

1	Einleitung .....	3
1.1	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen .....	3
1.1.1	Definition .....	3
1.1.2	Epidemiologie .....	3
1.1.3	Ätiologie und Pathogenese .....	4
1.1.3.1	Genetische Faktoren .....	4
1.1.3.2	Immunologische Faktoren .....	5
1.1.3.3	Umweltfaktoren .....	5
1.1.4	Klinik und Pathologie .....	6
1.1.5	Therapie .....	6
1.1.6	Bedeutung der physiologischen Darmflora .....	7
1.1.7	Tiermodelle für entzündliche Darmerkrankungen .....	10
1.2	Angeborenes Immunsystem .....	11
1.2.1	Mononukleäre Phagozyten und ihre Rolle bei der Immunabwehr .....	12
1.2.2	Ontogenese, Phänotypen und Morphologie .....	12
1.2.3	Dendritische Zellen .....	13
1.2.3.1	Ontogenese und Zelltypen von DCs .....	13
1.2.3.2	Aktivierung und Polarisation von T-Zellen .....	15
1.2.4	Makrophagen .....	16
1.3	Rezeptoren und deren Liganden .....	17
1.3.1	Entdeckung von Toll .....	18
1.3.2	TLRs der Wirbeltiere .....	18
1.3.3	Expression von Toll-like Rezeptoren .....	18
1.3.4	Aktivierung von Toll-like Rezeptoren .....	19
1.3.5	Signalwege von Toll-like Rezeptoren .....	20
1.4	Zielsetzung .....	23
2	Material und Methoden .....	24
2.1	Materialien und Geräte .....	24
2.1.1	Geräte .....	24
2.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	24
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien .....	25
2.1.4	Medien und Zusätze .....	26
2.1.5	Antikörper für die Durchflußzytometrie und ELISA .....	26
2.1.6	Molekularbiologische Kits .....	27
2.1.7	Enzyme, Plasmide und Zellen .....	27
2.1.8	DNA-Molekulargewichtsstandards .....	28
2.1.9	M13- und 16S rRNA PCR-Primer .....	28
2.1.10	Bakterien und Zelllinien .....	28
2.1.10.1	Verwendete Referenzstämme .....	28
2.1.10.2	Eukaryontische Zelllinien .....	29
2.1.11	Medien und Puffer .....	29
2.1.11.1	Fest- und Flüssigmedien zur Bakterienkultivierung .....	29
2.1.11.2	Flüssigmedien für Zellkulturexperimente .....	30
2.1.11.3	Puffer .....	30
2.2	Methoden .....	31
2.2.1	Molekularbiologische und biochemische Methoden .....	31
2.2.1.1	DNA-Extraktion aus Fäzes .....	31
2.2.1.2	PCR-Amplifikation eubakterieller 16S rRNA aus Fäzes .....	31
2.2.1.3	Silika-Aufreinigung der PCR-Produkte .....	32
2.2.1.4	Gelelektrophorese der 16S rRNA Amplifikate .....	32
2.2.1.5	Anlegen einer 16S rRNA Klonbibliothek .....	33

2.2.1.6	Isolierung der bakteriellen Plasmid-DNA .....	34
2.2.1.7	Analyse der 16S rRNA Klonbibliothek durch Sequenzierung .....	35
2.2.1.8	Phylogenetische Analyse der 16S rRNA Sequenzen.....	35
2.2.2	RFLP-Analyse.....	35
2.2.3	DGGE-Analyse .....	36
2.2.3.1	DNA-Extraktion aus DGGE-Banden und direkte Sequenzierung.....	36
2.2.4	PCR-basierte denaturierende HPLC.....	37
2.2.5	Mikrobiologische Methoden .....	38
2.2.5.1	Herstellung von Bakteriensuspensionen für Zellstimulations-experimente	38
2.2.6	Zellbiologische Methoden.....	39
2.2.6.1	Kulturbedingungen von Maus- und Humanzellen.....	39
2.2.6.2	Passagieren.....	39
2.2.6.3	Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung.....	40
2.2.6.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	40
2.2.6.5	Mykoplasmentest.....	41
2.2.7	Verwendete Zelllinien .....	42
2.2.7.1	RAW264.7 .....	42
2.2.7.2	HEK293 .....	42
2.2.8	Transfektion und Stimulation von HEK293 Zellen .....	42
2.2.8.1	$\beta$ -Gal Reporter Gene Assay zur Bestimmung der Transfektionseffizienz...	43
2.2.8.2	Luciferase-Assay zur Bestimmung der Rezeptoraktivität .....	44
2.2.9	Gewinnung und Kultivierung primärer Zellen.....	44
2.2.9.1	Generierung muriner Makrophagen aus dem Peritoneum .....	44
2.2.9.2	Gewinnung der murinen Peritonealmakrophagen .....	44
2.2.9.3	Generierung muriner dendritischer Zellen aus dem Knochenmark .....	45
2.2.9.4	Isolierung von intraepithelialen- und Lamina Propria Lymphozyten.....	46
2.2.9.5	Isolierung von Lymphozyten aus MLN, Milz und Leber .....	47
2.2.10	Mixed-Lymphocyte-Reaction (MLR) .....	49
2.3	Immunologische Methoden.....	50
2.3.1	MACS.....	50
2.3.2	Durchflußzytometrie .....	50
2.3.2.1	Oberflächenfärbung .....	50
2.3.2.2	Nachweis von Oberflächenmarkern.....	51
2.3.2.3	Messung von Immunmediatoren in Zellkulturüberständen .....	52
2.4	Tiere und Zuchtbedingungen .....	53
2.4.1	Mäuse und Ileitis-Induktion durch Infektion mit <i>T. gondii</i> .....	53
2.4.2	Colitis-Induktion durch Dextransulfat .....	53
2.4.3	Spezifisch-pathogenfreie Zucht (SPF) .....	53
2.4.4	Generierung keimfreier und gnotobiotischer Tiere .....	54
3	Ergebnisse .....	55
3.1	Einfluss des angeborenen Immunsystems auf die Zusammensetzung der bakteriellen Flora im Colon .....	55
3.1.1	Mikrobiologische Untersuchungen .....	55
3.1.2	Molekulargenetische Untersuchungen .....	56
3.1.3	Komplexe Florenanalyse einer 16S rRNA Klonbibliothek von Coloninhalt bei gesunden WT- und TLR-defizienten Tieren.....	61
3.2	Molekulare Analyse der Darmflora mittels DHPLC.....	64
3.2.1	Analyse bakterieller Floren mittels 16S DHPLC .....	64
3.2.2	Phylogenetische Analyse der Darmflora mittels PCR-RFLP .....	66
3.3	Charakterisierung der Darmflora im Verlauf der akuten Darmentzündung .....	69
3.3.1	DSS-induzierte Colitis.....	69

3.3.2	<i>Toxoplasma gondii</i> induzierte Ileitis .....	70
3.4	Zellkultorexperimente .....	72
3.4.1	Interaktion isolierter <i>E. coli</i> Stämme mit TLR4 und TLR2 <i>in-vitro</i> .....	72
3.4.2	Konstitutionelle und induzierbare NO- und TNF- $\alpha$ -Synthese .....	76
3.4.3	Charakterisierung von Maus-Peritonealmakrophagen anhand von Oberflächenmarkern .....	79
3.4.3.1	Interaktion isolierter <i>E. coli</i> mit Peritonealmakrophagen der Maus .....	80
3.5	Modellsysteme für die Untersuchung von Zellen des mononukleären Phagozytensystems in der Maus .....	82
3.5.1	Funktionelle Untersuchung isolierter Immunzellen .....	82
3.5.1.1	Phänotypisierung von DCs .....	83
3.5.1.2	Immunmediatoren in Zellkulturüberständen von BM-DCs .....	84
3.5.2	Mixed Lymphocyte Reaction .....	86
3.5.2.1	Autologe MLR .....	86
3.5.3	Charakterisierung von Lymphozyten aus dem Ileum, MLN, Leber und Milz .....	88
4	Diskussion .....	93
4.1	Einfluss von TLRs auf die Besiedlung des Darms .....	93
4.2	Einfluss von TLRs auf die Pathogenese von CED .....	95
4.2.1	DSS-Colitis als Darmentzündungsmodell .....	95
4.2.2	<i>T. gondii</i> -induzierte Ileitis im Mausmodell .....	96
4.2.3	Interaktion isolierter <i>E. coli</i> Stämme mit TLR2 und TLR4 <i>in-vitro</i> .....	97
4.2.4	Einfluss von Probiotika auf die Zytokinsynthese in RAW264.7 Makrophagen <i>in-vitro</i> .....	98
4.3	Funktionelle Untersuchung von Immunzellen der Maus .....	100
4.3.1	Gnotobiotische C57BL/6 Mäuse und definierte Rekolonisierung .....	100
4.3.2	Funktionelle Untersuchung Ag-präsentierender DCs aus der LP und MLN .....	101
4.3.3	Differenzierung von Lymphozyten Populationen aus dem Ileum der Maus .....	103
4.4	Ausblick .....	105
5	Zusammenfassung .....	106
6	Abkürzungsverzeichnis .....	108
	Literaturverzeichnis .....	110
	Publikationsliste .....	121
	Lebenslauf .....	123
	Danksagung .....	124
	Erklärung .....	125

# 1 Einleitung

## 1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

### 1.1.1 Definition

Bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) des Menschen handelt es sich um rezidivierende oder kontinuierlich entzündliche Erkrankungen des Intestinaltrakts. CED, mit Morbus Crohn (Synonym: Ileitis, nach seiner häufigsten Lokalisation im terminalen Ileum) und Colitis ulcerosa (Synonym: ulzerative Colitis) als den beiden wichtigsten Entitäten, gehören zu den Erkrankungen, deren Häufigkeit in den letzten Jahrzehnten immer mehr zugenommen hat. Colitis ulcerosa ist bereits seit dem späten 19. Jahrhundert bekannt, während Morbus Crohn erstmals in den dreißiger Jahren des 20. Jahrhunderts beschrieben wurde [34].

Zwischen beiden Erkrankungen bestehen eindeutige Unterschiede, was das makroskopische und histologische Erscheinungsbild sowie ihr Verteilungsmuster angeht. Andererseits bestehen Überschneidungen in Symptomatik und extraintestinalen Begleiterscheinungen. Es ist immer noch ungeklärt, ob es sich um separate Krankheiten oder lediglich um verschiedene Manifestationsformen ein- und derselben Krankheit handelt. Eine Übersicht der Abgrenzungen beider Krankheitsbilder ist Tab. 1 zu entnehmen.

### 1.1.2 Epidemiologie

Die CED sind weltweit verbreitet, kommen jedoch in den westlichen Industrieländern, und hier mit einem Nord-Süd-Gefälle, weitaus häufiger vor als in Entwicklungsländern. Die Inzidenz beider Erkrankungen ist ähnlich und liegt in Deutschland bei 5-10 pro 100.000 Einwohner pro Jahr [159]. Weiße Bevölkerungsgruppen sind häufiger betroffen als Schwarze und Lateinamerikaner. Beim Morbus Crohn (M. Crohn) sind beide Geschlechter gleichermaßen betroffen, bei der Colitis ulcerosa überwiegt der Frauenanteil leicht. Der Altersgipfel der Krankheitsmanifestation liegt im 2. bis 3. Lebensjahrzehnt [40-41]. Nach Schätzungen ist das Risiko an CED zu erkranken für Verwandte von CED-Patienten, verglichen mit der Gesamtbevölkerung, mindestens um den Faktor 10 erhöht [41]. Derartige epidemiologische Häufungen sprechen ursächlich entweder für genetische und/oder für umweltbedingte Faktoren [49].

### 1.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie und Pathogenese der CED sind weitgehend unklar, jedoch konnten in den vergangenen Jahren signifikante Fortschritte im Verständnis der Pathogenese von CED erreicht werden. Es gibt Hinweise, dass umweltbedingte, immunologische und genetische Faktoren beteiligt sind. Eine genetisch beeinflusste, überschießende und anhaltende Immunreaktion gegen die eigene Darmflora scheint eine der wichtigsten Ursachen dieser Erkrankungen zu sein. Zwillingsstudien sowie die Tatsache, dass die Erkrankungen bei Verwandten ersten Grades gehäuft auftreten, legen genetische Einflüsse nahe. Der Einfluss von Umweltfaktoren lässt sich aus epidemiologischen Daten ableiten, nach denen die Erkrankungen mit zunehmender industrieller Entwicklung zunehmen.

Das derzeitige Denkmodell setzt sich somit aus einer beim genetisch empfänglichen Individuum stattfindenden, durch Umweltfaktoren ausgelösten Entgleisung des Immunsystems zusammen.

#### 1.1.3.1 Genetische Faktoren

Das Erkrankungsrisiko für Verwandte ersten Grades von Colitis ulcerosa-Patienten ist 10-fach erhöht, beim Morbus Crohn ist der Faktor noch höher. Beide Formen kommen in bestimmten Subpopulationen gehäuft vor. Die Identifikation von Varianten des NOD2/CARD15-Gens (engl.: *Nucleotid Oligodimerisation Domain/Caspase Recruitment Domain*) konnten im Jahr 2001 als Risikofaktor für M. Crohn bestätigt werden [161]. Dieser intrazelluläre Lipopolysaccharid-Rezeptor wird in peripheren Monozyten exprimiert und aktiviert nach Bindung bakterieller Lipopolysaccharide den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (engl.: *Nuclear Factor  $\kappa$ B*), der wiederum die Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine hoch reguliert. Etwa 15% der Morbus Crohn-Patienten besitzen aufgrund einer Insertionsmutation mit Verschiebung des Leserasters im NOD2/CARD15-Gen ein verkürztes und damit inaktives NOD2-Protein [25, 139].

Funktionelle Analysen von NOD2 und NF- $\kappa$ B deuten an, dass die Entzündungsreaktion der intestinalen Mukosa als „Sofortantwort“ des angeborenen Immunsystems auf mehreren Ebenen reguliert wird und notwendig ist, um die Darmhomöostase zu erhalten und das Eindringen von Pathogenen in den Körper zu verhindern. Fortschritte zu den genetischen Grundlagen der CED und der besonderen Rolle des angeborenen Immunsystems haben das pathogenetische Paradigma einer fehlgesteuerten Reaktion von T-Zellen auf Bestandteile der Darmflora erweitert und ergänzt.

### 1.1.3.2 Immunologische Faktoren

Neben NOD2 wurden angeborene Immunmechanismen identifiziert, die mit kommensalen und pathogenen Bakterien des Darmlumens interagieren, wie zum Beispiel die so genannten Toll-like Rezeptoren, auf die an anderer Stelle detailliert eingegangen wird.

Das darmassoziierte Immunsystem muss eine Toleranz gegenüber der natürlichen Darmflora aufrechterhalten. Voraussetzung hierfür ist eine intakte Schleimhautbarriere sowie die korrekte Erkennung der physiologischen Standortflora.

Die Gewebeschädigung der Darmschleimhaut bei CED wird durch das Immunsystem des Darmes bewirkt [174]. Bei diesen Prozessen könnte eine Autoimmunreaktion durch eine Störung der immunologischen Toleranz bzw. eine unspezifische Schädigung durch eine überschießende Reaktion auf exogene Antigene, verursacht durch eine defekte Regulation des intestinalen Immunsystems, eine Rolle spielen. Das häufige Auftreten von Autoantikörpern gegen Bestandteile von Granulozyten bei Patienten mit CED (62% der Patienten mit Colitis ulcerosa, 4% der Patienten mit Morbus Crohn) unterstützt die Hypothese der Autoimmunpathogenese [173].

Patienten mit CED weisen ferner eine vermehrte Produktion von Entzündungsmediatoren, wie zum Beispiel Prostaglandine, Leukotriene, Plättchen-aktivierender Faktor und Zytokine auf, die von Monozyten, Makrophagen oder Granulozyten synthetisiert werden. Bezüglich der lymphozytären Zytokinsynthese findet sich bei Patienten mit Morbus Crohn ein Th-1-typisches Zytokinmuster, das heißt eine vermehrte Produktion von Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- $\alpha$ , Interleukin (IL)-2 und Interferon (IFN)- $\gamma$ , während bei Patienten mit Colitis ulcerosa ein Th-2-typisches Zytokinmuster, mit einer vermehrten Produktion von IL-4, IL-5 und IL-10, vorliegt [49].

### 1.1.3.3 Umweltfaktoren

Auch Umwelteinflüsse wie Rauchen, Ernährung, Stress und Hygiene sind von Belang [49]. Hinweise für die Bedeutung von Umweltfaktoren ergeben sich, wie oben bereits erwähnt, unter anderem aus der Zunahme der Inzidenz der CED mit zunehmender Industrialisierung und Entwicklung [45]. So wurde z.B. gezeigt, dass der Konsum von Zigaretten einen eindeutigen Risikofaktor in Genese und Unterhaltung beim Morbus Crohn darstellt [138], bei der Colitis ulcerosa ist die Inzidenz dagegen invers [159].

### 1.1.4 Klinik und Pathologie

Leitsymptom der CED ist die Diarrhoe. Während der Stuhl bei Colitis ulcerosa blutig-schleimig ist, kommt es beim Morbus Crohn selten zu Blutbeimengungen. Weitere Symptome der CED sind Fieber, Abdominalschmerz, allgemeine Ermüdung und Gewichtsverlust [49, 147-148].

Die Lokalisation der Entzündung überwiegt beim Morbus Crohn im terminalen Ileum (Ileitis), kann aber auch den terminalen Dünndarm und Dickdarm (Ileokolitis) sowie das Kolon (Colitis) befallen und sich über den gesamten Gastrointestinaltrakt, vom Mund bis zum Anus, ausdehnen. Läsionen bei Morbus Crohn sind in der Regel diskontinuierlich, das heißt gesunde und betroffene Schleimhaut kommen nebeneinander vor. Die Entzündung erstreckt sich über sämtliche Schichten der Darmwand. Mit fortschreitender Erkrankung kann es zu Stenosen und infolgedessen zu mechanischen Obstruktionen kommen [147-148].

Im Gegensatz dazu befällt die Colitis ulcerosa ausschließlich das Kolon. Die Entzündung breitet sich kontinuierlich aus, wobei die Schwere der Inflammation von distal nach proximal abnimmt. Histologische Hauptmerkmale sind Kryptenabszesse und Epitheldysplasien sowie ein progredienter Verlust an Becherzellen. Ferner beschränkt sich das Entzündungsgeschehen auf die Mukosa, die Submukosa ist pathologisch nicht verändert.

### 1.1.5 Therapie

Die Therapie der CED besteht in der unspezifisch antiinflammatorischen Behandlung. In erster Linie kommen das Sulfonamid Sulfasalazin, beziehungsweise dessen wirksame Komponente 5-Amino-Salicylat (5-ASA: Mesalazin oder Mesalamin) zum Einsatz [143]. Die Wirkung besteht darin, dass die Prostaglandin- und Leukotrien-Synthese unterdrückt und die chemotaktische Rekrutierung von Entzündungszellen blockiert wird. Für den akuten Schub werden als stärker antiinflammatorische Agenzien Glucocorticoide wie zum Beispiel Budenosid eingesetzt, was sich aufgrund geringer systemischer Nebenwirkungen bewährt hat [18]. Für Ausnahmefälle stehen Immunsuppressiva wie Azathioprin, 6-Mercaptopurin, Cyclosporin oder Methotrexat zur Verfügung, wobei Nebenwirkungen hier häufig sind und die Wirkung zum Teil erst nach vier bis sechs Monaten eintritt [143, 147].

In sehr schweren Fällen kann man durch vorübergehende parenterale Ernährung bei ca. 60 % der Patienten eine Remission erreichen [93]. Ferner befinden sich neuere, spezifischere Wege der Immunsuppression in der klinischen Prüfung oder sind kürzlich zugelassen worden. Hier sind primär der gegen TNF- $\alpha$  gerichtete Antikörper *Infliximab* und die Therapie mit IL-10 zu nennen [152, 170]. Darüber hinaus werden Antibiotika wie Metronidazol und Ciprofloxacin in der

Rezidivprophylaxe eingesetzt [151, 166, 200]. Diese Therapie, ebenso wie die mit Probiotika zielen auf eine Veränderung der Darmflora ab und kommen vor allem beim Morbus Crohn zum Einsatz. Trotz dieser mannigfaltigen Therapiemöglichkeiten gelingt die endgültige Heilung von CED nicht, da auf eine Remission der Entzündung nach einem mehr oder weniger langen Intervall ein Rezidiv folgt. Die chirurgische Entfernung der betroffenen Abschnitte des Magen-Darmtraktes führt lediglich bei der Colitis ulcerosa zur kompletten Ausheilung [147]. Beim Morbus Crohn dagegen entstehen häufig neue Entzündungsherde in vormals nicht betroffenen Arealen [141, 165]. Außerdem erweist sich das etablierte Arsenal anti-inflammatorischer Pharmaka nicht selten als unzureichend.

**Tab. 1** Übersicht: Abgrenzung von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa [159]

	<b>Morbus Crohn</b>	<b>Colitis ulcerosa</b>
<b>Lokalisation</b>	kann gesamten Verdauungstrakt befallen (1/3 Kolon; 1/3 Kolon und Ileum; 1/3 Ileum; proximalerer Befall sehr selten)	auf Kolon beschränkt, Rektum stets befallen
<b>endoskopisches Aussehen</b>	diskontinuierliche Entzündung („skip lesions“); scharf begrenzte, tiefe Ulzerationen, Pflastersteinrelief	kontinuierliche Entzündung, unscharf begrenzte, flache Ulzerationen, Pseudopolypen
<b>Histologie</b>	transmuraler Befall; nicht-verkäsende Granulome (pathognomonisch, aber selten), entzündliches Infiltrat der Darmwand	auf Schleimhaut und Submukosa begrenzt; Kryptenabszesse; entzündliches Infiltrat der Lamina propria
<b>Klinik</b>	Bauchschmerzen und Durchfälle (nur selten blutig); perianale Erscheinungen	schleimig-blutige Durchfälle, Tenesmen; keine perianalen Erscheinungen
<b>Verlauf</b>	oft schleichender Beginn, Verlauf in Schüben mit inkompletten Remissionen	oft akuter Beginn, Verlauf in Schüben, teilweise mit kompletten Remissionen; seltener chronisch-kontinuierlicher Verlauf
<b>extraintestinale Manifestation</b>	häufiger als bei der Colitis ulcerosa, sklerosierende Cholangitis kommt nicht vor	seltener als beim M. Crohn, sklerosierende Cholangitis kommt vor
<b>Komplikationen</b>	Fisteln, Stenose, Abszesse, Strikturen	toxisches Megakolon, schwere Blutungen, Kolonkarzinom
<b>Therapie</b>	keine operative Heilung möglich; operative Therapie oft komplikationsreich	operative Resektion ist kurativ (wenn auch Ultima ratio)

### 1.1.6 Bedeutung der physiologischen Darmflora

Etliche pathogene Mikroorganismen gelangen über den Darm als Eintrittspforte in den Wirtsorganismus. Darum ist es nicht verwunderlich, dass sich im Laufe der Evolution ein sehr komplexes Geflecht von Mechanismen zur Abwehr von Darmpathogenen herausgebildet hat. Außer den mechanischen Barrieren wie der Auskleidung der Mukosa mit Schleim und der chemischen Barriere durch Magensäure [182] ist in diesem Zusammenhang vor allem das Darm-assoziierte lymphatische Gewebe (engl.: *Gut-Associated Lymphoid Tissue*, GALT) zu nennen. Neben der Milz als zentralem, sekundärem Lymphorgan umfasst das GALT mehr lymphoide Zellen als jedes andere sekundäre Lymphorgan des Organismus [21]. Das lymphatische Gewebe der Mukosa umfasst T- und B-Zellen, Granulozyten, Mastzellen, Makrophagen und Dendritische

Zellen. Die T-Zellpopulation lässt sich in zwei Hauptgruppen unterteilen, die intraepithelialen Lymphozyten (IEL) und die diffus verteilten, primären Immunzellen der Lamina propria (LPL). LPLs machen den größten Anteil aus und bestehen zu 95% aus  $\alpha\beta$ -T-Zellen, die wie im peripheren Blut auch in  $CD4^+$  (engl.: *Cluster of Differentiation*) und  $CD8^+$  T-Zellen untergliedert werden können. IELs dagegen sind vorwiegend  $\gamma\delta$ - $CD8^+$  T-Zellen, die sich morphologisch und funktionell stark von LPLs unterscheiden. Im Dünndarm gibt es Lymphozytencluster, die auch als Peyer'sche Plaques bezeichnet werden. Diesen Lymphozyten werden Antigene durch hochspezialisierte Epithelzellen, den so genannten M-Zellen zugeführt und präsentiert [134, 217].

Aber auch Zellen wie Enterozyten, die nicht primär dem GALT zugerechnet werden [49], scheinen Aufgaben bei der Immunabwehr wahrzunehmen [91, 175]. Trotz intensiver Forschung wird das GALT noch nicht in allen Details verstanden. Nirgendwo sonst im Organismus befinden sich solch hohe Konzentrationen an körperfremder, potentiell antigener Substanz und so hohe Zahlen an Immunzellen so nahe beieinander wie im Kolon. Eine der herausragendsten Leistungen des GALT ist es, apathogene Mikroorganismen der Darmflora zu tolerieren und gleichzeitig Darmpathogene an der Invasion des Organismus zu hindern. Dies kann nur gelingen, wenn regulatorische Mechanismen eine überschießende Immunreaktion verhindern und gleichzeitig die Bereitschaft zur schnellen, adäquaten Immunantwort aufrechterhalten bleibt. Darum liegt die Vermutung nahe, dass sich das GALT im gesunden Organismus in einem sehr streng geregelten Gleichgewichtszustand befindet, der so genannten physiologischen Entzündung [21], die zu einer immunologischen Toleranz gegenüber der Darmflora führt.

Die oft als physiologische Darmflora bezeichnete mikrobielle Population des Magen-Darmtraktes ist ein äußerst heterogenes Gemisch aus mehr als 400 verschiedenen Spezies [182]. Der Großteil dieser Bakterien ist im distalen Ileum und Kolon lokalisiert wo sich die CED am häufigsten manifestieren. Hier liegt die Konzentration der anaeroben Bakterien um das 1000-fache über der von Aerobiern. Die Aufgabe der anaeroben Mikroflora besteht in der bakteriellen Fermentation von Nahrungspartikeln, Synthese von Vitaminen und Schutz vor pathogenen Organismen. Aerobe und anaerobe Bakterien stellen als Antigene eine ständige Herausforderung an die in der Mukosa residenten immunkompetenten Zellen dar [32, 62, 151]. Die exakte Zusammensetzung der Darmflora ist mannigfaltigen Einflüssen unterworfen und daher keineswegs konstant [17]. Zwischen den verschiedenen Wirtsspezies, aber auch zwischen den Individuen einer Spezies bestehen beträchtliche Unterschiede [182]. Auch für ein einzelnes Individuum kann sich die Florenzzusammensetzung ändern, was zum Beispiel für Säuglinge zum Zeitpunkt des Abstillens gut belegt ist [163-164].

Mittlerweile mehren sich die Berichte, dass auch die apathogene, physiologische Darmflora in immunologische Wechselwirkung mit dem Wirtsorganismus tritt. So kann man tief greifende Veränderungen immunologischer Parameter beobachten, wenn man zuvor keimfreie Tiere (KF-Tiere) mit einer apathogenen, physiologischen Flora besiedelt. Diese Veränderungen manifestieren sich sowohl im GALT selbst [73, 80, 95, 180-181], als auch in anderen peripheren Organen [29]. Daraus kann man folgern, dass der Normalflora neben der Verhinderung der Darmbesiedlung mit pathogenen Keimen [182] auch eine eher aktive, immunmodulatorische Rolle zukommt.

Studien haben gezeigt, dass sich die Veränderungen immunologischer Parameter als Folge der Besiedlung des Darmes in Abhängigkeit von dem besiedelnden Keim qualitativ und quantitativ deutlich voneinander unterscheiden können. Während beispielsweise SFB (engl.: *Segmented Filamentous Bacteria*) besiedelte KF-Tiere im Gegensatz zu Tieren, die mit Clostridien besiedelt wurden im Dünndarm einen deutlichen Anstieg an  $\alpha\beta$ -IELs sowie eine erhöhte MHC-II Expression und eine gesteigerte IgA Produktion zur Folge hatte [195], stieg im Dickdarm das Verhältnis von  $CD4^-CD8^+$  zu  $CD4^+CD8^-$   $\alpha\beta$ -IELs lediglich bei Clostridien-besiedelten, jedoch nicht bei SFB-besiedelten Tieren an [203].

Aufgrund der postulierten Rolle der Normalflora bei der Entstehung von CED führt dies zu neuen Einschätzungen über die Bedeutung der Florenzzusammensetzung für CED. So erscheint es vorstellbar, dass normalerweise apathogene Keime im genetisch prädisponierten Individuum zu Induktoren der Inflammation werden. Darum ist die Untersuchung der immunmodulatorischen Funktion der Darmflora von großer Bedeutung, um deren Rolle für die Entstehung von CED zu definieren.

Ferner wird diskutiert, ob ein Subtyp der Spezies *Escherichia coli* in der Pathogenese von Morbus Crohn [26, 28, 35-36] sowie die Gattungen *Shigella*, *Salmonella* und *Yersinia* in der Pathogenese von Colitis ulcerosa eine Rolle spielen [172]. Das Toxin von *Clostridium difficile* wird mit einer Verschlimmerung der Erkrankung in Zusammenhang gebracht [172]. In neueren Untersuchungen konnte eine bestimmte DNA-Sequenz von *Pseudomonas fluorescenc* in 43% der Läsionen bei Morbus Crohn-Patienten nachgewiesen werden [190, 213]. Diese Sequenz ließ sich bevorzugt aus Lamina propria mononukleären Zellen der erkrankten Mukosa isolieren. Ob die erwähnten Mikroorganismen allerdings primär für die Entstehung der CED verantwortlich sind, oder ob sie sich erst sekundär in der erkrankten Darmschleimhaut ansiedeln, ist unklar.

### 1.1.7 Tiermodelle für entzündliche Darmerkrankungen

Lange Zeit gestaltete sich die Untersuchung der CED sehr schwierig, da man in Ermangelung geeigneter Tiermodelle auf humanes Untersuchungsmaterial angewiesen war. In den letzten Jahren jedoch sind zahlreiche Tiermodelle, vor allem Mausmodelle zur weiteren Erforschung der CED etabliert worden [46]. Sie eignen sich besonders zum Studium der genetischen, immunologischen und umweltbedingten Faktoren, die eine initiiierende Rolle im Krankheitsgeschehen der CED spielen.

Wie bei Menschen sind genetisch determinierte Unterschiede in der Suszeptibilität für chronische Darmentzündungen auch bei verschiedenen Inzuchtmäusen mit experimentell induzierten entzündlichen Darmerkrankungen beobachtet worden [22, 46-47, 122-123, 131]. Interessanterweise erwiesen sich in mehreren Modellen bestimmte Inzuchtstämme als sehr anfällig und andere als relativ resistent gegenüber CED. Chemische Stoffe, mit denen nach oraler Applikation eine experimentelle Colitis bei Versuchstieren induziert werden kann, sind beispielsweise das Polysaccharid DSS (engl.: *Dextran Sulfate Sodium*) sowie das Kontaktallergen TNBS (engl.: *Trinitrobenzene Sulfonic Acid*). Sowohl bei der TNBS-induzierten [47] als auch bei der DSS-induzierten Colitis zeigten Mäuse des Stammes C3H/HeJ schwerere histopathologische Läsionen als Mäuse der Stämme DBA/2J und C57BL/6J [122].

Da bei verschiedenen Modellen Tiere unter keimfreien Bedingungen keine CED entwickeln, ist eine Mitbeteiligung der physiologischen Darmflora an der Entstehung der CED sehr wahrscheinlich. Ein Beispiel für ein solches Modell ist die HLA-B27-transgene Ratte [157, 171, 196]. Für die Entstehung einer Colitis spielen sowohl aerobe als auch anaerobe Bakterien eine Rolle, wobei insbesondere die obligat anaeroben Darmbakterien von Bedeutung sind [158]. So entwickelten HLA-B27-transgene Ratten, welche nur mit fakultativ anaeroben Bakterien besiedelt waren, eine deutlich geringere Colitis und Magenschleimhautentzündung (Gastritis) als solche, die sowohl mit fakultativ anaeroben als auch mit obligat anaeroben Bakterien assoziiert waren [157-158]. Im Verlauf der chronischen intestinalen Entzündung scheinen den verschiedenen Bakterien unterschiedliche Funktionen zuzukommen [157]. Keimfreie HLA-B27-transgene Ratten, die mit einem Bakteriencocktail, bestehend aus sechs obligat und fakultativ anaeroben Bakterienspezies, einschließlich *Bacteroides vulgatus*, einem strikt anaeroben Keim, infiziert wurden, bildeten eine stärkere Colitis aus, als solche, die mit dem gleichen Bakteriencocktail ohne *Bacteroides vulgatus* infiziert wurden [157]. Des Weiteren scheint *Bacteroides vulgatus* eher für die Entstehung einer Colitis und Gastritis verantwortlich zu sein, während andere Bakterien, wie z.B. *Escherichia coli* und Bakterien der Gattung *Enterococcus*

[142] eher für die Chronifizierung und systemische Ausbreitung der Entzündung von Bedeutung sind.

Aufgrund der sehr hohen genetischen Homologie zwischen Maus und Mensch ist davon auszugehen, dass die Gene, die bei der Maus den Phänotyp der CED modifizieren, auch beim Menschen eine Rolle spielen. Dies könnte Einsicht in die Pathogenese der CED geben und neue Ansätze für Therapie und Prophylaxe aufweisen.

## **1.2 Angeborenes Immunsystem**

Die Entwicklung des Immunsystems wurde durch den Selektionsdruck, der von pathogenen Mikroorganismen ausgeht, entscheidend beeinflusst [127]. Bei Wirbeltieren wird die Immunantwort in angeborene (engl.: *Innate*) und erworbene Immunität (engl.: *Adaptive Immunity*) unterteilt [7-8, 37-38, 192]. Das angeborene Immunsystem ist die erste Verteidigungslinie des Körpers gegen eine Vielzahl von Krankheitserregern. Hierzu zählen unter anderem der Säuremantel der Haut, eine intakte epitheliale Barriere sowie die Sekretion von Defensinen, das Komplementsystem, antimikrobielle Enzyme sowie unspezifische Mediatoren wie Interferone und Interleukine. Eine weitere Aufgabe des angeborenen Immunsystems ist es, die erworbene Immunantwort zu induzieren [7-8]. Das angeborene Immunsystem, auch als unspezifisches Immunsystem bezeichnet, da es unabhängig vom jeweils eindringenden Erreger aktiv werden kann, ermöglicht eine sehr schnelle Antwort auf eine Infektion schon in den ersten Stunden [79]. Bei Vertebraten umfasst dieses System Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen (DCs), welche aufgrund ihrer Fähigkeit eingedrungene Pathogene durch Phagozytose aufzunehmen, auch als Phagozyten bezeichnet werden [7-8, 23, 85]. Darüber hinaus sind Mastzellen und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) zu nennen, wobei erstere hauptsächlich für die Auslösung allergischer Reaktionen verantwortlich sind, während NK-Zellen eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunität gegen Viren und andere intrazelluläre Krankheitserreger übernehmen und an der antikörperabhängigen zellvermittelten Cytotoxizität beteiligt sind.

Durch die Infektion mit einem pathogenen Organismus kommt es durch die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie IL-6 und IL-8 zu Entzündungsreaktionen, die wiederum zur Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems führen [85]. Die Erkennung von Bakterien geschieht beispielsweise mit Hilfe der Toll-like Rezeptoren (TLRs), welche körperfremde von körpereigenen Bestandteilen unterscheiden können [7-8, 85, 103, 128, 192].

### 1.2.1 Mononukleäre Phagozyten und ihre Rolle bei der Immunabwehr

Wie oben erwähnt setzt sich das Immunsystem des menschlichen Körpers aus zwei Komponenten zusammen, dem angeborenen, unspezifischen und dem erworbenen, spezifischen Immunsystem. Beide Komponenten ergänzen sich und bilden einen gemeinsamen Abwehrmechanismus. Aufgabe des angeborenen Immunsystems ist die initiale Erkennung von Krankheitserregern oder entarteten Zellen und deren Beseitigung sowie die Einleitung der spezifischen Immunantwort durch T- und B-Zellen. Zellen des angeborenen Immunsystems werden durch verschiedene mikrobielle Strukturen (Zellwandbestandteile von Bakterien, CpG-DNA, doppelsträngige RNA, usw.) oder den Verlust von Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: *Major Histocompatibility Complex*, MHC) Klasse-I-Molekülen auf somatischen Zellen aktiviert. Die Abwehrreaktionen beinhalten sowohl Phagozytose als auch die Sekretion antimikrobieller Enzyme und löslicher Mediatoren.

Zellen des mononukleären Phagozytensystems (Monozyten, Makrophagen, myeloische DCs und deren Vorläufer) spielen eine besondere Rolle bei der Immunabwehr, da sie sowohl für die rasche angeborene Immunantwort, als auch für die Induktion einer spezifischen Antwort wichtig sind. Insbesondere DCs sind in der Lage phagozytierte Antigene im Kontext mit MHC-II zu präsentieren, ein essentieller Schritt zur Aktivierung naiver T-Zellen.

### 1.2.2 Ontogenese, Phänotypen und Morphologie

Ausgehend von pluripotenten Stammzellen im Knochenmark entstehen die myeloische und die lymphatische Stammzellreihe mit ihren Vorläuferzellen. Aus lymphatischen Vorläufern entstehen B- und T-Lymphozyten sowie NK-Zellen und eine Gruppe von DCs. Wohingegen aus der myeloischen Reihe nach verschiedenen Differenzierungsschritten Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten und mononukleäre Phagozyten hervorgehen. Die Proliferation, Differenzierung und Migration dieser Zellen wird unter anderem durch Zytokine und Chemokine stimuliert [114]. Im Knochenmark spielen dabei die Kolonie-stimulierenden-Faktoren (engl.: *Colony Stimulating Factor*, CSF) eine wesentliche Rolle. Die Differenzierung vom myeloischen Vorläufer zum Monoblasten, welcher sich durch eine hohe Selbsterneuerungskapazität auszeichnet, erfolgt unter Stimulierung mit Interleukin (IL)-3, IL-4, Granulozyten/Makrophagen Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) und M-CSF. Während ein Teil der Zellen zu Makrophagen differenziert und unter steady-state-Bedingungen im Gewebe verbleibt, reift ein weiterer Anteil der Monozyten zu DCs, welche nach Phagozytose von Antigenen in Richtung Lymphknoten migrieren [156].

Zellen des mononukleären Phagozytensystems werden über die Expression spezifischer Oberflächenantigene charakterisiert. Monozyten tragen unter anderem die Marker CD14, CD11a, CD11b und CD11c auf ihrer Zelloberfläche. MHC-II ist nur gering exprimiert, wird aber bei der Differenzierung zu Makrophagen und DCs hoch reguliert. Makrophagen weisen neben anderen Markern, CD14, CD16 und ICAM-1 (engl.: *Intercellular Adhesion Molecule* oder CD54) auf. Unreife DCs tragen als Oberflächenantigene MHC-II, CD1a, den Fc-Rezeptor (FcR oder CD89), CD11c und kein CD14. Während der Reifung, die durch Stimuli wie LPS initiiert wird, werden spezifische Marker wie CD83, CD54, CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) hoch reguliert [19].

### 1.2.3 Dendritische Zellen

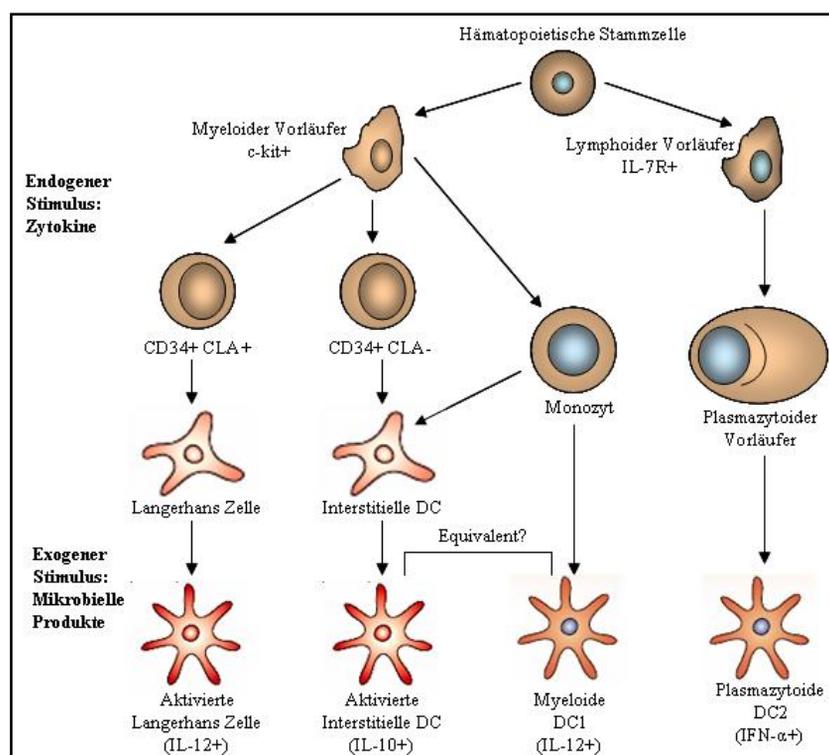
Diese wohl wichtigsten Zellen des menschlichen Immunsystems wurden von Steinman und Cohn 1973 [184] in den peripheren Lymphorganen der Maus gefunden und gehören somit zu der als letztes entdeckten Population von Immunzellen. Die wissenschaftlichen Auseinandersetzungen über ihre Identität und die Abgrenzung von anderen potenziell antigenpräsentierenden Zellen, Makrophagen und B-Zellen, beanspruchte viel Zeit. Heute jedoch steht außer Frage, dass DCs *in-vivo* die meisten T-Zell-Antworten induzieren, da sie die einzigen Zellen sind, die in Abwesenheit von aktivierten T-Zellen professionell Antigen präsentieren und gleichzeitig T-Zellen kostimulieren können [84]. DCs fungieren über die Verbindung von Phagozytose und Antigenpräsentation als Schaltstelle zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem. Gerade deswegen sind sie auch primäres Zielobjekt, Vehikel und Vermehrungsreservoir von pathogenen Krankheitserregern.

Mit ihrem sternartig verzweigten Zellkörper sind DCs prädestiniert, sich im Gewebe durch Extension und Retraktion ihrer Fortsätze zu bewegen. Außerdem bieten diese, je nach Vorkommen entweder langen dünnen oder astartig verdickten Zytoplasma-Protrusionen eine große Kontaktfläche für die Aufnahme von Antigen und die Adhäsion an naive Lymphozyten [19].

#### 1.2.3.1 Ontogenese und Zelltypen von DCs

Ihren Bildungsort haben alle Typen von DCs im Knochenmark. Entscheidende Wachstumsfaktoren sind Flt-3 Ligand und GM-CSF. Unter deren Einfluss differenzieren aus CD34<sup>+</sup>-hämatopoetischen Stammzellen lymphoide (IL-7R<sup>+</sup>) und myeloide (c-kit<sup>+</sup>) Vorläuferzellen [116, 124-125, 153]. Noch im Knochenmark bilden sich in der myeloiden Linie CLA<sup>+</sup>- (engl.: *Cutaneous Lymphocyte Associated Antigen*) und CLA<sup>-</sup>-Vorläufer aus [179], wie in Abb.

1 dargestellt. Erstere wandern als Langerhans-Zellen (LCs) in die Epidermis, aus  $CLA^-$ -Vorläufern entwickeln sich  $CD1a$ -Zellen, die als interdigitierende DCs (iDCs) die Dermis und andere Gewebe besiedeln. LCs und iDCs besitzen beide den myeloiden Marker  $CD11c$  und können im unreifen Stadium nach der *steady-state*-Migration in den Lymphknoten Selbstantigene von apoptotischen Zellen präsentieren [187]. Die dort induzierten regulatorischen T-Zellen ( $T_{Reg}$ , früher als Suppressorzellen bezeichnet) vermitteln als Antwort auf die Präsentation des Selbstantigens zusammen mit geringer Kostimulation Toleranz. Bei Infektion und Entzündung können reife LCs und iDCs nach Fremdartigen-Aufnahme unmittelbar in die drainierenden Lymphknoten wandern und dort primäre Immunreaktionen auslösen.



**Abb. 1** Entwicklungswege Dendritischer Zellen. Unter dem Einfluss von Zytokinen differenzieren Vorläufer zu LCs und DCs in einem ruhenden Zustand (phänotypische Reifung). Monozyten und plasmazytoide Vorläufer bleiben unter dem endogenen Einfluss von Zytokinen in einem weniger differenzierten Zustand. DCs myeloider und lymphoider Herkunft benötigen Produkte von Bakterien oder Viren um aktiviert (funktionelle Reifung) zu werden. CLA, *cutaneous lymphocyte associated antigen*. Verändert, nach [179].

Die  $CD34^+$ -Stammzellen können im Knochenmark zu zwei weiteren Vorläufer-Zellen differenzieren, den myeloiden ( $CD14^+$  und  $CD11c^+$ ) Monozyten und lymphoiden (prä  $T\alpha^+$ ), plasmazytoiden Vorläufer-Zellen [179]. Monozyten können im Blut Bakterien phagozytieren. In Abhängigkeit von Lipopolysaccharid (LPS) aus der Zellwand Gram negativer Bakterien können Monozyten dann zu Makrophagen differenzieren. Anders verhält es sich bei Bakterienkontakt in Gegenwart inflammatorischer Zytokine wie GM-CSF. In dieser Situation differenzieren Monozyten zu DCs vom Typ-1 [162, 169]. Diese sind zur Produktion großer Mengen des inflammatorischen Zytokins IL-12 befähigt, werden durch GM-CSF stimuliert und exprimieren TLR2, TLR3 und TLR4 [57, 82-83]. Dagegen differenzieren Virus-infizierte Vorläufer-Zellen zu plasmazytoiden, IFN- $\alpha$  produzierenden DCs (DC2-Typ). Charakteristischerweise exprimieren

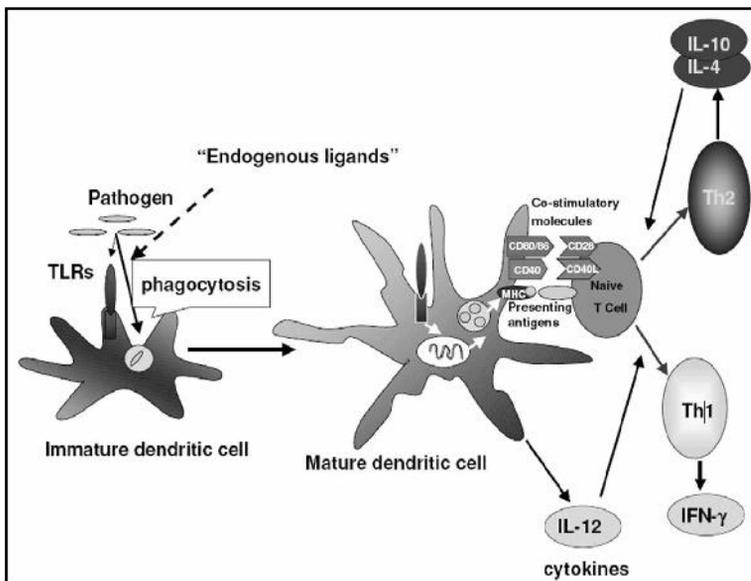
plasmazytoide Zellen das Molekül BDCA-2 (engl.: *Blood Dendritic Cell A-2*; CD303) und können über TLR9 durch bakterielle DNA und nicht-methylierte CpG Desoxy-Oligonukleotide stimuliert werden [44, 104-105].

### 1.2.3.2 Aktivierung und Polarisation von T-Zellen

Gelangen DCs in die Lymphknoten, aktivieren sie nicht nur T-Lymphozyten, sondern sind auch für die Differenzierung dieser Effektorzellen entscheidend [186]. In den T-Zell-Arealen der Lymphknoten präsentieren DCs die antigenen Strukturen auf MHC-II Molekülen zur Erkennung durch T-Zellrezeptoren (engl.: *T-Cell Receptors*; TCR) naiver T-Zellen, die zu 95% aus  $\alpha\beta$ - und zu 5% aus  $\gamma\delta$ -TCRs bestehen. Die Interaktion von DC und T-Zelle stellt das erste Signal der T-Zellaktivierung dar [20]. Für die Induktion einer Immunantwort sind allerdings weitere Signale notwendig. Durch die Interaktion der kostimulatorischen Moleküle CD80 bzw. CD86 mit CD28, welches konstitutiv auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert wird, kommt es zur Induktion der IL-2 Synthese. IL-2 ist essentiell für die klonale Expansion von T-Zellen [1] und wird nach Aktivierung von ihnen selbst produziert. Aus diesem Grund ist die Interaktion zwischen CD80/CD86 mit CD28 ein weiteres Signal, welches für die Proliferation und Differenzierung naiver T-Zellen essentiell ist [186]. Induziert durch die Aktivierung der T-Zellen, wird auf deren Oberfläche ein Molekül exprimiert, welches als CD154 oder CD40L bezeichnet wird und der Ligand für das CD40 Antigen von DCs ist. Durch die Bindung von CD154 an CD40 nimmt die Expression der kostimulatorischen Moleküle weiter zu, wodurch wiederum die Aktivierung naiver T-Zellen verstärkt wird.

Für die Differenzierung von  $CD4^+$  T-Zellen in Th1- und Th2-Effektorzellen sind weitere Signale notwendig, wie die Sekretion von immunmodulatorischen Zytokinen. Essentiell für die Polarisierung von Th1-Effektorzellen ist IL-12, welches von aktivierten DCs in den T-Zell-Arealen sezerniert wird [119, 136, 199]. TLRs, welche auf der Oberfläche von DCs exprimiert werden, spielen durch die Erkennung spezifischer pathogener Strukturen eine entscheidende Rolle bei der Sekretion von IL-12. Ein weiteres Th1-polarisierendes Zytokin ist  $IFN\gamma$ . Die Stimulation von naiven T-Zellen durch IL-12 führt zur vermehrten  $IFN\gamma$  Produktion, wodurch es zu einer verstärkten Th1-Polarisierung kommt [78].

Der Reifungsprozess von unreifen zu reifen DCs sowie deren Fähigkeit naive T-Zellen zu aktivieren ist in Abb. 2 dargestellt.



**Abb. 2** Die Rolle von TLRs auf die Regulation der angeborenen Immunantwort. TLRs auf unreifen DCs erkennen konservierte Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen von Mikroorganismen. Aktivierung der TLRs sowie Phagozytose stimuliert die DC-Reifung. Reife DCs präsentieren die Antigene naiven T-Zellen, in Assoziation mit der Induktion von co-stimulatorischen Molekülen und Zytokinen. Interleukin (IL)-12 ist ein wichtiges Zytokin in der Differenzierung naiver T-Zellen und induziert die Aktivierung von Th1-Zellen sowie die Produktion von Zytokinen wie  $\text{IFN-}\gamma$ . Die Differenzierung naiver T-Zellen zu Th2-Zellen führt zur Produktion von Zytokinen wie IL-4, 5, 10 und 13 [13].

Im Unterschied zur Th1-Polarisierung ist der genaue Mechanismus der Th2-Polarisierung nicht eindeutig geklärt. Anfänglich ging man davon aus, dass alleine die Abwesenheit von IL-12 ausreicht, um Th2-Immunantworten zu induzieren [86, 109]. Zusätzlich weisen immer mehr Daten darauf hin, dass das für die Th2-Polarisierung notwendige Zytokin IL-4 vermutlich ausschließlich von T-Zellen selbst produziert wird [101].

