i>Phycoerithrin</i>
PE/Cy7	<i>Phycoerithrin-cyanine 7</i>
PerCP	<i>Peridinin-chlorophyll-protein</i>
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PRKDC	engl.: <i>DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit</i> , dt.: DNA-abhängige Proteinkinase
PRR	engl.: <i>pattern-recognition receptor</i> , dt.: Mustererkennungsrezeptoren
PYD	<i>Pyrin domain</i> (Pyrindomäne)
qRT-PCR	engl.: <i>real-time quantitative PCR</i> , quantitative Echtzeit-PCR
RAG-1	Rekombinationsaktivierungsgen 1
RNA	Ribonukleinsäure
RORγt	engl.: <i>RAR-related orphan receptor gamma t</i> , dt.: RAR-verwandtes Orphan-Rezeptor-Gamma
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
SCID	engl.: <i>severe combined immunodeficiency</i> , dt.: Schwere kombinierte Immundefekt
s.c.	subkutan

## Anhang

---

siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SNPs	engl.: <i>Single nucleotide polymorphisms</i> , dt.: Einzelnukleotid-Polymorphismus
T-bet	<i>T-box transcription factor TBX21</i>
TCR	engl.: <i>T cell receptor</i> , dt.: T-Zell-Rezeptor
Th Zelle	T-Helfer-Zelle
TNBS	2,4,6-Trinitrobenolsulfonsäure
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor Alpha
T <sub>reg</sub>	Regulatorische T-Zelle
w/	<i>with</i> (deutsch: mit)
w/o	<i>without</i> (deutsch: ohne)

## 6.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pufferlösung für FACS-Analysen und Zellseparationen .....	22
Tabelle 2: Pufferlösungen für die Lamina propria-Isolation .....	23
Tabelle 3: Individuell hergestellte Zellkulturmedien .....	23
Tabelle 4: Primär konjugierte Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	24
Tabelle 5: Antikörper für <i>in vitro</i> Experimente .....	25
Tabelle 6: Zytokine und Proteine .....	25
Tabelle 7: qRT-PCR Primer.....	26
Tabelle 8: qRT-PCR Master-Mix pro Zielgen und Probe .....	28
Tabelle 9: Ablauf des Syntheseprogrammes im LightCycler .....	28
Tabelle 10: Zytokinkonzentrationen der <i>in vitro</i> T-Zell-Polarisierung .....	35

### 6.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Pathogenese chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen. ....	8
Abbildung 1-2: Aufbau des NLRP3-Inflammasoms. ....	10
Abbildung 1-3: T-Zell Polarisierung im Darm bei CED. ....	16
Abbildung 2-1: CD4 <sup>+</sup> CD45RB <sup>high</sup> Transferkolitis - Induktion und Versuchsablauf. ....	31
Abbildung 3-1: <i>Ex vivo</i> -Analyse der CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen gesunder WT und <i>Nlrp3</i> <sup>-/-</sup> Mäuse. ....	37
Abbildung 3-2: <i>In vitro</i> T-Zell-Differenzierungs-Kulturbedingungen zeigen eine reduzierte IL-17A Sekretion bei <i>Nlrp3</i> <sup>-/-</sup> Th <sub>17</sub> Zellen. ....	39
Abbildung 3-3: Klinische Ausprägung der CD4 <sup>+</sup> CD45RB <sup>high</sup> Transferkolitis unter Verwendung von <i>Nlrp3</i> <sup>-/-</sup> bzw. WT T-Zellen nach vier Wochen Kolitisdauer. ....	41
Abbildung 3-4: Klinische Ausprägung der CD4 <sup>+</sup> CD45RB <sup>high</sup> Transferkolitis unter Verwendung von <i>Nlrp3</i> <sup>-/-</sup> bzw. WT T-Zellen nach sechs Wochen Kolitisdauer. ....	42
Abbildung 3-5: IL-6-Serumspiegel und Anzahl von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut im Verlauf der Transferkolitis. ....	44
Abbildung 3-6: Zytokinprofil im Kolongewebe nach sechs Wochen Transferkolitis. ....	46
Abbildung 3-7: Protein-Expressionsprofil von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren in CD4 <sup>+</sup> T-Zellen aus der Lamina propria nach sechs Wochen Transferkolitis. ....	48
Abbildung 3-8: Charakterisierung der transferierten WT und <i>Nlrp3</i> <sup>-/-</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in mesenterialen Lymphknoten nach sechs Wochen Kolitisdauer. ....	50



## 7. Literaturverzeichnis

Abraham, C. and J. H. Cho (2009). "Inflammatory bowel disease." N Engl J Med **361**(21): 2066-2078.

Acosta-Rodriguez, E. V., et al. (2007). "Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells." Nat Immunol **8**(9): 942-949.

Agostini, L., Martinon, F., Burns, K., McDermott, M. F., Hawkins, P. N., & Tschopp, J. (2004). "NALP3 Forms an IL-1 $\beta$ -Processing Inflammasome with Increased Activity in Muckle-Wells Autoinflammatory Disorder. ." Immunity **20**(3): 319-325.

