

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

DISSERTATION

**Einfluss der intestinalen Mikroflora und Toll-Like-Rezeptoren des
angeborenen Immunsystems auf chronisch-entzündliche
Darmerkrankungen im Mausmodell**

**Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité- Universitätsmedizin Berlin**

von

Julia Ballouhey

(geb. Niebergall)

aus Berlin

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. rer.nat. S. Bereswill
 2. Prof. Dr. med. F. Gunzer
 3. Prof. Dr. med. J. Hühn

Datum der Promotion: 8. April 2011

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen beim Menschen	4
1.2	Die Rolle der kommensalen Darmflora bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen	7
1.3	Die Rolle von TLR bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen	11
1.4	Tiermodelle für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	16
1.5	Fragestellungen und Ziele der Arbeit	20

2 Material und Methoden

2.1	Materialien	21
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien	21
2.1.2	Geräte und Materialien	22
2.1.3	Puffer und Lösungen	23
2.1.4	Nährmedien und biochemische Speziesdiagnostik	24
2.1.5	Antimikrobielle Substanzen, Seren und Antikörper	25
2.1.6	Lipid A	25
2.2	Versuchstiere	26
2.2.1	Mausstämme	26
2.2.2	Vorbereitung der Tiere	26
2.2.3	Art der Tierhaltung	27
2.3	Tierversuche	28
2.3.1	Übersicht sämtlicher Methoden	28
2.3.2	Ileitis-Induktion durch orale Infektion mit <i>T. gondii</i>	29
2.3.3	Colitis-Induktion mit Dextransodiumsulfat	29
2.3.4	Gewichtsbestimmung und klinischer „Score“	30
2.3.5	Probenentnahme und Bestimmung der Darmlängen bei Ileitis und Colitis	31
2.4	Aufbereitung der Asservate	32
2.4.1	Beurteilung der Histopathologie in Ileum und Colon	32
2.4.1.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)	33
2.4.1.2	Histologische Auswertung	33
2.4.2	Beurteilung der Parasitenlast	34
2.4.2.1	Peroxidase-Antiperoxidase-Färbung (PAP)	35

2.4.3	Kulturelle Analysen der Darmflora	36
2.4.3.1	Anzucht (aerob/anaerob)	36
2.4.3.2	Biochemische Speziesdiagnostik	38
2.4.4	Translokation von Bakterien	38
2.4.5	Konzentrationsbestimmungen von Zytokinen	38
2.4.6	Generierung gnotobiotischer Mäuse	39
2.4.6.1	Rekolonisierung mit <i>E. coli</i>	40
2.4.6.2	Applikation von <i>E. coli</i> Lipid A	40
2.4.7	Polymyxin B-Behandlung von Mäusen mit Ileitis	40
2.5	Statistische Methoden	41

3 Ergebnisse

3.1	Einfluss von TLR-Defizienz auf die Darmflora bei <i>T.gondii</i> -induzierter Ileitis	42
3.1.1	Analyse der Darmflora TLR-defizienter Tiere mit Ileitis	44
3.1.1.1	Bakterielle Translokation bei Ileitis	45
3.1.2	Klinischer Zustand TLR-defizienter Tiere mit Ileitis	46
3.1.3	Histopathologie TLR-defizienter Tiere mit Ileitis	48
3.1.3.1	Dissemination von <i>T.gondii</i> im Ileum	50
3.1.3.2	Zytokin-Konzentrationen in Organüberständen TLR- defizienter Tiere mit <i>T.gondii</i> - induzierter Ileitis	51
3.1.4	Einfluss von TLR4-Liganden bei gnotobiotischen TLR-defizienten Mäuse mit <i>T.gondii</i> - induzierter Ileitis	53
3.1.4.1	<i>E.coli</i> -Rekolonisierung von TLR4-defizienten Tieren mit <i>T.gondii</i> -induzierter Ileitis	53
3.1.4.2	Applikation von <i>E.coli</i> Lipid A bei TLR4-defizienten Tieren mit <i>T.gondii</i> -induzierter Ileitis	55
3.1.5	Polymyxin B-Behandlung von Mäusen mit <i>T.gondii</i> -induzierter Ileitis	57
3.2	Einfluss von TLR-Defizienz auf die Darmflora bei DSS-Colitis	61
3.2.1	Analyse der Darmflora TLR-defizienter Tiere mit Colitis	61
3.2.1.1	Bakterielle Translokation bei DSS-Colitis	63
3.2.2	Klinisches Ausmaß der DSS-Colitis TLR-defizienter Tiere	65
3.2.3	Histopathologie TLR-defizienter Tiere mit DSS-Colitis	66
3.2.3.1	Zytokin-Konzentrationen in Organüberständen TLR- defizienter Tiere mit DSS-Colitis	66
3.3	Einfluss von LBP-Defizienz auf die Darmflora bei DSS-Colitis	68
3.3.1	Analyse der Darmflora im Entzündungsmodell des Colons bei LBP-	

defizienten Tieren mit DSS-Colitis	68
3.3.1.1 LBP-abhängige Translokation von Bakterien	70
3.3.2 Klinisches Ausmaß der DSS-Colitis LBP-defizienter Tiere	70
3.3.3 Ausprägung der Histopathologie LBP-defizienter Tiere mit DSS-Colitis	71
3.3.3.1 Zytokin-Konzentrationen in Organüberständen LBP-defizienter Tiere	72
4 Diskussion	
4.1 Der Einfluss von kommensalen Darmbakterien im <i>T.gondii</i> -induzierten Ileitis-Modell und der DSS-Colitis bei TLR-defizienten Tieren	74
4.2 Der Einfluss von Toll-like Rezeptoren auf entzündliche Darmerkrankungen	79
4.2.1 Der Einfluss von Toll-like Rezeptoren im <i>T.gondii</i> -induzierten Ileitismodell	79
4.2.2 Der Einfluss von Toll-like Rezeptoren im DSS-Colitis-Modell	81
4.2.3 Der Einfluss von Toll-like Rezeptoren bei Patienten mit CED	85
4.3 Klinische Relevanz der erhobenen Befunde in Mausmodellen für Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen	87
5 Zusammenfassung	91
6 Literaturverzeichnis	93
7 Abkürzungsverzeichnis	107

Lebenslauf

Publikationen

Danksagung

Selbständigkeitserklärung

1 Einleitung

1.1 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen beim Menschen

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) des Menschen sind rezidivierende oder kontinuierliche Entzündungen des Darms. Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sind die beiden wichtigsten Verlaufsformen (Blumberg RS *et al.* 2001).

Morbus Crohn ist durch eine diskontinuierlich segmental auftretende Entzündung des gesamten Gastrointestinaltraktes mit prädominanter Lokalisation im terminalen Ileum gekennzeichnet. Makroskopisch ist eine transmurale Entzündung der segmental betroffenen Darmabschnitte mit einer ödematös-fibrotischen Verdickung der Darmwand charakteristisch ebenso wie die Ausbildung segmentaler Stenosen, eines Pflastersteinreliefs und einer lymphofollikulären Hyperplasie. Histologisch werden Epitheloidzellgranulome und mehrkernige Riesenzellen beobachtet (Carter MJ *et al.* 2004, Stange EF *et al.* 2006).

Morbus Crohn ist durch einen in Schüben auftretenden Verlauf mit hoher Rezidivhäufigkeit charakterisiert. Klinisch fallen die Patienten durch kolikartige Abdominalschmerzen, Fieber, Gewichtsverlust und Durchfälle meist ohne Blutauflagerungen auf. Komplikationen äußern sich lokal durch Fistelbildungen aufgrund des transmuralen Befalls, anorektale Abszesse und Darmstenosen. Extraintestinale Symptome sind relativ häufig und manifestieren sich meist an Haut (Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum), Augen (Episkleritis, Iritis, Uveitis) und Gelenken (Arthritis, ankylosierende Spondylitis meist HLA-B27 positiv) (Carter MJ *et al.* 2004, Rothfuss KS *et al.* 2006, Stange EF *et al.* 2006).

Colitis ulcerosa als weitere Krankheitsentität der CED ist eine auf das Colon begrenzte Entzündung, die sich von distal nach proximal kontinuierlich ausbreitet. Histopathologisch ist diese Erkrankung durch Ulzerationen oberflächlicher Schleimhautschichten mit histologisch sichtbaren Kryptenabszessen, bestehend aus Granulozyteninfiltrationen und einer zerstörten Gefäßzeichnung der Mukosa, gekennzeichnet. Im fortgeschrittenen Stadium dominieren Schleimhautatrophien aufgrund rezidivierender Ulzerationen, so dass nicht betroffene Schleimhautinseln als Pseudopolypen mit überwiegend lymphozytärer und histiozytärer Infiltration imponieren.

Die klinischen Leitsymptome der Colitis ulcerosa sind blutig-schleimige Durchfälle, begleitet von Abdominalschmerzen und Tenesmen. Typische intestinale Komplikationen sind massive Blutungen, das toxische Megakolon, gekennzeichnet durch septische Temperaturen bei Peritonitis mit konsekutiver Perforationsgefahr, und ein erhöhtes Karzinomrisiko. Extraintestinale Manifestationen sind bei der Colitis ulcerosa seltener zu finden als beim Morbus Crohn. Die primär sklerosierende Cholangitis (PSC) tritt gehäuft in Assoziation mit einer Colitis ulcerosa auf (Podolksy D 2002, Rothfuss KS *et al.* 2006, Stange EF *et al.* 2006).

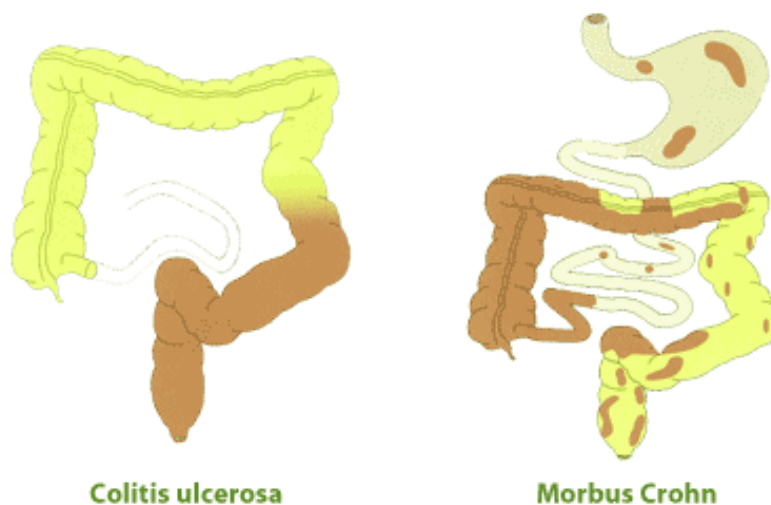


Abbildung 1: Lokalisationen von Entzündungsprozessen im Gastrointestinaltrakt bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn. Colitis ulcerosa zeichnet sich durch einen kontinuierlichen Befall des Kolons von distal nach proximal aus, die Manifestationen beim Morbus Crohn sind diskontinuierlich mit Befall des gesamten Verdauungstraktes (www.walzel.at).

Die weltweite Inzidenz von Colitis ulcerosa beträgt ca. 10-20/100 000 pro Jahr, von Morbus Crohn ca. 10-200/100 000 pro Jahr mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen dem 20. bis 40. Lebensjahr (Mac Donald TT, Monteleone G 2005). Männer und Frauen sind zu etwa gleichen Teilen betroffen. Es wird eine verminderte Häufigkeit des bisher bestehenden Nord-Süd-Gefälles in den letzten Jahren beobachtet (Lakatos L *et al.* 2007). Die genaue Ätiologie der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen ist trotz intensiver Forschung zum heutigen Zeitpunkt unbekannt. Unterschiedliche klinische und experimentelle Studien zeigen multifaktorielle Ansatzpunkte, die eine Störung der Immunregulation auf dem Boden von genetischen Dispositionen, Umwelteinflüssen

oder Infektionen bei der Auslösung und Ausprägung CED vermuten lassen (Podolksy D 2002, Fiocchi C. 1998, Danese S *et al.* 2006, Scaldaferri F *et al.* 2007).

Eine familiäre Häufung ist vor allem bei Patienten mit Morbus Crohn beobachtet worden. Dafür verantwortlich ist eine Mutation im NOD2/CARD15-Gen auf dem Chromosom 16, die anhand einer Screening-Methode mit DNA-Markierungen in Familien mit gehäuften Auftreten von CED beschrieben wurde (Hugot JP *et al.* 1996/2001). Das NOD2/CARD15-Gen codiert für ein zytoplasmatisches Protein, welches in Makrophagen gebildet wird und als Rezeptor zur Wiedererkennung des bakteriellen Produktes Lipopolysaccharid (LPS) und zur Aktivitätsregulierung von NF- κ B (nukleärer Faktor- κ B) dient (Ogura Y *et al.* 2001, Cuthbert AP *et al.* 2002, Podolsky D.M. 2002). Es wird vermutet, dass durch das NOD2/CARD15-Gen Veränderungen der Mechanismen zur Wiedererkennung von Bakterienprodukten und/oder durch eine Erhöhung der Immunaktivität auf die kommensale Darmflora eine Rolle bei der Auslösung eines M. Crohns spielen könnten (Hart AL *et al.* 2002). Anhand von *in vitro* Versuchen konnte eine verminderte Toleranz von T-Zellen in der Lamina propia von M.Crohn-Patienten gegenüber Antigenen der eigenen Darmflora gezeigt werden, indem eine erhöhte Th1-Immunantwort anhand der Messung von Zytokinen wie INF- γ , TNF- α und IL-12 in mononukleären Zellen aus Biopsien entzündeter Darmabschnitte nachgewiesen werden konnte (Duchmann R *et al.* 1995). Da nur etwa 17-25% der M. Crohn-Patienten eine Mutation des NOD2-Gens auf dem Chromosomen 16 besitzen (Hugot JP *et al.* 2001, 2006, Gil A. 2004) und eine erhöhte Inzidenz von M. Crohn bei Trägern der NOD2/CARD15 Mutation nicht belegt werden konnte (Rescigno, Nieuwenhuis 2007), ist die NOD2/CARD15 Mutation eher als Prädisposition für die Immunpathogenese zu sehen.

Bei der Colitis ulcerosa wurden genetische Assoziationen einerseits auf unterschiedlichen DR-Allelen (DR2, DRB1*0103 und DRB1*12), andererseits anhand von HLA-Polymorphismen (A-HLA, B-HLA, C-HLA, G-HLA) beobachtet, die einen Zusammenhang zwischen der Colitis ulcerosa sowie auch Regionen auf den Chromosomen 3, 7 und 12 vermuten lassen (Satsangi J *et al.* 1996, Farrell RJ *et al.* 2002, Torres MI *et al.* 2004).

Als auslösende Umweltfaktoren einer CED werden das Rauchen von Zigaretten, welches als protektiv für Colitis ulcerosa und als Risikofaktor für M. Crohn gilt, der

Konsum von nicht steroidal Antiphlogistika (NSAID: engl. non-steroid anti-inflammatory drugs), psychologischer Stress und das Vorhandensein des Wurmfortsatzes, wobei eine Appendektomie als möglicherweise protektiv für Colitis ulcerosa angesehen wird, diskutiert (Farrell RJ, *et al.* 2002; Mac Donald TT, Monteleone G 2005). Die Darmflora stellt jedoch einen der wichtigsten Umweltfaktoren bei der Auslösung und Erhaltung einer CED dar (Podolksy D 2002, Farrell RJ, *et al.* 2002). Mehrere Studien bestätigen die Hypothese, dass aufgrund einer gestörten Barrierefunktion der Darmschleimhaut bei genetisch prädisponierten Patienten eine verminderte Antigentoleranz vorliegt und somit eine überschießende Immunreaktion ausgelöst wird (Blumberg RS *et al.* 2001, Thompson-Chagoyan OC *et al.* 2005)

1.2 Die Rolle der kommensalen Darmflora bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Die Darmflora des Menschen stellt ein komplexes Ökosystem dar, welches im gesunden Zustand ausgeglichen ist, jedoch bei Veränderungen der Bakterienzusammensetzung und deren Funktion weitreichende Auswirkungen auf die Funktion der Schleimhautbarriere und die daraus folgende Immunantwort haben kann (Teitelbaum JE *et al.* 2002).

Eine Analyse der Zusammensetzung der kommensalen Darmflora bei Säugetieren zeigte die Identifizierung von über 100 verschiedenen Bakterienarten im Darm gesunder Individuen. Etwa 500 Arten mit ungefähr 20 vorherrschenden Gattungen werden im gesamten Verdauungstrakt vermutet (Kleesen B *et al.* 2000, Salminen S *et al.* 1998, Guarner F *et al.* 2003, 2006). Die dominanten Ordnungen sind *Bacteroidales*, *Bifidobacteriales*, *Enterobacteriales*, *Clostridiales* und *Lactobacillales*, wobei mehr als 90% der globalen Darmflora aus obligaten Anaerobiern besteht und die fakultativ anaeroben Enterobakterien wie *E.coli* einen relativ geringen Anteil der gesunden Flora bilden (Donskey CJ *et al.* 2003).

Die Zusammensetzung der Darmflora im gesunden Zustand des Menschen ist heute zum Teil erforscht (siehe Abb. 2). Ob und inwieweit die Darmflora sich im entzündeten Zustand verändert sowie die dafür zugrunde liegenden Ursachen sind weitgehend ungeklärt.

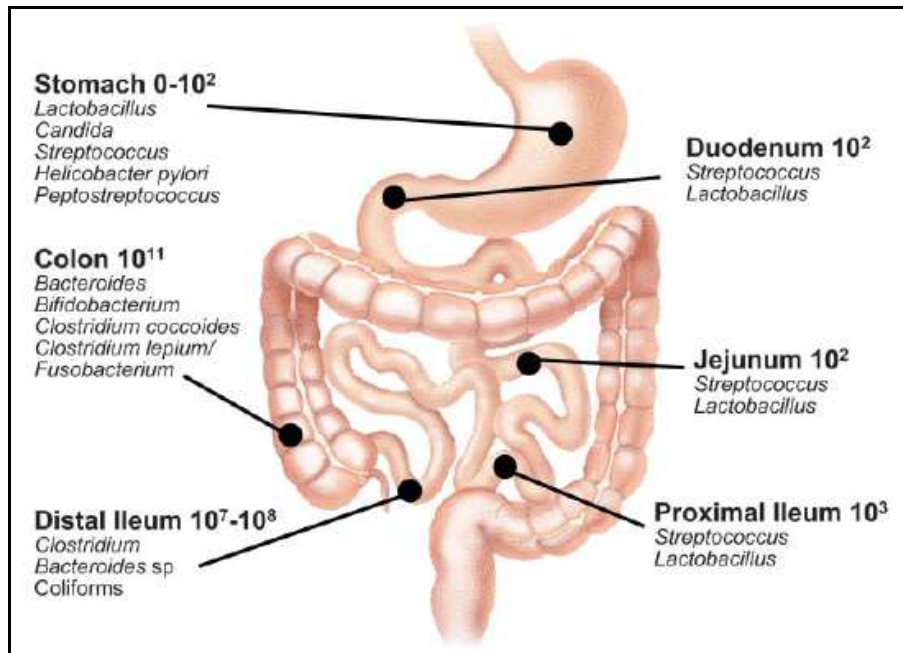


Abbildung 2: Bakterienflora des menschlichen Gastrointestinaltraktes im gesunden Zustand: Die Schnittstelle zwischen Wirt und dessen Umwelt. Dargestellt sind die luminalen Konzentrationen der gastrointestinalen Flora mit den vorherrschenden identifizierten Arten des jeweiligen Gastrointestinalabschnittes (aus Sartor *et al.* 2007).

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen sind durch eine überschießende Aktivierung des mukosalen Immunsystems gekennzeichnet, welches durch das Vorhandensein der kommensalen Darmflora beeinflusst wird (Podolsky DK 2002). Dieser überschießenden Aktivierung des Immunsystems liegt eine Störung der intestinalen Barrierefunktion zugrunde, welche die Immunreaktivität gegenüber bakteriellen Antigenen erhöht (Basset C *et al.* 2002, Lodes MJ *et al.* 2004). Bei Patienten mit einem aktiven Schub einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung konnte eine Akkumulation von kommensalen *Escherichia coli* und *Bacteroides spp.* im entzündeten Gewebe nachgewiesen werden, wobei ein zusätzlicher Verlust der Diversität der Darmflora im Verlauf der Entzündung vermutet wird (Swidsinski A *et al.* 2002, Darfeuille-Michaud A *et al.* 2004). In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass zur Ausbildung einer spontanen Colitis bei HLA-B27-transgenen Ratten das Vorhandensein der kommensalen Darmflora erforderlich war, dagegen sich bei in einem keimfreien Umfeld gehaltenen Tieren keine Colitis entwickelte. Wurden die Tiere im keimfreien Umfeld jedoch mit kommensalen Bakterien definiert kolonisiert, konnte je nach Bakterienspezies eine experimentelle Colitis hervorgerufen werden, wobei v.a. *Bacteroides spp.* eine entscheidende Rolle an der Auslösung einer Colitis spielten (Rath HC *et al.* 1996, 1999, 2001). Diese erhobenen Befunde werfen derzeit neue

Fragestellungen zur Erforschung der bislang ungeklärten Mechanismen der Interaktion von Darmmukosa und luminaler Mikroflora im gesunden sowie entzündeten Zustand bei CED auf.

Im gesunden Zustand befinden sich keine luminalen Antigene der kommensalen Bakterienflora in der Lamina propria. Eine intakte Epithelbarriere und eine regelmäßige Apoptose von T-Lymphozyten verhindern die Aktivierung von proinflammatorischen Zytokinen und eine daraus folgende Entzündungsreaktion. Eine bisher ungeklärte Frage ist, wie das intestinale Immunsystem zwischen kommensalen und pathogenen Bakterien unterscheiden kann (Duchmann R *et al.* 1995, MacDonald TT, Monteleone G 2005). Bei CED ist die überschießende Aktivierung des Immunsystems mit einer verminderten Toleranz gegenüber der natürlicherweise im Darm vorkommenden kommensalen Bakterien assoziiert, die im gesunden Zustand durch regulatorische T-Zellen, natürliche Killerzellen, B-Lymphozyten, Makrophagen sowie dendritische Zellen und deren Zytokinproduktion reguliert wird (Duchmann R *et al.* 1995). Eine Entzündung entsteht durch eine übermäßige Aktivierung des Immunsystems nach dem Übertritt von bakteriellen Antigenen in die Lamina propria mit einem Anstieg von Makrophagen, dendritischen Zellen und T-Zellen in der Lamina propria und konsekutiv gesteigerter Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen sowie freien Radikalen (Sartor RB 2006, 2007; MacDonald TT, Monteleone G, 2001, 2005).

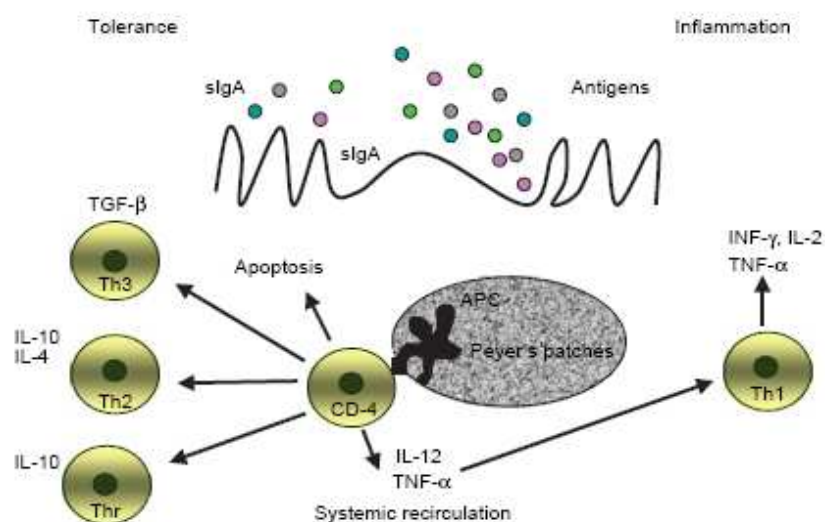


Abbildung 3: Toleranz vs. Entzündung im Darm-assoziierten Lymphgewebe (engl. GALT: gut-associated lymphoid tissue). Bakterielle Antigene gelangen vom Darmlumen ins lymphoide Gewebe und in die Lamina propria (LP), in denen sich Antigen-präsentierende Zellen (engl. APC: antigen-presenting cells)

wie dendritische Zellen und Makrophagen befinden. APC aktivieren CD4-Lymphozyten, die ihrerseits unterschiedliche Immunantworten (Th1, Th2, Th3, Th17) auslösen und je nach Zytokinbildung einen zytotoxischen Epithelschaden (IL-2, IL-12, TNF- α , INF- γ) in Form einer Entzündung provozieren oder in Form von protektiven Zytokinen (IL-4, IL-10, TGF- β) die natürliche Toleranz aufrecht erhalten können (nach Thompson-Chagoyan OC *et al.* 2005).

Ein Zusammenbruch des Gleichgewichts zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen in der Darmmukosa verursacht eine chronische Entzündungsreaktion (Duchmann R *et al.* 1995, Thompson-Chagoyan OC *et al.* 2005).

Folgende Zellpopulationen und Entzündungsmediatoren wurden von Patienten mit CED charakterisiert: So dominieren bei Morbus Crohn-Patienten aktivierte CD4-T-Helfer-Lymphozyten der Th1-vermittelten Immunantwort mit der Bildung von Interferon-gamma (IFN- γ) und Interleukin 2 (IL-2). CD4-Lymphozyten differenzieren nach Stimulation durch IL-12 und IL-18, die von Makrophagen und dendritischen Zellen (DC) sezerniert wurden. Bei M. Crohn-Patienten ist die Produktion dieser Zytokine erhöht, und es wurde eine Akkumulation von IL-12 beobachtet, die von aktivierten CD4-Zellen ausgeschüttet wurden (Monteleone *et al.* 1999, MacDonald & Monteleone 2001). Die so differenzierten Th-1-Zellen sind resistent für apoptotische Stimuli. Sie bewirken folglich eine kontinuierliche Bildung von Zytokinen und somit eine Aufrechterhaltung des Entzündungsprozesses (Monteleone G *et al.* 1999, MacDonald TT, Monteleone G 2001, 2005).

Bei Patienten mit Colitis ulcerosa überwiegen CD4-Lymphozyten einer Th-2-Antwort. Sie sind charakterisiert durch die Bildung vom Transforming Growth Factor β (TGF- β) und Interleukin-5 (IL-5), wobei der typische Anstieg von IL-4 nicht immer nachweisbar ist. Natürliche Killerzellen (NK) produzieren IL-13, wodurch ein zytotoxischer Epithelschaden in der Colonschleimhaut provoziert wird (Elson CO *et al.* 2000, 2005, Toms C *et al.* 2001, Fuss IJ *et al.* 1996, 2004).

Eine vermutliche intestinale Barrierestörung führt zu einem Übertritt von Bakterienprodukten vom Darmlumen in tiefe submuköse Areale, so dass entweder eine direkte Interaktion mit Immunzellen, vor allem dendritischen Zellen und T-Lymphozyten, ausgelöst werden kann (MacDonald TT, Monteleone G 2005) oder dass intraepitheliale Immunrezeptoren des angeborenen Immunsystems wie TLR (engl. toll-like-receptor) eine veränderte Gentranskription von Zytokinen bewirken, um somit eine gesteigerte

Immunantwort auszulösen (Podolsky DK 2002, Abreu MT *et al.* 2005, Arancibia S *et al.* 2007) .

Eine krankheitsauslösende und/oder -unterhaltende Rolle der kommensalen Darmflora bei CED ist inzwischen gut belegt (Sartor RB 2005, 2006, 2007, Elson CO *et al.* 2005, Swidinski A *et al.* 2002). Ob dem Mechanismus der überschießenden Aktivierung des Immunsystems eine epitheliale Barrieredysfunktion zugrunde liegt oder aber immunologische Fehlregulationen an der Immunopathogenese CED beteiligt sind, bleibt Gegenstand weiterer Forschungen (Schmitz H *et al.* 1999, MacDonald TT, Monteleone G 2005, Sartor RB *et al.* 2006, 2007) .

1.3 Die Rolle von TLR bei chronisch-entzündlichen Darm-entzündungen

Die luminale Oberfläche des Ileum- bzw. Colonepithels ist im ständigen Kontakt mit gram-positiven und gram-negativen Bakterien der kommensalen Darmflora und deren Bakterienprodukten (Abreu MT 2005, Fukata M 2005). Der initiale Kontakt zwischen pathogenen und kommensalen Mikroorganismen und Immunzellen wird durch Rezeptoren des angeborenen Immunsystems vermittelt, die als „pathogen recognition receptors“ (PRRs) bezeichnet werden (MacDonald TT, Monteleone G 2005). Zu den PRRs gehören CD14, der Macrophage Scavenger Receptor (MSR), Toll-like-Rezeptoren (TLRs) und Komplement-Rezeptoren (Medtzhitov R 2000, Becker M *et al.* 2006, De Jager PL 2007). Sie erkennen molekulare Muster oder Moleküle von Mikroorganismen („pathogen associated molecular patterns“, PAMPs). Toll-like Rezeptoren sind Transmembranrezeptoren, die molekulare Produkte von extrazellulären Pathogenen wie zum Beispiel gram-negativen und gram-positiven Bakterien, Virus-DNA und -RNA, sowie Pilzen und Protozoen erkennen. Derzeit wurden 12 Rezeptoren der TLR-Familie mit jeweils multiplen Liganden bei Mensch und Maus identifiziert (Barton GM *et al.* 2002, Akira S *et al.* 2007, Wang RF *et al.* 2008). Die Erkennung von LPS, ein Bakterienprodukt gram-negativer Bakterien, erfolgt über TLR4-Rezeptoren und führt zu einer Expression von proinflammatorischen Genen in unterschiedlichen Zelltypen (Abreu MT 2005, Jerala R 2007). Für TLR-2 ist im Vergleich zu anderen TLRs die größte Anzahl von Liganden bekannt. Darunter befinden sich Lipoproteine von Mykoplasmen, Spirochäten und gram-positiver Bakterien,

Lipoarabinomannan von Mykobakterien, Zymosan von Hefen und andere (Kirschning CJ *et al.* 2002, Underhill D *et al.* 2002). TLR-2 ist insbesondere an der Immunantwort auf gram-positive Bakterien beteiligt. Die Zellwand gram-positiver Bakterien enthält Peptidoglykane, Lipoteichonsäure und Lipoproteine. Diese PAMPs lösen nach Bindung an TLR2 eine Immunantwort in Wirtszellen aus.

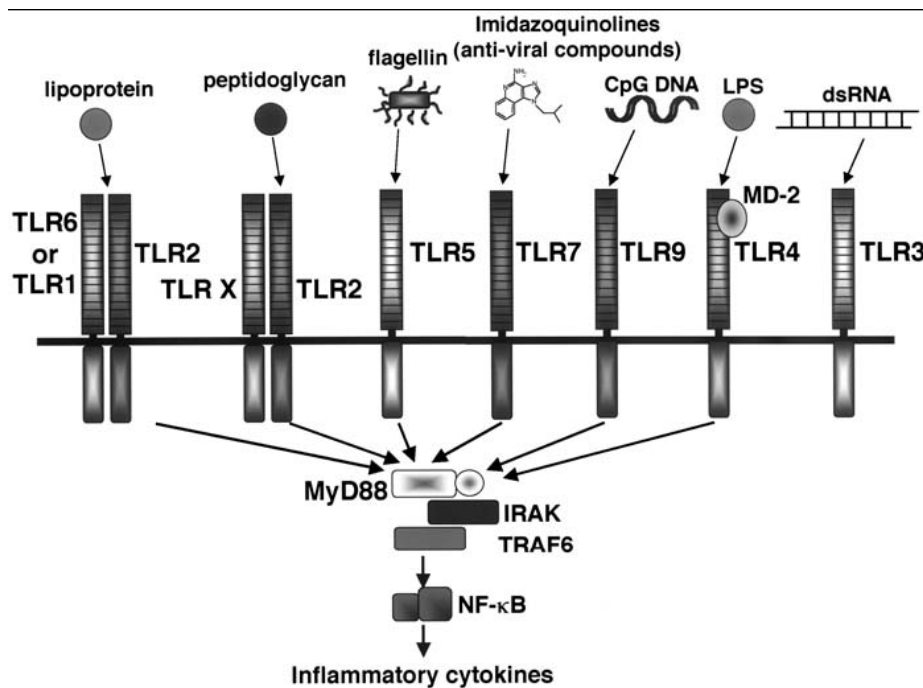


Abbildung 4: Übersicht der Liganden der TLR-Familie. Die Immunantworten aller Liganden, mit Ausnahme der ds-RNA, ist MyD88-abhängig, belegt anhand der Bildung inflammatorischer Zytokine. MyD88 ist nicht an dem Übertragungsweg des ds-RNA-anhängigen TLR-3 beteiligt, welcher im Augenblick unbekannt ist (aus Akira S *et al.* 2003).

Im gesunden Zustand lösen kommensale Bakterien keine entzündliche Immunantwort bei intestinalen Epithelzellen *in vitro* aus. Pathogen-assoziierte Moleküle des Magen-Darm-Traktes werden durch TLRs erkannt und bewirken anschließend eine Aktivierung von dendritischen Zellen, die als Voraussetzung für die Reifung von T-Helferzellen, Bildung von proinflammatorischen Zytokinen und der Auslösung einer erworbenen Immunantwort notwendig ist (Pasare C, Medtzhitov R 2005). Im gesunden Zustand des Menschen erfüllen TLRs ausgleichende Funktionen wie die Anregung zur Bildung von antimikrobiellen Peptiden, eine Verstärkung der epithelialen Barrierschutzfunktion und Proliferation von Epithelzellen. Die Induktion einer Wundheilung im Darm und die Eliminierung von intramukosalen Bakterien erfolgt also dank einer intakten TLR-Signalübertragung im gesunden Zustand. Bei Patienten mit CED ist eine

inflammatorische Immunantwort auf die kommensale Darmflora zu beobachten. Demzufolge kann die Pathogenese von CED möglicherweise mit einer erhöhten oder verminderten TLR-Übertragung assoziiert sein (Fukata M *et al.* 2007).

Die TLR- bzw. NOD/CARD-abhängige Aktivierung des Immunsystems erfolgt über Signalkaskaden, an denen verschiedene Adapterproteine beteiligt sind (Kawai T *et al.* 2007).