Th1-Immunantworten dominieren vor allem bei klassischen inflammatorischen Prozessen oder bei viralen Infektionen [100]. Typische Zytokine, welche von Th1-Zellen produziert werden, sind  $\text{IFN}\gamma$ , IL-2 sowie  $\text{TNF-}\alpha$  und  $\text{TNF-}\beta$ , welche wiederum sehr spezifische Aufgabe erfüllen. Bei der so genannten Zell-vermittelten Überempfindlichkeitsreaktion vom Spättyp (Typ IV) ist  $\text{IFN-}\gamma$  für die Aktivierung von Makrophagen, IL-2 für die T-Zell-Proliferation und -Aktivierung,  $\text{TNF-}\alpha$  und  $\beta$  für die Aktivierung von Endothelzellen und aktivierte Makrophagen, über die Sekretion von IL-12, ebenfalls für die T-Zell-Aktivierung zuständig. Im Gegensatz dazu findet man Th2-Immunantworten hauptsächlich im Rahmen von Allergien und Parasiteninfektionen [87, 92, 107]. Als typische Zytokine, die von Th2-Zellen sezerniert werden, gelten IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13, die für die Antikörpersynthese, Eosinophilen- und IgE-Aktivierung von Bedeutung sind.

### 1.2.4 Makrophagen

Makrophagen gehören wie DCs zu den mononukleären Leukozyten und sind im ganzen Körper verteilt [60, 188]. Die Tatsache, dass sowohl Makrophagen als auch DCs aus Monozyten hervorgehen zeigt, wie eng diese Verwandtschaft ist [42, 60]. Wichtigster Unterschied zwischen den beiden Zelltypen ist, dass Makrophagen hauptsächlich zur Aufnahme von Zellen durch

Phagozytose dienen, während DCs der Antigenpräsentation dienen [2, 59, 188, 204]. Im Gegensatz zu DCs beseitigen Makrophagen aber auch apoptotische körpereigene Zellen und Zellbestandteile, die nicht mehr benötigt werden, wie etwa die Zellkerne von ausgereiften Erythrozyten [2]. Zusammen mit Neutrophilen werden Makrophagen als professionelle Phagozyten bezeichnet. Die Erkennung von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (engl.: *Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMPs) bestimmt auch hier die Unterscheidung von selbst und nicht-selbst [2, 51, 197]. Makrophagen können außerdem zwischen pathogenen und nicht-pathogenen Bakterien unterscheiden [37-38, 197]. Makrophagen sind sowohl in der angeborenen als auch in der erworbenen Immunantwort der Prototyp der Effektorzelle [42, 176, 188].

Aktiviert werden sie durch eine Kombination der Signalmoleküle IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , wodurch sich ihre Fähigkeit intrazelluläre Mikroorganismen zu töten und abzubauen erhöht [132]. Ähnlich wie bei DCs führt die Stimulation von Makrophagen zur Produktion der Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12 sowie zur verstärkten Expression co-stimulatorischer Moleküle wie CD80 oder CD86 und Antigen-präsentierenden Molekülen wie MHC-II [24, 54, 118, 177, 221].

Die Aktivität proinflammatorischer Makrophagen kann jedoch auch unter anderem durch die Sekretion von Stickstoffmonoxid (engl.: *Nitric Oxide*, NO) zu Gewebeschädigungen führen, so dass deren Regulation eine wichtige Rolle während Entzündungsreaktionen spielt [42, 59]. Es gibt Hinweise, dass aktivierte Makrophagen nach einer Entzündung auch die Wundheilung fördern [42].

### **1.3 Rezeptoren und deren Liganden**

Die zentrale Aufgabe des Immunsystems ist die Differenzierung zwischen Fremd und Eigen. Diese Unterscheidung ist wesentlich für die Erkennung und Eliminierung von Krankheitserregern oder entarteten Zellen und zur Vermeidung von Autoimmunität. Das erworbene Immunsystem verfügt durch Rekombination über eine fast unlimitierte Zahl von antigenspezifischen T-Zellen und Antikörpern. Das angeborene Immunsystem dagegen besitzt nur eine begrenzte Anzahl von Rezeptoren, die konservierte, als PAMPs bezeichnete Strukturen, erkennen. Diese so genannten Mustererkennungs-Rezeptoren (engl.: *Pattern-Recognition Receptors*, PRRs) lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. Die Eine vermittelt Phagozytose, die Andere leitet die Produktion proinflammatorischer und regulatorischer Zytokine ein und ist für die Induktion kostimulatorischer Moleküle verantwortlich. Zu den Mitgliedern der zweiten Gruppe gehören vor allem die TLRs [6, 15].

### 1.3.1 Entdeckung von Toll

Der Rezeptor Toll wurde 1984 in der Fliege *Drosophila melanogaster* von Anderson and Nüsslein-Volhard entdeckt und spielt dort eine wesentliche Rolle in der dorso-ventralen Ausrichtung des Embryos [12]. Ein Zusammenhang zwischen der Immunabwehr und Toll wurde erst später entdeckt [67, 192]. Der extrazelluläre Bereich dieses Rezeptors besteht aus einer Leucin-reichen Domäne, während der intrazelluläre Teil des Rezeptors dem Interleukin-1-Rezeptor (IL-1R) ähnlich ist, weshalb man diesen Bereich als TIR-Domäne (Toll/IL-1R homology domain) bezeichnet [55].

### 1.3.2 TLRs der Wirbeltiere

Wenig später fand man in Säugetieren homolog zum Toll, die TLRs. Bislang wurden 11 Mitglieder dieser Rezeptor-Familie in Säugern charakterisiert, wobei TLR10 bisher nur im humanen [31] und TLR11 nur im murinen [226] System nachgewiesen werden konnte. Für viele dieser TLRs, die im Gegensatz zum *Drosophila* Toll direkt durch Fremdstrukturen aktiviert werden, kennt man deren Liganden. Nach einer Aktivierung von TLRs auf mononukleären Phagozyten kommt es zur Produktion verschiedener Zytokine, welche systemisch und lokal wirken und für die Rekrutierung weiterer Immunzellen sowie für die Aktivierung einer humoralen Immunantwort sorgen. Die Sekretion dieser Zytokine führt im Allgemeinen zur Stimulierung des Immunsystems und damit zu einer verbesserten Abwehr gegen Krankheitserreger. Bei einer überschießenden Produktion kann es allerdings im schlimmsten Fall zum septischen Schock und infolge dessen zum Tod kommen [63, 201].

### 1.3.3 Expression von Toll-like Rezeptoren

TLRs werden auf verschiedenen Zelltypen des Immunsystems exprimiert [225], hauptsächlich jedoch auf Zellen des mononukleären Phagozyten-Systems (MPS). Die Expression von TLRs auf den unterschiedlichen Immunzellen ist in Tab. 2 dargestellt. Die Expression einzelner TLRs ist allerdings nicht nur auf Immunzellen beschränkt, so kommt der humane TLR3 beispielsweise auf Fibroblasten und der murine TLR2 auf Adipozyten vor.

**Tab. 2** Expression von Toll-like Rezeptoren auf humanen Immunzellen

	TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR6	TLR7	TLR8	TLR9	TLR10
<b>Monozyten</b>	++	+++		+++	+	+		++		
<b>Makrophagen</b>	+	+	-/+	+++	+	+	-/+	++		
<b>plasmazytoide DCs</b>	+					-/+	++		++	
<b>myeloische DCs</b>	+	+	++	-/+	+	+		+		
<b>B-Zellen</b>	++					++	+		+	++
<b>T-Zellen</b>										
<b>NK-Zellen</b>	+									

+++ : sehr hohe Expression, - : keine Expression [90, 130, 135].

### 1.3.4 Aktivierung von Toll-like Rezeptoren

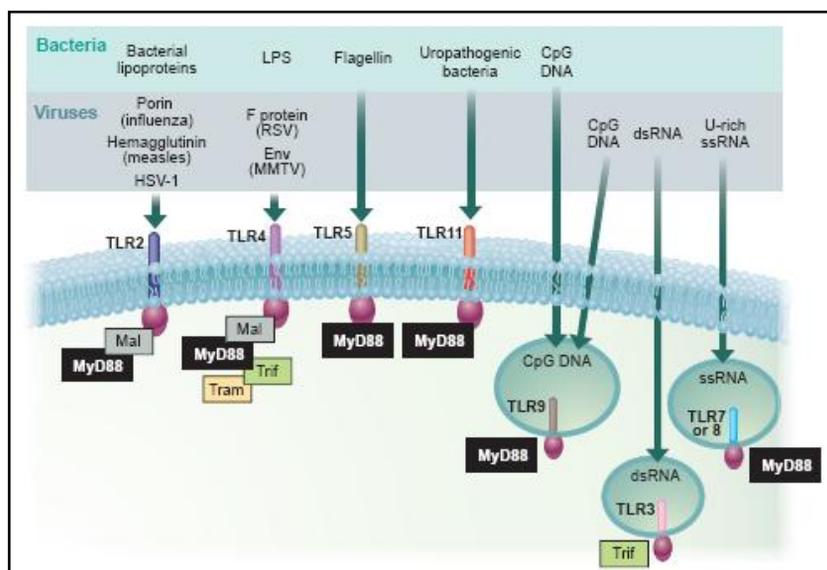
Die Erkennung spezifischer Agonisten führt im Allgemeinen zur Dimerisierung von TLRs [3, 145]. Die meisten PAMPs werden in Form von TLR-Homodimeren erkannt, lediglich TLR1 und TLR6 scheinen als Heterodimere mit TLR2 zu agieren [145]. So wird das Heterodimer aus TLR1 und TLR2 von einigen speziellen bakteriellen triacetylierten Lipopeptiden stimuliert [30]. Die Kombination aus TLR2 und TLR6 reagiert auf diacetylierte Lipopeptide von beispielsweise Mycoplasmen [10], Peptidoglykan [193, 224], Lipoarrabinomannan der Mycobakterien [206] und Zymosan, einem Bestandteil der Hefe [205].

Untersuchungen an verschiedenen LPS-hyporesponsiven Mausstämmen ergaben, dass TLR4 ein wesentlicher Bestandteil des LPS-Signalwegs ist [149, 155]. In dem Mausstamm C3H/HeJ konnte eine Punktmutation im kodierenden Bereich des TLR4-Gens für das fehlende Ansprechen auf LPS verantwortlich gemacht werden. Bei LPS-hyposensiblen C57BL/10ScCr-Mäusen wurde eine genomische Deletion des TLR4 Gens festgestellt. Auch durch Genetargeting hergestellte TLR4 defiziente Mäuse zeichnen sich durch einen Defekt in der LPS-Signaltransduktion aus.

Die aktivierende Komponente des LPS, einem Bestandteil der Zellwand Gram negativer Bakterien ist Lipid A, welches aus einem Diglucosamin besteht, das über Ester- und Amidbrücken mit langkettigen Fettsäuren verbunden ist (Poltorak et al., 2000; Lien et al., 2001). Die Bindung von Lipid A an TLR4 ist zusätzlich abhängig von dem sezernierten und TLR4-assoziierten Protein MD-2 [50, 96]. Endogene Liganden von TLR4 sind zum Beispiel die Hitzeschockproteine Hsp60 und Hsp70 [16, 209] und Fibronectin [140].

Ein weiteres bakterielles PAMP ist Flagellin, ein Protein, das an der Motilität Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien beteiligt ist. Dieses Protein aktiviert TLR5 [68]. TLR3 wird durch doppelsträngige RNA (dsRNA) aktiviert, die im Allgemeinen bei viralen Infekten produziert wird [9]. CpG-Dinukleotide sind im menschlichen Genom unterrepräsentiert und meistens methyliert. Unmethylierte CpG-Motive bakteriellen, aber auch viralen Ursprungs wirken als PAMPs und aktivieren nach Internalisierung hauptsächlich den intrazellulär exprimierten TLR9 [64, 74, 76]. Zellen, welche TLR7 und TLR8 exprimieren, können durch Imidazoquinoline, die

man als synthetische Immunmodulatoren mit antiviralen und antitumoralen Eigenschaften einsetzt, aktiviert werden. Darüber hinaus spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Erkennung viraler Einzelstrang-RNA (ssRNA) [75]. Für TLR10 konnte wie oben bereits erwähnt noch kein natürlicher Ligand gefunden werden. Der erst kürzlich identifizierte TLR11 ist bekannt dafür uropathogene *Escherichia coli* zu erkennen, weshalb ihm eine Bedeutung bei der Bekämpfung von Infektionen der inneren Organe und des Urogenitaltrakts zugesprochen wird [226]. Der erste nun definierte Ligand für TLR11 ist ein Profilin-ähnliches Protein des Bakteriums *Toxoplasma gondii* [110, 223]. Während TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 intrazellulär, in endosomalen Kompartimenten lokalisiert sind, werden die übrigen TLRs an der Zelloberfläche exprimiert [4, 69, 111, 126]. Ein Überblick über die TLRs und ihre bakteriellen und viralen Liganden im murinen System ist in Abb. 3 dargestellt.

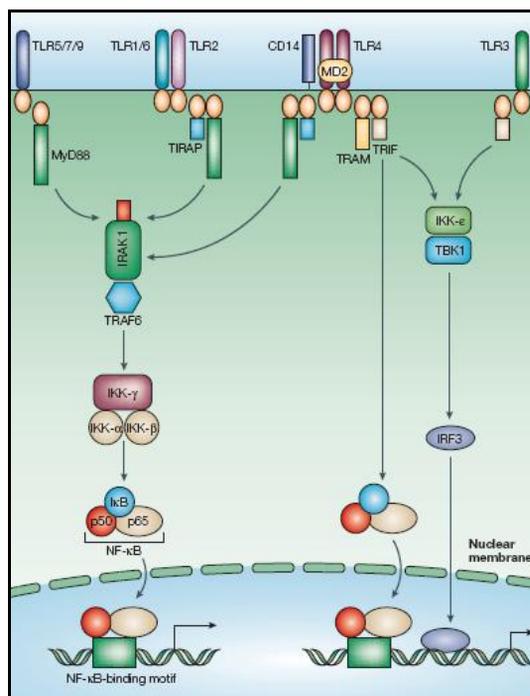


**Abb. 3** Murine TLRs und ihre Liganden. TLRs auf Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS) erkennen Proteine oder Lipide bakterieller oder viraler Herkunft. TLRs in endosomalen Membranen detektieren bakterielle sowie virale Nukleinsäuren. HSV-1, Herpes simplex virus 1; LPS, lipopolysaccharide; RSV, Roux sarcoma virus; MMTV, mouse mammary tumor virus [137].

### 1.3.5 Signalwege von Toll-like Rezeptoren

Bei der Stimulierung von TLRs werden Adaptermoleküle rekrutiert, die intrazellulär an die TIR (Toll/IL-1-Rezeptor)-Domäne der TLRs binden. Diese Adaptern besitzen selbst eine TIR-Domäne, die für die Interaktion mit TLRs verantwortlich ist. Nicht nur die Vielfalt an Agonisten entscheidet über den weiteren Verlauf der Signaltransduktion, sondern auch die an der Signalweiterleitung beteiligten Adapter. Das zentrale Adaptermolekül der meisten TLRs ist MyD88 (engl.: *Myeloid Differentiation Factor 88*). Während TLR5, TLR7 und TLR9 alleine über MyD88 reguliert werden, wurden für die anderen TLRs weitere Adaptermoleküle identifiziert. Hierbei handelt es sich zum einen um TIRAP/Mal (engl.: *TIR domain-containing Adapter Protein / MyD88-adaptor-like*), welches bei der TLR2 und TLR4 MyD88-abhängigen Signaltransduktion eine entscheidende Rolle spielt. Ein weiteres Molekül ist TRIF (engl.: *TIR*

*domain-containing adapter inducing IFN- $\beta$* ) [219]. MyD88 ist ein Adapter der für die Produktion proinflammatorischer Zytokine notwendig ist, während TRIF den MyD88-unabhängigen Signalweg über TLR3 und TLR4 vermittelt. In diesem Zusammenhang wurde ein weiteres Adaptermolekül namens TRAM (engl.: *TRIF-Related Adaptor Molecule*) identifiziert, welches ebenfalls bei dem MyD88-unabhängigen Signalweg über TLR4 von Bedeutung ist [220]. Eine Darstellung der Signaltransduktionswege der verschiedenen TLRs und ihrer Adaptermoleküle ist in Abb. 4 gezeigt.



**Abb. 4** Beteiligung TIR-Domänen-enthaltender Adapter bei der TLR-vermittelten Signalweiterleitung [7].

Der komplette Signalweg wird hier am Beispiel des bisher am besten untersuchten und für diese Arbeit bedeutendsten Rezeptors TLR4 erläutert. LPS-Monomere werden im Serum von löslichem LBP (engl.: *LPS Binding Protein*) gebunden [218]. Dieser Komplex bindet dann zum einen an GPI (Glycosylphosphatidylinositol)-gebundenes CD14, ein in die Plasmamembran verankertes Oberflächenmolekül ohne Transmembrandomäne, zum anderen an sezerniertes CD14. Die Interaktion von TLR4 mit diesem Komplex führt zur Dimerisierung von TLR4-Molekülen und damit zu deren Aktivierung, wobei die Spezifität der LPS-Bindung durch das TLR4-assoziierte Protein MD-2 (engl.: *Myeloid Differentiation*) unterstützt wird [53, 178]. Zusammen mit TOLLIP (engl.: *TOLL-Interacting Protein*) interagiert das Adaptermolekül MyD88 nun über seine N-terminale „death domain“ mit der Serin/Threonin Protein Kinase IRAK (engl.: *IL-1 Receptor-Associated Kinase*) und rekrutiert diese an den Rezeptor-Heterokomplex, was zur Autophosphorylierung der Kinase führt [215]. Die Phosphorylierung

von IRAK ist ausschließlich für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B von Bedeutung, nicht aber für den MAP-Kinase-Weg (engl.: *Mitogen-Activated Protein Kinase*) [113]. An dieser Stelle teilt sich nun der Signalweg. Hyperphosphorylierte IRAK verlässt den Rezeptorkomplex und interagiert mit TRAF6 (engl.: *TNF Receptor-Associated Factor*) [99] welches wiederum die MAP-Kinasen TAK1 (engl.: *TGF- $\beta$  Activated Kinase*) und MEKK1 (engl.: *MAPK Extracellular Kinase Kinase*) bindet [102]. TAK1 und/oder MEKK1 aktivieren die I $\kappa$ B Kinase (engl.: *Inhibitor  $\kappa$ B*), woraufhin das inhibitorische Protein I $\kappa$ B phosphoryliert wird, es zu dessen Degradierung und damit zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B kommt. Dieser transloziert in den Zellkern und reguliert dort eine Reihe Aktivierungs-assoziiierter Gene. ECSIT (engl.: *Evolutionarily Conserved Intermediate in Toll-pathway*) kann ebenfalls an TRAF6 binden und führt über die Aktivierung von MAP-Kinasen wie JNK (engl.: *c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal Kinase*), p38 und ERK (engl.: *Extracellular Related Kinase*) zur Freisetzung von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 (engl.: *Activating Protein*) [102].

Das oben bereits erwähnte Adapterprotein TRIF vermittelt den MyD88-unabhängigen Signalweg. TRAM (engl.: *TRIF-Related Adapter Molecule*) assoziiert mit TLR4 bzw. TLR3 und TRIF, in geringerem Maße auch mit I $\kappa$ B, IKK $\epsilon$  und TBK1 (engl.: *TANK-Binding Kinase*) [50, 220], siehe Abb. 4, was zu einer Induktion von IFN- $\beta$  und IFN-induzierbaren Genen führt [77]. Durch die Interaktion mit TRIF kommt es zur Phosphorylierung von IRF3 (engl.: *Interferon Regulatory Factor*), was eine Translokation von IRF3 und damit eine gesteigerte transkriptionelle Aktivität zur Folge hat. IFN- $\beta$  ist für die Produktion von iNOS (engl.: *Inducible Nitric Oxide Synthase*) und IP10 (engl.: *Interferon-inducible Protein*) notwendig [117, 198, 222]. Für TLR2 sind noch zwei weitere Signalwege charakterisiert. Zum einen kontrollieren PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase) und die GTPase Rac1 die Aktivierung von NF- $\kappa$ B unabhängig von I $\kappa$ B [14], zum anderen wird durch die Stimulation von TLR2 MyD88-abhängig sowohl NF- $\kappa$ B aktiviert als auch Apoptose induziert, was über FADD (engl.: *Fas-Associated Death Domain-protein*) und Caspase 8 verläuft [11].

In den meisten Studien wird ausschließlich über die Spezifität einzelner mikrobieller Bestandteile, ihre Bindung und Effekte berichtet. Viel wahrscheinlicher ist jedoch, dass ein Zusammenspiel verschiedener mikrobieller Bestandteile eines Organismus über verschiedene TLRs einer Zelle vorliegt, die je nach Ligand in angepasste, leicht unterschiedliche Reaktionen münden [207-208]. Eine Heterodimerisierung unterschiedlicher TLRs kann zur Veränderung der Ligandenspezifität führen, was beispielsweise mit der Interaktion von TLR2 und TLR6 gezeigt werden konnte [144-145, 194].

## **1.4 Zielsetzung**

Ziel dieser Arbeit war es durch die Analyse genetisch varianter Mäuse, die sich in der Expression der TLRs unterscheiden, die Rolle der angeborenen Immunität für die Ansiedlung der Wirtsflora und der daraus resultierenden Rolle für die Pathogenese entzündlicher Darmerkrankungen zu untersuchen. Das Wechselspiel zwischen der genetisch determinierten Ausstattung mit diesen zentralen Mustererkennungsmolekülen der angeborenen Immunität und der wirtsspezifischen Flora und deren Bedeutung für die Entwicklung von CED sollte molekular- und mikrobiologisch untersucht werden. Durch die Aufzucht genetisch varianter Mäuse unter streng gnotobiotischen, sprich keimfreien Bedingungen sowie der gezielten Rekolonisierung mit definierten Bakterienarten wurde eine Aussage über den Einfluss der genetischen Heterogenität des TLR-Systems auf die Ausbildung einer intestinalen Flora und ihrer Bedeutung in der Pathogenese der CED erwartet. Die Kenntnis über die am Krankheitsgeschehen beteiligten Bakterien ist wichtig für das Verständnis der Pathogenese von CED und könnte neue Ansätze für Therapie und Prophylaxe, beispielsweise durch die Induktion einer immunologischen Toleranz bieten.

Des Weiteren soll die daraus resultierende unterschiedliche Reaktivität des angeborenen Immunsystems, insbesondere der DCs und Makrophagen sowie deren Einfluss auf leichte oder schwere Krankheitsverläufe der CED untersucht werden. Langfristiges Ziel ist eine gezielte Modulation der angeborenen Immunität durch Entwicklung und Anwendung von Prä- und Probiotika, um über eine Umstellung der Darmflora auch ohne Antibiotika eine klinische Besserung oder gar vollständige Heilung der CED zu erreichen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien und Geräte

#### 2.1.1 Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Anaerobiertöpfe	OXOID, Wesel
Bestrahlungsgerät Gamma-Cell 40	Atomic Energy, Mississauga, Kanada
Biofuge Fresco	Heraeus Instruments, Hanau
CEQ™8000 Genetic Analysis System	Beckman Coulter, Krefeld
DCode Universal Mutation Detection System	Bio-Rad Laboratories, München
Eagle Eye II Videodokumentationssystem	Stratagene, Heidelberg
FACS-Calibur	BD Biosciences, Heidelberg
FastPrep FP120 Cell Disrupter	Qbiogene, Illkirch, Frankreich
Gammacell® 40 Exactor	MDS Nordion, Ottawa, ON, Kanada
GeneGenius	Syngene, Cambridge, Großbritannien
Horizontale Gel Elektrophorese	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Megafuge Zentrifuge	Heraeus, Osterode
Microprocessor pH meter ph3000	Wiss. Tech. Werkst., Weilheim
Mikroskope	Zeiss, Oberkochen
Mini-MACS Magnet	Milteny Biotech, Bergisch Gladbach
Neubauer Improved	Labor Optic, Friedrichsdorf
SpectraFluor Plus	TECAN Deutschland, Crailsheim
Spektrometer Freiburg	Amersham Pharmacia Biotech,
Sterilbank Antair BSK	Anthos Mikrosysteme, Köln
Thermocycler Tristar	Biometra, Göttingen
Tischzentrifugen 5415C, 5417R	Eppendorf, Hamburg
Vacuum Zentrifuge	Heraeus Instruments, Hanau

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Materialbezeichnung	Hersteller
AnaeroGen-Beutel	OXOID, Wesel
Anaerotest	Merck, Darmstadt
CryoFlex Schlauch	Nunc, Wiesbaden
ELISA-Platten	BD Biosciences, Heidelberg
Impfshlingen (10 µl)	Süsse, Gudensberg
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
MACS-Säulen	Milteny Biotech, Bergisch Gladbach
Mörser (Mikropistill)	A. Hartenstein, Würzburg
Mr. Frosty, Nalgene Cryo-Einfrierbox	Nunc, Wiesbaden
Nunc Röhrchen, Nunc Brand Cryo tubes	Nunc, Wiesbaden
Pasteurpipetten steril	A. Hartenstein, Würzburg
PCR Tubes (0,2 ml)	Biozym, Oldendorf
Petrischalen	Falcon, Heidelberg
Polystyrolröhrchen für Durchflußzytometer	Falcon, Heidelberg

Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Sterilfilter	Millipore, Eschborn
UV-Küvetten	Eppendorf, Hamburg
Zellkulturflaschen	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturplatten (6, 12, 24 und 96 Well)	Nunc, Wiesbaden
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	Falcon, Heidelberg

### 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Produktbezeichnung	Hersteller
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ampicillin (Mikrobiologie)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin (Gnotobioten)	Ratiopharm, Ulm
Borsäure	Riedel-de Haen, Seelze
Bromphenolblau	Bio-Rad Laboratories, München
BSA (30%)	Sigma-Aldrich, Steinheim
CFSE	Invitrogen, Karlsruhe
Ciprofloxacin	Bayer Vital, Leverkusen
Collagenase/ Dispase	Roche Diagnostics, Mannheim
Concanavalin A (ConA, # C5275)	Sigma-Aldrich, Steinheim
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Roche Diagnostics, Mannheim
Dextransulfat 40 kDa	ICN Biochemicals, Irvine, CA, USA
DMSO	Serva, Heidelberg
DNase I	Roche Diagnostics, Mannheim
Ethanol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
EDTA	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Formamid deionisiert	Roth, Karlsruhe
FuGENE6 Transfektionsreagenz	Roche Diagnostics, Mannheim
Glycerin	Roth, Karlsruhe
GM-CSF	CellConcepts, Umkirch
Halothan <sup>®</sup>	Eurim-Pharm, Mühlheim
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Imipinem	MSD, Haar
IPTG	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
LPS <i>Salmonella minnesota</i> Re595	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Maleinsäure	Roth, Karlsruhe
Metronidazol	Fresenius, Bad Homburg
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitratdihydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat	Roth, Karlsruhe
Natriumjodid	Roth, Karlsruhe

Pam <sub>2</sub> Cys	EMC Microcollections, Tübingen
Percoll	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenol (Roti-Phenol)	Sigma-Aldrich, Steinheim
SEB	Sigma-Aldrich, Steinheim
Silbernitrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Silika Matrix	Sigma-Aldrich, Steinheim
Streptavidin-HRP	BD Biosciences, Heidelberg
Sulfanilamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe
SYBR <sup>®</sup> Green I nucleic acid gel stain	Sigma-Aldrich, Steinheim
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim
TMB	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trichloromethan (Chloroform)	Merck, Darmstadt
Tris-HCl	Merck, Darmstadt
Trypton / Pepton aus Casein	Merck, Darmstadt
Tween20	Roth, Karlsruhe
Vancomycin	Cell Pharm, Hannover
X-Gal	Sigma-Aldrich, Steinheim
Xylencyanol FF	Bio-Rad Laboratories, München
7-AAD Staining Solution	BD Biosciences, Heidelberg

## 2.1.4 Medien und Zusätze

Produktbezeichnung	Hersteller
DMEM	PAA Laboratories, Cölbe
FCS	Biochrom, Berlin
L-Glutamin	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin	PAA, Pasching, Österreich
RPMI-1640	PAA Laboratories, Cölbe
Streptomycin	PAA, Pasching, Österreich

## 2.1.5 Antikörper für die Durchflußzytometrie und ELISA

FACS-Antikörper (anti-Maus)	Konjugat	Klon	natürliches Rezeptor- Vorkommen
CD11b (Integrin $\alpha_M$ chain)	FITC	M1/70	myeloide Zellen, NK-Zellen
CD11c (Integrin $\alpha_X$ chain)	FITC	HL3	myeloide Zellen (Knochenmarks- Vorläuferzellen)
CD16/CD32 (Fc $\gamma$ III/II)	PerCP-Cy5	2.4G2	NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, B-Zellen und den meisten fetalen Thymozyten
CD19	FITC	1D3	B-Zellen
CD25 (IL-2 Receptor, $\alpha$ -chain)	R-PE	3C7	aktivierte T-Zellen, B-Zellen, Monozyten
CD3	PE-CY5	17A2	Thymozyten, T-Zellen
CD4 (L3T4)	APC	RM4-5	Thymozyten, Th-Zellen, Monozyten

CD8	FITC	53-6.7	Makrophagen, B-Zellen Thymocyten, cytotoxische T-Zellen (etwa 1/3 der peripheren Zellen)
CD80 (B7-1)	PE	3H5	Untergruppe von B-Zellen
CD86 (B7-2)	R-PE	GL1	Monozyten, aktivierte B-Zellen, Dendritische Zellen
CD69	PE	H1.2F3	T-Zellen, NK-Zellen
MHC-II	FITC	I-A/I-E	APCs
TCR $\alpha\beta$	PE	H57-597	T-Zellen
TCR $\gamma\delta$	FITC	GL3	T-Zellen

ELISA-Antikörper	Bezeichnung
mTNF- $\alpha$	BD OptEIA™ Mouse TNF (Mono/Mono) ELISA Set
mIFN- $\gamma$	BD OptEIA™ Set Mouse IFN-gamma
mIL-6	BD OptEIA™ Mouse IL-6 ELISA Set
mIL-8	BD OptEIA™ Set Mouse Interleukin 8
mIL-10	BD OptEIA™ Mouse IL-10 ELISA Set
mIL-12p(40)	BD OptEIA™ Mouse IL-12 (p40) ELISA Set

Alle FACS- und ELISA-Antikörper wurden von der Firma BD Biosciences in Heidelberg bezogen.

## 2.1.6 Molekularbiologische Kits

Produktbezeichnung	Hersteller
DTCST™ Quick Start Kit	Beckman Coulter, Krefeld
Invisorb Spin Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
Luciferase Reporter Gene Assay	Roche Diagnostics, Mannheim
QIAmp DNA Stool Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Rneasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
TA Cloning® Kit, TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen, Groningen
Venor® <i>GeM</i> -Mykoplasmen-Detektionskit	Minerva Biolabs, Berlin
$\beta$ -Gal Reporter Gene Assay	Roche Diagnostics, Mannheim

## 2.1.7 Enzyme, Plasmide und Zellen

Produktbezeichnung	Hersteller
Ampli Taq DNA-Polymerase	Applied Biosystems, PE, USA
<i>E. coli</i> TOP10F'	Invitrogen, Groningen, Niederlande
ELAM-1, RSV $\beta$ -Gal	C. J. Kirschning, Universität München
hCD14, hTLR2, hTLR4	C. J. Kirschning, Universität München
hMD2	K. Miyake, Universität Tokio, Japan
Lysozym	Fluka, Steinheim
pCR®2.1 Plasmid, pCR®2.1 TOPO® Plasmid	Invitrogen, Groningen, Niederlande
<i>Pfu</i> Turbo DNA-Polymerase	Stratagene, Heidelberg
Proteinase K	Roth, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase (4 U/ $\mu$ l)	Boehringer Mannheim
<i>EcoRI</i> (10 U/ $\mu$ l), 10x Puffer R <sup>+</sup>	Boehringer Mannheim

*Hae*III (10 U/μl), 10x Puffer R<sup>+</sup>

Boehringer Mannheim

## 2.1.8 DNA-Molekulargewichtsstandards

Produktbezeichnung	Hersteller
Gene Ruler 50 bp DNA Ladder (0,5 μg/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot
Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus (0,5 μg/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot
Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (0,5 mg/ml)	Fermentas, St. Leon-Rot

## 2.1.9 M13- und 16S rRNA PCR-Primer

Primer	Spezifität	Sequenz (5'-3')	Zielregion
M13 (20)F	M13-Bindungsstelle	GTAAAACGACGGCCAGT	universell
M13 (40)F	M13-Bindungsstelle	GTTTCCAGTCACGAC	universell
M13 (24)R	M13-Bindungsstelle	AACAGCTATGACCATG	universell
TPU1-F	Bakterien	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	16S, 8-27
TPU2-F	Bakterien	CCARACTCCTACGGGAGGCA	16S, 334-353
RTU8-R	Bakterien	AAGGAGGTGATCCANCCRCA	16S, 1522-1541
HDA1-F	Bakterien	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	16S, 339-360
HDA2-R	Bakterien	GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC	16S, 539-518
HDA1 GC		(CGCCCGGGGCGCGCCCGGG CGGGGCGGGGGCACGGGGGG) ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	16S, 339-360
F-968	Bakterien	AACGCGAAGAACCTTAC	16S, 968-984
R-1378	Bakterien	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG	16S, 1401-1378
F-968 GC		(CGCCCGGGGCGCGCCCGGGC GGGGCGGGGGCACGGGGGG)AA CGCGAAGAACCTTAC	
F-968-30GCT		(CGCCCGCCGCCGCCCGCCGCCCGT CCCGCC)AACGCGAAGAACCTTAC	
Lac1-F	Bakterien	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	16S, 364-382
Lac2-R	Bakterien	ATTCACCGCTACACATG	16S, 690-707
Lac1GC		(CGCCCGGGGCGCGCCCGGG CGGGGCGGGGGCACGGGGGG) AGCAGTAGGGAATCTTCCA	

## 2.1.10 Bakterien und Zelllinien

### 2.1.10.1 Verwendete Referenzstämme

Bakterium	DSMZ no.	Bakterium	DSMZ no.
<i>Escherichia coli</i>	DSM 1103	<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM 2569
<i>Bacteroides vulgatus</i>	DSM 1447	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	DSM 20079
<i>Bacteroides ovatus</i>	DSM 1896	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	DSM 10533
<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC 25285	<i>Lactobacillus gasserii</i>	DSM 20243
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	ATCC 29741		

## 2.1.10.2 Eukaryontische Zelllinien

Zelllinie	Herkunft / DSMZ collection no.
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen (ATCC, CRL-1573)
RAW264.7	Murine monozytische Leukämiezellen (ATCC, TIB-71)

## 2.1.11 Medien und Puffer

### 2.1.11.1 Fest- und Flüssigmedien zur Bakterienkultivierung

Name	Firma / Art.Nr.	Einsatzbereich
Columbia 5% SB-Agar	Oxoid, PB5039A	Nährreiches Grundsubstrat, welches maximales Wachstum von Mikroorganismen ermöglicht
MacConkey Nr. 3	Oxoid, PO5002A	Selektiv für Gram-negative Stäbchen, enthält Laktose: Bildung von Acetaldehyd durch laktosespaltende Bakterien → rote Kolonien z.B. <i>E. coli</i> laktose-negative Bakterien → helle, transparente Kolonien z.B. <i>Proteus</i> ssp.
Columbia Agar mit Kanamycin/Vancomycin	Heipha, Dr. Müller GmbH, 382e	Selektiv für Anaerobier; hemmt das Wachstum von aeroben Bakterien
Acid-Agar	Nährbodenküche der Abt. Med. Mikrobiologie, Charité CBF	Selektiv für Gram-positive Kokken, Äsculinspaltung → Schwarzfärbung
CNA 5% SB IMPRO	BD, 257306	Gram-positive Kokken
Rogosa-Agar	Merck, 1.05413.0500	Selektiv für Gram-positive *LAB
Hirn-Herz-Glucose Bouillon	Oxoid, CM0225B	Flüssigvollmedium (Anreicherungsmedium)
Thioglycolat Bouillon	Oxoid, CM0173T	Flüssigvollmedium (Anaerobier)
MRS Bouillon	Sigma, 69966	Flüssigmedium für Milchsäurebakterien
Luria Bertani Agar (LB)	Nährbodenküche der Abt. Mikrobiologie, Charité CCM	Vollmedium mit 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g Natriumchlorid, 15 g Agar Agar, ad 1000 ml Aqua dest.
LAXI Agar LB Agar mit Ampicillin, X-Gal und IPTG	Nährbodenküche der Abt. Mikrobiologie, Charité CCM	Vollmedium mit Antibiotikum und X-Gal / IPTG; Blau-Weiß-Selektion transformierter <i>E. coli</i> Klone, wie LB: bei 50 °C Zugabe von 250 µl

Ampicillin (200 mg/ml), 200 µl X-Gal  
(40 mg/ml), 50 µl IPTG (100 mM)

\*LAB: Lactic acid bacteria (Milchsäurebakterien)

### 2.1.11.2 Flüssigmedien für Zellkulturexperimente

Medium	Zusammensetzung
RPMI	RPMI 1640 + Hepes, 5% bzw. 10% FCS, 200 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin
DMEM	DMEM + 4,5 g/L Glucose, L-Glutamine, Pyruvat, 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin
Einfriermedium	10% DMSO, 90% FCS

### 2.1.11.3 Puffer

Puffer / Lösungen	Zusammensetzung
Eluens A (DHPLC)	0,1 M TEAA-Lösung in Aqua dest., pH 7
Eluens B (DHPLC)	0,1 M TEAA-Lösung in Aqua dest., 25% Acetonitril, pH 7
Agarosegel-Probenpuffer	1,5 g Ficoll, 25 mg Bromphenolblau, 25 mg Xylen Cyanol FF ad 10 ml Aqua dest.
Blocking Reagenz	10% Blocking Reagenz (Roche, Mannheim) in Maleinsäure, pH 8,0
Detektionspuffer	0,1 M Tris-Salzsäure, 0,1 M Natriumchlorid, pH 9,5
Entwickler	67,4 g Natriumcarbonat-Decahydrat, 1 ml 2%, Natriumthiosulfatlösung (w/v), 3,5 ml 37%iges Formaldehyd mit Aqua dest. auf 1000 ml
FACS-Fix	500 ml PBS, 54 ml Formaldehyd (37%)
FACS-Wash	500 ml PBS, 25 ml FCS, 5 ml Natrium-Acid Stammlösung
Fällungslösung	50 µl Natrium-Acetat, 50 µl EDTA, 25 µl Glycogen
Färbelösung	1 g Silbernitrat, 3,5 ml 37%iges Formaldehyd ad 1000 ml Aqua dest.
Kaliumphosphat-Puffer	23,14 g Kaliumdihydrogenphosphat, 164,38 g Kaliumhydrogenphosphat ad 1000 ml Aqua dest.
Lysis-Puffer	10 mM Tris, pH 8,0 (Salzsäure), 150 mM Natriumchlorid, 20 mM EDTA, 1% SDS ad 10 ml Aqua dest.
Maleinsäure-Puffer	0,1 M Maleinsäure, 0,15 M Natriumchlorid, pH 7,5
PBS 10x	80 g NaCl, 2 g KCl, 17,8 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O, 2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4 ad 1000 ml Aqua dest.
PCR-Puffer 10x	100 mM Tris-Salzsäure, pH 8,3, 500 mM Kaliumchlorid
Polyacrylamidgel (DGGE)	21 g Harnstoff, 5 ml Rapid Gel XL (40%), 6 ml 10x TBE, 500 µL DMSO ad 50 ml Aqua dest.; Polymerisierung mit 292 µl APS (10%), 30 µl TEMED
Sanguetti-Puffer	10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,1% Triton-X-100, pH 9
Silika Waschpuffer	50 mM Natriumchlorid, 10 mM Tris, 2,5 mM EDTA, 50% Ethanol (v/v), pH 7,5
Silika-Suspension	2,5 g Silika, 25 ml 6 M Natriumjodid
TAE Puffer (50x)	242 g Tris-Base, 57,1 ml Essigsäure, 100 ml 500 mM EDTA ad 1000 ml Aqua dest.
TBE 10x	108 g Tris, 55 g Borsäure, 6,42 g EDTA, pH 8,0 ad 1000 ml Aqua dest.
TE-Puffer	1 ml 1 M Tris-HCl, 0,2 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 ad 100 ml Aqua dest.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Molekularbiologische und biochemische Methoden**

#### **2.2.1.1 DNA-Extraktion aus Fäzes**

Die Extraktion der DNA erfolgte unter Verwendung eines kommerziellen Kits (QIAamp® DNA Stool Mini Kit) mit den im Kit enthaltenen Reagenzien entsprechend den Angaben des Herstellers. Für die DNA-Isolierung aus Maus-Fäzes wurden 180 mg bis 200 mg Fäzes in 1,4 ml ASL-Puffer gelöst und 1 min gevortext, so dass eine homogene Suspension entstand. Diese wurde für 5 min bei 70 °C erhitzt, Dann 5 min gevortext und anschließend 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Stuhl enthält zahlreiche Verbindungen, die zum DNA-Abbau führen oder nachfolgende enzymatische Reaktionen inhibieren können. Bei der DNA-Präparation mit dem oben genannten Kit werden solche Substanzen entfernt. Ein urheberrechtlich geschütztes Reagenz das Inhibitoren adsorbiert, sorgt zusammen mit einem Lysepuffer für eine effiziente Entfernung der Inhibitoren. Um die DNA-Konzentration, Ausbeute und Reinheit zu bestimmen wurden die Extrakte 1:10 mit AE-Puffer gemischt und über ein Spektrum von 220 nm bis 320 nm photometrisch gemessen.

#### **2.2.1.2 PCR-Amplifikation eubakterieller 16S rRNA aus Fäzes**

Für die Erstellung einer Klonbibliothek der Darmflora von TLR2-, TLR4- und TLR2/4-defizienten Mäusen sowie den dazugehörigen C57BL/10-Wildtyp Kontrolltieren (WT) wurde auf die Amplifikation von 16S rRNA Genen zurückgegriffen, da diese in allen Organismen vorkommen und sich die Gensequenz innerhalb der Spezies unterscheidet. Darüber hinaus sind einige Sequenzbereiche stark konserviert, während sich andere Abschnitte in verschiedenen Organismen stark voneinander unterscheiden, was auf eine evolutionäre Zugehörigkeit der Organismen schließen lässt. Ein weiterer Vorteil ist, dass man zu Identifikationszwecken auf zahlreiche 16S rRNA Sequenz Datenbanken zurückgreifen kann.

Für die Polymerasekettenreaktion (engl.: *Polymerase Chain Reaction*, PCR) wurden zwei als Primer bezeichnete Oligonukleotide (zwischen 15 und 25 Basen) so gewählt, dass sie den zu amplifizierenden Sequenzbereich flankieren. Nach einer sequenzspezifischen Hybridisierung an die Zielsequenz dienen die 3'OH-Enden der Primer als Startpunkt für die Synthese eines neuen komplementären DNA-Strangs durch die DNA-Polymerase. Zur spezifischen Amplifikation eubakterieller 16S rRNA wurden die in Abschnitt 2.1.9 aufgelisteten Primer verwendet. Da die hitzestabile Taq-DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* (AmpliTaq DNA Polymerase) keine „Proofreading“-Aktivität besitzt, wurde den Reaktionsansätzen Pfu-DNA-Polymerase im

Verhältnis 10:1 beigemischt. Diese katalysiert bei einem identischen Temperaturoptimum von 72 °C ein „Proofreading“. Die PCR erfolgte im T3 Thermocycler, mit einem Endvolumen von 50 µl, bestehend aus 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTPs, 20 mg/ml BSA, je 0,5 µM beider Primer, 5,0 U AmpliTaq DNA Polymerase, 0,5 U Pfu Turbo Cx DNA Polymerase und 3 µl der extrahierten DNA (etwa 100 ng). Die Amplifikationsprogramme, unterschiedlich für jedes Primerpaar, sind in Tab. 3 dargestellt. Die Amplifikate wurden anschließend, wie in Abschnitt 2.2.1.4 beschrieben, auf einem 3%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

**Tab. 3** PCR Amplifikationsprogramme

Primerpaar	Initiale	Hauptzyklusbedingungen				End
	Denaturierung Temp. (°C) Zeit (min)	Zyklen	Denaturierung Temp. (°C) Zeit	Anlagerung Temp. (°C) Zeit	Elongation Temp. (°C) Zeit	Elongation Temp. (°C) Zeit
HDA1-HDA2	94, 2	35	94, 30 s	61, 1 min	72, 1 min	72, 7 min
Lac1GC-Lac2	95, 7	30	93, 30 s	60, 1 min	72, 1 min	72, 30 min
TPU1-RTU8	95, 5	25	95, 45 s	56, 1 min	72, 3 min	72, 5 min
968FGC-1378R	95, 7	30	93, 30 s	60, 1 min	72, 1 min	72, 30 min

F, forward primer; R, reverse primer.

Weiteren Einsatz fand die PCR zur Genotypisierung der transgenen Mäuse. Die dafür notwendige DNA wurde aus den Schwanzenden der entsprechenden Mäuse isoliert, worauf hier jedoch nicht weiter eingegangen wird.

### 2.2.1.3 Silika-Aufreinigung der PCR-Produkte

Für die Aufreinigung der PCR-Produkte mittels Silika-Matrix werden 50 µl PCR-Produkt mit 90 µl Na-Iodid (6 M, sterilfiltriert) und 7 µl Silika-Matrix (Silika in 6 M NaI) versehen und gevortext und anschließend für 10 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Nach einminütiger Zentrifugation bei 13000 rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 100 µl Silika-Waschpuffer gelöst. Zentrifugations- und Waschschrift wurden ein weiteres Mal wiederholt und das Pellet anschließend in 50 µl TE-Puffer gelöst und 10 min bei 50 °C im Thermoblock inkubiert. Nach einminütiger Zentrifugation bei 13000 rpm konnte mit den Überständen weiter gearbeitet werden.

### 2.2.1.4 Gelelektrophorese der 16S rRNA Amplifikate

Die qualitative Kontrolle der PCR-Produkte sowie der DNA-Extrakte erfolgte durch Auftrennung eines Gemisches aus je 3 µl Amplifikat bzw. 1 µl DNA-Extrakt und 3-5 µl

Agarosegel-Probenpuffer in einem horizontalen 0,8-3%igen Agarosegel. Zur Anfärbung der Nukleinsäuren wurde der Agarose 1  $\mu$ l Ethidiumbromid (10 mg/ml) je 100 ml Agarose-Lösung beigemischt. Als Längenmarker wurden die in Abschnitt 2.1.8 aufgelisteten DNA-Marker verwendet. Die Trennung erfolgte bei 10 V/cm in 1x TBE. Das Gel wurde anschließend mit dem Eagle Eye Videodokumentationssystem durch UV-Transillumination visualisiert und dokumentiert.

### 2.2.1.5 Anlegen einer 16S rRNA Klonbibliothek

Die PCR-Amplifikate der bakteriellen 16S rRNA-Genfragmente (TPU1/RTU8) aus den Fäzesproben von WT, TLR2-, TLR4- und TLR2/4-defizienten Tieren wurden mit Hilfe des TOPO TA-Cloning Kits gemäß der Herstellerangaben kloniert. Abweichend von den Empfehlungen wurden die zu klonierenden PCR-Produkte zunächst extrahiert und mit Hilfe des QiaQuick Gel Extraction Kits einer präparativen Agarosegelelektrophorese unterzogen. Diese Vorgehensweise führte zu einer effizienteren Transformation der bakteriellen 16S rRNA. Zur Klonierung wurden gemäß Herstellerempfehlung PCR-Produkte verwendet, die nicht älter als 24 Stunden waren. Nach der Amplifikation erfolgte die Addition eines 3'-A-Überhangs. Die PCR-Produkte wurden in den bereits linearisierten Plasmid-Vektor pCR2.1 mit T-Überhang ligiert. Die ligierten PCR-Produkte wurden in kompetente *E. coli* TOP10F'-Zellen transformiert. Die transformierten Zellen wurden auf LB-Agarplatten bei 37 °C über Nacht kultiviert und im Anschluss einem Blau-Weiß-Screening mittels X-Gal unterzogen. In vielen Klonierungsvektoren liegt in der aminoterminalen codierenden Sequenz der  $\beta$ -Galactosidase ( $\alpha$ -Fragment) eine Multiple Cloning Site, in die Fremd-DNA, wie z.B. PCR-Fragmente, eingebracht werden können. Dadurch wird die Gensequenz der  $\beta$ -Galactosidase unterbrochen und das Enzym wird nicht mehr exprimiert. Daraus folgt, dass das X-Gal nicht mehr gespalten wird und somit auch kein blauer Farbstoff entsteht. Die nach der Transformation entstandenen Kolonien erscheinen dann nicht blau, wie die mit leerem Vektor, sondern weiß. X-Gal wird häufig in Verbindung mit IPTG (zur Induktion des lac-Promotors) zur Selektion von blauen Kolonien verwendet. Nach Subkultivierung positiver (weißer) Klone auf Ampicillin-angereichertem (50  $\mu$ g/ml) LB-Agar, wurden die Einzelkolonien in 1 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 225 rpm kultiviert. Die Zellsuspensionen wurden anschließend für mindestens 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert, die Überstände dekantiert und die Plasmid-DNA aus den Pellets mittels MiniPrep Kit nach den Herstellerangaben isoliert. Der Erfolg der Plasmidisolierung erfolgte mittels Gelelektrophorese auf einem 1%igen Agarosegel, wobei jeweils ein Gemisch aus 5  $\mu$ l Plasmid und 5  $\mu$ l Frontmarker aufgetragen wurde. Da Plasmide in

Ringform, supercoiled sowie in linearisierter Form vorkommen, wurden jeweils drei Banden erwartet. Zur Ermittlung der Insertlängen rekombinanter Plasmide wurde eine Kontroll-PCR durchgeführt. Dazu wurden die Inserts mit Hilfe der zu den flankierenden Plasmidbereichen komplementären Primern M13(40)F und M13(24)R in einem Trioblock amplifiziert. Als Ausgangs-DNA diente das Zelllysate zu prüfender weißer Kolonien. Dazu wurde mit einem sterilen Zahnstocher Koloniematerial in 100 µl sterilem TE-Puffer aufgenommen, für 10 min bei 95 °C erhitzt und anschließend kurz anzentrifugiert. Für die M13-PCR-Ansätze, mit einem Endvolumen von 50 µl werden 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTPs, je 30 pmol der universellen Primer M13(40)F und M13(24)R, 5,0 U AmpliTaq DNA Polymerase, 0,5 U Pfu Turbo Cx DNA Polymerase und jeweils 2 µl Plasmid-DNA einer weißen Kolonie (100 ng) eingesetzt. Das dazugehörige Amplifikationsprotokoll ist in Tab. 4 dargestellt. Eine Fällung zur Konzentrierung der PCR-Produkte erfolgte mit Ethanol nach dem CEQ 8000 Protokoll des Herstellers.

**Tab. 4** Amplifikationsprotokoll für M13-PCR-Produkte

Primerpaar	Initiale		Hauptzyklusbedingungen			End
	Denaturierung Temp. (°C) Zeit (min)	Zyklen	Denaturierung Temp. (°C) Zeit	Anlagerung Temp. (°C) Zeit	Elongation Temp. (°C) Zeit	Elongation Temp. (°C) Zeit
M13(40)F-(24)R	95, 3	29	95, 45 s	56, 1,45 min	72, 3 min	72, 5 min

Für die Negativkontrolle diente Wasser anstelle von DNA. Als Positivkontrolle diente *E. coli*-Zelllysate eines Klons, dessen Plasmid-Insert sequenziert worden war.

### 2.2.1.6 Isolierung der bakteriellen Plasmid-DNA

Zur Präparation der Plasmid-DNA wurde je 1 ml LB-Medium mit Ampicillin (50 µg/ml) mit transformierten Bakterien aus einer weißen Kolonie beimpft und auf LAXI-Festmedium bei 37 °C über Nacht kultiviert. Die Isolierung und Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des Invisorb Spin Plasmid Mini Kits gemäß den Angaben des Herstellers. Während der Aufreinigung wurde abweichend vom empfohlenen Protokoll die an der Säulenmatrix gebundene Plasmid-DNA einmal zusätzlich mit 70%igem Ethanol gewaschen. Zur Kontrolle wurden je 5 µl der isolierten Plasmid-DNA zusammen mit 3 µl Agarosegelprobenpuffer auf ein horizontales 0,8%iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Nach Analyse des Gels unter UV-Licht konnte die Konzentration der erhaltenen Plasmid-DNA abgeschätzt werden.