Alex, P., et al. (2009). "Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis." Inflamm Bowel Dis **15**(3): 341-352.

Allen, I. C., et al. (2010). "The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer." J Exp Med **207**(5): 1045-1056.

Annunziato, F., et al. (2007). "Phenotypic and functional features of human Th17 cells." J Exp Med **204**(8): 1849-1861.

Antoni, L., et al. (2014). "Intestinal barrier in inflammatory bowel disease." World J Gastroenterol **20**(5): 1165-1179.

Arbore, G., et al. (2016). "T helper 1 immunity requires complement-driven NLRP3 inflammasome activity in CD4(+) T cells." Science **352**(6292): aad1210.

Atreya R, M. J., Finotto S, Müllberg J, Jostock T, Wirtz S, Schütz M, Bartsch B, Holtmann M, Becker C, Strand D, Czaja J, Schlaak JF, Lehr HA, Autschbach F, Schürmann G, Nishimoto N, Yoshizaki K, Ito H, Kishimoto T, Galle PR, Rose-John S, Neurath MF (2000). "Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: Evidence in Crohn disease and experimental colitis in vivo." Nature Medicine **6**(5): 583-588.

Bankole, E., et al. (2021). "The Relationship between Mucins and Ulcerative Colitis: A Systematic Review." J Clin Med **10**(9).

Barnabei, L., et al. (2021). "NF-kappaB: At the Borders of Autoimmunity and Inflammation." Front Immunol **12**: 716469.

Bauer, C., et al. (2012). "Protective and aggravating effects of Nlrp3 inflammasome activation in IBD models: influence of genetic and environmental factors." Dig Dis **30 Suppl 1**: 82-90.

Bauer, C., et al. (2010). "Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome." Gut **59**(9): 1192-1199.

Bauernfeind, F. G., et al. (2009). "Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression." J Immunol **183**(2): 787-791.

Baumann, H. and J. Gauldie (1994). "The acute phase response." Immunology Today **15**(2): 74-80.

Baumgart, D. C. and W. J. Sandborn (2007). "Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies." Lancet **369**(9573): 1641-1657.

Ben-Neriah, Y. and M. Karin (2011). "Inflammation meets cancer, with NF-kappaB as the matchmaker." Nat Immunol **12**(8): 715-723.

Bianco, A. M., et al. (2015). "Genetics of inflammatory bowel disease from multifactorial to monogenic forms." World J Gastroenterol **21**(43): 12296-12310.

Black, R. A., et al. (1988). "Generation of biologically active interleukin-1 beta by proteolytic cleavage of the inactive precursor." Journal of Biological Chemistry **263**(19): 9437-9442.

Bosma G.C., C. R. P., Bosma M. J. (1983). "A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse." Nature **301**(5900): 527-530.

Broz, P. and V. M. Dixit (2016). "Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling." Nat Rev Immunol **16**(7): 407-420.

Bruchard, M., et al. (2013). "Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth." Nat Med **19**(1): 57-64.

Bruchard, M., et al. (2015). "The receptor NLRP3 is a transcriptional regulator of TH2 differentiation." Nat Immunol **16**(8): 859-870.

Caruso, R., et al. (2014). "NOD1 and NOD2: signaling, host defense, and inflammatory disease." Immunity **41**(6): 898-908.

Chang, S. H., et al. (2006). "Act1 adaptor protein is an immediate and essential signaling component of interleukin-17 receptor." J Biol Chem **281**(47): 35603-35607.

Cheifetz, A. S. (2013). "Management of active Crohn disease." JAMA **309**(20): 2150-2158.

Chen, G. Y., et al. (2011). "A functional role for Nlrp6 in intestinal inflammation and tumorigenesis." J Immunol **186**(12): 7187-7194.

Choy, M. C., et al. (2017). "An Overview of the Innate and Adaptive Immune System in Inflammatory Bowel Disease." Inflamm Bowel Dis **23**(1): 2-13.

Chung, Y., et al. (2009). "Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling." Immunity **30**(4): 576-587.

Coccia, M., et al. (2012). "IL-1beta mediates chronic intestinal inflammation by promoting the accumulation of IL-17A secreting innate lymphoid cells and CD4(+) Th17 cells." J Exp Med **209**(9): 1595-1609.

Cominelli, F., et al. (1990). "Interleukin 1 (IL-1) gene expression, synthesis, and effect of specific IL-1 receptor blockade in rabbit immune complex colitis." J Clin Invest **86**(3): 972-980.

Cominelli, F., et al. (1992). "Recombinant interleukin-1 receptor antagonist blocks the proinflammatory activity of endogenous interleukin-1 in rabbit immune colitis." Gastroenterology **103**(1): 65-71.

Consortium, U. I. G., et al. (2009). "Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region." Nat Genet **41**(12): 1330-1334.

Cummings, J. R., et al. (2010). "The genetics of NOD-like receptors in Crohn's disease." Tissue Antigens **76**(1): 48-56.

de Vasconcelos, N. M., et al. (2016). "Inflammasomes as polyvalent cell death platforms." Cell Mol Life Sci **73**(11-12): 2335-2347.

