

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

## **Die Rolle des NLRP3-Inflammasoms beim murinen SLE**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
**Georg Lorenz**

aus  
**Annaberg-Buchholz**

Jahr  
**2016**

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Jörg C. Prinz  
Prof. Dr. Stephan Ralf Thureau  
Prof. Dr. Anne Krug

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. hum. biol. Maciej Lech

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 18.02.2016

Diese Arbeit wurde von Anfang 2012 bis Anfang 2015 in der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV, Abteilung für klinische Biochemie in der Arbeitsgruppe Prof. Anders der LMU München angefertigt. Die Betreuung erfolgte durch Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders und PD. Dr. hum. biol. Maciej Lech.

**Förderung:** Die Arbeit wurde im Rahmen des FöFoLe (Förderprogramm für Forschung und Lehre) der LMU München unter Leitung von Prof. Dr. med. Jürgen Heesemann gefördert.

**Publikation der Ergebnisse:** Einige der hier dargestellten Ergebnisse wurden im Journal *Annals of the Rheumatic Diseases* unter dem Titel „NLRP3 and ASC suppress lupus-like autoimmunity by driving the immunosuppressive effects of TGF- $\beta$  receptor signalling“ publiziert:

Lech M\*, Lorenz G\*, Kulkarni OP, Grosser MO, Stigrot N, Darisipudi MN,  
Günthner R, Wintergerst MW, Anz D, Susanti HE, Anders HJ,  
*NLRP3 and ASC suppress lupus-like autoimmunity by driving the  
immunosuppressive effects of TGF-beta receptor signalling.*

Ann Rheum Dis, 2014

\*equal contribution



**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>9</b>
1.1	Der Systemische Lupus Erythematoses beim Menschen	9
1.2	Immunologie: Physiologie des angeborenen und adaptiven Immunsystems	20
1.2.1	Das angeborene Immunsystem	21
1.2.2	Physiologie des erworbenen Immunsystems	26
1.3	NLRs, das Konzept des Inflammasoms und der IL-1-, IL-18- und IL-33-Sekretion	27
1.3.1	Das NLRP3-Inflammasom	33
1.3.2	Aktivierungsprozess des NLRP3-Inflammasoms: Stimuli und Ablauf	33
1.3.3	Funktionen des NLRP3-Inflammasoms	37
1.3.4	Das NLRP3-Inflammasom im Kontext verschiedener Erkrankungen	37
1.4	Projekthypothese	38
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>39</b>
2.1	Materialien	39
2.1.1	Tabelle 7: Laborgerätschaften	39
2.1.2	Tabelle 8: Einwegmaterialien	40
2.1.3	Tabelle 9: Kits	40
2.1.4	Tabelle 10: Chemikalien, Reagenzien, Medien, Liganden	41
2.1.5	Tabelle 11: Pufferzusammensetzung	42
2.1.6	Tabelle 12: Mausstämme	42
2.1.7	Tabelle 13: Primer für RT-PCR	43
2.1.8	Tabelle 14: Antikörper für Immunhistologie, Durchflusszytometrie etc.	45
2.2	Zellkultur	45
2.2.1	Isolation primärer Zellen aus Milz, Knochenmark und Thymus	45
2.2.2	Verarbeitung primärer muriner Zellen	46
2.2.3	Positive Selektion von Milzzellen durch MACS Magnetic Cell Separation	48
2.2.4	Entfernung toter Zellen aus Zellisolaten	48
2.2.5	Stimulation der Splenozyten, BMDCs bzw. Thymozyten	49
2.2.6	In vitro Phagozytoseassay mit FITC-konjugierten Dextranpartikeln	49
2.2.7	In vitro MTS Proliferationsassay	50
2.2.8	In vitro LDH-Zelltodassay	51
2.3	Tierexperimente und Tierhaltung	52
2.3.1	Tierzucht, -haltung und Genotypisierung	52
2.3.2	Urinsammlung und Blutentnahme	53

2.3.3	Organentnahme und Konservierung	53
2.3.4	Färbung und Auswertung histologischer Schnitte	54
2.4	Expressionsanalyse – RT-PCR / Gene Array	55
2.4.1	Isolation von RNS aus Geweben	55
2.4.2	Herstellen von cDNA	55
2.4.3	RT-PCR	56
2.4.4	TGF- $\beta$ Gene Array	57
2.5	Immunologische Verfahren	57
2.5.1	ELISA	57
2.5.2	<i>Crithidia luciliae</i>	59
2.5.3	Western Blotting	59
2.5.4	Durchflusszytometrie	61
2.6	Statistische Analyse	62
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>63</b>
3.1	NLRP3- und ASC-Defizienz in C57BL/6 Mäusen führt per se nicht zu Zeichen spontaner Autoimmunität und vermehrter Entzündung	63
3.2	NLRP3 <sup>-/-</sup> und ASC <sup>-/-</sup> C57BL/6 <sup>lpr/lpr</sup> Mäuse zeigen verminderte Caspase-1-Aktivität sowie IL-1 $\beta$ - und IL-18-Sekretion in vitro bzw. in vivo	67
3.3	ASC- und NLRP3-Defizienz aggravieren das lymphoproliferative Syndrom in C57BL/6 <sup>lpr/lpr</sup> Mäusen im Alter von 6 Monaten	69
3.4	ASC- bzw. NLRP3-defiziente C57BL/6 <sup>lpr/lpr</sup> Mäuse zeigen aggravierte autoimmune Lungen- und Nierenschädigung	76
3.5	ASC und NLRP3 unterdrücken die Expansion und Aktivierung dendritischer Zellen und Makrophagen in C57BL/6 <sup>lpr/lpr</sup> Mäusen	80
3.6	NLRP3 und ASC unterdrücken die Expansion und Aktivierung von T-Zellen und autoreaktiven T-Zellen in C57BL/6 <sup>lpr/lpr</sup> Tieren	83
3.7	B-Zell Subpopulationen expandieren in ASC- und NLRP3-defizienten C57BL/6 <sup>lpr/lpr</sup> Mäusen	85
3.8	Systemische (Auto-)Antikörper- und Interleukinlevel sind in NLRP3 <sup>-/-</sup> und ASC <sup>-/-</sup> C57BL/6 <sup>lpr/lpr</sup> Mäusen kaum verändert	87
3.9	NLRP3 und ASC interferieren mit dem TGF- $\beta$ -Signaling in vitro und in vivo	89

---

<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>91</b>
4.1	Die Bedeutung von IL-1 $\beta$ und IL-18 bei Autoinflammation und Autoimmunität	92
4.2	Die Rolle der Proteine NLRP3 und ASC beim SLE	95
4.3	Mechanismus der durch NLRP3 bzw. ASC vermittelten Immunsuppression	97
4.4	Sind NLRP3 und ASC neue humane SLE-Risikogene? – Grenzen der Studie	103
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>106</b>
<b>6</b>	<b>Quellenverzeichnis</b>	<b>107</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>118</b>
<b>8</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung: Georg Lorenz</b>	<b>122</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b>	<b>123</b>
<b>10</b>	<b>Curriculum Vitae</b>	<b>124</b>





# 1 Einleitung

## 1.1 Der Systemische Lupus Erythematodes beim Menschen

**Definition:** Der Systemische Lupus Erythematodes (SLE) ist eine generalisierte chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung, die durch eine dysfunktionale Immunzellantwort mit Produktion von pathologischen Autoantikörpern und der Ablagerung von Immunkomplexen in Organen, Gefäßbindegewebe, Gelenken und Haut charakterisiert ist. In den daraus entstehenden Entzündungsprozess kann somit prinzipiell jedes Organ involviert sein [1, 2].

Der SLE zählt zur Gruppe der Kollagenosen. Diese manifestieren sich bevorzugt am Bindegewebe und an Gefäßen als Vaskulitis und weisen immunologische bzw. klinische Gemeinsamkeiten wie antinukleäre Antikörper (ANA) auf [1, 2].

**Epidemiologie:** Seine Häufigkeit wird variabel mit einer Prävalenz von 20-70/100.000 und einer Inzidenz von 1-10/100.000/a angegeben [3]. Laut medizinischen Standardwerken erkranken hauptsächlich Frauen im gebärfähigen Alter mit einem geschlechtsabhängigen Risiko von w:m = 10:1 [2]. Eine Aufarbeitung der epidemiologischen Daten zeigt die prädominante Rolle des Risikofaktors „weibliches Geschlecht“ und die zwei- bis dreifach erhöhte Inzidenz und Prävalenz unter schwarzen Amerikanern und Asiaten im Vergleich zur kaukasischen Bevölkerung. Dabei ist bisher unklar, ob die Diskrepanz zwischen niedrigen Inzidenzen unter schwarzen Afrikanern im Gegensatz zu hohen unter afrikanischstämmigen Migranten weltweit auf Untererfassung zurückzuführen ist [2]. Weiterhin finden sich erhöhte Häufigkeiten unter indigenen Völkern in Australien, Kanada und USA im Vergleich zu nicht-indigenen.

Interessanterweise ergaben Studien aus USA, UK und Schweden bei der differenzierten Analyse nach Hautfarbe einen klassischen altersbezogenen Krankheitsbeginn für schwarze Bevölkerungsgruppen zwischen 15 und 44 Jahren, wohingegen Kaukasierinnen den altersadaptierten Erkrankungsgipfel erst später im 37.-50. Lebensjahr zeigten [3]. SLE bei Kindern vor dem 16. Lebensjahr ist mit  $< 1/100.000/a$  sehr selten [3].

**Klinik:** Da im Zuge der autoimmunen Gewebeentzündung nahezu jedes Organ betroffen sein kann, präsentiert sich der systemische Lupus als klinisch sehr heterogene Erkrankung. Sehr oft finden sich Allgemeinsymptome (Fieber, schwere Fatiguesymptomatik, Schlafstörungen), muskuloskelettale Symptome wie Arthralgien, Hautbeteiligung und serologische Veränderungen. Aber auch schwere Organmanifestationen wie Glomerulonephritis, Lungenbeteiligung, meist in Form einer Pleuritis, oder eine ZNS Beteiligung kommen vor [4, 5]. Letztere stellt den Kliniker dabei vor eine besondere Herausforderung, da sich diese mit einem breiten Spektrum an neurologischen und psychiatrischen Symptomen – reichend von zerebralen Anfällen bis

Depressionen und Psychosen – manifestieren kann, ohne Krankheitsaktivität in anderen Organsystemen zeigen zu müssen [4, 5]. Tabelle 1 listet die wesentlichen Symptome nach betroffenem Organsystem in absteigender Häufigkeit auf.

Die Symptomvielfalt des SLE macht ihn bei verschiedenen klinischen Konstellationen zu einer möglichen Differentialdiagnose, an die stets gedacht werden sollte. So kann die definitive Abgrenzung gegen andere rheumatischen Erkrankungen ebenso wie gegen lymphatische Malignome oder bestimmte Infektionserkrankungen wie HIV, Tbc oder Endokarditis schwierig sein [4].

**Tabelle 1: Klinisch betroffene Organsysteme nach Häufigkeit;** nach [2, 4, 6]

Häufigkeit [%]	Betroffenes Organsystem	Klinische Präsentation
95	Allgemeinbeschwerden	Fieber; Gewichtsverlust; Fatigue; Schlafstörung; Lymphadenopathie (selten)
85	Kutane Beteiligung	Schmetterlingserythem; diskoide hyperkeratotische Läsionen; Photosensibilität
>80	Bewegungsapparat	Nicht-erosive Polyarthritits (80%); Myositis (40%); Rheuma-ähnliche Arthritis (selten)
30-70	Nierenbeteiligung	Lupusnephritis I-VI: Nephritisches-, Nephrotisches- Syndrom oder RPGN; CKD
60-70	Kardiovaskulär und pulmonale Beteiligung	Serositis: Pleuritis und Perikarditis; Myokarditis; Libman-Sacks-Endokarditis; Koronaritis; Lupuspneumonitis; Früharteriosklerose und 2-17x Infarkttrisiko; 2x Schlaganfallrisiko; Vaskuläre Beteiligung: Raynaud-Phänomen (16%), Vaskulitis, thrombotische Ereignisse
sehr variabel angegeben [6]: 1-50	Gastrointestinal	Ulzerationen der Mundhöhle; Übelkeit; Erbrechen; Anorexie; Abdominalschmerzen; abdominale Vaskulitis (selten); Hepatosplenomegalie
20-60	ZNS und PNS	ZNS (20%) [4]: Variables Bild: akute Psychosen, affektive Störungen, Vigilanzstörungen, fokale neurologische Defizite; PNS (15%): Neuropathie

**Befunde:** Neben dem klinischen Bild gibt es eine Reihe immunologischer, hämatologischer und serologischer Befunde, die beim systemischen Lupus in variabler Konstellation auftreten können und diagnostische sowie therapeutische Relevanz besitzen.

So finden sich als Zeichen der systemischen Entzündung regelmäßig eine erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), ein Abfall der Lymphozytenzahl, eine Erniedrigung von Komplementfaktoren (C3 und C4), interessanterweise aber i.d.R. keine erhöhten Werte des C-reaktiven Proteins. Letzteres ist vermutlich zurückzuführen auf erhöhtes IFN- $\alpha$  und die damit verbundenen Suppression der CRP-Produktion. Ein Anstieg der CRP-Werte bei einem SLE-Patienten spricht daher mehr für eine Infektion und weniger für einen Schub der Erkrankung [2, 4, 7].

Im Rahmen der Autoimmunpathogenese des systemischen Lupus kommt es durch die fehlgeleitete adaptive und konsekutiv humorale Immunität zur Produktion von Autoantikörpern gegen körpereigene Zielstrukturen (siehe: „Ätiologie und Pathogenese“). Klinisch bedeutet dies einige mehr oder weniger spezifische immunologische Befunde. Zum Teil werden diese zur Überwachung der Krankheitsaktivität herangezogen und können die Diagnosestellung erleichtern. 90% der SLE-Patienten zeigen demnach positive ( $> 1:80$ ) antinukleäre Antikörper (ANA), die aufgrund ihrer hohen Sensitivität regelhaft Bestandteil der Diagnostik sind. Dabei sind sie aber unspezifisch, da ANA auch im Rahmen anderer Kollagenosen oder chronischer Infektion vorkommen können. Eine genaue Differenzierung dieser gegen unterschiedliches nukleäres Material gerichteten Antikörper kann weiteren Aufschluss bieten, da sie mit verschiedenen Krankheitsmanifestationsformen assoziiert sind, oder Korrelation mit der Krankheitsaktivität zeigen. Antikörper gegen doppelsträngige DNA (dsDNA-Antikörper) sind nicht nur spezifischer (Spez.: 75-100%, Sens.: 66-95%) für den SLE, sie fluktuieren auch mit der Krankheitsaktivität und korrelieren mit renaler und zentralnervöser Beteiligung. Auch Anti-Sm-Antikörper, gerichtet gegen small nuclear Ribonucleoprotein (snRNP), sind mit einer Nierenbeteiligung und deren Schwere assoziiert. Sie finden sich mit 20% aber deutlich seltener als dsDNA-Antikörper. Anti-Ro (=SSA) ist zwar wie Anti-La (=SSB) nicht lupusspezifisch, deutet aber auf das Vorliegen eines sekundären Sjögren Syndroms hin. Beide Antikörper finden sich zudem beim neonatalen Lupus-Syndrom mit ggf. irreversiblen Herzblock beim Neugeborenen durch diaplazentar übertragene Antikörper [2, 4, 8-10].

Darüber hinaus kann beim SLE Antikörperproduktion gegen extranukleäre Antigene wie Komplement (z.B.: AntiC1q) auftreten, die mit der Krankheitsaktivität korreliert, aber aufgrund widersprüchlicher Studienlage einen unklaren Wert bei der Erfassung renaler Entzündung hat [11, 12]. Manche Patienten bilden Antiphospholipid-Antikörper (APA) gegen Cardiolipin,  $\beta$ 2-

Glycoprotein 1AK oder Phosphatidylserin, welche mit thrombotischen und thromboembolischen Ereignissen und habituellen Aborten assoziiert sind. Auch Gerinnungsfaktoren können als Epitope dienen und z.B. als Anti-FVIII-Antikörper zur Hemmkörperhämophilie führen. In manchen Fällen zeigen sich Blutbildveränderungen infolge autoantikörperinduzierter Zytopenien oder chronischer Entzündungsaktivität im Sinne einer Coombs-positiven hämolytischen Anämie, einer Leuko-, Lympho- und Thrombozytopenie [2]. Siehe hierzu auch Tabelle 2.

**Tabelle 2: Serologische, immunologische und hämatologische Befunde; nach [2, 4, 9, 13]**

Befund		Bedeutung / Korrelation
<b>Serologisch</b>	BSG ↑	Unspezifisch; SLE Aktivität „flare“
	Ferritin ↑ [14]	Unspezifisch; SLE Aktivität „flare“
	Komplement C3 / C4 Verbrauch	Unspezifisch; SLE Aktivität; eingeschränkter Wert in der Prädiktion von renalen „flares“
<b>Immunologisch</b>	ANA	95 % Unspezifisch
	Anti-dsDNA	60-90 % Spezifisch; Nieren- und ZNS-Beteiligung; Hautbeteiligung; Krankheitsaktivität
	Anti-Nukleosom	60-90 % Nierenbeteiligung; Hautbeteiligung
	Anti-Sm	10-20 % Spezifisch; Nierenbeteiligung; Schwere Nierenläsion
	Anti-Ro (SSA)	60 % Unspezifisch; neonatales Lupus-Syndrom; sek. Sjögren Syndrom; Hautbeteiligung
	Anti-La (SSB)	20 % Unspezifisch; neonatales Lupus-Syndrom
	Anti-NMDAR	33-50 % Neuropsychiatrische Symptome
	Anti-C1q	40-50 % Nicht vollständig spezifisch; Lupus-Aktivität; Nephritis-„Flares“?
	Antiphospholipid	35 % Thrombophilie; habituelle Aborte
	Alpha Aktinin	20 % Nicht spezifisch; Nierenbeteiligung
	Anti-Faktor VIII	Hemmkörperhämophilie
	Anti-Histon	Medikamenteninduzierter SLE
	<b>Hämatologisch</b>	Anämie
Thrombopenie		
Lymphopenie		
Leukopenie		

**Diagnosekriterien:** Unter Berücksichtigung der bereits besprochenen klinischen Symptome (Tabelle 1) und der labordiagnostischen Befunde (Tabelle 2) hat das ACR (American College of Rheumatology) Klassifikationskriterien für den SLE herausgegeben. Nach ihnen darf ein SLE diagnostiziert werden, wenn 4 der 11 in Tabelle 3 abgebildeten Kriterien bei einem Patienten positiv bewertet werden [2].

**Tabelle 3: Revidierte Kriterien des ACR 1997; modifiziert nach [9]**

1. Schmetterlingserythem	Flaches oder erhabenes Erythem über Wangenknochen; typischerweise Aussparung der Nasolabialfalten
2. Diskoider Lupus Erythematoses	Erythematös erhabene Flecken mit Schuppung und atrophischen Narben
3. Fotosensibilität	Hautausschlag nach Sonnenlichtexposition; durch Patient oder Arzt erfasst
4. Orale Ulzera	Orale oder nasopharyngeale Ulzerationen, i.d.R schmerzlos; Erfassung durch Arzt
5. Nicht-erosive Arthritis	2 oder mehr beteiligte periphere Gelenke
6. Serositis	1. Pleuritis: überzeugende Anamnese oder auskultiert 2. Perikarditis: durch EKG oder auskultiert
7. Nierenbeteiligung	1. andauernde Proteinurie >0,5g/d oder +++ im Urinstix 2. Zylinder (Hb, erythrozytär, granulär, tubulär oder gemischt)
8. ZNS-Beteiligung	1. Anfälle ohne andere Auslöser 2. Psychose ohne andere Auslöser
9. Hämatologische Befunde	1. Hämolytische Anämie mit Retikulozytose 2. Leukopenie <4000/mm <sup>3</sup> bei 2 oder mehr Untersuchungen 3. Lymphopenie <1500/mm <sup>3</sup> bei 2 oder mehr Untersuchungen 4. Thrombopenie <100.000/mm <sup>3</sup> bei Abwesenheit auslösender Medikamente
10. Immunologische Befunde	1. Anti-dsDNA-Antikörper in abnormen Titern 2. Anti-Sm 3. Antiphospholipid-Antikörper
11. Antinukleäre Antikörper (ANA)	Abnormaler Titer in der Immunfluoreszenz oder einer äquivalenten Methode ohne Einnahme von Medikamenten

**Aktivitäts-, Schadensindex und Lebensqualität:** Des Weiteren empfiehlt die European League Against Rheumatism (EULAR) für die Evaluation klinischer Studien und für Therapieentscheidungen die Krankheitsaktivität zu erfassen [15]. Aufgrund des mannigfaltigen Präsentationsmusters des SLE gibt es dazu verschiedene bereits validierte Tools – jeweils mit unterschiedlichen Stärken und Schwächen. So quantifiziert der Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) klinisch praktikabel die globale Aktivität der Erkrankung in 0 (Remission) -105 (maximaler Befall) Punkte [16, 17].

Neben der akut entzündlichen Krankheitsaktivität sollte weiterhin das Ausmaß chronischer Organschäden über den Systemic Lupus International Collaboratory Clinics / American College of Rheumatology (SLICC / ACR) -Schadenindex erfasst werden. Bereits früh im Krankheitsverlauf auftretende, chronische Organschäden sind dabei mit einer schlechten Prognose für den Patienten verbunden [17, 18]. Als dritte Dimension in der Betreuung von SLE-Patienten sollte darüber hinaus die Lebensqualität erfasst werden [19].

**Therapie:** Neben der immunsuppressiven Therapie (Tabelle 4), die abhängig von der jeweiligen Krankheitsaktivität erfolgt, gilt es, etwaige Komorbiditäten adäquat zu therapieren, die als Diabetes mellitus, Hypertonus, Hyperlipidämie oder Osteopenie regelmäßig bei Lupus-Patienten auftreten. Weiterhin sollten Patienten über die Notwendigkeit des Rauchverzichts und adäquaten Lichtschutzes aufgeklärt werden. Bei leichten Manifestationsformen, wie Gelenkbefall, kommen NSAIDs und Dauermedikation mit Antimalarika (z.B.: Hydroxychloroquin) zum Einsatz. Für letztere ist auch eine Risikoreduktion in Bezug auf schwere Krankheitsschübe, Nieren- und ZNS-Beteiligung nachgewiesen. Bei schwerem Organbefall, wie Nieren- oder ZNS-Beteiligung, helfen Glukokortikoide gemeinsam mit Azathioprin, Mycophenolat-Mofetil (MMF) und Methotrexat in der Erhaltungstherapie. Bei besonders schweren Verläufen, insbesondere ausgeprägter Glomerulonephritis, stellen eine Cyclophosphamid-Stoßtherapie oder MMF gemeinsam mit Steroiden die Therapie der ersten Wahl dar [20-22].

Für Belimumab, einen Antikörper gegen BLyS (BAFF), der die Anzahl an B-Zellen, Plasmazellen und Autoantikörpern reduziert, wurde in 2 randomisierten, placebokontrollierten, klinischen Studien BLISS-52 und -76, Efficacy und Sicherheit bei Patienten mit aktiver Erkrankung demonstriert [23-26]. Rituximab, ein monoklonaler Antikörper gegen CD20 zur B-Zell Depletion, brachte in 2 großen Studien, EXPLORER und LUNAR, bei Patienten ohne bzw. mit Lupusnephritis in Kombination mit Glukokortikoiden kein besseres Outcome im Vergleich zur Placebogruppe. Bei therapieresistentem SLE hingegen erwies sich Rituximab als nützlich. Diese Daten, in Hinsicht auf die Tatsache, dass von möglichen PML-Fällen durch JC-slow-Virus

unter Rituximab und Chemotherapie berichtet wurde, beschränken seinen Einsatz derzeit auf schwere, alternativ nicht beherrschbare Situationen in der Kombinationstherapie [22, 27-30].

Eine autologe hämatopoetische Stammzelltransplantation als Ultima Ratio im Sinne eines „Reboots“ des Immunsystems ergab in einer präliminären, nicht randomisierten Studie an 50 Patienten einerseits längerfristig krankheitsfreie Intervalle aber auch erhebliche Risiken. Sie hat lediglich eine Indikation bei ausgeschöpften Optionen und lebensbedrohlicher Krankheitsaktivität [22, 31].

Trotz aller Bemühungen stellt der SLE immer noch eine chronische, nicht heilbare Erkrankung mit verkürzter Lebenserwartung dar [32].

**Tabelle 4: Therapeutische Ansätze beim SLE im Überblick; modifiziert nach [22]**

<b>Indikation:</b> <b>Therapie:</b>	Keine Organbe- teiligung (z.B.: nur Haut)	Organ- Beteiligung (z.B.: Niere)	Nephritis: Induktion	Nephritis: Erhaltung	Therapie- resistenz
Antimalarika	+	+	+	+	+
Glukokortikoide	+	+	+	+	+
Mycophenolat-Mofetil		+	+	+	+
Azathioprin		+		+	+
Methotrexat		+			+
Cyclophosphamid			+		+
Cyclosporin					+
Belimumab					+
Rituximab					+
Stammzelltransplantation					+
Andere (z.B.: Plasmapherese)					+

**Prognose und Verlauf:** Die Prognose des SLE ist sowohl inter- als auch intra-individuell uneinheitlich. Sie variiert von milden bis fulminanten, therapieresistenten Verläufen mit Organversagen und Tod durch einen Krankheitsschub. Hauptsächlich jedoch wird sie beeinflusst durch im Rahmen der Erkrankung oder unter Immunsuppression auftretende Begleit- bzw. Folgeerkrankungen, beispielsweise Infektionen, Herzkreislauferkrankungen, Niereninsuffizienz oder Malignome [32-36]. Es lassen sich drei Verlaufsformen des Systemischen Lupus unterscheiden, nämlich „chronisch-aktiv“, „schubhaft“ und „lange ruhig“, die sich beim selben Patienten abwechseln können. Davon machen die ersten beiden die häufigeren Formen der Erkrankung aus [33]. Im Vergleich zu 1955, als die 5-Jahresüberlebensrate 50% betrug, hat sich diese wie auch die 10-Jahresüberlebensrate, möglicherweise durch den Einsatz immunsuppressiver Therapieregime, bis Anfang des 21. Jahrhunderts auf über 90% verbessert [34-36]. Eine große Studie mit über 9500 Patienten zeigte jedoch im Jahre 2006, dass Lupus-Patienten immer noch ein 2,4-fach höheres Mortalitätsrisiko aufweisen als die Normalbevölkerung [34]. Dabei ist ein Rückgang der Mortalität in frühen Erkrankungsphasen zugunsten von Infektionen (9-faches Risiko), Herzkreislauferkrankungen (1,7-faches Risiko) und Niereninsuffizienz (4,3-faches Risiko) in späteren Krankheitsstrecken zu beobachten [32-36]. Negativ prädiktive Faktoren bezüglich des Überlebens sind beispielsweise fortgeschrittenes Alter (>50 Jahre) zum Zeitpunkt der Diagnose, männliches Geschlecht, niedriges C3 Level oder hämolytische Anämie innerhalb des ersten Jahres nach Diagnose [37].

Laut zweier Studien an insgesamt 1370 Patienten gelingt es lediglich in 6,5%-25 % der Fälle eine komplette Remission (SLEDAI=0) ohne Bedarf an Immunsuppressiva zu erzielen, die in 1,5% – 12 % der Patienten über 5 Jahre anhält [38, 39]. Der SLE und seine immer noch unerfreuliche Prognose bedürfen somit weiterer Forschung zum besseren Verständnis und zur Entwicklung zielgerichteter Therapien.

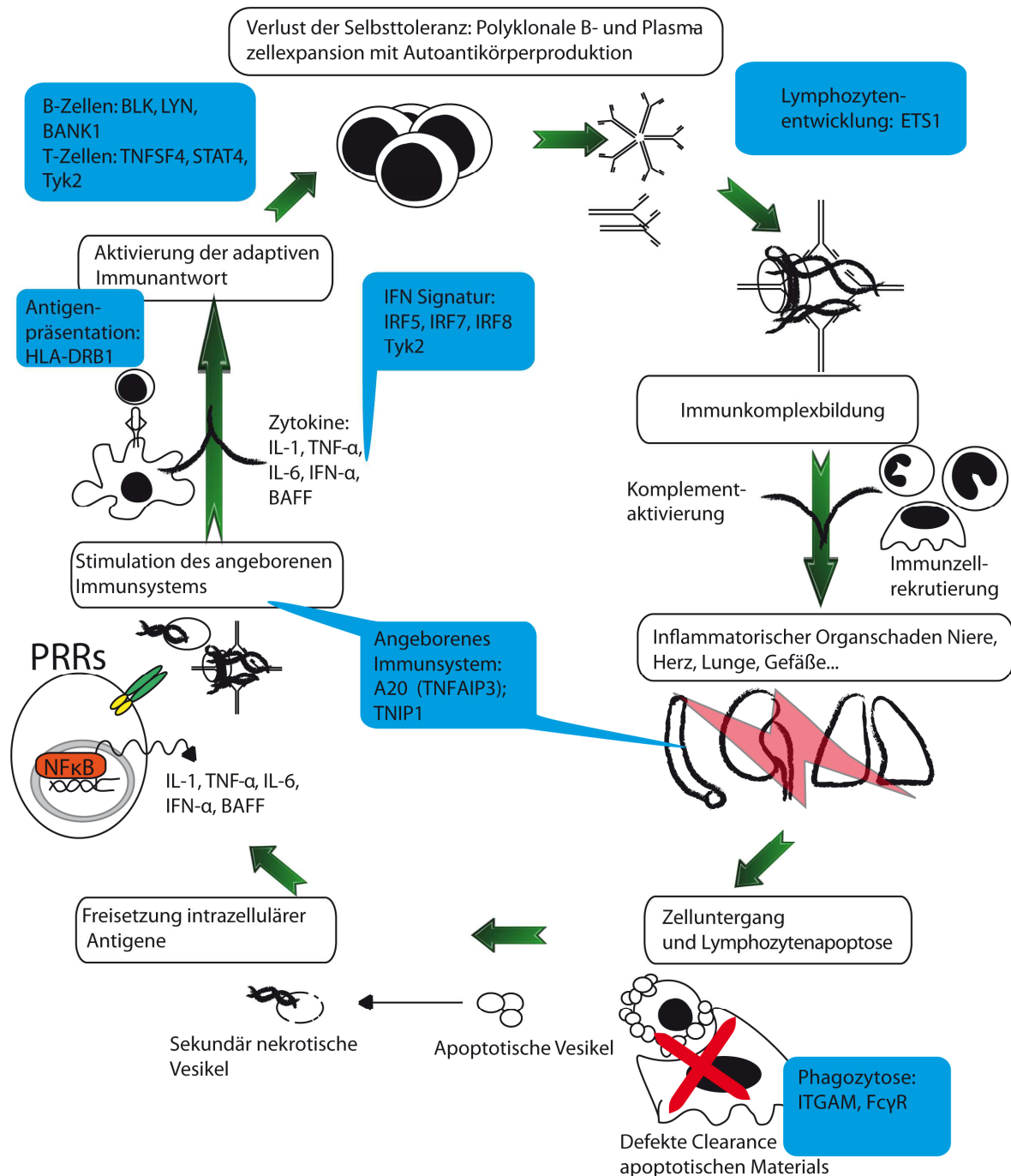
**Ätiologie und Pathogenese:** Die Ätiologie und Pathogenese des SLE sind bisher nicht zufriedenstellend geklärt. Beidem liegt ein multifaktorielles Geschehen zugrunde. Dabei spielen eine genetische Prädisposition zur unkontrollierten Immunantwort, hormonelle Einflüsse auf selbige, ebenso wie Umweltfaktoren eine Rolle bei der Entstehung von Autoantikörperproduktion, Immunkomplexdeposition und chronischer Gewebeentzündung [40, 41].

Beim Gesunden wird einer derart pathologischen Reaktion i.d.R durch zentrale und periphere Toleranzmechanismen, wie Rezeptor-editing, Deletion autoreaktiver Thymozyten und B-Zellen, Anergie-Induktion oder regulatorische T-Zellen an verschiedenen Kontrollpunkten Einhalt geboten [42].



Vereinfacht stelle man sich für den Lupus-Patienten vor, dass zu Beginn der Erkrankung ein Verlust der Immuntoleranz des adaptiven Immunsystems gegenüber körpereigenen Bestandteilen mit polyklonaler Expansion autoreaktiver B-Zellen und letztendlich Plasmazellen steht, was zur Bildung von Autoantikörpern führt, die bei Lupus-Patienten im Mittel 3,3 Jahre vor Krankheitsausbruch nachweisbar sein können [43, 44]. Die dafür nötigen Antigene aus dem Zellinneren werden insbesondere von apoptotischen Zellen in kleinen Membranbläschen an der Oberfläche exponiert, wo sie einer Immunantwort zugänglich sind [45-47]. Apoptose als programmierte Form des Zelltods verfolgt jedoch biologisch gerade den Nutzen intrazellulären Inhalt für das Immunsystem inert, d.h. ohne entzündliche Reaktion, zu klären, indem die apoptotischen Körperchen schnell von Phagozyten eliminiert werden [45]. Bei einigen Lupus-Patienten liegt allerdings eine defekte Clearance dieser Partikelchen vor, die in der Folge extrazellulär akkumulieren und als sekundär nekrotische Partikel ihren Inhalt freigeben. Dieser besteht aus nukleärem (DNS/Histone/RNS) und zytosolischem Materialien und formt mit entsprechenden Autoantikörpern Immunkomplexe. Durch ihren Gehalt an Ribo- bzw. Desoxyribonukleinsäuren können Immunkomplexe, neben der lokalen Komplementaktivierung, auch Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems über TLR-9 und -7 stimulieren [47-51].

Die Aktivierung der Zellen der angeborenen Immunität schließt nun den „Circulus Vitiosus der Autoimmunität des SLE“ (Abbildung 1), indem aktivierte dendritische Zellen und Makrophagen ein pro-entzündliches Mediator-Set freisetzen. Beispiele hierfür sind IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , Baff (B-Zell aktivierender Faktor) und, wie für murine Modelle gezeigt, IL-1 $\beta$  und IL-18. Diese Interleukine befeuern einerseits lokal die entzündliche Antwort, andererseits stimulieren sie auch das adaptive Immunsystem zur weiteren Dysregulation und Produktion von Autoantikörpern. So trägt beispielsweise Baff zu verlängertem B-Zell-Überleben und vermehrter Maturation zu Plasmazellen bei [52-55].



**Abbildung 1: „Circulus Vitiosus der Autoimmunität beim SLE“**

Mögliches pathogenetisches Modell des SLE; Erläuterung siehe Text; blaue Kästen zeigen eine Auswahl bereits über GWAS identifizierter Risiko-Loci beim SLE ( $p < 10^{-8}$  gemäß [56]); **Abkürzungen:** **PRRs:** Pattern-Recognition Receptors, Gennamen siehe Abkürzungsverzeichnis gemäß [www.genecards.org](http://www.genecards.org).

Anhand dieses vereinfacht pathogenetischen Modells (Abbildung 1: “Circulus Vitiosus der Autoimmunität beim SLE“) lässt sich die Bedeutung genetischer Polymorphismen verstehen. Immerhin besteht ein erhöhtes Erkrankungsrisikos für Geschwister Betroffener und eine Konkordanzrate für monozygote Zwillinge von 24-56% im Vergleich zu 2-4% für dizygote Zwillinge [57-61]. Über die GWAS (Genome-Wide Association Studies) konnten in den letzten Jahren einige Polymorphismen in immunologisch relevanten Genen identifiziert werden, die

zum Auftreten des SLE prädisponieren. Mit wenigen Ausnahmen ist hierbei davon auszugehen, dass es ein Zusammentreffen von schätzungsweise mindestens 4 solcher Risikoallele in einem Individuum benötigt, da die einzelnen Odds Ratios mit  $< 2$  jeweils recht gering sind [40, 62-64]. Es finden sich Varianten der Gene ETS1 und IKZF1, die für die Entwicklung und Reifung von B-Zellen und Plasmazellen und Th-Zellsubgruppen relevant sind. Ebenso treten Polymorphismen innerhalb von Genen auf, die am IFN-TypI-Signaling beteiligt sind (IRF5, -7, -8, TYK2), welches bei vielen Lupus-Patienten vermehrt stattfindet [56]. Defekte in Genen für die Clearance apoptotischer Materialien oder die Beseitigung von Immunkomplexen, wie die Komplementproteine C1q, C1r, C1s, C4, C2 oder Fc $\gamma$  Rezeptoren auf Zellen, prädisponieren ebenso zum SLE wie bestimmte Varianten innerhalb der HLA kodierenden Regionen (HLA-DRB1). Schließlich sei auf weitere Gene mit Bedeutung vorwiegend im Signaling der angeborenen Immunität (A20, NLRP1) hingewiesen (siehe hierzu auch Abbildung 1) [56, 64, 65].

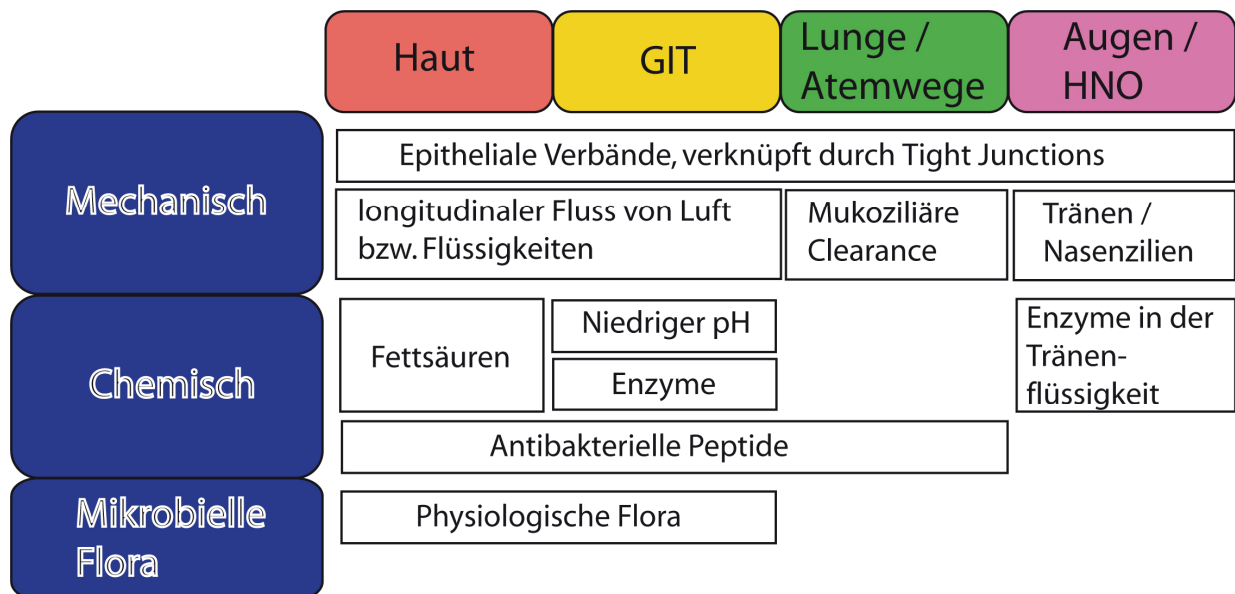
Wie bereits erwähnt, stellt darüber hinaus das weibliche Geschlecht einen weiteren beachtlichen Risikofaktor dar. Diskutiert werden hierzu drei Mechanismen. Zum einen die differenzielle X-Inaktivierung mit verminderter Depletion autoreaktiver Zellen bei der thymischen Selektion [66]. Zweitens ein Gendosiseffekt mit einem Mehr an immunologisch relevanten Genen (TLR-7 u.a.) auf dem X-Chromosom, was durch eine 14-fache Inzidenz des Klinefelter-Syndroms (47, XXY) unter männlichen SLE-Patienten gestützt wird [67-69]. Drittens scheinen aber auch hormonelle Einflüsse, z.B. Östrogene, eine Rolle zu spielen, da zum einen beim juvenilen SLE das w:m Verhältnis mit 3:1 niedriger ist als im Erwachsenenalter, zum anderen frühe Menarche und Hormonersatztherapie laut der Nurses' Health Study das Risiko für einen SLE erhöhen [70, 71].

Neben genetischer Prädisposition und hormonellem Status beeinflussen auch exogene Faktoren die Krankheitsentstehung und deren Verlauf. So können Viren das angeborene Immunsystem via Pattern-Recognition Rezeptoren wie TLRs / RIG-like helicase aktivieren und dysregulieren. EBV wird beispielsweise als ein möglicher Auslöser des SLE in der Kindheit vermutet. UV-Licht kann durch eine lokale Entzündungsreaktion und vermehrte Apoptose den Circulus Vitiosus der Autoimmunität in Gang bringen oder verstärken [40, 72].

Beim Gesunden ohne entsprechende genetische Prädisposition werden derartige Prozesse durch Selektion von B- und T- Zellen, Anergie-Induktion bei Überstimulation durch Autoantigene und die Depletion „selbsterkennender T-Zellen“ verhindert [42, 73].

## 1.2 Immunologie: Physiologie des angeborenen und adaptiven Immunsystems

Seit der Beobachtung durch Edward Jenner im späten 18. Jahrhundert, dass die durchgemachte Infektion mit Kuhpocken einen Schutz gegen die wesentlich schwerwiegendere Pockenerkrankung vermittelt, setzt sich die Immunologie mit den Mechanismen der Abwehr von Krankheitserregern in mehrzelligen Organismen auseinander. In Anbetracht der unzähligen potentiell pathogenen Mikroorganismen, die uns alltäglich umgeben, nämlich Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten, sind wir doch erstaunlich selten krank. Grund hierfür sind neben schützenden physikalischen wie chemischen Barrieren und unserer kommensalen Flora (Abbildung 2), die Pathogene am Eindringen in unsere Körper hindern, eine Vielzahl von Effektorzellen (Granulozyten, Monozyten bzw. Makrophagen, dendritische Zellen, natürliche Killerzellen, B- bzw. Plasma- und T-Zellen) und lösliche Moleküle (z.B.: Komplement und Antikörper), die jene bekämpfen und zusammen als Immunsystem bezeichnet werden. Akademisch lässt sich dieses in zwei Schenkel, die sofort reagible angeborene Immunität (innate immunity) und die zeitversetzt pathogenspezifische erworbene (adaptive) Immunität, teilen. In vivo funktionieren beide Systeme aber in enger Zusammenarbeit [73].

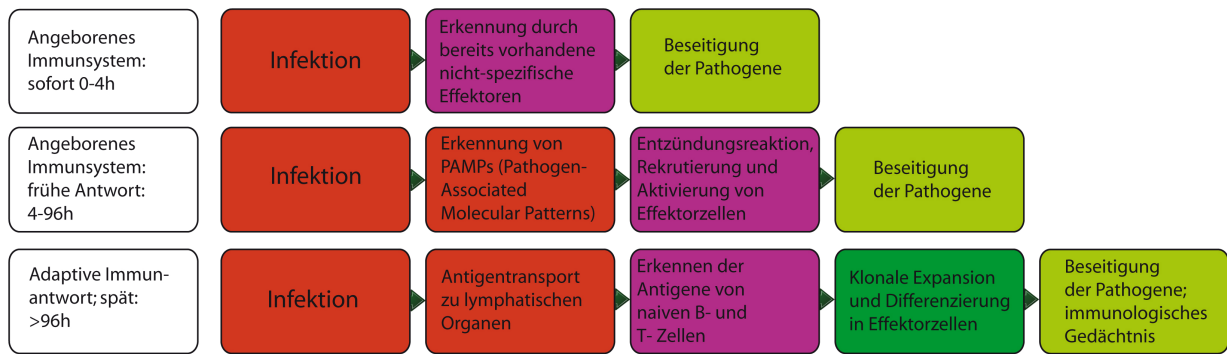


**Abbildung 2: Physiologische Barrieren zum Schutz vor Pathogenen;** nach [73]; Mechanische Barrieren, chemische Abwehrmechanismen und Besiedlung mit apathogener mikrobieller Flora verhindern das Eindringen von Pathogenen in den Organismus. **GIT:** Gastrointestinaltrakt, **HNO:** Hals-Nase-Ohren

Das Immunsystem hat 4 wesentliche Aufgaben zu erfüllen. Zuerst muss das Eindringen von Mikroorganismen erkannt werden. Daraufhin sollen diese durch eine adäquate Effektorfunktion beseitigt werden. Dabei ist weiterhin wesentlich, dass falsche oder überschießende Reaktionen des Immunsystems verhindert werden, um Gewebeschäden zu minimieren. Versagen in diesem Punkt führt zu Autoimmunerkrankungen oder Allergien. Viertens gilt es ein immunologisches Gedächtnis aufzubauen, welches bei erneuter Exposition gegenüber demselben Pathogen Immunität verleiht. Dies ist Aufgabe des adaptiven Immunsystems [73].

### 1.2.1 Das angeborene Immunsystem

Haben Pathogene die epithelialen Körperbarrieren überwunden (Abbildung 2), stellt das angeborene Immunsystem die erste Verteidigungslinie dar. Dabei erlaubt ihm eine im Vergleich zum adaptiven Immunsystem relativ geringe Zahl an genetisch rigide kodierten Rezeptoren – sog. Pattern-Recognition Receptors (PRRs) – auf Gewebemakrophagen das Erkennen von konservierten Motiven pathogener Organismen, sog. Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs). Diese finden sich nicht auf körpereigenen Zellen. Diese Mustererkennung erlaubt somit die sofortige Reaktion auf Bedrohung und gleichzeitig die Diskriminierung von „Selbst“ und „Fremd“. Im Falle wenig virulenter Pathogene kann bereits deren Erkennung und anschließende Beseitigung durch Phagozytose eine Infektion abwenden. Nicht selten gelingt es Pathogenen allerdings, das angeborene Immunsystem zu überfordern, was einen Infektionsherd mit verstärkter Rekrutierung und Aktivierung von Effektorzellen des angeborenen Immunsystems (Neutrophile und Monozyten) zur Folge hat. Diese halten die Infektion in Schach, bis das adaptive Immunsystem zur Bekämpfung der Erkrankung wirksam werden kann. Zu diesem Zeitpunkt hat mit der Zellrekrutierung begonnen, was wir Entzündung nennen und was uns als *rubor, calor, dolor, tumor* und *functio laesa* bei Erkrankung zu schaffen macht. Besonders die dendritischen Zellen der angeborenen Immunität spielen bei diesem Prozess als Antigen-präsentierende Zellen (APCs) eine wesentliche Rolle bei der Initiierung der adaptiven Immunantwort [73, 74]. Abbildung 3 gibt einen schematischen Überblick über die zeitlichen Abläufe und Phasen der Immunantwort.



**Abbildung 3: Phasen der Immunantwort bei Infektion;** modifiziert nach [73]; **Von oben nach unten:** Zeitlicher Ablauf der angeborenen und adaptiven Immunantwort auf Pathogene / Infektionen; **links nach rechts:** Beseitigung der Infektion abhängig von der Leistungsfähigkeit des Immunsystems und der Beschaffenheit der jeweiligen Pathogene

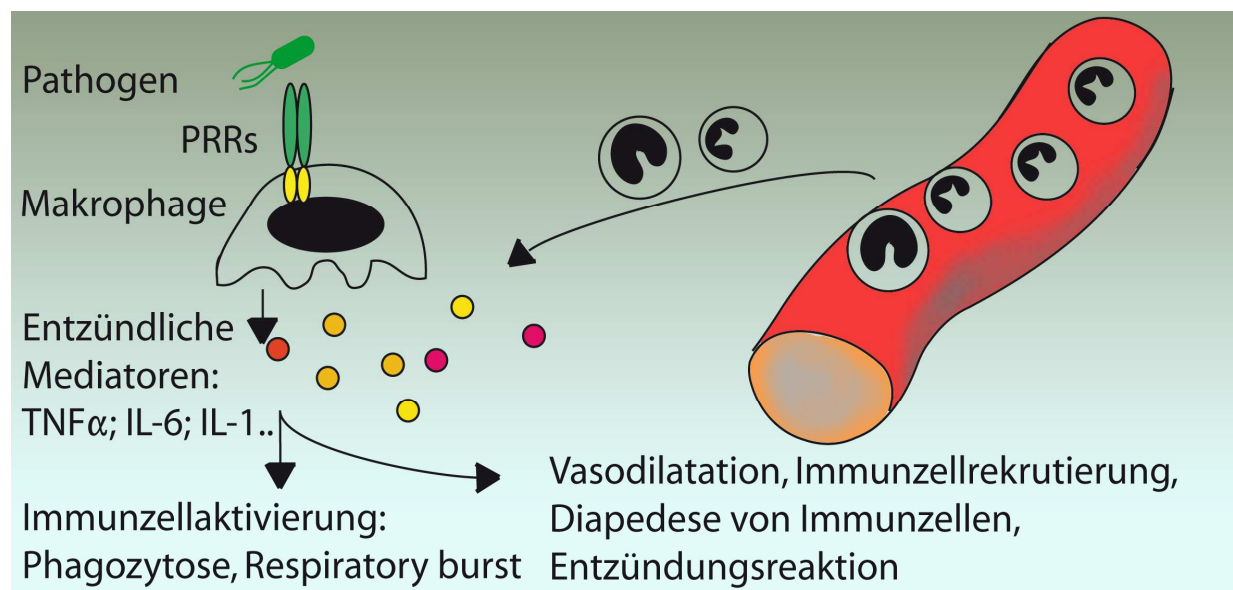
Je nach Beschaffenheit, Virulenz oder bevorzugt intra- oder extrazellulärer Vermehrung des Erregers bedarf das angeborene Immunsystem zum einen verschiedener PRRs zu deren Erkennung und zum anderen verschiedener Effektormechanismen zu deren Beseitigung. Extrazelluläre Erreger sind meist der Phagozytose durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten zugänglich. Dagegen erschweren bekapselte Erreger durch eine Polysaccharidkapsel ihre Aufnahme in Phagozyten [73]. Diesem Umstand kann jedoch wiederum durch die Opsonierung durch das Komplementsystem entgegengewirkt werden. Viren und einige obligat intrazelluläre Bakterien stellen das angeborene Immunsystem weiterhin vor die Aufgabe, diese entweder vor Eintritt in die Zellen abzufangen oder befallene Zellen zu erkennen und diese mitsamt Erreger zu eliminieren. Dies leisten natürliche Killerzellen [73].

Doch wie genau erkennen nun Makrophagen, neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen und humorale Moleküle ihre Opponenten?