### **2.2.1.7 Analyse der 16S rRNA Klonbibliothek durch Sequenzierung**

Die mittels PCR aus dem hypervariablen Bereich der 16S rRNA amplifizierte Abschnitte bzw. die anschließend isolierten Plasmide konnten nun bei ausreichender Konzentration direkt für die Sequenzierung eingesetzt und nach der modifizierten Kettenabbruch-Methode nach Sanger semiautomatisch sequenziert werden. Im Falle einer zu geringen Plasmid-Konzentration wurden die 16S rRNA-Genfragmente mit Hilfe der universellen Primer M13(40)F und M13(24)R erneut amplifiziert. Die Aufreinigung erfolgte mittels Silika-Matrix, wie in Kapitel 2.2.1.3 beschrieben.

### **2.2.1.8 Phylogenetische Analyse der 16S rRNA Sequenzen**

Die erhaltenen Nukleinsäuresequenzen wurden auf Homologien zu publizierten Sequenzen untersucht, wofür die folgenden Datenbanken bzw. Suchmaschine herangezogen wurden:

- NCBI BLAST, Bethesda, USA
- HUSAR - Sequence Analysis, Heidelberg
- Ribosomal Database Project II - Seqmatch, Michigan, USA
- Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW, Kyoto, Japan
- BioEdit Sequence Alignment, Carlsbad, USA

Sequenzhomologien von >95% wurden zur Identifizierung der Bakterien berücksichtigt.

### **2.2.2 RFLP-Analyse**

Die Analyse der Restriktions-Fragment Längen Polymorphismen (RFLP) dient dazu, genetische Variationen zwischen unterschiedlichen Spezies oder einzelnen Individuen einer Art zu erkennen. Man verdaut dazu eine geeignete DNA-Fraktion verschiedener Organismen mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen und vergleicht die entstehenden Bandenmuster im Gel. Unterschiede lassen sich dadurch erklären, dass zwischen zwei Schnittstellen neue Sequenzteile inseriert oder bestehende deletiert wurden, Schnittstellen durch Mutationen unbrauchbar gemacht wurden oder durch Mutationen neue Schnittstellen eingeführt wurden.

Für die Gesamtauswertung der Klonbibliothek durch phylogenetische Untersuchung wurde Fäzes-DNA von 80 Klonen aus TLR2-, 81 aus TLR4- und 91 aus TLR2/4-defizienten Tieren sowie 79 Klone von WT-Tieren herangezogen. 16S rRNA-Gene wurden amplifiziert, kloniert und anschließend analysiert. Die Restriktion der Gene erfolgte mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*, mit der Schnittstelle 5'-G-A-A•T-T-C-3' und *HaeIII*, mit der Schnittstelle 5'-A-A-G•C-T-T-3'. Eine elektrophoretische Auftrennung erfolgte auf einem 2%igen Agarosegel. Der

Restriktionsansatz von 20 µl setzte sich jeweils aus 2 µl *EcoRI*, 1 µl *HaeIII*, 2 µl R<sup>+</sup>-Puffer, 9 µl dH<sub>2</sub>O und 6 µl PCR-Produkt zusammen. Der Verdau erfolgte für 60 min bei 37 °C.

### 2.2.3 DGGE-Analyse

Die PCR-basierte denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE) dient als schnelles und effektives Verfahren für die Analyse von Unterschieden oder Veränderungen der Darmflora. Bei der DGGE werden Bereiche des bakteriellen 16S rRNA-Gens mittels PCR amplifiziert und im Harnstoffgradienten elektrophoretisch, je nach GC-Gehalt, aufgetrennt. Um die Auftrennung zu vereinfachen wird eine GC-reiche Sequenz an einen der beiden Primer eines Primerpaares gehängt. Da die Primer an Sequenzen binden, die bei allen Bakterienarten vorhanden sind, wird die gesamte Bakterienpopulation erfasst, wobei Anzahl und Stärke der einzelnen Banden über die Komplexität der Population Auskunft geben. Es kann vorkommen, dass DNA-Fragmente mit unterschiedlicher DNA-Sequenz an gleiche Positionen migrieren, was eine DNA-Extraktion der Banden von besonderem Interesse und eine Sequenzierung mit anschließender Zuordnung der phylogenetischen Abstammung notwendig macht. Für die DGGE wurde die D Gene Apparatur von Bio Rad verwendet und die Proben für 16 h bei 60 °C und 80 V für GC968-Amplifikate in einem 35-60%igen und für HDA-GC- und Lac-GC-Amplifikate in einem 30-50%igen Harnstoffgradienten aufgetrennt. (Abweichungen sind den Abbildungsbeschriftungen zu entnehmen).

#### 2.2.3.1 DNA-Extraktion aus DGGE-Banden und direkte Sequenzierung

Um die aufgetrennten 16S rRNA-Teilgene Bakterienarten zuordnen zu können, wurde eine Sequenzanalyse der DNA aus den DGGE-Banden durchgeführt. Die Gele wurden dafür für 20 min mit SYBR Green I (10 µl 10000-fach Konzentrat auf 100 ml Aqua dest.) gefärbt. Dieser fluoreszierende Farbstoff lagert sich selektiv in doppelsträngige DNA ein und emittiert Fluoreszenzenergie bei einer Anregungswellenlänge von 530 nm. Die so gefärbten DGGE-Banden wurden bei UV-Durchlicht aus dem Gel geschnitten und in 100 µl Aqua dest. über Nacht bei 37 °C geschüttelt, so dass die Amplifikate in Lösung gehen konnten. Die auf diese Weise eluierten Amplifikate dienten als Vorlage für die Reamplifikation unter Standardbedingungen mit den Oligonukleotiden 968F und 1378R. Die gewonnenen Amplifikate wurden mit dem Primer 968F sequenziert. Verbargen sich hinter einer DGGE-Bande 16S rRNA-Gene mehrerer Bakterienarten, war eine eindeutige phylogenetische Zuordnung nur nach einer Klonierung der Reamplifikate, wie in Abschnitt 2.2.1.5 beschrieben, möglich.

## 2.2.4 PCR-basierte denaturierende HPLC

Da molekulare PCR-basierte Techniken wie DGGE oder Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese (TGGE) extrem aufwendig und zeitintensiv sind, wurde in unserer Arbeitsgruppe ein optimiertes Protokoll für die Detektion intestinaler Mikroorganismen entwickelt, welches die Anwesenheit von Bakterien aber auch Pilzen aufzuzeigen vermochte [58]. Die Rede ist von der denaturierenden High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) mit dem WAVE<sup>®</sup> Microbial Analysis System. Bei dieser Methode ist das Trennprinzip dem der DGGE ähnlich, wobei die Auftrennung der Amplifikate hier nicht elektrophoretisch in einem chemischen Gradienten erfolgt, sondern auf sequenzabhängigen Bindungseigenschaften der teilweise denaturierten DNA an das Säulenmaterial basiert. Für den Vergleich der Floren zwischen WT- und TLR2-, TLR4- sowie TLR2/4-defizienten Tieren als Ergänzung zu den bisher eingesetzten Methoden, wurden bakterielle 16S rRNA-Genfragmente aus Gesamt-DNA von Fäzesproben amplifiziert. Die PCR erfolgte im T3 Thermocycler, mit einem Endvolumen von 50 µl, bestehend aus 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTPs, 20 mg/ml BSA, je 30 µM der Primer F968-30GCT und 1378R, 5,0 U AmpliTaq DNA Polymerase, 0,5 U Pfu Turbo Cx DNA Polymerase und 1 µl der extrahierten DNA (etwa 100 ng). Das für die DHPLC verwendete Oligonukleotid F968-30GCT besitzt eine modifizierte, etwas verkürzte GC-Klammer, amplifiziert jedoch den gleichen Sequenzabschnitt wie das bei der DGGE eingesetzte Oligonukleotid F968-30GC. Daraus resultiert eine verbesserte Trennung der Amplifikate bei der DHPLC. Die Oligonukleotide F968-30GCT und 1378R, komplementär zu Regionen die die variablen Regionen V6-V8 von 16S rRNA Genen flankieren, wurden zur Amplifizierung eines etwa 400 bp langen Fragments eingesetzt. Das Amplifikationsprotokoll ist der Tab. 5 zu entnehmen.

**Tab. 5** Amplifikationsprotokoll für PCR-Produkte mit den Oligo-Primern F968-30GCT-R1378

Primerpaar	Initiale		Hauptzyklusbedingungen			End
	Denaturierung Temp. (°C) Zeit (min)	Zyklen	Denaturierung Temp. (°C) Zeit	Anlagerung Temp. (°C) Zeit	Elongation Temp. (°C) Zeit	Elongation Temp. (°C) Zeit
F968-30GCT- R1378	95, 7	30	93, 30 s	60, 1	72, 1	72, 30

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit dem DNA-Purification Kit nach den Angaben des Herstellers. Die Proben wurden unverdünnt mit einem Injektionsvolumen von 5 µl auf die Säule aufgetragen. Ein Ionenaustausch erfolgte durch einen Stufengradient der Lösungen A und B. Die Denaturierung erfolgte, je nach GC-Gehalt, durch eine Säulentemperatur von 63,1 °C

über einen Zeitraum von 18,8 min bei einer Flussrate von 0,5 ml/min und einer Wellenlänge von 492-526 nm. Der Gradientenverlauf ist der nachstehenden Tab. 6 zu entnehmen.

**Tab. 6** DHPLC-Gradient zur Trennung bakterieller 16S rRNA Fragmente

<b>Gradient</b>	<b>Zeit (min)</b>	<b>Eluens A (%)</b>	<b>Eluens B (%)</b>
Injektion	0	55	45
100 bp (5,3 min)	3	40	60
350 bp (10,8 min)	9	30	70
600 bp (14,8 min)	10	30	70
Start Clean	10,5	0	100
Stopp Clean	12	0	100
Start Equilibrierung	13	55	45
Stopp Equilibrierung	15	55	45

## 2.2.5 Mikrobiologische Methoden

Sowohl der Einfluss Gram-negativer Bakterien auf das Entzündungsgeschehen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen als auch der Gram-positiver Bakterien auf eine mögliche Reduktion einer überschießenden Reaktion des Immunsystems sollte mit Hilfe von Stimulationsexperimenten mit murinen sowie humanen Zelllinien und primären Maus-Immunzellen untersucht werden.

### 2.2.5.1 Herstellung von Bakteriensuspensionen für Zellstimulationsexperimente

Kryokonservierte Bakterienreferenzstämme oder Einzelkolonien frisch kultivierter Bakterienstämme aus dem Ileum erkrankter *T. gondii* infizierter Versuchstiere wurden in 2 ml LB-Medium aufgenommen und über Nacht bei 37 °C und 150 rpm kultiviert. Je nach zu kultivierendem Bakterium wurde auf die in Kapitel 2.1.11.1 aufgelisteten Medien zurückgegriffen. Zur Kontrolle auf Reinheit der Kultur wurden anschließend 10 µl der Zellsuspension auf Blutplatte ausgestrichen und im Brutschrank bei 37 °C über Nacht kultiviert. Die Bakterien wurden bei 13000 rpm für 10 min runterzentrifugiert, die Überstände verworfen und die Pellets in 1 ml sterilem PBS resuspendiert und erneut 5-10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden abgossen und der Waschschrift wiederholt. Das Pellet wurde in 1 ml sterilem PBS aufgenommen, resuspendiert und zur Bestimmung der optischen Dichte (OD) 500 µl der Bakteriensuspension zu 4500 µl PBS geben und OD bei 600 nm bestimmt. Die Bakterien konnten nun mit PBS auf die gewünschte OD von 1 eingestellt werden. Ein Wasserbad wurde auf 95 °C vorgeheizt und die Bakterien für 30 min Hitze-inaktiviert. Zur

Kontrolle der Letalität erfolgte anschließend ein Ausstrich auf Platte und Kultivierung wie oben beschrieben.

## **2.2.6 Zellbiologische Methoden**

### **2.2.6.1 Kulturbedingungen von Maus- und Humanzellen**

Das Wachstum und die Vermehrung von Zellen in Kultur hängen im Wesentlichen von zwei Faktoren ab, den Umweltbedingungen und dem Nährstoffangebot. Optimale äußere Bedingungen (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% Luftfeuchtigkeit) werden in geeigneten Brutschränken konstant gehalten. Zellkulturmedien basieren auf einem synthetischen Grundmedium, welche mit Salzen, Zuckern, Aminosäuren, Vitaminen und Spurenelementen angereichert sind. Diesen werden tierisches Serum (meist FCS) zugefügt, um die Zellen optimal mit Hormonen und Wachstumsfaktoren zu versorgen, die eine wichtige Voraussetzung für die Proliferation der Zellen darstellen. Außerdem werden dem Medium die Antibiotika Penicillin und Streptomycin hinzugefügt, um einer Kontamination durch Bakterien vorzubeugen. Bei sehr geringem Serumgehalt des Mediums (1%) vermehren sich die Zellen nur sehr zögernd bis gar nicht und können auf diese Weise einige Wochen in der G<sup>0</sup>-Phase des Zellzyklusses arretiert werden. Enthält die Nährlösung einen höheren FCS-Anteil, üblicherweise 5-10%, wachsen die Zellen bis ihr Wachstum durch gegenseitige Berührung gebremst wird. Dann müssen die Zellen durch Umsetzen verdünnt und mit frischen Nährstoffen versorgt werden.

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die verwendeten Lösungen und Medien wurden, sofern nicht anders erwähnt, auf 37 °C vortemperiert.

### **2.2.6.2 Passagieren**

Bei frischen Zellkulturen sollte mindestens einmal pro Woche das alte Wachstumsmedium mit einer sterilen Pipette abgesaugt und die gleiche Menge an frischem Kulturmedium neu hinzugegeben werden. Nach 10-14 Tagen hat sich eine Monolayer-Zellschicht auf dem Flaschenboden gebildet. Die Zellen erreichen eine so hohe Konfluenz und damit eventuell bereits Wachstumshemmung, dass sie passagiert (umgesetzt, gesplittet) werden müssen. Dies geschieht durch den Vorgang der Trypsinierung. Adhärente Zellen wachsen als zusammenhängende einschichtige Zelllage unter Anheftung an eine inerte Oberfläche. Sie zeigen dichteabhängige Proliferationshemmung (Kontaktinhibition). Weitere Zellvermehrung ist nur DNA möglich, wenn „Passagiert“ wird. Passagieren ist in regelmäßigen Abständen notwendig, damit die Zellen in einem teilungsfähigen Zustand bleiben und nicht durch die ausgeschiedenen

Stoffwechselprodukte sowie durch Mangel an Nährstoffen sterben. Bei der Trypsinierung werden die Zellen von der Unterlage mit Hilfe von Trypsin in Verbindung mit EDTA gelöst. Trypsin spaltet Proteine an den Stellen der Aminosäuren Arginin und Lysin, EDTA bindet die zweiwertigen Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ , welche zellbindende Membranproteine stabilisieren.

### 2.2.6.3 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

Benötigte Materialien:

Trypanblau: 0,2% (w/v) Trypanblau in 0,9%iger NaCl-Lösung

Neubauer Zählkammer:

Um die Lebensfähigkeit von Zellen zu prüfen wird heute auf den einfach und schnell anzuwendenden Routinetest der Trypanblaufärbung zurückgegriffen. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Das Trypanblau dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Cytosol und färbt diese Zellen tiefblau. Lebende Zellen erscheinen unter dem Mikroskop leuchtend hell. Bei zu langer Einwirkzeit des Trypanblaus ist ein Anstieg toter Zellen zu beobachten, da der Farbstoff cytotoxisch wirkt. Für die Bestimmung der Zellzahl wurde eine 1:10 Verdünnung der Zellsuspension hergestellt.

*Berechnung der Zellzahl:*  $z = Z \times V \times 10^4$

$z$  = Zellen/ml

$Z$  = Zahl der ungefärbten Zellen in einem Großquadrat ( $1 \text{ mm}^2$ )

$V$  = Verdünnungsfaktor

$10^4$  = Kammerfaktor

### 2.2.6.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Eine große Zellkulturflasche, dicht bewachsen mit Zellen, wurde bei 1200 rpm und  $4^\circ\text{C}$  für 10 min abzentrifugiert, der Bodensatz in 10 ml 5%igem RPMI resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Bodensatz in DMSO/FCS aufgenommen. 1 ml Zellsuspension wurde in Nunc-Röhrchen gefüllt, steril verschlossen und maximal 15 min bei RT äquilibriert. Da DMSO toxisch auf Zellen wirkt, sollte so schnell wie möglich weitergearbeitet werden. Die Röhrchen müssen nur DNA zusätzlich in einen CryoFlex Schlauch eingeschweißt werden, wenn sie in flüssigem  $\text{N}_2$  in der Flüssigkeit stehen, um Kontaminationen zu vermeiden und weil die Röhrchen, sollte  $\text{N}_2$  eindringen, beim Auftauen explodieren könnten. Die Einfrierbox "Mr. Frosty" wurde mit 250 ml Isopropanol gefüllt, die Röhrchen überführt und für 48 h bei  $-70^\circ\text{C}$  Gefrierschrank gelagert, wo die Zellen schonend  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  heruntergekühlt

werden. Nach 48 h wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur Sicherheit sollte ein Röhrchen aufgetaut und die Zellzahl bestimmt werden, um sicher zu stellen, dass die Zellen den Einfriervorgang überlebt haben. Zum Auftauen wurden die Zellen entnommen, in ein 37 °C Wasserbad überführt und anschließend in warmem Medium aufgenommen. Um restliches DMSO vollständig zu entfernen wurden die Zellen runterzentrifugiert und das Pellet in frischem Medium resuspendiert.

### 2.2.6.5 Mykoplasmentest

Mykoplasmen stellen als Kontaminanten in kontinuierlichen Zelllinien ein großes Problem dar. Als chronische Infektion beeinträchtigen sie auf vielfältige Weise die Funktion von Zellkulturen. Sie nehmen Einfluss auf den Metabolismus der Zellen und verändern so deren Wachstum, ihre immunologischen und biochemischen Eigenschaften sowie deren Lebensfähigkeit. Die Infektion einer Zellkultur mit Mykoplasmen ist visuell oder lichtmikroskopisch nicht zu erkennen. Aus diesem Grunde ist eine regelmäßige Überprüfung einer Zellkultur wichtig. Hierfür wurde der Venor®*GeM*-Mykoplasmen-Detektionskit verwendet, ein Nukleinsäure-Amplifikationstest auf Basis einer PCR. Mit Venor®*GeM* sind 1-5 fg Mykoplasmen-DNA, entsprechend 2-5 Mykoplasmen pro Probenvolumen, detektierbar. Die Primer amplifizieren einen Abschnitt der 16S rRNA-Region des Mykoplasmen-genoms, mit einer Größe von etwa 270 bp, welches dann direkt in einem 1,5%igen Agarosegel sichtbar gemacht werden kann. Das gewählte Template ist innerhalb der Spezies *Mycoplasma* hochkonserviert, zeigt jedoch auch deutliche Sequenzhomologien zum Genom von *Acholeplasma laidlawii* und verschiedenen Ureaplasmen. Mit Venor®*GeM* können daher neben den typischerweise als Kontaminanten in Zellkulturen auftretenden Mykoplasmen Spezies *M. orale*, *M. hyorhinae*, *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. salivarium* und *M. hominis* auch *M. pneumoniae*, *A. laidlawii*, *M. synoviae* sowie verschiedene Ureaplasma Spezies detektiert werden.

Der Ansatz für die PCR hatte abweichend von den Herstellerangaben ein Gesamtvolumen von 25 µl, bestehend aus 2,5 µl 10x Puffer, 1,5 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2,5 µl Primer/NTP-Mix, 2,5 µl der internen Kontrolle, 0,2 µl Taq-Polymerase und jeweils 2 µl Zellüberstand oder Positivkontrolle. Abweichend von den Herstellerangaben erfolgte auch die Amplifikation im T3-Thermocycler, mit jeweils einem Zyklus für 2 min bei 94 °C, gefolgt von 55 °C und 72 °C und dann 30 s bei 94 °C. Anschließend folgten 34 Zyklen für 1 min bei 55 °C, 1 min bei 72 °C und zuletzt 4 min bei 72 °C.

## 2.2.7 Verwendete Zelllinien

### 2.2.7.1 RAW264.7

Zellen der Maus-Makrophagenzelllinie RAW264.7 (*Abelson Murine Leukemia Virus-induced Tumor*) wurden in RPMI 1640 Medium mit 10% FCS, 200 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin für die Stimulierung mit Bakterien und anschließender Zytokinbestimmung in 96-well Platten mit einer Zellzahl von  $2 \times 10^4$  Zellen/well ausgesät und bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchte über Nacht inkubiert.

### 2.2.7.2 HEK293

HEK293 ist eine seit Ende der 1970er Jahre bestehende humane Zelllinie, die als Transformationsprodukt einer menschlichen embryonalen Nierenzelle (engl.: *Human Embryonic Kidney*, HEK) mit DNA-Teilen des menschlichen Adenovirus 5 geschaffen wurde. Spezifisch wurden 4,5 kb des viralen Genoms in das Erbgut der Nierenzelle eingebaut. HEK293 sind hypotriploide Epithelzellen, welche adhärent wachsen. Die HEK293 Zelllinie wird oft bei der Entwicklung von Virenimpfstoffen, Chemotherapeutika sowie zur Produktion von rekombinanten Adenovirus-Vektoren verwendet und kann gut in serumfreien Medien kultiviert werden.

## 2.2.8 Transfektion und Stimulation von HEK293 Zellen

Die stabil transfizierten CD14/HEK293 bzw. HEK293 Wildtyp Zellen wurden mit einer Zellzahl von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml in DMEM Vollmedium ausgesät und bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank über Nacht kultiviert. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium durch Frisches ersetzt und die Zellen mittels FuGene6 Transfektionsreagenz transient transfiziert. FuGENE 6 ist ein auf Lipiden basierendes Transfektionsreagenz. Es bildet Komplexe mit der DNA und kann diese so in die Zellen transportieren. Die Transfektion erfolgte mit den Plasmiden für TLR4 (0,2 ng), MD2 (40 ng), dem ELAM-1 Luciferase-Reportergen (120 ng) und dem Rous Sarcoma Virus (RSV)- $\beta$ -Galactosidase-Kontroll-Plasmid (40 ng) bzw. für TLR2 (40 ng) und den beiden Reportergenen. Die Zellen wurden erneut über Nacht im Brutschrank kultiviert. Nachdem etwa 50-80% Konfluenz erreicht wurde, erfolgt die Stimulation der Zellen mit inaktivierten Bakterien wie *E. coli*, *P. mirabilis*, *B. vulgatus* oder *L. johnsonii* und den Positivkontrollen LPS für das TLR4- und Pam2Cys für das TLR2-Signalling. Als Negativkontrollen dienten Zellen, die weder transfiziert noch stimuliert waren und Zellen die zwar transfiziert jedoch nicht stimuliert waren.

Zur Messung der Transfektionseffizienz dient der  $\beta$ -Gal-Assay, da das Messsignal direkt von den zur Verfügung stehenden Genkopien abhängt. Zur Analyse des TLR-Signallings dient die Transfektion mit dem NF- $\kappa$ B-abhängigen E-Selektions (ELAM-1)-Promotor Luciferase Reportergen, dessen Expression in Form von messbaren Lichtblitzen überprüfbar ist.

Ein TLR-Signalling führt zur Translokation von NF- $\kappa$ B, einem Transkriptionsfaktor, der in die Aktivierung verschiedener Gene wie dem ELAM-1 involviert ist. Um die Induktion eines TLR-Signallings als Antwort auf eine Liganden-Stimulation zu überprüfen, wurde das Reporter-Plasmid, welches Luciferase unter der Kontrolle des NF- $\kappa$ B-induzierbaren ELAM-1-Promotors exprimiert, verwendet.

### **2.2.8.1 $\beta$ -Gal Reporter Gene Assay zur Bestimmung der Transfektionseffizienz**

Die  $\beta$ -Galactosidase diente im Zellstimulationstest als Reporterprotein. Das Gen für  $\beta$ -Galactosidase wurde zusammen mit dem für TLR2 bzw. 4 in die Zellen transfiziert. Die mit diesem Test bestimmte Aktivität der  $\beta$ -Galactosidase diente als Maß für die Transfektionseffizienz, da sie direkt von der Menge der zur Verfügung stehenden Genkopien abhängt. Es ist jedoch keine absolut quantitative Aussage. Es können lediglich die Transfektionsraten innerhalb eines Versuchsansatzes miteinander verglichen werden. Dies ist wichtig, um die Ergebnisse des Luciferase-Tests besser beurteilen zu können.

Mit Hilfe des  $\beta$ -Gal Reporter Gene Assays wird die Aktivität des Enzyms  $\beta$ -Galactosidase bestimmt. In diesem Test wird zu lysierten Zellen das Substrat Galacton Plus gegeben. Dieses wird durch  $\beta$ -Galactosidase gespalten. Diese Reaktion läuft bei einem pH-Wert von 7.8 optimal ab. Durch ein zweites Reagenz (Initiationslösung) wird der pH-Wert auf über 12 erhöht, was zur Freisetzung von Lichtblitzen führt. Diese können in einem Luminometer detektiert werden. Entgegen den Angaben des Herstellers wurde der Test mit der Hälfte der angegebenen Mengen durchgeführt.

Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend 100  $\mu$ l Lysispuffer hinzugegeben. Während der Lyse schüttelten sie 15 min bei Raumtemperatur. Das Zell-Lysat wurde auf eine 96-well-Mikrotiterplatte überführt und bei 4000 rpm für 7 min zentrifugiert. Vom Überstand wurden 25  $\mu$ l in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Diese wurden mit 50  $\mu$ l Substratlösung versetzt und für mindestens 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Zugabe von 25  $\mu$ l Initiationslösung wurde sofort die Lichtproduktion über einen Zeitraum von 1000 ms gemessen. Lagen die Messwerte außerhalb des Messbereichs, wurde die Zeit auf bis zu 200 ms reduziert.

### **2.2.8.2 Luciferase-Assay zur Bestimmung der Rezeptoraktivität**

Mit dem Luciferase-Test wurde ermittelt, ob die bakteriellen Liganden an die TLRs binden. Das Reporterprotein ist die Luciferase. Das Gen dafür wurde zusammen mit den TLRs in die Zellen transfiziert. Luciferase wird nur exprimiert, wenn NF- $\kappa$ B in aktiver Form vorliegt. NF- $\kappa$ B wird umgewandelt, wenn ein Ligand mit einem TLR interagiert. Ist das Enzym vorhanden, katalysiert es die ATP-abhängige Carboxylierung des Substrats Luciferin. Dabei wird ein Lichtsignal freigesetzt, welches im Luminometer detektierbar ist. In diesem Test wurde ebenfalls der abzentrifugierte Zellüberstand aus der Lyse verwendet. Davon wurden 25  $\mu$ l/well in eine Mikrotiterplatte gegeben und mit 50  $\mu$ l Luciferasereagenz versetzt. Die Lichtfreisetzung wurde im SPECTRAFluor Plus sofort gemessen.

### **2.2.9 Gewinnung und Kultivierung primärer Zellen**

#### **2.2.9.1 Generierung muriner Makrophagen aus dem Peritoneum**

Die Injektion von Thioglycolat in das Peritoneum erhöht sich die Anzahl der zu gewinnenden Makrophagen (vermutlich eine Mischpopulation aus Monozyten und Makrophagen) deutlich. Hierzu wird pro Maus 0,5 ml 4%iges Thioglycolat-Brewer-Medium intraperitoneal injiziert.

#### **2.2.9.2 Gewinnung der murinen Peritonealmakrophagen**

Fünf Tage nach Thioglycolat-Injektion wurden die Versuchstiere durch Genickbruch getötet. Mit sterilem Präparierbesteck wurde die Bauchhaut freigelegt. Nachfolgend wurden 3 ml kaltes RPMI mit 5% FCS (R5) in die Bauchhöhle injiziert, gespült und die Peritonealflüssigkeit an den Seiten des Bauchraums abgesaugt. Sie wurde in ein steriles 50 ml Falconröhrchen überführt und auf Eis gelagert. Der Bauchraum wurde auf diese Weise zweimal gespült. Die gewonnenen Zellen wurden bei 1200 rpm und 4°C für 10 min pelletiert. Das Zellpellet wurde aufgeschüttelt, zur Erythrozytenlyse in 5 ml  $\text{NH}_4\text{Cl}$  aufgenommen und 5 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Pelletieren wurden die Zellen mit R5 gewaschen. Das Pellet wurde in 3 ml R5 aufgenommen und die Zahl der vitalen Zellen in einer 1:10 Verdünnung mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zwischenzeitlich wurden die Zellen auf Eis gelagert. Die frisch isolierten Zellen wurden in R5 mit einer Zellzahl von  $3 \times 10^5$  Zellen/well in einer 96-well-Flachbodenplatte ausplattiert. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C kultiviert. Vor der Stimulation werden alle nicht-adhärenenten Zellen durch einmaliges Spülen mit R5 entfernt. Die Zellen können nun stimuliert werden. Die Dauer der Stimulation ist abhängig vom gewünschten Zytokin und liegt etwa zwischen vier und 48 Stunden.

### 2.2.9.3 Generierung muriner dendritischer Zellen aus dem Knochenmark

Zur Gewinnung des Knochenmarks wurden Ober- und Unterschenkel von C57BL/6, C57/BL10 oder Balb/c Mäusen aus dem Hüftgelenk herausgetrennt und in sterilem PBS maximal 2 h auf Eis gelagert. Vor der Präparation der Knochen wurden diese in 70%igem Ethanol sterilisiert und das restliche Muskelgewebe entfernt. Nach dem Abtrennen der Gelenkkapseln wurden die Markstränge mit 5 ml R5 unter Verwendung einer 10 ml Spritze und einer 25 G-Kanüle ausgespült. Das Knochenmark wurde mit Hilfe einer 10 ml Pasteurpipette am Petrischalenboden vorsichtig resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für 10 min bei 4 °C und 1200 rpm zentrifugiert, die Überstände anschließend abgegossen und der Bodensatz mit 5 ml 1,66%igem Ammoniumchlorid bei RT resuspendiert und für 2,5-5 min leicht geschwenkt um die Erythrozyten zu lysieren. Das Prinzip beruht darauf, dass Erythrozyten anfälliger für hypotonen Schock sind als Leukozyten und andere kernhaltige Zellen. Diese Anfälligkeit nutzt man bei der selektiven Lyse der Erythrozyten durch Zugabe von Lösungen mit geringer Salzkonzentration. Die Zellsuspension wurde mit R5 auf 15 ml aufgefüllt, über ein Sieb gegeben um größere Zellverklumpungen zu entfernen und mit 5 ml R5 nachgespült. Nach erneuter Zentrifugation wurde der nun helle Bodensatz in R5 plus GM-CSF (1:500) resuspendiert und die Zellen mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. In Gegenwart von GM-CSF entwickeln sich adhärente Monozyten innerhalb von fünf bis sieben Tagen zu dendritischen Zellen, die zunehmend weniger adhärent sind, stark aggregieren und die für dendritische Zellen typische Morphologie (zahlreiche längliche Fortsätze) sowie distinkte Oberflächenmarker aufweisen. Um die GM-CSF-Konzentration aufrechtzuerhalten wurde alle zwei Tage das Medium ersetzt. Ab Tag vier wachsen die DC-Vorläuferzellen zunehmend in Suspension und lösen Zellaggregaten. An Tag sechs wurden alle nicht-adhärenenten Zellen geerntet, 10 min bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Bodensatz in 2 ml GM-CSF angereichertem R5 resuspendiert. Um die Knochenmark-generierten DCs (engl.: *Bone Marrow-Derived Dendritic cells*, BM-DC) anschließend zu isolieren wurden in einem 15 ml Falcon 2 ml Zellsuspension vorsichtig auf 4 ml kaltes, 30%iges BSA gegeben und 30 min bei 2500 rpm und 4 °C zentrifugiert, wobei sich die BM-DCs in der Interphase ansammeln, von wo sie sich gut ernten lassen. Die isolierten BM-DCs wurden zweifach gewaschen und zur Kontrolle der BM-DCs im unreifen Zustand Überstände für eine FACS-Messung der entsprechenden Oberflächenmarker entnommen. Zur terminalen Reifung und Entfernung adhärenent-wachsender Makrophagen wurden die Zellen durch Spülen mit warmem 10%igem RPMI in 6-well Platten überführt, stimuliert, kultiviert und nach weiteren 48 h durchflußzytometrisch untersucht. Die terminale Reifung

muriner BM-DCs erfolgte durch Stimulation mit LPS (10 ng/ml/well) bzw. hitzeinaktivierten *E. coli*, die zuvor aus dem terminalen Ileum von Mäusen isoliert und kultiviert wurden, wie in Abschnitt 2.2.5.1 beschrieben.

#### **2.2.9.4 Isolierung von intraepithelialen- und Lamina Propria Lymphozyten**

##### *Organentnahme:*

Die Versuchstiere wurden durch Genickbruch oder mit Hilfe von Halothan getötet und die Bauchhaut mit sterilem Präparierbesteck freigelegt. Die Bauchdecke wurde geöffnet und der gesamte Dünndarm entnommen. Der Darm wurde von Fett und den Peyerschen Plaques befreit und longitudinal geöffnet. Mukus und Fäzes wurden sorgfältig abgestrichen und der Darm mehrfach in sterilem PBS gewaschen.

##### *Isolierung der intraepithelialen Lymphozyten (IEL):*

Der Darm wurde in kleinen Stücken in 15 ml DTT-Lösung (150 mg/ml) für ca. 15 min bei 300 rpm und 37 °C geschüttelt. Der Überstand wurde verworfen, die Darmstücke in 10 ml PBS gewaschen und anschließend in 15 ml PBS/FCS/EDTA (PBS, 10% FCS, 5 mM EDTA) aufgenommen. Die Darmstücke wurden erneut für 15 min bei 300 rpm und 37 °C geschüttelt und anschließend über ein grobes Metallsieb und einen Cellstrainer (70 µm) in 50 ml Falcons überführt und somit die erste IEL-Fraktion aufgefangen. Der Restdarm wurde erneut in 15 ml PBS/FCS/EDTA aufgenommen und das Vorgehen dreifach wiederholt und die Überstände separat gesammelt. Die Zellsuspensionen wurden jeweils mit RPMI (RPMI, 10% FCS, 0,5% Pen/Strep, 5 mM HEPES) aufgefüllt und zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, 4 °C). Das Pellet wurde in 5 ml RPMI aufgenommen und die Darmstücke für 10 min in RPMI bei RT, zur EDTA Neutralisierung stengelassen.

##### *Isolierung der Lamina Propria Lymphozyten (LPL):*

Der restliche Darm wurde in RPMI unter Zugabe von DNase I (40 µl bzw. 100 µg/ml) und Collagenase/Dispase (350 µl bzw. 100 U/ml) für eine Stunde geschüttelt. Durch mechanisches Auf- und Abpipettieren wurde anschließend versucht die Zellausbeute noch zu erhöhen. Die LPL-Fraktion wurde durch ein grobe Sieb und Cellstrainer in einem 50 ml Falcon aufgefangen und der Vorgang einmal wiederholt.

Die IEL- und LPL-Fraktionen wurden bei 1200 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und anschließend in 5 ml 40%igem Percoll pro Darm aufgenommen. Je 5 ml wurden vorsichtig auf 5 ml 70%iges Percoll in einem 15 ml Falcon aufpipettiert. Der Percoll-Gradient wurde für

34 min bei 1900 rpm zentrifugiert, die Interphase entnommen und mit RPMI auf 50 ml aufgefüllt und erneut für 10 min bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Zur Zellzählung wurden die LPL-Pellets in 2 ml und die IEL-Pellets in 5 ml RPMI resuspendiert.

#### *Differenzierung zwischen IEL- und LPL:*

Ein Differenzierungsmerkmal zwischen IEL und LPL ist eine Variierung der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen. So zeichnen sich IELs durch einen höheren CD8<sup>+</sup> Anteil aus, mit einem höheren Anteil an CD8αα als CD8αβ. Für die Unterscheidung der Lymphozyten und um eine Aussage über den Einfluss des Entzündungsgeschehens auf die Zellen treffen zu können, wurde eine Färbung von Oberflächenantigenen durchgeführt, wofür die Zellen auf die benötigten Wells in FACS-Wash verteilt und runterzentrifugiert wurden. Um unspezifische FC-Bindungen zu blockieren, wurde das Pellet in 100 µl FC-Block in FACS-Wash (anti FCγ, 1:500 verdünnt) aufgenommen, 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Antikörper in der vorgegebenen Verdünnung hinzugegeben und abermals mindestens 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen gewaschen und bei 1500 rpm für 3 min zentrifugiert, das Pellet in 100 ml FACS-Wash resuspendiert, in Tubes auf Eis überführt und für eine lebend-tot-Färbung der Zellen mit 1 µl 7AAD versetzt und 10 min inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Messung wie in Abschnitt 2.3.2.2 beschrieben.

### **2.2.9.5 Isolierung von Lymphozyten aus MLN, Milz und Leber**

#### *Mesenteriale Lymphknoten:*

Zur Untersuchung, wie organisierte Lymphfollikel in der Darmwand die Immunantwort der Maus beeinflussen, wurden die Mesenterialen Lymphknoten (MLN) isoliert, vom Fett befreit und in 10 ml Medium (R5: RPMI plus 5% FCS, 2,5 ml Penicillin/Streptomycin, L-Glutamin, HEPES) überführt, auf Eis gelagert und zwischen den rauen Seiten zweier Objektträger zerrieben. Die Zellsuspension wurde in 10 ml R5 mit 350 µl Collagenase/Dispase (100 U/l) aufgenommen und 15 min bei 37 °C geschüttelt. Die Zellsuspension wurde über ein Sieb in ein 50 ml Falcontube überführt, mit R5 auf 50 ml aufgefüllt und 10 min bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen, das Pellet in R5 aufgenommen und die Zellen gezählt. Die Zellen wurden dann mit MACS-Puffer gewaschen und auf  $1 \times 10^7$  Zellen pro 90 µl eingestellt um anschließend durch ein Sorting ausschließlich die CD4<sup>+</sup>-Zellen zu erhalten.

#### *Milz:*

Die Milzen wurden separat aufgearbeitet, das heißt sie wurden zerschnitten, über einen Cellstrainer (70 µm) in 20 ml R5 aufgenommen und 10 min bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert.

Eine Zellzählung fand nach Erythrozytenlyse, wie in Abschnitt 2.2.9.2 beschrieben statt. Je nachdem welche Lymphozyten gewünscht waren konnte eine Zellsortierung, wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben, durchgeführt werden.

#### *Leber:*

Für die Gewinnung von Leberlymphozyten wurde die Leber den Tieren entnommen und homogenisiert, indem sie über ein Nylonsieb (70 µm) filtriert wurde. Die Zellsuspensionen wurden mit PBS gewaschen, bei 50 g für 1 min zentrifugiert und die Überstände entnommen. Dieses Vorgehen wurde viermal wiederholt. Die Überstände wurden gepoolt, mit RPMI plus 5% FCS und Pen/Strep gewaschen und anschließend über einen 40% / 70% Percoll-Gradienten gegeben. Die Zellen wurden aus der Interphase entnommen, mit R5 gewaschen und konnten anschließend nach der Färbung entsprechender Oberflächenmarker durchflußzytometrisch analysiert werden.

#### **2.2.9.5.1 CFSE-Färbung zur einheitlichen Markierung von Zellen**

Die Methode der CFSE-Färbung erlaubt die Analyse der Zellproliferation auf Einzelzellniveau. Der in geringer, nicht zytotoxischer Konzentration anzuwendende Fluoreszenzfarbstoff CFSE (Carboxy-Fluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester) bindet kovalent an zytoplasmatische Proteine. Bei jeder Zellteilung verteilt sich der Farbstoff auf beide Tochterzellen, so dass sich die Fluoreszenzintensität jeweils halbiert. Der Referenzwert für ungeteilte Zellen ist für jede Messung neu festzulegen, da die Fluoreszenz auch in sich nicht teilenden Zellen langsam abnimmt. In Co-Kulturrexperimenten mit verschiedenen Zellpopulationen kann eine CFSE-markierte Zelle später im Durchflußzytometer re-identifiziert werden, da der Farbstoff über lange Zeit stabil bleibt, in FL1 strahlt und dort quantitativ bestimmt werden kann. Die Fluoreszenzintensität gibt somit Aufschluss über die bis zum Zeitpunkt der Messung abgelaufenen Teilungszyklen.

Zur Markierung der Th-Zellen wurden diese in 900 µl 37 °C warmem PBS aufgenommen und mit 100 µl CFSE versehen (0,25 µM CFSE-Endkonzentration), 15 min bei 37 °C im Wasserbad bei Dunkelheit inkubiert und anschließend 3 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden einmal mit warmem R5 gewaschen, erneut zentrifugiert, das Pellet in 1 ml R5 aufgenommen und 30 min im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Dann wurden die Zellen erneut zentrifugiert, gewaschen und abermals zentrifugiert, so dass ungebundenes CFSE durch Bindung an Serumproteine im Medium aus der Zellsuspension entfernt wurde. Anschließend wurden die Zellen auf eine Zellzahl von  $3 \times 10^5/\text{ml}$  ( $\hat{=} 3 \times 10^4/\text{well}$ ) eingestellt.

### 2.2.10 Mixed-Lymphocyte-Reaction (MLR)

Werden aufgereinigte T-Lymphozyten mit antigenpräsentierenden Zellen (APC) eines allogenen, das heißt eines genetisch anderen Mausstammes inkubiert, präsentieren die APCs ihre eigenen Alloantigene und stimulieren die Proliferation alloreaktiver T-Zellen unter anderem über die Expression von MHC-II und die Produktion verschiedener Zytokine [5]. DCs besitzen die Fähigkeit, allogene T-Zellen stark zu stimulieren. Mit steigendem Reifegrad nimmt die Potenz der DCs allogene T-Zellen zu aktivieren zu [185]. Um eine stimulierende Wirkung der DCs und somit deren Reife zu testen, werden diese mit aufgereinigten T-Zellen eines allogenen Mausstammes in einem definierten Mengenverhältnis inkubiert. Die Stimulation wird anhand der Proliferation gemessen, wofür die T-Zellen wie in Abschnitt 2.2.9.5.1 beschrieben mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE gefärbt wurden.

#### *Allogene MLR:*

Bei einer allogenen MLR sind die Stimulatoren und Effektoren von verschiedenen Spendern. Die ausgereiften Maus BM-DCs wurden im Gammacell® 40 Exactor mit 3000 Watt für 28 min bestrahlt um eine weitere Proliferation derselben zu verhindern. Da hier jedoch ausschließlich die T-Zellen fluoreszenzmarkiert wurden, kann aus Zeitersparnis auf die Bestrahlung der DCs verzichtet werden. Eine allogene MLR wurde mit gesunden naiven bzw. mit gnotobiotisch, monorekolonisierten Tieren sowie mit TLR4<sup>-/-</sup>-Mäusen versus dem WT durchgeführt, wofür zum einen auf BM-DCs aus Balb/c Mäusen und T-Zellen aus MLNs von BL/6 sowie BL/10 Mäusen zurückgegriffen und zum anderen auf BM-DCs von BL/6 sowie T-Zellen aus MLNs von Balb/c Tieren zurückgegriffen wurde. Es wurden 96-well Flachbodenplatten verwendet, mit einem Volumen von 200 µl/well. Als Negativkontrolle dienten reine T-Zellen, die wie in Abschnitt 2.2.9.5 aus MLNs isoliert wurden, und hier mit einer Zellzahl von  $3 \times 10^5$ /ml Einsatz fanden. Positivkontrollen waren ConA- (0,25 µg/ml) und SEA- (32 pg/ml) stimulierte T-Zellen. Für die Proliferationsassays wurden 100 µl T-Zellen in der oben angegebenen Konzentration sowie 100 µl BM-DCs, wie in Abschnitt 2.2.9.3 beschrieben generiert und mit Zellzahlen von  $1 \times 10^5$ /ml,  $1 \times 10^4$ /ml sowie  $1 \times 10^3$ /ml eingesetzt. Zur Aktivierung der BM-DCs, um die Proliferation allogener T-Zellen anzuregen, wurden diese zum einen mit reinem LPS und zum anderen mit *E. coli* aus dem terminalen Ileum Ileitis erkrankter Mäuse stimuliert. Es wurden mehrere Parallelansätze angefertigt, so dass die Überstände an Tag 5, 6 und 7 entnommen und für eine durchflußzytometrische Messung vorbereitet werden konnten.

### *Autologe MLR:*

In der autologen MLR werden nur Zellen verwendet, die von demselben Spender stammen. Für die TLR4-abhängige Aktivierung von CD4<sup>+</sup> Lymphozyten aus der Milz durch Stimulierung mit CD11c<sup>+</sup> DCs aus LPL und MLN in naiven und *T. gondii* infizierten C57BL/10 Mäusen wurden jeweils WT und TLR4<sup>-/-</sup> Tiere peroral mit 100 Zysten *T. gondii* ME49 infiziert. Sechs Tage darauf wurden die Organe entnommen und für die Isolierung von IEL, LPL und DCs wie oben beschrieben verfahren. Aufgrund einer geringen DC-Ausbeute aus dem Dünndarm wurden die Zellen in 96-well Rundbodenplatten ausgesät, um eine räumliche Nähe von dendritischen Zellen und T-Zellen zu gewährleisten und lediglich eine Zellzahl von 3 x 10<sup>4</sup> T-Zellen und 1 x 10<sup>4</sup> DCs eingesetzt. Ansonsten wurde wie bei einer allogenen MLR verfahren.

## **2.3 Immunologische Methoden**

### **2.3.1 MACS**

Für die magnetische Zell-Sortierung (engl.: *Magnetic Cell Sorting of Mouse Leukocytes*, MACS) von Maus-Leukozyten werden 1 x 10<sup>7</sup> Zellen in 90 µl MACS-Puffer mit 10 µl CD4 (L3T4) MicroBeads magnetisch markiert und für 15 min bei etwa 6 °C inkubiert. Anschließend wurden 10 ml MACS-Puffer hinzugegeben und die Zellen 10 min bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Um die Säule von zellschädigendem Na-Azid zu befreien, wurde diese mit 500 µl Puffer gespült. Gleiches geschah vor der Nutzung der Beads, um auch hier möglichst zellschonend vorgehen zu können. Die Zellsuspension wurde in 500 µl Puffer aufgenommen und in eine Trennsäule, die sich im Magnetfeld des MACS Separators befand, überführt. Die Säule wurde dreifach mit je 500 µl Puffer gespült, so dass alle CD4<sup>+</sup> Zellen in der Säule verbleiben, alle unmarkierten jedoch hindurchgespült werden. Nach erneuter Zugabe von 500 µl Puffer wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt, so dass die zurückgehaltenen CD4<sup>+</sup> Zellen als Zellfraktion eluiert werden konnte. Um restliches, aus dem Puffer verbliebenes EDTA zu entfernen, wurden die Zellen zweimal mit je 15 ml 5%igem RPMI gewaschen.

### **2.3.2 Durchflußzytometrie**

#### **2.3.2.1 Oberflächenfärbung**

Um die Expression von Oberflächenmarkern auf der Zelloberfläche zu ermitteln, wurden die Zellen in 100 µl FACS-Wash pro Well in eine 96-Well-Spitzbodenplatte überführt, die gewünschten Antikörper sowie die dazugehörigen Isotypkontrollen in der entsprechenden Verdünnung hinzugegeben und die Platte für 20-30 min im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt. Im

Anschluss wurde die Platte bei 2200 rpm für 3 min zentrifugiert, die Überstände abgesaugt und das Pellet zweimal mit 150 µl FACS-Wash gewaschen. Zur Fixierung der Zellen wurden 150 µl FACS-Fix pro Well hinzugefügt, wodurch die Zellen bis zu einer Woche bei 4 °C aufbewahrt werden konnten bevor eine Messung der Marker stattfand.

### 2.3.2.2 Nachweis von Oberflächenmarkern

Bei der durchflußzytometrischen Analyse (engl.: *Fluorescent Activated Cell Sorter*, FACS) werden in einem Flüssigkeitsstrahl hydrodynamisch fokussierte Einzelzellen durch einen Laserstrahl angeregt und für jede einzelne Zelle Fluoreszenz und Lichtstreuung gemessen. Die Intensität des vor- bzw. seitwärts gestreuten Lichts ermöglicht eine Aussage über die Größe und Granularität einer Zelle. Von jeder Zelle wurden die folgenden vier Parameter analysiert:

- Vorwärtslichtstreuung (FSC = Forward Scatter; 2 °-10 ° zum einfallenden Licht), welche proportional zur Zellgröße ist.
- Seitwärtslichtstreuung (SSC = Side Scatter; 90 ° zum einfallenden Licht), welche proportional zur Oberflächenstruktur (Membranfaltung) und Granularität der Zelle ist.
- Fluoreszenzintensität 1 (FL 1), welche proportional zu der Intensität der Anfärbung mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) ist. FITC hat ein Absorptionsmaximum von 495 nm und ein Emissionsmaximum von 519 nm.
- Fluoreszenzintensität 2 (FL 2), welche proportional zu der Intensität der Anfärbung einer Zelle mit R-Phycoerythrin (PE) ist. Dieses hat Absorptionsmaxima bei 488 nm und 565 nm und ein Emissionsmaximum bei 578 nm.

Bevor die Proben gemessen werden, muss ein Referenzwert vorgegeben werden, so dass relative Veränderungen der Fluoreszenzintensität bestimmt werden können. Dieser Referenzwert wird mit Negativkontrollen eingestellt, so genannten Isotypkontrollen. Je nach Zellart und Färbeprotokoll kann es zu unspezifischen Bindungen der Antikörper kommen, so dass immer parallel Isotypkontrollen durchgeführt werden müssen. Darunter versteht man einen Antikörper des gleichen Subtyps wie der spezifische Antikörper, mit dem Unterschied, dass die Isotypenkontrolle gegen ein Antigen gerichtet ist, das bei Säugern gewöhnlich nicht vorkommt, beispielsweise gegen Glucose Oxidase von *Aspergillus niger*. Viele Zellen zeigen auch eine gewisse Eigenfluoreszenz, die durch das Färben und möglicherweise Permeabilisieren noch verstärkt wird. Dies kann falsch positive Ergebnisse liefern. Die Isotypenkontrolle beugt dem vor. Bei der Auswertung der Proben wird die Isotypkontrolle deshalb quasi als Leerwert abgezogen. Mit diesen Zellen wurden DNA die Parameter des Gerätes eingestellt. Die

Einstellung erfolgte, wenn der FACSCalibur sich im „SETUP-Modus“ befindet, alle Zellen im FSC-SSC-Dot-Plot-Diagramm sichtbar waren und durch Einstellung der Strahlungsintensität des Lasers eine komplette Verteilungskurve im Histogramm der entsprechenden Fluoreszenzwellenlänge erschien. Die Kurve sollte ungefähr beim Nullpunkt des Diagramms beginnen. Die Streulichtsignale wurden in linearer, die Fluoreszenz-Signale in logarithmischer Verstärkung aufgenommen. Bei jeder Messung wurden 10 000 der Zielzellen gespeichert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der „CELLQuest Research Software“ (BD) als zweiparametrisches Diagramm (Dot-Plot), in dem jede Zelle als ein Punkt dargestellt ist.