Dignass, A., et al. (2012). "Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 1: definitions and diagnosis." J Crohns Colitis **6**(10): 965-990.

Donovan, C., et al. (2020). "The role of the microbiome and the NLRP3 inflammasome in the gut and lung." J Leukoc Biol **108**(3): 925-935.

Duewell, P., et al. (2010). "NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals." Nature **464**(7293): 1357-1361.

Dungan, L. S. and K. H. Mills (2011). "Caspase-1-processed IL-1 family cytokines play a vital role in driving innate IL-17." Cytokine **56**(1): 126-132.

Dupaul-Chicoine, J., et al. (2010). "Control of intestinal homeostasis, colitis, and colitis-associated colorectal cancer by the inflammatory caspases." Immunity **32**(3): 367-378.

Elinav, E., et al. (2013). "Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms." Nat Rev Cancer **13**(11): 759-771.

Elinav, E., et al. (2011). "NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis." Cell **145**(5): 745-757.

Elson, C. O., et al. (2005). "Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota." Immunol Rev **206**: 260-276.

Fujino, S., et al. (2003). "Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease." Gut **52**(1): 65-70.

Gaffen, S. L. (2009). "Structure and signalling in the IL-17 receptor family." Nat Rev Immunol **9**(8): 556-567.

Geremia, A., et al. (2014). "Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease." Autoimmun Rev **13**(1): 3-10.

Glocker, E. O., et al. (2009). "Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor." N Engl J Med **361**(21): 2033-2045.

Gris, D., et al. (2010). "NLRP3 plays a critical role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by mediating Th1 and Th17 responses." J Immunol **185**(2): 974-981.

Guan, Q. (2019). "A Comprehensive Review and Update on the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease." J Immunol Res **2019**: 7247238.

Halle, A., et al. (2008). "The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta." Nat Immunol **9**(8): 857-865.

Hanaei, S., et al. (2018). "Association of NLRP3 single nucleotide polymorphisms with ulcerative colitis: A case-control study." Clin Res Hepatol Gastroenterol **42**(3): 269-275.

Harder, J., et al. (2009). "Activation of the Nlrp3 inflammasome by Streptococcus pyogenes requires streptolysin O and NF-kappa B activation but proceeds independently of TLR signaling and P2X7 receptor." J Immunol **183**(9): 5823-5829.

Hatscher, L., et al. (2021). "Select hyperactivating NLRP3 ligands enhance the T(H)1- and T(H)17-inducing potential of human type 2 conventional dendritic cells." Sci Signal **14**(680).

Heeger, P. S. and C. Kemper (2012). "Novel roles of complement in T effector cell regulation." Immunobiology **217**(2): 216-224.

Heller, F., et al. (2005). "Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution." Gastroenterology **129**(2): 550-564.

Henao-Mejia, J., et al. (2012). "Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity." Nature **482**(7384): 179-185.

Hirota, S. A., et al. (2011). "NLRP3 inflammasome plays a key role in the regulation of intestinal homeostasis." Inflamm Bowel Dis **17**(6): 1359-1372.

Hoffman, H. M., et al. (2001). "Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome." Nat Genet **29**(3): 301-305.

Hovhannisyan, Z., et al. (2011). "Characterization of interleukin-17-producing regulatory T cells in inflamed intestinal mucosa from patients with inflammatory bowel diseases." Gastroenterology **140**(3): 957-965.

Hu, B., et al. (2019). "Transmissible inflammation-induced colorectal cancer in inflammasome-deficient mice." Oncoimmunology **8**(10): e981995.

Hundorfean, G., et al. (2012). "Functional relevance of T helper 17 (Th17) cells and the IL-17 cytokine family in inflammatory bowel disease." Inflamm Bowel Dis **18**(1): 180-186.

I J Fuss, M. N., M Boirivant, J S Klein, C de la Motte, S A Strong, C Fiocchi and W Strober (1996). "Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5." The Journal of Immunology **157**(3).

Ivanov, II, et al. (2008). "Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine." Cell Host Microbe **4**(4): 337-349.

Ivanov, II, et al. (2006). "The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells." Cell **126**(6): 1121-1133.

Iwase, S., et al. (2019). "Interleukin-6 as a diagnostic marker for infection in critically ill patients: A systematic review and meta-analysis." Am J Emerg Med **37**(2): 260-265.

Javanmard Khameneh, H., et al. (2019). "The Inflammasome Adaptor ASC Intrinsically Limits CD4(+) T-Cell Proliferation to Help Maintain Intestinal Homeostasis." Front Immunol **10**: 1566.

K. S. Rothfuss, E. F. S., K. R. Herrlinger (2006). "Extraintestinal manifestations and complications in inflammatory bowel diseases." World J Gastroenterol **12**(30): 4819-4831.

Kanai, T., et al. (2001). "Macrophage-derived IL-18-mediated intestinal inflammation in the murine model of Crohn's disease." Gastroenterology **121**(4): 875-888.

Kelley, N., et al. (2019). "The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation." Int J Mol Sci **20**(13).