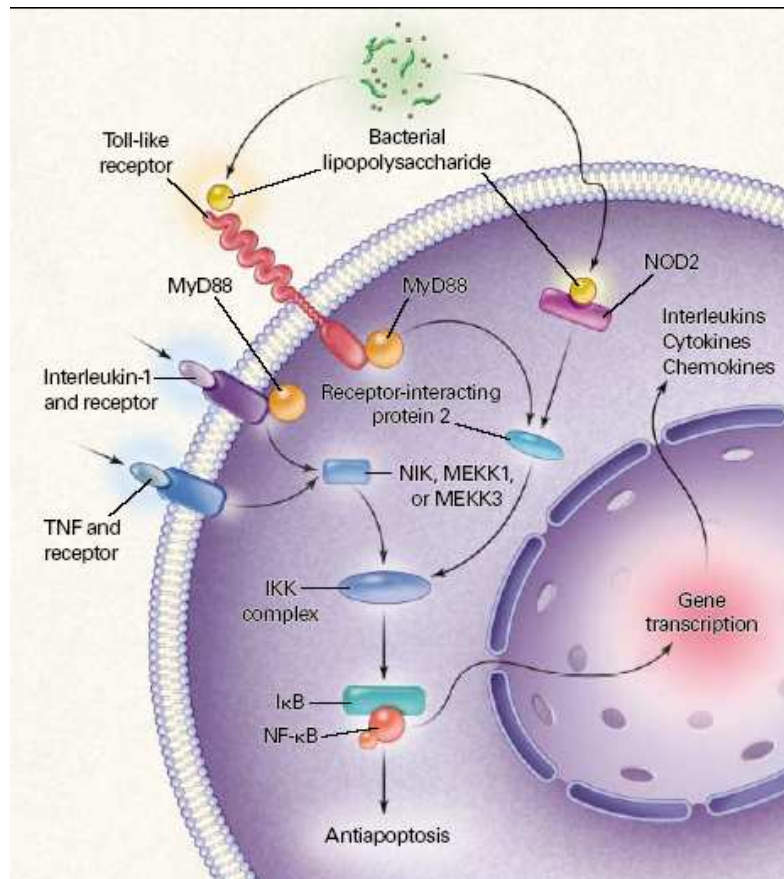


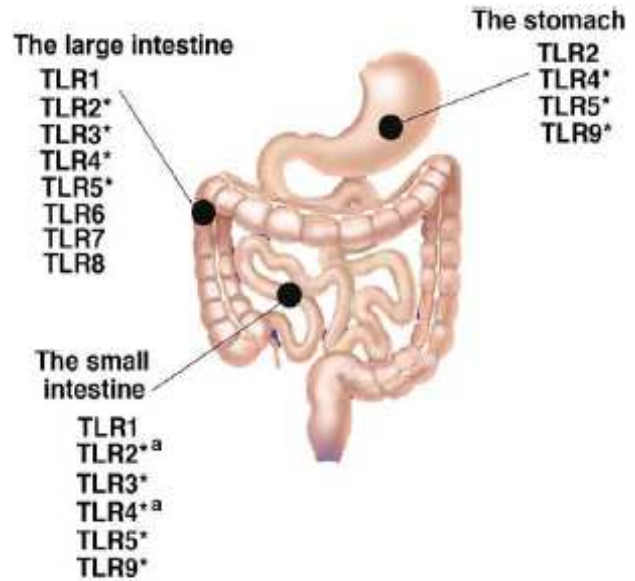
Abbildung 5: Allgemeiner zellulärer Aktivierungsmechanismus einer chronisch-entzündlichen Darmentzündung (CED). Die Aktivierung von NF-κB (nukleärer Faktor-κB), ein aus Proteinen bestehender regulatorischer Transkriptionsfaktor, stellt den Hauptmechanismus der Zellaktivierung und der Bildung von unterschiedlichen Entzündungsmediatoren dar, einschließlich einer Vielzahl von Zyto- und Chemokinen. Dieser reguliert ebenfalls den programmierten Zelltod (Apoptose). Einige Entzündungsfaktoren, die auch eine Rolle bei CED spielen, aktivieren NF-κB entweder über Stimulierung von intermediären Enzymen wie NIK (engl. NF-κB-inducing kinase), MEKK1 oder MEKK3 (engl. Mitogen-activated protein kinase kinase) oder durch Bindung an das Receptor-interacting Protein 2, welches zu einer Phosphorylierung vom Inhibitor der κB-Kinase (IKK) und einer darauf folgenden Dissoziation des Dimers NF-κB selbst führt. NF-κB gelangt folglich in den Zellkern zur Beeinflussung der Gen-Transkription. Zytokine wie IL-1 und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) binden an deren jeweiligen Oberflächen-Rezeptor, Bakterienprodukte wie Lipopolysaccharide (LPS) binden an die

Oberflächenrezeptoren der Gruppe der „pattern-recognition-Rezeptoren“ (PRR) wie Toll-like-Rezeptoren (TLR). Durch das Eindringen von bakteriellen LPS in das Zytoplasma kann dieser Mechanismus auch mittels NOD2, eines intrazytoplasmatischen Rezeptors, ausgelöst werden. NOD2 ist ein Genprodukt des IBD1-Gens, dessen Mutation gehäuft bei M. Crohn-Patienten nachgewiesen wird und die Aktivierung des NF- κ B-Mechanismus zu verändern scheint (nach Podolsky 2002).

Nach Bindung der Bakterienbestandteile an TLR bzw. NOD-Proteine entsteht eine Signalkaskade via Adapterproteinen wie MyD88, Rezeptor-interacting Protein 2 und unterschiedlichen Kinasen, deren Aktivierung wiederum zur Aktivierung des Immunmediators NF- κ B führt, der nach seiner Dissoziation in den Zellkern gelangt und dort die Transkription von Zytokinen induziert (Podolsky DK 2002, Abreu MT *et al.* 2005, Arancibia S *et al.* 2007). Immunologische Fehlregulationen durch Polymorphismen der TLR- und NOD2/CARD15-Gene sind offenbar an der Immunpathogenese von CED beteiligt, indem entweder die Aufnahme bakterieller Antigene und/oder die Fähigkeit des angeborenen Immunsystems eine Toleranz gegenüber kommensalen Bakterien auszubilden, verändert wird (Abreu MT *et al.* 2005). So konnte gezeigt werden, dass TLR4 (Franchimont D *et al.* 2004, Török MI *et al.* 2004, De Jager PL *et al.* 2007) und NOD (Ogura Y *et al.* 2001, Hugot JP *et al.* 2001, Hampe J *et al.* 2001) signifikant mit CED beim Menschen assoziiert sind. Klinische Studien bestätigen, dass eine höhere TLR2- und TLR4-Expression in Darmresektaten bei Patienten mit aktiven CED nachgewiesen werden konnten (Frovola L *et al.* 2007, Szebeni B *et al.* 2008). In genmodifizierten Mäusen konnte eine Assoziation von Mutationen in NOD2/CARD15 und der Entstehung von CED gezeigt werden. So führte NOD2 zu einer übermäßigen TLR2-vermittelten, Th1-Zytokinantwort (Watanabe T *et al.* 2004, Yang Z *et al.* 2007). Erkennungsmoleküle des angeborenen Immunsystems wie TLRs werden zell- und gewebsspezifisch exprimiert (siehe Abb.6).

Abbildung 6:

Expression von TLRs im gesunden menschlichen Gastrointestinaltrakt. Die meisten TLRs werden im Ileum und im Colon exprimiert. In intestinalen Epithelzellen und Lamina propria-Makrophagen konnten TLR2- und TLR4-mRNA-Expressionen nachgewiesen werden, jejunale glatte Muskelzellen und der Plexus myentericus bilden TLR4-mRNA. *Proteinnachweis wurde bestätigt. ^a Es wurde gezeigt, dass der Rezeptor mit dem jeweilig dazugehörigen Liganden eine Immunantwort auslöst. Daten über eine mukosale TLR-Expression im Ösophagus liegen bis jetzt nicht vor (nach Fukata M 2008).



Die für Bakterien relevanten TLRs werden im gesamten Gastrointestinaltrakt der Maus regelmäßig exprimiert, wobei eine Prädominanz im Colon beobachtet wurde (Ortega-Cava CF *et al.* 2003). TLR4-mRNA wird in intestinalen Epithelzellen nach Lipopolysaccharid (LPS)-Stimuli gram-negativer Bakterien vermindert exprimiert (Abreu MT *et al.* 2001, Naik S *et al.* 2001, Otte JM *et al.* 2004). Weiterhin konnte eine TLR4-Expression in glatten Muskelzellen des Jejunums und im Plexus myentericus nachgewiesen werden, jedoch nur in geringem Maße in der jejunalen Epithelschicht, welches ein Hinweis darauf ist, dass glatte Muskelzellen und Zellen des Plexus myentericus ebenfalls bei der intestinalen Immunabwehr eine Rolle spielen (Rumio C *et al.* 2006). Die Antwort von intestinalen Epithelzellen auf TLR2-Liganden gram-positiver Bakterien ist nur geringgradig ausgeprägt und führt zu einer verminderten Expression von TLR2 (Melmed G *et al.* 2003). Die verminderte Immunantwort von intestinalen Epithelzellen mit einer daraus resultierenden verminderten TLR-Expression lässt darauf schließen, dass das angeborene Immunsystem demnach nicht über TLRs zwischen obligat pathogenen und kommensalen Bakterien differenzieren kann, wenn keine Translokation von bakteriellen Antigenen in tiefere subepitheliale Gewebsschichten erfolgt (Abreu MT *et al.* 2005).

1.4 Tiermodelle für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

Verschiedene Tiermodelle haben einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung der Pathogenese von CED geleistet (Pizarro TT *et al.* 2003, Elson CO *et al.* 2005). Bei diesen Modellen werden vier verschiedene Typen unterschieden: chemisch oder mikrobiotisch induzierte, spontan ausgelöste oder genetisch veränderte knockout- bzw. transgen induzierte Modelle. Da M. Crohn und Colitis ulcerosa unterschiedliche histo- und immunpathologische Charakteristika aufweisen, wurden zwei verschiedene Mausmodelle für unsere Versuche ausgewählt. Das Zytokinprofil bei Patienten mit M. Crohn ist, wie bereits beschrieben, durch eine dominierende Bildung von IL-12 und IFN- γ gekennzeichnet. Die Induktion einer terminalen Ileitis durch orale Infektion mit *Toxoplasma gondii* ist ein Mausmodell für CED, die Parallelen zur Immunpathogenese des M. Crohn beim Menschen durch Induktion einer Th1-Typ Antwort mit vergleichbarem Zytokinprofil erkennen lässt (Liesenfeld O 2002). *Toxoplasma gondii* ist ein obligat intrazellulärer Parasit, der normalerweise durch eine orale Aufnahme von rohem, Parasitenzysten enthaltenem Fleisch oder kontaminiertem Trinkwasser übertragen wird.

Eine *T. gondii*-induzierte Ileitis wird durch eine perorale Infektion mit 100 Zysten *T.gondii* des ME49-Stammes bei suszeptiblen C57BL-Mäusen hervorgerufen. Innerhalb von 13 Tage nach der Infektion sterben die Tiere der suszeptiblen Mausstämme C57BL/6 und C57BL/10 (H2b-Haplotyp), die Tiere der BALB/c-Stämme überleben jedoch. Nach 7 Tagen führt die orale Infektion von *T.gondii* bei C57BL/6 Mäusen zu einer massiven Entzündung des terminalen Ileums, gekennzeichnet durch eine vollständige Zerstörung der Villi und der Mukosa. Das Modell der *T.gondii*-induzierten Ileitis wurde ursprünglich für C57BL/6-Mäuse etabliert (Liesenfeld O 2002). Die uns zur Verfügung stehenden TLR-defizienten Tiere besitzen einen C57BL/10 genetischen Hintergrund (Poltorak A *et al.* 1998) und zeigten in vergleichenden Vorversuchen, dass C57BL/10-Tiere nach einer *T.gondii*-Infektion den präfinalen Zustand und eine den C57BL/6-Tieren vergleichbar schwere Histopathologie mit etwa einem Tag Verzögerung entwickelten. Die Probenentnahme erfolgte dementsprechend an Tag 9 p.i.. Diese histologischen Veränderungen werden durch einen Anstieg von aktivierten CD4⁺ T-Zellen und einer vermehrten Ausschüttung von Th1-Zytokinen wie IFN- γ , TNF- α und iNOS (induzierbarer Stickstoffmonoxid-Synthetase) in der Lamina propia vermittelt

(Liesenfeld O *et al.* 1996, 1999, 2002, Mordue DG *et al.* 2001, Kasper L *et al.* 2004, Mennechet FJ *et al.* 2004). Dieses Th1-Zytokinprofil ist bei mit *T.gondii* infizierten Tieren im Vergleich zu nicht infizierten Tieren signifikant erhöht. Die Gabe von TNF- α Antikörpern und des iNOS (induzierte NO-Synthase) Inhibitors Aminoguanidin verhindern Nekrosen und verlängern die Überlebenszeit (Liesenfeld O *et al.* 1996, 1999). Die starke NO-Ausschüttung und die Bildung von IFN- γ und TNF- α bewirken eine massive Schleimhautentzündung und tragen so nach spätestens acht Tagen infolge einer *T.gondii*-Infektion zu einer nahezu 100%igen Mortalität bei. Dieses Mausmodell entspricht demzufolge immunpathologisch einem akuten Schub eines M.Crohns und ist nicht als Modell einer chronischen Verlaufsform geeignet (Liesenfeld O 2002). Analog zu menschlichen CED ist es durch bakterielle Translokationen und eine Th1-Typ-Immunantwort gekennzeichnet. Die Vorteile entsprechen einer hohen experimentellen Reproduzierbarkeit der terminalen Ileitis und der immunologischen Veränderungen in Form einer Th1-Immunantwort mit identischem Zytokinprofil der M.Crohn-Patienten. Ein weiterer Vorteil ist, dass in einem relativ kurzen Abstand klinische, histopathologische und mikrobiologische infektionsbedingte Veränderung ab Tag sechs p.i. auftreten und so eine zügige Versuchsdurchführung gewährleisten. Zusammengefasst führen die genannten Argumente zu der Auswahl dieses Darmentzündungsmodells in der vorliegenden Arbeit, welches hervorragend zur Analyse pathogenetischer Mechanismen und Darmfloraveränderungen bei entzündlichen intestinalen Erkrankungen geeignet ist (Liesenfeld O 1999, 2002).

In der folgenden Abbildung werden der mögliche Mechanismus des Eindringens von *T.gondii* durch das Darmepithel und deren Interaktion mit intraepithelialen- und T-Lymphozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen zusammengefasst (siehe Abb.7).

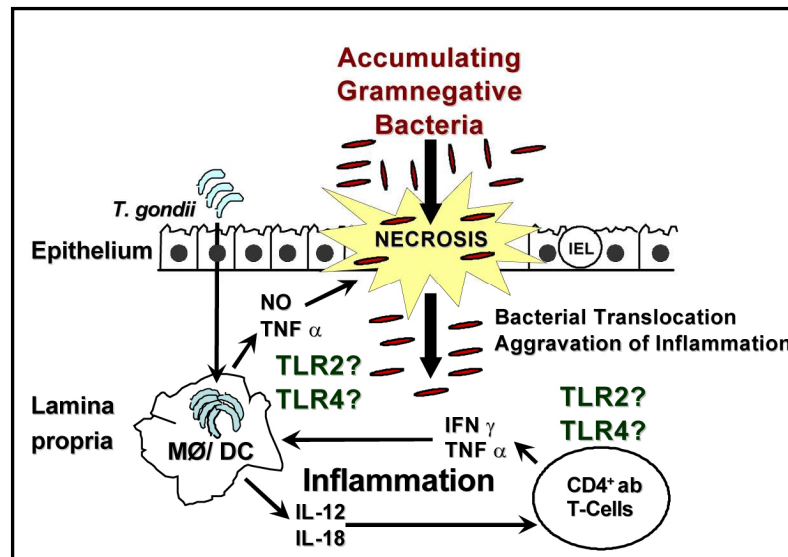


Abbildung 7: Th1-Typ Immunantwort im Ileum von C57BL/10-Mäusen nach einer Infektion mit *T.gondii*; IEL: intraepitheliale Lymphozyten (in Zusammenarbeit mit MM. Heimesaat, D. Fuchs, A. Fischer und S. Bereswill).

Es sind nur wenige alternative Tiermodelle einer terminalen Ileitis beschrieben worden (Liesenfeld O 2002, Pizarro TT *et al.* 2003, Elson CO *et al.* 2005). Im SAMP1/Yit-Maus-Modell kommt es zu spontan, und somit nicht induzierten chronischen Dünndarmentzündungen. Diese wird sowohl durch eine Aktivierung der Th1- als auch der Th2-Immunantwort hervorgerufen (Kosiewicz MM *et al.* 2001, Bamias G *et al.* 2005, Elson CO *et al.* 2005). Es wird vermutet, dass ein epithelialer Zelldefekt aufgrund einer Aktivierung von pathogenetischen CD4⁺ T-Zellen entsteht, die auf bakterielle Antigene verstärkt reagieren und so eine lokale Entzündungsreaktion auslösen. Gnotobiotische SAMP1/Yit-Mäuse entwickelten im Vergleich zu mit SPF-Flora rekolonisierten SAMP1/Yit-Mäusen keine Ileitis (Kosiewicz MM *et al.* 2001). Der Nachteil dieses Mausmodells ist, dass pathologische Veränderungen erst nach Wochen eintreten und somit ein langer Beobachtungszeitraum und damit verbundene erhöhte Laborkosten erforderlich sind. Eine grundlegende Analyse der kommensalen Flora ist bei diesem Modell bislang nicht realisiert worden.

Anhand des *T.gondii*-induzierten Ileitismodells wurden in der vorliegenden Arbeit Veränderungen der Darmflora während des akuten Entzündungsprozesses im Ileum und die Rolle von Bakterien und deren Produkte an der Entzündungsreaktion untersucht. Durch eine orale Infektion mit *T.gondii* von TLR-defizienten Mäusen galt es,

die Rolle transmuraler Rezeptoren des angeborenen Immunsystems an der Immunpathogenese von CED im Tiermodell zu identifizieren. Dafür wurden TLR-2, TLR-4 und TLR2/4 defiziente Tiere verwendet. Die Herstellung gnotobiotischer TLR4-defizienter Tiere durch eine fünffache Antibiotikatherapie und die anschließende Rekolonisierung mit *E.coli* bzw. Applikation von *E.coli* Lipid A trug zusätzlich zum Verständnis der Rolle von Zellwandbestandteilen gram-negativer Bakterien als TLR4-Liganden an der Immunpathogenese von CED bei.

Die akute Dextransodiumsulfat (DSS) induzierte Colitis ist ein chemisch induziertes Entzündungsmodell. Durch eine 7-tägige orale Applikation von 3-4%igen DSS im Trinkwasser (Rath HC *et al.* 1996, 1999, Siegmund B *et al.* 2001) wird eine Colitis hervorgerufen, die histologisch durch lymphoide Hyperplasie, Infiltration von Entzündungszellen in die Lamina propria, fokaler Kryptenzerstörung mit epithelialen Ulzerationen gekennzeichnet ist (Okayasu I *et al.* 1990, Cooper HS *et al.* 1993, Dieleman LA *et al.* 1998). Diese histopathologischen Defekte entstehen vermutlich durch einen direkten toxischen Epithelschaden sowie eine verstärkte Phagozytose von DSS durch Stimulation von Makrophagen der Lamina propria und einer folglich vermehrten Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen (Okayasu I *et al.* 1990, Ohkusa T *et al.* 1995). Das Zytokinprofil einer Colitis ulcerosa ist durch die Ausschüttung von IL-5 (Fuss IJ *et al.* 1996), IL-15 (Yoshihara K *et al.* 2006) und IFN- γ sowie IL-4 (Dieleman LA *et al.* 1998) charakterisiert, so dass eine unspezifische Aktivierung sowohl der Th1- als auch eine Th2-Immunantwort an deren Auslösung eine entscheidende Rolle spielt. Da das Th1-, nicht jedoch das Th2-Zytokinprofil einen wichtigen Einfluss auf die Chronizität einer Entzündung besitzt (Sartor RB 1994), ist das DSS-Colitis-Modell nach einer 7-tägigen Applikation von DSS als Modell für eine akute Colitis geeignet (Dieleman LA *et al.* 1998). Diese kann z.B. im Rahmen eines akuten Schubes einer Colitis ulcerosa, aber auch bei M.Crohn mit Colonbeteiligung entstehen.

Bei unseren Colitisexperimenten kamen neben TLR-defizienten Tieren auch LBP-defiziente Tiere zum Einsatz, um den Einfluss des Immunsystems und bestimmter Zellwandbestandteile gram-negativer Bakterien auf die Zusammensetzung der Darmflora und deren Beteiligung an der Entzündungsreaktion zu untersuchen.

1.5 Fragestellungen und Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von Komponenten des angeborenen Immunsystems in Form von TLR-Rezeptoren auf CED-assoziierte Entzündungsprozesse im Ileum und im Colon zu untersuchen. Im einzelnen:

1. qualitative und quantitative Charakterisierung der Darmflora im Entzündungsmodell der *T.gondii*-induzierten Ileitis und der DSS-Colitis bei TLR-defizienten Tieren und die Erkennung von Veränderungen der Darmflora während der Entzündungsprozesse im Vergleich zum gesunden Zustand bei TLR-defizienten Tieren.
2. Bestimmung des Einflusses der gesamten Darmflora bzw. definierter Bakterienarten sowie Identifizierung von bakteriellen Zellwandbestandteilen (TLR-Liganden) und deren Einfluss auf die Auslösung von Entzündungsreaktionen im Ileum und Colon.
3. Untersuchung von Therapieansätzen im Entzündungsmodell der *T.gondii*-induzierten Ileitis.

Diese Fragestellungen wurden untersucht, um molekulare Wechselwirkungen zwischen Darmbakterien und TLR-Rezeptoren als Komponenten des angeborenen Immunsystems zu erforschen. Tiere im gesunden Zustand und Tiere mit entzündlichen Darmerkrankungen wurden einerseits miteinander verglichen, um den Einfluss der Darmflora auf entzündliche Prozesse zu analysieren. Andererseits wurden Unterschiede zwischen TLR-defizienten Tieren, Tiere mit genetisch veränderter angeborener Immunität und genetisch unveränderten Wildtyp-Tieren erarbeitet. Die Gabe von definierten Bakterienarten und gereinigten TLR-Liganden ermöglichten die Identifizierung von bakteriellen Molekülen an der Beteiligung der Auslösung von CED in Mausmodellen.

2. Material & Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tab.1 Verwendete Chemikalien und Herstellerangaben

Reagenzien	Hersteller/Zulieferer
Aqua dest.	Abt. Med. Mikrobiologie, Charité, CBF
Ammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Citronensäure	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
DAB- Tabletten	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
DSS 3% (Dextansodiumsulfat)	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
Eisessig	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Entellan [®]	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eosin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd	DAKO, Glostrup, Dänemark
Formalin 37%	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
H ₂ O ₂ (30% Lösung in Wasser)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Halothan	Eurim-Pharm, Mülheim, Deutschland
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Iso-Propanol	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Kaliumaluminiumsulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumjodat	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
N-(1-Naphthyl)ethylendiamindi- hydrochlorid	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
PAP (Peroxidase-Antiperoxidase)	DAKO, Glostrup, Dänemark
PBS	Bio Whittaker, Walkersville, USA
Phenol	Roth, Karlsruhe, Deutschland

RNAlater	Qiagen, Hilden, Deutschland
RPMI 1640	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Sulfanilamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tissue Tec [®]	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Xylol	J.T. Baker, Deventer, USA

2.1.2 Geräte und Materialien

Tab.2 Verwendete Geräte und Materialien

Geräte	Hersteller
Anaerobier-Töpfe	Oxoid, Wesel, Deutschland
Anaerocult [®]	Oxoid, Wesel, Deutschland
Anaerotest [®]	Merck, Darmstadt, Deutschland
15 ml Falcon-Tubes	Nunc, Roskilde, Dänemark
50 ml Falcon-Tubes	Nunc, Roskilde, Dänemark
Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau, D
Cryo-Röhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Deckgläschen	Marienfeld, Lauda-Königshofen, D
Gavage-Sonden	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Glasspatel	Abt. Med. Mikrobiologie, Charité, CBF
Glasspitzen	Abt. Med. Mikrobiologie, Charité, CBF
Glasstäbe	Abt. Med. Mikrobiologie, Charité, CBF
Haemocult [®]	Beckman Coulter/ PCD, Krefeld
Histologiekassetten	Simport, Quebec, Kanada
Kanülen Sterican Größe 10, 12	Braun, Melsungen, Deutschland
Mikroskop	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Mikroskop mit Digitalkamera	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Mikrotiterplatten	ImmunoMaxi, Biochrom, Berlin
Mikrotom	Microm, Walldorf, Deutschland
Mörser	Halbenwanger Berlin, Deutschland
Multipipette	Costar, San Diego, USA
Objektträger	DAKO, Glostrup, Dänemark

Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipetten 10-100 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pistill	Halbenwanger Berlin, Deutschland
Präparierbesteck	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,5 ml	BIOzym, Oldendorf, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Schüttler (Vortex)	Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland
Spritzen 1 ml	Omnifix-F 1 ml, Braun
SpectraFluor Plus	Tecan, San Diego, USA
Sterile Arbeitsbank	Lamina Air Flow Class 100, Gelman Instrument
Sterilisiertes Trockenfutter	ssniff-V1120M-Z, ssniff-V1530R/M-H, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, D
Vakuum Zentrifuge	Heraeus Instruments, Hanau, D
Zellkulturschalen	Nunc, Roskilde, Dänemark

2.1.3 Puffer und Lösungen

Tab.3 verwendete Puffer und Lösungen

Puffer/ Lösungen	Zusammensetzung
Stammlösung der Phoshat gepufferten Salzlösung (PBS)	150,4 g Kaliumhydrogenphosphat · 3H ₂ O, 26 g Natriumhydrogenphosphat · H ₂ O , Aqua dest. auf 800 ml, pH 7.4
PBS-Gebrauchslösung	20 ml PBS-Stammlösung, 480 ml Aqua dest., pH 7.4
Hämalaun (nach Mayer)	1 g Hämatoxylin, 0,2 g Natriumjodat, 50 g Chloralhydrat, 50 g Kaliumaluminiumsulfat, 1 g Citronensäure, Aqua dest. auf 1000 ml
Eosin (nach Mayer)	780 ml Ethanol (96%), 10 ml Phloxinlösung (1%), wässrige Eosinlösung, bestehend aus: 1 g Eosin, 3 Tropfen Eisessig, Aqua dest. auf 100 ml, 10 ml Eisessig
DAB-Lösung	DAB-Tablette in 5 ml PBS, abgedunkelt gelagert

DAB-Arbeitslösung	2 ml des braunen Überstandes der DAB-Lösung in 10 µl 30%igem H ₂ O ₂
H ₂ O ₂ -Lösung	4 ml 30%iges H ₂ O ₂ in 36 ml Aqua dest.
CuSO ₄ -Lösung	100 ml 0,85%iger NaCl-Lösung, 0.5 g Kupfersulfat, lichtgeschützt gelagert

2.1.4 Nährmedien und biochemische Speziesdiagnostik

Tab.4 Nährmedien zur bakteriellen Diagnostik

Nährmedium	Verwendung
Blut-Agar	Universalmedium für aerob wachsende Bakterien
Columbia-Agar	Universalmedium für aerob und anaerob wachsende Bakterien
Endo-Agar	Selektiv für Enterobakterien, enthält Laktose Differenzierung von laktosespaltenden Bakterien (→ rote Kolonien, z.B. <i>E.coli</i>) und laktose-negativen Bakterien (→ helle, transparente Kolonien, z.B. <i>Proteus spp.</i>)
Acid-Agar	Selektiv für aerobe Kokken, Prinzip der Äsculinspaltung, Differenzierung von Enterokokken (schwarz) und Staphylokokken (hell)
Kanamycin- Vancomycin-Agar (KV)	Selektiv für obligat anaerobe Bakterien wie <i>Bacterioides</i> und <i>Prevotella spp.</i>
Rogosa-Agar	Selektiv für <i>Lactobacillus spp.</i>
Hirn-Herz-Glucose- Bouillon (HH-Bouillon)	Flüssiges Anreicherungsmedium
Thioglycolat-Bouillon	Flüssigvollmedium

Sämtliche Nährmedien wurden in der Nährbodenküche der Abteilung für Medizinische Mikrobiologie, Charité, CBF hergestellt.

Biochemische Leistungsprüfung

Api [®] 10 S	bioMérieux [®] SA	Identifizierung von Enterobacteriaceae
Api [®] rapid 32 A	bioMérieux [®] SA	Identifizierung von obligat anaeroben Bakterien

2.1.5 Antimikrobielle Substanzen, Seren und Antikörper

Tab.5 Verwendete Antibiotika, Seren und Antikörper

Antibiotika/ Seren/ AK	Verwendung	Hersteller
Ampicillin	β -Laktam-Antibiotikum, Breitbandantibiotikum	Ratiopharm
Ciprofloxacin	Fluorchinolon, Breitbandantibiotikum v.a.gegen gram-negative Bakterien	Bayer Vital
Imipenem	β -Laktam-Antibiotikum, Breitbandantibiotikum im gram-positiven, gram-negativen, aeroben und anaeroben Bereich	MSD
Metronidazol	Familie der Nitro-5-Imidazole, wirksam gegen Anaerobier und Protozoen	Fresenius
Vancomycin	Glykopeptid-Antibiotikum, wirksam gegen gram-positive Kokken	Cell Pharm
Polymyxin B	Polypeptid, LPS-Antagonist, nicht reabsorbierbar, enges Wirkungsspektrum im gram-negativen Bereich	Euro OTC Pharma GmbH
Penicillin/ Streptomycin	β -Laktam-Antibiotikum gegen gram-positive Aminoglykosid gegen gram-negative Bakterien	Biochrom
Schweineserum	zur Peroxidase-Antiperoxidase-Färbung (PAP)	DAKO
Kaninchenserum	Primär-Antikörper (AK) der PAP-Färbung	AG Liesenfeld, Charité, CBF
Schweine-anti- Kaninchen- Immunglobulin	Sekundär-Antikörper der PAP-Färbung	DAKO
2.1.6 Lipid A		
Lipid A	Lipid A des <i>E.coli</i> -Stammes R515, Nr. ALX-581-200-L002	Axxora Life Sciences Grünberg, Deutschland

2.2 Versuchstiere

2.2.1 Mausstämme

Tab.6 Verwendete Versuchstiere

Maus		Wildtyp	Kreuzungsschema
C57BL/10	(1,2)	C57BL/10 ScSn	Inzucht 100%
TLR4 ^{-/-}	(2)	C57BL/10 ScCr	Inzucht 100%, TLR4-Deletion
TLR2 ^{-/-}	(3)	C57BL/10 ScSn	7x auf C57BL/10 ScSn zurückgekreuzt
TLR2/4 ^{-/-}	(4)	C57BL/10 ScSn/ScCr	7x auf C57BL/10 ScSn/ScN zurückgekreuzt
C57BL/6		C57BL/6J	Inzucht 100%
BALB/c		BALB/c	Inzucht 100%
LBP ^{-/-}		BALB/c	Inzucht 100%
NMRI		NMRI	Inzucht 100%

(1) Poltorak A *et al.* 2001, (2) Poltorak A *et al.* 1998, (3) Werts C *et al.* 2001, (4) Lembo A *et al.* 2003

Sämtliche TLR-defiziente Mäuse mit C57BL/10-Hintergrund sowie LBP-defiziente Mäuse mit BALB/c-Hintergrund wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Marina Freudenberg, MPI für Immunbiologie, Freiburg, zur Verfügung gestellt. Die weitere Zucht der Tiere erfolgte in der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin der Charité, CBF. C57BL/6-, BALB/c- und NMRI-Tiere wurden ebenfalls von den Forschungseinrichtungen für experimentelle Medizin (FEM) der Charité, CBF bereitgestellt.

2.2.2 Vorbereitung der Tiere

Die weitere Aufzucht der Tiere erfolgte in der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin der Charité, CBF. Sämtliche TLR-defizienten Tiere wurden 7 x in den genetischen C57BL/10-Hintergrund zurückgekreuzt. Die Tierexperimente wurden zuvor

von der deutschen Tierschutzkommission geprüft und nach den entsprechenden Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Für die Versuche wurden sowohl männliche als auch weibliche Tiere verwendet. Zu Versuchsbeginn waren die Mäuse 3-5 Monate alt. In den jeweiligen Experimenten fanden Tiere desselben Alters und Geschlechtes Verwendung. Nach Bestimmung ihres jeweiligen Ausgangsgewichtes wurden die Mäuse zur Identifizierung an den Ohren markiert und je nach Gruppe in die entsprechenden Käfige gesetzt.

2.2.3 Art der Tierhaltung

Die Mäuse wurden in den Tierställen der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin der Charité, CBF unter speziellen pathogenfreien Bedingungen (SPF) gezüchtet und gehalten.

Je nach Gruppengröße wurden Makrolonkäfige Typ II oder III benutzt. Einmal wöchentlich erhielten die Tiere sterilisiertes Trockenfutter (ssniff-V1120M-Z, ssniff-V1530R/M-H in Pelletform; ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und frisches Leitungswasser ad libitum. Eine Maus fraß durchschnittlich 3-6 g und trank ca. 5-7 ml pro Tag. Einstreu (ssniff $\frac{3}{4}$ Faser, jeluxyl 300/500) wurde bei einer Temperatur von 121°C 20 Minuten lang autoklaviert und mit den Käfigen einmal wöchentlich gewechselt. Das Klima in den Zuchträumen war standardisiert. Die relative Luftfeuchtigkeit betrug 55-60% bei einer Temperatur von 21°C. Der Lichtrhythmus wechselte automatisch im 12-Stunden-Takt (Helligkeitsphase von 8-20 Uhr, Dunkelphase von 20-8 Uhr).

Es befanden sich 3 bis maximal 10 Tiere desselben Geschlechts in einem Käfig entsprechender Größe (Typ II oder III).

2.3 Tierversuche

2.3.1 Übersicht sämtlicher Methoden

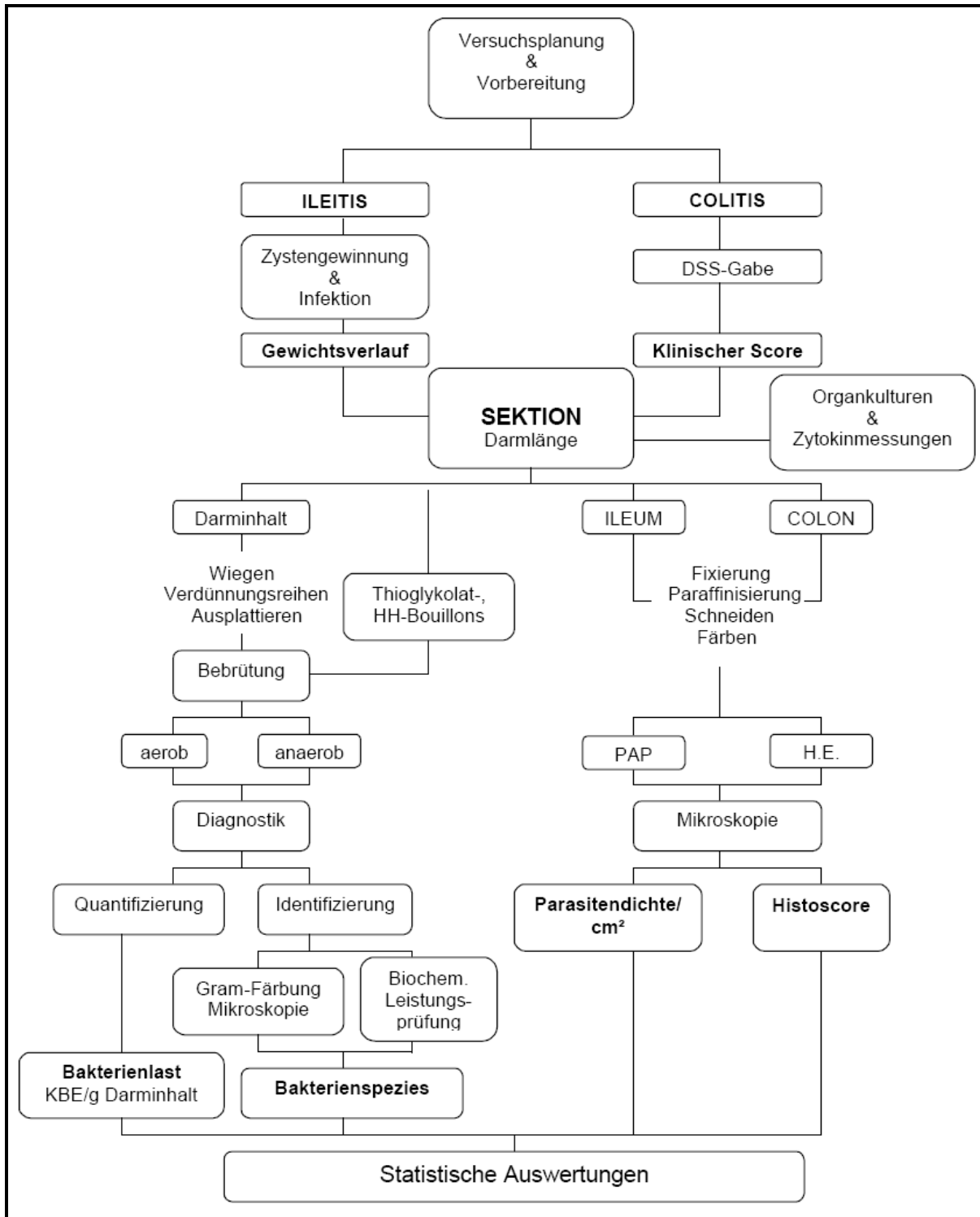


Abbildung 7: Übersicht sämtlicher Methoden zur Versuchsvorbereitung, Probenentnahme und Probenaufarbeitung sowie deren Auswertung bei *T.gondii*-induzierter Ileitis und DSS-Colitis.