### **2.3.2.3 Messung von Immunmediatoren in Zellkulturüberständen**

Die Zytokinproduktion wurde in Kulturüberständen von stimulierten und nicht-stimulierten Zelllinien und primären Zellen quantifiziert. Die Überstände wurden nach 6 bis 24 Stunden Stimulationszeit, abhängig vom gewünschten Zytokin, entnommen. Für die Bestimmung der Zytokinkonzentrationen in den Zellkulturüberständen kamen unter anderem die ELISA-Kit Opteia Sets Mouse IFN- $\gamma$ , Mouse IL-10 sowie Mouse IL12p(40) zum Einsatz. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Bei Verwendung des TNF- $\alpha$  Sets war das Beschichten einer Maxisorpplatte mit 50  $\mu$ l/Well des monoklonalen anti-Mouse TNF- $\alpha$ -Antikörpers (3  $\mu$ g/ml in 100 mM NaH<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6) über Nacht bei 4 °C erforderlich. Die Platte wurde anschließend zweimal mit je 200  $\mu$ l PBS / 0,05% Tween20 pro Well gewaschen und überschüssige Bindungsstellen durch eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur (RT) mit 200  $\mu$ l PBS / 0,05% Tween20 / 10% FCS pro Well abgesättigt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS / 0,05% Tween20 wurden die Überstände 1:2 verdünnt in PBS / 10% FCS aufgetragen (je 100  $\mu$ l/well). Die Standardreihe für den TNF- $\alpha$  Standard begann bei einem Höchstwert von 10 000 pg/ml und wurde jeweils 1:2 mit PBS / 10% PBS runterverdünnt. Die Proben wurden für drei Stunden bei RT inkubiert, anschließend dreimal mit PBS / 0,05% Tween20 gewaschen und der monoklonale biotinylierte Rat anti-Mouse TNF- $\alpha$  Detektionsantikörper aufgetragen (0,5  $\mu$ g/ml in 100  $\mu$ l PBS / 0,05% Tween20 / 10% FCS). Das Enzymreagenz Streptavidin-Peroxidase-Konjugat wurde 1:1000 (1  $\mu$ g/ml) in PBS / 0,05% Tween20 / 10% FCS verdünnt und je 100  $\mu$ l/Well zugegeben. Nach dreißigminütiger Inkubation bei RT und dreimaligem Waschen wurde der ELISA mit je 100  $\mu$ l Substratlösung (TMB-Substrat) pro Well entwickelt. Nach etwa 20 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 100  $\mu$ l 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt und durch Messen der Absorption bei 450 nm die Konzentration der Proben in pg/ml im ELISA-Reader bestimmt. Wie bei der TNF- $\alpha$  Messung musste auch für die Bestimmung von murinem IL-6 eine Maxisorpplatte über Nacht beschichtet werden, wofür der murine capture anti-Mouse IL-6

Antikörper 1:250 in 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,2 verdünnt und 50 µl/well aufgetragen wurden. Anschließend wurde weiter verfahren wie oben beschrieben. Der IL-6 Standard wurde in Konzentrationen von 2000 pg/ml bis 31,25 pg/ml in 1:2 Verdünnungsschritten eingesetzt. Der biotinylierte IL-6 Zweitantikörper wurde 1:500 verdünnt und 100 µl/well aufgetragen.

Stickstoffmonoxid (NO)-Konzentrationen in stimulierten Makrophagen-Kulturüberständen wurden mit der Griess-Reaktion [61] bestimmt. Bei der Griess-Reaktion wurden 50 µl Zellüberstand mit 50 µl 1,5%igem Sulfanilamid in 1 M HCl plus 0,15% N-(1-Naphthyl)-Ethylendiamindihydrochlorid gemischt. Nach 10 Minuten wurde die Absorption bei 540 nm photometrisch bestimmt. Die NO-Konzentrationen wurden über eine Standardkurve errechnet und auf den Proteingehalt in µM bezogen.

## **2.4 Tiere und Zuchtbedingungen**

### **2.4.1 Mäuse und Ileitis-Induktion durch Infektion mit *T. gondii***

C57BL/10ScSn (Wildtyp) [150], TLR2<sup>-/-</sup> (C57BL/10ScSn sieben Mal zurückgekreuzt mit einer TLR2-knockout Maus von Tularik Inc.) [214], C57BL/10ScN (C57BL/10ScSn mit einer Deletion im TLR4-Gen) [149-150] und TLR2/TLR4-Doppelknockout (C57BL/10ScN sieben Mal zurückgekreuzt mit einer TLR2-knockout Maus von Tularik Inc.) Die Mäuse [112] wurden vom Max-Planck-Institut für Immunologie in Freiburg bezogen. Die weitere Zucht aller Mausstämme inklusive C57BL/6 und NMRI erfolgte im Forschungsinstitut für Experimentelle Medizin in Berlin und wurde wie auch die Experimente an sich nach den Bestimmungen des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Für die Ileitis-Induktion wurden Mäuse per oral mittels Gavage unter Verwendung einer gebogenen Knopfsonde mit jeweils 100 Zysten des *T. gondii* Stamms ME49 aus homogenisierten Gehirnen von intraperitoneal infizierten NMRI Mäusen mit einem Volumen von 0,3 ml PBS, pH 7,4 infiziert.

### **2.4.2 Colitis-Induktion durch Dextransulfat**

Für die Induktion einer Colitis erhielten die in Abschnitt 0 genannten Versuchstiere über einen Zeitraum von sieben Tagen gelöstes Dextran-Natrium-Sulfat (DSS) (3,5% (w/v)) im Trinkwasser. Dies verursachte eine akute Colitis. Die Probennahme erfolgte am Tag acht nach Infektion, einen Tag nach Absetzen des DSS. Die Trinkwassermengen wurden täglich überprüft.

### **2.4.3 Spezifisch-pathogenfreie Zucht (SPF)**

Die Haltung der Mäuse erfolgte unter kontrollierten SPF-Bedingungen. Die Mäuse waren in Plexiglas Käfigen in einem IVC-Gestell (engl.: *Individually Ventilated Cages*) untergebracht, die

mit 50 mbar Überdruck ventiliert wurden. Der Käfigboden war mit autoklaviertem, handelsüblichen Einstreu bedeckt. Die Ernährung der Mäuse erfolgte mit unbegrenzt und frei zugänglichem, autoklaviertem Granulatfutter und autoklaviertem Wasser. Sowohl das Einstreu, als auch das Futter und das Trinkwasser wurden im wöchentlichen Rhythmus erneuert. Raumtemperatur (20-23 °C) und relative Luftfeuchtigkeit (50-55% rL) wurden konstant gehalten. Die Abwesenheit von Mauspathogenen wurde regelmäßig kontrolliert. Alle durchgeführten Tierversuche wurden von der zuständigen Tierschutzkommission genehmigt. Als Zuchttiere wurden heterozygote Erbträger der inaktivierenden Mutation des TLR2- bzw. TLR4-Gens verpaart. Die Nachkommen dieser Tiere wurden durch Nachweis der Mutation in genomischer DNA genotypisiert. Die Genotypisierung erfolgte wie in [167] beschrieben.

#### **2.4.4 Generierung keimfreier und gnotobiotischer Tiere**

Um die kultivierbare Darmflora gänzlich zu determinieren wurden 8 Wochen alte Mäuse in sterile Käfige transferiert und mit einem Antibiotikacocktail, bestehend aus Ampicillin (1 g/l), Vancomycin (500 mg/l), Ciprofloxacin (200 mg/l), Imipenem (250 mg/l) und Metronidazol (1 g/l) im Trinkwasser für mindestens 6 Wochen nach dem Standardprotokoll behandelt. Um die Keimfreiheit des Darms zu überprüfen wurden Fäzesproben in Flüssigmedium (BHI (engl.: *Brain Heart Infusion*)- und Thioglycolat-Medium) über einen Mindestzeitraum von einer Woche bei 37 °C inkubiert, die optische Dichte bestimmt sowie mikroskopische Untersuchungen von Gramfärbungen sowohl von Fäzesproben als auch vom Darminhalt durchgeführt.

Zum Zweck der kontrollierten Besiedlung der Mäuse mit einer oder mehreren Bakterienspezies, bezeichnet als gnotobiotische Zucht, wurden die zuvor keimfrei generierten Tiere mit Hilfe einer Magensonde mit einer definierten Menge an Bakterien besiedelt. Der Erfolg der Besiedlung wurde anhand mikrobiologischer Kontrollen bestätigt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Einfluss des angeborenen Immunsystems auf die Zusammensetzung der bakteriellen Flora im Colon

##### 3.1.1 Mikrobiologische Untersuchungen

Um zu untersuchen wie sich das Fehlen der Bakterienrezeptoren TLR2 und TLR4 auf die Darmflora auswirkt, wurde die Colonflora in Wildtyp-Mäusen und Mäusen mit einem TLR2/4 Defekt analysiert und verglichen. Hierfür wurde von jeweils drei TLR2/4-defizienten (Tier-Nr. 2-4) und drei C57BL/10 Wildtyp-Mäusen (Tier-Nr. 5-7), die sich in einem Stoffwechselkäfig befanden, über den Zeitraum von einer Stunde Fäzesproben gesammelt. Anschließend wurden die Proben homogenisiert, in 0,5 ml sterilem Wasser resuspendiert und die Bakteriendichte in 0,05 ml des Homogenats durch Kultivierung auf Blutagar bestimmt. Durch Analyse auf dem Selektivmedium Rogosa wurde parallel dazu der Anteil an Laktobazillen bestimmt. Wie in Tab. 7 zu sehen, unterscheidet sich die Gesamtanzahl an kultivierbaren Bakterien zwischen den Wildtyp und TLR2/4-defizienten Tieren nicht signifikant, wobei der Anteil an Laktobazillen bei den Wildtyp-Tieren um etwa 20% erhöht ist.

Tab. 7 Keimzahlen in Fäzesproben von TLR2/4-defizienten und Wildtyp-Tieren

Tier-Nr. / Gruppe (Fäzesgewicht)	Zucht-Nr.	Blut-Agar KBE/0,05 ml H KBE/1 mg Fäzes	Rogosa-Agar KBE/0,05 ml H KBE/1 mg Fäzes	% Rogosa
2 / TLR2/4 <sup>-/-</sup> (143 mg / 0,5 ml $\pm$ 14,3 mg / 0,05 ml)	507	19.200.00 1.342.657	6.800.000 475.524	35
3 / TLR2/4 <sup>-/-</sup> (183 mg / 0,5 ml $\pm$ 18,3 mg / 0,05 ml)	509	15.000.000 819.672	9.800.000 535.519	65
4 / TLR2/4 <sup>-/-</sup> (143 mg / 0,5 ml $\pm$ 14,3 mg / 0,05 ml)	511	14.000.000 979.021	8.300.000 580.419	59
<b>Mittelwerte <math>\pm</math> SD</b>		<b>16.066.667<math>\pm</math>2.759.227</b> <b>1.047.117<math>\pm</math>268.060</b>	<b>8.300.000<math>\pm</math>1.500.000</b> <b>530.487<math>\pm</math>52.628</b>	<b>53 <math>\pm</math> 16</b>
5 / WT (71 mg / 0,5 ml $\pm$ 7,1 mg / 0,05 ml)	5	28.200.000 3.971.831	15.300.000 2.154.929	54
6 / WT (131 mg / 0,5 ml $\pm$ 13,1 mg / 0,05 ml)	7	13.000.000 992.366	8.000.000 610.687	61
7 / WT (118 mg / 0,5 ml $\pm$ 11,8 mg / 0,05 ml)	3	10.900.000 923.729	10.000.000 847.458	91
<b>Mittelwerte <math>\pm</math> SD</b>		<b>17.366.667<math>\pm</math>9.440.516</b> <b>1.962.624<math>\pm</math>1.740.347</b>	<b>11.100.000<math>\pm</math>3.772.267</b> <b>1.204.538<math>\pm</math>831.687</b>	<b>69 <math>\pm</math> 20</b>
<b>p-Werte</b>		0,830149565	0,298217732	0,343284903

Alle Tiere waren männlich und etwa zwei Monate alt. Die p-Werte wurden anhand des Student'schen t-Tests ermittelt. H, Homogenat; KBE, Kolonie-bildende Einheit.

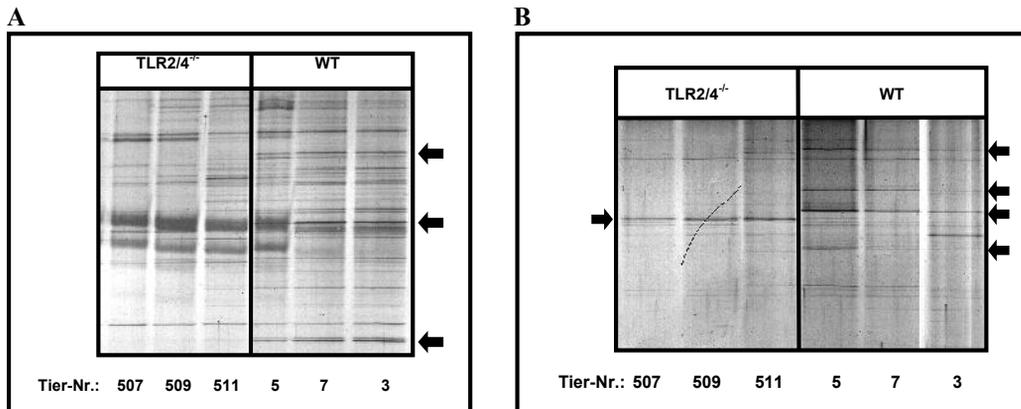
Zur Bestimmung des prozentualen Anteils an kultivierbaren *Lactobacillus* ssp., die in der Darmflora der Maus in großer Menge vorkommen und die auf Rogosa-Agar selektiv anzüchtbar

sind, wurden 50 auf Blutplatten wachsende Einzelkolonien entnommen und parallel, in gleicher Anordnung auf Blut- und Rogosa-Agar transferiert. Die Anzahl der Kolonien, die auf Rogosa-Agar wachsen konnten, wurde nach 72 Stunden Inkubationszeit bei 37 °C unter strikt anaeroben Bedingungen durch Auszählen bestimmt. Im Gegensatz zu den in Tab. 7 dargestellten Ergebnissen, war der Lactobacillusanteil an der Gesamtflora bei den Wildtyp-Tieren mit  $17\% \pm 6\%$  (Mittelwert  $\pm$  SD) signifikant niedriger als bei den TLR2/4<sup>-/-</sup> Tieren mit  $56\% \pm 4,0\%$  (Mittelwert  $\pm$  SD) (p-Wert: 0,00090208).

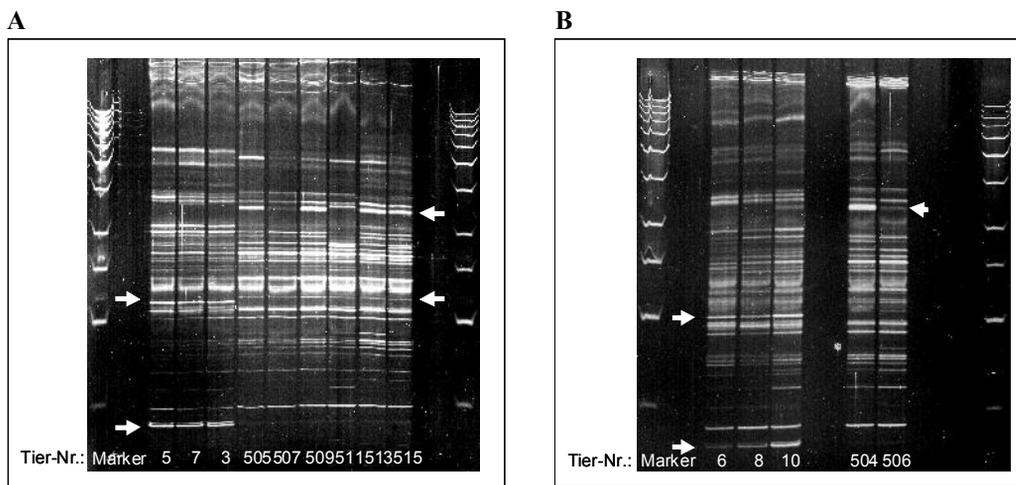
### 3.1.2 Molekulargenetische Untersuchungen

Im Rahmen der molekulargenetischen Untersuchungen sollte der Fragestellung nachgegangen werden, ob das Ansiedeln von Darmbakterien sowie die Zusammensetzung der Darmflora durch die Erkennung von PAMPs durch TLRs beeinflusst werden. Dazu wurde die kulturell-mikrobiologische Analyse des Darminhalts aus dem Colon durch den Einsatz molekulargenetischer Methoden ergänzt. Da die detaillierteste Information zur bakteriellen Zusammensetzung und deren Diversität mittels Klonierung und anschließender Sequenzierung von 16S rRNA-Genen erhalten werden kann, wurden exemplarisch Klonbibliotheken für gesunde Tiere mit und ohne TLR-Defizienz hergestellt. Für die Untersuchung des Einflusses einer TLR-Defizienz auf die Florenzusammensetzung im Colon gesunder Tiere, wurde die Flora von TLR2-, TLR4- und TLR2/4-defizienten Tieren gegenüber dem Wildtyp zum einen mittels PCR-DGGE untersucht und zum anderen 16S rRNA Klonbibliotheken angefertigt. Hierfür wurden drei Versuchstiere pro Gruppe im Alter von drei Monaten getötet und luminaler Fäzes aus dem distalen Colon entnommen und in PBS resuspendiert. Gesamt-DNA, die durch Phenolextraktion gewonnen wurde, diente als Template für die PCR-Amplifikation bakterieller 16S rRNA-Gene mit den Bakterien-spezifischen Consensusprimern TPU1 (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG; *Escherichia coli* Positionen 8-27) und RTU8 (AAG GAG GTG ATC CAN CCR CA; *E. coli* Positionen 1522-1541) [211]. Für die hoch auflösende DGGE wurde die V2-V3 Region von 16S rRNA-Genen aus DNA von Bakterien des gesamten Darminhalts mit den Primern HDA1-GC (**CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC** TCC TAC GGG AGG CAG CAG T-39; die GC-Klammer ist fett dargestellt) und HDA2 (59-GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA C-39) [212] verwendet. Die HDA Primer wurden erstmals von Turner und Kollegen (S. J. Turner, G. D. Lewis, D. J. Saul, C. S. Baker, and A. G. Rodrigo, New Zealand Microbiol. Soc. Ann. Meet., poster paper, 1998) beschrieben. Neben möglichen Unterschieden in den komplexen Floren der Wildtyp und TLR-defizienten Tiere (Abb. 5) sollten geschlechterspezifische Unterschiede (Abb. 6), ebenso untersucht werden,

wie der Einfluss des Alters (Abb. 7). Darüber hinaus sollten Umwelteinflüsse wie der Standortfaktor (hier nicht gezeigt) sowie Einflüsse der Ernährung auf die Darmflora (Abb. 7) überprüft werden. Zuerst wurden die beiden Tiere mit der größten genetischen Differenz miteinander verglichen, also der Wildtyp- mit den TLR2/4-defizienten Tieren. Die markanten Unterschiede in den Bandenmustern sind mit Pfeilen an den jeweiligen Positionen gekennzeichnet, wobei diejenigen am linken Bildrand solche markieren, die nur im Wildtyp und die am rechten Bildrand für solche stehen, die nur bei den TLR-defizienten Tieren vorkommen.



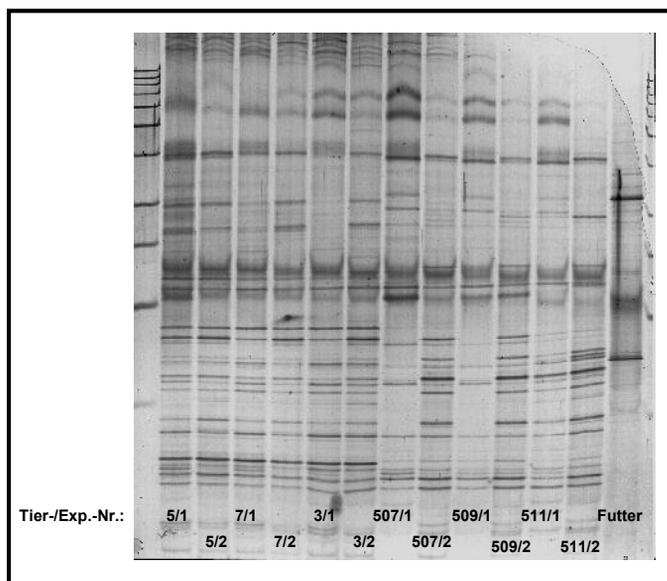
**Abb. 5** Unterschiede in den Bandenmustern zwischen jeweils drei Wildtyp und TLR2/4-defizienten Tieren. Detektion der dominierenden Bakteriengruppen in gesunden Wildtyp und TLR2/4-defizienten Tieren durch molekulare Analysen. Genetische Fingerprints der Darmflora von gesunden Tieren wurden durch DGGE-Analysen PCR-amplifizierter bakterieller 16S rRNA-Gene aus Fäzes-DNA erstellt. (A) HDA-Amplikon. (B) GC968-Amplikon. Die Pfeile symbolisieren Unterschiede im Bandenmuster zwischen Wildtyp und TLR2/4-defizienten Tieren. Die Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängige Experimente.



**Abb. 6** Vergleich bakterieller Gemeinschaften von WT und TLR2/4-defizienten Tieren bei Männchen und Weibchen. Genetische Fingerprints der Darmflora von gesunden Tieren wurden durch DGGE-Analysen PCR-amplifizierter bakterieller 16S rRNA-Gene aus Fäzes-DNA erstellt. HDA-Amplikon. (A) Männchen. Proben: Nr. 5, 7 und 3 stammen aus WT- und Nr. 505, 507, 509, 511, 513 und 515 aus TLR2/4-defizienten Tieren. (B) Weibchen. Proben: Nr. 6, 8 und 10 stammen aus WT- und Nr. 504 und 506 aus TLR2/4-defizienten Tieren. Pfeile symbolisieren Unterschiede zwischen Wildtyp und TLR-defizienten Tieren.

Die Ergebnisse zeigen, dass man mit Hilfe denaturierender Gradientengele genetische Fingerabdrücke der Floren erhält, die sich gut miteinander vergleichen lassen und Übereinstimmungen sowie Abweichungen der Profile deutlich erkennbar machen.

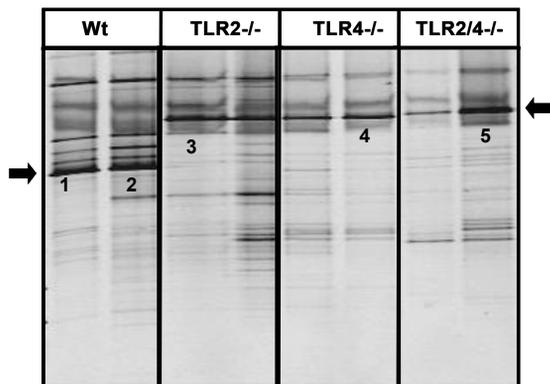
Wie in Abb. 7 zu sehen ist, unterscheiden sich die Floren zwischen Wildtyp und TLR2/4-defizienten Tieren nur durch einzelne wenige Banden. Was dagegen jedoch sehr deutlich wird ist, dass sich die Flora der TLR2/4-defizienten Tiere zu einem späteren Zeitpunkt zu etablieren scheint. Im Gegensatz zu den Wildtyp-Tieren, bei denen das Bandenmuster unabhängig vom Alter der Tiere einheitlich erscheint, nimmt die Bandenanzahl bei den TLR2/4-defizienten Tieren mit zunehmendem Alter deutlich zu.



**Abb. 7** Vergleich bakterieller Gemeinschaften von WT und TLR2/4-defizienten Tieren in Abhängigkeit des Alters. Genetische Fingerprints der Darmflora von gesunden Tieren wurden durch DGGE-Analysen PCR-amplifizierter bakterieller 16S rRNA-Gene aus Fäzes-DNA erstellt. HDA-Amplikon. Proben: Nr. 5, 7 und 3 stammen aus WT- und Nr. 507, 509 und 511 aus TLR2/4-defizienten Tieren. Bei Exp. 1 hatten die Tiere ein Alter von 5 ½, bei Exp. 2 eines von 9 ½ Wochen. Als Kontrolle dient extrahierte DNA einer Futterprobe. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Der ausschließlich visuelle Vergleich von Bandenmustern ist problematisch, da hinter einer Bande verschiedene Bakterien-Spezies verborgen sein können. Um diese Problematik zu umgehen, wurden durch den Farbstoff Sybr-Green sichtbar gemachte Banden unter UV-Durchlicht aus einem DGGE-Gel geschnitten und direkt sequenziert. Dabei wurde das Augenmerk besonders auf solche Banden gerichtet, die durch ihre Intensität auffielen und für eine bestimmte Gruppe prägnant zu sein schienen, in diesem Fall also entweder im Wildtyp oder in den TLR-defizienten Tieren auftraten. Einige Banden, in Abb. 8 mit den Ziffern 1-5 gekennzeichnet, wurden ausgeschnitten und sequenziert und führten bei dem Vergleich mit vorhandenen Datenbankeinträgen mit Homologien um 92% zu den in Tab. 8 dargestellten Ergebnissen. Wie eben erwähnt, ergab die Sequenzierung für die Banden eins und zwei, die beide aus dem Wildtyp stammen und rein visuell für ein und dasselbe zu stehen scheinen, nicht das gleiche Ergebnis. Hinter der Bande eins verbirgt sich das Butyrat-produzierende Bakterium A2-175, hinter der Bande 2 *Ruminococcus* sp. 14531, die beide der Ordnung Clostridiales

angehören. Doch auch die aus dem TLR4-defizienten Tier stammenden Bakterien (Bande 4) wurden den Clostridien ssp. zugeordnet.



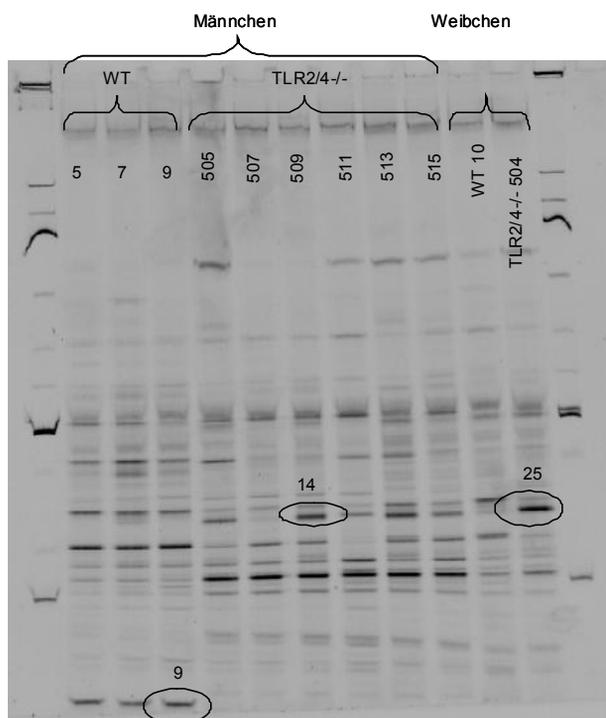
**Abb. 8** Vergleich bakterieller Gemeinschaften von WT- und TLR2-, TLR4- sowie TLR2/4-defizienten Tieren. Genetische Fingerprints der Darmflora von gesunden Tieren wurden durch DGGE-Analysen PCR-amplifizierter bakterieller 16S rRNA-Gene aus Fäzes-DNA erstellt. GC968-Amplikons. Die am linken bzw. rechten Bildrand durch Pfeile markierten Banden sind solche die entweder nur im Wildtyp oder aber nur im TLR-defizienten Tier vorkommen, wobei die hier mit 3, 4 und 5 beschrifteten Banden unabhängig vom TLR-Status in allen drei TLR-defizienten Gruppen vorkommen.

**Tab. 8** Sequenzierungsergebnis extrahierter Banden

Banden-Nr. / TLR-Status	NCBI-Blast	Fit (%)	Bp	Accession No.	Pubmed-Ref.
1 / WT	Butyrate-producing bacterium A2-175	92	315/339	AJ270485	<a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10742256/">10742256</a>
2 / WT	Ruminococcus sp. 14531	91	328/357	AJ315979	15023953
3 / TLR2 <sup>-/-</sup>	Unidentified rumen bacterium RFN18	91	325/354	AB009177	Tajima , K. 1997
4 / TLR4 <sup>-/-</sup>	Clostridium sp. cTPY-12	92	329/357	AY239460	14663493
5 / TLR2/4 <sup>-/-</sup>	Unidentified rumen bacterium RFN18	92	319/354	AB009177	Tajima , K. 1997

Bandenextraktion aus DGGE-Gel und direkte Sequenzierung. GC968-Amplikon. Alle Ergebnisse beziehen sich auf Gene der variablen 16S rRNA Regionen.

Da wie oben gezeigt die Sequenzierung einzelner Banden zu keinem eindeutigen Ergebnis führte, wurde eine Klonbibliothek für die extrahierten und in Abb. 9 mit den Nummern 9 (WT9), 14 (TLR2/4-Defizienz, Nr. 509) und 25 (TLR2/4-Defizienz, Nr. 504) gekennzeichneten Banden erstellt. Hierfür wurden HDA PCR-Produkte mit dem TOPO TA Cloning Kit in kompetente *E. coli* TOP 10F' Zellen kloniert und anschließend die M13 PCR-Produkte von 15 Klonen pro Bande mit dem Primer HDA1 sequenziert. Die Banden 14 und 25 stammen aus einem TLR2/4-defizienten Tier, wobei es sich bei dem Tier Nr. 509 um ein Männchen, bei dem Tier Nr. 504 dagegen um ein Weibchen handelt. Die Bande Nr. 9 scheint für den Wildtyp spezifisch zu sein, da diese bei allen drei untersuchten Wildtyptieren, jedoch bei keinem der TLR-defizienten Tiere vorzufinden war. Leider gelang die Klonierung der Bande 9 aus technischen Gründen bis auf zwei Ausnahmen nicht, wodurch sich ein Vergleich zwischen Wildtyp und TLR2/4-defizienten Tieren auf diesem Wege nicht erzielen ließ. Das Ergebnis der Sequenzierung, mit Homologien zwischen 93% und 100% ist dennoch in der Tab. 9 abgebildet. Auch hier wird wieder deutlich erkennbar, dass sich hinter einer einzelnen Bande mehrere Spezies verbergen können, wobei es sich in der überwiegenden Anzahl um bisher nicht identifizierte bzw. nicht-kultivierbare Bakteriengene der 16S rRNA Regionen handelt. Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen scheint es wie oben schon gezeigt keine zu geben.



**Abb. 9** Vergleich der Bandenmuster von drei WT und sechs TLR2/4-defizienten Männchen sowie einem WT- und einem TLR2/4-defizienten Weibchen. Genetische Fingerprints der Darmflora von gesunden Tieren wurden durch DGGE-Analyse PCR-amplifizierter bakterieller 16S rRNA-Gene aus Fäzes-DNA erstellt. HDA-Amplikon.

Die in Abb. 9 mit den Nummern 9, 14 und 25 gekennzeichneten Banden, welche spezifisch für den Wildtyp bzw. die TLR-defizienten Tiere unabhängig vom Geschlecht waren, wurden aus dem Gel isoliert, die DNA extrahiert, kloniert und sequenziert. Das Sequenzierungsergebnis der isolierten Banden aus einem DGGE-Gel, bei dem die Bande 9 aus einem Wildtyp-Männchen, Bande 14 aus einem TLR2/4-defizienten Männchen und die Bande 25 aus einem TLR2/4-defizienten Weibchen stammen und für diese spezifisch zu sein scheinen, ist der Tab. 9 zu entnehmen. Es wurden jeweils 15 Klone pro Tier hergestellt, wobei sich die Wildtyp-Klone nur schlecht kultivieren ließen, weshalb hier lediglich 2 Klone sequenziert werden konnten. Das BLAST-Ergebnis zeigt den Datenbankeintrag mit der höchsten Übereinstimmung, welcher mit dem daneben stehendem Fit in % und der Anzahl der Nukleotide und dessen Positionen angegeben ist. Die Referenzen können unter der angegebenen Accession-Nr. in Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) eingesehen werden.

**Tab. 9** Sequenzierungsergebnis von Klonen aus WT- und TLR2/4<sup>-/-</sup>-Tieren bei Männchen und Weibchen

Banden-Nr. Klon-Nr.	BLAST	Nucl	Fit (%)	Nt	Accession
<b>TLR2/4<sup>-/-</sup>, 504, Weibchen</b>					
B25-K1	Proteobacterium BHI80-5 16S rRNA gene, strain BHI80-5.	1-142	97	66/68	AJ431214
B25-K2	B.fibrisolvans DNA for ribosomal RNA gene (strain NCDO 2221).	1-145	98	56/57	X89970
B25-K3	Clostridium polysaccharolyticum 16S rRNA gene, strain DSM 1801	1-144	98	81/82	X77839
B25-K4	uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone kl021	1-160	97	156/160	AJ419007
B25-K5	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: NK233	1-268	100	117/117	AB064705
B25-K7	C.polysaccharolyticum	1-150	95	79/80	
B25-K8	Clostridium sp.	1-80	100	44/44	
B25-K9	Butyrivibrio fibrisolvans strain WV1	1-149	98	56/57	AF396927
B25-K10	uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone k055	1-50	96	48/50	AJ418972

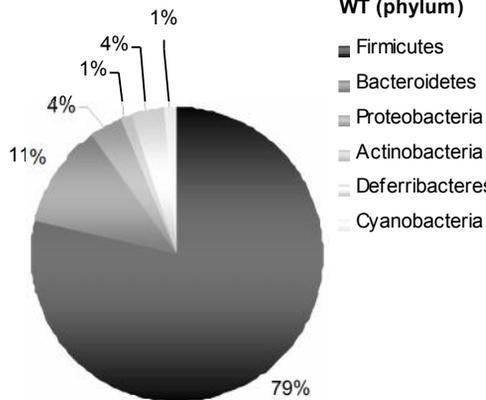
B25-K12	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence,clone:NK233	1-268	100	121/121	AB064705
B25-K13	Unidentified eubacterium from anoxic bulk soil	1-150	100	70/70	
B25-K14	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence,clone:NK233	1-268	100	122/122	AB064705
B25-K15	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence,clone:NK233	1-268	100	122/122	AB064705
B25-K16	uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone kl021	1-159	97	156/160	AJ419007
<b>TLR2/4<sup>-/-</sup>, 509, Männchen</b>					
B14-K2	Butyrivibrio hungatei strain Su6	1-136	100	59/59	AY178635
B14-K3	uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone kl021	1-144	98	142/144	AJ419007
B14-K4	Prevotella ruminicola strain TF2-5	1-134	97	70/72	AF218620
B14-K5	Prevotella ruminicola strain TF2-5	1-143	93	69/74	AF218620
B14-K6	uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone kl021	1-142	95	136/142	AJ419007
B14-K7	Human intestinal firmicute CO2 gene for 16S rRNA	1-139	93	73/78	AB064903
B14-K8	uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone k055	1-142	98	51/52	AJ418972
B14-K10	uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone kl021	1-139	98	81/82	AJ419007
B14-K12	uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone kl021	1-144	97	140/144	AJ419007
B14-K13	uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone kl021	1-144	94	136/144	AJ419007
B14-K14	uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone kl021	1-144	90	97/107	AJ419007
<b>WT9, Männchen</b>					
B9-K12	uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone kl035		97	164/168	AJ419012
B9-K13	uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone kl035		99	168/196	AJ419012

### 3.1.3 Komplexe Florenanalyse einer 16S rRNA Klonbibliothek von Coloninhalt bei gesunden WT- und TLR-defizienten Tieren

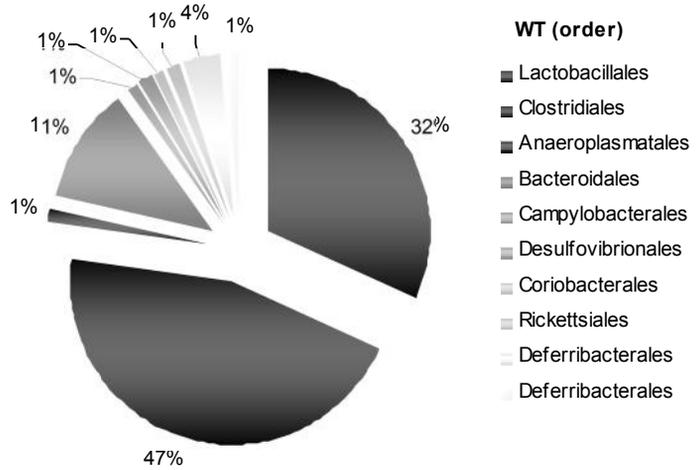
Es sollte analysiert werden, ob eine TLR-Defizienz einen erkennbaren Einfluss auf die Zusammensetzung einer komplexen Darmflora im gesunden Colon hat. Dazu wurde die Colonflora von gesunden TLR2-, TLR4- und TLR2/4-defizienten Tieren mittels PCR-DGGE und 16S rRNA-Klonbibliotheken analysiert. Drei Versuchstiere pro Gruppe wurden im Alter von drei Monaten getötet und der Coloninhalt aus dem distalen Colon entnommen. Die Sequenzanalyse der Klonbibliotheken mit 16S rRNA-Genen und die Speziesidentifikation durch Vergleich mit Datenbankeinträgen zeigte, dass die Zusammensetzung der Darmflora in den dargestellten taxonomischen Einheiten zwischen TLR-defizienten Tieren und dem Wildtyp nicht signifikant unterschiedlich war. Das Ergebnis der umfassenden Florenanalyse der 16S rRNA-Klonbibliothek von 79 WT-Klonen, jeweils 81 Klonen von TLR2- und TLR4-defizienten Tieren sowie 91 Klonen von TLR2/4-defizienten Tieren, auf der Basis der Taxa Stamm (gr.: *phylum*) und Ordnung (gr.: *order*), ist in separaten Kreisdiagrammen für die jeweilige biologische Klassifikation in Abb. 10 A-H dargestellt. Die Ergebnisse bestätigen das Resultat der kulturellen Analyse insofern, als dass auch hier bei den Wildtyp-Tieren im Gegensatz zu allen TLR-defizienten Tieren ein um etwa 10% geringerer Anteil an Firmicutes, die sich auf Ebene der Ordnung in erster Linie in Lactobacillales und Clostridiales einteilen ließen, gefunden werden konnte. Darüber hinaus beherbergt der Wildtyp, ersten Ergebnissen zu Folge (Abb. 10 A-B), das umfangreichste Spektrum an Bakterienarten. Die Diversität der Bakterienordnungen nimmt vom Wildtyp über die TLR4- und TLR2-defizienten Tiere bis zu den TLR2/4-defizienten Tieren ab,

wobei der Anteil an Firmicutes in allen drei TLR-defizienten Tiergruppen bei etwa 87% liegt. Der verbleibende Anteil lässt sich den Gattungen Bacteroidetes, mit etwa einem Vorkommen von 10% sowie Proteobacteria und Actinobacteria zuordnen.

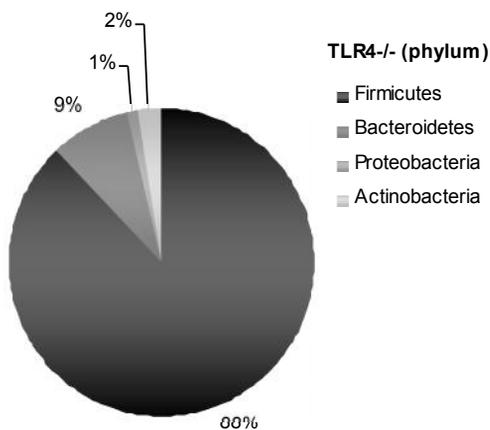
A



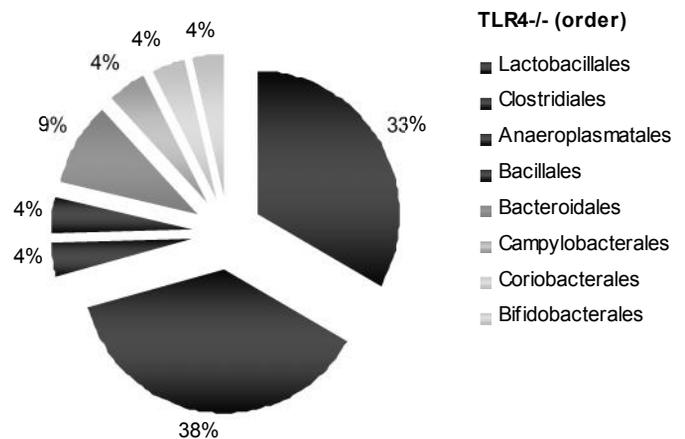
B



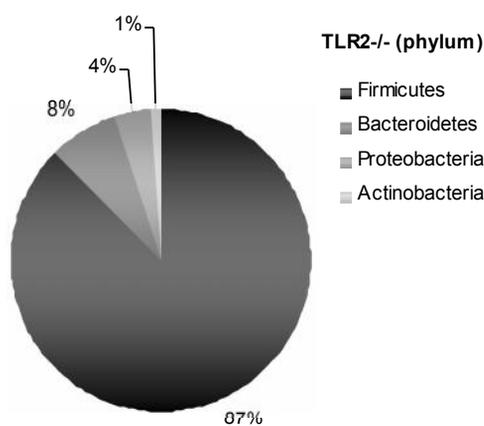
C



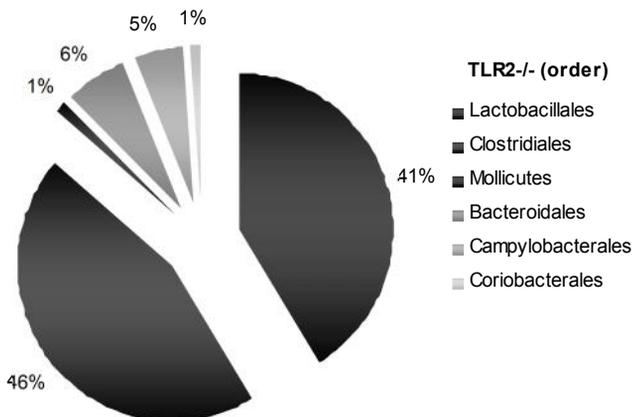
D

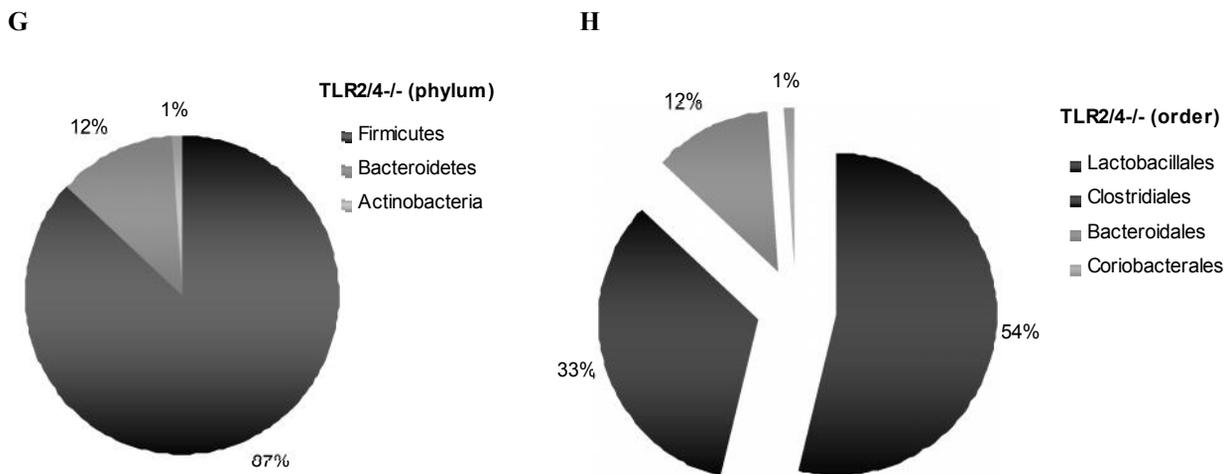


E



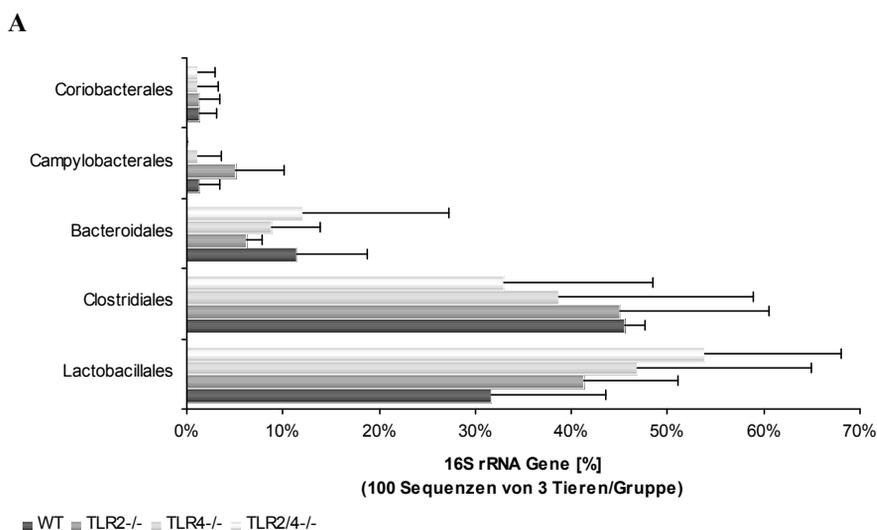
F



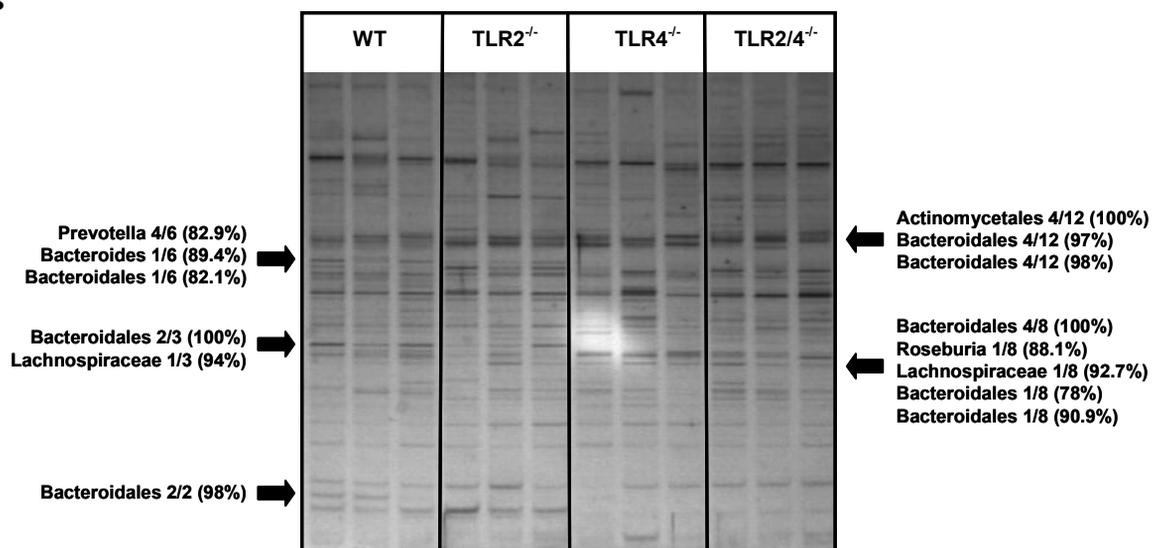


**Abb. 10** Zusammensetzung der Normalflora im Colon bei Wildtyp und TLR-defizienten Tieren. Dargestellt ist die Zusammensetzung der Colonflora bei gesunden C57BL/10, TLR2-, TLR4- und TLR2/4-defizienten Mäusen mittels Analyse von 16S rRNA-Klonbibliotheken. Die kompletten 16S rRNA-Gene wurden aus der Gesamt-DNA des Coloninhalts amplifiziert (n=3 pro Gruppe; A, C, E, G: Gattung. B, D, F, H: Ordnung. (A-B) 79 WT-Klone. (C-D) 81 TLR4<sup>-/-</sup>-Klone. (E-F) 81 TLR2<sup>-/-</sup>-Klone. (G-H) 91 TLR2/4<sup>-/-</sup>-Klone). Die Tortenstücke repräsentieren den prozentualen Anteil der taxonomischen Gruppen.

In Form von Balkendiagrammen ist in Abb. 11 A die Zusammensetzung der Normalflora im Colon gesunder Tiere auf der Ebene der Ordnung noch einmal dargestellt. Das Ergebnis resultiert wie oben beschrieben aus einer umfangreichen Analyse klonierter 16S rRNA Gensequenzen aus Fäzes-DNA von WT-, TLR2-, TLR4- und TLR2/4-defizienten Tieren. Während der Anteil an *Lactobacillales* vom Wildtyp über die TLR2- und TLR4- zu den TLR2/4-defizienten Tieren hin zunimmt, nimmt der Anteil an *Clostridiales* in diese Richtung hin ab. Bei den übrigen Ordnungen *Bacteroidales*, *Campylobacteriales* und *Coriobacteriales* ist dagegen keine solche Tendenz erkennbar.



B



**Abb. 11** Molekulare Analyse der Normalflora im Colon bei Wildtyp und TLR-defizienten Tieren. (A) Dargestellt ist die Zusammensetzung der Colonflora bei gesunden, drei Monate alten TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup>, TLR2/4<sup>-/-</sup> und C57BL/10-WT Mäusen, durch Analyse klonierter bakterieller 16S rRNA-Gene einer Klonbibliothek. Die kompletten 16S rRNA-Gene wurden aus der Gesamt-DNA des Coloninhalts amplifiziert (n=3 pro Gruppe; 100 Klonsequenzen pro Gruppe). Die Balken repräsentieren den prozentualen Anteil der taxonomischen Gruppen auf der Y-Achse. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichung (nicht signifikant). (B) Resultate der individuellen 16S rRNA DGGE-Profile (Primer HDA1-GC/HDA2, 16S rRNA, V2-3 Region) aus der Colonflora bei Wildtyp-, TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup> und TLR2/4<sup>-/-</sup> defizienten Mäusen (n=3 pro Gruppe). Bakterienspezies wurden anhand von Sequenzanalysen bakterieller 16S rRNA-Genfragmente durch Vergleich mit Datenbanken identifiziert. Banden, die lediglich im Wildtyp auftraten sind am linken, solche die nur bei TLR-defizienten Tieren vorkamen am rechten Bildrand durch Pfeile gekennzeichnet und durch Angaben der größten Übereinstimmung mit vorhandenen Datenbankeinträgen ergänzt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

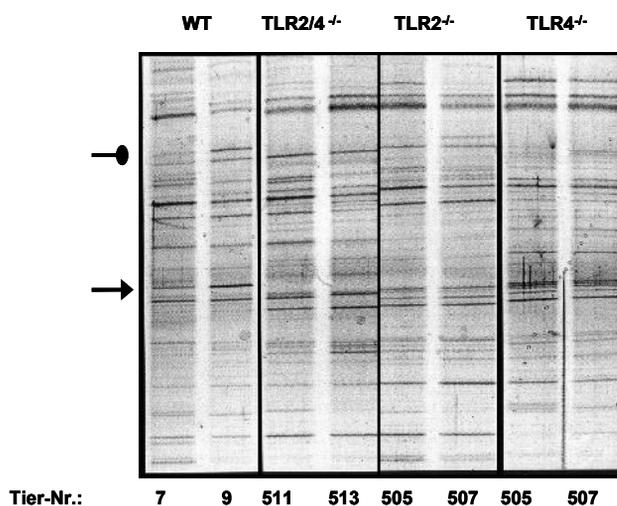
Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es wenige Bakterienarten gibt, die aufgrund eines TLR2- und/oder TLR4-Defekts unterschiedlich Colonisieren. Auch eine Reduktion der Florenvielfalt sowie ein Anstieg des Laktobazillenanteils bei den TLR2/4-defizienten Tieren im Vergleich zum Wildtyp ist zu beobachten, was die Ergebnisse der kulturellen Analysen bestätigt. Hohe Standardabweichungen (Abb. 11 A) machen jedoch deutlich, dass die in den Kreisdiagrammen auf den ersten Blick eindeutigen Unterschiede in der Florenzusammensetzung zwischen dem Wildtyp und den TLR-defizienten Tieren kritischer betrachtet werden müssen. Die interindividuelle Variabilität ist extrem hoch. Um also statistisch auswertbare und aussagekräftigere Ergebnisse zu erhalten, müsste demnach eine wesentlich höhere Anzahl an Tieren pro Gruppe untersucht werden.