Wie einleitend erwähnt, eignen sich PAMPs, wie z.B. bakterielles LPS, CpG Motive auf DNA, Strukturproteine wie Flagellen, spezifisch angeordnete Mannose-Motive auf der Oberfläche von Bakterien und dsRNA als Signale für diese Erkennung. Dabei dienen bestimmte Rezeptoren, wie Scavenger-Rezeptoren oder der Makrophagen-Mannose-Rezeptor, der Phagozytose von erkannten Fremdorganismen. Frei im Plasma zirkulierende Moleküle, wie Mannose-bindendes Lektin (MBL), ermöglichen die Erkennung charakteristisch angeordneter Mannose- und Fucose-Residuen auf Bakterien und erleichtern deren Phagozytose (Opsonierung). Auch das Komplementsystem ist unter anderem zu dieser Funktion fähig. Im klassischen Aktivierungsweg bewirkt dieses nach Bindung von C1q und Bildung der C3-Konvertase an der Bakterienoberfläche durch seine Spaltprodukte (C3a, C5a, C3b, C5b) die weitere Zellrekrutierung (C3a, C5a), Opsonierung (C3b) oder die direkte Lyse der Pathogene (Membrane Attack Complex: C5b, C6, C7, C8, C9). Diese Prozesse laufen auf durch C-reaktives Protein (CRP)

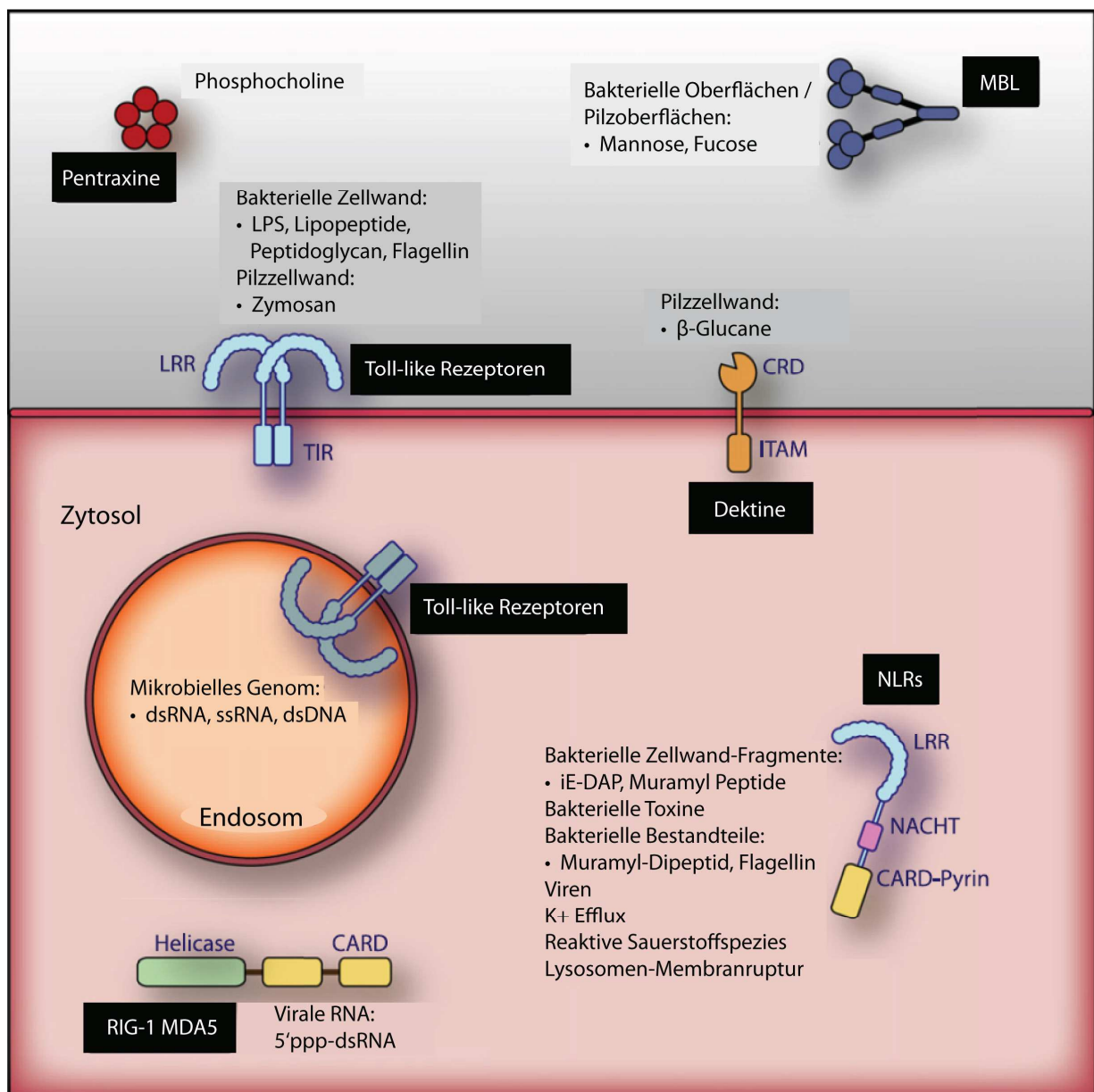
oder durch Antikörperbindung vormarkierten Erregeroberflächen ab. Der Lektinpathway führt zur Assemblierung der C3-Konvertase an durch Lektin vormarkierten pathogenen Oberflächen. Im alternativen Weg formt sich die Konvertase durch Ablagerung von spontan im Plasma aktiviertem C3 auf Oberflächen ohne Komplement-inhibitorische Funktion was die „Selbst“-versus-„Fremd“-Diskrimination ausmacht [73].

Neben den oben beschriebenen Phagozytoserezeptoren und dem Komplementsystem verfügt das angeborene Immunsystem weiterhin über Signaling-Rezeptoren, die verschiedene Klassen von Pathogenen differenzieren können und an der Entwicklung der Entzündung und einer differenzierten Immunantwort beteiligt sind [73, 74]. Hierzu zählen die lange bekannten Toll-like Rezeptoren (TLRs), C-Typ-Lektin Rezeptoren, NOD-Like Rezeptoren (NLRs) und RIG-I-Like Rezeptoren (RLRs). Die Aktivierung dieser Rezeptoren setzt intrazelluläre Signalkaskaden in Gang, die zur Expression und Freisetzung pro-entzündlicher Mediatoren wie TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 und so zur Entzündung führen. Siehe hierzu Abbildung 4 [75].



**Abbildung 4: Modell der initialen Entzündungsantwort – Entwicklung einer Entzündungsreaktion über Mustererkennungsrezeptoren;** Pathogenmotive werden über PRRs erkannt. Intrazelluläre Signalkaskaden führen zur Freisetzung entzündlicher Mediatoren, wie TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 u.a. Diese Mediatoren stimulieren Entzündungszellen zur Phagozytose oder zum Respiratory burst. Weiterhin wirken sie vasodilatierend und rekrutieren weitere Immunzellen an den Ort der Entzündung.

Dabei befinden sich die ersten beiden Rezeptor-Klassen (TLRs und C-Typ-Lektin Rezeptoren) membrangebunden auf der Zelloberfläche bzw. in Endosomen, wohingegen NLRs, RLRs im Zytosol lokalisiert sind, um dort intrazelluläre Erreger wie Viren wahrnehmen zu können [73, 76]. Zwischen dem Signaling beider Klassen – membrangebundener bzw. zytosolischer – Rezeptoren bestehen dabei Wechselwirkungen, wie die Regulation der Expression des jeweils anderen Systems, was eine differenzierte Immunantwort erlaubt [77]. Abbildung 5 zeigt die eben besprochenen Mustererkennungsmechanismen der angeborenen Immunität nochmals im Überblick.



**Abbildung 5: Angeborene Immunität und Mustererkennungsmechanismen;** aus [78]; dargestellt sind im Plasma zirkulierende Moleküle (Pentraxine, MBL), membrangebundene Rezeptoren (TLRs, Dektine) auf der Zellmembran bzw. Endosomenmembran und zytosolische Rezeptoren (NLRs, RIG-1 und MDA5) sowie deren Liganden / Aktivatoren



Über die Detektion von Eindringlingen hinaus sind einige dieser Rezeptoren an der Registrierung von körpereigenen Gefahrensignalen, sog. Danger- / Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs), beteiligt, die beispielsweise aus sterbenden Zellen bei Gewebeschaden freigesetzt werden und ebenso eine Entzündungskaskade auslösen [75]. So kann sterile Entzündung entstehen, was eine Aktivierung von Immunzellen auch ohne die Anwesenheit von pathogenen oder fremden Agenzien bedeutet. Dies hat weitreichende Folgen. Im Falle einer dysregulierten Immunantwort und überschießender Entzündung kann das angeborene Immunsystem über diese Mechanismen zur entzündlichen Gewebeschädigung und systemischen Autoimmunität beitragen – beispielsweise beim SLE [75]. Belege hierfür sind die TLR-7-abhängige Verstärkung der Autoantikörperproduktion oder eine Milderung der Glomerulonephritis durch TLR-4-Blockade im Tiermodell [75, 79, 80].

Tabelle 5 gibt einen Überblick über einige dieser Rezeptoren, deren Lokalisation und Liganden.

**Tabelle 5: Mitglieder der PRRs im Überblick;** nach [75] und [81, 82]

Familie	Mitglieder	Lokus	Ligand	Erkennung	
<b>TLR</b>	TLR-1	Plasmamembran	Triacyl Lipoprotein	Bkt.	
	TLR-2	Plasmamembran	Lipoprotein	Bkt., Virus, Selbst	
	TLR-3	Endolysosom	dsRNA	Virus	
	TLR-4	Plasmamembran	LPS	Bkt., Virus, Selbst	
	TLR-5	Plasmamembran	Flagellin	Bkt.	
	TLR-6	Plasmamembran	Diacyl Lipoprotein	Bkt. Virus	
	TLR-7 (hTLR-8)	Endolysosom	ssRNS	Bkt., Virus, Selbst	
	TLR-9	Endolysosom	CpG DNS	Bkt., Virus, Selbst, Protozoen	
	TLR-10	Endolysosom	?	?	
	TLR-11	Plasmamembran	Profilin-like molecule	Protozoen	
	<b>CLR*</b>	Dektin-1	Plasmamembran	$\beta$ -Glucan	Pilz
Dektin-2		Plasmamembran	$\beta$ -Glucan	Pilz	
MINCLE		Plasmamembran	SAP130	Pilz, Selbst	
<b>RLRs*</b>	RIG-I	Zytoplasma	Kurze dsRNA	Virus	
	MDA5	Zytoplasma	Lange dsRNA	Virus	
<b>NLRs*</b>	<b>-NLRC</b>	NOD1	Zytoplasma	iE-DAP	Bkt.
		NOD2	Zytoplasma	MDP	Bkt.
	<b>-NLRB</b>	NAIP (Maus: <i>Naip</i> 1-7)	Zytoplasma	Flagellin; TTSS	Bkt.
	<b>-NLRP*</b>	NLRP1	Zytoplasma	Bazillus anthracis Toxin	Toxin
		NLRP3	Zytoplasma	Vielzahl von Stimuli **	Bkt., Virus, Stress
	<b>Andere*</b>	RAGE	Zytoplasma	Amyloid, HMGB1, S100; DNS / RNS(in vitro)	Selbst
		AIM2	Zytoplasma	dsDNA	Virus, Selbst [83]

\* Mitglieder der Familie / Subfamilie nicht vollständig aufgeführt; \*\* das klassische Liganden/Rezeptor Modell ist in diesem Falle wahrscheinlich nicht zutreffend [84]. **Abkürzungen:** **Bkt.:** Bakterium **CLR:** C-Type-Lectin Receptors; **RLRs:** Retinoic Acid-Inducible Gene-I-(RIG-I)-Like Receptors; **NLRs:** NOD like receptors; übrige siehe Abkürzungsverzeichnis

### 1.2.2 Physiologie des erworbenen Immunsystems

Dieser Abschnitt kann angesichts der Komplexität des erworbenen Immunsystems nur eine grobe Darstellung seiner Funktionsweise geben, um den Rahmen dieser Arbeit einzuhalten.

Das erworbene oder adaptive Immunsystem tritt gerade dann in Kraft, wenn die Kompetenzen des angeborenen Immunsystems nicht mehr ausreichend sind, um den Körper vor eindringenden Pathogenen zu schützen [73].

Es hebt sich durch eine pathogenspezifische Immunreaktion und die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses vom Musterkennungssystem des angeborenen Immunsystems ab. Im Gegensatz zu fest genetisch kodierten PRRs besitzen B- und T-Lymphozyten der adaptiven Immunität die Fähigkeit, ihre Rezeptoren zufällig aus variablen Rezeptorgensegmenten zu rekombinieren. So entsteht eine nahezu unendliche Diversität an B- und T-Zellklonen mit einzigartigem Rezeptor. Befällt ein Pathogen also den Körper haben diese Zellen den passenden Erkennungsmechanismus bereits parat. Im Falle von B-Zellen werden diese über membranständige Immunglobulinmoleküle erkannt, was letztendlich zur Sekretion von Immunglobulinen führt. T-Zellen sind darauf spezialisiert, Peptide aus unterschiedlichen Zellkompartimenten, die von Körperzellen an MHCI (aus dem Zytosol) oder MHCII (aus Endosomen) auf ihrer Oberfläche präsentiert werden, zu erkennen. CD4<sup>+</sup> T-Zellen detektieren dabei MHCII gebundene Peptide, aktivieren die Antigen-präsentierende Zelle und den Makrophagen zur Abtötung des aufgenommenen Pathogens und stimulieren B-Zellen zur Antikörperproduktion. CD8<sup>+</sup> T-Zellen hingegen registrieren an MHCI präsentierte Fragmente, beispielsweise eines zytosolischen Virus und sind darauf spezialisiert, die Trägerzelle zu vernichten [73].

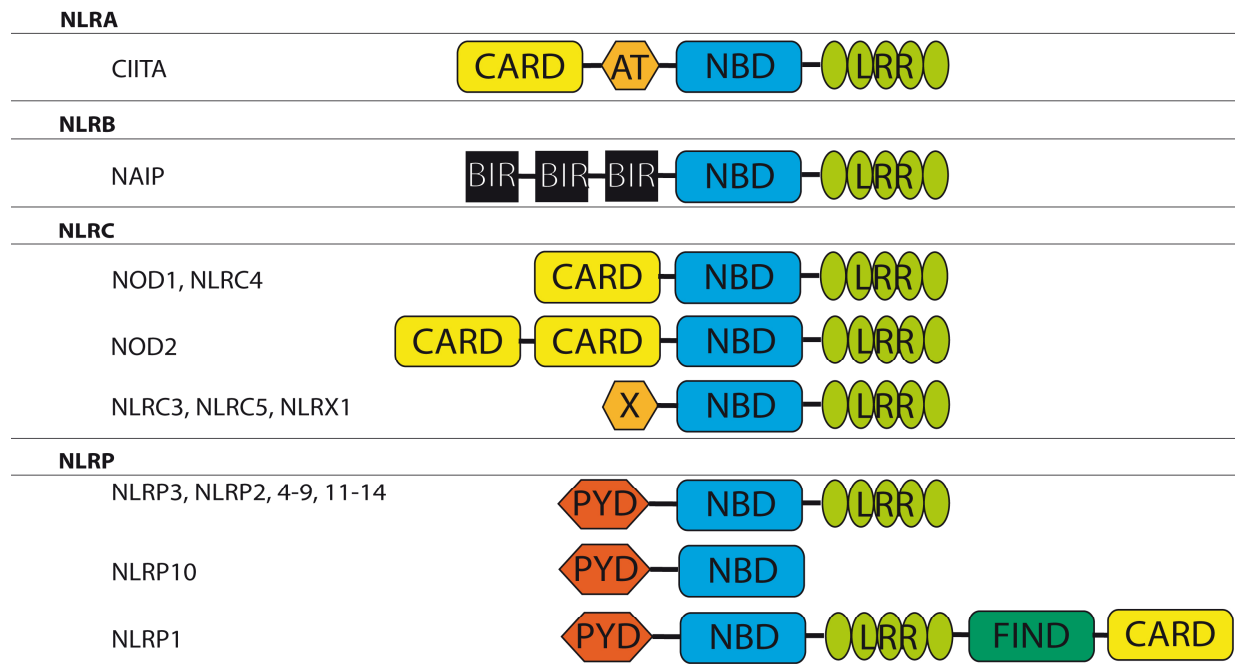
Neben diesen Effektormechanismen stimuliert das erworbene Immunsystem z.B. über die Produktion von Antikörpern, die Pathogene opsonieren, maßgeblich Zellen und Funktionen des angeborenen Immunsystems. Somit arbeiten diese beiden Systeme in vivo eng ineinander verzahnt. Nach beendeter Immunreaktion bleiben einzelne Lymphozyten als Gedächtniszellen zurück, die bei erneuter Infektion schnell reagieren können, so dass die übliche Zeit bis zum Einsetzen der verzögerten adaptiven Immunantwort verkürzt ist [73].

### **1.3 NLRs, das Konzept des Inflammasoms und der IL-1-, IL-18- und IL-33-Sekretion**

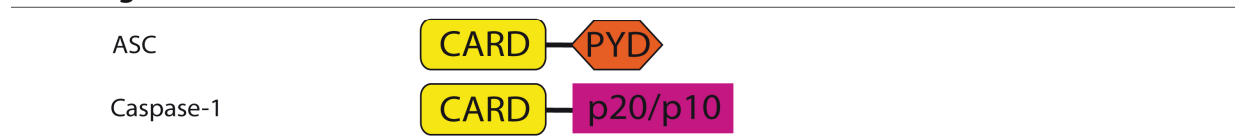
Die im Kapitel 1.2.1 und in Tabelle 5 bereits erwähnten NLRs (Nucleotide-Binding Domain (NBD) And Leucine Rich Repeats (LRR) Containing Receptors, gelegentlich auch als NOD-Like Rezeptoren bezeichnet) sind zytosolische Pattern-Recognition Rezeptoren (PRRs). Sie zeigen Ähnlichkeit zu einem bereits bei Pflanzen vorhanden Immunmechanismus, den R-Proteinen. Namen gebend ist ihr Aufbau. Die meisten Mitglieder der NLR Familie besitzen eine dreiteilige Struktur mit einer invarianten zentralen Domäne mit ATPase-Aktivität, die Nukleotid-Bindung (ATP) und Oligomerisation vermittelt und daher als Nucleotide-Binding Site (NBS), Nucleotide-Binding Domain (NBD) oder Nucleotide-Binding Oligomerization Domain (NOD) bezeichnet wird. C-terminal wird sie von einer Leucin Rich Repeat-(LRR)-Domäne flankiert, die vermutlich bei der Ligandenerkennung eine Rolle spielt. Die Struktur an der N-terminalen Flanke der NLRs ist variabel und für homotypische Interaktion mit anderen Proteinen, wie dem Adaptermolekül Apoptosis Associated Speck-Like Protein (ASC) oder der

Caspase-1, relevant. Zudem erfolgt nach ihrer Struktur die Einteilung der NLRs in weitere Subgruppen wie NLRA (Acidic Transactivation Domain), NLRB (Baculoviral Inhibitory Repeat Domain), NLRC (Caspase-Recruitment And Activation Domain), NLRP (Pyrin Domain). Beim Menschen sind derzeit 22 solcher NLRs bekannt [85-87]. Siehe hierzu Abbildung 6.

### A Subklassen und Aufbau humaner NLRs



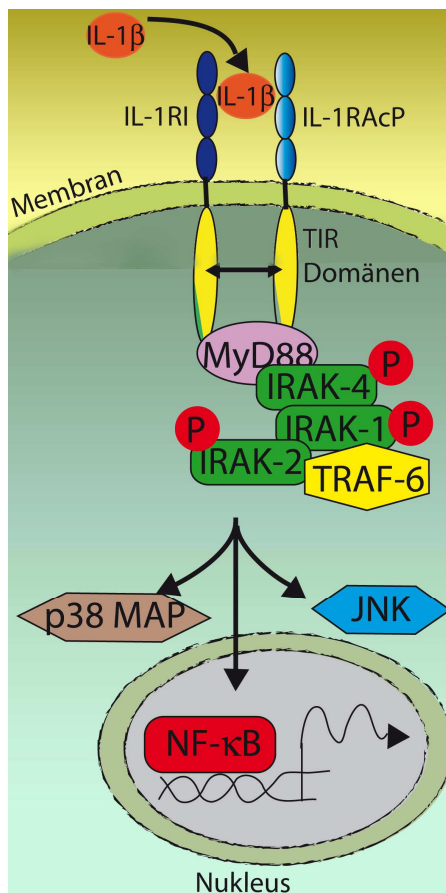
### B Interagierende Proteine / Inflammasom-assoziierte Proteine



**Abbildung 6: Subklassen und struktureller Aufbau der NLRs mit interagierenden Proteinen;** modifiziert nach [86]; **A:** Subklassen und schematischer Aufbau der NLRs: **AT:** Acidic Transactivation Domain; **BIR:** Baculoviral Inhibitory Repeat Domain; **CARD:** Caspase-Recruitment And Activation Domain **PYR:** Pyrin Domain; **NBD:** Nucleotide-Binding Domain; **LRR:** Leucin Rich Repeat **B:** Mit einigen NLRs interagierende Proteine: **ASC:** Apoptosis Associated Speck-Like Protein

Aufgrund der Homologie zu Signalwegen der Apoptoseinduktion wurde zunächst vermutet, dass diese Proteine via Leukozytenapoptose an entzündlichen Antworten beteiligt sind [86]. Im Jahre 2002 erkannten Martinon, Burns und Tschopp jedoch eine andere wesentliche Funktion eines NLRs im angeborenen Immunsystem. Sie beschrieben in mit LPS vorbehandelten mechanisch zerstörten THP-1 Zellen die Formation eines makromolekularen Komplexes, der für die Aktivierung der pro-inflammatorischen Caspase-1 benötigt wird und zeigten, dass dieser aus dem NLR, NLRP1, dem Adapterprotein ASC und den Caspasen -5 und -1 besteht. Letztere ist für die Aktivierung des pro-entzündlichen Mediators IL-1 $\beta$  verantwortlich. Im weiteren Verlauf prägte Jürgen Tschopp für diese Caspase-1-aktivierende und IL-1 $\beta$ -sezernierende Maschinerie den Begriff des „**Inflammasoms**“ [88].

IL-1 $\beta$  ist ein enorm potenter Mediator mit einer Schlüsselrolle in der Induktion der „akuten Phase Reaktion“. Sein Rezeptor aus der IL-1-Rezeptor-Familie besitzt eine intrazelluläre Toll-like/IL-1 Rezeptor-(TIR)-Domäne, homolog zu der der TLRs, und nutzt demnach auch die gleichen Signalkaskaden (Abbildung 7). IL-1 $\beta$  wird vornehmlich aus aktivierten Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen freigesetzt. Nach MYD88/NF $\kappa$ B anhängigem Signaling über seinen Rezeptor induziert es die Aktivierung von Makrophagen, die Bildung vasoaktiver Substanzen, die Sekretion von Interleukinen (IL-6, IL-1 u.a.) und die Exposition von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen. Somit amplifiziert es die lokale und systemische Entzündungsreaktion. Folge ist die Induktion von Fieber, eine Herabsetzung der Schmerzschwelle und Hypotonie [89, 90]. Weiterhin besitzt IL-1 indirekte Funktion bei der Stimulation von B- und T-Zellantworten und der Produktion von Antikörpern. Für zwei weitere entzündliche Interleukine, IL-18 und IL-33, die ihre Wirkung ebenfalls über Mitglieder der IL-1-Rezeptor-Familie vermitteln, ist mittlerweile bekannt, dass ihre Sekretion ebenfalls Caspase-1-abhängig über Inflammasomkomplexe erfolgt [89-91]. Abbildung 7 zeigt das Signaling über die IL-1-Rezeptor-Familie und fasst bekannte Wirkungen der Interleukine -1, -18, -33 sowie ihre Beteiligung an autoinflammatorischen Erkrankungen zusammen.

**IL-1-Rezeptor-Signaling:****IL-1-Rezeptor-Signaling:**

IL-1 $\beta$  Bindung führt zur Dimerisierung von IL-1RI (IL-1-Rezeptor 1) und IL-1RAcP. Es kommt zur intrazellulären Annäherung der TIR-(Toll-like-/IL-1-Rezeptor) Domäne. MyD88 wird rekrutiert. Es folgt die Phosphorylierung von IRAK-1,-2,-4 und die Rekrutierung von TRAF-6. IRAK-1 und TRAF-6 führen über mehrere Schritte zur nukleären Translokation von NF $\kappa$ B. Weiterhin werden p38 MAP (Mitogen-Activated Proteinkinase) und JNK (c-Jun Amino-terminal Kinase) aktiviert.

Diese Signalkaskade steht stellvertretend für das Signaling von TLRs, und der IL-1R Familie und gilt in ähnlicher Weise auch für IL-18.

**IL-1 $\beta$ -****Wirkungen:**

- **Induktion:** IL-6, IL-23 u.a.; COX2, iNOS, PGE2
- **Expression:** Adhäsionsmoleküle (Endothel)
- **Makrophagen:** Migration und Aktivierung
- **T-Zellen:** Stimulation  $\rightarrow$  Th2-Antwort; Th17-Antwort
- **B-Zell-** Stimulation; Antikörper  $\uparrow$

**IL-18-****Wirkungen:**

- **Induktion:** GM-CSF, TNF, IL-6
- **Expression:** Adhäsionsmoleküle (Endothel)
- **Neutrophile:** Respiratory burst  $\uparrow$ ; NK Zellen stimulierend
- **T-Zellen:** Stimulation  $\rightarrow$ ; CD8+Zellen; Th1- / Th2- / Th17-Antwort

**IL-33-****Wirkungen:**

- **Verstärkte Freisetzung:** IL-6, TNF, IL-1 $\beta$ , MCP-1 aus Mastzellen
- **Makrophagen / Mastzellen:** Costimulation
- **T-Zellen:** Stimulation  $\rightarrow$  Th2-Antwort; chemotaktisch auf Th2 Zellen

**- Involviert bei / Assoziation mit\*:**

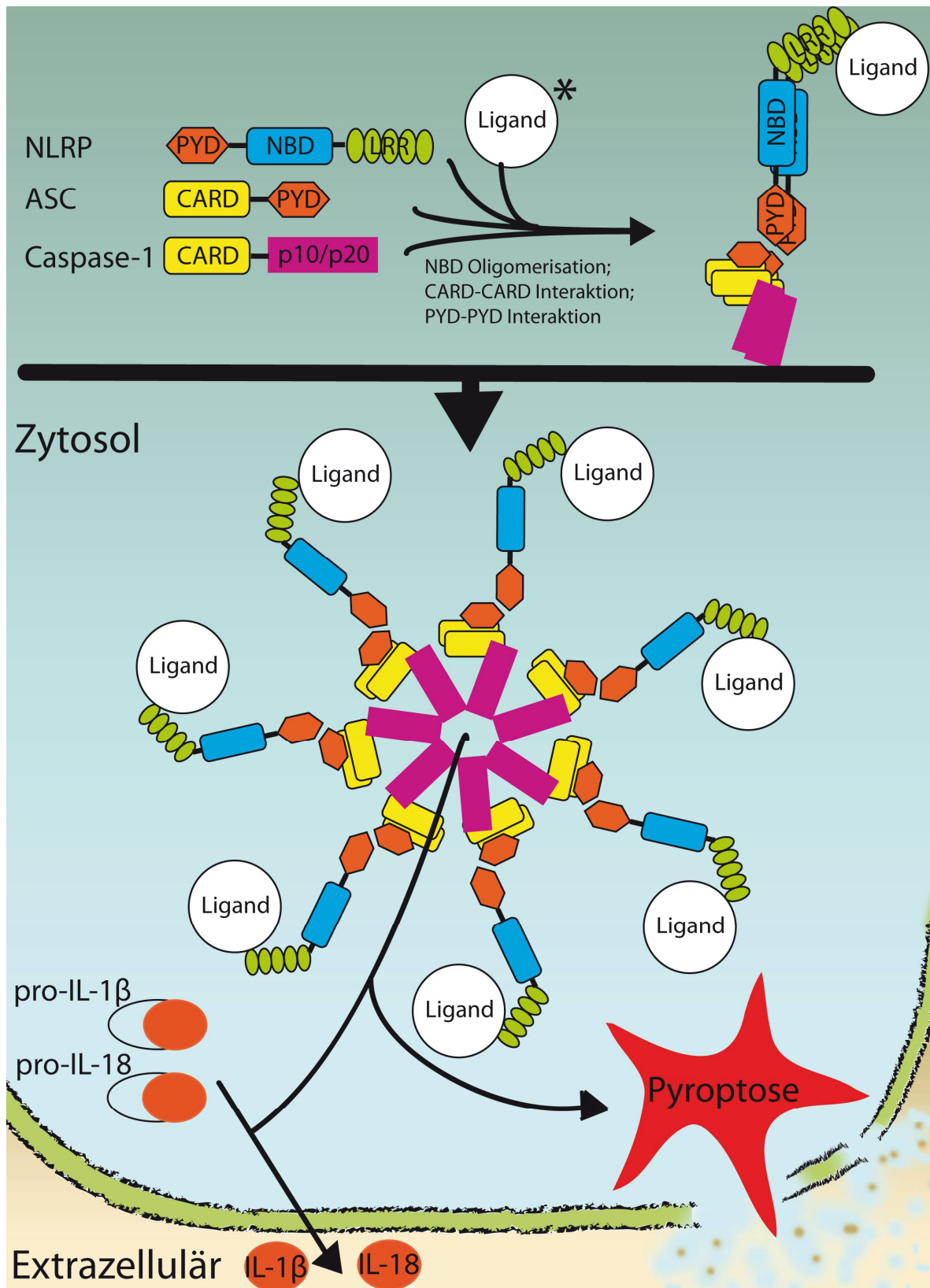
- |   |  |   |
|---|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Rheumatoide Arthritis</li> <li>• Juvenile Rheumatoide Arthritis</li> <li>• M. Bechterew</li> <li>• Gicht</li> <li>• Diabetes</li> <li>• ZNS Erkrankungen</li> <li>• early onset Psoriasis</li> <li>• SLE: Hautbeteiligung</li> <li>• Silikose</li> <li>• Lichen sclerosus</li> <li>• Colitis ulcerosa</li> <li>• Multiple Sklerose</li> <li>• Sjögren Syndrom</li> <li>• Purpura Schönlein Henoch</li> <li>• IgA-Nephropathie</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Multiple Sklerose</li> <li>• Rheumatoide Arthritis</li> <li>• CED</li> <li>• Psoriasis</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Maus: Wiederholte IL-33 Injektion <math>\rightarrow</math> Eosinophilie, Splenomegalie, Lungen- und Darm-Pathologie</li> </ul> |
|---|--|---|

\* Daten z.T. lediglich aus Tiermodellen, einige Assoziationen finden sich nur in speziellen Populationen siehe hierfür: [89]

**Abbildung 7: Schematische Darstellung des IL-1-Rezeptor-Signaling mit Wirkungen und assoziierten Erkrankungen der Interleukine IL-1 $\beta$ , IL-18 und IL-33** [89, 90]; **links:** schematische Darstellung des IL-1- und in ähnlicher Weise auch des IL-18-Rezeptor Signaling; **Tabelle rechts oben:** Wirkungen der Interleukine IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-33; **Tabelle rechts unten:** Bedeutung dieser Interleukine bei entzündlichen Erkrankungen; **CED:** Chronisch-entzündliche Darmerkrankung

Abbildung 7 legt nahe, wie bedeutend die stringente Kontrolle der Sekretion von IL-1 $\beta$  ist, um einerseits einer überschießenden Immunreaktion und autoinflammatorischen Erkrankungen vorzubeugen, andererseits aber bei Bedrohungen für den Körper adäquate Entzündungsreaktionen in Gang zu bringen. Hieran sind NLRs in Form des Inflammasoms maßgeblich beteiligt. Mittlerweile ist neben NLRP1 für zwei weitere NLRs, **NLRP3** und NLRC4 bekannt, dass sie ein Inflammasom zur IL-1 $\beta$ - und IL-18-Sekretion ausbilden. Diese NLRs heben sich von der Funktionsweise anderer PRRs, wie z.B. TLRs, insofern ab, als dass sie anstelle einer NF $\kappa$ B Aktivierung die Sekretion des Mediators IL-1 $\beta$  vermitteln [84, 92].

Eine weitere Funktion des Inflammasoms, nach Aktivierung durch seine(n) „Liganden“, ist die Initiierung einer pro-entzündlichen, Caspase-1-abhängigen Form des Zelltods in Makrophagen, die **Pyroptose** genannt wird. Dieser Zelltod teilt einerseits Charakteristika mit der Apoptose, indem er programmiert auf Caspase-1-abhängige Weise abläuft und die Struktur und Domänen des Inflammasoms an das Apoptosom erinnern (siehe Abbildung 8). Andererseits zeigt er aber auch Eigenschaften der Nekrose, da er nicht immunologisch inert abläuft, sondern mit einem Integritätsverlust der Plasmamembran einhergeht. Es wird vermutet, dass Pyroptose die Funktion hat, einen durch Infektion oder PAMPs-Signale ausgelösten „gewaltsamen Tod“ eines Makrophagen an den Organismus zu signalisieren. Welche Mechanismen dabei die Entscheidung zwischen Interleukinproduktion, die nachweislich aus lebenden Zellen erfolgt, vs. Pyroptose und Zelluntergang treffen, ist bis dato nicht bekannt [84, 86, 93]. Abbildung 8 stellt die derzeitige hypothetische Vorstellung der Inflammasomaktivierung sowie dessen Funktionen bildlich dar.



**Abbildung 8: Hypothetischer Mechanismus der Assemblierung, Aktivierung und Funktion des Inflammasoms;** nach [86] und [94]; **Oben:** Ligandenbindung → Konformationsänderung und Dimerisation der NBDs; PYD-PYD-Interaktion → ASC rekrutiert; CARD-CARD-Interaktion → Caspase-1-Rekrutierung; **Unten:** Ausbildung des makromolekularen Komplexes → autokatalytischen Aktivierung der Caspase-1 → Prozessierung der pro-entzündlichen Mediatoren IL-1 $\beta$  und IL-18 / Induktion des Zelltodes über Pyroptose → der Freisetzung von intrazellulärem Inhalt durch Integritätsverlust der Plasmamembran; \* Für das NLRP3-Inflammasom scheint die Ligandenhypothese nicht zutreffend [84].



### 1.3.1 Das NLRP3-Inflammasom

Unter den ohnehin bemerkenswerten „Inflammasomes“ ist das 2004 von Jürgen Tschopp und Kollegen beschriebene **NLRP3-Inflammasom** wiederum einzigartig. Analog zur Abbildung 8 besteht es aus dem Protein NLRP3 und dem Adaptermolekül ASC, welches zur Caspase-1 Aktivierung essentiell ist, da NLRP3 selbst keine CARD-Domäne besitzt (Abbildung 6) [95].

Unter den NLRs mit Inflammasombildung ist NLRP3 das meist studierte. Welche Zellen bzw. Gewebe exprimieren aber NLRP3? Verschiedene murine und humane Expressionsstudien liefern teils widersprüchliche Antworten auf diese Frage. Eine basale Expression von NLRP3 findet sich in den lymphatischen Organen, wie Milz und Lymphknoten. Tschopp berichtet weiterhin über eine Expression in humanen nicht verhornenden Epithelien, wie gastrointestinaler oder vaginaler Mukosa, entsprechend seiner Funktion als PRR in der Pathogendetektion. Unter den Immunzellen zeigen lediglich herkömmliche dendritische Zellen, Monozyten und neutrophile Granulozyten eine geringe basale Expression. Die Daten zu Zellen des adaptiven Immunsystems, wie B- und T-Zellen bleiben kontrovers [96-98]. Einigkeit besteht jedoch darüber, dass NLRP3 in Immunzellen, wie Monozyten und Makrophagen, durch TLR-Stimulation über MyD88- sowie TRIF-abhängiges Signaling sehr stark, z.B. >20-fach nach LPS-Stimulation, induziert wird, wohingegen die übrigen in den Inflammasomkomplex rekrutierten Proteine ASC und Caspase-1 bereits konstitutiv exprimiert sind [84, 96, 98, 99].

### 1.3.2 Aktivierungsprozess des NLRP3-Inflammasoms: Stimuli und Ablauf

Bemerkenswert ist die Vielfalt an Stimuli, die zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms führen. Neben der Detektion von bakteriellen Bestandteilen wie LPS, MDP (PAMPs) und porenbildenden Toxinen ist das NLRP3-Inflammasom in der Lage, auf ein breites Spektrum an DAMPs zu reagieren, die kristalline Strukturen (MSU, Silicia) oder auch extrazellulären ATP-Anstieg umfassen [94]. Tabelle 6 zeigt einige bekannte Aktivatoren des NLRP3-Inflammasoms.

**Tabelle 6: Aktivatoren des NLRP3-Inflammasoms; modifiziert nach [100] und [101]**

Gruppe	Beispiele
<b>PAMPs</b>	Bakterielle RNA
	LPS
	Peptidoglycan / Muramyl Dipeptide (MDP)
	Poly I:C
<b>Lebende Bakterien</b>	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Listeria monocytogenes</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b>Viren</b>	Influenza Virus
	Sendai Virus
<b>Toxine</b>	Aerolysin ( <i>Aeromonas hydrophila</i> )
	A-Toxin ( <i>S. aureus</i> )
	Gramicidin ( <i>Bacillus brevis</i> )
	Listeriolysin O
	Maitotoxin ( <i>Marina dinoflagellates</i> )
	Nigericin ( <i>Streptomyces hygoscopus</i> )
<b>DAMPs</b>	ATP
	Calcium-Pyrophosphat-Dihydrat-Ablagerungen
	Calcium-Oxalat [107]
	Mono-Natrium-Uratkristalle
	Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)
	SDS
	Trinitro-Chlorobenzen (TNCB) (Keratinocyten)
	UV-B Strahlung (Keratinocyten)

Wie das NLRP3-Inflammasom durch diese Stimuli aktiviert wird, ist eine Frage, die auch nach über einem Jahrzehnt noch nicht bis ins letzte Detail geklärt ist. Das enorme biologische Potential der IL-1 $\beta$ -Sekretion, zusammen mit der breiten Vielfalt endogener und exogener Aktivatoren des NLRP3-Inflammasoms, legen nahe, dass dessen Aktivität zugunsten einer physiologischen Gewebemöostase einer strikten Kontrolle bedarf. Dabei liegen die Abwehr von Pathogenen und die Vermeidung von autoinflammatorischen Syndromen an entgegengesetzten Enden des regulatorischen Spektrums. Aus diesem Grund unterliegt das NLRP3-Inflammasom zumindest in vitro einem 2-stufigen Aktivierungsprozess [84, 87]. In ruhenden Immunzellen ist die basale Expression von NLRP3 und pro-IL-1 $\beta$  im Gegensatz zu der anderer NLRs (z.B.: NLRC4) sehr gering (siehe auch Kapitel 1.3.1). Als erstes Signal bedarf es daher einer NF $\kappa$ B-abhängigen aufregulierten Expression von NLRP3 und IL-1 $\beta$  nach Aktivierung der Zelle durch TLR-Stimulation, NOD-Liganden oder inflammatorische Mediatoren. Dies können demnach

vielerlei Stimuli wie TNF, CpG, LPS, ja sogar IL-1 $\beta$  selbst leisten (Abbildung 9: links). Als zweites Signal dient nun der NLRP3 aktivierende Agonist (Tabelle 6), der auf bisher ungeklärte, wahrscheinlich indirekte Weise die Assemblierung des Inflammasoms vermittelt. Die übrigen in den Komplex rekrutierten Proteine ASC und Caspase-1 sind bereits konstitutiv exprimiert und unterliegen keiner derartigen Regulation [84, 87].

Die Diversität der als Signal-2 dienenden Aktivatoren legt nahe, dass das von Charles Janeway postulierte Pattern-Recognition-Modell, also das Erkennen von verbreiteten mikrobiellen Motiven durch genetisch konservierte Rezeptoren (siehe Kapitel 1.2.1), auf das NLRP3-Inflammasom nur schwer anzuwenden ist. Vielmehr scheint in diesem Fall die Guard-Hypothese zutreffend. Diese fordert genetisch determinierte Mechanismen, die nicht Pathogene oder deren Produkte selbst erkennen, stattdessen aber als „Wächter“ Abweichungen von physiologischen Zellzuständen oder -prozessen registrieren. Sie erkennen damit uniforme Wirkungen verschiedener Pathogene, z.B. auf die zelluläre Membranintegrität oder auf Stoffwechselwege [78, 84]. Ebenfalls hilfreich scheint die Damage- oder Danger-Hypothese zum Verständnis des NLRP3-Inflammasoms, die das Erkennen von Pathogenen über die von selbigen angeordnete Gewebeschädigung beschreibt [78, 84].

Als gemeinsame Endstrecke diverser DAMPs und PAMPs, die demnach zur Assemblierung des NLRP3-Inflammasoms und zur IL-1 $\beta$ -Sekretion führen, werden derzeit 3 Mechanismen diskutiert.

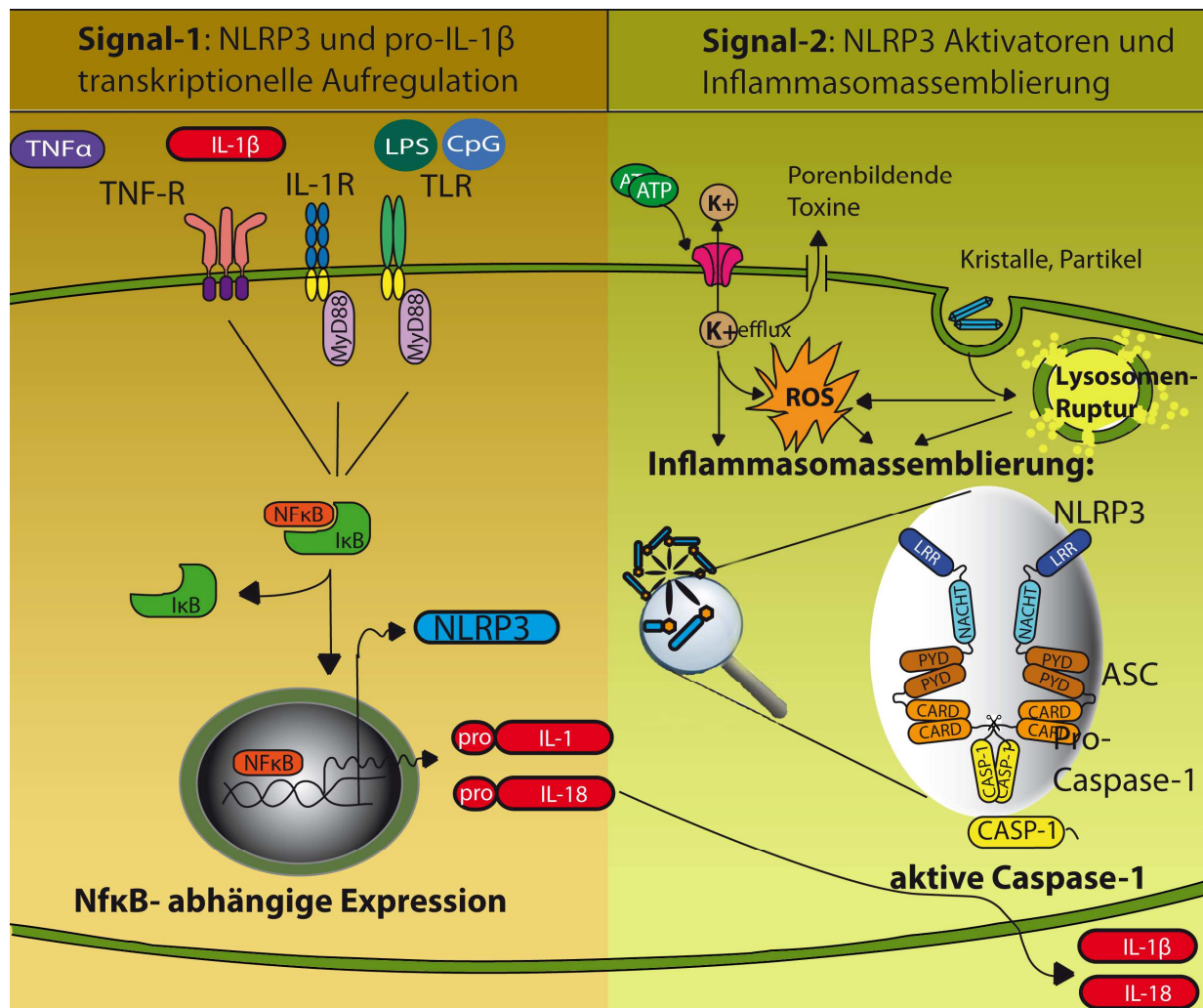
Erstens gibt es Hinweise dafür, dass die NADPH-Oxidase-abhängige oder mitochondriale Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die hoch konservierte Gefahrensignale darstellen und durch viele Aktivatoren induziert werden, im Signalweg vor der Assemblierung des NLRP3-Inflammasoms steht. Dass ROS als alleiniges Signal nicht ausreichend ist, wird vermutet, da nicht alle ROS induzierende Agenzien zur Inflammasomaktivierung führen [102]. Experimentelle Daten lassen derzeit davon ausgehen, dass ROS eher bei der transkriptionellen Regulation von NLRP3 eine Rolle spielen und somit als Signal-1 dienen [103].

Zweitens stimulieren extrazelluläres ATP – über den P2X7 Ionenkanal – und Porenbildung in der Plasmamembran durch bakterielle Exotoxine das Ausströmen von Kalium aus der Zelle, was als Aktivierungssignal dienen könnte [78, 84].

Drittens wird vermutet, dass lysosomale Inhalte durch Phagozytose von kristallinen Strukturen, wie Urat- oder Siliziumkristallen, und folgender Lysosomenruptur freigesetzt werden und als Triggersignal dienen [102].

Man nimmt an, dass NLRP3 in Abwesenheit derartiger Stimuli über seine LRR Domänen in einem inaktiven Zustand gehalten wird. Auch die Chaperone HSP-90 und SGT-1 scheinen dabei eine Rolle zu spielen [102].

Zusammenfassend ist der Prozess der NLRP3-Inflammasomaktivierung noch nicht abschließend geklärt. Abbildung 9 veranschaulicht die eben besprochenen Modelle.



**Abbildung 9: Die 2-Signalthypothese der NLRP3-Inflammasomaktivierung;** nach [104]; **Signal-1 / links:** Nach NFκB aktivierendem Signaling über TNF-α, IL-1β oder TLR-Liganden wie CpG (TLR-9) oder LPS (TLR-4) kommt es zur transkriptionellen Aufregulation von NLRP3 und pro-IL-1β. **Signal-2 / rechts:** Die drei derzeit diskutierte Mechanismen der NLRP3-Inflammasomaktivierung: Erstens kann über einen ATP-abhängigen Kaliumkanal (P2X7) oder durch toxininduzierte Membrandefekte Kalium aus der Zelle strömen, was als Signal dienen könnte. Zweitens kann Lysosomenruptur infolge der Phagozytose kristalliner und partikulärer Strukturen lysosomale Inhalte freisetzen. Drittens könnte die Produktion von radikalen Sauerstoffspezies im entzündlichen Milieu als Aktivator dienen. Nach Signal-1 (NLRP3- und pro-IL-1β-Expression) erfolgt demnach durch diese Stimuli die NLRP3-Inflammasomassemblierung. Dieses besteht aus NLRP3, dem Adapterprotein ASC und rekrutierter Pro-Caspase-1. Die autokatalytische Aktivierung der Caspase-1 führt in der Folge zur Prozessierung von IL-1β und IL-18 aus ihren Pro-Formen. Lupenelement von de.freepic.com

### 1.3.3 Funktionen des NLRP3-Inflammasoms

Als Inflammasom vermittelt NLRP3 über die Aktivierung der Caspase-1 die Sekretion der pro-entzündlichen Interleukine IL-1 $\beta$  und IL-18 sowie eine pro-entzündliche Form des Zelltodes – die Pyroptose. Diese Kaskaden amplifizieren die initiale Entzündungsreaktion. Pyroptose lässt sich hierbei als Meldung des „gewaltsamen Todes“ eines Phagozyten an die Umgebung betrachten, da NLRP3 im Stande ist, einen Verlust der zytoplasmatischen (K<sup>+</sup> Efflux) bzw. lysosomalen (lysosomale Bestandteile) Membranintegrität zu detektieren. Die Heterogenität verschiedener DAMPs, die NLRP3 aktivieren können, hat dazu geführt, es als eine integrierende Plattform für zelluläre Stresssignale und alterierte physiologische Prozesse zu betrachten [84]. Nach Aktivierung erfüllt es über die Stimulation des angeborenen Immunsystems hinausgehende Funktionen. Über die Sekretion der Interleukine IL-1 $\beta$  und IL-18 beeinflusst es die nachfolgende adaptive Immunantwort [105]. So findet sich etwa die experimentelle Kontaktdermatitis, eine T-Zell-abhängige Immunreaktion, in ASC<sup>-/-</sup> und NLRP3<sup>-/-</sup> Mäusen attenuiert [98].

### 1.3.4 Das NLRP3-Inflammasom im Kontext verschiedener Erkrankungen

Wie weitreichend ist die pathophysiologische Bedeutung des NLRP3-Inflammasoms?

Zeitgleich mit der Erstbeschreibung des NLRP3-Inflammasoms konnten J. Tschopp und Kollegen zeigen, dass Makrophagen von Patienten mit Muckle-Wells-Syndrom, einem autoinflammatorischen, periodischen Fiebersyndrom, nach LPS-Stimulation eine deutlich erhöhte IL-1 $\beta$ -Produktion, im Sinne eines konstitutiv überaktiven NLRP3-Inflammasoms, aufwiesen [95]. Dies lieferte die Rationale für eine therapeutische IL-1 $\beta$ -Blockade bei autoinflammatorischen Syndromen, wie dem Muckle-Wells-Syndrom, Familial Cold Autoinflammatory Disorder (FCAS) sowie den Chronic Infantile Neurologic Cutaneous And Articular Syndrome (CINCA), die assoziiert sind mit Mutationen im NLRP3-Gen. Man geht davon aus, dass die Mutationen in der zentralen NO-Domäne zu einem konstitutiv aktiven NLRP3-Inflammasom, überschießender IL-1 $\beta$ -Produktion und so zu periodischem Fieber führen [89, 95].

Auch die Entdeckung, dass Uratkristalle zu den Aktivatoren von NLRP3 zählen, eröffnete zügig neue Therapieansätze bei der Behandlung der akuten Gichtarthropathie mit Anakinra, einem IL-1R-Antagonisten [86, 106]. Im Tiermodell ist NLRP3 weiterhin an der Pathogenese der Kalziumoxalatnephropathie beteiligt [107].

Sogar bei der Insulinresistenz scheint eine NLRP3-Inflammasom-vermittelte Entzündung beteiligt. In einer doppelblinden, kontrollierten Studie in der Typ-II-Diabetiker mit Anakinra behandelt wurden, konnten verbesserte  $\beta$ -Zell-Funktion und Blutzuckerwerte nachgewiesen werden [86, 108].

## 1.4 Projekthypothese

Entzündung ist eine physiologische und unverzichtbare Reaktion, um die Gewebemöostase nach Infektion oder Verletzung durch bestimmte Noxen wiederherzustellen. Eine überschießende Entzündungsreaktion, im Kontext von Autoimmunerkrankungen und autoinflammatorischen Syndromen, kann hingegen desaströse Folgen für den Organismus haben [86].

Die Kontrolle der IL-1 $\beta$ - und IL-18-Sekretion sowie der konsekutiven Entzündungsreaktion implizieren eine wesentliche Rolle des NLRP3-Inflammasoms bei einer Reihe autoinflammatorischer Störungen. Diese Annahme bestätigt sich durch das Ansprechen dieser Erkrankungen auf Anakinra [89, 109-111]. Weiterhin hat sich NLRP3 als wesentlicher Faktor bei der Pathogenese von Kristallopathien erwiesen [86, 107].