2.3.2 Ileitis-Induktion durch orale Infektion mit *T. gondii*

Die *T.gondii*-induzierte Ileitis im Mausmodell entspricht immunpathogenetisch der entzündlichen Immunantwort eines akuten Schubes einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung im Ileum des Menschen (Liesenfeld O 2002).

Die Versuchstiere des Ileitismodells wurden mit dem Parasiten *Toxoplasma gondii* vom Stamm ME49, einem für die Maus avirulenten und zystenbildenden Stamm (Typ II), peroral infiziert. Dieser Stamm wurde uns freundlicherweise von Prof. J. Remington der Stanford University (CA, USA) zur Verfügung gestellt.

Die benötigten *T. gondii*-Zysten zur Ileitis-Induktion wurden aus homogenisierten Gehirnen sogenannter Bank-Mäuse gewonnen. Bei Bank-Mäusen handelte es sich um NMRI-Mäuse, die 2-3 Monate zuvor intraperitoneal mit 10 Zysten *T.gondii* des ME49-Stammes infiziert worden waren. Die Mäuse dieses Stammes entwickelten eine chronisch-progrediente Encephalitis, bei der die Parasiten in Form von Bradyzoiten lebenslang in Zysten im Gehirn des Wirtes persistieren (Liesenfeld O 2002, Montoya JG *et al.* 2004). Am Tag der Infektion zur Ileitis-Induktion der entsprechenden Versuchstiere wurden Gehirne von NMRI-Tieren unter sterilen Bedingungen entnommen, mit einem Pistill in einem Mörser zerrieben und in sterilem PBS suspendiert. Anschließend wurde die Anzahl der Zysten in der Gehirnsuspension mikroskopisch bestimmt und auf die gewünschte Zielgröße von 100 Zysten in 0,3 ml PBS bei einem pH von 7,4 angepasst. TLR2-, TLR4-, TLR2/TLR4- defiziente Mäuse sowie C57BL/10- und C57BL/6-Tiere wurden jeweils mit 100 Zysten *T.gondii* in 0,3 ml PBS oral per Gavage infiziert.

2.3.3 Colitis-Induktion mit Dextransodiumsulfat

Die Dextransodiumsulfat-induzierte Colitis bei Nagetieren ähnelt klinisch und immunpathologisch einer akuten Colitis bei CED des Menschen (Okayasu I *et al.* 1990).

Um eine Colitis zu induzieren, erhielten TLR2-, TLR4-, TLR2/4- und LBP- defiziente Tiere sowie C57BL/10- und BALB/c-Tiere im Trinkwasser gelöstes 3,5%iges DSS (40.000 kDa) täglich ad libitum (Okayasu I *et al.* 1990). Je nach klinischem Zustand der Tiere wurde DSS insgesamt 6-7 Tage lang verabreicht und jeden dritten Tag durch frisches DSS ersetzt. 24-48 Stunden vor der Sektion erhielten die Tiere Trinkwasser ohne DSS. Die Trinkmengen wurden täglich kontrolliert. Die Probenentnahme fand am Tag 7-8 statt.

2.3.4 Gewichtsbestimmung und klinischer „Score“

Die klinischen Merkmale einer akuten Colitis bei der Maus sind durch Gewichtsverlust, Diarrhö und rektale Blutungen gekennzeichnet (Okayasu I *et al.* 1990).

Bei sämtlichen Tieren wurde vor Induktion der Entzündung das Ausgangsgewicht bestimmt. Post inductionem wurden die Mäuse täglich gewogen. Anhand der Ohrmarkierungen konnte das Gewicht eindeutig den jeweiligen Mäusen zugeordnet werden.

Für die Tiere mit induzierter DSS-Colitis wurde ein klinischer Score (Siegmond B *et al.* 2001) erstellt, bei dem folgende Parameter täglich zu definierten Zeitpunkten (morgens) überprüft wurden:

Klinischer „Score“: (Britta Siegmund *et al.* 2001)

- **1. Gewichtsverlust:**

0-5%	0
5-10%	1
10-15%	2
15-20%	3
> 20%	4

- **2. Hämocult:**

negativ	0
positiv	2
makroskopisch sichtbar	4

- **3. Stuhlkonsistenz:**

geformt	0
weich	2
wässrig/ am Anus klebend	4

Der klinischer „Score“ (maximale Punktzahl von 12) wurde täglich anhand des Gewichtsverlustes, dem Nachweis von okkultem Blut im Stuhl und der Stuhlkonsistenz jeder einzelnen Maus neu erhoben. Der Gewichtsverlust wurde in Prozent angegeben und folgendermaßen errechnet:

Gewichtsverlust = $(\text{Ausgangsgewicht an Tag 0} - \text{Gewicht an Tag xy}) \times 100 / \text{Ausgangsgewicht an Tag 0}$.

Ebenso wurde das Allgemeinbefinden der Mäuse wie struppiges Fell, gekrümmte Schonhaltung, Bewegungseinschränkungen und Separation von anderen Tieren deskriptiv dokumentiert.

2.3.5 Probenentnahme und Bestimmung der Darmlängen bei Ileitis und Colitis

Der Zeitpunkt der Sektion wurde von dem klinischen Zustand der C57BL/10-Wildtypen beeinflusst und fand an Tag 7 oder 8 post inductionem statt. Als Richtwert galt dabei ein Gewichtsverlust von ca. 15% der Wildtyp-Kontrollen.

Am Tag der Sektion wurden die Tiere mit dem Inhalationsnarkotikum Halothan[®] getötet. Die Bauchdecke der Mäuse wurde anschließend mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Die Tiere wurden auf einer Korkplatte fixiert. Das Fell wurde unter sterilen Bedingungen an der Bauchseite eröffnet, gefolgt von einer parasternalen kardialen Punktion. Zwei Tropfen des Herzblutes wurden zur Anlage einer Blutkultur unter sterilen Bedingungen in eine Hirnherz-Bouillon gegeben, um eine potentielle Translokation von lebenden Bakterien ins Blut nachzuweisen. Der Rest des kardialen Blutes wurde zur späteren Gewinnung von Serum in ein Eppendorfgefäß überführt, welches zur Konzentrationsbestimmung von Zytokinen diente. Das Peritoneum wurde durch einen Y-Schnitt weiträumig eröffnet, und es wurden Gewebeproben von mesenterialen (MLN) bzw. coecalen Lymphknoten, Milz und Leber unter sterilen Bedingungen für Organkulturen zur Konzentrationsbestimmungen von Zytokinen entnommen. Ein Drittel der Milz und 1-2 mesenteriale Lymphknoten wurden zusätzlich jeweils in Thioglykolat-Bouillons gegeben, um eine mögliche Translokation von Bakterien aus dem Darm in das entsprechende Organ zu untersuchen. Es folgte die Freipräparation des Darms und die Gewinnung bzw. Bearbeitung von Proben für histologische, mikrobiologische, molekularbiologische und immunologische Analysen (Abb.8).

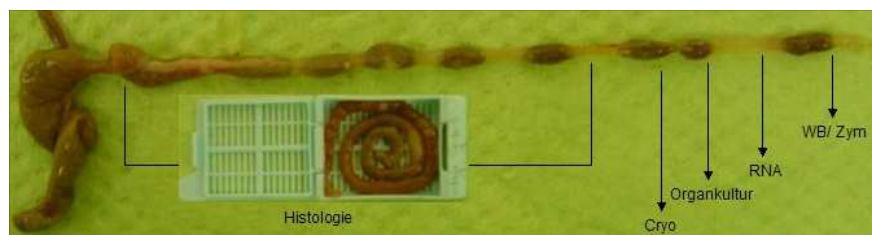


Abbildung 8: Probenentnahme der Darmabschnitte bei DSS-Colitis

Cryo: Gefrierschnitte zur Immunhistologie, RNA: RNA-Expression, WB/Zym: Westernblot/ Zymologie

Zur mikrobiologischen Analyse der Darmflora von Ileum und Colon wurde aus dem jeweils terminalen Abschnitt (1cm) der Darminhalt in ein mit 1,5 ml sterilen PBS gefülltes Eppendorfgefäß überführt und suspendiert. Dieses Probengefäß wurde auf Eis gelagert und nach der Sektion zur bakteriellen Florenanalyse sofort weiterverarbeitet.

Desweiteren wurden ca. 2 cm Colon bzw. Ileum in einem Eppendorfgefäß für Westernblots bzw. Zymographie in flüssigem Stickstoff schockgefroren, 1 cm mit PBS gespülter Darmabschnitt in ein mit RNA-later[®] gefülltes Eppendorfgefäß zur Bestimmung von mRNA-Expressionen bei –20°C eingefroren und 0,5 cm des jeweiligen Darmabschnittes mit Tissue Tec[®] auf dem Boden eines Cryo-Röhrchens bedeckt und für spätere Gefrierschnitte der Immunhistologie ebenfalls schockgefroren und bei –80°C gelagert. Der verbleibende Dünn- bzw. Dickdarm wurde mit dem distalen Ende nach innen in eine Histologiekassette gerollt und in 5% igem Formalin fixiert, um anschließend HE- und PAP-Färbungen zur Bestimmung des Ausmaßes der Darmpathologie und der Parasitenlast durchführen zu können.

Als ein weiterer Parameter zur Bestimmung des Ausmaßes der Darmpathologie wurde die relative Verkürzung der Darmlänge festgelegt (Heimesaat MM *et al.* 2006). Hierfür wurde das Ileum vom Magenausgang bis zum Caecum bzw. das Colon vom Caecumende bis zum Anus mit einem Lineal gemessen und die relative Verkürzung des jeweiligen Darmabschnittes folgendermaßen errechnet:

Relative Verkürzung der Darmlänge = $(\text{Mittelwert der Darmlänge am Tag 0} - \text{Mittelwert der Darmlänge am Tag 7/8 p.i. nach DSS-Gabe}) \times 100 / \text{Mittelwert der Darmlänge an Tag 0}$. Als Referenz für die Bestimmung der Darmlängen an Tag 0 dienten naive Kontrolltiere desselben Geschlechts und desselben Genotypes (negative Kontrolle). Die Ergebnisse wurden in Prozent angegeben.

Jede Gruppe bestand aus 5 Mäusen. Sämtliche Experimente wurden dreimal durchgeführt.

2.4 Aufbereitung der Asservate

2.4.1 Beurteilung der Histopathologie in Ileum und Colon

Zur histologischen Beurteilung der Pathologie in Ileum und Colon wurde der in 5%igem Formalin fixierte Darmabschnitt nach 24 Stunden im Institut für Pathologie der Charité, CBF in eine absteigende Alkoholreihe eingelegt, um das Formalin zu entfernen. Am folgenden Tag wurden die Organproben in Paraffin eingebettet, mit dem Microtom 5 µm dünne Schnitte angefertigt, die mindestens 1 Stunde lang auf Objektträgern bei 50°C fixiert wurden. Die Schnitte wurden nach Hämatoxylin-Eosin (HE) und Peroxidase-Antiperoxidase-Färbung (PAP) zur weiteren Beurteilung gefärbt.

2.4.1.1 Hämtoxylin-Eosin-Färbung

Zur Färbung der jeweiligen Gewebekomponenten bindet das positiv geladene Hämtoxylin an die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA (Kernfärbung) und das negativ geladene Eosin an die positiv geladenen Proteine im Gewebe (Plasmafärbung). Dafür wurden die Schnitte in die entsprechenden Lösungen für die jeweils angegebene Zeit getaucht.

Absteigende Alkoholreihe (Entparaffinisierung)

- 2 x Xylol je 5 min
- Isopropanol 5 min
- 96% Ethanol 5 min
- 80% Ethanol 5 min
- 70% Ethanol 5 min

Hämatoxylin 3 min

Spülen in Leitungswasser (Bläuen) 6 min

Eosin 4 min

Kurzes Spülen in Leitungswasser

Aufsteigende Alkoholreihe (Entwässerung)

- 70% Ethanol 5 min
- 80% Ethanol 5 min
- 96% Ethanol 5 min
- Isopropanol 5 min
- 2 x Xylol je 5 min

Eindecken der Objektträger mit Entellan®.

2.4.1.2 Histologische Auswertung

Die HE-gefärbten Schnitte wurden im Lichtmikroskop bei 200facher Vergrößerung von zwei unabhängigen Gutachtern untersucht und einem standardisierten histologischen Punktesystem von null bis sechs Punkten zugeordnet.

Histologischer Score für Ileitis: (Heimesaat MM *et al.* 2006)

- | | |
|---|------------------------------------|
| 0 | normal |
| 1 | ödematöse Veränderungen der Zotten |

- 2 intraluminales Transsudat, Epithelschicht intakt
- 3 intraluminales Transsudat mit Abschilferung von Epithelzellen
- 4 Beginnende Auflösung der Epithelschicht
- 5 Zerstörung der Mukosa, Nekrosen (< 50% des Ileums)
- 6 transmurale Zerstörung der Darmwand, Nekrosen (> 50% des Ileums)

Histologischer Score für Colitis: (Siegmond B *et al.* 2001)

- 0 normal
- 1 diskrete fokale lymphoepitheliale Läsionen
- 2 Einwanderung von Entzündungszellen inklusive neutrophiler Granulozyten in die Lamina propria
- 3 Erosionen und Ulzera der Mukosa
- 4 ausgedehnte, tiefe Zerstörung der Mukosa
- 5 Einwanderung von Entzündungszellen bis in die Submukosa
- 6 transmurale Zerstörung der Darmwand mit ausgeprägter Infiltration von Entzündungszellen, Nekrose

Repräsentative Ausschnitte wurden mit der Mikroskopanlage (Axiostar, Zeiss) digital fotografiert und bei Bedarf mit der EasyBase[®]-Software nachbearbeitet.

2.4.2 Beurteilung der Parasitenlast

Die Beurteilung der Dissemination von *T. gondii* im Ileum der untersuchten Tiergruppen erfolgte an immunhistochemisch gefärbten Gewebeproben.

Zum Nachweis von *T. gondii*-Tachyzoiten oder *T. gondii*-Antigen im Darmgewebe diente die Peroxidase-Antiperoxidase-Färbung (PAP). Die Bestimmung der Parasitenzahl wurde von zwei unabhängigen Gutachtern lichtmikroskopisch bei 400facher Vergrößerung an einem beliebig ausgewählten 1 cm langen distalen und proximalen Darmabschnitt durchgeführt. Es wurden parasitenhaltige Vakuolen pro Zentimeter Darmrolle gemittelt (Gesamtmittelwert aus distalen und proximalen Mittelwerten pro cm).

2.4.2.1 Peroxidase-Antiperoxidase-Färbung (PAP)

Die PAP-Färbung ist eine immunhistochemische Färbung und diente uns zum Nachweis von *T. gondii*-Tachyzoiten oder *T.gondii*-Antigenen in Form kleiner brauner intrazellulärer Strukturen in zytoplasmatischen Vakuolen im Darmgewebe. Sie erfolgte an zwei aufeinander folgenden Tagen. Es wurden stets Schnitte als Positiv- und Negativ-Kontrollen mitgeführt.

Die 5 µm dünnen, in Paraffin gebetteten Schnitte wurden in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffinisiert und in einer 3%igen H₂O₂-Lösung 20 Minuten lang inkubiert, so dass die endogene Peroxidaseaktivität im Gewebe blockiert wurde. Die Schnitte wurden mehrmals mit Aqua dest. gespült und mit PBS (pH 7,4) gewaschen. Nach einer 30-minütigen Inkubation der Schnitte bei Raumtemperatur mit Schweineserum der Verdünnung 1:10 wurde ein polyklonaler Primär-Antikörper gegen *T. gondii* auf jeden Schnitt aufgetragen und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Der Primär-Antikörper wurde zuvor aus dem Serum eines mit *T.gondii*-infizierten Kaninchens gewonnen und anschließend 1:2000 verdünnt. Am folgenden Tag wurden die Schnitte zunächst mit PBS gespült und anschließend wurde der Sekundär-Antikörper in einer 1:100 Verdünnung hinzugefügt. Als Sekundär-Antikörper diente ein Schwein-Kaninchen-Immunglobulin, welches den Kaninchen-Primär-Antikörper bindet. Die Schnitte wurden unter Lichtschutz 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Spülen mit PBS wurde das Enzym Peroxidase-Antiperoxidase (PAP) in einer 1:100 Verdünnung hinzugegeben und wiederum 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließend für 5 Minuten aufgetragene lichtempfindliche Diaminobenzidin-Lösung (DAB) diente als farbstoffbildender Elektronen-spendender Katalysator. Anhand der positiven Kontrollschnitte wurde die intrazelluläre Braunfärbung der Parasiten mikroskopisch überprüft und gegebenenfalls die Inkubationszeit der übrigen Schnitte angepasst. Es folgten eine 7-minütige Inkubation in einer Kupfer-Sulfat-Lösung und das Spülen unter fließendem Wasser mit dem Ziel, das DAB-Produkt abzudunkeln. Zur Gegenfärbung wurden die Schnitte 5 Sekunden in Hämatoxylin getaucht, unter fließendem Wasser gespült und 15 Sekunden in Ammoniaklösung gebläut. Zum Schluss wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und die Objektträger mit Entellan[®] eingedeckt.

2.4.3 Kulturelle Analysen der Darmflora

Der entnommene Darminhalt des Ileums bzw. Colons wurde nach der Sektion gewogen. Dieses Gewicht floss später in die Berechnungen der Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) pro g Darminhalt mit ein.

Nach einer Resuspension des Darminhaltes in PBS wurde für jede zu untersuchende Probe eine dreistufige Verdünnungsreihe von 1:100, 1:10 000 und 1:1 000 000 mit steriler physiologischer Natriumchlorid (NaCl)-Lösung erstellt. Diese Verdünnungsreihe erweiterte das Spektrum der Auswertung, da sonst sowohl bei Überwucherung als auch bei Minderbewachung der Nährmedien die quantitative und morphologische Beurteilung der Bakterienflora erschwert sein würde. Gleichzeitig konnte anhand des Bakterienwachstums der jeweiligen Verdünnungsreihe eine Korrelation der Keimzahlen überprüft werden und Kontaminationen ausgeschlossen werden. Bei zu erwartender geringer Bakterienanzahl unterhalb der Nachweisgrenze wurde zusätzlich unverdünnter Darminhalt ausplattiert bzw. in Anreicherungsbouillons gegeben und diese nach Trübung der Bouillons auf festen Nährmedien ausgestrichen.

2.4.3.1 Anzucht (aerob/anaerob)

100 µl jeder Probe der jeweiligen Verdünnung wurden auf verschiedenen Nährmedien mit sterilen Glasspateln ausplattiert und sowohl aerob für 24-48 Stunden als auch anaerob für mindestens 72 Stunden bei 37°C kultiviert. Die anaeroben Agarplatten wurden in Anaerobier-Töpfen mit sauerstoffbindenden Anaerocult®A bebrütet.

Zur quantitativen Bestimmung der Gesamtbakterienlast wurde ein Universalmedium wie Blut- oder Columbia-Agar verwendet. Die Gesamtbakterienlast wurde nach aerober und anaerober Bebrütung durch Zählung der KBE und Errechnung der Gesamtzahl pro Gramm Darminhalt durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor ermittelt. Folgendem Schema entsprechend galt:

Kolonie-bildende Einheiten	Anzahl der Bakterien/ml
• 1 KBE	10^0
• 2 – 10 KBE	10^{1-2}
• 10 – 100 KBE	10^{2-3}
• 100 – 1000 KBE	10^{3-4}
• 1000 – 10000 KBE	10^{4-5}

- beginnend konfluierend 10^{5-6}
- konfluierend 10^6
- Bakterienrasen, Überwucherung $>10^6$

Zur Identifizierung der unterschiedlichen Koloniemorphologien und zur Vervollständigung der quantitativen Analysen wurden Selektivplatten herangezogen. Endo-Agar wurde zur Identifizierung von Enterobakterien verwendet. Gram-positive Kokken (z.B. Enterokokken, vergrünende Streptokokken, Staphylokokken) wurden auf Acid-Agar gezüchtet, Laktobazillen auf Rogosa-Agar. Kanamycin-Vancomycin-Agar wurde als selektives Kulturmedium zur Anzucht obligat anaerober Bakterien verwendet. Die Identifizierung der Morphotypen erfolgte nach aerober und anaerober Bebrütung anhand des Wachstumsverhaltens, der Gramfärbung und der anschließenden biochemischen Leistungsprüfung von Reinkulturen.

Um obligat anaerobe Bakterien zu bestätigen, wurde eine Einzelkolonie der jeweiligen Spezies nach der anaeroben Kultivierung von der anaeroben KV-Platte isoliert und auf aeroben sowie anaeroben Columbiaplatten subkultiviert. Bei ausschließlicher Aufzucht auf anaeroben Columbia-Platten nach mindestens 48 Stunden Bebrütung wurde das Isolat als obligat anaerob wachsendes Bakterium klassifiziert.

Eine weitere Identifizierung der jeweiligen Bakterienisolate erfolgte durch eine Gram-Färbung, wobei die Bakterien anschließend mikroskopisch bei 1000facher Vergrößerung in gram-positiv, gram-negativ und in Kokken bzw. Stäbchen unterteilt wurden. Hierzu wurden repräsentative Einzelkolonien von den Agar-Platten in einen Tropfen NaCl auf einen Objektträger transferiert und hitzefixiert. Die Gram-Färbung lief folgendermaßen ab:

Gram – Färbung

- Victoria-Blau 2 min → Färbung
- Lugol-Beize 2 min → Beizung
- Chininalkohol 1 % 10 - 15 s → Entfärbung
- Safranin 0,5 % 1 min → Gegenfärbung

Nach jedem Schritt wurden die Objektträger unter Leitungswasser gespült.

2.4.3.2 Biochemische Speziesdiagnostik

Die biochemische Leistungsprüfung dient zur Bestätigung der bereits durch kulturelle Anzucht und Gram-Färbung identifizierten Bakterien. Diese erfolgte mittels des Api[®]10 S Systems zur Identifizierung von gram-negativen Stäbchen (Enterobakterien wie z.B. *E.coli*, *Proteus spp.*) und des Api[®]rapid 32 A Systems zur Identifizierung von obligat anaeroben Bakterien (wie z.B. *Bacteroides spp.*, *Prevotella spp.*).

Weiterhin wurden fragwürdige Ergebnisse der Identifizierung der Bakterienspezies von den Kollegen der Med. Mikrobiologie Charité CCM auf molekulargenetischer Ebene mittels Sequenzierung untersucht und mit den kulturellen Ergebnissen verglichen.

2.4.4 Translokation von Bakterien

Zur Untersuchung einer Translokation von lebenden Bakterien der Darmflora in Organe wie mesenteriale bzw. coecale Lymphknoten, Milz und Leber wurden während der Probenahme unter sterilen Bedingungen ein Teil des jeweiligen Organs in je eine Thioglykolat-Bouillon gegeben. Zum Ausschluss einer Bakteriämie wurde kardiales Vollblut in einer Hirn-Herz-Bouillon angereichert. Nach einer Inkubation bei 37°C wurden die Flüssigmedien im Falle einer Trübung nach 2-3 Tagen auf Festnährmedien mit einem sterilen Tupfer zur aeroben und anaeroben Diagnostik ausgestrichen. Bei fehlender Trübung erfolgte nach 7 Tagen ein Endausstrich auf Columbia-Agar mit anschließender 2-3 tägiger aerober und anaerober Bebrütung.

2.4.5 Konzentrationsbestimmungen von Zytokinen

Während der Probenentnahme wurden 1 cm lange Ileum- bzw. Colonproben mit PBS gespült, längs aufgeschnitten und schließlich in 0,5 ml RPMI 1640 Lösung unter Zugabe von 1% Penicillin/Streptomycin in 24-Flachboden-Platten kultiviert. Nach einer Inkubation von 18-24 Stunden bei 37°C wurden die Kulturüberstände abpipettiert und bis zur weiteren Analyse bei – 80°C gelagert.

Die Konzentrationen von Interferon-gamma (IFN- γ) wurden mittels „Sandwich“-Verfahren, einer ELISA-Technik (enzyme linked immunosorbent assay), bestimmt. Dieses immunologische Nachweisverfahren basiert auf einer spezifischen Antikörper-Antigen-Reaktion. Der „Coating“-Antikörper wurde an eine Mikrotiterplatte adhärirt und mit den nachzuweisenden Antigenen in den Kulturüberständen inkubiert. Nachdem die an der Platte gekoppelten Antikörper die in der Probe vorhandenen Antigene gebunden

hatten, wurde ein zweiter, an Peroxidase-gekoppelter Antikörper hinzugefügt, so dass ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex entstand. Nach Zugabe eines Chromogens wurde die Absorption der Lösung photometrisch bei 450 nm gemessen.

Die Stickstoffmonoxid-Konzentrationen (NO) wurden mit der Griess-Reaktion (Griess JP 1879, Tsikas D 2007) ermittelt. Hierfür wurden 50 µl Überstand jeder Probe mit 1,5%igem Sulfanilamid in 1 ml HCl und 0,15% N-(1-naphthyl) ethyldiamindihydrochlorid (Griess-Reagenz) gemischt.

Die Griess-Reaktion beruht auf der Umsetzung von Griess-Reagenz mit Nitrit in den Überständen zu einem Diazofarbstoff, dessen Absorption nach 10 Minuten im sichtbaren Bereich bei 540 nm photometrisch bestimmt wurde. Die Absorption ist proportional zur NO-Konzentration, welche über eine Standardkurve errechnet wurde.

Alle Messwerte wurden auf den Gesamtproteingehalt bzw. auf Organgewichte bezogen.

2.4.6 Generierung gnotobiotischer Mäuse

Um gnotobiotische Mäuse zu gewinnen, erhielten die Tiere zur Eradikation der Darmflora einen Antibiotika-Cocktail nach einem Standardprotokoll (Heimesaat MM *et al.* 2006) über einen Zeitraum von 6-8 Wochen *ad libitum* im Trinkwasser. Dieser Antibiotika-Cocktail bestand aus 1 g/l Ampicillin, 500 mg/l Vancomycin, 200 mg/l Ciprofloxacin, 250 mg/l Imipenem und 1 g/l Metronidazol. Jeglicher Umgang mit den Tieren erfolgte unter streng sterilen Kautelen. Zur Kontrolle des Kolonisationsstatus wurden wöchentlich und während der Sektion Stuhlproben entnommen. Das Bakterienwachstum dieser Stuhlproben wurden nach einer 7-tägigen Inkubation bei 37°C in Hirn-Herz-Bouillon und Thioglykonat-Bouillon anhand der Trübung beobachtet. Bei sichtbarer Trübung wurden Bakterien dieser Proben auf festen Nährböden unter aeroben und anaeroben Bedingungen gezüchtet und mikrobiologisch und biochemisch identifiziert. Die Tiere, bei denen an drei aufeinander folgenden Wochen keine kultivierbare Darmflora mehr nachgewiesen werden konnten, galten als frei von kultivierbaren Bakterien (gnotobiotisch) und wurden, je nach Protokoll, mit *E.coli* rekolonisiert oder mit *E.coli* Lipid A behandelt.

2.4.6.1 Rekolonisierung mit *E.coli*

Gnotobiotische C57BL/10 Wildtyp- sowie TLR2-, TLR4- und TLR2/4- defiziente Tiere wurden mit einem *E.coli*-Isolat aus einer zuvor an Ileitis erkrankten C57BL/6-Maus peroral rekolonisiert. Vier Tage vor den Rekolonisierungsexperimenten wurden die Antibiotika durch steriles Trinkwasser ersetzt. Die *E.coli*-Isolate wurden aus Stuhlproben von fünf C57BL/6-Tieren mit akuter Ileitis isoliert, die 7 Tagen zuvor peroral mit *T.gondii* infiziert wurden. Nachfolgend wurden die *E.coli*-Isolate biochemisch und molekulargenetisch eindeutig identifiziert. Nach einer Anreicherung in Hirn-Herz-Bouillons und einer Einstellung auf einen McFarland-Trübungswert von sechs (einer Bakterienlast von 10^9 - 10^{10} KBE/ml entsprechend), wurden die Suspensionen zentrifugiert (4000U/min, 10 min, bei Raumtempertatur), in sterilem PBS gewaschen und anschließend wurde das Pellet in 5 ml PBS resuspendiert.

Jedes Tier erhielt an drei aufeinander folgenden Tagen 0,3 ml der *E.coli*-Suspension, die mittels peroraler Gavage zugeführt wurde. Vier Tage nach der letzten Applikation wurde jedes Tier mit 100 Zysten *T.gondii* zur Ileitis-Induktion peroral infiziert.

2.4.6.2 Applikation von *E.coli* Lipid A

Durch die Behandlung von gnotobiotischen Wildtypen und TLR4-defizienten Mäusen mit synthetischem Lipid A sollte die Rolle des Lipopolysaccharids, einem Zellwandbestandteil gram-negativer Stäbchenbakterien, als möglicher Auslöser einer pathologischen Immunreaktion bei *T.gondii*-Ileitis untersucht werden. Die gereinigte Lipid-A-Fraktion des *E.coli*-LPS bindet hochspezifisch an TLR4 (Akira S 2007, Jerala R 2007). Gnotobiotische C57BL/10- und TLR4-defiziente Tiere wurden sechs Tage vor bis neun Tage nach der *T.gondii*-Infektion mit 15 µl/ml gereinigtem Lipid A des *E.coli*-Stammes R515 im autoklavierten Trinkwasser ad libitum behandelt.

2.4.7 Polymyxin B-Behandlung von Mäusen mit Ileitis

Den zuvor mit *T. gondii*-infizierten C57BL/6-Tieren wurde zur prophylaktischen und therapeutischen Behandlung der Ileitis der nicht resorbierbare LPS-Antagonist Polymyxin B (Euro OTC Pharma, Kamen, Deutschland) verabreicht. Die Mäuse erhielten eine Dosierung von 50 mg/kg KG/Tag in PBS zweimal täglich peroral über Gavage. Polymyxin B wurde 24 Stunden vor und nach der Infektion mit *T. gondii* abgesetzt, um jegliche Wechselwirkungen zwischen den Parasiten und dem

Antibiotikum zu vermeiden. Die prophylaktische Polymyxin-Therapie begann fünf Tage vor der Parasitengabe, die therapeutische Behandlung fing fünf Tage nach der Parasitengabe an und wurde bis zum Tag 8 p.i., dem Zeitpunkt der Sektion, fortgeführt.

2.5 Statistische Methoden

Die statistische Signifikanzberechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen erfolgte mit dem Students t-Test und dem Mann-Whitney-U-Test. Die Signifikanzniveaus p wurden jeweils neu festgelegt und mit Sternen gekennzeichnet: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$.

Die Überlebenszeiten wurden anhand von Kaplan-Meier-Kurven verdeutlicht.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss von TLR-Defizienz auf die Darmflora bei *T. gondii*-induzierter Ileitis

Aufbauend auf vorangegangene Untersuchungen, in denen ein TLR-abhängiger Unterschied im Hinblick auf die Zusammensetzung der Darmflora im Ileum gesunder Tiere nicht nachgewiesen werden konnte, wurde in der vorliegenden Arbeit eine mögliche TLR-Abhängigkeit der Darmflorazusammensetzung im Modell der akuten Ileitis überprüft. Im gesunden Zustand wurden gram-positive Bakterien der Gattungen *Laktobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* und *Clostridium* identifiziert. Der Anteil aerober gram-negativer Stäbchen, die als *E.coli*-Spezies identifiziert wurden, betrug $7,2 \pm 9,0 \times 10^4$ KBE/g luminalen Ileuminhaltes. Der Anteil obligat anaerober gram-negativer Stäbchen, identifiziert als *Bacteroides/Prevotella spp.*, befand sich unterhalb der Nachweisgrenze. Es wurde eine Gesamtbakterienlast des Darminhaltes von $1,6 \pm 0,8 \times 10^9$ KBE/g Darminhalt an Tag 0 bei gesunden Tieren ermittelt. Anschließend wurden die Bakterienfloren gesunder und an akuter Ileitis erkrankter Wildtypen miteinander verglichen. Die Ergebnisse dieser komplexen kulturellen Florenanalyse der Wildtyp-Tiere sind durch eine Verminderung der Diversität der Flora im entzündeten Zustand des Dünndarmes gekennzeichnet. Ein signifikanter Anstieg gram-negativer Bakterien wie *E.coli* um ca. 7 bzw. *Bacteroides/Prevotella spp.* um ca. 11 logarithmische Stufen ging mit einer signifikanten Verringerung der Anzahl aerober (Laktobazillen) von $p < 0,05$ und anaerober gram-positiver Stäbchen (*Clostridium/Eubacterium spp.*) unterhalb der Nachweisgrenze mit $p < 0,001$ im entzündeten Zustand einher (Abb.9).