Khan, I., et al. (2019). "Alteration of Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease (IBD): Cause or Consequence? IBD Treatment Targeting the Gut Microbiome." Pathogens **8**(3).

Khor, B., et al. (2011). "Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease." Nature **474**(7351): 307-317.

Kobayashi, T., et al. (2008). "IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease." Gut **57**(12): 1682-1689.

Korzenik, J. R. and D. K. Podolsky (2006). "Evolving knowledge and therapy of inflammatory bowel disease." Nat Rev Drug Discov **5**(3): 197-209.

Kotlarz, D., et al. (2012). "Loss of interleukin-10 signaling and infantile inflammatory bowel disease: implications for diagnosis and therapy." Gastroenterology **143**(2): 347-355.

Kühn, R., et al. (1993). "Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis." Cell **75**(2): 263-274.

Kusugami K., F. A., Tanimoto M., Shinoda M., Haruta J., Kuroiwa A., Ina K., Kanayama K., Ando T., Matsuura T. (1995). "Elevation of Interleukin-6 in Inflammatory Bowel Disease Is Macrophage- and Epithelial Cell-Dependent." Digestive Diseases and Sciences **40**(5): 949-959.

Lalor, S. J., et al. (2011). "Caspase-1-processed cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18 promote IL-17 production by  $\gamma\delta$  and CD4 T cells that mediate autoimmunity." J Immunol **186**(10): 5738-5748.

Lamacchia, C., et al. (2010). "Enhanced Th1 and Th17 responses and arthritis severity in mice with a deficiency of myeloid cell-specific interleukin-1 receptor antagonist." Arthritis Rheum **62**(2): 452-462.

Lasiglie, D., et al. (2011). "Role of IL-1 beta in the development of human T(H)17 cells: lesson from NLRP3 mutated patients." PLoS One **6**(5): e20014.

Latz, E., et al. (2013). "Activation and regulation of the inflammasomes." Nat Rev Immunol **13**(6): 397-411.

Lee, M. and E. B. Chang (2021). "Inflammatory Bowel Diseases (IBD) and the Microbiome-Searching the Crime Scene for Clues." Gastroenterology **160**(2): 524-537.

Lee, Y. K., et al. (2009). "Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage." Immunity **30**(1): 92-107.

Levy, M., et al. (2017). "NLRP6: A Multifaceted Innate Immune Sensor." Trends Immunol **38**(4): 248-260.

Levy, M., et al. (2015). "Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling." Cell **163**(6): 1428-1443.

Lexberg, M. H., et al. (2008). "Th memory for interleukin-17 expression is stable in vivo." Eur J Immunol **38**(10): 2654-2664.

Ligumsky, M., et al. (1990). "Role of interleukin 1 in inflammatory bowel disease--enhanced production during active disease." Gut **31**(6): 686-689.

Ling-Long Peng, Y. W., Feng-Ling Zhu, Wang-Dong Xu, Xue-Lei Ji, and Jing Ni (2016). "IL-23R mutation is associated with ulcerative colitis: A systemic review and meta-analysis." Oncotarget **8**(3): 4849-4863.

Liszewski, M. K., et al. (2013). "Intracellular complement activation sustains T cell homeostasis and mediates effector differentiation." Immunity **39**(6): 1143-1157.

Liu, J. Z., et al. (2015). "Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations." Nat Genet **47**(9): 979-986.

Liu, Z., et al. (2011). "The increased expression of IL-23 in inflammatory bowel disease promotes intraepithelial and lamina propria lymphocyte inflammatory responses and cytotoxicity." J Leukoc Biol **89**(4): 597-606.

Loddo, I. and C. Romano (2015). "Inflammatory Bowel Disease: Genetics, Epigenetics, and Pathogenesis." Front Immunol **6**: 551.

Lopetuso, L. R., et al. (2013). "Opposing Functions of Classic and Novel IL-1 Family Members in Gut Health and Disease." Front Immunol **4**: 181.

Luckheeram, R. V., et al. (2012). "CD4(+)T cells: differentiation and functions." Clin Dev Immunol **2012**: 925135.

Ma, L., et al. (2016). "Role of interleukin-6 to differentiate sepsis from non-infectious systemic inflammatory response syndrome." Cytokine **88**: 126-135.

MacDonald, T. T. and S. L. Pender (1998). "Lamina propria T cells." Chem Immunol **71**: 103-117.

Maelfait, J., et al. (2008). "Stimulation of Toll-like receptor 3 and 4 induces interleukin-1beta maturation by caspase-8." J Exp Med **205**(9): 1967-1973.

Maher, B. M., et al. (2013). "Nlrp-3-driven interleukin 17 production by gammadeltaT cells controls infection outcomes during Staphylococcus aureus surgical site infection." Infect Immun **81**(12): 4478-4489.

Mahida, Y. R., et al. (1989). "Enhanced production of interleukin 1-beta by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis of Crohn's disease." Gut **30**(6): 835-838.

Mak'Anyengo, R., et al. (2018). "Nlrp3-dependent IL-1beta inhibits CD103+ dendritic cell differentiation in the gut." JCI Insight **3**(5).