Im Gegensatz dazu ist die Rolle des Inflammasoms bei Autoimmunerkrankungen weniger klar. Zwar induzieren NLRP3-aktivierende Mutationen im Mausmodell keinen spontanen autoimmunen Phänotyp, genetische Assoziationsstudien haben initial lediglich NLRP1 mit systemischem Lupus in Verbindung gebracht und die Datenlage zur IL-1 $\beta$ - oder IL-1 $\beta$ -Rezeptor-Blockade bei SLE in Maus und Mensch ist widersprüchlich [53, 64, 112-116]. Jedoch lässt sich im Falle des SLE, als Beispiel für systemische Autoimmunität, vermuten, dass das NLRP3-Inflammasom aufgrund seiner Fähigkeit, über sezernierte Interleukine Immunkzellen zu stimulieren und Lymphozytenproliferation anzutreiben, eine aggravierende Rolle bei der Pathogenese spielt. Das breite Spektrum an sterilen DAMPs, die hierbei als Aktivatoren dienen können, macht es weiterhin zu einem potentiellen Risikokandidaten, um sterile Gewebeentzündung aufrechtzuerhalten [53, 117, 118].

Um die Rolle des NLRP3-Inflammasoms im Kontext der systemischen Autoimmunität, speziell des SLE, zu überprüfen, generierten wir NLRP3- bzw. ASC-defiziente C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Doppelknockoutmäuse und verglichen diese gegen altersadaptierte C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäuse. Letztere entwickeln spontan einen milden Lupus-ähnlichen Phänotyp [119]. Durch zusätzliche Defizienz der Inflammasomkomponenten NLRP3 bzw. ASC würden im autoimmunen lpr-Hintergrund die pro-inflammatorischen IL-1- und IL-18-Achsen vermindert aktivierbar sein. Dies, so vermuteten wir, würde einen protektiven Effekt auf lokale Gewebeentzündung und systemische Autoimmunität erwirken.

Unsere Hypothese ging demnach von einem attenuierten Lupus-ähnlichen Phänotyp in unseren NLRP3<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> und ASC<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Doppelknockoutmäusen im Vergleich zu C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Tieren aus. Eine Erwartung, die durch unsere Daten überraschenderweise widerlegt wurde.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Tabelle 7: Laborgerätschaften

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Gelelektrophorese-Kammer	Gelelektrophorese-Kammer	PeqLab Biotechnologie, Erlangen, D
ELISA-Reader	Tecan, GENios Plus	Tecan, Crailsheim, D
Plate-Washer	Microplate-Washer ELx50	Biotek, Bad Friedrichshall, D
Durchflussszytometer	FACSCalibur™	BD Bioscience, Heidelberg, D
Analysesoftware	FlowJo software	TreeStar, Ashland, US
Analysesoftware, Durchflussszytometer	CellQuest Software Pharmin-gen	BD Pharmingen, Heidelberg, D
CO <sub>2</sub> Brutschrank	Heracell 150; Heracell Typ B5060 EC-CO 2	Heraeus Sepatech, Osterode, D
Elektr. Pipettierhilfe	Easypet; Pipetus; Research Pro 5-100µl	Eppendorf AG, Hamburg, D; Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D; Eppendorf AG, Hamburg, D
(Gewebe)homogenisator	Ultra Turrax T25	IKA GmbH, Staufen, D
Kamera	Canon 450	Canon
Konfokalmikroskop	Olympus BX 61	Olympus, Hamburg, D
Kryomikrotom	Jung CM 3000	Leica, Solms, D
Magnetrührer	IKAMAG REO	IKA-Werke GmbH&Co.KG, Staufen, D
Manueller Dispenser	Multipette Plus	Eppendorf AG, Hamburg, D
Manuelle Pipettierhilfe	Research Plus 30-300µl	Eppendorf AG, Hamburg, D
Manuelle Pipettierhilfen	Pipetman 2, 10, 20, 100, 200, 1000µl	Gilson, Middleton, WI, US
Mikroskop	Leitz DM RBE	Leica Microsystems, Wetzlar, D
Mikroskop-Imaging	CellP software	Olympus, Hamburg, D
Nukleinsäurequantifizierung	ND-1000 Spectrophotometer	PeqLab Biotechnologie, Erlangen, D
Real-Time-PCR	LightCycler 480	Roche, Mannheim, D
pH-Meter	pH-Meter WTW	WTW GmbH, Weilheim, D
Röntgen-Entwicklermaschine	Curix 60	AGFA, Köln, D
Rotormischer	Heavy duty Rotator	Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen, D
SDS-Gelelektrophorese-Kammer	MiniVE, vertical electrophoresis system	Amersham Bioscience, Glatbrugg, CH
SDS Gelelektrophorese Spannungsquelle	Power-PAC 3000	BioRad, München, D
Sterile Werkbänke	SterilGard Hood Class II, A/B3; Microflow, biological safety cabinet Klasse 2	Baker Company, Sanford, Maine, US; Nunc GmbH, Wiesbaden, D
Thermomixer	Thermomixer 5436; Thermocycler UNO-II	Eppendorf, Hamburg, D; Biometra, Göttingen, D
UV-Licht		Bachofer Laborgeräte, Reutlingen, D
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, US
Waagen	BP 110S; EC-211; Mettler PJ 3000; Mettler P 1200 N	Sartorius, Göttingen, D; Acculab Sartorius Group, Bohemia, US; Mettler Toledo, Gießen, D
Walzenmischer	Stuart Roller Mixer SRT6	Bibby Scientific, Stone, UK
Wasserbadinkubator	Wasserbad HI 1210	Leica Microsystems, Solms, D
Western Blotting	Semi-Dry Transfer Cell	BioRad, München, D
Zählkammer	Neubauer Zählkammer	Roth, Karlsruhe, D
Zentrifugen	Centrifuge 5415 C; Centrifuge 5418; Centrifuge 5417R und: Megafuge 1.0 R; Universal 16	Eppendorf, Hamburg, D; und Heraeus Sepatech, Osterode, D; Hettich, Bäch, CH

### 2.1.2 Tabelle 8: Einwegmaterialien

Verwendung	Bezeichnung	Hersteller
Eppendorf-Tubes / Falcons	1,5ml; 2ml; 15ml; 50ml	TPP, Trasadingen, CH
Histologie: Einbettkassetten	Embedding cassettes „biopsy“	ISOLAB, Wertheim, D
Kanülen	Mikrolance 3 20,26, 30G	BD, Fraga, E
Pipettenspitzen	Sapphire 10, 200, 1000µl	Grainer Bio-One, Frickenhausen, D
Röntgenfilme	BioMax XAR Film Kodak	Sigma Aldrich, Deisenhofen, D
Serologische Pipetten	5ml; 10ml; 25ml Cellstar	Grainer Bio-One, Frickenhausen, D
Skalpelle	Disposable Scalpel	Feather Safety Razor Co., LTD, Osaka, J
Spritzen	Diskardit II 1, 2, 5ml	BD, Fraga, E
Sterile Einwegpinzetten	Pinzette-steril-	Angiokard Medizintechnik GmbH & Co.KG, Friedeburg, D
Steriles Filtersieb (Zellisolation)	MACS Pre-Separation Filter 30µm; Cell strainer 70µm	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D; BD Falcon, Franklin Lakes, US
Sterilfiltersystem	Vakuumfiltrationssystem 150, 500ml	TPP, Trasadingen, CH
Whatman Papier		Sigma Aldrich, Deisenhofen, D
6 / 12 / 96-Well-Platten Zellkultur	Zellkulturtestplatte 6 / 12 / 96F	TPP, Trasadingen, CH
96-Well-Platten ELISA	NUNC-ImmunoPlate F96, Maxi-sorp	Thermo Scientific, Waltham, US
Westernblot Membran	Immobilon-P transfer membrane 0,45µm pore size	Millipore, Merck, Darmstadt, D
Zellschaber	Cell Scraper 24 cm	TPP, Trasadingen, CH
Zelltrennungs-Säulen	MidiMACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D

### 2.1.3 Tabelle 9: Kits

Verwendung	Kit	Hersteller
ELISA-Kits	Pentraxin 3/TSG-14 DUOSet	R&D, Minneapolis, US
	IgG-1-; IgG-2a-; IgG-2b-; IgG-3-; IgE- ELISA;	Bethyl, Hamburg, D
	OptEIA-mouse-IL-1 β; -mouse-IL-6; -mouse-IL-10; -mouse-IL-12(p40); -mouse-IL-12(p70); -mouse-MCP-1	BD, Franklin Lakes, US
	Mouse IL-18 Platinum ELISA; Ready-Set-Go-IL-4; -IL-21; -IL-22; -IL-23	eBioscience, San Diego, US
	ELISA MAX mouse -IL-17A; -TNF-α	BioLegend, San Diego, US
	Albumin ELISA	Bethyl, Hamburg, D
	Mouse TGF-β1 DuoSet	R&D, Minneapolis, US
Intrazelluläre Färbung	Cytofix/Cytoperm Plus	BD, Franklin Lakes, US
Kreatinin Bestimmung	Creatinine FS	Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, D
LDH-Assay	Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche, Mannheim, D
RNA Isolation	Ambion PureLink RNA Mini Kit	Life technologies GmbH, Darmstadt, D
TGF-β-RT-PCR Arrays	TGF-β Signaling Targets PCR Array Maus; RT <sup>2</sup> SYBR Green qPCR Master-Mix	Qiagen, Hilden, D
Zell-Proliferationsassay	Cell Titer 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega GmbH, Mannheim, D



## 2.1.4 Tabelle 10: Chemikalien, Reagenzien, Medien, Liganden

Verwendung	Bezeichnung	Hersteller
Antibiotika	Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Pasching, A
Antikoagulation, „Cell detachment“	EDTA	PAN Biotech KG, Berlin, D
Bradford Reagenz	BIO-RAD Proteinassay	BIO-RAD, München, D
ELISA Coating	Poly-L-Lysine	Cultrex, Trevigen, Gaithersburg, US
ELISA Signaldetektion	OptEIA	BD
Färbung toter Zellen	Trypan Blau	Sigma, Deisenhofen, D
Genotypisierung	Agarosepulver; DNA Ladder Low range; Loading Dye (6x); Ethidiumbromid; Primer; Proteinkinase K	Invitrogen, Karlsruhe, D; Fermentas, St. Leon-Rot, D; Roth, Karlsruhe, D; Metabion, Martinsried D; Merck, Darmstadt, D
Gewebefixierung	Formaldehydlösung 18 %	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Gewebelagerung	RNAlater	Qiagen GmbH, Hilden, D
Liganden (TLR)	CpG; LPS; Imiquimod;	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Liganden (weitere)	Lipofectamin; mTGF- $\beta$ 1; ATP; rmTNF- $\alpha$ ; Goat Anti-mouse IgM; Peroxidase Conjugate	Invitrogen, Eugene, US; Cell Signalling, Boston, US; InvivoGen, San Diego, US; R&D Systems Minneapolis, US; Millipore, Billerica, US
Lysispuffer	NH <sub>4</sub> Cl (Ammoniumchlorid)	Merck, Darmstadt, D
Milchpulver	Skim milk powder	Merck, Darmstadt, D
Mounting-Medium	Mounting medium with DAPI	Vector Lab, Peterborough, UK
Myeloische Zelldifferenzierung	rmFlt3; rmGM-CSF; rmM-CSF	ImmunoTools, Friesoythe, D
Narkosegas	Isofluran Forene	Abbott, Wiesbaden, D
Protein Marker	peqGOLD Protein-Marker IV	PeqLab Biotechnologie, Erlangen, D
Proteinverarbeitung	Complete protease inhibitor cocktail; Phosphatase Inhibitor Cocktail 2; $\beta$ -Mercaptoethanol	Roche Diagnostics, Mannheim, D; Sigma-Aldrich, Steinheim, D; Roth, Karlsruhe, D
Reverse Transkription	Acrylamid; Hexanucleotide; 25mM dNTPs; RNAsin	Ambion, Darmstadt, D; Roche, Mannheim, D; GE Healthcare, München; Promega, Mannheim, D
	0,1M DTT; 5x First strand Buffer; Superscript II	Invitrogen, Karlsruhe, D
RNA Isolation	Ethanol zur Analyse	Merck, Darmstadt, D
Röntgenentwickler	Developer; Rapid fixer	AGFA, Mortsel, B
RT-PCR	SYBR Green Dye; Taq DNA-Polymerase; 10xPE-Puffer; 1,25mM dNTPs; 25mM MgCl <sub>2</sub>	Applied Biosystems, Norwalk, US; New England BioLabs, Ipswich, US; Finnzymes, Espoo, FIN; Metabion, Martinsried, D; Fermentas, St. Leon-Rot, D
Sonstige Chemikalien	Glycin; H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; Tris; Acrylamid HCl; NaCl; DMSO; Urea; APS; Natriumazid; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; KCl; Methanol; H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% Tween-20	Roth, Karlsruhe, D Merck, Darmstadt, D
	SDS; TEMED	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D BioRad, München, D
Supplement; Blockierung	BSA (Bovines Serum Albumin); FCS (Fetales Kälberserum)	Roche Diagnostics, Mannheim, D; Biochrom KG, Berlin, D
Westernblot Signaldetektion	ECL plus chemiluminescent kit	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, D
Zellisolation, Wasch-Puffer	Dulbecco's PBS (1x)	PAN Biotech KG, Aidenbach, D
Zellkulturmedium	RPMI 1640-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, D
Zelllyse, Histologie, Zellkultur	Triton X-100	Fluka, Chemie AG, Buchs, CH

### 2.1.5 Tabelle 11: Pufferzusammensetzung

Verwendung	Puffer	Zusammensetzung / Hersteller
Agarose Gel	TBE-Puffer	55g Borsäure, 108g Tris 5,84g EDTA, 10L H <sub>2</sub> O
Durchflusszytometrie	FACS Puffer	DPBS: 500ml; BSA: 1g; Natriumazid: 0,1%
ELISA	Annexin binding Puffer 0,05M NaBicarbonatpuffer	BD Pharmingen, Heidelberg, D NaHCO: 2,1g; Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> : 2,645g; auf 500ml
	PBS (10x)	NaCl: 80,0g; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> : 11,6g; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : 2,0g; KCl: 2,0g; auf 1L mit Wasser; titrieren (pH7,0)
	Tris-NaCl (10x)	Tris: 60,57g; NaCl: 81,816g auf 1L (pH 8,0)
Proteinextraktion	RIPA Puffer	Sigma Aldrich, St. Louse, US
SDS Gelelektrophorese	Loading Dye (4x)	Millipore Wasser: 3,8ml; 0,5M Tris HCl (pH 6,8): 1ml ; Glycerol: 0,8ml; 10% SDS: 1,6ml; β-Mercaptoethanol: 0,4ml; 1% (w/v) Bromophenol blau: 0,4ml (Gesamt 8ml)
Western Blotting	Running Puffer (Lämml)	Tris: 3g; Glycin14,4g; SDS: 1g; ad 1Liter (pH 8,3)
	Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, Rockford, US
	TBS (x10)	Tris: 24,23g; NaCl: 80,06g mit Wasser und HCl auf 1000ml (pH 7,6)
	TBS-T	TBS + 0,05% Tween
	Separating Puffer (1,5mM)	Tris: 18,2g; 100ml (pH 8,8)
	Stacking Puffer (0,5mM)	Tris: 6,05g; 100ml (pH 6,8)
	Transfer-Puffer	Tris: 1,5g; Glycine: 7,2g; auf 500ml mit Wasser

### 2.1.6 Tabelle 12: Mausstämme

Hintergrund	Stamm	Vertrieb / Herkunft
C57BL/6	C57BL/6	Jackson Laboratories, Bar Harbour, Maine, US
C57BL/6 <sup>lpr/lpr</sup>	ASC <sup>-/-</sup> (BL/6 Hintergrund); NLRP3 <sup>-/-</sup> (BL/6 Hintergrund)	Dr. Dan Muruve, Universität von Calgary, CAN
	C57BL/6 <sup>lpr/lpr</sup>	Charles River Laboratories, Calco, Italien
	ASC <sup>-/-</sup> bzw. NLRP3 <sup>-/-</sup> BL/6 <sup>lpr/lpr</sup>	Laborinterne Tierzucht

### 2.1.7 Tabelle 13: Primer für RT-PCR

Quelle: Metabion, Martinsried, D

Gen	Accession Nummer	Sequenz
APRIL	NM_001159505.1	forward primer: 5'- GTTGCTCTTTGGTTGAGTTGGG -3' reverse primer: 5'- GTTGGATCAGTAGTGCGACAGC -3'
ASC	NM_023258	forward primer: 5'- GAGCAGCTGCAAACGACTAA -3' reverse primer: 5'- GCTGGTCCACAAAGTGTCT -3'
BAD	NM_007522	forward primer: 5'- GTACGAACTGTGGCGACTCC -3' reverse primer: 5'- GAGCAACATTCATCAGCAGG -3'
BAX	NM_007527	forward primer: 5'- GATCAGCTCGGGCACTTTAG -3' reverse primer: 5'- TTGCTGATGGCAACTTCAAC -3'
BCL6	NM_009744	forward primer: 5'- AGTTTCTAGGAAAGGCCGGA -3' reverse primer: 5'- ACTAGCGTGCCGGGTAAACT -3'
BID	NM_007544	forward primer: 5'- GTGTAGCTCCAAGCACTGCC -3' reverse primer: 5'- GCAAACCTTTGCCTTAGCC -3'
BIM	NM_009754	forward primer: 5'- GCCCTACCTCCCTACAGAC -3' reverse primer: 5'- GCTCCTGTGCAATCCGTATC -3'
BLIMP1	NM_007548	forward primer: 5'- ACCAAGGAACCTGCTTTTCA -3' reverse primer: 5'- TAGACTTCACCGATGAGGGG -3'
BLyS	NM_033622	forward primer: 5'- CCTCCAAGGCATTTCTCTT -3' reverse primer: 5'- GACTGTCTGCAGCTGATTGC -3'
Caspase-1	NM_009807	forward primer: 5'- TCAGCTCCATCAGCTGAAAC -3' reverse primer: 5'- TGGAAATGTGCCATCTTCTTT -3'
Caspase-3	NM_009810	forward primer: 5'- TGCTGGTGGGATCAAAGC -3' reverse primer: 5'- TGAATCCACTGAGGTTTTGTTG -3'
Caspase-7	NM_007611	forward primer: 5'- AAGCCAGACCGCTCCTCTAT -3' reverse primer: 5'- ACAGATAAGTGGGCACTCGG -3'
Caspase-8	NM_009812	forward primer: 5'- GCAGGTACTCGGCCACAG -3' reverse primer: 5'- TGTGGGATGTAGTCCAAGCA -3'
Caspase-9	NM_015733	forward primer: 5'- AGCCAGAGGTTCTCAGACCA -3' reverse primer: 5'- CATATCTGCATGTCCCCTGA -3'
CD180	NM_008533	forward primer: 5'- GAGCCACCACATCCTCAGAT -3' reverse primer: 5'- TGAGTTTGGTAAAGTGCCAGG -3'
CENTB1	NM_153788	forward primer: 5'- CCTCGATTGAACTGGTGGAA -3' reverse primer: 5'- AGGTAATGCTGTCCGCTCTC -3'
Clec4a2	NM_011999	forward primer: 5'- GCACAATGAATTGAAGTGCAC -3' reverse primer: 5'- GGAACCAAGTAGCAGTGGGA -3'
CYLD	NM_173369	forward primer: 5'- GGGATGGAAGGTTTGATGG -3' reverse primer: 5'- CTCCTTTCCTGTGTACGCT -3'
Dock2	NM_033374	forward primer: 5'- TGAGCATGGAACAAGCTGAT -3' reverse primer: 5'- TCGACTATGGCAACAAAATCC -3'
DOK2	NM_010071	forward primer: 5'- ATGGTCAGGATGGAGGAGC -3' reverse primer: 5'- ATATAACACGGCTGCGAACC -3'
DUBA	NM_138604	forward primer: 5'- AGCGGGCTACAACAGTGAAG -3' reverse primer: 5'- AAGGCCTTTTCAAACCAGTG -3'
ERBIN	NM_021563	forward primer: 5'- GCCCTGAGACACCCTGAGA -3' reverse primer: 5'- CAACCGCACAAACAACTTC -3'
IFIT1	NM_008331	forward primer: 5'- CAAGGCAGGTTTCTGAGGAG -3' reverse primer: 5'- GACCTGGTCACCATCAGCAT -3'
IFIT3	NM_010501	forward primer: 5'- TTCCCAGCAGCACAGAAAC -3' reverse primer: 5'- AAATTCCAGGTGAAATGGCA -3'
IFN- $\gamma$	NM_008337	forward primer: 5'- ACAGCAAGGCCGAAAAAGGAT -3' reverse primer: 5'- TGAGCTCATTGAATGCTTGG -3'
IL-6	NM_031168	forward primer: 5'- TGATGCACTTGCAGAAAACA -3' reverse primer: 5'- ACCAGAGGAAATTTTCAATAGGC -3'
IL-12-p40	NM_008352	forward primer: 5'- CTAGACAAGGGCATGCTGGT -3' reverse primer: 5'- GCTTCTCCCACAGGAGGTTT -3'
IRAK-M	NM_028679	forward primer: 5'- CACTGCTGGGAGAGCTTTG -3' reverse primer: 5'- CCAGCCAGCTGTTTGAAAGT -3'

Gen	Accession Nummer	Sequenz
IRF4	NM_013674	forward primer: 5'- CAACCGCACAAACAACTTC -3' reverse primer: 5'- CAAAGCACAGAGTCACCTGG -3'
MCP-1	NM_011333	forward primer: 5'- CCTGCTGTTACAGTTGCC -3' reverse primer: 5'- ATTGGGATCATCTTGCTGGT -3'
Mx1	NM_010846	forward primer: 5'- TCTGAGGAGAGCCAGACGAT -3' reverse primer: 5'- CTCAGGGTGTGATGAGGTC -3'
MHCII	NM_010378	forward primer: 5'- TGTACTGGCCAATGTCTCCA -3' reverse primer: 5'- CTCTGATTCTGGGGGTCCTC -3'
NLRP 3	NM_145827	forward primer: 5'- AGAAGAGACCACGGCAGAAG -3' reverse primer: 5'- CCTTGGACCAGGTTTCAGTGT -3'
NLRX1	NM_178420.3	forward primer: 5'- CACCTGGGTACCTTCGTGTT -3' reverse primer: 5'- GCCCACAAATTCAACCACTT -3'
NFκB-p50	NM_008689	forward primer: 5'- CATCACACGGAGGGCTTC -3' reverse primer: 5'- GAACGATAACCTTTGCAGGC -3'
NFκB-p65	NM_009045	forward primer: 5'- GAGTCTCCATGCAGCTACGG -3' reverse primer: 5'- CGTTCTCTTCAATCCGGT -3'
RIPK1	NM_009068	forward primer: 5'- GAAGACAGACCTAGACAGCGGA -3' reverse primer: 5'- CAGTAGCTTCACTACTCGACTG -3'
RIPK3	NM_019955	forward primer: 5'- CTGTCAAGTTATGGCCTACTGGTG -3' reverse primer: 5'- GAACACGACTCCGAACCCTC -3'
SHIP	NM_010566	forward primer: 5'- GCTGTTCCGGAATTGTGTTT -3' reverse primer: 5'- GTGAAGAACCCTCATGGGGAC -3'
SHP1	NM_013545	forward primer: 5'- GTACCCACTGAACTGCTCGG -3' reverse primer: 5'- ATCACCAGGTTGGCTGAGAC -3'
SHP2	NM_011202	forward primer: 5'- GACGGGAGGAACATGACATC -3' reverse primer: 5'- AAAACTGCCATCGACTCCTC -3'
SIKE	NM_025679	forward primer: 5'- TTCAGGTGGACGATAACCAA -3' reverse primer: 5'- GAGATTCCTGCTGATGGACAG -3'
SIGIRR	NM_023059	forward primer: 5'- GGATGACAAAGATCCCATGC -3' reverse primer: 5'- ATGCAGATCCTGGTTTCCTG -3'
SOCS1	NM_009896	forward primer: 5'- ACTTCTGGCTGGAGACCTCA -3' reverse primer: 5'- ACAAGCTGCTACAACCAGGG -3'
SOCS3	NM_007707	forward primer: 5'- AAGGCCGGAGATTTTCGCT -3' reverse primer: 5'- AACTTGCTGTGGGTGACCAT -3'
ST2	NM_010743	forward primer: 5'- TGACGGCCACCAGATCATTACAG -3' reverse primer: 5'- GCCAAAGCAAGCTGAACAGGCAATAC -3'
TACI	NM_021349.1	forward primer: 5'- GGTCCAGGATTGAGGCTAAGTA -3' reverse primer: 5'- GGAGAGTTTGCTTGTGACCCA -3'
TANK	NM_011529	forward primer: 5'- GCTTCCAGAATGGGTACGTG -3' reverse primer: 5'- TGGTAGGAATGCCAGCTCTC -3'
Tbet	NM_019507	forward primer: 5'- TCAACCAGCACCAGACAGAG -3' reverse primer: 5'- ATCCTGTAATGGCTTGTGGG -3'
Tnf-α	NM_013693.2	forward primer: 5'- CCACCACGCTCTTCTGTCTAC -3' reverse primer: 5'- AGGGTCTGGGCCATAGAACT -3'
TLR-2	NM_011905	forward primer: 5'- CATCACCGGTCAGAAAACAA -3' reverse primer: 5'- ACCAAGATCCAGAAGAGCCA -3'
TLR-4	NM_021297	forward primer: 5'- TGTTCTTCTCCTGCCTGACA -3' reverse primer: 5'- TGTCATCAGGGACTTTGCTG -3'
TLR-7	NM_133211	forward primer: 5'- GGATGATCCTGGCCTATCTC -3' reverse primer: 5'- TGTCTCTCCGTGTCCACAT -3'
TLR-9	NM_031178	forward primer: 5'- CAGTTTGTGAGAGGGAGCCT -3' reverse primer: 5'- CTGTACCAGGAGGGACAAGG -3'
TOLLIP	NM_023764	forward primer: 5'- GCGGGTCTCTGTGCAGTT -3' reverse primer: 5'- TGTGGGTGTTATACGGAGGAA -3'
18s	NR_003278	forward primer: 5'- GCAATTATTCCCATGAACG -3' reverse primer: 5'- AGGGCCTCACTAAACCATCC -3'

### 2.1.8 Tabelle 14: Antikörper für Immunhistologie, Durchflusszytometrie etc.

Verwendung	Bezeichnung / Zielstruktur	Hersteller	
Durchflusszytometrie	Anti-Maus CD3e FITC; Anti-Maus CD4 APC; Anti-Maus CD8 PerCP; Anti-Maus CD11c PE; Anti-Maus CD25 PerCP; Anti-Maus CD21 FITC; Anti-Maus CD23 PE; Anti-Maus B220 APC; Anti-Maus IgM PE; Anti-Maus IgD FITC; Anti-Maus $\kappa$ -Leichtkette PE; Anti-Maus CD138 APC; Anti-Maus CD44 PE; Anti-Annexin FITC; Propidiumiodid	BD Pharmingen, Heidelberg, D	
	Anti-Maus CD5 PE	BD Bioscience, Heidelberg, D	
	Anti-Maus foxP3 PE	BioLegend, San Diego, US	
	Anti-Maus MHCII FITC	eBioscience, San Diego, US	
	Anti-Maus F <sub>4/80</sub> APC; Anti-Maus CD19 FITC	AbD SeroTec, Düsseldorf, D	
	Anti-Maus CD69 PE	Caltag Laboratories, Buckingham, UK	
	Immunhistologie	Anti-CD11c, Anti-Maus CD45	BD, Franklin Lakes, US
		Anti-gespaltene Caspase-3 (polyklonal #9661)	Cell signalling, Danvers, US
		Anti-Maus C3c complement GAM/C3c/FITC	Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, NL
		Anti-Maus CD3e	BD Pharmingen, San Diego, US
Anti-Maus CD19		Antibodies-online.de	
Anti-Maus Ki-67		Dako Cytomatic, Hamburg, D	
Anti-Maus MAC2		Cedarlane, Eching, D	
Anti-Maus -neutrophil		AbD SeroTec, Düsseldorf, D	
Anti-Maus IgM; Anti-Maus IgG		Caltag Laboratories, Burlingame, CA, US	
Anti-Smad2/3		Cell Signaling, Boston, US	
Dapi Kernfärbung	Vector, Burlingame, US		
Goat Anti-mouse IgG; rat adsorbed, FITC conjugate	Invitrogene, Camarillo, US		
Goat Anti-rabbit IgG Biotin konjugiert; Streptavidin –Alexa fluor	Vector Laboratories Burlingame, CA, US		
Magnetische beads	CD19 MicroBeads; CD11c MicroBeads; Dead Cell Removal Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D	
Westernblot	Anti-gespaltene Caspase-1 p10 Phospho-Smad2 (Ser465/467); Anti- $\beta$ -Aktin; HRP-konjugierter Anti-rabbit-IgG; Anti-gespaltene Caspase-3	Santa Cruz, Heidelberg, D Cell Signalling, Danvers, US	

## 2.2 Zellkultur

### 2.2.1 Isolation primärer Zellen aus Milz, Knochenmark und Thymus

Die Gewinnung der Zellen erfolgte aus den jeweiligen Organen von Mäusen im Alter von 4-6 Wochen für Thymozyten, 6-10 Wochen für Splenozyten und BMDCs, um dem altersabhängigen Optimum für die Zelltypen Rechnung zu tragen. Bei vergleichenden Experimenten zwischen den einzelnen Mauslinien wurden Altersunterschiede von wenigen Tagen akzeptiert, um alle Zelltypen gleichzeitig isolieren und stimulieren zu können.

Zu Beginn wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, auf einem sauberen Arbeitsbrett fixiert und mit Ethanol besprüht. Die Eröffnung des Situs, Organentnahme und Prozessierung erfolgte unter sterilen Konditionen unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse II, mit

sterilem Besteck. Zwischen den Arbeitsschritten wurden die Organe oder Zellsuspensionen in DPBS (Thymozyten und Splenozyten) bzw. RPMI (BMDCs) auf Eis kühl gelagert.

### 2.2.2 Verarbeitung primärer muriner Zellen

Unmittelbar nach der Isolation primärer Zellen erfolgte die Bestimmung der Zellausbeute mittels einer Neubauer-Zählkammer. Abhängig von Größe des Zellpellets und der gewählten Vorverdünnung wurde dazu eine 1:5- bis 1:100-fache Verdünnung der ursprünglichen Zellsuspension in DPBS ohne Calcium- und Magnesium-Ionen hergestellt. Die wiederum 1:1 mit Trypanblau verdünnt und in die Kammer pipettiert wurde. Die korrekte Montage der Zählkammer wurde durch das Erscheinen von Newtonschen Interferenzfarben überprüft. Die Zellzahl [n-facher Verdünnungsfaktor  $\times 10^4$ /(ml DPBS)] wurde in der Folge durch manuelles Auszählen von 4 Gruppenquadraten und anschließender Mittelung dieser Werte bestimmt. Die Zugabe des Trypanblaus erfolgte erst unmittelbar vor der Auszählung, um keinen artifiziellen Anstieg der toten Zellmenge zu erzeugen. Trypanblau ist ein anionischer Diazol-Farbstoff mit Affinität zu Proteinen. Seine Struktur verbietet ihm die Passage unversehrter Zellmembranen, so dass er selektiv nur sterbende oder tote Zellen mit verllorener Membranintegrität penetrieren und zytosolische Proteine blau färben kann\*. Blaue, also nicht vitale, Zellen wurden daher von der Zählung ausgeschlossen. Entsprechend der errechneten Zellzahl wurde mit dem geeigneten Medium auf die gewünschte Zellmenge/ml verdünnt und anschließend ausplattiert.

Die Bebrütung der primären Zellen nach der Isolation erfolgte in einem Brutschrank unter konstanten Umgebungsbedingungen von 37°C und einem Kohlendioxidanteil von 5%. Der weitere Umgang mit selbigen erfolgte ausschließlich unter sterilen Konditionen. Um dies zu gewährleisten, wurden die Zellkulturplatten nur innerhalb einer Sicherheitswerkbank der Klasse II geöffnet, die mindestens einmal täglich einer UV-Bestrahlung ausgesetzt und vor und nach Gebrauch mit 70%-igem Ethanol ausgewischt wurde. Kritische Zellkulturgegenstände, wie Pipettenspitzen oder serologische Pipetten, wurden vor Gebrauch bei 120°C für 20min autoklaviert, beziehungsweise als steril verpackte Einmalprodukte bezogen.

**Isolation von primären murinen Thymozyten:** Nach Entnahme der beiden Thymuslappen wurden diese mit der Rückseite eines sterilen Spritzenkolbens auf einen Nylonnetz mit Porengröße 70µm zerrieben. Der Filter wurde mit PBS gespült, bis ausschließlich fettreiche, nicht zerreibbare Bestandteile in ihm zurückblieben. Der Durchfluss mit den Organbestandteilen wurde in einem 50ml FALCON gesammelt. Anschließend wurde für 5min bei 230 x g und 4°C zentrifugiert. Auf eine Lyse der roten Blutzellen wurde bei diesem Protokoll verzichtet, da oh-

---

\* <http://de.wikipedia.org/wiki/Trypanblau>\_17.10.2014

nehin wenige Erythrozyten im Pellet waren und die Thymozyten nicht unnötig gestresst werden sollten. Nach Verwerfen des Überstandes wurde daher in 3ml DPBS resuspendiert und die Suspension wurde durch ein 30µm Zellsieb in ein 15ml FALCON überführt, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Anschließend wurde noch zweimal mit DPBS gewaschen (Zentrifugation: 5min, 230 x g, 4°C) und in 2 bis 3ml DPBS resuspendiert und gezählt. Es wurden 5 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Well in 6-Well-Platten bzw. 500 x 10<sup>3</sup> in 96-Well-Platten in RPMI mit 5% FBS und 1% Penizillin und Streptomycin ausplattiert.

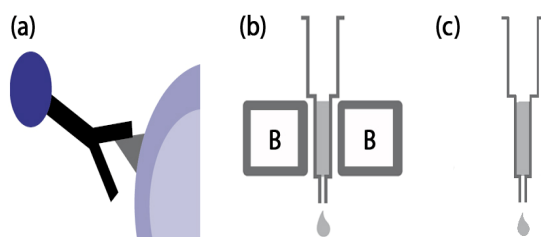
**Isolation von primären murinen Splenozyten:** Bis zur ersten Zentrifugation wurde analog zur Thymozytenisolation verfahren. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet allerdings in 3-5ml sterilfiltrierter 0,155-molarer Ammoniumchloridlösung (NH<sub>4</sub>Cl) in Wasser resuspendiert und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um osmotische Lyse der roten Blutzellen herbeizuführen. Anschließend wurde mit DPBS auf 50ml aufgefüllt, um den Prozess zu beenden, und wieder bei 230 x g und 4°C 5 Minuten lang zentrifugiert. Um Reste der Lyse-lösung zu entfernen, wurde noch zweimal gewaschen (wie oben) und anschließend durch einen 30µm-Filter passiert, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Plattiert wurden nach Zählung zwischen 3 bis 5 x 10<sup>6</sup> Zellen pro 6-Well-Platte in RPMI-Medium mit FCS Konzentrationen von 1-10% und 1% Penicillin/Streptomycin-Antibiose.

**Isolation von Bone Marrow Dendritic Cells (BMDCs):** Nach Tötung der Maus wurden untere und obere Extremität von Haut befreit, die Extremitäten an Hüfte bzw. Schulter exartikuliert und unterhalb der Tibia bzw. des Radius abgesetzt. Daraufhin wurden die Muskelpakete von den Knochen entfernt, die gesäuberten Knochen in einem 50ml FALCON in RPMI gesammelt und auf Eis gelagert. Schnellstmöglich wurde mit der Isolation fortgefahren, indem die Enden der Knochen mit einer sterilen Schere gekappt wurden, um sie mit RPMI-Medium durch eine 26G Nadel zu perfundieren, bis sich der Knochen gänzlich weiß färbte. Dabei wurde das zellhaltige Mark aus dem Knochen gespült und in einer Petrischale aufgefangen. Nach Verarbeitung aller Knochen wurde das in die Petrischale gespülte Mark durch Einziehen und Ausspülen durch eine 20G Nadel homogenisiert, in ein 50ml FALCON überführt und zentrifugiert (230 x g, 5min, 4°C). Rote Blutzellen und deren Vorläufer wurden durch Resuspension des Pellet in 3-5ml 0,155-molarer Ammoniumchloridlösung für 5 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Das nachfolgende Verfahren glich dem der Splenozyten-Isolation. Die Zellen wurden in RPMI mit 10% FCS und 1% Penizillin/Streptomycin ausplattiert, welches für die folgende Woche mit 1µg/ml GM-CSF supplementiert wurde, um die Zellen auszudifferenzieren. Das Protokoll sah am Tag 2 nach der Isolierung die Zugabe von 1ml Medium pro Well der 12-Well-Platten vor.

Am Tag 5 wurde ein Medienwechsel vorgenommen, um am Tag 7 in selbigem die Stimulation der Zellen durchzuführen.

### 2.2.3 Positive Selektion von Milzzellen durch MACS Magnetic Cell Separation

Mit dem MACS Microbeads System von Miltenyi ist es möglich, selektiv bestimmte Zellpopulationen aufgrund ihrer CD-(Cluster Of Differentiation)-Oberflächenmarker zu isolieren oder depletieren. Das Verfahren basiert auf hochselektiven Antikörpern gegen bestimmte Oberflächenantigene auf der Zelloberfläche, die mit superparamagnetischen Partikeln verbunden sind. Man inkubiert die Zellmischpopulation, z.B. Splenozyten oder Lymphozyten, für 20 Minuten bei 4°C in 90µl Isolationspuffer und 10µl Microbeads pro  $1 \times 10^6$  Zellen und passiert diese Suspension anschließend durch eine Säule, auf welche ein starkes B-Feld wirkt. Jene Zellen, an die aufgrund ihres Oberflächenmarkerbesatzes ein Antikörper mit Microbeads gebunden hat, können die Säule nicht passieren und werden nach Entfernen des Magnetfeldes separat in ein frisches 15ml FALCON eluiert (siehe hierzu Abbildung 10). Vor der Passage der Zellen durch die Säulen wurden diese mit 3ml des Isolationspuffers vorgespült. Dieser Puffer bestand aus DPBS, pH 7,2, 0,5% BSA zum Blockieren unspezifischer Bindung und 2mM EDTA zur Vermeidung von Zellklumpung und wurde im Anschluss an die Herstellung sterilfiltriert. Laut Angaben des Herstellers erfolgen aufgrund des geringen Durchmessers der Microbeads von 50nm keine unspezifischen Quervernetzungen von Oberflächenrezeptoren und somit auch keine Zellaktivierung. Die durch anschließende Durchflusszytometrie bestimmte Reinheit der Population betrug zwischen 70-80%. Zum Einsatz kamen CD19-Microbeads zur Positivselektion [120].



**Abbildung 10: Prinzip der magnetischen Zellseparation (Positivselektion);** modifiziert aus der Versuchsanleitung Miltenyi Biotec [120]: (a) Inkubieren von Zellen mit Microbeads; (b) Die Passage der markierten Zellen durch die MACS-Säule unter externem B-Feld hält solche mit gebundenem Antikörper zurück. (c) Nach Entfernen des Magnetfeldes können letztere eluiert werden.

### 2.2.4 Entfernung toter Zellen aus Zellisolaten

Für die Durchführung von Zelltodanalysen oder nach bestimmten Isolationsverfahren, die eine steigende Anzahl toter Zellen mit sich brachten, war es nötig, sterbende Zellen vor dem Ausplattieren zu entfernen. Hierzu wurde das Dead Cell Removal Kit von Miltenyi Biotec verwendet. Laut Herstellerangaben erkennen die Beads ein Antigen in der Membran von toten und sterbenden Zellen. Evtl. handelt es sich um Phosphatidylserin. Zunächst wurden die Zellen im Binding-Puffer des Kits resuspendiert und anschließend bei Raumtemperatur mit den Micro-



beads für 15 Minuten inkubiert. Auf die mit Puffer vorbereitete Säule im Magnetfeld wurde die Zellsuspension anschließend aufgetragen. Die Säule wurde danach verworfen und der Durchfluss als lebende Fraktion weiter prozessiert (siehe auch Abbildung 10).

### **2.2.5 Stimulation der Splenozyten, BMDCs bzw. Thymozyten**

Die isolierten Zellen wurden nach dem Aussäen für unterschiedliche Zeiträume, 4-6h für anschließende RNA Extraktion und 24-72h zur Messung von Interleukinen im Überstand, mit verschiedenen Substanzen stimuliert.

Zum Einsatz kamen als TLR Liganden: Imiquimod (5µg/ml), CpG (10µg/ml), LPS (1µg/ml) und Poly I:C (0,5µg/ml). Poly I:C wurde zuvor mit Lipofectamine co-inkubiert, um den intrazellulären Rezeptor erreichen zu können. Für in vitro Zelltodexperimente an Thymozyten bzw. BMDCs wurde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM); verwendet.

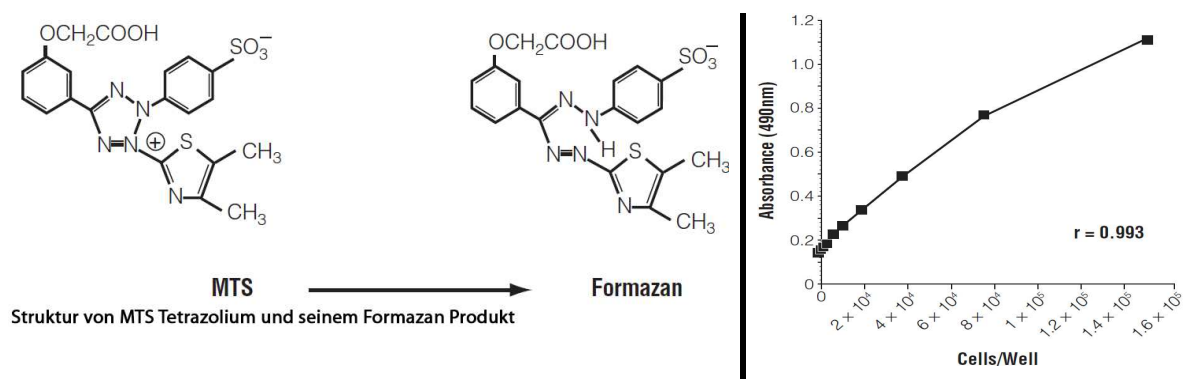
Zur Durchführung des Westernblots auf phosphoryliertes SMAD2 (p-SMAD2) und zur Überprüfung der nukleären Translokation des SMAD2/3-Komplexes wurden BMDCs aus Wildtyp bzw. NLRP3<sup>-/-</sup> bzw. ASC<sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäusen nach Ausdifferenzierung mittels GM-CSF für 30min mit 1 und 10ng rekombinantem TGF-β1 stimuliert und nach Verwerfen des Überstandes in RIPA-Puffer mit Proteinaseinhibitor und Phosphataseinhibitor lysiert.

### **2.2.6 In vitro Phagozytoseassay mit FITC-konjugierten Dextranpartikeln**

Um die Phagozytosefunktion von milzresidenten Monozyten und dendritischen Zellen mit möglichst geringen Isolationsartefakten untersuchen zu können, erfolgte die Isolation und Plattierung von  $5 \times 10^6$  Splenozyten pro Well wie beschrieben in RPMI mit 5% FCS und 1% Penicillin- und Streptomycin-Antibiose. Da ein Großteil dieser Zellpopulation nicht adhärente B- und T-Zellen sind, wurde nach 4h initialer Inkubation das Medium wieder abgesaugt, die Platten mit DPBS gewaschen und wieder frisches Medium zugesetzt. Auf diese Weise wurden Makrophagen und dendritische Zellen aufgrund ihrer Adhäsionsfähigkeit angereichert. Durch Zugabe von 0,1µg/ml LPS ins Medium wurden die Zellen für 12h über Nacht voraktiviert. Nach Inkubation mit 0,2mg/ml FITC-konjugiertem Dextran für 120min folgte die Evaluation der Inkorporation des Farbstoffs im Durchflusszytometer. Um unspezifische Bindung der Substanz an die Zelloberfläche von aktiver Phagozytose abgrenzen zu können, wurden parallel Zellen bei 4°C im Kühlschrank oder nach Fixierung mit 3%-iger PFA-Lösung mit dem Dextrankonjugat inkubiert und gemessen.

### 2.2.7 In vitro MTS Proliferationsassay

Der hier verwendete kolorimetrische Cell Titer 96 AQ One Solution Cell Proliferation Assay beruht laut Hersteller auf der Reduktion eines Tetrazolium-Salzes (MTS) zu seinem Formazanprodukt, was mit einer Änderung der Absorption einhergeht. Der vollständige Ablauf der Reaktion erfordert dabei die Präsenz von NAD(P)H, welches nur in metabolisch aktiven, ergo vitalen Zellen regeneriert werden kann. Die gemessene Absorbance ist dabei direkt proportional zu den in Lösung befindlichen vitalen Zellen (Abbildung 11) [121]. Zur Durchführung wurden CD19+ Zellen wie beschrieben gewonnen und in einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen pro 96er-Well in FBS freiem Medium mit Penicillin und Streptomycin ausplattiert. Der Verzicht auf FBS diente zum einen dem Vermeiden unspezifischer Zellaktivierung und zum anderen dem Synchronisieren der Zellzyklen durch Nährstoffentzug. Nach 10h folgte die Stimulation der Zellen mit Imiquimod ( $5\mu\text{g/ml}$ ), CpG ( $10\mu\text{g/ml}$ ), LPS ( $1\mu\text{g/ml}$ ) oder Ziege-Anti-Maus-IgM ( $10\mu\text{g/ml}$ ). Als interne Positivkontrolle wurden zudem je 4 Well mit 10% FBS im Medium stimuliert. Da die Evaluation durch eine Absorptionsmessung zu erfolgen hatte, wurden alle Liganden aus den Stocks derart in Medium verdünnt, dass stets  $10\mu\text{l}$  Stimulus zu  $90\mu\text{l}$  zellhaltigem Medium zugesetzt werden konnte, die Schichtdicke bei der Messung folglich als konstant zu betrachten war. Nach einer Inkubationszeit von 48h wurden je  $20\mu\text{l}$  des MTS-haltigen Substrats zum Medium zugesetzt. Die Messung erfolgte anschließend nach ein-, zwei-, drei- bzw. vierstündiger Inkubationszeit bei  $37^\circ\text{C}$ .

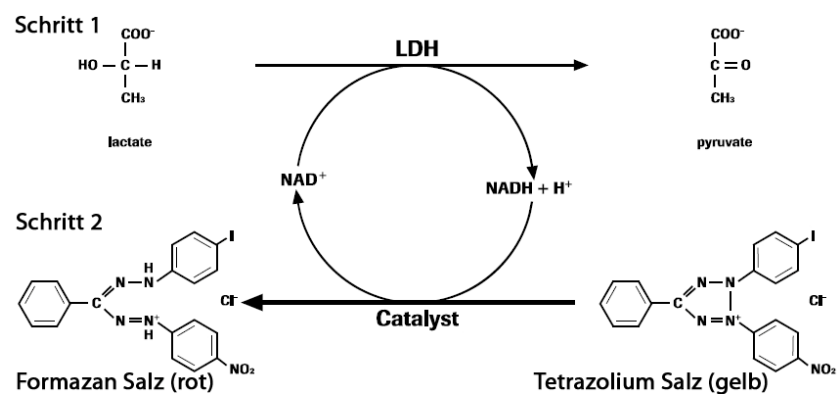


**Abbildung 11: Cell Titer 96 AQ One Solution Cell Proliferation Assay;** nach dem Online-Protokoll des Pro-mega Assays [121]; **links:** Umsetzung von MTS zu seinem Formazanprodukt; **rechts:** lineare Korrelation von Absorbance zur vitalen Zellzahl

### 2.2.8 In vitro LDH-Zelltodassay

Der LDH-Assay nutzt die enzymatische Aktivität des bei Zellyse frei werdenden und ubiquitär vorhandenen Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH), um so indirekt auf abgelaufenen Zelltod rückzuschließen. LDH, die nach Integritätsverlust der Zellmembran in den Überstand freigesetzt wird, setzt aus dem Substrat des Kits Laktat zu Pyruvat um und regeneriert dabei  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}/\text{H}^+$ , welches wiederum die Umsetzung eines Tetrazolium-Salzes (INT) zu seinem Formazanprodukt katalysiert und damit einen Farbumschlag von gelb zu rot bedingt (Abbildung 12).

Da diese zweite Reaktion, wie unter Kapitel 2.2.7 beschrieben, auch von vitalen Zellen ermöglicht wird, ist darauf zu achten, dass nur zellfreie Überstände im Test verwendet werden [122]. Zur Durchführung des Assays wurden Thymozyten isoliert und in einer Dichte von  $5 \times 10^5$  Zellen pro 96er-Well ausplattiert. Zur Induktion des Zelltods wurde  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1mM) verwendet. Als Hintergrundkontrolle dienten unstimulierte Proben. Vor Durchführung des Assays wurde zur Bestimmung der maximalen LDH-Freisetzung eine Zellysesolution Triton X-100 3% zu den Zellen gegeben. Alle Kontrollen und Stimulationen wurden mindestens in Quadrupeln durchgeführt. Nach 12-stündiger Inkubation wurden die Überstände nach Zentrifugation (10min,  $230 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ ) in eine unsterile 96-Well ELISA Platte überführt. Es folgte die Zugabe von  $100\mu\text{l}$  des Reaktionssubstrats bei Raumtemperatur im Dunklen und die Absorptionsmessung bei 492 nm. Aus den so erhaltenen Werten wurde nach folgender Formel der prozentuale Zelltod errechnet:  $\text{Zelltod (in \%)} = (\text{Absorbance der Probe} - \text{Absorbance Negativkontrolle}) / (\text{Absorbance Positivkontrolle} - \text{Absorbance Negativkontrolle})$ . Die Bestimmung der von den Angaben im Kit abweichenden optimalen Zellkonzentrationen erfolgte im Vorfeld an Thymozyten und Splenozyten von C57/BL6 Wildtypmäusen.



**Abbildung 12:** modifiziert nach [122]; zeigt die biochemischen Prozesse bei der Detektion von LDH im Überstand von Zellkulturmedien

## 2.3 Tierexperimente und Tierhaltung

### 2.3.1 Tierzucht, -haltung und Genotypisierung

Die Herkunft der C57BL/6, C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup>, ASC<sup>-/-</sup> und NLRP3<sup>-/-</sup> Mäuse ist aus der Tabelle 12 unter Material zu entnehmen. Die C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> NLRP3<sup>-/-</sup> bzw. ASC<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Doppelknockoutmäuse wurden durch Kreuzen von C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> mit NLRP3<sup>-/-</sup> bzw. ASC<sup>-/-</sup> C57BL/6 Tieren erzeugt.