## 3.2 Molekulare Analyse der Darmflora mittels DHPLC

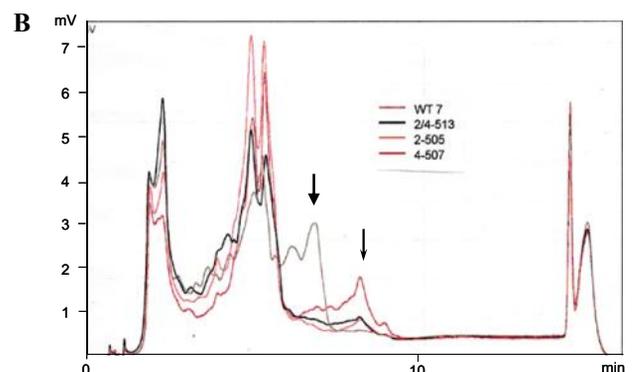
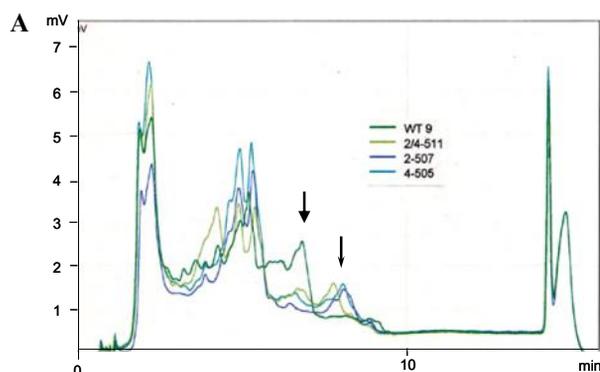
### 3.2.1 Analyse bakterieller Floren mittels 16S DHPLC

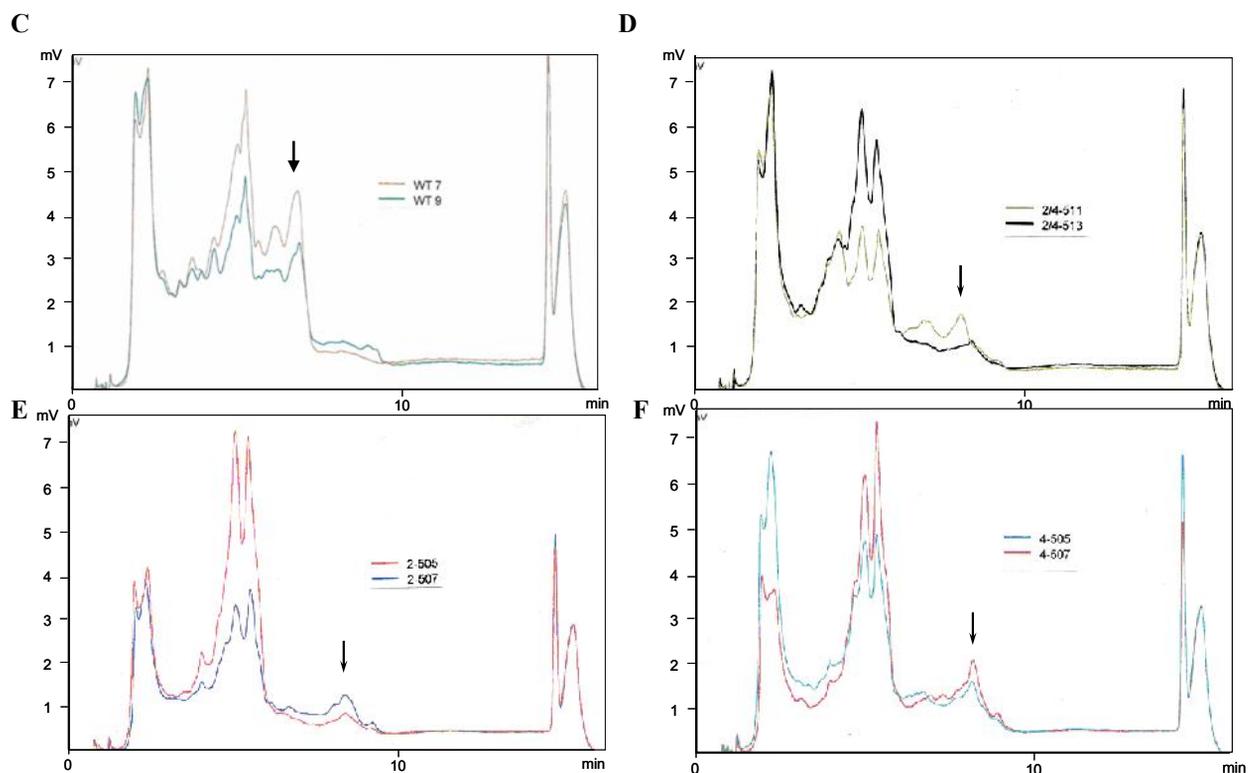
Im Vorfeld der *Denaturing High Performane Liquid Chromatography* (DHPLC)-Analyse wurde eine PCR-Amplifikation von 16S rRNA-Genen analog zur DGGE, wie in Kapitel 2.2.4

beschrieben, durchgeführt. Es wurden jeweils zwei Tiere pro Gruppe ausgewählt, bei denen Unterschiede im DGGE-Profil erkennbar waren (Abb. 12). Als einfache und vor allem schnelle Nachweismethode sollte nun mittels DHPLC untersucht werden, ob sich mit Hilfe dieser Methode abhängig vom TLR-Status Unterschiede erkennen lassen. Wie in Abb. 13 zu sehen, erfolgte die Trennung der Proben zwischen drei und 14 Minuten, wobei jedes Amplifikat durch das Erscheinen mehrerer Peaks gekennzeichnet war. In den Abbildungen A und B wurden die Profile aller vier Gruppen übereinander gelegt, so dass Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den TLR-defizienten Tieren, mit unterschiedlich starken Pfeilen gekennzeichnet, deutlich erkennbar wurden. Im Gegensatz zu den TLR-defizienten Tieren erscheinen beim Wildtyp, wie in Chromatogramm C zu erkennen, Peaks mit Retentionszeiten zwischen 5,5 min und 7 min, während bei den TLR-defizienten Tieren Spezies zwischen 6,5 min und 9 min eluieren (Abb. 13 D-F), welche in Proben aus Wildtyp-Tieren nicht auftraten. Aufgrund von Unterschieden im Trennungsprinzip konnten die beiden Methoden nicht direkt miteinander verglichen werden, dass heißt einzelne Banden konnten nicht bestimmten Peaks zugeordnet werden. Die DHPLC war damit eine ergänzende Methode um mit relativ geringem Zeitaufwand Unterschiede in der Darmflora abhängig vom TLR-Status deutlich zu machen.



**Abb. 12** Molekulare Analyse der Normalflora im Colon bei Wildtyp und TLR-defizienten Tieren. Individuelle 16S rRNA DGGE-Profile (Primer HDA1GC und HDA2, 16S rRNA, V2-3 Region) aus der Colonflora bei Wildtyp-, TLR2-, TLR4- und TLR2/4-defizienten Mäusen. Die Pfeile am linken Bildrand symbolisieren Banden die nur im Wildtyp (●) vorkommen oder aber im Wildtyp sowie im TLR2<sup>-/-</sup> (→) und die am rechten Bildrand (◆) stehen für solche die in allen drei TLR-defizienten Tiergruppen aber nicht im Wildtyp vorkommen.





**Abb. 13** Analyse der bakteriellen Floren in Wildtyp- und TLR-defizienten Tieren mittels 16S DHPLC. PCR-Amplifikation von 16S rRNA-Genen mit dem Primer F968-30GTC und anschließende Auftrennung mittels DHPLC. Die Elution erfolgte innerhalb von 14 min, wobei die Retentionszeiten für die bedeutenden Peaks zwischen 3 min und 9 min, abhängig vom TLR-Status, lagen. (A-B) Vergleich von WT (Tier-Nr. 7 bzw. 9), TLR2- (Nr. 505 bzw. 507), TLR4- (Nr. 505 bzw. 507) und TLR2/4- (Nr. 511 bzw. 513) defizienten Tieren. (C) WT, (D) TLR2/4-Defizienz, (E) TLR2 Knockout und (F) TLR4-Defizienz. Vergleich von jeweils zwei Tieren.

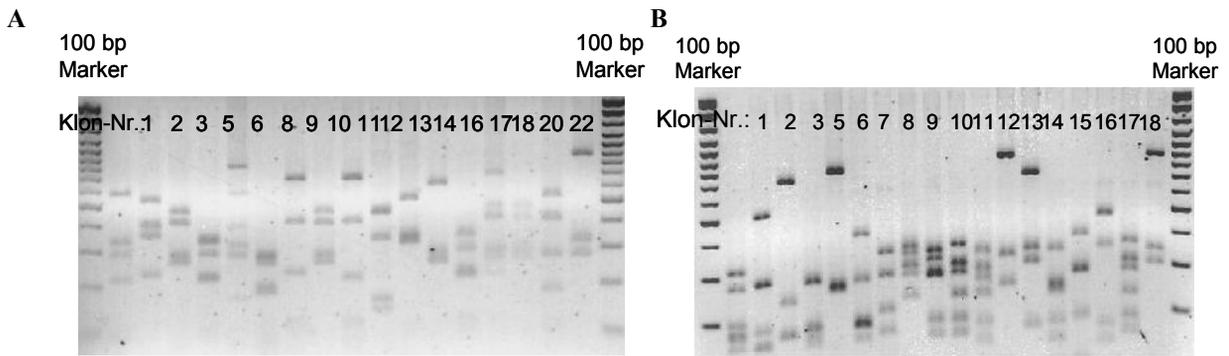
Wie bei der DGGE, bei der sich 16S rRNA-Genfragmente mehrerer bakterieller Spezies hinter einer Bande verbergen können, so befindet sich vermutlich auch bei der DHPLC-Analyse DNA mehrerer Spezies in einem Peak. Was die Analyse zudem erschwert, sind die nah beieinander liegenden Retentionszeiten. Für eine exaktere Trennung der Eluenten müsste eine Reamplifikation zwischengeschaltet werden, wodurch genauere Peakprofile erzielt werden könnten. Da die sich unterscheidenden Peakfraktionen nicht aufgefangen und somit auch nicht sequenziert wurden, kann an dieser Stelle nicht genauer gesagt werden worin sich die Floren unterscheiden. Alles was deutlich gemacht werden konnte ist eine erneute Bestätigung, dass die Zusammensetzung der Darmflora in Abhängig vom TLR-Status geringfügig differiert.

### 3.2.2 Phylogenetische Analyse der Darmflora mittels PCR-RFLP

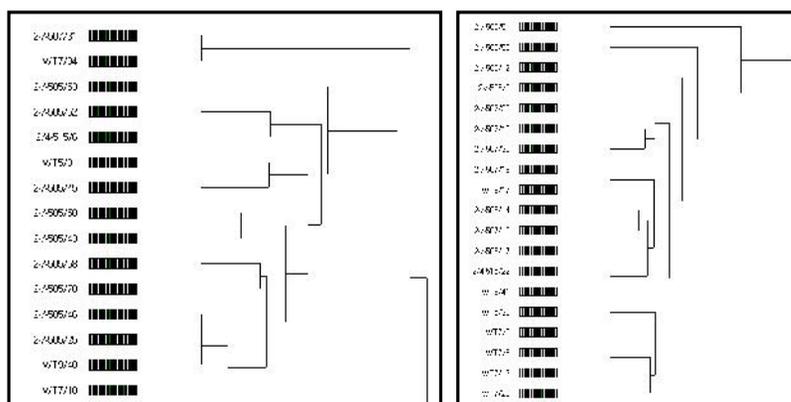
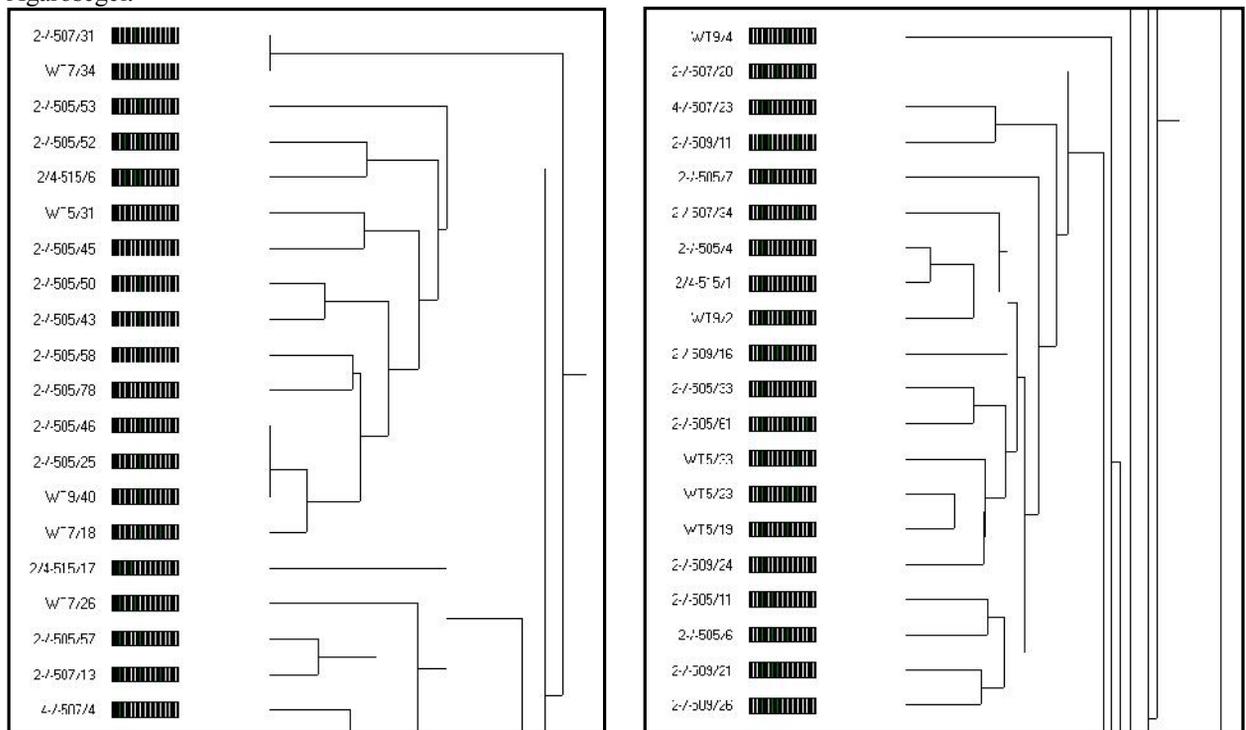
Da die Generierung einer Klonbibliothek extrem zeitaufwendig und kostspielig ist, wurde die von Botstein, White, Skolnick und Davis 1980 beschriebenen Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP) als einfache und zuverlässige Methode gewählt, um zusätzliche Daten zur phylogenetischen Einordnung der mikrobiellen Zusammensetzung der Darmflora für

eine hohe Probenanzahl zu erhalten. Unter Verwendung solcher Fingerprintmethoden ist es möglich, den Grad der Verwandtschaft zwischen Genotypen zu bestimmen. Sie dient dazu, genetische Variation zwischen unterschiedlichen Spezies oder einzelnen Individuen einer Art zu erkennen. Man verdaut dazu eine geeignete DNA-Fraktion verschiedener Organismen mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen und vergleicht die entstehenden Bandenmuster im Gel. Die zugrunde liegende Annahme geht davon aus, dass nah verwandte Organismen beim Einsatz der gleichen Restriktionsenzyme nur wenige Polymorphismen aufweisen. Für die Gesamtauswertung wurde die angelegte Klonbibliothek aus Fäzes-DNA, die aus insgesamt 332 Klonen bestand, herangezogen. Diese setzte sich aus jeweils drei Tieren pro Gruppe zusammen, wobei 81 Klone aus TLR2- sowie TLR4- und 91 aus TLR2/4-defizienten Tieren stammten und 79 Klone von WT-Tieren verwendet wurden. Die 16S rRNA-Gene wurden amplifiziert, kloniert und anschließend analysiert. Die Restriktion der Gene erfolgte mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI*, ursprünglich in *E. coli* und *HaeIII*, in *Haemophilus aegypti* entdeckt. Eine elektrophoretische Auftrennung erfolgte auf einem 2%igen Agarosegel.

Dabei wird vorausgesetzt, dass Banden identischer Größe ähnliche DNA-Fragmente repräsentieren. Aus dem erhaltenen Bandenmuster wurde für eine Ähnlichkeitsanalyse ein Dendrogramm erstellt. Mit Hilfe des Programms Gelscan Professional V5.1 konnte das Dendrogramm sofort aus der Bandenmatrix per Computer erstellt werden (Abb. 15). In Abb. 14 sind lediglich Ausschnitte der Dendogramme dargestellt, doch auch diese machen eine hohe Variabilität der Restriktionsschnittmuster deutlich. Interessanterweise weichen die 16S rRNA-basierten Profile von WT- und TLR-defizienten Tieren kaum voneinander ab, alle Gruppen weisen sehr diverse Cluster auf. So gut wie kein Bandenmuster kommt mehrfach vor. Und wenn dies der Fall war, war es dabei völlig unerheblich, ob diese Klone von einem Wildtyp oder aber einem Knockout Tier stammten. Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass sowohl die Probenanzahl als auch die RFLP-Technik an sich für einen Vergleich zwischen den Gruppen ungeeignet zu sein scheint, sie sollte lediglich als eine qualitative Richtlinie für ein genetisches Fingerprint-Experiment angesehen werden. Eine Schwierigkeit stellen zu geringe Unterschiede in den Bandengrößen dar, die eine zuverlässige Unterscheidung schwierig macht. Unterschiede die zu erkennen sind, sind eher auf individuelle Variabilitäten zurückzuführen als auf eine eindeutige TLR-abhängige Flora. Die ähnlichen Bandenmuster weisen auf eine enge Verwandtschaft zwischen den Spezies hin. 16 große Verzweigungen waren dem Dendrogramm zu entnehmen, von denen sich zwei Hauptzweige verwandtschaftlich weiter entfernt von den anderen einordnen lassen. Proben aus diesen zwei Gruppen stammen ausschließlich aus Wildtyp- sowie aus TLR2-defizienten Tieren (Abb. 15 unten).



**Abb. 14** Agarosegelbilder von RFLP-Fragmenten einiger Klone eines TLR2- sowie eines TLR2/4-defizienten Tieres. Die 16S rRNA-Gene wurden amplifiziert, kloniert und anschließend analysiert. Die Restriktion der Gene erfolgte mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HaeIII*. (A) Klone eines TLR2<sup>-/-</sup>-Tieres (Tier-Nr. 507). (B) Klone eines TLR2/4-defizienten Tieres (Tier-Nr. 515). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte auf einem 2%igen Agarosegel.



**Abb. 15** Ausschnitte des Dendrogramms nach RFLP einer Klonbibliothek von Fäzes-DNA. (3 Tiere pro Gruppe, 81 Klone TLR2<sup>-/-</sup> und TLR4<sup>-/-</sup>, 91 Klone TLR2/4<sup>-/-</sup>, 79 Klone WT. Die Bezeichnung 2-/507/31 in der obersten Zeile links bezeichnet den TLR-Status (TLR2<sup>-/-</sup>), die Tier-Nr. (507) und die Klon-Nr. (31). In der zweiten Spalte sind die Bandenschnittmuster dargestellt. Die letzte Spalte stellt die verwandtschaftlichen Beziehungen dar. Je ähnlicher sich ein Restriktions-

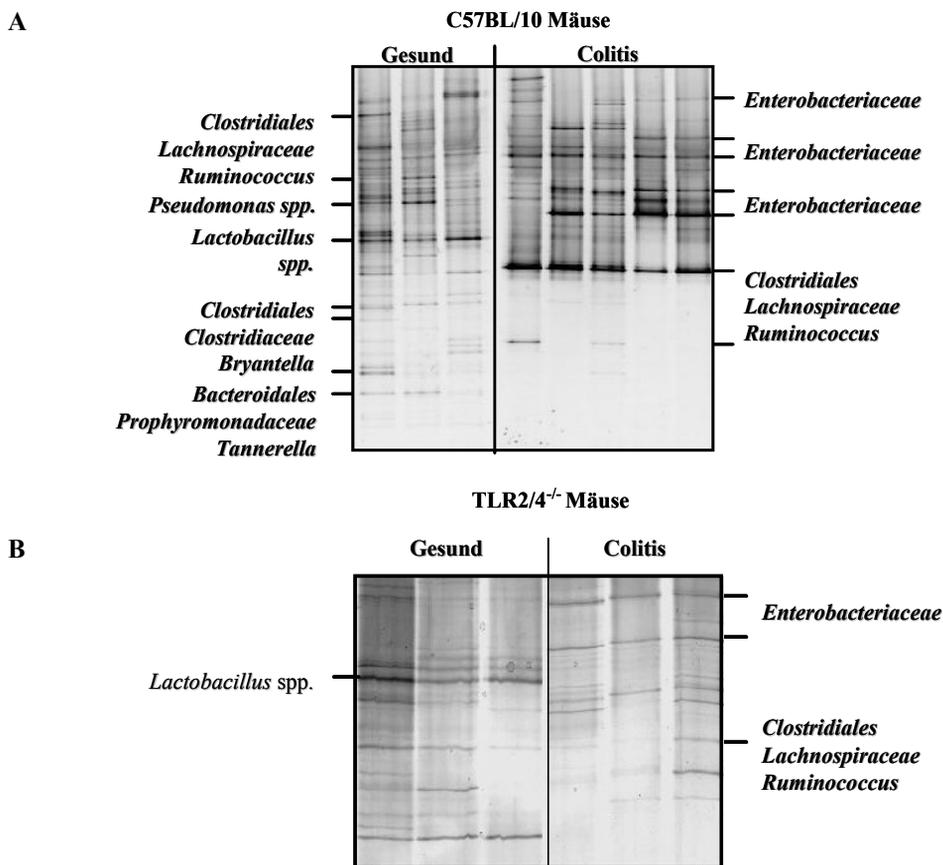
schnittmuster ist, desto weniger Verzweigungen treten auf und umso geringer ist die genetische Differenz zwischen den Spezies. Die beiden Abbildungen unten zeigen die beiden Gruppen, deren Verwandtschaft zu den anderen Spezies am geringsten ist. Bis auf eine Ausnahme befinden sich in diesen Gruppen nur Proben aus WT- bzw. TLR2-defizienten Tieren.

Interessanterweise weichen die 16S rRNA-basierten Profile von WT- und TLR-defizienten Tieren nicht stark voneinander ab, alle Gruppen von Proben zeigen gemischte Cluster auf. Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass sowohl die Anzahl der Klone als auch die RFLP-Technik an sich für einen Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen nicht geeignet ist, sondern lediglich als eine qualitative Richtlinie für ein genetisches Fingerprint angesehen werden sollte. Eine starke interindividuelle Variabilität konnte also auch mit dieser Methode gezeigt werden, wohingegen eine TLR-abhängige Flora ausgeschlossen werden kann.

### **3.3 Charakterisierung der Darmflora im Verlauf der akuten Darmentzündung**

#### **3.3.1 DSS-induzierte Colitis**

Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen resultiert die Zerstörung der Barrierefunktion des Darms aus einer gesteigerten Immunantwort gegen bakterielle Antigene. Die entzündungsverstärkenden Wirkungen der kommensalen Intestinalflora bei Colitis wurde in zahlreichen Experimenten untersucht, genaue Kenntnisse über die Bakterienzusammensetzung während einer Entzündung sind jedoch bisher nicht bekannt. Um Verschiebungen der Darmflora während einer DSS-induzierten Barrierezerstörung zu charakterisieren und solche Bakterien zu entdecken deren Anwesenheit charakteristisch für den Zustand einer Colitis sein könnten, wurde eine globale Analyse der Floren von gesunden und Colitis-kranken C57BL/10 sowie TLR2/4-defizienten Tieren angefertigt. Diese Experimente wurden am Institut für Mikrobiologie und Hygiene von André Fischer und Gernot Reifenberger durchgeführt. Das Monitoring intestinaler Bakteriengemeinschaften mittels DGGE und anschließender Bandensequenzierung zeigte, dass eine akute Colitis mit einer Verschiebung der Flora hin zu Mitgliedern der *Enterobacteriaceae* einhergeht (Abb. 16). Darüber hinaus ist die Bakteriengemeinschaft bei erkrankten Tieren weniger komplex, was auf eine Reduktion der Bakterienvielfalt während einer akuten Entzündung hindeutet. Während bisher nicht-definierte Mitglieder der *Bacteroidales* Gruppe, *Bryantella* spp., *Tannerella* spp., Clostridia und Lactobacilli im entzündeten Colon nicht mehr entdeckt werden konnten, wurden Bakterien der *Clostridiales* Gruppe dort vermehrt detektiert [71].

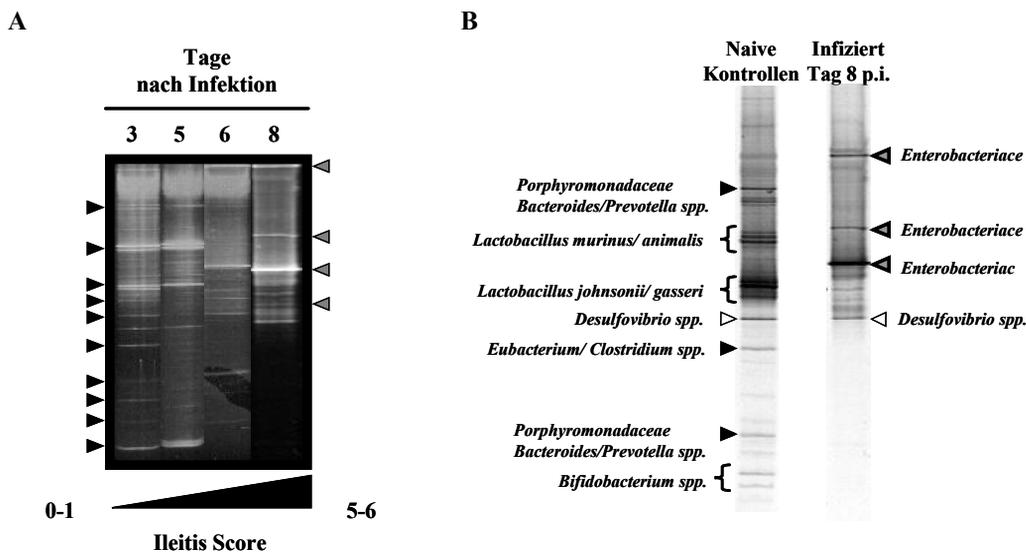


**Abb. 16** Molekulare Analyse dominierender Bakteriengemeinschaften im Dickdarm gesunder und Colitis-erkrankter Mäuse. (A) DGGE Profile der Dickdarmflora in gesunden und kranken Wildtyp Mäusen. Die gezeigten Ergebnisse stehen für C57BL/10 Wildtyp Mäuse ohne DSS-Behandlung sowie für solche nach DSS-Behandlung für sieben Tage. Bakterienspezies wurden durch Sequenzvergleich von 16S rRNA Genfragmenten, die aus DNA repräsentativer Banden amplifiziert wurden, identifiziert. Die DGGE Profile sind repräsentativ für mindestens drei Mäuse pro Gruppe und Experiment. (B) DGGE Profile der Dickdarmflora in gesunden und kranken TLR2/4 defizienten Mäusen. DGGE Profile luminaler intestinaler Bakterien von Wildtyp und TLR2/4-defizienten Mäusen wurden durch PCR-basierte Analyse von Gesamt-DNA aus Dickdarminhalt von Mäusen mit und ohne Colitis an Tag acht nach DSS-Behandlung für sieben Tage generiert. Bakterienspezies wurden durch vergleichende Sequenzanalyse von 16S rRNA Genfragmenten, amplifiziert aus DNA, die aus entsprechenden Banden eluiert wurde identifiziert. Die DGGE Profile sind repräsentativ für mindestens drei Mäuse pro Gruppe und Experiment. (A/B) Für die Amplifikation wurde das Primerpaar GC968F und R1378 [70] verwendet. Die Ergebnisse waren in zwei unabhängigen Experimenten reproduzierbar [72].

### 3.3.2 *Toxoplasma gondii* induzierte Ileitis

Auch das Entzündungsgeschehen während einer Ileitis wird durch Veränderungen der Intestinalflora begleitet, was ebenfalls durch André Fischer und Gernot Reifemberger gezeigt werden konnte. Die Histopathologie des Ileums von *T. gondii* infizierten C57BL/6 Mäusen zeigt eine milde Infektion innerhalb von 3-5 Tagen nach Infektion. Die akute Phase der Infektion an den Tagen 6-8 wurde durch Zellschädigung, eine massive Gewebeerstörung und Nekrose begleitet [70]. Das Monitoring intestinaler Bakteriengemeinschaften mittels PCR-basierter DGGE-Analyse zeigte, dass die akute Phase einer Infektion mit einer Reduktion der

Bakterienvielfalt (Abb. 17 A) sowie einer Verschiebung in Richtung *Enterobacteriaceae* einherging (Abb. 17 B). Sequenzanalysen von 16S rRNA Genfragmenten aus DGGE-Banden ergaben, dass *Lactobacilli*, *Bifidobacteria* ebenso wie *Clostridia* und bisher nicht-charakterisierte *Bacteroidetes/Prevotella* Spezies der *Porphyromonadaceae* Familie, welche bei den gesunden Tieren dominierten, im entzündeten Zustand nicht mehr nachgewiesen werden konnten (Abb. 17 B).



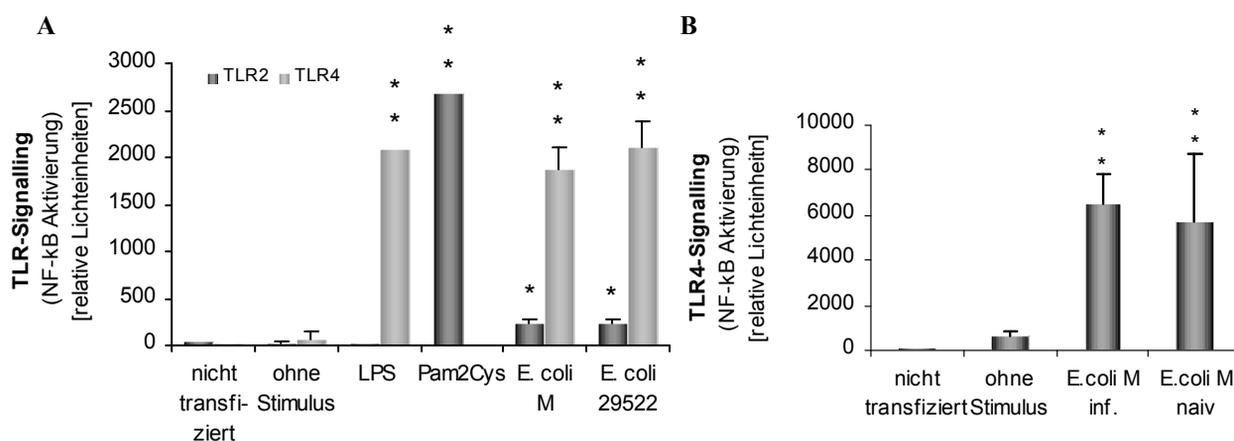
**Abb. 17** Monitoring von Veränderungen der Darmflora während einer Dünndarmentzündung mittels DGGE. (A) Populationsveränderungen der Florenzusammensetzung während einer Dünndarmentzündung innerhalb von acht Tagen. Genetische Fingerprints der Dünndarmflora wurden mittels DGGE-Analyse generiert und bakterielle 16S rRNA Gene aus Gesamt-DNA, die aus Dünndarminhalt von Mäusen 3, 5, 6 und 8 Tage nach *T. gondii* Infektion isoliert wurde, amplifiziert. Der dazugehörige histopathologische Score, der die Schädigung des Darmgewebes angibt und von 0 bis 6 zunimmt, ist jeweils darunter angegeben. Die schwarzen und grauen Pfeile geben Banden/Spezies an, die während der Ileitis verschwinden bzw. hinzukommen. Die Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei Mäuse pro Gruppe und Experiment. Die Ergebnisse wurden in zwei unabhängigen Experimenten erzielt. (B) Bakteriengruppen im Dünndarm von naiven, gesunden und *T. gondii* infizierten Mäusen. Genetische Fingerprints der Dünndarmflora wurden mittels DGGE bakterieller 16S rRNA Gene erstellt. Die Amplikons wurden mit Hilfe der DGGE separiert, entsprechende Banden aus dem Gel geschnitten und sequenziert. Taxonomische Übereinstimmungen von 16S rRNA Genen zu Datenbankeinträgen sind mit entsprechenden Markierungen angegeben, wobei diese ebenfalls für solche Banden stehen, die während des Entzündungsprozesses verschwinden oder hinzukommen. Die Pfeile mit weißer Füllung stehen für Bakteriengruppen deren Anwesenheit sich durch eine Dünndarmentzündung nicht verändert. DNA weiterer nicht-markierter Banden konnte aus den entsprechenden Gelstücken nicht reamplifiziert werden. Die DGGE Profile sind repräsentativ für mindestens drei Mäuse pro Gruppe [70].

Die Verschiebung der Floren im entzündeten Zustand hin zur Familie der *Enterobacteriaceae* (96,6%) und *Bacteroidetes* spp. (3,4%) [70] macht deutlich, warum bei den nachfolgenden Stimulationsexperimenten der Schwerpunkt auf Bakterien dieser Spezies gelegt wurde und deren Einfluss auf das Entzündungsgeschehen genauer charakterisiert werden sollte.

### 3.4 Zellkulturexperimente

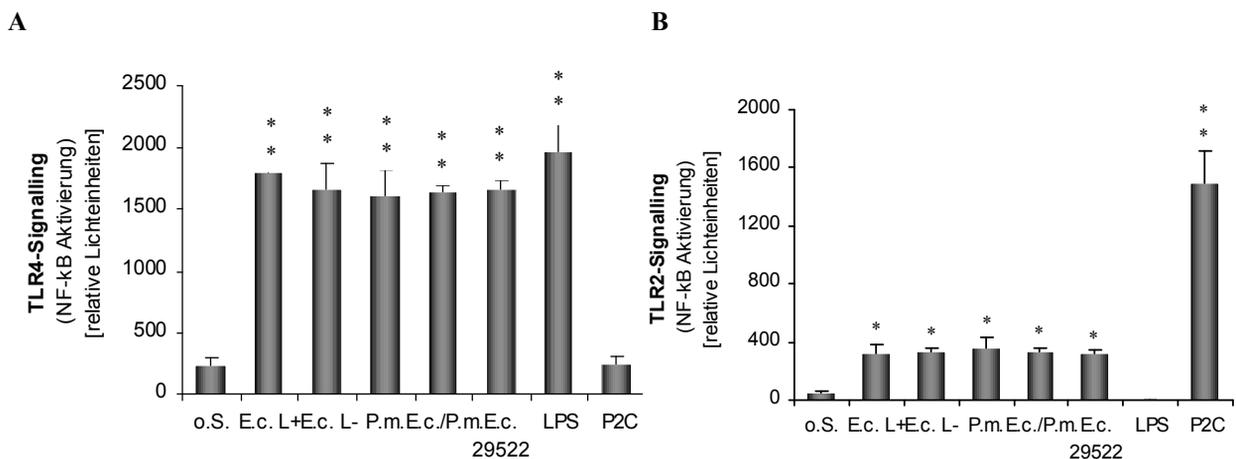
#### 3.4.1 Interaktion isolierter *E. coli* Stämme mit TLR4 und TLR2 *in-vitro*

Das pro-inflammatorische Potential von *E. coli* M, einem *E. coli* Stamm aus dem entzündeten Ileum der Maus, sollte ebenso wie dasjenige anderer kommensaler Darmbewohner *in-vitro* untersucht werden. Um zu überprüfen, ob und ggf. mit welchen TLRs Darmbakterien, die im entzündeten Maudarm akkumulieren, interagieren, wurde die Aktivierung von stabil transfizierten CD14/HEK293 Zellen nach Stimulation mit hitzeinaktivierten Bakterien sowie definierten TLR-Agonisten gemessen. Die Zellen wurden mit jeweils einem Gen für den humanen TLR2, TLR4 bzw. für TLR2 und 4 parallel sowie mit dem Plasmid für humanes MD-2 und weiteren Plasmiden, wie unter 2.2.8 beschrieben, transfiziert und nach Stimulation mit definierten Bakterien die Aktivierung von NF- $\kappa$ B mit Hilfe eines Luziferase-Reporterkonstruktes gemessen. Die TLRs wurden konstitutiv unter einem CMV-Promotor exprimiert und deren Expression funktionell mittels Stimulation mit bekannten Agonisten der jeweiligen TLRs überprüft. Da bei der experimentellen Darmentzündung in unserem Ileitis-Mausmodell bei den *T. gondii* infizierten Mäusen in erster Linie Bakterien aus der Familie der *Enterobacteriaceae*n sowohl in den TLR-defizienten, als auch in den Wildtyp-Vergleichstieren mit Entzündungsherden assoziiert waren (Abb. 16 und Abb. 17) [71], sollten Bakterien wie *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* aber auch *Bacteroides* spp. mit Hilfe verschiedener Zellkultur-Systeme bezüglich ihrer Stimulationsfähigkeit und TLR-Interaktion untersucht werden. Die Verwendbarkeit des HEK293 *in-vitro* Systems wurde durch Stimulation von TLR2- bzw. TLR4-überexprimierenden Zellen mit den jeweils TLR-spezifischen Liganden LPS (TLR4) und Pam2Cys (TLR2) sowie durch Stimulation mit *E. coli* M aus dem entzündeten Maus-Ileum und dem *E. coli* Referenzstamm ATCC 29522 (Abb. 18 A) überprüft. Als Kontrollen dienten Zellen, die nicht transfiziert worden waren und solche, die zwar transfiziert, jedoch nicht stimuliert wurden. Bei der Aktivierung von NF- $\kappa$ B über das TLR-Signalling durch reines LPS bzw. Pam2Cys ist ausschließlich einer der beiden Rezeptoren beteiligt. Beim Signalling durch Stimulierung mit *E. coli* dagegen sind beide Rezeptoren beteiligt, wobei die Rolle von TLR2 eine wesentlich geringere spielt als die von TLR4. Darüber hinaus sind *E. coli* aus naiven Tieren genauso dazu in der Lage eine Entzündung über den Anstieg von NF- $\kappa$ B zu initiieren, wie solche aus dem entzündeten Ileum der Maus, was dafür spricht, dass Pathogenitätsfaktoren bei diesem Prozess keine Rolle spielen.



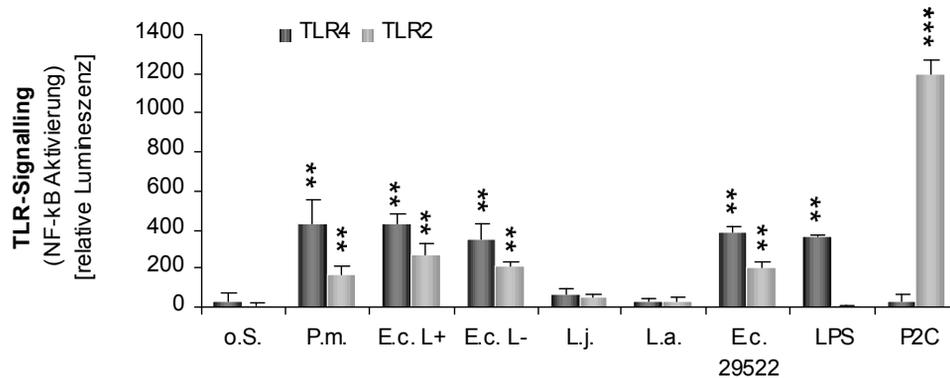
**Abb. 18** TLR-Signalling in HEK293 Zellen. Die x-Achse zeigt an womit die Zellen stimuliert wurden, die y-Achse gibt Auskunft über die gemessene NF-κB Aktivierung in Form der relativen Lichteinheiten. Mit welchem Rezeptor die Zellen jeweils transfiziert wurde, ist über die Farbe der Balken angegeben. (A) Signalling über TLR2 (HEK-WT) bzw. über TLR4 (HEK-CD14) durch hitzeinaktivierte *E. coli* M ( $OD_{0,6}$ ) aus dem Ileum der Maus und einem *E. coli* Referenzstamm (ATCC 29522) sowie den spezifischen TLR-Liganden LPS und Pam2Cys. Als zusätzliche Kontrollen dienten nicht transfizierte sowie nicht-stimulierte HEK293 Zellen. *E. coli* aus fünf Tieren fanden Einsatz. Es erfolgten Dreifachbestimmungen, aus denen Mittelwerte bestimmt und die entsprechenden Standardabweichungen berechnet wurden. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und führte zu gleichen Ergebnissen. (B) TLR4-Signalling durch *E. coli* M aus dem Ileum *Toxoplasma gondii* infizierter und naiver Tiere, in stabil transfizierten CD14/HEK293 Zellen. Die Bakterien-OD betrug jeweils 0,5. Vor der Verwendung wurden die Zellen hitzeinaktiviert. Die Stimulation erfolgte für 20 Stunden. *E. coli* aus infizierten Tieren wurden von drei Mäusen gepoolt und es erfolgten Dreifachbestimmungen. *E. coli* aus naiven Tieren wurden von sechs Mäusen gepoolt und es wurden ebenfalls Dreifachbestimmungen durchgeführt. Jeder Balken repräsentiert die Mittelwerte von Doppelbestimmungen. Standardabweichungen und Signifikanzen, durch Vergleich mit nicht-stimulierten Zellen, wurden mit dem Student's t-test ermittelt (\*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ).

Der Vergleich der Stimulationsfähigkeit Laktose-positiver und -negativer *E. coli*-Bakterien aus dem Ileum der Versuchstiere sowie der Kostimulation von *E. coli* mit den Gram-negativen Enterobacteriaceae *Proteus mirabilis*, welche ebenso wie *E. coli* zur kommensalen Darmflora zählen, wurde anhand des Luciferase-Signals gemessen, welches durch die NF-κB Aktivierung als letzter Schritt einer Signaltransduktionskette zustande kommt. Ob für die Signalweiterleitung Gram-positiver bzw. -negativer Bakterien unterschiedliche Signalwege zum Einsatz kommen, also ob der Rezeptorkomplex TLR4/CD14/MD-2 oder lediglich TLR2 erforderlich ist oder ob sich der Signalweg ändert, sobald eine Mehrfachstimulation stattfindet, sollte hier ermittelt werden. Wie aus Abb. 19 deutlich hervorgeht, kommt es bei allen Gram-negativen Bakterien zu einer starken NF-κB Aktivierung über TLR4 (A) sowie einer schwachen über TLR2 (B). In TLR4 transfizierten HEK293 Zellen führt die Stimulation mit dem TLR2 Liganden Pam2Cys zu einer vernachlässigbaren NF-κB Aktivierung über TLR4, wohingegen die Stimulation in TLR2 transfizierten Zellen ein starkes Signal hervorruft. Gleiches gilt für LPS, den spezifischen TLR4 Liganden in umgekehrtem Maße.



**Abb. 19** Interaktion von *E. coli* und *P. mirabilis* Isolaten aus dem entzündeten Maus-Ileum mit TLRs *in-vitro* in HEK293 Zellen. (A) Kommensale *E. coli* der Maus aktivieren NF-κB über TLR4. CD14 stabil transfizierte humane embryonale Nierenzellen (HEK293), transient transfiziert mit humanem TLR4 und MD-2, wurden mit reinem LPS, Pam2Cys, *E. coli* und *P. mirabilis* (aus dem entzündeten Maus-Ileum) oder dem *E. coli* Referenzstamm ATCC 29522 inkubiert. Die x-Achse zeigt an womit die Zellen stimuliert wurden, die y-Achse gibt Auskunft über die gemessene NF-κB Aktivierung in Form der relativen Lichteinheiten. (B) *E. coli* verursacht eine geringere NF-κB Aktivierung über TLR2. HEK293 Zellen wurden mit dem humanen TLR2 transient transfiziert und mit dem TLR2-Liganden Pam2Cys und weiteren Liganden, wie unter A beschrieben, inkubiert. Jeder Balken repräsentiert die Mittelwerte von Doppelbestimmungen. Standardabweichungen und Signifikanzen, durch Vergleich mit nicht-stimulierten Zellen, wurden mit dem Student's t-test ermittelt (\*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ). Ähnliche Ergebnisse wurden für die Stimulierung mit acht weiteren *E. coli*- und fünf weiteren *P. mirabilis*-Stämmen, isoliert aus dem entzündeten Maus Ileum, erzielt (hier nicht gezeigt). O.S. (ohne Stimulus), E.c. L+/- (*E. coli*, Laktose positiv/negativ), P.m. (*Proteus mirabilis*), E.c. 29522 (*E. coli* Referenzstamm ATCC 29522), LPS (Lipopolysaccharid; Re 595), P2C (Pam2Cys). Alle Bakterien wurden hitzeinaktiviert und mit einer OD von 1 eingesetzt.

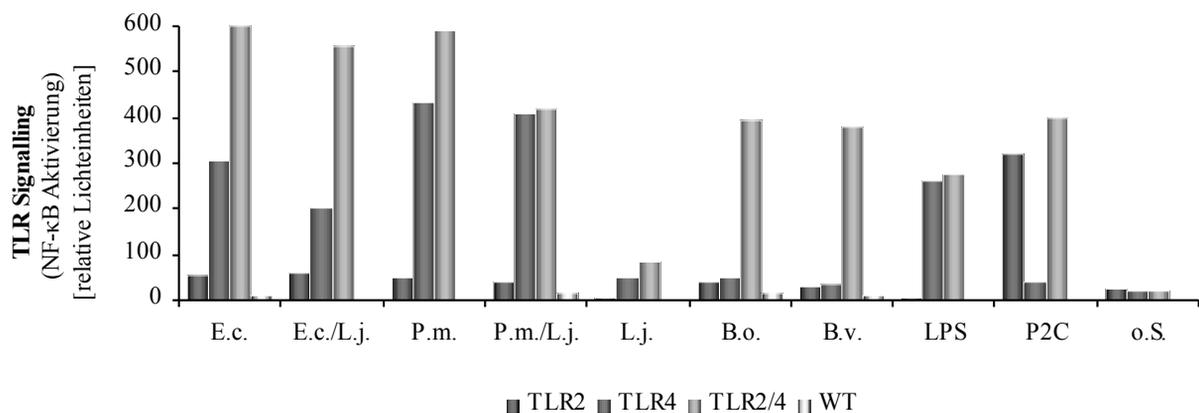
Die TLR2- sowie TLR4-Rezeptorbeteiligung bei der Signalweiterleitung in transient transfizierten HEK293 Zellen, durch die Stimulation mit Gram-positiven *Lactobacillus* spp. im Vergleich zu Gram-negativen Bakterien wie *E. coli* oder *P. mirabilis* ist in Abb. 20 dargestellt. *P. mirabilis* und *E. coli* (Laktose-positiv und -negativ) sowie der *E. coli* Referenzstamm lösen eine NF-κB-Aktivierung über TLR4 und ein etwa halb so starkes Signal über TLR2 aus, reines LPS bedient sich lediglich der TLR4-basierten Signalweiterleitung, während Pam2Cys fast ausschließlich die TLR2-Signaltransduktion nutzt. *Lactobacillus* spp., die einen Grossteil der kultivierbaren kommensalen Darmflora ausmachen und von denen man aufgrund ihrer Gram-positiven Zellwand ein Signal über TLR2 erwartet hätte, aktiviert NF-κB weder über TLR2 noch über TLR4, das zu messende Signal entspricht in etwa dem der nicht stimulierten Zellen. Ob also *Lactobacillus* für ihre Signalweiterleitung zusätzlich zu dem Rezeptor TLR2 weitere Corezeptoren wie beispielsweise MD-2 benötigt, welches *in-vivo* zur Verfügung stehen würden, müsste in weiteren Experimenten untersucht werden.



**Abb. 20** In transient transfizierten HEK293 Zellen, die entweder mit den Plasmiden für TLR2 oder mit den Plasmiden für den Rezeptorkomplex TLR4/CD14/MD-2 transfiziert wurden, wurde die NF- $\kappa$ B Aktivierung durch Stimulation mit Gram-positiven sowie Gram-negativen Bakterien, über die relative Lumineszenz gemessen. Die x-Achse zeigt an womit die Zellen stimuliert wurden, die y-Achse gibt Auskunft über die gemessene NF- $\kappa$ B Aktivierung in Form der relativen Lichteinheiten. Mit welchem Rezeptor die Zellen jeweils transfiziert wurden, ist über die Farbe der Balken angegeben. Zum Einsatz kamen die hier aufgeführten Bakterienspezies sowie Rezeptor-spezifische Kontrollsubstanzen, o.S. bedeutet ohne Stimulus. P.m. (*Proteus mirabilis*, n=6), E.c. L+/- (*E. coli*, Laktose positiv (n=7), negativ (n=2)), L.j. (*Lactobacillus johnsonii*; DSM 10533), L.a. (*Lactobacillus acidophilus*; DSM 20079), E.c. 29522 (*E. coli* Referenzstamm ATCC 29522), LPS (Lipopolysaccharid; Re 595), P2C (Pam2Cys). Alle Bakterien wurden hitzeinaktiviert und mit einer OD von 1 eingesetzt. Umrechnung der Transformationseffizienzen und Einbeziehung in die Luciferase-Werte. Es erfolgten jeweils Dreifachbestimmungen von denen Mittelwerte und SD+/- bestimmt wurden. Das Experiment führte in drei unabhängigen Untersuchungen zu den gleichen Ergebnissen. Signifikanzen wurden durch Vergleich mit nicht-stimulierten Zellen, mit dem Student's t-test ermittelt (\*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ ).

In einem weiteren Experiment wurden stabil transfizierte CD14/HEK293 Zellen zum einen wie zuvor beschrieben separat mit den Plasmiden für TLR2 bzw. TLR4/MD-2 sowie den in Abschnitt 2.2.8 beschriebenen Kontrollplasmiden transient transfiziert und zum anderen mit allen Plasmiden in derselben Zelle, so dass diese anschließend sowohl TLR2, als auch TLR4 und die dazugehörigen Corezeptoren exprimierten. Durch die Anwesenheit beider TLRs sowie der beiden Corezeptoren CD14 und MD-2 sollte über die Beteiligung der Rezeptoren an einer Signalweiterleitung hinaus die Bedeutung der Corezeptoren für diesen Mechanismus überprüft werden. Nachdem eine 50-80%ige Konfluenz der Zellen erreicht war, wurden diese mit hitzeinaktivierten Bakterien einzeln oder ko-inkubiert und das TLR-Signal nach 24 Stunden Inkubationszeit über die NF- $\kappa$ B Aktivierung anhand der Lumineszenz gemessen. In den Wildtyp HEK293 Zellen, die über keinen der Rezeptoren verfügen, konnte keine NF- $\kappa$ B Aktivierung gemessen werden. Bei Stimulation mit Gram-negativen Bakterien wie *E. coli* und *P. mirabilis* konnte das üblicherweise über TLR4 vermittelte Signal durch die zusätzliche Anwesenheit von TLR2 noch verstärkt werden, wohingegen für eine Signalweiterleitung durch Stimulation mit den Gram-positiven Bakterien *Bacteroides ovatus* oder *Bacteroides vulgatus* das Vorhandensein beider Rezeptoren sowie aller Corezeptoren erforderlich war. Gleiches gilt für *L. johnsonii*, auch diese Gram-positiven Bakterien vermittelten lediglich eine geringe NF- $\kappa$ B Aktivierung in

Anwesenheit beider TLRs sowie aller Corezeptoren. Eine NF- $\kappa$ B Aktivierung durch Stimulation mit LPS war sowohl in Anwesenheit von TLR4 als auch TLR2/4 zu verzeichnen, während dies durch Stimulation mit Pam2Cys in Anwesenheit von TLR2 bzw. TLR2/4 der Fall war (Abb. 21).



**Abb. 21** NF- $\kappa$ B Aktivierung über TLR2, TLR4 und TLR2/4 im Vergleich zum HEK293 Wildtyp (ohne TLR), durch Stimulation mit den im Folgenden aufgeführten Gram-positiven und -negativen Bakterien bzw. Rezeptorspezifischen Kontrollsubstanzen. Die x-Achse zeigt an womit die Zellen stimuliert wurden, die y-Achse gibt Auskunft über die gemessene NF- $\kappa$ B Aktivierung in Form der relativen Lichteinheiten. Mit welchem Rezeptor die Zellen jeweils transfiziert wurden, ist über die Farbe der Balken angegeben. O.S. steht für ohne Stimulus. E.c. (*E. coli*), L.j. (*Lactobacillus johnsonii*; DSM 10533), P.m. (*Proteus mirabilis*), B.o. (*Bacteroides ovatus*), B.v. (*Bacteroides vulgatus*), LPS (Lipopolysaccharid; Re 595), P2C (Pam2Cys). Signalling via TLRs. Alle Bakterien wurden hitzeinaktiviert und mit einer OD von 1 eingesetzt. Umrechnung der Transformationseffizienzen und Einbeziehung in die Luciferase-Werte.