Mao, L., et al. (2018). "The Role of NLRP3 and IL-1beta in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease." Front Immunol **9**: 2566.

Mariathasan, S., et al. (2006). "Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP." Nature **440**(7081): 228-232.

Marsal, J. and W. W. Agace (2012). "Targeting T-cell migration in inflammatory bowel disease." J Intern Med **272**(5): 411-429.

Martens, E. C., et al. (2018). "Interactions of commensal and pathogenic microorganisms with the intestinal mucosal barrier." Nat Rev Microbiol **16**(8): 457-470.

Martin, B. N., et al. (2016). "T cell-intrinsic ASC critically promotes T(H)17-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis." Nat Immunol **17**(5): 583-592.

Martinon, F., et al. (2006). "Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome." Nature **440**(7081): 237-241.

Meng, G., et al. (2009). "A mutation in the Nlrp3 gene causing inflammasome hyperactivation potentiates Th17 cell-dominant immune responses." Immunity **30**(6): 860-874.

Menoret, A., et al. (2018). "T cell-directed IL-17 production by lung granular gammadelta T cells is coordinated by a novel IL-2 and IL-1beta circuit." Mucosal Immunol **11**(5): 1398-1407.

Mills, K. H., et al. (2013). "The role of inflammasome-derived IL-1 in driving IL-17 responses." J Leukoc Biol **93**(4): 489-497.

Mishima, Y. and R. B. Sartor (2020). "Manipulating resident microbiota to enhance regulatory immune function to treat inflammatory bowel diseases." J Gastroenterol **55**(1): 4-14.

Mitsuyama, K., Sata, M. & Tanikawa, K. (1991). "Significance of interleukin-6 in patients with inflammatory bowel disease." Gastroenterologia Japonica **26**: 20-28.

Mizoguchi, A. (2012). "Animal models of inflammatory bowel disease." Prog Mol Biol Transl Sci **105**: 263-320.

Mizoguchi, E., et al. (2020). "Recent updates on the basic mechanisms and pathogenesis of inflammatory bowel diseases in experimental animal models." Intest Res **18**(2): 151-167.

Mombaerts, P., et al. (1992). "RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes." Cell **68**(5): 869-877.

Moreira Lopes, T. C., et al. (2020). "Macrophage polarization in intestinal inflammation and gut homeostasis." Inflamm Res **69**(12): 1163-1172.

Muise, A. M., et al. (2009). "Polymorphisms in E-cadherin (CDH1) result in a mis-localised cytoplasmic protein that is associated with Crohn's disease." Gut **58**(8): 1121-1127.

Mukasa, R., et al. (2010). "Epigenetic instability of cytokine and transcription factor gene loci underlies plasticity of the T helper 17 cell lineage." Immunity **32**(5): 616-627.

Munoz-Planillo, R., et al. (2013). "K(+) efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter." Immunity **38**(6): 1142-1153.

Naser, S. A., et al. (2012). "Role of ATG16L, NOD2 and IL23R in Crohn's disease pathogenesis." World J Gastroenterol **18**(5): 412-424.

Nenci, A., et al. (2007). "Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation." Nature **446**(7135): 557-561.

Neurath, M. F. (2014). "Cytokines in inflammatory bowel disease." Nat Rev Immunol **14**(5): 329-342.

Neurath, M. F. and S. Pettersson (1997). "Predominant Role of NF- $\kappa$ B p65 in the Pathogenesis of Chronic Intestinal Inflammation." Immunobiology **198**(1-3): 91-98.

Nielsen, O. H., et al. (2003). "Upregulation of interleukin-12 and -17 in active inflammatory bowel disease." Scand J Gastroenterol **38**(2): 180-185.

Nowarski, R., et al. (2015). "Epithelial IL-18 Equilibrium Controls Barrier Function in Colitis." Cell **163**(6): 1444-1456.

Ogura, Y., et al. (2001). "Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF- $\kappa$ B." J Biol Chem **276**(7): 4812-4818.

Okayasu, I., et al. (1990). "A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice." Gastroenterology **98**(3): 694-702.

Ostanin, D. V., et al. (2009). "T cell transfer model of chronic colitis: concepts, considerations, and tricks of the trade." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **296**(2): G135-146.



P Parronchi, P. R., F Annunziato, S Sampognaro, A Becchio, L Giannarini, E Maggi, C Pupilli, F Tonelli, S Romagnani (1997). "Type 1 T-helper Cell Predominance and interleukin-12 Expression in the Gut of Patients With Crohn's Disease." American Journal of Pathology **150**(3): 823-832.

Pallone, F. and G. Monteleone (1998). "Interleukin 12 and Th1 responses in inflammatory bowel disease." Gut **43**(6): 735-736.

Peiqing Shi, S. Z., Yingying Lin, Yongfeng Liu, Yan Liu, Zhijian Chen, Yufang Shi, Youcun Qian (2011). "Persistent Stimulation with Interleukin-17 Desensitizes Cells Through SCFb-TrCP-Mediated Degradation of Act1." Science Signaling **4**(197): ra73-ra73.