Die Haltung der Versuchstiere erfolgte in Makrolone IIR, bei einer maximalen Gruppengröße von 5 Tieren pro Käfig und 12-stündlichem hell-dunkel-Zyklus. Der Zugang zu autoklaviertem Futter und Wasser erfolgte ad libitum. Der Status der Tierhaltung entsprach den Bedingungen für „Specific Pathogen Free“. Einstreu, Futter und Wasser wurden vor Gebrauch autoklaviert. Umsetzten oder Trennen der Jungtiere wurde stets in einer Sterilwerkbank durchgeführt. Die Tierversuche erfolgten gemäß den geltenden gesetzlichen Bestimmungen und waren vorab durch die Regierung von Oberbayern bewilligt worden.

Der korrekte Genotyp der jeweiligen Mäuse wurde mittels PCR überprüft. Genomische DNS wurde aus Schwanzspitzen der Mäuse gewonnen. Nach Amplifikation (PCR) der Schlüsselsequenzen (siehe Tabelle 15 bezüglich entsprechender Primersequenzen) wurden die Fragmente im Agarosegel aufgetrennt. Abweichende Längen der Amplifikate ließen auf die Versehrtheit bzw. Intaktheit der jeweiligen Gene schließen (siehe Abbildung 13 und Legende). Die Freisetzung genomischer DNS aus Schwanzspitzen erfolgte durch 4-stündigen Verdau in PBNPuffer mit Proteinkinase K (Konzentration: 20mg/ml) bei 56°C unter Schütteln im Thermoblock und anschließender Zentrifugation für 4min bei 14.000rpm. Die anschließende PCR erfolgte aus 1µl/0,5µl genomischer DNS zu 24/24,5µl Master-Mix, bestehend aus Wasser (Aqua ad iniectabilia), 25mM dNTPs Mix, 2,5µl PE-Puffer, je 0,5µl / 1µl Primer 1, Primer 2, bzw. Primer 3 und 0,2µl Taq-Polymerase (5.000 U/ml) und ggf. PCR-Optimizer. Die genauen PCR-Ansätze sind der Tabelle 16 zu entnehmen.

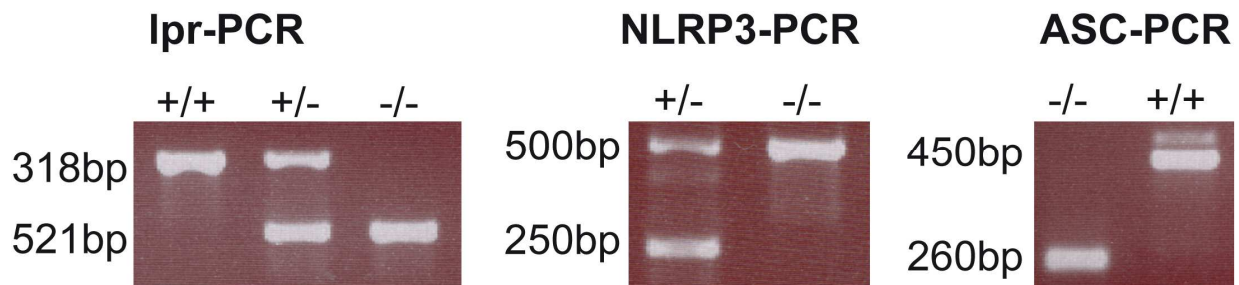
Cycling-Bedingungen wurden optimiert und dann entsprechend für die jeweiligen Genotypen beibehalten. Die amplifizierte DNS wurde nach Mischen mit Glycerinaldehydpuffer auf einem 2% Ethidiumbromid-Agarosegel (2g Agarose in 100ml TBE-Puffer, 8µl Ethidiumbromid) aufgetrennt (200V, 35min). Zum Größenvergleich diente ein DNS-Marker. Wildtyp-DNS und Wasser dienten als Negativkontrollen. Durch Anregung mit UV-Licht konnten DNS-Banden durch Ethidiumbromid im Gel sichtbar gemacht werden (Abbildung 13).

**Tabelle 15: Verwendete Primer für die Genotypisierung**

Gen	Primer Wildtyp Allel	K.O Allel
Lpr	5'- GGTGCAGCCAGAAGCTAG -3'	5'- GGTGCAGCCAGAAGCTAG -3'
	5'- GTTCCTCTTAGCATCTCTCTG -3'	5'- GTTCCTCTTAGCATCTCTCTG -3'
NLRP3	5'- ACACTGGTCATCTTCAGCA -3'	5'- AAGTCGTGCTGCTTCATCT -3'
	5'- TCAAGCTAAGAGAACTTTCTG -3'	5'- TCAAGCTAAGAGAACTTTCTG -3'
ASC	5'- CTAAGCACAGTCATTGTGAGCTCC -3'	5'- CTAGTTTGCTGGGGAAAGAAC -3'
	5'- AAGACAATAGCAGGCATGCTGG -3'	5'- AAGACAATAGCAGGCATGCTGG -3'

**Tabelle 16: PCR-Ansätze zur Genotypisierung aus genomischer DNS**

Gen	DNS ( $\mu$ l)	Master-Mix (24 / 24,5 $\mu$ l)
lpr	1,0	10xPE: 2,5 $\mu$ l; dNTPs: 4 $\mu$ l; 5xPCR Optimizer: 5 $\mu$ l; Primer1/2/3: 0,5 $\mu$ l; Taq-Polymerase: 0,2 $\mu$ l; H <sub>2</sub> O: 10,8 $\mu$ l
NLRP3	1,0	10xPE: 2,5 $\mu$ l; dNTPs: 4 $\mu$ l; 5xPCR Optimizer: 5 $\mu$ l; Primer1/2/3: 1 $\mu$ l; Taq-Polymerase: 0,2 $\mu$ l; H <sub>2</sub> O: 9,3 $\mu$ l
ASC	0,5	10xPE: 2,5 $\mu$ l; dNTPs: 4 $\mu$ l; Primer1/2/3: 1 $\mu$ l; Taq-Polymerase: 0,2 $\mu$ l; H <sub>2</sub> O: 14,8 $\mu$ l

**Abbildung 13: Beispielbilder der via Agarosegelelektrophorese durchgeführten Genotypisierung**

**Lpr-PCR** (Fas Rezeptor/lpr ursächlich für Lymphoproliferation): Wildtyp-Allel: 318bp; K.O.: 521bp; gezeigt sind WT, Heterozygotie und K.O.; **NLRP3-PCR**: Wildtyp-Allel: 250bp; K.O.: 500bp; **ASC-PCR**: Wildtyp-Allel: 450bp; K.O.: 260bp. Durch Kombination der NLRP3- bzw. ASC-PCR mit der lpr-PCR an gleichen Proben in unterschiedlichen PCR-Durchläufen wurde der Genotyp der verschiedenen lpr-Mauslinien überprüft.

### 2.3.2 Urinsammlung und Blutentnahme

Jeweils im Alter von 2, 4 und 6 Monaten erfolgte die Blutabnahme bei den Tieren. Dazu wurden die Mäuse mit einem Isofluran-Sauerstoff-Gemisch in eine kurze Narkose versetzt. Durch eine Kapillare floss das Vollblut aus dem im Augenwinkel gelegenen Venenplexus in ein mit 10 $\mu$ l 0,5-molarem EDTA vorbenetztes Eppendorf Tube. Im Anschluss erfolgten die Zentrifugation der Blutprobe und das Abpipettieren des Überstandes (Plasma).

Weiterhin wurde zu selbigen Zeitpunkten Spontanurin durch leichte Massage des Blasenbereichs gesammelt. Bis zur Analyse wurden die Proben bei -20°C gelagert.

### 2.3.3 Organentnahme und Konservierung

Nach dem Euthanasieren der Tiere im Alter von 1,5-2 Monaten bzw. 6 Monaten durch zervikale Dislokation wurden nach Eröffnen des Situs Milz, Leber-, Lungengewebe, Nieren und Lymphknoten entnommen. Das Gewicht von Milz und Lymphknoten wurde hierbei bestimmt, bevor alle entnommenen Gewebe zu ungleichen Teilen in RNAlater bei 20°C, bei -70°C, oder

in Histologiekassetten in Formalin (1,8%) konserviert wurden. Nach 24-stündiger Lagerung in dieser Lösung wurden die für die Histologie bestimmten Organteile in Paraffinblöcke eingebettet.

#### **2.3.4 Färbung und Auswertung histologischer Schnitte**

Wie beschrieben, wurden entnommene Gewebeproben in Histologiekassetten platziert und für 24h in 1,8%-iger Formalinlösung fixiert, bevor selbige in Paraffinblöcke gebettet wurden. Aus letzteren wurden mittels Kryomikrotom 2µm dünne Sektionen erstellt und auf mit Ammoniumsulfat vorbehandelte Objektträger übertragen. Nach Trocknung (12h, 37°C) erfolgte die Behandlung mit Xylol und Entfernung des Parafins mit Alkohol. Daraufhin konnten die Schnitte ihrer jeweiligen Färbung zugeführt werden.

Zur Einschätzung des histologischen Gesamtbildes wurde stets eine Periodic-Acid Schiff-(PAS)-Färbung angefertigt. Aus selbiger erfolgte auch die Quantifizierung der nephritischen Veränderungen in den Lupustieren, gemäß den auch für Menschen beschriebenen Aktivitäts- und Chronizitäts-Scores. Diese wurden bereits in anderen Arbeiten auf murine Lupusnephritis übertragen [123, 124]. Demgemäß wurden Nierenschnitte hinsichtlich glomerulärer Proliferation, Leukozyteninfiltrate, hyaliner Substanz, interstitieller Entzündung, zellulärer Halbmondformationen und Nekrosen in Glomeruli evaluiert. Jedes dieser Items wurde dabei mit 0 (keine Pathologie) bis 3 (schwerste Pathologie) beziffert, wobei Halbmonde und Nekrosen 2-fach in die Gesamtsumme eingingen. Diese wurde als Aktivitätsindex bezeichnet. Seine Punktzahl lag demnach zwischen 0-24 Punkten pro Einzelniere. Chronische Nierenschäden hingegen wurden nach 4 Kriterien – Glomerulosklerose, fibröse Halbmonde, interstitieller Fibrose und tubuläre Atrophie – ebenfalls mit je 0-3 Punkten und folglich einem Gesamtscore von 0-12 beziffert (Chronizitätsindex).

Die Menge an Komplement C3c-, IgM- oder IgG-Ablagerung innerhalb der Nierenglomeruli wurde semiquantitativ von 0-3 auf den entsprechend gefärbten Schnitten erfasst und nach Fluoreszenz- / Färbungsintensität und Verteilung (ganzer Glomerulus vs. nur lokal) bewertet. Dabei wurden 10 Glomeruli pro Niere evaluiert.

Die Infiltration von CD45- und MAC2-positiven Zellen und Neutrophilen innerhalb der Nierenglomeruli erfolgte durch Auszählen der entsprechend gefärbten Zellen in mind. 10 Glomeruli pro Niere.

Die Schwere peribronchialer Leukozyteninfiltrate wurde anhand von PAS-Schnitten ebenfalls semiquantitativ erfasst (0-3) und anschließend in gleicher Weise auf CD45 gefärbten Schnitten validiert. Auch hier entspricht der Wert 0 „keinen pathologische Veränderungen“ und 3 „massiven lymphozytären Infiltraten“.

Die Evaluation der übrigen immunhistochemischen Schnitte, wie die Färbung auf nukleär transloziertes SMAD2/3, erfolgte unter Zuhilfenahme von Adobe Photoshop 4 extended zur Flächenkalkulation.

## **2.4 Expressionsanalyse – RT-PCR / Gene Array**

### **2.4.1 Isolation von RNS aus Geweben**

Die Isolation von RNS aus Geweben erfolgte aus in RNAlater bei  $-20^{\circ}\text{C}$  konservierten Proben aus Nieren-, Milz-, und Lungengewebe. Kleine Organstücke wurden nach Umlegen in einen Lysepuffer in 2ml Eppendorf-Röhrchen mit einem elektrischen Gewebehomogenisator aufgeschlossen. Nach Überführen in 70%-igen Ethanol im Verhältnis 1:1 und einminütigem Vortexen wurden die Proben zentrifugiert und der Überstand ( $700\mu\text{l}$ ) auf Säulen des Ambion Pure-Link RNA Mini Kits geladen. Nach 30-sekündiger Zentrifugation bei  $10.000\text{rpm}$ , wobei RNS an Säulenmaterial adsorbiert wurde, erfolgten Zugabe von  $350\mu\text{l}$  Wasch-Puffer-1 und Zentrifugation für 30sec bei  $10.000\text{rpm}$ . Anschließend wurden die Säulen in selber Weise 2-mal mit je  $500\mu\text{l}$  Wasch-Puffer-2 gewaschen und zentrifugiert. Es folgte das Trockenzentrifugieren der Säule für 2min bei  $14.000\text{rpm}$  ohne Ladung der Säule mit Flüssigkeit. Danach war die RNS bereit, mit  $33\mu\text{l}$  RNase freiem Wasser (2min inkubiert) über einen weitere Zentrifugation (2min,  $14.000\text{rpm}$ ) eluiert zu werden. Die aus der Säule zentrifugierte RNS-Lösung wurde anschließend sofort auf Eis gelagert, um Degradierung zu vermeiden, bis die Konzentration und die Reinheit ( $260\text{nm}/280\text{nm}$ ) der Lösung mittels Nano Drop-(ND-1000)-Spectrophotometer bestimmt wurde. Im Anschluss erfolgte die Lagerung der Proben bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verarbeitung innerhalb der nächsten 24h.

### **2.4.2 Herstellen von cDNA**

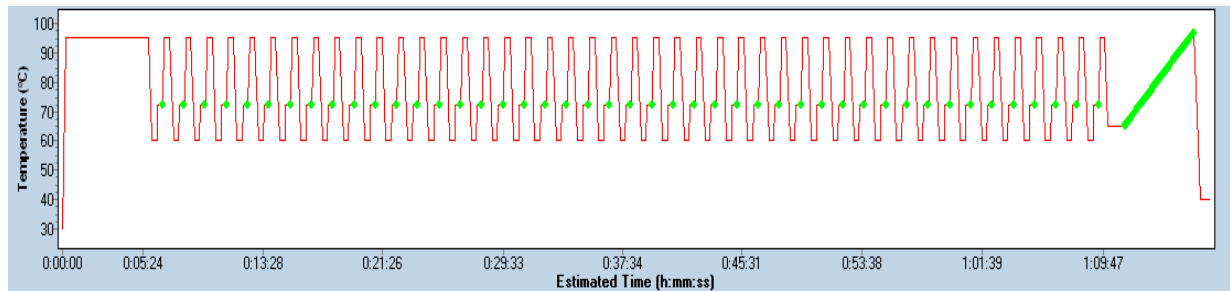
Die RNA wurde zunächst auf eine Konzentration von  $1\mu\text{g}/10\mu\text{l}$  verdünnt. Nach Linearisieren der RNA-Stränge durch 5-minütige Inkubation bei  $65^{\circ}\text{C}$  wurden die Proben mit jeweils  $10\mu\text{l}$  „Reverse Transkriptase“-Master-Mix versetzt. Dieser beinhaltete pro  $10\mu\text{l}$  verdünnter RNA-Probe  $4\mu\text{l}$  5x Puffer,  $0,4\mu\text{l}$  25mM dNTPs-Mischung,  $1\mu\text{l}$  0,1M DTT,  $0,25\mu\text{l}$  Acrylamid ( $15\mu\text{l}/\text{ml}$ ),  $0,215\mu\text{l}$  Hexanukleotide und  $3,2\mu\text{l}$  RNase freies Wasser, wozu zuletzt  $0,5\mu\text{l}$  RNasin und  $0,435\mu\text{l}$  Superscript II gegeben wurde. Nach Durchmischen der Proben wurden diese für mindestens 1,5h bei  $42^{\circ}\text{C}$  im Thermoblock inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Inaktivierung der Polymerase für 5min bei  $85^{\circ}\text{C}$ . Die Lagerung der cDNA Proben bis zur Durchführung der RT-PCR erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Es wurden einige RNA-Proben parallel zu obigem Verfahren mit einem „Reverse Transkriptase minus“-Master-Mix versetzt und inkubiert. Letzterer glich dem Master-Mix, enthielt aber anstelle der Polymerase Superscript II lediglich Wasser. Dies diente als Negativkontrolle des Transkriptionsprozesses und zum Ausschluss von unspezifischer Amplifikation bei der folgenden RT-PCR.

### 2.4.3 RT-PCR

Durch die aus organischer RNA hergestellte cDNA konnten nun mittels RT-PCR die Expressionslevel verschiedener Gene zwischen den Genotypen vergleichend quantifiziert werden. Hierbei wurde parallel zu den ablaufenden PCR-Zyklen, die ein bestimmtes Gen entsprechend einem gewählten Primerpaar amplifizieren, die Menge der erzeugten DNA bestimmt. Durch einen im Reaktionsansatz enthaltenen Farbstoff (SYBR Green), der sich an doppelsträngige DNA anlagert, kann bei der RT-PCR bei jedem Zyklus proportional zur Menge der amplifizierten DNA eine Zunahme der Fluoreszenzintensität gemessen werden. Aus dieser ließ sich dann vergleichend zwischen den Genotypen errechnen, in welcher Probe mehr cDNA enthalten war. In solchen Proben, in denen initial bereits mehr cDNA für ein spezifisches Gen vorhanden ist, wird auch bei einem früheren Zyklus ein signifikantes Fluoreszenzsignal (cycle threshold; ct-Wert; hypothetischer Anfangswert einer exponentiellen (Fluoreszenz)kurve) erreicht werden. Um Unterschiede in der eingesetzten Gesamt-cDNA zwischen den Proben zu berücksichtigen, bestimmt man auch die ct-Werte für 18S als ein Housekeeping-Gen, welches in den Zellen eines Organs gleichermaßen exprimiert ist. Bei der vergleichenden Kalkulation von Genexpressionsleveln zwischen den Genotypen (NLRP3<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup>; ASC<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup>; C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> bzw. NLRP3<sup>-/-</sup>; ASC<sup>-/-</sup>; C57BL/6) wurden diese Unterschiede dann berücksichtigt. Als Negativkontrolle diente weiterhin für jedes Primerpaar ein Wasser-Signal anstelle von cDNA. Auch Primer-Melting-Peaks wurden zur Bewertung der Ergebnisse herangezogen. Abbildung 14 zeigt das für unsere Analysen verwendete PCR Programm. Die Sequenzen der verwendeten Primerpaare für die vergleichenden Expressionsanalysen aus Milzen, Nieren und Lungen der lpr-Mäuse bzw. C57BL/6-Tiere und Mutanten sind den Tabellen unter Materialien zu entnehmen. Je 10 µl des SYBR-Green Master-Mixes (1,21 ml H<sub>2</sub>O, 2 ml Taq-Puffer (10x), 2,4 ml 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 µl 25 mM dNTPs, 4 ml PCR Optimizer, 200 µl BSA (20 mg/ml), 40 µl SYBR Green), je 0,6 µl der 1:10 verdünnten Primer, 0,4 µl cDNA in 8,24 µl Wasser mit 0,16 µl Taq-Polymerase bildeten einen Reaktionsansatz.





**Abbildung 14: Screenshot des verwendeten RT-PCR-Programms:** Zu Beginn ein 5-minütiger Denaturierungsschritt bei 95°C; es folgt ein 45-zyklisches Programm; Annealing: ca. 60°C; Elongation: ca. 75°C; Denaturierung: ca. 95°C; Kühlung zum Ende des Programms

## 2.4.4 TGF- $\beta$ Gene Array

Entsprechend den Herstellerempfehlungen wurde aus, analog zu Kapitel 2.4.1, hergestellter RNA aus Milzgewebe mittels eines kommerziellen qPCR SYBR Green Master-Mixes (Qiagen) cDNA hergestellt. Entsprechend der Gebrauchsanweisung des RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Kits (Qiagen) wurde die so gewonnene cDNA auf die mitgelieferten Platten mit enthaltenen Primern pipettiert. Im Array enthalten waren 5 Housekeeping-Gene ( $\beta$ -Aktin,  $\beta$ 2-Mikroglobulin, Glyceraldehyde-3-Phosphat Dehydrogenase,  $\beta$ -Glucuronidase und Heat Shock Protein 90 $\alpha$ ) sowie Kontrollen bezüglich genomischer DNA-Kontamination, RNA Qualität und regelrechtem RT-PCR Ablauf. Die Messungen erfolgten wie auch alle herkömmlichen RT-PCRs am LightCycler 480.

## 2.5 Immunologische Verfahren

### 2.5.1 ELISA

Der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein Verfahren zum quantitativen Nachweis spezifischer Proteine anhand eines enzymatisch umgesetzten Farbsubstrats. Er erfolgte in 96-Well-Platten. Antikörper detektieren dabei spezifische Proteine über erkannte Epitope auf selbigen. Diese Antikörper wurden beim „Sandwich-ELISA“ zunächst auf der ELISA-Platte fixiert (Coating) und binden in den Proben befindliches Antigen (z.B. IL-18 im Falle des IL-18 ELISA). Nach Waschen der Platte (3-5x) wurde dann nach 1-stündigem Blockieren (in 10% FCS) und erneutem Waschen (5x) der Platte mit einem zweiten Antikörper gegen das Antigen inkubiert (2h), der seinerseits mit dem Enzym Horseradish Peroxidase (HRP) konjugiert wurde. Dieses Enzym setzte nach einem weiteren Waschschrift (5-7x) 100 $\mu$ l eines zugegebenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Tetramethylbenzidin (TMB) Substrats in einer Farbreaktion von farblos zu blau um (bei Raumtemperatur im Dunkeln). Durch Zugabe von 50 $\mu$ l 1-molare Schwefelsäure wurde diese nach 10-30min gestoppt (Endfarbe gelb). Im ELISA-Reader konnte dann bei 450nm die Absorption bestimmt werden und mit ebenfalls auf der Platte befindlichen Verdünnungsreihen

bekannter Proteinkonzentrationen (Standard) verglichen werden. Zur Bestimmung der unspezifischen Signalintensität (Background) wurden stets einige Wells nur mit Assay Diluent inkubiert, in welchem auch die Probenverdünnung erfolgt war. Je nach verwendetem Assay Kit erfolgte die Durchführung der einzelnen Wasch- bzw. Inkubationsschritte gemäß den Angaben der Gebrauchsanweisung. Bei manchen Kits war dabei statt der gemeinsamen Zugabe des Antikörpers mit dem HRP-Konjugat ein separater Inkubationsschritt mit letzterem notwendig.

Auch der Antikörper-ELISA, der zum Nachweis von spezifischen Antikörpern im Plasma dient, beruht auf einem ähnlichen Prinzip mit entsprechenden Schritten. Der Unterschied besteht darin, dass anstelle eines ersten Antikörpers das Antigen, gegen welches die nachzuweisenden Antikörper gerichtet sind, zu Beginn auf der Platte immobilisiert wird. Dieses Verfahren kam beim Nachweis der Anti-dsDNA-, Anti-Sm-, Anti-Nukleosom-Antikörper, Rheumafaktor und den Gesamt-IgG-, -IgM-, -IgE-, und IgG-Subtypen-ELISAs zum Einsatz.

Für die nicht-kommerziellen ELISAs gibt Tabelle 17 einen Überblick über die verwendeten Puffer, die Inkubationszeiten und Waschschrte.

**Tabelle 17: Coating-, Wasch-Puffer, Assay-Diluent und verwendete Antikörper der nicht-kommerziellen ELISAs**

ELISA	Anti-dsDNA*	Anti-Sm	Anti-Nukleosom*	Rheumafaktor
Coating-Puffer	0,05M Natriumbicarbonat	0,05M Natriumbicarbonat	0,05M Natriumbicarbonat	0,05M Natriumbicarbonat
Antigen auf Platte	dsDNA (2µg/ml)	Smith-Antigen 1:250	dsDNA + Histone (je 2µg/ml)**	Hase IgG (10µg/ml)
Wasch-Puffer	Tris-NaCl	Tris-NaCl	Tris-NaCl	Tris-NaCl
Proben Inkubationszeit	2h	2h	2h	2h
Assay Diluent	Tris-NaCl +1%BSA	Tris-NaCl +1%BSA	Tris-NaCl +1%BSA	Tris-NaCl +1%BSA
Detektionsantikörper	Anti-Maus IgG; 1:50.000	Anti-Maus IgG; 1:50.000	Anti-Maus IgG; 1:50.000	Anti-Maus IgG; 1:50.000

\* Vor dem Coating mit dsDNA wurde die Platte mit Polylysin und PBS (1:1) vorinkubiert; \*\* dsDNA und Histone wurden vor dem Coating bei 37°C zur Bindung für 30min vorinkubiert

### 2.5.2 *Crithidia luciliae*

Um die via ELISA bestimmten Antikörper gegen dsDNA hinsichtlich ihrer Spezifität zu bewerten, führten wir Immunfluoreszenztests an *Crithidia luciliae*-Slides durch. Diese kommerziell erhältlichen Objektträger sind mit begeißelten Protozoen namens *Crithidia luciliae* beschichtet, deren Kinetoplast aus dsDNA besteht, die von dsDNA-Antikörpern aus Plasma direkt gebunden werden kann. Dieser Test zeichnet sich durch sehr hohe Spezifität, jedoch nur geringe Sensitivität aus [125, 126]. Die vorgefertigten Slides wurden demnach für 30min mit 1:10 in PBS verdünntem Plasma von lpr-Tieren inkubiert. Als interne Negativkontrolle diente Plasma von C57BL/6 und NLRP3<sup>-/-</sup> Mäusen. Alle Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt, um die Objektträger vor dem Austrocknen zu bewahren. Anschließend wurden die Proben mittels vorsichtigem Hinzupipettieren und Verwerfen von PBS 5-mal gewaschen. Daran schloss sich die Zugabe von jeweils 20 $\mu$ l, 1:1000 in PBS verdünntem, FITC-konjugiertem Ziege-(Goat)-Anti-Maus IgG an, zur Detektion der an die Kinetoplasten gebundenen dsDNA-Antikörper. Um Ausbleichen des Farbstoffes zu vermeiden, folgte die 30-minütige Inkubation im Dunkeln in der Feuchtkammer. Nach erneutem Waschen wurden die Slides getrocknet und mit DAPI-haltigem Mounting-Medium und Deckglas verschlossen. Die Auswertung der Schnitte erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die Anzahl und Intensität positiv gefärbter Kinetoplasten pro Gesichtsfeld wurde hier semiquantitativ mit einem Score von 0-3 bewertet. Es wurde dabei über 10 Gesichtsfelder pro Schnitt gemittelt.

### 2.5.3 Western Blotting

**Proteingewinnung und Konzentrationsbestimmung:** Proteinextrakte für nachfolgende Westernblots wurden aus Gewebehomogenisaten oder primären BMDCs generiert. Alle Isolationsschritte bis zur Zugabe des Proteinaseinhibitors erfolgten hierbei auf Eis oder im Kaltraum bei 4°C. Das Homogenisieren der Gewebeproben wurde auf Trockeneis durchgeführt, um eine Probenerwärmung zu vermeiden. Dem Zellysepuffer (RIPA Puffer) wurde stets Proteinaseinhibitor und, bei geplantem Nachweis phosphorylierter Proteine, Phosphataseinhibitor in den vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen zugesetzt. Die Konzentration der Proteinisolate wurde im Anschluss mittels Bradford-Assay bestimmt. Dazu wurden jeweils 2 $\mu$ l Probe und 8 $\mu$ l Bradford Reagenz in 96-Well-Platten pipettiert und nach 10-minütiger Inkubation im ELISA-Reader die Absorptionswerte bei 590 nm bestimmt. Als Standard dienten eine von 1mg/ml BSA ausgehende Verdünnungsreihe und reines Wasser als Basalwert.

**Herstellung von SDS-Gelen:** Zunächst wurde hierbei das Trenngel in die vorbereitete Kammer gegossen und mit Wasser überschichtet, um eine horizontale Grenzschicht zu erreichen. Nach 30-minütigem Aushärten des Gels, wurde das Sammelgel aufgebracht und ein Kamm für die späteren Probestaschen eingelegt. Tabelle 18 zeigt die Zusammensetzung der Gele.

**Tabelle 18: Zusammensetzung der Gele**

10% Trenngel	Wasser: 3,28ml; Acrylamid: 2,64ml; Separating Puffer: 2ml; 10% SDS: 80 $\mu$ l; APS (Ammoniumpersulfat) 60 $\mu$ l; TEMED 8 $\mu$ l
15% Trenngel	Wasser: 1,92ml; Acrylamid: 4ml; Separating Puffer: 2ml; 10% SDS: 80 $\mu$ l; APS (Ammoniumpersulfat) 60 $\mu$ l; TEMED 8 $\mu$ l
5% Sammelgel	Wasser: 1,71ml; Acrylamid: 0,51ml; Stacking Puffer: 0,75ml; 10% SDS: 30 $\mu$ l; APS (Ammoniumpersulfat) 30 $\mu$ l; TEMED 3 $\mu$ l

**SDS-Gelelektrophorese:** Seit langem ist bekannt, dass mithilfe dieses Verfahrens in einem Tris-basierten Puffersystem (Laemmli-Puffer) Proteine dem molekularen Gewicht nach elektrophoretisch aufgetrennt werden können [127, 128]. Auf das fertige SDS-Gel wurden daher die zuvor für 5min bei 95°C in  $\beta$ -Mercaptoethanol und SDS-haltigem „4x Protein Loading Dye“ denaturierten Proteine in gleicher Konzentration aufgetragen. Der Proteinmarker IV (Peglab) diente als Größenmaßstab. Eine über das Puffersystem in der Elektrophoresekammer auf das Gel angelegte Spannung von 90-150V sorgte über die Dauer von mehreren Stunden für die Auftrennung der Proteine. Aufgrund der durch SDS verliehenen negativen Ladungen wanderten die Proteine dabei von Kathode zur Anode.

**Western Blot** bezeichnet das Übertragen von Proteinen auf eine Trägermembran durch erneutes Anlegen einer Spannung. Die Proteine wandern dabei aus dem SDS-Gel auf eine Trägermembran und können darauf mit spezifisch gegen sie gerichteten Antikörpern nachgewiesen werden [129, 130]. Dem gängigen Verfahren folgend, transferierten wir Proteine bei 15V für 30-45min auf eine zuvor mit Methanol aktivierte Membran. Hierzu wurde Transfer-Puffer verwendet. Daran anschließend folgte nach Waschen mit TBS-T (2x5min) das Blockieren der Membran in 5% Milchpulver gelöst in TBS-Puffer. Im Anschluss wurde die Membran unter permanenter Bewegung bei 4°C mit dem Erstantikörper (Verdünnung 1:100-1:1000 in 2% Milch) gegen das gewünschte Zielproteine über Nacht inkubiert. Nach erneutem Waschen (5x5min) folgte die Zugabe des HRP-konjugierten Detektionsantikörpers (Anti-rabbit IgG) für 1h. Nach weiterem Waschen (5x5min) wurde die Membran in Dunkelheit mit dem Detektionssubstrat inkubiert, mit Whatman-Papier getrocknet und ihr Signal mittels Röntgenfilmen detektiert. Markerbanden wurden manuell auf dem Film nachgezeichnet. Nach Entfernen der gebundenen Antikörper von der Membran mittels 15-minütiger Inkubation mit Stripping-Puffer und

Waschen der Membran (5x5min) konnte erneut blockiert werden und nach selbigem Prinzip die Detektion von  $\beta$ -Aktin als „Loading“-Kontrolle der Ausgangsproteinmengen durchgeführt werden. Für die Detektion wurden Antikörper gegen gespaltene Caspase-1 (Verdünnung 1:100), gespaltene Caspase-3 (1:500),  $\beta$ -Aktin (1:1000), phosphoryliertes Smad2 (1:250) und Anti-Hase IgG (1:10.000) verwendet (siehe Kapitel 2.1.8 Tabelle 14). Letzterer lieferte über sein HRP-Konjugat das Detektionssignal.

#### 2.5.4 Durchflusszytometrie

Diese Methode erlaubt die Charakterisierung und Differenzierung von in Suspension befindlichen Zellen hinsichtlich mehrerer Dimensionen, wie Größe, Granularität und intra- sowie extrazellulär fluoreszenzmarkierter Zielstrukturen. Das Durchflusszytometer drückt dabei die Zellsuspension durch eine Kapillare. Durch einen laminären Hüllstrom der Trägerflüssigkeit wird erreicht, dass suspendierte Zellen einzeln hintereinander aufgereiht durch die Kapillare strömen (hydrodynamische Fokussierung). In dieser werden sie nun mit Laserlicht beschossen, was zu Beugungs- und Streueffekten führt. Detektoren im Durchflusszytometer erfassen diese beiden Parameter als Forward- bzw. Sideward-Scatter. Daraus lässt sich die Größe einer Zelle (Forward Scatter) und die Granularität (Sideward Scatter) bestimmen. Zur weiteren Differenzierung von Zellpopulationen lassen sich gemischte Zellsuspensionen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen bestimmte Oberflächenantigene oder intrazelluläre Bestandteile färben. Je nach konjugiertem Farbstoff emittiert der Antikörper nach Anregung durch einen Laserstrahl dann wiederum Licht in einem bestimmten Wellenlängenbereich, welches vom Gerät gemessen wird. Bei dem hier verwendeten Gerät ist es möglich, 4 derartige Farbkanäle zeitgleich zu unterscheiden, so dass auf einer Zelle bis zu vier verschiedene (Oberflächen)-Antigene gleichzeitig nachgewiesen werden können, insofern die verwendeten Antikörper mit 4 distinkten Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind [131, 132].

In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie zur Charakterisierung der verschiedenen Milzzellpopulationen angewandt. Vor Durchführung wurde dabei eine Einzelzellsuspension aus den jeweiligen Organen hergestellt, was mit dem Zerreiben selbiger zwischen einem Spritzenstempel und einem 70 $\mu$ m Filter begann. Daraufhin wurden die Zellen mit PBS durch den Filter in ein 50ml FALCON gespült. Nach dem Pelletieren wurden rote Blutzellen durch 15-minütige Inkubation mit Lysepuffer (NH<sub>4</sub>Cl) lysiert. Die Reaktion wurde mit PBS gestoppt. Daran schlossen sich zwei weitere Zentrifugations- und Waschschrte in PBS an, bis die Zellen durch einen 30 $\mu$ m Filter passiert und nach Pelletieren in 2-5ml FACS-Puffer resuspendiert wurden. Jeweils 100 $\mu$ l der Zellsuspension wurden in ein FACS-Tube überführt und mit den entsprechenden Antikörpern (jeweils 1,4 $\mu$ l, außer: FoxP3 und F<sub>4/80</sub>: 10 $\mu$ l) für 1h bei 4°C inku-

biert. Nach Waschen der Zellen mit PBS (2x2ml) und Verwerfen des Überstandes waren die Zellen bereit zur Analyse, welche sich stets sofort anschloss. Im Falle der Färbung intrazellulärer Proteine, wie  $\kappa$ -Leichtkette für CD138-positive Plasmazellen oder FoxP3 für regulatorische T-Zellen, war jedoch zuvor ein weiterer Schritt nötig. Die Zellmembran wurde entsprechend der Gebrauchsanleitung des Cytotfix/Cytoperm Kits (BD) aufgeschlossen. Nach 45-minütiger Inkubation mit dem für intrazelluläre Antigene bestimmten Antikörper folgten 2 erneute Waschgänge und die Überführung in FACS-Puffer.

Für die Charakterisierung von T-Zellen benutzten wir Co-Färbungen bestehend aus CD3, CD4, CD8, CD69 bzw. CD3, CD4, CD8, CD44 für T-Helferzellen, zytotoxische Zellen und deren Aktivierungsstatus (CD69 bzw. CD44). Regulatorische T-Zellen wurden via CD3, CD4, CD25, FoxP3 erfasst. B-Zellen wurden erfasst mittels B220, IgM, IgD für naive B-Zellen bzw. B220, CD21, CD23 zur Differenzierung von folliculären und Marginalzonen B-Zellen, bzw. B220, CD19, CD69 zur Erfassung aktivierter B-Zellen. Dendritische Zellen und Makrophagen wurden durch CD11c, F<sub>4/80</sub> und MHCII Co-Färbung differenziert und hinsichtlich Aktivierung (MHCII) überprüft.

Die Zellkonzentration pro Probe wurde mittels Zugabe kommerzieller Counting Beads, entsprechend den Herstellerangaben, determiniert, so dass mithilfe der bekannten Ausgangsverdünnung die Gesamtzellzahl pro Organ errechnet werden konnte.

Abweichend von dem oben beschriebenen Protokoll lief die durchflusszytometrische Charakterisierung des Zelltods mittels Annexin und Propidiumiodid (PI) ab. Hierbei wurden die Zellen in Annexin-binding-Puffer suspendiert. Anschließend wurde bei Dunkelheit und Raumtemperatur für 15min mit Annexin-Antikörper inkubiert, gewaschen und erst 5min vor der Durchflusszytometrie PI zugegeben.

## 2.6 Statistische Analyse

Die im Folgenden dargestellten Balkendiagramme stellen das arithmetische Mittel der innerhalb eines Genotyps gemessenen Ergebnisse mit zugehörigem Standard Error of the Mean (SEM) dar. Für die Berechnung der statistischen Signifikanzen zwischen den Gruppen kam der zweiseitige t-Test zum Einsatz. Dieser wurde mittels Microsoft Excel 2010 durchgeführt. Die Darstellung des Signifikanzniveaus bedient sich folgenden Schlüssels: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3 Ergebnisse

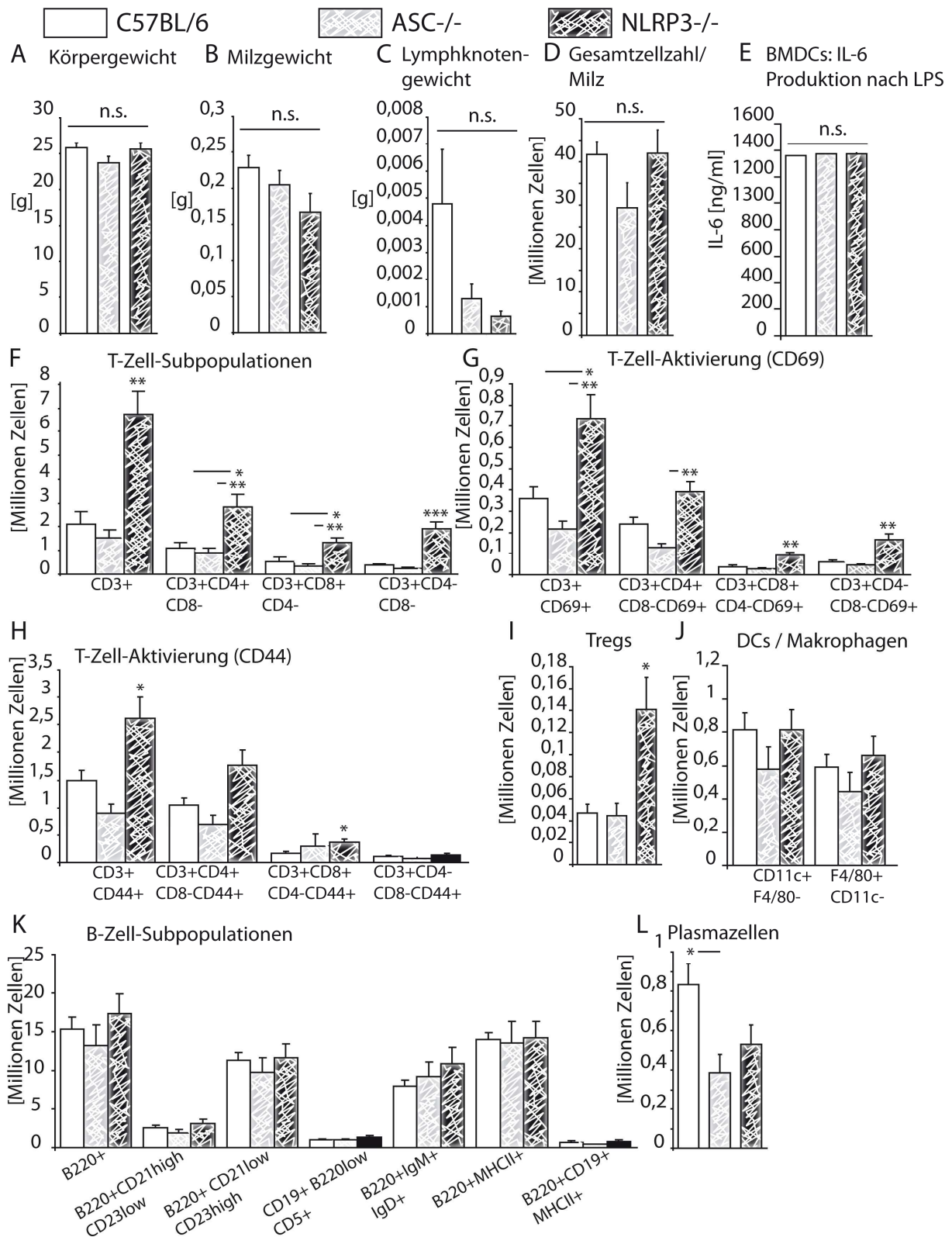
#### 3.1 NLRP3- und ASC-Defizienz in C57BL/6 Mäusen führt per se nicht zu Zeichen spontaner Autoimmunität und vermehrter Entzündung

Um die Ergebnisse im *lpr*-Hintergrund besser interpretieren zu können und die bisher unbeantwortete Frage nach der Rolle des NLRP3-Inflammasoms und seines Adapterproteins ASC im murinen Lupusmodell umfassend zu beantworten, untersuchten wir zunächst herkömmliche NLRP3- bzw. ASC-defiziente C57BL/6 Mäuse auf Anzeichen spontaner Autoimmunität.

Wie erwartet, entwickelte keiner der beiden Knockoutmausstämme ohne die treibende *lpr*-Mutation ein lymphoproliferatives Syndrom. Somit fanden sich kein signifikant unterschiedliches Körper-, Milz- und Lymphknotengewicht im Alter von 6 Monaten zwischen NLRP3<sup>-/-</sup>, ASC<sup>-/-</sup> und C57BL/6 Mäusen (Abbildung 15A-C). Auch die durchflusszytometrisch bestimmte Gesamtzellzahl der Milzen unterschied sich nicht signifikant zwischen den jeweiligen Gruppen (Abbildung 15D). Je 2 Stichproben auf Anti-dsDNA-Antikörper mittels *Crithidia luciliae* Slides in NLRP3<sup>-/-</sup>, ASC<sup>-/-</sup> und C57BL/6 Mäusen zeigten sich negativ (nicht gezeigt).

Für Makrophagen und dendritische Zellen aus NLRP3- und ASC-defizienten Mäusen ist bekannt, dass aufgrund der defekten NLRP3-Inflammasombildung und Caspase-1-Aktivierung nach Stimulation *in vitro* die IL-1 $\beta$ -Produktion vermindert ist [98, 133, 134]. Um punktuell zu evaluieren, ob darüber hinaus der angeborene Immunschenkel bezüglich anderer relevanter Mediatoren wie IL-6 beeinträchtigt ist, stimulierten wir BMDCs aus unseren Tieren mit LPS und bestimmten die Interleukinproduktion mittels ELISA. Abbildung 15E gibt zu erkennen, dass die IL-6-Produktion aus dendritischen Zellen bei NLRP3- und ASC-Defizienz unbeeinträchtigt bleibt.

Die detaillierte Analyse der zellulären Zusammensetzung der Milzzellen im Alter von 6 Monaten via Durchflusszytometrie zeigte lediglich für NLRP3-defiziente Tiere eine Expansion des T-Zellkompartiments inklusive CD4-CD8<sup>-</sup> T-Zellen und regulatorischer T-Zellen (Abbildung 15 F-I). Weiterhin fand sich dabei eine vermehrte Anzahl aktivierter CD69-positiver T-Zellen für NLRP3<sup>-/-</sup> Mäuse (Abbildung 15G und H). DCs, Makrophagen und B-Zell-Subpopulationen fanden sich unverändert (Abbildung 15J und K). ASC-defiziente Mäuse verhielten sich hierbei ähnlich den C57BL/6 Kontrolltieren, abgesehen von einer signifikant reduzierten Anzahl an Plasmazellen (Abbildung 15L). Die pathophysiologische Relevanz dieser Befunde allerdings scheint angesichts fehlender Lymphoproliferation (Abbildung 15B-D) und negativer *Crithidia*-Färbung des Plasmas gering ausgeprägt.



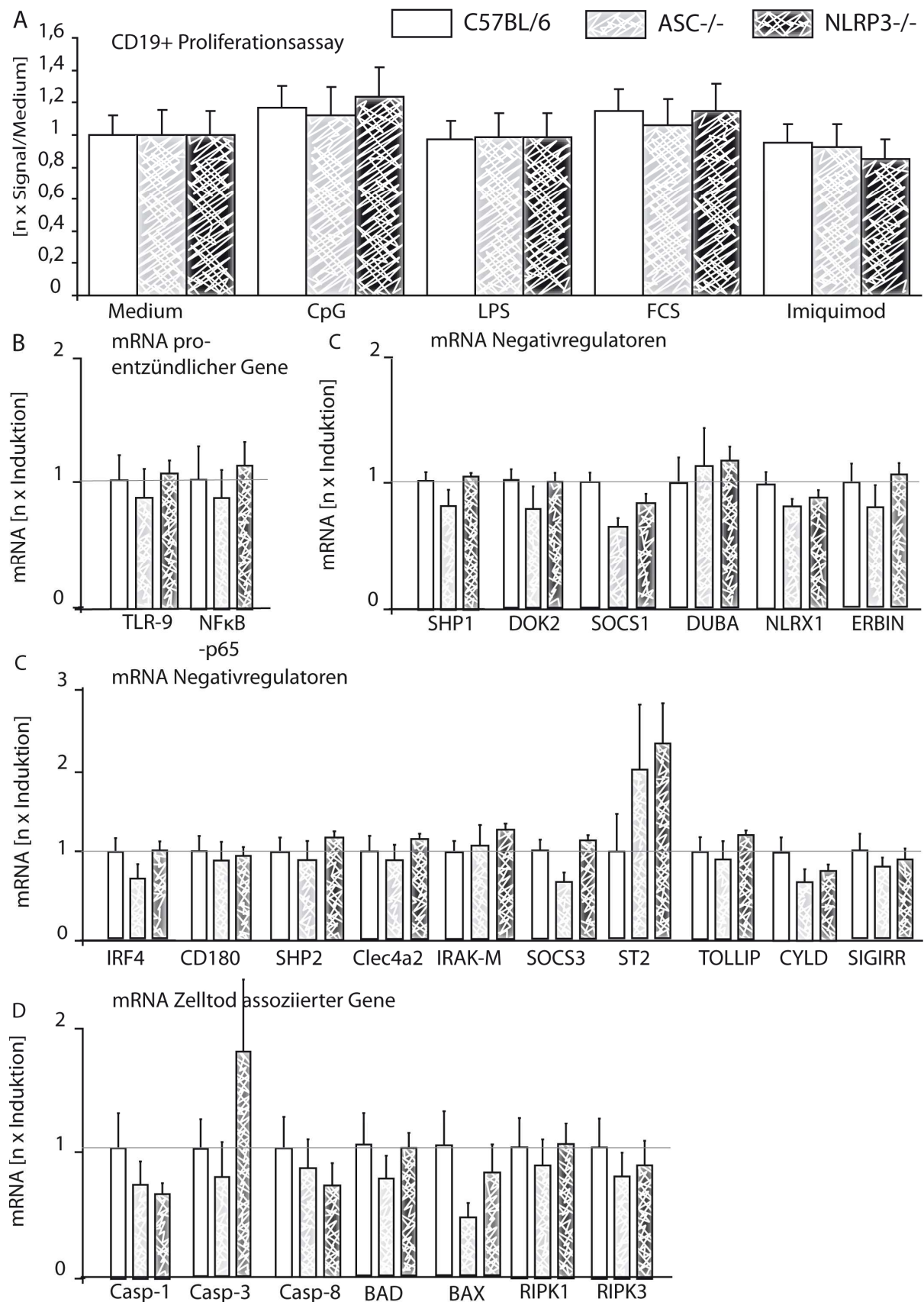
**Abbildung 15: Evaluation von herkömmlichen C57BL/6, ASC<sup>-/-</sup> und NLRP3<sup>-/-</sup> Mäusen; A-D:** Körper-, Milz-, Lymphknotengewichte in Gramm im Alter von 6 Monaten (5 Mäuse/Gruppe); **D:** mittels Durchflusszytometrie bestimmte Milz-Gesamtzellzahl; **E:** IL-6 in Überständen von mit LPS (1µg/ml) stimulierten BMDCs von 6 Wochen alten C57BL/6, ASC<sup>-/-</sup>, NLRP3<sup>-/-</sup> Mäusen; **F:** T-Zell-Subpopulationen; **G/H:** aktivierte T-Zellsubpopulationen CD69<sup>+</sup> bzw. CD44<sup>+</sup>; **I:** regulatorische T-Zellen (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>); **J:** dendritische Zellen (CD11c<sup>+</sup>F<sub>4/80</sub><sup>-</sup>); Makrophagen (F<sub>4/80</sub><sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>); **K:** B-Zell-Subpopulationen (B220+Gesamt, Marginalzonen B-Zellen, Follikuläre B-Zellen, B1-Zellen, B220+MHCII<sup>+</sup>, Gesamtzahl aktivierter B-Zellen (B220+CD19<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>)); **L:** Plasmazellen (CD138+κ-Leichtkette+); jeweils in 10<sup>6</sup> Zellen; jeweils 6 Monate alte Mäuse (5/Gruppe); \*=*p*<0,05; \*\*=*p*<0,01; \*\*\*=*p*<0,001; P-Wert aus t-Test im Bezug zu C57BL/6-Kontrolltieren



Zum gründlichen Ausschluss von etwaigen Zeichen der Autoimmunität untersuchten wir in ASC<sup>-/-</sup> bzw. NLRP3<sup>-/-</sup> Tieren weiterhin, ob deren B-Zellen auf mitogene Stimuli vermehrt proliferieren würden. Abbildung 16A zeigt, dass über CD19-magnetische-Beads isolierte Zellen nach Stimulation mit CpG (TLR-9-Agonist), LPS (TLR-4-Agonist), Imiquimod (TLR-7-Agonist) und FCS nicht vermehrt proliferieren. Als Negativkontrolle in diesem B-Zell Proliferationsexperiment diente FCS-freies Medium.

Nicht zuletzt aufgrund der irritierenden durchflusszytometrisch bestimmten T-Zellzahlen in NLRP3<sup>-/-</sup> Tieren analysierten wir die Milzen unserer Tiere weiterhin mittels RT-PCR auf die quantitative Expression pro-entzündlicher, anti-entzündlicher und zelltodassoziierter Gene (Abbildung 16B-D). Dabei fanden sich keine relevanten Unterschiede in der Expression der Gene NFκB-p65, TLR-9 (Abbildung 16B: pro-entzündliche Gene); SHP1, DOK2, SOCS1, DUBA, NLRX1, ERBIN, IRF4, CD180, SHP2, Clec4a2, IRAK-M, SOCS3, ST2, TOLLIP, CYLD, SIGIRR (Abbildung 16C: Negativregulatoren – i.d.R. aufreguliert bei Entzündung [135]) und Caspase-1, Caspase-3, Caspase-8, BAD, BAX, RIPK1, RIPK3 (Abbildung 16D: an verschiedenen Zelltodformen beteiligte Gene [136, 137]). Diese Daten sind ein weiteres Indiz dafür, dass a priori Autoimmunität in ASC<sup>-/-</sup> bzw. NLRP3<sup>-/-</sup> Tieren weitestgehend ausgeschlossen werden kann.