### 3.4.2 Konstitutionelle und induzierbare NO- und TNF- $\alpha$ -Synthese

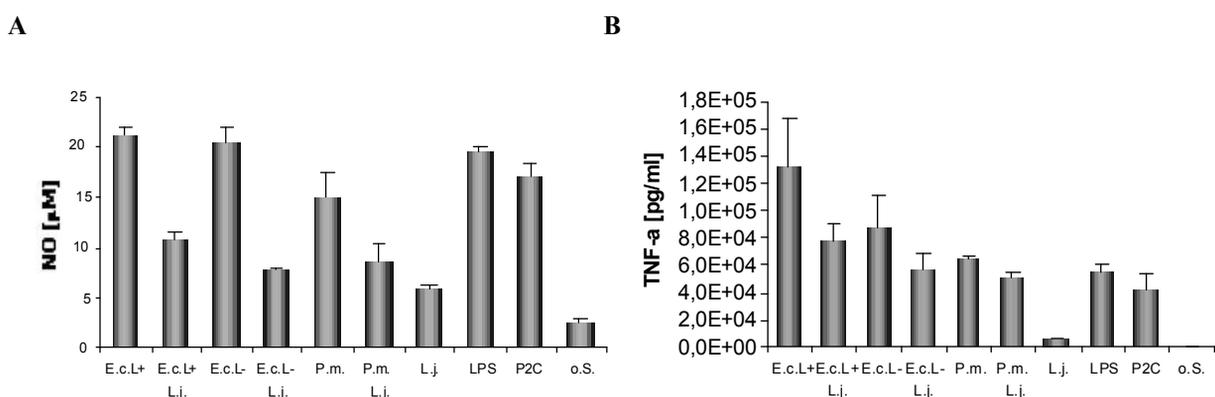
Da sich durch die Ergebnisse mit den transfizierten HEK293 Zellen eine TLR2- und TLR4-vermittelte Aktivierung der untersuchten Zellen durch hitzeinaktivierte Bakterien zeigte galt es, diese weiter zu untersuchen und in einem für die Immunantwort relevanten Zelltyp zu verifizieren. Da das Transfektionssystem der HEK293 Zellen nur ein künstlich geschaffenes System darstellt, sollte im nächsten Schritt ein System etabliert werden, welches der *in-vivo* Situation eher entspricht. Da HEK293 Zellen von sich aus keine TLRs exprimieren, wurden im nächsten Schritt Zellen untersucht, die natürlicherweise alle bekannten TLRs exprimieren.

Hierdurch war es möglich, die Interaktion von Bakterien und TLRs in ihrem natürlichen Zusammenhang zu untersuchen. Verwendet wurde hierzu zunächst die Makrophagen-ähnliche Zelllinie RAW264.7 und später murine Peritonealmakrophagen. Um die Aktivierung dieser Zellen darzustellen, wurde die Expression von Immunmediatoren in den Zellkulturüberständen mit entsprechendem Antikörpernachweissystem detektiert.

Stickstoffmonoxid (NO) wird von einer Vielzahl von Immunzellen wie Makrophagen, neutrophilen Granulozyten oder Thrombozyten synthetisiert. Makrophagen exprimieren normalerweise keine NO-Synthase. Werden diese aber durch Zytokine wie TNF- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$

aktiviert, induzieren diese iNOS (*cytokine inducible NO-Synthase*), so dass antimikrobiell wirkendes NO produziert wird. Es wird also deutlich warum an dieser Stelle nach der NO-Synthese vorerst in der Makrophagen-ähnlichen Zelllinie RAW264.7 geguckt wird, nachdem diese mit unterschiedlichen Darm-assoziierten Bakterien stimuliert wurden.

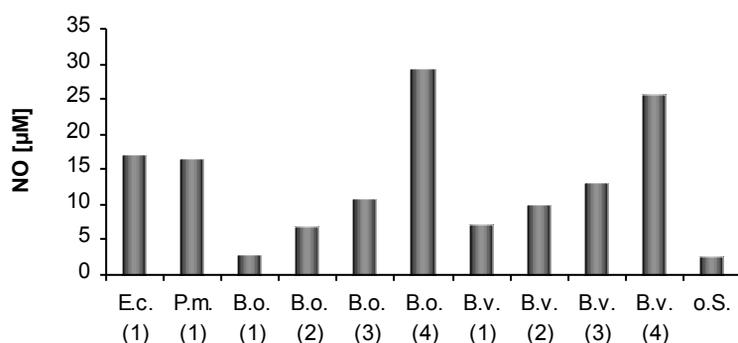
Auch das pro-inflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$  nimmt bei der Abwehrreaktion des Körpers eine wichtige Rolle ein. Es gehört zu den Substanzen, die eine Entzündungsreaktion im Körper auslösen oder verstärken, indem es B- und T-Zellen aktiviert, Granulozyten und Makrophagen rekrutiert, Tumorzellen zerstört und als endogenes Pyrogen wirkt. Bei chronischen Entzündungen kommt TNF- $\alpha$  in großen Mengen vor. Durch die andauernde Entzündung entwickeln sich im Laufe der Zeit zunehmend Gewebeschäden. Um die Fähigkeit bestimmter Bakterien eine Zytokinexpression zu verstärken *in-vitro* untersuchen zu können, wurden Zellen der Linie RAW264.7 für 24 Stunden mit hitzeinaktivierten Darmbakterien inkubiert und die Synthese von NO sowie TNF $\alpha$  in den Kulturüberständen gemessen (Abb. 22). Ob dem Gram-positiven Bakterium *Lactobacillus johnsonii* ein probiotisches Potential zugesprochen werden kann, sollte anhand einer Kostimulation untersucht werden. Dazu wurden die RAW264.7 Zellen zusätzlich zu den Gram-negativen Bakterien *E. coli* oder *P. mirabilis* mit dem Gram-positiven Bakterium *L. johnsonii* stimuliert und die NO- und TNF- $\alpha$  Ausschüttung in den Kulturüberständen gemessen. Wie in Abb. 22 A zu sehen ist, konnte die NO-Ausschüttung dadurch nahezu halbiert werden. Auch die TNF- $\alpha$  Synthese verändert sich durch Kostimulation, wenn auch nicht so ausgeprägt wie bei der NO-Synthese. Der protektive Einfluss von *L. johnsonii* scheint hier demnach nicht ganz so ausgeprägt zu sein (Abb. 22 B).



**Abb. 22** (A) NO- und (B) TNF- $\alpha$ -Messung in Überständen aus 24 Stunden stimulierten RAW264.7 Maus Makrophagen. Bei den Kostimulationen mit *L. johnsonii* wurden diese in 10-fachem Überschuss dazugegeben. E.c. L<sup>+/-</sup> (*Escherichia coli* Laktose-positiv/negativ), P.m. (*Proteus mirabilis*), L.a. (*Lactobacillus acidophilus*, DSM 20079), L.j. (*Lactobacillus johnsonii*, DSM 10533), B.o. (*Bacteroides ovatus*, DSMZ 1869), B.v. (*Bacteroides vulgatus*, DSMZ 1447), LPS (Lipopolysaccharid, Re 595), P2C (Pam2Cys), o.S. (ohne Stimulus). *E. coli*- und *Proteus*-Stämme stammen aus dem terminalen Ileum von Toxoplasmen-infizierten TLR2/4 KO-Mäusen an Tag acht post Infektion. Das Experiment wurde mehrmals wiederholt wobei die Messungen jeweils zu den gleichen Ergebnissen führten. Eingesetzte Verdünnungen und Konzentrationen: E.c. L<sup>+</sup> (1:10), E.c. L<sup>+</sup> + L.j. (x9), E.c. L<sup>-</sup>

(1:10), E.c. L + L.j. (x9), P.m. (1:10), P.m. + L.j. (x9), L.a. (1:2,2), L.j. (1:2,2), B.o. (1:2,2), B.v. (1:2,2), LPS (100 ng), Pam2Cys (100 ng).

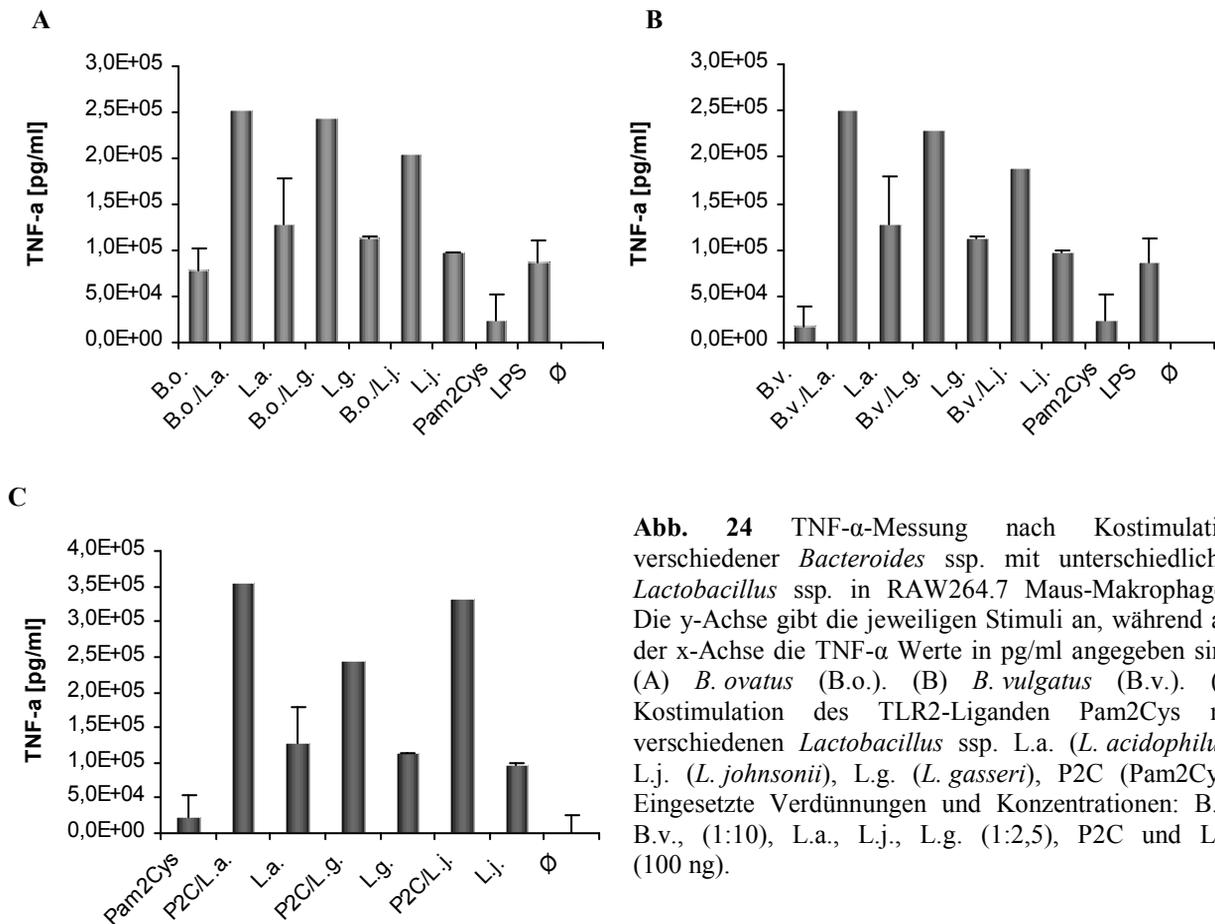
Da auch *Bacteroides* ssp. zu den kommensalen Darmbakterien zählen, wurde im nachfolgenden Experiment die Stimulationsfähigkeit von *B. ovatus* sowie *B. vulgatus* in unterschiedlichen Konzentrationen im Vergleich zu *E. coli* und *P. mirabilis* durch die Messung von NO in Kulturüberständen von RAW264.7 Maus-Makrophagen gemessen. Die Ergebnisse lassen Rückschlüsse auf die Bedeutung von *Bacteroides* ssp. beim Ausbruch und der Erhaltung entzündlicher Darmerkrankungen zu. Auch wenn *Bacteroides* ssp. ebenso wie *E. coli* und *P. mirabilis* mit Entzündungsherden Ileitis-erkrankter Tiere assoziiert sind [71] scheinen sie einen weitaus geringeren Einfluss auf das Entzündungsgeschehen zu haben. Dies lässt sich zumindest vermuten, da im Rahmen des beschriebenen *in-vitro* Experiments die *Bacteroides* ssp. in einem drei- bis vierfachen Überschuss gegenüber den *E. coli* vorhanden sein mussten um eine ähnlich hohe NO-Ausschüttung zu verursachen (Abb. 23).



**Abb. 23** NO-Expression in RAW264.7 Makrophagen nach 24-stündiger Stimulation mit den unten angegebenen Bakterien. Auf der x-Achse sind die Stimuli in den jeweiligen Konzentrationen angegeben. Die y-Achse zeigt die NO-Werte in µM an. E.c. (*E. coli*), P.m. (*P. mirabilis*), B.o. (*B. ovatus*, DSMZ 1869), B.v. (*B. vulgatus*, DSMZ 1447), o.S. (ohne Stimulus). (1) = 1:8, (2) = 1:4, (3) = 1:2,6, (4) = 1:2. Alle Bakterien wurden hitzeinaktiviert und mit einer OD von 1 eingesetzt.

Wie bei der oben beschriebenen Kostimulation von *E. coli* und *L. johnsonii* sollte nun auch der Einfluss der Kostimulation mit den *Bacteroides* ssp. *B. ovatus*, *B. vulgatus* und *B. thetaiotaomicron* mit verschiedenen *Lactobacillus* ssp. auf die TNF- $\alpha$  Synthese untersucht werden. Zum Einsatz kamen hier zusätzlich zu *L. johnsonii* die *Lactobacillus* ssp. *L. acidophilus* und *L. gasseri*. Im Gegensatz zu den vorhergehenden Kostimulationsexperimenten von *E. coli* bzw. *P. mirabilis* und *Lactobacillus* ssp., bei denen sich die NO- bzw. TNF- $\alpha$  Ausschüttung durch Kostimulation etwa halbieren ließ, führte eine Kostimulation mit *Bacteroides* ssp. zu einer gesteigerten TNF- $\alpha$  Synthese, unabhängig davon welche *Bacteroides* ssp. oder *Lactobacillus* ssp. koinkubiert wurden (Abb. 24). Zur Kontrolle, welcher Rezeptor an diesem Phänomen ursächlich beteiligt sein könnte, wurden die Zellen auch mit dem spezifischen TLR2-Liganden Pam2Cys und Laktobazillen koinkubiert. Dem Ergebnis nach zu urteilen werden von *Bacteroides* und *Lactobacillus* ssp. zusätzlich zum bisher bekannten TLR2-Signalling weitere jeweils

unterschiedliche Signalwege in Anspruch genommen, die dann durch Kostimulation additiv zu einer noch höheren TNF- $\alpha$  Synthese führen.

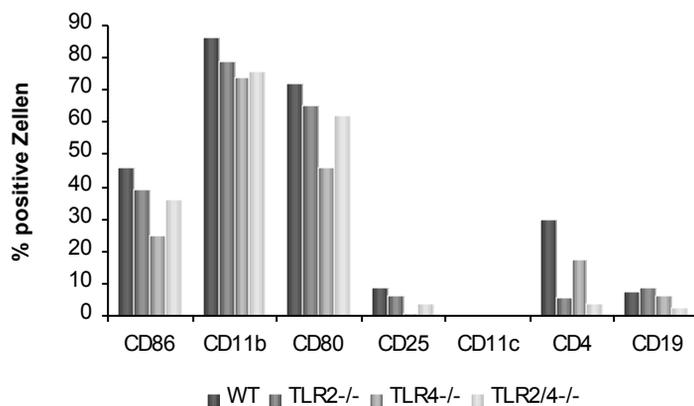


**Abb. 24** TNF- $\alpha$ -Messung nach Kostimulation verschiedener *Bacteroides* ssp. mit unterschiedlichen *Lactobacillus* ssp. in RAW264.7 Maus-Makrophagen. Die y-Achse gibt die jeweiligen Stimuli an, während auf der x-Achse die TNF- $\alpha$  Werte in pg/ml angegeben sind. (A) *B. ovatus* (B.o.). (B) *B. vulgatus* (B.v.). (C) Kostimulation des TLR2-Liganden Pam2Cys mit verschiedenen *Lactobacillus* ssp. L.a. (*L. acidophilus*), L.j. (*L. johnsonii*), L.g. (*L. gasseri*), P2C (Pam2Cys). Eingesetzte Verdünnungen und Konzentrationen: B.o., B.v., (1:10), L.a., L.j., L.g. (1:2,5), P2C und LPS (100 ng).

### 3.4.3 Charakterisierung von Maus-Peritonealmakrophagen anhand von Oberflächenmarkern

Um die in den vorangestellten Experimenten erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren, sollten in einem nächsten Schritt Peritonealmakrophagen, die aus der Maus isoliert wurden, untersucht werden. Dazu sollten diese zunächst als solche charakterisiert werden. Sie gehören zu den klassischen Antigen-präsentierenden Zellen, ebenso wie DCs und B-Zellen. Dazu wurden die Zellen wie in Abschnitt 2.2.9.2 beschrieben gewonnen, entsprechend aufgearbeitet, mit anti-Maus FACS-Antikörpern gefärbt und durchflußzytometrisch untersucht. Wie in Abb. 25 zu erkennen, zeichnen sich alle Zellen durch eine starke MHC-II Expression sowie durch die Anwesenheit der kostimulatorischen Moleküle CD80 sowie CD86 aus und besitzen somit die Fähigkeit CD4<sup>+</sup> T-Zellen effektiv zu aktivieren. Das es sich bei den durch Thioglycolatinjektion angereicherten und aus dem Peritoneum gewonnenen Zellen auch wirklich ausschließlich um Makrophagen handelt, ist anhand der Negativergebnisse für den B-Zellmarker CD19 sowie den

CD11c-Marker für unreife DCs zu erkennen. Der Aktivierungsmarker CD25 ist auf aktivierten Makrophagen und B-Zellen nur moderat vorhanden und wird von T-Zellen nur im aktivierten Zustand überexprimiert. Der für Makrophagen typische Marker CD11b war auf nahezu 80-90% der Zellen vorzufinden, ebenso wie die kostimulatorischen Moleküle CD80 (50-75%) und CD86 (25-45%).



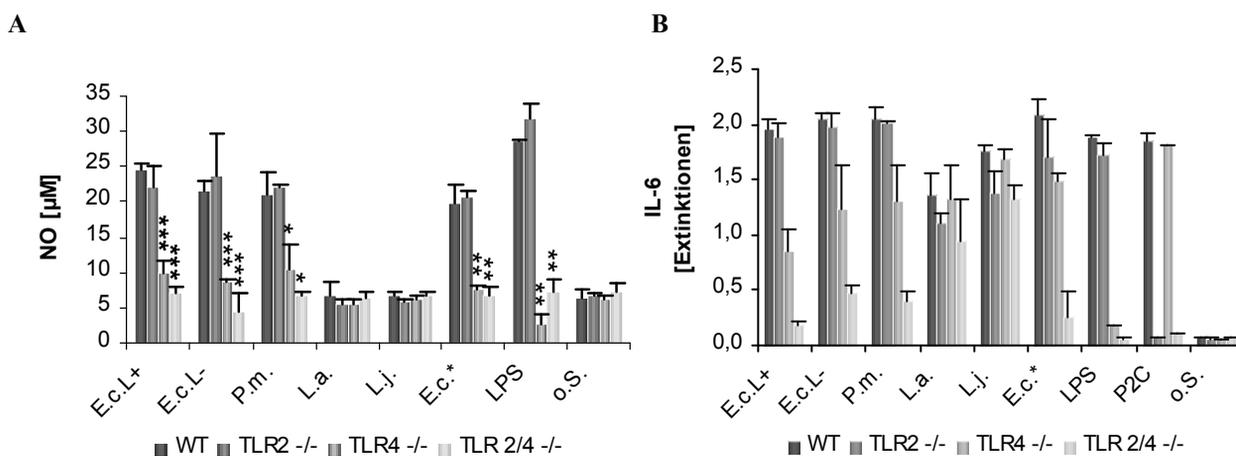
**Abb. 25** Durchflusszytometrische Bestimmung der Oberflächenrezeptoren CD86, CD11b, CD80, CD25, CD11c, CD4 und CD19 auf murinen Peritonealmakrophagen von WT-Tieren und TLR2-, TLR4- sowie TLR2/4-defizienten Tieren. Um die Makrophagen zuvor im Peritoneum anzureichern, wurde den Tieren über einen Zeitraum von fünf Tagen Thioglycolat gespritzt. Die x-Achse gibt die untersuchten Oberflächenrezeptoren an, während auf der x-Achse der Anteil der jeweils positiven Zellen in % angegeben ist.

Bei den untersuchten Oberflächenproteinen (CD11c, CD11b, CD4, CD25, CD80 und CD86) auf murinen Peritonealmakrophagen war bei den TLR-defizienten Tieren stets eine geringere Expression im Vergleich zum Wildtyp festzustellen (Abb. 25).

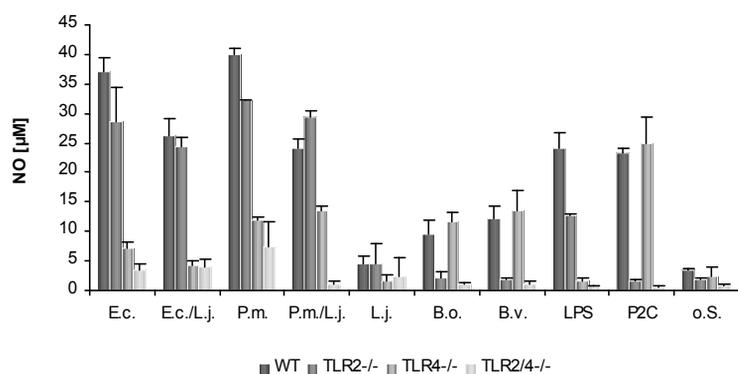
### 3.4.3.1 Interaktion isolierter *E. coli* mit Peritonealmakrophagen der Maus

Hier sollte überprüft werden, ob eine Aktivierung von Maus-Peritonealmakrophagen durch kommensale Bakterien TLR-abhängig verläuft. Peritonealmakrophagen, die aus WT, TLR2-, TLR4- und TLR2/4-defizienten Tieren (n = 3 pro Gruppe) isoliert wurden, wurden mit reinem LPS, Pam2Cys oder ganzen Bakterien inkubiert. Bei der Bestimmung von Immunmediatoren, die von stimulierten Peritonealmakrophagen der Maus ausgeschüttet werden, wurde bei TLR4- und TLR2/4-defizienten Tieren durch Stimulation mit den Gram-negativen Bakterien *E. coli* und *P. mirabilis* sowie mit reinem LPS eine geringere NO und IL-6 Ausschüttung als bei TLR2-defizienten und WT-Tieren festgestellt (Abb. 26). Dies korreliert mit der Beobachtung, dass im entzündeten Zustand bei TLR4- und TLR2/4-defizienten Tieren eine weniger massive epitheliale Zerstörung durch massive Akkumulation Gram-negativer Bakterien vorzufinden war, als dies bei TLR2-defizienten und WT-Tieren der Fall war [70], was auf einen TLR4-Effekt zurückzuführen ist. Eine Stimulation mit den Gram-positiven Bakterien *L. acidophilus* und *L. johnsonii* dagegen führt zu keiner NO-Ausschüttung. IL-6 wird durch die Stimulation mit Lactobacillen in

geringem Maße sezerniert, von WT- und TLR4-defizienten Zellen etwas mehr. Dass die TLR2- und TLR2/4-defizienten Zellen verhältnismäßig viel IL-6 ausschütten ist eher ungewöhnlich, eine Expression wie durch Stimulation mit Pam2Cys wäre eher zu erwarten gewesen, da das Signalling Gram-positiver Bakterien TLR2-vermittelt ist.



**Abb. 26** TLR-abhängige Aktivierung von Maus-Peritonealmakrophagen durch kommensale Bakterien. Peritonealmakrophagen, isoliert aus Wildtyp (WT), TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup> und TLR2/4<sup>-/-</sup> Tieren (n = 3 pro Gruppe) wurden mit reinem LPS, Pam2Cys oder ganzen Bakterien inkubiert (o.S.; ohne Stimulus, E.c. L<sup>+</sup>/<sup>-</sup>; *Escherichia coli* Laktose positiv/negativ, P.m.; *Proteus mirabilis*, L.a.; *Lactobacillus acidophilus*, L.j.; *Lactobacillus Johnsonii*, E.c.\*; *E. coli* Referenzstamm ATCC 29522, LPS; Lipopolysaccharid, Re 595, P2C; Pam2Cys. Alle Bakterien wurden hitzeinaktiviert und mit einer OD von 1 eingesetzt). Jeder Balken repräsentiert die Mittelwerte von Doppelbestimmungen. Standardabweichungen und Signifikanz, durch Vergleich mit nicht-stimulierten Zellen, wurden mit dem Student's t-test ermittelt (\*, P < 0,05, \*\*, P < 0,01, \*\*\*, P < 0,001). Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Versuche. (A) NO-Messung. (B) IL-6-Messung. Da die Messwerte teils oberhalb der Konzentration des höchsten Standardwertes lagen, wurden für die Auswertung die Extinktionen herangezogen. Standardwerte bereits um 20% extrapoliert.



**Abb. 27** Interaktion von isolierten Bakterien mit Maus Peritonealmakrophagen aus TLR2-, TLR4-, TLR2/4-defizienten und C57BL/10 WT-Tieren. Die Tiere wurden fünf Tage vor Entnahme der Makrophagen zur Anreicherung der Immunzellen im Peritoneum mit Thioglycolat intraperitoneal behandelt. Die Zellen wurden ausgesät und nach Erreichen einer Konfluenz von 80% mit hitzeinaktivierten Bakterienisolaten mit einer OD von 1 stimuliert. In den Kulturüberständen wurde nach 24 Stunden Inkubationszeit

anschließend der NO-Gehalt bestimmt. E.c. (*Escherichia coli*), P.m. (*Proteus mirabilis*), L.j. (*Lactobacillus johnsonii*, DSM 10533), B.o. (*Bacteroides ovatus*, DSMZ 1869), B.v. (*Bacteroides vulgatus*, DSMZ 1447), LPS (Lipopolysaccharid, Re 595), P2C (Pam2Cys), o.S. (ohne Stimulus). Eingesetzte Verdünnungen und Konzentrationen: E.c., P.m., B.o., B.v. (1:10), L.j. (1:2,5), LPS, P2C (100 ng).

Wie in Abb. 27 deutlich wird, ist die NO-Ausschüttung durch Stimulation mit *E. coli* oder *P. mirabilis* TLR4-vermittelt, da es bei den TLR4- bzw. TLR2/4-defizienten Tieren nur zu einer sehr geringen NO-Expression kommt. Im TLR2-defizienten Tier ist die NO-Expression um etwa 1/10-tel geringer als beim WT. Dies deutet darauf hin, dass die NO-Ausschüttung durch

Stimulation mit *E. coli*/*P. mirabilis* nicht ausschließlich TLR4-vermittelt ist, sondern zu einem geringeren Teil auch durch TLR2. Diese Annahme wird nochmals verstärkt durch die Ergebnisse der Kostimulation mit *L. johnsonii*, dessen Signalweg TLR2-vermittelt ist. Eine Kostimulation scheint zu bewirken, dass *L. johnsonii* *E. coli* bzw. *P. mirabilis* Bindungsstellen streitig macht, was, jedoch lediglich im Wildtyp, eine verminderte NO-Expression zur Folge hat. Die NO-Expression geht im WT Tier bei Kostimulation genau um den Anteil zurück, der TLR2-vermittelt ist, da nun der NO-Wert mit dem des TLR2-defizienten Tieres nach Stimulation mit *E. coli* ohne Kostimulation korreliert. Die Stimulation mit *L. johnsonii* allein hat keine NO-Expression zur Folge. Das anti-inflammatorische Potential von *L. johnsonii* wird hier also abermals deutlich.

### **3.5 Modellsysteme für die Untersuchung von Zellen des mononukleären Phagozytensystems in der Maus**

Da humane Makrophagen und DCs aufwendig zu isolieren und aufzureinigen sind, greift man für zellbiologische Untersuchungen häufig auf Zellkulturmodelle zurück. Für zellbiologische *in-vitro* Untersuchungen in der Maus greift man zur Isolierung von Makrophagen gerne auf den Peritonealraum und zur Generierung von DCs meistens auf Knochenmark zurück. In Kultur mit entsprechenden Zytokinen können diese Zellen dann zu Makrophagen (M-CSF) oder DCs (GM-CSF, IL-4) differenzieren. In den folgenden Experimenten sollten nun die im *in-vitro* Modell mit Zellkulturen beobachteten Veränderungen in der Zytokinproduktion anhand von Makrophagen und DCs aus der Maus kontrolliert werden.

#### **3.5.1 Funktionelle Untersuchung isolierter Immunzellen**

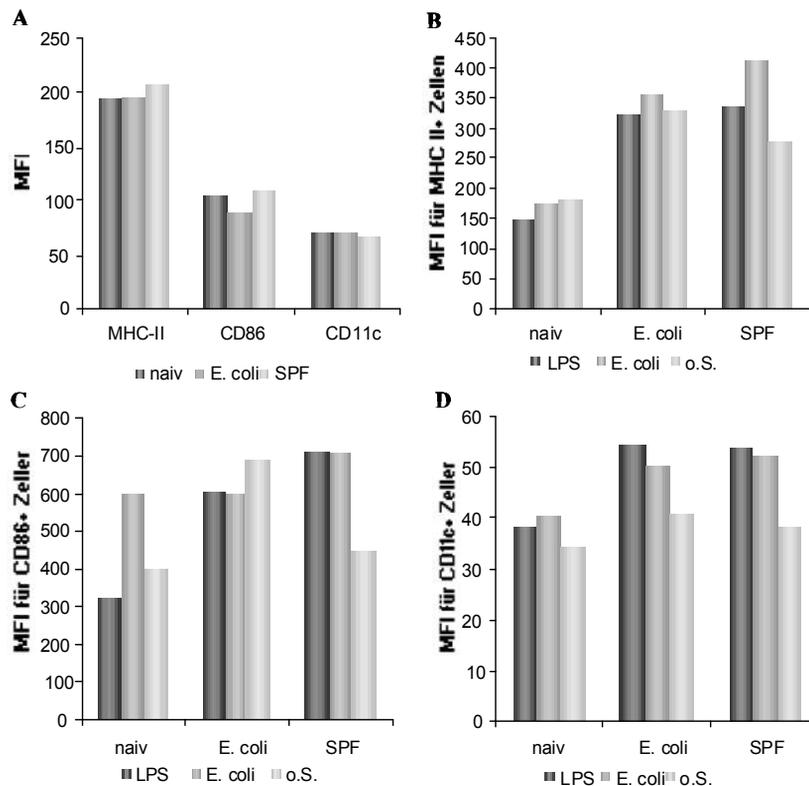
Tiere mit den jeweiligen TLR-Defekten und Besiedlungsmustern wurden zur Gewinnung entsprechender Primärzellkulturen aufgearbeitet. Um eine zahlenmäßig ausreichende Menge von dendritischen Zellen zu erhalten, wurden diese aus dem Knochenmark gewonnen und mit verschiedenen Liganden inkubiert. Die Expression verschiedener Oberflächenmarker als Parameter der Reifung wurde durchflußzytometrisch untersucht. Die Fähigkeit zur Antigenpräsentation wurde in einer Mixed Lymphocyte Reaction (MLR) mit allogenen T-Lymphozyten bestimmt und über die Messung der IL-12 p40, IL-10 und TNF- $\alpha$  Sekretion quantifiziert. Da der Hauptkontakt zwischen Mikroorganismen und dem Darm am Epithel stattfindet, wurde versucht dendritische Zellen direkt aus Darmepithelzellen zur funktionellen Untersuchung zu isolieren. Die isolierten Zellen fanden Einsatz in einer autologen MLR. Auch hier wurden die Zellen im Anschluss durchflußzytometrisch untersucht und die Freisetzung des

proinflammatorischen Zytokins IL-12p40, des Th1-polarisierenden Zytokins IFN- $\gamma$  sowie des Entzündungsmediators IL-6 gemessen.

### 3.5.1.1 Phänotypisierung von DCs

Der Einfluss der kommensalen Flora auf das Entzündungsgeschehen bei CED ist inzwischen nicht mehr von der Hand zu weisen. Im Tierexperiment mit *T. gondii* induzierter Ileitis konnte an C57BL/6 Mäusen gezeigt werden, dass bei gnotobiotische Tieren eine unterschiedliche bakterielle Rekolonisierung zu Unterschieden bei Immunreaktionen im Rahmen von Entzündungsprozessen führten. So überlebten 80% der nicht rekolonisierten, also keimfreien Mäuse die akute Phase der Infektion und 75% verstarben erst an Tag 28 post Infektion (p.i.), wohingegen alle Tiere an Tag 8 p.i. verstarben, die mit einer spezifisch pathogenfreien (SPF)-Flora rekolonisiert wurden. *E. coli* mono-besiedelte gnotobiotische Tiere entwickelten zwar nur moderate histopathologische Schäden, verstarben jedoch auch an Tag 13 p.i. [70]. Um diese Beobachtungen auch auf zellulärer Ebene charakterisieren zu können, wurden Knochenmarksgenerierte DCs von keimfreien C57BL/6 Mäusen, die anschließend mit *E. coli* oder einer SPF-Flora rekolonisiert wurden, mit gnotobiotischen, unbesiedelten Tieren verglichen. Eine Phänotypisierung der Zellen zeigte ein charakteristisches Expressionsprofil der Oberflächenmarker CD86, CD11c sowie für MHC-II (Abb. 28). Im unreifen Zustand an Tag 6, also vor der Stimulation, zeigen sowohl die gnotobiotischen, als auch die *E. coli*- und SPF-besiedelten Tiere für MHC II einen mittleren Fluoreszenzindex (MFI) um 200, für CD86 um die 100 und für CD11c einen Wert um 75 an. Der Reifungsmarker CD86 ist bei den rekolonisierten Tieren an Tag 9 erhöht, so wird hier für die *E. coli* besiedelten Tiere ein MFI von 600 und für die SPF-besiedelten Tiere ein MFI von 700 erreicht, unabhängig davon ob und womit die Zellen anschließend stimuliert wurden (Abb. 28 C). Gleiches gilt für den Oberflächenrezeptor MHC-II, der von einem MFI 200 im unreifen Zustand nun bei den *E. coli* und SPF-besiedelten Tieren auf Werte um 350 kommt (Abb. 28 B). Bei den Zellen der keimfreien Tiere bleibt der MFI von 200 für MHC II im unreifen Zustand auch nach Stimulation erhalten oder geht sogar noch leicht zurück. CD11c, der Marker für unreife DCs bleibt auch bei den ausgereiften Zellen bei einem mittleren Fluoreszenzindex von etwa 40-50. Darüber hinaus scheint es keinen Unterschied zu machen, ob die Zellen durch Stimulation mit *E. coli* oder reinem LPS zur Reifung gebracht oder aber gar nicht stimuliert wurden, da sie scheinbar schon allein aufgrund der technischen Abläufe, wie dem Pipettieren und das Umsetzen in wechselnde Kulturgefäße, ausreifen. Anhand der Oberflächenmarker alleine würde sich hier also keine Aussage über den Reifezustand der Zellen treffen lassen, denn nur diejenigen Zellen, die mit Antigen in Kontakt gekommen sind, nicht

jedoch die der gnotobiotischen, unstimulierten Zellen sind auch in der Lage Zytokine zu sezernieren, worauf im späteren Verlauf noch detaillierter eingegangen wird.

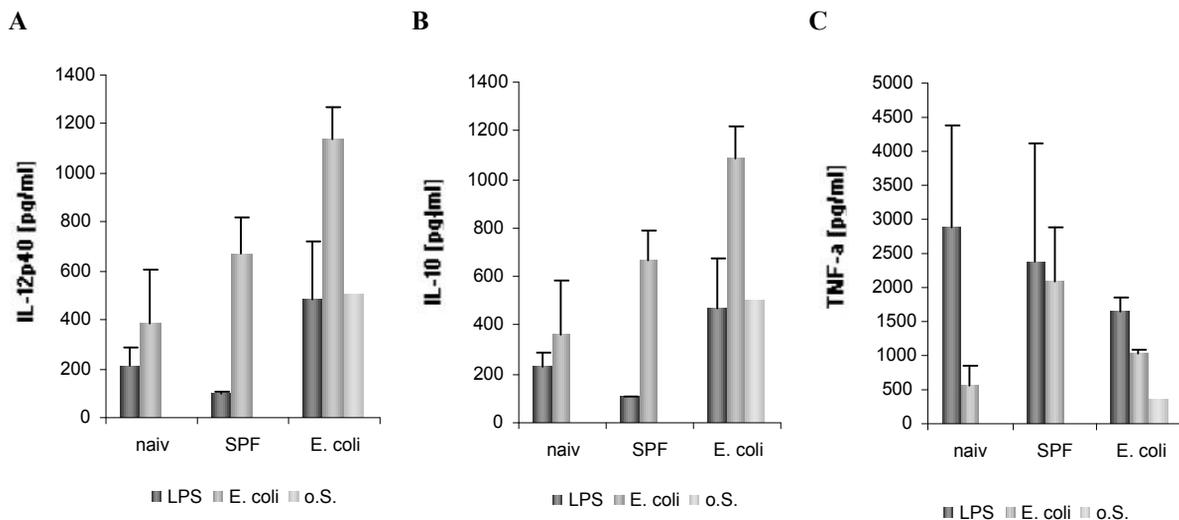


**Abb. 28** Oberflächenmarker auf Knochenmarksgenerierten DCs. Keimfreie (sterile), naive C57BL/6 Mäuse wurden mit *E. coli* bzw. einer SPF-Flora besiedelt. Als Referenz dienten sterile, unbesiedelte Tiere. Bestimmt wurde der Reifungsgrad anhand der Expression von Oberflächenmarkern von unreifen an Tag sechs und durch Stimulation mit *E. coli* bzw. LPS zur Reifung gebrachter BM-DCs an Tag neun (d9). (A) Oberflächenmarker unreifer DCs an d6, (B) MHC II an d9, (C) CD86 an d9 und (D) CD11c an d9. MFI; mittlerer Fluoreszenzindex.

### 3.5.1.2 Immunmediatoren in Zellkulturüberständen von BM-DCs

Um die nachstehenden Ergebnisse besser verstehen und interpretieren zu können, gehe ich vorerst kurz auf einzelne pro- und anti-inflammatorische Zytokine und deren Bedeutung ein. TNF- $\alpha$  wird nach Antigenaufnahme von Makrophagen oder DCs sehr schnell exprimiert. Nach Angaben von Zytodiagnostik-Labors werden maximale TNF- $\alpha$  Plasmaspiegel bereits nach einer Stunde erreicht. TNF- $\alpha$  ist somit das schnellste proinflammatorische Zytokin. Vor allem Gram-negative Bakterien wie *E. coli* erzeugen in Makrophagen eine schnelle TNF- $\alpha$ -Freisetzung. Ein weiteres proinflammatorisches Zytokin ist IL-12, welches im Gegensatz zu TNF- $\alpha$  von APCs auch bei Kontakt mit intrazellulären Erregern (z.B. Viren oder Chlamydien) stark freigesetzt wird. Zeitlich folgt es dem TNF- $\alpha$  mit etwas Abstand, maximale Plasmaspiegel treten hier erst etwa 3 Stunden nach der Aktivierung der DCs auf. IL-12 ist das wichtigste Zytokin das undifferenzierte Helferzellen (Th0) dazu veranlasst, sich in Th1-Zellen zu differenzieren. Außerdem ist IL-12 ein starker Aktivator sowohl für natürliche Killerzellen wie auch für zytotoxische (CD8<sup>+</sup>) T-Lymphozyten. IL-10 ist das wichtigste antiinflammatorische Zytokin, es kann praktisch als Gegenstück zum IL-12 aufgefasst werden, da es neben der entzündungshemmenden Funktion auch eine Inhibition der IFN- $\gamma$  Synthese bewirkt, also auch im

Bezug auf die Th1-Differenzierung dem IL-12 entgegen gesetzt ist. IL-10 wird ebenfalls von APCs gebildet, die Mechanismen die darüber entscheiden ob IL-10 oder IL-12 gebildet wird, werden bisher noch nicht genau verstanden. Die Messungen der Zytokine IL-12p40, IL-10 und TNF- $\alpha$ , wie in Abb. 29 zu sehen, deuten darauf hin, dass Th1- und Th2-Antworten nicht parallel ablaufen können, sie hemmen sich gegenseitig. In erster Linie sind dafür die Zytokine IFN- $\gamma$  (Th1) und IL-4 (Th2) verantwortlich.



**Abb. 29** Messung von Immunmediatoren in Zellkulturüberständen von BM-DCs. DC-Vorläuferzellen wurden aus dem Knochenmark isoliert und *in-vitro* durch die Zugabe von GM-CSF generiert. An Tag 6 wurden die Zellen durch Stimulation mit *E. coli* oder LPS zur Reifung gebracht. Gemessen wurden (A) IL-12p40, (B) IL-10 und (C) TNF- $\alpha$ , in Kulturüberständen von stimulierten Maus BM-DCs aus keimfrei gemachten (naiven), SPF- und *E. coli*-besiedelten C57BL/6 Mäusen (n=3), die durch Stimulation mit *E. coli* bzw. reinem LPS zur Reifung gebracht wurden und mit solchen verglichen wurden, die keinem Stimulus ausgesetzt waren (o.S.). Das Experiment wurde mehrfach wiederholt und führte zu gleichen Ergebnissen.

IL-10 (Abb. 29 B), als anti-inflammatorisches TH2-Zytokin und TNF- $\alpha$  (Abb. 29 C), als pro-inflammatorisches TH2-Zytokin scheinen in entgegengesetztem Maße sezerniert zu werden, wie der Vergleich der Balken für die mit LPS- und *E. coli*-stimulierten Zellen zeigt, wobei es hier weniger von Bedeutung zu sein scheint, ob die DCs aus einem naiven/unbesiedelten, SPF-besiedelten oder *E. coli*-besiedelten Tier stammen. Hohe Standardabweichungen bei der TNF- $\alpha$  Messung lassen das Ergebnis jedoch anzweifeln. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass wie oben erwähnt Maximalwerte bereits nach einer Stunde erreicht werden, die Stimulation in diesem Experiment jedoch für 24 Stunden erfolgte und somit der Abbau unterschiedlich weit fortgeschritten sein könnte. Die Gegenspieler IL-12 (Abb. 29 A) und IL-10 (Abb. 29 B) ließen ihr Gegenspiel in diesem Experiment leider nicht erkennen, da sie gleichermaßen sezerniert wurden. Ein direkter Vergleich der Messwerte ist aufgrund der zu unterschiedlichen Zeitpunkten erreichten Maximalwerte nicht möglich. Das hier abgebildete Ergebnis ist eine Momentaufnahme nach 24 Stunden, die darauf hindeutet, dass sich der gewählte Versuchsaufbau

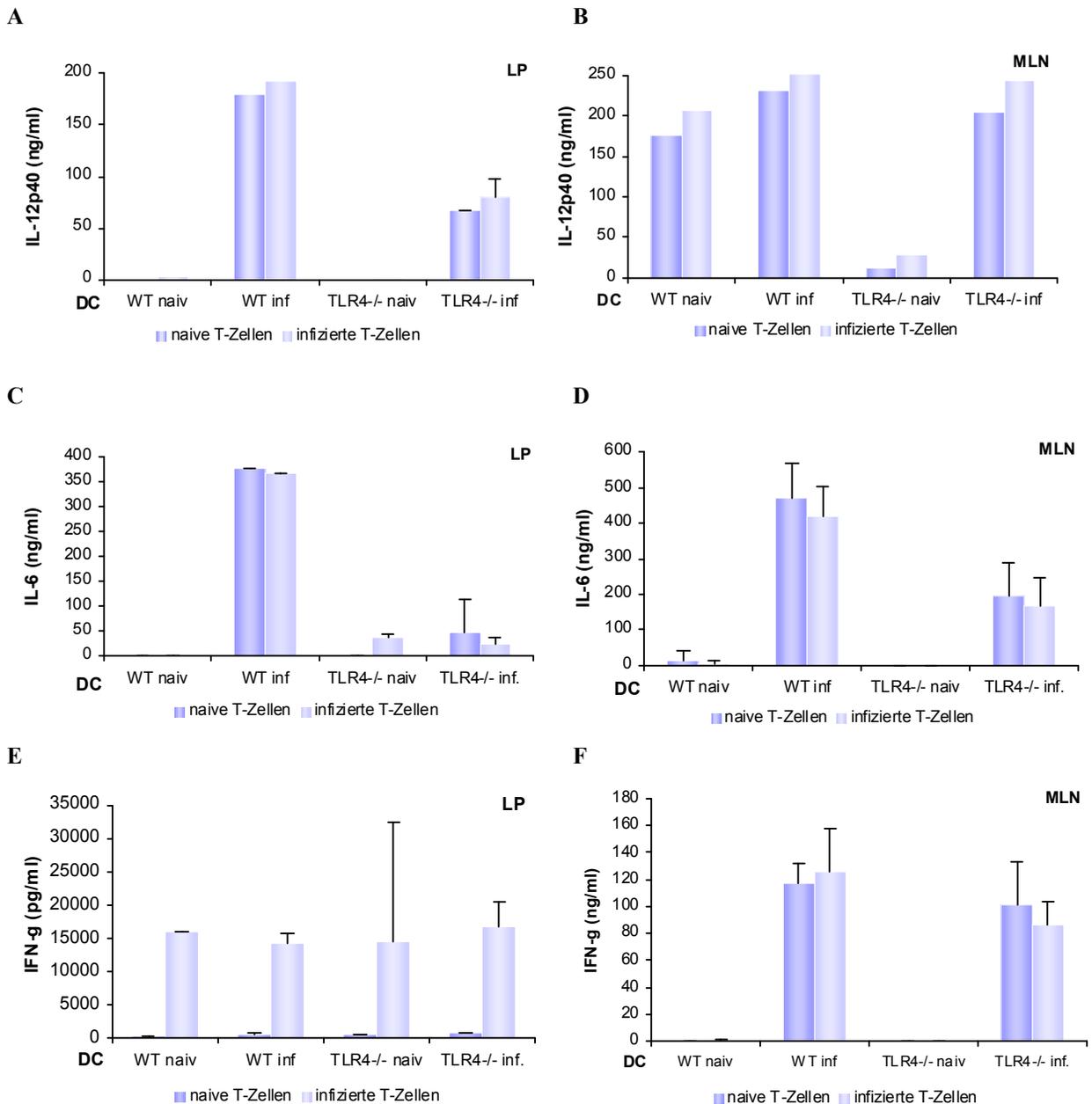
als ungeeignet erweist um Unterschiede zwischen unterschiedlich besiedelten Tieren zu ermitteln, da es sich bei den DCs um Knochenmarkvorläuferzellen handelt, die sich ungeachtet des Besiedlungsstatus nicht voneinander unterscheiden.

### 3.5.2 Mixed Lymphocyte Reaction

In gemischten Lymphozytenreaktionen (MLR) sollte die antigenpräsentierende Funktion von Knochenmark-generierten DCs aus naiven und *T. gondii* infizierten C57BL/10 Mäusen und somit deren Fähigkeit T-Zellen zur Proliferation anzuregen untersucht werden. Auf Erkennung fremder HLA-Moleküle reagieren T-Zellen mit Zellteilung. Je fremder sich die Zellen sind desto stärker wird die T-Zellproliferation ausfallen. Zunächst wurden die Zellen ungelastet, d.h. ohne exogene Beladung mit Antigen untersucht. Autologe DCs führten zu keiner signifikanten Steigerung des Stimulationsindex. Auch eine Antigenpulsung durch Infektion der Tiere mit dem Parasiten *T. gondii* erzielte keinen ausreichenden Stimulationseffekt autologer T-Zellen. Die *in-vitro* generierten Zellen sind dennoch in der Lage, effektiv Antigene aufzunehmen und zu präsentieren, was bei der autologen MLR in Abb. 30 an höheren Zytokinmesswerten in den Zellkulturüberständen bei den *T. gondii* infizierten gegenüber den naiven Tieren abzulesen ist.

#### 3.5.2.1 Autologe MLR

Für die Analyse einer TLR4-abhängigen Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus der Milz wurde eine autologe gemixte Lymphozytenreaktion mit CD11c<sup>+</sup> DCs aus der Lamina propria (Ileum) oder den mesenterialen Lymphknoten (MLN) durchgeführt. Die T-Zellen stammten von naiven bzw. C57BL/10 Mäusen, die mit 100 Zysten *T. gondii* des Stammes ME49 infiziert wurden. Am Tag 6 post Infektion wurden die T-Zellen isoliert und für sieben Tage mit den DCs im Verhältnis 3:1 in Kokultur gehalten. Dabei wurden DCs aus Wildtyp sowie aus TLR4-defizienten Tieren miteinander verglichen. Die T-Zellproliferation wurde durch die Markierung der T-Zellen mit CFSE, einem Fluoreszenzfarbstoff, der nach Anregen mit Licht der Wellenlänge 488 nm grünes Licht bei 517 nm emittiert und sich erst in Zellen einlagert und anschließend bei der Zellteilung durch Verteilen auf die Tochterzellen ausverdünnt, durchflusszytometrisch bestimmt. Im Anschluss wurde die Sezernierung der Zytokine IL-12p40 (A-B), IL-6 (C-D) sowie IFN- $\gamma$  (E-F) in den Kulturüberständen bestimmt (Abb. 30).



**Abb. 30** Messergebnisse einer autologen MLR mit DCs aus der Lamina propria und mesenterialen Lymphknoten von Balb/C Mäusen mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz von naiven und *T. gondii* infizierten WT- und TLR4-defizienten C57BL/10 Mäusen. Die Ergebnisse geben die Zytokinkonzentrationen in Kulturüberständen einer autologen MLR an Tag 2, mit  $1 \times 10^5$  DCs und  $3 \times 10^5$  T-Zellen an. (A) IL-12p40, CD11c<sup>+</sup>-DCs aus der Lamina propria des Dünndarms, naive CD4<sup>+</sup> Milz-T-Zellen, *T. gondii* infizierte CD4<sup>+</sup> Milz-T-Zellen (6 Tage post Infektion per oral mit 40 Zysten des Stammes ME49 bzw. 100 Zysten, hier nicht gezeigt). (B) IL-12p40, CD11c<sup>+</sup> DCs aus MLNs, naive CD4<sup>+</sup> Milz-T-Zellen, *T. gondii* infizierte CD4<sup>+</sup> Milz-T-Zellen (6 Tage post Infektion per oral mit 40 Zysten des Stammes ME49). (C) IL-6-Produktion nach MLR mit DCs aus der Lamina propria (LP) und T-Zellen aus der Milz. (D) IL-6-Produktion nach MLR mit DCs aus MLN und T-Zellen aus der Milz. (E) IFN-γ Produktion nach MLR mit naiven und infizierten LP DCs und naiven und infizierten Milz T-Zellen. (F) IFN-γ Produktion nach MLR mit naiven und infizierten DCs aus MLN und naiven und infizierten T-Zellen aus der Milz.