Podolsky, D. K. (2002). "Inflammatory bowel disease." N Engl J Med **347**(6): 417-429.

Powrie, F., et al. (1994). "Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells." Immunity **1**(7): 553-562.

Powrie, F., Leach, M.W., Mauze, S., Barcomb Caddle, L., Coffman, R.L. (1993). "Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice." International Immunology **5**(11): 1461-1471.

Powrie, F. and H. Uhlir (2004). "Animal models of intestinal inflammation: clues to the pathogenesis of inflammatory bowel disease." Novartis Found Symp **263**: 164-174; discussion 174-168, 211-168.

Pyrillou, K., et al. (2020). "Alternative Pathways of IL-1 Activation, and Its Role in Health and Disease." Front Immunol **11**: 613170.

Ranson, N., et al. (2018). "NLRP3-Dependent and -Independent Processing of Interleukin (IL)-1beta in Active Ulcerative Colitis." Int J Mol Sci **20**(1).

Rao, D. A., et al. (2007). "IL-1alpha and IL-1beta are endogenous mediators linking cell injury to the adaptive alloimmune response." J Immunol **179**(10): 6536-6546.

Raphael, I., et al. (2015). "T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases." Cytokine **74**(1): 5-17.

Rathinam, V. A., et al. (2012). "Regulation of inflammasome signaling." Nat Immunol **13**(4): 333-342.

Raza, A., et al. (2012). "Th17 cells: interactions with predisposing factors in the immunopathogenesis of inflammatory bowel disease." Expert Rev Clin Immunol **8**(2): 161-168.

Reinecker, H.-C., et al. (2008). "Enhand secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1β by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease." Clinical and Experimental Immunology **94**(1): 174-181.

Reinisch W., G. C., Tillinger W., Wyatt J., Lichtenberger C., Willheim M., Dejaco C., Waldhör T., Bakos S., Vogelsang H., Gangl A., Lochs H. (1999). "Clinical relevance of serum interleukin-6 in Crohn's disease: Single point measurements, therapy monitoring,

and prediction of clinical relapse." American Journal of Gastroenterology **94**(8): 2156-2164.

Rogler, G., et al. (1998). "Nuclear factor  $\kappa$ B is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa." Gastroenterology **115**(2): 357-369.

Rostami, A. and B. Ciric (2013). "Role of Th17 cells in the pathogenesis of CNS inflammatory demyelination." J Neurol Sci **333**(1-2): 76-87.

Rovedatti, L., et al. (2009). "Differential regulation of interleukin 17 and interferon gamma production in inflammatory bowel disease." Gut **58**(12): 1629-1636.

S Fujino, A. A., S Bamba, A Ogawa, K Hata, Y Araki, T Bamba, and Y Fujiyama (2003). "Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease." Gut **52**(1): 65-70.

S. Inoue, T. M., M. Iida, M. Mizuno, F. Kuroki, K. Hoshika, M. Shimizu (1999). "Characterization of Cytokine Expression in the Rectal Mucosa of Ulcerative Colitis: Correlation With Disease Activity." The American Journal of Gastroenterology **94**(9).

Sadlack B., M. H., Schorle H., Schimpl A., Feller A. C., Horak I. (1993). "Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene." Cell **75**(2): 253-261.

Salem, M., et al. (2015). "ATG16L1: A multifunctional susceptibility factor in Crohn disease." Autophagy **11**(4): 585-594.

Sanchez de Medina, F., et al. (2014). "Intestinal inflammation and mucosal barrier function." Inflamm Bowel Dis **20**(12): 2394-2404.

Sanchez-Munoz, F., et al. (2008). "Role of cytokines in inflammatory bowel disease." World J Gastroenterol **14**(27): 4280-4288.

Sands, B. E. (2004). "From symptom to diagnosis: clinical distinctions among various forms of intestinal inflammation." Gastroenterology **126**(6): 1518-1532.

Schirmer, M., et al. (2019). "Microbial genes and pathways in inflammatory bowel disease." Nat Rev Microbiol **17**(8): 497-511.

Schönbeck, U., Mach, F., Libby, P. (1998). "Generation of Biologically Active IL-1 $\beta$  by Matrix Metalloproteinases: A Novel Caspase-1-Independent Pathway of IL-1 $\beta$  Processing." The Journal of Immunology **7**(161).

Schroder, K. and J. Tschopp (2010). "The inflammasomes." Cell **140**(6): 821-832.

Schulte, W., et al. (2013). "Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets--an updated view." Mediators Inflamm **2013**: 165974.

Siegmund, B. (2010). "Interleukin-18 in intestinal inflammation: friend and foe?" Immunity **32**(3): 300-302.

Siegmund, B., et al. (2001). "Neutralization of interleukin-18 reduces severity in murine colitis and intestinal IFN-gamma and TNF-alpha production." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **281**(4): R1264-1273.

Siegmund, B., et al. (2001). "IL-1 beta -converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(23): 13249-13254.