Zusammenfassend zeigen die Abbildungen 15 und 16, dass NLRP3<sup>-/-</sup> bzw. ASC<sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäuse keine Anzeichen spontaner Autoimmunität aufweisen und keine vermehrte oder geminderte Entzündung in deren Organismen abzulaufen scheint. Auffällig ist lediglich die Expansion der T-Zellpopulationen in NLRP3<sup>-/-</sup> Tieren, die in Anbetracht aller übrigen Befunde jedoch nicht zur Beeinträchtigung der Tiere führt.



**Abbildung 16: Evaluation von herkömmlichen C57BL/6, ASC-/- und NLRP3-/- Mäusen; A:** MTS Proliferationsassay mit über CD19+ Selektion angereicherten B-Zellen aus C57BL/6, ASC-/- und NLRP3-/- Mäusen. Stimuli: Medium, CpG, LPS, FCS (Positivkontrolle), Imiquimod. **B-D:** mRNA-Expression in Milzzellen aus 6 Monate alten Mäusen: Pro-entzündliche Gene, Negativregulatoren, Zelltodd assoziierte Gene; **Casp-1-/3-/8:** Caspase 1/3/8; (5 Tiere/Gruppe)

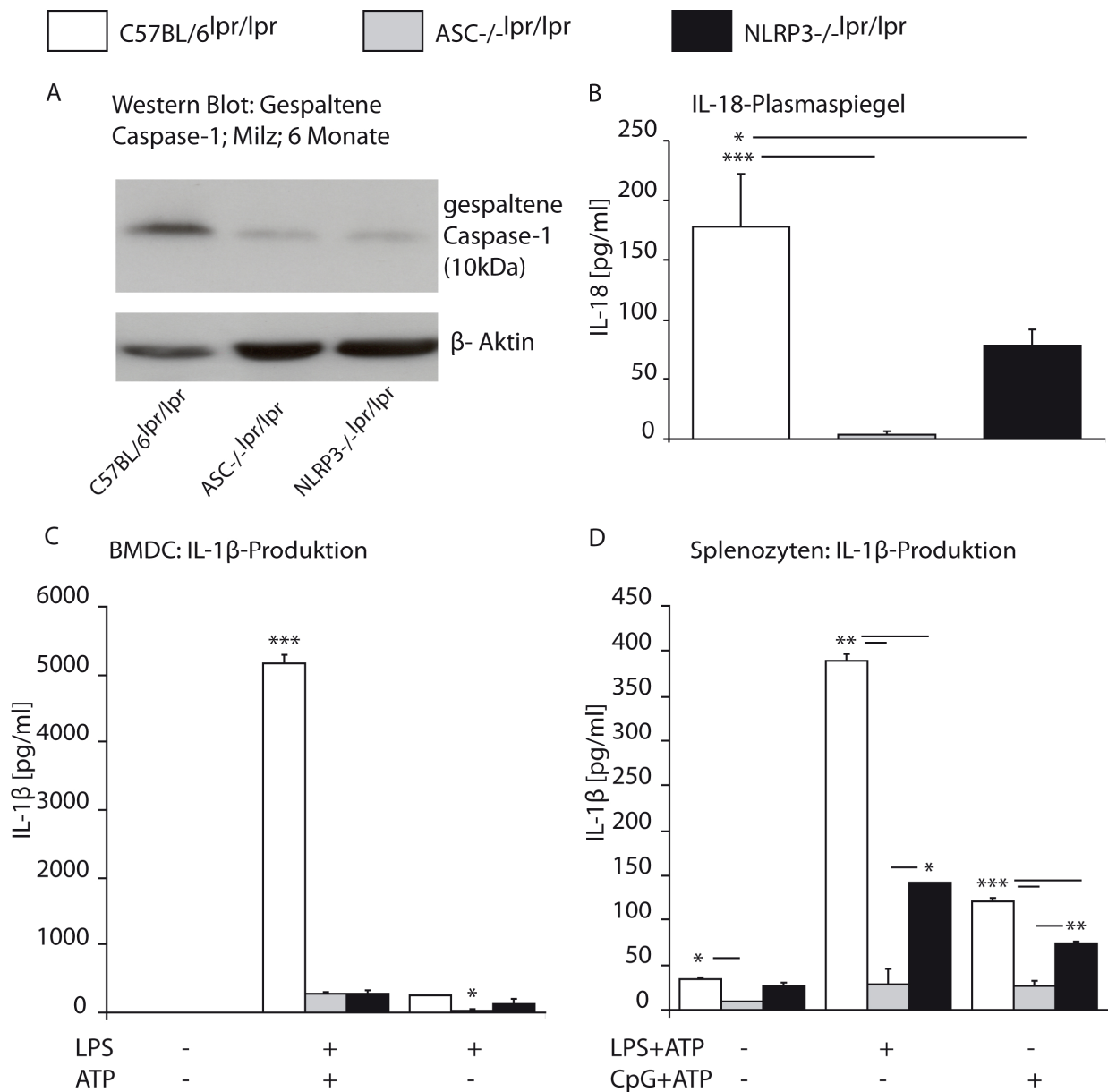
### 3.2 NLRP3<sup>-/-</sup> und ASC<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäuse zeigen verminderte Caspase-1-Aktivität sowie IL-1 $\beta$ - und IL-18-Sekretion *in vitro* bzw. *in vivo*

Wie oben beschrieben, ist für ASC<sup>-/-</sup> und NLRP3<sup>-/-</sup> Mäuse bekannt, dass deren Makrophagen und dendritische Zellen auf sterile und pathogene Entzündungssignale nur eingeschränkt IL-1 $\beta$  produzieren. Somit stellte sich die Frage, ob dieses Phänomen in Mäusen im Lupus bedingenden *lpr*-Hintergrund ebenfalls vorhanden ist.

Daher untersuchten wir Milzen 6 Monate alter NLRP3<sup>-/-</sup> bzw. ASC<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäuse mittels Western-Blot-Analyse auf deren Caspase-1-Aktivität in Immunzellen. Abbildung 17A zeigt, dass die Aktivität der Caspase-1 in beiden Mausstämmen im Vergleich zur der in C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Kontrollen reduziert ist.

Demnach fragten wir uns, ob sich dieser Defekt in der Inflammasom-Caspase-1-Achse auch in eine Reduktion der systemischen IL-1 $\beta$ - und IL-18-Spiegel übersetzen würde. Daher untersuchten wir Plasma aus 6 Monate alten Mäusen mittels ELISA auf die Spiegel von IL-18 (Abbildung 17B) und IL-1 $\beta$ . Letzteres fand sich allerdings im Plasma aller Tiere kaum detektierbar und daher nicht signifikant verändert zwischen den Gruppen (nicht gezeigt). Folglich entschieden wir uns dafür, den Defekt in der IL-1 $\beta$ -Sekretion über *in vitro* Stimulationsexperimente mit LPS und ATP an BMDCs und Splenozyten nachzuweisen. Auch CpG testeten wir in analoger Weise als Signal-1 zur Induktion des Inflammasoms, welches schließlich mit ATP aktiviert wurde. Dabei erhielten wir vergleichbare Resultate (Abbildung 17C und D).

Abbildung 17 zeigt, dass in Übereinstimmung mit der bisherigen Datenlage auch im *lpr*-Hintergrund NLRP3- oder ASC-Defizienz zu einer Reduktion der Caspase-1-Aktivität, der systemischen IL-18-Level und der IL-1 $\beta$ -Produktion *in vitro* führen. Somit sind in NLRP3<sup>-/-</sup> und ASC<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen zwei wesentliche pro-inflammatorische Interleukinachsen vermindert aktivierbar.



**Abbildung 17: Caspase-1-, IL-1 $\beta$ -, IL-18-Aktivität in NLRP3<sup>-/-</sup> und ASC<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen; A:** Westernblots auf gespaltene Caspase-1 (10kDa) in Milzzellen 6 Monate alter C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup>, ASC<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> und NLRP3<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäuse; repräsentativ für 3 Westernblots **B:** Plasma-IL-18-Spiegel im Alter von 6 Monaten (6-8 Tiere pro Gruppe). **C:** IL-1 $\beta$ -Produktion durch mit LPS und ATP stimulierte myeloische dendritische Zellen (BMDCs); **D:** IL-1 $\beta$ -Produktion aus LPS + ATP / CpG + ATP stimulierten Milzzellen (repräsentativ für je 2 Experimente mit von je 2 Tieren gepoolten Milzzellen); \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ ; P-Wert aus t-Test im Bezug zu C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Kontrolltieren

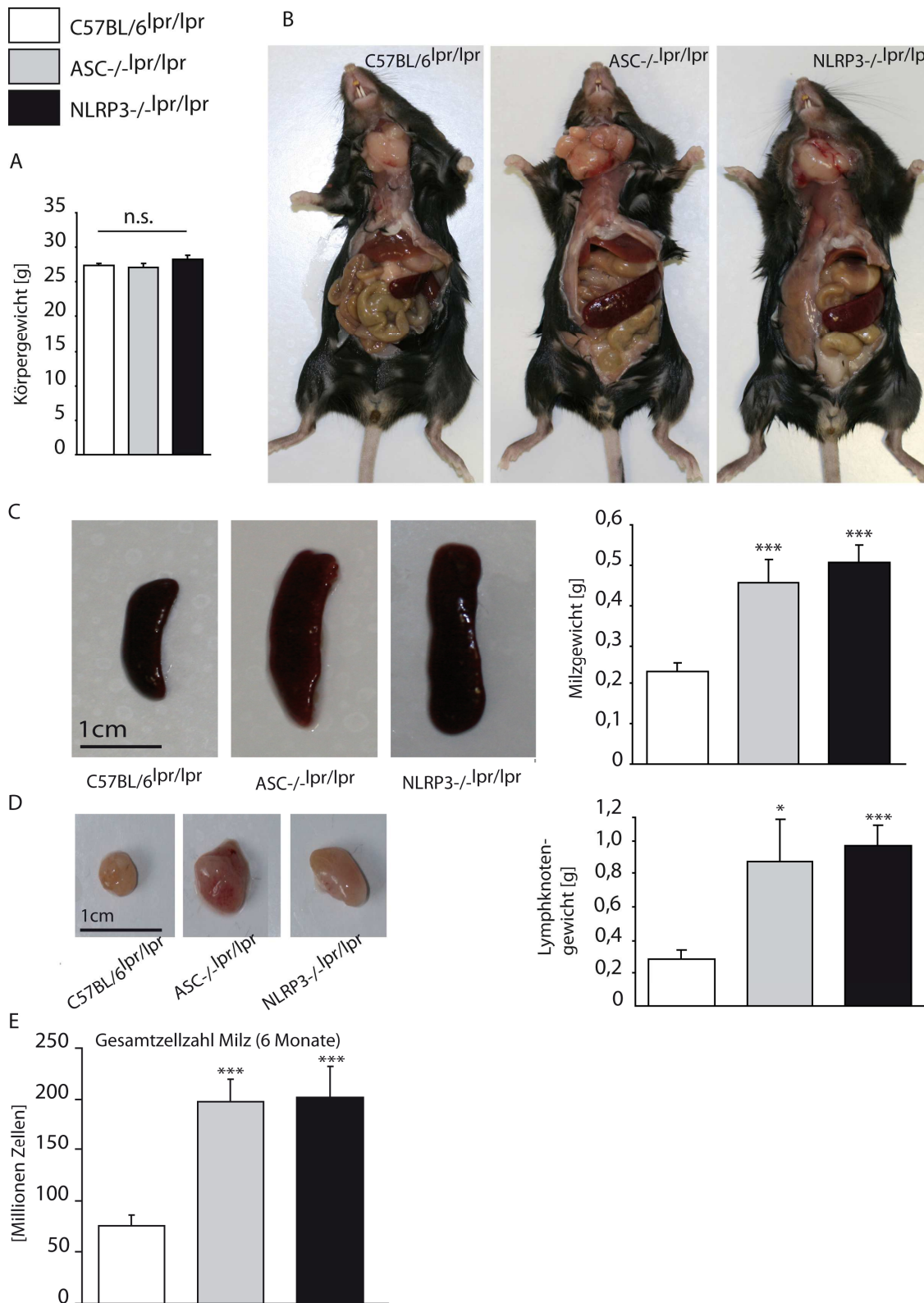
### 3.3 ASC- und NLRP3-Defizienz aggravieren das lymphoproliferative Syndrom in C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen im Alter von 6 Monaten

Um die Projekthypothese, die einen attenuierten Phänotyp von NLRP3- und ASC-defizienten C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen im Vergleich zu C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Kontrollen postuliert, zu überprüfen, charakterisierten wir alle drei Mausstämmen im Alter von 6 Monaten. Die homozygote Mutation eines einzelnen Gens, welches für den Fas-Rezeptor kodiert, resultiert aufgrund defekter Lymphozytenapoptose in diesen lpr-Mäusen in einem Autoimmunsyndrom, welches einem milden SLE ähnelt [119, 138].

Sowohl NLRP3<sup>-/-</sup> als auch ASC<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäuse ließen sich problemlos züchten und zeigten keine Auffälligkeiten bezüglich Verhalten und Körpergewicht, verglichen mit herkömmlichen C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Tieren (Abbildung 18A).

Völlig konträr zur Hypothese zeigten beide Stämme aber deutlich erhöhte Milz- (Abbildung 18B und C) und Lymphknotengewichte (Abbildung 18B und D) im Alter von 6 Monaten, von denen letztere bereits im Alter von 4 Monaten äußerlich am lebenden Tier sichtbar waren (nicht gezeigt). Als zusätzliche Evidenz wurde die Gesamtzahl der Milzzellen mittels Durchflusszytometer bestimmt, um die erhöhte Lymphozytenzellzahl zu quantifizieren. In Übereinstimmung mit den erhöhten Milzgewichten fand sich hierbei auch eine deutlich erhöhte Zellzahl in Milzen aus NLRP3<sup>-/-</sup> bzw. ASC<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen im Vergleich zum C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Genotyp (Abbildung 18).

Diese Befunde nämlich, vermehrte Splenomegalie, Lymphadenopathie und eine vermehrte Anzahl an Milzzellen stehen im Widerspruch zur initialen Hypothese.



**Abbildung 18: Lymphproliferation ist aggraviert in NLRP3<sup>-/-</sup> und ASC<sup>-/-</sup> lpr-Tieren; A:** Körpergewicht 6 Monate alter lpr-Mäusen (8-12 Mäuse/Gruppe); **B:** Repräsentative Situs von lpr-Mäusen; deutlich vergrößerte zervikale Lymphknoten und Milzen bei ASC<sup>-/-</sup> und NLRP3<sup>-/-</sup> defizienten lpr-Mäusen im Vergleich zur C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Kontrolle; **C:** Repräsentative Aufnahme von Milzen selbiger Genotypen; rechts: Milzgewicht in Gramm (8-12 Mäuse/Gruppe); **D:** Repräsentative Aufnahme von zervikalen Lymphknoten selbiger Genotypen; rechts: Lymphknotengewichte in Gramm (8-12 Mäuse/Gruppe); **E:** Durchflusszytometrie: Gesamtzellzahl der Milzen von, ASC<sup>-/-</sup> (18 Tiere) und NLRP3<sup>-/-</sup> (19 Tiere) defizienten lpr-Mäusen versus C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> (8 Tiere); \*= $p < 0,05$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ ; P-Wert aus t-Test im Bezug zu C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Kontrolltieren

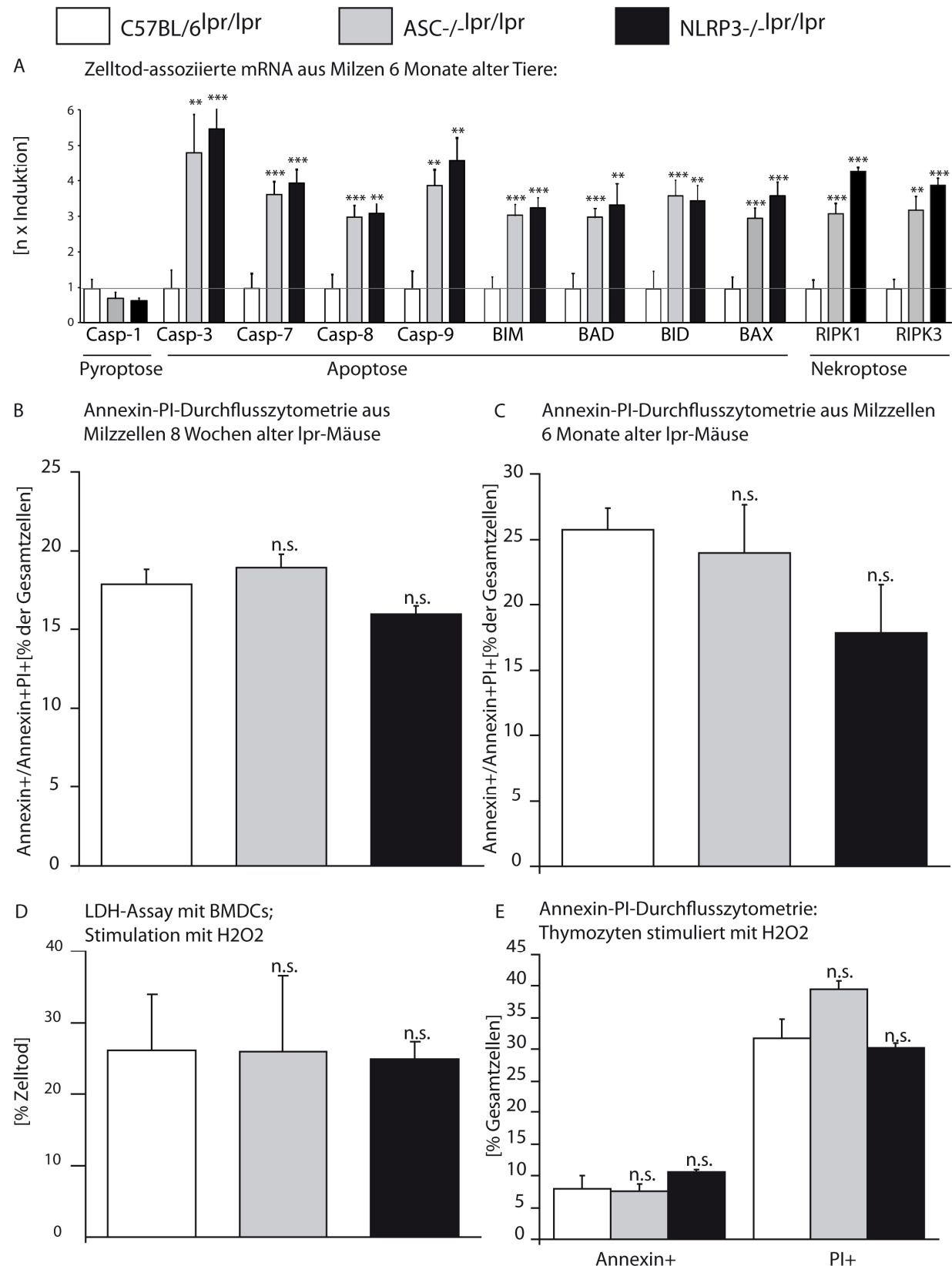
Angesichts dieser Befunde stellte sich die Frage, ob die beobachtete Zellvermehrung in lymphatischen Geweben eher vermehrter Lymphoproliferation oder verminderter apoptotischer Clearance von Immunzellen geschuldet sei. Ein Punkt, der aufgrund der mannigfaltigen Ätiopathogenese des SLE und der Besonderheiten des Caspase-1 aktivierenden NLRP3-Inflammasoms nicht einfach von der Hand zu weisen war. In diesem Kontext sei kurz daran erinnert, dass erstens beim Menschen vermehrt anfallende, nicht abgeräumte spät-apoptotische / nekrotische Zellbestandteile zu finden sind, die Gewebeentzündung befeuern und im lpr-Mausmodell die Deletion des Fas-Rezeptors zur Bildung autoreaktiver Zellen führt [48, 138, 139]. Zweitens liegt aufgrund der molekularen Ähnlichkeit des NLRP3-Inflammasoms zum Apoptosom (beide aktivieren zudem Caspasen) eine mögliche Rolle bei der Apoptoseinduktion nahe [84].

Daher unternahmen wir eine Reihe von Experimenten, um dieser Frage auf den Grund zu gehen. Dabei untersuchten wir zunächst die mRNA-Expression von an verschiedenen Formen des Zelltods beteiligten Genen aus Milzgewebe 6 Monate alter Tiere. Diese Experimente ergaben eine Aufregulation der proapoptotischen Gene Caspase-3, -8, -9, BIM, BAD, BID, BAX und der an der Induktion von Nekroptose beteiligten Gene RIPK1 und RIPK3 [136, 137] (Abbildung 19A).

Daher galt es nun zu untersuchen, inwieweit diese auf transkriptioneller Ebene vorhandenen Veränderungen die apoptotische Clearance von Lymphozyten beeinflussen würden. Dazu analysierten wir Milzlymphozyten aus 8 Wochen alten (Abbildung 19B) und 6 Monate alten (Abbildung 19C) ASC<sup>-/-</sup> bzw. NLRP3<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Tieren. Dargestellt sind der prozentuale Anteil der Summe aus apoptotischen (Annexin<sup>+</sup>) und sekundär nekrotischen Zellen (Annexin<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>). Hierbei fand sich verglichen mit C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen keine signifikante Reduktion der Gesamtzahl Annexin<sup>+</sup>/Annexin PI<sup>++</sup> (früh bzw. spät-apoptotischer) Zellen.

Da weder im Alter von 8 Wochen noch nach 6 Monaten ein Apoptose-Defekt *in vivo* konsistent nachweisbar war, scheiden ein *a priori* bestehender, ebenso wie ein im Erkrankungsverlauf erworbener Apoptose-Defekt als Erklärung für den aggravierten Phänotyp höchstwahrscheinlich aus.

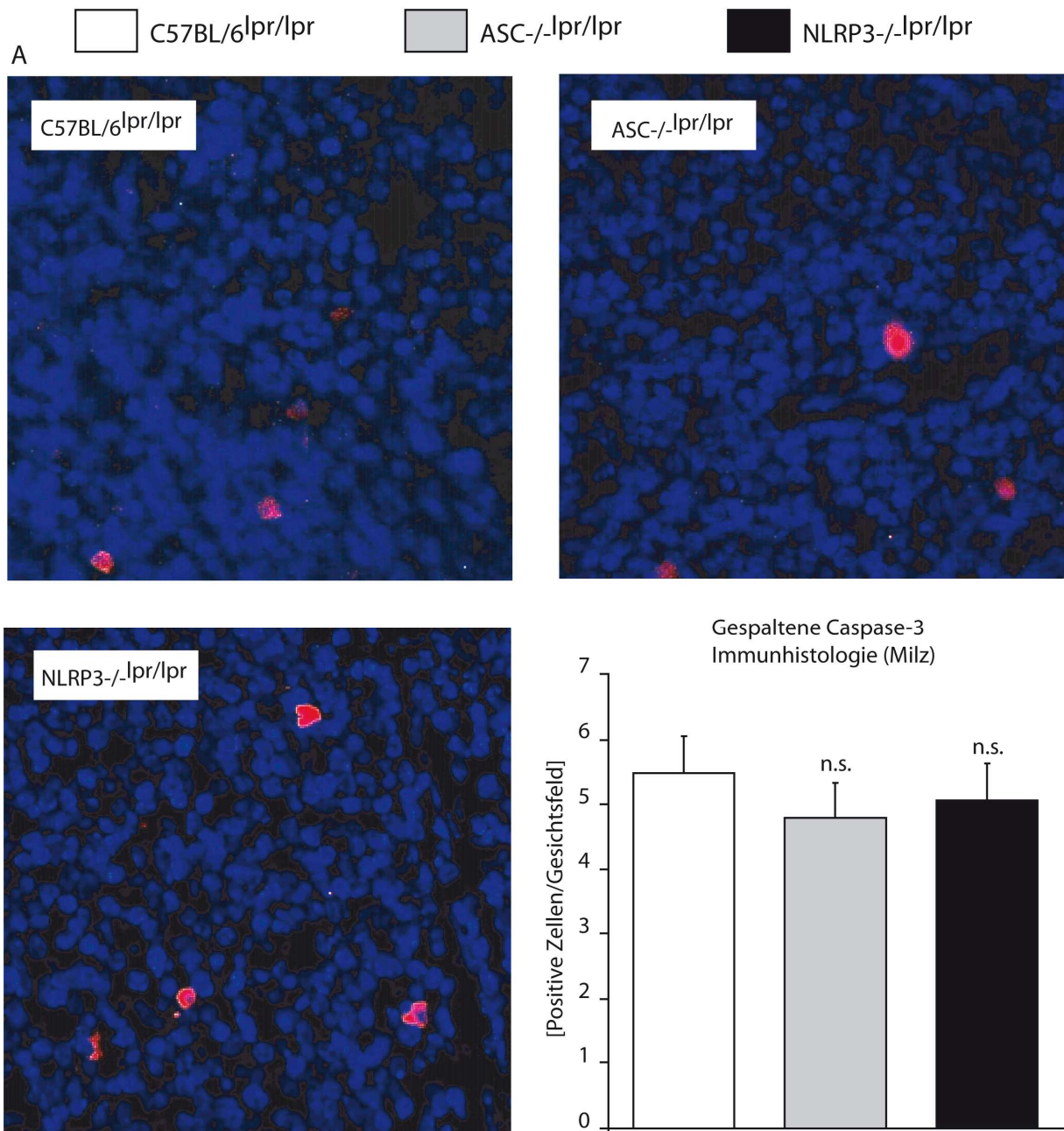
Auch in Zellkulturstimulationsexperimenten an dendritischen Zellen und Thymozyten, in welchen wir Zelltod durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Exposition auslösten, fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen im LDH-Assay (nekrotischer und apoptotischer Zelltod) und in der AnnexinV/PI-Durchflusszytometrie (frühe Apoptose bzw. Nekrose) (Abbildung 19D und E).



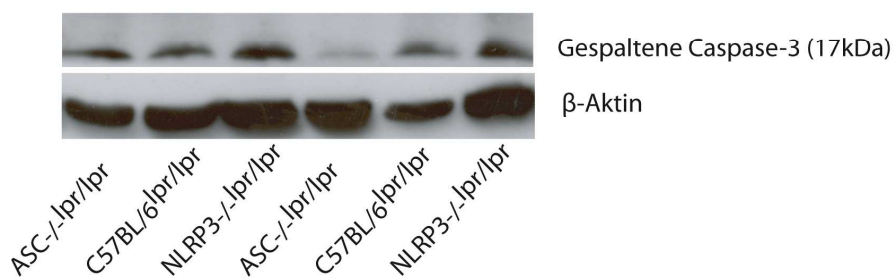
**Abbildung 19: Apoptose und Nekrose in Lymphozyten aus ASC- bzw. NLRP3-defizienten *lpr*-Tieren; A:** RT-PCR auf zelltodassoziierte Gene; Darstellung als n-fache Induktion im Vergleich zur C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Kontrolle; \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$  versus C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup>; **B:** Durchflusszytometrische Analyse von Milzzellen aus 8 Wochen alten Tieren mittels AnnexinV/PI-Cell Death Detection Kit entsprechend dem Herstellerprotokoll (2 Mäuse/Gruppe); **C:** Durchflusszytometrische Analyse von Milzzellen aus 6 Monate alten Tieren mittels AnnexinV/PI-Cell Death Detection Kit (mindestens 5 Mäuse/Gruppe); **D:** LDH-Assay aus Überständen von mit H2O2 stimulierten (1nM, 12h) BMDCs (4 Wells/Genotyp); **E:** Durchflusszytometrische Analyse mittels AnnexinV/PI-Cell Death Detection Kit von H2O2 stimulierten Thymozyten 6 Wochen alter Tiere (4 Wells/Genotyp)



Als weitere Evidenz für den Ausschluss eines Apoptose-Defektes in ASC- bzw. NLRP3-defizienten *lpr*-Tieren führten wir darüber hinaus immunhistochemische Färbungen auf gespaltene Caspase-3 in Milzsektionen 6 Monate alter Mäuse durch. Auch hierbei zeigten sich annähernd gleiche Anzahlen positiver (im Bild rot), d.h. gerade in Apoptoseausführung begriffener Zellen, bei den einzelnen *lpr*-Genotypen (Abbildung 20A). Auch der Westernblot auf gespaltene Caspase-3 in lymphatischem Milzgewebe zeigte demnach ebenfalls keine konsistenten Unterschiede zwischen *ASC*<sup>-/-</sup> *C57BL/6*<sup>*lpr/lpr*</sup>, *NLRP3*<sup>-/-</sup> *C57BL/6*<sup>*lpr/lpr*</sup> und herkömmlichen *C57BL/6*<sup>*lpr/lpr*</sup> Mäusen (Abbildung 20B).



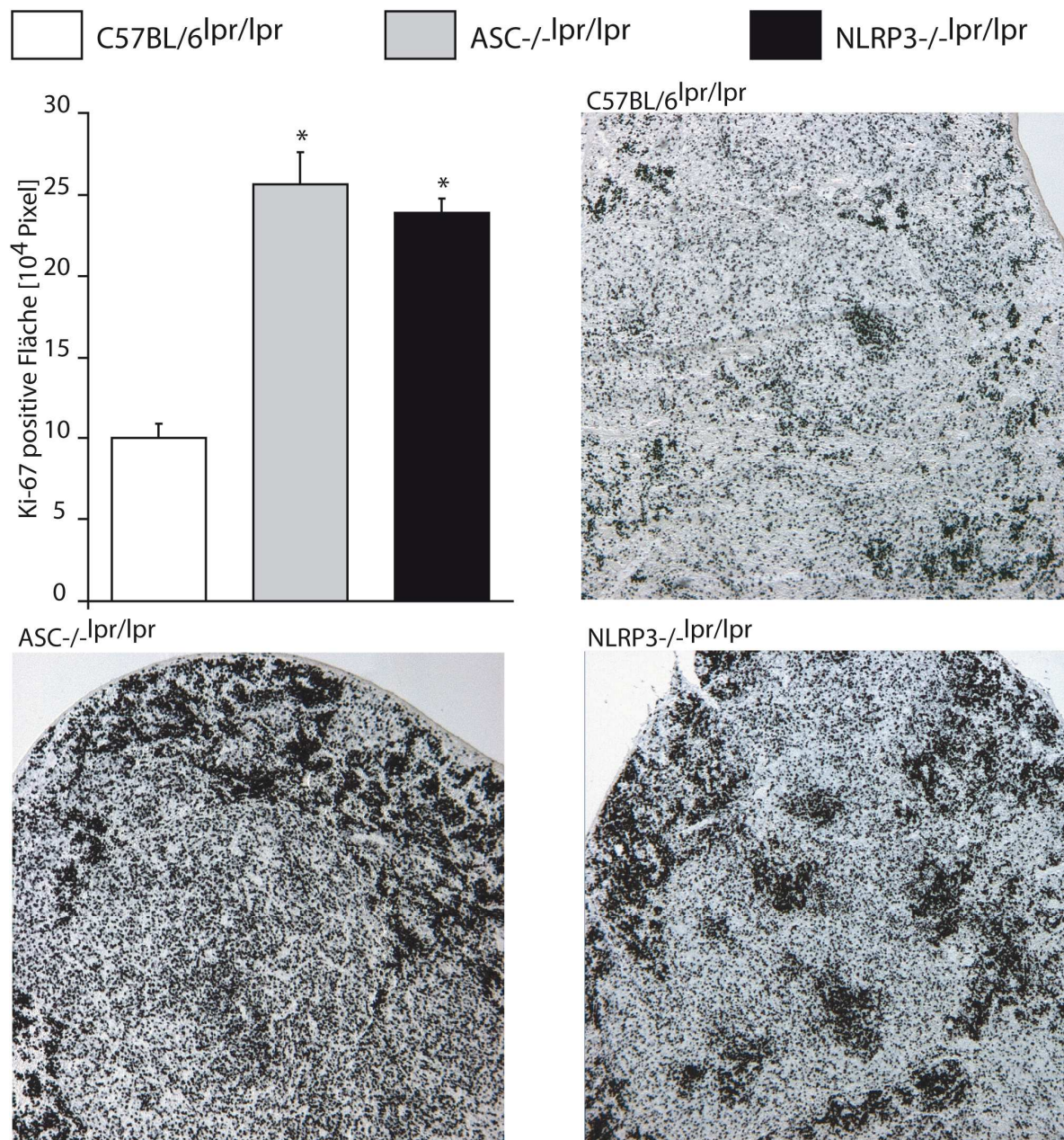
B Westernblot aus Milzzellen: Gespaltene Caspase-3



**Abbildung 20: Gespaltene Caspase-3-Aktivität in Milzzellen aus ASC- bzw. NLRP3-defizienten lpr-Tieren;**  
**A:** Immunhistologische Färbung: Gespaltene Caspase-3 in Milzsektionen 6 Monate alter lpr-Mäuse; Beispielbilder mittels Adobe Photoshop CS3 extended aus Einzelbildern erstellt (blauer Kanal: DAPI-Kernfärbung; rot: (Alexa-Fluor Anti-gespaltene Caspase-3; Alexa-Fluor); Gruppenvergleich mittels Auszählen positiver (roter) Zellen pro "High-Power Field" (5 Mäuse/Gruppe). **B:** Westernblot auf gespaltene Caspase-3 (oben) und  $\beta$ -Aktin (unten) als Loading-Kontrolle

Diese Daten zeigen, dass ASC- und NLRP3-Defizienz trotz leicht widersprüchlicher Daten im C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Hintergrund letztendlich nicht zu einer relevanten Alteration des apoptotischen Phänotyps führen. Die erhöhte Expression Apoptose-relevanter Gene (Abbildung 19A) übersetzt sich nicht in vermehrten Zelltod.

Vielmehr scheint, wie Abbildung 21 anhand einer größeren Ki-67-positiven Fläche in Milzen von ASC<sup>-/-</sup> bzw. NLRP3<sup>-/-</sup> lpr-Mäusen verglichen mit Kontrolltieren zeigt, eine vermehrte Proliferation der Immunzellen ausschlaggebend für die erhöhte Lymphozytenzahl zu sein.



**Abbildung 21: Ki-67-Färbung von Milzen aus ASC- bzw. NLRP3-defizienten lpr-Tieren;** oben links: Auswertung der Ki-67+ Fläche via Adobe Photoshop CS3 extended (4 Milzen/Gruppe); oben rechts / unten links / unten rechts Beispielbilder von Ki-67-gefärbten Milzen in den verschiedenen Genotypen. \*=p<0,05. P-Wert aus t-Test im Bezug zu C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Kontrolltieren

Welche Schlüsse lassen diese hier in Kapitel 3.3 gemachten Beobachtungen zu?

In Kapitel 3.1 wurde berichtet, dass die Abwesenheit von NLRP3 oder ASC für sich alleine im C57BL/6-Hintergrund keine derartige spontane Autoimmunität induziert. Abbildung 18 zeigt jedoch deutlich, dass NLRP3- bzw. ASC-Defizienz im Kontext einer Lupus-induzierenden Mutation (*lpr*) überraschenderweise keine Abschwächung sondern eine deutliche Aggravation des lymphoproliferativen Syndroms im Mausmodell bewirkt. NLRP3 und ASC schützen also konträr zur Projekthypothese vor Lymphoproliferation, Splenomegalie und Lymphadenopathie in C57BL/6<sup>*lpr/lpr*</sup> Mäusen.

Weiterhin lässt sich bei defektem Inflammasom in ASC<sup>-/-</sup> und NLRP3<sup>-/-</sup> *lpr*-Tieren zwar, wie in Kapitel 3.2 gezeigt wurde, reduzierte Caspase-1-Aktivität und folglich auch geringere IL-1 $\beta$ - und IL-18-Sekretion nachweisen, Defekte in der Lymphozytenapoptose jedoch treten trotz reduzierter Caspase-1-Aktivität nicht auf. Die Expansion der Immunzellen in Milz und Lymphknoten in ASC<sup>-/-</sup> und NLRP3<sup>-/-</sup> *lpr*-Mäusen ist daher weniger einer defekten apoptotischen Clearance als vielmehr einer vermehrten Lymphoproliferation geschuldet.

### **3.4 ASC- bzw. NLRP3-defiziente C57BL/6<sup>*lpr/lpr*</sup> Mäuse zeigen aggravierte autoimmune Lungen- und Nierenschädigung**

Der SLE beim Menschen bedingt des Öfteren autoimmune Organbeteiligung in Form von Lupusnephritis und Lungenbefall [2, 4, 13]. BL/6<sup>*lpr/lpr*</sup> Mäuse zeigen dagegen lediglich eine milde Lupusnephritis und kaum Lungenpathologie [119]. Dennoch fragten wir uns, ob sich die massive Lymphoproliferation in NLRP3<sup>-/-</sup> bzw. ASC<sup>-/-</sup> BL/6<sup>*lpr/lpr*</sup> Mäusen auch in vermehrte autoimmune Organschädigung übersetzten würde.

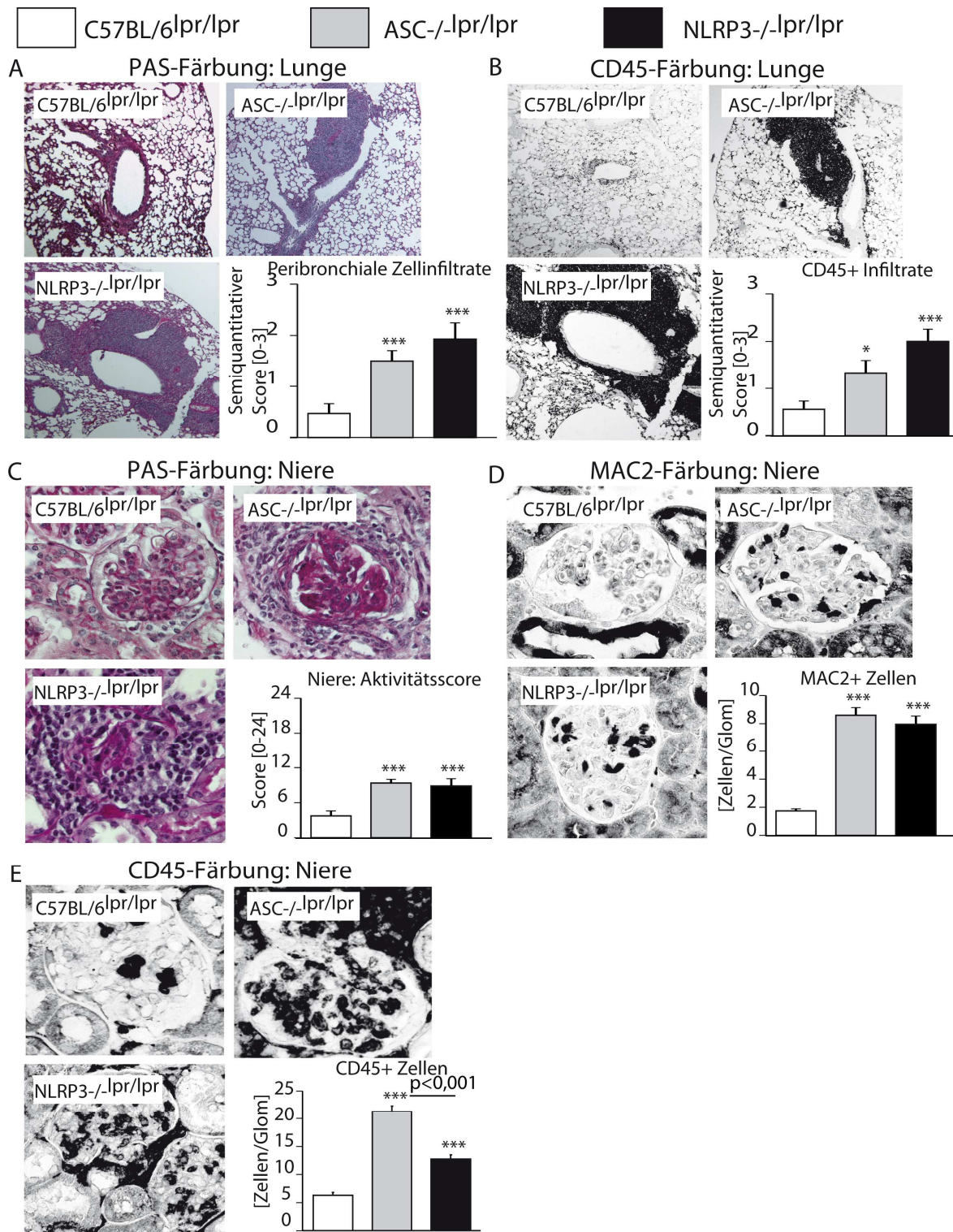
In beiden NLRP3- bzw. ASC-defizienten *lpr*-Mauslinien fand sich im Vergleich zu herkömmlichen C57BL/6<sup>*lpr/lpr*</sup> Mäusen eine signifikant vermehrte peribronchiale Infiltration CD45-positiver Zellen innerhalb der Lungen im Alter von 6 Monaten (Abbildung 22A und B).

NLRP3- und ASC-Defizienz aggravierte weiterhin eine diffuse mesangioproliferative Glomerulonephritis und periglomeruläre Entzündung in B6<sup>*lpr/lpr*</sup> Tieren mit einem signifikant erhöhten Aktivitätsscore der Lupusnephritis im PAS-Schnitt (Abbildung 22C). Demgemäß fand sich für diese beiden Genotypen eine signifikant vermehrte Infiltration MAC2-positiver Makrophagen innerhalb der Glomeruli (Abbildung 22D). Weiterhin zeigte sich in NLRP3<sup>-/-</sup> bzw. ASC<sup>-/-</sup> BL/6<sup>*lpr/lpr*</sup> Mäusen die Gesamtzahl CD45-positiver Leukozyten innerhalb der Niere im Vergleich zu Kontrolltieren vermehrt (Abbildung 22E). Die lokal vermehrte entzündliche Aktivität wurde darüber hinaus für NLRP3- und ASC-defiziente Mäuse mittels einer immunhistochemischen Komplement-(C3)-Färbung semiquantitativ als höher befunden (Abbildung 22F). Interessanterweise ließen sich aber keinerlei Unterschiede für die glomeruläre IgM- oder IgG-

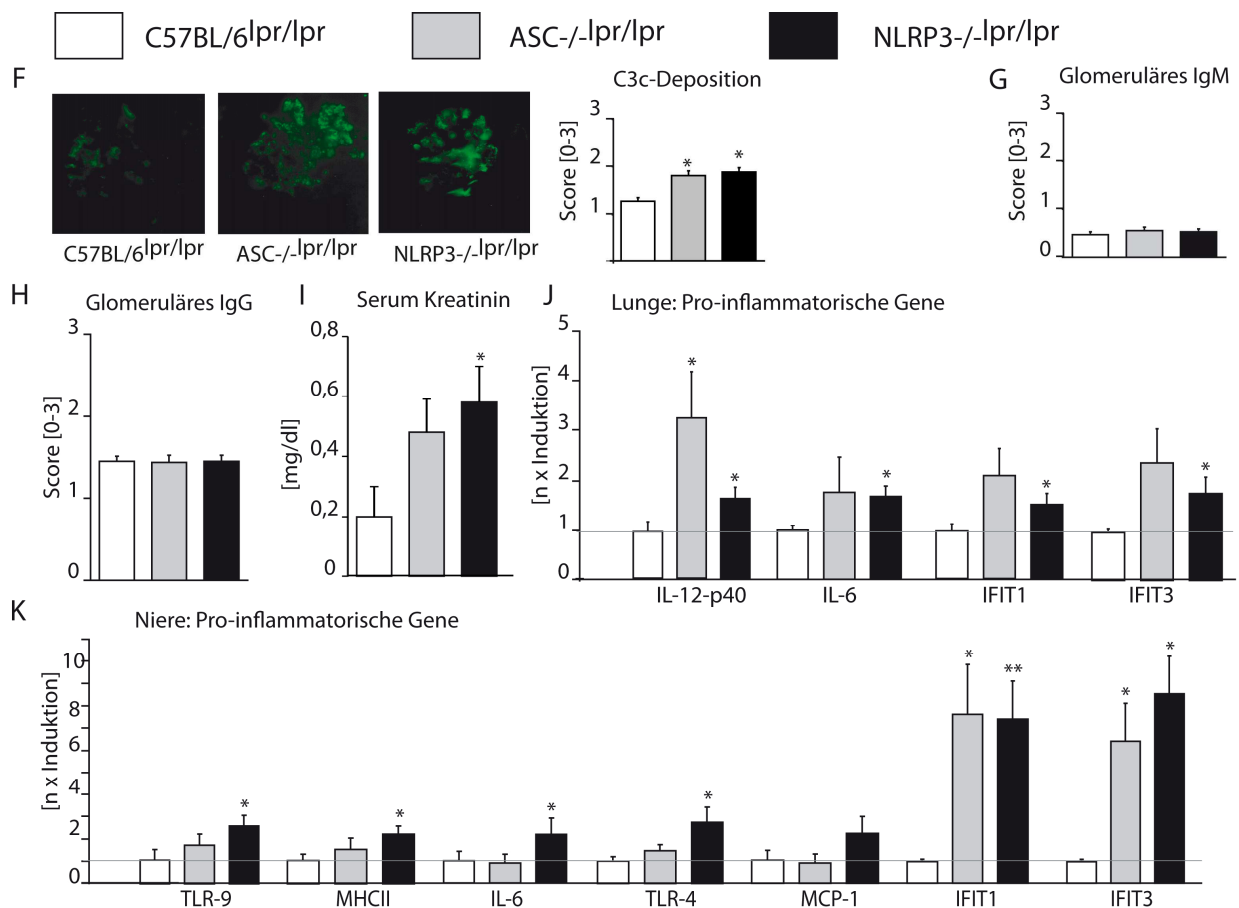
Deposition zwischen irgendeinem der untersuchten Genotypen im Vergleich zu B6<sup>lpr/lpr</sup> feststellen (Abbildung 22G bzw. 22H).

Um die klinischen Folgen und die Gewebeentzündung selbst zu objektivieren, führten wir Kreatininmessungen und RT-PCR-Analysen aus Nieren- und Lungengewebe von NLRP3<sup>-/-</sup> und ASC<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> durch. Die Serumkreatinin-Werte fanden sich dabei für NLRP3<sup>-/-</sup> und ASC<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> erhöht, wobei dies nur im Falle von NLRP3-Defizienz statistische Signifikanz erreichte (Abbildung 22I).

Die Analyse des Expressionsstatus pro-entzündlicher Gene aus Lungen- und Nierengewebe selbiger Mäuse zeigte eine vermehrte Expression von IL-6 und IL-12 im Lungengewebe, wobei ersteres dabei nur zwischen NLRP3<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen und Kontrollen Signifikanz erreichte. Weitere Gene, wie IFIT1 und IFIT3, als Interferon-abhängige Markergene waren trendartig in Richtung Erhöhung verschoben (Abbildung 22J). An Gesamtnierengewebe untersuchten wir ebenfalls mittels RT-PCR die Expression einiger Markergene und fanden für die unter Kontrolle von Interferon stehenden Gene IFIT1 und IFIT3 signifikant erhöhte Werte für ASC<sup>-/-</sup> bzw. NLRP3<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Tiere. Einige Gene wie IL-6, TLR-4, MHCII, MCP-1 fanden sich dabei jedoch lediglich für NLRP3-defiziente C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäuse signifikant erhöht (Abbildung 22K).



**Abbildung 22A-E: Autoimmune Lungen- und Nierenschädigung;** Histologische Färbungen der Lungen (A,B) und Nieren (C-E) von C57BL/6-, ASC<sup>-/-</sup> und NLRP3<sup>-/-</sup> lpr-Mäusen; **A:** PAS-Färbung der Lungen zeigt peribronchiale Immunezellinfiltrate bei ASC<sup>-/-</sup> und NLRP3<sup>-/-</sup> lpr-Mäusen; quantifiziert im Graphen (Daten aus 5-8 Mäusen/Gruppe); **B:** CD45-Färbungen der histologischen Schnitte zeigen CD45-positive Zellinfiltrate in selbigen Tieren (Daten aus 5-9 Mäusen/Gruppe); **C:** PAS-Färbung zeigt vermehrte Glomerulonephritis in ASC<sup>-/-</sup> und NLRP3<sup>-/-</sup> lpr-Mäusen im Vergleich zur Kontrolle; quantifiziert als Nephritis-Aktivitätsscore (0-24; 7-12 Mäuse/Gruppe); **D:** Die MAC-2-Färbung zeigt vermehrte Infiltration von Makrophagen in die Glomeruli von ASC<sup>-/-</sup> und NLRP3<sup>-/-</sup> Mäusen; quantifiziert als MAC2+ Zellen/Glomerulus (10 Glomeruli/Niere, 5-8 Mäuse/Gruppe); **E:** CD45+ Zellinfiltration für NLRP3- bzw. ASC-defiziente bzw. C57BL/6 lpr-Tiere; quantifiziert als CD45+/Glomerulus (10 Glomeruli/Niere, 8 Mäuse/Gruppe); \*=*p*<0,05; \*\*\*=*p*<0,001; P-Wert aus t-Test im Bezug zu C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Kontrolltieren



**Abbildung 22F-K: Autoimmune Lungen- und Nierenschädigung; F:** Komplement C3c-FITC-Immunfluoreszenzfärbung der Nieren von 6 Monate alten C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> bzw. ASC- bzw. NLRP3-defizienten lpr-Mäusen; Beispielbilder und Semiquantitative Evaluation der Komplementablagerung (4 Nieren/Gruppe). **G/H:** Semiquantitative Bewertung des innerhalb der Glomeruli deponierten IgM bzw. IgG im Alter von 6 Monaten (8 Nieren/Gruppe); **I:** Serumkreatinin-Werte aus C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> bzw. ASC- oder NLRP3-defizienten lpr-Mäusen im Alter von 6 Monaten (6-8 Mäuse/Gruppe); **J:** RT-PCR Expressionsanalyse von pro-entzündlichen Markergenen in Lungengewebe 6 Monate alter Mäusen (aus 5 Mäusen/Gruppe); **K:** RT-PCR Expressionsanalyse von pro-entzündlichen Genen in Nierengewebe im Alter von 6 Monaten (5 Mäuse/Gruppe); \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; P-Wert aus t-Test im Bezug zu C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Kontrolltieren

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass NLRP3 und ASC nicht nur vor Lymphoproliferation sondern auch vor damit verbundenen autoimmunen Organschädigungen schützen, da aus der vermehrten Lymphoproliferation in NLRP3<sup>-/-</sup> bzw. ASC<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> vermehrte autoimmune Gewebeschädigung resultiert. Zudem war die autoimmune Gewebeschädigung in diesen Mäusen nicht mit vermehrter Antikörperdeposition sondern vermehrter zellulärer Immunität und Zellinfiltration verbunden.

Aus der Zusammenschau mit den Vorbefunden aus herkömmlichen NLRP3- bzw. ASC-defizienten C57BL/6 Tieren (Kapitel 3.1) lässt sich schlussfolgern, dass die Abwesenheit dieser Proteine per se nicht in der Lage ist, Autoimmunität und Organschäden zu triggern. Im lymphoproliferativen C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Hintergrund hingegen, schützen beide Proteine vor aggregierter Lymphoproliferation und damit einhergehenden autoimmunen Organschäden.

### 3.5 ASC und NLRP3 unterdrücken die Expansion und Aktivierung dendritischer Zellen und Makrophagen in C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen

Das NLRP3-Inflammasom wirkt im angeborenen Immunsystem entzündungsfördernd durch die Sekretion der pro-entzündlichen Mediatoren IL-1 $\beta$  und IL-18. Diese können APCs und andere Immunzellen aktivieren [89, 90, 102, 140]. Gemäß unserer initialen Hypothese vermuteten wir für ASC- bzw. NLRP3-defiziente Tiere eine reduzierte Aktivierung von APCs.

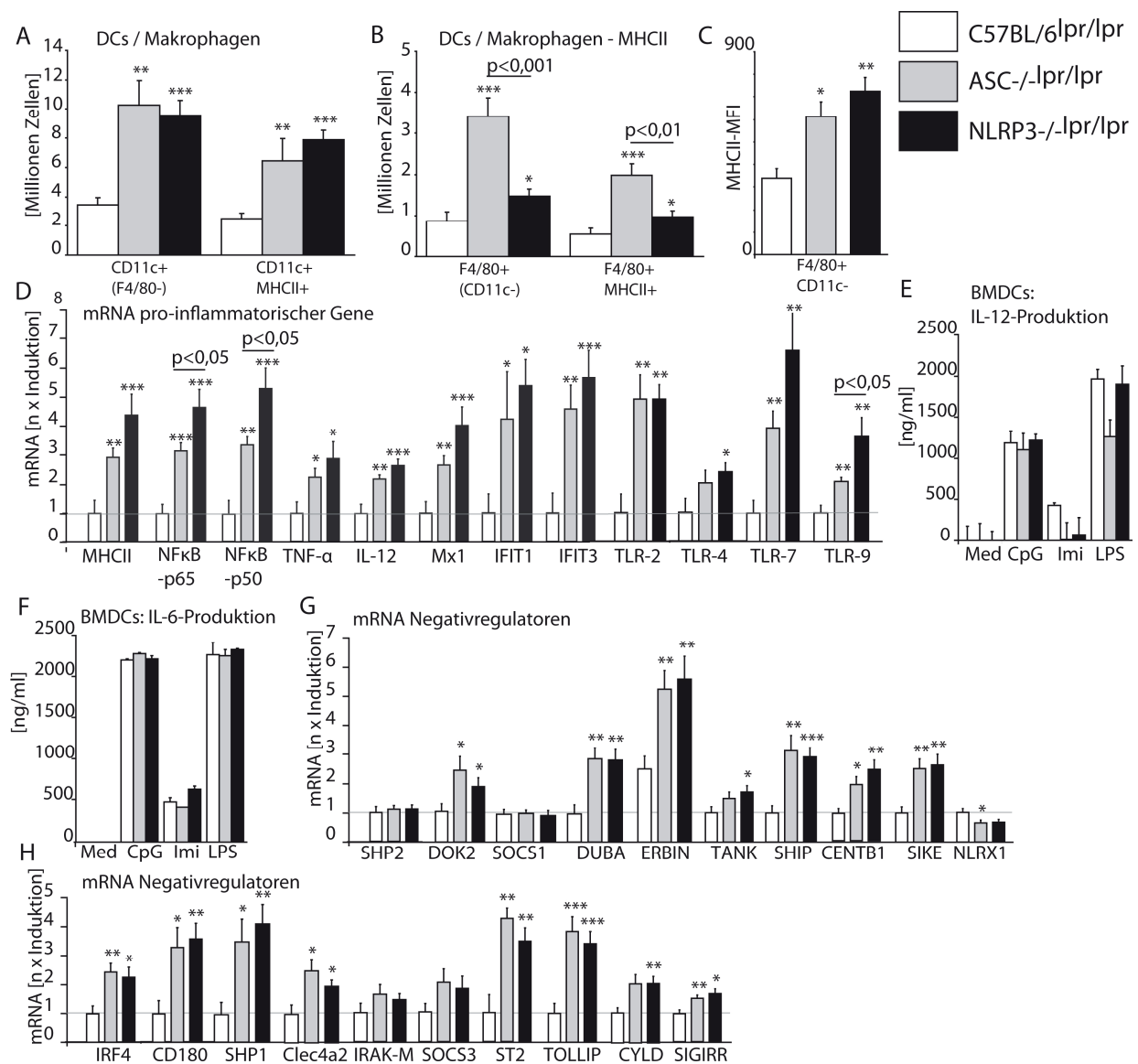
Wir benutzen die Expression des Markers MHCII auf der Oberfläche von CD11c+F<sub>4/80</sub>- dendritischen Zellen und F<sub>4/80</sub>+CD11c- Makrophagen als Aktivierungsmarker bei der durchflusszytometrischen Analyse von Milzzellen 6 Monate alter NLRP3- bzw. ASC-defizienter C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäuse. Als Kontrolle dienten herkömmliche C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäuse. Entgegen der aufgrund der bisher bekannten NLRP3-Inflammasom-Funktionen prognostizierten Erwartungen zeigte sich hier in Übereinstimmung mit vermehrter Lymphoproliferation, dass NLRP3- und ASC-Defizienz in lpr-Mäusen mit einer Expansion dendritischer Zellen (Abbildung 22A) und der Makrophagen (Abbildung 22B) einherging. Weiterhin fand sich eine erhöhte Anzahl aktivierter dendritischer Zellen (CD11c+F<sub>4/80</sub>-MHCII+) und F<sub>4/80</sub>+CD11c-MHCII+ aktivierter Makrophagen (Abbildung 23A und B). Die Analyse der Mean Fluorescence Intensity (MFI) der MHCII-Expression auf Makrophagen lieferte Hinweise für eine vermehrte Aktivierung der Einzelzellen (Abbildung 23C).

In Übereinstimmung damit ergab die RT-PCR-Analyse aus Milzen eine erhöhte Expression einer Vielzahl pro-entzündlicher Gene, wie NF $\kappa$ B-p50, NF $\kappa$ B-p65, TNF- $\alpha$ , IL-12-p40, IFIT1, IFIT3, Mx1, und MHCII in NLRP3- bzw. ASC-defizienten C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen (Abbildung 23D).

Aufgrund der ebenfalls vermehrten Expression der TLRs -4, -7 und -9 (Abbildung 23D), für die im Kontext des SLE sterile körpereigene Liganden als PAMPs beschrieben wurden [141-143], überprüften wir, ob dendritische Zellen aus NLRP3- und ASC-defizienten lpr-Mäusen ein verstärktes TLR-Signaling aufweisen würden. Wir untersuchten daher die Induktion von IL-12 und IL-6 nach in vitro Stimulation von BMDCs aus allen drei Genotypen mit LPS, Imiquimod und CpG, jeweils als TLR-4, TLR-7, TLR-9 Liganden. Es fanden sich jedoch keine Unterschiede in der Produktion dieser Mediatoren (Abbildung 23E bzw. F).

Um auf grundlegende Defekte in der Kontrolle von Immunsignalwegen zu untersuchen, analysierten wir Milzen 6 Monaten alter Tiere auf mRNAs bekannter Negativregulatoren von Entzündungsprozessen [135]. Diese zeigten sich jedoch entsprechend der Norm induziert (Abbildung 23G und H). Daher schlossen wir einen derartigen Defekt als Ursache für den unerwarteten Phänotyp zunächst aus.



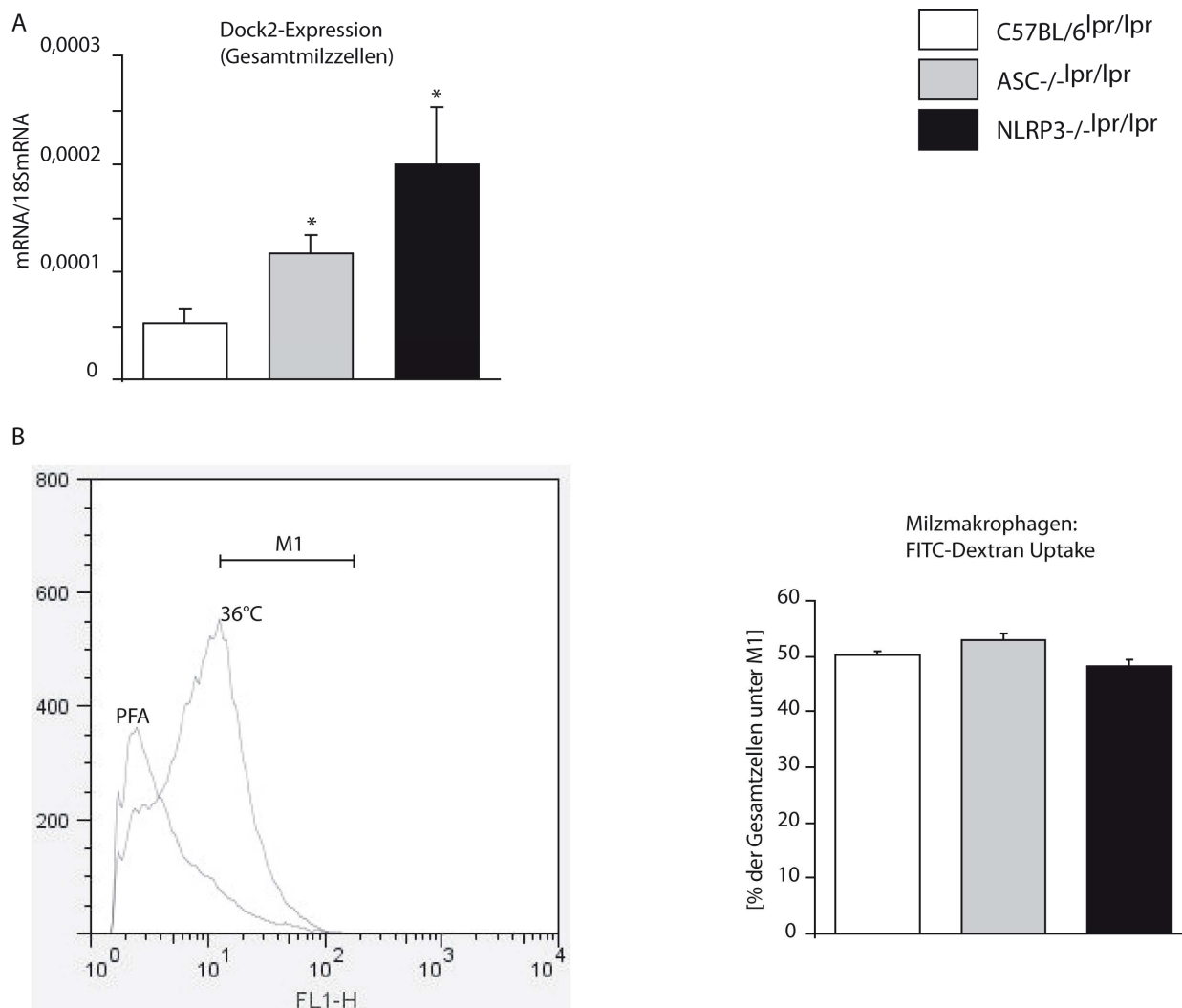


**Abbildung 23: Expansion dendritischer Zellen und Makrophagen (APCs) und vermehrte Aktivierung in NLRP3- bzw. ASC-defizienten C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen;** **A** und **B**: Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellzahl von CD11c<sup>+</sup> dendritischen Zellen (**A**) und F<sub>4/80</sub><sup>+</sup> Makrophagen (**B**) sowie der aktivierten MHCII<sup>+</sup> Subpopulationen (**A** und **B**); **C**: MFI für MHCII auf Makrophagen im Alter von 6 Monaten (8-18 Mäuse/Gruppe); **D**: RT-PCR Expressionsanalyse aus Milzzellen auf pro-inflammatorische Gene im Alter von 6 Monaten (5Mäuse/Gruppe); **E** und **F**: IL-12- (**E**) und IL-6-Produktion (**F**) von myeloischen dendritischen Zellen (BMDCs) nach Stimulation mit TLR-Liganden CpG, Imiquimod und LPS (repräsentativ für 2 unabhängige Experimente; jedes Einzelexperiment für Zellpool aus mindestens 2 Mäusen gleichen Genotyps im Alter von 6-8 Wochen); **G** und **H**: RT-PCR Expressionsanalyse aus Milzzellen von 6 Monate alten Mäusen auf gängige Negativregulator-mRNA im Alter von 6 Monaten; \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ ; P-Wert aus t-Test im Bezug zu C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Kontrolltieren

Eine gestörte Phagozytose von nekrotischen Partikeln oder Zelldebris kann bei der Pathogenese des SLE eine treibende Rolle spielen [48, 139]. Zur weiteren Ursachenklärung untersuchten wir deshalb, inwiefern die Migration bzw. die Aufnahme von Partikeln durch Milzmakrophagen in NLRP3<sup>-/-</sup> und ASC<sup>-/-</sup> lpr-Mäusen beeinträchtigt sein könnte. Abbildung 24A zeigt die Ergebnisse einer RT-PCR-Studie auf Dock2-Expression aus Milzen von NLRP3<sup>-/-</sup> bzw. ASC<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen im Vergleich zur Kontrolle. Deducator Of Cytokines 2 (Dock2) ist ein

Marker, der für die Migration und Phagozytose von Immunzellen eine Rolle spielt und in bestimmten ASC<sup>-/-</sup> Mauslinien defizient beschrieben wurde [144, 145]. Die Abbildung gibt zu erkennen, dass selbiger in unseren Tieren eher im Sinne einer vermehrten Aktivierung der Immunzellen aufreguliert ist.

Darüber hinaus untersuchten wir die Phagozytoseaktivität von Milzmakrophagen in Form der Aufnahme von FITC-gelabelter Dextranpartikel *in vitro*. Wir stellten hierbei keine reduzierte Aktivität für ASC- und NLRP3-defiziente *lpr*-Tiere fest (Abbildung 24B).



**Abbildung 24: Migration und Phagozytose der Makrophagen; A:** Dock2-Expression aus Milzen 6 Monate alter *lpr*-Mäuse; Vergleich der nach 18S normierten CP-Werte (5 Mäuse pro Gruppe); **B:** „FITC-konjugiertes Dextran“-Aufnahme von adherenten Makrophagen und dendritischen Zellen der Milz nach Prä-Inkubation mit LPS (0,1µg/ml) über Nacht; Zur Kontrolle dienten in Paraformaldehyd (PFA) und bei 4°C mit gleicher Konzentration mit FITC-Dextran inkubierte Zellen; **links:** Nach 2-stündiger Inkubation wurde die Aufnahme von FITC-Dextran durchflusszytometrisch wie im linken Bild (exemplarisch für NLRP3<sup>-/-</sup>lpr/lpr gezeigt) über Histogrammplots und die FL1-Signalintensität bestimmt. **Rechts:** Darstellung der mittleren FITC-Dextranaufnahme durch adherente Milzmakrophagen und dendritische Zellen; Daten repräsentativ für 4 Stichproben/Gruppe und 2 Stichproben/PFA bzw.4°C-Kontrollgruppe; \*= $p < 0,05$ ; P-Wert aus t-Test im Bezug zu C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Kontrolltieren

Somit führt die Abwesenheit von NLRP3 und ASC in *lpr*-Mäusen zur Expansion von Makrophagen, dendritischen Zellen, zur vermehrten Aktivierung selbiger Zellen und einer erhöhten Expression entzündungsassoziierter mRNA. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zur gemäß der initialen Projekthypothese vermuteten reduzierten Aktivierbarkeit Antigen-präsentierender Zellen, aufgrund reduzierter IL-1beta- oder IL-18-Sekretion.

Weiterhin lässt sich die vermehrte APC-Aktivierung nicht auf Defekte in der phagozytotischen Clearance oder ein primär alteriertes TLR-Signaling zurückführen. Angesichts der gleichmäßigen Interleukinproduktion nach TLR-Stimulation und der Induzierbarkeit bekannter Negativregulatoren *in vivo* im Alter von 6 Monaten, scheint ein Defekt in diesen Bereichen nicht im Stande zu sein, die Aggravation der beiden Phänotypen und die vermehrte Anzahl aktivierter dendritischer Zellen und Makrophagen zu erklären.

### **3.6 NLRP3 und ASC unterdrücken die Expansion und Aktivierung von T-Zellen und autoreaktiven T-Zellen in C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Tieren**

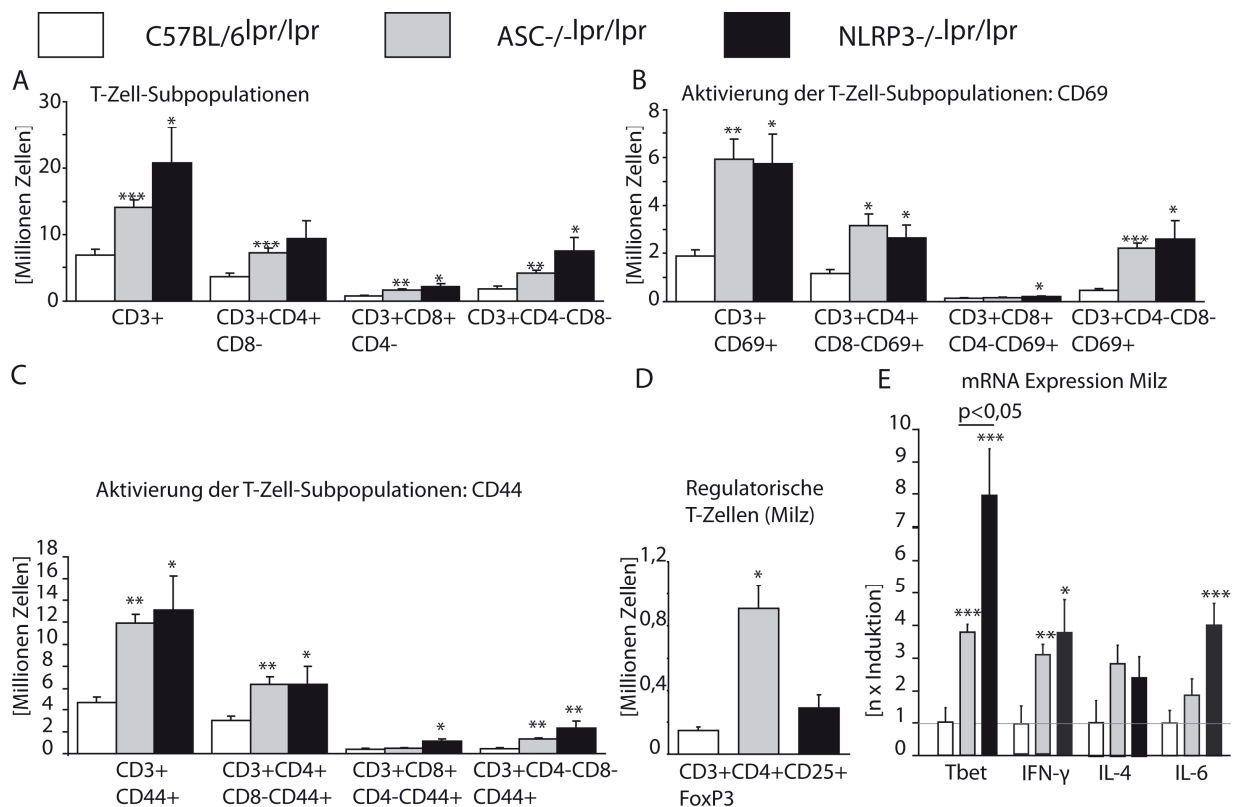
Wie aber beeinflusst die beobachtete Aktivierung der Antigen-präsentierenden Zellen die T-Zellsubpopulationen? Um diese Frage zu klären, charakterisierten wir Splenozyten aus NLRP3- bzw. ASC-defizienten C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> und C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen durchflusszytometrisch bezüglich der Expression der Oberflächenmarker CD3, CD4, CD8, CD25, FoxP3, CD69 und CD44. Die letzteren beiden dienten dabei als Aktivierungsmarker. Sowohl NLRP3- als auch ASC-defiziente Mausstämmen zeigten dabei eine vermehrte Anzahl CD3+CD4+ T-Helferzellen, CD3+CD8+ zytotoxischer Zellen und CD3+CD4-CD8- (doppelnegativer) „autoreaktiver Zellen“ (Abbildung 25A). Diese autoreaktive T-Zellpopulation zeigt beim SLE in Maus und Mensch eine abnorme Zunahme und wird mit der Pathogenese der Erkrankung in Zusammenhang gebracht [146-148]. Die Co-Färbung dieser Subpopulationen mit den Aktivierungsmarkern CD69 (Abbildung 25B) ergab, dass sowohl T-Helferzellen (CD3+CD4+CD8-), als auch zytotoxische T-Zellen (CD3+CD8+CD4- nur für NLRP3-/-<sup>lpr/lpr</sup>), als auch autoreaktive T-Zellen in NLRP3-/- bzw. ASC-/- C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen vermehrt aktiviert waren. Da CD69 ein früher Aktivierungsmarker ist und von manchen Autoren als für das chronische Lupusmodell ungeeignet betrachtet wird, überprüften wir die T-Zell-Aktivierung auch mittels CD44 [149] (Abbildung 25C). Auch hier bestätigte sich eine vermehrte Anzahl aktivierter T-Zellen im Allgemeinen, T-Helferzellen und „autoreaktiver“ T-Zellen. Ebenfalls signifikant vermehrt, aktiviert allerdings lediglich für den NLRP3-/- *lpr*-Genotyp, fanden sich zytotoxische T-Zellen (CD3+CD8+CD4-).

CD4+CD25+FoxP3+ „regulatorische“ T-Zellen zeigten sich dahingegen lediglich in ASC-/- C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Tieren signifikant vermehrt (Abbildung 25D). Die Funktion dieser regulatori-

schen T-Zellen jedoch, nämlich die Suppression von T-Zellproliferation, zeigte sich sowohl für ASC- als auch NLRP3-defiziente Tiere normal ausgeprägt (nicht gezeigt)\*.

Mittels Expressionsanalysen aus Milzzellen sollte darüber hinaus die T-Helfer-Immunantwort weiter charakterisiert werden. Es fanden sich dabei sowohl für von Th1-Differenzierung abhängige Gene, wie Tbet (T-box expressed in T-cells) und IFN- $\gamma$ , als auch für Th2-Differenzierungsmarker, wie IL-4 und IL-6, eine erhöhte Expression in NLRP3- bzw. ASC-defizienten C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen [150, 151]. Allerdings erreichten nicht alle dieser Markergebene statistische Signifikanz (Abbildung 25E).

Zusammenfassend veranschaulichen diese Daten, dass ASC und NLRP3 vor Expansion und vermehrter Aktivierung verschiedener T-Zellkompartimente, inklusive der autoreaktiven CD3+CD4-CD8- Zellen, schützen.



**Abbildung 25: T-Zellen und T-Zellsubpopulationen;** **A:** Durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Subpopulationen aus Milzen 6 Monate alter C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> und ASC- bzw. NLRP3-defizienter lpr-Mäuse (8-17 Tiere/Gruppe); **B:** Gesamtzahl der aktivierten (CD69+) T-Zell-Subpopulationen (8-18 Mäuse/Gruppe); **C:** Gesamtzahl der aktivierten (CD44+) T-Zell-Subpopulationen (3-8 Mäuse/Gruppe); **D:** Gesamtzahl der CD3+CD4+CD25+FoxP3+ regulatorischen T-Zellen in Milzen 6 Monate alter Mäuse; **E:** RT-PCR Expressionsanalyse aus Milzen 6 Monate alter Mäuse (5 Tiere/Gruppe) auf Markergene der TH1- und TH2-Differenzierung; \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ ; P-Wert aus t-Test im Bezug zu C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Kontrolltieren

\* Die Daten zur Überprüfung der Funktion regulatorischer T-Zellen wurden von der Arbeitsgruppe um Dr. David Anz speziell von Maximilian Wintergerst erhoben. Dafür möchte ich mich auch hier nochmals bedanken.

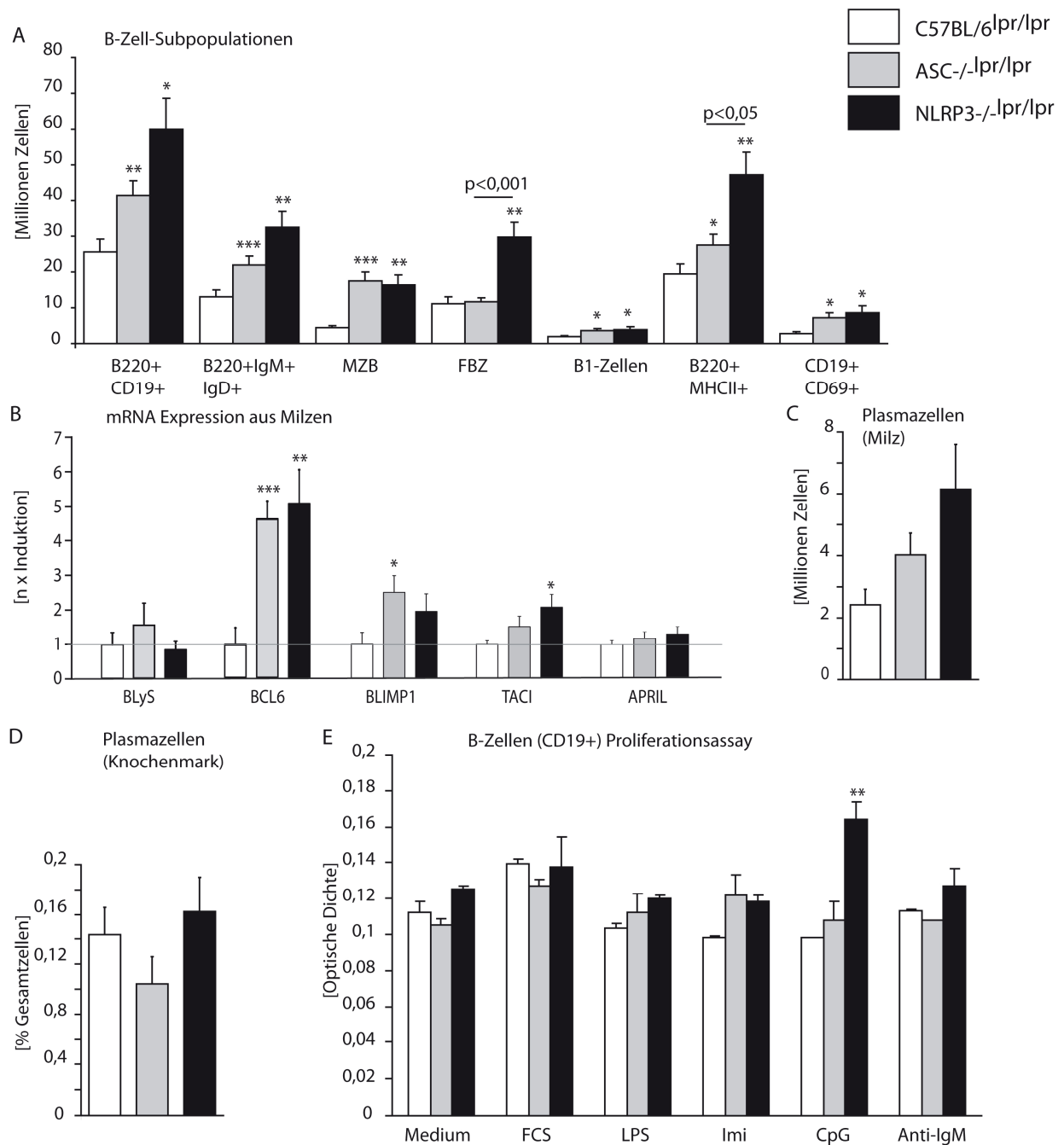
### 3.7 B-Zell Subpopulationen expandieren in ASC- und NLRP3-defizienten

#### C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen

Weiterhin galt es zu untersuchen, inwiefern sich die Expansion und vermehrte Aktivität von Antigen-präsentierenden Zellen (Kapitel 3.5) und T-Zellen (Kapitel 3.6) auf die einzelnen B-Zellpopulationen übertragen würde. In NLRP3- bzw. ASC-defizienten C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen fanden sich bei der durchflusszytometrischen Betrachtung verhältnismäßig mehr B220+CD19+ B-Zellen, B220+IgM+IgG+ naive B-Zellen, B220+CD21<sup>high</sup>CD23<sup>low</sup> Marginalzonen-B-Zellen, CD19+B220<sup>low</sup>CD5+ B1a-B-Zellen (Abbildung 26A). Auch die Gesamtzahl der aktivierten Zellen in Form von B220+MHCII+ bzw. B220+CD19+CD69+ Zellen ergab sich vermehrt. B220+CD21<sup>low</sup>CD23<sup>high</sup> follikuläre B-Zellen hingegen waren alleine in NLRP3-defizienten C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen im Vergleich zu C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Kontrolltieren expandiert (Abbildung 26A). Diese B-Zellexpansion war in der Expressionsanalyse mittels RT-PCR aus Milzen von NLRP3- bzw. ASC-defizienten C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Tieren mit einer vermehrten Expression des Transkriptionsfaktors BCL6 verbunden (Abbildung 26B). Dieser spielt eine Rolle bei der Bildung von Keimzentren, BCR-induzierter Lymphozytenapoptose und bei der Suppression der Plasmazellreifung [152]. Andere Faktoren, wie BlyS (B Lymphocyte Stimulator), auch BAFF (B Cell Activating Factor Belonging To The TNF Family) genannt, und APRIL (A Proliferation-Inducing Ligand), die beide B-Zell-Proliferations- und Überlebenssignale liefern, zeigten sich nicht verändert exprimiert. Deren Rezeptor auf B-Zellen, TACI (Transmembrane Activator And CAML-Interactor), und der Transkriptionsfaktor BLIMP1 (B Lymphocyte Induced Maturation Protein), der die Plasmazelldifferenzierung induzieren kann, fanden sich lediglich in NLRP3<sup>-/-</sup> bzw. ASC<sup>-/-</sup> lpr-Mäusen signifikant verändert [153-157] (Abbildung 26B).

Tatsächlich zeigte sich demnach auch die Gesamtzahl der CD138+κ-Leichtketten+ Plasmazellen nicht signifikant vermehrt, was aber evtl. der Anzahl untersuchter Tiere geschuldet sein könnte (Abbildung 26C). Auch im Knochenmark von 8 Wochen alten Tieren fanden sich keine Unterschiede bezüglich der Anzahl an Plasmazellen (Abbildung 26D).

Um das Proliferationsverhalten von B-Zellen auf T-Zell-unabhängige Stimuli zu untersuchen, stimulierten wir angereicherte CD19+ B-Zellen in vitro mit TLR-Liganden für TLR-4 (LPS), TLR-7 (Imiquimod), TLR-9 (CpG), und Anti-Maus-IgM zur Aktivierung des B-Zell-Rezeptors [158-160]. FCS diente hierbei als Positivkontrolle für die Proliferationsanalyse. Das Experiment ergab lediglich für NLRP3<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> eine vermehrte Proliferation infolge von TLR-9-Stimulation (Abbildung 26E).



**Abbildung 26: B-Zellen und Plasmazellen; A:** Durchflusszytometrische Analyse der B-Zell-Subpopulationen in Milzen 6 Monate alter *lpr*-Mäuse (8-18Mäuse/Gruppe); von links nach rechts: Gesamtzahl an B-Zellen (B220+CD19+), naiven B-Zellen (B220+IgM+IgD+), Marginalzonen B-Zellen (MBZ; B220+CD21<sup>high</sup>CD23<sup>low</sup>), folliculären B-Zellen (FBZ; B220+CD21<sup>low</sup>CD23<sup>high</sup>), B1-Zellen (CD19+B220<sup>low</sup>CD5+), Gesamtzahl B220-positiver und aktivierter (MHCII+) Zellen und Gesamtzahl aktivierter MHCII+ B-Zellen (B220+CD19+); **B:** RT-PCR aus Milzen 6 Monate alter C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> und ASC- bzw. NLRP3-defizienter *lpr*-Mäuse auf B-Zell-relevante Gene (5Mäuse/Gruppe); **C:** Gesamtzahl der Plasmazellen (CD138+ und  $\kappa$ -Leichtkette-intrazellulär+) innerhalb der Milzen nach 6 Monaten (8-18Mäuse/Gruppe); **D:** Plasmazellen im Knochenmark nach 8 Wochen (5/Gruppe); **E:** MTS-Proliferationsassay angewendet auf via MACS-Kit angereicherten CD19+ B-Zellen aus 8 Wochen alten *lpr*-Mäusen nach Stimulation mit FCS (Positivkontrolle), LPS, Imiquimod, CpG und Anti-Maus-IgM-Antikörper für 48 Stunden (4 Stichproben/Gruppe x 2 Experimente); \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ ; P-Wert aus t-Test im Bezug zu C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Kontrolltieren

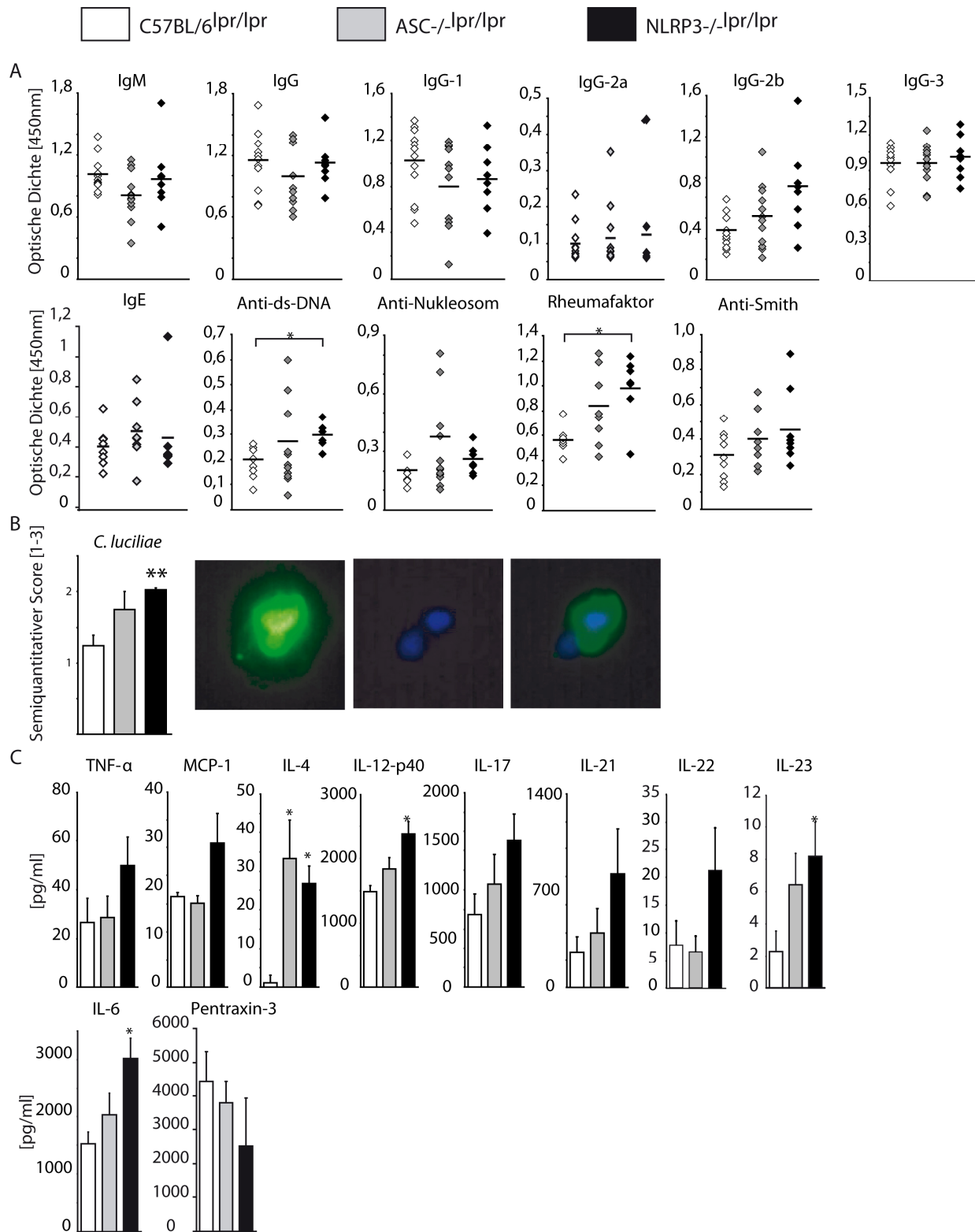
Zusammenfassend ist NLRP3- und ASC-Defizienz in *lpr*-Mäusen also sowohl mit der abnormen Expansion von T-Zellsubpopulationen (Kapitel 3.6) als auch verschiedener B-Zellsubpopulationen verbunden. Dies impliziert einen immunsuppressiven Effekt von NLRP3 und ASC auf T- und B-Zellen. Interessant ist das beobachtete, vermehrte Proliferationspotential von NLRP3<sup>-/-</sup> *lpr*-Mäusen nach TLR-9-Stimulation. Da NLRP3<sup>-/-</sup> C57BL/6 Mäuse ohne *lpr*-Mutation diese Qualität aber nicht aufweisen (Kapitel 3.1, Abbildung 16A), kommt dieser Effekt nur in Kombination mit der lymphoproliferativen *lpr*-Mutation in NLRP3<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>*lpr/lpr*</sup> Tieren zum Tragen.

### **3.8 Systemische (Auto-)Antikörper- und Interleukinlevel sind in NLRP3<sup>-/-</sup> und ASC<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>*lpr/lpr*</sup> Mäusen kaum verändert**

Nachdem die Anzahl an Plasmazellen (Kapitel 3.7) ebenso wie die in den Nieren deponierte Antikörpermenge (Kapitel 3.4) in NLRP3<sup>-/-</sup> und ASC<sup>-/-</sup> *lpr*-Tieren nicht signifikant verändert war, überrascht es nicht, dass sich die systemischen Antikörperspiegel, wie Gesamt-IgM, -IgG, -IgG-1, -IgG-2a, -IgG-2b, -IgG-3, -IgE und Autoantikörperspiegel, wie Anti-Sm, als weitestgehend unabhängig vom Genotyp erwiesen (Abbildung 27A). Ausgenommen davon fanden sich Anti-dsDNA-Antikörper und Rheumafaktor als Autoantikörper in NLRP3<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>*lpr/lpr*</sup> Mäusen signifikant erhöht im Vergleich zu herkömmlichen C57BL/6<sup>*lpr/lpr*</sup> Tieren (Abbildung 27A). Die Spezifität der Anti-dsDNA-Antikörper wurde mittels *Crithidia luciliae*-Assay überprüft (Abbildung 27B).

Ähnliche Beobachtungen machten wir bei der Analyse der systemischen Interleukinspiegel. Mit Ausnahme erhöhter IL-12p40, IL-6, IL-23 und IL-4 Werte in NLRP3<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>*lpr/lpr*</sup> Tieren zeigten sich hierbei keine signifikanten Veränderungen für die Mediatoren TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-17, IL-21, IL-22 und Pentraxin-3 (Abbildung 27C). Systemische Level von IFN- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-10 waren weitestgehend nicht detektierbar (nicht gezeigt).

Demnach beeinflusst der immunsuppressive Effekt von ASC und NLRP3 auf Makrophagen, dendritische Zellen sowie T- und B-Zellen die Produktion der systemischen Interleukinmenge und die (Auto-)Antikörperproduktion, abgesehen von einigen Trends, nicht stark. Möglicherweise lassen sich die recht konsistent in Richtung Erhöhung verschobenen Interleukintrends auf vermehrte systemische Immunzellaktivierung zurückführen.



**Abbildung 27: Plasmapbefunde in ASC<sup>-/-</sup> und NLRP3<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Tieren; A:** Mittels ELISA bestimmte Plasmaspiegel für Gesamt-IgM, -IgG, -IgG-1, -IgG-2a, -IgG-2b, -IgG-3, -IgE und Anti-ds-DNA-, Anti-Nukleosom- und (RF) Rheumafaktor-Antikörper im Alter von 6 Monaten (aus 8-12 Tieren/Gruppe); **B:** Spezifität der Anti-dsDNA-Antikörper quantifiziert mittels *Crithidia*-Staining; Bilder rechts zeigen *Crithidia* Slides im blauen (DAPI) und grünen (FITC-Anti-Maus-IgG) Fluoreszenzkanal sowie beide Signale übereinander; Probe einer NLRP3<sup>-/-</sup>lpr-Maus; **C:** Plasma Interleukinwerte in 6 Monate alten Tieren (8-12/Gruppe); \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; P-Wert aus t-Test im Bezug zu C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Kontrolltieren



### 3.9 NLRP3 und ASC interferieren mit dem TGF- $\beta$ -Signaling in vitro und in vivo

Welcher Mechanismus aber könnte eine Erklärung für den durchaus unerwarteten Phänotyp der NLRP3- und ASC-defizienten *lpr*-Mäuse liefern?

Einleitend wurde die Rolle der Proteine NLRP3 und ASC bei der Bildung des Caspase-1 rekrutierenden sowie IL-1 $\beta$ - und IL-18-sezernierenden NLRP3-Inflammasomkomplexes beschrieben. Die Tatsachen, dass diese pro-entzündlichen Interleukine in NLRP3- und ASC-defizienten Mäusen vermindert sind (Kapitel 3.2) und dass der lymphoproliferative Phänotyp von NLRP3- bzw. ASC-defizienten *lpr*-Mäusen (Kapitel 3.3) in IL-1 $\alpha$ -/- und IL-18-/- C57BL/6<sup>*lpr/lpr*</sup> Mäusen nicht nachweisbar war [161], ließen uns vermuten, dass der Phänotyp dieser Mäuse auf eine Inflammasom-, IL-1 $\beta$ - und IL-18-unabhängige Funktion der Proteine ASC und NLRP3 zurückzuführen sei. Neben meist eher Entzündung antreibenden Funktionen für ASC oder NLRP3 in verschiedenen Populationen fanden Wang et al. Anfang 2013 eine vom Inflammasom und der IL-1 $\beta$ /IL-18-Sekretion unabhängige Rolle für NLRP3 und ASC in der Förderung von TGF- $\beta$ -Signaling in tubulären Zellen der Niere [162-166]. Da TGF- $\beta$  eine stark immunsuppressive Funktion hat, insofern als TGF- $\beta$ -/- Mäuse ein schweres autoinflammatorisches Syndrom entwickeln [167], fragten wir uns, ob die Abwesenheit von NLRP3 oder ASC in unseren *lpr*-Mäusen auch zu reduziertem TGF- $\beta$ -Signaling in Immunzellen von C57BL/6<sup>*lpr/lpr*</sup> Mäusen führen würde. In diesem Falle könnte vermindertes immunsuppressives TGF- $\beta$ -Signaling die vermehrte Lymphoproliferation und autoimmune Gewebeschädigung erklären.

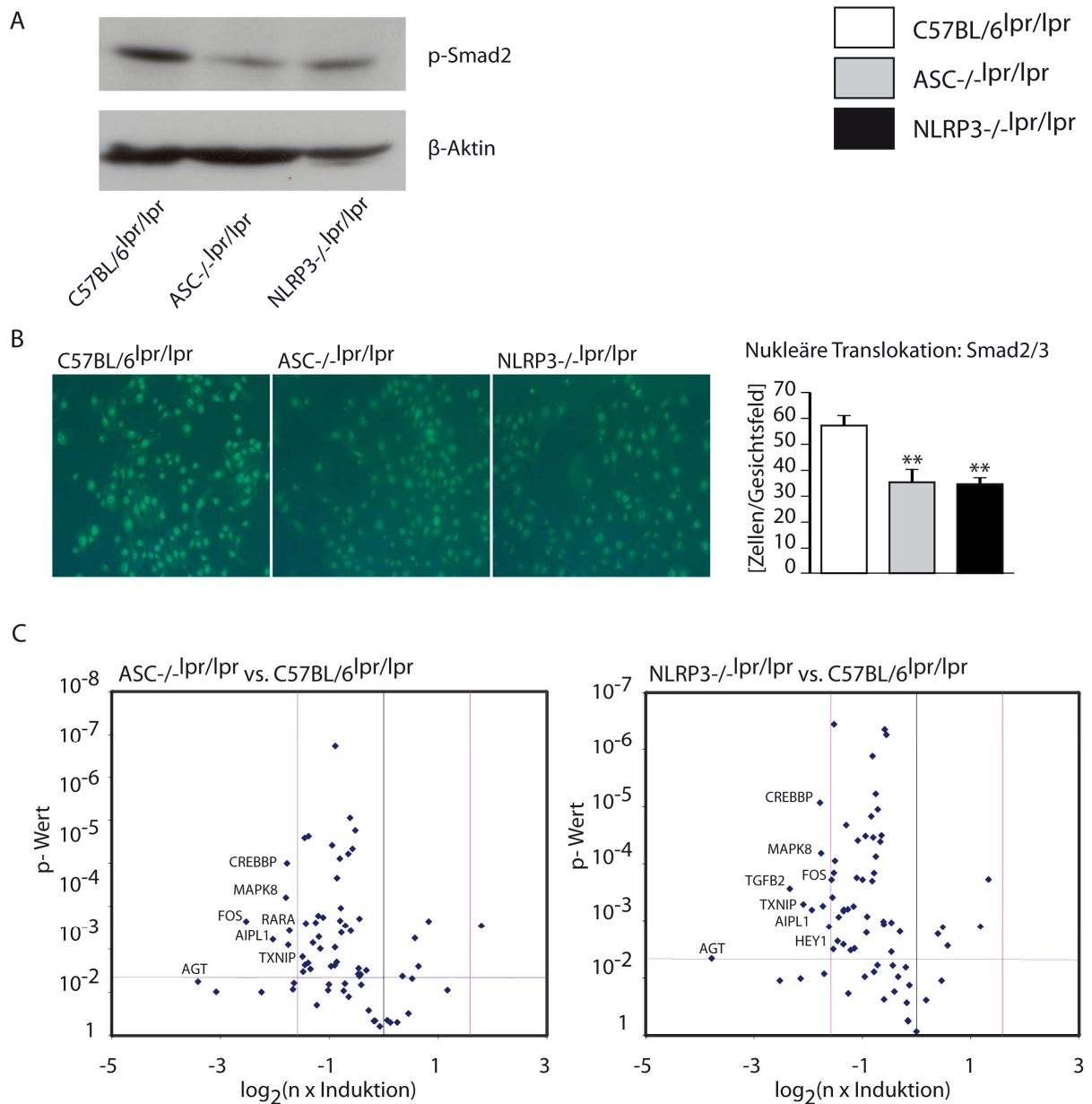
Tatsächlich zeigten Milzzelllysate aus NLRP3- und ASC-defizienten Mäusen im Westernblot eine verminderte Phosphorylierung des TGF- $\beta$ -abhängigen Transkriptionsfaktors SMAD2 [166] (Abbildung 28A).

Weiterhin zeigte sich an in vitro stimulierten dendritischen Zellen aus NLRP3-/- bzw. ASC-/- C57BL/6 Mäusen im Vergleich zu solchen aus C57BL/6 Tieren eine reduzierte nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors SMAD2 nach TGF- $\beta$ -Stimulation dieser Zellen (Abbildung 28B).

Zur weiteren Testung der Hypothese untersuchten wir, ob unter der Kontrolle von TGF- $\beta$ /SMAD-abhängigem Signaling stehende Gene in Lymphozyten aus NLRP3-/- bzw. ASC-/- C57BL/6<sup>*lpr/lpr*</sup> Mäusen vermindert exprimiert sein würden. Diese Vermutung wurde mittels PCR-Array für TGF- $\beta$ -abhängige Gene aus Milzzellen bestätigt (Abbildung 28C).

Zu beachten ist weiterhin, dass die systemischen Level an TGF- $\beta$ 1 im ELISA zwischen den einzelnen Gruppen nicht signifikant verändert waren (nicht gezeigt), was auf reduzierte TGF- $\beta$ -Wirkung und weniger auf verminderte Sekretion hinweist.

Diese Daten sprechen also kumulativ für eine Funktion von NLRP3 und ASC bei der Stimulation des immunsuppressiven TGF- $\beta$ -Signalings in Immunzellen. Eine Defizienz von NLRP3 und ASC geht somit wahrscheinlich mit einer Reduktion des TGF- $\beta$ -Signalings und verminder-ten immunsuppressiven Effekten desselben einher.



**Abbildung 28: TGF- $\beta$ -Signaling ist reduziert in NLRP3- und ASC-defizienten lpr-Mäusen; A:** Westernblot zum Nachweis von phosphoryliertem Smad2 in Milzzellysaten 6 Monate alter C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> und ASC- bzw. NLRP3-defizienter lpr-Mäuse; **B:** Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis nukleär transloziertem Smad3/Smad3 nach 30-minütiger TGF- $\beta$ -Stimulation von BMDCs aus NLRP3-/- und ASC-/- C57BL/6 versus C57BL/6 Tieren; Beispielbilder und Quantifizierung der pro Gesichtsfeld positiv evaluierten Zellen; \*\*= $p < 0,01$ ; P-Wert aus t-Test im Bezug zu C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Kontrollen. **C:** RT-PCR-Gen-Array für TGF- $\beta$ -abhängige Gene; Darstellung im Volcano Plot: Jeweils im Vergleich zur C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Kontrolle links: ASC-/-<sup>lpr/lpr</sup>; rechts: NLRP3<sup>lpr/lpr</sup> (RNA aus Milzen 6 Monate alter Mäuse; 3 Arrays pro Gruppe, jede Probe Pool aus 2-3 unterschiedlichen Milz-mRNA-Isolaten)

## 4 Diskussion

Beim SLE spielt neben dem primären Toleranzdefekt des adaptiven Immunsystems mit gestörter Funktion von B- und T-Zellen, mit dem klinischen Korrelat der Autoantikörper, auch das angeborene Immunsystem eine wesentliche Rolle. So ist die von dendritischen Zellen vermittelte Stimulation der adaptiven Immunreaktion zwar nicht ursächlich für den SLE im Mausmodell, sie trägt aber wesentlich zur verstärkten Expansion autoreaktiver B- und T-Zellen bei. Auch der Aktivierung von TLRs durch Autoantigene auf B-Zellen und konsekutivem MyD88-Signaling kommt eine wichtige Rolle bei der Bildung von ANA zu [42, 168-172]. Weiterhin sind Mechanismen der angeborenen Immunität für die Schwere von Gewebeschädigung infolge der lokalen Entzündungsreaktion mitverantwortlich. Bei der Lupusnephritis, einem Musterbeispiel einer solchen Organbeteiligung, kommt es durch Immunkomplexformation lokal zur Aktivierung von Komplement, über TLRs zur Stimulation von intrarenalen Makrophagen, dendritischen Zellen und von Nicht-Immunzellen. Diese produzieren in der Folge pro-entzündliche Mediatoren, die lokale Gewebeentzündung antreiben [173, 174].

NLRP3 ist ein zytosolischer PRR und wesentlicher Bestandteil der angeborenen Immunität. Zusammen mit seinem Adapterprotein ASC bildet er – nach Aktivierung durch eine breite Vielfalt mikrobieller und steriler Entzündungssignale (PAMPs und DAMPs) – das NLRP3-Inflammasom. Dieser makromolekulare Komplex ist für die Aktivierung der Caspase-1 und die dadurch vermittelte Spaltung und Aktivierung der Pro-Formen von IL-1 $\beta$  und IL-18 bekannt (siehe Einleitung) [84, 88, 92]. Über IL-1-Rezeptor- und IL-18-Rezeptor-abhängiges Signaling vermitteln diese zahlreiche pro-entzündliche Effekte und amplifizieren eine Entzündungsreaktion. Zudem ist aktivierte Caspase-1 an der Ausführung einer entzündlichen Zelltodform namens Pyroptose beteiligt, der zwar programmiert, im Gegensatz zur Apoptose aber nicht immunologisch inert, sondern unter Integritätsverlust der Zytoplasmamembran abläuft und daher mit einer Entzündungsreaktion verbunden ist. Pyroptose liefert demnach weitere pro-entzündliche Gefahrensignale an die Umgebung und ist wesentlich bei der Beseitigung intrazellulärer Erreger, wie z.B. *Salmonella typhimurium* [84, 89, 100, 102, 175, 176].

Unter den Gesichtspunkten, dass erstens angeborene Immunität sowohl bei systemischen als auch lokalen Entzündungsprozessen der Autoimmunität involviert ist und zweitens das NLRP3-Inflammasom imstande ist, DAMPs und PAMPs in IL-1 $\beta$ -, IL-18- oder Pyroptose-vermittelte Entzündung zu übersetzen, hatten wir vermutet, dass NLRP3- bzw. ASC-Defizienz den Phänotyp in C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen attenuieren würde.

Unsere Daten hingegen widerlegen diese Hypothese und zeigen stattdessen, dass NLRP3 und ASC die Expansion und Aktivierung Antigen-präsentierender dendritischer Zellen und Makrophagen sowie von B- und T-Zellen unterdrücken. Die systemische Antikörperproduktion blieb hingegen bis auf höhere dsDNA-Titer und Rheumafaktoren, ebenso wie die Immunkomplexdeposition in Nierenglomeruli annähernd unverändert. Somit mildern NLRP3 und ASC *in vivo* autoimmune Gewebeschädigung in Nieren und Lungen von C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Tieren, indem sie eher die zellulär vermittelte und weniger die humorale Immunität hemmend beeinflussen.

Unserem Wissen nach ist dies die erste Studie, welche die Funktion der Proteine NLRP3 und ASC im Kontext der Autoimmunität in einem „knockout“-Mausmodell derart umfassend untersucht.

#### **4.1 Die Bedeutung von IL-1 $\beta$ und IL-18 bei Autoinflammation und Autoimmunität**

Das NLRP3-Inflammasom ist für die Sekretion von IL-1 $\beta$  und IL-18 verantwortlich. Über IL-1 $\beta$  ist bekannt, dass es nicht nur an der Fieber-Induktion, der Induktion anderer Entzündungsmediatoren wie IL-6, der Rekrutierung von Entzündungszellen, sondern auch an entzündlicher Gewebedestruktion maßgeblich beteiligt ist [89, 104, 110]. Genetische Syndrome in Kindern mit einem Überschuss der pro-entzündlichen IL-1-Achse führen demnach zu entzündlichen Hautläsionen, steriler Osteomyelitis, Neutrophilie, Thrombophilie, erhöhter BSG und erhöhtem CRP. Diese, durch IL-1-medierte, Syndrome werden als autoinflammatorische Erkrankungen bezeichnet und umfassen auch das familiäre Mittelmeerfieber, den juvenilen M. Still, das Hyper-IgD Syndrom und die mit Defekten im NLRP3-assoziierten Cryopyrin-Associated Periodic Syndromes [89, 110]. Letztere Patienten leiden unter lokalen und systemischen Entzündungsschüben, die oft durch milde virale Infekte oder Kälteexposition ausgelöst werden. Selbst Erkrankungen wie Gicht oder Typ-II Diabetes gehören wahrscheinlich in diese Gruppe autoinflammatorischer Erkrankungen [89, 110].

Auch IL-18, welches über einen dem IL-1-Rezeptor vergleichbaren Signalweg arbeitet, ruft ähnliche Antworten hervor. Es wird zur Abwehr von Erregern durch das angeborene Immunsystem von Monozyten / Makrophagen als Hauptquelle produziert. Seine Wirkung besteht in der Amplifikation der angeborenen Immunantwort durch Induktion von Mediatoren wie GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder IL-8, der Aktivierung und Rekrutierung von Entzündungszellen. Darüber hinaus verbindet IL-18 aber auch die angeborene mit der adaptiven Immunantwort, indem es als Costimulationssignal für Interleukine wie IL-2 auf T-Zellen wirkt oder Th1- und Th2-Antworten stimulieren kann [89]. Auch für IL-18 sind Assoziationen mit Autoinflammations-

oder Autoimmunsyndromen beschrieben. Bei Colitis ulcerosa, M. Crohn, Psoriasis, Multipler Sklerose und rheumatoider Arthritis könnte IL-18 eine wichtige Rolle spielen [89, 177-180]. Doch was ist zur pathogenetischen Rolle von IL-1 $\beta$  und IL-18 im Kontext von Autoimmunität und SLE in Maus und Mensch bekannt? Versuche mit IRAK-1-defizienten Mäusen, die eine defekte Negativregulation des TLR- und IL-1r-Signaling aufweisen, ergaben eine Resistenz dieser Tiere gegen die Induktion einer autoimmunen Enzephalomyelitis und verminderte zentralnervöse Entzündungsprozesse [181]. Experimentelle Daten aus IL-1 $\beta$ -defizienten BALB/c Mäusen, in welchen durch die Immunisierung mit monoklonalen Anti-DNS-Antikörpern ein experimenteller SLE induziert wurde, zeigten weiterhin signifikant reduzierte systemische Werte für TNF, IFN, verminderte Autoantikörperpegel und eine signifikante Minderung der Proteinurie bei abgeschwächter Immunkomplexdeposition. Daraus konnten die Autoren auf eine wesentliche Rolle von IL-1 $\beta$  bei der Pathogenese des SLE im experimentellen Modell schließen [116]. Ein Behandlungsversuch mit dem IL-1R-Antagonisten Anakinra bei 3 SLE-Patienten milderte erfolgreich die Schwere einer Arthritis nach Versagen der herkömmlichen Therapie, wohingegen serologische Parameter, wie Anti-dsDNA-Antikörper, unbeeinflusst blieben [114]. Daneben wies eine andere präliminäre Patientenstudie neben verbesserten arthritischen Beschwerden auch serologische Verbesserungen nach [115]. Genetische Assoziationsstudien konnten weiterhin ein erhöhtes Auftreten von bestimmten Polymorphismen im IL-1Ra-Gen, welches für einen natürlichen IL-1Rezeptorantagonisten kodiert, in chinesischen, taiwanesischen und iranischen Bevölkerungsgruppen mit SLE finden [182-184]. Eine Untersuchung an Afroamerikanern erbrachte weiterhin eine Assoziation eines bestimmten IL-1 $\beta$ -Allels mit der Erkrankung [185]. Auch eine Verbindung von IL-18 mit der Pathogenese des SLE wird durch neuere Daten nahe gelegt. So finden sich in SLE-Patienten höhere Plasmaspiegel von IL-18. Bezüglich der Assoziation von IL-18 mit der Krankheitsaktivität differieren die Beobachtungen [118, 186]. Eine kürzlich publizierte Metaanalyse konnte auch für spezielle IL-18-Genvarianten einen genetischen Zusammenhang mit dem SLE bei asiatischen Patienten nachweisen [187]. Auch im *lpr*-Mausmodell finden sich starke Hinweise auf einen Beitrag von IL-18 zum „lupus-like“ Phänotyp. So zeigen MRL<sup>*lpr/lpr*</sup> Mäuse wie auch Lupus-Patienten erhöhte Serumwerte für dieses Interleukin. Weiterhin lässt sich durch Verabreichen von IL-18 an diese Mäuse ein schwereres Krankheitsbild erzielen und die intra-renale Überexpression von IL-18 ist imstande, Nephritis und systemische Krankheitsaktivität auszulösen. Da sich durch Gabe von IL-18 an normale Mäuse allerdings kein SLE auslösen lässt, bleibt eine Rolle als ursächlicher Faktor weiter unklar [118, 188].

In unserer Studie machten wir die Beobachtung, dass Lymphoproliferation und histologische Organschädigungen im Alter von 6 Monaten in NLRP3- und ASC-defizienten C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Tieren ausgeprägter waren als in den C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen. Diese Effekte scheinen in ASC-/- und NLRP3-/- lpr-Tieren unabhängig von den bisher bekannten pro-inflammatorischen Wirkungen der beiden Interleukine IL-1 $\beta$  und IL-18 zu sein, da erstens IL-1 $\beta$  und IL-18 wie vermutet reduziert produziert wurden, und zweitens IL-1r- und IL-18-defiziente lpr-Mäuse keinen vergleichbaren Phänotyp entwickelten [161].

Wir erfassten eine größere Anzahl von aktivierten dendritischen Zellen, Makrophagen sowie von B- und T-Zellen. Die systemischen Autoantikörperlevels waren, abgesehen von einigen Trends zu höheren Werten, größtenteils unbeeinflusst. Trotz ähnlichen systemischen Autoantikörperlevels und Immunkomplexmengen in den Nieren zeigten ASC-/- und NLRP3-/- lpr-Tiere deutlich ausgeprägtere autoimmune Gewebeschädigungen mit vermehrtem Influx von CD45+ Leukozyten bzw. MAC2+ Makrophagen in ihren Nierenglomeruli. In diesen NLRP3-/- bzw. ASC-/- lpr-Mäusen ergaben sich aber reduzierte systemische IL-18- und kaum detektierbare IL-1 $\beta$ -Spiegel. Letzteres wurde allerdings auch in C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen beobachtet, weshalb wir zum Nachweis der reduzierten IL-1 $\beta$ -Sekretion auf die Zellkultur auswichen. Die hierbei gemachten Beobachtungen stehen in Einklang mit dem bisherigen Modell des NLRP3-Inflammasoms, welches neben dem Protein NLRP3 seines Adapters ASC bedarf, um Caspase-1-abhängig IL-1 $\beta$  und IL-18 zu sezernieren [86, 94].

Aus der Aggravation des lymphoproliferativen Syndroms und der autoimmunen Gewebeschädigung in diesen „NLRP3-Inflammasom-defizienten“ Tieren trotz niedriger IL-18- und IL-1 $\beta$ -Spiegel schließen wir, dass reduzierte IL-18- und IL-1 $\beta$ -Level in C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen nicht vollständig vor systemischer Autoimmunität und autoimmuner Gewebeschädigung schützen. Eine primär ursächliche Rolle der beiden Mediatoren in der Ätiopathogenese des SLE scheint nach den von uns gemachten Beobachtungen nicht wahrscheinlich. Inwiefern sie allerdings den späteren Krankheitsverlauf und die Schwere von Gewebeschädigung beeinflussen, wird sich in weiteren Studien an IL-1r- und IL-18-defizienten lpr-Tieren zeigen. Spekulativ, aber durchaus vorstellbar, ist beispielsweise, dass die reduzierte Produktion von IL-1 $\beta$  oder IL-18 in NLRP3-/- und ASC-/- C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen insofern ist, einige Beobachtungen, wie fehlende signifikante Unterschiede in der Gesamtzahl an Plasmazellen oder der systemischen Spiegel für IgG, IgM und Anti-Sm-Antikörper, zu erklären. So weisen IL-1 $\beta$ -defiziente BALB/c Mäuse beispielsweise in einem anderen experimentellen Lupusmodell deutlich geringere Anti-dsDNA Titer als Kontrolltiere auf [116]. IL-18 stellt eine wichtige Verbindung zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort dar. Mit seinen bereits mehrfach erwähnten Fähigkeiten, T-Zell-

Antworten zu stimulieren, könnte auch IL-18 immunologische Prozesse, wie Autoantikörper- oder Interleukinproduktion, beeinflussen. Ergo könnten auch die niedrigen Level an IL-18 in NLRP3<sup>-/-</sup> bzw. ASC<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen ursächlich für die niedrigen Spiegel einzelner Interleukine in selbigen Tieren sein [89].

Somit bleibt aber für C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäuse festzuhalten, dass geringere oder gestörte IL-1 $\beta$ - und IL-18-Sekretion per se nicht vor Lupusnephritis und amplifizierter Autoimmunität schützen, wie NLRP3- und ASC-defiziente C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäuse mit reduzierten IL-1 $\beta$ - und IL-18-Spiegeln zeigen. Dies schließt jedoch eine aggravierende, pathogenetische Bedeutung dieser Interleukine im Verlauf der Erkrankung, wie sie von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurden (siehe oben), keineswegs aus. Möglicherweise aber sind unsere Beobachtungen von Nutzen, den mäßigen Erfolg von IL-1 $\beta$ -Blockade mittels Anakinra besser zu verstehen [112, 114].

#### 4.2 Die Rolle der Proteine NLRP3 und ASC beim SLE

Die beiden Proteine ASC und NLRP3 formen im Rahmen von Entzündungsprozessen, aktiviert durch sterile Gefahrensignale (DAMPs), das NLRP3-Inflammasom, welches die Caspase-1-abhängige Sekretion der pro-entzündlichen Interleukine IL-1 $\beta$  und IL-18 vermittelt und weiterhin einen inflammatorischen Zelltod, genannt Pyroptose, vermitteln kann. Nach obig diskutierten pro-entzündlichen Effekten der Mediatoren IL-1 $\beta$  und IL-18 und den immunostimulatorischen Charakteristika von Pyroptose hätte sich für NLRP3 und ASC, als obligate Bestandteile des NLRP3-Inflammasoms, eine Verschlimmerung des murinen SLE erwarten lassen [53, 102].

Unsere Daten jedoch stehen im Gegensatz zu dieser Überlegung. In diesem – unseres Wissens nach – erstmalig durchgeführten Experiment zur Untersuchung des NLRP3-Inflammasoms im Kontext des SLE ergab sich, dass die Proteine NLRP3 und ASC die Vermehrung und Aktivierung dendritischer Zellen sowie von B- und T-Zellen unterdrücken. Damit verbunden war eine protektive Funktion vor autoimmuner Gewebeschädigung. In NLRP3<sup>-/-</sup> und ASC<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen fanden sich, trotz aggravierter histologischer Organschäden in Lungen und Nieren, interessanterweise kaum vermehrte IgG-, IgM-, IgE- und Autoantikörperspiegel und somit auch keine vermehrten Immunkomplexablagerungen in den Glomeruli. Daraus schließen wir, dass NLRP3 und ASC immunsuppressive Funktionen hauptsächlich auf zellulärer Ebene ausüben. Dazu kommt, dass die verstärkten Organschäden in diesen Tieren eher durch vermehrte zelluläre Immunität und weniger durch alterierte humorale Immunität zu erklären sind.

NLRP3<sup>-/-</sup> bzw. ASC<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Tiere weisen weiterhin eine verminderte Produktion der pro-entzündlichen Mediatoren IL-1 $\beta$  und IL-18 in Folge verminderter Caspase-1-Aktivität auf.

Somit scheinen die immunsuppressiven Funktionen von NLRP3 und ASC unabhängig von der Sekretion der pro-entzündlichen Mediatoren IL-1 $\beta$  und IL-18 durch das NLRP3-Inflammasom zu sein. Unterstrichen wird diese Überlegung dadurch, dass IL-1r- bzw. IL-18-defiziente C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäuse im Alter von 6 Monaten keinen den NLRP3-/- bzw. ASC-/- C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Tieren vergleichbaren Phänotyp aufweisen [161].

NLRP3 und ASC haben also immunsuppressive Funktionen in Immunzellen, die unabhängig vom bisher bekannten NLRP3/ASC/Caspase-1-Komplex und dessen IL-1 $\beta$ - und IL-18-sezernierender Funktion ablaufen [161].

Da herkömmliche NLRP3-/- und ASC-/- C57BL/6 Mäuse, also solche ohne die Lupus-auslösende lpr-Mutation, keinen spontanen autoimmunen Phänotyp aufweisen, ist allerdings davon auszugehen, dass NLRP3- und ASC-Defizienz eher die Krankheitsschwere beeinflussen, als primäre Ursachen der Erkrankung zu sein. Es sei jedoch in diesem Zusammenhang darauf verwiesen, dass auch NLRP3-/- C57BL/6-Tiere, also solche ohne lpr-Mutation, im Alter von 6 Monaten eine im Vergleich zur Kontrolle übermäßige Expansion von T-Zellsubpopulationen, inklusive „autoreaktiver“ CD3+CD4-CD8- T-Zellen, aufwiesen, ohne jedoch darüber hinaus systemische Anzeichen von Autoimmunität zu zeigen (Kapitel 3.1).

Wie aber lassen sich unsere Daten zum NLRP3-Inflammasom im Vergleich zu anderen Arbeiten einordnen? In unseren NLRP3-/- und ASC-/- Tieren zeigte sich eine aggravierte mesangio-proliferative Lupusnephritis trotz annähernd gleicher IgG- und IgM-Immunkomplexdeposition. In einem anderen experimentellen Lupus-Mausmodell (MRL<sup>lpr/lpr</sup>) fanden Zhao et al. bei der pharmakologischen Blockade des P2X7 Rezeptors, einem „upstream“-Aktivator des NLRP3-Inflammasoms, eine Besserung der Nephritis, der systemischen Autoantikörper-Spiegel und der Überlebensspanne erkrankter Tiere [189]. Weiterhin fanden sie, im Gegensatz zu unseren Daten, unter Einsatz des „NF $\kappa$ B und Inflammasominhibitors“ Bay11-7082 in MRL<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen eine Reduktion nephritischer Läsionen und von Aktivitätsparametern bei reduzierter NLRP3-Inflammasom-Aktivität [190]. Kritisch hierbei erscheint allerdings, dass Bay11-7082 keineswegs selektiv die Assemblierung des NLRP3-Inflammasoms hemmt. Vielmehr ist es ein „Multi-Target-Inhibitor“. So inhibiert es z.B. IKK (I $\kappa$ B kinase) im TNF/NF $\kappa$ B-Signalweg und wurde als Zelltod-auslösendes Agens in einer Reihe von Zelllinien beschrieben [191-194]. Eine kausale Schlussfolgerung aus der Assoziation von reduzierter Inflammasomaktivität mit gebesserter Nephritis unter Bay11-7082 muss demnach kritisch betrachtet werden. Die reduzierte NLRP3-Inflammasomaktivität könnte in diesem Kontext ein pathogenetisch irrelevantes Begleitphänomen von blockiertem NF $\kappa$ B-Signaling in den MRL<sup>lpr/lpr</sup> Tieren sein.



Darüber hinaus sei in diesem Zusammenhang auf einen ähnlichen, zunächst widersprüchlichen Phänotyp bei der Erforschung der Rolle von TLR-9 im C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Lupusmodell verwiesen. TLR-9-defiziente C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäuse entwickelten, trotz Wegfall einer als rein pro-inflammatorisch angenommenen Signalkaskade der angeborenen Immunität, paradoxerweise einen aggravierten Phänotyp, der sich in diversen anderen Arbeiten bestätigen ließ [142, 143, 195]. Vor dieser Beobachtung jedoch hatten *in vitro* und *in vivo* Studien z.B. mittels TLR-9-Blockade pro-inflammatorische und stimulierende Effekte auf die B-Zellproliferation nachgewiesen und einen organprotektiven Effekt bei TLR-9-Blockade im SLE-Modell beobachtet [196-200]. Erst im Zuge weiterer Forschung wurde klar, dass der unerwartete Phänotyp von TLR-9-defizienten C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen auf inhibitorische Zweitwirkungen, nämlich auf immunstimulatorisches TLR-7-Signaling, zurückzuführen ist [201, 202]. Demnach ist die Beobachtung kein Novum, dass pro-entzündliche Rezeptoren der angeborenen Immunität, wie TLR-9 oder in unserem Fall die Inflammasomkomponenten NLRP3 und ASC, auch immunsuppressive Funktionen innehaben können. Im Kontext systemischer Autoimmunität wie beim murinen *lpr*-Modell können für diese, eigentlich als pro-inflammatorisch betrachteten PRRs, wie NLRP3 und ASC, also völlig gegensätzlich immunregulatorische Funktionen zum Tragen kommen.

Interessanterweise zeigt eine erst kürzlich publizierte Studie von Yang et al. an Lupus-Patienten, dass die Expression des NLRP3-Inflammasoms in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) ähnlich der Situation in unseren NLRP3<sup>-/-</sup> und ASC<sup>-/-</sup> Tieren invers mit der Ausprägung der Erkrankungsschwere (bestimmt via SLEDAI) korreliert. Weiterhin bewirkte eine Steroidtherapie eine Korrektur der zu niedrigen NLRP3-Expression in diesen Patienten. Sie schlussfolgern daraus auf eine wesentliche Rolle des Inflammasoms bei der Pathogenese und Progression des humanen SLE [203].

Eine von Zhao et al. vorgeschlagene selektive Blockade des NLRP3-Inflammasoms am Patienten muss nach unseren Daten, die eine schützende Rolle von NLRP3 und ASC beim murinen SLE zeigen, und unter Berücksichtigung der von Yang et al. präsentierten humanen Beobachtungen, sehr kritisch hinterfragt werden [189, 190]. Sie bedarf vor allem weiterer humaner Studien zur Rolle des NLRP3-Inflammasoms.

### **4.3 Mechanismus der durch NLRP3 bzw. ASC vermittelten Immunsuppression**

Bisher wurde in NLRP3-defizienten Tieren auch für andere, nicht infektiöse Krankheitsmodelle eine Verschlechterung des Phänotyps und somit ein protektiver Effekt für NLRP3 beschrieben. Für die altersbedingte Makuladegeneration ließ sich zeigen, dass in Drusen aus Patientenretina ebenso wie im Tiermodell NLRP3-Inflammasomaktivität nachgewiesen wurde. NLRP3-

/- Tiere zeigen dabei im Tiermodell für die feuchte Makuladegeneration einen exazerbierten Phänotyp, der in IL-1r-defizienten Tieren nicht vorzufinden ist. Die Behandlung von retinalen Pigmentepithelzellen mit IL-18 reduzierte die Produktion von VEGF, einem Schlüsselfaktor in der Neoangiogenese der feuchten AMD. Die Autoren schließen daraus auf eine protektive Rolle von NLRP3 und IL-18 betreffend der Progression der AMD [203-205]. Auch in einem Modell für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, der DSS-induzierten Kolitis in Mäusen, sind protektive Funktionen für NLRP3 und ASC sowie Caspase-1 beschrieben, die mit der IL-18-sezernierenden Funktion des NLRP3-Inflammasoms verbunden sind [206]. Einige Autoren gehen hierbei von einer pro-regenerativen Rolle von IL-18 bei der Wiederherstellung der Darmbarriere aus [206-208]. Abwesenheit von NLRP3, ASC, oder Caspase-1 und somit infolge defekten Inflammasom-Signalings reduzierter IL-18-Produktion wären also ein Erklärungsansatz für die aggravierte Colitis durch defekte Darmbarrieren in diesen Tieren [208]. Unterstrichen wird diese Überlegung dadurch, dass sich durch Verabreichung von IL-18 an Caspase1-/- Mäuse nach Kolitisinduktion im DSS-Modell eine Verbesserung des Phänotyps erzielen lässt [206]. Jedoch wurden auch gegenteilige Beobachtungen im Sinne einer aggravierenden Funktion von NLRP3 im Kontext des DSS-induzierten Kolitismodells gemacht, die möglicherweise auf einer alterierten intestinalen Mikroflora beruhen [209, 210]. In unserem lpr-Mausmodell hingegen führen lediglich die Defizienz von NLRP3 bzw. ASC (Kapitel 3.3), nicht aber die Defizienz von IL-1r oder IL-18, zu einer Aggravation des lymphoproliferativen Syndroms und der autoimmunen Gewebeschädigung im Alter von 6 Monaten [161]. Damit scheidet eine durch reduzierte IL-1 $\beta$ - und IL-18-Spiegel in NLRP3-/- und ASC-/- lpr-Mäusen vermittelte Aggravation des Phänotyps, im Gegensatz zu den Beobachtungen bei AMD oder DSS-induzierter Kolitis, als Erklärungsansatz höchstwahrscheinlich aus. Vielmehr suchten wir einen Mechanismus für NLRP3 und ASC, der unabhängig von deren IL-1- und IL-18-sezernierenden Funktionen im Stande wäre, einen suppressiven Effekt von NLRP3 und ASC auf die Lymphoproliferation zu erklären.

Bei der weiteren Suche nach den möglichen Ursachen schlossen wir einige mögliche pathophysiologische Mechanismen aus. Wir untersuchten zum einen, wie sich NLRP3- bzw. ASC-Defizienz auf die Fähigkeit der Lymphozyten, Zelltod zu unterlaufen, auswirken würde. Grund für diese Untersuchung waren die Parallelen zwischen dem NLRP3-Inflammasom und dem Apoptosom. Beide sind molekulare Plattformen, die ähnliche Stresssignale erkennen. So ist wie beim NLRP3-Inflammasom auch die Aktivierung des Apoptosoms durch lysosomale Ruptur möglich. Weiterhin rekrutieren beide Plattformen Caspasen, die in der Lage sind, unterschiedliche Formen des Zelltods Pyroptose bzw. Apoptose zu initiieren [84, 211]. Wir fragten uns

demnach, ob Caspase-1-mediierter Zelltod auch eine Rolle bei der Clearance von aktivierten Lymphozyten im Lupusmodell spielen könnte.

Unsere Daten ergaben hierbei letztlich keine entscheidenden Hinweise auf alterierten Lymphozyten-Zelltod in Milzen aus 6 Monate alten NLRP3<sup>-/-</sup> bzw. ASC<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Tieren. Wir stellten keine grundlegenden Unterschiede in der Anzahl apoptotischer oder nekrotischer Zellen in Milzen junger Mäuse fest. In vitro Experimente an BMDCs und Thymozyten auf H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Zelltod ergaben keine signifikanten Unterschiede. Auch gespaltene Caspase-3 in Milzsektionen 6 Monate alter Tiere fand sich in annähernd gleicher Frequenz in NLRP3<sup>-/-</sup> bzw. ASC<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Tieren wie in Kontrollen. Lediglich die Dysregulation zelltodassoziiertes mRNA war im Alter von 6 Monaten signifikant unterschiedlich zwischen den einzelnen Gruppen (Kapitel 3.3).

Darüber hinaus untersuchten wir die Frage, ob eine Interferenz der Proteine NLRP3 und ASC mit anderen angeborenen Immunzellrezeptoren vorliegen würde, wie sie beispielsweise für TLR-9 und TLR-7 bekannt ist [201, 202]. Da aber BMDCs aus NLRP3<sup>-/-</sup> bzw. ASC<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen nach Stimulation mit LPS (TLR-4 Ligand), CpG (TLR-9 Ligand) und Imiquimod (TLR-7 Ligand) vergleichbare Mengen der Interleukine IL-6 und IL-12 produzierten, schlossen wir ein alteriertes Signaling der angeborenen Immunität zumindest für diesen Zelltyp aus (Kapitel 3.5).

Dass eine vermehrte Produktion von Interleukinen durch Immunzellen primär ursächlich für den Phänotyp sein könnte, erscheint insofern unwahrscheinlich, als dass NLRP3<sup>-/-</sup> bzw. ASC-defiziente C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäuse bei deutlich erhöhter Anzahl an Makrophagen, dendritischen T-Zellen, T- und B-Zellen nur relativ moderate Erhöhungen der verschiedenen hier geprüften Interleukinspiegel zeigen (Kapitel 3.8).

Doch welcher Mechanismus könnte dann dem schützenden Effekt von NLRP3 bzw. ASC im C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mausmodell zugrunde liegen? Wie lassen sich vermehrte Lymphoproliferation und vermehrte Aktivierung Antigen-präsentierender Zellen in NLRP3<sup>-/-</sup> und ASC<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Tieren erklären? Weshalb also zeigen unsere Tiere eine aggravierte Lupusnephritis und vermehrte Immunzellinfiltration in pulmonalem Gewebe?

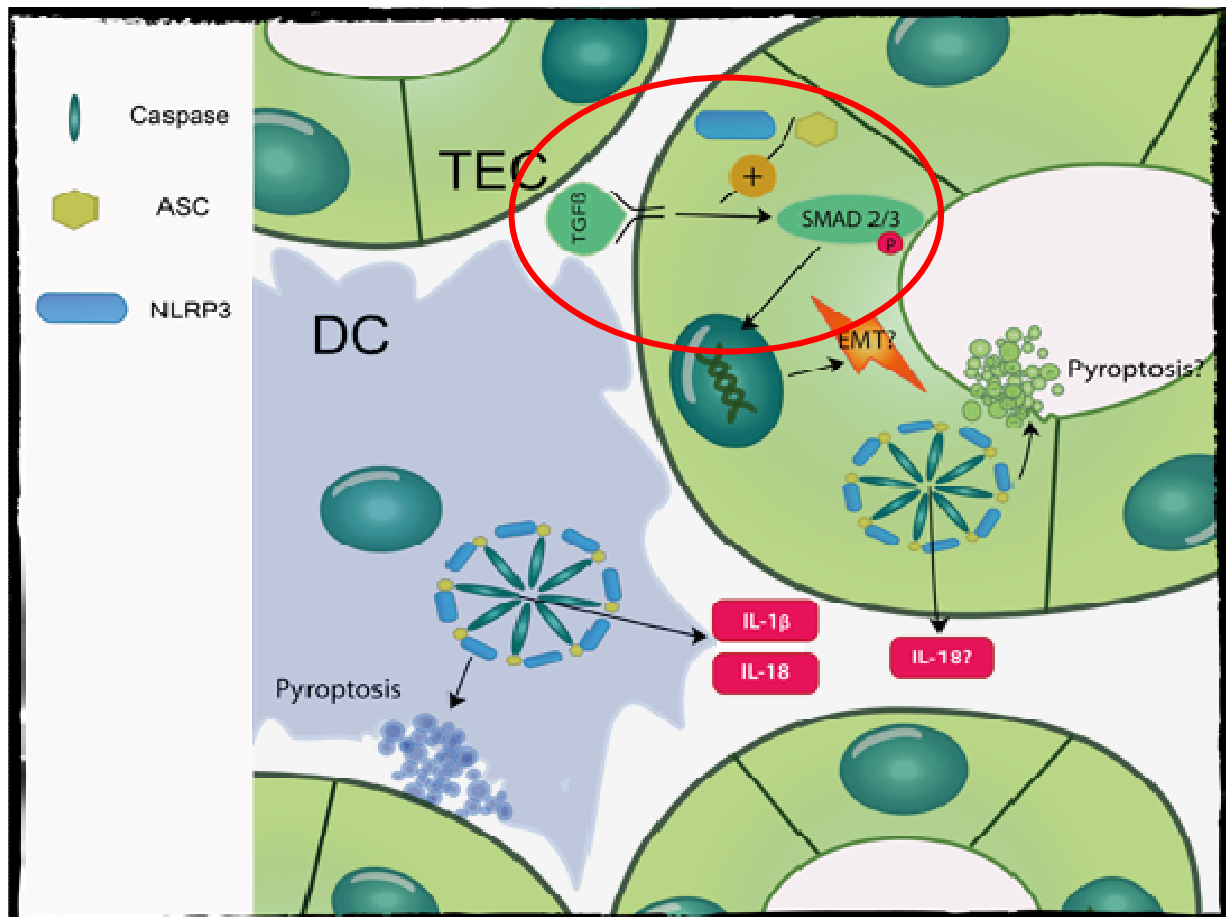
Unsere Daten deuten in Richtung gestörten immunsuppressiven TGF- $\beta$ -Rezeptor-Signalings, wie es bereits von Wang et al. für Tubuluszellen der Niere beschrieben wurde [166]. Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ist ein von Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen sezernierter auto- und parakriner Modulator des Immunsystems und der Immunantwort. TGF- $\beta$  ist im Stande, diese Zellen nach ihrer Aktivierung zu inhibieren, sowie die Proliferation von T- und B-Zellen zu hemmen. Weiterhin unterdrückt TGF- $\beta$  die Expression der für die An-

tigenpräsentation nötigen Moleküle MHCII auf APCs und hat inhibitorische Wirkung auf Gewebemakrophagen, Monozyten und dendritische Zellen. Damit ist TGF- $\beta$  ein wesentlicher Faktor bei der Aufrechterhaltung von Immuntoleranz und der Prävention von Autoimmunität [212-214]. Drei Varianten von TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3) sind bekannt, von denen vor allem TGF- $\beta$ 1 in signifikanten Mengen von Immunzellen produziert wird und dem die wesentlichen immunregulatorischen Funktionen zugeschrieben werden. TGF- $\beta$  wirkt über seinen TGF- $\beta$ -Rezeptor auf der Zelloberfläche mit intrazellulärer Serin-/Threoninkinasefunktion, die nach Bindung autophosphoryliert wird und in der Phosphorylierung von Smad2 (Mothers Against Decapentaplegic Homologue 2) und Smad3 resultiert. Diese translozieren im Komplex mit Smad4 in den Nukleus und regulieren dort die Transkription von Zielgenen [213, 214]. TGF- $\beta$ 1 $^{-/-}$  (genetischer Hintergrund: CF1 $^{-/-}$ , Inzucht-129 $^{-/-}$  und Inzucht-C57BL/6-Mischung (Thomas Doetschman, Arizona)) oder konditionelle TGF- $\beta$ -Rezeptor II $^{-/-}$  Mäuse (genetischer Hintergrund: 129SVxC57BL/6-Mischung (Stefan Karlsson, Lund, Schweden)) entwickeln Anzeichen spontaner Autoimmunität wie antinukleäre Antikörperbildung, disseminierte Entzündung und lymphozytäre Organinfiltrationen mit tödlichem Ausgang [215, 216]. Die genauen Mechanismen, über welche TGF- $\beta$ 1-Defizienz zu seinem Phänotyp führen, sind noch nicht definitiv geklärt. Es spielt aber eine wichtige Rolle bei der Unterdrückung von durch T-Zellen vermittelter Autoimmunität [213, 214, 217]. Transgene Mäusen, die auf T-Zellen einen nicht-funktionellen TGF- $\beta$ -Rezeptor exprimieren, zeigten neben autoimmunen Gewebeschäden und Autoantikörperproduktion eine vermehrte Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD44 auf T-Zellen und eine Expansion aktivierter B-Zellen [214]. Auch in unseren Tieren zeigte sich eine erhöhte Anzahl aktivierter CD69 $^{+}$  bzw. CD44 $^{+}$  T-Zellen sowie eine Expansion und vermehrte Aktivierung von B-Zellpopulationen. Eine für TGF- $\beta$ 1-defiziente Mäuse beschriebene gestörte Funktion regulatorischer T-Zellen bei der Kontrolle von T-Zell Proliferation konnten wir für NLRP3- und ASC-defiziente C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäuse allerdings nicht feststellen [213, 214, 217]. Neben T-Zell-vermittelter Autoimmunität hat TGF- $\beta$ 1 weiterhin wesentliche immunmodulatorische Wirkung auf dendritische Zellen und Makrophagen. TGF- $\beta$ 1 reguliert die Expression von MHCII auf diesen Zellen [213]. In TGF- $\beta$ 1-defizienten Mäusen lässt sich also bereits vor den entzündlichen Gewebeschäden eine vermehrte Expression von MHCII auf mRNA-Ebene und in Gewebefärbungen nachweisen [218]. Dass dies von Bedeutung für die krankheitsrelevante Selbstantigenpräsentation und Entwicklung von TGF-abhängiger Autoimmunität ist, belegen [TGF- $\beta$ 1 $^{-/-}$ ; MHCII $^{-/-}$ ]-Mäuse, die keinen autoimmunen Phänotyp entwickeln [213, 219, 220]. Im Übrigen wird die wesentliche Funktion von TGF- $\beta$ -vermittelter Suppression auf Antigen-präsentierende Zellen dadurch verdeutlicht, dass Tiere defizient für den TGF- $\beta$ -Rezeptor

selektiv auf dendritischen Zellen ebenfalls spontan einen autoimmunen Phänotyp entwickeln [221]. Diese Beobachtung ist wesentlich für unsere Überlegung, da somit für unsere NLRP3<sup>-/-</sup> bzw. ASC<sup>-/-</sup> lpr-Mäuse, trotz regelrechter Funktion von regulatorischen T-Zellen, bereits gestörtes TGF- $\beta$ -Rezeptor-Signaling auf dendritischen Zellen in der Lage wäre, den aggravierten Phänotyp zu erklären. In Übereinstimmung mit der vermehrten Expression von MHCII in TGF- $\beta$ 1-defizienten Tieren und der beachtlichen Funktion der APCs bei TGF- $\beta$ -Rezeptor<sup>-/-</sup>-abhängiger Autoimmunität stellten wir in NLRP3<sup>-/-</sup> bzw. ASC<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen auf mRNA-Ebene in Splenozyten eine vermehrte Expression von MHCII fest. Weiterhin fanden sich in diesen Tieren vermehrt MHCII-positive, aktivierte dendritische Zellen und Makrophagen.

Zusammengenommen wären die hier aufgeführten phänotypischen Befunde also mit gestörtem TGF- $\beta$ /TGF- $\beta$ -Rezeptor-Signaling in Einklang zu bringen. Sie wären weiterhin imstande, verstärkte Lymphoproliferation, vermehrte zelluläre Immunität und daraus resultierende Gewebeschädigung bei lymphozytären Organinfiltraten in NLRP3<sup>-/-</sup> und ASC<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen zu erklären.

Doch ist die bereits von Wang et al. für Tubuluszellen der Nieren beschriebene Interferenz von NLRP3 und ASC mit dem TGF- $\beta$ -abhängigen Signaling auf Immunzellen übertragbar? In dieser Arbeit beschreiben die Autoren, dass TGF- $\beta$ 1-abhängiges Signaling in NLRP3- und ASC-defizienten Tubulusepithelzellen unabhängig von Caspase-1, IL-1 und IL-18 reduziert ist, was zur reduzierten Phosphorylierung von Smad2 und TGF- $\beta$ -abhängiger Genexpression führt [166]. Siehe hierzu Abbildung 29.



**Abbildung 29: Schematische Darstellung des von Wang et al. gezeigten Mechanismus der Beeinflussung des TGF- $\beta$ -Signaling durch NLRP3 und ASC;** aus [104]; links: Legende: Symbole stellvertretend für die Proteine ASC, NLRP3 und Caspase-1; rechts: Rot eingekreist ist der für die hier angestellten Überlegungen relevante Bereich; NLRP3 bzw. ASC fördern auf nicht näher bekannte Weise das TGF- $\beta$ -Rezeptor-Signaling in Tubuluszellen upstream von SMAD2/3. NLRP3 bzw. ASC fördern die nukleäre Translokation von phosphoryliertem SMAD2/3 in den Nukleus [166]

Es ist gut dokumentiert, dass NLRP3 und ASC von Makrophagen, dendritischen Zellen und – nach Stimulation – auch in B- und T-Zellen exprimiert werden [84, 96, 98, 99]. Für eine ähnliche Rolle von NLRP3 und ASC in Immunzellen von C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen spricht, dass NLRP3- und ASC-Defizienz zu einer reduzierten Expression TGF- $\beta$ -abhängiger Gene in Splenozyten führte. Weiterhin fanden wir auch eine reduzierte Phosphorylierung des TGF- $\beta$ -abhängigen Transkriptionsfaktors Smad2 in diesen Zellen. Darüber hinaus zeigten NLRP3- bzw. ASC-defiziente C57BL/6-BMDCs nach TGF- $\beta$ -Stimulation eine verringerte Translokation des Smad2/Smad3 Transkriptionsfaktors in den Nukleus. Somit schließen wir, dass der aggravierte Phänotyp in NLRP3<sup>-/-</sup> und ASC<sup>-/-</sup> C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen wahrscheinlich auf reduziertes TGF- $\beta$ -Signaling in Immunzellen dieser Tiere zurückzuführen ist. Über welche Immunzellen das mangelhafte TGF- $\beta$ -Signaling dabei prädominant seine Wirkung entfaltet und welche intrazellulären Signalwege im Speziellen dabei gestört sind, bleibt offen. Weiterhin wäre eine Reproduktion der hier gemachten Beobachtungen in anderen Modellen für Autoimmunität

durchaus interessant. Leider war es uns in diesem Zusammenhang nicht möglich, ein Experiment durchzuführen, welches den Kausalzusammenhang von gestörtem TGF- $\beta$ -Rezeptor-Signaling und dem in NLRP3 $^{-/-}$  und ASC $^{-/-}$  C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> zweifelsfrei belegen kann. Der Grund dafür liegt in der Natur des molekularen Mechanismus. Da NLRP3 $^{-/-}$  und ASC $^{-/-}$  vermutlich, wie in Abbildung 29 für Tubuluszellen dargestellt, intrazellulär das Signaling am TGF- $\beta$ -Rezeptor in unbekannter Stärke beeinflussen, dieses aber nicht vollständig unterbinden, ist eine Wiederherstellung des Signalings auf Ausgangsniveau und damit ein Erreichen des Wildtypniveaus durch die Applikation von TGF- $\beta$  technisch nicht umsetzbar. Eine Applikation von TGF- $\beta$  an alle Gruppen, nämlich NLRP3 $^{-/-}$  und ASC $^{-/-}$  C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> und C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Kontrollen, würde vermutlich den Phänotyp aller Tiere mildern (inklusive den der Kontrollen!), aber dennoch Unterschiede bestehen lassen. Ebenso ließe sich bei Rekonstitution des Phänotyps durch Gabe von TGF- $\beta$  ausschließlich an NLRP3 $^{-/-}$  und ASC $^{-/-}$  C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Tiere die Kausalität des Mechanismus nicht beweisen, da TGF- $\beta$  eben immunsuppressive Effekte hat und eine Verbesserung in den behandelten Gruppen auch ohne einen mechanistisch kausalen Zusammenhang zu erwarten wäre. Da TGF- $\beta$ 1 $^{-/-}$  und konditionelle TGF- $\beta$ -Rezeptor II $^{-/-}$  Knockoutmäuse mit wenigen Wochen Krankheitsdauer bis zum letalen Ausgang eine rapide Progression der Erkrankung aufweisen, wohingegen NLRP3 $^{-/-}$  bzw. ASC $^{-/-}$  C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> erst im Alter von mehreren Monaten einen Phänotyp entwickeln, kann selbst eine NLRP3 $^{-/-}$  TGF- $\beta$ -Rezeptor II<sup>flox/flox x Mx1-Cre</sup> lpr/lpr-Tripelknockoutmaus einen kausalen Zusammenhang nicht weiter stützen [215, 216]. Die Lebensfähigkeit einer solchen Maus ist überdies ungewiss.

Damit bleibt hierzu abschließend zu formulieren, dass NLRP3- und ASC-Defizienz mit immunsuppressivem TGF- $\beta$ -Rezeptor-Signaling in Lymphozyten und Antigen-präsentierenden Zellen interferieren. Dies bietet einen möglichen Erklärungsansatz für den aggravierten autoimmunen Phänotyp von NLRP3 $^{-/-}$  und ASC $^{-/-}$  C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Tieren. Durch reduziertes TGF- $\beta$ -Rezeptor-Signaling ließen sich somit Lymphoproliferation, vermehrte Aktivierung Antigen-präsentierender Zellen und stärkere Organläsionen durch gesteigerte zelluläre Immunität in NLRP3 $^{-/-}$  und ASC $^{-/-}$  C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen trotz reduzierter IL-1 $\beta$ - und IL-18-Produktion erklären – ein gemeinsamer Erklärungsansatz, der den relativ geringen phänotypischen Unterschieden zwischen NLRP3- und ASC-defizienten Mäusen Rechnung trägt.

#### 4.4 Sind NLRP3 und ASC neue humane SLE-Risikogene? – Grenzen der Studie

Wie einleitend besprochen, spielen bei der Ätiopathogenese des SLE neben hormonellen und umweltbedingten Faktoren auch eine genetische Prädisposition zur unkontrollierten Immunantwort eine Rolle [40, 41]. Wir zeigten in dieser Arbeit, dass NLRP3- und ASC-Deletion im lpr-Mausmodell zu einer Aggravation des lymphoproliferativen Syndroms und zu vermehrten

autoimmunen Organschäden beiträgt. NLRP3- bzw. ASC-Defizienz per se, ohne Lupus induzierende *lpr*-Mutation, sind alleine nicht imstande Lymphoproliferation auszulösen. Dennoch weisen unsere Ergebnisse auf die Beeinflussung der Krankheitsschwere in Form autoimmuner Organschäden durch diese beiden Genprodukte hin. Somit sind NLRP3 und ASC neue, mit murinem SLE-assoziierte Risikogene mit protektiver Funktion.

Wir hatten uns zur Durchführung unserer Experimente für den C57BL/6<sup>*lpr/lpr*</sup> Hintergrund entschieden, in welchem durch Deletion des Fas-Rezeptors spontane Autoimmunität in diesen Mäusen entsteht [119, 138]. Grund war, dass ASC-/- und NLRP3-/- Mäuse bereits im C57BL/6-Hintergrund vorlagen. Dies erleichterte uns die zügige Einkreuzung der Mäuse. Das C57BL/6<sup>*lpr/lpr*</sup> Modell hat sich bereits zur Untersuchung anderer immunregulatorischer Faktoren wie TLR-9, IRAK-M, SIGIRR und des langen Pentraxin-3 beim SLE als nützlich erwiesen [222-225]. Daraus können in Zukunft möglicherweise vielversprechende, neue Strategien entwickelt werden, wie z.B. eine therapeutische Beeinflussung der TLR-Aktivität [52, 226, 227].

Es dürfen jedoch die Unterschiede zwischen murinem, *lpr*-induziertem „lupus-like phenotype“ und humanem SLE nicht vergessen werden. Im Mausmodell wird ein lymphoproliferatives Syndrom durch eine einzige genetische Alteration, die Deletion des Fas-Rezeptors, induziert. Beim Menschen hingegen entsteht der SLE gemäß derzeitiger Auffassung durch ein kompliziertes Zusammenspiel von Umwelteinflüssen mit einer komplex ausgestalteten genetischen Ausstattung [40, 41]. Somit ergeben sich gravierende Unterschiede zwischen SLE und murinem Lupus. Wohingegen letzterer durch starke Lymphoproliferation, sichtbar an massiv vergrößerten Lymphknoten und Milzen, charakterisiert ist, finden sich beim (humanen) SLE meist nur milde Splenomegalie und inkonstante Lymphadenopathie (25%-67%). Aber auch hier sind Verläufe mit massiver Splenomegalie bis zur spontanen Milzruptur beschrieben [228, 229]. Weiterhin löst die Deletion des Fas-Rezeptors in Menschen selbst keinen SLE aus, sondern führt zur Erkrankung des ALPS (Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome oder Canale-Smith-Syndrom) mit non-maligner Lymphoproliferation, Hepatosplenomegalie und Autoimmunitätsmerkmalen wie CD4-CD8- T-Zellen [230, 231].

Dennoch sind einige Gemeinsamkeiten des *lpr*-Mausmodells mit dem humanen SLE, wie eine vermehrte Anzahl autoreaktiver T-Zellen, die Produktion von anti-dsDNA-Antikörpern und die Entwicklung einer Nephritis oder Lungenbeteiligung bzw. des Hautbefalls im MRL<sup>*lpr/lpr*</sup> Modell nicht von der Hand zu weisen [119, 138, 232].

Eine Assoziation von Polymorphismen in NLR-Genen mit dem (humanen) SLE ist demnach bereits vermutet worden. Eine genetische Assoziationsstudie an 144 SLE-Patienten aus Brasilien bezüglich einiger Risikoallele in 7 verschiedenen NLR-Genen, darunter auch NLRP3,



konnte bereits eine Korrelation für NLRP1-Genpolymorphismen finden. NLRP3 war in dieser Studie jedoch nicht signifikant mit SLE assoziiert [64]. Dies schließt einen relevanten Beitrag von NLRP3 und seinem Adapter ASC zum humanen SLE jedoch keinesfalls aus, der durch unsere Experimente in Mäusen suggeriert wird. Wie die Studie von Yang et al. an human PBMCs zeigt, lässt sich für das NLRP3-Inflammasom auch eine wesentliche, vielleicht wie im Mausmodell, protektive Rolle beim SLE im Patienten erwarten [203]. Inwiefern die von uns gemachten Beobachtungen, wie etwa vermehrte Immunzellaktivierung durch reduziertes NLRP3 oder reduziertes TGF- $\beta$ -Rezeptor-Signaling auch im Patienten zu finden sind und ggf. therapeutisch beeinflusst werden können, bleibt in zukünftigen Studien abzuwarten.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Das NLRP3/ASC-Inflammasom übersetzt infektiöse und sterile Gefahrensignale in die Sekretion von IL-1 $\beta$  und IL-18 und konsekutiv in IL-1r- bzw. IL-18r-/NF- $\kappa$ B-abhängige Entzündung. Wir vermuteten, dass das NLRP3-Inflammasom auf selbige Weise zur Aggravation von autoimmuner Gewebeentzündung beitragen und so unter anderem zu einer Verstärkung von autoimmunen Organschäden führen würde [89, 109-111].

Um diese Hypothese zu untersuchen, generierten wir NLRP3- bzw. ASC-defiziente C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Doppelknockoutmäuse und charakterisierten deren Phänotyp im Alter von 6 Monaten. C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäuse entwickeln eine milde Form des murinen SLE und dienten in allen Experimenten als Vergleichsmaßstab.

Überraschenderweise bewirkte ASC- bzw. NLRP3-Defizienz im lpr-Hintergrund eine Aggravation des lymphoproliferativen Phänotyps mit Glomerulonephritis und autoimmuner Lungenbeteiligung, welche in dieser Schwere nicht in C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen zu erwarten sind. Die Charakterisierung der Lymphozytenpopulationen ergab für ASC- und NLRP3-defiziente lpr-Mäuse, trotz reduzierter Produktion der Interleukine IL-1 $\beta$  und IL-18, eine Expansion aktivierter dendritischer Zellen, der aktivierten Makrophagen sowie der B- und T-Zellen.

Die Inflammasomkomponenten NLRP3 und ASC unterdrücken daher Autoimmunität und autoimmune Lungen- und Nierenschädigung bei C57BL/6<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen. Dabei beeinflussen sie eher zelluläre als humorale Abläufe der Autoimmunreaktion. Ursächlich für diese Effekte der Proteine NLRP3 und ASC sind möglicherweise fördernde Einflüssen auf immunsuppressive TGF- $\beta$ /SMAD-abhängige Signalwege.

Diese Arbeit identifiziert somit zwei neue, für den SLE und die Lupusnephritis relevante Risikogene – NLRP3 und ASC.

## 6 Quellenverzeichnis

1. Perl, A., *Pathogenic mechanisms in systemic lupus erythematosus*. Autoimmunity, 2010. **43**(1): p. 1-6.
2. Herold, G., *Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung*. 2011.
3. Pons-Estel, G.J., et al., *Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus*. Semin Arthritis Rheum, 2010. **39**(4): p. 257-68.
4. Manson, J.J. and A. Rahman, *Systemic lupus erythematosus*. Orphanet J Rare Dis, 2006. **1**: p. 6.
5. Tench, C.M., et al., *The prevalence and associations of fatigue in systemic lupus erythematosus*. Rheumatology (Oxford), 2000. **39**(11): p. 1249-54.
6. Sultan, S.M., Y. Ioannou, and D.A. Isenberg, *A review of gastrointestinal manifestations of systemic lupus erythematosus*. Rheumatology (Oxford), 1999. **38**(10): p. 917-32.
7. Gaitonde, S., D. Samols, and I. Kushner, *C-reactive protein and systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 2008. **59**(12): p. 1814-20.
8. Avina-Zubieta, J.A., et al., *Clinical evaluation of various selected ELISA kits for the detection of anti-DNA antibodies*. Lupus, 1995. **4**(5): p. 370-4.
9. Kronbichler, A. and G. Mayer, *Renal involvement in autoimmune connective tissue diseases*. BMC Med, 2013. **11**: p. 95.
10. Migliorini, P., et al., *Anti-Sm and anti-RNP antibodies*. Autoimmunity, 2005. **38**(1): p. 47-54.
11. Akhter, E., et al., *Anti-C1q antibodies have higher correlation with flares of lupus nephritis than other serum markers*. Lupus, 2011. **20**(12): p. 1267-74.
12. Katsumata, Y., et al., *Anti-C1q antibodies are associated with systemic lupus erythematosus global activity but not specifically with nephritis: a controlled study of 126 consecutive patients*. Arthritis Rheum, 2011. **63**(8): p. 2436-44.
13. Rahman, A. and D.A. Isenberg, *Systemic lupus erythematosus*. N Engl J Med, 2008. **358**(9): p. 929-39.
14. Nishiya, K. and K. Hashimoto, *Elevation of serum ferritin levels as a marker for active systemic lupus erythematosus*. Clin Exp Rheumatol, 1997. **15**(1): p. 39-44.
15. Johannes W. J. Bijlsma, J.A.P.S., *Eular Textbook on Rheumatic Diseases*. Bmj Publishing Group, 2012, 2012: p. 476-505.
16. Bombardier, C., et al., *Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE*. Arthritis Rheum, 1992. **35**(6): p. 630-40.
17. Luijten, K.M., et al., *The Systemic Lupus Erythematosus Responder Index (SRI); a new SLE disease activity assessment*. Autoimmun Rev, 2012. **11**(5): p. 326-9.
18. Rahman, P., et al., *Early damage as measured by the SLICC/ACR damage index is a predictor of mortality in systemic lupus erythematosus*. Lupus, 2001. **10**(2): p. 93-6.
19. Gladman, D.D., et al., *Lack of correlation among the 3 outcomes describing SLE: disease activity, damage and quality of life*. Clin Exp Rheumatol, 1996. **14**(3): p. 305-8.
20. *A randomized study of the effect of withdrawing hydroxychloroquine sulfate in systemic lupus erythematosus. The Canadian Hydroxychloroquine Study Group*. N Engl J Med, 1991. **324**(3): p. 150-4.
21. Fessler, B.J., et al., *Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups: XVI. Association of hydroxychloroquine use with reduced risk of damage accrual*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(5): p. 1473-80.
22. Merrill, J.T., *Treatment of systemic lupus erythematosus: a 2012 update*. Bull NYU Hosp Jt Dis, 2012. **70**(3): p. 172-6.

23. Stohl, W., et al., *Belimumab reduces autoantibodies, normalizes low complement levels, and reduces select B cell populations in patients with systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 2012. **64**(7): p. 2328-37.
24. Navarra, S.V., et al., *Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial*. *Lancet*, 2011. **377**(9767): p. 721-31.
25. Wallace, D.J., et al., *Safety profile of belimumab: pooled data from placebo-controlled phase 2 and 3 studies in patients with systemic lupus erythematosus*. *Lupus*, 2013. **22**(2): p. 144-54.
26. Wallace, D.J., et al., *A phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 2009. **61**(9): p. 1168-78.
27. Matteucci, P., et al., *Leukoencephalopathy and papovavirus infection after treatment with chemotherapy and anti-CD20 monoclonal antibody*. *Blood*, 2002. **100**(3): p. 1104-5.
28. Merrill, J.T., et al., *Efficacy and safety of rituximab in moderately-to-severely active systemic lupus erythematosus: the randomized, double-blind, phase II/III systemic lupus erythematosus evaluation of rituximab trial*. *Arthritis Rheum*, 2010. **62**(1): p. 222-33.
29. Rovin, B.H., et al., *Efficacy and safety of rituximab in patients with active proliferative lupus nephritis: the Lupus Nephritis Assessment with Rituximab study*. *Arthritis Rheum*, 2012. **64**(4): p. 1215-26.
30. Sfrikakis, P.P., J.N. Boletis, and G.C. Tsokos, *Rituximab anti-B-cell therapy in systemic lupus erythematosus: pointing to the future*. *Curr Opin Rheumatol*, 2005. **17**(5): p. 550-7.
31. Burt, R.K., et al., *Nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation for systemic lupus erythematosus*. *JAMA*, 2006. **295**(5): p. 527-35.
32. Doria, A., et al., *Long-Term Prognosis and Causes of Death in Systemic Lupus Erythematosus*. *The American journal of medicine*, 2006. **119**(8): p. 700-706.
33. Barr, S.G., et al., *Patterns of disease activity in systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 1999. **42**(12): p. 2682-8.
34. Bernatsky, S., et al., *Mortality in systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 2006. **54**(8): p. 2550-7.
35. Trager, J. and M.M. Ward, *Mortality and causes of death in systemic lupus erythematosus*. *Curr Opin Rheumatol*, 2001. **13**(5): p. 345-51.
36. Urowitz, M.B., et al., *Changing patterns in mortality and disease outcomes for patients with systemic lupus erythematosus*. *J Rheumatol*, 2008. **35**(11): p. 2152-8.
37. Kasitanon, N., L.S. Magder, and M. Petri, *Predictors of survival in systemic lupus erythematosus*. *Medicine (Baltimore)*, 2006. **85**(3): p. 147-56.
38. Drenkard, C., et al., *Remission of systematic lupus erythematosus*. *Medicine (Baltimore)*, 1996. **75**(2): p. 88-98.
39. Urowitz, M.B., et al., *Prolonged remission in systemic lupus erythematosus*. *J Rheumatol*, 2005. **32**(8): p. 1467-72.
40. Mok, C.C. and C.S. Lau, *Pathogenesis of systemic lupus erythematosus*. *J Clin Pathol*, 2003. **56**(7): p. 481-90.
41. Morel, L., et al., *Polygenic control of susceptibility to murine systemic lupus erythematosus*. *Immunity*, 1994. **1**(3): p. 219-29.
42. Celhar, T., R. Magalhaes, and A.M. Fairhurst, *TLR7 and TLR9 in SLE: when sensing self goes wrong*. *Immunol Res*, 2012. **53**(1-3): p. 58-77.
43. Arbuckle, M.R., et al., *Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus*. *N Engl J Med*, 2003. **349**(16): p. 1526-33.

44. Dorner, T., C. Giesecke, and P.E. Lipsky, *Mechanisms of B cell autoimmunity in SLE*. Arthritis Res Ther, 2011. **13**(5): p. 243.
45. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
46. Mountz, J.D., et al., *Autoimmune disease. A problem of defective apoptosis*. Arthritis Rheum, 1994. **37**(10): p. 1415-20.
47. Munoz, L.E., et al., *The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity*. Nat Rev Rheumatol, 2010. **6**(5): p. 280-9.
48. Munoz, L.E., et al., *Remnants of secondarily necrotic cells fuel inflammation in systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(6): p. 1733-42.
49. Emlen, W., J. Niebur, and R. Kadera, *Accelerated in vitro apoptosis of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus*. J Immunol, 1994. **152**(7): p. 3685-92.
50. Uccellini, M.B., et al., *Toll-like receptor-dependent immune complex activation of B cells and dendritic cells*. Methods Mol Biol, 2009. **517**: p. 363-80.
51. Lau, C.M., et al., *RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement*. J Exp Med, 2005. **202**(9): p. 1171-7.
52. Kim, W.U., A. Sreih, and R. Bucala, *Toll-like receptors in systemic lupus erythematosus; prospects for therapeutic intervention*. Autoimmun Rev, 2009. **8**(3): p. 204-8.
53. Shaw, P.J., M.F. McDermott, and T.D. Kanneganti, *Inflammasomes and autoimmunity*. Trends Mol Med, 2011. **17**(2): p. 57-64.
54. Gerl, V., et al., *Blood dendritic cells in systemic lupus erythematosus exhibit altered activation state and chemokine receptor function*. Ann Rheum Dis, 2010. **69**(7): p. 1370-7.
55. Hahn, B.H., *Belimumab for systemic lupus erythematosus*. N Engl J Med, 2013. **368**(16): p. 1528-35.
56. Guerra, S.G., T.J. Vyse, and D.S. Cunninghame Graham, *The genetics of lupus: a functional perspective*. Arthritis Res Ther, 2012. **14**(3): p. 211.
57. Alarcon-Segovia, D., et al., *Familial aggregation of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other autoimmune diseases in 1,177 lupus patients from the GLADEL cohort*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(4): p. 1138-47.
58. Block, S.R., et al., *Studies of twins with systemic lupus erythematosus. A review of the literature and presentation of 12 additional sets*. Am J Med, 1975. **59**(4): p. 533-52.
59. Deapen, D., et al., *A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1992. **35**(3): p. 311-8.
60. Jarvinen, P., et al., *Systemic lupus erythematosus and related systemic diseases in a nationwide twin cohort: an increased prevalence of disease in MZ twins and concordance of disease features*. J Intern Med, 1992. **231**(1): p. 67-72.
61. Arnett, F.C., et al., *Systemic lupus erythematosus: current state of the genetic hypothesis*. Semin Arthritis Rheum, 1984. **14**(1): p. 24-35.
62. Graham, R.R., et al., *Review of recent genome-wide association scans in lupus*. J Intern Med, 2009. **265**(6): p. 680-8.
63. Gateva, V., et al., *A large-scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL10 as risk loci for systemic lupus erythematosus*. Nat Genet, 2009. **41**(11): p. 1228-33.
64. Pontillo, A., et al., *Polimorphisms in inflammasome genes are involved in the predisposition to systemic lupus erythematosus*. Autoimmunity, 2012. **45**(4): p. 271-8.
65. Byrne, J.C., et al., *Genetics of SLE: functional relevance for monocytes/macrophages in disease*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 582352.
66. Lockshin, M.D., *Sex differences in autoimmune disease*. Orthop Clin North Am, 2006. **37**(4): p. 629-33.

67. Dillon, S., et al., *Klinefelter's syndrome (47,XXY) among men with systemic lupus erythematosus*. Acta Paediatr, 2011. **100**(6): p. 819-23.
68. Scofield, R.H., et al., *Klinefelter's syndrome (47,XXY) in male systemic lupus erythematosus patients: support for the notion of a gene-dose effect from the X chromosome*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(8): p. 2511-7.
69. Shen, N., et al., *Sex-specific association of X-linked Toll-like receptor 7 (TLR7) with male systemic lupus erythematosus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(36): p. 15838-43.
70. Costenbader, K.H., et al., *Reproductive and menopausal factors and risk of systemic lupus erythematosus in women*. Arthritis Rheum, 2007. **56**(4): p. 1251-62.
71. Lahita, R.G., *The role of sex hormones in systemic lupus erythematosus*. Curr Opin Rheumatol, 1999. **11**(5): p. 352-6.
72. James, J.A., et al., *An increased prevalence of Epstein-Barr virus infection in young patients suggests a possible etiology for systemic lupus erythematosus*. J Clin Invest, 1997. **100**(12): p. 3019-26.
73. Murphy K, T.P., Walport M, *Janeway's Immunobiology*. Garland Science, 2007.
74. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
75. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation*. Cell, 2010. **140**(6): p. 805-20.
76. Thompson, M.R., et al., *Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection*. Viruses, 2011. **3**(6): p. 920-40.
77. Lee, M.S. and Y.J. Kim, *Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk*. Annu Rev Biochem, 2007. **76**: p. 447-80.
78. Medzhitov, R., *Approaching the asymptote: 20 years later*. Immunity, 2009. **30**(6): p. 766-75.
79. Kulkarni, O.P., et al., *Recombinant chaperonin 10 suppresses cutaneous lupus and lupus nephritis in MRL-(Fas)lpr mice*. Nephrol Dial Transplant, 2012. **27**(4): p. 1358-67.
80. Li, J., et al., *Toll-like receptors as therapeutic targets for autoimmune connective tissue diseases*. Pharmacol Ther, 2013. **138**(3): p. 441-51.
81. Di Virgilio, F., *The therapeutic potential of modifying inflammasomes and NOD-like receptors*. Pharmacol Rev, 2013. **65**(3): p. 872-905.
82. Tang, D., et al., *PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity*. Immunol Rev, 2012. **249**(1): p. 158-75.
83. Zhang, W., et al., *AIM2 facilitates the apoptotic DNA-induced systemic lupus erythematosus via arbitrating macrophage functional maturation*. J Clin Immunol, 2013. **33**(5): p. 925-37.
84. Gross, O., et al., *The inflammasome: an integrated view*. Immunol Rev, 2011. **243**(1): p. 136-51.
85. Zurek, B., et al., *Mutational analysis of human NOD1 and NOD2 NACHT domains reveals different modes of activation*. Innate Immun, 2012. **18**(1): p. 100-11.
86. Dagenais, M., A. Skeldon, and M. Saleh, *The inflammasome: in memory of Dr. Jurg Tschopp*. Cell Death Differ, 2012. **19**(1): p. 5-12.
87. von Moltke, J., et al., *Recognition of bacteria by inflammasomes*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 73-106.
88. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, *The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta*. Mol Cell, 2002. **10**(2): p. 417-26.
89. Arend, W.P., G. Palmer, and C. Gabay, *IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines*. Immunol Rev, 2008. **223**: p. 20-38.

90. Dinarello, C.A., *Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 519-50.
91. Muzio, M., et al., *IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling*. Science, 1997. **278**(5343): p. 1612-5.
92. Newton, K. and V.M. Dixit, *Signaling in innate immunity and inflammation*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(3).
93. Brough, D. and N.J. Rothwell, *Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1beta is cytosolic and precedes cell death*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 5): p. 772-81.
94. Martinon, F., A. Mayor, and J. Tschopp, *The inflammasomes: guardians of the body*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 229-65.
95. Agostini, L., et al., *NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder*. Immunity, 2004. **20**(3): p. 319-25.
96. Guarda, G., et al., *Differential expression of NLRP3 among hematopoietic cells*. J Immunol, 2011. **186**(4): p. 2529-34.
97. Kummer, J.A., et al., *Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response*. J Histochem Cytochem, 2007. **55**(5): p. 443-52.
98. Sutterwala, F.S., et al., *Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1*. Immunity, 2006. **24**(3): p. 317-27.
99. O'Connor, W., Jr., et al., *Cutting edge: CIAS1/cryopyrin/PYPAF1/NALP3/CATERPILLER 1.1 is an inducible inflammatory mediator with NF-kappa B suppressive properties*. J Immunol, 2003. **171**(12): p. 6329-33.
100. Petrilli, V., et al., *The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(6): p. 615-22.
101. Watanabe, H., et al., *Activation of the IL-1beta-processing inflammasome is involved in contact hypersensitivity*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(8): p. 1956-63.
102. Schroder, K. and J. Tschopp, *The inflammasomes*. Cell, 2010. **140**(6): p. 821-32.
103. Bauernfeind, F., et al., *Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome*. J Immunol, 2011. **187**(2): p. 613-7.
104. Lorenz, G., M.N. Darisipudi, and H.J. Anders, *Canonical and non-canonical effects of the NLRP3 inflammasome in kidney inflammation and fibrosis*. Nephrol Dial Transplant, 2013.
105. Ciraci, C., et al., *Control of innate and adaptive immunity by the inflammasome*. Microbes Infect, 2012. **14**(14): p. 1263-70.
106. So, A., et al., *A pilot study of IL-1 inhibition by anakinra in acute gout*. Arthritis Res Ther, 2007. **9**(2): p. R28.
107. Mulay, S.R., et al., *Calcium oxalate crystals induce renal inflammation by NLRP3-mediated IL-1beta secretion*. J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 236-46.
108. Larsen, C.M., et al., *Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus*. N Engl J Med, 2007. **356**(15): p. 1517-26.
109. Dinarello, C.A., *Interleukin-18 and the pathogenesis of inflammatory diseases*. Semin Nephrol, 2007. **27**(1): p. 98-114.
110. Dinarello, C.A., *Interleukin-1beta and the autoinflammatory diseases*. N Engl J Med, 2009. **360**(23): p. 2467-70.
111. Dinarello, C.A., *Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases*. Blood, 2011. **117**(14): p. 3720-32.
112. Chang, D.M., *Interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist in systemic lupus erythematosus*. Immunol Invest, 1997. **26**(5-7): p. 649-59.

113. Kiberd, B.A. and A.W. Stadnyk, *Established murine lupus nephritis does not respond to exogenous interleukin-1 receptor antagonist; a role for the endogenous molecule?* Immunopharmacology, 1995. **30**(2): p. 131-7.
114. Moosig, F., et al., *IL-1RA in refractory systemic lupus erythematosus*. Lupus, 2004. **13**(8): p. 605-6.
115. Ostendorf, B., et al., *Preliminary results of safety and efficacy of the interleukin 1 receptor antagonist anakinra in patients with severe lupus arthritis*. Ann Rheum Dis, 2005. **64**(4): p. 630-3.
116. Voronov, E., et al., *IL-1 beta-deficient mice are resistant to induction of experimental SLE*. Eur Cytokine Netw, 2006. **17**(2): p. 109-16.
117. Doria, A., et al., *Autoinflammation and autoimmunity: bridging the divide*. Autoimmun Rev, 2012. **12**(1): p. 22-30.
118. Favilli, F., et al., *IL-18 activity in systemic lupus erythematosus*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1173**: p. 301-9.
119. Cohen, P.L. and R.A. Eisenberg, *Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease*. Annu Rev Immunol, 1991. **9**: p. 243-69.
120. Biotec, M.M., *mouse CD19 magnetic beads Data sheet*. 2013 Onlineversion © 2006 Miltenyi Biotec GmbH.
121. Promega, *CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Data Sheet*. Revised 12/2012.
122. Roche, *Cytotoxicity Detection Kit (LDH)*. Content version: February 2011.
123. Patole, P.S., et al., *Coactivation of Toll-like receptor-3 and -7 in immune complex glomerulonephritis*. Journal of Autoimmunity, 2007. **29**(1): p. 52-59.
124. Austin, H.A., 3rd, et al., *Diffuse proliferative lupus nephritis: identification of specific pathologic features affecting renal outcome*. Kidney Int, 1984. **25**(4): p. 689-95.
125. Herzer, P., G. Greif, and E.M. Lemmel, [*The Crithidia luciliae immunofluorescence test for detection of antibodies to double-stranded DNA (author's transl)*]. Klin Wochenschr, 1982. **60**(3): p. 143-51.
126. Conrad, K., et al., *High sensitive detection of double-stranded DNA autoantibodies by a modified Crithidia luciliae immunofluorescence test*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1173**: p. 180-5.
127. Weber, K. and M. Osborn, *The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*. J Biol Chem, 1969. **244**(16): p. 4406-12.
128. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
129. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1979. **76**(9): p. 4350-4354.
130. Renart, J., J. Reiser, and G.R. Stark, *Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(7): p. 3116-20.
131. <http://www.unimedizin-mainz.de/toxikologie/facs-und-array-core-facility/was-ist-zytometrie.html?type=98>, *Was ist Durchflusszytometrie?*
132. <http://genome.tugraz.at/GrundlBiomTechnik/FACS.pdf>, B.B.C.E., *Einführung in die Durchflußzytometrie*.
133. Netea, M.G., et al., *Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages*. Blood, 2009. **113**(10): p. 2324-35.



134. He, Y., L. Franchi, and G. Nunez, *TLR agonists stimulate Nlrp3-dependent IL-1beta production independently of the purinergic P2X7 receptor in dendritic cells and in vivo*. J Immunol, 2013. **190**(1): p. 334-9.
135. Gunthner, R., et al., *Pattern-recognition receptor signaling regulator mRNA expression in humans and mice, and in transient inflammation or progressive fibrosis*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(9): p. 18124-47.
136. Vandenabeele, P., et al., *Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(10): p. 700-14.
137. Danial, N.N., *BAD: undertaker by night, candyman by day*. Oncogene, 2008. **27 Suppl 1**: p. S53-70.
138. Cohen, P.L. and R.A. Eisenberg, *The lpr and gld genes in systemic autoimmunity: life and death in the Fas lane*. Immunol Today, 1992. **13**(11): p. 427-8.
139. Gaip, U.S., et al., *Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (SLE)*. J Autoimmun, 2007. **28**(2-3): p. 114-21.
140. Martinon, F., et al., *NALP inflammasomes: a central role in innate immunity*. Semin Immunopathol, 2007. **29**(3): p. 213-29.
141. Lartigue, A., et al., *Critical role of TLR2 and TLR4 in autoantibody production and glomerulonephritis in lpr mutation-induced mouse lupus*. J Immunol, 2009. **183**(10): p. 6207-16.
142. Christensen, S.R., et al., *Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus*. Immunity, 2006. **25**(3): p. 417-28.
143. Lartigue, A., et al., *Role of TLR9 in anti-nucleosome and anti-DNA antibody production in lpr mutation-induced murine lupus*. J Immunol, 2006. **177**(2): p. 1349-54.
144. Ippagunta, S.K., et al., *The inflammasome adaptor ASC regulates the function of adaptive immune cells by controlling Dock2-mediated Rac activation and actin polymerization*. Nat Immunol, 2011. **12**(10): p. 1010-6.
145. Ippagunta, S.K., et al., *Addendum: defective Dock2 expression in a subset of ASC-deficient mouse lines*. Nat Immunol, 2012. **13**(7): p. 701-2.
146. Ford, M.S., et al., *The immune regulatory function of lymphoproliferative double negative T cells in vitro and in vivo*. J Exp Med, 2002. **196**(2): p. 261-7.
147. Hammond, D.M., et al., *Double-negative T cells from MRL-lpr/lpr mice mediate cytolytic activity when triggered through adhesion molecules and constitutively express perforin gene*. J Exp Med, 1993. **178**(6): p. 2225-30.
148. Anand, A., et al., *Characterization of CD3+ CD4- CD8- (double negative) T cells in patients with systemic lupus erythematosus: activation markers*. Lupus, 2002. **11**(8): p. 493-500.
149. Hasegawa, A. and T. Nakayama, *[Role of CD69 in the pathogenesis of inflammation]*. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi, 2010. **33**(4): p. 189-95.
150. O'Garra, A., *Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets*. Immunity, 1998. **8**(3): p. 275-83.
151. Smeets, R.L., et al., *Molecular pathway profiling of T lymphocyte signal transduction pathways; Th1 and Th2 genomic fingerprints are defined by TCR and CD28-mediated signaling*. BMC Immunol, 2012. **13**: p. 12.
152. Niu, H., *The proto-oncogene BCL-6 in normal and malignant B cell development*. Hematol Oncol, 2002. **20**(4): p. 155-66.
153. Mackay, F., et al., *Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations*. J Exp Med, 1999. **190**(11): p. 1697-710.
154. Yan, M., et al., *Identification of a receptor for BlyS demonstrates a crucial role in humoral immunity*. Nat Immunol, 2000. **1**(1): p. 37-41.

155. Ng, L.G., C.R. Mackay, and F. Mackay, *The BAFF/APRIL system: life beyond B lymphocytes*. Mol Immunol, 2005. **42**(7): p. 763-72.
156. Cancro, M.P., *Peripheral B-cell maturation: the intersection of selection and homeostasis*. Immunol Rev, 2004. **197**: p. 89-101.
157. Johnson, K., et al., *Regulatory events in early and late B-cell differentiation*. Molecular Immunology, 2005. **42**(7): p. 749-761.
158. Bekeredjian-Ding, I.B., et al., *Plasmacytoid dendritic cells control TLR7 sensitivity of naive B cells via type I IFN*. J Immunol, 2005. **174**(7): p. 4043-50.
159. Davis, H.L., et al., *CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen*. J Immunol, 1998. **160**(2): p. 870-6.
160. Donahue, A.C. and D.A. Fruman, *Proliferation and survival of activated B cells requires sustained antigen receptor engagement and phosphoinositide 3-kinase activation*. J Immunol, 2003. **170**(12): p. 5851-60.
161. Lech, M., et al., *NLRP3 and ASC suppress lupus-like autoimmunity by driving the immunosuppressive effects of TGF-beta receptor signalling*. Ann Rheum Dis, 2014.
162. Fernandes-Alnemri, T., et al., *The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation*. Cell Death Differ, 2007. **14**(9): p. 1590-604.
163. Ippagunta, S.K., et al., *Inflammasome-independent role of apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) in T cell priming is critical for collagen-induced arthritis*. J Biol Chem, 2010. **285**(16): p. 12454-62.
164. Narayan, S., et al., *Increased interleukin-10 production by ASC-deficient CD4+ T cells impairs bystander T-cell proliferation*. Immunology, 2011. **134**(1): p. 33-40.
165. Shigeoka, A.A., et al., *An inflammasome-independent role for epithelial-expressed Nlrp3 in renal ischemia-reperfusion injury*. J Immunol, 2010. **185**(10): p. 6277-85.
166. Wang, W., et al., *Inflammasome-Independent NLRP3 Augments TGF-beta Signaling in Kidney Epithelium*. J Immunol, 2013. **190**(3): p. 1239-49.
167. Boivin, G.P., et al., *Onset and progression of pathological lesions in transforming growth factor-beta 1-deficient mice*. Am J Pathol, 1995. **146**(1): p. 276-88.
168. Teichmann, L.L., et al., *Dendritic Cells in Lupus Are Not Required for Activation of T and B Cells but Promote Their Expansion, Resulting in Tissue Damage*. Immunity, 2010. **33**(6): p. 967-978.
169. Teichmann, Lino L., et al., *Signals via the Adaptor MyD88 in B Cells and DCs Make Distinct and Synergistic Contributions to Immune Activation and Tissue Damage in Lupus*. Immunity, 2013. **38**(3): p. 528-540.
170. Choi, J., S.T. Kim, and J. Craft, *The pathogenesis of systemic lupus erythematosus—an update*. Current Opinion in Immunology, 2012. **24**(6): p. 651-657.
171. Aringer, M., C. Günther, and M.A. Lee-Kirsch, *Innate immune processes in lupus erythematosus*. Clinical Immunology, 2013. **147**(3): p. 216-222.
172. Shlomchik, M.J., et al., *The role of B cells in lpr/lpr-induced autoimmunity*. J Exp Med, 1994. **180**(4): p. 1295-306.
173. Lech, M. and H.-J. Anders, *The Pathogenesis of Lupus Nephritis*. Journal of the American Society of Nephrology, 2013.
174. Allam, R. and H.-J. Anders, *The role of innate immunity in autoimmune tissue injury*. Current Opinion in Rheumatology, 2008. **20**(5): p. 538-544  
10.1097/BOR.0b013e3283025ed4.
175. Bergsbaken, T., S.L. Fink, and B.T. Cookson, *Pyroptosis: host cell death and inflammation*. Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(2): p. 99-109.
176. Miao, E.A., et al., *Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria*. Nat Immunol, 2010. **11**(12): p. 1136-42.

177. Arican, O., et al., *Serum levels of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in patients with active psoriasis and correlation with disease severity*. *Mediators Inflamm*, 2005. **2005**(5): p. 273-9.
178. Blom, L. and L.K. Poulsen, *IL-1 family members IL-18 and IL-33 upregulate the inflammatory potential of differentiated human Th1 and Th2 cultures*. *J Immunol*, 2012. **189**(9): p. 4331-7.
179. Ludwiczek, O., et al., *Elevated systemic levels of free interleukin-18 (IL-18) in patients with Crohn's disease*. *Eur Cytokine Netw*, 2005. **16**(1): p. 27-33.
180. Wiercinska-Drapalo, A., et al., *Plasma interleukin-18 reflects severity of ulcerative colitis*. *World J Gastroenterol*, 2005. **11**(4): p. 605-8.
181. Deng, C., et al., *IL-1 receptor-associated kinase 1 regulates susceptibility to organ-specific autoimmunity*. *J Immunol*, 2003. **170**(6): p. 2833-42.
182. Tahmasebi, Z., et al., *Interleukin-1 gene cluster and IL-1 receptor polymorphisms in Iranian patients with systemic lupus erythematosus*. *Rheumatol Int*, 2013.
183. Tsai, L.J., et al., *The different expression patterns of interleukin-1 receptor antagonist in systemic lupus erythematosus*. *Tissue Antigens*, 2006. **68**(6): p. 493-501.
184. Huang, C.M., et al., *Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in chinese patients with systemic lupus erythematosus*. *Clin Rheumatol*, 2002. **21**(3): p. 255-7.
185. Parks, C.G., et al., *Systemic lupus erythematosus and genetic variation in the interleukin 1 gene cluster: a population based study in the southeastern United States*. *Ann Rheum Dis*, 2004. **63**(1): p. 91-4.
186. Xu, W.D., H.F. Pan, and D.Q. Ye, *Association of interleukin-18 and systemic lupus erythematosus*. *Rheumatol Int*, 2012.
187. Wen, D., et al., *Association of Interleukin-18 (-137G/C) Polymorphism with Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus: A Meta-Analysis*. *Int Rev Immunol*, 2013.
188. Menke, J., et al., *Targeting transcription factor Stat4 uncovers a role for interleukin-18 in the pathogenesis of severe lupus nephritis in mice*. *Kidney Int*, 2011. **79**(4): p. 452-63.
189. Zhao, J., et al., *P2X7 blockade attenuates murine lupus nephritis by inhibiting activation of the NLRP3/ASC/caspase 1 pathway*. *Arthritis Rheum*, 2013. **65**(12): p. 3176-85.
190. Zhao, J., et al., *Bay11-7082 attenuates murine lupus nephritis via inhibiting NLRP3 inflammasome and NF-kappaB activation*. *Int Immunopharmacol*, 2013. **17**(1): p. 116-22.
191. Dai, Y., et al., *Interruption of the NF-kappaB pathway by Bay 11-7082 promotes UCN-01-mediated mitochondrial dysfunction and apoptosis in human multiple myeloma cells*. *Blood*, 2004. **103**(7): p. 2761-70.
192. Lee, J., et al., *BAY 11-7082 is a broad-spectrum inhibitor with anti-inflammatory activity against multiple targets*. *Mediators Inflamm*, 2012. **2012**: p. 416036.
193. Mori, N., et al., *Bay 11-7082 inhibits transcription factor NF-kappaB and induces apoptosis of HTLV-I-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells*. *Blood*, 2002. **100**(5): p. 1828-34.
194. Rauert-Wunderlich, H., et al., *The IKK inhibitor Bay 11-7082 induces cell death independent from inhibition of activation of NFkappaB transcription factors*. *PLoS One*, 2013. **8**(3): p. e59292.
195. Yu, P., et al., *Toll-like receptor 9-independent aggravation of glomerulonephritis in a novel model of SLE*. *Int Immunol*, 2006. **18**(8): p. 1211-9.
196. Anders, H.J., et al., *Activation of toll-like receptor-9 induces progression of renal disease in MRL-Fas(lpr) mice*. *FASEB J*, 2004. **18**(3): p. 534-6.

197. Barrat, F.J., et al., *Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus*. J Exp Med, 2005. **202**(8): p. 1131-9.
198. Hemmi, H., et al., *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA*. Nature, 2000. **408**(6813): p. 740-5.
199. Allam, R. and H.J. Anders, *The role of innate immunity in autoimmune tissue injury*. Curr Opin Rheumatol, 2008. **20**(5): p. 538-44.
200. Leadbetter, E.A., et al., *Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors*. Nature, 2002. **416**(6881): p. 603-7.
201. Nickerson, K.M., et al., *TLR9 regulates TLR7- and MyD88-dependent autoantibody production and disease in a murine model of lupus*. J Immunol, 2010. **184**(4): p. 1840-8.
202. Santiago-Raber, M.L., et al., *Critical role of TLR7 in the acceleration of systemic lupus erythematosus in TLR9-deficient mice*. J Autoimmun, 2010. **34**(4): p. 339-48.
203. Yang, Q., et al., *Deregulated NLRP3 and NLRP1 inflammasomes and their correlations with disease activity in systemic lupus erythematosus*. J Rheumatol, 2014. **41**(3): p. 444-52.
204. Campbell, M. and S.L. Doyle, *An eye on the future of inflammasomes and drug development in AMD*. J Mol Med (Berl), 2013.
205. Doyle, S.L., et al., *NLRP3 has a protective role in age-related macular degeneration through the induction of IL-18 by drusen components*. Nat Med, 2012. **18**(5): p. 791-8.
206. Zaki, M.H., et al., *The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis*. Immunity, 2010. **32**(3): p. 379-91.
207. Lopetuso, L.R., S. Chowdhry, and T.T. Pizarro, *Opposing Functions of Classic and Novel IL-1 Family Members in Gut Health and Disease*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 181.
208. Zaki, M.H., M. Lamkanfi, and T.D. Kanneganti, *The Nlrp3 inflammasome: contributions to intestinal homeostasis*. Trends Immunol, 2011. **32**(4): p. 171-9.
209. Bauer, C., et al., *Protective and aggravating effects of Nlrp3 inflammasome activation in IBD models: influence of genetic and environmental factors*. Dig Dis, 2012. **30 Suppl 1**: p. 82-90.
210. Bauer, C., et al., *Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome*. Gut, 2010. **59**(9): p. 1192-9.
211. Denes, A., G. Lopez-Castejon, and D. Brough, *Caspase-1: is IL-1 just the tip of the ICEberg?* Cell Death Dis, 2012. **3**: p. e338.
212. Letterio, J.J. and A.B. Roberts, *Regulation of immune responses by TGF-beta*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 137-61.
213. Aoki, C.A., et al., *Transforming growth factor beta (TGF-beta) and autoimmunity*. Autoimmun Rev, 2005. **4**(7): p. 450-9.
214. Rubtsov, Y.P. and A.Y. Rudensky, *TGF[beta] signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(6): p. 443-453.
215. Leveen, P., et al., *Induced disruption of the transforming growth factor beta type II receptor gene in mice causes a lethal inflammatory disorder that is transplantable*. Blood, 2002. **100**(2): p. 560-8.
216. Shull, M.M., et al., *Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease*. Nature, 1992. **359**(6397): p. 693-9.
217. Bommireddy, R. and T. Doetschman, *TGF-beta, T-cell tolerance and anti-CD3 therapy*. Trends Mol Med, 2004. **10**(1): p. 3-9.
218. Geiser, A.G., et al., *Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) controls expression of major histocompatibility genes in the postnatal mouse: aberrant*

- histocompatibility antigen expression in the pathogenesis of the TGF-beta 1 null mouse phenotype.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(21): p. 9944-8.
219. Letterio, J.J., et al., *Autoimmunity associated with TGF-beta1-deficiency in mice is dependent on MHC class II antigen expression.* J Clin Invest, 1996. **98**(9): p. 2109-19.
220. Bommireddy, R., et al., *Self-antigen recognition by TGF beta1-deficient T cells causes their activation and systemic inflammation.* Lab Invest, 2006. **86**(10): p. 1008-19.
221. Ramalingam, R., et al., *Dendritic cell-specific disruption of TGF-beta receptor II leads to altered regulatory T cell phenotype and spontaneous multiorgan autoimmunity.* J Immunol, 2012. **189**(8): p. 3878-93.
222. Lech, M., et al., *Interleukin-1 receptor-associated kinase-M suppresses systemic lupus erythematosus.* Ann Rheum Dis, 2011. **70**(12): p. 2207-17.
223. Lech, M., et al., *Tir8/Sigirr prevents murine lupus by suppressing the immunostimulatory effects of lupus autoantigens.* J Exp Med, 2008. **205**(8): p. 1879-88.
224. Lech, M., et al., *Lack of the long pentraxin PTX3 promotes autoimmune lung disease but not glomerulonephritis in murine systemic lupus erythematosus.* PLoS One, 2011. **6**(5): p. e20118.
225. Lartigue, A., et al., *Role of TLR9 in Anti-Nucleosome and Anti-DNA Antibody Production in lpr Mutation-Induced Murine Lupus.* The Journal of Immunology, 2006. **177**(2): p. 1349-1354.
226. Horton, C.G., Z.J. Pan, and A.D. Farris, *Targeting Toll-like receptors for treatment of SLE.* Mediators Inflamm, 2010. **2010**.
227. Wang, C., et al., *Therapeutic potential of SIGIRR in systemic lupus erythematosus.* Rheumatol Int, 2013. **33**(8): p. 1917-21.
228. Nadri, Q. and O. Alfurayh, *Spontaneous rupture of the spleen: A rare complication in a patient with lupus nephritis on hemodialysis,* 2010. p. 712-714.
229. Tuinman, P.R., et al., *A young woman with generalised lymphadenopathy. Systemic lupus erythematosus (SLE).* Neth J Med, 2011. **69**(6): p. 284-8.
230. Price, S., et al., *Natural history of autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with FAS gene mutations.* Blood, 2014. **123**(13): p. 1989-99.
231. Teachey, D.T., *Targeting cytokines in ALPS: it's FAShionable.* Blood, 2014. **123**(8): p. 1116-8.
232. Furukawa, F., et al., *Spontaneous Autoimmune Skin Lesions of MRL/n Mice: Autoimmune Disease-Prone Genetic Background in Relation to Fas-Defect MRL/lpr Mice.* J Invest Dermatol, 1996. **107**(1): p. 95-100.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

ACR	American College of Rheumatology
AGT	Angiotensinogen
AIM2	Absent In Melanoma 2
AIPL1	Aryl Hydrocarbon Receptor Interacting Protein-Like 1
ALPS	Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome / Canale-Smith-Syndrom
ANA	Antinukleäre Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APRIL	A Proliferation-Inducing Ligand
ASC	Apoptosis Associated Speck-Like Protein
AT	Acidic Transactivation Domain
ATP	Adenosintriphosphat
A20 / TNFAIP3	Tumor Necrosis Factor, Alpha-Induced Protein 3
BAD	Bcl2 Antagonist Of Cell Death
Baff / BLyS	B-Cell Activating Factor
BANK1	B-Cell Scaffold Protein With Ankyrin Repeats 1
BAX	BCL2-Associated X Protein
BCL6	B-Cell Lymphoma 6 Protein
BCR	B-Cell Receptor
BID	BH3 Interacting Domain Death Agonist
BIM	BCL2 Interacting Mediator Of Cell Death
BIR	Baculoviral Inhibitory Repeat Domain
Bkt.	Bakterium
BLIMP1	PR Domain Containing 1, With ZNF Domain
BLK	B Lymphocyte Kinase
BSA	Bovines Serum Albumin
BMDC(s)	Bone Marrow Dendritic Cell(s)
CARD	Caspase-Recruitment And Activation Domain
Casp(-1)	Caspase(-1)
CD	Cluster Of Differentiation
cDNS / cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankung
CENTB1	Centaurin, Beta 1
CINCA	Chronic Infantile Neurologic Cutaneous and Articular Syndrome
CKD	Chronic Kidney Disease / chronisches Nierenversagen
Clec4a	C-Type Lectin Domain Family 4, Member A
CREBBP	CREB Binding Protein
CRP	C-reaktives Protein
CYLD	Cylindromatosis (Turban Tumor Syndrome)
DAMPs	Danger- / Damage-Associated Molecular Patterns
DNS / DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynucleotidtriphosphate
Dock2	Dedicator Of Cytokinesis 2
DOK2	Docking Protein 2
dsRNS / dsRNA	Doppelstrang-Ribonukleinsäure
DUBA	Deubiquitinating Enzyme A
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERBIN	ERBB2-Interacting Protein

ETS1	V-ets Avian Erythroblastosis Virus E26 Oncogene Homolog 1
FAS	Fas Cell Surface Death Receptor
FCAS	Familial Cold Autoinflammatory Disorder
FCS	Fötales Kälberserum
Fc $\gamma$ R	Fc Fragment Of IgG Receptor
FOS	FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog
FoxP3	Forkhead Box P3
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GWAS	Genome-Wide Association Study
HEY1	Hes-Related Family BHLH Transcription Factor With YRPW Motif 1
HLA (DRB1)	Human Leukocyte Antigen (Class II DR Beta 1)
HMGB1	High Mobility Group Box 1
HRP	Horseradish Peroxidase
HSP	Hitzeschockprotein
iE-DAP	y-D-glutamyl-m-diaminopimelic acid
IFIT1 / IFIT3	Interferon-Induced Protein With Tetratricopeptide Repeats 1 / 3
IFN	Interferon
Ig-	Immunglobulin-
I $\kappa$ B	Inhibitory kappa B
IKFZ1	IKAROS Family Zinc Finger 1
IKK	Inhibitory kappa B Kinase
IL(-1r)	Interleukin(-1 Receptor (murin))
IRAK-M	IL-1 Receptor-Associated Kinase M
IRF4/5/7/8	Interferon Regulatory Factor 4/5/7/8
ITGAM	Integrin, Alpha M (Complement Component 3 Receptor 3 Subunit)
lpr	Lymphoproliferation
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin Rich Repeat
LYN	Lck/Yes-Related Novel Protein Tyrosine Kinase
MAPK8 / JNK1	Mitogen-Activated Protein Kinase 8
MBL	Mannose-bindendes Lektin
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein 1
MDA5	Melanoma Differentiation-Associated Protein 5
MDP	Muramyl Dipeptide
MFI	Mean Fluorescence Intensity
MHC	Major Histocompatibility Complex
MINCLE	Macrophage-Inducible C-Type Lectin
MMF	Mycophenolat-Mofetil
MSU	Monosodium Urate
Mx1	Myxoma Resistance Protein 1
MyD88	Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88
NAIP	NLR Family, Apoptosis Inhibitory Protein
NALP / NLRP (-3)	NACHT, LRR And PYD Domains-Containing Protein (-3)
n.d.	nicht detektierbar
NBD	Nucleotide-Binding Domain
NF $\kappa$ B	Nuclear Factor-kappa B
NLR	NOD-Like Receptor
NLRX1	NLR Family Member X1
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor
NOD	Nucleotide-Binding Oligomerization Domain
NSAIDs / NSAR	Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs / nichtsteroidale Antirheumatika

PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PAS	Periodic-Acid Schiff
PBMC(s)	Peripheral Blood Mononuclear Cell(s)
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI	Propidiumiodid
PML	Progressive multifokale Leukenzephalopathie
PNS	Peripheres Nervensystem
PRR(s)	Pattern-Recognition Rezeptor(en)
PYR	Pyrin Domain
RAGE	Receptor For Advanced Glycation End-Products Variant 20
RARA	Retinoic Acid Receptor, Alpha
RIG-I	Retinoic Acid Inducible Gene I
RIPA	Puffer Radioimmunoprecipitation Assay-Puffer
RIPK1 / RIPK3	Receptor-(TNFRSF)-Interacting Serine-Threonine Kinase 1 / 3
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPGN	Rapidly Progressive Glomerulonephritis
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
rpm	rotations per minute / Umdrehungen pro Minute
SAP130	Sin3A-Associated Protein, 130kDa
SDS	Sodium Dodezyl Sulfate
SEM	Standard Error of the Mean
SHIP	SH2 Domain-Containing Inositol 5-Phosphatase 1
SHP1 / SHP2	Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 6 / Type 11
SIGIRR	Single Immunoglobulin IL-1-Related Receptor
SIKE	Suppressor Of IKBKE 1
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SLEDAI	SLE Disease Activity Index
SLICC	Systemic Lupus International Collaborating Clinics
SMAD2/3	Mothers Against Decapentaplegic Homolog 2/3
snRNP	small nuclear Ribonucleoprotein
SOCS1 / SOCS3	Suppressor Of Cytokine Signaling 1 / 3
(ss / ds)RNA / RNS	(einzelsträngige / doppelsträngige) Ribonukleinsäure
STAT4	Signal Transducer And Activator Of Transcription 4
ST2	Suppression Of Tumorigenicity 2
TACI	Transmembrane Activator And CAML-Interactor
TANK	TRAF Family Member-Associated NFκB Activator
Tbet	T-box Expressed In T-cells
TGF-β	Transforming Growth Factor beta
Th1 / Th2	T-Helferzellen Typ1 / 2
TIR	Toll-Interleukin-1 Receptor
TLR(s)	Toll-Like Rezeptor(en)
TNF-α	Tumor Nekrosis Faktor alpha
TNFSF4	Tumor Necrosis Factor (Ligand) Superfamily, Member 4
TNIP1	TNFAIP3 Interacting Protein 1
TOLLIP	Toll Interacting Protein
TRAF-6	TNF Receptor-Associated Factor 6
TRIF	Toll/IL-1R-Domain-Containing Adaptor Protein Inducing Interferon-β
TTSS	Type III Secretion System
TXNIP	Thioredoxin Interacting Protein
Tyk2	Tyrosinkinase 2



---

ZNS                      Zentrales Nervensystem  
-/-                      Im Sinne von ASC<sup>-/-</sup>, NLRP3<sup>-/-</sup>: homozygote Defizienz

## 8 Eidesstattliche Versicherung: Georg Lorenz

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

### **Die Rolle des NLRP3-Inflammasoms beim murinen SLE**

selbständig 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. Einige der hier dargestellten Ergebnisse wurden des Weiteren im Journal Annals of the Rheumatic Diseases (ARD) unter dem Titel „NLRP3 and ASC suppress lupus-like autoimmunity by driving the immunosuppressive effects of TGF- $\beta$  receptor signalling“ publiziert.

---

Ort, Datum

---

Georg Lorenz

## 9 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt in erster Linie Prof. Dr. Hans-Joachim Anders und meinem Betreuer PD. Dr. hum. biol. Maciej Lech für gedanklichen Austausch, Anstöße, Aufmunterung und vor allem technische sowie fachliche Expertise. In einem Projekt wie dem hier dargestellten, in dem Lösungen und Versuchserfolge teilweise nicht unbeträchtlich auf sich warten ließen, kann ich beiden für ihre persönliche Art und fachliche Kompetenz nicht genug danken.

Darüber hinaus vielen Dank an alle übrigen Labormitglieder, die wie Frau Heni Eka Susanti und Dr. Onkar Prakash Kulkarni große Anteile an meiner Einarbeitung in verschiedene Methoden hatten, oder wie meine Mitdoktoranden Roman Günthner, Ingo Harter, Marian Oskar Grosser und Hauke Bruns für eine schöne Zeit im und um das Laborleben sorgten. Auch Dan Draganovici und Janina Mandelbaum möchte ich hier für die Anfertigung histologischer Schnitte, für die Hilfe bei der Genotypisierung der Mäuse und für ihre freundliche Art danken. Des Weiteren gilt es der Arbeitsgruppe um Dr. David Anz, insbesondere Maximilian Wintergerst, für die Durchführung von Experimenten zur T-Zellfunktionalität zu danken.

Die hier vorgelegte Arbeit wurde im Rahmen des Promotionsstudiengangs Molekulare Medizin des FöFoLe (Förderprogramms für Forschung und Lehre) der LMU München gefördert.

## 10 Curriculum Vitae

### Persönliche Daten:

Name: Georg Lorenz  
 Geb. am: 21.04.1988 in Annaberg-Buchholz  
 Staatsangehörigkeit: deutsch

### Werdegang:

07/2015 Erteilung der Approbation als Arzt durch die Regierung von Oberbayern  
 Seit 01/2012 experimentelle Promotionsarbeit „*Die Rolle des NLRP3-Inflammasoms beim murinen SLE*“ gefördert durch das Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe), Nephrologisches Zentrum der Medizinischen Poliklinik IV Innenstadt, LMU München, unter Prof. Dr. Hans-Joachim Anders

11/2011 – 06/2015 Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes

10/2010 – 06/2015 klinischer Abschnitt der ärztlichen Ausbildung, Studium der Humanmedizin an der LMU München, mündlicher Teil der Ärztlichen Prüfung (Note: 1), schriftlicher Teil der Ärztlichen Prüfung (Note: 1)

10/2008 – 10/2010 vorklinischer Abschnitt der ärztlichen Ausbildung, Studium der Humanmedizin an der LMU/TU München, Physikum (Note: 1,0)

07/2007 – 03/2008 Zivildienst im Fuhrpark der Herzogsägmühle in Peiting, „Arbeit für Menschen mit Behinderung“

09/1998 – 06/2007 Welfengymnasium Schongau und Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife (1,3)

09/1994 – 07/1998 Primus-Koch-Volksschule Hohenpeißenberg

### Berufliche Erfahrungen/Praktika:

04/2014 – 04/2015 Praktisches Jahr: Terial „Chirurgie“ am Zentralklinikum Augsburg, Terial „Innere Medizin“ am Universitätsspital Zürich, Wahlfach „Anästhesie“ am LMU Klinikum München Großhadern

02/2013 – 03/2013 Ambulanzfamulatur in der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV Innenstadt, Nephrologisches Zentrum München

08/2011 – 10/2011 Wahlfamulatur am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der LMU München

03/2011 – 04/2011	Famulatur auf der chirurgischen Intensivstation G5, LMU Klinikum Großhadern
02/2011 – 03/2011	Famulatur in der Orthopädie im Krankenhaus Barmherzige Brüder München
02/2009 – 03/2009	Krankenpflegepraktikum am Krankenhaus Weilheim, Chirurgie
07/2008 – 09/2008	Krankenpflegepraktikum am Krankenhaus Weilheim, Chirurgie
05/2008 – 07/2008	Forschungspraktikum an der Universität Ulm, Abteilung Virologie

### Preise und Vorträge:

11/2013	Posterpräsentation im Rahmen der Kidney Week der ASN (American Society of Nephrology), Atlanta GA, gefördert durch ein Reisestipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes
07/2013	Munich Nephrology Forum Award 2013 (1.Platz)
05/2013	Einladung zum Kurzvortrag: ERA-EDTA Istanbul 2013: „The inflammasome-related molecules NLRP3 and ASC suppress lupus-nephritis of C57BL/6 <sup>lpr/lpr</sup> mice“
03/2013	Posterpreis der DGIM, Fach Rheumatologie: „NLRP3 und ASC unterdrücken Autoimmunität beim SLE“

### Publikationen; Stand 09/2015:

1. Lech M\*, **Lorenz G\***, Kulkarni OP, Grosser MO, Stigrot N, Darisipudi MN, Günthner R, Wintergerst MW, Anz D, Susanti HE, Anders HJ, *NLRP3 and ASC suppress lupus-like autoimmunity by driving the immunosuppressive effects of TGF-beta receptor signalling*. Ann Rheum Dis, 2014. \***equal contribution**
2. **Lorenz G**, J. Desai, and H.J. Anders, *Lupus nephritis: update on mechanisms of systemic autoimmunity and kidney immunopathology*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2014. 23(3): p. 211-7.
3. **Lorenz G**, M.N. Darisipudi, and H.J. Anders, *Canonical and non-canonical effects of the NLRP3 inflammasome in kidney inflammation and fibrosis*. Nephrol Dial Transplant, 2014. 29(1): p. 41-8.
4. Lech M, Gröbmayer R, Ryu M, **Lorenz G**, Hartter I, Mulay SR, Susanti HE, Kobayashi KS, Flavell RA, Anders HJ, *Macrophage phenotype controls long-term AKI outcomes--kidney regeneration versus atrophy*. J Am Soc Nephrol, 2014. 25(2): p. 292-304.
5. Günthner R, Kumar VR, **Lorenz G**, Anders HJ, Lech M, *Pattern-recognition receptor signaling regulator mRNA expression in humans and mice, and in transient inflammation or progressive fibrosis*. Int J Mol Sci, 2013. 14(9): p. 18124-47.