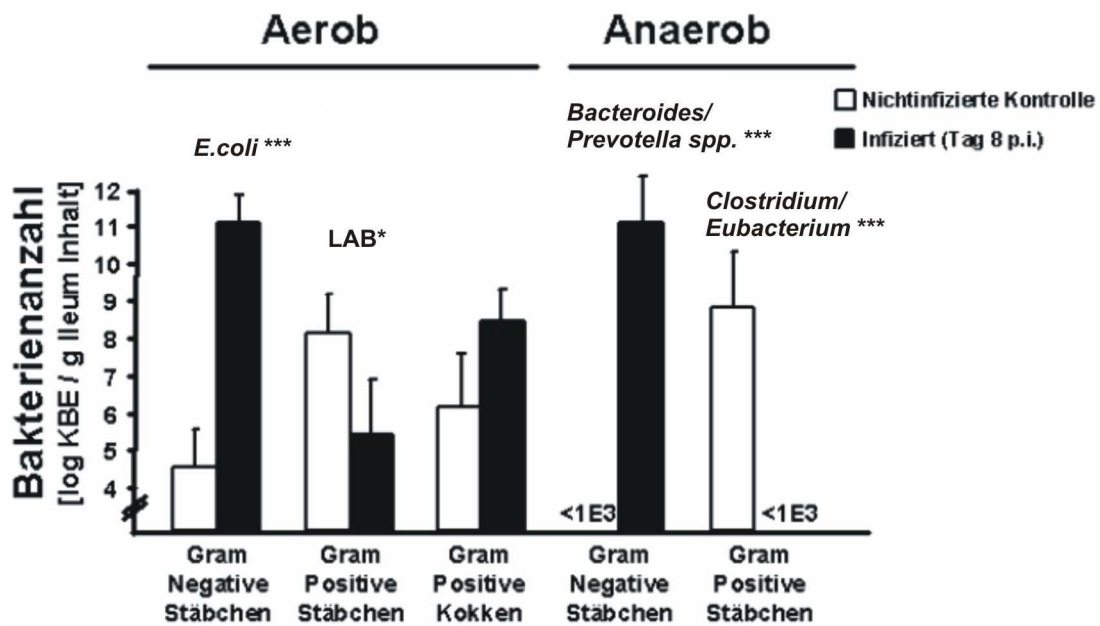


Abbildung 9. Quantifizierung von kultivierbaren Bakterien im Ileum gesunder und erkrankter C57BL/6-Wildtypen. Die Bakterienanzahl des Darminhaltes von gesunden (weißer Balken) und von an Tag 8 mit *T. gondii* infizierten Tieren (schwarzer Balken) wurde anhand von Kultivierungen ermittelt. Durch biochemische Leistungsprüfung wurden *E.coli*, Laktobazillen (LAB), *Bacteroides/Prevotella spp.* und *Clostridium/Eubacterium spp.* identifiziert. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Experimenten mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelt (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$ im Vergleich zu Bakterien in gesunden Mäusen).

Um den Einfluss der TLR-Defizienz auf die Zusammensetzung der Darmflora einerseits und das Ausmaß der Entzündungsreaktionen bei Ileitis andererseits zu prüfen, wurde die Bakterienvielfalt des Ileums bei C57BL/10-Wildtyp-Mäusen und TLR-defizienten Mäusen mit *T.gondii*-Ileitis untersucht. Das Modell der *T.gondii*-induzierten Ileitis wurde ursprünglich für C57BL/6-Mäuse etabliert (Liesenfeld O. 2002). Da TLR-defiziente Tiere einen C57BL/10 genetischen Hintergrund besitzen, zeigten vergleichende Vorversuche, dass C57BL/10-Tiere nach einer *T.gondii*-Infektion den präfinalen Zustand und eine den C57BL/6-Tieren vergleichbar schwere Histopathologie mit einem Tag Verzögerung entwickelten. Die Probenentnahme erfolgte dementsprechend an Tag 9 p.i.. Die Zusammensetzung der Bakterienflora verhielt sich in beiden Mausstämmen nahezu identisch (Daten hier nicht gezeigt).

3.1.1 Analyse der Darmflora TLR-defizienter Tiere mit Ileitis

Nachdem ein intraluminaler Konzentrationsanstieg von gram-negativen Bakterien an Ileitis erkrankten C57BL/6-Wildtyp-Tieren gezeigt werden konnte, wurde dieser nun auf eine mögliche TLR-Abhängigkeit anhand von Wildtyp- und TLR-defizienten Tieren im Ileitismodell untersucht.

Abbildung 10 verdeutlicht, dass bei allen Gruppen, unabhängig vom TLR-Genotyp, im entzündeten Ileum ein Anstieg der *E.coli*-Last in vergleichbarem Ausmaß zu beobachten war. Der signifikante Anstieg der Anzahl von *E.coli* betrug bei den Wildtyp- und TLR2/4^{-/-} Tieren fünf bis sechs logarithmische Stufen, bei den TLR2^{-/-} und TLR4^{-/-} Tieren drei bis vier logarithmische Stufen im Vergleich zu gesunden Tieren des entsprechenden Genotyps. Obligat anaerobe gram-negative Stäbchen wie *Bacteroides/Prevotella spp.* zeigten an Tag 9 p.i. einen tendenziellen, aber nicht signifikanten Anstieg um etwa zwei bis drei logarithmische Stufen im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren, unabhängig vom TLR-Genotyp. Die Gattung *Bacteroides* setzte sich aus folgenden Spezies zusammen: *B.ovatus*, *B.merdae*, *B.uniformis* und *B.thetaiotaomicron*. Die *Prevotella*-Population wurde als *P. oralis* und *P. buccae* differenziert. Gram-positive Stäbchen wie *Laktobazillen* und *Clostridien* zeigten eine nicht signifikante Tendenz zur Verringerung der Anzahl im entzündeten Darm bei TLR4^{-/-} und TLR2/4^{-/-} Tieren. Die Anzahl der Enterokokken stellt ebenfalls einen nicht signifikanten tendenziellen Anstieg im Vergleich zum gesunden Zustand dar. Die Enterokokken-Spezies wurden als *E. faecalis*, *E. faecium* und *E. gallinarum* identifiziert. Die Veränderung der Zusammensetzung der Darmflora im Modell der *T.gondii*-induzierten Ileitis erfolgte somit TLR-unabhängig. Die kulturellen Bakterienanalysen zeigten weder einen TLR-abhängigen qualitativen noch quantitativen Unterschied zwischen Wildtyp- und TLR-defizienten Mäusen. Die bakterielle Verschiebung mit einer Erhöhung der Anzahl der gram-negativen Stäbchen an Ileitis erkrankten Tieren war in allen Tiergruppen in vergleichbarem Ausmaß zu finden.

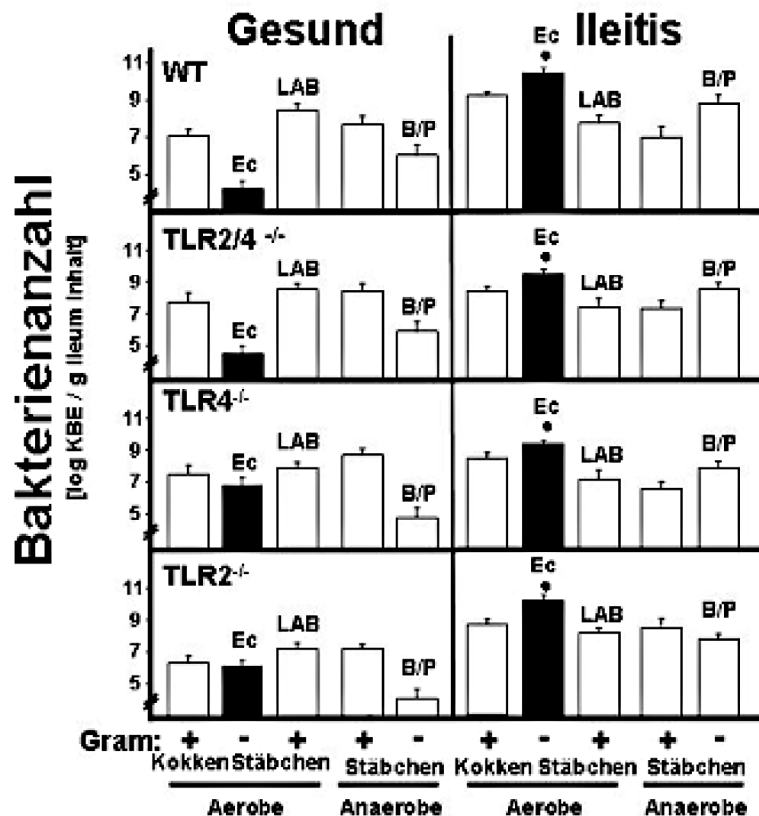


Abbildung 10: Quantitative Zusammensetzung der ilealen Darmflora TLR-defizienter Tiere und Wildtypen im gesunden und kranken Zustand. Bakterienkonzentrationen (KBE, koloniebildene Einheiten) wurden im Ileum von gesunden (n=6) und an Tag 9 p.i. mit *T.gondii* infizierten, an Ileitis erkrankten Tieren (n=9) dargestellt. Anhand biochemischer Leistungsprüfung wurden *E.coli* (Ec), Laktobazillen (LAB) und *Bacteroides/Prevotella* spp. (B/P) identifiziert. Standardabweichungen, Mittelwerte und Signifikantsniveaus ($p < 0.05$) wurden aus drei unabhängigen Experimenten mittels Student's t-test ermittelt.

3.1.1.1 Bakterielle Translokation bei Ileitis

Da eine massive Überwucherung des Ileumlumens von an Ileitis erkrankten Tieren mit *E.coli* gezeigt werden konnte, wurde nun eine mögliche bakterielle Translokation von lebenden Bakterien in Organe des Immunsystems untersucht. Um deren Vorkommen in mesenterialen Lymphknoten (MLNs), Milz, Leber und kardialen Vollblut nachzuweisen, wurden jeweils Proben der entsprechenden Organe von erkrankten Wildtyp- und TLR-defizienten Tieren an Tag 9 p.i. entnommen und in Thioglykolat- bzw. Hirn-Herz-Bouillons angereichert und inkubiert. Nach dem Ausstreichen der trüben Anreicherungsbouillons auf feste Nährmedien erfolgte sowohl eine aerobe als auch eine anaerobe Bebrütung (siehe Material und Methoden).

Kommensale *E.coli* konnte in MLNs und Milzen unabhängig vom TLR-Genotyp in vergleichbarer Häufigkeit bestimmt werden. In kardialem Vollblut wurde nur bei einem von fünf TLR-2-defizienten Tieren ein *E.coli* nachgewiesen. Bei den Tieren der übrigen Genotypen konnte eine Bakteriämie zum Zeitpunkt der Blutentnahme ausgeschlossen werden. Da sowohl in MLNs und Milzen von Wildtyp-Tieren als auch sämtlicher TLR-defizienter Tiere *E.coli* nachgewiesen werden konnte, scheint weder TLR-2 noch TLR-4 für die Limitierung der bakteriellen Translokation im Entzündungsmodell der *T.gondii*-induzierten Ileitis erforderlich zu sein.

	WT	TLR2 ^{-/-}	TLR4 ^{-/-}	TLR2/4 ^{-/-}
Positive MLN-				
Kultur in %	100 (5/5)	100 (5/5)	60 (3/5)	100 (5/5)
Bakterienspezies in MLN	<i>E.coli</i> (5), EK (3)	<i>E.coli</i> (5), EK (1), Proteus (1)	<i>E.coli</i> (3), EK (2), Proteus (1), vergrünende SK (1)	<i>E.coli</i> (5), Proteus (4)
Positive Milz-				
Kultur in %	80 (4/5)	80 (4/5)	0	20 (1/5)
Bakterienspezies in der Milz	<i>E.coli</i> (3), EK (3)	<i>E.coli</i> (4), EK (1)		<i>E.coli</i> (1)
Positive Blut-				
Kultur in %	0	20 (1/5)	0	0
Bakterienspezies im Blut		<i>E.coli</i> (1)		

Tabelle 7: Translokation bei Wildtyp- und TLR-defizienten Tieren mit *T.gondii*-induzierter Ileitis

MLN: mesenteriale Lymphknoten, EK: Enterokokken, SK: Streptokokken. Die Häufigkeiten positiver kultureller Nachweise sind in Prozent dargestellt. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Mäuse mit Bakteriennachweis pro Anzahl aller Versuchstiere der entsprechenden Gruppe an. Dargestellt sind Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes.

3.1.2 Klinischer Zustand TLR-defizienter Tiere mit Ileitis

Es wurden zunächst die relativen Gewichtsabnahmen und die Überlebensraten bei Wildtyp- und TLR-defizienten Tieren erstellt und anschließend klinische Parameter einer Dünndarmentzündung auf eine mögliche TLR-Abhängigkeit hin untersucht.

Abb.11A zeigt, dass die mit *T.gondii*-infizierten Mäuse, unabhängig vom TLR-Genotyp, einen Gewichtsverlust ab Tag 4 p.i. aufwiesen und am Tag 8 p.i. auf dem Höhepunkt der Ileitis hingegen kein signifikanter Unterschied der relativen Gewichtsverluste zu verzeichnen war. Die hohen Standardabweichungen innerhalb der jeweiligen Gruppen könnten diese Beobachtung erklären. Unabhängig von TLR-Genotyp verloren die

untersuchten Mäuse bis zum Tag der Sektion zwischen 15% bis 20% Prozent ihres Ausgangsgewichtes.

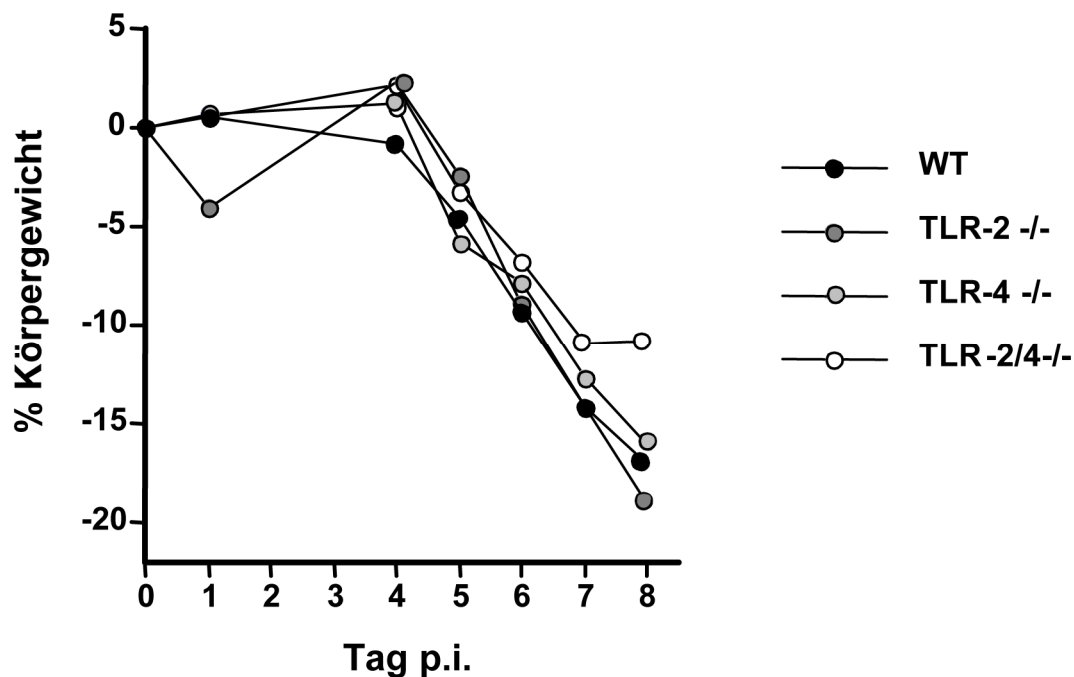


Abbildung 11A: Körpergewichtsverlust von Wildtyp-, TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} und TLR2/4^{-/-}Tieren mit *T.gondii*-induzierter Ileitis. Das Körpergewicht wurde täglich bei C57BL/10-Wildtypen (WT, schwarz, n=10), TLR2^{-/-} (dunkelgrau, n=11), TLR4^{-/-} (hellgrau, n=11) und TLR2/4^{-/-}Tieren (weiß, n=8) bis Tag 8 p.i. gemessen. Die Ergebnisse stammen von zwei gepoolten, unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte, die Abnahme des Körpergewichts ist in Prozent angegeben.

Als weiterer klinischer Parameter wurde die Überlebensrate herangezogen. Es bestand ein signifikanter Unterschied der Überlebensraten zwischen Wildtyp- und TLR2^{-/-} Tieren einerseits und TLR4^{-/-} und TLR2/4^{-/-} Tieren andererseits. 80% der TLR2/4^{-/-}Tiere und 65% der TLR4^{-/-} Tiere waren an Tag 10 p.i. noch am Leben, während zum gleichen Zeitpunkt jedoch 90% der Wildtypen bereits verstorben waren. An Tag 11 lebte keines der Wildtyp-Tiere mehr (Abb. 11B). An Tag 10 lebten noch 20% der TLR2^{-/-}Mäuse. Deren Anzahl verringert sich auf 10% bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes an Tag 22 p.i.. Es überlebten 60% der TLR2/4^{-/-}Tiere und 55% der TLR4^{-/-} Tiere bis Tag 22.

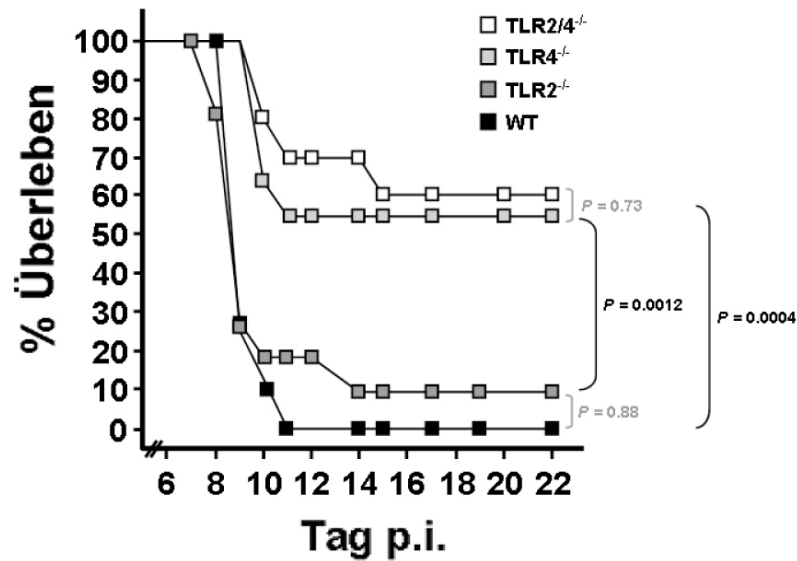


Abbildung 11B: Überlebensraten von Wildtyp-, TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} und TLR2/4^{-/-}-Tieren mit *T.gondii*-induzierter Ileitis. Das Überleben wurde täglich bei C57BL/10-Wildtypen (WT, schwarz, n=10), TLR2^{-/-} (dunkelgrau, n=11), TLR4^{-/-} (hellgrau, n=11) und TLR2/4^{-/-}-Tieren (weiß, n=8) bis zum Tag 22 p.i. verfolgt. Die Ergebnisse stammen von zwei gepoolten, unabhängigen Experimenten. Die Überlebensraten wurden mit dem Kaplan-Meier-Test bestimmt. Die Signifikanzen wurden mit dem Log-Rang-Test berechnet. Daten in Kooperation mit Dr. Andre Fischer (biol. Dissertationsschrift).

Zwischen Wildtyp- und TLR2^{-/-}-Mäusen einerseits sowie TLR4^{-/-} und TLR2/4^{-/-}-Mäusen andererseits waren keine signifikanten Unterschiede im kumulativen Überleben erkennbar. TLR4^{-/-} und TLR2/4^{-/-}-Tiere zeigten ein hoch signifikant ($p < 0.001$) längeres Überleben als die TLR2^{-/-} und C57BL/10-Wildtyp-Tiere. Es besteht dementsprechend eine TLR4-Abhängigkeit der Überlebensraten im akuten Ileitismodell.

3.1.3 Histopathologie TLR-defizienter Tiere mit Ileitis

Nachdem anhand des kinetischen Verlaufes der Überlebensraten gezeigt werden konnte, dass TLR4- und TLR2/4-defiziente Tiere eine signifikant geringere Mortalität aufwiesen als die Wildtyp- und TLR2-defizienten Tiere, sollte nun untersucht werden, ob zu einem definierten Zeitpunkt (Tag 9 p.i.) eine TLR4-Defizienz zu einer verminderten Ausprägung der Histopathologie des Ileums führt. Mit Hilfe eines standardisierten histologischen Punktesystems (Heimesaat MM *et al.* 2006, Heimesaat MM *et al.* 2007) wurde das histopathologische Ausmaß der Dünndarmopathie der Mäuse an Tag 9 nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T.gondii* analysiert.

Auffallend war, dass TLR4- und TLR2/4-defiziente Tiere eine signifikant geringere Ausprägung der Histopathologie des Ileums aufwiesen als Wildtyp- und TLR2-defiziente Mäuse (Abb 12). TLR4- bzw. TLR2/4- defiziente Tiere wiesen mit Histo-„Scores“ von 2.4 ± 0.5 bzw. 1.4 ± 0.6 eine signifikant geringer ausgeprägte Histopathologie im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren auf, während bei TLR2-defiziente Mäuse mit Punktwerten von 3.5 ± 1 kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte.

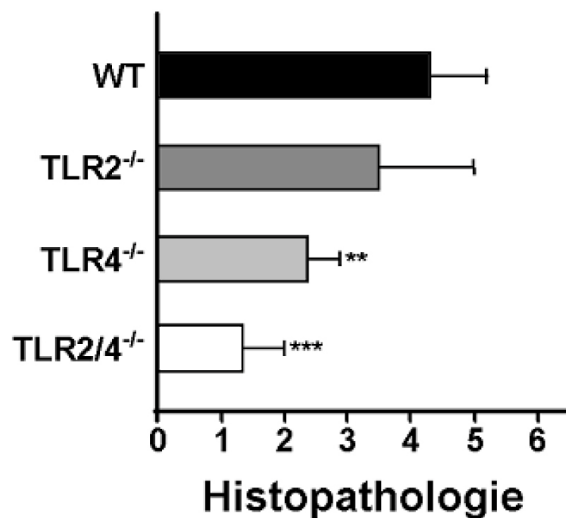
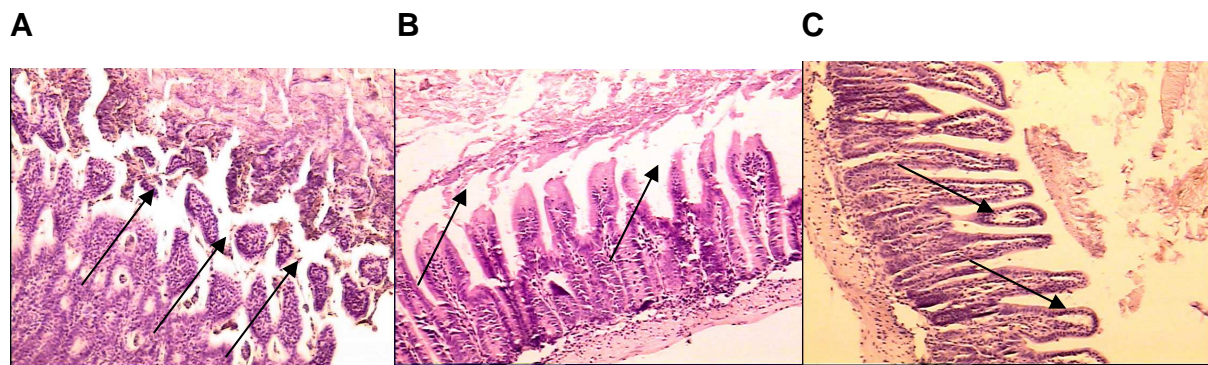


Abbildung 12: Histopathologie des terminalen Ileums bei C57BL/10-Wildtypen (WT, n=5), TLR2^{-/-} (n=5), TLR4^{-/-} (n=5) und TLR2/4^{-/-}-Tieren (n=5) am Tag 9 p.i.. Angegeben sind Standardabweichungen, Mittelwerte und Signifikanzniveaus. Die Signifikanzniveaus wurden mit dem Student's t-test bestimmt (**p<0.01, ***p<0.001 im Vergleich zum Wildtyp). Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Versuche. Daten in Kooperation mit Dr. Andre Fischer (biol. Dissertationsschrift).

Die Abbildungen 13A-C zeigen repräsentative Ausschnitte des Ileums der Wildtyp-, TLR4^{-/-} und TLR2/4^{-/-}-Tiere.

Die histologischen Präparate der Wildtyp-Tiere waren durch ausgeprägte nekrotische Bereiche der Mukosa mit vollständig zerstörter Epithelschicht und Zelldetritus im Lumen gekennzeichnet (Pfeile: Histo-„Scores“ von 4-5). Bei TLR4- und TLR2/4-defizienten Mäusen war ein intraluminales Transsudat nachweisbar, die Epithelschicht war jedoch, entsprechend einem Histo-„Score“ von 2.0-2.5, intakt. Bei TLR2/4-defizienten Tiere war lediglich eine ödematöse Schwellung der Zottenschleimhaut zu erkennen (Histo-„Score“ von 1.0-1.5).



Wildtyp an Tag 9 p.i.
Histo-Score von 4-5

TLR4^{-/-}Tiere an Tag 9 p.i.
Histo-Score von 2.0-2.5

TLR2/4^{-/-}Tiere an Tag 9 p.i.
Histo-Score von 1.0-1.5

Abbildung 13: Histopathologie der *T.gondii*-induzierten Ileitis bei Wildtyp-, TLR4^{-/-} und TLR2/4^{-/-}Tieren an Tag 9 p.i.. Dargestellt sind HE-gefärbte Schnitte von Ilea *T.gondii*-infizierter Mäuse. Die schwarzen Pfeile markieren A: schwere Zerstörung der Mukosa mit Nekrosen und Einwanderung von Entzündungszellen, B: intraluminales Transsudat bei intakter Epithelschicht, C: ödematöse Schwellung der Zottenschleimhaut.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass das Vorhandensein von TLR4 die Histopathologie des Ileums im *T.gondii*-Entzündungsmodell der Maus verstärkt bzw. eine TLR4-Defizienz das histopathologische Ausmaß einer akuten Ileitis vermindert. Zusätzlich wurden die oben beschriebenen Daten der TLR4-Abhängigkeit in Hinblick auf die längeren Überlebensraten im akuten Ileitismodell bestätigt.

3.1.3.1 Dissemination von *T. gondii* im Ileum

Auf der Suche nach der Ursache dieser unterschiedlich ausgeprägten Entzündungsreaktionen des Dünndarms wurde das Ausmaß der Dissemination von *T.gondii* an Immunperoxidase-gefärbten Schnitten des terminalen Ileums bestimmt. Von zwei unabhängigen Gutachtern wurden die obligat intrazellulären Parasiten in ovalen zytoplasmatischen Vakuolen im distalen Bereich des Ileums gezählt. Wie in Abb.14 dargestellt, wurde die Dissemination von *T.gondii* im Ileum weder von TLR2 noch TLR4 beeinflusst, da sich die Anzahl der Tachyzoiten im Dünndarm zwischen den einzelnen Tiergruppen nicht unterschied.

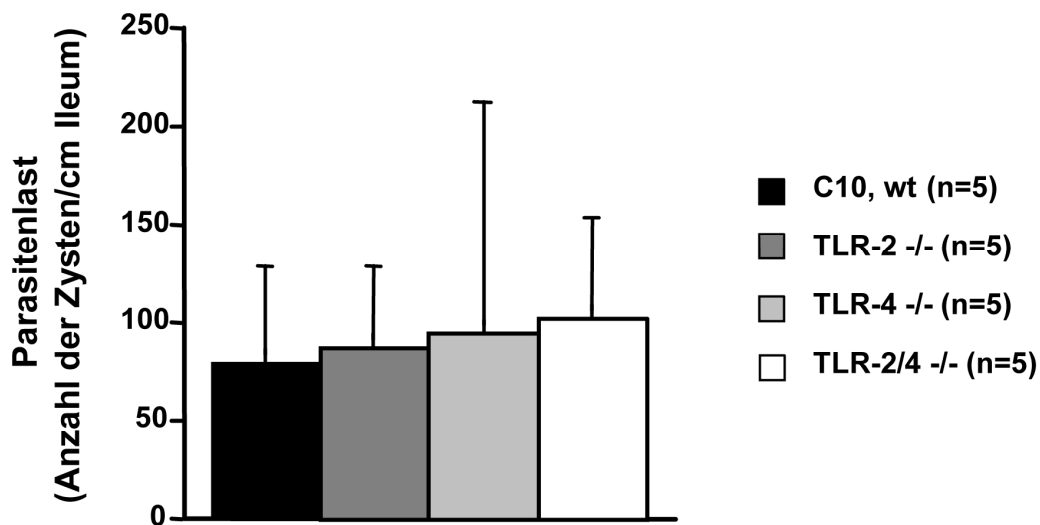


Abbildung 14: Parasitenlast des terminalen Ileums bei C57BL/10-Wildtypen (WT, n=5), TLR2^{-/-} (n=5), TLR4^{-/-} (n=5) und TLR2/4^{-/-}-Tieren (n=5) am Tag 9 p.i.. Angegeben sind Standardabweichungen, Mittelwerte und Signifikanzniveaus. Die Signifikanzniveaus wurden mit dem Student's t-test bestimmt. Die Daten stellen repräsentative Ergebnisse von zwei unabhängigen Versuchen dar.

Somit können unterschiedlich ausgeprägte histologische und klinische Entzündungszeichen zwischen den Tiergruppen nicht durch eine TLR2- oder TLR4-vermittelte geringere *T.gondii*-Last des Dünndarms erklärt werden.

3.1.3.2 Zytokin-Konzentrationen in Organüberständen TLR-defizienter Tiere mit *T.gondii*-induzierter Ileitis

Um die intestinale Immunantwort weiterhin zu charakterisieren, wurden Zytokine vom Th1-Typ wie IFN- γ und NO in Ileumkulturüberständen mittels ELISA bzw. Griess-Reaktion bestimmt.

In gesunden Tieren war, wie zu erwarten, kein TLR-abhängiger Unterschied der IFN- γ - und NO-Konzentrationen zwischen den Tiergruppen zu erkennen, da in diesen gesunden Tieren keine Entzündungsreaktion vorliegt (Abb.15A/B). In Organüberständen entzündeter Ilea stiegen die IFN- γ -Konzentrationen in allen Tiergruppen im Vergleich zu gesunden Ilea an. Die gemessenen NO-Werte im entzündeten Zustand zeigten einen signifikanten Anstieg nur bei Wildtyp- und TLR2-defizienten Tieren. Zwischen gesunden und erkrankten TLR4- bzw. TLR2/4-Tieren war kein signifikanter Konzentrations-Anstieg zu beobachten. Deutlich erkennbar waren

darüber hinaus die signifikant niedrigeren IFN- γ - und NO-Werte bei an Ileitis erkrankten TLR4- und TLR2/4-defizienten Tiere, verglichen mit den erkrankten Wildtyp- und TLR2-defizienten Mäusen an Tag 9 p.i..

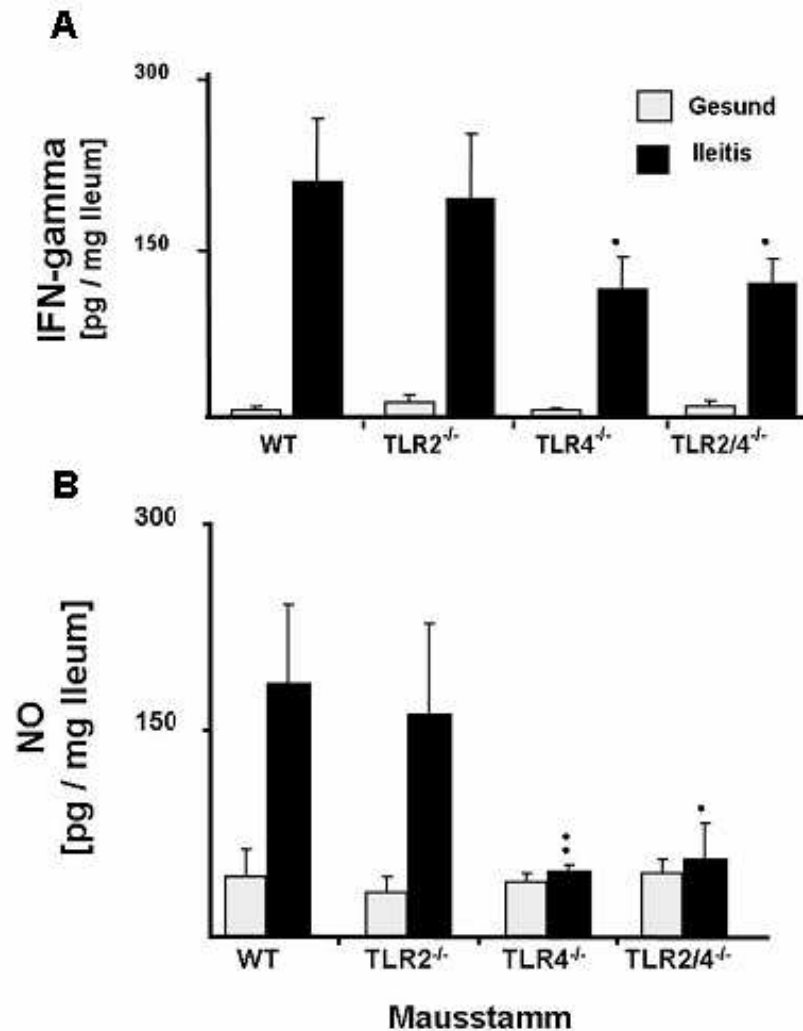


Abbildung 15: Proinflammatorische Zytokin-Konzentrationen im Ileum von C57BL/10-Wildtyp- (n=5), TLR2^{-/-} (n=5), TLR4^{-/-} (n=5) und TLR2/4^{-/-}-Tieren (n=3) bei gesunden Tieren und an *T.gondii*-induzierter Ileitis erkrankten Tieren an Tag 9 p.i.. Dargestellt sind IFN- γ (A) und NO-Konzentrationen (B) in Überständen aus Organkulturen des terminalen Ileums (pg/mg Ileum). Angegeben sind Standardabweichungen, Mittelwerte und Signifikanzniveaus. Die Signifikanzniveaus wurden mit dem Student's t-test bestimmt (*p<0.05, **p<0.01, im Vergleich zum Wildtyp). Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Versuche.

Zusammenfassend ist erkennbar, dass bei vergleichbarer Florenzusammensetzung aller Tiergruppen durch das Vorhandensein von TLR4 die Immunpathologie, gemessen anhand der Zytokin-Konzentrationen, im *T.gondii*-induzierten Ileitis-Modell der Maus verstärkt wird.

3.1.4 Einfluss von TLR4-Liganden bei gnotobiotischen TLR-defizienten Mäusen mit *T.gondii*-induzierter Ileitis

Anhand der bisherigen Versuche wurde festgestellt, dass die Zusammensetzung der Darmflora im Ileitismodell von einer intraluminalen Akkumulation gram-negativer Bakterien, insbesondere *E.coli*, gekennzeichnet war. Das Vorhandensein von TLR4 verstärkte die Immunpathologie des Ileums und deren klinischen Auswirkungen. Die folgenden Versuche an gnotobiotischen Mäusen sollten die Hypothese untersuchen, ob Zellwandbestandteile des *E.coli* als TLR4-Liganden ursächlich an der Vermittlung der Immunpathologie der *T.gondii*-induzierten Ileitis beteiligt sein könnten.

3.1.4.1 *E.coli*-Rekolonisierung von TLR-defizienten Tieren mit *T.gondii*-induzierter Ileitis

Gnotobiotische Wildtyp- sowie TLR2-, TLR4- und TLR2/4- defiziente Tiere wurden mit einem *E.coli*-Isolat aus einer zuvor an Ileitis erkrankten C57BL/6-Maus peroral rekolonisiert. Zur Herstellung der Gnotobioten hatten die Tiere zuvor einen 5-fachen Antibiotika-Cocktail zur Eradikation der Darmflora erhalten (siehe 2.4.6). Nachdem keine kultivierbare Darmflora mehr nachgewiesen werden konnte, wurde jedes Tier mit einer *E.coli*-Suspension an drei aufeinander folgenden Tagen durch orale Gavage rekolonisiert und anschließend mit *T.gondii* zur Ileitis-Induktion peroral infiziert.