Sivakumar, P. V., et al. (2002). "Interleukin 18 is a primary mediator of the inflammation associated with dextran sulphate sodium induced colitis: blocking interleukin 18 attenuates intestinal damage." Gut **50**(6): 812-820.

Song, J., et al. (2019). "Diagnostic and prognostic value of interleukin-6, pentraxin 3, and procalcitonin levels among sepsis and septic shock patients: a prospective controlled study according to the Sepsis-3 definitions." BMC Infect Dis **19**(1): 968.

Steege, J. C., et al. (1997). "The neonatal development of intraepithelial and lamina propria lymphocytes in the murine small intestine." Dev Immunol **5**(2): 121-128.

Strober, W., et al. (2007). "The fundamental basis of inflammatory bowel disease." J Clin Invest **117**(3): 514-521.

Strober, W., et al. (2002). "The immunology of mucosal models of inflammation." Annu Rev Immunol **20**: 495-549.

Sturm, A., et al. (2008). "Mucosal T cell proliferation and apoptosis in inflammatory bowel disease." Curr Drug Targets **9**(5): 381-387.

Su, H., et al. (2018). "Mycobacterium tuberculosis PPE60 antigen drives Th1/Th17 responses via Toll-like receptor 2-dependent maturation of dendritic cells." J Biol Chem **293**(26): 10287-10302.

Sutton, C., et al. (2006). "A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis." J Exp Med **203**(7): 1685-1691.

Szabo SJ, K. S., Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH (2000). "A Novel Transcription Factor, T-bet, Directs Th1 Lineage Commitment." Cell **100**(6): 655-669.

Thaiss, C. A., et al. (2016). "Integration of Innate Immune Signaling." Trends Immunol **37**(2): 84-101.

Tourkochristou, E., et al. (2019). "Role of NLRP3 inflammasome in inflammatory bowel diseases." World J Gastroenterol **25**(33): 4796-4804.

Ueno, A., et al. (2018). "Th17 plasticity and its relevance to inflammatory bowel disease." J Autoimmun **87**: 38-49.

Van Assche, G., et al. (2010). "The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis." J Crohns Colitis **4**(1): 7-27.

Van der Sluis, M., et al. (2006). "Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection." Gastroenterology **131**(1): 117-129.

Villani, A. C., et al. (2009). "Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility." Nat Genet **41**(1): 71-76.

Wagatsuma, K. and H. Nakase (2020). "Contradictory Effects of NLRP3 Inflammasome Regulatory Mechanisms in Colitis." Int J Mol Sci **21**(21).

Wallace, K. L., et al. (2014). "Immunopathology of inflammatory bowel disease." World J Gastroenterol **20**(1): 6-21.

Winsor, N., et al. (2019). "Canonical and noncanonical inflammasomes in intestinal epithelial cells." Cell Microbiol **21**(11): e13079.

Xu, W. D., et al. (2015). "Association of Interleukin-23 receptor gene polymorphisms with susceptibility to Crohn's disease: A meta-analysis." Sci Rep **5**: 18584.

Yang, S. K., et al. (2011). "Association of CARD8 with inflammatory bowel disease in Koreans." J Hum Genet **56**(3): 217-223.

Yao, X., et al. (2017). "Remodelling of the gut microbiota by hyperactive NLRP3 induces regulatory T cells to maintain homeostasis." Nat Commun **8**(1): 1896.

Ye, B. D. and D. P. McGovern (2016). "Genetic variation in IBD: progress, clues to pathogenesis and possible clinical utility." Expert Rev Clin Immunol **12**(10): 1091-1107.

Yeshi, K., et al. (2020). "Revisiting Inflammatory Bowel Disease: Pathology, Treatments, Challenges and Emerging Therapeutics Including Drug Leads from Natural Products." J Clin Med **9**(5).

Younis, N., et al. (2020). "Inflammatory bowel disease: between genetics and microbiota." Mol Biol Rep **47**(4): 3053-3063.

Zaki, M. H., et al. (2010). "The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis." Immunity **32**(3): 379-391.

Zaki, M. H., et al. (2010). "IL-18 production downstream of the Nlrp3 inflammasome confers protection against colorectal tumor formation." J Immunol **185**(8): 4912-4920.

Zenewicz, L. A., et al. (2009). "CD4 T-cell differentiation and inflammatory bowel disease." Trends Mol Med **15**(5): 199-207.

Zhang, D. H., et al. (1997). "Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene." J Biol Chem **272**(34): 21597-21603.

Zhang, H. X., et al. (2014). "NLRP3 gene is associated with ulcerative colitis (UC), but not Crohn's disease (CD), in Chinese Han population." Inflamm Res **63**(12): 979-985.

Zhang, S., et al. (2016). "Interleukin-17A Induces IL-1beta Secretion From RPE Cells Via the NLRP3 Inflammasome." Invest Ophthalmol Vis Sci **57**(2): 312-319.

Zhang, T., et al. (2021). "NF-kappaB signaling in inflammation and cancer." MedComm (2020) **2**(4): 618-653.

Zhang, Y. Z. and Y. Y. Li (2014). "Inflammatory bowel disease: pathogenesis." World J Gastroenterol **20**(1): 91-99.