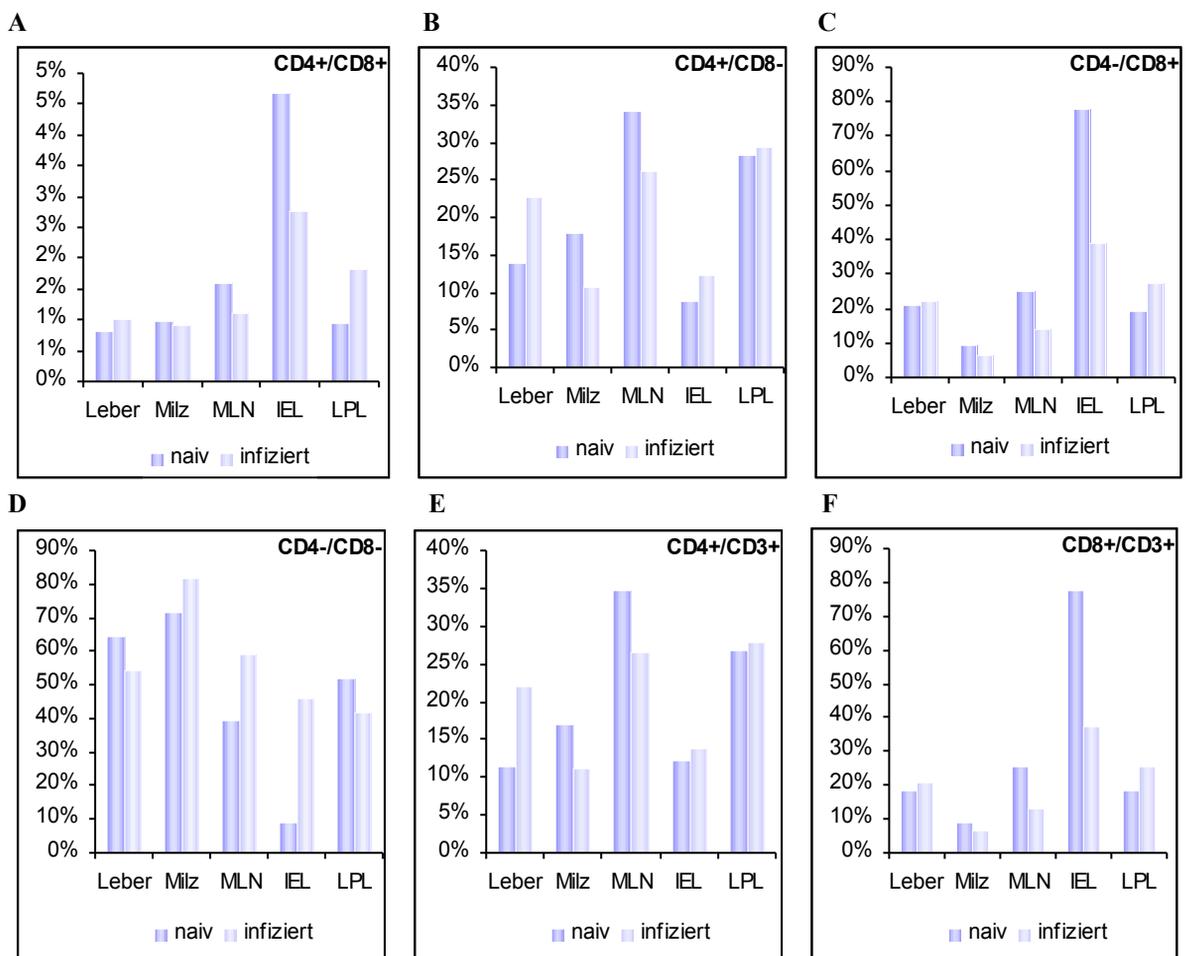
Wie in Abb. 30 A zu sehen ist, führt die Stimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz von Balb/c Mäusen mit CD11c<sup>+</sup> DCs aus der Lamina propria (LP) oder mesenterialen Lymphknoten (MLN) aus naiven WT und TLR4-defizienten C57BL/10 Mäusen zu keinerlei TLR4-Aktivität im Dünndarm, da keine IL-12p40 Sezernierung erkennbar war. Die Stimulation von T-Zellen mit

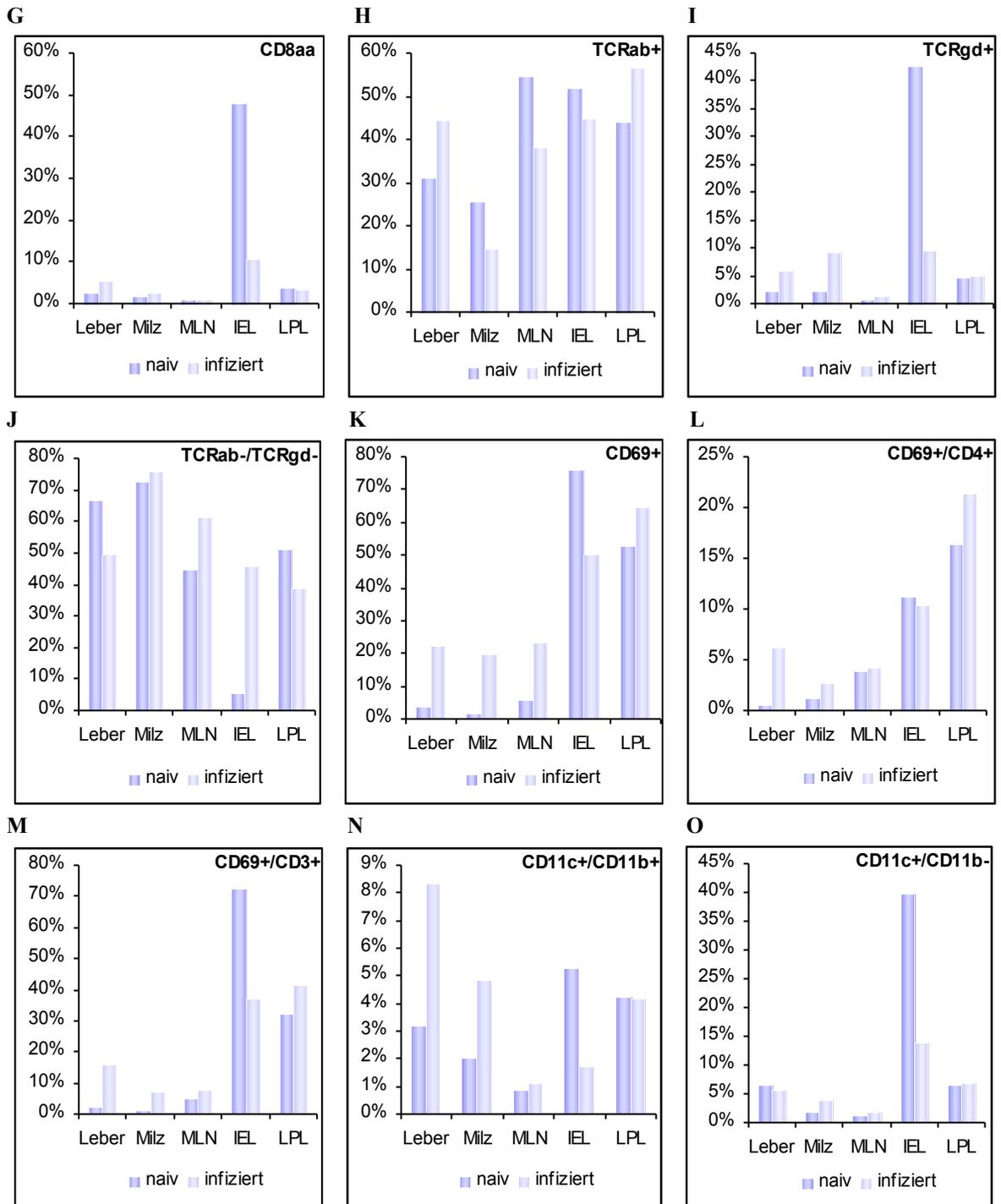
DCs aus *T. gondii* infizierten Tieren dagegen führte unabhängig davon ob die T-Zellen aus einem infizierten oder naiven Tier stammten, sowohl bei den infizierten WT- als auch bei den infizierten TLR4-defizienten DCs zu einer IL-12p40 Ausschüttung, wobei die IL-12p40 Konzentration bei Stimulation mit DCs aus den infizierten WT-Tieren dreimal so hoch war. Die IL-12p40 Expression in der Lamina propria ist im infizierten TLR4<sup>-/-</sup> signifikant geringer als im infizierten WT (A), gleiches gilt für die Sezernierung von IL-6 (C). Ähnliches gilt für DCs aus MLN, außer, dass hier durch Stimulation mit naiven WT DCs aus ungeklärten Gründen IL-12p40 ausgeschüttet wird (B). Nach per oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* ME49 wird TLR4 auf mononukleären Zellen der Lamina propria im Dünndarm exprimiert. Die Anzahl TLR4-positiver Zellen ist im WT erhöht. Durch mukosale Antigene der Toxoplasmen kommt es sowohl im WT als auch im TLR4<sup>-/-</sup> zur IL-12p40 Expression durch DCs des Intraepitheliums und der Lamina propria. Durch Antigenaufnahme, Prozessierung und CD4<sup>+</sup> T-Zellpräsentation kommt es zu einer Th1-Zytokinantwort. Zur IFN- $\gamma$  Ausschüttung scheinen im Gegensatz zu den anderen untersuchten Parametern nur infizierte T-Zellen in der Lage zu sein. Darüber hinaus gab es keine Unterschiede zwischen der Stimulation mit infizierten und naiven DCs (E), die darüber hinaus vergleichsweise geringe IFN- $\gamma$  Werte um 15 ng/ml im Vergleich zu im Schnitt 100 ng/ml in MLN erreichten (F).

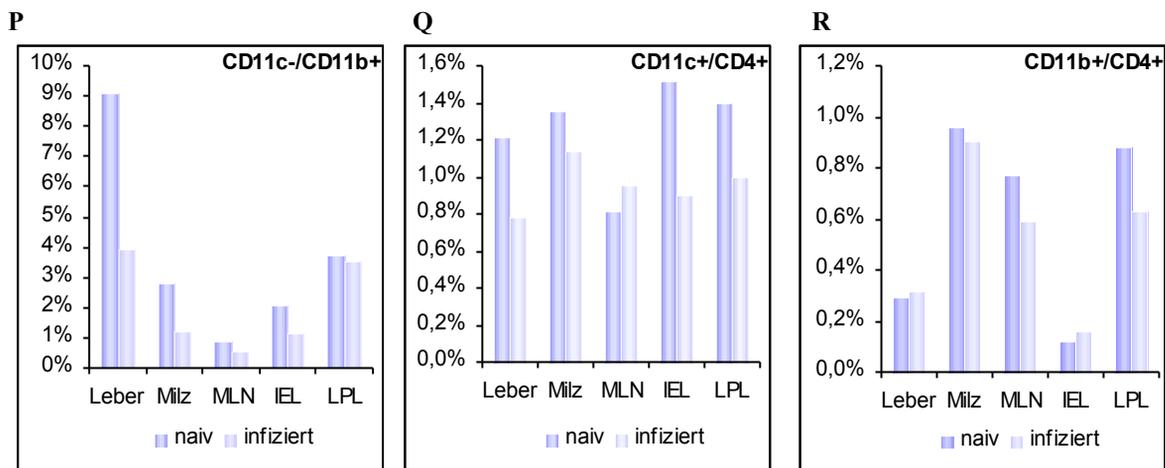
### 3.5.3 Charakterisierung von Lymphozytenpopulationen aus dem Ileum, MLN, Leber und Milz

Bei einer *T. gondii* Infektion mit Zysten werden freie *T. gondii* Zoiten ins Darmlumen abgegeben, wo sie in Enterozyten eindringen, sich vermehren und den Prozess in Gang setzen. Mit Zoiten beladene Enterozyten schütten Chemokine wie das Monocyte chemotactic protein 1, Macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  und  $\beta$  sowie MIP-2/CXCL2 aus, welche wiederum Leukozyten in die Lamina propria rekrutieren, woraufhin sich die Parasiten in verschiedene entfernter gelegene Gewebe, inklusive dem Gehirn verteilen. Leukozyten der mononukleären Phygozytenlinie, insbesondere DCs (meistens CD11c<sup>+</sup>) sind bekannt dafür intaktes Gewebe zu durchdringen und Viren, Pilze oder Bakterien vom Epithelium zu den Lymphknoten zu transportieren. Nach Courret N et al., 2006 [33] konnte nach oraler *T. gondii* Infektion ein starker Befall sekundärer Lymphorgane beobachtet werden, was auf einer Verteilung der Parasiten durch ein lymphatisches „Network“ während der Anfangsphase des Parasitismus beruht. Auch bekannt für ihre T-Zell-stimulatorischen Fähigkeiten, könnten DCs *T. gondii* transportieren, zumal Tachyzoiten effektiv in diese eindringen und dort überleben. *T. gondii* Tachyzoiten benutzen demzufolge DCs und Monozyten/Makrophagen als Shuttle-Zellen um ins Gehirn zu

gelangen. Der Einfluss einer *T. gondii*-Infektion von C57BL/6 Mäusen mit 100 Zysten des Stammes ME49 sollte durch Phänotypisierung von Lymphozyten aus IEL und LPL aus dem Dünndarm, MLN, Leber und Milz im Vergleich zu naiven Tieren durch die durchflusszytometrische Messung von Oberflächenmarkern und des Aktivierungszustands der Zellen bestimmt werden (Abb. 31). Dafür wurden die entsprechenden Organe von jeweils zwei Tieren pro Gruppe entnommen, die Lymphozyten nach den entsprechenden Protokollen separat isoliert und anschließend die jeweiligen Fraktionen gepoolt. Um die Zellen MHC-I- bzw. MHC-II-Molekülen zuordnen zu können, wurden die Zellen mit den Lymphozytenmarkern für CD3, CD4 sowie CD8 gefärbt. Zur genaueren Charakterisierung wurden die Zellen darüber hinaus mit CD8 $\alpha$  sowie mit den Markern für die T-Zellrezeptoren- (TCR)  $\alpha\beta$  bzw. TCR  $\gamma\delta$  gefärbt. Der Aktivierungszustand der Zellen wurde anhand der Markierung mit CD69 gemessen. Da die Parasiten während ihrer Distribution im Körper ebenso mit CD11c<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup> Zellen assoziiert sein können, wurden auch diese Marker eingesetzt.







**Abb. 31** Messung von Oberflächenmarkern bzw. des Aktivierungszustands von Lymphozyten aus IEL, LPL, MLN, Leber und Milz von naiven und *T. gondii* infizierten Tieren an Tag 7 post Infektion im Vergleich. Von jeweils 2 naiven- und 2 infizierten- C57BL/6-WT Mäusen wurde der Dünndarm sowie MLN, Milz und Leber entnommen und die Lymphozyten aus dem Intraepithelium (IEL), der Lamina propria (LPL), den mesenterialen Lymphknoten (MLN), der Milz und der Leber isoliert, die Zellen gefärbt und die entsprechenden Oberflächenmarker durchflusszytometrisch bestimmt.

Die Differenzierung von Thymus-unabhängigen intraepithelialen Lymphozyten aus dem Dünndarm von Mäusen sowie Lymphozyten aus der Lamina propria geschieht anhand der Einteilung in überwiegend CD4- bzw. CD8-positive Lymphozyten sowie anhand der T-Zellrezeptoren, die sich in TCR $\alpha\beta$  oder  $\gamma\delta$  einteilen lassen. So befinden sich in der IEL-Fraktion überwiegend CD8-positive (Abb. 31 B-C und E-F) von denen die Mehrheit CD8 $\alpha\alpha$  Homodimere bilden (G, nur im naiven), die CD8  $\beta$ -Kette dagegen fehlt komplett. Bei den CD8 $^+$ /CD4 $^+$  Zellen (E) handelt es sich um T-Helferzellen, während es sich bei den CD8 $^+$ /CD3 $^+$  Zellen (F) um cytotoxische T-Zellen handelt. Darüber hinaus gibt es ebenso einen geringen Anteil CD4 $^+$  CD8 $^+$  doppelt-positiver Zellen (A). Etwa 40% der naiven Zellen besitzen den TCR $\gamma\delta$  Rezeptor, während dieser bei Lymphozyten aus der LP, der Milz, den MLN und der Leber bei unter 10% der Zellen nachweisbar war (I). TCR $\alpha\beta$  war auf Lymphozyten der Milz mit knapp 20% am wenigsten vorhanden, während dieser in IELs und LPLs auf nahezu 50% der Zellen zu finden war (H). Dass rund 50% aller Lymphozyten in den untersuchten Kompartimenten weder TCR $\alpha\beta$  noch TCR $\gamma\delta$  aufwiesen (J), spricht dafür, dass hier keine reinen T-Zellpopulationen untersucht wurden. Im Gegensatz zu Lymphozyten aus der Lamina propria sind in den IELs mehr aktivierte CD3 $^+$ -Zellen vorzufinden (M). Die LPL-Fraktion setzt sich dagegen zu ca. 30% aus B-Zellen (in der Regel Plasmazellen, hier nicht gezeigt) und etwa 60% T-Zellen zusammen, die entweder CD4- oder aber CD8-positiv sind, im Verhältnis 2:1 (Abb. 31 B-C). Hier sind mehr aktivierte CD4 $^+$ -Zellen anzutreffen (L) von denen nur etwa 5% den TCR $^+\gamma\delta$  besitzen (I). Auch Makrophagen exprimieren geringe Level an CD4 (R). Hier sind CD4 $^+$ /CD11b $^+$  Zellen bis zu

einem Prozent in den jeweiligen Fraktionen nachweisbar. Gleiches gilt für aktivierte DCs, die sich durch die Expression von CD11c auszeichnen, wie in Abb. Q zu sehen ist.

## 4 Diskussion

### 4.1 Einfluss von TLRs auf die Besiedlung des Darms

In der komplexen Kommunikation zwischen Darmflora und gastrointestinalem Immunsystem nimmt das Darmepithel eine Schlüsselrolle ein [216]. Die Fähigkeit der Epithelzellen bakterielle Zellwandbestandteile zu erkennen beruht auf der Expression von *pattern recognition receptors* (PRR), welche repetitive Muster von sowohl Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien der kommensalen Flora, als auch von Pilzen, Viren und pathogenen Keimen erkennen. Toll-like Rezeptoren (TLR) sind eine Gruppe von bisher 11 bekannten humanen PRRs, welche spezifische Liganden oder *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), wie Lipopolysaccharid, Lipoteichonsäure oder Peptidoglykan erkennen. So empfängt die Darmschleimhaut einerseits Signale der Darmflora und andererseits Signale von Immunzellen im Darm. Das Darmepithel kann überdies harmlose von pathogenen Keimen unterscheiden, es reagiert nur eingeschränkt auf Zellwandstrukturen der kommensalen Flora. Die genauen Mechanismen hierzu sind noch nicht bekannt, allerdings scheint beispielsweise die begrenzte mucosale Expression von TLRs Entzündungsprozesse zu minimieren. TLRs besitzen starke immunregulatorische Eigenschaften [216] und kommen auf verschiedensten Zellen des darmassoziierten Immunsystems wie DCs, T-Zellen, NKs oder Makrophagen vor.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Fragestellung nachgegangen werden, ob und gegebenenfalls inwieweit TLRs, als Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, die mikrobielle Besiedlung des Darms determinieren. Um dies beantworten zu können, wurde die Colonflora von C57BL/10 Wildtyp (WT)-Mäusen und Tieren mit einem TLR2/4 Defekt analysiert. Es wurden sowohl kulturell-mikrobiologische Untersuchungen in Form von Keimzahlbestimmungen in Fäzesproben vorgenommen, als auch molekulargenetische Methoden angewendet, wie das Anlegen einer Klonbibliothek und Auftrennung der Proben mittels Degenerierender Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE). Erste Ergebnisse in Tab. 7 und Abb. 5 deuten darauf hin, dass weder TLR2 noch TLR4 einen gravierenden Einfluss auf die Zusammensetzung der kommensalen Darmflora haben. Tiere, die einen TLR-Defekt aufweisen, entwickeln eine ebenso diverse Flora wie der Wildtyp und auch die Kolonie bildenden Einheiten der bakteriellen Hauptvertreter unterscheiden sich im WT- und TLR-defizienten Tier nur unwesentlich. Lediglich einzelne Bakterienarten kolonisieren auf dem Hintergrund eines TLR-Defekts unterschiedlich (Abb. 5 und Abb. 6). Um diese Beobachtung zu konkretisieren und die rein visuell nicht eindeutig zu beurteilenden Ergebnisse des DGGE-Bandenvergleichs zu

untermauern, wurden einzelne Banden aus dem Gel isoliert und nach entsprechender Aufarbeitung sequenziert. Da auch diese Ergebnisse keine eindeutige Aussage zuließen, ob die zu verzeichnenden Unterschiede TLR-basiert sind, wurde eine komplexe Florenanalyse einer 16S rRNA Klonbibliothek des Coloninhalts von WT- sowie TLR2-, TLR4- und TLR2/4-defizienten Tieren durchgeführt und die Speziesidentifikation durch Vergleich mit Datenbankeinträgen auf Basis der Taxa Gattung und Ordnung miteinander verglichen. Hierbei zeigte sich eine Abnahme der Diversität der Floren bei den TLR-defizienten Tieren gegenüber dem Wildtyp (Abb. 10 und Abb. 11 A). Betrachtet man darüber hinaus die taxonomische Einheit der Ordnung, so wird deutlich, dass innerhalb der Gattung Firmicutes eine Verschiebung dahingehend stattfindet, dass im Wildtyp die Ordnung Lactobacillales zu 32% und die Clostridiales zu 47% vorkommen, während im TLR2/4-defizienten Tier mehr als die Hälfte, also 54% Lactobacillales und nur noch 33% Clostridiales vorkommen. Auch die mikrobiologischen Untersuchungen führten zu einem ähnlichen Ergebnis. Hier wurden ebenso Fäzesproben aus dem Colon von C57BL/10 Wildtyp und TLR2/4-defizienten Tieren analysiert. Der prozentuale Anteil kultivierbarer Laktobazillen lag beim Wildtyp bei  $17\% \pm 6\%$ , was signifikant niedriger war als bei den TLR2/4-defizienten Tieren mit  $56\% \pm 4,0\%$ . Die Laktobazillen verschaffen sich also scheinbar durch das Fehlen der untersuchten Rezeptoren, überwiegend jedoch durch die TLR4-Defizienz, einen Vorteil gegenüber anderen kommensalen Darmbewohnern wie den Clostridien. Anhand der vorher beschriebenen DGGE-Analyse lässt sich methodenbedingt keine Aussage über die quantitativen Verschiebungen treffen. Die Minimierung der Florenvielfalt vom Wildtyp hin zum TLR2/4-Knock-out, welche auf einem DGGE-Gel sichtbar gemacht werden könnte, konnte anhand dieser Ergebnisse jedoch nicht bestätigt werden. Die entsprechenden genetischen Fingerabdrücke der Colonflora von TLR2-, TLR4- und TLR2/4-defizienten Tieren waren annähernd identisch mit dem Wildtypmuster (Abb. 11). Lediglich einzelne, mit Pfeilen markierte Banden waren ausschließlich im Wildtyp sowie im TLR2-defizienten Bandenmuster vorzufinden sowie auch umgekehrt einzelne Banden lediglich im TLR4- und TLR2/4-defizienten Bandenmuster vorzufinden waren. Eine Sequenzanalyse der entsprechenden 16S rRNA-Gene zeigte, dass diese DNA den *Bacteroidales* zugeordnet werden konnte. Um zu überprüfen, ob diese Banden tatsächlich TLR-abhängig an- bzw. abwesend waren, wurde die Colonflora von Wildtyp- und TLR-defizienten Tieren einer anderen Haltungseinrichtung analysiert und hier zeigte sich, dass die zuvor gemachten Beobachtungen nicht zutrafen (hier nicht gezeigt). Es ist also davon auszugehen, dass es sich bei den beobachteten Unterschieden eher um interindividuelle Variabilitäten handelt, als um ein TLR-abhängiges Besiedlungsmuster, was

durch die phylogenetische Analyse der Darmflora mittels RFLP auch noch einmal anschaulich gezeigt werden konnte (Abb. 14 und Abb. 15).

## **4.2 Einfluss von TLRs auf die Pathogenese von CED**

### **4.2.1 DSS-Colitis als Darmentzündungsmodell**

Ein häufig verwendetes Modell für Studien einer Colitis ist die Natrium-Dextransulfat-Colitis (DSS-Colitis). Durch die repetitive Gabe von Dextransulfat kann eine chronische Colitis induziert werden, die sich histologisch durch Ulzerationen, Verlust der Krypten sowie Makrophagen- und Lymphozyteninfiltration auszeichnet und sich daher für das Studium der CED eignet. Der Einfluss von TLRs auf die Symptomatik und die bakterielle Besiedelung im Rahmen von Darmentzündungen sollte hier verifiziert werden. Durch die Charakterisierung der Florennmuster mittels PCR-DGGE konnte gezeigt werden, dass eine DSS-induzierte Colitis mit einer deutlichen Verschiebung der Flora hin zu Enterobakterien sowie einer Verminderung der bakteriellen Diversität einhergeht (Abb. 16). Nach siebentägiger DSS-Behandlung konnte an Tag acht beim C57BL/10-Wildtyp ein signifikanter Anstieg von *E. coli* festgestellt werden, welcher mit einer klinischen Verschlechterung einherging. Dies war bei den TLR-defizienten Tieren nicht nachzuweisen. Der deutliche Verlust der bakteriellen Diversität ging bei der DSS-induzierten Colitis mit einem signifikanten Anstieg kommensaler Gram-negativer Bakterien, welche als *E. coli* identifiziert werden konnte, einher. Von anderen Erkrankungen ist bereits bekannt, dass es zu einer Überwucherung des Darms mit Enterobakterien kommt, was vermutlich mit dem Zusammenbruch der mukosalen Barrierefunktion zusammenhängt. Das Entzündungs-induzierende Potential von *E. coli* ist jedoch stammabhängig, wie bei Mäusen mit akuter Colitis gezeigt werden konnte. Eine Behandlung mit dem *E. coli* Stamm Nissle 1917 (Mutaflor®) führte zu einer besseren Reduktion pro-inflammatorischer Zytokine, als unter einer Antibiose mit Vancomycin und Imipenem. Auch bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen konnte durch Mutaflor® *in-vivo* eine deutliche Minderung des TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ -Spiegels sowie eine Steigerung des anti-inflammatorischen Interleukins IL-10 nachgewiesen werden.

Den Ergebnissen nach zu urteilen ist der Einfluss von *E. coli* auf das Entzündungsgeschehen bei einer DSS-Colitis sehr wahrscheinlich. Durch die Abwesenheit von TLR2/4 werden Enterobacteriaceae, deren Erkennung, wie in Abb. 12 deutlich wird TLR4-vermittelt ist, nun nicht mehr vom Immunsystem erkannt. Es erfolgt keine überschießende Reaktion, welche gewöhnlich mit einer gravierenden Gewebeschädigung einhergeht. Eben diese

Gewebeschädigung, das damit einhergehende Nährstoffangebot sowie pH-Veränderungen könnten im Wildtyp also dafür verantwortlich sein, dass sich die luminalen Bedingungen für *E. coli* so zum positiven verändern, dass ihnen optimale Wachstumsbedingungen geboten werden und es somit zu den oben beschriebenen Florenverschiebungen kommt.

#### 4.2.2 *T. gondii*-induzierte Ileitis im Mausmodell

Die orale Infektion von suszeptiblen C57BL/6-Mäusen mit 100 Zysten des Parasiten *Toxoplasma gondii* führt zu einer Th1-Typ-Immunreaktion, die überschießend abläuft und im Ileum und, in milderer Form, in der Leber der Tiere die Ausbildung von Nekrosen zur Folge hat und somit histologisch den CED ähnelt. Die Mäuse versterben sieben bis dreizehn Tage nach Infektion. Die histologischen Veränderungen sind vor allem durch CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und ihre Effektormoleküle IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und NO verursacht und nicht durch *T. gondii* selbst. Die Zytokine IL-12 und IL-18 sind hinsichtlich ihrer Bedeutung bei der Induktion einer Th1-Typ-Immunreaktion und der Abwehr von Mikroorganismen in Mausmodellen gut untersucht. Ihre Rolle in überschießenden Immunantworten, die zur Immunpathologie führen, ist bekannt. Auch die orale Infektion der Maus mit *T. gondii* führt zu verstärkter Produktion von IL-12 und IL-18. Bei den *T. gondii* infizierten Mäusen konnten im Vergleich zu den gesunden Tieren erhöhte IFN- $\gamma$  und NO-Werte festgestellt werden sowie eine erhöhte Anzahl aktivierter CD4<sup>+</sup>-T-Zellen [70].

Im Rahmen der Dünndarmentzündung kommt es zu drastischen Veränderungen der Darmflora, was mittels PCR-DGGE sehr anschaulich gezeigt werden konnte. Genetische Fingerprints der Dünndarmflora wurden mittels DGGE-Analyse generiert und bakterielle 16S rRNA-Gene aus der Gesamt-DNA, die aus Dünndarminhalt von Mäusen 3, 5, 6 und 8 Tage nach *T. gondii* Infektion isoliert wurde, amplifiziert. Der histopathologische Score, der die Schädigung des Darmgewebes angibt, wurde mit jedem Tag größer. Die Diversität der Flora ging gegenüber den naiven Kontrollen zurück und es dominierten einzelne Bakterienarten, die der Gruppe der Enterobacteriaceae zugeordnet werden konnten (Abb. 17). Die Gram-negativen Bakterien, die bei Entzündung akkumulieren, tragen somit bei der *T. gondii* induzierten Ileitis ebenso wie bei der DSS-Colitis zur Pathogenese der Ileitis bei und verstärken die Symptomatik. Umfangreiche kulturelle Analysen machten deutlich, dass sich die Konzentration der dominierenden Darmbakterien zwischen Wildtyp und TLR-defizienten Tieren nicht signifikant unterscheidet, unabhängig vom Schweregrad der Entzündung.

### 4.2.3 Interaktion isolierter *E. coli* Stämme mit TLR2 und TLR4 *in-vitro*

Studien haben gezeigt, dass Teile der kommensalen Intestinalflora, eine übersteigerte Reaktion des intestinalen Immunsystems und die daraus resultierende Störung der epithelialen Barriere des Darms eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa spielen. Diese, zur Pathogenese beitragenden Bakterien der kommensalen Flora galt es nun zu identifizieren und im Detail zu untersuchen. Dabei ging es in erster Linie um die Frage, welche bakteriellen Faktoren oder Mechanismen an der Verstärkung der Pathogenese von CED beteiligt sind. Um beurteilen zu können, ob kommensale *E. coli* eine Immunantwort über TLR2 oder TLR4 auslösen, wurde überprüft, ob der *E. coli* Stamm M, ein Isolat aus dem entzündeten Ileum der Maus, in der Lage ist NF- $\kappa$ B in HEK293 Zellen, welche humanes TLR2 und/oder TLR4 exprimierten, *in-vitro* zu aktivieren. Dabei zeigte sich, dass die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch *E. coli* M *in-vitro* sowohl über TLR2 als auch TLR4 gesteuert wird und sich kein Unterschied zu der Stimulierung der Zellen mit dem Referenzstamm *E. coli* ATCC29522 feststellen lässt (Abb. 18 und Abb. 19). Vergleicht man die gemessenen Signale mit denen der natürlichen TLR2- und TLR4-Liganden Pam2Cys und LPS, so wird deutlich, dass die untersuchten *E. coli* Stämme eine starke NF- $\kappa$ B Aktivierung über TLR4 und eine weitaus schwächere über TLR2 verursachen. Gleiche Ergebnisse wurden durch die Stimulation mit dem fakultativ pathogenen, Gram-negativen Bakterium *Proteus mirabilis* erzielt, welches ebenso zur kommensalen Flora des Colons zählt (Abb. 19, Abb. 20, Abb. 21). Dass die NF- $\kappa$ B Aktivierung durch die Signalweiterleitung beider TLR-Rezeptoren noch verstärkt wird, geht aus den Versuchsergebnissen hervor, bei denen CD14 stabil transfizierte HEK293 Zellen nicht nur mit einem der beiden Rezeptoren transient transfiziert wurden, sondern mit beiden, sowie dem Plasmid für humanes MD-2, welches üblicherweise nur bei Stimulationsversuchen über TLR4 Einsatz findet (Abb. 21). Dies deutet darauf hin, dass sich durch die Stimulation mit Gram-negativen Bakterien das NF- $\kappa$ B Aktivierungssignal über TLR2 durch die Anwesenheit des Corezeptors MD-2 noch verstärken lässt. Das Zelloberflächenmolekül MD-2, auch bekannt als Lymphozyten Antigen 96, ist aus der Literatur bisher lediglich für die Aktivierung über TLR4 bekannt [81]. Ähnliches scheint den Ergebnissen nach zu urteilen jedoch auch für die Signalweiterleitung über TLR2 zuzutreffen. Auch bei den anaeroben Bakterienspezies *Bacteroides ovatus*, welche ebenso zur vorherrschenden kommensalen Darmflora zählen und systemische Antikörperantworten bei entzündlichen Darmerkrankungen hervorzurufen [168] sowie *Bacteroides vulgatus* scheinen hier zusätzliche Faktoren für die Signalweiterleitung notwendig zu sein. Sie lösen nicht, wie bei Gram-negativen Bakterien üblich, ein Signal über

TLR4 aus (Abb. 27), da ihnen das Lipid A in ihrer Zellwand fehlt, welches das biologisch aktive Motiv des TLR4-Liganden LPS ist. Für die Aktivierung der Signalweiterleitung scheint zudem die alleinige Anwesenheit von TLR2 nicht auszureichen, da in CD14 stabil transfizierten HEK293 Zellen erst dann eine NF- $\kappa$ B Aktivierung zu verzeichnen war, wenn zusätzlich zu TLR2 auch noch TLR4 sowie das Plasmid für humanes MD-2 transient transfiziert wurden (Abb. 21). Dass es sich hierbei nicht um einen TLR4-Effekt handelt, sondern MD-2 basiert zu sein scheint, kann dem Ergebnis in Abb. 27 entnommen werden, bei dem durch die Stimulation mit *B. ovatus* und *B. vulgatus* keine Stickstoffmonoxid-Expression in TLR2-defizienten murinen Peritonealmakrophagen gemessen werden konnte, in TLR4-defizienten Zellen dagegen schon. Dass einige TLRs Corezeptoren benötigen, um eine Signalkaskade zu aktivieren, ist bekannt. So interagiert TLR4 wie oben bereits erwähnt mit CD14 und MD-2, um auf LPS adäquat reagieren zu können. MD-2 scheint jedoch auch eine Bedeutung bei der NF- $\kappa$ B Aktivierung über TLR2 zuzukommen, wie durch Stimulation mit den untersuchten *Bacteroides* ssp. in murinen Peritonealmakrophagen gezeigt werden konnte. Zu diesem Ergebnis kamen auch andere Arbeitsgruppen, die gezeigt haben, dass MD-2 nicht nur für eine TLR4-, sondern ebenso für eine TLR2-vermittelte Antwort auf LPS benötigt wird [43, 178].

#### **4.2.4 Einfluss von Probiotika auf die Zytokinsynthese in RAW264.7 Makrophagen *in-vitro***

Probiotische Bakterienstämme wie Lactobacillen oder Bifidobakterien, welche zu den Hauptvertretern der kommensalen Darmflora zählen, besitzen ein immer mehr anerkanntes immunmodulatorisches Potenzial, welches z. T. durch Interaktionen mit TLRs vermittelt wird. Lactobacillen haben je nach Stamm unterschiedlich ausgeprägte Effekte auf die Zytokinsynthese. Beispielsweise erhöht *Lactobacillus acidophilus* pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  oder IL-12, während *L. reuteri* [115], *L. casei* und *L. gasseri* durch Steigerung der IL-10-Synthese anti-inflammatorisch wirken und sich daher eventuell bei chronisch entzündlichen Erkrankungen anbieten würden. Sowohl Probiotika als auch deren isolierte DNA allein hemmen den intrazellulären Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, der eine zentrale Bedeutung bei entzündlichen Veränderungen im Rahmen der CED hat [66, 89]. So konnte für *Lactobacillus rhamnosus* eine Hemmung der durch LPS stimulierten TNF- $\alpha$  Produktion in Makrophagen nachgewiesen werden [146]. Haller et al. haben gezeigt, dass apathogene *E. coli* und Laktobazillen in Monozyten die pro-inflammatorische Zytokinexpression hemmen und die anti-inflammatorische Zytokinproduktion stimulieren [65]. Das pro-inflammatorische Potential von *L. johnsonii* und *L. acidophilus* konnte mit Stimulationsexperimenten in murinen RAW264.7 Makrophagen

gezeigt bestätigt werden, bei denen NO- sowie TNF- $\alpha$  Spiegel in den Zellkulturüberständen gemessen wurden. Während *E. coli* [189], *P. mirabilis*, LPS und Pam2Cys starke NO- und TNF- $\alpha$  Level induzierten, waren die Messsignale durch die Stimulation mit *L. johnsonii* zum Teil am Detektionslimit (Abb. 22). Interessanterweise konnten die durch *E. coli* und *P. mirabilis* induzierten NO- und TNF- $\alpha$  Spiegel durch Kostimulation mit hitzeinaktivierten *L. johnsonii* Isolaten in 10-fachem Überschuss reduziert werden (Abb. 22 und Abb. 27). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Florenzusammensetzung im gesunden Dünndarm ein Milieu bietet, bei dem durch Gram-negative Bakterien induzierte Immunantworten herunterreguliert werden. Eine mögliche Erklärung dafür könnten die in Abb. 27 dargestellten Ergebnisse bieten. Diese sprechen dafür, dass eine Kostimulation von *E. coli* oder *P. mirabilis* mit *L. johnsonii* in isolierten murinen Peritonealmakrophagen dazu führt, dass die Lactobacillen, welche von TLR2 erkannt werden, den Gram-negativen Bakterien, deren Signaltransduktion ebenfalls z. T. TLR2-vermittelt ist [48, 97], diesen Rezeptor streitig machen, was über die Hemmung des intrazellulären Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B eine verminderte NO-Expression zur Folge hat. Diese Vermutung beruht darauf, dass das NO-Signal genau um den Wert zurückgeht, der ausschließlich auf eine TLR2 Aktivität zurückzuführen ist.

Dass *Bacteroides* Spezies, die ebenso wie *E. coli* und *P. mirabilis* mit Entzündungsherden Ileitis-erkrankter Mäuse assoziiert waren [72], sagt dagegen noch nichts darüber aus, ob sie auch primär am Ausbruch der Erkrankung beteiligt sind. Darauf deuten Stimulationsexperimente mit Maus RAW264.7 Makrophagen hin, bei denen das Potential von *B. ovatus* und *B. vulgatus* die NO-Expression *in-vitro* zu induzieren überprüft wurde, im Vergleich mit *E. coli* und *P. mirabilis*. Es zeigte sich deutlich, dass bei beiden *Bacteroides* Spezies nahezu doppelt so hohe Bakterienkonzentrationen eingesetzt werden mussten, um ähnlich starke NO-Expressionen zu erhalten wie durch die Stimulation mit *E. coli* (Abb. 23). Auch zeigt sich bei Kostimulationen mit *Bacteroides* und *Lactobacillus* Spezies *in-vitro*, dass beide Spezies separat keinen großen Einfluss auf die TNF- $\alpha$  Synthese haben. Stimuliert man RAW264.7 Makrophagen dagegen mit beiden Spezies gleichzeitig, so verdoppelt sich die TNF- $\alpha$  Expression nahezu, unabhängig davon, ob es sich um pro- oder anti-inflammatorisch wirkende *Lactobacillus* Spezies handelt (Abb. 24). Dies scheint wiederum dafür zu sprechen, dass *Bacteroides* und *Lactobacillus* Spezies zumindest zum Teil unterschiedliche Signalwege nutzen, die dann additiv zu einer erhöhten pro-inflammatorischen Immunantwort führen. Dass die Stimulation sowohl mit *L. acidophilus* als auch mit *L. gasseri* zu gleichen TNF- $\alpha$  Spiegeln führt, obwohl von *L. gasseri* bekannt ist, dass es anti-inflammatorisch wirkt, lässt sich damit erklären, dass jedes Bakterium zunächst eine Immunantwort auslöst. Die immunmodulatorischen Wirkungen von Lactobacillen dagegen

beziehen sich auf ein akutes Geschehen mit Zytokinanstieg, welches durch die Anwesenheit von Lactobacillen verstärkt oder abgeschwächt werden kann. Da die Experimente in einem Zellkulturexperiment mit gesunden Zellen ohne vorherige Stimulation mit z.B. *E. coli* oder LPS erfolgten, konnte die Stimulation mit einem pro- oder anti-inflammatorischen Bakterium zu keiner Änderung des TNF- $\alpha$  Spiegels führen, die eine pro- oder anti-inflammatorische Wirkung gezeigt hätte.

### **4.3 Funktionelle Untersuchung von Immunzellen der Maus**

#### **4.3.1 Gnotobiotische C57BL/6 Mäuse und definierte Rekolonisierung**

Da man inzwischen weiß, dass der kommensalen Flora eine entscheidende Rolle beim Ausbruch und der Pathogenese entzündlicher Darmerkrankungen zukommt, sollte in einem weiteren Experiment der Beitrag einzelner Bakterien im Detail untersucht werden. Dabei stand die Frage im Vordergrund, ob eine unterschiedliche bakterielle Besiedelung zu Unterschieden bei Immunreaktionen im Rahmen von Entzündungsprozessen führt. Dafür war es notwendig, zunächst gnotobiotische C57BL/6 Wildtyp Tiere ohne nachweisbare kultivierbare Flora zu analysieren. Zur Generierung gnotobiotischer Mäuse wurden diese mit einem Antibiotikacocktail über sechs Wochen behandelt (siehe 2.4.4). Da sämtliche Tiere dieselbe Antibiotikabehandlung erhielten und sich lediglich durch ihren Rekolonisierungsstatus unterschieden, sollte der Beitrag einzelner Bakterien bei einer Dünndarmentzündung untersucht werden.

Bei einer *T. gondii* induzierten Ileitis gnotobiotischer Mäuse überlebten 80% der nicht rekolonisierten, also keimfreien Mäuse die akute Phase der Infektion und 75% bis Tag 28 post Infektion (p.i.). Im Gegensatz dazu verstarben alle Tiere, die mit einer SPF-Flora rekolonisiert wurden an Tag 8 p.i. [70]. Die Überlebensraten korrelierten dabei mit den beobachteten entzündlichen Veränderungen im Ileum. Während bei den gnotobiotischen Tieren an Tag 8 p.i. keinerlei entzündliche Veränderungen nachweisbar waren, entwickeln SPF rekolonisierte gnotobiotische Mäuse zum gleichen Zeitpunkt schwerwiegende histopathologische Schäden [70]. Wurden gnotobiotische Tiere mit einzelnen Bakterienarten rekolonisiert, so unterschied sich deren inflammatorisches Potential sehr voneinander. Wurden sie mit *E. coli* mono-assoziiert, entwickelten sie eine moderate Histopathologie an Tag 8 p.i., überlebten jedoch Tag 13 p.i. nicht [70].

Um diese Veränderungen auf zellulärer Ebene charakterisieren zu können, sollte überprüft werden, ob definierte Mikroflora Unterschiede in der Induktion von Toleranz/Reifung dendritischer Vorläuferzellen, die aus dem Knochenmark isoliert wurden, bewirken. Verglichen

wurden gnotobiotische, nicht-rekolonisierte C57BL/6 Mäuse mit gnotobiotischen *E. coli* mono- und SPF-rekolonisierten Tieren. Die Stimulation unreifer Zellen mit hitzeinaktivierten *E. coli* oder reinem LPS zeigte eine Induktion des Reifungsprozesses von DCs, ohne diese jedoch zu schädigen. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Stimulation mit *E. coli* als auch mit LPS zu einer Erhöhung der Expression der spezifischen Reifungsmarker CD11c, CD86 und MHC-II führt. Die erhöhte Expression der Oberflächenantigene waren messbare Anzeichen dafür, dass die Stimulation unreifer DCs mit *E. coli* bzw. LPS zu deren Reifung führte (Abb. 28). Was die Tiere für einen Rekolonisierungsstatus hatten, spielte dabei keine Rolle. An Tag 6 nach Zellentnahme hatten alle DCs unabhängig vom Rekolonisierungsstatus ein gleiches Oberflächenmarkerprofil. Die Zellen befanden sich in einem unausgereiften Zustand. Erst an Tag 3 post Stimulation war nun ein Unterschied zwischen den gnotobiotischen, sterilen und den rekolonisierten Tieren anhand des Reifezustands der DCs feststellbar. Da jedoch auch die nicht stimulierten Zellen eine gesteigerte Expression der Reifungsmarker aufwiesen, ist bei diesem Versuchsaufbau davon auszugehen, dass allein das manuelle Prozedere dazu führt, dass die Zellen zur Ausreifung gebracht werden. Das ändert jedoch nichts an dem Ergebnis, dass die Zellen aus den keimfreien Tieren ein deutlich anderes Profil aufweisen, als die der rekolonisierten Tiere. Ein Gedächtnis, auf Fremdartigene mit der Ausreifung dendritischer Zellen zu reagieren, scheint hier demnach nicht vorhanden zu sein, weshalb dieser Prozess hier möglicherweise mit einiger Verzögerung eintritt. Dies korreliert mit den zuvor beschriebenen tierexperimentellen Ergebnissen, nach denen 75% der *T. gondii* infizierten gnotobiotischen Tiere die akute Phase der Infektion überleben. Eine überschießende Reaktion des Immunsystems, mit damit einhergehender Gewebeschädigung, scheint hier verzögert abzulaufen.

Ferner führte im Zellkulturexperiment sowohl die Stimulation mit *E. coli* als auch mit LPS im Gegensatz zu nicht-stimulierten Kontrollzellen zu einer gesteigerten Sekretion von IL-10 und IL-12, vorwiegend bei den *E. coli* rekolonisierten Tieren, wohingegen das antiinflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$  in genau entgegengesetztem Maße sezerniert wurde (Abb. 29).

#### **4.3.2 Funktionelle Untersuchung Antigen präsentierender DCs aus der LP und MLN**

In entzündeten Darmabschnitten von Patienten mit CED finden sich vermehrt T-Zellen, die IL-12 und IL-18 im Übermaß produzieren. Diesen Immunzellen sowie den Interleukinen wird eine zentrale Rolle bei der Krankheitsentstehung von CED zugeschrieben. Es ist nicht anzunehmen, dass Mukosa-assoziierte oder gar luminale Bakterien primär Kontakt mit Makrophagen haben. Hier scheint den dendritischen Zellen eine Schlüsselrolle zuzukommen [6, 56, 154]. Ausläufer

dendritischer Zellen durchstoßen, periskopartig das Darmepithel und nehmen entweder über Aktin-vermittelte Phagozytose ganze Bakterien oder über Rezeptor-vermittelte Endozytose bzw. Makropinozytose lösliche bakterielle Antigene auf [160]. Die Reifung dendritischer Zellen zu hocheffizienten APCs wird ebenfalls über TLRs gesteuert. Wie gezeigt werden konnte, sind je nach Ligand TLR2 oder TLR4 involviert [129]. Das Potential von DCs ihre Fähigkeit als Antigen präsentierende Zelle unter Beweis zu stellen, wurde in einer autologen MLR mit DCs aus der Lamina propria und mesenterialen Lymphknoten von Balb/c Mäusen mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz von naiven und *T. gondii* infizierten WT- und TLR4-defizienten C57BL/10 Mäusen überprüft. Nach per oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* ME49 wird TLR4 auf mononukleären Zellen der Lamina propria im Dünndarm exprimiert. Die Anzahl TLR4-positiver Zellen ist im WT erhöht. Durch mukosale Antigene der Toxoplasmen kommt es sowohl im WT als auch im TLR4-defizienten Tier zur IL-12p40 Expression durch DCs des Intraepitheliums und der Lamina propria. Durch Antigenaufnahme, Prozessierung und CD4<sup>+</sup> T-Zellpräsentation kommt es zu einer Th1-Zytokinantwort. Die IL-12p40 Expression in der Lamina propria ist jedoch im infizierten TLR4-defizienten Tier signifikant niedriger als im infizierten WT, gleiches gilt für IL-6. Ähnliches gilt für DCs aus MLNs, außer, dass hier durch Stimulation mit naiven WT DCs IL-12p40 ausgeschüttet wird. Zur IFN- $\gamma$  Ausschüttung scheinen im Gegensatz zu den anderen untersuchten Parametern nur infizierte T-Zellen in der Lage zu sein. Darüber hinaus gab es keine Unterschiede zwischen der Stimulation mit inf. und naiven DCs. Doch auch die infizierten T-Zellen ergaben vergleichsweise geringe IFN- $\gamma$  Werte um die 15 ng/ml im Vergleich zu im Schnitt 100 ng/ml in MLNs. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass es eine angeborene Immunität gegenüber *T. gondii* gibt [52], da infizierte DCs aus dem WT sowohl von naiven als auch von infizierten T-Zellen aktiviert werden konnten (Abb. 31 A, C, D, F). Von Furuta et al. [52] konnte in der Ba-F3 Zell-Linie, welche Maus (m) TLR2 oder mTLR4/mMD-2 stabil exprimierten gezeigt werden, dass *T. gondii* ME49 eine NF- $\kappa$ B Aktivierung über TLR4 verursacht, was anhand eines Luciferase-Signals gemessen wurde. Um sicherzustellen, dass dieser Effekt nicht ausschließlich auf der Anwesenheit von LPS beruht, wurde die LPS Aktivität durch die Zugabe von 10 mg Polymyxin B ausgeschaltet und gezeigt, dass das Luciferase-Signal das Gleiche war wie ohne Polymyxin B Zugabe. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *T. gondii* ME49 eine TLR4-agonistische Aktivität besitzt. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass die angeborene Immunantwort durch TLR4 in protektive Mechanismen gegenüber einer peroralen Infektion mit *T. gondii* ME49 involviert ist. Ein Teil der Reaktion scheint dennoch TLR4-unabhängig zu sein, da es auch bei DCs aus TLR4-defizienten Mäusen zu einer, wenn auch sehr viel geringeren, Zytokinausschüttung kommt (Abb. 30).

### 4.3.3 Differenzierung von Lymphozyten Populationen aus dem Ileum der Maus

Das Darmepithel wird durch die Basalmembran von der darunter liegenden Lamina propria separiert. In den parazellulären Räumen der Enterozyten befinden sich intraepitheliale Lymphozyten (IEL), die in unmittelbarem Kontakt mit der Basalmembran stehen und deren physiologische Bedeutung bislang weitgehend ungeklärt ist. Da sie aufgrund ihrer exponierten Lokalisation innerhalb der Mukosa diejenigen Immunzellen darstellen, welche zuerst mit pathogenen Agenzien wie invasiven Mikroorganismen in Kontakt treten, ist davon auszugehen, dass sie im Sinne von „Wächtern des Epithels“ tätig sind [94, 98, 108, 133]. Man vermutet, dass IEL durch die Interaktion zwischen Antigen und ihrem T-Zell Rezeptor (TCR) aktiviert werden [191] und über eine Sekretion zahlreicher Botenstoffe mit den Immunzellen der Lamina propria kommunizieren. Allein aufgrund der kompartimentspezifischen Verteilung intestinaler T-Zellpopulationen lässt sich eine funktionelle Zweiteilung des mukosalen Immunsystems annehmen. Im Gegensatz zu den vielfältigen Immunzellen der Lamina propria handelt es sich bei humanen IEL fast ausschließlich um T-Lymphozyten, welche zu 80-90%  $\alpha\beta$ - und zu 10-20%  $\gamma\delta$ -positiv sind [39, 183, 210]. Eine Besonderheit intestinaler  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten besteht darin, dass sich ihr Vorkommen nahezu vollständig auf die Epithelschicht beschränkt und sie kaum innerhalb der Lamina propria nachgewiesen werden können [27, 202]. Generell lassen sich  $\gamma/\delta$ + IEL in zwei Subpopulationen unterteilen, die entweder das CD8 $\alpha\beta$  Heterodimer exprimieren oder aber doppelt negativ (CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>) sind [88]. Weitere 5-20% der IELs exprimieren ein CD8 $\alpha\alpha$  Homodimer. Neben ihrer Beteiligung an der mukosalen Immunantwort wird diskutiert, ob  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten bei der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen wie dem Morbus Crohn oder der Colitis ulcerosa eine Rolle spielen.

Da man CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Lamina propria eine Schlüsselrolle bei der Entstehung einer Ileitis nachsagt, wurden Lymphozyten aus der Lamina propria, dem Intraepithelium sowie aus der Milz, der Leber und den mesenterialen Lymphknoten aus *T. gondii* infizierten und naiven C57BL/10 Mäusen anhand ihrer Oberflächenmarker analysiert (Abb. 27).

Bei den IEL handelt es sich um eine eigenständige Gruppe von Lymphozyten im Darm. Diese Zellen regulieren unterschiedliche Arten von Zytotoxizität und sezernieren multiple Zytokine *in vitro*. Sie haben aufgrund ihrer anatomischen Lage den direktesten Kontakt mit luminalen Antigenen. Ein Großteil der humanen IEL ist CD8-positiv. Es wird vermutet, dass sich ein Teil der IEL, hauptsächlich die  $\gamma\delta$ -positiven Zellen, thymusunabhängig innerhalb des Epithels entwickelt, während die  $\alpha\beta$ -Zellen aus der Lamina propria in das Epithel eintreten. CD69, ein

phosphoryliertes Disulfid-gekoppeltes Homodimer, ist ein Aktivierungsmarker, der innerhalb von zwei Stunden nach Stimulation induziert wird.