Die *E.coli*-Last im Ileum betrug an Tag 9 nach Rekolonisierung bei allen gnotobiotischen Tiergruppen 10^9 - 10^{10} KBE/g Darminhalt (Abb.16A) und zeigte keinen TLR-abhängigen Unterschied.

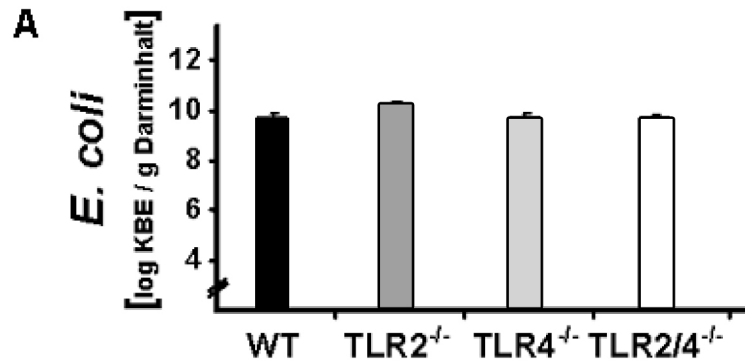


Abbildung 16A: Vergleichbare *E.coli*-Konzentrationen im terminalen Ileum nach Rekolonisierung gnotobiotischer Wildtyp- (n=3) und TLR2- (n=3), TLR4- (n=3) und TLR2/4- (n=3) defizienter Tiere. Angegeben sind Standardabweichungen, Mittelwerte und Signifikanzniveaus. Die Signifikanzniveaus wurden mit dem Student's t-test bestimmt. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Gnotobiotische Wildtyp- und TLR2-defiziente Tiere wiesen nach Rekolonisierung mit *E.coli* mittelgradig ausgeprägte histologische Entzündungszeichen im Ileum in Form von intraluminales Transsudat mit Abschilferungen von Epithelzellen bis hin zur beginnenden Auflösung der Epithelschicht bei einem Histo-„Score“ von 3.5 ± 2 bzw. 2.67 ± 0.67 auf (Abb. 16B). Bei einigen Tieren konnten beginnende Nekrosen beobachtet werden. TLR4- und TLR2/4-defizienten Tieren hingegen zeigten signifikant ($p < 0.05$) geringere histopathologische Veränderungen wie eine ödematös geschwollene Schleimhaut und allenfalls diskret fokale Läsionen der Dünndarmzotten entsprechend einem Histo-„Score“ von 0.67 ± 0.33 bzw. 0.67 ± 0.17 .

Die weißen Balken in Abbildung 16B verdeutlichen, dass *T.gondii*-infizierte gnotobiotische Tiere ohne *E.coli*-Rekolonisierung praktisch keine histopathologischen Veränderungen im Bereich des terminalen Ileums aufweisen. In Ilea von Wildtypen ohne *T.gondii*-Infektion konnten nach Rekolonisierung mit *E.coli* erwartungsgemäß ebenfalls keine pathologischen Veränderungen des Ileums nachgewiesen werden (Daten hier nicht gezeigt). Somit konnten potentielle histologische Veränderungen durch *E.coli*-Rekolonisierung als möglichen alleinigen Entzündungstrigger in naiven, gnotobiotischen Mäusen ausgeschlossen werden.

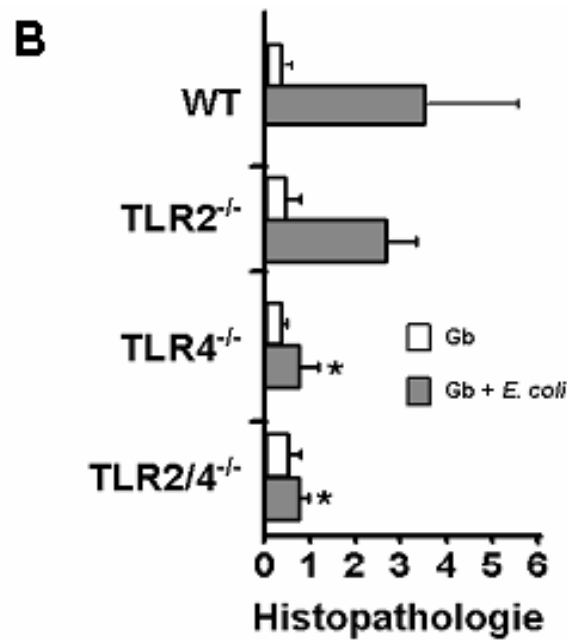


Abbildung 16B: Dargestellt ist das histopathologische Ausmaß der terminalen Ileitis von gnotobiotischen Mäusen (Gb) ohne Besiedlung (weißer Balken) und mit *E.coli*-Monokolonisierung (grauer Balken) an Tag 9 p.i. bei Wildtyp- (n=3), TLR2^{-/-} (n=3), TLR4^{-/-} (n=3) und TLR2/4^{-/-} (n=3) defizienten Tieren. Es wurden Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzniveaus angegeben (*p<0.05 im Vergleich zum Wildtyp bzw TLR2^{-/-}). Die Signifikanzniveaus wurden mit dem Student's t-test bestimmt. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Versuche.

Mit *E.coli*-rekolonisierte TLR4^{-/-} und TLR2/4^{-/-} defiziente Tiere wiesen an Tag 9 p.i. eine signifikant geringere Histopathologie des Ileums im Vergleich zu Wildtyp- bzw. TLR2^{-/-} defizienten Tieren auf.

Sowohl *E.coli* als auch TLR4 trugen demnach wesentlich zur intestinalen Immunpathologie einer terminalen Ileitis bei.

3.1.4.2 Applikation von *E.coli* Lipid A bei TLR4-defizienten Tieren mit *T.gondii*-induzierter Ileitis

Um zu überprüfen, ob auch Lipid A als Zellbestandteil gram-negativer Bakterien und als TLR4-Ligand an der Auslösung einer immunpathologischen Reaktion bei *T.gondii*-Ileitis beteiligt war, erhielten gnotobiotische Wildtyp- und TLR4-defiziente Tiere gereinigtes *E.coli*-Lipid A peroral verabreicht. TLR4 stellt einen hochspezifischen Rezeptor für die Lipid A-Fraktion des bakteriellen LPS dar (Akira S *et al.* 2007, Jerala R 2007). Die Applikation von gereinigtem *E.coli*-Lipid A begann 6 Tage vor der *T.gondii*-Infektion und endete an Tag 9 p.i. (siehe 2.4.6.2). Um das Ausmaß der Ileitis zu bestimmen, wurde erneut die histopathologischen Veränderungen in Ilea dieser *E.coli*-Lipid A behandelten

Tiere mit der von *E.coli* rekolonisierten Tiere und konventionellen SPF-Tieren verglichen (Abb. 17).

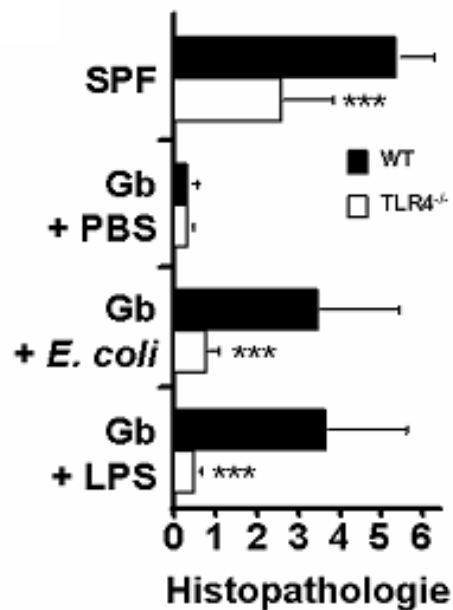


Abbildung 17: Einfluss von oraler Gabe des Lipid A (LPS) auf den Schweregrad der ilealen Immunpathologie bei gnotobiotischen (Gb) Wildtyp- (n=4, schwarze Balken) und TLR4- (n=4, weiße Balken) defizienten Tieren am Tag 9 p.i. verglichen mit PBS-behandelten Tieren (WT n=22; TLR4^{-/-} n=7), mit *E.coli* monokolonisierten Tieren (WT n=16; TLR4^{-/-} n=7) und SPF-Tieren (WT n=22, TLR4^{-/-} n=9). Angegeben sind Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzniveaus (***) p<0.001 Wildtyp versus TLR4^{-/-}). Die Signifikanzniveaus wurden mit dem Student's t-test bestimmt. Daten in Kooperation mit Dr. A. Fischer (biol. Dissertationsschrift).

Die histologische Ausprägung der Ileitis der mit LPS behandelten Wildtyp-Tiere war mit der Ausprägung der mit *E.coli* rekolonisierten Wildtyp-Tiere an Tag 9 p.i. vergleichbar (Abb. 17; Punktwerte von 3.7 ± 2 versus 3.5 ± 2). Hingegen entwickelten sowohl mit LPS behandelte TLR4-defiziente Mäuse als auch die, die mit *E.coli* rekolonisiert wurden, allenfalls geringgradige histopathologische Veränderungen im Bereich des Ileums an Tag 9 p.i. (Punktwerte von 0.5 ± 0.2 bzw. 0.8 ± 0.3). Die TLR4-defizienten Tiere zeigten eine signifikant ($p < 0.001$) geringere Ausprägung der Histopathologie als die entsprechend behandelten Wildtyp-Tiere im Ileitis-Modell, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den LPS behandelten Tieren und den mit *E.coli* rekolonisierten Tieren bestand.

Wie bereits bei 3.2.3 beschrieben, wiesen Wildtyp-Mäuse mit SPF-Flora erneut eine ausgeprägte Histopathologie mit schweren Nekrosen (5.4 ± 0.8) auf. Es besteht somit

ein signifikanter Unterschied ($p < 0.001$) im Vergleich zu den TLR4-defizienten Tieren mit SPF-Flora, die einen geringeren Histo-„Score“ von 2.5 ± 1.2 aufwiesen.

Weder bei PBS-behandelten gnotobiotischen Wildtyp-Tieren noch bei TLR4-defizienten Tieren konnten histopathologische Veränderungen im Ileum an Tag 9 p.i. festgestellt werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Applikation von *E.coli* Lipid A als Komponente gram-negativer Bakterien bei Wildtyp-Tieren an der Auslösung einer immunpathologischen Reaktion im gleichen Maße beteiligt war wie die Rekolonisierung mit lebenden *E.coli*. Auf der Grundlage der erhobenen Befunde, dass TLR4-defiziente Mäuse vor einer Ileitis geschützt waren, konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass TLR4 für die LPS-vermittelte Signalübertragung der Immunpathologie im vorliegenden Modell notwendig war.

3.1.5 Polymyxin B-Behandlung von Mäusen mit *T.gondii*-induzierter Ileitis

Da LPS an der Vermittlung der Immunantwort im Ileitismodell ursächlich beteiligt zu sein scheint, wurden *T.gondii*-infizierte Wildtyp-Mäuse mit dem nicht resorbierbaren Antibiotikum Polymyxin B behandelt. Dieses Antibiotikum besitzt zusätzlich eine Funktion als LPS-Antagonist (Tsuzuki H *et al.* 2001). Es wurden zwei Behandlungsregime mit Polymyxin B durchgeführt: ein prophylaktisches, 5 Tage vor der Infektion beginnend, und ein therapeutisches von Tag 5 bis Tag 8 p.i..

Abbildung 18A spiegelt die Überlebensraten für mit Placebo-behandelte (•), mit Polymyxin B prophylaktisch (schwarze Dreiecke) und therapeutisch (graue Dreiecke) behandelten Tieren vor bzw. nach der Infektion mit *T.gondii* wider. Mit Polymyxin B behandelte Tiere beider Behandlungsregime zeigten eine höhere Überlebensrate als unbehandelte Tiere. An Tag 8 p.i. waren bereits alle Kontrolltiere verstorben. 63.2% der prophylaktisch und 48% der therapeutisch behandelten Tiere lebten zu diesem Zeitpunkt noch. In der prophylaktischen Behandlungsgruppe überlebten insgesamt 5.3% und in der therapeutischen Gruppe 4% der Tiere bis Tag 28 p.i..

An Tag 8 p.i. war anhand der histologischen „Scores“ (Abb.18C) eine signifikant geringere Ausprägung der Histopathologie des Ileums bei den prophylaktisch behandelten Tieren zu beobachten („Score“ von 3.3 ± 1). Gleichzeitig wurde bei diesen Tieren eine signifikant ($p < 0.05$) verminderte NO-Konzentration als Marker einer lokalen proinflammatorischen Immunantwort im Vergleich zu Placebo-behandelten Tieren an Tag 9 p.i. gemessen (Abb.18D). Therapeutisch behandelte Tiere wiesen eine signifikant

($p < 0.05$) geringere Histopathologie des Ileums im Vergleich zu den PBS-Kontroll-Tieren auf. Während im Ileum PBS-behandelter Kontroll-Tiere an Tag 8 p.i. eine transmurale Zerstörung der Darmwand mit schwersten Nekrosen zu erkennen waren, wiesen therapeutisch mit Polymyxin B-behandelte Tiere moderate histopathologische Veränderungen mit Abschilferungen von Epithelzellen und beginnender Auflösung der Epithelschicht auf (Histo-„Score“ 5.75 ± 0.5 versus 4.6 ± 0.5).

Als weiterer Parameter einer Entzündungsreaktion im Ileum wurde die relative Verkürzung der Dünndarmlänge bestimmt (Heimesaat MM *et al.* 2006). Abbildung 18B zeigt, dass bei Placebo-behandelten Mäusen mit schwerer Ileitis an Tag 8 nach *T.gondii*-Infektion die Länge des Ileums im Vergleich zu den Kontrolltieren um $19.0 \pm 4.8\%$ reduziert war. Dagegen zeigten die Tiere, die prophylaktisch Polymyxin B erhielten, eine signifikant geringere Dünndarmverkürzung von $9.3 \pm 6.4\%$ im Vergleich zu den Placebo-behandelten Tieren an Tag 8. Therapeutisch behandelte Tiere zeigten tendentiell eine geringere Dünndarmverkürzung als die Placebo-Kontrolltiere an Tag 8, auch wenn aufgrund der hohen Standardabweichung in der therapeutischen Polymyxin-Gruppe der Unterschied nicht signifikant war.

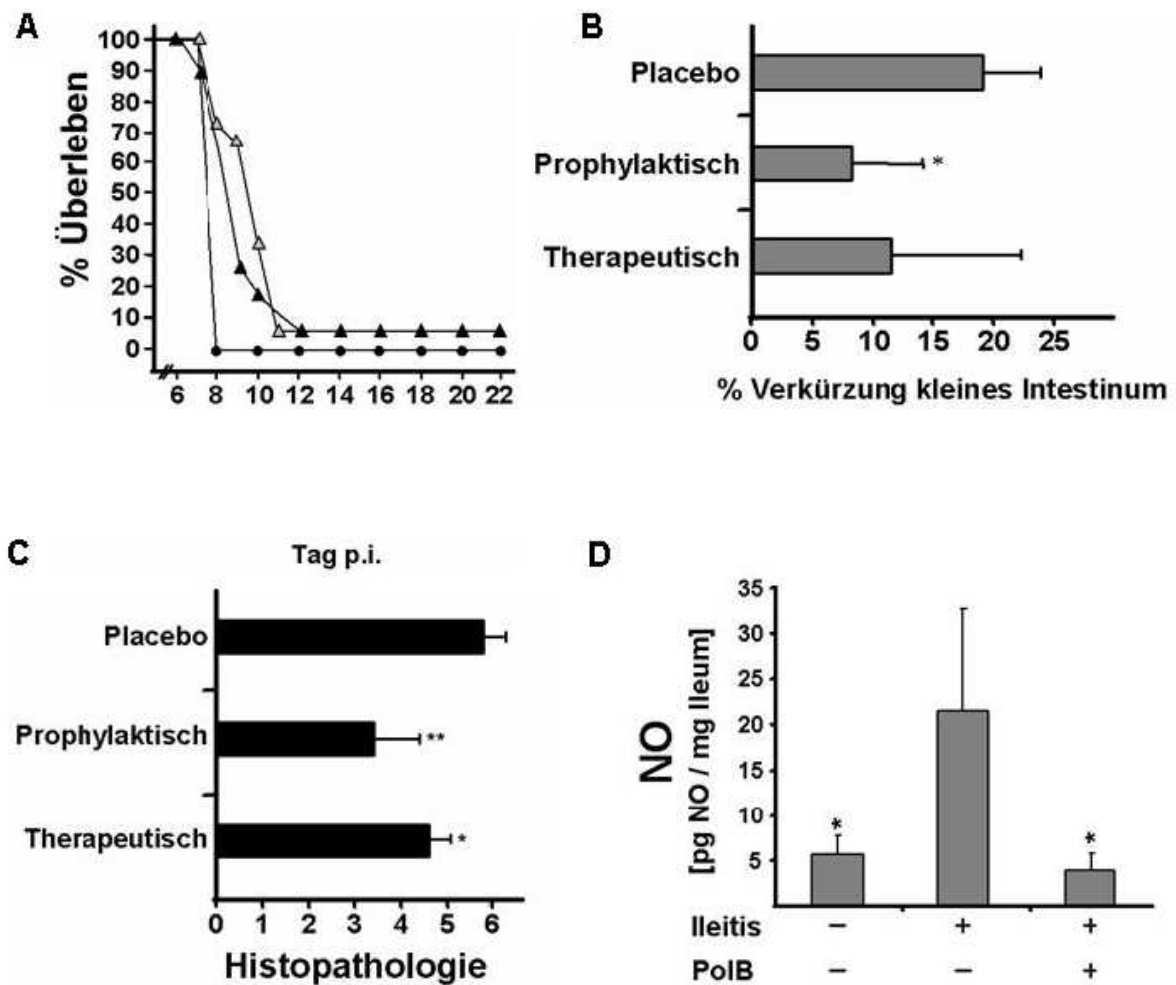


Abbildung 18: Auswirkungen der Behandlung mit Polymyxin B bei C57BL/6-Mäusen mit *T.gondii*-induzierter Ileitis

A: Überlebensraten nach Polymyxin B Behandlung in Abhängigkeit der jeweiligen Behandlungsregime: prophylaktisch (schwarze Dreiecke, n=19), therapeutisch (graue Dreiecke, n= 10) oder Placebo (schwarze Kreise, n=10). B: prozentuale Verkürzung des Dünndarms nach prophylaktischer (n=5) bzw. therapeutischer (n=5) Polymyxin B Behandlung im Vergleich zu Placebo-behandelten Tieren (*p<0.05 im Vergleich zur Placebogruppe). C: Histopathologie nach prophylaktischer (n=5) und therapeutischer (n=5) Polymyxin B Behandlung verglichen mit Placebo-behandelten Tieren (*p<0.05, **p<0.01 im Vergleich zur Placebogruppe). D: NO-Konzentrationen in Ileumorgan-Kulturüberständen von Tieren nach prophylaktischer Polymyxin B Behandlung (n=4) und Placebo-behandelten Tieren (n=5) (*p<0.05 im Vergleich zur Placebo-Gruppe). Angegeben sind Mittelwerte, Standardabweichungen sowie Signifikanzniveaus. Die Signifikanzniveaus wurden mittels Student's t-test bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Daten in Kooperation mit Dr. A. Fischer (biolog.Dissertationsschrift).

Mikrobiologische Analysen bestätigten, dass bei Polymyxin B behandelten Tieren an Tag 8 p.i. *E.coli* im Ileum selektiv eradiziert werden konnte, andere Bakteriengruppen hingegen nicht verändert waren (Daten hier nicht gezeigt).

Zusammenfassend, führte die orale Gabe des LPS-Antagonisten Polymyxin B zu einer Minderung der *T.gondii*-induzierten Ileitis. Es konnte ein Zusammenhang zwischen der Überlebensrate, der Histopathologie und der lokalen Zytokinkonzentration der Polymyxin-behandelten Tiere gezeigt werden, die eine geringergradigere Immunpathologie im Ileitismodell aufwiesen. Damit konnte der TLR4/LPS-vermittelte Signalweg im vorliegenden Modell bestätigt werden. Eine Abschwächung dieses Signalweges durch LPS-Antagonisten wie Polymyxin B könnte folglich einen möglichen therapeutischen Ansatzpunkt für die Behandlung bzw. Prophylaxe einer Ileitis bei CED bieten.

3.2 Einfluss von TLR-Defizienz auf die Darmflora bei DSS-Colitis

In Vorarbeiten zeigten kulturelle Analysen der Darmflora gesunder Tiere, dass kein signifikanter Unterschied in der Zusammensetzung der Colonflora zwischen TLR2-, TLR4- und TLR2/4-defizienten Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Tieren im gesunden Zustand bestand. Analog zu den Daten des Ileitismodells sollte nun in einem akuten Entzündungsmodell des Dickdarms einerseits entzündungsassoziierte Veränderungen der Colonflora im Vergleich zu den gesunden Tieren überprüft werden, und andererseits sollten diese Veränderungen auf eine TLR-Abhängigkeit hin untersucht werden.

Die DSS-induzierte Colitis ist ein chemisch induziertes Entzündungsmodell der Maus, bei der eine akute Colitis durch eine 6-7-tägige Applikation von 3,5%igem Dextransodiumsulfat mit dem Trinkwasser ausgelöst wird (Rath HC *et al.* 1996, 1999, Siegmund B *et al.* 2001). Die Symptome manifestieren sich durch einen Gewichtsverlust der Mäuse, Diarrhö und rektalen Blutungen. Histologisch ist die DSS-Colitis durch eine Infiltration von Lymphozyten in die Lamina propria mit fokalen Kryptenabszessen, multiplen Erosionen und einer lymphoiden Hyperplasie der Mukosa des Colons gekennzeichnet (Okayasu I *et al.* 1990, Heimesaat MM *et al.* 2007).

3.2.1 Analyse der Darmflora TLR-defizienter Tiere mit Colitis

Anhand einer kulturellen Analyse der Colonflora wurden mögliche entzündungsassoziierte Veränderungen der Darmflora von erkrankten Wildtyp- und TLR-defizienten Tieren vergleichend untersucht.

Abbildung 19 zeigt eine quantitative Darstellung unterschiedlicher bakterieller Gruppen im Zustand vor und während der Entzündung bei Wildtypen, verglichen mit TLR2-, TLR4- und TLR2/4-defizienten Tieren. Die Konzentrationen von kommensalen *E.coli* im entzündeten Colon von DSS-behandelten Wildtyp-Mäusen stieg signifikant um etwa vier logarithmische Stufen an (☆☆☆ $p < 0,001$).

Bei allen TLR-defizienten Tieren mit DSS-Colitis war ein weniger stark ausgeprägter Anstieg der *E.coli*-Konzentrationen im Cololumen im Vergleich zu den erkrankten Wildtyp-Tieren zu beobachten (** $p < 0,01$). Die Veränderungen der Anzahl der Enterokokken, Laktobazillen, *Bacteroides/Prevotella spp.* und Clostridien im entzündeten Zustand waren sowohl bei den Wildtyp-Mäusen als auch bei den TLR-defizienten Mäusen in etwa vergleichbar. Tendenziell war ein nicht signifikanter Anstieg

der *Enterococcus spp.* und *Bacteroides/Prevotella spp.* bei allen Tiergruppen nachzuweisen. Ausschließlich die Gruppe der DSS-behandelten TLR2/4-defizienten Tiere zeigte eine signifikant geringere Bakterienlast an *Bacteroides/Prevotella spp.* und *Enterococcus spp.* im Colonlumen im Vergleich zu den erkrankten Wildtyp-Tieren mit Colitis an Tag 8.

Biochemische Leistungsprüfungen identifizierten die *Bacteroides*-Spezies als *B.ovatus*, *B.merdae*, *B. uniformis*, *B. vulgatus* und *B. thetaiotaomicron*. Die *Prevotella*-Gattung setzte sich aus *P.oralis* und *P.buccae* zusammen, die *Enterococcus*-Populationen umfassten *E. faecalis*, *E.faecium* und *E.gallinarum*.

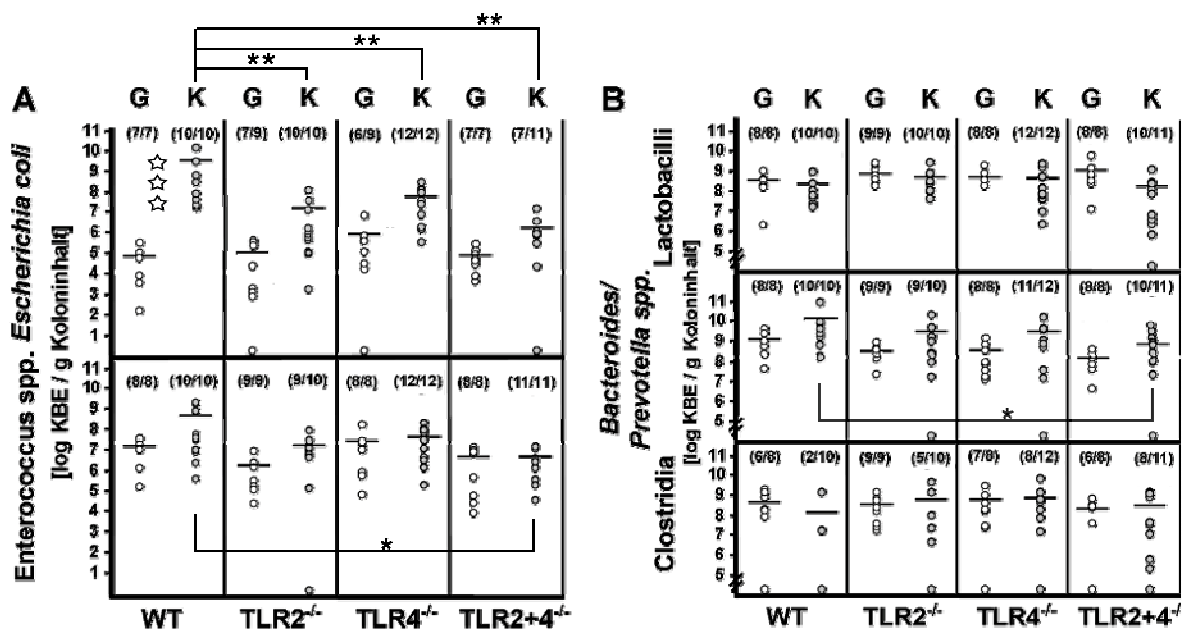


Abbildung 19: Kulturelle Analysen der Zusammensetzung der Colonflora von gesunden (G, weiße Punkte) und erkrankten (K, graue Punkte) TLR2-, TLR4- und TLR2/4-defizienten Tieren, verglichen mit Wildtyp-Tieren an Tag 8 nach siebentägiger DSS-Gabe. Die Daten sind in log KBE/g Coloninhalt angegeben. A: Dargestellt sind die Werte für *E.coli* und *Enterococcus spp.* und in B: *Lactobacillus spp.*, *Bacteroides/Prevotella spp.* und *Clostridium spp.*. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Mäuse mit Bakteriennachweis pro Anzahl aller Versuchstiere der entsprechenden Gruppe an. Angegeben sind Einzelwerte und Mediane. Signifikanzniveaus wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ im Vergleich zu erkrankten Wildtyp-Tieren, ☆☆☆ $p < 0.001$ im Vergleich zu gesunden Wildtyp-Tieren). Die gepoolten Daten stammen aus zwei unabhängigen Versuchen, in Kooperation mit Dr. A. Fischer (biolog.Dissertationsschrift).

Zusammenfassend wurde ein signifikanter Anstieg der *E.coli*-Konzentration im Colon von an DSS-Colitis erkrankten Wildtyp-Tieren gezeigt. Somit war sowohl bei der DSS-

Colitis als auch bei der *T.gondii*-Ileitis eine entzündungsbedingte Erhöhung der gram-negativen Bakterienlast bei den Wildtyp-Tieren zu finden.

Im Vergleich zum Ileitis-Modell wiesen die an DSS-Colitis erkrankten Tiere einen weit geringer ausgeprägten intraluminalen Anstieg der *E.coli*-Konzentration auf, unabhängig vom TLR-Genotyp.

3.2.1.1 Bakterielle Translokation bei DSS-Colitis

Es konnte ein entzündungsbedingter Anstieg gram-negativer Bakterien im Colon an Colitis-erkrankten Mäusen mit einem signifikanten TLR-abhängigen Unterschied nachgewiesen werden. Anschließend sollte nun untersucht werden, ob eine entsprechende TLR-abhängige Translokation der untersuchten Bakterienpopulation im Entzündungszustand der Tiere in andere Organsysteme erfolgte.

Blutkulturen sind nicht in der Tabelle 8a angegeben, da in keiner Probe ein Bakterienwachstum nachgewiesen werden konnte und somit eine Bakteriämie zu dem entsprechenden Zeitpunkt der Blutentnahme nahezu ausgeschlossen werden konnte.

Im gesunden Zustand wurden bei Wildtyp-Mäusen gram-positive Stäbchen in mesenterialen Lymphknoten, Milz und Leber identifiziert. Bei TLR2- und TLR4-defizienten gesunden Tieren wurde kein Bakterienwachstum in den Organkulturen angereichert, bei den naiven TLR2/4-defizienten Tieren konnten Enterokokken in der Leber von lediglich einem Tier nachgewiesen werden, wobei eine potentielle sekundäre Kontamination nicht ausgeschlossen werden konnte.

	WT	TLR2 ^{-/-}	TLR4 ^{-/-}	TLR2/4 ^{-/-}
positive MLN -Kultur in %	100 (3/3)	0	0	0
Bakterienspezies in MLN	Gram-pos.Stb.(3)			
positive Milz -Kultur in %	33 (1/3)	0	0	0
Bakterienspezies in Milz	Gram-pos.Stb.(1)			
positive Leber -Kultur in %	33 (1/3)	0	0	33 (1/3)
Bakterienspezies in Leber	Gram-pos.Stb.(1)			EK (1)

Tabelle 8a: Bakterielle Translokation bei Wildtyp- und TLR-defizienten Tieren im gesunden Zustand

MLN: mesenteriale Lymphknoten, EK: Enterokokken, Gram-pos.Stb.: gram-positive Stäbchen. Die Häufigkeiten positiver kultureller Nachweise sind in Prozent dargestellt. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Mäuse mit Bakteriennachweis pro Anzahl aller Versuchstiere in der entsprechenden Gruppe an.

Im Entzündungszustand des Colons, wie in der folgenden Tabelle dargestellt, bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Tiergruppen hinsichtlich der Translokationshäufigkeit. In den MLNs wurden sowohl bei den Wildtyp-Tieren als auch bei den TLR-defizienten Tieren gram-positive Stäbchen nachgewiesen. Bei den TLR4-defizienten Tieren wurde zusätzlich ein Enterokokkenwachstum beobachtet. Gram-negative Bakterien, die im Entzündungszustand im Darmlumen anstiegen, konnten in der Leberkultur eines TLR2- und eines TLR4-Tieres nachgewiesen werden. Milz- und Leberkulturen der Wildtyp-Tiere und der TLR2/4-defizienten Tiere zeigten kein Bakterienwachstum.

	WT	TLR2 ^{-/-}	TLR4 ^{-/-}	TLR2/4 ^{-/-}
positive MLN -Kultur in %	40 (2/5)	60 (3/5)	50 (3/6)	33 (2/6)
Bakterienspezies in MLN	Gram-pos.Stb. (2)	Gram-pos.Stb. (3)	EK(2), Gram-pos.Stb.(1)	Gram-pos.Stb. (2)
positive Milz -Kultur in %	0	0	33 (2/6)	0
Bakterienspezies in Milz			EK(1), Gram-pos.Stb.(1)	
positive Leber -Kultur in %	0	40 (2/5)	33 (2/6)	0
Bakterienspezies in Leber		<i>E.coli</i> (1), EK (1)	EK(1), <i>E.coli</i> (1), Gram-pos.Stb. (2)	

Tabelle 8b: Translokation bei Wildtyp- und TLR-defizienten Tieren mit DSS-Colitis

MLN: mesenteriale Lymphknoten, EK: Enterokokken, Gram-pos.Stb.: gram-positive Stäbchen. Die Häufigkeiten positiver kultureller Nachweise sind in Prozent dargestellt. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Mäuse mit Bakteriennachweis pro Anzahl aller Versuchstiere in der entsprechenden Gruppe an.

Zusammenfassend bestand eine Translokation gram-positiver Bakterien in die lokalen, mesenterialen Lymphknoten im entzündeten Zustand aller Tiergruppen, der im gesunden Zustand nur bei den Wildtypen zu beobachten war. Es bestand kein signifikanter Unterschied der Translokationshäufigkeit gram-negativer Bakterien im entzündeten Zustand. Somit kann kein Zusammenhang zwischen einem TLR-abhängigen Ausmaß eines entzündungsbedingten Anstiegs der *E.coli*-Konzentrationen im Colonlumen und einer Translokation gram-negativer Bakterien in andere Organsysteme hergestellt werden.

3.2.2 Klinisches Ausmaß der DSS-Colitis TLR-defizienter Tiere

Um einen möglichen Einfluss von TLR2 und TLR4 auf die Immunpathogenese einer akuten DSS-Colitis zu untersuchen, wurde das Ausmaß der Colitis anhand von klinischen Parametern von Wildtyp-Mäusen mit TLR2-, TLR4- und TLR2/4-defizienten Mäusen an Tag 8 nach Beginn der DSS-Behandlung verglichen.

Nach einer 7-tägigen DSS-Gabe konnte beobachtet werden, dass die Wildtyp-Tiere ausgeprägte Symptome einer Colitis, wie einen Gewichtsverlust von 15-20% und makroskopisch blutigen, wäßrigen Stuhl mit einem klinischen Gesamtindex (siehe 2.3.4) von 11.3 ± 1.1 entwickelten. Im Gegensatz dazu wurde bei den TLR2-, TLR-4 und TLR2/4-defizienten Tieren ein hoch signifikant ($p < 0.001$) geringeres klinisches Ausmaß der Colitis mit Werten von 7.1 ± 1.6 , 7.0 ± 3 und 4.2 ± 2.3 beobachtet (Abb. 20).

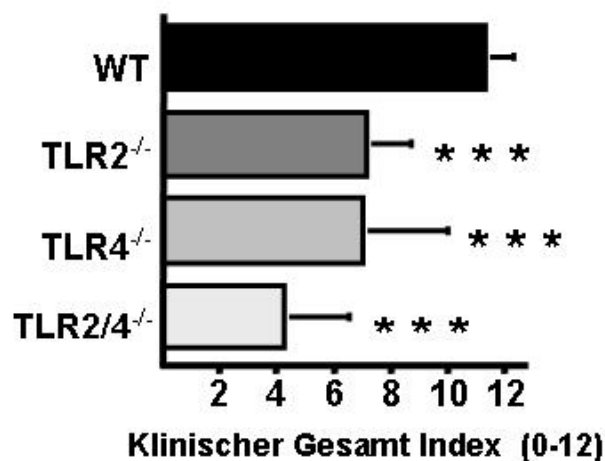


Abbildung 20: Klinischer Schweregrad der Colitis bei Wildtyp- (schwarzer Balken, n=10), TLR2- (dunkelgrauer Balken, n=10), TLR4- (hellgrauer Balken, n=12) und TLR2/4-defizienten Tieren (weißer Balken, n=11) am Tag 8 nach siebentägiger DSS-Behandlung. Klinische Parameter wurden täglich überwacht. Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten. Angegeben sind Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzniveaus. Die Signifikanzniveaus wurden mittels Student's t-test bestimmt (***) $p < 0.001$ im Vergleich zum Wildtyp).

Die Ergebnisse dieser Gegenüberstellung zeigten, dass eine akute Colitis mittels TLR2- und TLR4-Rezeptoren verstärkt werden kann. In Zusammenschau der bisherigen Ergebnisse besteht desweiteren ein rein deskriptiver Zusammenhang zwischen den erhöhten *E.coli*-Konzentrationen im Colonlumen und dem ausgeprägten klinischen Schweregrad im entzündeten Zustand des Colons.

3.2.3 Histopathologie TLR-defizienter Tiere mit DSS-Colitis

Nachdem anhand des klinischen Ausmaßes der Colitis ein TLR-abhängiger Unterschied im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren gezeigt werden konnte, sollte diese TLR-Abhängigkeit nun in Hinsicht auf die Histopathologie des Colons untersucht werden.

Dazu wurden HE-gefärbte Gewebeschnitte von zwei unabhängigen Pathologen (C.L. und H.A.L.) analysiert und einem standardisierten histologischen Punktesystem (Siegmond B *et al.* 2001) zugeordnet.

Die Abbildung 21 zeigt, dass DSS-induzierte histopathologische Veränderungen in Form von tiefen Gewebeschäden im Colon sowohl bei Wildtyp-Mäusen als auch bei TLR2- und TLR4-defizienten Tieren im gleichen Ausmaß bestanden. Nur bei TLR2/4-defizienten Tieren war ein signifikant ($p < 0.05$) geringeres Ausmaß der pathologischen Veränderungen zu erkennen. TLR2/4-defiziente Tiere zeigten oberflächliche Gewebeschäden der Mukosa im Vergleich zu den tiefen Infiltrationen von Entzündungszellen bis in die Submukosa bei den Wildtyp-Tieren.

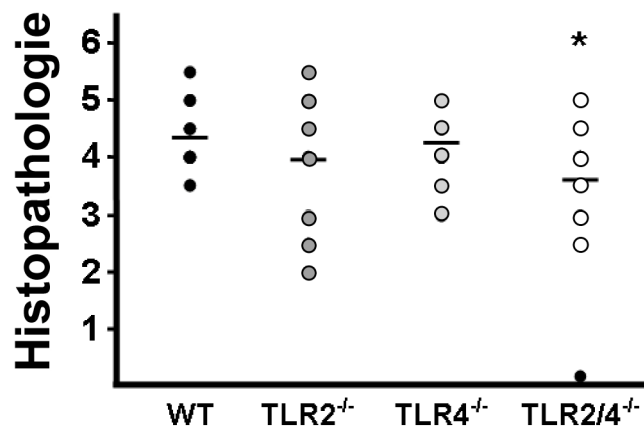


Abbildung 21: Histopathologische Veränderungen im Colon bei C57BL/10-Wildtyp- (WT, n=10), TLR2^{-/-} (n=10), TLR4^{-/-} (n=12) und TLR2/4^{-/-}-Tieren (n=11) an Tag 8 nach siebentägiger DSS-Behandlung. Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten. Angegeben sind Einzelwerte und Mediane; Signifikanzniveaus wurden mit dem Students-t-Test bestimmt (* $p < 0.05$ im Vergleich zum Wildtyp).

3.2.3.1 Zytokin-Konzentrationen in Organüberständen TLR-defizienter Tiere mit DSS-Colitis

Analog zu den Untersuchungen im Ileitis-Modell wurden auch im Colitis-Modell die IFN- γ -Konzentrationen in den Organüberständen von mesenterialen Lymphknoten (MLN) bestimmt.

Anhand der Abbildung 22 ist deutlich zu erkennen, dass in den Organkulturüberständen von mesenterialen Lymphknoten des Colons TLR-defizienter Tiere hoch signifikant niedrigere IFN- γ -Konzentrationen ($p < 0.001$) nachgewiesen werden konnten als bei denen der Wildtyp-Tiere. Die Messung der IFN- γ -Konzentrationen in Colonkulturüberständen ergab keinen Unterschied zwischen den TLR-defizienten Tieren und den Wildtyp-Tieren (Daten hier nicht gezeigt).

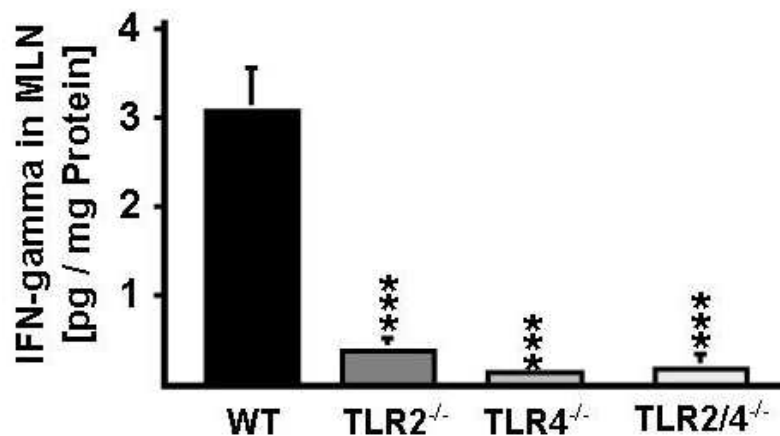


Abbildung 22: IFN- γ -Konzentrationen in Organkulturüberständen von Colon-drainierten MLNs von Wildtyp- (schwarzer Balken, $n=3$), TLR2^{-/-} (dunkelgrauer Balken, $n=4$), TLR4^{-/-} (hellgrauer Balken, $n=5$) und TLR2/4^{-/-}-Tieren (weißer Balken, $n=4$) mit Colitis an Tag 8 nach siebentägiger DSS-Behandlung. Angegeben sind Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzniveaus. Die Signifikanzniveaus wurden mittels Student's t-test bestimmt (** $p < 0.001$ im Vergleich zum Wildtyp). Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Zusammenfassend erklären die erhobenen Zytokindaten eine vermehrte Immunantwort mit daraus resultierender erhöhter entzündlicher Aktivität im Colon der Wildtyp-Tiere, welche sich sowohl histopathologisch in ausgeprägten morphologischen Veränderungen des Colons als auch anhand des erhöhten klinischen Ausmaßes im Vergleich zu den TLR-defizienten Tieren widerspiegelt.

3.3 Einfluss von LBP-Defizienz auf die Darmflora bei DSS-Colitis

Die bisherigen Versuche im DSS-Colitis-Modells konnten eine TLR-Abhängigkeit in Hinsicht auf entzündungsassoziierte Veränderungen der Colonflora zeigen. Die *E.coli*-Konzentration im Darmlumen der Wildtyp-Tiere war erhöht. Weiterführend sollte nun die Rolle von LPS als Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien auf die Zusammensetzung der Colonflora im entzündeten Zustand untersucht werden. Dies erfolgte anhand von LBP-defizienten Mäusen, verglichen mit BALB/c-Mäusen als Kontrolltiere. Analog zu den bisherigen Versuchen wurden ebenfalls das klinische und histopathologische Ausmaß der Entzündung bestimmt sowie Zytokin-Konzentrationen in MLNs gemessen.

3.3.1 Analyse der Darmflora im Entzündungsmodell des Colons bei LBP defizienten Tieren mit DSS-Colitis

Eine erneute kulturelle Analyse der Colonflora bei gesunden und an DSS-Colitis erkrankten LBP-defizienten Tieren zeigte einen signifikant geringeren Konzentrationsanstieg von kommensalen *E.coli* im Colonlumen von DSS-behandelten LBP-defizienten Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren mit DSS-Colitis an Tag 8 nach Beginn der DSS-Behandlung. Die Differenz betrug etwa zwei logarithmische Stufen (* $p < 0.05$). Es konnte auch diesmal ein *E.coli*-Konzentrationsanstieg vom gesunden zum an Colitis erkrankten Zustand, unabhängig von Genotyp, nachgewiesen werden. Der *E.coli*-Konzentrationsanstieg der LBP-defizienten Tiere fiel signifikant geringer aus. Die Veränderungen der Konzentrationen der Enterokokken, Laktobazillen, *Bacteroides/Prevotella spp.* und Clostridien im entzündeten Zustand waren sowohl bei den Wildtyp-Mäusen als auch bei den LBP-defizienten Mäusen in etwa vergleichbar.

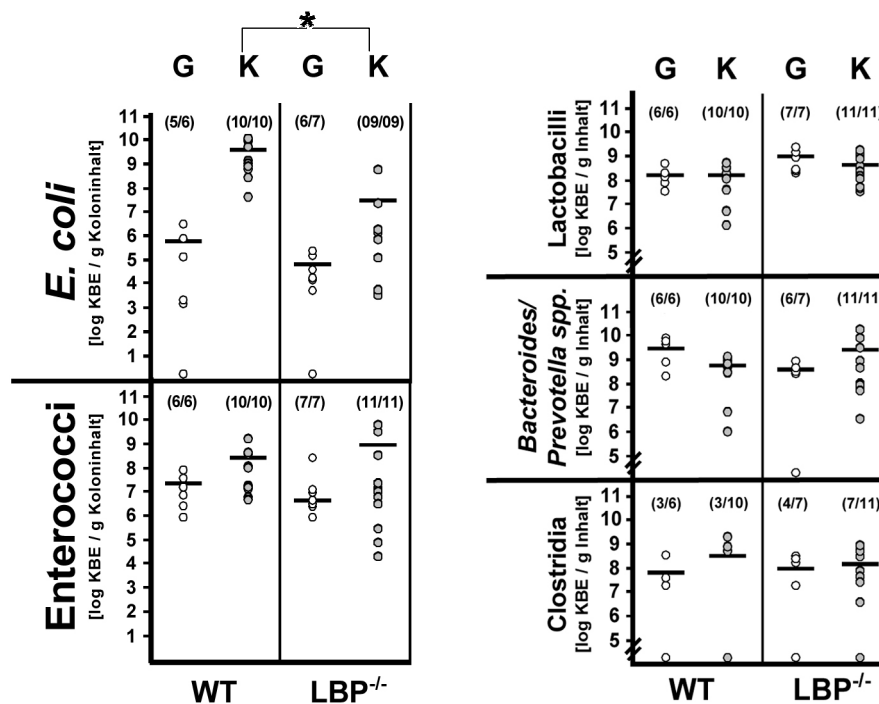


Abbildung 23: Kulturelle Analysen der Colonflora von gesunden (G, weiße Punkte) und erkrankten (K, graue Punkte) LBP-defizienten Tieren verglichen mit Wildtyp-Kontrollen an Tag 8 nach siebentägiger DSS-Gabe. Die Daten sind in log KBE/g Coloninhalt angegeben. A: Dargestellt sind die Werte für *E.coli* und *Enterococcus spp.* und in B: *Lactobacillus spp.*, *Bacteroides/Prevotella spp.* und *Clostridium spp.*. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Mäuse mit Bakteriennachweis pro Gesamtzahl der Versuchstiere in der jeweiligen Gruppe an. Angegeben sind Einzelwerte und Mediane; Signifikanzniveaus wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt (* $p < 0.05$ im Vergleich zum kranken Wildtyp). Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Versuchen.

Zusammenfassend wurde ein signifikanter Anstieg der *E.coli*-Konzentration im Colon an DSS-Colitis erkrankten Wildtyp- und LBP-defizienten Tieren gezeigt, der den Ergebnissen der TLR-defizienten Tiere im Colitis-Modell entspricht. Es konnte mit diesem Versuch ein LBP-abhängiger Unterschied zu den Wildtyp-Tieren gezeigt werden, da LBP-defiziente Tiere einen signifikant geringeren Anstieg der *E.coli*-Konzentration im entzündeten Zustand aufweisen als Wildtyp-Tiere. Somit wurde zusätzlich zur TLR-Abhängigkeit auch der Einfluss von LBP als TLR4-Ligand gram-negativer Bakterien auf die Zusammensetzung der Colonflora im entzündeten Zustand bewiesen.

3.3.1.1 LBP-abhängige Translokation von Bakterien

Es sollte nun anhand LBP-defizienter Tiere untersucht werden, ob eine LBP-abhängige Translokation von Bakterien im DSS-Colitismodell in andere Organsysteme erfolgte.

In Tabelle 9 ist zu erkennen, dass in beiden gesunden Tiergruppen in keinem der untersuchten Organe ein Bakterienwachstum nachgewiesen werden konnte. Bei allen an DSS-Colitis erkrankten BALB/c-Tieren konnten in den Organkulturen der MLNs ein Wachstum von gram-negativen Bakterien gezeigt werden. Leber- und Milzkulturen waren steril. Im Gegensatz dazu wurden bei den LBP-defizienten an DSS-Colitis erkrankten Tieren nur bei einem von sechs Tieren translozierte gram-negative Bakterien in den Organüberständen der MLN nachgewiesen werden. Bei einem Tier konnten zusätzlich gram-positive Stäbchen gezeigt werden. Die Milzkulturen waren auch bei den LBP-defizienten Tieren steril, bei zwei von sechs Tieren wurden gram-positive Stäbchen in der Leber gefunden.

	BALB/c (DSS)	LBP-/- (DSS)	BALB/c (gesund)	LBP-/- (gesund)
positive MLN -Kultur in %	100 (5/5)	33% (2/6)	0	0
Bakterienspezies in MLN	<i>E.coli</i> (5)	<i>E.coli</i> (1), gram-pos.Stb.(1)		
positive Milz -Kultur in %	0	0	0	0
Bakterienspezies in Milz				
positive Leber -Kultur in %	0	33% (2/6)	0	0
Bakterienspezies in Leber		Gram-pos.Stb.(2)		

Tabelle 9: Translokation bei gesunden und an DSS-Colitis erkrankten BALB/c-Wildtyp- und LBP-defizienten Tieren. MLN: mesenteriale Lymphknoten, gram-pos.Stb.: gram-positive Stäbchen. Die Häufigkeiten positiver kultureller Nachweise sind in Prozent dargestellt. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Mäuse mit Bakteriennachweis pro Anzahl aller Versuchstiere in der entsprechenden Gruppe an.

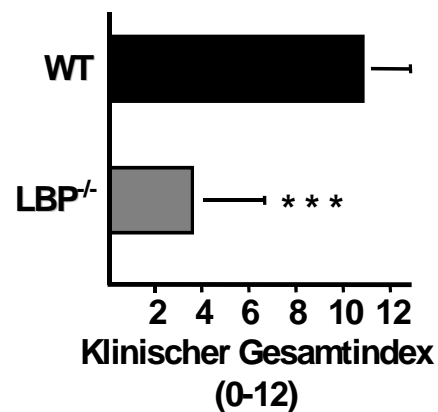
Zusammenfassend kann eine höhere Translokationsrate gram-negativer Bakterien in lokalen mesenterialen Lymphknoten bei erkrankten BALB/c-Tieren und eine Translokation gram-positiver Stäbchen in MLN und Leber bei erkrankten LBP-defizienten Tieren beobachtet werden.

3.3.2 Klinisches Ausmaß der DSS-Colitis LBP-defizienter Tiere

Um einen möglichen Einfluss von LPS bzw. LBP auf die Ausprägung einer Colitis zu untersuchen, wurden LBP-defiziente Tiere im DSS-induzierten Colitismodell klinisch

untersucht und mit BALB/c-Kontrolltieren verglichen. Nach einer 7-tägigen DSS-Behandlung wiesen die Kontroll-Tiere ausgeprägte Symptome einer Colitis mit einem klinischen Gesamtindex von 10.8 ± 1.7 auf. Die LBP-defizienten Tiere hingegen wiesen eine hoch signifikant ($p < 0.001$) geringere klinische Ausprägung einer Colitis mit einem klinischen Gesamtindex von 3.7 ± 2.7 im Vergleich zu BALB/c-Kontrolltieren auf.

Abbildung 24: Dargestellt ist der klinische Gesamtindex an Tag 8 nach 7-tägiger DSS-Behandlung bei BALB/c-Wildtypen (schwarzer Balken) und LBP-defizienten Tieren (grauer Balken). Klinische Parameter wurden täglich überwacht. Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Standardabweichungen und Mittelwerte. Signifikanzniveaus wurden mittels Student's t-test (** $p < 0.001$) bestimmt.



Diese Ergebnisse verdeutlichen einen möglichen Einfluss von LPS bzw. LBP an der Übertragung von gram-negativen Bakterien im angeborenen Immunsystem im Zusammenhang mit der Auslösung einer Colitis.

3.3.3 Ausprägung der Histopathologie LBP-defizienter Tiere mit DSS-Colitis

Eine mögliche LBP-Abhängigkeit sollte nun weitergehend im Hinblick auf die Ausprägung der Histopathologie anhand LBP-defizienter Tiere mit DSS-Colitis untersucht werden. HE-gefärbte Colonschnitte wurden von zwei unabhängigen Pathologen (C.L. und H.A.L.) analysiert und einem standardisierten histologischen Punktesystem (Siegmond B *et al.* 2001) zugeordnet. LBP-defiziente Tiere und Wildtyp-Tiere unterscheiden sich nicht hinsichtlich der Schwere histopathologischer Veränderungen im Colon an Tag 8. Das histopathologische Ausmaß beider Tiergruppen ist durch eine tiefe Zerstörung der Mukosa gekennzeichnet (Histologischer "Score" von 4).

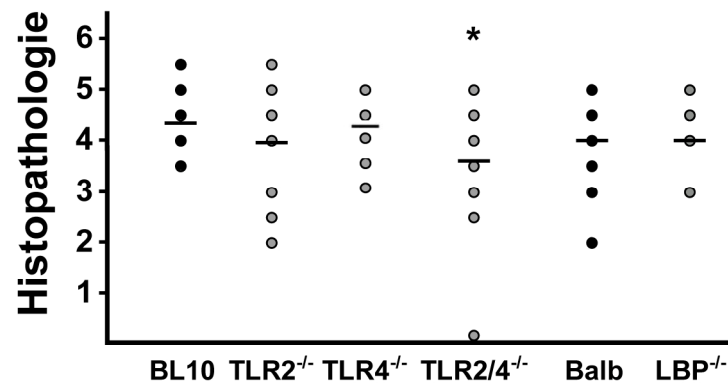


Abbildung 25: Histopathologische Veränderungen im Colon bei BALB/c-Kontrolltieren (n= 5) und LBP-defizienten Tieren (n= 6) verglichen mit C57BL/10-Kontrolltieren und TLR-defizienten Tieren an Tag 8 nach siebentägiger DSS-Behandlung. Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten. Angegeben sind Einzelwerte und Mittelwertbalken; Signifikanzniveaus wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt (* $p < 0.05$ im Vergleich zum Wildtyp).

Es konnte demnach keine LBP-Abhängigkeit der Histopathologie im Colitis-Modell nachgewiesen werden, selbst wenn eine Abhängigkeit im klinischen Ausmaß und auf die Zusammensetzung der Colonflora zu finden ist. Im Gesamtüberblick wiesen allein die TLR2/4-defizienten Tiere ein signifikant geringeres histopathologisches Ausmaß im Vergleich zu den Kontrolltieren auf.

3.3.3.1 Zytokin-Konzentrationen in Organüberständen LBP-defizienter Tiere

Analog zu den Untersuchungen der TLR-defizienten Tiere im Colitis-Modell wurden ebenso bei LBP-defizienten Tieren die IFN- γ -Konzentration in den Organüberständen von MLN gemessen.

Anhand der folgenden Abbildung ist zu erkennen, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den IFN- γ -Konzentrationen in MLN-Kulturüberständen von BALB/c-Kontrolltieren und LBP-defizienten Tieren mit Colitis bestand.

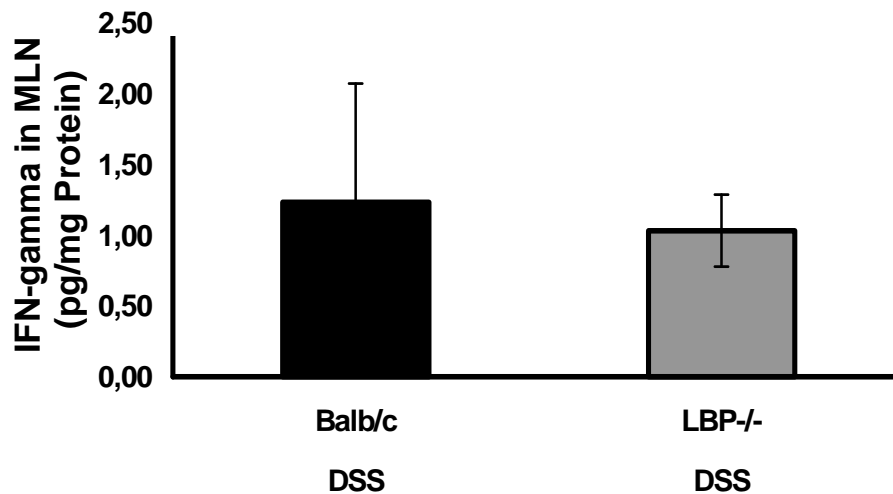


Abbildung 26: IFN-gamma Konzentrationen in MLN-Kulturüberständen von BALB/c-Wildtyp-Tieren (schwarzer Balken) und LBP-/-Tieren (grauer Balken). Die Werte sind in pg/mg Protein dargestellt. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass ein signifikant geringeres klinisches Ausmaß der Colitis bei LBP-defizienten Tieren zu beobachten ist, auch wenn die anhand der IFN- γ -Konzentration in MLN gemessene entzündliche Aktivität und das Ausmaß der Histopathologie keinen signifikanten Unterschied bestätigten.

In Zusammenschau aller Ergebnisse konnte kein Einfluss von LBP als Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien auf die Immunpathogenese einer DSS-Colitis nachgewiesen werden. Es konnte hingegen gezeigt werden, dass TLR-Rezeptoren wesentlich zur die Immunpathologie einer DSS-Colitis beitragen.

4 Diskussion

4.1 Der Einfluss von kommensalen Darmbakterien im *T.gondii*-induzierten Ileitis-Modell und der DSS-Colitis bei TLR-defizienten Tieren

Eine vorherrschende Theorie zur Erklärung der Entwicklung einer CED beschreibt eine überschießende Immunantwort des angeborenen Immunsystems auf die kommensale intestinale Flora in genetisch suszeptiblen Individuen (Farrell RJ *et al.* 2002, Bamias G *et al.* 2005, Sartor RB 2005). Dementsprechend spielt das Vorhandensein von kommensalen Bakterien im Gastrointestinaltrakt eine wichtige Rolle in der Pathogenese von CED (Podolsky DK 2002). Die kulturelle umfangreiche Florenanalyse dieser Arbeit zeigte bei Wildtyp- und TLR-defizienten Tieren einen signifikanten Anstieg von kommensalen *E.coli* in einer *T.gondii*-induzierten Ileitis, unabhängig vom Schweregrad der intestinalen Entzündung. Der Anteil gram-positiver Stäbchen, wie Laktobazillen und Clostridien, war bei allen erkrankten Tiergruppen leicht vermindert, wobei die Enterokokken und *Bacteroides/Prevotella spp.* geringgradig erhöht waren (Abb.10). Andere Arbeiten bestätigen unsere Befunde, dass ein Anstieg insbesondere der Anaerobier *Bacteroides spp.* und der Aerobier *Enterobacteriaceae* v.a. *E.coli* bei Patienten mit M.Crohn zu finden ist, auch wenn die bakterielle Zusammensetzung in Proben von Patienten mit CED und den Kontrollen identisch ist (Swidsinski A *et al.* 2002). Darfeuille-Michaud *et al.* zeigten anhand von *in vitro* Versuchen, dass adhesive *E.coli*-Stämme in Epithelzellen von Patienten mit CED signifikant erhöht sind im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten (Darfeuille-Michaud A *et al.* 1998).

E.coli besitzt im Gegensatz zu Laktobazillen ein ausgeprägtes proinflammatorisches Potential in *T.gondii*-infizierten gnotobiotischen Mäusen (Heimesaat MM *et al.* 2006), das im Weiteren ebenso bei der experimentellen Colitis beobachtet werden konnte (Waidmann M *et al.* 2003, Dieleman LA *et al.* 1998, 2004, Sartor RB 2005). Da *E.coli* dieses stark proinflammatorische Potential besitzt, wurde demzufolge auch das Bakterienprodukt LPS gram-negativer Bakterien auf die Fähigkeit untersucht, eine Ileitis hervorzurufen (Heimesaat MM *et al.* 2006). Der TLR4-Ligand gramnegativer Bakterien, LPS, spielt eine entscheidene Rolle bei der Induktion und Verstärkung einer Dünndarmentzündung. Um den Beitrag einzelner Bakterienspezies und deren

Bestandteile an TLR-defizienten Tieren zu untersuchen, wurden zunächst *T.gondii*-infizierte gnotobiotische Tiere ohne nachweisbare Flora generiert. Diese wiesen keinerlei histopathologische Veränderungen im Bereich des terminalen Ileums auf (Abb.16/17). Nach definierter *E.coli*-Rekolonisierung betrug die *E.coli*-Last im Ileum an Tag 9 bei allen gnotobiotischen Tiergruppen unabhängig vom TLR-Genotyp 10^9 - 10^{10} KBE/g Darminhalt (Abb.16A). Histopathologisch wiesen mit *E.coli* rekolonisierte TLR4- und TLR2/4-defiziente Tiere an Tag 9 p.i. eine signifikant geringere Ausprägung der Ileitis im Vergleich zu Wildtyp- bzw. TLR2-defizienten Tieren auf. Die mit *E.coli* Lipid A behandelten TLR4-defizienten Tiere zeigten eine signifikant geringere Ausprägung der Histopathologie als die entsprechend behandelten Wildtyp-Tiere im Ileitis-Modell, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den LPS behandelten Tieren und den *E.coli* rekolonisierten Tieren bestand (Abb.17). Demnach trugen sowohl *E.coli* als auch TLR4 wesentlich zur intestinalen Immunpathologie einer terminalen Ileitis bei. Desweiteren konnte an Tag 9 p.i. bei Wildtyp- und TLR-defizienten Tieren kommensale *E.coli* in MLNs und Milzen unabhängig vom TLR-Genotyp in vergleichbarer Häufigkeit bestimmt werden, so dass weder TLR2 noch TLR4 für die Limitierung der bakteriellen Translokation im Entzündungsmodell der *T.gondii*-induzierten Ileitis erforderlich zu sein scheint. In diesem Zusammenhang zeigten verminderte IFN- γ - und NO-Konzentrationen im Ileum TLR4-defizienter Mäuse, dass translozierte *E.coli* eine intestinale Gewebedestruktion und das Ausmaß der Entzündung über LPS-vermittelte Anregung von Entzündungsmediatoren wie IFN- γ - und NO verstärken. Dieleman *et al.* zeigten als weitere Dysfunktion des Immunsystems bei CED eine erhöhte Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen von intestinalen Epithelzellen und mukosalen Immunzellen (Stadnyk AW 2002, Dieleman LA *et al.* 2004). Diese Entzündungsmediatoren werden in Experimenten des akuten Ileitismodells von T-Lymphozyten der Th1-Antwort (CD4- oder CD8-T-Lymphozyten) ausgeschüttet (Liesenfeld O *et al.* 1996, 1999, 2002). Demzufolge könnten spezifische Veränderungen der intestinalen Bakterienflora oder eine Blockade bzw. Abschwächung des LPS-vermittelten Signalübertragungsweges neue Behandlungsmöglichkeiten oder Präventionsstrategien bei CED ermöglichen.

Die Möglichkeit, den LPS-vermittelten Übertragungsweg zu blockieren, wurde in dieser Arbeit mit dem nicht resorbierbaren Antibiotikum und LPS-Antagonisten Polymyxin B (Tsuzuki H *et al.* 2001, Tsubery H *et al.* 2005) mit sowohl prophylaktischem als auch therapeutischem Behandlungsziel untersucht. Beide Behandlungsregime führten zu

einer geringergradigen Entzündung des Ileums und zu höheren Überlebensraten der so behandelten Mäuse im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren (Abb.18). Kulturelle Untersuchungen der Darmflora der mit Polymyxin-behandelten Tiere bestätigten an Tag 9 p.i. eine selektive Eradikation von *E.coli* (Daten hier nicht gezeigt; Heimesaat MM *et al.* 2007). Damit konnte der TLR4/LPS-vermittelte Signalweg im vorliegenden Modell bestätigt werden.

Ähnliche Beobachtungen konnten ebenfalls im akuten DSS-Colitis-Modell gezeigt werden. Eine umfangreiche Analyse der Colonflora zeigte nach 7-tägiger DSS-Behandlung, dass eine Zerstörung der Barrierefunktion der Colonschleimhaut mit einem signifikanten Anstieg von *E.coli* bei C57BL/10-Wildtyp-Tieren, nicht jedoch bei TLR-defizienten Tieren, vergesellschaftet war (Abb. 19). Bei anderen Bakteriengruppen wie Enterokokken, Laktobazillen, *Bacteroides/Prevotella spp.* und Clostridien waren keine entzündungsbedingten Veränderungen zu erkennen. Ausschließlich die Gruppe der DSS-behandelten TLR2/4-defizienten Tiere wiesen eine schwach signifikant geringere Bakterienlast an *Bacteroides/Prevotella spp.* und *Enterococcus spp.* im Vergleich zu erkrankten Wildtyp-Tieren mit Colitis an Tag 8 auf. In Zusammenschau der komplexen Florenanalyse mittels molekularer Methoden, die neben kultivierbaren auch schwer bzw. nicht kultivierbare Spezies erfassen, konnte gezeigt werden, dass die DSS-induzierte Colitis mehrfach reproduzierbar durch einen Verlust der bakteriellen Diversität gekennzeichnet war. Dieser Verlust der Diversität der Dickdarmflora war hauptsächlich durch einen Anstieg der gram-negativen Bakterien charakterisiert, die als *E.coli* identifiziert werden konnten. Dieser Verlust der bakteriellen Diversität war bei TLR2- und/oder 4 defizienten Tieren weniger ausgeprägt (Abb.19), wobei einerseits ein geringerer Anstieg der *E.coli*-Konzentrationen im Colonlumen im Vergleich zu den erkrankten Wildtyp-Tieren und andererseits geringere makroskopische Symptome zu beobachten waren (Abb.20). So könnte *E.coli* möglicherweise als sensitiver Biomarker zur Bestimmung einer Colitis mit hohem Schweregrad dienen.

Bakterielle intestinale Überwucherungen mit Enterobakterien werden bei verschiedenen intestinalen Gewebeschäden beobachtet (Husebye E 2005). Wie bereits bei dem *T.gondii*-Ileitis-Modell beobachtet, beruht diese bakterielle Florenverschiebung zugunsten der Enterobakterien vermutlich auf einer Zerstörung der mukosalen Physiologie und der damit verbundenen Barrierschutzfunktion.

Eine hohe Anzahl von *E.coli* wurde vermehrt bei Entzündungen des Colons von IL-2^{-/-} Mäusen beobachtet (Schuppler M *et al.* 2004). Auch in gnotobiotischen IL-10^{-/-} und IL-2^{-/-} Mäusen konnte durch das Vorhandensein von *E.coli* und anderen Darmbakterien wie *Enterococcus faecalis* eine Colitis T-Zell-vermittelt ausgelöst und verstärkt werden (Waidmann M *et al.* 2003, Kim SC *et al.* 2005, 2007, Ruiz PA *et al.* 2005, 2006). Das Fehlen des protektiven TGF-beta-Übertragungsweges und das Vorhandensein von TLR2-vermittelten proinflammatorischen Genexpressionen in intestinalen Epithelzellen von *Enterococcus faecalis*-monoassoziierten IL-10^{-/-} Mäusen lassen vermuten, dass IL-10 und TGF-beta eine entscheidene Rolle bei der Erhaltung des Gleichgewichts von intestinalen Epithelzellen im Zusammenspiel mit kommensalen Darmbakterien spielen (Ruiz PA *et al.* 2006). Ein wichtiger Beitrag der kommensalen Bakterien zur Ausprägung einer DSS-Colitis konnte durch verminderte Entzündungszeichen nach antibiotischer Behandlung gezeigt werden (Hans W *et al.* 2000, Rath HC *et al.* 2001). Zur Ausbildung einer spontanen Colitis bei HLA-B27-transgenen Ratten war das Vorhandensein der kommensalen Darmflora erforderlich. Dagegen entwickelte sich bei in einem keimfreien Umfeld gehaltenen Tieren keine Colitis. Wurden die Tiere im keimfreien Umfeld jedoch mit kommensalen Bakterien definiert kolonisiert, konnte je nach Bakterienspezies eine experimentelle Colitis hervorgerufen werden, wobei v.a. *Bacteroides* spp. eine entscheidende Rolle an der Auslösung einer Colitis spielten (Rath HC *et al.* 1996, 1999, 2001). Interessanterweise zeigten immundefiziente Mäuse mit einer induzierten DSS-Colitis ebenso wie immunkompetente BALB/c-Mäuse schwere Entzündungszeichen, wobei nur geringste entzündliche Veränderungen der Colonschleimhaut bei immundefizienten gnotobiotischen Mäusen nach DSS-Applikation beobachtet wurden (Tlaskalova-Hogenova HL *et al.* 2005).

Das entzündliche Potential individueller Bakterienspezies kann dabei, wie bereits bei der *T.gondii*-induzierten Ileitis beschrieben, sehr unterschiedlich sein. Einerseits besitzt *E.coli* ein stark colitogenes Potential nach Kolonisierung von keimfreien IL-2-defizienten Mäusen, wobei eine Kolonisierung mit *B.vulgatus* einen protektiven Effekt bewirkt und sogar die Auslösung einer *E.coli*-bedingten Colitis in Form einer Co-Kolonisierung verhindern kann. Der Stamm *E.coli* Nissle 1917 induzierte allerdings keine Colitis (Waidmann M *et al.* 2003). Eine Behandlung von Mäusen mit induzierter DSS-Colitis mit *E.coli* Nissle 1917 bewirkt eine Abschwächung der Entzündung durch eine verminderte Bildung von proinflammatorischen Zytokinen (Schultz M *et al.* 2004, 2008). Dieser protektive Effekt von *E.coli* Nissle 1917 scheint TLR2- und TLR4- abhängig zu sein

(Sturm A *et al.* 2005, Grabig A *et al.* 2006). Das entzündliche Potential von *E.coli* ist demzufolge stammabhängig.

Über welche Mechanismen *E.coli* entzündungsverstärkend wirkt, ist bisher ungeklärt. Unsere Untersuchungen zeigten, dass eine verminderte Ausprägung der Colitis bei TLR2-,TLR4- und TLR2/4-defizienten Tieren zu beobachten war. Anhand von LBP-defizienten-Tieren wurde gezeigt, dass LPS als Bakterienprodukt gram-negativer Bakterien und TLR4-Ligand eine wichtige Rolle im Hinblick auf die Zusammensetzung der Colonflora im entzündeten Zustand spielt, da ein signifikanter Anstieg der *E.coli*-Konzentration im Colon an DSS-Colitis erkrankten Wildtyp- und LBP-defizienten Tieren gezeigt werden konnte, wobei LBP-defiziente Tiere einen signifikant geringeren Anstieg der *E.coli*-Konzentration im entzündeten Zustand im Gegensatz zu den Wildtyp-Tieren aufwiesen (Abb. 23). Somit wurde zusätzlich zur TLR-Abhängigkeit auch der Einfluss von LBP als TLR4-Ligand gram-negativer Bakterien auf die Zusammensetzung der Colonflora im entzündeten Zustand bewiesen. Dementsprechend ist der Anstieg von *E.coli* als ein allgemeiner proinflammatorischer TLR/LBP-unabhängiger Marker zu werten und nicht von einem genetischen Hintergrund abhängig.

Zusammenfassend konnte eine Akkumulation von gram-negativen Bakterien, insbesondere *E.coli*, TLR-unabhängig im Ileum nachgewiesen werden. Durch eine Induktion proinflammatorischer Zytokine wie IFN- γ und NO tragen sie so zum ilealen Entzündungsprozess erheblich bei. Dieser Entzündungsprozess wird im *T.gondii*-Modell über den TLR4-Signalweg verstärkt. Die entscheidende Rolle des LPS gram-negativer Bakterien an der Beteiligung der Auslösung und Verstärkung der Ileitis wurde anhand der Behandlung gnotobiotischer Tiere mit *E.coli*-Isolat sowie *E.coli*-Lipid A verdeutlicht. Die Blockade des TLR4/LPS-vermittelten Signalweges mittels Polymyxin B wies eine verminderte Histo- und Immunpathologie sowohl in prophylaktischem als auch therapeutischem Behandlungsregime auf.

Im DSS-Colitismodell konnte eine Assoziation zwischen der Akkumulation von *E.coli* mit einem stark entzündlichen Potential und der Colitisinduktion beobachtet werden. Das Erkennen des Zusammenhangs zwischen der intestinalen Flora und der Entwicklung einer CED kann zu weiteren Studien mit möglichen Therapieansätzen führen. Ein Angriffspunkt weiterer Projekte könnte durchaus die Veränderung der luminalen Bakterienflora darstellen, indem v.a. Pro- und/oder Präbiotika und deren Modulation der Darmflora untersucht werden (siehe Kapitel 4.3).

4.2 Der Einfluss von Toll-like Rezeptoren auf entzündliche Darmerkrankungen

4.2.1 Der Einfluss von Toll-like Rezeptoren im *T.gondii*-induzierten Ileitis-Modell

Der initiale Kontakt zwischen pathogenen und kommensalen Mikroorganismen und Immunzellen im Darm wird durch Rezeptoren des angeborenen Immunsystems vermittelt, die als „pathogen recognition receptors“ (PRRs) bezeichnet werden (MacDonald TT, Monteleone G 2005). TLRs gehören zur Familie der PRRs, die molekulare Produkte von Mikroorganismen wie LPS (Lipopolysaccharide) und LTA (Lipoteichonsäure) via TLR4 und TLR2 erkennen (Takeda K *et al.* 2005).

Es ist bisher unklar, wie das angeborene Immunsystem zwischen obligat pathogenen und kommensalen Bakterien differenzieren kann. Erfolgt diese Differenzierung möglicherweise über TLRs, spielt die TLR4-vermittelte LPS-Übertragung in menschlichen CED eine entscheidende Rolle?

Unsere Ergebnisse zeigen, dass TLR4- und TLR2/4-defiziente Tiere sowohl ein hoch signifikantes längeres Überleben (Abb.11B) als auch eine verminderte Ausprägung der Histopathologie im Vergleich zu den Wildtyp- und TLR2-defizienten Tieren im Ileitis-Modell aufwiesen (Abb.12/13). Immunpathologische Befunde wie z.B. eine signifikant geringere IFN- γ - und NO-Konzentration bei an Ileitis erkrankten TLR4- und TLR2/4-defizienten Tieren gingen ebenfalls mit einer verminderten Ausprägung einer intestinalen Entzündung verglichen mit erkrankten Wildtyp- und TLR2-defizienten Mäusen an Tag 9 p.i. einher (Abb.15). Sowohl IFN- γ als auch NO repräsentieren Entzündungsmediatoren bei Gewebeschäden im Ileum (Liesenfeld O *et al.* 1999). Die nachgewiesene vermehrte Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie NO und IFN- γ aus antigenpräsentierenden Zellen bei Wildtyp-Tieren mit Ileitis unterstützt die Hypothese, dass translozierte *E.coli* möglicherweise die intestinale Entzündungsreaktion über einen LPS-vermittelten Signalweg verstärken könnten.

Die Dissemination von *T.gondii* im Ileum wurde weder durch eine von TLR2- noch TLR4-Defizienz der Maus beeinflusst, da sich die Anzahl der Tachyzoiten im Dünndarm zwischen den einzelnen Tiergruppen nicht unterschied und dies somit als eine mögliche Ursache der unterschiedlichen immunpathologischen und histologischen Befunde der TLR4 und TLR2/4-defizienten Tiere gegenüber den Wildtyp- und TLR2-defizienten Tieren ausgeschlossen werden konnte (Abb.14).

Die Darmflorenanalyse TLR-defizienter Tiere mit Ileitis ergaben unabhängig der TLR-Defizienz einen intraluminalen Konzentrationsanstieg gram-negativer Bakterien, insbesondere von *E.coli*. Dennoch wiesen TLR-4-defiziente Tiere ein signifikant längeres Überleben im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren auf, was auf eine entscheidende Rolle von TLR4 an der Signalübertragung von pathogenen gram-negativen Bakterien zu schließen lässt.

Neben der genetischen Disposition (siehe Kapitel 4.2.3) wurden immunologische Mechanismen als Ursache an der Auslösung von CED anhand der Signalübertragungswege von unterschiedlichen Adaptermolekülen untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von TLR2 und TLR4 auf die Ausprägung einer *T.gondii*-induzierten Ileitis untersucht. Weitere Adaptermoleküle wie z.B. MyD88 und weitere TLRs wurden in anderen Arbeiten im Hinblick auf die Ausprägung dieser Immunpathologie untersucht (Scanga CA *et al.* 2002, Bennouna S *et al.* 2006, Yarovinsky F *et.al.* 2008, Khan IA 2007).

MyD88 spielt eine entscheidene Rolle bei der zellulären Immunantwort des Wirtes auf eine orale *T.gondii*-Infektion, da eine unkontrollierte Vermehrung der Parasiten in *T.gondii*-infizierten MyD88-defizienten Tieren und eine verminderte IL-12-Bildung MyD88-abhängig nachgewiesen werden konnte. *In vitro*-Versuche konnten belegen, dass die IL-12-Produktion als Immunantwort auf lösliche *T.gondii*-Antigene in peritonealen Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und dendritischen Zellen (DCs) der Milz bei MyD88-defizienten Mäusen im Vergleich zur IL-12-Bildung antigenpräsentierender Zellen der Kontrolltiere stark vermindert ausfällt, wobei dendritische Zellen TLR2- und TLR4-defizienter Tiere eine normale IL-12-Antwort auslösen (Scanga CA *et al.* 2002). Die IL-12-abhängige IFN- γ -Produktion fiel folglich bei den MyD88-defizienten Tieren geringer aus.

Neuere Ergebnisse zeigen, dass die angeborenen Abwehrmechanismen des Wirtes auf eine orale *T.gondii*-Infektion zwar MyD88-abhängig erfolgen, jedoch die Beeinflussung des erworbenen Immunsystems durch intraperitoneale Applikation eines avirulenten *Toxoplasma-gondii*-Stammes MyD88-unabhängig ist (Sukhumavasi W *et al.* 2008).

Eine Beteiligung von TLR9 an einer Th1-Typ angeborenen Immunantwort auf eine orale *T.gondii*-Infektion wird aufgrund einer TLR9-abhängigen Expansion von DCs in mesenterialen Lymphknoten infizierter Wildtyp-Mäuse verglichen mit TLR9-defizienten Mäusen (Minns LA *et al.* 2006) und aufgrund einer verminderten Ausprägung von

Entzündungszeichen bei TLR9-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (Minns LA *et al.* 2006, Khan IA 2007) vermutet.

Weitere Studien zeigen eine deutlich verringerte Ausschüttung vom proinflammatorischen IL-12 aus DCs bei TLR11-defizienten Mäusen mit einer systemischen *T.gondii*-Infektion, aber dennoch mit einer erhöhten Parasitenlast im Vergleich zu infizierten Wildtypmäusen (Yarovinsky F *et al.* 2005, 2006). In weiteren Versuchen bei TLR11-defizienten Mäusen wurden die beobachteten Pankreas- und Fettgewebsnekrosen bei *T.gondii*-infizierten Mäusen auf das Fehlen des TLR11 zurückgeführt, so dass die entscheidende Rolle der TLR abhängigen und – unabhängigen Erkennungsmechanismen von pathogenen Erregern im Hinblick auf eine Prävention bei pathogen-induzierten Gewebeerstörungen kritisch hinterfragt werden sollte (Yarovinsky F *et al.* 2008). In diesen Versuchen von Yarovinsky *et al.* konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung der IFN- γ -Ausschüttung über eine TLR-unabhängige Antwort der NK-Zellen erfolgte.

Zusammenfassend ist erkennbar, dass weitere TLR-Signalübertragungswege als die in dieser Arbeit untersuchten TLR2- und TLR4- abhängigen Signalwege das angeborene Immunsystems des Wirtes im Hinblick auf eine *T.gondii*-Infektion beeinflussen. Unsere Untersuchungen zeigten, dass die Immunpathologie im *T.gondii*-induzierten Ileitis-Modell der Maus durch einen Anstieg der kommensalen *E.coli*-Konzentration im Darmlumen hervorgerufen wird, welche wiederum via TLR4 immunpathologisch getriggert wird.

4.2.2 Der Einfluss von Toll-like Rezeptoren im DSS-Colitis-Modell

Anhand von dem von Okayasu *et al.* (Okayasu I *et al.* 1990) etabliertem DSS-Modell der Maus wurden mehrere Studien zur Untersuchung der Rolle von bakteriellen Bestandteilen und des angeborenen Immunsystems im Hinblick auf eine verstärkte intestinale Entzündungsreaktion kontrovers diskutiert (Dieleman LA *et al.* 2004, Ohkawara T *et al.* 2005).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass DSS-induzierte histopathologische Veränderungen in Form von tiefen Gewebeschäden im Colon sowohl bei Wildtyp-Mäusen als auch bei TLR2- und TLR4-defizienten Tieren im gleichen Ausmaß vorhanden sind. Nur bei TLR2/4-defizienten Tieren war ein signifikant ($p < 0.05$) geringeres Ausmaß der pathologischen Veränderungen im Vergleich zu TLR2-, TLR4-defizienten und Wildtyp-Mäusen zu erkennen. Somit konnte histopathologisch kein TLR-bedingter protektiver

Effekt auf die DSS-Colitis nachgewiesen werden. Möglicherweise spielt nur die synergistische oder additive Wirkung von TLR2 und TLR4 eine entscheidende Rolle wie anhand des signifikant geringeren pathologischen Ausmaßes der TLR2/4-defizienten Tieren mit DSS-Colitis gezeigt werden konnte. Andererseits sind in unseren Versuchen der akuten DSS-Colitis signifikant ($p < 0.001$) geringere klinische und makroskopische Entzündungszeichen bei TLR2-, TLR-4 und TLR2/4-defizienten Tieren nachzuweisen. Rakoff-Nahoum, Medzhitov *et al.* wiesen im Gegensatz zu unseren Ergebnissen nach, dass bei TLR2- und TLR4-defizienten Tieren eine höhere Mortalität und intestinale Pathologie im Vergleich zu Wildtyp-Tieren nach DSS-Gabe besteht (Rakoff-Nahoum S *et al.* 2004; Araki *et al.* 2005). In deren Studie wiesen die Wildtyp-Kontrolltiere keine makroskopischen oder mikroskopischen Entzündungszeichen auf. Die abweichenden Ergebnisse könnten einerseits aufgrund des unterschiedlichen genetischen Hintergrundes (F2-Generation von 129/svJ x C57BL/6 Kreuzung versus F7-Generation von C57BL/10) oder andererseits aufgrund eines unterschiedlichen Protokolls zur Induktion der DSS-Colitis beruhen. Es wurde ein geringerer prozentualer Anteil von 1,2% bzw. 2% versus 3,5% DSS in unseren Versuchen im Trinkwasser der Tiere für 7 Tage verwendet (Rakoff-Nahoum S *et al.* 2004; Araki A *et al.* 2005). Der DSS-bedingte Epithelschaden beruhe nach Rakoff-Nahoum *et al.* auf einer defekten Gewebeproliferation und Wundheilungsfunktion in TLR-defizienten Tieren, die somit die Intaktheit intestinaler Epithelzellen und die Wechselwirkung körpereigener Erkennungsrezeptoren wie TLRs mit den Bakterienprodukten kommensaler Darmflora zerstören. Die MyD88-abhängige TLR-vermittelte Signalübertragung verursache einen Schutz vor einer erhöhten Mortalität, Morbidität, intestinalen Blutungen und intestinalen Epithelschäden, die durch eine DSS-Colitis hervorgerufen werden. Zur Triggerung der MyD88-abhängigen TLR-vermittelten Signalkaskade werden kommensale Darmbakterien vermutet, die somit einen protektiven Effekt vor direkten intestinalen Epithelschäden entgegen unserer Ergebnisse verantworten. Eine kulturelle Analyse zur Identifizierung der kommensalen Darmflora wurde nicht durchgeführt. Der TLR-vermittelte Schutz vor Epithelschäden erfolge einerseits über die Bildung eines Gleichgewichts von Protektionsfaktoren, indem luminale TLR-Liganden kommensaler Bakterien von TLRs im Colonepithel detektiert werden, oder andererseits über eine TLR-Liganden induzierte Produktion von Protektionsfaktoren infolge eines Epithelschadens. Störungen dieser Interaktionen zwischen kommensalen Bakterien und TLRs können zu einer chronischen Darmentzündung mit Epithelschäden führen, wie sie

bei Patienten mit CED beobachtet werden (Rakoff-Nahoum S *et al.* 2004, 2006). Komponenten des angeborenen Immunsystems sind demnach für regenerative Funktionen im Gastrointestinaltrakt erforderlich. So wird vermutet, dass MyD88-, TLR2- oder TLR4-defiziente Mäuse eine stärkere Ausprägung einer Colitis in Folge einer verminderten Wundheilung entwickelten (Rakoff-Nahoum S *et al.* 2004, Araki A *et al.* 2005). Unterschiedliche Haltungsbedingung der Tiere und eine unterschiedliche Zusammensetzung der kommensalen Darmflora könnten die entscheidene Rolle der grundsätzlich verschiedenen Ergebnisse unserer Untersuchungen verglichen mit den Experimenten von Rakoff-Nahoum *et al.* sein. Sowohl Rakoff-Nahoum *et al.* und auch Fukata *et al.* haben eine verminderte Epithelzellproliferation bei MyD88-defizienten Mäusen (Rakoff-Nahoum S *et al.* 2004, 2006) und eine gesteigerte Apoptose von Epithelzellen nach DSS-induzierten Mukosaschäden beschrieben (Fukata M *et al.* 2005, 2007). Als Mechanismus liege dem eine durch TLR4 induzierte Bildung von Cyclooxygenase 2 (COX2) und Prostaglandin E2 (PGE2) zugrunde, die somit die Regulation von intestinalen Epithelzellen (IEC) und deren Apoptose steuere (Fukata M *et al.* 2007).

Ohkawara *et al.* untersuchten die Rolle von TLR4 an TLR4-defizienten Mäusen nach Induktion einer DSS-Colitis anhand biologischer Marker wie MIF (migration inhibitory factor), MPO (Myeloperoxidase) und TNF- α (tumor necrosis factor α). Die Ausschüttung von TNF- α gemessen mit ELISA in Colonproben war bei Wildtyp-Tieren mit DSS-Colitis signifikant erhöht im Vergleich zu TLR4-defizienten Tieren mit DSS-Colitis. Die Myeloperoxidase-Ausschüttung war sowohl bei den Wildtyp-Mäusen als auch bei den TLR4-defizienten Tieren mit DSS-Colitis im Vergleich zu den naiven Tieren erhöht. Die Expression des MIF war im Colon der TLR4-defizienten Tiere mit DSS-Colitis erhöht, so dass anschließend die Behandlung mit einem MIF-IgG eine signifikante klinische und histologische Besserung der Colitis verursachte (Ohkawara T *et al.* 2005). Diese Untersuchungen lassen vermuten, dass MIF eine entscheidende Rolle unabhängig von der TLR4-Expression in der DSS-Colitisinduktion spielt.

Ortega-Cava *et al.* zeigten interessanterweise eine unterschiedliche Lokalisation der jeweiligen TLR-Expressionen im Colon. Insbesondere konnte eine erhöhte TLR4-Expression im distalen Colon beschrieben werden. Dies ist genau die Lokalisation, an der DSS einen akuten, intraluminalen Epithelschaden verursacht. Zusätzlich konnte in Darmsegmenten nach einer DSS-induzierten Colitis eine vermehrte TLR4-Expression im Vergleich zu gesunden Darmsegmenten bewiesen werden. Diese Korrelation konnte

weder für TLR2, die vorrangig im proximalen Colon, noch für MyD88, deren Expression interessanterweise im gesamten Intestinaltrakt gleichmäßig verteilt vorlag, festgestellt werden. Eine weitere Hypothese wäre somit, dass die Verteilung der PRR-Expressionen (pattern-recognition-Rezeptoren) in der Colonschleimhaut der Maus die Anpassung an die kommensale Darmflora widerspiegelt (Ortega-Cava *et al.* 2003).

In unseren Experimenten identifizieren wir zunächst die für die DSS-Colitis relevanten Veränderungen der kommensalen Darmbakterien als eine Erhöhung der intraluminalen Konzentration von kommensalen *E.coli* an Wildtyp-Tieren und setzten dann gezielt TLR4- versus TLR2-defiziente Mäuse ein, um einen TLR-abhängigen Übertragungsweg zu überprüfen. In den Studien von Rakoff-Nahoum *et al.* wurden unabhängig von der Identifizierung der kommensalen Darmflora eine allgemeine TLR-Abhängigkeit untersucht, die nicht gezielt nach TLR4 ausgerichtet war, da die Versuche vorrangig an MyD88-defizienten oder IL-10- bzw. IL-2- defizienten Tieren durchgeführt wurden. Anhand des Mausmodell einer spontan induzierten Colitis in IL-10 und IL-2 defizienten Mäusen konnte eine Induktion einer pathologischen Th-1-Antwort durch kommensale Darmflora, wie sie auch bei Patienten mit Colitis ulcerosa nachgewiesen wurde, sowohl über eine MyD88-abhängige als auch -unabhängige Signalkaskade ausgelöst werden (Rakoff-Nahoum *et al.* 2006). Dies beweist jedoch nicht, dass diese Induktion auch TLR-abhängig ist. Die MyD88-abhängige Signaltransduktion der kommensalen Darmbakterien könnte möglicherweise TLR-unabhängig über den IL1- oder IL-18-abhängigen Signalweg oder weitere noch unerforschte PRRs (pattern-recognition-Rezeptoren) wie z.B. NLRs (NOD-like receptor) erfolgen (Meylan E *et al.* 2006, Kawai T *et al.* 2007).

In MyD88-defizienten Zellen wurde eine durch LPS induzierte Aktivierung von NF- κ B mit einer verzögerten Kinetik beobachtet. Diese Beobachtung belegte die Existenz eines von MyD88 unabhängigen Weges bei der Signalweiterleitung über LPS. Um diese Signalkette aufzuklären, führten Akira *et al.* eine Subtraktionsanalyse mit aus nicht stimulierten und aus LPS-stimulierten MyD88-defizienten Makrophagen extrahierter RNA durch. Bei dieser Analyse wurden mehrere Gene identifiziert, die von LPS MyD88-unabhängig induziert wurden. Dazu gehörten durch IFN induzierbare Gene wie IP-10 und GARG-16. Weitere Studien zeigten, dass eine LPS-Stimulation zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 führt und dadurch unabhängig von der Signalweiterleitung über MyD88 IFN- β induziert. IFN- β aktiviert wiederum Stat1, woraus schließlich die Induktion mehrerer durch IFN induzierbarer Gene resultiert. Neben dem TLR4-Liganden

aktiviert auch der TLR3-Ligand dsRNA NF- κ B in MyD88-defizienten Zellen. Daraus ergibt sich, dass die durch TLR3 und TLR4 vermittelte Signaltransduktion über MyD88-unabhängige Wege verlaufen kann (Akira S. *et al.* 2001, 2003, 2007).

4.2.3 Der Einfluss von Toll-like Rezeptoren bei Patienten mit CED

Bewiesen werden konnte bisher, dass eine erhöhte TLR4-Expression in entzündeten Darmabschnitten besteht, ohne zu wissen, ob diese TLR4-Expression in intestinalen Epithelzellen Ursache oder Folge der Entwicklung einer CED ist (Cario E *et al.* 2000, Fort MM *et al.* 2005). Cario *et al.* konnten mittels Westernblot und immunhistochemischen Untersuchungen nachweisen, dass die Expression von TLR4 in intestinalen Epithelzellen (IEC) bei Patienten sowohl mit M. Crohn als auch mit Colitis ulcerosa signifikant erhöht ist. Diese erhöhte Expression von TLR4 in intestinalen Epithelzellen bei Patienten mit CED bewirkt eine verstärkte LPS-Erkennung gram-negativer Bakterien der intestinalen Mukosa, welche wiederum zu einer verminderten Toleranz luminaler Bakterientoxine mit Auslösung einer überschießenden Entzündungsreaktion führt (Cario E *et al.* 2000). Dieser TLR4-LPS-Effekt fand sich ebenfalls in unseren histopathologischen und klinischen Ergebnissen im Ileitis- und Colitis-Modell bestätigt.

Die Expression von TLR3 in IECs bei Patienten mit Colitis ulcerosa ist vergleichbar mit der von den gesunden Kontrollen, die von M. Crohn-Patienten ist im Gegensatz dazu signifikant verringert (Cario E *et al.* 2000). Das Vorkommen der verringerten TLR3-Expression in M. Crohn-Patienten, nicht jedoch in Colitis ulcerosa-Patienten verdeutlicht die unterschiedlichen pathophysiologischen Mechanismen der beiden Verlaufsformen CED.

Als ein möglicher ätiologischer Ansatzpunkt für die unterschiedlichen pathophysiologischen Mechanismen der beiden Verlaufsformen CED als Ursache für eine Störung der Immunregulation wurde eine genetische Disposition in Form von Polymorphismen einzelner Nukleotide des TLR4-Rezeptors im Zusammenhang mit CED in der Literatur widersprüchlich diskutiert (Franchimont D *et al.* 2004, Török HP *et al.* 2004, Oostenbrug LE *et al.* 2005). Ein signifikant vermehrtes Vorkommen des TLR4 Asp299Gly-Polymorphismus konnte sowohl beim M. Crohn als auch bei der Colitis ulcerosa nachgewiesen werden, ohne dass ein Einfluss auf den Phänotyp der Erkrankung beobachtet werden konnte (Franchimont D *et al.* 2004). Patienten mit diesem TLR4-Polymorphismus weisen eine höhere Suszeptibilität für Infektionen gram-

negativer Bakterien auf (Kiechl S *et al.* 2002, Lorenz E *et al.* 2002). Die nachgewiesene genetische Assoziation in Patienten mit M. Crohn von dem TLR4 Asp299Gly- und dem NOD2-Polymorphismus lässt eine gestörte Interaktion mit gram-positiven und gram-negativen Bakterien vermuten und stellt so einen möglichen auslösenden Faktor eines M. Crohn dar (Franchimont D *et al.* 2004). Andere Studien zeigten, dass der TLR4 Asp299Gly-Polymorphismus weder mit M. Crohn noch mit Colitis ulcerosa assoziiert werden kann (Oostenbrug LE *et al.* 2005). Trotz dieser teils diskrepanten Befunde sind sich die Autoren dieser genetischen Studien einig, dass TLR4 eine wichtige Rolle bei CED zu spielen scheint.

Weitere ätiologische Ansatzpunkte wurde von Bouma G und Strober W 2003 festgehalten, indem sie mehrere Beobachtungen in Form von Prinzipien aufstellten, die zu einer CED führen könnten. Der Verlust der epithelialen Barrierschutzfunktion (Podolsky DK. 2002), aber auch das Ungleichgewicht zwischen Effektor- (Th1 oder Th2-Zellen) und regulatorischen T-Zellen stellten wichtige Ansatzpunkte zur Entstehung CED dar. Wie bereits an Tiermodellen gezeigt (Boirivant M *et al.* 1998, Heller F *et al.* 2002), besteht die Unterteilung einer durch Th1- und Th2-ausgelösten Darmschleimhautentzündung auch bei humanen CED. Histopathologisch scheint M. Crohn eine Th1-vermittelte Colitis zu sein, wobei die Colitis ulcerosa ein Th2-vermitteltes Profil aufweist (Bouma G *et al.* 2003). Bei Patienten mit M. Crohn konnte anhand von immunhistochemischen Untersuchungen eine erhöhte Ausschüttung von IL-12 sowohl in vivo- (Monteleone G *et al.* 1997, Parronchi P *et al.* 1997) als auch in ex vivo-Versuchen (Liu Z *et al.* 1999) nachgewiesen werden, wobei diese bei Patienten mit Colitis ulcerosa erniedrigt war. Als weiteres Argument für eine Th1-vermittelte Immunantwort konnte aus isolierten T-Zellen aus Darmproben von Patienten mit M. Crohn eine signifikant erhöhte IFN- γ - und erniedrigte IL-4-Ausschüttungen verglichen mit Kontrollproben gezeigt werden (Fuss IJ *et al.* 1996). Im Gegensatz dazu konnten aus Darmproben von Patienten mit Colitis ulcerosa keine erhöhten Konzentrationen des für die Th2-Antwort typischen Zytokins IL-4 bestimmt werden. Es gibt jedoch weitere Hinweise wie eine erhöhte Ausschüttung von IL-13 (Heller F *et al.* 2002), die Bildung von Autoantikörpern wie pANCA oder Antitropomyosin-Ak (Saxon A *et al.* 1990, Das KM *et al.* 1993) sowie das Th2-vermittelte Profil der IgG-Subklassen IgG1 und IgG4 (Kett K *et al.* 1987), dass die Entstehung einer Colitis bei Patienten mit Colitis ulcerosa Th2-vermittelt erfolgt.

Ein zusätzlicher Verlust der epithelialen Barrierefunktion durch Schädigung der intestinalen Epithelzellen (IEC) bewirkt, dass eine Vielzahl von TLR-Liganden, welche von kommensalen Bakterien gebildet werden, von antigen-präsentierenden Zellen mit einer TLR-Expression erkannt werden und Th1- bzw. Th2-vermittelt zu einer Darmentzündung führen (Strober W *et al.* 2002).

4.3 Klinische Relevanz der in Mausmodellen erhobenen Befunde für Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

An die Erkenntnisse des vorherigen Kapitels anschließend, gibt es neue therapeutische Ansätze, die Th1-vermittelte Entzündung des Colons bei Patienten mit M. Crohn durch Hemmung von IL-12 oder die daraus folgende Zytokinausschüttung von TNF α zu kontrollieren. Der Einsatz von spezifischen TNF- α -Antikörpern hat sich durch seine hohe Wirksamkeit bereits bewährt. Targan SR zeigte 2000, dass 60% der Patienten von einer Befundverbesserung profitierten (Targan SR 2000). Spezifische TNF- α -Antikörper und auch spezifische IL-12-Antikörper scheinen zu wirken, indem eine Apoptose von Th-1-Effektor-Zellen verursacht wird (Fuss IJ *et al.* 1999).

Unsere Ergebnisse zeigten, dass eine intestinale Entzündung weitgehend von der Zusammensetzung der Darmflora beeinflusst wird. Veränderungen des Gleichgewichts der Darmflora tragen zu einer ilealen Entzündung maßgebend bei. Demzufolge könnten spezifische Veränderungen der intestinalen Bakterienflora oder eine Blockade des LPS-vermittelten Signalübertragungsweges neue Behandlungsmöglichkeiten oder Präventionen einer Ileitis oder Colitis ermöglichen. Mögliche Ansatzpunkte stellen Antibiotika, Pro- und Präbiotika oder eine Behandlung mit TLR-Antagonisten bzw. TLR-Agonisten dar.

Eine Möglichkeit, den LPS-vermittelten Übertragungsweg zu blockieren, wurde mit dem nicht resorbierbaren Antibiotikum und LPS-Antagonisten Polymyxin B (Tsuzuki H *et al.* 2001) mit prophylaktischem und auch therapeutischem Behandlungsziel in dieser Arbeit untersucht. Beide Behandlungsmethoden verbesserten den Entzündungszustand im Ileum und die so behandelten Tieren wiesen höhere Überlebensraten auf als unbehandelte Vergleichstiere (Abb.18). Polymyxin B hemmt die biologische Aktivität von LPS durch eine hohe Affinitätsbindung an Lipid A in der äußeren Zellmembran gram-negativer Bakterien. Tsuzuki H *et al.* konnten in vorhergehenden Versuchen

zeigen, dass nach einer LPS-Neutralisierung mit Polymyxin B eine sofortige Hemmung der NF- κ B-Bindungsaktivität und eine Hemmung der TNF- α -Ausschüttung in menschlichen peripheren mononukleären Zellen des Blutes *in vitro* gemessen werden konnte (Tsuzuki H *et al.* 2001). Der therapeutische Einsatz ist jedoch durch die hohe Toxizität (Nephro- und Zytotoxizität) limitiert, so dass systemische Applikationen nur nach strenger Indikationsstellung im Einsatz sind. Weitere Derivate von Polymyxin B werden auf einen möglichen systemischen Einsatz untersucht (Katz M *et al.* 2003, Tsubery H *et al.* 2005). Auch wenn der genaue Mechanismus der Blockade der NF- κ B-Bindungsaktivität von LPS-Antagonisten noch ungeklärt ist, so besteht dennoch ein therapeutischer Ansatzpunkt für Patienten mit CED und anderen Erkrankungen, die mit einem erhöhten proinflammatorischen Zytokinprofil aufgrund gram-negativer Bakterien einhergehen.

Andere Studien zeigten, dass Entzündungen des Colons von TLR4-Antagonisten erfolgreich unterdrückt werden konnte (Fort MM *et al.* 2005). Der TLR4-Antagonist CRX 526 ist ein Aminoacryl-Glucosaminid-Phosphat und weist einen Lipid A-mimetischen sowie TLR4-antagonistischen Effekt auf (Persing DH *et al.* 2002), indem die LPS-Interaktion mit dem Immunsystem gehemmt, eine Expression von proinflammatorischen Genen verhindert wird und somit eine Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α nicht erfolgen kann. Lipid A ist ein aktiver Bestandteil des LPS und bindet an TLR4 (Stöver AG *et al.* 2003). Die Entwicklung einer chronischen Colitis konnte sowohl im DSS-Colitis-Modell als auch im Modell der MDR1a-Gen-defizienten Maus durch eine Behandlung mit dem CRX-526 TLR4-Antagonisten verhindert werden, indem die Interaktion zwischen den enteralen Bakterien und dem angeborenen Immunsystem gehemmt wurde (Fort MM *et al.* 2005). Der TLR4-Antagonist CRX-526 stellt eine effektive Behandlungsmöglichkeit der CED dar, wissend dass TLR4 eine wichtige Rolle in der Pathogenese CED spielt, jedoch nicht die einzige darstellt. Elson *et al.* konnten in ihrem C3H/HeJ-Bir-Mausmodell der spontanen Entwicklung einer chronischen Colitis eine genetische Komponente in der Entwicklung einer CED nicht ausschließen (Elson CO *et al.* 2000). Weiterhin ist in der Literatur beschrieben, dass es neben LPS noch weitere TLR4-Liganden wie Heparansulfate, Hyaluronsäure, Fibrinogen und Pneumolysin gibt (Johnson GB *et al.* 2003). Für diese TLR4-Liganden wurde die blockierende Wirkung des TLR4-Antagonisten CRX-526 noch nicht bewiesen.

Weitere Behandlungsmethoden, die bei CED mit der konventionellen Behandlungstherapie assoziiert werden können, sind Probiotika. Probiotika sind lebende Mikroorganismen, die die intestinale Mikroflora verändern und einen positiven Effekt auf die Gesundheit des Wirtes ausüben (Fuller R 1989, 1992). Bakterien mit einer hohen probiotischen Aktivität sind Laktobazillen und Bifidobazillen (Shanahan F 2001, Marteau P *et al.* 2003). Probiotika bewirken Modifikationen des intestinalen Gleichgewichts durch Bildung antimikrobieller Substanzen (Gibson GR 1995), Senkung des intra-colischen pH-Wertes durch Stimulierung der Milchsäurebildung (Langhendries JP 1995, Kruis W *et al.* 2004), Hemmung der Adhäsion von pathogenen Bakterien (Fujiwara S 1997) und Immunmodulation (Isolauri E *et al.* 1995, Madsen KL *et al.* 1999, Shanahan F. 2001, Quigley EMM *et al.* 2007). Andere Probiotika besitzen anti-inflammatorische Eigenschaften und die Kapazität, ein adäquates Gleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen zu schaffen, insbesondere zwischen IL-10 und IL-12 (Quigley EMM *et al.* 2007). Madsen *et al.* konnten anhand von IL-10-defizienten Mäusen nachweisen, dass eine verminderte Besiedlung des Colons mit *Lactobacillus sp.* an eine erhöhte Besiedlung des Colons mit mukosal-adhärenenten und translozierten aeroben Bakterien gebunden ist. Eine Repopulation des Cololumens mit *Lactobacillus sp.* normalisiert die defekte Mukosaschicht und wirkt vorbeugend auf die Entwicklung einer Colitis (Madsen KL *et al.* 1999).

Präbiotika und Synbiotika bewirken eine Modulation der Darmflora. Präbiotika sind unverdauliche Lebensmittelinhalte wie z.B. Laktulose und Oligosaccharide, die einen positiven Effekt auf den Wirt durch selektive Stimulation des Wachstums und/oder der Aktivität auf bestimmte Bakterienspezies im Colon ausüben (Gibson GR 1995). Synbiotika sind eine Kombination von Pro- und Präbiotika. Durch diese Kombination wird das Überleben der probiotischen Organismen verbessert, da die spezifischen Substrate der Präbiotika zu deren Fermentation dienen (Gibson GR 1995, Collins D *et al.* 1999, Vrese M *et al.* 2008).

Escherichia coli Nissle 1917 ist ein nicht-pathogener *E.coli*-Stamm. Die Verabreichung des nicht pathogenen Stammes *Escherichia coli* Nissle 1917 wies vergleichende Ergebnisse im Gegensatz zu der Goldstandard-Therapie mit Mesalazin im Hinblick auf den Remissionserhalt bei Colitis ulcerosa- oder Pouchitis-Patienten auf (Rembacken BJ *et al.* 1999, Gionchetti P 2000, 2002, Kruis W *et al.* 2004). In tierexperimentellen Studien an TLR-2- und TLR-4-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass die orale und rektale Behandlung mit *Escherichia coli* Nissle 1917 das Ausmaß einer DSS-

induzierten Colitis TLR-2- und TLR-4-abhängig vermindert, indem geringere intestinale Ulzerationen und Zellinfiltrate durch eine verminderte Expression von proinflammatorischen Zytokinen vom Th1-Typ wie IFN- γ , IL-2 und TNF- α beobachtet wurden (Sturm A *et al.* 2005, Grabig S *et al.* 2006). In diesem Zusammenhang konnte ebenfalls gezeigt werden, dass *E.coli* Nissle 1917-Überstände einerseits den T-Zell-Zyklus und die T-Zell-Teilung via TLR-2 hemmen (Sturm A *et al.* 2005), andererseits die TLR2- und TLR4-Expression in T-Lymphozyten des peripheren Blutes erhöhen (Grabig S *et al.* 2006).

Bei Patienten mit CED besteht eine verminderte Toleranz des Immunsystems gegenüber der natürlicherweise im Darm vorkommenden kommensalen Bakterien, welche sich anhand einer überschießenden Aktivierung sowohl der zellvermittelten als auch der humoralen Immunantwort auf diese Bakterien äußert (Duchmann R *et al.* 1995). Unsere Arbeit verdeutlichte die Notwendigkeit einer detaillierten Analyse der Darmflora, um den Beitrag einzelner Bakterienspezies an der Pathogenese CED zu zeigen. Dies unterstützt bereits vorhandene, hier dargestellte Behandlungsmethoden der CED, durch Modulation der Darmflora den intestinalen Entzündungsprozess, verursacht durch ein Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen in der Darmmukosa, zu hemmen.

5 Zusammenfassung

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) wie M. Crohn und Colitis ulcerosa entstehen aufgrund einer gestörten Interaktion zwischen wirtseigenem Immunsystem und seiner kommensalen Darmflora, wodurch eine erhöhte Reaktivität des Immunsystems gegen die bakteriellen Antigene ausgelöst wird. Auch wenn beide Erkrankungen klinisch und pathologisch ähnliche Charakteristika aufweisen, zeigen neuere Erkenntnisse an Patientenstudien und Studien an Mausmodellen deutliche pathophysiologische, die auslösende Immunantwort betreffende, Unterschiede.

Ziel dieser vorliegenden Arbeit war es, mögliche Veränderungen der kommensalen Darmflora durch eine globale Florenanalyse von TLR-defizienten Mäusen anhand zwei unterschiedlicher Entzündungsmodelle zu erkennen, um schließlich nach einer Identifizierung von bakteriellen Zellwandbestandteilen (TLR-Liganden) deren Einfluss auf die Auslösung der Entzündungsreaktionen im Ileum bzw. Colon zu untersuchen.

Dazu wurden einerseits das Tiermodell der *T.gondii*-induzierten Ileitis als etabliertes Mausmodell mit einem Th1-Zytokinprofil und andererseits die DSS-induzierte Colitis mit einer unspezifischen Aktivierung der Th1- und Th2-Immunantwort entsprechend der beiden Krankheitsentitäten ausgewählt.

Im entzündlichen Darmgewebe von Patienten mit einer akuten CED konnte eine erhöhte Konzentration von kommensalen *Escherichia coli* und *Bacteroides spp.* nachgewiesen werden (Swidinski A *et al.* 2002, Darfeuille-Michaud A *et al.* 2004). Eine genaue Zusammensetzung der kommensalen Darmflora im akuten Entzündungszustand war bisher unerforscht.

Unsere mikrobiologischen Florenanalysen zeigten, dass eine Ileitis durch eine Akkumulation von *E. coli* über die TLR4-vermittelte Signaltransduktion verstärkt wird. Im Gegensatz zum *T.gondii*-Modell konnte beim DSS-Colitis-Modell nachgewiesen werden, dass sowohl TLR4 als auch TLR2 eine entscheidende Rolle bei der entzündungsvermittelnden Signaltransduktion spielt. Nicht nur eine Akkumulation von gram-negativen *E. coli*, sondern auch von gram-positiven Enterokokken war im entzündeten Zustand bei Kontrolltieren, jedoch nicht bei TLR2/4-defizienten Tieren zu finden.

Durch Untersuchungen an gnotobiotischen TLR-defizienten Tieren, die selektiv rekolonisiert worden waren, konnte LPS als maßgeblicher proinflammatorischer

bakterieller Zellwandbestandteil und TLR4-Ligand identifiziert werden. Auch klinisch konnte eine verminderte Mortalität und immunpathologisch ein vermindertes Ausmaß einer akuten Ileitis bei TLR4-defizienten Tieren nachgewiesen werden. Verminderte IFN- γ - und NO-Werte im entzündeten terminalen Ileum konnten in dieser Tiergruppe beobachtet. Somit konnte der TLR4/LPS-vermittelte Signalweg im vorliegenden Modell bestätigt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit erlaubten die Identifizierung und Erkennung des Einflusses entzündungsrelevanter Komponenten des angeborenen Immunsystems auf CED-assoziierte Entzündungsprozesse im Ileum und Colon. Dies ermöglicht weitere Forschungen von therapeutischen Ansatzpunkten, ein Gleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen in der Darmmukosa durch Modulation der Darmflora oder Blockade von TLR4 wieder herzustellen.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Abreu MT, Vora P, Faure E *et al.* Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 2001;1:167(3):1609-16
- 2 Abreu MT, Fukata M, Arditi M. TLR-signaling in the gut in health and disease. *J Immunol* 2005; 15:174(8):4453-60
- 3 Akira S, Takeda K and Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol* 2001; 2:675-680
- 4 Akira S, Yamamoto M, Takeda K. Role of adaptors in toll-like receptor signalling. *Biochem soc trans* 2003; 31 (3): 637-43
- 5 Akira S, Uematsu S. Toll-like Receptors and Type I Interferons. *J.Biol. Chem.* 2007, Vol. 282, 15319-15323
- 6 Araki A, Kanai T, Ishikura T *et al.* MyD88-deficient mice develop severe intestinal inflammation in dextran sodium sulfate colitis. *J Gastroenterol.* 2005 ; 40(1) :16-23
- 7 Arancibia S, Beltran CJ, Aguirre IM *et al.* Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biol Res* 2007; 40 (2):97-112
- 8 Bamias G *et al.* Proinflammatory effects of TH2 cytokines in a murine model of chronic small intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2005 ;128 :654-666
- 9 Bamias G, Nyce MR, De La Rue SA *et al.* New concepts in the pathophysiology of inflammatory bowel diseases. *Ann Intern Med.* 2005;143: 895-904
- 10 Barton GM, Medtzhitov R. Toll-like-receptors and their ligands. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 270: 81-92
- 11 Basset C, Holton J, Inflammatory bowel disease: is these intestine a trojan horse? *Sci Prog* 85. 2002, 33-56
- 12 Becker M, Cotena A, Gordon S *et al.* Expression of the class A macrophage scavenger receptor on specific ubpopulation of murine dendritic cells limits their endotoxin response. *Eur J Immunol* 2006 ; 36 (4) : 950-960
- 13 Blumberg RS, Strober W. Prospects for research in inflammatory bowel disease. *JAMA* 2001;285:643-7

- 14 Boirivant M, Fuss I, Chu A *et al.* Oxazolone colitis: a murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibody to interleukin 4. *J Exp Med* 1998; 188, 129-139
- 15 Bouma G and Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2003;3 (7):521-33
- 16 Buzoni-Gatel D, Werts C. *Toxoplasma gondii* and subversion of the immune system. *Infect. Immun* 2006; 74 (3): 448-52
- 17 Cario E, Podolsky D. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infection and Immunity* 2000; 68:7010-7017
- 18 Carter MJ, Lobo AJ, Travis SPL *et al.* Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* 2004;53 (Suppl.V)
- 19 Collins D, Gibson GR. Probiotics, prebiotics and synbiotics : approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am J Clin Nutr* 1999; 69(suppl): 1052S-7S
- 20 Cooper HS, Murthy SNS, Shah RS *et al.* Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 1993;69:238-249
- 21 Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM *et al.* The contribution of NOD2 gene mutation to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002; 122:867-74
- 22 Danese S, Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol.* 2006; 14;12:4807-12
- 23 Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich C *et al.* Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1998;115:1405-1413
- 24 Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, *et al.* High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004; 127:412-421
- 25 Das KM, Dasgupta A, Mandal A *et al.* Autoimmunity to cytoskeletal protein tropomyosin. A clue to the pathogenetic mechanism for ulcerative colitis. *J Immunol.* 1993; 150:2487-2493.
- 26 De Jager PL, Franchimont D, Waliszewska A *et al.* The role of Toll receptor pathway in susceptibility to inflammatory bowel disease. *Genes Immun.* 2007; 8(5): 387-97

- 27 Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H *et al.* Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* 1998; 114: 385-391
- 28 Dieleman LA, Hoentjen F, Quian BF *et al.* Reduced ration of protective versus proinflammatory cytokine responses to commensal bacteria in HLA-B27 transgenic rats. *Clin Exp Immunol* 2004 ; 136 : 30-39
- 29 Donskey CJ, Hujer AM, Das SM *et al.* Use of denaturing gradient gel electrophoresis for analysis of the stool microbiota of hospitalized patients. *J. Microbiol. Methods* 2003;54:249-256
- 30 Duchmann R, Kaiser I, Hermann E *et al.* Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 1995;102:448-55
- 31 Elson CO, Cong Y and Sundberg J. The C3H/HeJBir mouse model: a high susceptibility phenotype for colitis. *J Immunol.* 2000;19:63-75
- 32 Elson CO, Yingzi C, Vance J. Experimental model of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the micobiota. *Immunological review* 2005; 206 (1): 260-276
- 33 Farrell RJ, Peppercorn MA. Ulcerative colitis. *Lancet* 2002; 359:331-40
- 34 Farrell RJ, La Mont JT. Microbiol factors in inflammatory bowel disease. *Gastro Clin North Am* 2002;31(1):41-62
- 35 Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998;115:182-205
- 36 Fort MM, Mozaffarian A, Stover AG *et al.* A synthetic TLR4 antagonist has anti-inflammatory effects in two murine models of inflammatory bowel disease. *J Immunol* 2005;174:6416-23
- 37 Frovola L, Drastich P, Rossmann P *et al.* Expression of Toll-ilke receptor (TLR)2, TLR4 and CD14 in biopsy samples of patients with inflammatory bowel diseases: Upregulated expression of TLR2 in terminal ileum of patients with ulcerative colitis. *J Histochem Cytochem.* 2008;56(3):267-74
- 38 Franchimont D, Vermeire S, El Housni H *et al.* Deficient host-bacteria intersctions in inflammatory bowel disease ? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn´s disease and ulcerative colitis. *Gut* 2004; 53(7):987-92

- 39 Fujiwara S, Hashiba H, Hirota T *et al.* Proteinaceous factor(s) in culture supernatant fluids of bifidobacteria which prevents the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* to gangliosylceramide. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:506-12
- 40 Fukata M, Michelson KS, Eri R *et al.* Toll-like receptor 4 is required for intestinal response to epithelial injuring and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288 (5): G1055-65
- 41 Fukata M, Abreu MT. TLR4-signalling in the intestine in health and disease. *Biochem Soc Trans* 2007; 35(Pt 6): 1473-8
- 42 Fukata M, M.D., Ph.D. *et al.* Role of Toll-like Receptors in Gastrointestinal Malignancies. *Oncogene* 2008;7,27(2):234-43
- 43 Fuller R. A review: probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 1989;66:365-78
- 44 Fuller R. ed. *Probiotics: the scientific basis*. London: Chapman and Hall. 1992
- 45 Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M *et al.* Disparate CD4+ lamina propria lymphocyte secretion profiles in inflammatory bowel disease: Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* 1996;157:1261-70
- 46 Fuss IJ *et al.* Anti-interleukin 12 treatment regulates apoptosis of Th1 T cells in experimental colitis in mice. *Gastroenterol.* 1999. 117; 1078-1088
- 47 Fuss IJ, Heller F, Boirivant M *et al.* Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical TH2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2004;113:1490-97
- 48 Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995;125:1401-12
- 49 Gil A. Interacciones medio ambiente genes. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal al dia* 2004;3:38-44
- 50 Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, *et al.* Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2000;119:305-309
- 51 Gionchetti P, Amadini C, Rizzello F, *et al.* Treatment of mild to moderate ulcerative colitis and pouchitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2002; 16(Suppl.4): 13-19

- 52 Grabig S, Paclik D, Guzy C *et al.* *Escherichia coli* strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis via toll-like receptor 2- and toll-like receptor 4-dependent pathways. *Infection and Immunity* 2006;4075-4082
- 53 Griess JP, Ber. Dtsch. Chem. Ges., 12, 1879, p. 426
- 54 Guarner F. Enteric flora in health and disease. *Digestion* 2006;73:Suppl.1:5-12
- 55 Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJP *et al.* Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in german and british populations. *Lancet* 2001; 357:1925-8
- 56 Hans W, Schölmerich J, Gross V *et al.* The role of the resident intestinal flora in acute and chronic dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12:267-273
- 57 Hart AL, Stagg AJ, Frame M *et al.* Review article : the role of the gut flora in health and disease, and its modification as therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2002 ;16 :1383-93
- 58 Heimesaat MM, Bereswill S, Fuchs D *et al.* Gram-negative Bacteria aggravate murine small intestinal Th-1-Type Immunopathology following oral infection with *Toxolasma gondii*. *The Journal of Immunology* 12, 2006, 177:8785-8795
- 59 Heimesaat MM, Fischer A, Siegmund B, Kups A, Niebergall J *et al.* Shift towards pro-inflammatory intestinal bacteria aggravates acute murine colitis via toll-like-receptors 2 and 4. *PLOS 1* 2007. 25;2(7):e662
- 60 Heimesaat MM, Fischer A, Jahn HK, Niebergall J *et al.* Exacerbation of murine ileitis by Toll-like receptor 4 mediated sensing of lipopolysaccharide from commensal *Escherichia coli*. *Gut* 2007. 56 (7); 941-8
- 61 Heller F, Fuss I. J., Nieuwenhuis E. E. *et al.* Oxazoone colitis : a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. *Immunity* 2002. 17, 69-638.
- 62 Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T *et al.* Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000. 40:740-745
- 63 Hugot JP, Laurent-Puing P, *et al.* Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996; 379-821-3
- 64 Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H *et al.* Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411:599-603
- 65 Hugot JP. CARD15/NOD2 mutations in Crohn's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1072:9-18

- 66 Husebye E: The pathogenesis of gastrointestinal bacterial overgrowth. *Chemotherapy* 2005; 51:1-22
- 67 Isolauri E, Joensuu J, Suomalinen H *et al.* Improved immunogenicity of oral D3 RRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG. *Vaccine* 1995;13:310-2
- 68 Jerala R. Structural biology of LPS recognition. *International Journal of Medical Microbiology* 2007, 10.1016
- 69 Johnson GB, Brunn GJ and Platt JL. Activation of mammalian Toll-like receptors by endogenous agonists. *Crit. Rev. Immunol* 2003; 23: 15-44
- 70 Kasper L, Courret N, Darche S *et al.* *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity. *Int J Parasitol* 2004; 34(3) : 401-9
- 71 Katz M, Tsubery H, Kolusheva S *et al.* Lipid binding and membrane penetration of polymyxin B derivatives studied in a biomimetic vesicle system. *Biochem J* 2003;375:405-413
- 72 Kawai T, Akira S. Signaling to NF- κ B by Toll-like-receptors. *Trends in molecular medicine* 2007;13,11:460-69
- 73 Kett K, Rognum TO & Brandtzaeg P. Mucosal subclass distribution of immunoglobulin G-producing cells is different in ulcerative colitis and Crohn's disease of the colon. *Gastroenterol.*1987; 93:919-924.
- 74 Khan IA. Toll road for *Toxoplasma gondii*: The mystery continues. *Trends Parasitol.* 2007;23(1):1-3
- 75 Kiechl S, Lorenz E, Reindl M *et al.* Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med* 2002;347:185-92
- 76 Kim SC, Tonkonogy SL, Albright CA *et al.* Variable phenotypes of enterocolitis in interleukin 10-deficient mice mono-associated with two different commensal bacteria. *Gastroenterology* 2005;128:891-906
- 77 Kim SC, Tonkonogy SL, Karrasch T *et al.* Dual-associated of gnotobiotic IL-10^{-/-} mice with 2 nonpathogenic commensal bacteria induced aggressive pancolitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13(12):1457-66
- 78 Kirschning CJ, Schumann RR. TLR2: cellular sensor for microbial and endogenous molecular patterns. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 270:121-44
- 79 Kleesen B, Bezirtzoglou E, Matto J. Cultured-based knowledge on biodiversity, development and stability of human gastrointestinal microbiota. *Microb Ecol Health Dis* 2000; 2:53-63

- 80 Kosiewicz MM *et al.* Th1-type responses mediate spontaneous ileitis in a novel murine model of Crohn's disease. *J Clin Invest* 2001;107: 695-702
- 81 Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J *et al.* Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 2004; 53:1617-1623
- 82 Lakatos L, Lakatos PL. Changes in the epidemiology of Inflammatory bowel disease. *Orv Hetil* 2007;148:223-8
- 83 Langhendries JP, Detry J, Van Hees J *et al.* Effect of a fermented infant formula containing viable bifidobacteria on the fecal flora composition and pH of healthy full-term infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995;21:177-81
- 84 Lembo A, Kalis C, Kirschning CJ *et al.* Differential contribution of Toll-like-receptors 4 and 2 to the cytokine response to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Staphylococcus aureus* in mice. *Infect Immun* 2003; 71:6058-62
- 85 Liesenfeld O, Kosek J, Remington JS *et al.* Association of CD4+ T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med*;1996; 184:597-607
- 86 Liesenfeld O, Kang H, Park D *et al.* TNF-alpha, nitric oxide and IFN-gamma are all critical for development of necrosis in the small intestine and early mortality in genetically susceptible mice infected perorally with *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol* 1999;21:365-376
- 87 Liesenfeld O. Oral infection of C57BL/6 mice with *Toxoplasma gondii*: a new model of inflammatory bowel disease? *J. Infect. Dis.* 2002 185 (Suppl. 1) : S96-S101
- 88 Liu Z *et al.* Hyperexpression of CD40 ligand (CG15) in inflammatory bowel disease and its contribution to pathogenic cytokine production. *J Immunol.* 1999, 163; 4049-4057.
- 89 Lodes MJ, Cong Y, *et al.* Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn's disease. *J Clin Invest* 113. 2004: 1296-1306
- 90 Lorenz E , Mira JP, Frees KL *et al.* Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med* 2002;162: 1028-32
- 91 MacDonald TT, Monteleone G. IL-12 and Th1 immune responses in human Peyer's patches. *Trends Immunol* 2001; 22:244

- 92 MacDonald TT, Monteleone G. Immunity, inflammation and allergy in the gut. *Science* 2005;307(5717):1920-5
- 93 Madsen KL, Doyle JS, Jewell LD *et al.* *Lactobacillus* species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology* 1999;116:1107-14
- 94 Marteau P, Shanahan F. Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17:725-40
- 95 Medzhitov R, Janeway CA. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev.* 2000;173:89
- 96 Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2001, 1:135.
- 97 Melmed G, Thomas LS, Lee N *et al.* Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut. *J Immunol* 2003;170 (3):1406-15
- 98 Mennechet FJ, Kasper LH, Rachinel N *et al.* Intestinal intraepithelial lymphocytes prevent pathogen-driven inflammation and regulate the Smad/T-bet pathway of lamina propria CD4+Tcells. *Eur J Immunol.* 2004;34(4):1059-67
- 99 Meylan E, Tschopp J and Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature.* 2006;442,39-44
- 100 Minns LA, Menard LC, Foureau DM *et al.* TLR9 is required for the gut-associated lymphoid tissue response following oral infection of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 2006;176(12):7589-97
- 101 Monteleone G, Trapasso F, Parrello T *et al.* Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *J Immunol;* 1999;163(1):143-7
- 102 Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis, *The Lancet* June 12, 2004, Vol 363
- 103 Mordue DG, Monroy F, La Regina M *et al.* Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *J Immunol.* 2001; 167 (8):4574-84
- 104 Naik S, Kelly EJ, Meijer L *et al.* Absence of Toll-like Receptor 4 explains endotoxin hyporesponsiveness in human intestinal epithelium. *J of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2001;32:449-53
- 105 Obermeier F, Dunger N, Strauch UG *et al.* CpG motifs of bacterial DNA essentially contribute to the perpetuation of chronic intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2005; 129:913-27

- 106 Ogura Y, Bonen DK, Inohara N *et al.* A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411-603-6
- 107 Ohkawara T, Takeda H, Nishihira J *et al.* Macrophage migration inhibitory factor contributes to the development of acute dextran sulphate sodium-induced colitis in Toll-like receptor 4 knockout mice. *Clin Exp Immunol.* 2005;141(3):412-21
- 108 Ohkusa T, Okayasu I, Tokoi S *et al.* Changes in bacterial phagocytosis of macrophages in experimental ulcerative colitis. *Digestion* 1995; 56:159-64
- 109 Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M *et al.* A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990;98:694-702
- 110 Ortega-Cava CF, Ishihara S, Rumi MA *et al.* Strategic compartmentalization of Toll-like receptor 4 in mouse gut. *J Immunol.* 2003; 170 (8): 3977-85
- 111 Oostenbrug LE, Drenth JP, de Jong DJ *et al.* Association between Toll-like receptor 4 and inflammatory bowel disease. *Inflamm bowel dis.* 2005;11(6):567-75
- 112 Otte JM, Cario E, Podolsky DK *et al.* Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2004; 126 (4): 1054-70
- 113 Parronchi P *et al.* Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with M. Crohn's disease. *Am J Pathol.* 1997. 150, 823-832.
- 114 Pasare C, Medtzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol.* 2005; 560:11-18
- 115 Pasare C, Medtzhitov R. Control of B-cell responses by toll-like receptors. *Nature* 2005; 438 (7066):364-8
- 116 Persing DH, Coler RN, Lacy MJ *et al.* Taking toll: lipid A mimetics as adjuvants and immunomodulators. *Trends Microbiol* 2002; 10: 32-37
- 117 Pizarro TT, Arseneau KO, Bamias G *et al.* Mouse models for the study of Crohn's disease. *Trends Mol Med* 2003; 9:218-222
- 118 Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 347. 2002, 417-429
- 119 Poltorak A, He X, Smirnova I *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282:2085-8

- 120 Poltorak A, Merlin T, Nielsen PJ *et al.* A point mutation in the IL-12R beta 2 gene underlies the IL 12 unresponsiveness of Lps-defective C57BL/10ScCr mice. *J Immunol* 2001; 167: 2106-11
- 121 Quigley EMM, Flourie B. Probiotics and irritable bowel syndrome: a rationale for their use and assessment of the evidence to date. *Neurogastroenterol Motil* 2007;19:166-72
- 122 Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S and Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004, 118: 229-241
- 123 Rakoff-Nahoum S, Hao L and Medzhitov R. Role of Toll-like receptors in spontaneous commensal-dependent colitis. *Immunity* 2006; 25 (2), 319-329.
- 124 Rath HC, Herfath HH, Ikeda JS *et al.* Normal luminal bacteria, especially *Bacteroides* species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats. *J Clin Invest.* 1996;98:945-953
- 125 Rath HC, Ikeda JS, Linde HS *et al.* Varying cecal bacterial loads influences colitis and gastritis in HLA-B27 transgenic rats. *Gastroenterology* 1999; 116: 310-319
- 126 Rath HC, Wilson KH, Sarot RB. Differential induction of colitis and gastritis in HLA-B27 transgenic rats selectively colonized with *Bacteroides vulgatus* or *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1999; (6): 2969-74
- 127 Rath HC, Schultz M, Freitag R *et al.* Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice. *Infect Immun* 2001; 69: 2277-85
- 128 Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM *et al.* Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 1999; 354: 635-9
- 129 Rescigno M, Nieuwenhuis EE. The role of altered microbial signaling via mutant NODs in intestinal inflammation. *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23(1): 21-6
- 130 Rothfuss KS, Stange EF, Herrlinger KR. Extraintestinal manifestations and complications in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol.* 2006; 14;12: 4819-31
- 131 Ruiz PA, Shkoda A, Kim SC *et al.* IL-10 gene-deficient mice lack TGF-beta/Smad signaling and fail to inhibit proinflammatory gene expression in

- intestinal epithelial cells after the colonization with colitogenic *Enterococcus faecalis*. J Immunol 2005; 174: 2990-2999
- 132 Ruiz PA, Shkoda A, Kim SC *et al.* IL-10 gene-deficient mice lack TGF-beta/Smad-mediated TLR2 degradation and fail to inhibit proinflammatory gene expression in intestinal epithelial cells under condition of chronic inflammation. Ann N Y Acad Sci. 2006;1072: 389-94
- 133 Rumio C, Besuoso D, Arnaboldi F *et al.* Activation of smooth muscle and myenteric plexus cells of jejunum via Toll-like receptor 4. J Cell Physiol 2006; 208(1): 47-54
- 134 Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC *et al.* Functional food science and gastrointestinal physiology and function. Br J Nutr 1998; 80: 147-71
- 135 Sandborn WJ. Transcending conventional therapies: the role of biologic and other novel therapies. Inflamm Bowel Dis. 2001; 7: S9-16
- 136 Sartor RB. Viewpoints on digestive diseases. Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. Gastroenterology 1994;106:533-9
- 137 Sartor RB. Probiotic therapy of intestinal inflammation and infections. Curr Opin Gastroenterol 2005; 21: 44-50
- 138 Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol 2006;3(7):390-407
- 139 Sartor RB, Blumberg RS, Braun J *et al.* CCFA Microbial-Host Interactions Workshop: Highlights and key observations. Inflamm bowel dis 2007; 13:5:600-619
- 140 Satsangi J, Welsh KI, Bunce M *et al.* Contribution of genes of the major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease. Lancet 1996; 347:1212-7
- 141 Saxon A, Shanahan F, Landers C *et al.* A distinct subset of antineutrophil cytoplasmic antibodies is associated with inflammatory bowel disease. J Allergy Clin Immunol. 1990; 86:202-210.
- 142 Scaldaferri F, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: Progress and current concepts of etiopathogenesis. Journal of digestive diseases. 2007;8:171-178
- 143 Scanga CA, Aliberti J, Jankovic D *et al.* MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. J Immunol 2002;168(12):5997-6001

- 144 Schmitz H, Barmeyer C, Fromm M *et al.* Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1999; 116:301-9
- 145 Schultz M, Strauch UG, Linde HJ *et al.* Preventive effects of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on acute and chronic intestinal inflammation in two different murine models of colitis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:372-378
- 146 Schultz M. Clinical use of *E.coli* Nissle 1917 in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14(7): 1012-8
- 147 Schuppler M, Lotzsch K, Waidmann M *et al.* An abundance of *Escherichia coli* is harbored by the mucosa-associated bacterial flora of interleukin-2-deficient mice. *Infect Immun* 2004;72: 1983-90
- 148 Siegmund B, Rieder F, Albrich S *et al.* Adenosine kinase inhibitor GP515 improves experimental colitis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 296:99-105
- 149 Shanahan F. Probiotics in inflammatory bowel disease. *Gut* 2001;48:609
- 150 Shepela C. The safety of biologic agents in the treatment of inflammatory bowel disease. *Minn Med* 2008; 91(6):42-5
- 151 Stadnyk AW. Intestinal epithelial cells as a source of inflammatory cytokines and chemokines. *Can J Gastroenterol* 2002; 16: 241-246
- 152 Stange EF, Travis SPL, Vermeire S *et al.* European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut* 2006; 55(Suppl I): i1-i15
- 153 Stöver AG, da Silva J, Evans JT *et al.* Structure-activity relationship of synthetic Toll-like receptor 4 agonists. *J Biol Chem* 2003; 279: 4440-4449
- 154 Strober W, Fuss IJ and Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol.* 2002 ; 20 :495-549
- 155 Sturm A, Rilling K, Baumgart D *et al.* *Escherichia coli* Nissle 1917 distinctively modulates T-cell cycling and expansion via toll-like receptor 2 signaling. *Infection and Immunity* 2005; 1452-1465
- 156 Sukhumavasi W, Egan CE, Warren AL *et al.* TLR adapter MyD88 is essential for pathogen control during oral *Toxoplasma gondii* infection but not adaptive immunity induced by vaccine strain of the parasite. *J Immunol* 2008; 181(5):3464-73
- 157 Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A *et al.* Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002; 122:44-54

- 158 Szebeni B, Veres G, Dezsofi A *et al.* Increased expression of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2008; 151 (1):34-41
- 159 Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:335-376
- 160 Takeda K. Evolution and integration of innate immune recognition systems: the toll-like receptors. *J Endotoxin Res* 2005;11(1):51-5
- 161 Targan SR. Biology of inflammation in Crohn's disease: mechanisms of action of anti-TNF- α therapy. *Can J Gastroenterol* 2000. 14; C13-C16
- 162 Targan SR, Landers CJ, Yang H *et al.* Antibodies to CBir1 flagellin define a unique response that is associated independently with complicated Crohn's disease. *Gastroenterology* 2005; 128:2020-2028
- 163 Teitelbaum JE, Walker WA. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. *Annu Rev Nutr* 2002; 22:107-38
- 164 Thompson-Chagoyan OC, Maldonado J, Gil A. Aetiology of Intestinal bowel disease: Role of intestinal microbiota and gut-associated lymphoid tissue immune response. *Clinical Nutrition* 2005; 24:339-352
- 165 Tlaskalova-Hogenova HL, Tuckova R, Stepankova T *et al.* Involvement of innate immunity in the development of inflammatory and autoimmune diseases. *Ann NY Acad Sci* 2005;1051:787-798
- 166 Toms C, Powrie F. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Microbes Infect* 2001; 3: 929-35
- 167 Török HP, Glas J, Tonenchi L *et al.* Polymorphisms of the lipopolysaccharide-signaling complex in inflammatory bowel disease; association of a mutation in the Toll-like receptor 4 gene with ulcerative colitis. *Clin Immunol* 2004;112:85-91
- 168 Torres MI, Le Discorde M, Lorite P *et al.* Expression of HLA-G in inflammatory bowel disease provides a potential way to distinguish between ulcerative colitis and Crohn's disease. *Int Immunol* 2004; 16:579-83
- 169 Tsikas D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/ nitric oxide area of research. *Journal of Chromatography B*, vol. 851, May 2007, p. 51-70
- 170 Tsubery H, Yaakov H, Cohen S *et al.* Neopeptide antibiotics that function as opsonins and membrane-permeabilizing agents for gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49 (8):3122-8

- 171 Tsuzuki H, Tani T, Ueyama H *et al.* Liposaccharide: neutralization by polymyxin B shuts down the signaling pathway of nuclear factor kappaB in peripheral blood mononuclear cells, even during activation. *J Surg Res* 2001; 100 :127-34
- 172 Underhill D, Ozinsky A. Toll-like receptors key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* 2002;14:103
- 173 Vrese M, Schrezenmeir J *et al.* Probiotics, prebiotics and synbiotics. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2008;111:1-66
- 174 www.walzel.at
- 175 Waidmann M, Bechtold O, Frick JS *et al.* *Bacteroides vulgatus* protects against *Escherichia coli*-induced colitis in gnotobiotic interleukin-2-deficient mice. *Gastroenterology* 2003;125:162-177
- 176 Wang R-F, Miyahara Y and Wang HY. Toll-like receptors and immune regulation: implications or cancer therapy. *Oncogene* 2008; 27:181-189
- 177 Watanabe T, Kitani A, Murray PJ *et al.* NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol*; 2004;5:800-8
- 178 Werts C, Tapping RI, Mathison JC *et al.* Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat. Immunol* 2001; 2:346-52
- 179 Yang Z, Fuss IJ, Watanabe T *et al.* NOD2 transgenic mice exhibit enhanced MDP-mediated downregulation of TLR2 responses and resistance to colitis induction. *Gastroenterology* 2007; 133(5): 1510-21
- 180 Yarovsky F, Zhang D, Andersen JF *et al.* TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 2005;308:1626-9
- 181 Yarovsky F, Sher A. Toll-like receptor recognition of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 2006;36(3):255-9
- 182 Yarovsky F, Hieny S, Sher A. Recognition of *Toxoplasma gondii* by TLR11 prevents parasite-induced immunopathology. *J Immunol.* 2008;181:8478-84
- 183 Yoshihara K, Yajima T, Kubo C *et al.* Role of interleukin 15 in colitis induced by dextran sulphate sodium in mice. *Gut* 2006;55 (3): 334-341
- 184 Zweigner J, Schumann RR, Weber JR. The role of lipopolysaccharide-binding protein in modulating the innate immune response. *Microbes Infect.* 8. 2006, 946-952

7 Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen-präsentierende Zellen
CBF	Charité, Campus Benjamin Franklin
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
COX	Cyclooxygenase
Cu	Kupfer
DAB	Diaminobenzidin-Lösung
DC	Dendritische Zellen
DNA	engl. desoxyribonucleine acid
DR-Allele	Genlocus nach HLA-Antigenklassifikation
DSS	Dextransodiumsulfat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	engl. enzyme linked immunsorbent assay
FEM	Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin
g	Gramm
HCl	Hydrogenchlorid = Salzsäure
HLA	Human Leukocyte Antigene/ Haupthistokompatibilitätskomplex
IEC	Intestinale Epithelzellen
IKK	Inhibitor der κ B-Kinase
IL	Interleukin
INF	Interferon
iNOS	Induzierte Stickstoffmonoxid-Synthetase
l	Liter
KBE	koloniebildende Einheit
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KO	engl. Knock-out
LP	Lamina propria
LPS	Lipopolysaccharid
μ	mikro
M. Crohn	Morbus Crohn
MEKK	engl. Mitogen-activated protein kinase kinase

mg	Milligramm
MIF	engl. Migration inhibitory factor
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MLN	mesenteriale Lymphknoten
MPO	Myeloperoxidase
MSR	engl. macrophage scavenger receptor
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	Nukleärer Faktor κ B
NIK	engl. NF- κ B inducing kinase
NK	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NLR	NOD-like receptor
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain
NSAID	engl. non-steroid anti-inflammatory drugs
PAMPs	engl. pathogen associated molecular patterns
PAP	Peroxidase-Antiperoxidase
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PGE2	Prostaglandin E2
p.i.	post infectionem
PRR	engl. pathogen recognition receptors
RNA	engl. ribonucleine acid
RPMI	engl. Rosewell Park Memeorial Institute- Nährmedium
SPF	engl. specific pathogen-free
TGF	engl. Transforming growth factor
Th	T-Helfer-Zellen
TLR	engl. Toll-like receptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Treg	regulatorische T-Zellen
U	engl. Unit
WT	Wildtyp

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

Publikationsliste

- 1 Heimesaat MM, Bereswill S, Fuchs D *et al.* Gram-negative Bacteria aggravate murine small intestinal Th-1-Type Immunopathology following oral infection with *Toxolasma gondii*. *The Journal of Immunology* 12, 2006, 177:8785-8795
- 2 Heimesaat MM, Fischer A, Siegmund B, Kups A, Niebergall J *et al.* Shift towards pro-inflammatory intestinal bacteria aggravates acute murine colitis via toll-like-receptors 2 and 4. *PLOS 1* 2007. 25;2(7):e662
- 3 Heimesaat MM, Fischer A, Jahn HK, Niebergall J *et al.* Exacerbation of murine ileitis by Toll-like receptor 4 mediated sensing of lipopolysaccharide from commensal *Escherichia coli*. *Gut* 2007. 56 (7); 941-8

Danksagung

Einen herzlichen Dank für die hilfreiche Unterstützung bei der Erstellung meiner Doktorarbeit geht an meinen Betreuer Dr. MM. Heimesaat und Doktorvater Prof. S. Bereswill, denn Sie brachten mir sehr viel Wissen und Geduld entgegen und sorgten mit wertvollen Ratschlägen für das Gelingen der Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Eltern und Großeltern bedanken, ohne die ein Studium und eine Doktorarbeit niemals möglich geworden wäre. Sie haben mich stets in jeglicher Hinsicht unterstützt.

Auch möchte ich mich bei Emel und Ines für ihr fundiertes statistisches Wissen und für die Veränderungen von Graphiken in letzter Sekunde bedanken. Ich konnte immer auf eure Hilfe zählen.

Ein weiteres großes Dankeschön geht an meine Schwester Kati und an meinen Ehemann Quentin, die mich stets aufbauten und für die erforderliche Abwechslung sorgten.

Erklärung

„Ich, Julia Niebergall, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Einfluss der intestinalen Mikroflora und Toll-Like-Rezeptoren des angeborenen Immunsystems auf chronisch-entzündliche Darmerkrankungen selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 10.07.2010

J. Niebergall