Zhao, C., et al. (2018). "NLRP3 inflammasome regulates Th17 differentiation in rheumatoid arthritis." Clin Immunol **197**: 154-160.

Zhen, Y. and H. Zhang (2019). "NLRP3 Inflammasome and Inflammatory Bowel Disease." Front Immunol **10**: 276.

Zhu, J. and W. E. Paul (2008). "CD4 T cells: fates, functions, and faults." Blood **112**(5): 1557-1569.

Zhu, J., et al. (2010). "Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*)." Annu Rev Immunol **28**: 445-489.

Zigmond, E., et al. (2012). "Ly6C hi monocytes in the inflamed colon give rise to proinflammatory effector cells and migratory antigen-presenting cells." Immunity **37**(6): 1076-1090.

## 8. Lebenslauf

Name: Cornelia Franziska Reichl  
Geburtsdatum: 20.01.1993  
Geburtsort: Wien, Österreich

### **Akademische und berufliche Laufbahn**

**03/2020-laufend** Weiterbildung zur Fachärztin für Anästhesiologie und Intensivmedizin am Klinikum der Universität München  
**12/2019** Erlangung der Approbation als Ärztin für Humanmedizin  
**03/2016-2021** Experimentelle Doktorarbeit in der Abteilung für Klinische Pharmakologie der Ludwig-Maximilians-Universität München  
» gefördert durch das Förderprogramm für Forschung und Lehre  
**10/2012-11/2019** Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München mit Ablegung des Ersten, Zweiten und Dritten Abschnittes der Ärztlichen Reifeprüfung  
**05/2011** Ablegung der österreichischen Reifeprüfung

### **Auslandsaufenthalte und außer-, sowie inneruniversitäres Engagement**

**2015-2019** Engagement bei „Campus for Change e.V.“ (ehrenamtlicher, studentischer Verein mit sozialen Hilfsprojekten u.a. in Afrika, Asien und Südamerika)  
» 12/15 – 08/17: Vorstand für Externe Kommunikation  
» 08/17 – 03/19: Vorstandsassistenz für Externe Kommunikation  
**2015-2016** Mitglied bei „Mit Sicherheit Verliebt“ (Sexualaufklärungsprojekt der Bundesvertretung der Medizinstudierenden in Deutschland e.V.)  
**2011-2012** einjähriger Auslandsaufenthalt als Au-Pair in den USA  
**2013-2020** Tätigkeit als Werkstudentin bei Lidl Vertriebs-GmbH & Co. KG

### **Wissenschaftliche Publikationen**

Rachel Mak'Anyengo, Peter Duewell, Cornelia Reichl, Christine Hörth, Hans-Anton Lehr, Sandra Fischer, Thomas Clavel, Gerald Denk, Simon Hohenester, Sebastian Kobold, Stefan Endres, Max Schnurr, and Christian Bauer. Nlrp3-dependent IL-1 $\beta$  inhibits CD103+ dendritic cell differentiation in the gut. **JCI Insight**. 2018;3(5):e96322

## 9. Danksagung

An allererster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Stefan Endres, Leiter der Abteilung für Klinische Pharmakologie, dafür danken, dass er mir die Möglichkeit geboten hat, in seiner Abteilung zu promovieren. Für die Erfahrungen, die ich im Rahmen meiner Promotion in seiner Abteilung sammeln konnte, bin ich auf ewig dankbar.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Max Schnurr danke ich für das Vertrauen, dass er in mich gesteckt hat, mich mit dem Thema meiner Doktorarbeit zu befassen. Ohne seine führende Hand und zahlreichen Ratschläge wäre diese niemals in der vorliegenden Fassung zustande gekommen.

Meinem Mitbetreuer und sozusagen Mentor während meiner gesamten experimentellen Laborzeit, sowohl vor Ort als auch via zahlreichen E-Mails danach, Dr. rer. biol. hum. Peter Düwell danke ich für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen, die mir den Weg zum fertigen Manuskript geebnet haben.

Allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, insbesondere Philipp Metzger und Laura Posselt, möchte ich für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit danken. Zahlreiche Tage und Nächte wurden gemeinsam verbracht und man konnte sich immer darauf verlassen, dass wissenschaftlicher Rat nie weit entfernt war. Rachel Mak' Ayengo und Christine Hörth gebührt ebenfalls speziell hervorgehobener Dank. Beide haben mir immer und wahrhaftig jederzeit, auch früh morgens, hilfsbereit zur Seite gestanden und mir darüber hinaus die beste Einarbeitung geboten, die man sich nur wünschen kann.

Der ideellen Förderung und materiellen Unterstützung im Rahmen des Promotionsstudienprogramms „Förderung für Forschung und Lehre“ (FöFoLe) bin ich zu großer Dankbarkeit verpflichtet.

## **10. Eidesstattliche Versicherung**

Ich, Cornelia Reichl, erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

### **Die Rolle des NLRP3-Inflammasoms in der T-Zell-Differenzierung in einem T-Zell-basierten Transferkolitismodell**

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 20.03.2023

Cornelia Reichl



---