Nach *T. gondii* Infektion sind die Parasiten mit CD11c<sup>+</sup>-Zellen assoziiert, wobei die Parasitenlast je nach Organ zeitabhängig variiert. So sind an Tag 2-3 nach Infektion im Intraepithelium und anschließend in der Lamina propria die Parasitenzahlen am höchsten, während sie in den MLN erst an Tag 3-7 nach Infektion ansteigen. Ab Tag 15 sinkt die Parasiten/CD11c<sup>+</sup> Anzahl in allen Dünndarmkompartimenten, möglicherweise einhergehend mit einer T-Lymphozyten Aktivität. Dieser Verlauf lässt anhand der erzielten Versuchsergebnisse verfolgen. CD11<sup>+</sup>-T-Zellen aus IELs von naiven, gesunden Tieren sind mit einem Anteil von 40% sehr stark vertreten, während bei den *T. gondii* infizierten Tieren an Tag 7 post Infektion der Anteil nur noch bei lediglich 15% liegt (Abb. 27 O). Dies spricht zum einen dafür, dass die T-Zellen von dort weg wandern durch die Lamina propria hindurch zu den weiter weg liegenden lymphatischen Organen und zum anderen dafür, dass *T. gondii* selber das Gewebe durchdringt und die erste Barriere bereits hinter sich gelassen hat. Die Wanderung von *T. gondii* bzw. die Verbreitung der Antigene in weitere Organe, lässt sich anhand des Aktivierungszustandes der T-Zellen durch die Messung von CD69 gut verfolgen. So geht der Aktivierungszustand bei den T-Zellen in den IELs bereits 7 Tage nach Infektion wieder zurück (80% im naiven Tier und 50% im infizierten Tier), wohingegen der Aktivierungszustand der T-Zellen aus der Lamina propria, der Leber, der Milz und den MLN bei den T-Zellen aus den infizierten Tieren den der T-Zellen aus naiven Tieren übersteigt. Nach Untersuchungen von [33] waren CD11b<sup>+</sup>-Zellen Leukozyten und Neutrophile (NIMP-R14<sup>+</sup>), wohingegen die Parasiten in CD19<sup>+</sup> B-Zellen nicht gefunden werden konnten, d.h. Parasiten-assoziierte CD11b<sup>+</sup> Zellen sind Monozyten und damit Kandidaten, die Parasiten-Kolonisation des Gehirns zu fördern. An Tag 7 post Infektion konnte die Mehrheit an Parasiten in CD11c<sup>-</sup>/CD11b<sup>-</sup> Zellen (aber nicht CD45<sup>+</sup>, also keine hämatopoetischen Zellen) gefunden werden. Zellen ohne den Oberflächenmarker CD45 können nicht auf Antigene reagieren, besitzen aber dennoch TCR. Die CD11c<sup>-</sup>/CD11b<sup>-</sup> Zellen erwiesen sich als Neutrophile, CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> Lymphozyten, B-Lymphozyten und MHC II<sup>+</sup> Zellen. Lebende *T. gondii* Tachyzoiten waren mit CD11c<sup>+</sup> DCs aus MLN und CD11b<sup>+</sup> Blutleukozyten assoziiert und tragen somit zum Gehirn-Parasitismus bei. *T. gondii* Zysten verlassen das Darmepithelium mit Hilfe von CD11c<sup>+</sup> oder CD11b<sup>+</sup> exprimierenden phagozytierenden Leukozyten und gelangen so in weiter entfernter gelegene Gewebe bis hin zum Gehirn. Da in diesem Experiment praktisch eine Momentaufnahme lediglich an Tag 7 post Infektion gemacht wurde, konnte hier leider kein eindeutiges Muster, was beispielsweise den zeitabhängigen Anstieg CD11c<sup>+</sup> Zellen oder den Aktivierungszustand der Lymphozyten in den verschiedenen Organen anbelangt, abgelesen

werden. Darüber hinaus sind Unterschiede zwischen Zellen aus naiven und infizierten Tieren auch keinem eindeutigen Muster zuzuordnen, so sind beispielsweise in der Leber und Milz in den infizierten Tieren mehr CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> Zellen anzutreffen, während bei den naiven Tieren die CD11c<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup> Zellen in diesen Organen überwiegen.

#### **4.4 Ausblick**

Da die Darmentzündung also durch die Zusammensetzung der Flora beeinflusst wird, öffnet dies neue Möglichkeiten der Prävention von CED durch die Modulation der Intestinalflora durch z.B. Prä- und Probiotikatherapie oder eine Unterbrechung der mukosalen Entzündung mittels anti-TLR Strategien. Durch eine vorsichtige Kontrolle der Signaltransduktion über TLRs könnte bei Patienten mit CED die Reaktion auf pathogene Keime so beeinflusst werden, dass es zur Erregerabwehr kommt aber keine überschießende Immunantwort stattfindet. Hierbei darf zum einen die Erkennung von Pathogenen über TLRs nicht unterbunden werden, da dies zu einer verminderten Aktivierung der angeborenen Immunität führen würde. Zum anderen muss jedoch eine überschießende Reaktion der angeborenen Immunität verhindert werden. Im Mittelpunkt derzeitiger Therapieansätze der entzündlichen Darmerkrankungen stehen deshalb Untersuchungen mit dem Ziel einer Kontrolle der Signaltransduktion über TLRs durch beispielsweise anti-TNF- $\alpha$  oder anti-LPS Gabe. Trotz weiterhin weitestgehender Unklarheit bezüglich der Ursachen von CED lassen diese Forschungsergebnisse auf eine noch bessere Kontrolle der Entzündungsreaktionen und damit einer besseren Lebensqualität von Patienten mit CED hoffen.

Langfristige Ziele, die man aufgrund der erhaltenen Ergebnisse verfolgen sollte, sind die Entschlüsselung der molekularen Interaktion zwischen Bakterienbestandteilen und dem System der natürlichen Abwehr, auf dem Hintergrund definierter genetischer Defekte, die Identifizierung der für chronisch entzündliche Darmerkrankungen pathophysiologisch relevanten Veränderungen der Darmflora sowie die Vorbereitung von klinischen Studien, zum prophylaktischen oder therapeutischen Einsatz von Probiotika bei gefährdeten oder erkrankten Personen.

## 5 Zusammenfassung

An der Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen sind eine genetische Prädisposition, Umweltfaktoren sowie die intestinale Mikroflora beteiligt. In Mausmodellen mit induzierter Darmentzündung wurden die Tiere nur krank, wenn sie unter normalen Bedingungen aufgezogen worden waren. Unter keimfreier Aufzucht blieben sie gesund [106, 120, 167]. Die wichtige Rolle der Intestinalflora bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa konnte in verschiedenen Tiermodellen und beim Menschen nachgewiesen werden. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit durch eine Florenverschiebung, mit einem deutlichen Anstieg proinflammatorischer Bakterien, sowohl bei DSS-induzierter Colitis als auch bei *T. gondii* induzierter Ileitis gegenüber gesunden Tieren bestätigt werden. Toll-like Rezeptoren (TLRs) sind die bisher wichtigsten Rezeptoren für die Erkennung von Pathogenen. Durch die Analyse genetisch varianter Mäuse, die sich in der Expression der TLRs unterschieden, konnte für TLR2 und TLR4 gezeigt werden, dass die Rolle der angeborenen Immunität für die Ansiedlung der kommensalen Wirtsflora unerheblich ist. Es wurde gezeigt, dass sich die Flora im Wildtyp nur unwesentlich von der, TLR-defizienter Tiere unterscheidet. Lediglich bei der Gattung Firmicutes, welche prozentual den größten Teil der kultivierbaren Flora ausmacht, kommt es zu einer Verschiebung. Während im Wildtyp mehr Clostridiales als Lactobacillales vorzufinden waren, überwog der Anteil an Lactobacillales im TLR2/4-defizienten Tier. Da diesen Bakterien jedoch kein Einfluss auf die Pathogenese von CED zugesprochen wird, wurde diese Beobachtung nicht weiter verfolgt. Bei der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen leistet TLR4, wie in der vorliegenden Arbeit sehr anschaulich gezeigt werden konnte, dagegen einen erheblichen Beitrag. Die Kombination von molekularbiologischen und konventionellen kulturellen Techniken zeigt auf, dass eine *T. gondii*-induzierte Ileitis mit einer enormen Reduktion der Bakterienvielfalt sowie einem Anstieg kommensaler Gram-negativer Darmbakterien einhergeht, welche als *E. coli* und *Bacteroides/Prevotella* ssp. identifiziert wurden. Bei TLR4-defizienten, sprich LPS-hyporesponsiven Tieren war ein abgemilderter Verlauf der Dünndarmentzündung zu verzeichnen, verglichen mit TLR2-defizienten oder Wildtyp Tieren. Diese Ergebnisse lassen den Rückschluss zu, dass LPS oder Lipoproteine Gram-negativer Bakterien die Ileitis triggern.

Bei einer entsprechenden genetischen Disposition der Patienten könnte sich die Schutzwirkung der anhaftenden apathogenen Keime auf die Mukosa ändern. Der Kontakt mit pathogenen Keimen führt über die Bindung an TLR4 zu einer unkontrollierten Stimulation des intrazellulären Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, was mit einer verstärkten Ausschüttung pro-

inflammatorischer Zytokine (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-1, IL-6 und IL-12) einhergeht. Dies konnte anhand von *in-vitro* Modellen sowohl mit murinen Zellkulturen als auch mit isolierten Immunzellen aus der Maus bestätigt werden. Generell kommt es bei den CED zu einer überschießenden Aktivität von zytotoxischen Lymphozyten in der Darmwand. Es kann also nochmals festgehalten werden, dass TLR4 keinen Einfluss auf die Ausbildung der Normalflora hat, dagegen aber sehr wohl auf das Entzündungsgeschehen bei CED.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen präsentierende Zelle
ATCC	American Type Culture Collection
BMDM $\Phi$	bone marrow derived macrophages
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	cluster of differentiation
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CFSE	Carboxy-Fluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester
ConA	Concanavalin A
CSF	colony-stimulating factor
DC	Dendritische Zelle
DGGE	Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTP	Nukleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dsRNA	double-stranded RNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELAM-1	Endothelzell Leukozyten Adhäsions Molekül
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
F protein	Fusion Protein
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HEK293	Humane Embryonale Nierenzellen 293
HSP60/70	Heat-Shock Protein 60/70
IEL	Intraepitheliale Lymphozyten
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1 Receptor
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
IRAK	IL-1 Receptor-Associated Kinase
I $\kappa$ B	Inhibitor von $\kappa$ B
KO	Knock out
LBP	LPS bindendes Protein
LC	Langerhans Zelle
LPL	Lamina Propria Lymphozyten
LPS	Lipopolysaccharide
LTA	Lipoteichonsäure (lipoteichonic acid)
MACS	Magnetic Cell Separation
MALT	Mucosa-Associated Lymphoid Tissue
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor

---

MD2	Myeloid Differentiation Protein
MHC	Major Histocompatibility Complex
MLR	Gemischte Lymphozyten Reaktion (mixed lymphocyte reaction)
MyD88	Myeloid Differentiation Primary Response Gene (88)
NF- $\kappa$ B	Nukleärer Transkriptionsfaktor (nuclear transcription factor $\kappa$ B)
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	Nucleotid Oligodimerisation Domain
PAMP	Pathogen-associated Molecular Patterns
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
PGN	Peptidoglykan
PI3 kinase	Phosphatidylinositol-3-OH Kinase
PRR	Pattern Recognition Receptor
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium Dodecyl Sulfat
SEB	Staphylococcus Enterotoxin B
TAE/TBE	Tris-Acetat-EDTA/Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N, N-Tetramethylethylendiamin
Th1/2	T-helper type 1/2
TIR	Toll/Interleukin-1 Rezeptor
TLR	Toll-like Receptor
TMB	3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor-alpha
Tollip	Toll-interacting protein
TRAF6	tumor necrosis factor receptor-associated factor 6
T <sub>Reg</sub>	Regulatorische T-Zelle
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid
$\beta$ -Gal	$\beta$ -Galactos

## Literaturverzeichnis

1. Abbas, A.K., *The control of T cell activation vs. tolerance*. Autoimmun Rev, 2003. **2**(3): p. 115-8.
2. Aderem, A. and D.M. Underhill, *Mechanisms of phagocytosis in macrophages*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 593-623.
3. Aderem, A. and R.J. Ulevitch, *Toll-like receptors in the induction of the innate immune response*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 782-7.
4. Ahmad-Nejad, P., et al., *Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments*. Eur J Immunol, 2002. **32**(7): p. 1958-68.
5. Ahmann, G.B., et al., *T cell recognition in the mixed lymphocyte response. I. Non-T, radiation-resistant splenic adherent cells are the predominant stimulators in the murine mixed lymphocyte reaction*. J Immunol, 1979. **123**(2): p. 903-9.
6. Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho, *Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity*. Nat Immunol, 2001. **2**(8): p. 675-80.
7. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
8. Akira, S. and K. Takeda, *Functions of toll-like receptors: lessons from KO mice*. C R Biol, 2004. **327**(6): p. 581-9.
9. Alexopoulou, L., et al., *Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3*. Nature, 2001. **413**(6857): p. 732-8.
10. Aliprantis, A.O., et al., *Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2*. Science, 1999. **285**(5428): p. 736-9.
11. Aliprantis, A.O., et al., *The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2*. Embo J, 2000. **19**(13): p. 3325-36.
12. Anderson, K.V. and C. Nusslein-Volhard, *Information for the dorsal--ventral pattern of the Drosophila embryo is stored as maternal mRNA*. Nature, 1984. **311**(5983): p. 223-7.
13. Andrade, C.F., et al., *Innate immunity and organ transplantation: the potential role of toll-like receptors*. Am J Transplant, 2005. **5**(5): p. 969-75.
14. Arbibe, L., et al., *Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway*. Nat Immunol, 2000. **1**(6): p. 533-40.
15. Armant, M.A. and M.J. Fenton, *Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals*. Genome Biol, 2002. **3**(8): p. REVIEWS3011.
16. Asea, A., et al., *Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4*. J Biol Chem, 2002. **277**(17): p. 15028-34.
17. Autenrieth, I.B., *[Physiology and pathophysiology of intestinal flora]*. Wien Klin Wochenschr, 1998. **110 Suppl 1**: p. 16-20.
18. Baert, F. and P. Rutgeerts, *Budesonide or prednisolone in active Crohn's disease*. Ann Med, 1995. **27**(6): p. 631.
19. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
20. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 767-811.
21. Beagley, K.W. and C.O. Elson, *Cells and cytokines in mucosal immunity and inflammation*. Gastroenterol Clin North Am, 1992. **21**(2): p. 347-66.
22. Berg, D.J., et al., *Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses*. J Clin Invest, 1996. **98**(4): p. 1010-20.

23. Beutler, B., K. Hoebe, and L. Shamel, *Forward genetic dissection of afferent immunity: the role of TIR adapter proteins in innate and adaptive immune responses*. C R Biol, 2004. **327**(6): p. 571-80.
24. Bliss, C.M., Jr., et al., *Helicobacter pylori lipopolysaccharide binds to CD14 and stimulates release of interleukin-8, epithelial neutrophil-activating peptide 78, and monocyte chemotactic protein 1 by human monocytes*. Infect Immun, 1998. **66**(11): p. 5357-63.
25. Bonen, D.K., et al., *Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan*. Gastroenterology, 2003. **124**(1): p. 140-6.
26. Boudeau, J., et al., *Invasive ability of an Escherichia coli strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease*. Infect Immun, 1999. **67**(9): p. 4499-509.
27. Brandtzaeg, P., et al., *T lymphocytes in human gut epithelium preferentially express the alpha/beta antigen receptor and are often CD45/UCHL1-positive*. Scand J Immunol, 1989. **30**(1): p. 123-8.
28. Bulois, P., et al., *Infectious agents and Crohn's disease*. Clin Microbiol Infect, 1999. **5**(10): p. 601-604.
29. Butler, J.E., et al., *Antibody repertoire development in fetal and newborn piglets, III. Colonization of the gastrointestinal tract selectively diversifies the preimmune repertoire in mucosal lymphoid tissues*. Immunology, 2000. **100**(1): p. 119-30.
30. Buwitt-Beckmann, U., et al., *TLR1- and TLR6-independent recognition of bacterial lipopeptides*. J Biol Chem, 2006. **281**(14): p. 9049-57.
31. Chuang, T. and R.J. Ulevitch, *Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1518**(1-2): p. 157-61.
32. Colombel, J.F., et al., *A controlled trial comparing ciprofloxacin with mesalazine for the treatment of active Crohn's disease. Groupe d'Etudes Therapeutiques des Affections Inflammatoires Digestives (GETAID)*. Am J Gastroenterol, 1999. **94**(3): p. 674-8.
33. Courret, N., et al., *CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single Toxoplasma gondii tachyzoites to the brain*. Blood, 2006. **107**(1): p. 309-16.
34. Crohn, B.B., L. Ginzburg, and G.D. Oppenheimer, *Regional ileitis: a pathologic and clinical entity*. 1932. Mt Sinai J Med, 2000. **67**(3): p. 263-8.
35. Darfeuille-Michaud, A., et al., *Presence of adherent Escherichia coli strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease*. Gastroenterology, 1998. **115**(6): p. 1405-13.
36. Darfeuille-Michaud, A., *Adherent-invasive Escherichia coli: a putative new E. coli pathotype associated with Crohn's disease*. Int J Med Microbiol, 2002. **292**(3-4): p. 185-93.
37. Delves, P.J. and I.M. Roitt, *The immune system. First of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(1): p. 37-49.
38. Delves, P.J. and I.M. Roitt, *The immune system. Second of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(2): p. 108-17.
39. Deusch, K., et al., *A major fraction of human intraepithelial lymphocytes simultaneously expresses the gamma/delta T cell receptor, the CD8 accessory molecule and preferentially uses the V delta 1 gene segment*. Eur J Immunol, 1991. **21**(4): p. 1053-9.
40. Duerr, R.H., et al., *Linkage and association between inflammatory bowel disease and a locus on chromosome 12*. Am J Hum Genet, 1998. **63**(1): p. 95-100.
41. Duerr, R.L., et al., *Cardiovascular effects of insulin-like growth factor-1 and growth hormone in chronic left ventricular failure in the rat*. Circulation, 1996. **93**(12): p. 2188-96.

42. Duffield, J.S., *The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde*. Clin Sci (Lond), 2003. **104**(1): p. 27-38.
43. Dziarski, R., et al., *MD-2 enables Toll-like receptor 2 (TLR2)-mediated responses to lipopolysaccharide and enhances TLR2-mediated responses to Gram-positive and Gram-negative bacteria and their cell wall components*. J Immunol, 2001. **166**(3): p. 1938-44.
44. Dzionek, A., et al., *BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction*. J Exp Med, 2001. **194**(12): p. 1823-34.
45. Ekblom, A., et al., *The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden*. Gastroenterology, 1991. **100**(2): p. 350-8.
46. Elson, C.O., et al., *Experimental models of inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 1995. **109**(4): p. 1344-67.
47. Elson, C.O., et al., *Hapten-induced model of murine inflammatory bowel disease: mucosa immune responses and protection by tolerance*. J Immunol, 1996. **157**(5): p. 2174-85.
48. Erridge, C., et al., *Lipopolysaccharides of Bacteroides fragilis, Chlamydia trachomatis and Pseudomonas aeruginosa signal via toll-like receptor 2*. J Med Microbiol, 2004. **53**(Pt 8): p. 735-40.
49. Fiocchi, C., *Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis*. Gastroenterology, 1998. **115**(1): p. 182-205.
50. Fitzgerald, K.A., D.C. Rowe, and D.T. Golenbock, *Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD2-complex*. Microbes Infect, 2004. **6**(15): p. 1361-7.
51. Fujihara, M., et al., *Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex*. Pharmacol Ther, 2003. **100**(2): p. 171-94.
52. Furuta, T., et al., *Roles of the small intestine for induction of toll-like receptor 4-mediated innate resistance in naturally acquired murine toxoplasmosis*. Int Immunol, 2006. **18**(12): p. 1655-62.
53. Gangloff, M. and N.J. Gay, *MD-2: the Toll 'gatekeeper' in endotoxin signalling*. Trends Biochem Sci, 2004. **29**(6): p. 294-300.
54. Garner, R.E., et al., *Secretion of TNF-alpha by alveolar macrophages in response to Candida albicans mannan*. J Leukoc Biol, 1994. **55**(2): p. 161-8.
55. Gay, N.J. and F.J. Keith, *Drosophila Toll and IL-1 receptor*. Nature, 1991. **351**(6325): p. 355-6.
56. Gewirtz, A.T. and J.L. Madara, *Periscope, up! Monitoring microbes in the intestine*. Nat Immunol, 2001. **2**(4): p. 288-90.
57. Gilliet, M., et al., *The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*. J Exp Med, 2002. **195**(7): p. 953-8.
58. Goldenberg, O., et al., *Use of denaturing high-performance liquid chromatography for rapid detection and identification of seven Candida species*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(12): p. 5912-5.
59. Gordon, S., *The role of the macrophage in immune regulation*. Res Immunol, 1998. **149**(7-8): p. 685-8.
60. Gordon, S., *Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response*. Cell, 2002. **111**(7): p. 927-30.
61. Green, L.C., et al., *Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids*. Anal Biochem, 1982. **126**(1): p. 131-8.

62. Greenbloom, S.L., A.H. Steinhart, and G.R. Greenberg, *Combination ciprofloxacin and metronidazole for active Crohn's disease*. Can J Gastroenterol, 1998. **12**(1): p. 53-6.
63. Gutierrez-Ramos, J.C. and H. Bluethmann, *Molecules and mechanisms operating in septic shock: lessons from knockout mice*. Immunol Today, 1997. **18**(7): p. 329-34.
64. Hacker, H., et al., *CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation*. Embo J, 1998. **17**(21): p. 6230-40.
65. Haller, D., et al., *IL-10 producing CD14<sup>low</sup> monocytes inhibit lymphocyte-dependent activation of intestinal epithelial cells by commensal bacteria*. Microbiol Immunol, 2002. **46**(3): p. 195-205.
66. Halstensen, T.S., H. Scott, and P. Brandtzaeg, *Intraepithelial T cells of the TcR gamma/delta<sup>+</sup> CD8- and V delta 1/J delta 1+ phenotypes are increased in coeliac disease*. Scand J Immunol, 1989. **30**(6): p. 665-72.
67. Hashimoto, C., K.L. Hudson, and K.V. Anderson, *The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein*. Cell, 1988. **52**(2): p. 269-79.
68. Hayashi, F., et al., *The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5*. Nature, 2001. **410**(6832): p. 1099-103.
69. Heil, F., et al., *The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily*. Eur J Immunol, 2003. **33**(11): p. 2987-97.
70. Heimesaat, M.M., et al., *Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with Toxoplasma gondii*. J Immunol, 2006. **177**(12): p. 8785-95.
71. Heimesaat, M.M., et al., *Exacerbation of murine ileitis by Toll-like receptor 4 mediated sensing of lipopolysaccharide from commensal Escherichia coli*. Gut, 2007. **56**(7): p. 941-8.
72. Heimesaat, M.M., et al., *Shift towards pro-inflammatory intestinal bacteria aggravates acute murine colitis via Toll-like receptors 2 and 4*. PLoS One, 2007. **2**(7): p. e662.
73. Helgeland, L., et al., *Microbial colonization influences composition and T-cell receptor V beta repertoire of intraepithelial lymphocytes in rat intestine*. Immunology, 1996. **89**(4): p. 494-501.
74. Hemmi, H., et al., *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA*. Nature, 2000. **408**(6813): p. 740-5.
75. Hemmi, H., et al., *Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway*. Nat Immunol, 2002. **3**(2): p. 196-200.
76. Hemmi, H., et al., *The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets*. J Immunol, 2003. **170**(6): p. 3059-64.
77. Hemmi, H., et al., *The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection*. J Exp Med, 2004. **199**(12): p. 1641-50.
78. Hilkens, C.M., et al., *Human dendritic cells require exogenous interleukin-12-inducing factors to direct the development of naive T-helper cells toward the Th1 phenotype*. Blood, 1997. **90**(5): p. 1920-6.
79. Hoffmann, J.A., et al., *Phylogenetic perspectives in innate immunity*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1313-8.
80. Imaoka, A., et al., *Proliferative recruitment of intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization of germ-free mice*. Eur J Immunol, 1996. **26**(4): p. 945-8.

81. Ishihara, S., et al., *Essential role of MD-2 in TLR4-dependent signaling during Helicobacter pylori-associated gastritis*. J Immunol, 2004. **173**(2): p. 1406-16.
82. Ito, T., R. Amakawa, and S. Fukuhara, *Roles of toll-like receptors in natural interferon-producing cells as sensors in immune surveillance*. Hum Immunol, 2002. **63**(12): p. 1120-5.
83. Ito, T., et al., *Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets*. J Exp Med, 2002. **195**(11): p. 1507-12.
84. Janeway, C.A., et al., *Immunologie*. 5 ed. 2002: Spektrum Akademischer Verlag. 808.
85. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
86. Jankovic, D., et al., *Single cell analysis reveals that IL-4 receptor/Stat6 signaling is not required for the in vivo or in vitro development of CD4+ lymphocytes with a Th2 cytokine profile*. J Immunol, 2000. **164**(6): p. 3047-55.
87. Jankovic, D., et al., *Parasite-induced Th2 polarization is associated with down-regulated dendritic cell responsiveness to Th1 stimuli and a transient delay in T lymphocyte cycling*. J Immunol, 2004. **173**(4): p. 2419-27.
88. Jarry, A., et al., *Subsets of CD3+ (T cell receptor alpha/beta or gamma/delta) and CD3- lymphocytes isolated from normal human gut epithelium display phenotypical features different from their counterparts in peripheral blood*. Eur J Immunol, 1990. **20**(5): p. 1097-103.
89. Jijon, H., et al., *DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function*. Gastroenterology, 2004. **126**(5): p. 1358-73.
90. Kadowaki, N., et al., *Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens*. J Exp Med, 2001. **194**(6): p. 863-9.
91. Kagnoff, M.F. and L. Eckmann, *Epithelial cells as sensors for microbial infection*. J Clin Invest, 1997. **100**(1): p. 6-10.
92. Kalinski, P., et al., *Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN-gamma and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells*. J Immunol, 1999. **162**(6): p. 3231-6.
93. Kasper, H., *Ernährungsmedizin und Diätetik*. 1996.
94. Kaufmann, S.H., *gamma/delta and other unconventional T lymphocytes: what do they see and what do they do?* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(6): p. 2272-9.
95. Kawaguchi, M., et al., *Cytolytic activity of intestinal intraepithelial lymphocytes in germ-free mice is strain dependent and determined by T cells expressing gamma delta T-cell antigen receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(18): p. 8591-4.
96. Kennedy, M.N., et al., *A complex of soluble MD-2 and lipopolysaccharide serves as an activating ligand for Toll-like receptor 4*. J Biol Chem, 2004. **279**(33): p. 34698-704.
97. Kirschning, C.J., et al., *Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide*. J Exp Med, 1998. **188**(11): p. 2091-7.
98. Klein, J.R., *Whence the intestinal intraepithelial lymphocyte?* J Exp Med, 1996. **184**(4): p. 1203-6.
99. Kollwe, C., et al., *Sequential autophosphorylation steps in the interleukin-1 receptor-associated kinase-1 regulate its availability as an adapter in interleukin-1 signaling*. J Biol Chem, 2004. **279**(7): p. 5227-36.
100. Komastu, T., D.D. Ireland, and C.S. Reiss, *IL-12 and viral infections*. Cytokine Growth Factor Rev, 1998. **9**(3-4): p. 277-85.

101. Kopf, M., et al., *Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses*. Nature, 1993. **362**(6417): p. 245-8.
102. Kopp, E., et al., *ECSIT is an evolutionarily conserved intermediate in the Toll/IL-1 signal transduction pathway*. Genes Dev, 1999. **13**(16): p. 2059-71.
103. Kopp, E.B. and R. Medzhitov, *The Toll-receptor family and control of innate immunity*. Curr Opin Immunol, 1999. **11**(1): p. 13-8.
104. Krug, A., et al., *Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells*. Eur J Immunol, 2001. **31**(7): p. 2154-63.
105. Krug, A., et al., *Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12*. Eur J Immunol, 2001. **31**(10): p. 3026-37.
106. Kuhn, R., et al., *Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis*. Cell, 1993. **75**(2): p. 263-74.
107. Lambrecht, B.N., H.C. Hoogsteden, and R.A. Pauwels, *Dendritic cells as regulators of the immune response to inhaled allergen: recent findings in animal models of asthma*. Int Arch Allergy Immunol, 2001. **124**(4): p. 432-46.
108. Lamm, M.E., *Current concepts in mucosal immunity. IV. How epithelial transport of IgA antibodies relates to host defense*. Am J Physiol, 1998. **274**(4 Pt 1): p. G614-7.
109. Langenkamp, A., et al., *Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells*. Nat Immunol, 2000. **1**(4): p. 311-6.
110. Lauw, F.N., D.R. Caffrey, and D.T. Golenbock, *Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin*. Trends Immunol, 2005. **26**(10): p. 509-11.
111. Leifer, C.A., et al., *TLR9 is localized in the endoplasmic reticulum prior to stimulation*. J Immunol, 2004. **173**(2): p. 1179-83.
112. Lembo, A., 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**(10): p. 6058-62.
113. Li, X., et al., *IL-1-induced NFkappa B and c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation diverge at IL-1 receptor-associated kinase (IRAK)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(8): p. 4461-5.
114. Lin, C.L., et al., *Dendritic cell chemotaxis and transendothelial migration are induced by distinct chemokines and are regulated on maturation*. Eur J Immunol, 1998. **28**(12): p. 4114-22.
115. Lin, Y.P., et al., *Probiotic Lactobacillus reuteri suppress proinflammatory cytokines via c-Jun*. Inflamm Bowel Dis, 2008. **14**(8): p. 1068-83.
116. Liu, Y.J., et al., *Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation*. Nat Immunol, 2001. **2**(7): p. 585-9.
117. Lopez-Collazo, E., et al., *Triggering of peritoneal macrophages with IFN-alpha/beta attenuates the expression of inducible nitric oxide synthase through a decrease in NF-kappaB activation*. J Immunol, 1998. **160**(6): p. 2889-95.
118. Ma, X., *TNF-alpha and IL-12: a balancing act in macrophage functioning*. Microbes Infect, 2001. **3**(2): p. 121-9.
119. Macatonia, S.E., et al., *Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells*. J Immunol, 1995. **154**(10): p. 5071-9.
120. Madsen, K.L., et al., *Lactobacillus species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice*. Gastroenterology, 1999. **116**(5): p. 1107-14.
121. Mahida, Y.R. and V.E. Rolfe, *Host-bacterial interactions in inflammatory bowel disease*. Clin Sci (Lond), 2004. **107**(4): p. 331-41.
122. Mahler, M., et al., *Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis*. Am J Physiol, 1998. **274**(3 Pt 1): p. G544-51.

123. Mahler, M., et al., *Genetic analysis of susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis in mice*. Genomics, 1999. **55**(2): p. 147-56.
124. Manz, M.G., et al., *Dendritic cell development from common myeloid progenitors*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **938**: p. 167-73; discussion 173-4.
125. Manz, M.G., et al., *Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors*. Blood, 2001. **97**(11): p. 3333-41.
126. Matsumoto, M., et al., *Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells*. J Immunol, 2003. **171**(6): p. 3154-62.
127. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition*. Cell, 1997. **91**(3): p. 295-8.
128. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system*. Science, 2002. **296**(5566): p. 298-300.
129. Michelsen, K.S., et al., *The role of toll-like receptors (TLRs) in bacteria-induced maturation of murine dendritic cells (DCs). Peptidoglycan and lipoteichoic acid are inducers of DC maturation and require TLR2*. J Biol Chem, 2001. **276**(28): p. 25680-6.
130. Miettinen, M., et al., *IFNs activate toll-like receptor gene expression in viral infections*. Genes Immun, 2001. **2**(6): p. 349-55.
131. Mombaerts, P., et al., *Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice*. Cell, 1993. **75**(2): p. 274-82.
132. Mosser, D.M., *The many faces of macrophage activation*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(2): p. 209-12.
133. Mowat, A.M. and J.L. Viney, *The anatomical basis of intestinal immunity*. Immunol Rev, 1997. **156**: p. 145-66.
134. Mowat, A.M., O.R. Millington, and F.G. Chirido, *Anatomical and cellular basis of immunity and tolerance in the intestine*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2004. **39 Suppl 3**: p. S723-4.
135. Muzio, M., et al., *Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells*. J Immunol, 2000. **164**(11): p. 5998-6004.
136. O'Garra, A., et al., *The role of macrophage- and dendritic cell-derived IL12 in Th1 phenotype development*. Res Immunol, 1995. **146**(7-8): p. 466-72.
137. O'Neill, L.A., *Immunology. After the toll rush*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1481-2.
138. Ochsenkuhn, T., M. Sackmann, and B. Goke, *[Inflammatory bowel diseases (IBD) -- critical discussion of etiology, pathogenesis, diagnostics, and therapy]*. Radiologe, 2003. **43**(1): p. 1-8.
139. Ogura, Y., et al., *A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease*. Nature, 2001. **411**(6837): p. 603-6.
140. Okamura, Y., et al., *The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4*. J Biol Chem, 2001. **276**(13): p. 10229-33.
141. Olaison, G., K. Smedh, and R. Sjodahl, *Natural course of Crohn's disease after ileocolic resection: endoscopically visualised ileal ulcers preceding symptoms*. Gut, 1992. **33**(3): p. 331-5.
142. Onderdonk, A.B., et al., *Correlation of cecal microflora of HLA-B27 transgenic rats with inflammatory bowel disease*. Infect Immun, 1998. **66**(12): p. 6022-3.
143. Ooi, C.J. and B.E. Sands, *Treatment of ulcerative colitis*. Curr Opin Gastroenterol, 1999. **15**(4): p. 298.
144. Ozinsky, A., et al., *Co-operative induction of pro-inflammatory signaling by Toll-like receptors*. J Endotoxin Res, 2000. **6**(5): p. 393-6.

145. Ozinsky, A., et al., *The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(25): p. 13766-71.
146. Pena, J.A. and J. Versalovic, *Lactobacillus rhamnosus GG decreases TNF-alpha production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages by a contact-independent mechanism*. Cell Microbiol, 2003. **5**(4): p. 277-85.
147. Podolsky, D.K., *Inflammatory bowel disease (2)*. N Engl J Med, 1991. **325**(14): p. 1008-16.
148. Podolsky, D.K., *Inflammatory bowel disease (1)*. N Engl J Med, 1991. **325**(13): p. 928-37.
149. Poltorak, A., et al., *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene*. Science, 1998. **282**(5396): p. 2085-8.
150. Poltorak, A., 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**(4): p. 2106-11.
151. Prantera, C., et al., *Metronidazole plus ciprofloxacin in the treatment of active, refractory Crohn's disease: results of an open study*. J Clin Gastroenterol, 1994. **19**(1): p. 79-80.
152. Present, D.H., et al., *Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(18): p. 1398-405.
153. Pulendran, B., et al., *Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo*. J Immunol, 2000. **165**(1): p. 566-72.
154. Pulendran, B., K. Palucka, and J. Banchereau, *Sensing pathogens and tuning immune responses*. Science, 2001. **293**(5528): p. 253-6.
155. Qureshi, S.T., et al., *Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4)*. J Exp Med, 1999. **189**(4): p. 615-25.
156. Randolph, G.J., et al., *Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo*. Immunity, 1999. **11**(6): p. 753-61.
157. Rath, H.C., 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**(4): p. 945-53.
158. Rath, H.C., et al., *Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice*. Infect Immun, 2001. **69**(4): p. 2277-85.
159. Renz-Polster, H., Krautzig, S., Braun, J., *Basislehrbuch Innere Medizin*. Vol. 3. 2004: Urban & Fischer. 1.290.
160. Rescigno, M., et al., *Toll-like receptor 4 is not required for the full maturation of dendritic cells or for the degradation of Gram-negative bacteria*. Eur J Immunol, 2002. **32**(10): p. 2800-6.
161. Rogler, G. and R. Duchmann, *Pathogenesis of inflammatory bowel disease – what is important for modern diagnostic and therapy?* Die Medizinische Welt, 2005. **Heft 7/8**.
162. Romani, N., et al., *Proliferating dendritic cell progenitors in human blood*. J Exp Med, 1994. **180**(1): p. 83-93.
163. Rotimi, V.O. and B.I. Duerden, *The development of the bacterial flora in normal neonates*. J Med Microbiol, 1981a. **14**(1): p. 51-62.
164. Rotimi, V.O. and B.I. Duerden, *Bacteroides species in the normal neonatal faecal flora*. J Hyg (Lond), 1981b. **87**(2): p. 299-304.
165. Rutgeerts, P., et al., *Predictability of the postoperative course of Crohn's disease*. Gastroenterology, 1990. **99**(4): p. 956-63.
166. Rutgeerts, P., et al., *Controlled trial of metronidazole treatment for prevention of Crohn's recurrence after ileal resection*. Gastroenterology, 1995. **108**(6): p. 1617-21.

167. Sadlack, B., et al., *Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene*. Cell, 1993. **75**(2): p. 253-61.
168. Saitoh, S., et al., *Bacteroides ovatus as the predominant commensal intestinal microbe causing a systemic antibody response in inflammatory bowel disease*. Clin Diagn Lab Immunol, 2002. **9**(1): p. 54-9.
169. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha*. J Exp Med, 1994. **179**(4): p. 1109-18.
170. Sands, B.E., *Novel therapies for inflammatory bowel disease*. Gastroenterol Clin North Am, 1999. **28**(2): p. 323-51.
171. Sartor, R.B., et al., *Animal models of intestinal and joint inflammation*. Baillieres Clin Rheumatol, 1996. **10**(1): p. 55-76.
172. Sartor, R.B., H.C. Rath und R.K. Sellon, *Microbial factors in chronic intestinal inflammation*. Curr. Opp. Gastroenterol., 1996. **12**: p. 327-333.
173. Seibold, F., et al., *Neutrophil antibodies (pANCA) in chronic liver disease and inflammatory bowel disease: do they react with different antigens?* Eur J Gastroenterol Hepatol, 1996. **8**(11): p. 1095-100.
174. Shanahan, F., et al., *Cytotoxic lymphocytes in human intestinal mucosa*. Adv Exp Med Biol, 1987. **216A**: p. 457-63.
175. Shanahan, F. and G.C. O'Sullivan, *How do intestinal T cells sense the dietary and microbial environment?* Gastroenterology, 2000. **118**(2): p. 444-6.
176. Shi, D., J. Das, and G. Das, *Inflammatory bowel disease requires the interplay between innate and adaptive immune signals*. Cell Res, 2006. **16**(1): p. 70-4.
177. Shibata, Y., et al., *Alveolar macrophage priming by intravenous administration of chitin particles, polymers of N-acetyl-D-glucosamine, in mice*. Infect Immun, 1997. **65**(5): p. 1734-41.
178. Shimazu, R., et al., *MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4*. J Exp Med, 1999. **189**(11): p. 1777-82.
179. Shortman, K. and Y.J. Liu, *Mouse and human dendritic cell subtypes*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(3): p. 151-61.
180. Shroff, K.E., K. Meslin, and J.J. Cebra, *Commensal enteric bacteria engender a self-limiting humoral mucosal immune response while permanently colonizing the gut*. Infect Immun, 1995a. **63**(10): p. 3904-13.
181. Shroff, K.E. and J.J. Cebra, *Development of mucosal humoral immune responses in germ-free (GF) mice*. Adv Exp Med Biol, 1995b. **371A**: p. 441-6.
182. Simon, G.L. and S.L. Gorbach, *Intestinal flora in health and disease*. Gastroenterology, 1984. **86**(1): p. 174-93.
183. Spencer, J., et al., *Expression of disulfide-linked and non-disulfide-linked forms of the T cell receptor gamma/delta heterodimer in human intestinal intraepithelial lymphocytes*. Eur J Immunol, 1989. **19**(7): p. 1335-8.
184. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution*. J Exp Med, 1973. **137**(5): p. 1142-62.
185. Steinman, R.M. and M.D. Witmer, *Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(10): p. 5132-6.
186. Steinman, R.M. and K. Inaba, *Myeloid dendritic cells*. J Leukoc Biol, 1999. **66**(2): p. 205-8.
187. Steinman, R.M., et al., *The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells*. J Exp Med, 2000. **191**(3): p. 411-6.

188. Stoy, N., *Macrophage biology and pathobiology in the evolution of immune responses: a functional analysis*. Pathobiology, 2001. **69**(4): p. 179-211.
189. Stuehr, D.J. and M.A. Marletta, *Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(22): p. 7738-42.
190. Sutton, C.L., et al., *Identification of a novel bacterial sequence associated with Crohn's disease*. Gastroenterology, 2000. **119**(1): p. 23-31.
191. Swidsinski, A., et al., *Mucosal flora in inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 2002. **122**(1): p. 44-54.
192. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira, *Toll-like receptors*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 335-76.
193. Takeuchi, O., et al., *Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components*. Immunity, 1999. **11**(4): p. 443-51.
194. Takeuchi, O. and S. Akira, *Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system*. Int Immunopharmacol, 2001. **1**(4): p. 625-35.
195. Talham, G.L., et al., *Segmented filamentous bacteria are potent stimuli of a physiologically normal state of the murine gut mucosal immune system*. Infect Immun, 1999. **67**(4): p. 1992-2000.
196. Taurog, J.D., et al., *The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats*. J Exp Med, 1994. **180**(6): p. 2359-64.
197. Taylor, P.R., et al., *Macrophage receptors and immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 901-44.
198. Toshchakov, V., et al., *TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages*. Nat Immunol, 2002. **3**(4): p. 392-8.
199. Trinchieri, G., *Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes*. Blood, 1994. **84**(12): p. 4008-27.
200. Turunen, U.M., et al., *Long-term treatment of ulcerative colitis with ciprofloxacin: a prospective, double-blind, placebo-controlled study*. Gastroenterology, 1998. **115**(5): p. 1072-8.
201. Ulevitch, R.J. and P.S. Tobias, *Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system*. Curr Opin Immunol, 1999. **11**(1): p. 19-22.
202. Ullrich, R., et al., *gamma delta T cells in the human intestine express surface markers of activation and are preferentially located in the epithelium*. Cell Immunol, 1990. **128**(2): p. 619-27.
203. Umesaki, Y., et al., *Differential roles of segmented filamentous bacteria and clostridia in development of the intestinal immune system*. Infect Immun, 1999. **67**(7): p. 3504-11.
204. Underhill, D.M., et al., *Dynamic interactions of macrophages with T cells during antigen presentation*. J Exp Med, 1999. **190**(12): p. 1909-14.
205. Underhill, D.M., et al., *The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens*. Nature, 1999. **401**(6755): p. 811-5.
206. Underhill, D.M., et al., *Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(25): p. 14459-63.
207. Underhill, D.M. and A. Ozinsky, *Toll-like receptors: key mediators of microbe detection*. Curr Opin Immunol, 2002. **14**(1): p. 103-10.

208. Underhill, D.M. and A. Ozinsky, *Phagocytosis of microbes: complexity in action*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 825-52.
209. Vabulas, R.M., et al., *Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(33): p. 31332-9.
210. Viney, J., T.T. MacDonald, and J. Spencer, *Gamma/delta T cells in the gut epithelium*. Gut, 1990. **31**(8): p. 841-4.
211. von Wintzingerode, F., et al., *Phylogenetic analysis of an anaerobic, trichlorobenzene-transforming microbial consortium*. Appl Environ Microbiol, 1999. **65**(1): p. 283-6.
212. Walter, J., et al., *Detection and identification of gastrointestinal Lactobacillus species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers*. Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(1): p. 297-303.
213. Wei, B., et al., *Pseudomonas fluorescens encodes the Crohn's disease-associated I2 sequence and T-cell superantigen*. Infect Immun, 2002. **70**(12): p. 6567-75.
214. Werts, C., et al., *Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism*. Nat Immunol, 2001. **2**(4): p. 346-52.
215. Wesche, H., et al., *MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex*. Immunity, 1997. **7**(6): p. 837-47.
216. Winkler, P., et al., *Molecular and cellular basis of microflora-host interactions*. J Nutr, 2007. **137**(3 Suppl 2): p. 756S-72S.
217. Wittig, B.M. and M. Zeitz, *The gut as an organ of immunology*. Int J Colorectal Dis, 2003. **18**(3): p. 181-7.
218. Wright, S.D., et al., *Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages*. J Exp Med, 1989. **170**(4): p. 1231-41.
219. Yamamoto, M., et al., *Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway*. Science, 2003. **301**(5633): p. 640-3.
220. Yamamoto, M., et al., *TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway*. Nat Immunol, 2003. **4**(11): p. 1144-50.
221. Yamamoto, Y., T.W. Klein, and H. Friedman, *Involvement of mannose receptor in cytokine interleukin-1beta (IL-1beta), IL-6, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor responses, but not in chemokine macrophage inflammatory protein 1beta (MIP-1beta), MIP-2, and KC responses, caused by attachment of Candida albicans to macrophages*. Infect Immun, 1997. **65**(3): p. 1077-82.
222. Yao, S.Y., et al., *Regulation by IFN-beta of inducible nitric oxide synthase and interleukin-12/p40 in murine macrophages cultured in the presence of Chlamydia pneumoniae antigens*. J Interferon Cytokine Res, 2001. **21**(3): p. 137-46.
223. Yarovinsky, F. and A. Sher, *Toll-like receptor recognition of Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol, 2006. **36**(3): p. 255-9.
224. Yoshimura, A., et al., *Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2*. J Immunol, 1999. **163**(1): p. 1-5.
225. Zarembek, K.A. and P.J. Godowski, *Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines*. J Immunol, 2002. **168**(2): p. 554-61.
226. Zhang, D., et al., *A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1522-6.

## Publikationsliste

1. Heimesaat MM, Bereswill S, Fischer A, Fuchs D, Struck D, Niebergall J, **Jahn HK**, Dunay IR, Moter A, Gescher DM, Schumann RR, Göbel UB, Liesenfeld O. Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*, 2006. **177**(12): p. 8785-95. (IF = 6,293)
2. Heimesaat MM, Fischer A, **Jahn HK**, Niebergall J, Freudenberg M, Blaut M, Liesenfeld O, Schumann RR, Göbel UB, Bereswill S. Exacerbation of murine ileitis by Toll-like receptor 4 mediated sensing of lipopolysaccharide from commensal *Escherichia coli*. *Gut*, 2007. **56**(7): p. 941-8. (IF = 9,02)
3. Heimesaat MM, Fischer A, Siegmund B, Kupz A, Niebergall J, Fuchs D, **Jahn HK**, Freudenberg M, Loddenkemper C, Batra A, Lehr HA, Liesenfeld O, Blaut M, Göbel UB, Schumann RR, Bereswill S. Shift towards pro-inflammatory intestinal bacteria aggravates acute murine colitis via Toll-like receptors 2 and 4. *PLoS One*, 2007. **2**(7): p. e662.

### Tagungsbeiträge (Poster/Abstracts)

1. Markus M. Heimesaat, André Fischer, **Hannah-Katharina Jahn**, Julia Niebergall, Oliver Liesenfeld, Ralf R. Schumann, Stefan Bereswill, Ulf B. Göbel. Gram-negative Commensal Gut Bacteria Aggravate Small Intestinal Inflammation via Toll-like Receptor 4.  
Charité, University Medicine Berlin, Institute of Microbiology and Hygiene, Charité Campus Mitte, Dorotheenstr. 96, D-10117 Berlin, and Campus Benjamin Franklin, Hindenburgdamm 27, D-12203 Berlin, Germany
  - 57. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie DGHM: Göttingen, Deutschland 2005, Abstract und Poster
  - 16<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ECCMID: Nizza, Frankreich 2006, Abstract
2. Markus M. Heimesaat<sup>\*</sup>, André Fischer<sup>†</sup>, David Fuchs<sup>\*</sup>, Oliver Goldenberg<sup>†</sup>, **Hannah Katharina Jahn**<sup>†</sup>, Ildiko R. Dunay<sup>\*</sup>, Ralf R. Schumann<sup>†</sup>, Annette Moter<sup>†</sup>, Dorothee M. Gescher<sup>†</sup>, Helmut Hahn<sup>\*</sup>, Ulf B. Göbel<sup>†</sup>, Stefan Bereswill<sup>†</sup>, Oliver Liesenfeld<sup>\*</sup>. A shift to gram-negative bacteria in the intestinal microflora contributes to immunopathology of acute ileitis in the *Toxoplasma gondii*-driven mouse model of small intestinal inflammation.  
<sup>\*</sup> Department of Medical Microbiology and Immunology of Infection, Charité - University Medicine Berlin, Charité Campus Benjamin Franklin, Berlin, Germany  
<sup>†</sup> Department of Microbiology and Hygiene, Charité - University Medicine Berlin, Charité Campus Mitte, Berlin, Germany
  - 15<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ECCMID: Kopenhagen, Dänemark 2005, Abstract und Poster
3. André Fischer<sup>1</sup>, **Hannah-Katharina Jahn**<sup>1</sup>, Markus M. Heimesaat<sup>2</sup>, Marina Freudenberg<sup>3</sup>, Oliver Goldenberg<sup>1</sup>, Stefanie Herrmann<sup>1</sup>, Oliver Liesenfeld<sup>2</sup>, Ulf B. Göbel<sup>1</sup>, Ralf R. Schumann<sup>1</sup>, Stefan Bereswill<sup>1</sup>. The Role of Innate Immunity in Gut Flora Development.  
<sup>1</sup> Institute for Microbiology and Hygiene, Charité University Medicine Berlin – Campus Mitte, Berlin, Germany  
<sup>2</sup> Department of Medical Microbiology and Immunology of Infection, Charité University Medicine Berlin - Campus Benjamin Franklin Berlin, Berlin, Germany  
<sup>3</sup> Max-Planck-Institute für Immunbiologie, Freiburg, Germany

4. Oliver Goldenberg, Stefanie Herrmann, Gina Marjoram, André Fischer, **Hannah-Katharina Jahn**, Stefan Bereswill, George Hong <sup>1</sup>, Thomas Adam, Barbara Graf, Ulf B. Goebel. PCR-based denaturing HPLC (DHPLC) for monitoring of bacterial and fungal communities in the human gastrointestinal flora.  
Charité University Medicine Berlin – Campus Mitte – Institute for Microbiology and Hygiene, Berlin, Germany  
<sup>1</sup> Transgenomics Ltd., Omaha, Nebraska
- 9. Minisymposium „Infektion und Immunabwehr“ Burg Rothenfels, Deutschland 2005, Abstracts

## **Lebenslauf**

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

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Ulf. B. Göbel für die Überlassung des Themas und für die Schaffung produktiver Arbeitsbedingungen am Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité.

Meinem Betreuer Prof. Dr. Stefan Bereswill danke ich für die Betreuung der Arbeit, für die engagierte Anleitung sowie für seine hilfreiche Kritik bei der Erstellung der Dissertationsschrift.

Für die freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre gilt mein Dank meinen Kollegen des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene. Insbesondere möchte ich André Fischer und Jana Eckert danken, die mir nicht nur fachlich tatkräftig zur Seite standen, sondern während des gesamten Zeitraums für eine sehr angenehme Atmosphäre am Arbeitsplatz gesorgt haben. Ein ganz besonderer Dank geht wegen ihrer enormen Hilfsbereitschaft an Gernot Reifenberger, Fränzi Creutzburg, Diana Wöllner, Solvy Wolke und Ursula Rüschenhof.

Dank auch an alle Tierpflegerkräfte im FEM für die gute Zusammenarbeit.

Meiner Mitstreiterin Stefanie Herrmann danke ich für die schöne Zeit.

Meinen Eltern und Freunden danke ich für Ihre Hilfe und Unterstützung in allen Lebenslagen.

Dir Tilman danke ich dafür, dass Du meinem endlosen Gezicke und Gemecker mit Verständnis begegnest und mir den Rücken stärkst und für Deine Mühe bei der Korrektur meiner Arbeit und für Deine konstruktive Kritik. Nicht zuletzt dafür widme ich Dir und Clara diese Arbeit.

## Erklärung

„Ich, Hannah-Katharina Jahn, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Einfluss von Toll-like Rezeptoren auf die Besiedlung des Darms und die Pathogenese entzündlicher Darmerkrankungen im Mausmodell selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift